

网络出版时间:2016-02-02 09:37

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.03.002

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160202.0937.004.html

食品动物源大肠杆菌耐药性分析及 16S rRNA 甲基化酶基因的检测

王 爽,邓向东,闫国栋,冯彩峰,代鹏飞,高彤彤,林居纯

(四川农业大学 动物医学院,四川 成都 611130)

【摘 要】 【目的】对四川地区临床分离的 437 株健康动物源及 82 株患病动物源大肠杆菌(*E. coli*)的耐药性及其机制进行研究,为临床合理用药提供理论依据。【方法】用 3 种氨基糖苷类药物和 11 种非氨基糖苷类药物对分离的大肠杆菌进行药物敏感性试验(K-B 纸片法)。选取至少耐 1 种氨基糖苷类药的大肠杆菌作为供试菌,通过 PCR 检测其 16S rRNA 甲基化酶基因 *armA*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD*、*rmtE* 和 *npmA*;对阳性菌株进行质粒接合试验;并用 K-B 纸片法分析临床菌和接合子对抗生素的敏感性。【结果】437 株健康动物源和 82 株患病动物源大肠杆菌对 14 种抗菌药物表现出不同程度的耐药性。健康动物源大肠杆菌对氨苄西林、氯霉素、磺胺甲恶唑的耐药率较高,分别为 69.79%、50.8%和 68.72%,对庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星比较敏感,敏感率分别为 75.97%、67.73%和 97.02%;其中有 134 株分离菌至少对 1 种氨基糖苷类药物表现出耐药性。患病动物源大肠杆菌除对美罗培南耐药率较低(为 3.66%)外,对其余药物的耐药率在 32.93%~100%,且都对至少 1 种氨基糖苷类药物表现出耐药性。多重耐药分析表明,健康动物源大肠杆菌主要分布于 0~4 耐,而患病动物源大肠杆菌至少耐 7 种抗菌药物,主要分布于 10~14 耐。在 134 株耐氨基糖苷类抗生素大肠杆菌中,检测到 5 株含 *rmtB* 基因,检测率为 3.73%,未检测到 *armA*、*rmtA*、*rmtC*、*rmtD*、*rmtE* 和 *npmA* 基因。在 82 株患病动物源大肠杆菌中,检测到 1 株含 *armA* 基因,10 株含 *rmtB* 基因,检出率分别为 1.22%和 12.2%,未检测到 *rmtA*、*rmtC*、*rmtD*、*rmtE* 及 *npmA* 基因;接合试验的耐药质粒传递率为 100%,受体菌接合频率在 $(9.2 \times 10^{-9}) \sim (4.8 \times 10^{-6})$ 。【结论】四川地区健康动物源大肠杆菌对抗生素呈中低水平耐药,多重耐药以 4 耐及以下为主,占 63.84%,主要由 *rmtB* 基因引起;而患病动物源大肠杆菌对抗生素则呈高水平耐药,89.02%为 10~14 耐,主要由 *rmtB* 和 *armA* 基因引起。

【关键词】 大肠杆菌;16S rRNA 甲基化酶;耐药性

【中图分类号】 S859.7

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)03-0011-06

Analysis on resistance of *Escherichia coli* from food of animal origin and detection of its 16S rRNA methylation enzymes

WANG Shuang, DENG Xiang-dong, YAN Guo-dong,

FENG Cai-feng, DAI Peng-fei, GAO Tong-tong, LIN Ju-chun

(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: 【Objective】The resistance of 437 *E. coli* strains isolated from healthy animals and 82 *E. coli* strains separated from sick animals in Sichuan and the mechanism were investigated to provide basis for its clinical rational use. 【Method】Sensitivity test was conducted to examine the separated *E. coli* strains with three Aminoglycosides and 11 non-Aminoglycosides. The strains with resistant to at least one Aminoglyco-

【收稿日期】 2014-08-06

【基金项目】 国家科技支撑计划项目(2012BAK01B02)

