



# 动物园禽源奇异变形杆菌对第三代头孢菌素的耐药分子机制

梁玉蕾<sup>1#</sup>, 李垠树<sup>1#</sup>, 陈秋如<sup>1</sup>, 董焱斌<sup>1</sup>, 丁爱萍<sup>2\*</sup>, 苑丽<sup>1\*</sup>

(1. 河南农业大学动物医学院, 郑州, 450002;  
2. 郑州市动物园, 郑州, 450008)

## 稿件运行过程

收稿日期: 2024-02-27

修回日期: 2024-03-12



**关键词:** 禽源奇异变形杆菌;  
头孢菌素类;  
耐药基因;  
膜孔蛋白;  
双组分信号转导系统

**Keywords:** Avian-origin *Proteus mirabilis*;  
Cephalosporins;  
Resistance gene;  
Porins;  
Two-component signal transduction system

中图分类号: S852.61

文献标志码: A

文章编号:

2310-1490(2024)-04-0811-08

DOI: 10.12375/ysdwxb.20240414

## 摘要

为研究观赏禽类中分离的奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)对第三代头孢菌素的耐药机制,于2019年从河南省某动物园禽类养殖区绿孔雀(*Pavo muticus*)、红绿金刚鹦鹉(*Ara chloroptera*)、火鸡(*Meleagris gallopavo*)、帽子鸡(polish chicken)和非洲鸵鸟(*Struthio camelus*)5种观赏禽类中分离17株奇异变形杆菌,经药物敏感性试验、*bla*<sub>CTX-M</sub>基因检测、全基因组测序、PFGE和RT-qPCR等探明受试菌对第三代头孢菌素的耐药机制。结果发现:共有6株受试菌对第三代头孢菌素耐药,除1株(6D)携带超广谱 $\beta$ -内酰胺酶*bla*<sub>CTX-M-14</sub>和1株(106A)携带AmpC酶*bla*<sub>ACT-16</sub>外,其余4株经PFGE检测证实为同一克隆型,且细菌体内双组分信号转导系统CpxAR、BaeSR和EnvZ/OmpR的表达量显著高于敏感菌,主要通过抑制耐药菌细胞膜上OmpC和OmpF的表达减少药物吸收,同时促进OmpW表达加速药物外排,从而减少菌体内药物浓度,进而导致其对第三代头孢菌素类耐药。研究表明,动物园禽类养殖区的奇异变形杆菌对第三代头孢菌素的耐药机制复杂多样,散播机制主要为染色体介导的克隆传播,应引起重视。

## Molecular Mechanism of Resistance to Third-generation Cephalosporins from Avian-origin *Proteus mirabilis* in a Zoo

基金项目: 河南省高校科技创新团队支持计划项目(23IRTSTHN021);河南省自然科学基金重点项目(232300421111)

第一作者简介: 梁玉蕾(1999—),女,硕士研究生;主要从事细菌耐药性研究。E-mail: 2663578845@qq.com

\*共同第一作者: 梁玉蕾; 李垠树

\*通信作者: 丁爱萍, E-mail: 3190593871@qq.com; 苑丽, E-mail: yuanli-hn@163.com

LIANG Yulei<sup>1#</sup>, LI Yinshu<sup>1#</sup>, CHEN Qiuru<sup>1</sup>, DONG Yanbin<sup>1</sup>, DING Aiping<sup>2\*</sup>, YUAN Li<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, 450002, China;

2. Zhengzhou Zoo, Zhengzhou, 450008, China)

**Abstract:** To study the molecular mechanism of resistance to third-generation cephalosporins in *Proteus mirabilis*. In 2019, 17 strains of *Proteus mirabilis* were isolated from the five ornamental birds such as green peacock (*Pavo muticus*), red-and-green macaw (*Ara chloroptera*), turkey (*Meleagris gallopavo*), polish chicken, and African ostrich (*Struthio camelus*) in the poultry breeding area of a zoo in Henan Province. The mechanism of resistance of *Proteus mirabilis* to third-generation cephalosporins was explored by antimicrobial susceptibility test,  $bla_{CTX-M}$  gene detection, whole genome sequencing, pulsed field gel electrophoresis and real-time relative quantitative PCR. The results showed that a total of six strains were resistant to third-generation cephalosporins, except for 6D carrying the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase  $bla_{CTX-M-14}$  and 106A carrying the AmpC enzyme  $bla_{ACT-16}$ , the other four strains were confirmed to be the same clone by pulsed field gel electrophoresis detection. and the expression levels of CpxAR, BaeSR and EnvZ/OmpR in the two-component signal transduction system in drug-resistant bacteria were significantly higher than those in the sensitive bacteria, and it reduces drug absorption by regulating the expression of OmpC and OmpF in the cell membrane of drug-resistant bacteria; Promote the expression of OmpW and accelerate drug efflux, thereby reducing the drug concentration in the antimicrobial-resistant bacteria, which in turn leads to their resistance to third-generation cephalosporins. These results indicate that the resistance mechanism of *Proteus mirabilis* to third-generation cephalosporins isolated in the poultry breeding area of the zoo is complex and diverse, and the dispersal mechanism is mainly chromosome-mediated clonal transmission, which should be paid attention to.

