

多黏菌素耐药基因的变异特征及传播规律的研究现状

孙 赫, 张亚超, 上官振坤, 张 益, 范若兰, 李 航, 关松磊*, 张林波*

(吉林农业大学生命科学院病原微生物与免疫学研究室, 长春 130118)

摘 要: 从2015年在中国首次发现质粒介导的黏菌素耐药基因 *mcr-1* 以来, 已经报道的黏菌素耐药基因有5大类, *mcr-1*、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4*、*mcr-5*。为了全面掌握各类黏菌素耐药基因的特征和传播规律, 为今后制定防控措施提供参考, 作者对该耐药基因的特征和传播规律进行总结, 发现: 1) 序列差异大: 目前发现的黏菌素耐药基因 *mcr-1*~*mcr-5*, 其核苷酸序列和氨基酸序列差异较大, 这些耐药基因的来源不同, 如 MCR-5 的氨基酸序列与 MCR-1、MCR-2、MCR-3、MCR-4 分别只有 36.11%、35.29%、34.72% 和 33.71% 的一致性。2) 变异亚型多: 除 *mcr-5* 外, 目前各类 *mcr* 都有若干亚型存在, *mcr-1* 和 *mcr-3* 都有 10 余种亚型。3) 与其他抗性基因普遍共存, 大大增加了多药耐药出现的概率。4) 传播广泛: 已经在 5 个大洲 40 多个国家广泛传播。总之, 质粒介导的黏菌素耐药基因变异速度快、类型复杂、传播广泛, 且普遍与多种耐药基因共存, 如 *bla_{CTX-M}*、*bla_{TEM-1}*、*bla_{NDM-5}*、*bla_{NDM-1}*、*aac(6')-Ib*、*floR*、*fosA3*、*oqxAB*, 一旦携带此基因的多药耐药致病菌大规模暴发, 将极大威胁人畜的健康, 使人畜彻底陷入“无药可用”的境地, 应当加强监管, 积极防控。

关键词: 基因变异; 多黏菌素; 耐药; 传播

中图分类号: Q931; R378

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)10-2102-10

Research Progress on the Variation Characteristic and Dissemination of Colistin Resistance Genes

SUN He, ZHANG Ya-chao, SHANGGUAN Zhen-kun, ZHANG Yi,

FAN Ruo-lan, LI Hang, GUAN Song-lei*, ZHANG Lin-bo*

(Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Since the discovery of *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistance gene from China in 2015, colistin resistant genes are divided into 5 categories according to reports, including *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5*. The researchers need to know the characteristic and the dissemination to provide reference for prevention and control measures in future. For this reason, we summarized the literature and found: 1) The differences in nucleotides and amino acids sequence from *mcr-1* to *mcr-5* are notable, the origin of these resistance genes is different, such as MCR-5 (the protein encoded by *mcr-5*) is distinct from MCR-1, MCR-2, MCR-3, MCR-4 with protein sequence identity of 36.11% (MCR-1), 35.29% (MCR-2), 34.72% (MCR-3) and 33.71% (MCR-4), respectively. 2) Many variant subtypes: Except for *mcr-5*, all other 4 kinds of gene type have several subtypes, such as there are more than ten subtypes of *mcr-1* and *mcr-3*. 3) The common coexistence with other resistant genes greatly increases the probability of multidrug re-

收稿日期: 2018-01-31

基金项目: 企业合作项目(GIFP500716; 2016051); 吉林省大学生科技创新基金项目(2017474)

作者简介: 孙 赫(1994-), 男, 满族, 内蒙古赤峰人, 硕士生, 主要从事病原微生物耐药基因的研究, E-mail: 515527768@qq.com

* 通信作者: 关松磊, E-mail: xiaoke377_1979@163.com; 张林波, E-mail: cczlb@126.com

sistance. 4) Spread widely: it has been widely spread in more than 40 countries and 5 continents. In conclusion, colistin resistance genes mediated by plasmid have the characteristics of rapid mutation, complex type, widely spread, and generally coexist with a variety of other antibiotic resistance genes, once a large-scale outbreak of multidrug resistant pathogenic bacteria carrying this gene will greatly threaten the health of human being and animals, supervision and control should be strengthened.

Key words: gene variant; colistin; drug resistance; dissemination

近年来,由于抗生素的滥用,多药耐药菌日益增多,致病性越来越强,治疗已陷入困境。多黏菌素(polymyxin/colistin)一直以来都被认为是防治产 β -内酰胺酶革兰阴性菌感染的“最后一道防线”。但是自从2015年,中国科学家首次报道了从动物源大肠埃希菌中分离到质粒介导的多黏菌素抗性基因*mcr-1*^[1],该基因的出现可能使人畜陷入“无药可用”的困境。随后,陆续有多种*mcr*基因被报道(包括*mcr-2*^[2]、*mcr-3*^[3]、*mcr-4*^[4]、*mcr-5*^[5])。这些耐药基因的突变率很高,每种类型又可以细分为若干亚型,截至目前,*mcr-1*报道有15种亚型,*mcr-2*有2种亚型,*mcr-3*有10种亚型,*mcr-4*有2种亚型。这种多样性是细菌适应外界抗生素压力的结果,可能会导致黏菌素耐药水平和传播能力的改变。为了全面了解黏菌素耐药的情况,本文对各亚型的特征及传播规律进行综述。

