

• 论 著 •

不同来源菌株中 8 种 mcr 亚型基因筛查及阳性菌株药敏分析*

赖斯华¹, 黄欢欢¹, 谢闰娥¹, 曾文创², 杨 玲³, 徐 霞^{1△}

(1. 广州医科大学金域检验学院, 广东广州 510030; 广州医科大学第一附属医院; 2. 呼吸疾病国家重点实验室; 3. 检验科, 广东广州 510030)

摘 要: **目的** 了解 8 种 mcr 亚型基因在不同来源临床标本细菌中的分布及阳性菌株的药敏情况。**方法** 采用 PCR 法分别对 128 株粪便标本分离的耐黏菌素菌株和 130 株临床感染标本分离的耐碳青霉烯菌株检测 8 种 mcr 亚型基因及 mcr 阳性菌株的碳青霉烯酶基因, 对阳性基因扩增产物进行测序分析; 对 mcr 阳性的菌株进行质谱鉴定和药敏分析; 质粒接合实验验证 mcr 基因的可转移性; 采用 PCR 法对质粒进行分型和检测 12 种毒力基因的存在情况。**结果** 128 株耐黏菌素菌株均没有发现 mcr2、mcr3、mcr4、mcr5、mcr6、mcr7、mcr8 基因; 130 株耐碳青霉烯菌株中没有发现 mcr2、mcr3、mcr4、mcr5、mcr6、mcr7、mcr8 基因。该 mcr1 阳性株不携带碳青霉烯酶基因, 药敏结果显示多重耐药性, 对黏菌素为中介, 对磺胺类、喹诺酮、碳青霉烯类、绝大部分头孢类药物等耐药, 产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)。mcr1 阳性菌株质粒接合成功; mcr1 阳性菌株携带 6 种质粒型及 3 种毒力基因。**结论** 在肠道中耐黏菌素菌株和临床上耐碳青霉烯分离株中 mcr1 存在一定的流行率, 其余 7 型的 mcr 基因流行率尚低; 为探究 mcr 基因与 ESBLs 和碳青霉烯酶之间的关系提供一定的临床依据。

关键词: mcr 基因; 肠道菌群; 多黏菌素耐药; 碳青霉烯耐药

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.24.007

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2020)24-2970-04

文献标识码: A

Screen of 8 subtypes of the mcr gene in isolates from different clinical specimens and analysis on the drug-sensitivity of positive strains*

LAI Sihua¹, HUANG Huanhuan¹, XIE Guie¹, ZENG Wenchuang², YANG Ling³, XU Xia^{1△}

(1. KingMed School of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510030, China; 2. Laboratory of Respiratory Disease, National Clinical Research Center for Respiratory Disease; 3. Department of Clinical Laboratory, the First Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510030, China)

Abstract: **Objective** To investigate the prevalence of 8 subtypes of the mcr gene in bacteria from different sources of clinical samples and the drug sensitivity of positive strains. **Methods** The PCR was applied to detect 8 subtypes of the mcr gene and the carbapenemase gene of the mcr-positive strain in 128 colistin-resistant strains isolated from fecal samples and 130 carbapenem-resistant strains isolated from clinically infected samples, and the sequence of positive amplification products was analyzed. The mcr-positive strains were identified by mass spectrometry and the drug sensitivity was analyzed. The plasmid transfer assay was performed to verify the transfer of mcr gene. PCR was used to type the plasmids and detect the presence of 12 virulence-related genes. **Results** No mcr2, mcr3, mcr4, mcr5, mcr6, mcr7, and mcr8 gene was found in 128 strains of colistin-resistance. None of the mcr2, mcr3, mcr4, mcr5, mcr6, mcr7, and mcr8 gene was found in 130 clinical samples of carbapenem-resistance. The mcr1-positive strain of carbapenem-resistance did not carry the carbapenemase gene, and its result of the antibiotic susceptibility test showed that it was intermediate to colistin. It was generally resistant to the drugs of sulfonamides, quinolones, carbon Penicillins, cephalosporins and so on. It also produced ESBLs. The mcr1-carrying isolate could transfer the mcr1 gene to the recipient strains successfully. 6 types of incompatibility plasmids and 3 types of virulence-related genes were detected in mcr1-carrying isolates. **Conclusion** There is a certain prevalence of mcr1 in the gut bacteria-resistant strains and the clinical

* 基金项目: 广东省自然科学基金项目(2017A030313906); 广州医科大学大学生实验室开放项目(2018-22)。

作者简介: 赖斯华, 女, 硕士研究生在读, 主要从事细菌感染流行性及耐药机制研究。△ 通信作者, E-mail: xuxia503@126.com。

本文引用格式: 赖斯华, 黄欢欢, 谢闰娥, 等. 不同来源菌株中 8 种 mcr 亚型基因筛查及阳性菌株药敏分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(24): 2970-2973.

carbapenem-resistant strains, and the prevalence of the remaining 7 types of mcr gene is still low. This paper provides the clinical basis to study the relationship between the mcr gene with ESBLs and carbapenemase.

