

论著

食源性变形杆菌氨基糖苷类修饰酶基因及 16S rRNA 甲基化酶基因研究

郭玉梅¹,张慧贤²,秦丽云¹,剧慧栋¹

(1. 石家庄市疾病预防控制中心微生物检验所,河北 石家庄 050011;

2. 河北省血液中心检验科,河北 石家庄 050011)

摘要:目的 了解食源性变形杆菌的氨基糖苷类耐药基因情况。方法 收集 2011—2014 年石家庄市售各类食品中分离到的对阿米卡星和庆大霉素至少有一种耐药的变形杆菌 124 株,用 PCR、测序和基因库在线比对方法分析 6 种氨基糖苷类修饰酶基因与 3 种 16S rRNA 甲基化酶基因。结果 124 株变形杆菌中氨基糖苷类修饰酶耐药基因 *aacC2*、*aacA4*、*aadA1* 和 *aphA6* 的检出率分别为 95.2% (118/124)、80.6% (100/124)、73.4% (91/124) 和 5.6% (7/124);16S rRNA 甲基化酶耐药基因 *rmtB* 检出率为 87.1% (108/124)。*aacC1*、*aadB*、*armA* 和 *rmtC* 基因均未检出。结论 *aacC2* 型氨基糖苷类修饰酶基因与 *rmtB* 型 16S rRNA 甲基化酶基因流行是食源性变形杆菌对氨基糖苷类抗生素耐药的重要原因。

关键词:变形杆菌;氨基糖苷类;耐药基因;氨基糖苷类修饰酶;16S rRNA 甲基化酶;食源性致病菌

中图分类号:R155;Q93-3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)06-0611-03

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.06.002

Epidemiological study of the genes conferring aminoglycoside and 16S rRNA methylase in foodborne *Proteus*

GUO Yu-mei, ZHANG Hui-xian, QIN Li-yun, JU Hui-dong

(Shijiazhuang Center for Disease Control and Prevention, Hebei Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective To understand the prevalence of genes conferring aminoglycoside resistance in foodborne strains of *Proteus*. **Methods** 124 strains of *Proteus* were collected from food samples of markets in Shijiazhuang from 2011 to 2014, which resisted toamikacin (AK) or/and gentamicin (CN). 6 kinds of aminoglycoside modifying enzyme genes (AMEs) and 3 kinds of 16S rRNA methylase genes were analyzed by PCR. **Results** The prevalence of the AMEs genes, *aacC2*, *aacA4*, *aadA1* and *aphA6*, was 95.2% (118/124), 80.6% (100/124), 73.4% (91/124) and 5.6% (7/124) respectively. The prevalence of 16S rRNA methylase gene *rmtB* was 87.1% (108/124). Other genes conferring aminoglycoside resistance, such as *aacC1*, *aadB*, *armA* and *rmtC* gene were not detected. **Conclusion** The spread of AMEs gene *aacC2* and 16S rRNA methylase gene *rmtB* plays an important role in aminoglycosides resistance of foodborne *Proteus*.

Key words: *Proteus*; aminoglycosides; resistance gene; aminoglycoside modifying enzyme; 16S rRNA methylase; foodborne pathogenic bacteria

变形杆菌属 (*Proteus*) 为条件致病菌,包括普通变形杆菌、奇异变形杆菌、产粘变形杆菌和潘氏变形杆菌,其中奇异变形杆菌和普通变形杆菌是引起原发性或继发性泌尿道感染的主要病原菌,亦可从创伤、烧伤或呼吸道感染中分离,是引起医院感染的主要病原菌;潘氏变形杆菌偶尔可引起医源性感染。在食品卫生学中,变形杆菌是引起食物中毒的主要病原菌之一,污染食物后,经过大量繁殖,食用后可引起胃肠炎。氨基糖苷类药物

由于其抗菌谱广、抗菌作用强,已被广泛应用于各类细菌感染的临床治疗,其作用机制是与细胞 30S 核糖体亚单位的 16S rRNA 解码区的 A 部位结合,抑制细菌蛋白质的合成,但是,随着抗生素的大量应用,细菌对氨基糖苷类药物的耐药越来越严重。产氨基糖苷类修饰酶和 16S rRNA 甲基化酶是近年来报道的介导氨基糖苷类高水平耐药的主要机制^[1-5]。为了解食源性变形杆菌氨基糖苷类抗菌药物的基因型分布和流行情况,本研究对 2011—2014 年石家庄市售食品中分离的 124 株变形杆菌进行了 6 种氨基糖苷类修饰酶基因和 3 种 16S rRNA 甲基化酶基因检测。

