

贵州省猪源大肠杆菌 16SrRNA 甲基化酶 基因调查与转移情况的研究

焦亚琴¹, 吕世明^{1*}, 谭艾娟², 李博岩¹, 刘金平¹, 黄弘宇², 杨可¹

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025)

[收稿日期] 2016-11-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 04-0020-05 [中图分类号] S859.7

[摘要] 对贵州省规模化养猪场的 167 株大肠杆菌进行 16SrRNA 甲基化酶基因的流行及转移情况研究, 为氨基糖类药物在兽医临床上的合理使用提供理论参考。采用微量肉汤稀释法测定药物敏感性, 聚合酶链反应 (PCR, Polymerase Chain Reaction) 方法检测 16SrRNA 甲基化酶基因的携带和转移。结果显示, 阿米卡星、卡那霉素、链霉素、庆大霉素、新霉素的平均耐药率分别为 17.5%、67.8%、80.9%、77.67% 和 75.33%。检测到 rmtB 8 株, 检测率为 4.8%, 未检测到 armA。由此可知, rmtB 基因可转移至沙门氏菌和大肠杆菌, 转移之后的菌株对大部分抗菌药物耐药水平大幅提高。

[关键词] 氨基糖苷类药物; 耐药; 16SrRNA 甲基化酶

The Research of 16SrRNA Methylation Enzyme Gene to *E. Coli* Investigation and Transfer in Guizhou

JIAO Ya-qin¹, LV Shi-ming^{1*}, TAN Ai-juan², LI Bo-yan¹, LIU Jin-ping¹, HUANG Hong-yu², YANG Ke¹

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. College of life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The object was 167 strains *E. colis* of the large-scale pig farms in Guizhou, explored the prevalence of 16SrRNA methylation enzyme gene and transferred research, to provide theoretical basis for the rational use of aminoglycosides. Application of trace the broth dilution method to determine the sensitivity of drugs and polymerase chain reaction (PCR) to detect 16S-RMTase genes' carry and transfer. The average resistance rates of amikacin, kanamycin, streptomycin, gentamicin, neomycin was 17.5%、67.8%、80.9%、77.67% and 75.33% respectively. 8 strains of rmtB were found and the detection rate was 4.8%, armA was not detected. Therefore, rmtB gene can be transferred to the salmonella and *E. coli*, and strain resistance level increased significantly after the transferred.

Key words: aminoglycoside drug; resistant; 16SrRNA methylation enzyme

基金项目: 贵阳市农业局科学技术计划项目“贵阳市屠宰场猪肉致病菌污染调查及防控措施研究”(筑科合 2010 第12-1号); 贵州大学研究生创新基金项目“贵州省猪源大肠杆菌 16SrRNA 甲基化酶耐药基因调查与转移的研究”(研农 2016019)

作者简介: 焦亚琴, 硕士研究生, 从事兽医药理学方面研究。

通讯作者: 吕世明。E-mail: lvlsmsm@163.com

抗菌药物的发现与应用给人类和动物健康带来了福利,但随着抗菌药物不规范地长期大量使用甚至滥用,细菌耐药性问题变得十分严峻^[1],新药研发的速度不及耐药性发展快,细菌感染疾病的治疗陷入:用药→耐药→加大剂量和种类用药→高度耐药和多重耐药→超级细菌产生的恶性循环^[2],如何降低或消除细菌耐药性的危害已成为全球关注的焦点^[3]。