【作者简介】 王 爽(1990—),女,河南南阳人,在读硕士,主要从事食品动物源细菌耐药性及其耐药机制研究。

E-mail:domina77@126.com

【通信作者】 林居纯(1968—),女,四川隆昌人,教授,博士,主要从事兽医药理学及毒理学研究。E-mail:juchunlin@126.com

side drug were selected and their 16S rRNA methylase genes (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE* and *npmA*) were detected by PCR. Plasmid conjugation experiment was also carried out to the positive strains and the drug susceptibility of clinical isolated bacteria and zygote to antimicrobial agents was executed by the Kirby-Bauer method. 【Result】 A total of 437 strains of healthy animal origin and 82 strains of sicken animal origin showed resistance to 14 antibacterial drugs. The resistant rates of *E. coli* strains of healthy animal origin against ampicillin, chloramphenicol and sulfamethoxazole were higher than other tested drugs with the rates of 69.79%, 50.8% and 68.72%, respectively. They were more sensitive to gentamycin, kanamycin and amikacin with sensitive rates of 75.97%, 67.73% and 97.02%, respectively. There were 134 strains with resistance to at least one aminoglycoside drug. The resistant rates of sick animal derived *E. coli* to 14 antibacterial drugs were 32.93% to 100% except for meropenem (3.66%). They were all resistant to at least one aminoglycoside drug. Strains separated from health animal were resistant to 0 to 4 drugs at the same time but those from sick animal were resistant to 10 to 14 drugs. A total of 5 *E. coli* strains containing *rmtB* gene were detected among the 134 strains with detection rate of 3.73%, while *armA*, *rmtA*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, and *npmA* gene were not detected. One strain was detected to contain *armA* gene and 10 strains were detected to contain *rmtB* gene among the 82 strains from diseased animal, with detection rates of 1.22% and 12.2%, respectively. But *rmtA*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, and *npmA* gene were not detected. Trans-conjugation test showed that resistant plasmids pass rate was 100%, and conjugation frequency of each receptor cell was $(9.2 \times 10^{-9}) - (4.8 \times 10^{-6})$. 【Conclusion】 In Sichuan, *E. coli* strains from healthy animals had low-level resistance and 63.84% were resistant to 4 or less antibiotics, which was mainly caused by *rmtB*. The *E. coli* separated from sick animals showed high-level resistance to antibiotics with 89.02% were resistant to 10–14 drugs, which was caused by *rmtB* and *armA* genes.

Key words: *Escherichia coli*; 16S rRNA methylase; resistance

氨基糖苷类抗生素由于其高效、广谱的特性以及具有浓度依赖性快速杀菌作用,临床上一直用于治疗革兰阴性菌所致的严重感染,但随着其在临床上的广泛应用,大肠杆菌等革兰氏阴性菌对其的耐药性也迅速增强^[1]。自 2003 年以来,16S rRNA 甲基化酶在临床菌中的发现,使革兰氏阴性杆菌的核糖体 16S rRNA 甲基化酶逐渐成为氨基糖苷类抗生素耐药新机制的研究热点^[2]。该类酶主要通过甲基化 16S 核糖体亚单位 A 位点的某个或某几个碱基,使氨基糖苷类药物不能与其作用靶点相结合,从而保护细菌的 16S rRNA,导致细菌对氨基糖苷类药物产生高度耐药性^[3]。编码 16S rRNA 甲基化酶的基因有 *rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD*、*rmtE*、*npmA* 和 *armA* 等^[4-8],其与质粒、转座子、整合子、插入序列共同区等可移动遗传因子密切相关,可能通过接合、转化等质粒转移方式使该类酶的耐药决定因子在不同地域间及遗传上不相关的菌株之间进行扩散,从而在更广泛的地区导致更多的临床菌对氨基糖苷类抗生素产生高度耐药性^[3,6,9-11]。本研究以四川地区分离的 437 株健康动物源和 82 株患病动物源大肠杆菌作为受试菌株,测定其对氨基糖苷类药物的耐

药性及耐药菌株的耐药决定因子转移情况,以阐明健康动物源大肠杆菌和患病动物源大肠杆菌对氨基糖苷类药物的耐药性差异,以及其 16S rRNA 甲基化酶和基因型的分布、转移情况,为本地区大肠杆菌病的流行病学及临床用药提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 2012~2013 年,从四川成都、雅安、蒲江、资阳、荣经、天全等不同养殖场临床分离的 437 株健康动物源和 82 株患病食品动物源大肠杆菌,经 Vitek-60 微生物鉴定系统鉴定确认为大肠杆菌,所涉及食品动物源包括猪、牛、鸡和鸭;大肠杆菌 ATCC25922(作为药敏质控菌),由四川农业大学动物试验中心提供;大肠杆菌 J53Az^R(对叠氮钠耐药,作为接合试验的受体菌),由四川农业大学药学实验室保存。

