



研究报告

两株分离自鸡粪便费格森埃希菌的耐药性

唐标¹ 张玲^{1,2} 常江^{1,2} 裘罕琦³ 戴贤君³ 夏效东² 杨华^{*1}

1 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所 浙江 杭州 310021

2 西北农林科技大学食品科学与工程学院 陕西 杨凌 712100

3 中国计量大学现代科技学院 浙江 杭州 310018

摘要:【背景】费格森埃希菌(*Escherichia fergusonii*)是与大肠杆菌同属、近源的病原菌,目前耐药性鲜有报道。【目的】对在浙江省鸡粪便中分离到的2株费格森埃希菌 EFCF053 和 EFCF056 进行耐药性检测和分析。【方法】通过微量肉汤稀释法进行 MIC 测定,二代高通量测序获得全基因组序列,并通过 ResFinder 数据库预测获得性耐药基因。利用 S1-PFGE 和 Southern blotting 杂交进行质粒和耐药基因的确认。【结果】两种菌均对氨苄西林、庆大霉素、氟苯尼考、磺胺异噁唑、复方新诺明、四环素耐药,其中菌株 EFCF056 还对粘菌素、头孢噻唑、大观霉素、恩诺沙星、氧氟沙星耐药。预测到耐药基因 β -内酰胺类 *bla*_{TEM-1A}、*bla*_{CTX-M-65}、*bla*_{OXA-1}、*bla*_{TEM-1B}、*bla*_{CTX-M-55}; 氨基糖苷类 *aac*(3)-*IId*、*aph*(3')-*Ia*、*aph*(3')-*Ib*、*aph*(6)-*Id*、*rmtB*、*aac*(6')-*Ib-cr*、*aadA2*; 粘菌素 *mcr-1*; 喹诺酮类 *qnrS2*、*aac*(6')-*Ib-cr*、*oqxA*、*oqxB*; 磷霉素 *fosA3*; 大环内酯类 *mph(A)*; 苯乙醇类 *catA1*、*floR*、*catB3*; 利福霉素 *ARR-3*; 磺胺类 *sul1*、*sul2*、*sul3*、*dfrA12*、*dfrA14*; 四环素类 *tet(A)*。另外,含有 *mcr-1* 基因的质粒通过实验证实可发生接合转移。【结论】结果显示费格森埃希菌可能是重要耐药基因存储库,费格森埃希菌与大肠埃希菌要在抗药性流行病学中加以区分,深入研究其 MIC 频率分布、重要耐药基因 *mcr-1* 及 ESBL 等,保障临床检测的准确性。

关键词: 鸡粪便, 费格森埃希菌, 耐药基因, *mcr-1*

Foundation items: Public Welfare Technology Applied Research Projects of Zhejiang Province (2017C32021); National Natural Science Foundation for the Youth of China (31700007); Youth Talent Training and International Cooperation Program of Zhejiang Academy of Agricultural Sciences (2017R19R08E01); State Key Laboratory for Quality and Safety of Agro-products (2010DS700124-ZZ1703, ZZ1905)

***Corresponding author:** Tel: 86-571-86404005; E-mail: yanghua@zaas.ac.cn

Received: 18-12-2018; **Accepted:** 25-03-2019; **Published online:** 24-04-2019

基金项目: 浙江省基础公益研究项目(2017C32021); 国家自然科学基金青年项目(31700007); 浙江省农业科学院青年人才及国际合作培养项目(2017R19R08E01); 省部共建农产品质量安全国家重点实验室(筹)(2010DS700124-ZZ1703, ZZ1905)

***通信作者:** Tel: 0571-86404005; E-mail: yanghua@zaas.ac.cn

收稿日期: 2018-12-18; **接受日期:** 2019-03-25; **网络首发日期:** 2019-04-24

Antimicrobial resistance of two *Escherichia fergusonii* strains isolated from chicken feces

TANG Biao¹ ZHANG Ling^{1,2} CHANG Jiang^{1,2} QIU Han-Qi³ DAI Xian-Jun³
XIA Xiao-Dong² YANG Hua^{*1}

1 Institute of Quality and Standard for Agro-products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China

2 College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China

3 College of Modern Science and Technology, China Jiliang University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China

