

孙凡, 苏宇航, 董洪燕, 等. 鸭源大肠杆菌中 16S rRNA 甲基化酶 *rmtB* 基因的分布、耐药性及传播特性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (10): 76-83.

SUN F, SU Y H, DONG H Y, et al. Analysis of distribution, drug resistance and transmission characteristics of 16S rRNA methyltransferase gene of duck-derived *Escherichia coli* carrying *rmtB* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (10): 76-83.

## 鸭源大肠杆菌中 16S rRNA 甲基化酶 *rmtB* 基因的分布、 耐药性及传播特性分析

孙凡<sup>1,2,3#</sup>, 苏宇航<sup>1#</sup>, 董洪燕<sup>1,2,3</sup>, 吴植<sup>1,2,3</sup>, 谢军<sup>1,2,3</sup>, 周庆康<sup>1,2,3</sup>,  
郭长明<sup>1,2,3</sup>, 封琦<sup>1,2,3</sup>, 王琦<sup>1,2,3</sup>, 朱善元<sup>1,2,3\*</sup>, 于圣青<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300;

2. 江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室, 江苏 泰州 225300;

3. 江苏现代畜牧与新兽药工程技术中心, 江苏 泰州 225300)

**摘要:** 通过对江苏省养殖场鸭源大肠杆菌氨基糖苷类抗生素的耐药基因携带以及耐药谱现状进行研究, 旨在为鸭大肠杆菌病的防治、耐药菌株的快速监测和合理用药提供指导。选取 2020—2024 年分离自江苏部分地区水禽养殖场的 60 株鸭源大肠杆菌, PCR 检测革兰阴性菌中介导高水平氨基糖苷类抗生素耐药的 16S rRNA 甲基化酶基因的流行情况, 并进行药物敏感性试验; 对 16S rRNA 甲基化酶阳性基因菌株进行接合试验和稳定性试验, 研究其是否具有水平传播的能力。PCR 鉴定结果显示, 从泰州鸭的肝脏中分离的大肠杆菌 TZ23YGE60 携带 *rmtB* 基因 (1/60, 1.67%), 其他 16S rRNA 甲基化酶基因未检测到; 药物敏感性试验结果表明, 分离菌株 TZ23YGE60 呈现严重的多重耐药性, 耐药谱为氨苄西林-阿莫西林-甲氧苄氨嘧啶-头孢拉定-头孢噻吩-头孢曲松-庆大霉素-阿米卡星-链霉素-卡那霉素-四环素-磺胺异噁唑-复方新诺明-环丙沙星-诺氟沙星-利福平-洛美沙星-红霉素-克林霉素-新霉素-氯霉素-氟苯尼考; 接合试验结果表明, 受体菌接合频率为  $2.34 \times 10^{-5} \sim 1.58 \times 10^{-1}$ , 37 °C 时接合效率最高; 稳定性试验结果显示质粒稳定存在。综上, 鸭源大肠杆菌 TZ23YGE60 具有水平传播的能力; 16S rRNA 甲基化酶耐药菌株的出现, 严重影响了氨基糖苷类药物作为治疗革兰阴性菌的常用药物抗感染治疗的效果, 限制了临床细菌感染治疗的药物选择, 且江苏地区鸭场耐药现象严重, 临床需要合理使用抗菌药物。

**关键词:** 鸭源; 大肠杆菌; 16S rRNA 甲基化酶基因; 耐药性

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)10-0076-08

## Analysis of distribution, drug resistance and transmission characteristics of 16S rRNA methyltransferase gene of duck-derived *Escherichia coli* carrying *rmtB*

SUN Fan<sup>1,2,3#</sup>, SU Yuhang<sup>1#</sup>, DONG Hongyan<sup>1,2,3</sup>, WU Zhi<sup>1,2,3</sup>, XIE Jun<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Qingkang<sup>1,2,3</sup>,  
GUO Changming<sup>1,2,3</sup>, FENG Qi<sup>1,2,3</sup>, WANG Qi<sup>1,2,3</sup>, ZHU Shanyuan<sup>1,2,3\*</sup>, YU Shengqing<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for High-Tech Research and Development of Veterinary Biopharmaceuticals,  
Taizhou 225300, China;

3. Jiangsu Modern Animal Husbandry and New Veterinary Drug Engineering Technology Center,  
Taizhou 225300, China)

**Abstract:** This study was to investigate the carriage of aminoglycoside antibiotic resistance genes and the current status of the antimicrobial resistance spectrum in *Escherichia coli* isolated from ducks in breeding farms in Jiangsu Province, and to provide guidance for prevention and treatment of duck colibacillosis, rapid monitoring of resistant strains, and rational drug use. Sixty strains of duck-origin *Escherichia coli* isola-

收稿日期: 2024-11-26; 修回日期: 2025-07-23

基金项目: 江苏现代农业产业技术体系建设项目 (JATS [2023] 351)