1.1.2 抗菌药敏片 氨基糖苷类药物:庆大霉素(10 μg/片),卡那霉素(30 μg/片),阿米卡星(30 μg/片)。非氨基糖苷类药物:阿莫西林/棒酸(阿莫西林 20 μg/片,棒酸 10 μg/片),氯霉素(30 μg/片),

磺胺甲恶唑(30 μg/片),美罗培兰(10 μg/片),氨苄西林(10 μg/片),头孢唑林(30 μg/片),头孢噻肟(30 μg/片),头孢曲松(30 μg/片),多西环素(30 μg/片),萘啶酸(30 μg/片),环丙沙星(5 μg/片),上述材料均购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.3 培养基和试剂 麦康凯琼脂、伊红美兰琼脂和营养琼脂均购自杭州天和微生物试剂有限公司;MH 肉汤、MH 琼脂购自北京奥博星生物技术有限责任公司;琼脂糖购自基因公司(西班牙生产,上海 Yito 责任有限公司分装);冰乙酸、EDTA、Tris 碱,购自成都市科龙化工试剂厂;DNA Marker DL2000、2×Taq PCR MasterMix、goldView,购自天根生化科技(北京)有限公司;胰蛋白胨、酵母提取

物,购自英国 Oxiod 公司。

1.1.4 主要仪器 微量可调加样器(德国 Eppendorf 公司),自动立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂,型号 SYQ-LDZX-40BZ),电热恒温干燥箱(重庆华茂仪器有限公司,型号 DGF25012C)。PCR 仪和电泳成套设备(北京市六一仪器厂),WaterPro Plus 超纯水仪(LABCONCO 公司),Gel-Doc2000 凝胶成像系统(Bio-rad 公司),高速冷冻离心机(Sigma 公司,型号 2K15)。

1.1.5 引物 16S rRNA 甲基化酶基因引物序列见表 1,均由上海生工生物工程技术有限公司(北京)合成。

表 1 16S rRNA 甲基化酶基因的 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequences of 16S rRNA methylase

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	片段长度/bp Size	参考文献 Reference
armA-F	AGGTTGTTTCCATTTCTGAG	591	[12]
armA-R	TCTCTCCATTCCCTTCTCC		
rmtA-F	CTAGCGTCCATCCTTTCCTC	635	[13]
rmtA-R	TTTGCTTCCATGCCCTTGCC		
rmtB-F	ATGAACATCAACGATGCCCT	768	[14]
rmtB-R	CCTTCTGATTGGCTTATCCA		
rmtC-F	CGAAGAAGTAACAGCCAAAG	711	[13]
rmtC-R	ATCCCAACATCTCTCCCACT		
rmtD-F	ATGAGCGAACTGAAGGAAAACTGCT	744	[15]
rmtD-R	TCATTTTCGTTTCAGCACGTAACAG		
rmtE-F	ATGAATATTGATGAAATGGTTG	822	[15]
rmtE-R	TCATTGATTTCCTCCGTTTGTG		
npmA-F	TTGGGTACTGGAGACGGTAG	421	[15]
npmA-R	CAGCTTGTATTGTTTCGCTC		

1.2 临床菌的药物敏感性测定

以大肠杆菌 ATCC25922 作为药敏质控菌,采用美国临床试验标准化协会(CLSI)推荐的 K-B 纸片法测定临床分离菌对氨基糖苷类代表药物庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星及其他 11 种非氨基糖苷类药物的敏感性。

1.3 氨基糖苷类耐药基因的 PCR 扩增

采用聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)检测 *rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD*、*rmtE*、*npmA* 和 *armA* 7 种 16S rRNA 甲基化酶基因,以煮沸法提取的大肠杆菌全基因组 DNA 作为 PCR 模板。PCR 反应体系总体积为 25 μL,其中模板 1 μL,F 引物 0.5 μL,R 引物 0.5 μL,2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL,加无菌双蒸水至 25 μL。*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD*、*rmtE* 和 *nPmA* 基因扩增的热循环参数为:94℃变性 5 min;94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 1min,共 30 个循环;72℃延伸 10

min。*armA* 基因扩增的热循环参数为 95℃变性 5 min;95℃变性 1 min,59℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 35 个循环;72℃延伸 10 min。

