

肺炎克雷伯菌产 CTX-M-14 型超广谱 β-内酰胺酶的基因环境研究

刘保光^{1, 2}, 汪保英^{1, 2}, 粟俞程^{1, 2}, 白明^{1, 2}, 苗明三¹, 许二平²

摘要: 目的 为研究肺炎克雷伯菌产 CTX-M-14 型 ESBL 基因的基因环境及其传播机制。方法 本试验对产 CTX-M-14 型 ESBL 基因进行质粒接合传递试验; 对阳性接合子进行质粒抽提并酶切, PBR322 载体连接并转化, 将转化子进行测序, 进行 Blast 比对研究基因环境。结果 质粒接合试验表明, 产 CTX-M-14 型 ESBL 基因的阳性菌株能通过质粒接合试验传递耐药性, CTX-M-14 基因可经质粒传递, 接合子的耐药表型与供体菌基本一致, 具有与供体菌相似的耐药表型, 仅个别药物的 MIC 值较供体菌有所降低。在含头孢噻肟平板上筛选的含 CTX-M-14 基因的阳性转化子对头孢噻肟耐药, 而对其它大多数药物表现敏感。产 CTX-M-14 型 ESBL 基因的基因环境表明, 阳性转化子含有 2 637 bp 的目的基因序列, 经 Blast 比对, 该转化子序列的基因环境结构元件包括上游插入序列 ISEcp1-35 区和-10 区、重复序列 IRR、876 bp 的 CTX-M-14 基因开放阅读框及下游插入序列 IS903 和 IRL, 上传 NCBI 获基因序列号为 HQ650134。结论 产 CTX-M-14 型 ESBL 菌株的耐药情况较严重, 临床菌可通过接合方式编码 ESBLs 的传播, 临床应加强细菌耐药性监测, 进行深入研究。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 超广谱 β-内酰胺酶; 基因环境; 质粒接合试验

中图分类号: R378.99, S855.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-2694(2019)10-0950-07

Gene environmental structure of CTX-M-14 type ESBL gene produced by *Klebsiella pneumoniae*

LIU Bao-guang^{1, 2}, WANG Bao-ying^{1, 2}, LI Yu-cheng^{1, 2}, BAI Ming^{1, 2}, MIAO Ming-san¹, XU Er-ping²

(1. Scientific Research and Experiment Center, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Key Laboratory for Modern Research on Zhongjing's Herbal Formulae of Henan Province,
Zhengzhou 450046, China)

Abstract: To study the genetic context surrounding blaCTX-M-14 in *Klebsiella pneumoniae*, and to explore the transmission mechanism of the resistant gene, the conjugation assay was performed and the blaCTX-M-14-carrying transconjugant was screened. The plasmid in the transconjugant was extracted and digested. The purified restriction fragment of plasmid inserted into PBR322 vector, and the positive recombinant plasmid was screened and sequenced. The results showed that blaCTX-M-14 could be successfully transferred to the recipient strain, and the susceptibility results of the corresponding transconjugant was consistent with that of the parental strain to most of the tested antibacterial drugs. A 2637bp fragment including blaCTX-M-14 in the positive recombinant plasmid was obtained and submitted to GenBank under the accession number with HQ650134. The sequence analysis showed that the ISEcp1 and IS903 elements were present in the upstream and downstream region of blaCTX-M-14 respectively. The multidrug resistance of the blaCTX-M-14-carrying *K. pneumoniae*, and the self-transmissible capacity of blaCTX-M-14 remind us that it is necessary to strengthen the monitoring of antimicrobial resistance in future studies.

河南省博士后科研项目启动经费(No. 19030075); 河南省中医药科学研究专项课题(No. 2019ZY1019); 河南中医药大学科研启动经费(No. 00104311-2019-11)联合资助

通讯作者: 许二平, Email: xuerping0371@163.com;

ORCID: 0000-0001-7384-9839

苗明三, Email: miaomingsan@163.com;

ORCID: 0000-0002-2999-805X

作者单位: 1. 河南中医药大学科研实验中心, 郑州 450046;

2. 河南省仲景方药现代研究重点实验室, 郑州 450046

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; ESBLs; gene environment; plasmid conjugation test

