

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20195128

· 论 著 ·

四环素类耐药基因在不同国家人体、动物和环境微生态中的多样性

张婷婷^{1,2}, 苗娇娇^{1,2}, 强裕俊^{1,2}, 李秀文^{1,2}, 彭贤慧^{1,2}, 张雯^{1,2}, 韩娜^{1,2}

(1. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所生物信息室 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206; 2. 感染性疾病诊治协同创新中心, 浙江 杭州 310003)

[摘要] **目的** 了解四环素类耐药基因在不同国家人体、动物和环境微生态中的分布情况及其多样性。**方法** 利用生物信息学方法, 对 2 036 份不同来源的微生态样本宏基因组测序数据进行四环素耐药基因的鉴定, 研究四环素耐药基因在不同来源、不同国别、不同人体部位的分布及耐药机制。**结果** 2 036 份样本中, 四环素耐药基因检出率为 44. 70% (910 份), 其中人源样本检出率最高, 达 78. 99% (880/1 114), 其次是动物样本, 检出率 40. 98% (25/61)。共检出 28 种四环素耐药基因, 248 份样本至少检出 10 种以上四环素耐药基因, 在人源性样本中 28 种基因全部检出, 动物源样本中检出 6 种基因。28 种四环素类耐药基因中, 包括 10 种编码核糖体保护蛋白基因, 其中 5 种 (*tetQ*、*tet32*、*tetW*、*tetO*、*tetM*) 在 50% 以上的人源样本中检出, 4 种在动物源样本中检出率 > 16%。338 份人源样本具有国别 (中国、丹麦、西班牙、美国和日本) 信息, 耐药基因分析显示, *tetO*、*tetQ* 和 *tetW* 3 种耐药基因在 5 个国家均有检出; 来源于中国的样本均检出 *tet32*、*tet40*、*tetO*、*tetQ* 和 *tetW* 5 种耐药基因, 并匹配上 24 种四环素耐药基因型。在人体不同部位微生态四环素类耐药基因分布中, 肠道中的耐药基因型分布最丰富, 共有 26 种四环素耐药基因匹配到肠道样本中, 其中 *tetQ*、*tetW*、*tetO*、*tet32*、*tet40* 5 种耐药基因型检出率 > 70%。**结论** 在人体、动物微生态中存在着大量的、多样的四环素类耐药基因, 公众健康和生态环境受到巨大威胁, 需要引起高度重视。

[关键词] 宏基因组学; 四环素; 耐药性; 四环素耐药基因; 细菌**[中图分类号]** R978. 1

Diversity of tetracycline resistance genes in human, animal and environmental micro-ecology in different countries

ZHANG Ting-ting^{1,2}, MIAO Jiao-jiao^{1,2}, QIANG Yu-jun^{1,2}, LI Xiu-wen^{1,2}, PENG Xian-hui^{1,2}, ZHANG Wen^{1,2}, HAN Na^{1,2} (1. Department of Bioinformatics, National Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2. Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Hangzhou 310003, China)

[Abstract] **Objective** To understand the distribution and diversity of tetracycline resistance genes in human, animal and environmental micro-ecology in different countries. **Methods** Metagenomic sequencing data of 2 036 micro-ecological specimens from different sources were identified tetracycline resistance genes, distribution and mechanism of tetracycline resistance genes from different sources, different countries and different sites of human body were studied. **Results** Among 2 036 specimens, detection rate of tetracycline resistance genes was 44. 70% ($n = 910$), with the highest detection rate in human specimens (78. 99%, 880/1 114), followed by animal specimens (40. 98%, 25/61). A total of 28 kinds of tetracycline resistance genes were detected, 248 specimens were detected