1.4 PCR 产物检测

取 5 μL PCR 产物在含有 GoldView 的 1.0% 的琼脂糖凝胶中进行电泳,通过 GelDoc2000 凝胶成像系统观察结果并拍照。将阳性产物送上海生工生物工程技术有限公司(北京)进行测序,测序结果用 Blast 进行比对分析。

1.5 接合试验

以扩增出 *armA* 和 *rmtB* 基因的动物源大肠杆菌为供体菌,以对叠氮钠耐药的大肠杆菌 J53Az^R 为受体菌进行试验。取对数生长期的供体菌、受体菌菌液各 500 μL,接种于同一新鲜的 4 mL LB 肉汤中,37℃恒温静置培养 7~8 h,让其接合。取上述混合菌液 100 μL 于胰蛋白胨大豆琼脂平板上(含 64 μg/mL 阿米卡星和 200 μg/mL 叠氮钠),37℃恒

温培养箱中倒置培养 24 h,在上述含药平板上同时设置供体菌、受体菌对照;挑取在含药平板上生长的菌落,转接于相应的含药胰蛋白胨大豆琼脂平板上,可生长的菌落即为疑似接合子。

1.6 接合子的 PCR 鉴定

随机挑取每个选择性平板上的 3~5 个单菌落进行 PCR 鉴定,试验方法同 1.2 节。

1.7 接合频率的计算

计数接合子、供体菌和受体菌菌落数,分别计算其平均值和供、受体菌的接合频率, $F_c = T/A \times$

100%,其中, F_c 为接合频率, T 为接合子平均菌落数; A 为受体菌或供体菌平均菌落数。

1.8 接合子和 J53Az^R 的药物敏感性测定

对接合子和 J53Az^R 的药物敏感性进行测定,测定方法同 1.2 节。

2 结果和分析

2.1 大肠杆菌的药物敏感性结果

供试大肠杆菌的药物敏感性测定结果见表 2。

表 2 437 株健康动物源性和 82 株患病动物源大肠杆菌对 14 种药物的耐药情况						
Table 2 Antimicrobial resistance of 437 <i>E. coli</i> isolates from healthy animals and 82 <i>E. coli</i> isolates from diseased animals to 14 antimicrobial agents						
抗菌药物 Antimicrobial agents	健康动物源大肠杆菌(<i>n</i> =437)			患病动物源大肠杆菌(<i>n</i> =82)		
	<i>E. coli</i> isolates from healthy animals(<i>n</i> =437)			<i>E. coli</i> isolates from diseased animals(<i>n</i> =82)		
	S	I	R	S	I	R
氨苄西林 Ampicillin	24.02	6.19	69.79	1.22	0.98	97.80
阿莫西林/棒酸 Amoxicillin/clavulanic acid	73.68	8.92	17.40	1.22	0.98	97.80
头孢唑啉 Cefazolin	76.43	4.12	19.45	3.66	0.00	96.34
头孢曲松 Ceftriaxone	77.81	7.09	15.10	3.66	4.88	91.46
头孢噻肟 Cefotaxime	83.98	5.26	10.76	4.98	14.63	80.49
美罗培兰 Meropenem	99.54	0.00	0.46	96.34	0.00	3.66
庆大霉素 Gentamicin	75.97	2.75	21.28	10.98	0.00	89.02
氯霉素 Chloramphenicol	44.39	4.81	50.80	1.22	3.66	95.12
多西环素 Doxycycline	54.24	13.27	32.49	7.32	13.41	79.27
萘啶酸 Nalidixic acid	56.06	5.04	38.90	0.00	0.00	100.00
环丙沙星 Ciprofloxacin	69.56	2.75	27.69	1.22	7.32	91.46
磺胺甲恶唑 Sulfamethoxazole	29.00	2.28	68.72	0.00	0.00	100.00
卡那霉素 Kanamycin	67.73	1.37	30.90	0.00	0.00	100.00
阿米卡星 Amikacin	97.02	0.00	2.98	65.85	1.22	32.93

注:“S”. 敏感率;“I”. 中介率;“R”. 耐药率。

Note:“S”. Susceptible ratio;“I”. Intermediate ratio;“R”. Resistant ratio.

