



研究报告

两株 *bla*_{NDM-5} 基因介导的碳青霉烯耐药禽源大肠杆菌 ST10 和 ST354 耐药性卢亚兰^{1,2} 代正云³ 陈凌云² 陈怡飞² 孙东昌¹ 杨华^{*2} 唐标^{*2}

1 浙江工业大学生物工程学院 浙江 杭州 310014

2 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所 浙江 杭州 310021

3 湖南科技学院化学与生物工程学院 湖南 永州 425000

摘要:【背景】近年来,对碳青霉烯类抗生素耐药的肠杆菌科细菌的出现对公众的健康构成了严重的威胁。【目的】为了解家禽养殖中肠道菌对碳青霉烯类抗生素耐药情况,对陕西西安和浙江海宁两地的鸡和鸭养殖场粪便进行耐药菌筛选并分析。【方法】在含美罗培南的 LB 琼脂平板上筛选可疑菌落并利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)鉴定。通过微量肉汤稀释法进行最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)测定。通过 Illumina HiSeq 平台进行全基因组测序。使用 ResFinder 数据库预测获得性耐药基因。利用 S1 酶切后脉冲场电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)和 Southern blot 杂交进行质粒和碳青霉烯类耐药基因的确认。【结果】分离出两株碳青霉烯类耐药的大肠杆菌 HN1-26 和 XN3-1, 均对头孢他啶、头孢噻唑、氨苄西林、奥格门丁、复方新诺明、磺胺异恶唑、恩诺沙星、氧氟沙星、美罗培南、四环素耐药。此外, XN3-1 对氟苯尼考和大观霉素耐药。菌株 HN1-26 和 XN3-1 的多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分别为 ST354 和 ST10。两菌株对美罗培南的 MIC 值均为 64 µg/mL, 但是在含美罗培南的 LB 平板上, 菌株 HN1-26 比菌株 XN3-1 生长得更快。两菌株都存在携带 *bla*_{NDM-5} 基因的 IncX3 型质粒。两个质粒的序列完全一致, 大小为 46 161 bp, 包含接合转移元件, 能够以大肠杆菌作为受体细胞进行转移。【结论】IncX3 型质粒是转移 *bla*_{NDM-5} 基因的重要载体, 在我国畜禽养殖中具有扩散风险。

关键词: *bla*_{NDM-5}, 大肠杆菌, 质粒, 家禽养殖场

Foundation items: State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products (2010DS700124-ZZ1703, ZZ1905); National Natural Science Foundation of China (31700007); Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2020C02031)

***Corresponding authors:** YANG Hua: Tel: 86-571-86404005; E-mail: yanghua@zaas.ac.cn
TANG Biao: Tel: 86-571-86415208; E-mail: tb_411@163.com

Received: 24-10-2019; **Accepted:** 31-12-2019; **Published online:** 21-02-2020

基金项目: 省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室项目(2010DS700124-ZZ1703, ZZ1905); 国家自然科学基金青年项目(31700007); 浙江省重点研发计划(2020C02031)

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

唐标: Tel: 0571-86415208; E-mail: tb_411@163.com

收稿日期: 2019-10-24; **接受日期:** 2019-12-31; **网络首发日期:** 2020-02-21

Two carbapenem-resistant avian *Escherichia coli* strains ST10 and ST354 mediated by *bla*_{NDM-5} gene

LU Ya-Lan^{1,2} DAI Zheng-Yun³ CHEN Ling-Yun² CHEN Yi-Fei² SUN Dong-Chang¹
YANG Hua^{*2} TANG Biao^{*2}

1 College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310014, China

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

3 College of Chemistry and Biological Engineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou, Hunan 425000, China

Abstract: [Background] Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* is now becoming a globally serious threat to public health. [Objective] To study the carbapenem resistance of intestinal bacteria isolated from poultry farms, feces of chicken and duck were screened at Xi'an of Shaanxi and Haining of Zhejiang Provinces. [Methods] The potential bacterial colonies on LB agar plate containing meropenem were picked and further characterized by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microbroth dilution method. Whole genome sequencing was performed by the Illumina HiSeq platform. Acquired resistance genes were predicted by the online ResFinder database analysis. In addition, plasmids and carbapenem resistance genes were confirmed by S1-pulsed-field gel electrophoresis (S1-PFGE) and Southern blot hybridization. [Results] Two carbapenem-resistant *Escherichia coli* strains HN1-26 and XN3-1 were isolated. Both of these strains were resistant to ceftazidime, ceftiofur, ampicillin, amoxicillin/clavulanate, trimethoprim/sulfamethoxazole, sulfisoxazole, enrofloxacin, ofloxacin, meropenem and tetracycline. Besides, XN3-1 was also shown to be resistant to florfenicol and spectinomycin. Multilocus sequence typing (MLST) results revealed that HN1-26 and XN3-1 were ST354 and ST10, respectively. The MIC values of these two strains to meropenem were 64 µg/mL, while HN1-26 grew faster than XN3-1 on LB plate with meropenem. Furthermore, these two strains contained the identical IncX3 type plasmid carrying antibiotic resistance gene *bla*_{NDM-5}, with a size of 46 161 bp. This IncX3 type plasmid contained complete conjugative elements and were able to transfer to *E. coli* recipient cells. [Conclusion] Our results suggested that the IncX3 plasmid is an important vehicle for transferring *bla*_{NDM-5} gene, which has the risk of spreading in livestock and poultry in China.