Key words: mcr gene; gut microbiota; polymyxin resistance; carbapenem-resistance

近年来,我国所面临的革兰阴性杆菌耐药问题尤为严峻,包括产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)肠杆菌科细菌、耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌等^[1]。其中,为治疗耐碳青霉烯类肠杆菌,多黏菌素重新进入临床使用,其成为治疗耐碳青霉烯类菌株的“最后一道防线”。过去认为,黏菌素的耐药是由染色体相关基因突变引起的,其耐药性不能在细菌间传播。然而,2015 年中国学者 LIU 等^[2]首次发现质粒携带黏菌素耐药基因 mcr1,证实了黏菌素的耐药性也可以通过质粒在不同菌属间进行水平传播,治疗耐碳青霉烯类菌株的最后一道防线被打破,给临床治疗感染提出了巨大的挑战。

从 mcr1 基因开始被报道至 2019 年 4 月,共发现了 7 种 mcr1 的变异体,分别为 mcr2、mcr3、mcr4、mcr5、mcr6、mcr7、mcr8^[3]。目前,mcr 亚型基因在肠道菌群中和在耐碳青霉烯菌株中的流行率尚不明确。本研究通过筛查住院患者和体检人群的粪便标本中耐黏菌素菌株中 mcr 亚型基因的携带情况,以及临床分离标本中耐碳青霉烯菌株中 mcr 亚型基因的携带情况,比较不同标本中 mcr 亚型基因的流行情况,并探究携带 mcr 基因的菌株与黏菌素及碳青霉烯类药物的耐药表型之间的关系。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 粪便菌株为 2017 年 6—10 月广州医科大学附属第一医院的住院患者 1 263 份粪便标本分离的 92 株耐黏菌素菌株及广州金域体检中心体检的 750 份粪便标本分离的 36 株耐黏菌素菌株(黏菌素耐药: ≥ 2 mg/L),同时保存患者的临床资料(包括性别、年龄、就诊科室、病史)。临床分离菌株为广州医科大学附属第一医院检验科微生物室 2017 年 1 月至 2018 年 7 月的痰、尿液、分泌物等临床标本。对每一份标本同时进行 3 种碳青霉烯类药物的药敏实验,收集和保存厄他培南(耐药: ≥ 2 mg/L)、亚胺培南(耐药: ≥ 4 mg/L)和美罗培南(耐药: ≤ 19 mm)其中一种或以上碳青霉烯类药物耐药的菌株,共得到 130 株耐碳青霉烯菌株,收集菌株的同时记录患者临床资料(科室、年龄、性别、分离日期等)。大肠埃希菌 J53 由广州医科大学附属第一医院检验科惠赠。

1.2 仪器与试剂 LB 肉汤干粉、麦康凯琼脂粉、营养琼脂购自广州环凯微生物公司;PCR 及电泳相关产品购自广州瑞真生物技术有限公司;电泳琼脂糖购自法国 Biowest 公司;所有引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司;G:BOX 凝胶成像系统购自英国 Syngene 公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌基因组 DNA 提取 挑取单菌落用 5 mL 的 LB 液体培养基培养,180 r/min,37 $^{\circ}$ C 摇菌 6 h。参照 QIAamp DNA 小提试剂盒使用说明书提取细菌基因组 DNA,−20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 耐药基因筛查 用 PCR 法对 138 株耐黏菌素的粪便分离菌株和 130 株耐碳青霉烯的临床分离菌株进行 mcr 基因(mcr1、mcr2、mcr3、mcr4、mcr5、mcr6、mcr7、mcr8)的特异性引物筛查,具体的引物参考国外相关文献[3-5]合成,见表 1。特异性筛查 mcr1 为阳性的菌株用全长序列(1 626 bp)的扩增引物 MCR-F(5'-ATGATGCAGCATACTTCTGTGT-3')及 MCR-R(5'-TCAGCGGATGAATGCG-3')进行扩增,将产物送至上海生工生物工程股份有限公司测序,并进行 BLAST 比对证实扩增产物基因的正确性。此外,对含 mcr 基因的阳性菌株进行 11 种碳青霉烯酶基因扩增(blaIMP、blaSPM、blaVIM、blaKPC、blaNDM、blaBIC、blaOXA-48、blaAIM、blaDIM、blaGIM 和 blaSIM)^[6],确定碳青霉烯酶基因是否存在。