第一作者: 孙凡, 女, 硕士, 助教; 苏宇航, 女, 在读专科生。#共同第一作者

\*通信作者: 朱善元, 博士, 教授, 主要从事水禽疫病防控研究, E-mail: jstzsy@126.com; 于圣青, 博士, 研究员, 主要从事水禽重要病原细菌的分子致病机制以及疫苗研究, E-mail: yus@shvri.ac.cn。

ted from the breeding farms between 2020 and 2024 were studied. PCR was used to detect the prevalence of 10 genes, including the 16S rRNA methylase gene *rmtB*, which mediates high-level aminoglycoside resistance in Gram-negative bacteria. Drug susceptibility testing was also conducted. Subsequently, conjugation experiments and stability tests were performed on *rmtB*-positive strains to investigate their ability for horizontal transmission. The PCR results showed that TZ23YGE60, isolated from the liver of a duck in Taizhou, carried the *rmtB* gene (1/60, 1.67%), while other 16S rRNA methylase genes were not detected. The drug susceptibility test revealed that the isolated strain TZ23YGE60 exhibited severe multidrug resistance, with a resistance spectrum including ampicillin, amoxicillin, trimethoprim, cephaloridine, cephalothin, ceftriaxone, gentamicin, ampicillin, streptomycin, kanamycin, tetracycline, sulfisoxazole, cotrimoxazole, ciprofloxacin, norfloxacin, rifampin, lomefloxacin, erythromycin, clindamycin, neomycin, chloramphenicol, and florfenicol. The conjugation experiments showed that the conjugation frequency of the recipient bacteria ranged from  $2.34 \times 10^{-5}$  to  $1.58 \times 10^{-1}$ , with the highest conjugation efficiency at 37 °C. The stability test demonstrated that the plasmid was stably maintained. The duck-origin TZ23YGE60 had the ability for horizontal transmission. The emergence of 16S rRNA methylase-resistant strains had severely affected the efficacy of aminoglycosides as commonly used antimicrobial agents for the treatment of Gram-negative bacterial infections, limiting the choice of drugs for clinical bacterial infection treatment. The problem of antimicrobial resistance is severe in duck farms in Jiangsu Province, and rational use of antimicrobial agents is required in clinical practice.

**Keywords:** duck source; *Escherichia coli*; 16S rRNA methylase gene; drug resistance

大肠杆菌是鸭最常见的病原菌之一，感染死亡率可达50%。随着抗生素的广泛使用，耐药谱越来越广，耐药现象非常严重，且呈多重耐药性<sup>[1-2]</sup>。氨基糖苷类药物（aminoglycoside antibiotics, AGAs）由于其高效、性质稳定、抗菌谱广、杀菌效果好等特点，一直作为治疗常用药物，但随着其在兽医和人医临床上的广泛应用，大肠杆菌等革兰阴性菌对其耐药性迅速增强。

氨基糖苷类药物的耐药机制主要有4种，而16S rRNA甲基化酶是由质粒介导的一种新的耐药机制，主要作用于30S核糖体，经甲基化酶修饰后，造成高水平氨基糖苷类抗生素耐药<sup>[3]</sup>。2003年，首次在日本临床分离的铜绿假单胞菌中发现16S rRNA甲基化酶RmtA<sup>[4]</sup>，由*rmtA*基因编码。现已发现10种16S rRNA甲基化酶基因，包括：*armA*、*rmtA*、*npmA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD*、*rmtE*、*rmtF*、*rmtG*和*rmtH*<sup>[5-9]</sup>。我国水禽源大肠杆菌主要流行*rmtB*和*armA*基因，常位于质粒或转座子上，通过接合或者转化进行水平传播<sup>[10]</sup>，且与可移动基因元件插入序列等相关<sup>[11]</sup>。

2020—2024年，课题组在江苏部分地区水禽养殖场进行采样，共分离鉴定出60株大肠杆菌。通过对分离菌株进行耐药性、16S rRNA甲基化酶基因的检测和耐药基因传播机制的初步研究，旨在为临床治疗和预防大肠杆菌病提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料来源

60份病料均为2020—2024年间收集自泰州、徐州、南京、淮安、盐城、南通等地区共15家养殖场的病死鸭脏器，相关信息见表1。

表1 不同年份菌株来源

| 年份   | 心 | 肝  | 脾 | 肺 | 肾 | 脑 | 肠道内容物 | 合计 |
|------|---|----|---|---|---|---|-------|----|
| 2020 | 2 | 7  | 1 | 1 | 2 | 0 | 0     | 13 |
| 2021 | 3 | 7  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0     | 10 |
| 2022 | 2 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0     | 15 |
| 2023 | 2 | 5  | 1 | 0 | 0 | 2 | 1     | 11 |
| 2024 | 3 | 8  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0     | 11 |

### 1.2 菌株来源

质控菌大肠杆菌 ATCC<sup>®</sup> 25922 和耐链霉素的受体菌大肠杆菌 C600，由本实验室保存。

### 1.3 主要试剂和仪器

麦康凯琼脂、MH琼脂和琼脂粉购自北京陆桥技术股份有限公司；LB肉汤、BPW增菌液购自海博生物技术有限公司；抗菌药物药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司；阿米卡星（655 U/mg）和链霉素（726 U/mg）购自中国食品药品检定研究所；dNTP Mixture、DNA Marker购自TaKaRa公司；琼脂糖购自西班牙Biowest公司。