Keywords: *bla*_{NDM-5}, *Escherichia coli*, Plasmid, Poultry farm

碳青霉烯类抗生素是一种抗菌谱广、抗菌活性较强的β-内酰胺类抗生素,因其具有对β-内酰胺酶稳定以及毒性低等特点,已经成为治疗严重细菌感染的最主要抗菌药物之一。然而随着碳青霉烯类药物使用的增加,含碳青霉烯耐药基因的菌株已经陆续被发现,特别是碳青霉烯耐药肠杆菌科菌株的发现,对公共健康造成巨大威胁。从2009年Yong等首次在克雷伯氏菌中发现了新德里金属-β-内酰胺酶-1 (new delhi metallo-β-lactamase-1, NDM-1) 以来^[1],世界各地也相继发现了携带*bla*_{NDM}的细菌^[2-5]。到目前为止,已经发现了24个*bla*_{NDM}变

型体^[6]。*bla*_{NDM-5}最早是在2011年由Hornsey等首次在大肠杆菌中发现^[7]并引起了广泛关注,紧接着很多国家也陆续报道了携带*bla*_{NDM-5}的肠杆菌科菌株,成为流行广泛的*bla*_{NDM}变型体之一^[8-11]。*bla*_{NDM-5}可通过不同类型质粒介导,例如IncF、IncN和IncX3等^[12]。其中,IncX3型质粒在肠杆菌科中宿主范围较窄^[13]。目前许多国家在人、动物和环境之中发现了携带*bla*_{NDM-5}的IncX3型质粒的肠杆菌科菌株,包括澳大利亚^[14]、印度^[15]、韩国^[16]、日本^[17]、尼日利亚^[18]、阿拉伯联合酋长国^[19]等。在中国,已有很多省市报道了人来源的携带*bla*_{NDM-5}

的 IncX3 型质粒, 包括浙江^[6,13,20]、江苏^[21]、山东^[22]、上海^[23]、青海^[24]、四川^[25]等, 而从动物中分离的报道仅占极少数。

本研究从浙江和陕西家禽的粪便中分离出碳青霉烯类耐药的菌株序列型分别为 ST354 和 ST10 的大肠杆菌 HN1-26 和 XN3-1, 这两株菌均携带 *bla*_{NDM-5} 基因。通过全基因组测序、药敏检测等手段解析了耐药机制, 并对两株菌的耐药性和耐药质粒进行了比较分析。这些研究结果将有助于增加研究者对携带 *bla*_{NDM-5} 基因的质粒在人和动物中传播规律的认知。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒, 上海捷瑞生物工程有限公司; Biofosun[®]革兰氏阴性需氧菌药敏板, 上海星佰生物技术有限公司; 美罗培南, 大连美仑生物技术有限公司。微生物自动生长曲线测定仪 Microscreen, 杰灵仪器制造(天津)有限公司; 细菌鉴定质谱, Bruker 公司。

1.2 菌株分离、鉴定

2018 年 10–12 月, 分别从陕西西安一家庭养鸡场和浙江海宁两个鸭养殖场各采集粪便样品 5、10 和 10 份, 使用含有美罗培南浓度为 4 μg/mL 的 LB 平板进行筛选, 挑选疑似克隆后纯化 3 次, 通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)快速鉴定。获得的菌株通过 16S rRNA 基因扩增^[26]比对, 最后使用 20%甘油保藏到–80 °C 冰箱。将分离株划线于 LB 平板, 37 °C 培养 12–24 h 复苏, 挑单克隆用于后续研究。

1.3 基因组 DNA 提取与测序

分离株在 LB 平板上划线, 37 °C 培养 12 h, 挑单菌落于含有 5 mL LB 液体培养基的试管中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h, 以 1%的接种量接种于装有 50 mL LB 液体培养基的三角瓶中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 2–3 h, 4 000 r/min 离心 10 min

收集菌体。按照 DNA 提取试剂盒的说明书提取基因组 DNA。使用 Illumina HiSeq 测序平台对分离获得的大肠杆菌进行全基因组测序, 序列使用 Velvet 软件进行组装。质粒相关的片段进一步通过 gap-closing 的方法获得完整序列。序列已提交 GenBank 数据库, 登录号分别是 VVKY000000000 和 VVKX000000000。

1.4 耐药基因预测与质粒分析

基因组通过 NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline 自动注释。使用 ResFinder 3.1 数据库^[27]对获得性耐药基因进行预测, 利用 PlasmidFinder 2.0^[28]进行质粒复制类型的预测, 同源质粒序列比对使用 Easyfig^[29]和 BRIG^[30]软件。

1.5 药敏实验

使用 Biofosun[®]革兰氏阴性需氧菌药敏板检测大肠杆菌分离株对氨苄西林(ampicillin, AMP)、头孢噻呋(ceftiofur, CEF)、头孢他啶(ceftazidime, CAZ)、奥格门丁(amoxicillin/clavulanate, A/C)、美罗培南(meropenem, MEM)、复方新诺明(trimethoprim/sulfamethoxazole, SXT)、磺胺异恶唑(sulfisoxazole, SF)、恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)、氧氟沙星(ofloxacin, OFL)、四环素(tetracycline, TET)、庆大霉素(gentamicin, GEM)、大观霉素(spectinomycin, SPT)、氟苯尼考(florfenicol, FFC)和粘菌素(colistin, CL) 14 种抗生素的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。以美国临床实验室标准化委员会(clinical and laboratory standards institute of America, CLSI)的标准判断结果^[31]。

将大肠杆菌分离株使用 LB 培养基生长到对数期, 使用生理盐水配制到麦氏浊度为 0.6, 按 10 倍比梯度稀释, 得到 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 六个梯度的菌悬液, 随后以点种的方式接种到美罗培南浓度分别为 0、4、8、16、32、64 和 128 μg/mL 的 LB 方形平板上, 测试大肠杆菌分离株在含有不同浓度美罗培南的 LB 培养基上的生长状态。以大肠杆菌 ATCC 25922 为对照菌株。

1.6 生长曲线的测定

将菌株 HN1-26 和 XN3-1 菌株 37 °C 培养 12 h

后,按照 1%接种量接种到 30 mL LB 培养基中,通过微生物自动生长曲线测定仪进行检测。美罗培南浓度分别设置为 0、8、16、32 和 64 $\mu\text{g/mL}$,实验重复 3 次。通过测定 OD_{600} 监测菌体生长浓度,使用 GraphPad Prism 8 软件绘制生长曲线。

