

98 株鸭源致病性大肠杆菌氨基糖苷类 耐药基因型与耐药表型的比较

于学辉, 黄 兰, 杨晓农, 刘 群

(西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041)

摘 要: 旨在调查鸭致病性大肠杆菌氨基糖苷修饰酶耐药基因(AMEs 基因)的携带情况, 探讨耐药基因与氨基糖苷类抗生素耐药表型的相关性。对 98 株鸭致病性大肠杆菌采用了 K-B 法, 选用氨基糖苷类抗生素链霉素、新霉素、庆大霉素、阿米卡星、大观霉素和卡那霉素进行药敏试验, 用建立的检测氨基糖苷类 AMEs 主要基因的四重 PCR 方法对上述菌株进行分子检测, 并随机选取耐药基因 *ant(3'')-I a*、*aac(3)-II a* 和 *aph(3')-II a* 各 3 个阳性扩增进行克隆测序, 对药敏试验结果和基因检测结果进行比较分析。结果表明, 98 株鸭致病性大肠杆菌有 67 株对上述氨基糖苷类药物中的一种或多种耐药, 耐药率为 68.4%(67/98); 有 49 株扩增出 AMEs 基因, AMEs 基因的检出率为 50%(49/98), 其中 *ant(3'')-I a* 的检出率为 30.6%(30/98), *aac(3)-II a* 为 13.3%(13/98), *aph(3')-II a* 为 3.1%(3/98), *ant(3'')-I a+aac(3)-II a* 为 2.0%(2/98), *aac(3)-II a+aph(3')-II a* 为 1.0%(1/98), 未检出 *aac(6')-I b* 基因; 序列分析结果表明, 扩增产物与 GenBank 中的相应序列有很高的同源性(>99%); AMEs 耐药基因与耐药表型的符合率为 73.1%(49/67), 符合率从高到低依次为大观霉素 60%(3/5)、庆大霉素 55%(11/20)、链霉素 33.3%(22/66)、卡那霉素 19%(4/21)、新霉素 12.5%(1/8)、阿米卡星 0%(0/3)。另外有 4 株细菌检测到相关耐药基因但耐药表型为敏感, 而有 22 株耐药表型为耐药却未检测到相关耐药基因。鸭致病性大肠杆菌氨基糖苷类耐药基因以 *ant(3'')-I a* 和 *aac(3)-II a* 两种为主, 耐药性与相关耐药基因的检出率基本呈正相关。

关键词: 鸭; 致病性大肠杆菌; 氨基糖苷类; 多重 PCR; 耐药基因; 耐药表型

中图分类号: S852.612; S859.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)12-1568-08

Correlation between Phenotype and Genotype of Resistance to Aminoglycoside in 98 Strains of Pathogenic *E. coli* from Ducks

YU Xue-hui, HUANG Lan, YANG Xiao-nong, LIU Qun

(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities,
Chengdu 610041, China)

Abstract: The objective of this paper is to investigate aminoglycoside resistance genes in *E. coli* from ducks and to study the correlation between the phenotypes and the genotypes of resistance. By using the K-B method and choosing aminoglycoside antibiotics including streptomycin (STR), neomycin (NEO), gentamycin (GEN), kanamycin (KAN), amikacin (AMK) and spectinomycin (SPT), the drug sensitivity tests were conducted for 98 strains of pathogenic *E. coli* from ducks. All strains of *E. coli* were detected by multiplex PCR method based on the main genes of AMEs to aminoglycoside, the resistance genes including *ant(3'')-I a*, *aac(3)-II a* and *aph(3')-II a* randomly selected from 3 *E. coli* strains with positive amplification were cloned and sequenced, then the results obtained from drug sensitivity tests were compared with that of PCR detection. The results showed that 67 strains out of 98 strains are resistant to one or several antibiotics with the resistance rate of 68.4%(67/98), and AMEs genes were amplified in 49 strain of the bacteria

收稿日期: 2010-06-23

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAD06A11); 国家科技支撑计划(2009BADB4B01)

