



鸭疫里默氏杆菌耐药基因传播方式的鉴定及分布

杨宇豪^{1,2,3,4#}, 姚弈舟^{1,2,3,4#}, 朱德康^{1,2,3,4}, 张相德⁵, 程安春^{1,2,3,4*}, 刘马峰^{1,2,3,4*}

- 1 西南动物疫病防控技术教育部工程研究中心, 四川 成都 611130
- 2 四川省动物疫病防控国际联合研究中心, 四川 成都 611130
- 3 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130
- 4 四川农业大学 动物医学院, 禽病防治研究中心, 四川 成都 611130
- 5 江苏益客食品集团股份有限公司, 江苏 宿迁 223800

杨宇豪, 姚弈舟, 朱德康, 张相德, 程安春, 刘马峰. 鸭疫里默氏杆菌耐药基因传播方式的鉴定及分布[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4455-4465.

YANG Yuhao, YAO Yizhou, ZHU Dekang, ZHANG Xiangde, CHENG Anchun, LIU Mafeng. Transmission ways and distribution of antibiotic resistance genes in *Riemerella anatipestifer*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4455-4465.

摘要:【目的】鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是一种感染鸭、鹅等禽类的革兰氏阴性病原菌。该菌的临床分离株具有多重耐药性, 且其耐药性呈现逐年增加的趋势, 但关于这些耐药基因在该菌的传播方式尚未被明确鉴定。本研究旨在鉴定耐药基因在鸭疫里默氏杆菌的传播方式, 以及这些耐药基因在该菌临床分离株中的分布情况。【方法】测定参考菌株 RA ATCC 11845、临床分离株 RA CH-1、RA CH-2 对 10 类 28 种药物的耐药表型; 通过基因组分析和基因缺失株的构建鉴定耐药基因; 自然转化实验鉴定其耐药基因传播方式; 通过 PCR 检测这些耐药基因在不同临床菌株的分布情况。【结果】耐药检测结果表明, 鸭疫里默氏杆菌 RA CH-1 株、RA CH-2 株对 β -内酰胺类、四环素类、大环内酯类、林可胺类及酰胺醇类等药物均具有耐药性, 而 RA ATCC 11845 株对以上药物敏感; 13 个耐药基因分别缺失后对相关药物变的敏感, 表明其参与耐药; 以上耐药基因均可通过自然转化方式转移至敏感菌株 RA ATCC 11845; 相关耐药基因在 2017–2023 年分离的 100 株临床株的检出率最低为 3%, 最高为 89%。【结论】耐药基因在鸭疫里默氏杆菌可通过自然转化的形式进行传播, 不同耐药基因在该菌临床分离株中的分布不同, 其中 *tet(X)* (*B739_0030*)

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1800200); 国家自然科学基金(32273003); 四川省自然科学基金(24NSFSC0034, 2022NSFSC1677)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1800200), the National Natural Science Foundation of China (32273003), and the Natural Science Foundation of Sichuan Province (24NSFSC0034, 2022NSFSC1677).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: LIU Mafeng, liumafengra@163.com; CHENG Anchun, chenganchun@vip.163.com

Received: 2024-06-14; Accepted: 2024-08-22; Published online: 2024-08-23

耐药基因携带率最高, *bla_{OXA}* (*G148_1768*)耐药基因携带率最低。

关键词: 鸭疫里默氏杆菌; 耐药基因; 传播方式; 自然转化

Transmission ways and distribution of antibiotic resistance genes in *Riemerella anatipestifer*

YANG Yuhao^{1,2,3,4#}, YAO Yizhou^{1,2,3,4#}, ZHU Dekang^{1,2,3,4}, ZHANG Xiangde⁵,
CHENG Anchun^{1,2,3,4*}, LIU Mafeng^{1,2,3,4*}

1 Engineering Research Center of Southwest Animal Disease Prevention and Control Technology, Ministry of Education of the People's Republic of China, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Sichuan International Joint Research Center for Animal Epidemic Prevention and Control, Chengdu 611130, Sichuan, China