[收稿日期] 2019-02-18**[基金项目]** “生物安全关键技术研发”重点专项(2018YFC1200100); 国家自然科学基金(81700016); 国家科技重大专项(2018ZX10305410、2018ZX10712001、2018ZX10733402)**[作者简介]** 张婷婷(1990-), 女(汉族), 山东省济南市人, 硕士研究生, 主要从事临床病原微生物识别和耐药性研究。**[通信作者]** 韩娜 E-mail: hanna@icdc. cn; 张雯 E-mail: zhangwen@icdc. cn

at least 10 kinds of tetracycline resistance genes, human specimens were detected all 28 kinds of tetracycline resistance genes, animal specimens were detected 6 kinds of tetracycline resistance genes. Among 28 tetracycline resistance genes, 10 coding ribosomal protective protein genes were found, 5 of which (*tetQ*, *tet32*, *tetW*, *tetO*, *tetM*) were detected in more than 50% of human specimens, and 4 were detected in animal specimens with a detection rate of more than 16%. 338 human specimens had national information (China, Denmark, Spain, the United States and Japan), analysis on drug resistance genes showed that *tetO*, *tetQ* and *tetW* were detected in 5 countries; specimens from China were matched 24 tetracycline-resistant genotypes, among which *tet32*, *tet40*, *tetO*, *tetQ* and *tetW* were detected in all Chinese specimens. Among the distribution of tetracycline resistance genes in micro-ecology of different sites of human body, intestinal tract had the richest distribution of drug resistance genotypes, 26 kinds of tetracycline resistance genes were matched to intestinal specimens, detection rates of *tetQ*, *tetW*, *tetO*, *tet32* and *tet40* were more than 70%. **Conclusion** There are a large number of tetracycline resistance genes in human and animal micro-ecology, which threaten the public health and ecological environment, and need to be paid more attention.

[Key words] metagenome; tetracycline; drug resistance; tetracycline resistance gene; bacteria

自二十世纪四十年代抗生素作为抗感染治疗的重要手段进入临床以来,抗生素的应用范围不断扩大,近几十年来已全面推广到畜牧、水产养殖业,用于促进动物健康生长和疾病预防。在人类和动物中,抗菌药物过度使用,甚至滥用、误用,导致细菌对抗菌药物的耐药性急剧增加,已经发展成为全世界关注的公共卫生难题,人类健康受到极大威胁。抗菌药物耐药性是由抗菌药物耐药性基因(antimicrobial resistance gene, ARG)导致的,近年研究表明,ARG广泛存在于自然环境中,如土壤^[1]、水^[2]、沉积物^[3]、动物^[4]和人的肠道^[5]中。尽管 ARG 已被证明具有悠久的历史,可以追溯到抗生素时代之前,但是抗菌药物的使用无疑加速了其在环境-动物-人体中的传播。在众多的抗菌药物类中,四环素类药物因其价格低、作用范围广、毒性低等优点,曾作为一种广谱抗生素广泛应用于临床和禽畜养殖业^[6]。然而,随着四环素类抗生素的大量使用,细菌对其逐渐产生了耐药性,治疗效果大大降低,限制了四环素类抗生素在临床上的应用。目前,临床仅有少量四环素类药物用于治疗非典型肺炎、牙周感染、急性盆腔炎、痤疮等局部或全身感染^[7-10]。而在兽医和禽畜养殖业中,四环素类药物仍被用作动物的抗菌促生长剂^[7, 11]。自第一个耐四环素志贺痢疾杆菌(1953年)和多重耐药志贺菌属(1955年)发现以来,耐四环素菌株不断增多,并以多重耐药为主。细菌对四环素类药物耐药的机制主要是获得编码相关蛋白的四环素耐药基因,目前发现的四环素类耐药基因种类已达 40 多种,已知的耐药机制主要有外排泵出机制、核糖体保护机制及产生灭活四环素的钝化酶等^[12]。而耐药基因与可移动成分,如可传递性质粒、转座子、接合转座子等结合,发生水平基因转移是

导致四环素类耐药基因传播的重要因素之一,从而导致四环素耐药基因广泛分布于人源、动物源和环境源这些由细菌组成的微生态环境中^[13]。

目前,四环素耐药基因在自然界微生态环境中的分布情况尚不明确,为深入、系统的探索四环素类耐药基因在人体、动物和环境微生态中的分布情况和耐药基因多样性,本研究拟采用宏基因组学和生物信息学分析工具,对 2 036 份来自于人、动物和环境微生态的宏基因组测序样本进行四环素类耐药基因研究,为临床和畜牧业感染性疾病的治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 宏基因组数据来源 收集 HMP^[14]、META-HIT^[15]、MG-RAST^[16]和 IMicrobe^[17]四个公共数据库,以及 2 型糖尿病研究中^[18]所测得的中国健康人肠道数据的宏基因组测序样本。HMP 和 META-HIT 数据库主要是关注人类微生物组;MG-RAST 数据库是一个开源数据库,样本来源涉及人、动物和环境;IMicrobe 数据库主要关注环境样本的宏基因组研究;T2D-Chinese 中的人类样本是关于 2 型糖尿病研究^[18]中的健康对照。