-80 °C超低温冰箱（型号：8940086V），各种微量移液器（型号：F1系列），离心机（型号：MTX-150）购自美国Thermo公司；摇床（型号：SHAKE SCS-24）购自上海离心机机械有限公司；PCR仪（型号：T100），凝胶成像系统（型号：GelDoc 2000）购自美国BIO-RAD公司。

### 1.4 细菌分离、纯化和鉴定

将病变脏器按1:10接种于BPW增菌液中，37 °C增菌18~20 h；三区划线于麦康凯平板，37 °C培养16~24 h；挑取疑似单菌落，划线于麦康凯平板进行纯化；挑取纯化单菌落划线于LB平板，37 °C培养16~24 h，待用。

DNA 制备：挑取纯化后的单菌落划线于 LB 平板上，37 ℃ 过夜培养。刮取适量菌苔用 500 μL 灭菌 0.85% 生理盐水悬浮，100 ℃ 金属浴 15 min，12 000 r/min 离心 5 min，收集上清液用作模板，-20 ℃ 保存备用。

引物合成和 PCR 反应：大肠杆菌种属鉴定引物序列参照文献 [12]，*phoA*-F，5'-CTTTGGTCGTA-AAATAAGGCG-3'；*phoA*-R，5'-TGCCCAAAG-CAGAGAGATTC-3'，由生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系总体积 25 μL：DNA 模板 1 μL，上下游引物各 1 μL，dNTPs Mixture 11 μL，灭菌双蒸水 11 μL。PCR 反应程序如下：94 ℃ 5 min；94 ℃ 40 s，55 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，30 个循环；72 ℃ 10 min。

结果判定：取 10 μL PCR 扩增产物，进行 1.0%

琼脂糖凝胶电泳，同时设立阴性对照，在 GelDoc 2000 凝胶成像系统下观察结果。

### 1.5 药物敏感性试验

以大肠杆菌 ATCC<sup>®</sup>25922 菌株作为药敏质控菌，参照 2019 年临床和实验室标准协会 (CLSI) 推荐的 K-B 纸片扩散法进行 28 种药物的药敏试验。

### 1.6 16S rRNA 甲基化酶基因的检测

参照相关文献设计 10 个 16S rRNA 甲基化酶基因引物 (表 2)，由生工生物科技有限公司合成。25 μL PCR 反应体系同 1.4。PCR 反应程序如下：94 ℃ 5 min；94 ℃ 40 s，退火 (温度见表 2) 1 min，72 ℃ 1 min，30 个循环；72 ℃ 10 min。PCR 产物送至擎科生物有限公司 (南京) 测序，结果提交至 NCBI 进行 BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 比对分析。

表 2 16S rRNA 甲基化酶基因的引物序列

| 引物名称           | 引物序列 (5'→3')            | 产物大小/bp | 退火温度/℃ | 参考文献 |
|----------------|-------------------------|---------|--------|------|
| <i>armA</i> -F | CAATCAGGGGCAGTTATCA     | 528     | 55     | [13] |
| <i>armA</i> -R | CCCTATAACCTTCGAATC      |         |        |      |
| <i>rmtA</i> -F | CTAGCGTCCATCCTTTCTCTC   | 635     | 55     | [13] |
| <i>rmtA</i> -R | TTGCTTCCATGCCCTTGCC     |         |        |      |
| <i>rmtB</i> -F | ACATCAACGATGCCCTCAC     | 724     | 55     | [13] |
| <i>rmtB</i> -R | AAGTTCTGTTCCGATGGTC     |         |        |      |
| <i>rmtC</i> -F | CGAAGAAGTAACAGCCAAAG    | 711     | 55     | [13] |
| <i>rmtC</i> -R | ATCCCAACATCTCTCCCACT    |         |        |      |
| <i>rmtD</i> -F | CGGCACGGATTGGGAAGC      | 401     | 55     | [13] |
| <i>rmtD</i> -R | CGGAAACGATGCGACGAT      |         |        |      |
| <i>rmtE</i> -F | ATGAATATTGATGAAATGGTTGC | 207     | 55     | [14] |
| <i>rmtE</i> -R | TGATTGATTTCTCCGTTTTTG   |         |        |      |
| <i>rmtF</i> -F | ATTCATCTGGGCTGCGTGCGAC  | 338     | 72     | [15] |
| <i>rmtF</i> -R | ACCAGCTCGTCCGACACCGTAA  |         |        |      |
| <i>rmtG</i> -F | CGTGTATGCGCGTCTGTTGGGT  | 420     | 71     | [15] |
| <i>rmtG</i> -R | ACGGTGCCTTCGATTGCCATT   |         |        |      |
| <i>rmtH</i> -F | ACAAAAAGCCCAAGCAGCGGCT  | 259     | 71     | [15] |
| <i>rmtH</i> -R | CGGTGCAGCATCAGCGGGTTTA  |         |        |      |
| <i>npmA</i> -F | AGGGCTATCTAATGTGGTG     | 528     | 52     | [16] |
| <i>npmA</i> -R | TATTTCCGCTTCTTCGTAT     |         |        |      |

### 1.7 接合试验

以携带 *rmtB* 基因的大肠杆菌分离株作为供体菌，阿米卡星抗性平板浓度为 32 μg/mL，大肠杆菌 C600 作为受体菌，链霉素抗性平板浓度为 3 000 μg/mL，在相应抗性平板上三区划线，37 ℃ 培养 24 h，分别挑取单菌落接种于 LB 肉汤，37 ℃ 过夜培养；按