3 Laboratory of Animal Diseases and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, Sichuan, China

4 Research Center of Avian Disease, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

5 Jiangsu YiKe Food Group Co., Ltd., Suqian 223800, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] *Riemerella anatipestifer* (RA) is a Gram-negative bacterium that mainly infects domesticated birds such as ducks and geese. The clinical isolates of RA are multi-drug resistant and increasing year by year. However, the transmission ways of antibiotic resistance genes in RA have not been identified. This study aims to identify the transmission ways and distribution of antibiotic resistance genes in the clinical isolates of RA. [Methods] The drug resistance phenotypes of the reference strain RA ATCC 11845 and the clinical isolates RA CH-1 and RA CH-2 to 28 antibiotics belonging to 10 categories were determined. The antibiotic resistance genes were identified by genome analysis and construction of gene deletion strains. The transmission ways of antibiotic resistance genes were identified by natural transformation. The distribution of these resistance genes in different clinical isolates was detected by PCR. [Results] RA CH-1 and RA CH-2 were resistant to β -lactams, tetracyclines, macrolides, lincosamides, and amide alcohols, while RA ATCC 11845 was sensitive to the above antibiotics. The resistant strains became sensitive to the corresponding antibiotics after the deletion of 13 resistance genes, respectively, indicating that these genes were involved in antibiotic resistance. All the resistant genes can be transferred to the sensitive strain RA ATCC 11845 by natural transformation. The detection rates of resistance genes in 100 clinical isolates from 2017 to 2023 varied within the range of 3% to 89%. [Conclusion] Antibiotic resistance genes can be transmitted in RA through natural transformation, and different antibiotic resistance genes presented varied distribution in clinical isolates, among which *tetX* (*B739_0030*) and *bla_{OXA}* (*G148_1768*) were carried by the most and fewest strains, respectively.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*; antibiotic resistance genes; transmission way; natural transformation

抗生素耐药基因的传播和扩散是目前全球面临的重大公共卫生问题^[1-2]。细菌主要通过基因突变和耐药基因水平转移 2 种方式获得耐药^[3-4]。基因水平转移主要包括接合转移、转导及自然转化 3 种方式^[5-7]。接合转移是细菌中普遍存在的一种 DNA 转移机制, 通过细菌与细菌之间的接触使质粒从一个菌转移至另一个菌^[8]。例如 INCA/C 质粒已在多种革兰氏阴性菌中发现, 包括肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌, 这种质粒通常携带 *qnrA1* 基因, 可对氟喹诺酮类药物产生耐药^[9]。转导是以噬菌体为载体进行基因的水平转移, 自然界中噬菌体会与环境中的细菌发生相互作用, 研究表明沙门氏菌、葡萄球菌等细菌可通过噬菌体传播耐药基因^[10]。自然转化是指细菌能够摄取环境中游离的 DNA 并整合至自身基因组的过程^[11]。在自然环境中, 只有少数细菌被发现具有摄取环境中游离 DNA 的能力; 因此, 这类细菌较易通过自然转化的方式来获得耐药基因^[12]。

鸭疫里默氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 是威克斯氏菌科 (*Weeksellaceae*)、里默氏菌属 (*Riemerella*) 的一种革兰氏阴性杆菌^[13]。该菌具有多种血清型和多重耐药的特点, 因此, 通过现有单一血清型疫苗或药物很难达到预期防控效果, 是目前威胁我国养鸭业健康发展的主要细菌性病原^[14]。目前鉴定的鸭疫里默氏杆菌耐药基因主要包括: β -内酰胺类耐药基因 *bla_{Tm-1}*、*bla_{OXA-209}*、*bla_{RAA-1}*、*bla_{RASA-1}*、*rad-1*^[15-19], 氨基糖苷类耐药基因 *aac(3)-Ig*、*aac(3)-Ic*、*aadS*^[20], 酰胺醇类耐药基因 *floR*、*cat*^[16,21], 大环内脂类耐药基因 *erm(F)*、*erm(E)*、*ere(D)*^[20], 林可酰胺类耐药基因 *lnu(H)* 和 *lnu(I)*^[22-23], 喹诺酮类耐药基因 *gyrA*^[15], 四环素类耐药基因 *tet(X)*^[24] 等。

前期研究发现, 鸭疫里默氏杆菌具有自然转化的现象^[25], 然而自然转化在该菌耐药基因

传播中的作用未被系统鉴定。本研究旨在探究鸭疫里默氏杆菌中耐药基因是否通过自然转化的形式进行水平转移, 并且对其耐药基因在临床株的携带情况进行调查, 为临床用药提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鸭疫里默氏杆菌 RA CH-1、RA CH-2 及其他临床分离株由本实验室分离并保存于 -80 °C 冰箱。RA ATCC 11845 购自美国典型培养物保藏中心; 鸭疫里默氏杆菌耐药基因缺失株由本研究构建; DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 培养基购自北京索莱宝科技有限公司; 抗生素购自大连美仑生物技术有限公司。