从表 2 可看出,健康动物源大肠杆菌对氨苄西林、氯霉素、磺胺甲恶唑耐药性较高,耐药率分别是 69.79%,50.8%和 68.72%,对庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星 3 种氨基糖苷类药物比较敏感,敏感率分别为 75.97%,67.73%和 97.02%;有 134 株菌至少对 1 种氨基糖苷类药物有耐药性。患病动物源大肠杆对萘啶酸、磺胺甲恶唑、卡那霉素耐药率高达 100%,对美罗培兰耐药率为 3.66%,对其余药物的

耐药率在 32.93%~97.80%。结果表明,患病动物源大肠杆菌较健康动物源大肠杆菌耐药性稍严重,但总的来说,大肠杆菌无论是健康动物源还是患病动物源其耐药情况都不容乐观。多重耐药结果(表 3)表明,健康动物源大肠杆菌 0 耐至 14 耐均有分布,但以 0~4 耐为主,占 63.84%;而患病动物源大肠杆菌对 14 种抗菌药物的多重耐药性更为严重,至少耐 7 种抗菌药物,89.02%为 10~14 耐。

表 3 437 株健康动物源和 82 株患病动物源大肠杆菌对 14 种抗菌药物的多重耐药率				
Table 3 Multi-resistance rate of 437 <i>E. coli</i> isolates from healthy animals and 82 <i>E. coli</i> isolates from diseased animals to 14 antimicrobial agents				
耐药谱 Resistance pattern	健康动物源大肠杆菌(<i>n</i> =437)		患病动物源大肠杆菌(<i>n</i> =82)	
	<i>E. coli</i> isolates from healthy animals(<i>n</i> =437)		<i>E. coli</i> isolates from disease animals(<i>n</i> =82)	
	菌株数 Number of strains	所占比例/% Ratio	菌株数 Number of strains	所占比例/% Ratio
0~4 耐 0—4 resistant	279	63.84	0	0.00
5~9 耐 5—9 resistant	108	24.72	9	10.98
10~14 耐 10—14 resistant	50	11.44	73	89.02

2.2 16S rRNA 甲基化酶基因的检测

采用 PCR 对 7 种 16S rRNA 甲基化酶基因进行检测,在 437 株健康动物源大肠杆菌中,检测到 5 株含 *rmtB* 基因,检出率为 1.14%,未检测到 *armA*、*rmtA*、*rmtC*、*rmtD*、*rmtE* 和 *npmA* 基因。在 82 株患病动物源大肠杆菌中,检测到 1 株含 *armA* 基因和 10 株含 *rmtB* 基因,检出率分别为 1.22% 和

12.2%,未检测到 *rmtA*、*rmtC*、*rmtD*、*rmtE* 及 *npmA* 基因。

2.3 接合子的 PCR 鉴定结果

取疑似接合子 DNA,用 *armA* 和 *rmtB* 特异性引物进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,得到与目的片段长度相符的条带(图 1)。

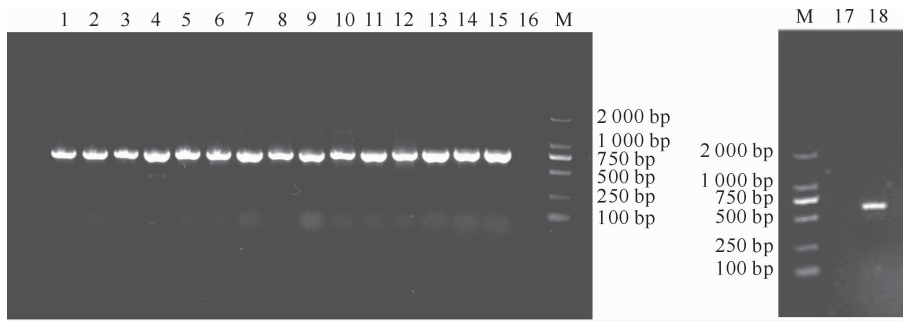


图 1 大肠杆菌 *rmtB* 和 *armA* 基因接合子 PCR 电泳检测

M. DNA 2 000 bp Marker;1~15. *rmtB* 阳性产物;16~17. 阴性对照;18. *armA* 阳性产物
Fig. 1 Detection of *rmtB* zygotes and *armA* zygote of *E. coli* by PCR and Agarose gel electrophoresis
M. DNA 2 000 bp Marker;1-15. *rmtB* PCR product;16-17. The negative control;18. *armA* PCR product