Abstract: [Background] *Escherichia fergusonii* is a pathogen highly homologous to *Escherichia coli*, but its antimicrobial resistance has rarely been reported. **[Objective]** In this study, two *E. fergusonii* strains, EFCF053 and EFCF056, which were isolated from chicken feces in Zhejiang province, were tested and analyzed for antimicrobial resistance. **[Methods]** MICs were determined by microbroth dilution method. The whole genome sequences were obtained by using the next-generation sequencing, and acquired antimicrobial resistance genes were predicted via ResFinder database. Plasmids and resistance genes were identified by S1-PFGE and Southern blotting hybridization. **[Results]** It was found that both strains were resistant to ampicillin, gentamicin, florfenicol, sulfamidoazole, trimethoprim/sulfamethoxazole and tetracycline. The strain EFCF056 was also resistant to colistin, ceftiofur, spectinomycin, enrofloxacin and ofloxacin. It was predicted that resistance genes existing in the strains were beta-lactam *bla*_{TEM-1A}, *bla*_{CTX-M-65}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{CTX-M-55}; aminoglycoside *aac(3)-IId*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *rmtB*, *aac(6')-Ib-cr*, *aadA2*; colistin *mcr-1*; quinolone *qnrS2*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*; fosfomycin *fosA*; macrolide *mph(A)*; phenicol *floR*, *catA1*, *catB3*; rifamycin *ARR-3*; sulfonamides *sul1*, *sul2*, *sul3*, *dfrA12*, *dfrA14*; tetracycline *tet(A)*. In addition, the data indicated that the plasmid harboring *mcr-1* gene had the ability of conjugative transfer. **[Conclusion]** The results showed that *E. fergusonii* might be a reservoir of antimicrobial resistant genes. It is necessary to distinguish it from *E. coli* in the epidemiology of antimicrobial resistance. Further studies are needed to investigate the MIC frequency distribution, important drug resistance genes *mcr-1* and ESBL for ensuring the accuracy of clinical detection.

Keywords: Chicken feces, *Escherichia fergusonii*, Antimicrobial resistance gene, *mcr-1*

埃希氏菌属成员目前包括 *Escherichia albertii*^[1]、*Escherichia blattae*^[2]、*Escherichia fergusonii*^[3]、*Escherichia hermanni*^[4]、*Escherichia vulneris*^[5]、*Escherichia marmotae*^[6]、*Escherichia adecarboxylata*^[7]、*Escherichia coli*^[8] 8 个种。其中 *Escherichia fergusonii* 和 *Escherichia coli* 在表型和基因组上非常相似, 分离过程中容易混淆^[9-10]。目前从大肠杆菌类似菌中简单有效鉴定出费格森埃希菌(*E. fergusonii*)的方式有多重 PCR^[11]、荧光定量 PCR^[12]等方法, 该菌对人和动物均具有致病性, 最开始 1985 年从人的血液、尿液、粪便中分离到^[3], 后来又广泛地在动物上分离获得, 比如山羊^[13]、牛^[14-15]、绵羊^[14]、马^[16]、火鸡^[17]、鸡^[18]和猪^[19]等动物。国

内也已经陆续报道从临床病人^[20]、雏鸡^[21]、羚羊^[22]等宿主分离到费格森埃希菌。目前该菌的耐药性研究相对大肠埃希菌较少, 但根据文献报道, 费格森埃希菌和其他肠杆菌科内种属一样是存在多重耐药性的种^[9,19]。费格森埃希菌在动物和临床上均分离到多重耐药菌^[9,19,23-24], 包括超广谱 β-内酰胺酶 (Extended spectrum beta-lactamases, ESBL) 携带菌株及粘菌素抗药菌株, 例如 Simmons 等在肉鸡中发现 ESBL 携带的菌株^[23-24], Glover 等在非洲的非灵长类动物中分离的 23 株费格森埃希菌中发现 14 株对粘菌素耐药^[10], 北京大学人民医院团队在广东发现 2 株 *mcr-1* 携带费格森埃希菌^[25], 但是鲜有该菌对碳青霉烯类抗生素耐药的报道。

前期实验中在浙江省衢州蛋鸡场新鲜粪便中分离鉴定到 2 株费格森埃希菌^[26], 本研究中经过药敏检测、全基因组分析后, 发现 2 株菌多重耐药且耐药基因丰富, 其中一株菌对粘菌素耐药, 并含有 *mcr-1* 耐药基因。此次研究为国内首次对粘菌素耐药的费格森埃希菌进行药敏实验验证及耐药基因分析的详细报道, 为该菌的分布特征及耐药基因传播提供了思路, 该菌的耐药性问题值得广泛重视。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器及培养基