1.2 引物设计与合成

研究使用的基因序列来自 NCBI 数据库, 引物序列由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 见表 1。

1.3 菌株最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值测定

参照美国临床和实验室标准协会中测定抗生素 MIC 的实验方法, 利用 96 孔培养板测定 10 类 28 种抗生素对 RA CH-1、RA CH-2、RA ATCC 11845 的 MIC 值。在 96 孔培养板中每孔加入的菌液含量约为 10^5 CFU; 加入的抗生素每孔浓度从左至右依次为 512、256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 。放入 37 °C 恒温培养箱培养 18–24 h 后, 记录以上菌株对不同种类抗生素的 MIC 值。

1.4 比较基因组分析

通过下载 NCBI 上公布的鸭疫里默氏杆菌 RA CH-1、RA CH-2、RA ATCC 11845 基因组, 对其基因组序列比较, 分析其存在的不同耐药基因。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers name	Primer sequences (5'→3')
<i>B739_0030</i> up p1	CGCGGATCCTGTGCTTAACCGAAAATTTGG
<i>B739_0030</i> up p2	CATGCCATGGTTGTTTGTCTGTATCTATTCG
<i>B739_0030</i> down p1	AAAACCTGCAGAATGGAATAAAACGGCACATAAC
<i>B739_0030</i> down p2	ACATGCATGCTAACCTTGATACGAAGCCGAAAG
<i>G148_1774</i> up p1	GCTGTTTTTATGTATGGTTCATTTACTAAAAGCGAAG
<i>G148_1774</i> up p2	GCTTCGGGGTCATTATATTGCATTAATAGTTCAC
<i>G148_1774</i> cfx p1	GTGAACTATTAATGCAATATAATGACCCCGAAGC
<i>G148_1774</i> cfx p2	GTTAGCTGACGTTTTTATTCTTAAGATTTTACTGAAGTTTG
<i>G148_1774</i> down p1	CAAACCTCAGTAAAATCTTAAGAATAAAACGTCAGCTAAC
<i>G148_1774</i> down p2	GGGATTTTTAGCACTGAACTTTAATCGAAGAACAG
<i>B739_0033</i> p1	ATGACAAAAAAGAAATTGCC
<i>B739_0033</i> p2	CTACGAAGGATGAAATTTTTC
<i>B739_0033</i> up p1	CGCGGATCCCTTATAATGCCAAATTTTGTC
<i>B739_0033</i> up p2	CATGCCATGGTAGTAACTTCTTACAGGTGAATAC
<i>B739_0033</i> down p1	AAAACCTGCAGTTCAAAGTCGGGTGGTTGTCAAG
<i>B739_0033</i> down p2	ACATGCATGCCGTTGTACGACATAGTAAAACCG
<i>G148_1767</i> up p1	CGCGGATCCTGTAATTTTATTACCTTTGTG
<i>G148_1767</i> up p2	CATGCCATGGTCAAAAATGGCACATAACGGTC
<i>G148_1767</i> down p1	AAAACCTGCAGAATGGAATAAAACGGCACATAAC
<i>G148_1767</i> down p2	ACATGCATGCCGCCTTTTGCAAATACTATGTTG
<i>G148_1771</i> up p1	CGCGGATCCATTCTTATTTCTCATCAAG
<i>G148_1771</i> up p2	CATGCCATGGTATTACCTTATTTTAAATTAAAAATTAAC
<i>G148_1771</i> down p1	ACGCGTCGACGAATAATGTAAATTTGATTTCG
<i>G148_1771</i> down p2	ACATGCATGCCGCGGCATTATGTGTAATTTTAG
<i>B739_0031</i> up p1	CGCGGATCCGCGGGCATTGTGAAAGATACC
<i>B739_0031</i> up p2	CATGCCATGGTTTAGTATGTTTTTTCTATTTC
<i>B739_0031</i> down p1	ACGCGTCGACAAAGACGAACGCACAACAAGG
<i>B739_0031</i> down p2	ACATGCATGCCTCTTCAATGCTGTAAATTTTC
<i>B739_0035</i> up p1	CATGCCATGGGAAATATTTCGTATATTTGCG
<i>B739_0035</i> up p2	CGGGGTACCTTGTTTGTCTGTATCTATTCG
<i>B739_0035</i> down p1	CTAGTCTAGAAATGGAATAAAACGGCACATAAC
<i>B739_0035</i> down p2	ACATGCATGCTGCTGCTCTTTAAGCTGCCGC
<i>G148_1768</i> up p1	CGCGGATCCCAAAGCACGACTGCCAATAAC
<i>G148_1768</i> up p2	CATGCCATGGAGGTAATAAAAATTACATTATATC
<i>G148_1768</i> down p1	ACGCGTCGACAAAGACGAACGCACAACAAGG
<i>G148_1768</i> down p2	ACATGCATGCCTCTTCAATGCTGTAAATTTCC
<i>G148_1777</i> up p1	CATGCCATGGGATGTTGTGAAAGAAATTCAAG
<i>G148_1777</i> up p2	CGGGGTACCTCAAAAATGGCACATAACGTTG
<i>G148_1777</i> down p1	CTAGTCTAGAAATGGAATAAAACGGCACATAAC
<i>G148_1777</i> down p2	ACATGCATGCCCATATTCTCAAAAATAGCAAC
<i>G148_1775</i> up p1	CGCGGATCCGATGCCTCCTTTTGCAAGACAAG
<i>G148_1775</i> up p2	CATGCCATGGTTGTAACGCGTCATTCTTC
<i>G148_1775</i> down p1	ACGCGTCGACCATCGGTTTGCGGAAATGGCGG