氨基糖苷类抗生素在临床主要的抗菌药物^[4],由于广泛和过度使用,其耐药问题十分严峻。氨基糖苷类抗生素修饰酶(AME, Aminoglycoside antibiotic modification enzyme)和16SrRNA甲基化酶可以在不同细菌间快速水平传播并不受菌属特异性限制,成为介导氨基糖苷类耐药最为广泛的途径。许多研究表明,氨基糖苷类药物高水平耐药的主要途径是由外源16SrRNA甲基化酶介导^[5]。贵州省养猪场细菌对氨基糖苷类的耐药较为严重^[6-7],此现象是否与16SrRNA甲基化酶耐药基因的存在有关,目前还未见相关报道。本研究以贵州省6个地州市规模化养猪场的167株大肠杆菌为对象,探讨贵州省规模猪场的16SrRNA甲基化酶基因的流行情况,并对16SrRNA甲基化酶在细菌间的转移进行了研究,以为氨基糖苷类药物的合理使用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 SW-CT-1F超净工作台:上海博迅实业有限公司医疗设备厂,2600型基因扩增仪:杭州明朗科学仪器有限公司, AUW120D-型电子天平:岛津制作所, XH-C快速混匀器SK-1:常州澳华仪器有限公司, HH.B11-420-S-II型恒温培养箱:上海贺德实验设备有限公司, LDZX-30FBS-型全自动高压蒸汽灭菌锅:上海申安医疗器械厂等。

1.1.2 药品 LB肉汤培养基,伊红美兰琼脂培养基(MHA, Eosin meilan AGAR medium),缓冲蛋白胨水(BPW, Buffered Peptone Water),木糖赖氨酸去氧胆酸盐琼脂(XLD, Bile acid salt AGAR xylose

lysine to oxygen),米勒-海顿肉汤培养基(MHB, Miller-Haydn broth medium),肠杆菌科生化鉴定管,链霉素、庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星、新霉素等标准品(纯度达99.9%),美仑生物公司。

1.1.3 菌株 167株实验大肠杆菌是贵州大学兽医药理学实验室2012年7月至2013年1月,从贵阳、兴义、安顺、毕节、凯里、六盘水6个地州市的规模猪场采集并分离鉴定;质控菌株为大肠杆菌ATCC25922,生工生物工程(上海)有限公司;16SrRNA甲基化酶基因阳性菌株由华南农业大学兽医学院实验室惠赠;受体菌大肠杆菌和沙门氏菌是贵州大学兽医药理学实验室分离鉴定。

1.2 方法

1.2.1 分离菌MIC值测定 按照临床和实验室标准协会(CLSI, Clinical And Laboratory Standards Institute)推荐的方法和判定标准,采用微量肉汤稀释法^[8]测定大肠杆菌对链霉素、庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星、新霉素的最低抑菌浓度(MIC, Minimal Inhibitory Concentration)值。

1.2.2 16SrRNA甲基化酶基因检测 模板DNA提取:采用煮沸法提取细菌的总DNA。引物:由贵州大学兽医药理学实验室设计,生工生物工程(上海)有限公司合成。

反应体系:为50 μL: MIX9.3 μL,上、下游引物各1 μL, DNA模板2 μL, 无菌水36.7 μL。反应条件:rmt B为预变性95℃, 5 min;变性95℃, 30 s;退火53.5℃, 30 s;延伸72℃, 30 s;再延伸72℃, 5 min;30个循环。armA为预变性95℃, 5 min;变性95℃, 30 s;退火53.5℃, 30 s;延伸72℃, 30 s;再延伸72℃, 5 min;32个循环。PCR产物凝胶,胶回收送生工生物工程(上海)有限公司测序。

1.2.3 16SrRNA甲基化酶基因在细菌间转移的研究

参考王冠玉的方法^[9]检测16SrRNA甲基化酶基因(rmtB)从供体菌(为携带rmtB基因对阿米卡星耐药的大肠杆菌)向受体菌(为不携带rmtB基因的大肠杆菌和沙门氏菌)的转移。

将供、受体菌的菌液稀释后,供体菌涂布于含阿米卡星(500 μg/mL),受体菌-大肠杆菌涂

布于含环丙沙星(16 μg/mL)、沙门氏菌涂布于头孢噻肟(64 μg/mL)的固体培养基上,37 ℃培养过夜;调整菌液浓度,吸光值(OD, optical density od)约为0.5,培养;离心,弃上清液生理盐水混匀菌体沉淀;涂布于MHA平板,培养;洗下菌苔,10²~10³倍稀释后,涂布于含阿米卡星和环丙沙星、阿米卡星和头孢噻肟的选择性培养基上,培养;挑选单菌落在不含抗生素的培养基上传代3次,再挑取单菌落在含双抗的选择性培养基上培养过夜,生长的菌落即初步认定为接合子,然后进行PCR检测验证,并按照"1.2.1方