1 黏菌素耐药基因各亚型的特点

1.1 *mcr-1*

*mcr-1*是最早被发现的由质粒介导的黏菌素耐药基因(mobile colistin resistance, *mcr-1*),全长1 626 bp,GC含量49%,编码产生MCR-1蛋白,此蛋白属于磷酸乙醇胺转移酶家族,能够催化磷酸乙醇胺与细胞膜脂多糖上的类脂A结合并修饰,降低类脂A磷酸基团的负电荷,使磷酸基团与黏菌素结合变弱,导致细菌产生黏菌素抗性^[6]。MCR-2~MCR-5各亚型的耐药机制与MCR-1基本相同,MCR-1含有5个跨膜的 α 螺旋并具有2个催化结构域,跨膜结构域可以将催化结构域锚定到细胞质膜的表面,完成对类脂A的共价修饰^[7]。*mcr-1*的传播主要依靠质粒,Inc X4、Inc I2、Inc HII1、Inc HII2、Inc F等质粒都可以携带*mcr-1*^[8],且大多数质粒上都存在插入序列ISApl1^[9]。目前,已经发现了*mcr-1*的10余种亚型(表1),是黏菌素基因中最庞大的家族,包括从白血病儿童的直肠拭子中产

KPC-3的肺炎克雷伯菌检测到的*mcr-1.2*^[10],从鸡肉中的大肠埃希菌中检测到的*mcr-1.3*^[11],从污水中大肠埃希菌检测到的*mcr-1.4*、*mcr-1.7*^[12],从病人泌尿道的大肠埃希菌中检测到的*mcr-1.5*^[13],从健康人携带的鼠伤寒沙门菌检测到的*mcr-1.6*^[14],从大肠埃希菌中检测到的*mcr-1.8*、*mcr-1.9*、*mcr-1.11*、*mcr-1.12*以及从莫氏杆菌中检测到的*mcr-1.10*^[15],此外还有在德国、中国和巴西的大肠埃希菌检测到的未命名的3种突变亚型^[16]。这些变异大大丰富了*mcr-1*家族群体。

1.2 *mcr-2*

*mcr-2*是继*mcr-1*之后被发现的第二种类型黏菌素耐药基因。研究者^[2]从比利时52头小牛和53头小猪的腹泻样本的大肠埃希菌中发现了不同于*mcr-1*的黏菌素耐药基因,命名为*mcr-2*。该基因全长1 617 bp,比*mcr-1*(1 626 bp)短9 bp,DNA序列和氨基酸序列分别有76.7%和81.0%的一致性。Inc X4不相容型质粒pKP37-BE在大肠埃希菌中携带*mcr-2*,插入序列ISEc69位于*mcr-2*附近,形成ISEc69-*mcr-2*,两者一同转移。研究还发现,ISEc69元件的主链序列及其编码的膜相关磷脂酸磷酸酶(phosphatidic acid phosphatase, PAP2)与莫拉菌属(*Moraxella osloensis*)相似性很高,说明*mcr-2*基因可能来源于莫拉克斯菌属^[2]。*mcr-1*(插入序列ISApl1)和*mcr-2*(插入序列ISEc69)基因相邻序列的不同,暗示了两种黏菌素耐药基因的整合、获得和传播的模式可能不同。目前报道的*mcr-2*突变亚型有两种(*mcr-2.1*和*mcr-2.2*),都来自于莫拉菌属^[15]。与*mcr-2*相比,*mcr-2.1*有8个氨基酸变异,但是*mcr-2.2*却有65个氨基酸都发生突变,突变率较高。

1.3 *mcr-3*

*mcr-3*是在山东省农场动物细菌抗菌素耐药性的常规监测中被发现的。研究者从健康猪的粪便大肠埃希菌样品中获得了与*mcr-1*和*mcr-2*不同的黏

表 1 黏菌素耐药基因各亚型的特征
Table 1 The characteristic of *mcr* variants

基因 Gene	GenBank accession No.	分离地 Place of isolation	发表 年份 Published year	携带者 Carrier	菌种 Strain	质粒类型① Plasmid type①	突变位点(氨基酸和/或核苷酸)② Mutation site (amino acids and/or nucleotides) ②
<i>mcr-1</i> ^[1]	KP347127	中国	2015	猪、人、家禽	<i>E. coli</i>	Inc X4, Inc I2, Inc HI1, Inc HI2, Inc F	
<i>mcr-1.2</i> ^[10]	KX236309	意大利	2016	白血病儿童	<i>K. pneumoniae</i>	Inc X4	Q3L(T8A)
<i>mcr-1.3</i> ^[11]	KU934208	中国	2017	鸡	<i>E. coli</i>	Inc I2	I37V(G111A, G112A)
<i>mcr-1.4</i> ^[12]	KY041856	中国	2017	医院污水	<i>E. coli</i>	Inc X4	D439N(G1318T)
<i>mcr-1.5</i> ^[13]	KY283125	阿根廷	2016	病人	<i>E. coli</i>	Inc I2	H452Y(C1354T)
<i>mcr-1.6</i> ^[14]	KY352406.1	中国	2017	人	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	Inc P	T215A, R536H(A1263G, A1607G)
<i>mcr-1.7</i> ^[12]	KY488488	中国	2017	医院污水	<i>E. coli</i>	Inc I2	A215T(G643A)
<i>mcr-1.8</i> [Direct Sub- mission]	KY683842	文莱	2017	家禽	<i>E. coli</i>		Q3R(A8G)
<i>mcr-1.9</i> [Direct Sub- mission]	KY685071.1	中国香港	2017	人	<i>E. coli</i>	Inc X4	氨基酸无突变(C27T)
<i>mcr-1.10</i> ^[16]	MF176238.1	英国	2017	猪	<i>Moraxella</i>	(pap2)	M2V, R11C, M155V, M234T, A354T, A443T
<i>mcr-1.11</i> [Direct Submission]	NG_055784.1	秘鲁	2017	人	<i>E. coli</i>		6S与7V间插入V(21位核苷 酸后插入GTG)
<i>mcr-1.12</i> [Direct Submission]	LC337668.1	日本	2017	猪	<i>E. coli</i>		Q3H(G9C)
<i>mcr-1</i> unnamed 1 ^[16]	MADL01000078.1	德国	2016	蜥蜴	<i>E. coli</i>	Inc X4	N311K, L316S, I323F(T933A, C946T, T947C, A967T, T987C, A999G)
<i>mcr-1</i> unnamed 2 [Direct Submission]	MOFD01000034.1	中国	2016	鸡	<i>E. coli</i>		H466N(C1396A)
<i>mcr-1</i> unnamed 3 [Direct Submission]	MTKG01000192.1	巴西	2017	海水	<i>E. coli</i>		W8C(G24C)