1 : 100 扩大培养供体菌和受体菌，37 ℃ 振荡培养至菌液  $OD_{600} = 0.5$  左右；按照 1 : 4 取供、受体菌液混合，分别于 30 ℃、37 ℃ 和 42 ℃ 静置共培养 16 ~ 20 h；将上述共培养的菌液 4 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，加入 200 μL 的 PBS 进行混匀，然后进行  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  的稀释梯度；取上述菌液 50 μL 挂

板于含阿米卡星 (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和链霉素 (3 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 双抗性的麦康凯平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 18~24 h。

### 1.8 接合子鉴定

在含阿米卡星 (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和链霉素 (3 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的双抗性麦康凯平板上呈光滑、边缘有不规则锯齿状的红色菌落, 初步筛选为疑似接合子; 将疑似菌落再次接种在含阿米卡星 (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和链霉素 (3 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的双抗麦康凯平板上进行确认。对抗性平板上长出的菌落进行 *rmtB* 基因的 PCR 检测, 确定为携带 *rmtB* 基因的接合子, 冻存于 -80  $^{\circ}\text{C}$  备用; 参照 1.5 进行药敏试验。

### 1.9 接合频率的计算

挑取供体菌 (携带 *rmtB* 基因的大肠杆菌分离株) 和受体菌 (大肠杆菌 C600) 的单菌落接种于 LB 肉汤中, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 16 h, 每株菌做 3 个平行; 按 1 : 100 扩大培养供体菌和受体菌, 并分别在 30  $^{\circ}\text{C}$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  和 42  $^{\circ}\text{C}$  条件下振荡培养, 使菌液的  $OD_{600}=0.5$  左右; 将供体菌和受体菌按照 1 : 1 体积比混匀, 在 30  $^{\circ}\text{C}$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  和 42  $^{\circ}\text{C}$  条件下静置培养 16~20 h; 将上述细菌共培养液以 4 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液并加入 200  $\mu\text{L}$  灭菌生理盐水, 重新悬浮菌液, 按照 10 倍稀释比从  $10^0$  稀释至  $10^{-7}$ , 分别吸取  $10^{-2}$ ~ $10^{-4}$  的菌液 100  $\mu\text{L}$  均匀涂至含有阿米卡星 (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和链霉素 (3 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 双抗性的麦康凯培养基上, 吸取  $10^{-5}$ ~ $10^{-7}$  梯度的菌液 100  $\mu\text{L}$  均匀涂至含有链霉素 (3 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的单抗的麦康凯琼脂培养基上筛选 C600 总数。每个稀释梯度 2 个重复, 随机挑取双抗药平板上的接合子进行药敏试验和 PCR 验证。接合频率=接合子数量/C600 数量。

### 1.10 *rmtB* 阳性接合子复制子分型

将 2 个接合子进行基因组 DNA 模板的制备, 方法同 1.4。根据参考文献 [17] 设计质粒复制子分型引物, 序列由生工生物科技有限公司合成。25  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系同 1.4。复制子 FrepB PCR 运行程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 52  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。剩余 17 种复制子 PCR 运行程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。

### 1.11 稳定性试验

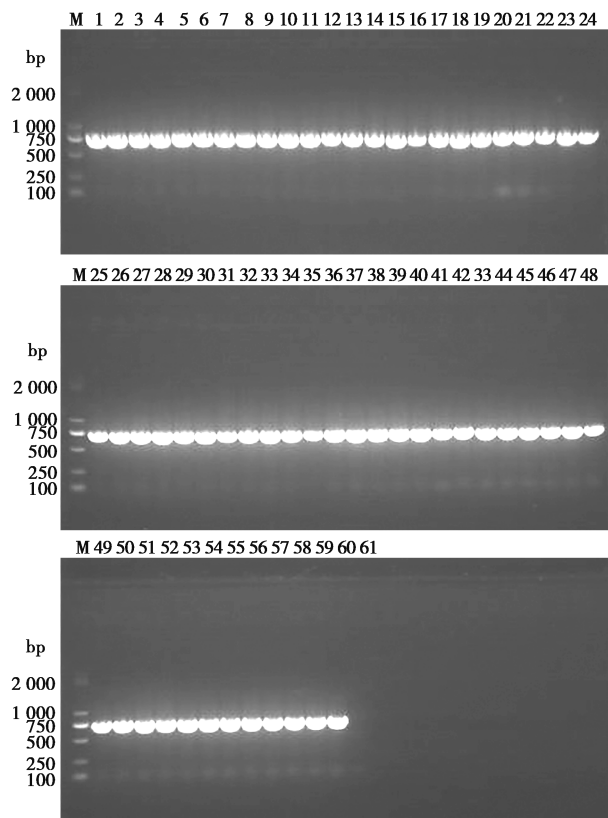
挑取受试菌株单菌落接种于 2 mL 的 LB 肉汤中, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 24 h; 取 100  $\mu\text{L}$  培养液转接新的 2 mL LB 肉汤, 继续 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 10 h 为传代 1 次; 连续传代接种 7 次。接种菌液于 LB 平板, 每个菌划 3~5 块平板; 挑取 LB 平板上的单菌落 (每个菌挑选 50 个) 转接于含抗性的 LB 平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  静置培养