作者简介: 于学辉(1961-), 男, 四川绵阳人, 博士, 副教授, 主要从事禽病学研究工作, Tel: 028-85522867, E-mail: yuxuehui@yahoo.cn

with the positive rate of 50% (49/98), in which the detection rates of *ant(3'')-I a*, *aac(3)-II a*, *aph(3')-II a*, *ant(3'')-I a + aac(3)-II a* and *aac(3)-II a + aph(3')-II a* were 30.6% (30/98), 13.3% (13/98), 3.1% (3/98), 2.0% (2/98) and 1.0% (1/98) respectively, and *aac(6')-I b* wasn't be discovered. The sequences analysis indicates that the amplified products shared high homology (over 99%) with the corresponding sequences in GenBank. The results of comparison show that the correlation rate between phenotype and genotype of resistance gene AMEs is 67% (45/67), in which the correlation rates of SPT, GEN, STR, KAN, NEO and AMK were 60% (3/5), 55% (11/20), 33.3% (22/66), 19% (4/21), 12.5% (1/8) and 0% (0/3), respectively. In addition, 4 strains carrying resistance genes showed the sensitive phenotype, while 22 strains with resistance phenotype didn't carrying the relevant genes. The main resistance genes of pathogenic *E. coli* from ducks to aminoglycoside are *ant(3'')-I a* and *aac(3)-II a*, and the drug resistance is positively correlative to the detection rate of relevant resistance genes.

Key words: duck; pathogenic *E. coli*; aminoglycoside; multiplex PCR; resistance gene; resistance phenotype

鸭源致病性大肠杆菌血清型复杂, 不同地区分离株的血清型存在较大的差异, 即使同一地区不同时间的分离株血清型的种类和优势血清型都有所不同^[1]。由于不同血清型的分离株间往往缺乏交叉保护, 给大肠杆菌病的免疫预防带来很大困难^[2], 因此, 化学药物预防和治疗仍是目前控制该病的主要手段。氨基糖苷类抗生素具有高效、广谱、药物动力学优良以及与其他抗菌药物有协同作用等特点, 而成为抗大肠杆菌感染的常用药物^[3], 但是, 随着使用量 and 应用频次不断增加, 以及氨基糖苷类等药物广泛用于饲料添加剂, 耐药问题越来越严重^[4]。

细菌对氨基糖苷类耐药是通过产氨基糖苷类修饰酶 (aminoglycosides-modifying enzymes, AMEs) 和产 16S rRNA 甲基化酶^[5] 介导的, 其中产 AMEs 为其主要原因^[6-7]。AMEs 是通过催化氨基糖苷类药物氨基或羟基的共价修饰, 使得氨基糖苷类药物与核糖体的结合减少及促进药物摄取 EDP-II 的阻断, 而介导耐药。AMEs 主要有氨基糖苷乙酰转移酶 (aminoglycoside acetyltransferases, AAC)、磷酸转移酶 (aminoglycoside phosphotransferases, APH)、核苷转移酶 (aminoglycoside nucleotidyl transferases, ANT), 目前已发现细菌能够产生 50 多种分别编码 AAC、APH 和 ANT 的基因^[8]。Shaw 等将修饰酶及其编码基因按修饰酶修饰的类型 (AAC、ANT 和 APH)、修饰的位点 (2', 3, 2'', 3'', 6', 4', 3', 6, 9), 修饰酶的底物谱 (I、II、III、IV、V 等) 以及独特的蛋白质序列 (即蛋白质亚型 a、b、c 等) 进行分类, 避免了命名的混乱^[9]。APH(3')-II 介导对卡

那霉素、新霉素、核糖霉素等的抗药性。AAC(6')-I 介导对阿米卡星、妥布霉素、奈替米星、卡那霉素、异帕米星、地贝卡星和西索米星的耐药, AAC(3)-II 引起对庆大霉素、妥布霉素、奈替米星、地贝卡星和西索米星的耐药。ANT(3'')-I 主要修饰链霉素的 3'' 羟基、大观霉素的 9 位羟基而产生耐药性。汤景元、张安云等分别对来自健康猪群和来自野生动物的大肠杆菌的介导对氨基糖苷类抗生素耐药的 4 种 AMEs 基因进行调查, 并比较了耐药基因与耐药表型的相关性^[10-11], 张璇等对猪源肠外致病性大肠杆菌的氨基糖苷类抗生素修饰酶编码耐药基因进行了检测^[12]。但到目前为止尚未见鸭源致病性大肠杆菌氨基糖苷类抗生素耐药基因报道, 本研究选用针对氨基糖苷类抗生素 4 个主要 AMEs 基因 [*aph(3')-II a*, *aac(6')-I b*, *ant(3'')-I a*, *aac(3)-II a*] 进行分子检测, 旨在调查鸭源致病性大肠杆菌 4 个 AMEs 基因的携带情况, 探讨耐药基因与耐药性表型的相关性, 以期对鸭源致病性大肠杆菌耐药性及其耐药基因的研究提供资料。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

我国西南地区 98 株鸭源致病性大肠杆菌分离株, 其中 O93 血清型 17 株, O78 血清型 11 株, O92 血清型 9 株, O36、O9、O77、O149 和 O154 各 4 株, O20、O142、O60、O45 和 O61 血清型各 3 株, O101、O137、O88、O22、O51、O117、O158、O76 和 O79 血清型各 2 株, O109、O43、O192、O46、O21、O17、