1.7 S1-PAGE、Southern blot 与接合转移实验

以本次实验分离株为供体菌,利福霉素抗性大肠杆菌 EC600 菌株作为受体菌。利用 *Xba* I 酶切标准菌株 *Salmonella enteric* serovar Braenderup H9812 作为分子标准, S1 核酸酶处理胶块,使用脉冲场电泳系统分离质粒^[32]。将地高辛标记的 *bla*_{NDM-5} 特异性探针进行 Southern blot 杂交。接合转移实验具体操作方法参考文献[6]。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

从来自陕西西安的一个鸡养殖场和浙江海宁的两个鸭养殖场中采集的 25 份粪便样品中分别选择性筛选出 8 株美罗培南耐药菌株。利用 MALDI-TOF MS 和 16S rRNA 基因序列比对后,确定从西安的养殖场筛选出 1 株大肠杆菌(XN3-1)和 1 株嗜麦芽寡养单胞菌,从海宁筛选出 1 株大肠杆菌(HN1-26), 2 株不动杆菌属和 3 株紫色杆菌属的菌株。

2.2 药敏实验

对两株美罗培南耐药的大肠杆菌进行了药物敏感实验,获得了对 14 种抗生素的 MIC 值并进行了对比。如表 1 所示,两株菌均表现出多重耐药,其中菌株 HN1-26 对庆大霉素、氟苯尼考、粘菌素和大观霉素 4 种抗生素敏感,对头孢他啶、头孢噻呋、氨苄西林、奥格门丁、复方新诺明、磺胺异恶唑、恩诺沙星、氧氟沙星、美罗培南、四环素 10 种抗生素表现出耐药性,而菌株 XN3-1 的耐药类型比菌株 HN1-26 多两种,其对氟苯尼考和大观霉素也表现出耐药性,并且 MIC 值相差较大,菌株 XN3-1 对氟苯尼考和大观霉素的 MIC 分别是 $>256\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $>512\text{ }\mu\text{g/mL}$,而菌株 HN1-26 为 $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $32\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 菌株 XN3-1 和 HN1-26 的 MIC 值

Table 1 MICs of strains HN1-26 and XN3-1

| 抗生素 Antibiotic | 菌株 Strains | |
|--|--------------------------------|-------------------------------|
| | HN1-26 ($\mu\text{g/mL}$) | XN3-1 ($\mu\text{g/mL}$) |
| 氨苄西林 Ampicillin (AMP) | $>512^*$ | $>512^*$ |
| 头孢噻呋 Ceftiofur (CEF) | 256* | 256* |
| 头孢他啶 Ceftazidime (CAZ) | $>256^*$ | $>256^*$ |
| 奥格门丁 Amoxicillin/Clavulanate (A/C) | $>512/256^*$ | 64/32* |
| 美罗培南 Meropenem (MEM) | 64* | 64* |
| 复方新诺明 Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT) | $>32/608^*$ | $>32/608^*$ |
| 磺胺异恶唑 Sulfisoxazole (SF) | $>512^*$ | $>512^*$ |
| 恩诺沙星 Enrofloxacin (ENR) | $>32^*$ | 8* |
| 氧氟沙星 Ofloxacin (OFL) | 32* | 16* |
| 四环素 Tetracycline (TET) | $>512^*$ | $>512^*$ |
| 庆大霉素 Gentamicin (GEM) | 0.5 | 1 |
| 大观霉素 Spectinomycin (SPT) | 32 | $>512^*$ |
| 氟苯尼考 Florfenicol (FFC) | 4 | $>256^*$ |
| 粘杆菌素 Colistin (CL) | 0.5 | 0.5 |

注: *: 判断为耐药。

Note: *: Represent antimicrobial resistance.

根据 MIC 测定,菌株 HN1-26 和 XN3-1 对美罗培南的 MIC 值均为 $64\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。进一步测试了菌株 HN1-26 和 XN3-1 在美罗培南浓度分别为 0、4、8、16、32、64、128 $\mu\text{g/mL}$ 的 LB 平板上的生长活力。从图 1 中可以看到,菌株 HN1-26 耐受性略高于 XN3-1,在培养液的稀释度为 10^{-6} 时,菌株 HN1-26 在美罗培南浓度为 $128\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时仍然可以生长,而菌株 XN3-1 不生长。同样,从生长曲线(图 2)可得知,菌株 HN1-26 的生长迟缓期要比菌株 XN3-1 的短,特别是在美罗培南浓度 $64\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,HN1-26 的迟缓期为 3 h,而 XN3-1 的迟缓期为 5 h,这与平板检测的稀释点滴图的测试结果类似。实验说明虽然两株菌的对美罗培南的 MIC 值相同,但在相同抗生素浓度下菌株 HN1-26 比 XN3-1 的生长活力高。