药敏检测试剂盒, 上海星佰生物技术有限公司; 利福霉素、粘菌素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 限制性内切酶、S1 核酸酶、DNA 聚合酶, 宝生物工程(大连)有限公司。脉冲场电泳系统、凝胶成像系统、PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司; LB 培养基的配制参考文献^[27]。

1.2 菌株来源与复苏

两株费格森埃希菌 EFCF053 和 EFCF056 于 2017 年在浙江省衢州市某蛋鸡场的健康蛋鸡的粪便中分离获得。通过多重 PCR、Viteck-2 Compact 细菌鉴定系统和 16S rRNA 比对确认后, 保藏至 -80 °C 冰箱。划线于 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 12 h 复苏。 *E. coli* EC600 接合转移受体菌由中国农业大学动物医学院汪洋教授赠送。

1.3 药敏检测

采用肉汤微量稀释法测定以下抗菌药物对试验菌株的最低抑菌浓度 (Minimal inhibition concentration, MIC), 使用 *E. coli* ATCC 25922 (American type culture collection, Manassas, VA) 作为质控菌株。使用农业农村部动物源细菌耐药性监测网指定的商业化产品(上海星佰生物技术有限公司), 抗菌药物包括氨苄西林(Ampicillin, AMP)、奥格门丁(Amoxicillin/Clavulanate, A/C)、庆大霉素(Gentamicin, GEM)、大观霉素(Spectinomycin, SPT)、四环素(Tetracycline, TET)、氟苯尼考(Florfenicol,

FFC)、磺胺异恶唑(Sulfisoxazole, SF)、复方新诺明(Trimethoprim/Sulfamethoxazole, SXT)、头孢噻呋(Ceftiofur, CEF)、头孢他啶(Ceftazidime, CAZ)、恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)、氧氟沙星(Ofloxacin, OFL)、美罗培南(Meropenem, MEM)、安普霉素(Apramycin, APR)、粘杆菌素(Colistin, CL)。所有 MIC 数据参照美国临床实验室标准化委员会 (Clinical and laboratory standards institute, CLSI) 2015 版 M100-S25 文件解释^[28]。

1.4 基因组 DNA 提取

参照上海捷瑞生物工程有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA。抽取的 DNA 通过琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop ONE 进行检测, 基因组条带清晰明亮, 质量合格后保存于 -20 °C 冰箱备用。

1.5 全基因组测序与分析

使用 Illumina HiSeq 测序平台对分离获得的费格森埃希菌进行全基因组测序, 序列使用 Velvet 软件进行组装。使用 ResFinder 3.1 数据库^[29] (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder>) 对耐药基因进行预测; 利用 PlasmidFinder 2.0 数据库^[30] (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder>) 进行质粒复制类型的预测; 质粒序列比对使用 Easyfig 软件^[31]; 平均核苷酸相似度(Average nucleotide identity, ANI) 分析使用 JSpeciesWS 网站^[32]。

1.6 S1-PFGE 和 Southern blotting 杂交

利用 *Xba* I 酶切标准菌株 *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 作为分子标准, S1 核酸酶处理包埋胶块, 使用脉冲场电泳系统分离质粒。电泳条件为: 最小分子量 5 kb, 最大分子量 500 kb, 电泳 16 h, 初始转换时间 2.16 s, 终末转换时间 63.8 s, 电压 6 V/cm, 电场夹角为 120°。将地高辛标记的 *mcr-1* 特异性探针参考孙龙^[33]的方法进行 Southern blotting 杂交。

1.7 接合转移实验

以携带 *mcr-1* 的菌株 EFCF056 为供体菌, *E. coli*

EC600 为受体菌进行接合试验。分别用无菌生理盐水制备处在对数期 2 麦氏浊度单位的菌悬液, 按供体菌与受体菌体积比 1:1 各吸取 100 μ L 混合后, 点在无抗 LB 培养基上的无菌滤膜上进行混合培养, 37 $^{\circ}$ C 培养 8 h 后, 1 mL 冲洗混合细菌配成菌悬液。取 100 μ L 涂布于含 400 μ g/mL 利福霉素及 4 μ g/mL 粘菌素的 LB 培养基上, 同时取 100 μ L 配制梯度浓度后分别在含 400 μ g/mL 利福霉素的 LB 培养基上涂布, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。双抗板上疑似菌落使用 *mcr-1* 引物进行菌落 PCR 验证。取相同浓度的供体菌和受体菌分别涂布在同时含 400 μ g/mL 利福霉素及 4 μ g/mL 粘菌素的双抗 LB 培养基上作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 药敏结果