收稿日期:2015-10-20

基金项目:石家庄市科学技术研究与发展指导计划(121461733)

作者简介:郭玉梅 女 主管检验技师 研究方向为食品微生物

E-mail:guokexin2199@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

收集2011—2014年分离自食品样品对氨基糖苷类抗生素阿米卡星和(或)庆大霉素耐药的124株变形杆菌。应用全自动细菌鉴定药敏系统对菌株进行系统生化鉴定和初步药敏试验,K-B药敏纸片法作为补充确证试验,药敏结果根据CLSI 2009^[6]进行判定。

1.1.2 主要仪器与试剂

Phoenix 100全自动细菌鉴定及药敏系统、NMIC/ID-4药敏鉴定板均购自美国BD,veriti型PCR扩增仪(美国AB),xcel型全自动毛细管电泳仪(德国Qiagen),抗生素K-B药敏纸片(英国OXOID)。

三糖铁琼脂培养基、细菌筛选(SS)琼脂培养基均购自北京陆桥技术有限责任公司,M-H培养基(英国OXOID);Premix TaqTM酶、PCR引物均购自大连宝生物工程有限公司,测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细菌DNA模板的制备

刮取适量纯培养菌落至200 μl无菌纯水中制成菌悬液;100℃煮沸10 min,立即冰浴10 min;12 000 r/min离心10 min后取上清液100 μl作为DNA模板,-20℃保存备用。

1.2.2 PCR反应体系与反应条件^[7-8]

PCR反应体系(30 μl):Premix TaqTM酶15 μl,上、下游引物各1 μl,模板DNA 1 μl,无菌纯水12 μl;PCR反应条件为:95℃预变性5 min,95℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸2 min,30个循环,72℃最终延伸5 min,变形杆菌氨基糖苷类抗生素耐药基因序列合成引物见表1。

1.2.3 PCR产物分析

将毛细管电泳出现阳性条带的PCR产物纯化后送上海生工生物工程技术服务有限公司双向测序,结果在GenBank进行在线比对。

1.2.4 药物敏感性试验

采用BD Phoenix 100全自动细菌鉴定及药敏系统进行药物敏感性试验,K-B纸片法作为补充。

1.3 统计学分析

采用B×C列联表进行卡方检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氨基糖苷类修饰酶和16S rRNA甲基化酶基因检测结果

氨基糖苷类修饰酶基因 *aacC2*、*aacA4*、*aadA1*、

表1 PCR引物及序列

基因	引物名称	序列(5'-3')	PCR产物大小/bp
<i>aacA4</i>	<i>aacA4</i> -F	ATGACTGA CATGACCTTGCG	540
	<i>aacA4</i> -R	TTAGGCATCACTGCGGTTCG	
<i>aacC1</i>	<i>aacC1</i> -F	ATGGGCATCATTGCGACATGTAGG	873
	<i>aacC1</i> -R	TTAGGTGGCGGTACTIONTGGGTC	
<i>aacC2</i>	<i>aacC2</i> -F	ATGCATACGGGAAAGGCAATAAC	861
	<i>aacC2</i> -R	CTAACCGGAAGGCTCGCAAG	
<i>aadA1</i>	<i>aadA1</i> -F	ATGAGGGAAGCGGTGATCG	792
	<i>aadA1</i> -R	TTATTGCGGACTACCTTGGTG	
<i>aadB</i>	<i>aadB</i> -F	ATGGACACAACGCAGGTCGC	534
	<i>aadB</i> -R	TTAGGCCGCATATCGCGACC	
<i>aphA</i>	<i>aphA6</i> -F	ATGGAATTGCCCAATATTATTC	781
	<i>aphA6</i> -R	TCAATTCAATTCATCAAGTTTA	
<i>armA</i>	<i>armA</i> -F	AGGTTGTTCCATTCTGAG	591
	<i>armA</i> -R	TCTCTTCATCCCTCTCC	
<i>rmtB</i>	<i>rmtB</i> -F	CCCAAACAGACCGTAGAGGC	585
	<i>rmtB</i> -R	CTCAAACCTCGCGGGCAAGC	
<i>rmtC</i>	<i>rmtC</i> -F	CGCGGATCCAGTGTATGAAAAATGTCTGG	1 001
	<i>rmtC</i> -R	CGGGGTACCGGTGTGTAGAAATTGCCTT	