14~16 h。在含抗性 LB 平板上生长的菌株为质粒稳定存在的菌株, 不生长的为质粒丢失的菌株。稳定性=耐药菌株数/总菌株数 $\times$ 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 大肠杆菌 PCR 鉴定

挑取麦康凯平板上可疑菌落, 进行大肠杆菌种属的 PCR 鉴定, 共获得 60 株鸭源大肠杆菌, 结果见图 1。



M. DNA Marker; 1~60. 分离菌株; 61. 阴性对照。

图 1 60 株分离菌株 *phaA* 基因 PCR 鉴定

### 2.2 药物敏感性试验

由表 3 可知, 60 株大肠杆菌分离株对克林霉素 100% 耐药, 对利福平和红霉素耐药率分别为 98.33%、96.67%, 对氨苄西林和阿莫西林耐药率达到 80% 以上, 对甲氧苄氨嘧啶、头孢拉定、四环素、磺胺异噁唑、复方新诺明、氯霉素和氟苯尼考耐药率达到 50% 以上, 耐药率较低的是美罗培南和阿米卡星 (<5%), 所有菌株都对多黏菌素敏感。对氨基糖苷类药物耐药的菌株有 40 株, 耐药率为 66.67%。由图 2 可知, 所有菌株均对 3 类及 3 类以上的抗菌药物耐药, 多重耐药率达 100%; 9 耐的菌株最多, 有 21

株, 占 35%; 最高可对 10 类抗生素耐药。最流行的耐药谱为氨苄西林-阿莫西林-甲氧苄氨嘧啶-链霉

素-四环素-磺胺异噁唑-复方新诺明-利福平-红霉素-林霉素-氯霉素-氟苯尼考 (5%)。

表 3 60 株分离菌株的药敏试验及 9 株接合子耐药结果

| 抗生素种类          | 抗生素    | 耐药   |       | 中介   |       | 敏感   |       | 接合子耐药 |       |
|----------------|--------|------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|
|                |        | 菌株数  | 占比/%  | 菌株数  | 占比/%  | 菌株数  | 占比/%  | 菌株数   | 占比/%  |
| 青霉素类<br>(+抑制剂) | 氨苄西林   | 49   | 81.67 | 4    | 6.67  | 7    | 11.67 | 9     | 100   |
|                | 阿莫西林   | 50   | 83.33 | 4    | 6.67  | 6    | 10    | 6     | 66.67 |
| 头孢类            | 甲氧苄氨嘧啶 | 36   | 60    | 2    | 3.33  | 23   | 38.33 | 9     | 100   |
|                | 头孢拉定   | 32   | 53.33 | 14   | 23.33 | 14   | 23.33 | 2     | 22.22 |
|                | 头孢噻吩   | 28   | 46.67 | 8    | 13.33 | 24   | 40    | 8     | 88.89 |
|                | 头孢曲松   | 19   | 31.67 | 0    | 0     | 41   | 68.33 | 5     | 55.56 |
|                | 头孢他啶   | 17   | 28.33 | 3    | 5     | 40   | 66.67 | 7     | 77.78 |
|                | 头孢吡肟   | 9    | 15    | 2    | 3.33  | 49   | 81.67 | 5     | 55.56 |
|                | 碳青霉烯类  | 美罗培南 | 2     | 3.33 | 1     | 1.67 | 57    | 95    | 0     |
| 氨基糖苷类          | 庆大霉素   | 14   | 23.33 | 0    | 0     | 46   | 76.67 | 9     | 100   |
|                | 链霉素    | 2    | 3.33  | 0    | 0     | 58   | 96.67 | 9     | 100   |
|                | 阿米卡星   | 23   | 38.33 | 22   | 36.67 | 15   | 25    | 9     | 100   |
|                | 卡那霉素   | 26   | 43.33 | 2    | 3.33  | 32   | 53.33 | 9     | 100   |
| 四环素类           | 四环素    | 38   | 63.33 | 1    | 1.67  | 21   | 35    | 9     | 100   |
| 磺胺类            | 磺胺异噁唑  | 34   | 56.67 | 3    | 5     | 23   | 38.33 | 6     | 66.67 |
|                | 复方新诺明  | 33   | 55    | 3    | 5     | 24   | 40    | 9     | 100   |
| 喹诺酮类           | 环丙沙星   | 19   | 31.67 | 0    | 0     | 41   | 68.33 | 4     | 44.44 |
|                | 诺氟沙星   | 17   | 28.33 | 2    | 3.33  | 41   | 68.33 | 2     | 22.22 |
|                | 利福平    | 59   | 98.33 | 1    | 1.67  | 0    | 0     | 6     | 66.67 |
|                | 洛美沙星   | 19   | 31.67 | 3    | 5     | 38   | 63.33 | 5     | 55.56 |
| 大环内酯类          | 红霉素    | 58   | 96.67 | 2    | 3.33  | 0    | 0     | 3     | 33.33 |
|                | 阿奇霉素   | 18   | 30    | 20   | 33.33 | 22   | 36.67 | 3     | 33.33 |
| 林可酰胺类          | 克林霉素   | 60   | 100   | 0    | 0     | 0    | 0     | 4     | 44.44 |
|                | 大观霉素   | 14   | 23.33 | 8    | 13.33 | 38   | 63.33 | 0     | 0     |
|                | 新霉素    | 22   | 36.67 | 10   | 16.67 | 28   | 46.67 | 5     | 55.56 |
| 氯霉素类           | 氯霉素    | 34   | 56.67 | 0    | 0     | 26   | 43.33 | 3     | 33.33 |
|                | 氟苯尼考   | 34   | 56.67 | 0    | 0     | 26   | 43.33 | 2     | 22.22 |
| 多黏菌素           | 多黏菌素 B | 0    | 0     | 0    | 0     | 60   | 100   | 0     | 0     |