法"测定接合子的MIC值。

2 结果

2.1 MIC值测定结果 从贵州省6个地(州、市)规模猪场分离到的167株大肠杆菌对氨基糖苷类药物的耐药程度较高,对阿米卡星、卡那霉素、链霉素、庆大霉素、新霉素的平均耐药率分别为17.5%、67.8%、80.9%、77.7%、75.3%;卡那霉素、庆大霉素和链霉素的耐药率较高,MIC值最高是>256 mg/L,为高度耐药,达到耐药的16倍,阿米卡星和新霉素相对较低。

表1 16SrRNA 甲基化酶耐药基因(*rmtB*和*armA*)的引物序列

基因类别	引物名称	核苷酸序列(5'→3')	大小	登录号
16SrRNA	<i>rmtB</i> -F	5'-CCGAAAACGATTTAGGAGACACC-3'	982	13906405
	<i>rmtB</i> -R	5'-GGCTTGGCAGTGGGGAAA-3'		
甲基化酶	<i>ArmA</i> -F	5'-GGCGTGAAGGTGATGAACAAG-3'	1219	13876853
	<i>ArmA</i> -R	5'-CAGCCGTTGGACAGAGTTTAGTA-3'		

表2 贵州省内167株猪源大肠杆菌对五种氨基糖苷类药物的平均耐药率

药物	阿米卡星	卡那霉素	链霉素	庆大霉素	新霉素
耐药率/%	17.5	67.8	80.9	77.7	75.3

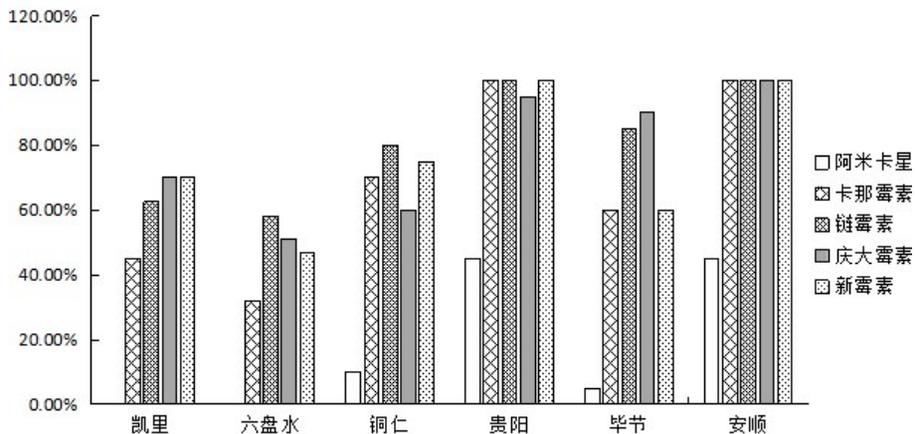


图1 贵州省各个地区大肠杆菌耐药率统计结果

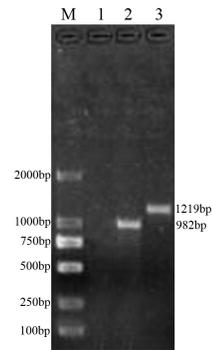
2.2 rmtB 基因的 PCR 检测结果 在试验的167 株大肠杆菌中,检测到 16SrRNA 甲基化酶-rmtB 基因,共检测到 8 株,检出率为 4.79%;图 2 为阳性菌株,即携带有 rmtB 和 armA 基因的大肠杆菌,1 泳道为阴性对照,2 泳道为 rmtB 基因,3 泳道为 armA 基因。图 3 为在 167 株大肠杆菌中检测到的 8 株,1 泳道为阴性对照,2~9 泳道为检测到的 8 株,即 rmtB 基因,而未检测到 armA 基因。测序结果经对比相似度均达到 99.9%,基本可确定其为 16SrRNA 甲基化酶 rmtB 基因。