(转下页 Carried forward)

(续表 1 Continued)

基因 Gene	GenBank accession No.	分离地 Place of isolation	发表 年份 Published year	携带者 Carrier	菌株 Strain	质粒类型① Plasmid type①	突变位点(氨基酸和/或核苷酸)② Mutation site (amino acids and/or nucleotides) ②
<i>mcr-2</i> ^[2]	NG_051171	比利时	2016	牛和猪	<i>E. coli</i>	Inc X4(ISEc69)	81.0% vs MCR-1(76.7% vs <i>mcr-1</i>)
<i>mcr-2</i> , 2 ^[15]	MF176239	西班牙	2017	猪	<i>M. pluranimantium</i>	(pap2)	H4Q, V57L, V140F, G320D, A339T, Y359F, G528D, AA534T
<i>mcr-3</i> ^[3]	NG_055505	中国	2017	猪	<i>E. coli</i>	Inc HI2	32.5% vs MCR-1(45.0% vs <i>mcr-1</i>)
<i>mcr-3</i> , 2 ^[17]	NG_055523	泰国	2017	人	<i>Shigella sonnei</i>	Inc HI2	T488I(C1463T)
<i>mcr-3</i> , 3 [Direct Sub- mission]	NG_055783	中国	2017	鸡	<i>Aeromonas veronii</i>		V121G, R297L, I313V, E337K, H341Y, D358E, G428A, Q468K, T488I, V493M, D494N, A496E, Q500K, K501N, D504A, T505N, S525A, V526I, K529Q, G530E, S535K, V540N
<i>mcr-3</i> , 5 ^[18]	NG_055782	中国	2017	人	<i>E. coli</i>	Inc P (TnAs3)	M23V, A457E, T488I (A67G, C1370A, C1463T)
<i>mcr-3</i> , 6 [Direct Sub- mission]	MF598076	德国	2017	圆腹雅罗鱼	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>		M13I, D41Y, I71V, S117N, V122G, E139D, R297L, I313V, E337K, H341Y, G428A, L458M, Q468K, T488I, V493M, D494N, A496E, Q500K, K501N, D504A, T505N, S525A, V526I, K529Q, G530E, S535K, V540N
<i>mcr-3</i> , 7 [Direct Sub- mission]	MF598077	德国	2017	火鸡	<i>Aeromonas media</i>		M13I, V61A, I71V, V122G, A127V, A154V, Q226K, R297L, I313V, I336V, E337K, H341Y, G428A, L458M, Q468K, V493M, D494N, A496E
<i>mcr-3</i> , 8 [Direct Sub- mission]	NG_055662	德国	2017	鲤鱼	<i>Aeromonas hydrophila</i>		M13I, V122G, R297L, I313V, E337K, H341Y, D358E, G428A, L458M, Q468K, T488I, V493M, D494N, A496E, Q500K, K501N, D504A, T505N, S525A, V526I, K529Q, G530E, S535K, V540N

(转下页 Carried forward)

(续表 1 Continued)

基因 Gene	GenBank accession No.	分离地 Place of isolation	发表 年份 Published year	携带者 Carrier	菌株 Strain	质粒类型① Plasmid type①	突变位点(氨基酸和/或核苷酸)② Mutation site (amino acids and/or nucleotides) ②
<i>mcr-3</i> . 9 [Direct Sub- mission]	NG_055663	德国	2017	鲤鱼	<i>Aeromonas hydrophila</i>		M13I, I71V, V122G, E144K, L151I, R297L, I313V, E337K, H341Y, D358E, Q468K
<i>mcr-3</i> . 10 [Direct Submission]	NG_055799		2017	鸭	<i>Aeromonas punctata</i>		V122G, R297L, I313V, E337K, H341Y, D358E, Q468K
<i>mcr-3</i> . 11 [Direct Submission]	MG489958		2018		<i>E. coli</i>		G373V, Q468T (G1118T, C1402A, A1403C)
<i>mcr-4</i> ^[4]	NG_055659	意大利	2017	猪	<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>	ColE10(CIS5) Inc II, Inc I2, Inc F, Inc X1, Inc HI2	34.0% vs MCR-1
<i>mcr-4</i> . 2 ^[9]	MG026621	意大利	2017	人	<i>Salmonella typhimurium</i>		Q331R (A1001G)
<i>mcr-4</i> . 4 [Direct Sub- mission]	MG822665		2018	猪	<i>E. coli</i>		H205N, Q331R (C613A, A992G)
<i>mcr-4</i> . 5 [Direct Sub- mission]	MG822664		2018	猪	<i>E. coli</i>		F110L, Q331R (C329T, A992G)
<i>mcr-5</i> ^[5]	NG_055658	德国	2017	禽类和食品	<i>Salmonella Paratyphi B dTα+</i>	ColE (Tn3)	36.11% vs MCR-1
<i>mcr-5</i> . 2 [Direct Submission]	MG384740	德国	2018	猪	<i>E. coli</i>	ColE (Tn3)	E233 缺失