Supported by the Henan Post-doctoral Research Project Start-up Funding (No. 19030075), and the Henan of Chinese Medicine Special Research Project (No. 2019ZY1019), and the Henan University of Chinese Medicine Research Start-up Funding (No. 00104311-2019-11)

Corresponding author: XU Er-ping, Email: xuerping0371@

163.com; MIAO Ming-san, Email: miaomingsan@163.com

肺炎克雷伯菌作为一种人兽共患条件病原菌,可引起人和多种动物感染,危害人和畜禽健康^[1]。近年来,随着抗菌药物的广泛应用,肺炎克雷伯菌对抗生素的耐药情况日趋严重,携带 β -内酰胺酶是该菌产生耐药的主要机制之一^[2]。ESBLs 主要由肠杆菌科细菌产生,肺炎克雷伯菌和大肠杆菌是其代表菌种^[3]。而 CTX-M 型酶分布广泛,是一组逐渐被认识且成员日益庞大的 ESBLs,以对头孢噻肟高水平耐药为主要特征^[4]。该酶目前已经成为亚洲国家如日本、韩国主要的 ESBLs 类型,我国也是 CTX-M 型酶的高发区,有研究表明,CTX-M 型 ESBLs 可能是我国华南地区,乃至全国常见的 ESBLs 类型之一^[5]。其中,华北地区流行的 CTX-M 型 ESBLs 主要为 CTX-M-14 型^[6]。据报道,CTX-M 型 ESBLs 编码基因常位于质粒上,该质粒大多可以接合,还常与周围可移动基因元件(如插入序列 IS_{Ecp1} 或 IS903、转座子)相关^[7-8]。研究发现,位于 CTX-M 基因周围的可移动元件对耐药基因的传播起重要作用^[9-10]。

目前,肺炎克雷伯菌耐药表型和分子分型报道较为多见^[11-16],但肺炎克雷伯菌产 CTX-M 型 β -内酰胺酶报道鲜见^[17-19]。本试验在前期研究基础上,开展产 CTX-M-14 型 ESBL 基因的遗传背景研究,这对控制该型 ESBLs 的传播具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株来源 郑州某鸡场分离、经过 VITEK-32 全自动鉴定仪证实、基因型鉴定的一株产 CTX-M-14 型 ESBL 肺炎克雷伯菌(耐药表型及基因型鉴定另文发表^[20],标号为 F₁),*E. coli* C600 受体菌由河南省人民医院检验科惠赠。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922(购自中国普通微生物菌种保存中心,阴性对照菌);肺炎克雷伯菌 ATCC700603(购自北京大学医学部,阳性对照菌)。

1.1.2 培养基 LB 琼脂、LB 肉汤购自广东环凯微生物科技公司。

1.1.3 药物 试验用抗生素为标准品或对照品,均购自中国兽医药品监察所,均在有效期内。

1.1.4 试剂 普通质粒小提试剂盒(TIANGEN,北京),PBR322 载体、Taq 酶等购自大连宝生物公司。

1.1.5 仪器 Vitek-32 全自动细菌鉴定仪购自法国生物-梅里埃公司,凝胶成像系统购自 Alpha In-

notech Corporation,PCR 扩增仪购自美国 Thermo-cycler2720。

1.2 方 法

1.2.1 CTX-M-14 型 ESBL 基因的质粒接合传递试验

1.2.1.1 供体菌(标号 F₁)与受体菌(*E. coli* C600)接合 用 LB 平板分离培养 F₁ 菌株和 *E. coli* C600(受体菌对利福平耐药),37 °C 过夜培养,挑培养的供体菌和受体菌的单菌落分别接种入 5 mL 的 LB 肉汤中,37 °C 过夜培养,取培养的供体菌和受体菌各 50 μ L 同时加到 5 mL LB 肉汤中混匀,37 °C 过夜培养。

1.2.1.2 阳性接合子的筛选与确认 1)取 100 μ L 接合菌液(剩余菌液 4 °C 保存)及只含受体菌、供体菌的对照菌液分别接种于 LB 平板(含 160 μ g/mL 利福平和 20 μ g/mL 头孢噻肟),37 °C 过夜培养;2)接合菌液在利福平和头孢噻肟上述浓度耐受的平板上能生长,生长的菌落即为阳性接合子;而对照菌液在利福平和头孢噻肟上述浓度耐受的平板上不生长。