将 2 株菌进行了药物敏感试验, 获得了对 15 种药物的 MIC 值并进行了比较(表 1)。两株菌均表现出多重耐药的特征, 其中菌株 EFCF053 对氨苄西林、庆大霉素、四环素、氟苯尼考、磺胺异噁唑、复方新诺明表现出耐药, 对恩诺沙星和氧氟沙星耐药则为中介值。菌株 EFCF056 耐药类型较多, 对氨苄西林、头孢噻呋、大观霉素、庆大霉素、四环素、氟苯尼考、磺胺异噁唑、复方新诺明、粘菌素、恩诺沙星、氧氟沙星 11 个抗生素表现出耐药, 同时对奥格门丁和头孢他啶则为中介值。EFCF056 相对 EFCF053 耐药种类增加, 比如对大观霉素、头孢噻呋、粘菌素、恩诺沙星、氧氟沙星耐药。同时判断为耐药的情况下, 菌株 EFCF056 表现出较高的 MIC, 比如氨苄西林(>512 vs 512), 庆大霉素(>512 vs 64)。

2.2 基因组测序及耐药基因分析

对 2 株费格森埃希菌 EFCF053 和 EFCF056 菌株进行了全基因组测序, 基因组大小分别为 4.77 Mb 和 5.02 Mb, 序列已经提交至 GenBank 数据库, 检索号分别为 RWHR000000000 和 RWHS000000000。以上两株菌与典型菌株 *E. fergusonii* ATCC 35469^T (CU928158.2) ANI 值分别为 98.54%和 98.43%, 高

表 1 菌株 EFCF053 和 EFCF056 的 MIC 值
Table 1 MICs of strains EFCF053 and EFCF056 (μ g/mL)

抗生素 Antimicrobial agents	EFCF053	EFCF056
氨苄西林 Ampicillin (AMP)	512*	>512*
奥格门丁 Amoxicillin/Clavulanate (A/C)	4/2	16/8*
头孢噻呋 Ceftiofur (CEF)	0.5	>256*
头孢他啶 Ceftazidime (CAZ)	0.25	8*
美罗培南 Meropenem (MEM)	\leq 0.03	\leq 0.03
庆大霉素 Gentamicin (GEM)	64	>512*
大观霉素 Spectinomycin (SPT)	32	512*
四环素 Tetracycline (TET)	128*	128*
氟苯尼考 Florfenicol (FFC)	>256*	>256*
磺胺异噁唑 Sulfisoxazole (SF)	>512*	512*
复方新诺明 Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT)	>32/608*	>32/608*
恩诺沙星 Enrofloxacin (ENR)	1	16*
氧氟沙星 Ofloxacin (OFL)	4	64*
安普霉素 Apramycin (APR)	8	8
粘杆菌素 Colistin (CL)	0.5	4*

注: *: 判断为耐药。
Note: *: Represent antimicrobial resistance.

于同种临界值 95%^[32], 可从基因组水平确定为费格森埃希菌。

对获得性耐药基因进行了预测, 结果显示 2 株菌的耐药表型都可以通过获得性耐药基因得到解释(表 2)。但是相同耐药表型的菌株耐药基因可能不同, 例如对复方新诺明耐药的菌株 EFCF053 的耐药基因是 *dfrA14*, 而 EFCF056 为 *dfrA12*; 对磺胺异噁唑耐药的菌株 EFCF053 的耐药基因是 *sul2*、*sul3*, 而在 EFCF056 中是 *sul1*、*sul2*; 介导菌株 EFCF053 对氨苄西林耐药的是 *bla*_{TEM-1A}, 而 EFCF056 中则是 *bla*_{TEM-1B}。多个基因共同介导耐药, 具体耐药贡献不明确, 例如菌株 EFCF056 对喹诺酮类耐药的基因有 *qnrS2*、*aac(6')-Ib-cr*、*oqxA*、*oqxB* 共 4 个。通过 2 株菌的耐药表型比较可以推测 *bla*_{CTX-M-65}、*bla*_{OXA-1}、*bla*_{CTX-M-55} 基因介导了头孢他啶和头孢噻呋的耐药, 基因 *rmtB*、*aadA2*、*aac(6')-Ib-cr* 更有可能参与大观霉素的耐药。预测到的 *fosA3*、*mph(A)*、