① 括号内是移动元件; ② 括号内是核苷酸突变

① In brackets is the mobile element; ② In brackets is the nucleotide mutation

菌素耐药基因 *mcr-3* ($MIC \geq 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[3]。*mcr-3* 由质粒 IncHI2-pWJ1 携带,大小为 261 119 bp, pWJ1 的 222.3 kb 区段(总序列的 85.4%)与首次报道的携带 *mcr-1* 的大肠埃希菌菌株质粒 pHN-SHP45-2 高度相似,说明两者同源性较近。*mcr-3* 基因全长 1 626 bp, *mcr-3* 与 *mcr-1* 及 *mcr-2* 的差异较大,核酸序列与 *mcr-1* 和 *mcr-2* 只有 45.0% 和 47.0% 的相似性,氨基酸序列与 MCR-1 和 MCR-2 也只有 32.5% 和 31.7% 的一致性。MCR-3 蛋白具有两个结构域,结构域 1(残基 1—172)含有 5 个跨膜 α -螺旋,结构域 2(残基 173—541)包含催化中心的周质结构域,结构域 2 的最适合结构是 4KAV(已被证明是最适合 MCR-1 和 MCR-2 的结构^[1-2])。*mcr-3* 目前共分分离得到 10 种亚型, *mcr-3*、*mcr-3.2*、*mcr-3.3*、*mcr-3.5*、*mcr-3.6*、*mcr-3.7*、*mcr-3.8*、*mcr-3.9*、*mcr-3.10* 和 *mcr-3.11* (NG_055505、NG_055523、NG_055783、NG_055782、MF598076、MF598077、NG_055662、NG_055663、NG_055799 及 MG489958)^[4,17-21],是目前为止除了 *mcr-1* 外,突变类型最复杂、涉及菌种最多、传播范围最广的黏菌素耐药基因。

1.4 *mcr-4*

mcr-4 是从意大利屠宰猪的盲肠内容物中分离的鼠伤寒沙门菌(4,5,12:i:-)R3445 中检测到的。*mcr-4* 基因位于 ColE10 质粒上(pMCR)。pMCR 质粒整合在染色体 I 型甲基化基因内,插入序列 IS5 参与了质粒与染色体的整合。ColE 是具有广泛宿主范围的小型非自交质粒,可以在不同的细菌种属中复制,大大增加了耐药基因的传播。此外 I1、I2、F、X1 和 HI2 家族质粒也都可以携带 *mcr-4*^[4]。MCR-4 蛋白与希瓦菌属(*Shewanella*)中发现的磷酸乙醇胺转移酶有 82.0%~99.0% 的氨基酸序列一致性,与 MCR-1、MCR-2 和 MCR-3 分别有 34.0%、35.0% 和 49.0% 的氨基酸序列一致性。目前在意大利、西班牙、比利时的猪源样本中均分离到了携带 *mcr-4* 的大肠埃希菌^[4]。目前报道的 *mcr-4* 的亚型有 3 种,在意大利和新加坡病人体内分离出的阴沟肠杆菌和鼠伤寒沙门菌携带的 *mcr-4.2*^[19,21],以及 *mcr-4.3* 和 *mcr-4.4*。

1.5 *mcr-5*

2011—2016 年间,研究者从 414 株乙型副伤寒沙门菌中分离到 14 株耐黏菌素 d-酒石酸发酵乙型副伤寒沙门菌亚种(*Salmonella Paratyphi B dTa* +),通过全基因组测序发现一种新的磷酸乙醇胺转移酶基

因 *mcr-5*^[5],*mcr-5* 基因全长 1 644 bp,是 Tn3 家族的 7 337 bp 转座子的一部分,通常位于多拷贝相关的 ColE 型质粒上,其中一株亚克隆株 12-02546-2 沙门菌的 *mcr-5* 基因不在质粒上,而是位于细菌染色体鸟氨酸脱羧酶上,推测可能是通过转座子整合到沙门菌染色体上。MCR-5 含有 547 个氨基酸,分为 3 个结构域:1 个跨膜结构域和 1 个硫酸酯酶结构域,此外还有一个未知功能的结构域(DUF1705)。MCR-5 与 MCR-1、MCR-2、MCR-3、MCR-4 氨基酸序列差异较大,分别只有 36.11%、35.29%、34.72% 和 33.71% 的一致性,且目前来源不明。在 MCR-5 硫酸酯酶结构域 C 末端中发现 5 个 MCR-5 保守残基(E248、T286、H389、D458 和 H459),与 MCR-1、MCR-2、MCR-3 和 MCR-4 中的残基相同。与之前发现的亚型不同,*mcr-5* 是由小型多拷贝 ColE 型质粒携带的,不携带任何参与质粒接合相关的转移基因。到目前为止,*mcr-5* 已经有两种突变亚型被报道。