O104 和 O141 血清型各 1 株,由西南民族大学禽病研究所鉴定与保存;大肠杆菌药敏试验质控菌株 ATCC25922 购自中国药品生物制品检定所;阳性对照菌株 E99 和 SLPE1-5 [*aph*(3')-II *a*⁺、*aac*(6')-I *b*⁺、*ant*(3'')-I *a*⁺ 和 *aac*(3)-II *a*⁺] 由四川大学生命科学学院王红宁教授惠赠。

1.2 主要试剂

链霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、阿米卡星和大观霉素抗生素药敏纸片,购自杭州微生物试剂有限公司。*Taq* DNA 聚合酶、PCR 试剂、DNA Markers、dNTPs、pMD 18-T Vector、Ampicillin、IPTG 和 X-gal 均购自 TaKaRa 公司;琼脂糖、Tryptone、Yeast extract 英国 Oxoid 公司;胶回收试剂盒和小质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。TOP10 感受态细胞购自四川希尔思生物分子有限责任公司。

表 1 引物序列及相关信息

Table 1 Sequences of primers and relative information

耐药基因 Resistance genes	引物序列 Sequences of primers	Tm 值/°C Tm value	产物大小/bp Size
<i>aph</i> (3')-II <i>a</i>	For 5'-TGACTGGGCACAACAGACAA-3'	57.5	677
	Rev 5'-CGGCGATACCGTAAAGCAC-3'	59.2	
<i>aac</i> (6')-I <i>b</i>	For 5'-ATGACCTTGCGATGCTCTATGA-3'	59.9	486
	Rev 5'-CGAATGCCTGGCGTGT-3'	60.0	
<i>ant</i> (3'')-I <i>a</i>	For 5'-ATCTGGCTATCTTGCTGACA-3'	56.9	284
	Rev 5'-TATGACGGGCTGATACTGG-3'	56.9	
<i>aac</i> (3)-II <i>a</i>	For 5'-ACCCTACGAGGAGACTCTGAATG-3'	59.3	384
	Rev 5'-CCAAGCATCGGCATCTCATA-3'	59.3	

1.5.2 PCR 模板质粒 DNA 的制备 参照 AXYPrep 质粒 DNA 小量提取试剂盒 (AXYGEN) 的说明书,采用离心法提取细菌 DNA 模板,将提取的质粒 DNA 置 -20 °C 保存备用。

1.5.3 耐药基因 PCR 检测 多重 PCR 反应体系见表 2。采用已建立的多重 PCR 方法,对 98 株鸭致病性大肠杆菌 *aph*(3')-II *a*、*aac*(6')-I *b*、*ant*(3'')-I *a* 和 *aac*(3)-II *a* 进行检测,以参考菌株作为阳性对照,灭菌超纯水作为空白对照。待 PCR 产物降至室温后使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,于紫外荧光成像系统下照相并保存。

1.5.4 PCR 产物序列测定分析 随机选择阳性菌株各 3 株对其 PCR 产物按照 AXYGEN 胶回收

1.3 主要仪器

核酸蛋白检测仪 DU800 (Beckman 公司,美国);普通 PCR 仪 my cycler (Bio-Rad 公司,美国);梯度 PCR 仪 (Thermo Hybaid 公司,美国);核酸电泳仪 powerpac universal (Bio-Rad 公司,美国);凝胶成像系统 VerSa Doc2000 (Bio-Rad 公司,美国)。

1.4 药敏试验

药敏试验按照 CLSI (clinical and Laboratory standards Institute) 推荐的 K-B (Kirby -Bauer) 法进行,判定结果以美国临床实验室标准委员会推荐的标准进行^[13]。

1.5 耐药基因的 PCR 检测

1.5.1 引物设计 参照文献[11]的引物,采用 NCBI 网站 BLAST 工具,在 GenBank 中进行检索,初步验证特异性后交上海英骏公司合成,引物信息见表 1。

试剂盒操作说明进行胶回收,回收产物与 pMD18-T Vector 16 °C 连接过夜。将连接产物转化进感受态细胞,于 LB 固体培养基上 37 °C 培养。挑取阳性克隆菌落于 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养。提取菌液质粒 DNA,经 PCR 反应鉴定为阳性后送华大基因科技有限公司测序。测序结果在 GenBank 比对分析。

2 结果

2.1 药敏试验结果

98 株鸭源致病性大肠杆菌分离株耐药率见表 3,耐药率最高是链霉素 66.3% (65/98),其次是卡那霉素 21.4% (21/98),庆大霉素 20.4% (20/98),

新霉素 8.2%(8/98),大观霉素 5.1%(5/98),耐药率最低的是阿米卡星,为 3.1%(3/98)。67 株细菌对氨基糖苷类抗生素耐药,耐药率为 68.4%(67/