变形杆菌属(*Proteus*)细菌在自然界中广泛存在,在人体内生存和繁殖的能力较强,临床上可引起腹泻、脓毒症、呼吸系统问题和尿路感染等疾病;奇异变形杆菌(*P. mirabilis*, PM)是公认的导致人类和动物感染的主要病原体之一<sup>[1]</sup>。近年来,人源和动物源奇异变形杆菌的临床分离率日趋增多,且临床分离菌株多呈现明显耐药<sup>[2]</sup>。 $\beta$ -内酰胺类为人医和兽医临床常用抗生素,但是,随着近年来第三代头孢菌素类药物在临床中的广泛应用,耐药菌也逐渐增多,尤其是质粒介导的超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(extended spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBLs)和 AmpC 酶的出现<sup>[3]</sup>,给临床有效防控耐药菌感染造成极大困难。细菌中的双组分信号转导系统(two-component signal transduction system, TCS)可调控多种基因(如细菌细胞膜上的膜孔蛋白或外排泵相关基因)的表达,从而参与细菌耐药性的形成<sup>[4]</sup>。

随着“One Health”理念的推广及普及,耐药菌在人与动物间的水平传播越来越受到人们的关注和重

视。动物园是人与动物密切接触和互动的一个重要场所。游客与动物互动(如接触或喂食)在教育 and 娱乐方面有一定价值,同时也可能增加病原菌或耐药菌的散播,但是,截至目前相关研究较少。课题组曾在某动物园禽类散养场分离获得1株染色体介导的替加环素耐药不动杆菌(*Acinetobacter indicus*),其可通过同源重组的方式进行水平散播<sup>[5]</sup>。本研究从河南省某动物园禽类养殖区分离获得17株禽源奇异变形杆菌,经药物敏感性试验、耐药基因检测、全基因组测序、PFGE和RT-qPCR,研究受试菌对第三代头孢菌素的耐药机制和散播机制,为临床控制第三代头孢菌素耐药菌的传播提供参考依据,并为评估动物园禽类散养场中人兽共患耐药菌在人与动物间的水平传播风险提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

2019年7月,在河南省某动物园禽类养殖区,采

集绿孔雀(*Pavo muticus*)、红绿金刚鹦鹉(*Ara chloroptera*)、火鸡(*Meleagris gallopavo*)、帽子鸡(polish chicken)和非洲鸵鸟(*Struthio camelus*)5种观赏禽类粪便或肛拭子样品,对于死体采集其肝脏或心脏组织样本,一只动物仅收集保存1份有效样品。细菌经常规分离、纯化及全自动细菌鉴定仪鉴定,共获得17株禽源奇异变形杆菌,详细分离动物及菌株命名见表1。

## 1.2 主要药品

除头孢噻肟和头孢噻吩购自上海源叶生物科技有限公司外,其他药物,包括阿米卡星、多西环素、氟苯尼考和恩诺沙星,均购自河南牧翔动物药业有限公司。药品使用时均在有效期内。

## 1.3 药物敏感性试验

采用微量肉汤稀释法检测头孢噻肟、头孢噻吩、阿米卡星、多西环素、氟苯尼考和恩诺沙星对17株禽源奇异变形杆菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),药敏结果按照美国临床试验室标准化协会(CLSI)判读<sup>[6]</sup>。试验重复3次,以*Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922为质控菌。

## 1.4 *bla*<sub>CTX-M</sub> 基因的检测

根据药敏结果,对头孢噻肟耐药却不携带耐药基因的临床菌株用煮沸法提取DNA,由北京擎科生物科技有限公司合成*bla*<sub>CTX-MU</sub>、*bla*<sub>CTX-M-1</sub>和*bla*<sub>CTX-M-9</sub>的引物序列<sup>[7]</sup>,PCR检测*bla*<sub>CTX-M</sub>相关基因。PCR产物送至北京擎科生物技术有限公司测序,结果经NCBI数据库序列比对后确定基因亚型。

## 1.5 PFGE 检测

根据前期试验结果,参照PFGE标准程序说明书对耐头孢噻肟但不携带*bla*<sub>CTX-M</sub>基因的奇异变形杆菌进行PFGE分型。用DNA限制性内切酶*Xba* I对受试菌进行酶切,沙门氏菌H9812作为参考菌株。