1.2.1.3 阳性接合子的 MIC 值检测 根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的微量肉汤稀释法^[21],分别测定阿莫西林(AMX)等 20 种药物对接合子及 *E. coli* C600 的最小抑菌浓度(MIC)。

1.2.1.4 阳性接合子的 PCR 检测 对筛选出的阳性接合子进行质粒抽提,分别用以下 *bla*_{CTX-M}、*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV} 及 *bla*_{ACT} 特异性引物,PCR 反应体系和条件参考文献[20],PCR 扩增后分别取 8 μ L 产物进行 1% 琼脂糖电泳,凝胶成像观察结果。

1.2.2 CTX-M-14 型 ESBL 的基因环境

1.2.2.1 接合子质粒双酶切 对筛选出的含有 CTX-M-14 基因的阳性接合子用质粒小提试剂盒进行抽提,经 0.8% 琼脂糖电泳(溴化乙锭染色),紫外投射仪下观察结果,确认接合子质粒存在后用 *Bam* HI 和 *Sal* I 双酶切。双酶切反应体积为 25 μ L,反应体系为接合子质粒 7 μ L,水 8 μ L,10×Buffer 4 μ L,*Bam* HI 3 μ L,*Sal* I 3 μ L,混匀并离心,37 °C 水浴酶切 3~4 h,经 0.6% 琼脂糖电泳(溴化乙锭染色),用凝胶成像摄相。

1.2.2.2 PBR322 克隆载体双酶切 PBR322 载体用 *Bam* HI 和 *Sal* I 2 个限制性内切酶进行双酶切。双酶切反应体积为 25 μ L,反应体系为载体质粒 8 μ L,水 7 μ L,10×Buffer 4 μ L,*Bam* HI 3 μ L,*Sal* I

3 μL, 混匀并离心, 37 °C水浴酶切3~4 h, 获得载体质粒酶切片段, 经0.6%琼脂糖凝胶电泳, 紫外投射仪下观察结果并摄相。

1.2.2.3 连接转化 酶切后的接合子质粒片段与酶切后的PBR322载体连接, 体系为:接合子质粒片段6 μL, PBR322载体2 μL, 10×Buffer 1 μL, T4 DNA连接酶1 μL, 16 °C连接过夜。将连接产物转入大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中然后涂于含头孢噻肟钠(20 μg/mL)、氨苄西林(50 μg/mL)及各含42 μL X-gal、IPTG及的LB固体培养板上过夜培养筛选。

1.2.2.4 阳性转化子的筛选及双酶切鉴定 无菌条件下, 用牙签挑取白色的单个菌落(即阳性转化子)接种于相应的培养基, 经培养, 再次抽提重组质粒, 所提质粒用BamH I和Sal I进行双酶切鉴定, 酶切产物经0.6%琼脂糖凝胶电泳(溴化乙锭染色), 紫外投射仪下观察结果并摄相。

1.2.2.5 阳性转化子的MIC值检测 根据CLSI推荐的方法^[21], 分别测定阿莫西林(AMX)等20种药物对阳性转化子的最小抑菌浓度(MIC)。

1.2.2.6 核苷酸序列测定与分析 接合子质粒经转化克隆及鉴定后得到转化子, 培养后其菌液送大连宝生物公司用M13通用引物Primer Walking测序(包括CTX-M-14基因, 并向其上下游连续测序), 把测的3段基因序列拼为一段完整序列, 结果用BioXM 2.6软件分析, 并在NCBI数据库中用BLAST工具进行同源序列比较。

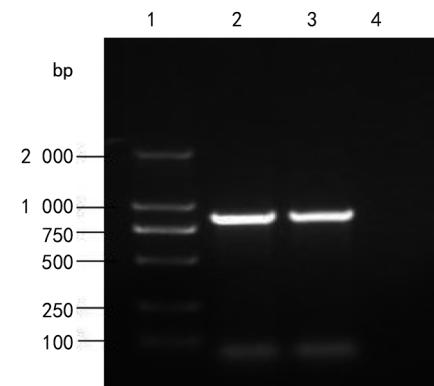
1.2.2.7 CTX-M-14型基因上下游分析 根据测序结果, 分析CTX-M-14基因的上游序列及下游序列, 对比CTX-M-14基因片段与原菌株测序结果有无差异。