(待续)

(续表 1)

引物名称 Primers name	Primer sequences (5'→3')
<i>G148_1775</i> down p2	ACATGCATGCCTCAAAATAGTTGAATTGAAAAG
<i>G148_1769</i> up p1	CGCGGATCCCTAAATTCAGGTTTACAAATTTC
<i>G148_1769</i> up p2	CATGCCATGGTATGAAACTTGCACCGCTCCC
<i>G148_1769</i> down p1	ACGCGTCGACTAAAAAGAAGGTTCCGAAATTC
<i>G148_1769</i> down p2	ACATGCATGCGGCTTGCTGAAATACATAAAATG
<i>B739_0036</i> up p1	GAGAGGCTTGAGTTTAGCCATATCGTTTTTC
<i>B739_0036</i> up p2	GCTTCGGGGTCATTATAGTATTCAATTTTCATGAG
<i>B739_0036</i> cfx p1	CTCATGAAAATGAATACTATAATGACCCCGAAGC
<i>B739_0036</i> cfx p2	GTTAGCTGACGTTTTTATTCTTAAGATTTTACTGAAGTTTG
<i>B739_0036</i> down p1	CAAACCTTCAGTAAAATCTTAAGAATAAAAACGTCAGCTAAC
<i>B739_0036</i> down p2	CATCGTTATGGGTAATGGACGCTTACTTTTC
<i>G148_1772</i> up p1	GCTGATGCTATGGAAAGCTTCATTACTGAAAAGG
<i>G148_1772</i> up p2	GCTTCGGGGTCATTATAGATTACCTGCCATTATG
<i>G148_1772</i> cfx p1	CATAATGGCAGGTAATCTATAATGACCCCGAAGC
<i>G148_1772</i> cfx p2	CGGAACCTTCTTTTTATCATTTAAGATTTTACTGAAGTTTG
<i>G148_1772</i> down p1	CAAACCTTCAGTAAAATCTTAATGATAAAAAGAAGGTTCCG
<i>G148_1772</i> down p2	CATCTGCTACGGTTGGTCGAAATTGAACTATTG
<i>B739_0030</i> p1	GAACGTTGCAATAATTGGTGGTGG
<i>B739_0030</i> p2	CAATTGCTGAAACGTAAAGTCGGG
<i>B739_0031</i> p1	GGATATTGTCAAACATAAAG
<i>B739_0031</i> p2	GCTTCTTTCGTTGAATTCAATCG
<i>B739_0036</i> p1	GTGCTACGGTACATGATAATAACC
<i>B739_0036</i> p2	CTCACCTTGTGTAATTCTTCCG
<i>G148_1767</i> p1	ATGACAATGCGAATAGATACAGAC
<i>G148_1767</i> p2	TTATACATTAAACAATTGCTG
<i>G148_1768</i> p1	TTGTGTAGTTGGGGGAAGGTTAG
<i>G148_1768</i> p2	GCTTCTTTCGTTGAATTCAATCG
<i>G148_1769</i> p1	ATGGCAGGTAATCAAGGTCATAAA
<i>G148_1769</i> p2	GAACAAAGAATTGGCATTGC
<i>G148_1771</i> p1	ATGAAAAATATAAAACCCCTTAAC
<i>G148_1771</i> p2	TCAATCCACTATTTCTGAAAC
<i>G148_1772</i> p1	GAAGAATTGCTGGAAAATACTTG
<i>G148_1772</i> p2	GTCGTTTTAGCAATATCAGC
<i>G148_1775</i> p1	ATGATTAACAAAACAAAATCTATA
<i>G148_1775</i> p2	TTAGCGGTAGTTTTTCTTATTTC