2.4 接合子频率的测定

本试验中所有临床阳性菌都能通过接合方式将 16S rRNA 甲基化酶基因传递给 J53Az^R,传递率为 100%。接合频率计算结果显示,*armA* 阳性菌的供体菌接合频率为 3.6×10^{-9} ,*rmtB* 阳性菌的供体菌接合频率在 $(5.7 \times 10^{-11}) \sim (3.2 \times 10^{-6})$; *armA* 阳性菌的受体菌接合频率为 6.7×10^{-7} ,*rmtB* 阳性菌的受体菌接合频率为 $(9.2 \times 10^{-9}) \sim (4.8 \times 10^{-6})$ 。

2.5 接合子及原菌株对供测氨基糖苷类药物的敏感性比较

接合子对 3 种氨基糖苷类代表药物的敏感性略高于临床阳性菌,但远远低于 J53Az^R,说明 16S rRNA 甲基化酶基因在转移到受体菌后使阴性受体菌对氨基糖苷类药物及其他 11 种非氨基糖苷类药物产生了较高的耐药性。

3 讨论

四川地区临床分离的大肠杆菌无论健康动物源还是患病动物源都有很高的耐药性。437 株健康动物源大肠杆菌除对美罗培兰(0.46%)和阿米卡星(2.98%)耐药率较低外,对其他大多数抗菌药物的耐药率在 10.76%~69.79%。82 株患病动物源大肠杆菌对萘啶酸、磺胺甲恶唑、卡那霉素耐药率高达 100%,对美罗培兰的耐药率为 3.66%,对其余药物的耐药率在 32.93%~97.8%,低于孙慧等^[16]的相

关报道,这可能与大肠杆菌的耐药性存在地域差异性及菌种差异性有关。健康食品动物源大肠杆菌对氨基糖苷类 3 种代表药物的敏感率整体高于其他的非氨基糖苷类药物,而对患病动物源大肠杆菌,氨基糖苷类药物的优势则不明显,存在很高的耐药性,这可能是在频繁使用此类药物过程中,大肠杆菌对其的耐药性有所增强。有关学者认为,细菌对氨基糖苷类药物的耐药机制主要是细菌可以产生水解氨基糖苷类抗生素的酶,但这些酶并不能水解所有的氨基糖苷类抗生素,比如阿米卡星^[17]。所以在本次研究中,大肠杆菌对阿米卡星的耐药率较低,但仍有菌株对阿米卡星耐药,尤其是患病动物源大肠杆菌。由此可见,产生氨基糖苷类抗生素酶并不是细菌耐药的唯一机制。目前研究认为,由质粒介导的 16S rRNA 甲基化酶是氨基糖苷类抗生素耐药的新的机制,其能使药物作用靶位 16S rRNA G1405 上的 N-7 位鸟苷变成甲基鸟苷或使 A1408 上的腺嘌呤 N-1 位甲基化,使细菌的 30S 核糖体 16S rRNA 与氨基糖苷类抗生素的亲和力下降,导致细菌对氨基糖苷类抗生素产生耐药性^[17]。本研究从 437 株健康动物源大肠杆菌中检测出 5 株携带有 *rmtB* 基因,占 1.14%;从 82 株患病动物源大肠杆菌中检测到 1 株含 *armA* 基因(占 1.22%)和 10 株含 *rmtB* 基因(占 12.2%),低于陈玉霞等^[18]的研究结果;检测到 *armA* 基因的菌株也能检测到 *rmtB* 基因,但未检测到

rmtA、*rmtC*、*rmtD*、*rmtE* 及 *npmA* 基因,这与陈玉霞等^[18]的研究结果相符。在四川地区,健康动物源大肠杆菌对阿米卡星的耐药率为 2.98%,患病动物源大肠杆菌的耐药率为 32.93%;患病动物源大肠杆菌 16S rRNA 甲基化酶基因的检测率远高于健康动物源大肠杆菌,且检测出 16S rRNA 甲基化酶基因的阳性菌株都对阿米卡星耐药,说明 16S rRNA 甲基化酶可能是导致细菌耐阿米卡星的主要机制之一。