2 结 果

2.1 质粒接合传递试验结果 接合子PCR扩增显示, bla_{CTX-M}及bla_{TEM}基因呈现阳性, 结果见图1, 而受体菌表现为阴性, 说明bla_{CTX-M}及bla_{TEM}基因能通过接合试验传递; 用bla_{ACT}型特异性引物扩增接合菌表现为阴性, 说明该基因不能与bla_{CTX-M}及bla_{TEM}等基因同时被接合。

2.2 接合子质粒及PBR322载体双酶切结果 阳性接合子及PBR322克隆载体抽提质粒后用BamH I和Sal I双酶切获得相应的质粒酶切片段, 酶切后结果如图2。

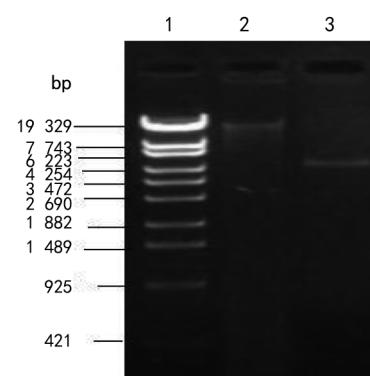
2.3 阳性转化子双酶切鉴定结果 筛选的阳性转化子抽提重组质粒用BamH I和Sal I进行双酶切



注: 1 为 Marker 2000; 2 为 TEM 型 PCR 产物; 3 为 CTX-M 型 PCR 产物; 4 为阴性对照。

图1 接合菌PCR产物凝胶电泳

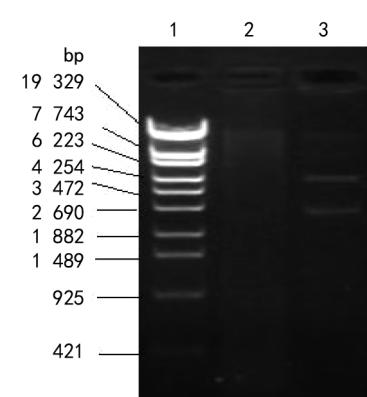
Fig.1 Gel electrophoresis of the zygomycetes PCR products



注: 1 为 Marker 19329; 2 为接合子质粒双酶切图; 3 为 PBR322 载体双酶切图。

图2 接合子质粒及PBR322载体质粒双酶切电泳图

Fig.2 Electrophoresis picture of the conjugal and PBR322 plasmids digested by two restriction enzymes



注: 1 为 Marker 19329; 2 为阴性对照; 3 为阳性转化子双酶切图。

图3 阳性转化子双酶切电泳图

Fig.3 Electrophoresis picture of the transformant plasmids digested by two restriction enzymes

鉴定, 结果见图3。

2.4 耐药表型的测定结果 通过测定供体菌、含

CTX-M-14 基因片段的阳性接合子及筛选的阳性转化子对阿莫西林、阿莫西林+克拉维酸、头孢噻肟、环丙沙星及阿米卡星等药物的耐药表型,分析各菌株对各种药物的敏感性,见表 1。供体菌对利福平敏感,而接合子对利福平耐药,原因在于接合子具有

受体菌对利福平耐药的特性。接合子的其余耐药表型与供体菌保持一致,具有供体菌相似的耐药表型。在含头孢噻肟平板上筛选的含 CTX-M-14 基因片段的阳性转化子对头孢噻肟耐药,而对其余的大多数药物表现敏感。

表 1 供体菌、阳性接合子及转化子对多种抗菌药物的敏感性

Tab.1 Susceptibility of the various types of strains to varieties of antimicrobial agents

抗菌药物	MIC/(μ g/mL)			
	F ₁	C600	F ₁ 阳性接合子	含 CTX-M-14 基因的转化子
阿莫西林 AMX	>128	4	>128	128
阿莫西林/克拉拉酸(4:1)	无	4	128	32
氨苄西林 AM	>128	8	>128	128
氨苄西林+舒巴坦 AM/SU(2:1)	128	8	32	32
头孢噻肟钠 CTX	64	<0.0625	64	64
头孢曲松 CRO	64	<0.0625	64	<0.0625
头孢噻呋 CTF	16	无	无	0.5
亚胺培南 IMI	<0.0625	无	无	无
头孢吡肟 CPM	1	无	无	无
粘菌素 COM	<0.0625	0.125	0.25	<0.0625
恩诺沙星 ENF	16	无	无	无
环丙沙星 CIP	16	1	32	<0.0625
左氟沙星 LVF	32	1	16	<0.0625
氟苯尼考 FLO	32	1	64	0.5
多西环素 DOX	32	0.25	32	1
阿米卡星 AK	64	0.5	128	<0.0625
磷霉素 FOS	>128	2	>128	<0.0625
新霉素 NEO	32	0.125	0.5	<0.0625
庆大霉素 GM	128	0.25	128	无
利福平 RIF	8	>128	128	4