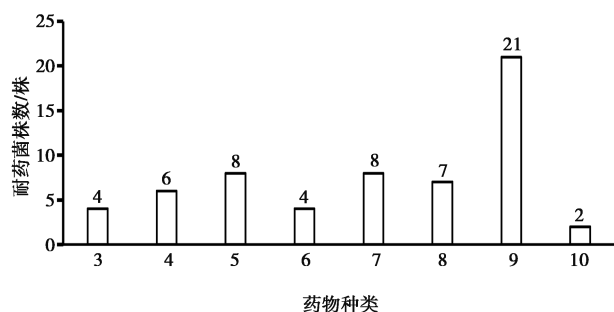
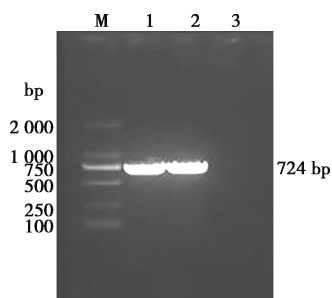


图 2 60 株分离菌株多重耐药统计

### 2.3 16S rRNA 甲基化酶基因检测

图 3 结果显示, 只有 1 株大肠杆菌携带 *rmtB* 基因, 命名为 TZ23YGE60。此菌株对氨基糖苷类药物阿米卡星和庆大霉素 100% 耐药, 基因型与耐药表型一致; 此菌株的耐药谱为氨苄西林-阿莫西林-甲氧苄氨嘧啶-头孢拉定-头孢噻吩-头孢曲松-庆大霉素-阿米卡星-链霉素-卡那霉素-四环素-磺胺异噁唑-复方新诺明-环丙沙星-诺氟沙星-利福平-洛美沙星-红霉素-克林霉素-新霉素-氯霉素-氟苯尼考。其他 16S rRNA 甲基化酶基因未检测到, 阳性率为 1.67%

(1/60); 此菌株分离自 2023 年泰州某鸭场鸭肝脏。

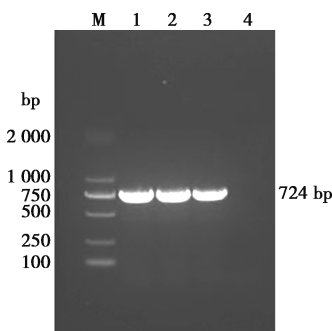


M. DNA Marker; 1, 2. *rmtB* 阳性菌株 TZ23YGE60; 3. 阴性对照。

图3 *rmtB* 基因 PCR 检测结果

## 2.4 接合试验

成功在双抗平板上筛选出接合子, 经过 PCR 检测为 *rmtB* 基因阳性 (图 4), 说明 *rmtB* 阳性分离菌株 TZ23YGE60 能通过接合方式将 16S rRNA 甲基化酶基因 *rmtB* 传递给受体菌 C600。药物敏感性试验结果显示, C600 100% 获得了氨苄西林、甲氧苄氨嘧啶、庆大霉素、链霉素、阿米卡星、卡那霉素、四环素和复方新诺明的耐药性, 未获得美罗培南和大观霉素和多黏菌素的耐药性 (表 3)。



M. DNA Marker; 1, 2. 接合子; 3. 阳性对照; 4. 阴性对照。

图4 接合子 PCR 检测结果

## 2.5 接合频率

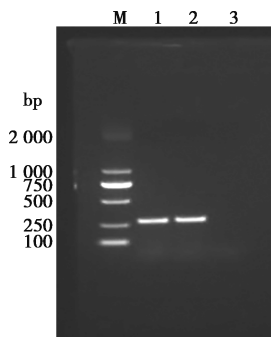
温度在 30 ℃ 时, 接合频率为  $5.38 \times 10^{-4}$ ; 温度在 37 ℃ 时, 接合频率为  $2.34 \times 10^{-5}$ ; 温度在 42 ℃ 时, 接合频率为  $1.58 \times 10^{-1}$ , 以 37 ℃ 时接合频率最高。