表 2 菌株 EFCF053 和 EFCF056 的耐药谱与获得性耐药基因
Table 2 Antimicrobial resistance profiles and acquired resistance genes of strains EFCF053 and EFCF056

抗生素类型 Antibiotic types		EFCF053		EFCF056	
		Susceptibility	Acquired resistance genes	Susceptibility	Acquired resistance genes
β-Lactam	AMP	R	<i>bla</i> _{TEM-1A}	R	<i>bla</i> _{CTX-M-65} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CTX-M-55}
	A/C	S		I	
	CEF	S		R	
	CAZ	S		I	
	MEM	S		S	
Aminoglycoside	GEM	R	<i>aac</i> (3)- <i>Ild</i> , <i>aph</i> (3')- <i>Ia</i> , <i>aph</i> (3'')- <i>Ib</i> , <i>aph</i> (6)- <i>Id</i>	R	<i>aac</i> (3)- <i>Ild</i> , <i>aph</i> (3')- <i>Ia</i> , <i>aph</i> (3'')- <i>Ib</i> , <i>aph</i> (6)- <i>Id</i> , <i>rmtB</i> , <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> , <i>aadA2</i>
	SPT	S		R	
Colistin	CL	S		R	<i>mcr</i> -1
Fluoroquinolone	ENR	I		R	<i>qnrS2</i> , <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>
	OFL	I		R	
Fosfomycin					<i>fosA3</i>
MLS-Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B					<i>mph</i> (A)
Phenicol	FFC	R	<i>floR</i>	R	<i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>catB3</i>
Rifampicin					<i>ARR-3</i>
Sulfonamides	SF	R	<i>sul2</i> , <i>sul3</i>	R	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>
	SXT	R	<i>dfrA14</i>	R	<i>dfrA12</i>
Tetracycline	TET	R	<i>tet</i> (A)	R	<i>tet</i> (A)

注：R：耐药；S：敏感。
Note: R: Resistance; S: Sensitive.

ARR-3 耐药基因, 分别可能介导菌株 EFCF056 对磷霉素、大环内脂类和利福霉素的耐药, 但是缺少药敏实验验证。另外重要的是, 在菌株 EFCF056 中发现了耐药基因 *mcr-1*, 造成了该菌对粘菌素的耐药; 两株菌都含有编码超广谱 β-内酰胺酶(ESBL)的基因, 菌株 EFCF053 中的 *bla*_{TEM-1A} 和 EFCF056 中的 *bla*_{CTX-M-65}、*bla*_{OXA-1}、*bla*_{TEM-1B} 和 *bla*_{CTX-M-55}。最后对 2 株菌的耐药质粒进行了预测, 发现多个复制子类型, 菌株 EFCF053 中有 *IncFIB*、*IncFII*、*IncHI2*、*IncHI2A*、*IncX1* 复制子; 而 EFCF056 中除了含有上述所有复制子外, 还预测到 *IncQ1* 和 *p0111* 复制类型, 这意味着 2 株菌都含有多个质粒。通过 S1-PFGE 可以进一步证明, 菌株 EFCF053 和 EFCF056 中大于 40 kb 的质粒分别为 4 个和 5 个, 且带型具有很大差异(图 1)。

2.3 携带耐药基因 *mcr-1* 的质粒分析

从表 1 可以发现菌株 EFCF056 对粘菌素耐药, MIC 为 4 μg/mL, 进一步在其基因组序列中预测到 *mcr-1* 基因。该基因位于组装序列的 Contig101 上, 片段大小为 47 800 bp。将该序列进行 BLAST, 与比对到的 2 个最同源的质粒进行了比较(图 2)。两个质粒均来源于大肠杆菌, 分别为 pHS13-1-*IncHI2* 和 pMCR1_025943, 前者在深圳腹泻病人中分离到, 后者从美国临床病人的直肠拭子中分离获得, 2 个质粒均大于 260 kb。在 *mcr-1* 耐药基因下游发现重组酶, 意味着该基因具有可移动元件, 具有发生水平转移的能力。针对菌株 EFCF056 中的该质粒进行了接合转移实验, 在含有利福霉素和粘菌素的双抗板上生长的疑似接合子进行了菌落 PCR 鉴定, 结果发现均能扩增出 1 626 bp 全长的 *mcr-1* 基因(图 3),