2.5 转化子核苷酸序列测定结果 经测序,通过 DNASTAR 软件把所得 CTX-M-14 及其上下游序列进行拼接,拼接出 2 637 bp 的基因序列,将序列在 NCBI 数据库进行 Blast 比对,包含上游序列 ISEcpl、下游序列 IS903 及完整的 CTX-M-14 基因开放阅读框等移动元件,序列号为 HQ650134,其基因序列如图 4。

2.6 含 CTX-M-14 型 ESBL 的基因上下游分析 测序结果经比对,测出 2 637 bp 的基因序列,其中包括上游序列 ISEcpl tnpA、-35 区和-10 区、重复序列 IRR、876 bp 的 CTX-M-14 基因开放阅读框及下游序列 IS903 和 IRL,见图 5。

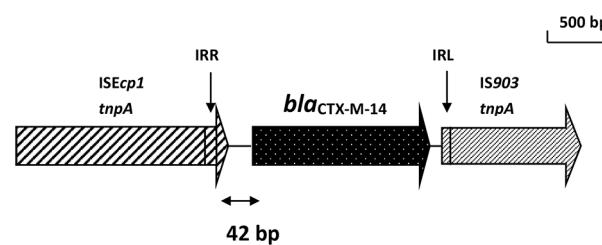


图 5 CTX-M-14 型 ESBL 基因的基因环境结构图

Fig.5 Genetic environment structure picture of CTX-M-14 gene β -lactamase

Sbjct 1	TTATCAGCTTTATGACTCGATATGGTAAAATAATAGTAAGAAAAGTAGTAAAAAGGG	60
Sbjct 61	GTTCTAATTATGATTAATAAAAATTGATTCAAAAGCTACGAATCTAACATCAAATGCAGGT →ISEcp1(70-1332 bp)	120
Sbjct 121	1320
Sbjct 1321	TGTCTGGTATAATAAGAATATCATCAATAAAATTGAGTGTTGCTCTGGATAACTTGCA ISEcp1 ←	1380
Sbjct 1381	GAGTTTATTAAGTATCATTGCAGCAAAGATGAAATCAATGATTATCAAAAATGATTGAA -35 区	1440
Sbjct 1441	<u>AGGTGGTTGTAATAATGTTACAATGTGAGAAGCAGTCTAAATTCTCGTGAAATAGT</u> 1500 -10 区	
Sbjct 1501	GATATTGAAGCTAATAAAAA <u>ACACACGTGGAATTAGGAAATACTGATGTAACACGGAT</u> 1560 IRR	
Sbjct 1561	TGACCGTATTGGAGTTGAGATGGTGACAAAGAGAGTGCAACGGATGATGTTCGCGCG →bla _{CTX-M-14} ORF(876 bp)	1620
Sbjct 1621	2400
Sbjct 2401	GAGAGCCGCCGCGATGTGCTGGCTTCAGCGCGAGAACATCGCCGAAGGGCTGTA <u>ACTG</u> 2460 bla _{CTX-M-14} ORF ← → IS903	
Sbjct 2461	<u>GTTTGTTGAATAATCGAAC</u> TTTGCTGAGTTGAAGGATCAGATCACGTATCTCCGA 2520 IRL	
Sbjct 2521	CAACGCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCAATAGTTCAAAATACCAACTGGCCCACCTACAA 2580	
Sbjct 2581	TAAAGCCCTCATCAAGCGTGGCTCCATAACTTCTGGATGATGAAGCTATTCA ? 2637 IS903(2460->2637 bp) ←	