2.3 rmtB 基因的转移 按照"1.2.3 方法",进行 rmtB 的水平接合转移,结果表明大肠杆菌携带的 rmtB 耐药基因可成功转移至 8 株大肠杆菌和 1 株沙门氏菌。PCR 检测和 rmtB 转移的产物电泳图,见图 4,1 泳道为阴性对照,2~10 泳道为接合成功的 9 株菌。测序结果经对比相似度均达到 99.9%,基本可确定其为 16SrRNA 甲基化酶 rmtB 基因。

2.4 接合子 MIC 值变化 从表可以看出,转移之后的菌株耐药水平大部分都有所提高,其中阿米卡星的 MIC 值变化最大,从敏感变为高度耐药, MIC 值均大于 256 mg/L,其次是新霉素。这与陈琳等^[10]猪阴沟肠杆菌 16SrRNA 甲基化酶耐药基因分析报道一致。因此,判断细菌是否含有 16SrRNA 甲基化酶,提示药物可能可以用阿米卡星和新霉素。如果该细菌对这两种药物均为高度耐药,那么该细菌很可能含有 16SrRNA 甲基化酶。

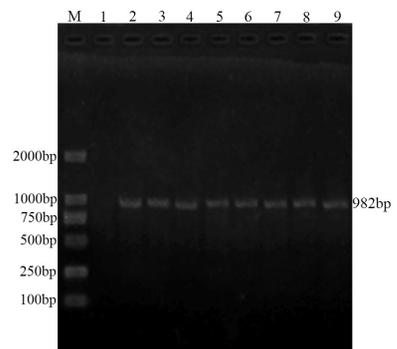
3 讨论

16SrRNA 甲基化酶介导的细菌对氨基糖苷类药物高度耐药,是通过菌体内 16SrRNA 甲基化酶的甲基化作用,对该菌产生的氨基糖类物质形成高水平耐药,使其在复杂的微生物环境下形成生态学优势,导致革兰氏阴性杆菌对多种临床常用氨基糖苷类药物高度耐药。由 16SrRNA 甲基化酶介导的氨基糖苷类药物的高水平耐药,以及由其与其他基因同时存在,引起高水平多重耐药,对临床药物选择造成了很大的压力,引起抗菌药物用药危机^[11]。本研究发现贵州省内出现 16SrRNA 甲基化酶基因 rmtB 基因,同样将对贵州省养猪场氨基糖苷类药物的使用造成一定的压力。



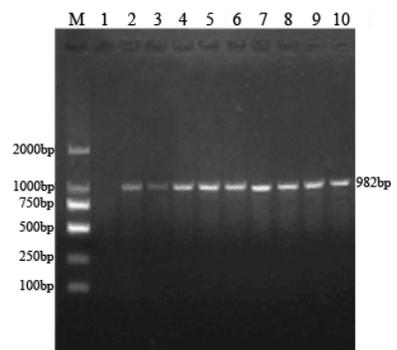
M: DL 2000 DNA Marker; 1: 大肠埃希菌 ATCC 25922;
2: rmtB; 基因 3: armA 基因

图 2 阳性菌 PCR 产物电泳结果



M: DL 2000 DNA Marker; 1: 大肠埃希菌 ATCC 25922;
2~9: 检测基因 rmtB

图 3 检测菌 PCR 产物电泳结果



M: DL 2000 DNA Marker; 1: 大肠埃希菌 ATCC 25922;
2~10: 接合子

图 4 接合子 PCR 产物电泳结果

表3 接合子对常见抗生素 MIC 值测定结果

药物名称	接合试验前		接合试验后		变化
	平均 MIC 值 /(mg · L ⁻¹)	结果判定	平均 MIC 值 /(mg · L ⁻¹)	结果判定	
阿米卡星	2.5	敏感	>512	高度耐药	↑
卡那霉素	341.33	耐药	>512	高度耐药	↑
磺胺嘧啶钠	810.7	耐药	1024	耐药	↑
诺氟沙星	32.4	耐药	174.2	耐药	↑
庆大霉素	165.5	耐药	234.7	耐药	↑
头孢他啶	192	耐药	654.8	高度耐药	↑
新霉素	29.3	耐药	341.8	耐药	↑