表 1 8 种 mcr 基因的特异性筛查引物

引物	序列(5'→3')	产物大小 (bp)
MCR-1F	ATGCCAGTTTCTTTTCGCGTG	502
MCR-1R	TCGGCAAATTGCGCTTTTGGC	
MCR-2F	GATGGCGGTCTATCCTGTAT	379
MCR-2R	AAGGCTGACACCCCATGTCAT	
MCR-3F	ACCAGTAAATCTGGTGGCGT	296
MCR-3R	AGGACAACCTCGTCATAGCA	
MCR-4F	TTGCAGACGCCCATGGAATA	207
MCR-4R	GCCGCATGAGCTAGTATCGT	
MCR-5F	GGACGCGACTCCCTAACTTC	608
MCR-5R	ACAACCAAGTACGAGAGCACG	
MCR-6F	GTCCGGTCAATCCCTATCTGT	556
MCR-6R	ATCACGGGATTGACATAGCTAC	
MCR-7F	AGGGGATAAACCGACCCTGA	335
MCR-7R	TGATCTCGATGTTGGGCACC	
MCR-8F	AACCGCCAGAGCACAGAATT	667
MCR-8R	TTCCCCAGCGATTCTCCAT	

1.3.3 菌株鉴定及药物敏感试验 按照质谱仪及法国生物梅里埃 VITEK-2 药敏分析系统操作说明书进行细菌鉴定和药敏分析。抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC)试验用微量肉汤稀释法,结果参照美国临床和实验室标准协会(CLSI) M100—S26 标准判读,黏菌素的药敏折点参照 EUCAST7.0 版判读标准(敏

感:≤2 mg/L)。

1.3.4 质粒接合实验 用 mcr1 基因阳性菌株作为供体菌,大肠埃希菌 J53 作为受体菌,接合前进行供受体菌的抗性验证。能在双抗培养基(含 2 mg/L 黏菌素及 150 mg/L 叠氮钠)生长的为接合子,挑取单个菌落在双抗培养基中传代培养 3 代,获得稳定传代的接合子。用 PCR 法验证接合子中 mcr1 基因的存在。

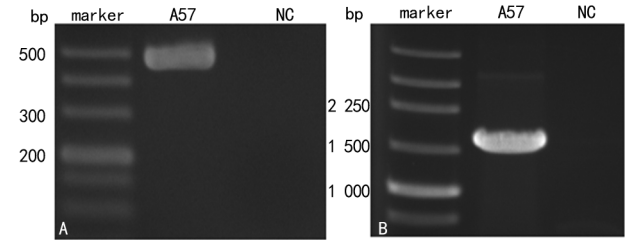
1.3.5 质粒复制子分型 用基于 PCR 的质粒复制子分型法对肠杆菌科细菌中 18 个主要质粒家族复制子(HI1、HI2、I1/Iγ、X、L/M、N、FIA、FIB、W、Y、P、T、FIC、A/C、FIIs、K、B/O、F)^[7]进行检测,并增加对 IncX1-IncX4^[8]的检测。用以上质粒复制子引物对 mcr1 基因阳性菌株进行 PCR 扩增,产物测序后比对得出相应的复制子类型。

1.3.6 毒力基因检测 用特异性 PCR 法,对 mcr1 阳性大肠埃希菌进行 12 种毒力因子的检测(stx1、stx2、eae、hlyA^[9], fyuA、iutA、sfa/foc、ibeA、fimH、cnf-1、papC 和 kpsMT II^[10])。

2 结 果

2.1 耐药基因筛查 128 株耐黏菌素的粪便标本分离株中(92 株来自住院患者和 36 株来自体检人群)筛查 mcr2、mcr3、mcr4、mcr5、mcr6、mcr7、mcr8 共 7 种 mcr 亚型基因,均未发现阳性基因。

130 株耐碳青霉烯菌株筛查 mcr1、mcr2、mcr3、mcr4、mcr5、mcr6、mcr7、mcr8 共 8 种 mcr 亚型基因,发现 1 株 mcr1 阳性菌株——A57 号菌株。经 mcr1 全长序列扩增并 BLAST 比对后,相似性为 100%,确证 A57 号携带 mcr1 阳性基因,PCR 结果见图 1。对 mcr1 阳性的菌株 A57 进行 11 种碳青霉烯酶基因扩增,未发现碳青霉烯酶阳性基因。