## 1.6 全基因组测序

根据PFGE分型结果,利用天根(TIANGEN)细菌全基因组提取试剂盒提取代表性受试菌的总基因组DNA(gDNA)。通过Illumina高通量测序仪进行测序,将获得的序列数据经SOAP、SPAdes和ABYSS进行序列拼接、组装和比对。使用CISA软件整合拼接结果,并对整合后的结果进行最终的优化处理,确保基因组序列的质量和准确性。使用ResFinder 4.1在线分析工具(<https://www.genomicpidemiology.org/services/>)对得到的基因组序列进行耐药基因的

查找。

## 1.7 RT-qPCR 检测

为进一步确认耐头孢噻肟却不携带耐药基因的奇异变形杆菌耐药机制,以敏感菌株作为对照菌,RT-qPCR检测耐药菌株的膜孔蛋白及相关调控蛋白的相对表达量。使用异硫氰酸胍-酚法抽提待测菌株的总RNA,测定其浓度及纯度后,按照HiScript<sup>®</sup> III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)反转录试剂盒(诺唯赞,中国)的说明进行反转录合成cDNA。以cDNA为模板,16S rRNA为内参基因,通过RT-qPCR对样品中待测基因的mRNA相对表达水平进行定量检测,反应条件为:95℃,30s;(95℃,10s;60℃,30s)40个循环;95℃,15s;60℃,60s;95℃,15s。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,每个样品重复3次。

## 1.8 数据分析

利用GraphPad Prism 8.0软件对试验数据进行统计和显著性分析,组内采用*t*检验,\*为 $P < 0.05$ 为有统计学差异;\*\*为 $P < 0.01$ 为差异显著;\*\*\*和\*\*\*\*分别为 $P < 0.001$ 和 $P < 0.0001$ ,均为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 药敏试验结果

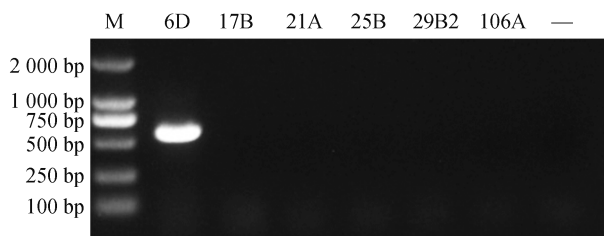
17株奇异变形杆菌对5种受试抗菌药的敏感性结果见表1。由表1可知,受试菌对多西环素和恩诺沙星的耐药率高达88.2%(15/17),仅有2株菌(39B和106A)对其敏感;对头孢噻肟和头孢噻吩的耐药率为35.3%(6/17)、对氟苯尼考的耐药率为23.5%(4/17);对阿米卡星耐药率较低,仅1株(22B)呈现耐药。有9株菌为多重耐药菌株,占52.9%,其中菌株6D除对阿米卡星敏感外,对头孢噻肟、头孢噻吩、多西环素、氟苯尼考和恩诺沙星均高度耐药。同时,发现9株多重耐药菌均分离自健康禽类,说明游客在动物园与健康动物间的互动也存在耐药菌的水平散播风险。

### 2.2 *bla*<sub>CTX-M</sub> 基因检测结果

用PCR检测6株对第三代头孢菌素耐药的禽源奇异变形杆菌是否携带*bla*<sub>CTX-M</sub>基因(图1),经测序和序列比对发现,6株耐药菌株中仅有1株(6D)为*bla*<sub>CTX-M</sub>阳性,其亚型为*bla*<sub>CTX-M-14</sub>,说明该动物园禽类散养场中禽源奇异变形杆菌对第三代头孢菌素耐药的原因复杂多样,需进一步研究。

表1 17株奇异变形杆菌药物敏感性试验结果  
Tab. 1 The susceptibility results of 17 strains of *Proteus mirabilis*

来源物种 Species of origin	菌株 Strains	分离部位 Separation site	头孢噻肟 CTX	头孢噻吩 CEF	阿米卡星 AMK	多西环素 DOX	氟苯尼考 FFC	恩诺沙星 ENFX
火鸡 <i>Meleagris gallopavo</i>	6B	粪便(腹泻)	<0.5	<0.5	32	128	>512	512
	6D	粪便(腹泻)	>512	>512	16	128	>512	>512
	10B	肛拭子	<0.5	<0.5	4	16	16	32
	12B	肛拭子	<0.5	<0.5	8	256	8	512
	25B	肛拭子	16	16	8	32	8	128
红绿金刚鹦鹉 <i>Ara chloroptera</i>	15	粪便(腹泻)	<0.5	<0.5	2	128	8	256
	17B	粪便(腹泻)	8	8	2	32	8	128
	18BA	粪便(腹泻)	<0.5	<0.5	4	64	256	512
绿孔雀 <i>Pavo muticus</i>	21A	肛拭子	16	16	2	32	4	128
	22A2	肛拭子	<0.5	<0.5	8	128	4	512
	22B	肛拭子	1	1	128	128	16	256
	105D	肝脏(死体)	<0.5	<0.5	4	128	8	256
	106A	心脏(死体)	4	4	1	4	16	2
	108H2	肝脏(死体)	<0.5	<0.5	8	64	8	256
帽子鸡 Polish chicken	29B2	肛拭子	16	16	4	32	8	128
	30A	肛拭子	<0.5	<0.5	32	128	32	>512
非洲鸵鸟 <i>Struthio camelus</i>	39B	粪便	<0.5	<0.5	4	2	2	2
耐药率/% Resistance rate			35.3	35.3	5.9	88.2	23.5	88.2