图 4 基因序列

Fig.4 Gene sequence

3 讨 论

据报道,肺炎克雷伯菌容易把耐药质粒转移给大肠埃希菌 C600,表明介导质粒的转移在不同种属的细菌之间具有一定的通用性^[22]。据报道,携带 CTX-M-14 基因的质粒大多含有多重耐药基因,表现出对多种抗生素的耐药特征,具有更多的传播机会^[20]。本研究发现供体菌同时含 CTX-M-14、SHV-11、TEM-1 及 ACT-like 等基因,但质粒接合试验及接合菌 PCR 扩增表明这些基因并不同时存在 1 个质粒上。该试验中 CTX-M 和 TEM 基因可以通过质粒在细菌间转移,但是 ACT 基因不能和 CTX-M 及 TEM 基因同时转移,这说明 ACT 基因可能存在于不同质粒或转座子上,有些质粒能通过质粒接合试验进行转移,有些质粒不能进行转移,说明这些细菌的耐药基因存在于不可转移的质粒上,细菌之间可以通过质粒接合传递耐药基因及耐药性,这是导致细菌产生多重耐药的重要原因之一。

药物敏感性试验表明,供体菌对青霉素类、三代头孢菌素类、氨基糖苷类及阿米卡星均耐药,而只对

碳青酶烯类的亚胺培南和四代头孢菌素类头孢吡肟表现敏感,这体现了 ESBLs 和 AmpC 酶结合的效果,这与管希周等^[23]研究报道一致。供体菌还表现对利福平敏感,而接合子对利福平耐药,原因在于接合子具有受体菌对利福平耐药的特性。接合子的其余耐药表型与供体菌基本一致,具有与供体菌相似的耐药表型,仅有个别药物的 MIC 值较供体菌降低。另外,具有临床意义的是供体菌把对三代头孢菌素的耐药性,转移给了受体菌 *E. coli* C600,预示耐药性的横向传播以及暴发流行的可能。含 CTX-M-14 基因的阳性转化子对头孢噻肟耐药,而对其余的大多数药物表现敏感,这与朱恒乾等^[24]报道一致。本试验中,接合子均具有 ESBLs 的表型,这显示该接合子在产生 TEM 型基因的同时一定产生其它类型的 ESBLs(如 SHV 型、CTX-M 型等),因为受体菌 *E. coli* C600 本身不存在对 β-内酰胺类耐药的其它机制。另外,该接合子 PCR 检测结果也支持了这点。接合子中的 TEM 型和 CTX-M 型基因是由产 ESBLs 供体菌通过接合传递而来,揭示临床菌

株通过接合试验在编码ESBLs基因的水平传播,导致了ESBLs菌株的流行。因此,临床应加强细菌耐药性监测、深入研究其耐药机制,对于减缓耐药性的产生和传播具有重要意义。

本研究发现,在bla_{CTX-M-14}基因的上游存在插入序列ISEcp1,据有关研究,该插入序列已在肺炎克雷伯菌、变形菌和沙门菌等多种肠杆菌科细菌中发现^[25]。Eckert等^[26]发现,产bla_{CTX-M-14}基因的上游均存在插入序列ISEcp1,同时其余CTX-M型ESBLs基因的上游也大多发现插入序列ISEcp1。本研究还发现,在bla_{CTX-M-14}基因的下游存在插入序列IS903,在bla_{CTX-M-14}基因的上游和下游均存在反向重复序列IRR和IRL,且在bla_{CTX-M-14}基因的上游与反向重复序列IRR间有42 bp的间隔,在bla_{CTX-M-14}基因下游的反向重复序列IRL中发现了公认的启动元件-35区,推测可能是对其下游基因表达的一种机制。Eckert等^[26]发现,5株产bla_{CTX-M-14}基因的下游有4株显示存在插入序列IS903。据Diestra等^[27]发现,含bla_{CTX-M-14}基因的周围环境区域高度保守,发现bla_{CTX-M-14}基因的上下游分别出现插入序列ISEcp1和IS903。据Lartigue等^[28]报道,在bla_{CTX-M-14}基因的上下游也分别出现ISEcp1和IS903,但在bla_{CTX-M-14}基因的上游与反向重复序列IRR间有43 bp的间隔,这与本研究发现的42 bp间隔有差异。可见,ISEcp1和IS903在bla_{CTX-M-14}基因的传播中具有重要作用,除了能介导bla_{CTX-M-14}基因从染色体转移到质粒外,也可使bla_{CTX-M-14}基因在不同的质粒之间进行传播。