2 传播情况

2.1 传播的机制

在各类型黏菌素耐药基因中,*mcr-1* 的传播机制是目前研究最多的,也是最具有代表性的。最普遍的传播形式是耐药基因存在于可移动元件上,如质粒、插入序列、转座子等。最早有科学家从畜禽源黏菌素耐药大肠埃希菌 pHNSHP45 质粒上发现了可水平转移的黏菌素耐药基因 *mcr-1*,并通过体外接合试验证明了该基因可通过多种可接合性质粒在不同菌种之间传播^[22-23]。Dénervaud 等^[23] 将临床分离得到的 3 种含有不同 *mcr-1* 质粒的大肠埃希菌作为供体,以肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯杆菌、阴沟肠杆菌为受体进行质粒接合转移试验,发现 *mcr-1* 基因可以通过质粒传播到这些菌中,菌株类型对接合转移效率的影响比质粒类型对接合转移效率的影响更显著。ISApl1 属于 IS30 家族的插入序列,两边侧翼序列为反向重复序列,左侧和右侧重复序列分别为 IRL 和 IRR。Liu 等^[18]、Snesrud 等^[24] 发现 ISApl1 在 *mcr-1* 基因的一端或两端连接,上游 ISApl1 的左侧重复序列 IRL 与下游 ISApl1 右侧的 IRR 识别并形成复合插入序列,促进其传播。可见转移元件在 *mcr* 传播过程中发挥了重要的作用。另外,携带 *mcr-1* 的菌株种类呈多样性,包括大肠埃希菌^[11,25]、阪崎肠杆菌^[26]、沙门菌^[27-28]、肺炎克雷伯

菌^[1]、志贺菌^[29]、解鸟氨酸劳特菌^[30]等,染色体遗传是纵向传播的一种形式,部分菌株可以克隆扩增和水平传播^[31-32]。Hernández 等^[20]在检测西班牙牛源大肠埃希菌多重耐药性情况时,其中一株细菌 ZTA15/01169-1EB1 同时携带 *mcr-1* 和 *mcr-3*, 这两个 *mcr* 基因可能位于同一质粒上,通过 PFGE 和 *mcr-1* 和 *mcr-3* 特异性探针的杂交结果显示 Inc HI2 为携带这两个黏菌素耐药基因的最适质粒,但是其黏菌素抗性较低($MIC \leq 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

mcr-2、*mcr-3*、*mcr-4*、*mcr-5* 的传播方式与 *mcr-1* 类似,也可以通过质粒、插入序列、转座子介导传播。大肠埃希菌 Inc X4 不相容型质粒 pKP37-BE 质粒可携带 *mcr-2*。ISEc9 转移元件介导的 *mcr-2* 转座与 ISA*p11* 元件介导的 *mcr-1* 转座机制有很大不同,*mcr-2* 基因的两侧 ISEc9 元件会通过 IS 元件的同源重组而形成环化中间体参与 *mcr-2* 的转移,环化中间体的出现可能加速多种细菌宿主中 *mcr-2* 黏菌素抗性的快速传播^[2]。另外,MCR-2 酶的跨膜区域为 TM2,而 MCR-1 酶的跨膜区域为 TM1,经过试验证实 TM2 比 TM1 能够更有效地促进磷酸乙醇胺与类脂 A 的结合,因此 MCR-2 的酶活性明显高于 MCR-1,且 *mcr-2* 的转录水平也明显高于 *mcr-1*,耐药性更强^[2]。

Inc HI2-pWJ1 质粒携带 *mcr-3*,上游的 801 bp 片段 *nimC* / *nimA-mcr-3* 属于 TnAs2 型转座子^[33],Inc P 质粒携带 *mcr-3*, 转座子 TnAs3 帮助基因的转移和传播。*mcr-4* 基因位于鼠伤寒沙门菌和大肠埃希菌的 ColE10 质粒上,插入序列 IS5 位于 *mcr-4* 附近,质粒的转移需要辅助质粒 Inc I2 的参与,而且在 Inc I1、Inc I2、Inc F、Inc X1 和 Inc HI2 家族质粒上也发现了 *mcr-4*^[20]。研究发现,沙门菌内的小型多拷贝 ColE 型质粒携带 *mcr-5*^[5],但在乙型副伤寒沙门菌亚克隆菌株中未发现携带 *mcr-5* 的质粒,*mcr-5* 已经随转座子 Tn3 整合在细菌染色体内的鸟氨酸脱羧酶基因上,说明 *mcr-5* 主要随着转座子传播。由此可见,质粒在 *mcr* 基因得以广泛传播的过程中起关键性作用,但是在质粒基因组中都发现移动元件的存在,推测移动元件——*mcr* 是黏菌素基因得以传播的一个重要因素。