存在 16S rRNA 甲基化酶基因的阳性菌株对测试药物都表现出耐药性。对阿米卡星耐药的菌株对其他 2 种氨基糖苷类药物也都表现出耐药性,同时对其非氨基糖苷类药物也表现出较高的耐药性,说明 16S rRNA 甲基化酶基因不但对氨基糖苷类抗生素具有耐药性,而且对非氨基糖苷类药物也具有耐药性,其对社会的危害性很严重。本试验中,所有临床阳性菌都能通过接合方式将 16S rRNA 甲基化酶基因传递给 J53A^R,传递率为 100%。在丁晓丽等^[3]的报道中,*armA* 基因不能通过质粒接合传递给受体菌,这与本次研究结果不符,其原因可能与接合试验菌株数多少或接合介质及接合时间等不同有关,但本试验接合频率与丁晓丽的报道相符。接合子对氨基糖苷类抗生素的敏感性略高于临床阳性菌,但远低于阴性菌,且 16S rRNA 甲基化酶基因可以以水平的方式进行传播的特性应引起社会的关注。

4 结 论

四川地区健康动物源大肠杆菌对抗生素呈低水平耐药,多重耐药性以 4 耐以下为主,占 63.84%,主要由 *rmtB* 基因引起;而患病动物源大肠杆菌则呈高水平耐药,89.02% 为 10~14 耐,主要由 *rmtB* 基因和 *armA* 基因引起。

〔参考文献〕

- [1] 李 耘,吕 媛,薛 峰,等.我国 2009 至 2010 年 MOHNA-RIN 项目临床分离常见病原菌的耐药监测 [J]. 中华检验医学杂志,2012,35(1):67-87.
Li Y, Lü Y, Xue F, et al. Antimicrobial susceptibility surveillance in China: a MOHNA-RIN program report (2009—2010) [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2012, 35(1): 67-87. (in Chinese)
- [2] Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Lancet, 2003, 362: 1888-1993.
- [3] 丁晓丽,陈 琳,黄东璋,等. 16S rRNA 甲基化酶在鸡肠道大肠杆菌中传播方式的分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(10): 216-219.
- [4] Ding X L, Chen L, Huang D Z, et al. Analysis of transfer modes of 16S rRNA methylase in chicken intestinal *E. coli* [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013, 40(10): 216-219. (in Chinese)
- [5] Yamane K, Wachino J, Doi Y, et al. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes [J]. Emerging Infectious Diseases, 2005, 11(6): 951-953.
- [6] Yamane K, Rossi F, Barberino M G, et al. 16S ribosomal RNA methylase *rmtD* produced by *Klebsiella pneumoniae* in Brazil [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 61(3): 746-747.
- [7] Davis M A, Baker K N, Orfe L H, et al. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(6): 2666-2669.
- [8] Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, *npmA*, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(12): 4401-4409.
- [9] Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, et al. Plasmid-borne 16S rRNA methylase *armA* in aminoglycoside-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Poland [J]. Journal of Medical Microbiology, 2011, 60(9): 1306-1311.
- [10] Doi Y, Adams-Haduch J M, Paterson D L. Genetic environment of 16S rRNA methylase gene *rmtD* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52(6): 2270-2272.
- [11] Gonzalez-Zorn B, Catalan A, Escudero J A, et al. Genetic basis for dissemination of *armA* [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005, 56(3): 583-585.
- [12] Galimand M, Abtcheva S, Courvalin P, et al. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548 [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(7): 2949-2953.
- [13] Ling M, Lin C J, Chen J H, et al. Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-Type extended-spectrum beta-lactamases [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(1): 104-111.
- [14] Yamane K, Wachino J, Suzuki S, et al. 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan [J]. Emerging Infectious Diseases, 2007, 13(4): 642-646.
- [15] Chen H L, Jien W L, Chia C L, et al. Spread of *ISCR1* elements containing *bla_{DHA-1}* and multiple antimicrobial resistance genes leading to increase of flomoxef resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(9): 4058-4063.