诸多研究及本研究均发现,16SrRNA 甲基化酶能在一些细菌间交换或转移,所以将可能致使越来越多的临床分离菌对氨基糖苷类药物产生高水平耐药^[4]。大量氨基糖苷类药物在畜牧养殖业的使用,促进 16SrRNA 甲基化酶在动物病原菌中的出现和扩散^[12]。近年来有研究表明,动物源细菌的耐药基因可以通过与人体直接接触或间接地通过食物链向人体进行传递。因此,在动物源细菌中检测到的 16SrRNA 甲基化酶基因,存在着传递给人类病原菌的危险^[13]。而且许多可用抗生素治疗后,出现严重的人类病原体产生耐药性的情况,可能构成现代医疗的最大威胁^[14]。目前,动物源细菌耐药性已引起全世界的高度关注^[15]。因此,加强耐药基因的耐药传播机制的研究以及对临床上耐药菌株的流行情况调查监控具有重要意义。

参考文献:

- [1] 李显志. 抗生素耐药基因古老起源与现代进化及其警示[J]. 中国抗生素杂志,2013,2(38): 81-89.
- [2] 韦 嫔,谭艾娟,黄弘宇,等. 五倍子降低大肠杆菌耐药性的效果[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(7): 137-139.
- [3] 孙 硕,吕世明,谭艾娟,等. 适应度代价对大肠杆菌药物敏感性恢复的作用[J]. 天津农业科学,2016,22(4): 33-35.
- [4] Pak-Leung Ho, Lai-Ming Leung. Prevalence of aminoglycoside modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methylase genes among aminoglycoside-resistant *Escherichia coli* isolates[J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 2014, 1(4):1-4.
- [5] 李国华,刘 琪,黎敏华,等. 大肠埃希菌中 16S rRNA 甲基化

酶 ArmA 基因的分布与耐药性的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2015,1(1): 130.

- [6] 冉江华,吕世明,谭艾娟,等. 遵义市规模养猪场大肠杆菌的耐药性检测[J]. 安徽农业科学,2014,42(6): 1714-1715.
- [7] 尹泽东,吕世明,肖 康,等. 贵阳市散养户猪鸡源性大肠杆菌耐药性调查[J]. 山地农业生物学报,2010,29(1): 85-87.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, teentieth informational supplement, M100S20[S].
- [9] 王冠玉. 不同来源大肠杆菌喹诺酮耐药基因水平转移的研究[D]. 贵阳: 贵州大学,2013.
- [10] 陈 琳,刘健华,张俊丰,等. 猪阴沟肠杆菌 16SrRNA 甲基化酶耐药基因分析中国农业科学,2011,44(1): 167-175.
- [11] Luo Y, Yang J. Prevalence of β -lactamases and 16S rRNA methylase genes amongst clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants[J]. Antimicrob Agents, 2011, 37: 352-355.
- [12] Sofiane B, Abdelaziz T. High prevalence of 16S rRNA methylase RmtB among CTX-M extended-spectrum-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from Islamabad, Pakistan[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2013, 41: 524-526.
- [13] 肖 方. 鸡源大肠杆菌 16SrRNA 甲基化酶基因的检测及扩散机制[D]. 郑州: 河南农业大学,2010,5:9.
- [14] Marta, Wittek, Graeme. Expansion of the aminoglycoside-resistance 16SrRNA (m1A1408) methyltransferase family: Expression and functional characterization of four hypothetical enzymes of diverse bacterial origin[J]. Biochimica et Biophysica Acta. 2014, 1844: 1648.
- [15] 马 苏,沈建忠. 动物源细菌耐药性监测国内外比较[J]. 中国兽医杂志 2016,52(9): 121-123.

(编辑:陈 希)