M. DL2000 DNA marker; —. 阴性对照。

M. DL2000 DNA marker; —. Negative.

图1 6株奇异变形杆菌  $bla_{CTX-M}$  基因扩增结果

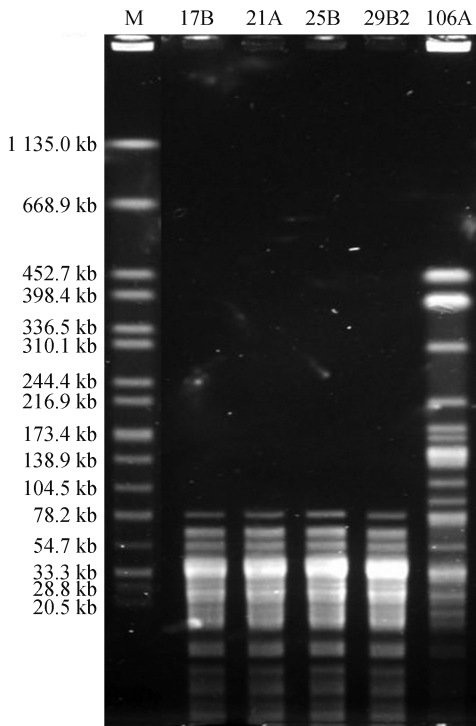
Fig. 1 The amplification map of  $bla_{CTX-M}$  in six strains of *Proteus mirabilis*

### 2.3 PFGE结果

根据前期试验结果,对5株耐第三代头孢菌素但不携带  $bla_{CTX-M}$  基因的禽源奇异变形杆菌进行PFGE分型。如图2所示,菌株17B、21A、25B和29B2具有完全相同的谱型,表明为同一克隆型,且这4株菌分别来自不同禽类样本,说明该动物园禽类散养场内对第三代头孢菌素耐药的禽源奇异变形杆菌存在明显的克隆散播。

### 2.4 全基因组测序结果

为进一步研究不携带  $bla_{CTX-M}$  但对第三代头孢菌素耐药的禽源奇异变形杆菌的耐药机制,选取17B和106A进行全基因组测序,将获得的序列数据经拼接、组装和比对后发现耐药菌106A除携带 $\beta$ -内酰胺类耐药基因  $bla_{ACT-16}$  外,还同时携带多个耐药基因,包括  $sul1$ 、 $dfrA14$ 、 $dfrA27$ 、 $aph(3')-Ia$ 、 $aph(6)-Id$ 、 $aph(3'')-Ib$ 、 $aac(3)-IId$ 、 $aadA16$ 、 $mph(A)$ 、 $qnrB6$ 、 $qnrB91$ 、 $aac(6')-Ib-cr$ 、 $tet(J)$ 、 $tet(A)$ 、 $cat$  和  $floR$ ,其中,  $bla_{ACT-16}$  属于 AmpC 酶。AmpC 酶能水解除第四代头孢菌素和碳青霉烯类之外的多数 $\beta$ -内酰胺类药物的 $\beta$ -内酰胺环而导致菌株耐药<sup>[8]</sup>,说明菌株106A对第三代头孢菌素耐药的原因是其产生了 AmpC 型  $bla_{ACT-16}$  酶。耐药菌株17B虽然对头孢噻肟耐药,但未检测到对第三代头孢菌素耐药的相关已知基因,暗示其可能通过其他机制,如外排泵、膜通透性改变等对第三代头孢菌素耐药,其耐药机制仍需进一步研究。