98)。其中有 34 株细菌只耐受 1 种药物(主要是链霉素),有 14 株细菌表现为二重耐药,有 15 株细菌表现为三重耐药,有 4 株细菌表现为四重耐药。

表 2 四重 PCR 反应体系的最终优化结果

Table 2 The optimized parameters of multi-PCR amplification system

试剂 Reagent	加样量 Sample amounts	循环参数 Cycle parameters
引物 Primer	(<i>aph</i> (3')-II a) 0.4 μ L \times 2 (<i>aac</i> (3)-II a) 0.9 μ L \times 2 (<i>ant</i> (3'')-I a) 1.8 μ L \times 2 (<i>aac</i> (6')-I b) 0.8 μ L \times 2	94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min
10 \times PCR buffer	2.5 μ L	94 $^{\circ}$ C 变性 50 s 54 $^{\circ}$ C 退火 45 s 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min(35 \times) 16 $^{\circ}$ C 保存
dNTPs (2.5 mmol \cdot L $^{-1}$)	2 μ L	
<i>Taq</i> 酶 (2.5 U \cdot μ L $^{-1}$)	0.2 μ L	
MgCl $_2$ (25 mmol \cdot L $^{-1}$)	2 μ L	
超纯水	8 μ L	
模板 DNA	2.5 μ L	
合计 Total	25 μ L	

表 3 98 株鸭源致病性对氨基糖苷类药物的耐药情况

Table 3 Resistance rates to aminoglycosides of 98 strains of pathogenic *E. coli* from ducks

药物 Antibiotics	耐药指标 Resistance indexes			药敏试验结果 Results of drug sensitivity tests		
	耐药菌株数 Resistant strains	中介菌株数 Intermediate strains	敏感菌株数 Sensitive strains	耐药率/% Resistance rate	中敏率/% Intermediate rate	敏感率/% Sensitive rate
	链霉素 STR	65	0	32	66.3(65/98)	0(0/98)
新霉素 NEO	8	3	87	8.2(8/98)	3.6(3/98)	88.8(87/98)
庆大霉素 GEN	20	0	78	20.4(20/98)	0(0/98)	79.6(78/98)
卡那霉素 KAN	21	0	77	21.4(21/98)	0(0/98)	78.6(77/98)
大观霉素 SPT	5	1	92	5.1(5/98)	1.0(1/98)	93.9(92/98)
阿米卡星 AMK	3	0	95	3.1(3/98)	0(0/98)	96.9(95/98)

2.2 大肠杆菌的耐药基因检测结果

应用建立的四重 PCR 对 98 株鸭源致病性大肠杆菌进行耐药基因的检测,共有 49 株细菌扩增出 AMEs 的 1 个或 2 个耐药基因,部分阳性菌株检测结果见图 1,耐药基因的携带率为 50%(49/98),其中 *ant*(3'')-I a、*aac*(3)-II a、*aph*(3')-II a、*ant*(3'')-I a+*aac*(3)-II a、*aac*(3)-II a+*aph*(3')-II a 的携带率分别为 30.6%(30/98)、13.3%(13/98)、3.1%(3/98)、2.0%(2/98)、1.0%(1/98),98 株鸭源