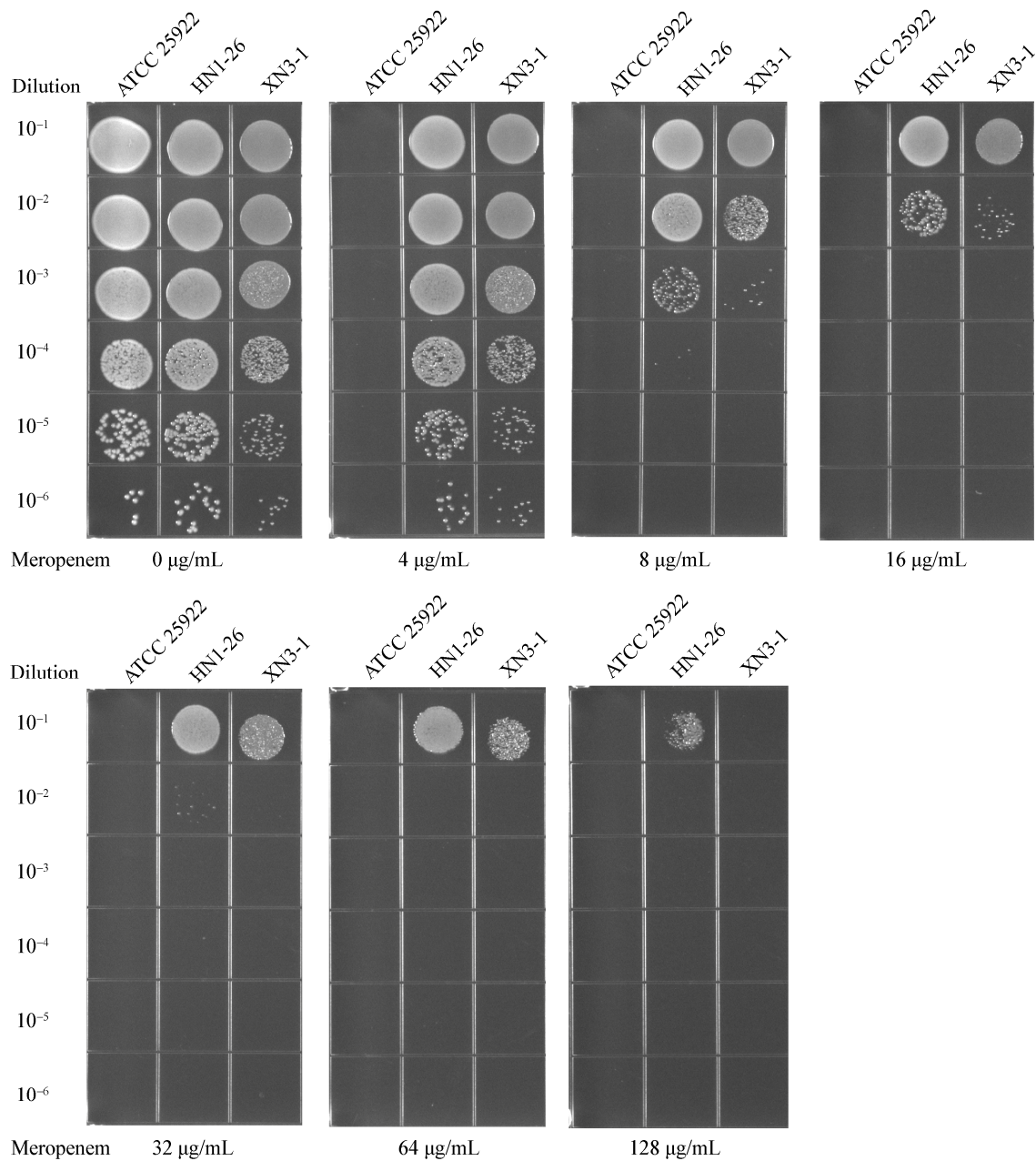


图 1 菌株 HN1-26 和 XN3-1 在不同浓度的美罗培南 LB 平板上的生长状况

Figure 1 The growth of HN1-26 and XN3-1 on LB plates with different meropenem concentration

2.3 质粒与耐药基因

通过 S1-PFGE 和 Southern blot 发现, 菌株 HN1-26 和 XN3-1 存在相同大小的携带 *bla*_{NDM-5} 的质粒(图 3), 将其命名为 pHNNDM-yll 和 pXNTBNDM。基于全基因组测序的组装结果, 获得的这两个质粒的全序列大小为 46 161 bp, 且序列完全一致。利用

ResFinder 数据库对测序结果进行了分析, 在菌株 HN1-26 的基因组中预测到 10 个获得性耐药基因: β -内酰胺类 *bla*_{NDM-5}、*bla*_{TEM-1B}; 氨基糖苷类 *aph(3'')-Ib*、*aph(3')-Ia*、*aph(6)-Id*; 喹诺酮类 *oqx*B; 甲氧嘧啶类 *dfrA17*; 苯丙醇类 *catA1*; 磺胺类 *sul2*; 四环素类 *tet(B)*; 在菌株 XN3-1 的基因组中预测到

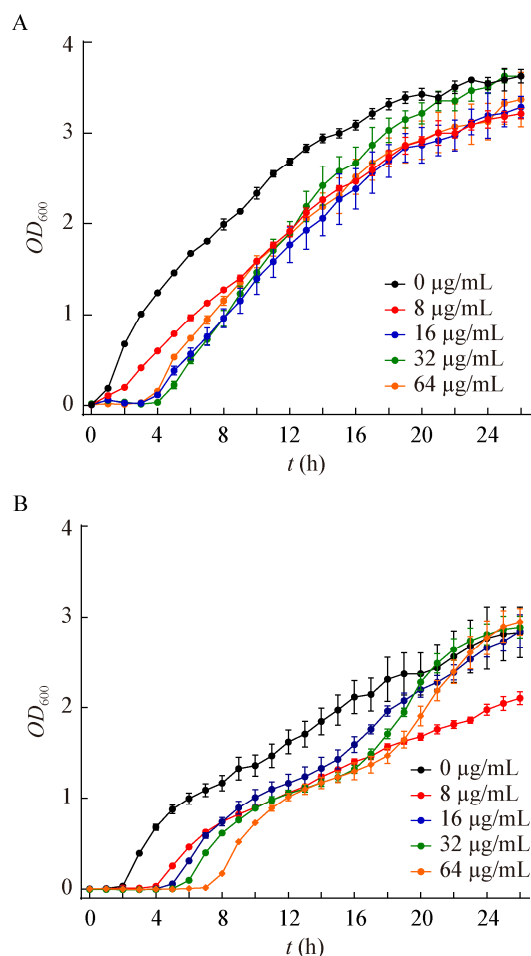


图2 菌株 HN1-26 (A)和 XN3-1 (B)的生长曲线

Figure 2 Growth curves of strains HN1-26 (A) and XN3-1 (B)

16 个获得性耐药基因: β -内酰胺类 *bla*_{NDM-5}、*bla*_{TEM-1B}; 氨基糖苷类 *aadA2*、*aph(6)-Id*、*aadA22*、*aph(3')-Ia*; 喹诺酮类 *qnrS1*; 甲氧苄啶类 *dfrA12*、*dfrA14*; 大环内酯类 *mph(A)*、*mdf(A)*、*lnu(F)*; 苯丙醇类 *catA1*、*floR*; 磺胺类 *sul3*; 四环素类 *tet(A)* (表 2)。虽然两种菌株对一些抗生素耐药表型相同,但是耐药基因却不同,例如菌株 HN1-26 对四环素的耐药基因是 *tet(B)*,而 XN3-1 是 *tet(A)*。此外,在 HN1-26 中预测到了 *parE* (p.I355T)突变、*gyrA* (p.S83L、p.D87N)双突变和 *parC* (p.S80I、p.E84G)双突变,在 XN3-1 中只预测到了 *gyrA* (p.S83L)突变,并且这些突变均介导了两株菌对喹诺酮类药物萘啶酸和环丙沙星的抗性。