2.2 传播的范围

黏菌素耐药基因最早被发现和报道的是 *mcr-1*。*mcr-1* 基因的产生可追溯到 20 世纪 80 年代,Shen

等^[34]对中国 1970—2014 年鸡肉样本进行检测,在首次发现之后的 20 多年里都没有检测到,在 2004 年和 2006 年检出 *mcr-1* 基因,从 2009 年开始 *mcr-1* 的检出率呈上升趋势,2009 年为 5.2% (6/115),2011 年为 11.9% (15/126),2012 年为 20.9% (24/115),2013 年为 25.4% (29/114),2014 年为 30.0% (15/50)。这一趋势与 2009 年开始我国大规模使用黏菌素相符合,说明耐药基因的产生与黏菌素压力相关。统计显示,国内动物性食品源大肠埃希菌 *mcr-1* 基因检出率为 4.9%~29.0%,且呈逐年递增的趋势^[1]。除了中国,其他 40 多个国家,包括德国、巴西、韩国、突尼斯、南非等也从禽类、猪、牛、鱼、污水、空气中检出 *mcr-1* 基因^[35]。值得注意的是,Zhang 等^[36]从临床病人的尿液和血液中也检测到 *mcr-1*,随后在患者工作的宠物店里猫和狗的粪便样本中也分离到了携带 *mcr-1* 大肠埃希菌。中国科学家在山东省的人、畜、禽类中都检测到了 *mcr-1*^[37]。以上研究说明黏菌素耐药基因已经在人畜之间传播。此外,Wang 等^[38]以 457 株携带 *mcr-1* 细菌的全基因组测序(WGS)制作了全球数据集,中国($n=212$)和越南($n=58$)是报道 *mcr-1* 阳性菌的序列数最多的国家;而山东省则是国内 *mcr-1* 检出最多的省份,通过分析这些 *mcr-1* 基因的上下游环境,证实了 ISA*p11* 在 *mcr-1* 传播过程中起到重要作用,而 Inc I2 和 Inc X4 是携带 *mcr-1* 的主要质粒类型,分别占分离株的 51% 和 38%。

MCR-3 蛋白与马来西亚的猪源大肠埃希菌、泰国人源肺炎克雷伯菌和美国人源尿道鼠伤寒沙门菌分离株发现的氨基酸一致性为 99.8% 至 100%^[3]。这一发现表明 *mcr-3* 基因已经存在于东南亚和北美的农业和临床环境的至少 3 种肠杆菌中。此研究还表明肠杆菌科的 *mcr-3* 可能来源于气单胞菌属,由于此菌属广泛分布在自然界,所以来源于此菌属的携带 *mcr-3* 的菌株可能已经在人类、动物和环境广泛传播^[3]。2018 年在日本先后报道出现了猪源携带 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 的大肠埃希菌,研究证明病猪大肠埃希菌更容易携带 *mcr*,可能与病猪有黏菌素用药史有关^[39]。到目前为止,黏菌素耐药基因已经在 5 个大洲的 40 多个国家广泛传播,尤其是亚洲和欧洲报道较多。我国是抗生素使用大国,也是最早报道黏菌素耐药基因的国家,*mcr-1* 和 *mcr-3* 在我国均有检出和报道。黏菌素耐药基因的传播情况见表 2。

表 2 黏菌素耐药基因的传播情况

Table 2 Spread of *mcr* variant

基因 Gene	国家 Country	来源 Source
<i>mcr-1</i>	中国(包括台湾)、德国、日本、巴西、韩国、突尼斯、南非、葡萄牙、马来西亚、老挝、泰国、文莱、法国、尼日利亚、阿尔及利亚、荷兰、比利时、越南、巴基斯坦、埃及、爱沙尼亚、委内瑞拉、立陶宛、加拿大、瑞士、柬埔寨、俄罗斯、波兰、新加坡、厄瓜多尔、阿拉伯半岛、秘鲁、哥伦比亚、玻利维亚、阿根廷、挪威、瑞典、英国、丹麦、西班牙、保加利亚、阿曼	猪、鸡、牛、狗、人类、猫、蚊子、鸥、肉品、鱼、污水
<i>mcr-2</i>	英国、比利时、日本、美国	猪、牛、禽类、肉类产品
<i>mcr-3</i>	日本、丹麦、美国、中国、德国、西班牙、马来西亚	猪、禽类
<i>mcr-4</i>	意大利、西班牙、比利时、新加坡	猪、禽类
<i>mcr-5</i>	日本、德国	猪、禽类

通过对 *mcr* 的基因环境分析发现不同类型的 *mcr* 来源不同,虽然有 *mcr* 基因通过移动元件整合到染色体的报道^[5],但是质粒是 *mcr* 基因的主要载体。携带 *mcr* 基因的质粒类型也十分广泛,如 Inc X4、Inc I2、Inc HI1、Inc HI2、Inc F、ColE 等,而移动元件——*mcr* 是黏菌素基因得以传播的一个重要因素。在多种肠杆菌中都检测到了 *mcr* 基因,而这些细菌的来源包括禽类、猪、牛、鱼、污水、水果、蔬菜、人体等。依据目前的报道,*mcr-1* 和 *mcr-3* 在中国检出率较高,*mcr-1* 在各国的传播最为广泛,且有可能来源于中国^[38],而 *mcr-4* 只在意大利、西班牙、比利时、新加坡检出,推测与食品的进出口以及出国旅游,使 *mcr* 基因能够跨国跨区域传播有关^[40]。

2.3 与其他抗性基因的共传播情况

mcr 基因很少单独存在,常常与其他抗性基因共存,引起多药耐药,这种方式极大地增加其危害性,极有可能使人畜面临“无药可用”的境地。携带 *mcr-1* 的质粒常携带以下多种抗性基因,如 *bla*_{CTX-M}、*bla*_{TEM-1}、*bla*_{NDM-5}、*bla*_{NDM-1}、*aac*(6′)-*Ib*、*floR*、*fosA3*、*oqxAB* 等^[41-42]。Liu 等^[1] 在 2010—2015 年间,从中国 20 个省市病鸡收集的 1 136 株大肠埃希菌中分离到了 58 株(5.11%)*mcr-1* 阳性菌株,其中的 54 株(93.1%)是多药耐药菌株,对喹诺