M. 沙门氏菌 H9812。  
M. *Salmonella* H9812.

图2 5株奇异变形杆菌的PFGE分型图谱  
Fig. 2 PFGE map of five strains of *Proteus Mirabilis*

## 2.5 RT-qPCR结果

### 2.5.1 膜孔蛋白相关基因的mRNA相对表达量

任选1株对头孢噻肟敏感的禽源奇异变形杆菌12B作为对照株,采用RT-qPCR检测耐药菌株17B的染色体编码膜孔蛋白相关基因的表达量,引物见表2,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算其膜孔蛋白基因 *ompA*、*ompC*、*ompF* 和 *ompW* 的相对表达水平。结果显示,菌株17B的 *ompC* 和 *ompF* 的相对表达量极显著降低,其中 *ompC* 的相对表达量较对照菌12B下降了约93.4%;而 *ompA* 和 *ompW* 的相对表达量极显著升高(图3)。

### 2.5.2 双组分信号转导系统相关基因的mRNA相对表达量

为探究引起外膜蛋白表达量变化的原因,以敏感菌株12B为对照菌,采用RT-qPCR检测耐药菌株17B的相关双组分信号转导系统相关基因(*cpxA*、*cpxR*、*baeS*、*baeR*、*envZ* 和 *ompR*)的相对表达水平。图4结果显示,与对照菌12B相比,耐药菌17B的 *cpxA* 和 *cpxR* 的相对表达量分别增加5倍和4倍,而 *baeS*、*baeR* 和 *envZ*、*ompR* 的相对表达量均增加2倍左右。

表2 RT-qPCR引物序列

Tab. 2 Primer sequences for RT-qPCR

靶基因 Target gene	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	长度/bp Length
<i>ompA</i>	F:TCGCATTAGCAGTGGCAGTGG	139
	R:CCGATATTCACGCCGTCCCAAT	
<i>ompC</i>	F:GCGTCGGCGGTTCTATCACTT	96
	R:AAGCAGCGGTGTCTGAGCAT	
<i>ompF</i>	F:ACGGTGTGGCGGTTCTATCAG	88
	R:TCTTGCAGGTTGGTACGGTACG	
<i>ompW</i>	F:AATCCAGCGGTAGGCAAACCTTG	119
	R:ACAGAAGCGTTCAGCATCCAGT	
<i>cpxA</i>	F:GCCCATCAAGTAGCCCGCAATC	163
	R:GCCACATCATCCGCCGATT	
<i>cpxR</i>	F:AATGTTGTGCTCGCCACTGAC	171
	R:ATCGCTGCCTCTTGCCGTTAA	
<i>baeS</i>	F:AATTGTGGTGGGTGATTGTC	89
	R:AACTGGTGCCTAACTGTTGCTT	
<i>baeR</i>	F:AAGTGTTAAGCCGTGACCAGTT	166
	R:TCCCAACGATAGCCTTGTCCAT	
<i>envZ</i>	F:AATGCCACACGCTACGGACAT	94
	R:TGCCTGGACCATCGTCTTCAAC	
<i>ompR</i>	F:AGTCCGATGGAGCGTTCTATTG	80
	R:TAGCCAGGATGGGTGGGATCT	
16S rRNA	F:TTCCTCCAGATCTCTACGCA	136
	R:CCTCAGCACATTGACGTTAC	

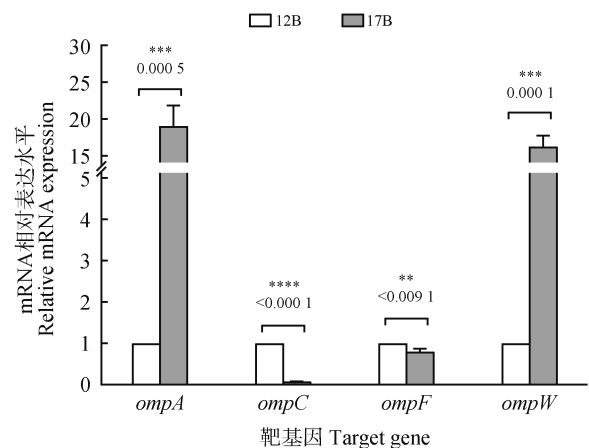


图3 耐药菌17B的膜孔蛋白基因相对mRNA表达水平  
Fig. 3 The relative mRNA expression of the porin-related genes of strain 17B

有文献<sup>[9]</sup>证明, CpxAR 双组分信号转导系统对 *ompF* 和 *ompC* 的表达具有负向调节作用, BaeSR 双组分信号转导系统对 *ompW* 为正调控、对 *ompC* 和 *ompF* 均为负调控, 而 EnvZ/OmpR 双组分信号转导系统对 *ompC* 正调控作用。本试验结果表明, 耐药菌 17B 的双组分信号转导系统 CpxAR、BaeSR 和 EnvZ/OmpR 的表达量显著高于敏感对照菌, 其抑制 OmpC 和 OmpF 表达而减少药物吸收, 促进 OmpW 表达而加速药物外排, 减少耐药菌体内的药物浓度, 进而对第三代头孢菌素类药物产生耐药。