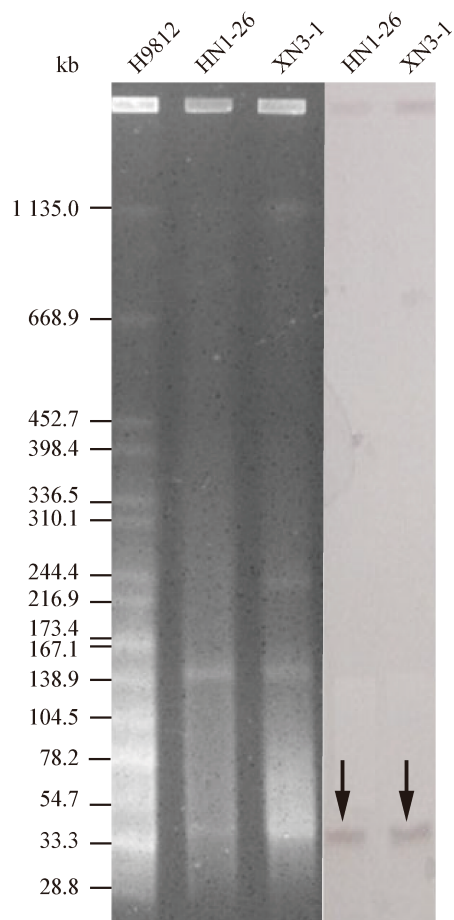


图3 菌株 HN1-26 和 XN3-1 的 S1-PFGE 和 Southern blot 结果

Figure 3 S1-PFGE and Southern blot results of strains HN1-26 and XN3-1

注: 肠炎沙门氏菌血清型 Braenderup H9812 被用作标记; 箭头: 含有 *bla*_{NDM-5} 基因的质粒。

Note: *Salmonella enteric* serovars Braenderup H9812 was used as a marker; Arrows: The plasmid harboring the *bla*_{NDM-5} gene.

两株菌携带 *bla*_{NDM-5} 的质粒通过预测发现是属于 IncX3 型的质粒,该质粒类型已经广泛分离于世界各地的临床上。多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分析^[33]将大肠杆菌 HN1-26 和 XN3-1 归为 ST354 和 ST10,进一步说明了携带 *bla*_{NDM-5} 的大肠杆菌具有种内差异性。与我们先前报道^[6]的在浙江蛋鸡中分离的 pTB203 质粒做比对,差异仅有 3 个 SNP。*bla*_{NDM-5} 基因位于典型的 IS*Aba125*-IS5-*bla*_{NDM-5}-*ble-trpF*-IS26 结构中,与前人报道^[23]的一致(图 4A)。质粒具备完整的接合转

表 2 菌株 HN1-26 和 XN3-1 的获得性耐药基因预测结果

Table 2 Acquired antimicrobial resistance genes of strains HN1-26 and XN3-1

| 抗生素类型 Antibiotic types | HN1-26 | | | XN3-1 | |
|--|----------------|--|--|----------------|--|
| | Susceptibility | Acquired resistance genes | | Susceptibility | Acquired resistance genes |
| β-lactam | AMP R | <i>bla</i> _{TEM-1B} | | R | <i>bla</i> _{TEM-1B} |
| | A/C R | <i>bla</i> _{NDM-5} | | R | <i>bla</i> _{NDM-5} |
| | CEF R | | | R | |
| | CAZ R | | | R | |
| | MEM R | | | R | |
| Aminoglycoside | GEM S | <i>aph</i> (6)- <i>Id</i> , <i>aph</i> (3')- <i>Ia</i> , | | S | <i>aph</i> (6)- <i>Id</i> , <i>aadA2</i> , |
| | SPT S | <i>aph</i> (3'')- <i>Ib</i> | | R | <i>aadA22</i> , <i>aph</i> (3')- <i>Ia</i> |
| Colistin | CL S | | | S | |
| Fluoroquinolone | ENR R | <i>oqxB</i> | | S | <i>qnrS1</i> |
| | OFL R | | | R | |
| Fosfomycin | | | | | |
| MLS-Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B | | <i>mdf</i> (A) | | | <i>Inu</i> (F), <i>mph</i> (A), <i>mdf</i> (A) |
| Phenicol | FFC S | <i>catA1</i> | | R | <i>floR</i> , <i>cmlA1</i> |
| Sulfonamides | SF R | <i>sul2</i> | | R | <i>sul3</i> |
| | SXT R | <i>dfrA17</i> | | R | <i>dfrA12</i> , <i>dfrA14</i> |
| Tetracycline | TET R | <i>tet</i> (B) | | R | <i>tet</i> (A) |