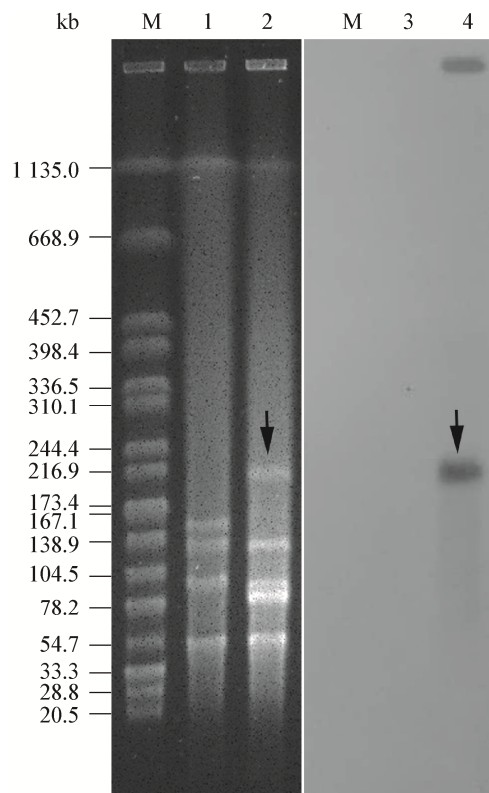


图1 菌株 EFCF053、EFCF056 的 S1-PFGE 与 *mcr-1* 基因的 Southern blotting 分析

Figure 1 S1-PFGE and Southern blotting with *mcr-1* gene analysis of strains EFCF053 and EFCF056

注: M: H9812 marker; 1, 2: 菌株 EFCF053 和 EFCF056 的 S1-PFGE 图, 显示了各自的质粒条带; 3, 4: 菌株 EFCF053 和 EFCF056 的中的质粒与 *mcr-1* 基因探针的 Southern blotting 图; 箭头: 含有 *mcr-1* 基因的质粒。

Note: M: H9812 marker; 1, 2: S1-PFGE of strains EFCF053 and EFCF056, showing the sizes of the respective plasmids; 3, 4: The plasmids of strains EFCF053 and EFCF056 with *mcr-1* gene probe in the Southern blotting; The arrows: The plasmid harboring the *mcr-1* gene.

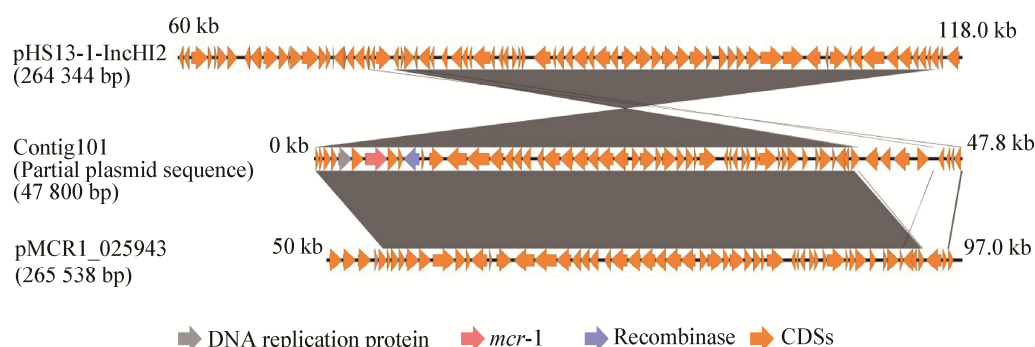


图2 *mcr-1* 基因所在片段与同源质粒的比较

Figure 2 Comparison of the fragment harboring *mcr-1* gene with homologous plasmids

并通过测序验证。该实验可证实菌株 ECECF056 中携带 *mcr-1* 基因的质粒可以发生接合转移, 通过计算, 接合转移效率为 0.56×10^{-6} 。