酮类、头孢菌素类、氨基糖苷类和磺胺类都有抗性,25 株(43.1%)同时携带 CTX-M 型基因,表明 *mcr-1* 和 *bla*_{CTX-M} 基因在大肠埃希菌中共存发生频率很高。携带 *mcr-3* 的 pWJ1 质粒上携带多种耐药基因,其中 2 个抗性基因对应的抗生素用于人类临床,包括喹诺酮类抗性基因[*aac*(6′)-*Ib-cr*]和利福平抗性基因(*arr3*)^[3]。*mcr-4* 可以与 *bla*_{TEM-1B}、*aph*(4)-1*a*、*aph*(3′)-1*c*、*aac*(3)-*Iva*、*aac*(3)-*IIa*、*strA*、*aadA1*、*floR*、*catA1*、*sul2*、*sul1*、*tet*(B)、*dfrA1*、*mph*(A)、*erm*(B)、*mphB* 等多种耐药基因共存于同一个质粒上^[4]。而携带 *mcr-5* 的 pSE13-SA01718 质粒上也含有额外的 *bla*_{TEM-1B} 耐药基因,由此可见,携带 *mcr* 的菌株常常是多药耐药菌株,尤其是耐碳氢霉烯类菌株危险性更高,对人畜的威胁更大。

3 应对策略

综上所述,黏菌素耐药基因具有变异类型复杂、变异频率高、传播范围广、与其他抗性基因普遍共存、潜在危害大的特点。应采取以下措施进行防控:①加强对其生物学行为特征的研究:虽然目前黏菌素处于低水平耐药(2~16 μg·mL⁻¹),但是由于 *mcr* 基因突变速度快、类型复杂,一旦出现与其他抗性基因共存的高度多药耐药亚型,将使人畜彻底陷入“无药可用”的境地。目前,我们对黏菌素耐药基因的突变规律和突变原因尚知之甚少,应该对其进行深入研究,包括转移元件的类型及其作用、辅助型质粒在基因传播中的作用、基因从质粒整合到染色体的方式及与其他抗性基因间的相互作用等都是研究的重点。②广泛筛查:*mcr* 基因在动物和动物性食品样本中的检出率远高于人源样本检出率,多数携带有 *mcr* 的多重耐药菌主要从动物源样本中检测到,这些耐药菌能够通过动物或食物链传播给人类,对人类健康造成潜在的严重威胁。应当在食源动物和人群中进行黏菌素耐药基因筛查,以了解其散播情况,并评估对人类健康的风险。③加强监管:目前全世界,包括中国在内,已经严格限制抗生素的使用,且采用多种新型组合疗法来治疗多重耐药菌引起的感染,但多黏菌素类药物在畜牧养殖中仍存在滥用的现象,应当切实加强畜牧养殖业的药物监管,定期监测,警惕黏菌素耐药基因的广泛传播。

参考文献(References):

[1] LIU Y Y, WANG Y, WALSH T R, et al. Emer-

- gence 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.
- [2] XAVIER B B, LAMMENS C, RUHAL R, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016 [J]. *Euro Surveill*, 2016, doi:10. 2807/1560-7917. ES. 2016. 21. 27. 30280.
- [3] YIN W J, LI H, SHEN Y B, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli* [J]. *mBio*, 2017, 8(3):e00543-17.
- [4] CARATTOLI A, VILLA L, FEUDI C, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016 [J]. *Euro Surveill*, 2017, 22(31):30589, doi:10. 2807/1560-7917. ES. 2017. 22. 31. 30589.
- [5] BOROWIAK M, FISCHER J, HAMMERL J A, et al. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in *d*-tartrate fermenting *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Paratyphi B [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2017, 72(12): 3317-3324.
- [6] BARON S, HADJADJ L, ROLAIN J M, et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2016, 48(6):583-591.
- [7] GAO R S, HU Y F, LI Z C, et al. Dissemination and mechanism for the MCR-1 colistin resistance [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(11):e1005957.
- [8] ZHOU K, LUO Q X, WANG Q, et al. Silent transmission of an IS1294b-deactivated *mcr-1* gene with inducible colistin resistance [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, doi:10. 1016/j. ijantimicag. 2018. 01. 004.
- [9] SNESRUD E, HE S S, CHANDLER M, et al. A model for transposition of the colistin resistance gene *mcr-1* by IS*ApI1* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(11):6973-6976.
- [10] DI PILATO V, ARENA F, TASCINI C, et al. *mcr-1. 2*, a new *mcr* variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(9):5612-5615.
- [11] YANG Y Q, LI Y X, SONG T, et al. Colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in *Escherichia coli* isolates from chickens in China [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(5):61:e01204-16.
- [12] ZHAO F F, FENG Y, LÜ X J, et al. Remarkable diversity of *Escherichia coli* carrying *mcr-1* from hospital sewage with the identification of two new *mcr-1* variants [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8:2094, doi:10. 3389/fmicb. 2017. 02094.
- [13] TIJET N, FACCONI D, RAPOPORT M, et al. Molecular characteristics of *mcr-1*-carrying plasmids and new *mcr-1* variant recovered from polyclonal clinical *Escherichia coli* from Argentina and Canada [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7):e0180347.
- [14] LU X, HU Y F, LUO M, et al. MCR-1. 6, a new MCR variant carried by an IncP plasmid in a colistin-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolate from a healthy individual [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(5):e02632-16, doi:10. 1128/AAC. 02632-16.
- [15] ABUOUNM, STUBBERFIELD E J, DUGGETT N A, et al. *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015 [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2017, 72(10):2745-2749, doi:10. 1093/jac/dkx286.
- [16] UNGER F, EISENBERG T, PRENGER-BERNINGHOFF E, et al. Imported reptiles as a risk factor for the global distribution of *Escherichia coli* harbouring the colistin resistance gene *mcr-1* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2017, 49(1):122-123.
- [17] ROER L, HANSEN F, STEGGER M, et al. Novel *mcr-3* variant, encoding mobile colistin resistance, in an ST131 *Escherichia coli* isolate from bloodstream infection, Denmark, 2014 [J]. *Euro Surveill*, 2017, 22(31):30584.
- [18] LIU L, FENG Y, ZHANG X X, et al. New variant of *mcr-3* in an extensively drug-resistant *Escherichia coli* clinical isolate carrying *mcr-1* and *bla_{NDM-5}* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(12): e01757-17, doi:10. 1128/AAC. 01757-17.
- [19] CARRETTO E, BROVARONE F, NARDINI P, et al. Detection of *mcr-4* positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016 [J]. *Euro Surveill*, 2018, doi:10. 2807/1560-7917. ES. 2018. 23. 2. 17-00821.
- [20] HERNÁNDEZ M, IGLESIAS M R, RODRÍGUEZ-LÁZARO D, et al. Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015 [J]. *Euro Surveill*, 2017, 22(31): 30586.
- [21] TEO J W P, KALISVAR M, VENKATACHALAM