注:A 为 mcr1 基因 502 bp 特异性片段扩增电泳图;B 为 mcr1 基因全长序列 1 626 bp 扩增电泳图。

图 1 PCR 扩增电泳图

2.2 mcr 阳性菌株鉴定及药物敏感试验 A57 号菌株经质谱鉴定为大肠埃希菌。如表 2 所示,其药敏结果显示对黏菌素的 MIC 为 2 mg/L,判读为中介,ES-BLs 检测阳性,并对 19 种药物表现出耐药差异性,对头孢类、青霉素类、喹诺酮及磺胺类药物等 12 种药物表现出耐药性(58%, 11/19),其中对一、二、三、四代头孢类药物表现出耐药性(88%, 8/9)。

表 2 携带 mcr1 基因的大肠埃希菌药物敏感试验结果

菌株 编号	MIC(ng/L)/判读																		
	SFP	TAZ	AN	SXT	TAX	FEP	IMI	TZP	TQC	ETP	LEV	MEM	CZ	ROX	AMC	FOX	CTR	ROXA	PB
A57	16/S	≥64/R	4/S	≥320/R	R	≥32/R	≤0.25/S	8/S	1/S	6/R	≥8/R	28/S	6/R	≥64/R	≥32/R	16/I	≥64/R	≥64/R	2/I

注:SFP 为头孢哌酮;TAZ 为头孢他啶;AN 为阿米卡星;SXT 为复方磺胺甲噁唑;TAX 为头孢噻肟;FEP 为头孢吡肟;IMI 为亚胺培南;TZP 为替拉西林;TQC 为替加环素;ETP 为厄他培南;LEV 为左氧氟沙星;MEM 为美罗培南;CZ 为头孢唑林;ROX 为头孢呋辛钠;AMC 为阿莫西林;FOX 为头孢西丁;CTR 为头孢曲松;ROXA 为头孢呋辛酯;PB 为黏菌素;S 为敏感;I 为中介;R 为耐药。

2.3 质粒接合 mcr1 基因阳性的菌株质粒接合成功,获得稳定传代的接合子,PCR 验证接合子中含有 mcr1 基因,即 mcr1 基因存在于质粒上,并能通过质粒转移。

2.4 质粒复制子分型与毒力基因检测 mcr1 基因阳性菌株携带 6 种质粒,分别为 IncFIB、IncFIC、IncA/C、IncI1、IncFrepB、IncX4。mcr1 基因阳性菌株携带 3 种毒力基因,分别为编码 I 型菌毛黏附素的基因 fimH、与铁摄取相关的气杆菌素受体的基因 iutA、与荚膜形成相关的基因 kpsMT II。

3 讨 论

mcr1 基因的发现证实黏菌素的耐药性可通过质粒在不同种属的细菌间进行水平传播,黏菌素耐药率可迅速提高,因此,自 2015 年来,国际上掀起了研究 mcr 基因的热潮。在很短的时间内,mcr1 基因已经在 6 个大洲(除南极洲)的 18 个国家中被发现。迄今为止,除了 mcr1 以外,关于 mcr2~mcr8 基因在人类样

本中流行情况的数据较少。中国香港一家医院收集 2016 年的 672 份粪便标本,检测出 14 株 mcr1 基因阳性大肠埃希菌^[11]。苏州一家医院收集了 134 例接受不孕不育评估女性的阴道拭子标本,其中 mcr4 基因检出率为 12.7%,mcr3 和 mcr2 基因检出率均为 15.0%,mcr1 和 mcr5 基因检出率为 0.7%^[12]。在另外一项国内的研究中发现,mcr3 基因在猪和农民中的检出率为 0.75%,分布于 13 个省,广东省发现 2 例农民携带 mcr3 基因^[13]。8 种 mcr 亚型基因在人类身上的流行率尚十分不明确,本研究选取了 mcr1 流行率高的肠道细菌来探究 mcr 亚型基因的流行情况。

在收集的耐黏菌素菌株中,前期研究已经发现 3 株 mcr1 基因阳性菌株^[14]。本研究在 128 份耐黏菌素粪便标本中均没有检出 mcr2、mcr3、mcr4、mcr5、mcr6、mcr7、mcr8 这 7 种亚型基因,说明除 mcr1 基因外,其余 mcr 亚型基因在肠道菌群中流行率非常低。在耐碳青霉烯类药物的 130 份临床感染标本中,发现