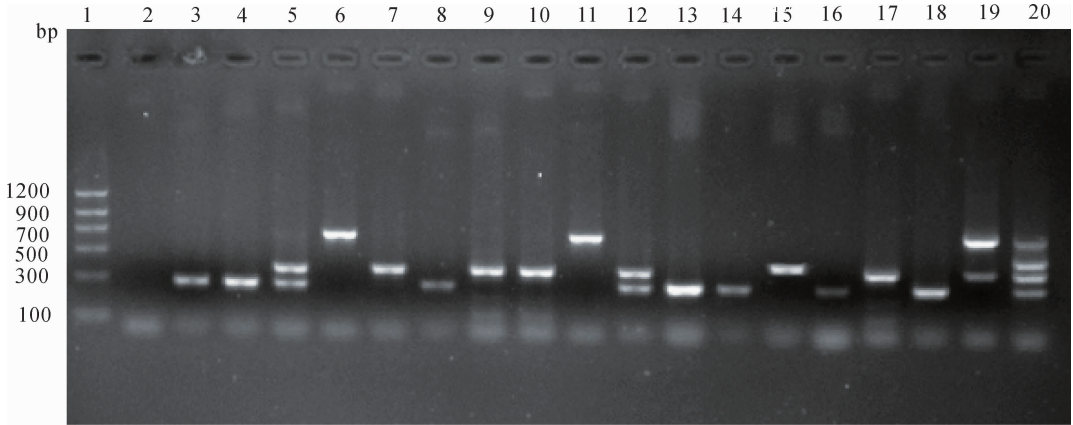
致病性大肠杆菌均未检出 *aac*(6')-Ib 基因(表 4)。

2.3 大肠杆菌耐药表型与耐药基因的比较结果

根据药敏试验和耐药基因的检测结果显示,98 株鸭源致病性大肠杆菌中有 67 株对 1 种或多种氨基糖苷类抗生素耐药,而有 49 株细菌扩增出了 AMEs 的 1~2 个耐药基因。耐药基因与耐药表型的符合率为 73.1%(49/67)。鸭源大肠杆菌耐药表型和耐药基因符合率的比较结果见表 5。符合率从高到低依次为大观霉素 60%(3/5)、庆大霉素

55%(11/20)、链霉素 33.3%(22/66)、卡那霉素 19%(4/21)、新霉素 12.5%(1/8),符合率最低的是阿米卡星 0%(0/3)。另外,有 4 株对氨基糖苷类抗

生素敏感的大肠杆菌检测到相关耐药基因(表 6);而 22 株对氨基糖苷类抗生素表现耐药的大肠杆菌却未检测到相关耐药基因。



1. DNA 相对分子质量标准;2. 阴性对照;3~19. 部分阳性菌株检测结果;20. 阳性对照

1. DNA Marker II; 2. Negative control; 3-19. Detection of partial positive strains; 20. Positive control

图 1 耐药基因多重 PCR 产物电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis of amplified products of resistance genes by multiple PCR

表 4 鸭源致病性大肠杆菌耐药基因的检出情况

Table 4 Detection results of resistance genes from pathogenic *E. coli* from ducks

菌株 Strains	耐药基因 AR genes	菌株 Strains	耐药基因 AR genes	菌株 Strains	耐药基因 AR genes
E314	<i>ant(3'')</i> - I a	E371	<i>ant(3'')</i> - I a	E333	<i>aac(3)</i> - II a
E320	<i>ant(3'')</i> - I a	E381	<i>ant(3'')</i> - I a	E337	<i>aac(3)</i> - II a
E322	<i>ant(3'')</i> - I a	E387	<i>ant(3'')</i> - I a	E346	<i>aac(3)</i> - II a
E323	<i>ant(3'')</i> - I a	E388	<i>ant(3'')</i> - I a	E377	<i>aac(3)</i> - II a
E326	<i>ant(3'')</i> - I a	E419	<i>ant(3'')</i> - I a	E379	<i>aac(3)</i> - II a
E327	<i>ant(3'')</i> - I a	E423	<i>ant(3'')</i> - I a	E389	<i>aac(3)</i> - II a
E329	<i>ant(3'')</i> - I a	E424	<i>ant(3'')</i> - I a	E403	<i>aac(3)</i> - II a
E331	<i>ant(3'')</i> - I a	E465	<i>ant(3'')</i> - I a	E415	<i>aac(3)</i> - II a
E335	<i>ant(3'')</i> - I a	E471	<i>ant(3'')</i> - I a	E431	<i>aac(3)</i> - II a
E336	<i>ant(3'')</i> - I a	E501	<i>ant(3'')</i> - I a	E434	<i>aac(3)</i> - II a
E339	<i>ant(3'')</i> - I a	E483	<i>ant(3'')</i> - I a	E448	<i>aac(3)</i> - II a
E351	<i>ant(3'')</i> - I a	E506	<i>ant(3'')</i> - I a	E484	<i>aac(3)</i> - II a
E355	<i>ant(3'')</i> - I a	E509	<i>ant(3'')</i> - I a	E514	<i>aac(3)</i> - II a
E357	<i>ant(3'')</i> - I a	E383	<i>ant(3'')</i> - I a + <i>aac(3)</i> - II a	E420	<i>a ph(3')</i> - II a
E359	<i>ant(3'')</i> - I a	E354	<i>ant(3'')</i> - I a + <i>aac(3)</i> - II a	E402	<i>a ph(3')</i> - II a
E360	<i>ant(3'')</i> - I a	E441	<i>aac(3)</i> - II a + <i>a ph(3')</i> - II a		
E361	<i>ant(3'')</i> - I a	E481	<i>a ph(3')</i> - II a		

表 5 鸭源大肠杆菌耐药基因型与耐药表型符合率的比较

Table 5 Comparison of correlation rate between phenotype and genotype of resistance gene of *E. coli* from ducks