1.5 耐药基因缺失株的构建

分别以 RA CH-1、RA CH-2 基因组为模板, 使用相应引物扩增耐药基因上游(up)片段和下游(down)片段; 分别以质粒 pEX18Gm、pLMF03 为模板扩增壮观霉素(spectinomycin, spc)抗性基因片段和头孢西丁(cefexitin, cfx)耐药基因片段。将上游片段、抗性基因片段、下游基因片段通过

融合 PCR 的方式进行连接, 得到 up-spc-down 或 up-cfx-down 片段。将融合片段通过自然转化方式转化至受体菌中, 利用含有壮观霉素 (80 µg/mL)或头孢西丁(1 µg/mL)的血平板筛选, 长出克隆后用引物 up p1+cfx p2 或 spc p2、cfx p1 或 spc p1+down p2 进行 PCR 鉴定。以此方法建构的耐药基因缺失株包括了 β-内酰胺类耐药基

因 *B739_0031*、*B739_0036*、*G148_1768* 和 *G148_1774*，四环素类耐药基因 *B739_0030*、*B739_0035*、*G148_1767* 和 *G148_1777*，大环内酯类耐药基因 *B739_0033*、*G148_1771*，林可胺类耐药基因 *G148_1775* 及酰胺醇类耐药基因 *G148_1769* 和 *G148_1772*。

1.6 自然转化

自然转化方法参照文献[26]进行操作。将 RA ATCC 11845 培养至对数生长期(OD_{600} 为 1.0–2.0)，并调整 OD_{600} 为 1.0。以 RA CH-1、RA CH-2 基因组为底物 DNA (2 μ g)与 300 μ L RA ATCC 11845 受体菌混合后进行自然转化，置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 1 h，随即将其涂布于含有相应抗性的血琼脂平板上，长出克隆后用耐药基因引物 up p1 及 down p2 进行 PCR 鉴定。

1.7 耐药基因在鸭疫里默氏杆菌临床分离株的分布

选取 100 株鸭疫里默氏杆菌临床分离株，对其耐药基因进行 PCR 鉴定，所用引物为耐药基因 up p1/down p2，统计 100 株临床分离株中耐药基因的数目及占比。

2 结果与分析

2.1 鸭疫里默氏杆菌 RA CH-1 株、RA CH-2 株和 RA ATCC 11845 株耐药表型测定

为测定 RA CH-1、RA CH-2 和 RA ATCC 11845 这 3 株鸭疫里默氏杆菌的耐药表型，检测了 10 类 28 种药物对 3 株菌的 MIC。结果如表 2 所示，与 RA ATCC 11845 相比，RA CH-1 及 RA CH-2 对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、大环内酯类、喹诺酮类、林可胺类、酰胺醇类、糖肽类、多肽类、磺胺类抗生素均具有耐药性；RA ATCC 11845 则是对多数药物敏感，仅对氨基糖苷类、多肽类类药物具有抗性。

表 2 不同抗生素对鸭疫里默氏杆菌的 MIC 值

Table 2 The MICs of different antibiotics to *Riemerella anatipestifer* (μ g/mL)