1 例由痰标本分离得到的 *mcr1* 基因阳性的大肠埃希菌菌株 A57 号(0.76%),但没有检出其余 7 种 *mcr* 亚型基因,说明耐碳青霉烯菌株中 *mcr* 的流行率不高。在我国的临床标本中还是以 *mcr1* 基因为主,其次为 *mcr2*、*mcr3* 和 *mcr4*,*mcr5*、*mcr6* 和 *mcr7* 比较少见,但由于旅游人员及动物的流通,仍需动态观察我国 *mcr* 亚型基因的流行情况,以防 *mcr* 的大规模流行,使治疗陷入无药可用的局面。

黏菌素被认为是用于治疗耐碳青霉烯菌株的有效药物,*mcr1* 基因与碳青霉烯耐药基因同时存在,这成为全球的一大关注点。本研究中,*mcr1* 基因阳性的大肠埃希菌尽管没有筛查到碳青霉烯酶基因,但该菌株对碳青霉烯类药物耐药的同时也对黏菌素耐药,这使临床上可选择的治疗药物大大减少。本研究中 *mcr1* 基因阳性的大肠埃希菌产 ESBLs,该菌株几乎对所有的头孢类药物耐药:对一、二代头孢类药物均耐药,三代头孢类药物中只对头孢哌酮敏感。*IncX4*、*IncI1* 型质粒为常见的质粒型传播 *mcr1* 基因。质粒接合实验证实 *mcr1* 基因可以通过水平方式转移到大肠埃希菌 J53 中,说明 *mcr1* 基因在肠杆菌科细菌之间存在潜在传播的风险。WANG 等^[15] 从养鸡场、农场、废水、苍蝇、屠宰场和超市中分离的细菌中检测到 *mcr1* 基因,这说明 *mcr1* 基因已经广泛存在于人类生活的环境中,成为细菌感染治疗中的巨大隐患。

4 结 论

本文探究了 *mcr* 亚型基因在广东地区的不同标本中的流行率,其中 *mcr1* 在肠道细菌中检出率较高。尽管目前 *mcr* 亚型基因的流行率尚低,但其爆发将会造成严重后果,仍需从人类、动物和环境 3 个方面持续监测 *mcr* 亚型基因的流行率,及时有效地防控 *mcr* 亚型基因的扩散。

参考文献

- [1] KHAN S N, KHAN A U. Breaking the spell: combating multidrug resistant 'superbugs'[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7(4):174-177.
- [2] LIU Y, WANG Y, WALSH T R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(2):161-168.
- [3] WANG X, WANG Y, ZHOU Y, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. [J]. *Emerg Microb Infect*,

- 2018, 7(1):122-127.
- [4] ZHANG J, CHEN L, WANG J, et al. Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1* to *mcr-5*) in human vaginal swabs[J]. *BMC Res Notes*, 2018, 11(1):143-151.
- [5] YANG Y Q, LI Y X, LEI C W, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(7):1791-1795.
- [6] POIREL L, WALSH T R, CUVILLIER V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70(1):119-123.
- [7] CARATTOLI A, BERTINI A, VILLA L, et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing[J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 63(3):219-228.
- [8] JOHNSON T J, BIELAK E M, FORTINI D, et al. Expansion of the *IncX* plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*[J]. *Plasmid*, 2012, 68(1):43-50.
- [9] GARCIA-GRAELLS C, DE KEERSMAECKER S C J, VANNESTE K, et al. Detection of plasmid-mediated colistin resistance, *mcr-1* and *mcr-2* genes, in *Salmonella* spp. isolated from food at retail in Belgium from 2012 to 2015[J]. *Foodborn Pathog Dis*, 2018, 15(2):114-117.
- [10] JOHNSON J R, STELL A L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(1):261-272.
- [11] CHAN W, AU C, HO D N, et al. Prospective study on human fecal carriage of *Enterobacteriaceae* possessing *mcr-1* and *mcr-2* genes in a regional hospital in Hong Kong[J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1):81-95.
- [12] ZHANG J, CHEN L, WANG J, et al. Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1* to *mcr-5*) in human vaginal swabs[J]. *BMC Res Notes*, 2018, 11(1):143-161.
- [13] XU Y, ZHONG L, SRINIVAS S, et al. Spread of MCR-3 colistin resistance in China: an epidemiological, genomic and mechanistic study[J]. *EBioMedicine*, 2018, 34(6):139-157.
- [14] 黄欢欢, 陈定强, 钱诚杰, 等. 粪便标本中携带 *mcr-1* 基因革兰阴性杆菌的分离与分子特征分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2019, 39(3):192-196.
- [15] WANG Y, ZHANG R, LI J, et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production[J]. *Nat Microbiol*, 2017, 2(4):16260.

(收稿日期:2020-03-03 修回日期:2020-07-16)