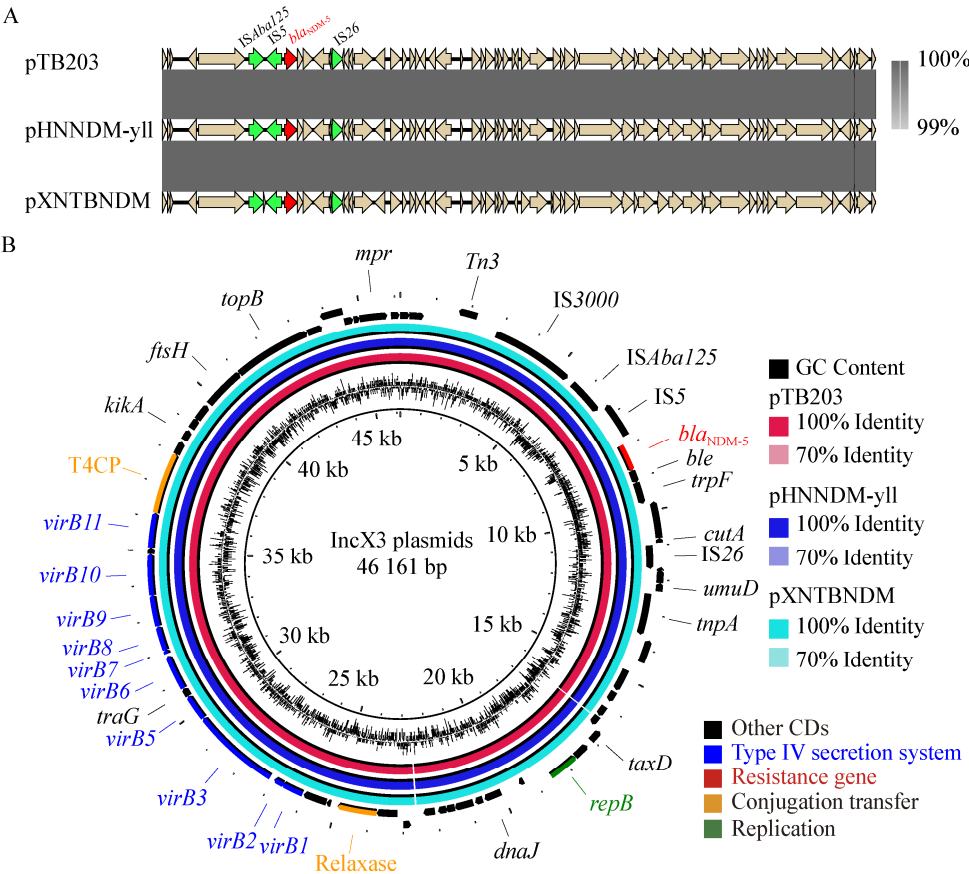


图 4 菌株 HN1-26 和 XN3-1 中质粒 pHNNDM-yII 和 pXNTBNDM 与 pTB203 的比较

Figure 4 Comparison of pHNNDM-yII and pXNTBNDM with pTB203

注：外环代表质粒的注释；基因根据功能注释不同的颜色。

Note: The external ring represents the annotation of plasmids; The genes are colored differently according to the function annotation.

移元件, 包括松弛酶基因、IV 型偶联蛋白编码基因(T4CP)和 IV 型细菌分泌系统基因簇(图 4B)。随后对两个质粒接合转移效率进行了测定, 结果分别为 $(2.58\pm0.14)\times10^{-2}$ 和 $(1.68\pm0.27)\times10^{-3}$, 证实了菌株 HN1-26 和 XN3-1 中携带的 *bla*_{NDM-5} 的质粒可以进行种内转移。

2.4 携带 *bla*_{NDM-5} 的质粒在中国的分布统计

*bla*_{NDM-5} 是分布最普遍的 *bla*_{NDM} 基因的变型体之一。目前世界各地已经从不同来源中发现了携带 *bla*_{NDM-5} 的质粒, 包括临床病人^[34]、动物^[35]和食品^[36]。在中国, 该类型质粒同样在各个省流行, 人类是 *bla*_{NDM-5} 的主要宿主。截至目前, 从家禽和家畜中共报道 23 个含 *bla*_{NDM-5} 的 IncX3 型质粒(表 3), 包括 2016 年从四川的猪中检测到的 1 个质粒^[25], 2017 年从浙江的蛋鸡中检测到 1 个质粒^[6], 2018 和 2019 年分别从江苏的奶牛和鹅中检测到 10 个质粒^[37]和 9 个质粒^[21], 2019 年从浙江和陕西西安的鸭和鸡粪便中检测到的 2 个质粒(本研究)。说明该质粒流行性

较强, 人和动物可以相互传播, 另外未分离到的省可能与医疗科研水平、取样少有很大关系。

3 讨论与结论

重要耐药细菌的流行会影响公共卫生安全, 危害人类健康, 一直以来都是被人们高度重视的问题。前人已报道了从临床、食品、动物和环境分离到相同类型的对人类具有威胁的病原菌, 如碳青霉烯类或粘菌素耐药的肠杆菌科细菌^[38-41]。本次研究从陕西西安和浙江海宁的家禽养殖场中发现了含有 *bla*_{NDM-5} 基因的大肠杆菌, 序列型分别为 ST10 和 ST354, *bla*_{NDM-5} 基因均由 IncX3 型质粒携带。根据药物敏感实验的结果显示, 菌株 HN1-26 和 XN3-1 分别对 10 种和 12 种不同的抗生素具有耐药性, 并且基本可以从获得性耐药基因和基因组突变得到解释。此次研究中, 还证实了菌株 HN1-26 和 XN3-1 中携带 *bla*_{NDM-5} 的 IncX3 型质粒具有接合转移的能力, 具有传播风险。

表 3 食品动物中携带 *bla*_{NDM-5} 的 IncX3 质粒在中国的分布

Table 3 The distribution of IncX3-plasmids carrying *bla*_{NDM-5} isolated from food animals in China