抗生素 Antibiotics	RA ATCC 11845	RA CH-1	RA CH-2
头孢噻吩 Ceftiofur	<0.25	0.5	0.5
氨曲南 Aztreonam	<0.25	16	4
头孢西丁 Cefoxitin	<0.25	<0.25	<0.25
氨苄青霉素 Ampicillin	<0.25	<0.25	1
头孢唑肟 Cefquinome	<0.25	<0.25	<0.25
苯唑西林 Oxacillin	<0.25	2	4
甲氧苄啶 Trimethoprim	<0.25	16	>512
卡那霉素 Kanamycin	64	64	32
庆大霉素 Gentamicin	16	16	16
链霉素 Streptomycin	16	16	32
新霉素 Neomycin	32	32	16
氟苯尼考 Florfenicol	1	1	4
万古霉素 Vancomycin	32	64	64
甲氧西林 Methicillin	<0.25	4	8
氯霉素 Chloramphenicol	2	2	32
多黏菌素 Polymyxin	>512	512	>512
四环素 Tetracycline	<0.25	4	16
强力霉素 Doxycycline	<0.25	1	8
红霉素 Erythromycin	<0.25	32	8
阿奇霉素 Azithromycin	0.5	256	2
螺旋霉素 Spiramycin	16	512	16
氧氟沙星 Ofloxacin	<0.25	0.5	4
恩诺沙星 Enrofloxacin	<0.25	1	8
吡哌酸 Pipemidic acid	2	128	256
林可霉素 Lincomycin	<0.25	>512	128
克林霉素 Clindamycin	<0.25	512	1
磺胺甲恶唑 Sulfamethoxazole	16	256	128
美罗培南 Meropenem	<0.25	<0.25	<0.25

2.2 鸭疫里默氏杆菌 RA CH-1 株和 RA CH-2 株耐药基因缺失株的构建

通过比较分析 RA CH-1、RA CH-2 和 RA ATCC 11845 的全基因组, 本研究从 RA CH-1、RA CH-2 基因组中共找到 13 个耐药基因。RA CH-1 基因组包含的耐药基因包括: 编码 β -内酰胺类耐药基因 *B739_0031*、*B739_0036*, 编码四环素类耐药基因 *B739_0030*、*B739_0035*, 编码大环内酯类耐药基因 *B739_0033*; RA CH-2 基因组包含的耐药基因包括: 编码 β -内酰胺类耐药基因 *G148_1768* 和 *G148_1774*, 编码四环素类耐药基因 *G148_1767* 和 *G148_1777*, 编码大环内酯类耐药基因 *G148_1771*, 编码林可胺类耐药基因 *G148_1775*, 编码酰胺醇类耐药基因 *G148_1769* 和 *G148_1772*。

其中, *B739_0030* 和 *B739_0035* 为同源基因, 相似性为 96%; *G148_1767* 和 *G148_1777* 为同源基因, 相似性为 100%; *G148_1769* 和 *G148_1772* 为同源基因, 相似性为 98.5%。

采用抗性基因替代的方法对目的基因进行缺失, 以 RA CH-1 Δ *B739_0030::spc* 缺失株的鉴定结果为例。结果如图 1 所示。以 RA CH-1 Δ *B739_0030::spc*

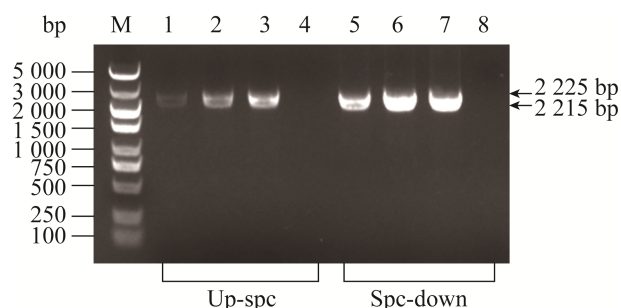


图 1 PCR 鉴定 *B739_0030* 基因缺失株凝胶电泳图
Figure 1 The identification of *B739_0030* gene deletion strain. Lane M: DNA marker; Lane 1, 2: Up-spc fragments were amplified from RA CH-1 Δ *B739_0030::spc*; Lane 3, 4: Up-spc fragments were amplified from positive control and RA CH-1, respectively; Lane 5, 6: Spc-down fragments were amplified from RA CH-1 Δ *B739_0030::spc*; Lane 7, 8: Spc-down fragments were amplified from positive control and RA CH-1, respectively.