## 2.6 *rmtB* 阳性接合子复制子分型

复制子分型结果显示, 分离菌株中 *rmtB* 质粒属于 IncFreB 群, 见图 5。

## 2.7 稳定性试验

观察菌株 TZ23YGE60 在无抗生素的 LB 肉汤中连续传代培养 7 代, 检测结果显示质粒均稳定存在。



M. DNA Marker; 1, 2. 接合子; 3. 阴性对照。

图5 接合子质粒分型结果

## 3 讨论

16S rRNA 甲基化酶耐药菌株的出现, 严重影响了氨基糖苷类药物作为治疗革兰阴性菌感染的常用药物的治疗效果, 限制了临床细菌感染治疗的药物选择。*rmtB* 基因首次在 2003 年日本临床样品中分离出的 1 株黏质沙雷菌中发现<sup>[18]</sup>, 是世界上流行较多的 16S rRNA 甲基化酶基因<sup>[19-20]</sup>。本研究选用 60 株江苏省部分养殖场病死鸭分离的大肠杆菌进行 16S rRNA 甲基化酶基因的筛选, 结果仅检测到 1 株 16S rRNA 甲基化酶基因 *rmtB*, 检出率为 1.67% (1/60), 低于陈燕杰等<sup>[21]</sup>、Yang 等<sup>[22]</sup>、Xia 等<sup>[23]</sup>、Long 等<sup>[24]</sup>和 Li 等<sup>[25]</sup>的研究结果。携带 *rmtB* 阳性菌的大肠杆菌 TZ23YGE60 株是 2023 年从病死鸭的肝脏分离的, 耐药谱为氨苄西林-阿莫西林-甲氧苄氨嘧啶-头孢拉定-头孢噻吩-头孢曲松-庆大霉素-阿米卡星-链霉素-卡那霉素-四环素-磺胺异噁唑-复方新诺明-环丙沙星-诺氟沙星-利福平-洛美沙星-红霉素-克林霉素-新霉素-氯霉素-氟苯尼考; 发现携带 16S rRNA 甲基化酶基因的菌株除了对氨基糖苷类抗生素表现出耐药, 对其他类抗生素也表现出很高的耐药性, 与我国 Xia 等<sup>[23]</sup>的研究类似。

60 株大肠杆菌分离株对克林霉素 100% 耐药, 对利福平和红霉素的耐药率达到 90% 以上, 对氨苄西林和阿莫西林的耐药率达到 80% 以上, 对甲氧苄氨嘧啶、头孢拉定、头孢噻吩、四环素、磺胺异噁唑、复方新诺明、氯霉素和氟苯尼考耐药率达到 50% 以上, 多重耐药率达 100%, 9 耐及以上的菌株占 38.33%, 耐药现象严重。焦凤超等<sup>[26]</sup>研究发现, 河南鸭养殖场对四环素、阿莫西林、氨苄西林和多西环素耐药率达到了 100%, 对磺胺异噁唑、链霉素、卡那霉素的耐药率达到了 50% 以上, 对阿米卡星的耐药率达到了 81.82%。本文优势耐药谱型为氨苄西林-阿莫西林-甲氧苄氨嘧啶-链霉素-四环素-磺胺异

噁唑-复方新诺明-利福平-红霉素-林霉素-氯霉素-氟苯尼考, 而四川畜禽耐药谱为氨苄西林-阿莫西林-克拉维酸-头孢噻肟-头孢曲松-头孢唑啉-阿米卡星-氯霉素-多西环素-萘啶酸-环丙沙星-复方新诺明-卡那霉素, 说明大肠杆菌多重耐药问题在全国范围内都很严重<sup>[27]</sup>。

携带 *rmtB* 阳性菌的大肠杆菌 TZ23YGE60 株对阿米卡星和庆大霉素表现出耐药, 基因型与表型一致, 且呈多重耐药性, 与相关文献结果一致<sup>[13,28-29]</sup>。16S rRNA 甲基化酶基因的传播通常与可移动的遗传元件, 如质粒、转座子和整合子有关, *rmtB* 基因的转移与 Tn2、IS26、ISCR1、ISCR3 和 IS903 有关<sup>[30]</sup>。本研究中 *rmtB* 阳性大肠杆菌接合成功, 复制子分型结果显示 *rmtB* 基因位于 IncFreB 型质粒上。质粒的接合性转移依赖于 DNA 转移、复制和细菌配对相关的基因表达, 基因的表达受药物、温度等外界因素的影响<sup>[7]</sup>, 本研究发现 37 °C 更利于接合转移。质粒的稳定性是将其在细胞内进行增殖并向后代扩散的能力。质粒可通过位点特异性的基因表达系统 (高拷贝)、主动分布系统 (中拷贝) 以及质粒依赖株 (低拷贝) 3 种方式<sup>[15,31-32]</sup> 进行增殖并向后代扩散。本研究中 *rmtB* 基因的稳定性为 100%, 进一步说明 *rmtB* 基因位于质粒上, 且可以进行稳定的水平传播, 这提高了氨基糖苷类药物耐药的风险。

### 4 结论

本研究发现江苏地区鸭源大肠杆菌中存在携带 *rmtB* 基因的菌株, 该 *rmtB* 阳性菌株呈严重的多重耐药性, 可以通过质粒水平传播, 并可稳定存在于菌株中, 说明 16S rRNA 甲基化酶是氨基糖苷类药物高度耐药的主要原因。药物敏感性结果表明, 分离菌对克林霉素、红霉素、氨苄西林、阿莫西林、利福平具有很高的耐药性, 对其他的抗菌药物也表现出不同程度的耐药性, 且耐药性严重。药敏试验结果可为江苏部分地区鸭场的临床用药和防治提供一定的依据。

### 参考文献:

[1] 刁有祥. 鸭鹅病防治及安全用药 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2016: 84-94.