3 讨论与结论

在本次研究中, 对分离获得的 2 株费格森埃希菌进行了全基因组测序和药敏实验。结果显示 2 株菌耐药谱广、耐药基因丰富, 同时检出 ESBL 和 *mcr-1* 基因, 这是国内第一次报道该菌同时含有这两类基因。此次研究中, *mcr-1* 基因携带质粒可证实具有接合转移的能力, 有传播风险。两株菌所有的耐药表型都可以通过相应的获得性耐药基因得到解释。但是部分耐药表型同时包含多个耐药基因, 目前无法确认哪一个占主要因素, 可能是共同作用的结果。另外, 由于药敏实验的限制, 没有穷尽所有的抗生素, 但是预测到了磷霉素耐药基因 *fosA3*、大环内脂类耐药基因 *mph(A)* 和利福霉素耐药基因 *ARR-3*。这意味着菌株 EFCF056 的耐药谱比药敏实验获得的结果更加广泛。另外, 两株菌质粒较多, 可以确定的 2 株菌具有大质粒 4-5 个。另外, 2 株菌没有获得基因组完成图, 所以质粒的数目和耐药基因的存在位置无法确认, 未来会通过全基因组完成图进一步探究。

费格森埃希菌的宿主非常广泛, 在健康或疾病动物、人体中都被分离得到。费格森埃希菌和大肠杆菌不容易区分, 难以判断, 所以该菌的研究可能容易被忽略。通过本次研究, 显示出费格森埃希菌是重要的耐药基因存储库, 可能与家禽养殖兽用抗

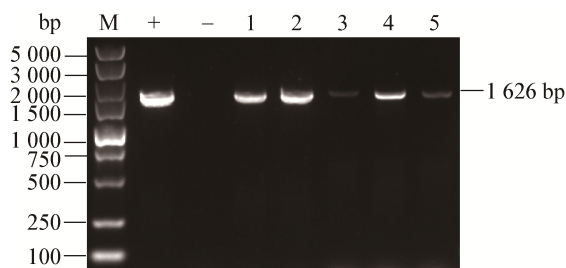


图3 接合子的 *mcr-1* 基因验证

Figure 3 Verification of *mcr-1* gene in transconjugants

注: M: DL5000 DNA marker; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 1-5: 疑似接合子的菌落 PCR 产物。

Note: M: DL5000 DNA marker; +: Positive control; -: Negative control; 1-5: PCR products of suspected transconjugant colonies.

生素的不规范使用相关, 其耐药性应引起广泛重视。未来应该对该菌进行动物源及临床上筛查和耐药性监测, 深入研究其 MIC 频率分布, 更全面深入地研究该菌的耐药现状和流行规律。