- 究进展 [J]. 疾病预防控制通报, 2013, 28(2): 84-87.
- Zhao L, Zhang X, Zhang Z Z, et al. Research progress of diagnosis and prevention of vaccine in hydatid disease [J]. Bull Dis Control Prev, 2013, 28(2): 84-87. (in Chinese)
- [9] Chow C, Gauci C G, Cowman A F, et al. *Echinococcus granulosus*: Oncosphere-specific transcription of genes encoding a host-protective antigen [J]. Exp Parasitol, 2004, 106 (3/4): 183-186.
- [10] Woollard D J, Heath D D, Lightowlers M W. Assessment of protective immune responses against hydatid disease in sheep by immunization with synthetic peptide antigens [J]. Parasitology, 2000, 121(2): 145-153.
- [11] Gauci C, Heath D, Chow C, et al. Hydatid disease: Vaccinology and development of the EG95 recombinant vaccine [J]. Expert Rev Vaccines, 2005, 4(1): 103-112.
- [12] Zheng H, Zhang W, Zhang L, et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus* [J]. Nat Genet, 2013, 45 (10): 1168-1175.
- [13] Oertle T, Huber C, van der Putten H, et al. Genomic structure and functional characterization of the promoters of human and mouse nogo/rtn4 [J]. J Mol Biol, 2003, 325(2): 299-323.
- [14] Roebroek A J, van de Velde H J, Van Bokhoven A, et al. Cloning and expression of alternative transcripts of a novel neuroendocrine-specific gene and identification of its 135-kDa translational product [J]. J Biol Chem, 1993, 268(18): 13439-13447.
- [15] Oertle T, Klinger M, Stuermer C A, et al. A reticular rhapsody: Phylogenic evolution and nomenclature of the RTN/Nogo gene family [J]. FASEB J, 2003, 17(10): 1238-1247.
- [16] Senden N H, van de Velde H J, Broers J L, et al. Cluster-10 lung-cancer antibodies recognize NSPs, novel neuro-endocrine proteins associated with membranes of the endoplasmic reticulum [J]. Int J Cancer Suppl, 1994, 8: 84-88.
- [17] Marsland B J, Tisdall D J, Heath D D, et al. Construction of a recombinant orf virus that expresses an *Echinococcus granulosus* vaccine antigen from a novel genomic insertion site [J]. Arch Virol, 2003, 148(3): 555-562.
- [18] Chow C, Gauci C G, Cowman A F, et al. A gene family expressing a host-protective antigen of *Echinococcus granulosus* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2001, 118(1): 83-88.
- [19] Woollard D J, Gauci C G, Lightowlers M W. Synthetic peptides induce antibody against a host-protective antigen of *Echinococcus granulosus* [J]. Vaccine, 1999, 18 (9/10): 785-794.
- [20] Woollard D J, Gauci C G, Heath D D, et al. Protection against hydatid disease induced with the EG95 vaccine is associated with conformational epitopes [J]. Vaccine, 2000, 19 (4/5): 498-507.

(上接第 16 页)

- [15] 原鸿雁, 郭兵方, 尹晶平, 等. 耐药大肠杆菌氨基糖苷类修饰酶和 16S rRNA 甲基化酶基因的分析 [J]. 江苏大学学报: 医学版, 2013, 23(5): 419-431.
- Yuan H Y, Guo B F, Yin J P, et al. Analysis of aminoglycoside modifying enzyme genes and 16S rRNA methylase genes in drug-resistant *Escherichia coli* strains [J]. Journal of Jiangsu University: Medicine Edition, 2013, 23 (5): 419-431. (in Chinese)
- [16] 孙 慧, 雷 战, 邹金峰, 等. 山东地区禽源致病性大肠杆菌氨基糖苷类药物耐药性及耐药基因的检测 [J]. 中国兽药学报, 2011, 31(9): 1279-1282.
- Sun H, Lei Z, Zou J F, et al. Mechanism of resistance and detection of resistance genes to aminoglycoside among avian *Escherichia coli* strains from Shandong province [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2011, 31 (9): 1279-1282. (in Chinese)
- [17] 高 辉, 王 杨, 黄云昆, 等. 16S rRNA 甲基化酶基因在产 ESBLs 肠杆菌科细菌中的分布 [J]. 检验医学, 2013, 28(9): 775-779.
- Gao H, Wang Y, Huang Y K, et al. Distribution of 16S rRNA methylase genes in *ESBLs*-producing enterobacteriaceae [J]. Laboratory Medicine, 2013, 28(9): 775-779. (in Chinese)
- [18] 陈玉霞, 李德喜, 杜向党, 等. 病犬大肠杆菌 16S rRNA 甲基化酶基因检测 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(17): 34-37.
- Chen Y X, Li D X, Du X D, et al. Molecular detection of 16S rRNA methylase genes among *Escherichia coli* strains isolated from diseased dogs [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(17): 34-37. (in Chinese)