| 菌株 | 质粒 | 长度 | 物种 | 宿主 | 省 | 登录号 | 文献 |
|-----------|------------|-------------|------------------------------|-------|-----------|---------------|------------|
| Stains | Plasmids | Length (bp) | Species | Host | Provinces | Accession No. | References |
| L37 | pL37-2 | 45 650 | <i>Escherichia coli</i> | Goose | Jiangsu | CP034591 | [21] |
| L65 | pL65-2 | 46 161 | <i>Escherichia coli</i> | Goose | Jiangsu | CP034744 | [21] |
| L100 | pL100-2 | 46 261 | <i>Escherichia coli</i> | Goose | Jiangsu | CP034748 | [21] |
| L103-2 | pL103-2-2 | 46 163 | <i>Escherichia coli</i> | Goose | Jiangsu | CP034847 | [21] |
| L33 | Unknown | ~46 000 | <i>Escherichia coli</i> | Goose | Jiangsu | | [21] |
| 1L43-1 | Unknown | ~46 000 | <i>Escherichia coli</i> | Goose | Jiangsu | | [21] |
| L102 | Unknown | ~46 000 | <i>Escherichia coli</i> | Goose | Jiangsu | | [21] |
| L103-1 | Unknown | ~46 000 | <i>Escherichia coli</i> | Goose | Jiangsu | | [21] |
| L99 | Unknown | ~46 000 | <i>Escherichia coli</i> | Goose | Jiangsu | | [21] |
| XG-K3 | Unknown | ~46 000 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Cow | Jiangsu | | [36] |
| XG-K4 | Unknown | ~46 000 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Cow | Jiangsu | | [36] |
| XG-K9 | Unknown | ~46 000 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Cow | Jiangsu | | [36] |
| TQ-K1 | pNDM-Kpn-1 | 46 161 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Cow | Jiangsu | | [36] |
| TQ-K2 | Unknown | ~46 000 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Cow | Jiangsu | | [36] |
| TQ-K3 | Unknown | ~46 000 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Cow | Jiangsu | | [36] |
| TQ-K4 | Unknown | ~46 000 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Cow | Jiangsu | | [36] |
| K11424 | Unknown | ~46 000 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Cow | Jiangsu | | [36] |
| K12016 | Unknown | ~46 000 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Cow | Jiangsu | | [36] |
| YZ-K1 | Unknown | ~46 000 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Cow | Jiangsu | | [36] |
| Unknown | pECNDM101 | 46 165 | <i>Eshcherichia coli</i> | Swine | Sichuan | KX507346 | [25] |
| ECCRA-119 | pTB203 | 46 161 | <i>Eshcherichia coli</i> | Hen | Zhejiang | CP029245 | [6] |
| HN1-26 | pHNNDM-yl1 | 46 161 | <i>Eshcherichia coli</i> | Duck | Zhejiang | CM018322 | This study |
| XN3-1 | pXNTBNDM | 46 161 | <i>Eshcherichia coli</i> | Hen | Shaanxi | CM018321 | This study |

值得注意的是, 菌株 HN1-26 和 XN3-1 的来源和 ST 型虽然均不相同, 但是其所含质粒 pHNNDM-yl1 和 pXNTBNDM 的序列完全一致, 并与已经报道的大肠杆菌分离株 EC119 的 pTB203 质粒序列也仅有 3 个碱基位点的差异, 这些结果表明 IncX3 型质粒是 *bla*_{NDM-5} 基因传播的高效载体, 且序列高度保守。本文分离的两株大肠杆菌携带 *bla*_{NDM-5} 基因的质粒完全一致, 对美罗培南的 MIC 值均为 64 µg/mL, 但是在进一步在对两株菌进行生长曲线的测定时发现, 两株菌对美罗培南表现出细微的抗药性差异, 菌株 HN1-26 相对 XN3-1 较强。造成这种情况的原因一方面是菌株的遗传背景差异可能造成对 *bla*_{NDM-5} 基因的表达强度不同, 或者不同菌株自身对美罗培南的抗性程度有一定差异; 另一方面也有可能是菌株携带其他耐药基因, 对美罗培南的抗性有交叉影响。以上 3 株菌都是从动物粪便中分离, 结合在人群中流行的文献报道^[13], 表明了携带 *bla*_{NDM-5} 基因的 IncX3 型质粒在中国畜禽养殖中传播的严重性。碳青霉烯类抗生素在动物中禁用, 因此相关抗性基因很可能是从人传给动物。遏制耐药性, 必须将人、动物和环境作为一个整体考虑, 始终坚持 One Health 理念^[42-43], 加强养殖动物的碳青霉烯类耐药菌的监测。

REFERENCES

- [1] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-β-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(12): 5046-5054
- [2] Mai WH, Chen DK, Li J, et al. Isolation and drug-resistant gene analysis of *Escherichia coli* strain carrying *bla*_{NDM-5} in Hainan province, China[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2016, 34(5): 354-357 (in Chinese)
麦文慧, 陈东科, 李娟, 等. 海南地区 1 株携带 *bla*_{NDM-5} 大肠埃希氏菌的分离及耐药基因分析[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(5): 354-357
- [3] Pál T, Ghazawi A, Darwish D, et al. Characterization of NDM-7 carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolates in the Arabian Peninsula[J]. Microbial Drug Resistance, 2017, 23(7): 871-878
- [4] Peirano G, Schreckenberger PC, Pitout JDD. Characteristics of NDM-1-producing *Escherichia coli* isolates that belong to the successful and virulent clone ST131[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(6): 2986-2988
- [5] Wang B, Sun DC. Detection of NDM-1 carbapenemase-producing *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter junii* in environmental samples from livestock farms[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015, 70(2): 611-613
- [6] Tang B, Chang J, Cao LJ, et al. Characterization of an NDM-5 carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST156 isolate from a poultry farm in Zhejiang, China[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 82
- [7] Hornsey M, Phee L, Wareham DW. A novel variant, NDM-5, of the New Delhi Metallo-β-lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(12): 5952-5954
- [8] Baek JY, Cho SY, Kim SH, et al. Plasmid analysis of *Escherichia coli* isolates from South Korea co-producing NDM-5 and OXA-181 carbapenemases[J]. Plasmid, 2019, 104: 102417
- [9] Mao JP, Liu WG, Wang W, et al. Antibiotic exposure elicits the emergence of colistin- and carbapenem-resistant *Escherichia coli* coharboring MCR-1 and NDM-5 in a patient[J]. Virulence, 2018, 9(1): 1001-1007
- [10] Nakano R, Nakano A, Hikosaka K, et al. First report of metallo-β-lactamase NDM-5-producing *Escherichia coli* in Japan[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(12): 7611-7612
- [11] Rojas LJ, Hujer AM, Rudin SD, et al. NDM-5 and OXA-181 beta-lactamases, a significant threat continues to spread in the Americas[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(7): e00454-17
- [12] Li X, Fu Y, Shen MY, et al. Dissemination of *bla*_{NDM-5} gene via an IncX3-type plasmid among non-clonal *Escherichia coli* in China[J]. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 2018, 7: 59
- [13] Shen ZQ, Hu YY, Sun QL, et al. Emerging carriage of NDM-5 and MCR-1 in *Escherichia coli* from healthy people in multiple regions in China: a cross sectional observational study[J]. EClinicalMedicine, 2018, 6: 11-20
- [14] Wailan AM, Paterson DL, Caffery M, et al. Draft genome sequence of NDM-5-producing *Escherichia coli* sequence type 648 and genetic context of *bla*_{NDM-5} in Australia[J]. Genome Announcements, 2015, 3(2): e00194-15
- [15] Krishnaraju M, Kamatchi C, Jha AK, et al. Complete sequencing of an IncX3 plasmid carrying *bla*_{NDM-5} allele reveals an early stage in the dissemination of the *bla*_{NDM} gene[J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2015, 33(1): 30-38
- [16] Hong JS, Song W, Park HM, et al. First detection of new delhi metallo-β-lactamase-5-producing *Escherichia coli* from companion animals in Korea[J]. Microbial Drug Resistance,