[2] 蒋新华, 张文波, 熊莉娟, 等. 一株鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及耐药分析 [J]. 中国家禽, 2012, 34 (5): 20-22.

[3] GONG J, KELLY P, WANG C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar *Indiana* in China (1984-2016) [J]. Zoonoses Public Health, 2017, 64 (4): 239-251.

[4] YOKOYAMA K, DOI Y, YAMANE K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Lancet,

2003, 362 (9399): 1888-1893.

[5] DOI Y, ARAKAWA Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides [J]. Clin Infect Dis, 2007, 45 (1): 88-94.

[6] 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]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51 (12): 4401-4409.

[7] DAVIS M A, BAKER K N K, ORFE L H, et al. Discovery of a gene conferring multiple -aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54 (6): 2666-2669.

[8] ZHOU Y, YU H, GUO Q, et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010, 29 (11): 1349-1353.

[9] YAN J J, WU J J, KO W C, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals [J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 54 (6): 1007-1012.

[10] 陈琳, 陈杖榴, 刘健华. 氨基糖苷类药物耐药新机制: 16S rRNA 甲基化酶的研究进展 [J]. 中国兽医科学, 2006, 36 (11): 935-939.

[11] LI G, LI X, HU J, et al. Molecular epidemiology and transmission of *rmtB*-positive *Escherichia coli* among ducks and environment [J]. Poult Sci, 2023, 102 (5): 102579.

[12] YAMANE K, WACHINO J I, DOI Y, et al. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11 (6): 951-953.

[13] 董洪燕, 宋海港, 朱善元, 等. 鸭源大肠杆菌的分离鉴定及致病性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49 (5): 1977-1984.

[14] FRITSCHÉ T R, CASTANHEIRA M, MILLER G H, et al. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52 (5): 1843-1845.

[15] TAYLOR E, SRISKANDAN S, WOODFORD N, et al. High prevalence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the UK and Ireland [J]. Int J Antimicrob Agents, 2018, 52 (2): 278-282.

[16] CHEN L, CHEN Z L, LIU J H, et al. Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59 (5): 880-885.

[17] CARATTOLI A, BERTINI A, VILLA L, et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing [J]. J Microbiol Methods, 2005, 63 (3): 219-228.

[18] DOI Y, YOKOYAMA K, YAMANE K, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48 (2): 491-496.

[19] YANG J, YE L, WANG W, et al. Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes *armA* and *rmtB* amongst clinical multidrug-

- resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates [J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 38 (4): 348-351.
- [20] AYAD A, DRISSI M, DE CURRAIZE C, et al. Occurrence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Escherichia coli* in Algerian hospitals [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1409.
- [21] 陈燕杰, 裴亚玲, 吴华, 等. 鸭源大肠杆菌氨基糖苷类耐药基因的检测与传播扩散机制 [J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29 (2): 138-141, 147.
- [22] YANG L, YANG L, LÜ D H, et al. Co-prevalance of PMQR and 16S rRNA methylase genes in clinical *Escherichia coli* isolates with high diversity of CTX-M from diseased farmed pigeons [J]. Vet Microbiol, 2015, 178 (3-4): 238-245.
- [23] XIA J, SUN J, CHENG K, et al. Persistent spread of the rmtB 16S rRNA methyltransferase gene among *Escherichia coli* isolates from diseased food-producing animals in China [J]. Vet Microbiol, 2016, 188: 41-46.
- [24] LONG H, FENG Y, MA K, et al. The co-transfer of plasmid-borne colistin-resistant genes mcr-1 and mcr-3.5, the carbapenemase gene bla<sub>NDM-5</sub> and the 16S methylase gene rmtB from *Escherichia coli* [J]. Sci Rep, 2019, 9 (1): 696.
- [25] LI G, LI X, HU J, et al. Molecular epidemiology and transmission of rmtB-positive *Escherichia coli* among ducks and environment [J]. Poult Sci, 2023, 102 (5): 102579.
- [26] 焦凤超, 李迎晓, 张迎冰, 等. 鸭源大肠杆菌耐药表型及耐药基因分析 [J]. 中国家禽, 2019, 41 (10): 64-68.
- [27] 邓向东. 四川省畜禽动物源大肠杆菌质粒介导 16S rRNA 甲基化酶耐药基因检测 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2014.
- [28] PARTRIDGE S R, GINN A N, WIKLENDT A M, et al. Emergence of blaKPC carbapenemase genes in Australia [J]. Int J Antimicrob Agents, 2015, 45 (2): 130-136.
- [29] DOI Y, WACHINO J I, ARAKAWA Y. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases [J]. Infect Dis Clin North Am, 2016, 30 (2): 523-537.
- [30] MAIDEN M C, BYGRAVES J A, FEIL E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (6): 3140-3145.
- [31] GUO Q, WANG P, MA Y, et al. Co-production of SFO-1 and DHA-1  $\beta$ -lactamases and 16S rRNA methylase ArmA in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67 (10): 2361-2366.
- [32] NAGASAWA M, KAKU M, KAMACHI K, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria [J]. J Infect Chemother, 2014, 20 (10): 635-638.