*aphA6*和16S rRNA甲基化酶基因 *rmtB*均有不同程度的检出,*aacC2*和 *rmtB*阳性率较高。*aacC1*、*aadB*、*armA*和 *rmtC*基因均未检出。氨基糖苷类耐药基因检测结果见表2。对6种基因的PCR扩增产物进行测序分析,结果与GenBank中已知的序列进行BLASTn比对分析,同源性均 $\geq 99.0\%$

表2 124株食源性变形杆菌氨基糖苷类耐药基因结果

Table 2 Prevalence of aminoglycoside resistant genes in 124 strains of *Proteus* isolated from food

类型	基因名称	阳性菌株数/株	检出率/%
氨基糖苷类修饰酶	<i>aacA4</i>	100	80.6(100/124)
	<i>aacC1</i>	0	0.0(0/124)
	<i>aacC2</i>	118	95.2(118/124)
	<i>aadA1</i>	91	73.4(91/124)
	<i>aadB</i>	0	0.0(0/124)
	<i>aphA6</i>	7	5.6(7/124)
16S rRNA甲基化酶	<i>armA</i>	0	0.0(0/124)
	<i>rmtB</i>	108	87.1(108/124)
	<i>rmtC</i>	0	0.0(0/124)

2.2 氨基糖苷类抗生素耐药谱及相关耐药基因流行模式

124株食源性变形杆菌中,氨基糖苷类耐药基因流行模式以 *aacA4* + *aacC2* + *aadA1* + *rmtB* 存在为主,构成比为57.3%,其次是 *aacA4* + *aacC2* + *rmtB* 模式,构成比为11.3%,另有4株菌未检出以上耐药基因。结合耐药谱,*aphA6*基因在对庆大霉素耐药的菌株中的阳性率为0.9%(1/115),在对庆大霉素和阿米卡星均耐药的菌株中阳性率为66.7%(6/9),二者的检出率差异有统计学意义($P < 0.05$);其余耐药基因在不同耐药谱的菌株中阳性

率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 氨基糖苷类修饰酶和 16S rRNA 甲基化酶基因
流行模式分布 ($n = 124$)

Table 3 Distribution composition rate of aminoglycoside
modifying enzyme and 16S rRNA methylase genes

耐药谱	耐药基因型	株数 /株	构成比 /%
庆大霉素	<i>aacA4 + aacC2 + aadA1 + rmtB</i>	71	57.3
	<i>aacA4 + aacC2 + aadA1 + aphA6 + rmtB</i>	1	0.8
	<i>aacA4 + aacC2 + aadA1</i>	4	3.2
	<i>aacA4 + aacC2</i>	3	2.4
	<i>aacC2</i>	1	0.8
	<i>aacC2 + aadA1</i>	2	1.6
	<i>aacC2 + aadA1 + rmtB</i>	7	5.6
	<i>aacC2 + rmtB</i>	6	4.8
	<i>aacA4 + rmtB</i>	1	0.8
	<i>rmtB</i>	1	0.8
	<i>aacA4 + aacC2 + rmtB</i>	14	11.3
全阴性		4	3.2
庆大霉素 + 阿米卡星	<i>aacA4 + aacC2 + aadA1 + aphA6 + rmtB</i>	4	3.2
	<i>aacA4 + aacC2 + aadA1 + rmtB</i>	1	0.8
	<i>aacA4 + aacC2 + rmtB</i>	1	0.8
	<i>aacC2 + aphA6</i>	2	1.6
	<i>aacC2 + aadA1 + rmtB</i>	1	0.8