- 2019, 25(3): 344-349
- [17] Sekizuka T, Inamine Y, Segawa T, et al. Characterization of NDM-5-and CTX-M-55-coproducing *Escherichia coli* GSH8M-2 isolated from the effluent of a wastewater treatment plant in Tokyo Bay[J]. Infection and Drug Resistance, 2019, 12: 2243-2249
- [18] Brinkac LM, White R, D'Souza R, et al. Emergence of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM-5) in *Klebsiella quasipneumoniae* from neonates in a Nigerian hospital[J]. mSphere, 2019, 4(2): e00685-18
- [19] Mouftah SF, Pál T, Darwish D, et al. Epidemic IncX3 plasmids spreading carbapenemase genes in the United Arab Emirates and worldwide[J]. Infection and Drug Resistance, 2019, 12: 1729-1742
- [20] Wang ZZ, Li ML, Shen XF, et al. Outbreak of *bla*_{NDM-5}-harboring *Klebsiella pneumoniae* ST290 in a tertiary hospital in China[J]. Microbial Drug Resistance, 2019, 25(10): 1443-1448
- [21] Liu ZY, Xiao X, Li Y, et al. Emergence of IncX3 plasmid-harboring *bla*_{NDM-5} dominated by *Escherichia coli* ST48 in a goose farm in Jiangsu, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2002
- [22] Zhu YQ, Zhao JY, Xu C, et al. Identification of an NDM-5-producing *Escherichia coli* sequence type 167 in a Neonatal patient in China[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29934
- [23] Zhang FF, Xie LY, Wang XL, et al. Further spread of *bla*_{NDM-5} in *Enterobacteriaceae* via IncX3 plasmids in Shanghai, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 424
- [24] Liao XP, Yang RS, Xia J, et al. High colonization rate of a novel carbapenem-resistant *Klebsiella lineage* among migratory birds at Qinghai Lake, China[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2019, 74(10): 2895-2903
- [25] Kong LH, Lei CW, Ma SZ, et al. Various sequence types of *Escherichia coli* isolates coharboring *bla*_{NDM-5} and *mcr-1* genes from a commercial swine farm in China[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(3): e02167-16
- [26] Xu YL, Wang JL, Zhang AM, et al. Rapid detection and identification on 16S rRNA gene of enteropathogenic[J]. Modern Preventive Medicine, 2011, 38(7): 3528-3529 (in Chinese)
- 许玉玲, 王建丽, 张爱梅, 等. 肠道致病菌 16S rRNA 基因的快速检测和鉴定[J]. 现代预防医学, 2011, 38(7): 3528-3529
- [27] Zankari E, Hasman H, Cosentino S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(11): 2640-2644
- [28] 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
- [29] Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer[J]. Bioinformatics, 2011, 27(7): 1009-1010
- [30] Alikhan NF, Petty NK, Zakour NLB, et al. BLAST ring image generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 402
- [31] 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
- [32] Tang B, Zhang L, Chang J, et al. Antimicrobial resistance of two *Escherichia fergusonii* strains isolated from chicken feces[J]. Microbiology China, 2019, 46(11): 3022-3029 (in Chinese)
- 唐标, 张玲, 常江, 等. 两株分离自鸡粪便费格森埃希菌的耐药性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 3022-3029
- [33] Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(4): 1355-1361
- [34] Sassi A, Loucif L, Gupta SK, et al. NDM-5 carbapenemase-encoding gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* from Algeria[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(9): 5606-5608
- [35] Tyson GH, Li C, Ceric O, et al. Complete genome sequence of a carbapenem-resistant *Escherichia coli* isolate with *bla*_{NDM-5} from a dog in the United States[J]. Microbiology Resource Announcements, 2019, 8(34): e00872-19
- [36] Liu BT, Zhang XY, Wan SW, et al. Characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in ready-to-eat vegetables in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1147
- [37] He T, Wang Y, Sun LC, et al. Occurrence and characterization of *bla*_{NDM-5}-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates from dairy cows in Jiangsu, China[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72(1): 90-94
- [38] Gao RS, Hu YF, Li ZC, et al. Dissemination and mechanism for the MCR-1 colistin resistance[J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(11): e1005957
- [39] Gao RS, Wang QJ, Li P, et al. Genome sequence and characteristics of plasmid pWH12, a variant of the *mcr-1*-harbouring plasmid pHNSHP45, from the multi-drug resistant *E. coli*[J]. Virulence, 2016, 7(6): 732-735
- [40] Liu ZH, Li JY, Wang XM, et al. Corrigendum: novel variant of new delhi metallo- β -lactamase, NDM-20, in *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 497
- [41] Wang QJ, Sun J, Ding YF, et al. Genomic insights into *mcr-1*-positive plasmids carried by colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from inpatients[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(7): e00361-17
- [42] Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, et al. Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and One Health perspectives[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1789
- [43] Wang XZ, Lin Z, Lu JH, et al. One Health strategy to prevent and control antibiotic resistance[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(8): 1361-1367 (in Chinese)
- 王宣焯, 林震宇, 陆家海, 等. 抗生素耐药防控的 One Health 策略[J]. 生物工程学报, 2018, 34(8): 1361-1367