1.2 四环素耐药基因来源 目前已经发现 44 种四环素耐药基因,基因序列均下载于 CARD 耐药数据库^[19]。

1.3 生物信息分析 基于基因序列相似度比对的方法,对来自耐药基因数据库 CARD 的 44 种四环素耐药基因(*tet*)在人体、动物和环境中的分布进行筛查。使用自主编写的 perl 脚本对测序的原始数据进行过滤,然后用 Bowtie2(v. 2. 2. 6)^[20]将过滤后的数据分别与 44 种四环素耐药基因进行比对。reads 比对长度 > 50 bp,且匹配 reads 数 > 10 条则

认为该样本中存在此耐药基因,反之则认为可能是随机匹配,此样本中未检出耐药基因。

1.4 统计分析方法 应用 R 3.4.0 软件进行数据分析,组间差异采用 Fisher 确切概率检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 宏基因组测序样本分布情况 共收集 2 036 份微生物样本的宏基因组测序数据,均来自公共数据库或已发表的研究项目,分别为人 1 114 份,动物 61 份和环境 861 份,样本多来自人类与环境,动物源样本较少。详见表 1。

表 1 2 036 份宏基因组数据来源及类别分布情况

Table 1 Distribution of sources and categories of 2 036 metagenomic data

样本来源	样本数(份)	构成比(%)
数据库		
HMP	749	36.79
META-HIT	124	6.09
MG-RAST	189	9.28
IMicrobe	900	44.20
T2D-Chinese	74	3.64
国家 [#]		
中国	74	6.64
西班牙	39	3.50
丹麦	85	7.63
美国	112	10.06
日本	28	2.51
其他国家	776	69.66
类别		
人源	1 114	54.71
动物源	61	3.00
环境	861	42.29
部位 [#]		
肠道	442	39.68
口腔	486	43.63
阴道	65	5.83
皮肤	27	2.42
呼吸道	94	8.44

: 为人源样本

2.2 不同样本来源四环素耐药基因分布 2 036 份样本中,910 份样本检出四环素耐药基因,检出率 44.70%。共检出 28 种四环素耐药基因,248 份样

本至少检出 10 种以上四环素耐药基因。人源样本中检出率最高,达 78.99%(880/1 114),且耐药基因分布最丰富,28 种四环素类耐药基因全部检出,占比较大;其次是动物样本,检出率 40.98%(25/61),检出 6 种四环素类耐药基因;环境样本中检出率最低,861 份样本中仅 5 份(0.58%)检出,且耐药基因多样性的分布比较窄,仅匹配到 2 种四环素类耐药基因,分别为 *tetG*(4 份)、*tetK*(1 份)。见图 1。

2.3 四环素不同耐药机制的耐药基因分布 28 种四环素类耐药基因根据耐药机制进行分类,结果显示,10 种为编码核糖体保护蛋白基因(*tetM*、*tetO*、*tetQ*、*tetS*、*tetT*、*tetW*、*tetBP*、*tet32*、*tet36*、*tet44*),16 种为编码泵外排蛋白基因(*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetG*、*tetK*、*tetL*、*tetAP*、*tetA46*、*tetA60*、*tetB46*、*tetB60*、*tet33*、*tet38*、*tet39*、*tet40*),以及 2 种编码钝化四环素类分子酶基因(*tetX*、*tet37*)。编码核糖体保护蛋白基因耐药机制占据绝对优势,10 种基因中有 5 种(*tetQ*、*tet32*、*tetW*、*tetO*、*tetM*)在 50% 以上的人类样本中检出,其中 4 种在动物中也有较高的检出率(16% 以上);而编码泵外排蛋白基因分布较广,基因型别最丰富,在人源样本中广泛分布,7 种耐药基因占比 20% 以上,动物源样本中仅检出 1 种耐药基因(*tet40*),同时此耐药机制也是环境源样本仅检出的 1 种;编码钝化四环素类分子酶基因型别较少,且只匹配到了人类样本上。见图 1。