药物 Antibiotics	耐药菌株数 Number of AR strains	耐药基因 AR genes	耐药基因检出率/% Detection rate/%
链霉素 STR	66	<i>ant</i> (3'')- I <i>a</i>	33.3%(22/66)
庆大霉素 GEN	20	<i>aac</i> (3)- II <i>a</i>	55%(11/20)
卡那霉素 KAN	21	<i>aph</i> (3')- II <i>a</i>	19%(4/21)
新霉素 NEO	8	<i>aph</i> (3')- II <i>a</i>	12.5(1/8)
大观霉素 SPT	5	<i>ant</i> (3'')- I <i>a</i>	60%(3/5)
阿米卡星 AMK	3	<i>aac</i> (6')- I <i>b</i>	0%(0/3)

表 6 4 株检测到耐药基因但耐药表型为敏感的大肠杆菌

Table 6 Detection of 4 strains of *E. coli* with resistance genes but showing sensitive phenotype

菌株 Strain	耐药基因 AR genes	链霉素 STR	庆大霉素 GEN	卡那霉素 KAN	新霉素 NEO	大观霉素 SPT	阿米卡星 AMK
E331	<i>ant</i> (3'')- I <i>a</i>	S	S	S	S	S	S
E354	<i>ant</i> (3'')- I <i>a</i> + <i>aac</i> (3)- II <i>a</i>	S	S	S	S	S	S
E371	<i>ant</i> (3'')- I <i>a</i>	S	S	S	S	S	S
E501	<i>ant</i> (3'')- I <i>a</i>	S	S	S	S	S	S

S. Sensitive

2.4 耐药基因的序列分析

将阳性克隆序列测定的结果用 DNASTar 软件分析,结果显示,各扩增产物与 GenBank 相应的耐药基因有很高的同源性(>99%),其中 *ant*(3'')- I *a*、*aac*(3)- II *a*、*aph*(3')- II *a* 基因序列与 GenBank 中相应序列 AJ884723、EU022314、AB434476 的同源性分别为 99.6%、99.7%和 99.1%。表明扩增出的产物即为目的耐药基因片段。

3 讨论

细菌对氨基糖苷类抗生素产生耐药往往是通过细菌产生的磷酸转移酶(APH)、乙酰转移酶(AAC)以及核苷转移酶(ANT)对进入胞内的活性分子进行修饰使之失去生物活性。作者在对氨基糖苷类药物耐药基因进行全面了解的基础上,选择了 *aph*(3')- II *a*、*aac*(6')- I *b*、*ant*(3'')- I *a* 和 *aac*(3)- II *a* 4 种耐药基因,所选的耐药基因是氨基糖苷类药物 3 种类型耐药基因的代表,他们与耐药表型有较强的相关性,具有相对稳定性和较低的同源性。作者用建立的 AMEs 基因四重 PCR 方法对我国西南地区 98 株鸭源致病性大肠杆菌分离株进行氨基糖苷修饰酶耐药基因的调查,共有 49 株细菌扩增出了 AMEs 的 1~2 个耐药基因,耐药基因的携带率为

50%,其中 *ant*(3'')- I *a*、*aac*(3)- II *a*、*aph*(3')- II *a*、*ant*(3'')- I *a* + *aac*(3)- II *a*、*aac*(3)- II *a* + *aph*(3')- II *a* 的携带率分别为 30.6%、13.3%、3.1%、2.0%、1.0%,均未检出 *aac*(6')- I *b* 基因。这是国内外首次对鸭源致病性大肠杆菌进行氨基糖苷修饰酶耐药基因的调查,有助于我们了解我国西南地区鸭源致病性大肠杆菌中氨基糖苷类耐药基因的分布情况。AMEs 在人医临床的流行情况非常复杂,往往因细菌种属差异、地域差异而不同^[14-16]。兽医临床上对 AMEs 的研究资料还不多,汤景元等^[10]调查了我国 95 个猪场 480 株来自健康猪群的大肠杆菌的氨基糖苷修饰酶耐药基因,发现主要以 *aadA1*(65.89%)、*aac*(3)- II (52.35%) 和 *aac*(3)- IV (12.91%) 3 种为主。陈琳等^[17]检测了 10 种 AMEs 基因在 *rmtB* 阳性菌中的分布情况,结果以 *aac*(3)- II (87.8%)、*aph*(3')- VII (77.6%) 和 *aph*(3')- II (79.6%) 3 种为主。金文杰等^[18]调查了 216 株禽致病性大肠杆菌氨基糖苷钝化酶耐药基因,发现主要以 *aadA1*(49.1%)、*strB*(65.7%) 和 *strA*(56%) 3 种为主,而 *aph*(3') 的阳性率为 16.2%。鸭鸭源致病性大肠杆菌以 *ant*(3'')- I *a*(30.6%) 和 *aac*(3)- II *a*(13.3%) 2 种为主,分析这种差异存在的原因,一方面可能来自于地域差异,另一方面可能源于被检