利益冲突:无

引用本文格式:刘保光,汪保英,栗俞程,等.肺炎克雷伯菌产CTX-M-14型超广谱 β -内酰胺酶的基因环境研究[J].中国人兽共患病学报,2019,35(10):950-956. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.121

参考文献:

- [1] 刘保光,吴华,张萍英.肺炎克雷伯菌研究进展[J].畜牧与兽医,2014,46(2):108-111. DOI: 10.3969/j.issn.1005-7021.2006.05.021
- [2] Bradford PA. Extended-spectrum β -Lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat[J]. Clin microbiol Rev, 2001, 14(4): 933-951. DOI:10.1128/CMR.14.4.933-951.2001
- [3] 匡秀华,杨玉荣,胡功政,等.鸡肠杆菌科细菌 β -内酰胺酶和超广谱 β -内酰胺酶的检测及药敏分析[J].中国兽医学报,2008,28(2):170-174. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2008.02.013
- [4] 陆坚,唐英春,吴本权,等.华南地区质粒介导超广谱 β -内酰胺酶的基因分型研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2002,22(6): 638-643. DOI: 10.3760/j.issn:0254-5101.2002.06.016
- [5] 肖庆忠,苏丹虹,江洁华,等.广州地区革兰阴性杆菌CTX-M和OXA型超广谱 β -内酰胺酶基因分型研究[J].中华医院感染学杂志,2005,15(12): 1321-1326. DOI: 10.3321/j.issn:1005-4529.2005.12.001
- [6] 季淑娟,顾怡明,谭文涛,等.中国部分地区大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌超广谱 β -内酰胺酶基因型研究[J].中华检验医学杂志,2004,27(9): 590-593. DOI: 10.3760/j.issn:1009-9158.2004.09.019
- [7] Karim A, Poirel L, Nagarajan S, et al. Plasmid mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 201(2): 237-241. DOI: 10.1016/s0378-1097(01)00276-2
- [8] Antonio O, Teresa C, Diana Al, et al. CTX-M-10 Linked to a Phage-Related Element Is Widely Disseminated among Enterobacteriaceae in a Spanish Hospital[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(4): 1567-1571. DOI: 10.1128/AAC.49.4.1567-1571.2005
- [9] 张陆,蒋月,徐国锋,等.可移动遗传元件相关的ESBLs基因传播机制研究[J].中国预防兽医学报,2014,36(5): 414-418. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0589.2014.05.20
- [10] 廖伟娇,江洁华,徐韫健,等.复合转座子ISEcp1B与IS903介导CTX-M ESBLs新基因亚型传播机制的研究[J].国际检验医学杂志,2011,32(10): 1027-1029. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.004
- [11] Hamza E, Dorgham S M, Hamza D A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in broiler poultry farming in Egypt [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2016, 7: 8-10. DOI: 10.1016/j.jgar.2016.06.004
- [12] Du J, Li P, Liu H, et al. Phenotypic and molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university teaching hospital, China [J]. PloS One, 2014, 9(4): e95181. DOI: 10.1371/journal.pone.0095181
- [13] Davis G S, Waits K, Nordstrom L, et al. Intermingled *Klebsiella pneumoniae* populations between retail meats and human urinary tract infections[J]. Clin Infect Dis, 2015, 61(6): 892-899. DOI: 10.1093/cid/civ428
- [14] Aly M M, Khalil S, Metwaly A. Isolation and molecular identification of *Klebsiella* microbe isolated from chicks[J]. Alex J Vet Sci, 2014, 43: 97-103. DOI: 10.5455/ajvs.167205
- [15] Wu H, Wang M, Liu Y, et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella* species isolated from chicken broilers [J]. Int J Food microbiol, 2016, 232: 95-102. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.001
- [16] Sandeep V, Larry O, Isaac M, et al. Molecular characteristics and antibiotic resistance profiles of *Klebsiella* Isolates in Mthatha, Eastern Cape Province, South Africa[J]. Int J Microbiol, 2017, 2017: 1-7. DOI: 10.1155/2017/8486742
- [17] 刘建华,潘玉善,付秀玲,等.一株七彩鸟肺炎克雷伯菌同时产TEM和SHV型 β -内酰胺酶的基因型鉴定[J].中国兽医学报,2009,29(12): 1557-1561. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-