2.4 不同国别四环素耐药基因的分布 1 114 份人源样本中有 776 份样本国别信息不完整,剔除此部分数据(如 HMP 和 IMicrobe 中缺乏清楚的国别信息的样本),338 份人源样本具有国别信息,其中,中国 74 份,西班牙 39 份,丹麦 85 份,美国 112 份,日本 28 份。分析结果显示,不同国家的微生物样本耐药基因分布存在很大的差异。中国来源的微生物样本共匹配上 24 种四环素耐药基因型,有 5 种耐药基因型别在样本中所占百分比为 100%,即在中国所有样本中均检出了该耐药基因,分别是 *tet32*、*tet40*、*tetO*、*tetQ* 和 *tetW*;其次是丹麦,匹配上 17 种四环素耐药基因型,*tet32*、*tetO*、*tetQ* 和 *tetW* 四种基因型占比 100%;西班牙共匹配上 16 种四环素耐药基因型,*tet32*、*tetO* 和 *tetW* 三种基因型占比 100%;美国和日本耐药基因型别最少,分别匹配上 5 种和 3 种四环素耐药基因型,且耐药率很低,基本在 20% 以下。同时研究发现,*tetO*、*tetQ* 和 *tetW* 三种基因在 5 个国家中均有检出,而 *tetL*、*tetS*、*tet33*、*tet36*、*tetA60*、*tetT*、*tet38* 为中国特有四环素耐药基因。详见图 2。

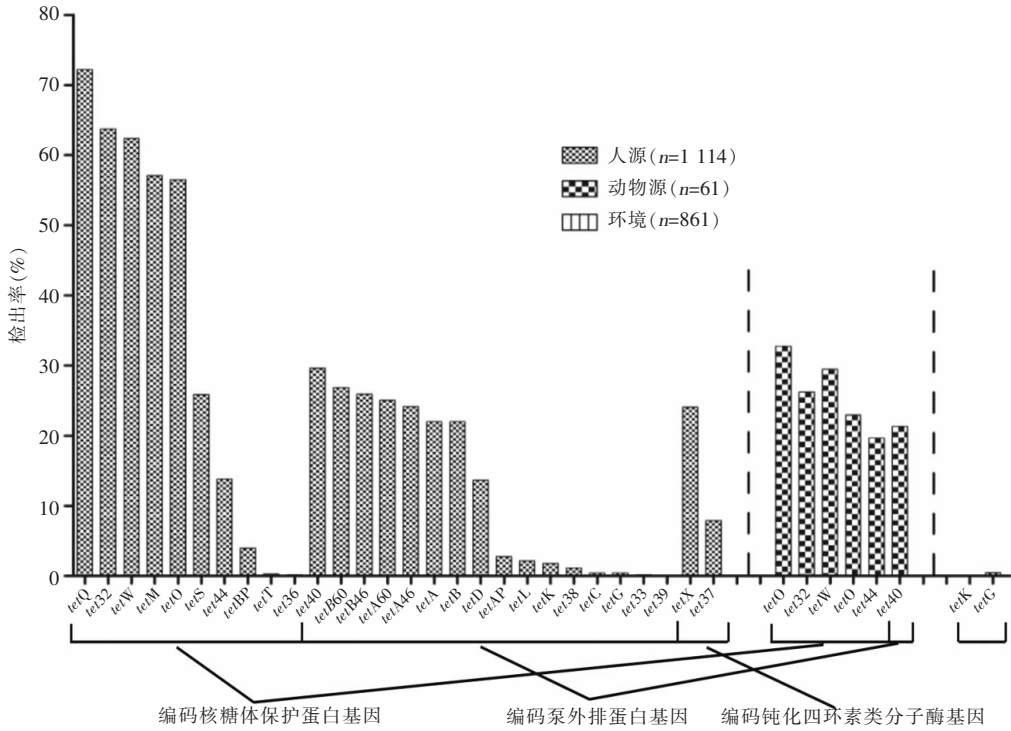


图 1 不同来源样本中四环素耐药基因和耐药机制的分布

Figure 1 Distribution of tetracycline resistance genes and resistance mechanisms in specimens from different sources