3 讨论

细菌对氨基糖苷类抗生素的耐药机制较为复杂, 最主要的耐药机制是耐药菌株产生氨基糖苷类抗生素修饰酶 (AMEs)。AMEs 根据修饰活性可分 3 类, 即磷酸转移酶 (*aph* 基因编码)、腺苷酰基转移酶 (*aad* 基因编码) 和乙酰转移酶 (*aac* 基因编码)。此外, 氨基糖苷类耐药新机制为 16S rRNA 甲基化酶, 该酶能使药物作用靶位甲基化, 导致甲基化后与氨基糖苷类药物亲和力和下降, 可以使细菌对氨基糖苷类药物产生高度耐药和广泛耐药。*rmtB* 型 16S rRNA 甲基化酶基因可从耐药的阴沟肠杆菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌及其他肠杆菌科细菌中检出^[4,9-10]。

本研究对 124 株食源性变形杆菌作了 6 种氨基糖苷类修饰酶和 3 种 16S rRNA 甲基化酶基因检测, 结果发现 *aacC2* 型氨基糖苷类修饰酶和 *rmtB* 型 16S rRNA 甲基化酶为食源性变形杆菌的流行型别。在菌株中, 3 类氨基糖苷修饰酶均有检出, 但以乙酰转移酶 *aacC2* 和 *aacA4* 基因型携带率最高, 分别占 95.2% 和 80.6%, 其次是腺苷酰基转移酶 *aadA1* 基因型, 占 73.4%, 磷酸转移酶 *aphA6* 基因型仅占 5.6%。提示食品中变形杆菌对氨基糖苷类抗生素以产生使游离羟基乙酰化和核苷化的转移酶为主要耐药机制, 尤其是磷酸转移酶 *aphA6* 基因为变形杆菌对阿米卡星耐药的主要机制。本研究中食源性变形杆菌携带 *rmtB* 型 16S rRNA 甲基化酶在国内尚属首次报道, 其携带

率高达 87.1%, 远远高于临床资料报道的阴沟肠杆菌 (8.6%)、大肠埃希菌 (12.3%)、肺炎克雷伯菌 (1.0%) 携带率^[4,9], 但低于文献报道的泛耐药铜绿假单胞菌携带率 (100%)^[10]。16S rRNA 甲基化酶 *armA* 型在除阴沟肠杆菌、沙门菌、志贺菌和肺炎克雷伯菌等均有报道, 在变形杆菌中尚未见报道。奇异变形杆菌中 *rmtC* 型 16S rRNA 甲基化酶基因早在 2006 于日本首次报道^[11], 本研究中未检出此基因型, 国内也鲜见关于变形杆菌的此基因型相关报道。

本研究在一定程度上反映了食品中变形杆菌对氨基糖苷类耐药的严重性, 尤其是质粒介导的 16S rRNA 甲基化酶在食源性变形杆菌中处于较高的流行水平, 应引起关注, 重视这一耐药现象, 加强对这一类耐药菌株的监控, 以防止耐药菌株广泛传播。

参考文献

- [1] 周颖杰, 王明贵. 质粒介导氨基糖苷类抗生素新耐药机制: 16S rRNA 甲基化酶[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(2): 155-159.
- [2] 邢雨丹, 糜祖煌, 徐鑫鑫, 等. 36 株多重耐药鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物耐药基因的流行病学研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(6): 442-445.
- [3] 刘鹏, 许小敏, 许兆军. 产气肠杆菌氨基糖苷类药物获得性耐药基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(15): 3645-3647.
- [4] 胡方兴, 何力自, 梁伟. 氨基糖苷类抗生素耐药肠杆菌科细菌 16S rRNA 甲基化酶基因研究[J]. 实用预防医学, 2015, 22(5): 617-620.
- [5] 王娜, 韩博, 郝玲, 等. 呼吸道感染肺炎克雷伯菌氨基糖苷类修饰酶基因分布及耐药性检测[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(4): 359-362, 380.
- [6] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement [Z]. USA: CLSI, 2009.
- [7] Hujer K M, Hujer A M, Hulten E A, et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(12): 4114-4123.
- [8] MA L, 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]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(1): 104-111.
- [9] Wachino J, Yamane K, Shibayama K, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, *rmtC*, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(1): 178-184.
- [10] 吴琼, 韩立中, 孙景勇, 等. 氨基糖苷类耐药的肠杆菌科细菌 16S rRNA 甲基化酶基因研究[J]. 检验医学, 2014, 29(5): 528-534.
- [11] 屠涌涛, 肖美英, 糜祖煌. 泛耐药铜绿假单胞菌氨基糖苷类修饰酶与 16S rRNA 甲基化酶基因检测研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(6): 1228-1230.