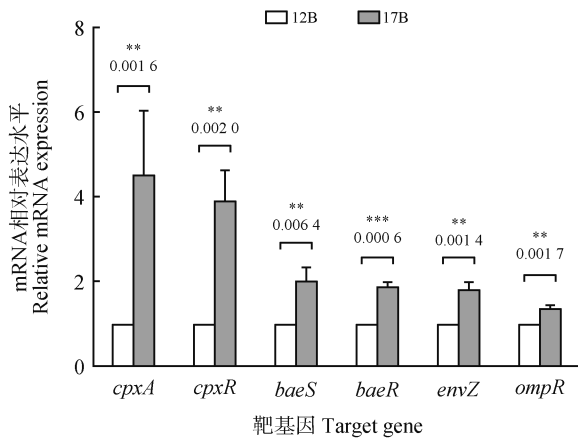


图4 17B中双组分系统相关基因的mRNA相对表达水平

Fig. 4 The relative mRNA expression of two-component system-related genes in 17B

### 3 讨论

目前国内的一些动物园为吸引游客, 会增设触摸或者喂食等游客与动物互动的活动。虽然这些活动在教育 and 娱乐方面具有一定的价值, 但这些行为也增加了人兽共患病病原体的传播风险, 具有严重的公共卫生安全隐患<sup>[10-11]</sup>。本研究结果表明, 河南省某动物园禽源奇异变形杆菌对头孢噻肟和头孢噻吩的耐药率均为 35.3% (6/17), 其中 2 株分离自腹泻禽类粪便样品, 1 株分离自死亡禽类的新鲜组织样品, 其余均来自于健康禽类肛门拭子。由此可见, 除患病禽类外, 健康禽类机体也会携带耐药菌, 这给临床治疗带来了困难, 需要引起重视。因此, 动物园应加强动物的管理和监测, 以保障人类和动物健康。其次, 游客也应提高自我防护意识, 在动物园与动物直接或间接接触后需做好消毒措施, 以减少病原微生物的感染概率。此外, 政府和相关部门也应该加强对动物园的监管和管理, 确保其严格遵守公共卫

生标准。

奇异变形杆菌是临床感染中常见的阴性菌, 其耐药性近年来随着广谱抗生素的广泛应用逐渐升高, 甚至出现多重耐药现象<sup>[12]</sup>。头孢噻肟属于第三代头孢菌素类药物, 是至关重要的人兽共用抗菌药物。然而, *bla*<sub>CTX-M</sub> 基因的出现导致奇异变形杆菌对第三代头孢菌素产生耐药性<sup>[13]</sup>。早在 2013 年潘玉善等<sup>[14]</sup>已发现禽源奇异变形杆菌中存在 *bla*<sub>CTX-M-65</sub> 基因, 且 CTX-M 型超广谱  $\beta$ -内酰胺酶基因在禽源奇异变形杆菌中的存在已经比较普遍。AmpC 酶是  $\beta$ -内酰胺酶的一个重要分支, 由染色体或质粒介导, 呈现出多样化的基因型趋势<sup>[15]</sup>。AmpC 酶的产生使细菌能够水解头孢菌素类药物, 进而失去抗菌活性, 也是奇异变形杆菌对第三代头孢耐药的重要原因之一<sup>[12]</sup>。葛强等<sup>[16]</sup>对分离得到的 21 株猪源奇异变形杆菌进行耐药基因扩增发现, 猪源奇异变形杆菌中携带 ESBLs 或 AmpC 的菌株比例较高, 分别为 57.1% 和 14.3%, 同时携带 ESBLs 和 AmpC 的菌株占 14.3%, 其中 ESBLs 菌株为 *bla*<sub>TEM</sub> 型、*bla*<sub>CTX-M</sub> 型或 *bla*<sub>TEM</sub> 型和 *bla*<sub>CTX-M</sub> 型。本研究测序结果显示, 1 株 (6D) 携带耐药基因 *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, 1 株 (106A) 携带耐药基因 *bla*<sub>ACT-16</sub>, 与耐药表型一致。