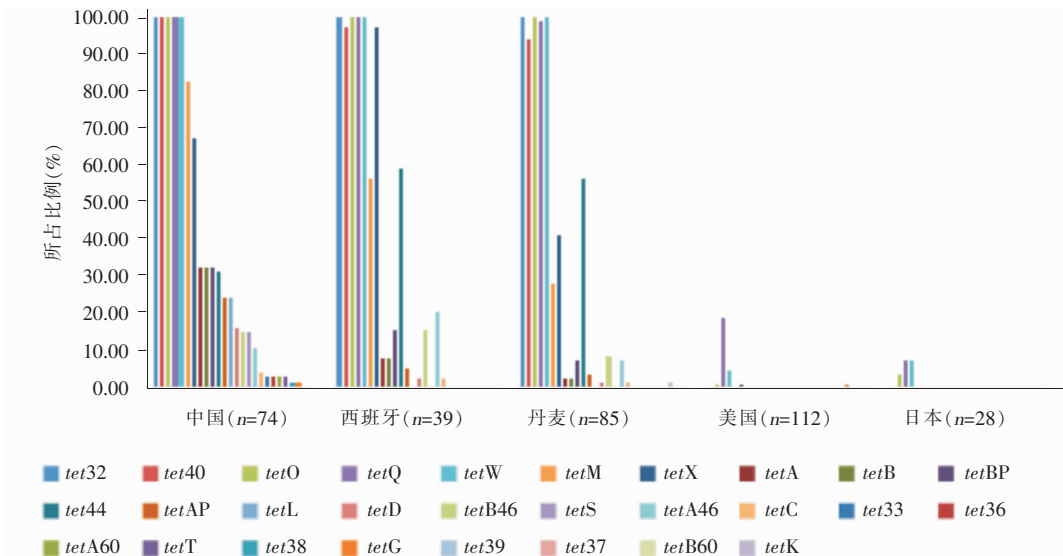


图 2 不同国别四环素耐药基因分布情况

Figure 2 Distribution of tetracycline resistance genes in different countries

2.5 不同部位四环素耐药基因分布情况 1 114 份人源样本根据采样部位进行分类,分为肠道、口腔、阴道、皮肤和呼吸道 5 大类。人体不同部位的四环素耐药基因分布是不均匀的,肠道中的耐药基因型分布最丰富,共有 26 种四环素耐药基因匹配到肠道样本中,其中有 5 种耐药基因型所占百分比 >70%,

即 *tetQ*、*tetW*、*tetO*、*tet32* 和 *tet40*;其次是口腔,共检出 21 种四环素耐药基因,*tetM*、*tetQ* 和 *tet32* 三种耐药基因型占比 >70%;阴道和皮肤中均检出 10 种耐药基因,呼吸道中检出 9 种耐药基因,阴道、皮肤及呼吸道检出的耐药基因所占百分比均低于 45%。见图 3。