4545.2009.12.034

- [18] Koovapra S, Bandyopadhyay S, Das G, et al. Molecular signature of extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine milk in eastern and north-eastern India[J]. Infect Genet Evol, 2016, 44: 395-402. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.07.032
- [19] Tripathi A, Dutta S K, Majumdar M, et al. High prevalence and significant association of ESBL and QNR genes in pathogenic *Klebsiella pneumoniae* isolates of patients from Kolkata, India[J]. Indian J microbiol, 2012, 52(4): 557-564. DOI: 10.1007/s12088-012-0281-z
- [20] Wu H, Liu B G, Liu J H, et al. Phenotypic and molecular characterization of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase and plasmid-mediated ACT-like AmpC β -lactamase produced by *Klebsiella pneumoniae* isolates from chickens in Henan Province, China[J]. Genet Mol Res, 2012, 11(3): 3357-3364. DOI: 10.4238/2012.September.24.1
- [21] CLSI. CLSI document VET01-A4. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for *Bacteria* isolated from animals [S]. Approved Standard-Fourth Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
- [22] 金光耀, 卓超, 苏丹红, 等. 广州发现产 CTX-M-15 型 ESBLs 肺炎克雷伯菌[C]. 中华医学会第一届感染与抗微生物治疗论坛·第八届全国感染性疾病及抗微生物化疗学术会议论文集. 上海:中华医学会, 2009, 294-297.
- [23] 管希周, 刘又宁, 罗燕萍, 等. 临床产多种 β -内酰胺酶大肠埃希菌的生物学研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(7): 819-822. DOI: 10.3321/j.issn:1005-4529.2005.07.038
- [24] 朱恒乾, 廖晓萍, 陈朝喜, 等. 宠物源大肠杆菌中质粒介导喹诺酮类耐药基因 *qnrD* 的研究[J]. 中国农业科学, 2010, 43(20): 4317-4322. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2010.20.025
- [25] 黎晓强, 卓超. CTX-M-15 型 ESBLs 的传播机制和基因环境的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2010, 31(3): 141-144.
- [26] Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various blaCTX-M genes[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(1): 14-23. DOI: 10.1093/jac/dki398
- [27] Diestra K, Juan C, Curiao T, et al. Characterization of plasmids encoding blaESBL and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(1): 60-66. DOI: 10.1093/jac/dkn453
- [28] Lartigue MF, Zinsius C, Wenger A, et al. Extended-Spectrum β -Lactamases of the CTX-M Type Now in Switzerland[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(8): 2855-2860. DOI: 10.1128/AAC.01614-06

收稿日期:2019-01-25 编辑:王晓欢

(上接第 938 页)

- [33] Okumura K, Ohtani K, Hayashi H, et al. Characterization of genes regulated directly by the virR/virs system in *Clostridium perfringens* [J]. J Bacteriol, 2008, 190(23): 7719-7727. DOI: 10.1128/JB.01573-07
- [34] Frandi A, Mengoni A, Brilli M, et al. Comparative genomics of VirR regulons in *Clostridium perfringens* strains [J]. BMC Microbiol, 2010, 10: 65. DOI: 10.1186/1471-2180-10-65
- [35] Awad MA, Ellemor DM, Boyd RL, et al. Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene [J]. Infect Immun, 2001, 69(12): 7904-7910. DOI: 10.1128/IAI.69.12.7904-7910.2001
- [36] Cheung JK, Keyburn AL, Carter GP, et al. The VirSR two-component signal transduction system regulates Net B toxin production in *Clostridium perfringens* [J]. Infect Immun, 2010, 78(7): 3064-3072. DOI: 10.1128/IAI.00123-10
- [37] Mehdizadeh Gohari I, Parreira VR, Nowell VJ, et al. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0122684. DOI: 10.1371/journal.pone.0122684
- [38] Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, et al. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* [J]. PLoS Pathog, 2008, 4: e26. DOI: 10.1371/journal.ppat.0040026
- [39] Bouillaut L, Dubois T, Sonenshein AL, et al. Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile* [J]. Res Microbiol, 2015, 166(4): 375-383. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.10.002
- [40] Connan C, Popoff MR. Two-component systems and toxino-genesis regulation in *Clostridium botulinum* [J]. Res Microbiol, 2015, 166(4): 332-343. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.12.012

收稿日期:2018-09-12 编辑:张智芳