本研究中 4 株同一克隆型头孢噻肟耐药菌 (17B、21A、25B 和 29B2) RT-qPCR 结果表明, 3 个双组分信号转导系统共同调节膜孔蛋白基因 (*ompA*、*ompC*、*ompF* 和 *ompW*) 的表达, 结果导致禽源奇异变形杆菌对头孢噻肟的抗性。OmpC 和 OmpF 为革兰阴性菌细胞膜上的主要孔道蛋白, 在抗菌药透过细胞膜进入菌体的过程中发挥重要作用<sup>[17]</sup>, 其表达量下降时会导致抗菌药的吸收减少, 从而降低菌体内药物浓度而导致耐药。OmpA 常与  $\beta$ -内酰胺酶或多药外排泵一起作为非特异性慢孔外排蛋白而促进菌体内药物的外排, Tsai *et al.*<sup>[18]</sup>证明 *ompA* 缺失株使厄他培南、亚胺培南、美罗培南、多尼培南、萘啶酸、阿米卡星和黏菌素的敏感性增加 2~3 倍。OmpW 属于小的外膜孔蛋白家族, 可作为一种动态变化的孔通道参与某些外排蛋白的外排功能, 如与小多重耐药蛋白 EmrE 共同作用促进特异性底物的泵出<sup>[9]</sup>。双组分信号转导系统是菌体内常见的调控元件, 通过调控膜孔蛋白的表达来影响药物的流入与排出, 进而产生耐药<sup>[4,9]</sup>。Masi *et al.*<sup>[19]</sup>研究表明, CpxA 分别调节 OmpF 孔蛋白和 AcrD 外排泵的表达, 以 CpxR

依赖性方式赋予菌株对 $\beta$ -内酰胺类和氨基糖苷类药物的抗性,证明CpxAR双组分信号转导系统对ompF的负向调节作用。Hu *et al.* [20]通过回补baeR基因发现OmpW在抗性菌株R200中的表达恢复正常水平,并且还完全恢复了对头孢曲松的耐药性,证明BaeSR双组分信号转导系统正向调控OmpW表达。Adler *et al.* [21]发现envZ突变降低OmpF的丰度,但OmpC的表达水平增加,证明EnvZ/OmpR双组分信号转导系统能负调控ompC的表达。

ESBLs的表达是导致第三代头孢菌素耐药的主要机制,在ESBLs中,CTX-M酶因其广泛流行和高效耐药特性而备受关注,其既可通过接合型质粒、插入序列、转座子等进行水平散播,也可以通过克隆进行垂直传播[22],其中ST131型大肠杆菌携带bla<sub>CTX-M-15</sub>在全球不同国家和地区的克隆传播和大流行,对公共卫生构成了严重威胁[23]。本研究发现,分离自不同品种禽类样本的第三代头孢菌素耐药菌(17B、21A、25B和29B2)具有相同的谱型,表明该动物园禽类散养场对第三代头孢菌素耐药的奇异变形杆菌存在着克隆传播,为控制该克隆传播,禽类散养场应在加强饲养管理的同时,严格消毒。尽管本研究检出的克隆传播菌株未携带CTX-M酶,但其仍对第三代头孢菌素耐药,如不能严格消毒,阻断耐药菌的克隆传播,不仅会造成在禽类散养场区域内流行散播,而且可能通过与游客的互动等直接或间接的接触造成更大范围的流行散播,故应引起人们的足够重视。

#### 参考文献:

- [1] 陈赫威, 马玲, 秦树英, 等. 产AmpC酶的猪源奇异变形杆菌分离鉴定及生物学特性分析[J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(7): 46-52.  
CHEN H W, MA L, QIN S Y, *et al.* Isolation, identification and biological characteristics of swine-sourced *Proteus mirabilis* producing AmpC enzyme[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 55(7): 46-52.
- [2] 刘根, 李世宗, 信爱国, 等. 一株野生马来穿山甲源奇异变形杆菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 野生动物学报, 2023, 44(3): 657-668.  
LIU G, LI S Z, XIN A G, *et al.* Isolation, identification and biological characteristics analysis of one *Proteus mirabilis* strain from wild *Manis javanica* [J]. Chinese Journal of Wildlife, 2023, 44(3): 657-668.
- [3] 蒋增海, 姚璐璐, 张超君, 等. 河南省猪产业链中耐头孢菌素沙门菌对 $\beta$ -内酰胺类和喹诺酮类药物的耐药机制分析[J]. 中国兽医学报, 2023, 43(11): 2274-2280.  
JIANG Z H, YAO L L, ZHANG C J, *et al.* Analysis of mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactams and quinolones for cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates from pig-borne food chain of Henan Province [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2023, 43(11): 2274-2280.
- [4] DE GAETANO G V, LENTINI G, FAMÀ A, *et al.* Antimicrobial resistance: two-component regulatory systems and multidrug efflux pumps[J]. Antibiotics, 2023, 12(6): 965.
- [5] 李垠树, 赵冰, 孙华润, 等. 1株同时携带tet(X6)和tet(X3)的禽源印地不动杆菌比较基因组学分析[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(8): 1620-1625.  
LI Y S, ZHAO B, SUN H R, *et al.* Comparative genomics analysis of an avian *Acinetobacter indicus* carrying both tet(X6) and tet(X3) [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2022, 42(8): 1620-1625.
- [6] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[M]. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- [7] PAGANI L, DELL'AMICO E, MIGLIAVACCA R, *et al.* Multiple CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(9): 4264-4269.
- [8] MUSILA L, KYANY'A C, MAYBANK R, *et al.* Detection of diverse carbapenem and multidrug resistance genes and high-risk strain types among carbapenem non-susceptible clinical isolates of target gram-negative bacteria in Kenya[J]. PLoS One, 2021, 16(2): e0246937.
- [9] ZHOU G, WANG Q, WANG Y S, *et al.* Outer membrane porins contribute to antimicrobial resistance in gram-negative bacteria [J]. Microorganisms, 2023, 11(7): 1690.
- [10] KANG Q, WANG X, ZHAO J N, *et al.* Multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates carrying bla<sub>OXA-1</sub> and bla<sub>NDM-1</sub> from wildlife in China; increasing public health risk [J]. Integrative Zoology, 2021, 16(6): 798-809.
- [11] 黄长岭. 动物园中需注意的人畜共患病种类及防控建议[J]. 福建畜牧兽医, 2023, 45(4): 62-63.  
HUANG C L. Species of zoonoses diseases in zoos and suggestions for prevention and control suggestions in zoos [J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2023, 45(4): 62-63.
- [12] 石鹭, 楼正青. 奇异变形杆菌的临床分布以及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2023, 33(6): 692-694.  
SHI H, LOU Z Q. Clinical distribution of *Proteus mirabilis* and analysis of its drug resistance [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2023, 33(6): 692-694.
- [13] CHALMERS G, ANDERSON R E V, MURRAY R, *et al.* Characterization of *Proteus mirabilis* and associated plasmids isolated from anaerobic dairy cattle manure digesters [J]. PLoS One, 2023, 18(8): e0289703.
- [14] 潘玉善, 苑丽, 吴华, 等. 禽源奇异变形杆菌超广谱 $\beta$ -内酰胺酶基因的分子特征[J]. 中国农业科学, 2013, 46(7):