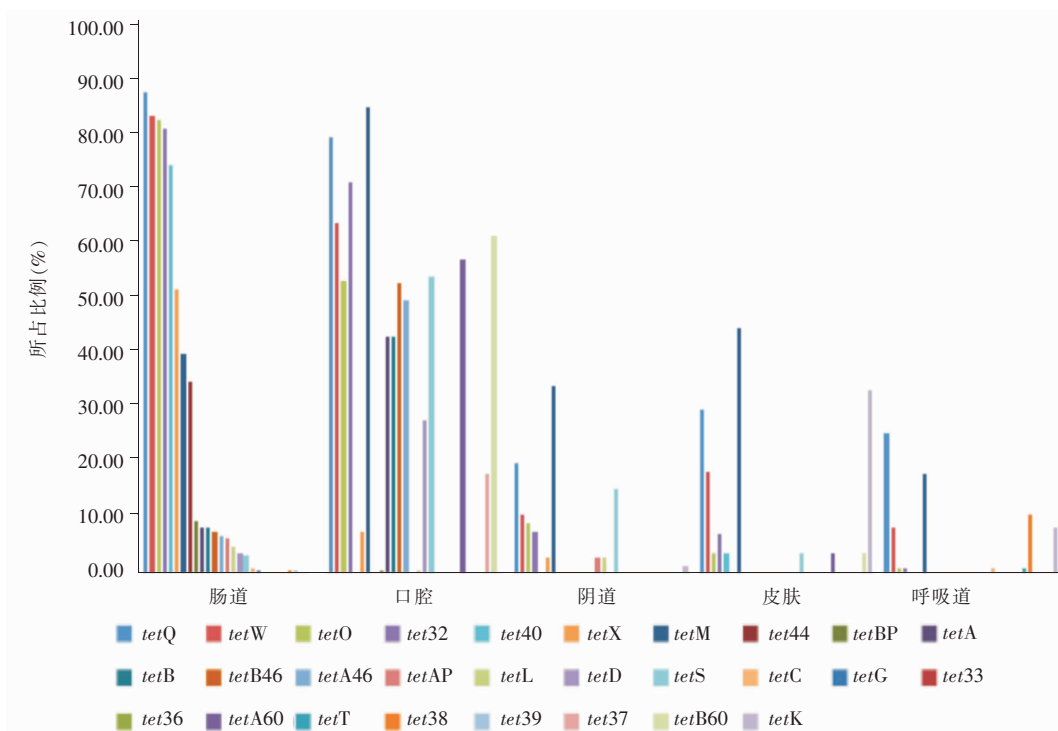


图 3 不同部位四环素耐药基因分布情况

Figure 3 Distribution of tetracycline resistance genes in different sites

3 讨论

抗菌药物的使用和细菌耐药性是相互依存、相互制约的两个方面。人类、动物和环境之间也不是孤立存在的,抗菌药物耐药基因可以通过水平转移在细菌间传播,也可以通过食物和接触的方式从动物微生态环境到人群微生态环境传播,而生活污水、废水,以及排泄物又造成耐药基因从动物和人类的微生态环境向环境中进一步传播,环境微生态中的抗菌药物积累到一定浓度也会通过生物链对人体和其他生物体构成潜在危害。采用宏基因组学分析方法,对来源于人、动物、环境的 2 036 份微生态样本的宏基因组测序数据进行四环素类耐药基因筛查和耐药机制研究,结果显示,不同来源的微生态样本中四环素耐药基因分布不同,人类样本中的耐药基因分布最丰富,其次是动物样本和环境样本。人类样本中的四环素耐药基因最丰富,且多为多种耐药基因并存,可能与长期以来人类抗菌药物滥用和误用有关。同时四环素类药物作为动物的抗菌促生长剂,广泛用于禽畜养殖业,因此,在动物样本中检测到了高比例的四环素耐药基因。相比于人类和动物样本,环境样本中耐药基因占比很小,推测可能是

由于环境样本主要来源于海洋、大气、土壤等,并未暴露在抗菌药物聚集的地方;其次也可能受实验和测序深度的影响,造成检出率比较低。目前,已发现 44 种四环素耐药基因,本研究检出 28 种耐药基因,以编码核糖体保护蛋白的耐药机制占据主导,其次为编码泵外排蛋白耐药,且此机制耐药基因检出型别最多,说明四环素耐药性的产生主要是由于获得了此两种耐药机制编码的四环素耐药基因而介导。

同时研究发现,不同国家间四环素耐药基因的分布也是不均衡的,中国、丹麦和西班牙的微生态样本中都检出不同类型的四环素耐药基因,*tetL*、*tetS*、*tet33*、*tet36*、*tetA60*、*tetT*、*tet38* 为仅在中国微生态样本中检出的耐药基因,美国和日本耐药比例相对较低,与胡永飞等^[21]研究结果一致,可能是国家的医疗制度和饮食习惯不同造成的。*tetO*、*tetQ* 和 *tetW* 3 种基因在 5 个国家中均有检出,说明此 3 种基因是四环素耐药基因中最普遍,分布最广的基因型。人体不同部位耐药基因分布研究显示,肠道和口腔微生态中的耐药基因都很丰富,肠道中的耐药基因型分布最普遍的是 *tetQ*、*tetW*、*tetO*、*tet32* 和 *tet40*,而口腔中普遍存在的是 *tetM*、*tetQ* 和 *tet32* 3 种耐药基因型。耐药基因型差异较大,可能是人体不同部位的微生物菌群结构的差异造成的。此结果

与 Seville 等^[22] 在 2009 年的研究结果一致, 研究分析欧洲六国健康人群的粪便和唾液样品中的四环素耐药基因, 发现口腔中最普遍存在的是 *tetM*, 肠道中普遍存在的依次是 *tetW*、*tetQ* 和 *tetO*。人体肠道中定植着大量的微生物群体, 这些正常菌群作为耐药基因的储存库, 不断的将耐药基因水平转移给致病菌, 通过与外界环境的交互作用, 在人和动物中交叉传播, 尤其是释放到环境中的耐药菌危害更严重, 可造成耐药基因的迅速转移散播, 因此, 肠道菌群中分布最丰富, 占比最高的耐药基因应受到足够的重视。