动物的种类不同,还有可能是所检测氨基糖苷钝化酶种类不同。

根据药敏试验和耐药基因的检测结果显示,98株鸭源致病性大肠杆菌中有67株对一种或多种氨基糖苷类抗生素耐药,而有49株细菌扩增出了AMEs的1~2个耐药基因。耐药基因与耐药表型的符合率为73.1%(49/67),这说明鸭致病性大肠杆菌对氨基糖苷类抗生素的抗性机制以产生针对该类抗生素的钝化酶为主,耐药性与相关耐药基因的检出率基本呈正相关。符合率从高到低依次为大观霉素60%、庆大霉素55%、链霉素33.3%、卡那霉素19%、新霉素12.5%,符合率最低的是阿米卡星0%(0/3)。对药敏试验和耐药基因检测的结果比较,发现因药物的不同,符合率存在差异,这可能与该类药物存在多种耐药机制有关,不同的耐药基因表现出相同的耐药表型这种现象与Miller等^[19]的研究结果一致。某些耐药基因跟耐药表型之间存在一定的相关性,例如大观霉素和庆大霉素的符合率为60%和55%。而有些耐药基因跟耐药表型之间的相关性很低,甚至出现了零相关性的情况,例如阿米卡星耐药率为0%(0/3),与汤景元等^[10]猪源大肠杆菌aac(6′)-Ib与阿米卡星符合率高达68.39%的结果有较大差距,这可能与该批鸭源致病大肠杆菌仅有3株对阿米卡星耐药有关,同时也说明细菌存在其他的耐药机制。作者发现有22株鸭源致病大肠杆菌耐药表型为阳性,但没有检测到相关的耐药基因,这一结果与汤景元等^[10]、张璇等^[11]对猪源的大肠杆菌,蔡培泉等^[20]对人源大肠杆菌,张安云等^[11]对野生动物源大肠杆菌以及金文杰等^[18]对禽源大肠杆菌的研究结果相似,分析这种现象普遍存在的原因,也许是因为氨基糖苷类抗生素发生耐药的其他机制在发挥作用,如携带了其他本研究中未检测的耐药基因,该现象也表明了我国不同来源的大肠杆菌存在的耐药基因比较复杂。此外,试验中还发现有些细菌虽然检测到了耐药基因,但是不表现出相关的耐药性,例如菌株E331、E371和E501;甚至有的细菌检测到多个耐药基因,但实际上对药物都表现为高度敏感,例如菌株E354。出现以上情况表明由于某种原因,耐药基因未能得到有效表达,从而未能发挥出其耐药的功能,这些细菌可能存在潜在的耐药性,也可能成为耐药基因的传播源,对于防止细菌耐药性的研究更有意义。

氨基糖苷类耐药的主要机制是产生钝化酶,即

抗生素的氨基或羟基被酶修饰而与核糖体结合不紧密,不能进入下一个阶段发挥抗菌作用,使细菌在抗生素存在的情况下仍能存活。不同菌株之间的耐药性相差很大,影响因素包括酶量、催化率、用药量等^[21]。本试验的检测结果显示,不同地区菌株氨基糖苷类耐药基因的检出率很不一致。如绵阳地区细菌耐药基因检出率为86.4%,而广汉地区的细菌耐药基因检出率则为45.5%。在我国的部分研究报告结果也表明,不同来源、不同菌株中氨基糖苷类耐药基因的检出率也不一致。不同地区检测到的氨基糖苷类钝化酶的种类和所占比例的差异,在很大程度上与该地区临床用药习惯有关。如文献报道^[22-24],在临床分离的肠杆菌和克雷伯菌中,AAC(3)与AAC(6′)是导致日本和智利分离菌对氨基糖苷类抗生素耐药的主要原因;在美国常见的钝化酶为ANT(2″)和AAC(2);捷克、斯洛伐克是ANT(2″)和AAC(3);而希腊耐药菌中AAC(6)-I的检出率很高。而本试验的结果也符合上述说法,如在峨眉地区检测到的氨基糖苷类钝化酶以ANT(3′′)-Ia为主,在绵阳地区则以AAC(3)-IIa为主。可见,同是氨基糖苷类耐药,同是由钝化酶修饰引起,但是结果却相差很大。

综上所述,本研究对我国西南地区鸭源致病性大肠杆菌的耐药资料的积累具有一定的现实意义,对于鸭源致病性大肠杆菌对氨基糖苷类药物的耐药的控制具有一定的借鉴意义。

参考文献:

- [1] 于学辉,程安春,汪铭书,等.鸭源致病性大肠杆菌的血清型鉴定及其相关毒力基因分析[J].畜牧兽医学报,2008,39(1):53-59.
- [2] 于学辉,程安春,汪铭书,等.鸭致病性大肠杆菌外膜蛋白型研究[J].畜牧兽医学报,2009,40(4):554-560.
- [3] KOTRA L P, HADDAD J, MOBASHERY S. Aminoglycosides; perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance[J]. *Antimicrob A gents Chemother*, 2000, 44: 3249-3256.
- [4] 于学辉,张焕容,汤承,等.我国西南地区鸭病原性大肠杆菌耐药性检测[J].养禽与禽病防治,2008,(4):4-8.
- [5] LIOU G F, YOSHIZAWA S, COURVALIN P, et al. Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens

- [J]. *J Mol Biol*, 2006, 359(2):358-364.
- [6] 李玉红,邹全明.氨基糖苷类钝化酶耐药机制的研究进展[J].国外医学·药学分册,2005,32(3):199-203.
- [7] 陈国忠,汪一萍,应建飞,等.大肠埃希菌 ICU 分离株发现 aadA4/5、aph(3')2-I 型氨基糖苷类修饰酶基因[J].中华医院感染学杂志,2009,19(19):2535-2538.
- [8] GEORGE A M. Multidrug resistance in enteric and other Gram-negative bacteria [J]. *FEMS Microbiol Lett*,1996,139(1):1-10.
- [9] SHAW K J, RATHER P N, HARE R S, et al. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes [J]. *Microbiol Rev*,1993,57(1):138-163.
- [10] 汤景元,王红宁,张鹏举,等.95 个猪场大肠杆菌耐药表型及氨基糖苷类药物耐药基因型调查[J].畜牧兽医学报,2008,39(4):472-477.
- [11] 张安云,王红宁,周万蓉,等.野生动物分离菌耐药基因多重 PCR 检测及序列分析[J].畜牧与兽医,2007,39(3):1-3.
- [12] 张璇,汤细彪,吴斌,等.肠外致病性大肠埃希菌多重耐药性及氨基糖苷类耐药基因分析[J].中国抗生素杂志,2009,34(8):498-504.
- [13] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test s for bacteria isolated from animal approved standard[M]. 2nd ed. Wayne, Pa. NCCLS,2003; M31-A2.
- [14] DOMÍGUEZ E, ZARAZAGA M, SÁENZ Y, et al. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from healthy children in Spain [J]. *Microb Drug Resist*, 2002, 8(4):321-327.
- [15] NEONAKIS I, GIKAS A, SCOULICA E, et al. Evolution of aminoglycoside resistance phenotypes of four Gram-negative bacteria; an 8-year survey in a University Hospital in Greece[J]. *Int J Antimicrob Agents*,2003, 22(5):526-531.
- [16] MATHEW A G, ARNETT D B, CULLEN P, et al. Characterization of resistance patterns and detection of apramycin resistance genes in *Escherichia coli* isolated from swine exposed to various environmental conditions [J]. *Int J Food Microbiol*,2003,89(1):11-20.
- [17] 陈琳,刘健华,张俊丰,等.猪肠道菌氨基糖苷类药物耐药基因分析[J].畜牧兽医学报,2009,40(7):1088-1096.
- [18] 金文杰,秦爱建,郑志明,等.禽致病性大肠杆菌中四种抗氨基糖苷类药物耐药基因的分子流行病学调查[J].中国预防兽医学报,2007,29(5):401-404.
- [19] MILLER G H, SEBATALLI F J, NAPLES L, et al. The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and the role of isepamicin a new broad spectrum aminoglycoside [J]. *J Chemother*, 1995, 2: 31-44.
- [20] 蔡培泉,王春新,赵琪,等.革兰阴性杆菌 9 种氨基糖苷类修饰酶基因的检测[J].现代实用医学,2004,16(6):326-328.
- [21] 刘丁,陈萍,李玉红,等.多重 PCR 检测鲍曼不动杆菌氨基糖苷乙酰转移酶相关基因[J].第三军医大学学报,2006,28(23):2320-2322.
- [22] NAVAROVÁ J, KETTNER K, KRČMÉRY V, et al. Aminoglycoside resistance patterns in clinical isolates of *E. coli* and *Klebsiella* sp from Czechoslovakia and the United States[J]. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*,1989,33(4):477-486.
- [23] MILLER G H, SEBATALLI F J, NAPLES L, et al. The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and the role of isepamicin a new broad spectrum aminoglycoside [J]. *J Chemother*, 1995,2: 31-44.
- [24] DOI Y, WACHINO J, YAMANE K, et al. Spread of novel aminoglycoside resistance gene aac(6)-Iad among *Acinetobacter* clinical isolates in Japan [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(6): 2075-2080.

(编辑 白永平)