- 1463-1469.
- PAN Y S, YUAN L, WU H, *et al.* Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Proteus mirabilis* from poultry [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46 (7): 1463-1469.
- [15] 肖园园, 谭彩霞, 李春辉, 等. 美国感染病学会关于产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶肠杆菌目细菌(ESBL-E)、耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌(CRE)、难治性耐药铜绿假单胞菌(DTR-PA)、产AmpC $\beta$ -内酰胺酶肠杆菌目细菌(AmpC-E)、耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)和嗜麦芽窄食单胞菌的抗感染治疗指引(2022版)摘要[J]. *中国感染控制杂志*, 2022, 21(12): 1267-1276.
- XIAO Y Y, TAN C X, LI C H, *et al.* Summary of infectious diseases society of America guidance on the treatment of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacterales, carbapenem-resistant Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance, AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacterales, carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia* infections (2022 edition) [J]. *Chinese Journal of Infection Control*, 2022, 21(12): 1267-1276.
- [16] 葛强, 马东鑫, 周雨晴, 等. 猪源奇异变形杆菌的分离鉴定及特征分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(5): 1804-1815.
- GE Q, MA D X, ZHOU Y Q, *et al.* Isolation, identification and biological characteristics of *Proteus mirabilis* of swine [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48 (5) : 1804-1815.
- [17] MASI M, VERGALLI J, GHAI I, *et al.* Cephalosporin translocation across enterobacterial OmpF and OmpC channels, a filter across the outer membrane [J]. *Communications Biology*, 2022, 5: 1059.
- [18] TSAI Y K, LIOU C H, LIN J C, *et al.* Effects of different resistance mechanisms on antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: a strategic system for screening and activity testing of new antibiotics [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, 55(4): 105918.
- [19] MASI M, PINET E, PAGÈS J M. Complex response of the CpxAR two-component system to  $\beta$ -lactams on antibiotic resistance and envelope homeostasis in Enterobacteriaceae [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2020, 64(6): e00291-20.
- [20] HU W S, LI P C, CHENG C Y. Correlation between ceftriaxone resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and expression of outer membrane proteins OmpW and Ail/OmpX-like protein, which are regulated by BaeR of a two-component system [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49 (9) : 3955-3958.
- [21] ADLER M, ANJUM M, ANDERSSON D I, *et al.* Combinations of mutations in *envZ*, *ftsI*, *mrdA*, *acrB* and *acrR* can cause high-level carbapenem resistance in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 71(5): 1188-1198.
- [22] BUSH K, BRADFORD P A. Epidemiology of  $\beta$ -lactamase-producing pathogens [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2020, 33(2): e00047-19.
- [23] KO K S. Antibiotic-resistant clones in Gram-negative pathogens: presence of global clones in Korea [J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 57(3): 195-202.