研究四环素类耐药基因在人体、动物和环境微生物生态中的分布情况, 以及耐药基因在不同来源、不同国别、不同人体部位的分布及耐药机制, 旨在为临床和畜牧业等感染性疾病的治疗提供一定的理论基础。细菌耐药性是全世界共同关注的议题, 促进临床合理合规使用抗菌药物, 以及减少动物例行使用抗菌药物, 是减缓人类和动物中抗药性产生速度的重大措施。同时也呼吁相关部门结合环境中抗菌药物的污染现状, 建立抗菌药物环境风险评估机制, 对抗菌药物耐药进行有效的监控, 提出符合我国国情的控制策略和预防措施。

[参 考 文 献]

[1] Riesenfeld CS, Goodman RM, Handelsman J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes[J]. *Environ Microbiol*, 2004, 6(9): 981-989.

[2] Baquero F, Martinez J, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19(3): 260-265.

[3] Pei R, Kim S, Carlson K, et al. Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG)[J]. *Water Res*, 2006, 40(12): 2427-2435.

[4] Caprioli A, Busani L, Martel JL, et al. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2000, 14(4): 295-301.

[5] Sommer MOA, Dantas G, Church GM. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora[J]. *Science*, 2009, 325(5944): 1128-1131.

[6] 代敏, 王雄清, 殷桂兰. 四环素耐药基因的生化 and 遗传机制研究进展[J]. *绵阳师范学院学报*, 2006, 25(5): 72-78.

[7] Roberts MC. Acquired tetracycline and/or macrolide-lincosamides-streptogramin resistance in anaerobes[J]. *Anaerobe*, 2003, 9(2): 63-69.

[8] 肖忠革, 金剑, 陈臻. 四环素类药物治疗牙周炎的作用机制及临床应用进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2005, 14(3): 409-

410,420.

[9] 徐霞. 甲硝唑联合四环素治疗急性盆腔炎的疗效[J]. *实用临床医学*, 2015, 16(8): 68-69.

[10] 张辰蔚, 李洋. 四环素及其衍生物在类风湿关节炎的应用[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2016, 10(3): 286-291.

[11] 韦嫔. 四环素类抗生素在养猪业的应用[J]. *饲料与畜牧·规模养猪*, 2015(7): 55-58.

[12] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, 65(2): 232-260.

[13] Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(9): 711-721.

[14] Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research[J]. *Nature*, 2012, 486(7402): 215-221.

[15] Ehrlich SD. MetaHIT: The European Union project on metagenomics of the human intestinal tract [M]// Nelson KE, Metagenomics of the Human Body, Springer, New York, NY, 2011: 307-316.

[16] Keegan KP, Glass EM, Meyer F. MG-RAST, a metagenomics service for analysis of microbial community structure and function[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1399: 207-233.

[17] Hurwitz B. iMicrobe: Advancing clinical and environmental microbial research using the iPlant cyberinfrastructure[C]. *International Plant & Animal Genome Conference XXII*, 2014.

[18] Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 55-60.

[19] Jia B, Raphenya AR, Alcock B, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D566-D573.

[20] Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. *Nat Methods*, 2012, 9(4): 357-359.

[21] Hu Y, Yang X, Qin J, et al. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2151.

[22] Seville L, Patterson AJ, Scott KP, et al. Distribution of tetracycline and erythromycin resistance genes among human oral and fecal metagenomic DNA[J]. *Microb Drug Resist*, 2009, 15(3): 159-166.

(本文编辑:文细毛)

本文引用格式:张婷婷, 苗娇娇, 强裕俊, 等. 四环素类耐药基因在不同国家人体、动物和环境微生物生态中的多样性[J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 18(9): 797-802. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20195128.

Cite this article as: ZHANG Ting-ting, MIAO Jiao-jiao, QIANG Yu-jun, et al. Diversity of tetracycline resistance genes in human, animal and environmental micro-ecology in different countries[J]. *Chin J Infect Control*, 2019, 18(9): 797-802. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20195128.