REFERENCES

- [1] Huys G, Cnockaert M, Janda JM, et al. *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(3): 807-810
- [2] Priest FG, Barker M. Gram-negative bacteria associated with brewery yeasts: reclassification of *Obesumbacterium proteus* biogroup 2 as *Shimwellia pseudoproteus* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Escherichia blattae* to *Shimwellia blattae* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(4): 828-833
- [3] Farmer III JJ, Fanning GR, Davis BR, et al. *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1985, 21(1): 77-81
- [4] Brenner DJ, Davis BR, Steigerwalt AG, et al. Atypical biogroups of *Escherichia coli* found in clinical specimens and description of *Escherichia hermannii* sp. nov.[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1982, 15(4): 703-713
- [5] Brenner DJ, McWhorter AC, Knutson JKL, et al. *Escherichia vulneris*: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1982, 15(6): 1133-1140
- [6] Liu S, Jin D, Lan RT, et al. *Escherichia marmotae* sp. nov., isolated from faeces of *Marmota himalayana*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(7): 2130-2134
- [7] Izard D, Mergaert J, Gavini F, et al. Separation of *Escherichia adecarboxylata* from the *Erwinia herbicola*-*Enterobacter agglomerans* complex and from the other *Enterobacteriaceae* by nucleic acid and protein electrophoretic techniques[J]. Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie, 1985, 136(2SB): 151-159,161-168
- [8] Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved lists of bacterial names[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1980, 30(1): 225-420
- [9] Gastra W, Kusters JG, van Duijkeren E, et al. *Escherichia fergusonii*[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 172(1/2): 7-12
- [10] Glover B, Wentzel J, Jenkins A, et al. The first report of *Escherichia fergusonii* isolated from non-human primates, in Africa[J]. One Health, 2017, 3: 70-75
- [11] Lindsey RL, Garcia-Toledo L, Fasulo D, et al. Multiplex polymerase chain reaction for identification of *Escherichia coli*, *Escherichia albertii* and *Escherichia fergusonii*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 140: 1-4
- [12] Simmons K, Rempel H, Block G, et al. Duplex PCR methods for the molecular detection of *Escherichia fergusonii* isolates from broiler chickens[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(6): 1941-1948
- [13] Hariharan H, López A, Conboy G, et al. Isolation of *Escherichia fergusonii* from the feces and internal organs of a goat with diarrhea[J]. The Canadian Veterinary Journal, 2007, 48(6): 630-631
- [14] Bain MS, Green CC. Isolation of *Escherichia fergusonii* in cases clinically suggestive of salmonellosis[J]. The Veterinary Record, 1999, 144(18): 511
- [15] Rimoldi GM, Moeller RB Jr. *Escherichia fergusonii* associated with pneumonia in a beef cow[J]. Journal of Veterinary Medicine, 2013, 2013: 829532
- [16] Weiss ATA, Lübke-Becker A, Krenz M, et al. Enteritis and septicemia in a horse associated with infection by *Escherichia fergusonii*[J]. Journal of Equine Veterinary Science, 2011, 31(7): 361-364
- [17] Herráez P, Rodríguez AF, Espinosa De Los Monteros A, et al. Fibrino-necrotic typhilitis caused by *Escherichia fergusonii* in ostriches (*Struthio camelus*)[J]. Avian Diseases, 2005, 49(1): 167-169
- [18] Oh JY, Kang MS, An BK, et al. Isolation and epidemiological characterization of heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia fergusonii* from healthy chickens[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 160(1/2): 170-175
- [19] Rayamajhi N, Cha SB, Shin SW, et al. Plasmid typing and resistance profiling of *Escherichia fergusonii* and other *Enterobacteriaceae* isolates from South Korean farm animals[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(9): 3163-3166
- [20] Song Y, Ma SQ. A case of multi-drug resistant *Escherichia fergusonii* isolated from blood stream infection induced by ascending urinary tract infection[J]. Chinese Journal of Microecology, 2015, 27(4): 475-476 (in Chinese)
宋宇, 马淑青. 尿路感染上行所致血流感染中分离出多重耐药弗格森埃希菌一例[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(4): 475-476
- [21] Lu Y, Zhao HY, Qi XL, et al. Identification of *Escherichia fergusonii* and analysis of its drug resistance[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 34(5): 48-51 (in Chinese)
陆彦, 赵红玉, 齐晓丽, 等. 弗格森埃希菌的鉴定及药敏试验[J]. 动物医学进展, 2013, 34(5): 48-51
- [22] Ye N, Quan ZF, Wang B, et al. Isolation, identification and drug

- sensitivity test of *Escherichia fergusonii* from Takin[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(2): 68-71 (in Chinese)
- 叶泥, 权自芳, 王彬, 等. 一株扭角羚弗格森埃希菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 动物医学进展, 2015, 36(2): 68-71
- [23] Simmons K, Islam MR, Rempel H, et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia fergusonii* isolated from broiler chickens[J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(6): 929-938
- [24] Lagacé-Wiens PRS, Baudry PJ, Pang P, et al. First description of an extended-spectrum- β -lactamase-producing multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* strain in a patient with cystitis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(6): 2301-2302
- [25] Wang RB, van Dorp L, Shaw LP, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1179
- [26] Zhang L, Chang J, Cao LJ, et al. Rapid identification and clustering analysis on *E. coli* isolates from chicken fecal by MALDI-TOF MS[J]. China Poultry, 2018, 40(20): 23-27 (in Chinese)
- 张玲, 常江, 曹刘杰, 等. 鸡粪便来源大肠杆菌的质谱法快速鉴定及聚类分析[J]. 中国家禽, 2018, 40(20): 23-27
- [27] Rédei GP. LB (Luria-Bertani) bacterial medium[A]//Rédei GP. Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics[M]. Dordrecht: Springer, 2008: 1087
- [28] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI Document M100-S25 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th Informational Supplement[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015
- [29] Zankari E, Hasman H, Cosentino S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(11): 2640-2644
- [30] Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, et al. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(7): 3895-3903
- [31] Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer[J]. Bioinformatics, 2011, 27(7): 1009-1010
- [32] Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, et al. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison[J]. Bioinformatics, 2016, 32(6): 929-931
- [33] Sun L. Study on the biological characters, molecular typing and carbapenem resistant mechanisms of *Proteus mirabilis* deficient in swarming motility[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2016 (in Chinese)
- 孙龙. 无迁徙生长碳青霉烯耐药奇异变形杆菌生物学特性、耐药机制及分子分型研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2016