- I, et al. *mcr-3* and *mcr-4* variants in carbapenemase-producing clinical *Enterobacteriaceae* do not confer phenotypic polymyxin resistance[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(3): e01562-17, doi: 10. 1128/JCM. 01562-17.
- [22] CUI M Q, ZHANG J F, GU Z, et al. Prevalence and molecular characterization of *mcr-1*-positive *Salmonella* strains recovered from clinical specimens in China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(5): e02471-16.
- [23] DÉNERVAUD T V, POIREL L, NORDMANN P. Transferability of the *mcr-1* Colistin Resistance Gene[J]. *Microb Drug Resist*, 2017, 23(7):813-814, doi:10. 1089/mdr. 2016. 0191.
- [24] SNESRUD E, ONG A C, COREY B, et al. Analysis of serial isolates of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* reveals a highly active *ISAp11* transposon[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(5):e00056-17.
- [25] LIU B T, SONG F J, ZOU M, et al. High incidence of *Escherichia coli* strains coharboring *mcr-1* and *bla_{NDM}* from chickens [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(3): e02347-16, doi: 10. 1128/AAC. 02347-16.
- [26] LIU B T, SONG F J, ZOU M, et al. Emergence of colistin resistance gene *mcr-1* in *Cronobacter sakazakii* producing NDM-9 and in *Escherichia coli* from the same animal [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(2):e01444-16.
- [27] FIGUEIREDO R, CARD R M, NUNEZ J, et al. Detection of an *mcr-1*-encoding plasmid mediating colistin resistance in *Salmonella enterica* from retail meat in Portugal[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(8):2338-2340.
- [28] 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]. *Foodborne Pathog Dis*, 2018, 15(2):114-117.
- [29] THANH D P, TUYEN H T, NGUYEN T N T, et al. Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(8):2314-2317.
- [30] LUO J, YAO X, LV L C, et al. Emergence of *mcr-1* in *Raoultella ornithinolytica* and *Escherichia coli* from retail vegetables, China[J/OL]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(10): e01139-17 [2018-07-02]. <http://aac.asm.org/content/61/10/e01139-17.long>.
- [31] LI X P, FANG L X, SONG J Q, et al. Clonal spread of *mcr-1* in PMQR-carrying ST34 *Salmonella* isolates from animals in China[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:38511, doi:10. 1038/srep38511.
- [32] SONNEVEND Á, GHAZAWI A, ALQAHTANI M, et al. Plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* from the Arabian Peninsula[J]. *Int J Infect Dis*, 2016, 50:85-90.
- [33] SUN J, XU Y C, GAO R S, et al. Deciphering MCR-2 colistin resistance[J]. *mBio*, 2017, 8(3): e00625-17.
- [34] SHEN Z Q, WANG Y, SHEN Y B, et al. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals[J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(3):293.
- [35] SUN J, ZHANG H M, LIU Y H, et al. Towards understanding MCR-like colistin resistance [J]. *Trends Microbiol*, 2018, doi:10. 1016/j. tim. 2018. 02. 006.
- [36] ZHANG X F, DOI Y, HUANG X, et al. Possible transmission of *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* between companion animals and human[J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(9):1679-1681.
- [37] WANG Y, ZHANG R M, LI J Y, et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production[J]. *Nat Microbiol*, 2017, 2:16260.
- [38] WANG R B, VAN DORP L, SHAW L P, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1* [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):1179, doi:10. 1038/s41467-018-03205-z.
- [39] FUKUDA A, SATO T, SHINAGAWA M, et al. High prevalence of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* in *Escherichia coli* derived from diseased pigs in Japan[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, 51(1):163-164.
- [40] NAKAYAMA T, KUMEDA Y, KAWAHARA R, et al. Carriage of colistin-resistant, extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* harboring the *mcr-1* resistance gene after short-term international travel to Vietnam[J]. *Infect Drug Resist*, 2018, 11:391-395.
- [41] YANG R S, FENG Y J, LV X Y, et al. Emergence of NDM-5- and MCR-1-producing *Escherichia coli* clones ST648 and ST156 from a single Muscovy Duck (*Cairina moschata*) [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(11):6899-6902.
- [42] YANG Y Q, ZHANG A Y, MA S Z, et al. Co-occurrence of *mcr-1* and ESBL on a single plasmid in *Salmonella enterica* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(8):2336-2338.