0030::spc 为模板, PCR 能扩增出 up-spc 片段及 spc-down 片段, 而对照组 RA CH-1 为模板, 则未扩增出条带, 说明 RA CH-1 Δ *B739_0030::spc* 有痕缺失株构建成功。其余缺失株的构建及验证方法与上述一致。

2.3 鸭疫里默氏杆菌耐药基因缺失后对药物敏感性测定

为进一步验证以上耐药基因是否参与相应药物耐药, 本研究检测了亲本株、耐药基因缺失株之间的耐药性差异。如表 3 所示, 缺失大环内酯类耐药基因 *B739_0033*、*G148_1771*, 林可胺类耐药基因 *B739_0033*、*G148_1775*, β -内酰胺类耐药基因 *B739_0036* 后, 缺失株对相应药物敏感性均降低至与 RA ATCC 11845 同一水平; 当菌株体内存在同类 2 个耐药基因时, 仅缺失 1 个对耐药表型无显著影响。只有当 2 个基因均缺失后才会对相应药物敏感, 如单缺四环素类耐药基因 *B739_0030* 或 *B739_0035* 对四环素 MIC 值无影响, 当 2 个耐药基因均缺失后才表现出对四环素敏感。

2.4 RA CH-1/RA CH-2 基因组携带耐药基因可以通过自然转化方式转移至敏感菌株 RA ATCC 11845

研究表明, 鸭疫里默氏杆菌具有发生自然转化的能力^[25]。为判定自然转化是否是该菌耐药基因平行转移的一种普遍方式, 本研究分别以 RA CH-1 和 RA CH-2 基因组为底物进行自然转化, 判断 RA CH-1、RA CH-2 基因组中耐药基因能否转移至敏感株 RA ATCC 11845 中。结果表明, RA CH-1/RA CH-2 基因组与 RA ATCC 11845 孵育后, 可使 RA ATCC 11845 对四环素类、大环内酯类药物产生耐药。对转化子进行 PCR 鉴定发现, 耐药基因 *B739_0030*、*B739_0033*、*G148_1767*、*G148_1771* 已经被转移至 RA ATCC 11845 的基因组(图 2); 其余耐药基因也同样如此, 可使 RA ATCC 11845 对 β -内酰胺类、

表 3 抗生素 MIC 值

Table 3 The MICs of the antibiotics

菌株 Strains	氨曲南 MIC 值 The MICs of aztreonam (μg/mL)	四环素 MIC 值 The MICs of tetracycline (μg/mL)	红霉素 MIC 值 The MICs of erythromycin (μg/mL)	克林霉素 MIC 值 The MICs of clindamycin (μg/mL)	氯霉素 MIC 值 The MICs of chloramphenicol (μg/mL)
RA CH-1	64	4	32	512	2
RA CH-1Δ <i>B739_0031</i>	64	4	32	512	2
RA CH-1Δ <i>B739_0036</i>	<0.25	4	32	512	2
RA CH-1Δ <i>B739_0031</i> Δ <i>B739_0036</i>	<0.25	4	32	512	2
RA CH-1Δ <i>B739_0030</i>	64	4	32	512	2
RA CH-1Δ <i>B739_0035</i>	64	4	32	512	2
RA CH-1Δ <i>B739_0030</i> Δ <i>B739_0035</i>	64	<0.25	32	512	2
RA CH-1Δ <i>B739_0033</i>	64	4	<0.25	<0.25	2
RA CH-2	4	16	8	1	32
RA CH-2Δ <i>G148_1768</i>	4	16	8	1	32
RA CH-2Δ <i>G148_1774</i>	1	16	8	1	32
RA CH-2Δ <i>G148_1768</i> Δ <i>G148_1774</i>	1	16	8	1	32
RA CH-2Δ <i>G148_1767</i>	4	16	8	1	32
RA CH-2Δ <i>G148_1777</i>	4	16	8	1	32
RA CH-2Δ <i>G148_1767</i> Δ <i>G148_1777</i>	4	4	8	1	32
RA CH-2Δ <i>G148_1771</i>	4	16	<0.25	1	32
RA CH-2Δ <i>G148_1775</i>	4	16	8	<0.25	32
RA CH-2Δ <i>G148_1769</i>	4	16	8	1	16
RA CH-2Δ <i>G148_1772</i>	4	16	8	1	32
RA CH-2Δ <i>G148_1769</i> Δ <i>G148_1772</i>	4	16	8	1	2
RA ATCC 11845	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	2

林可胺类及酰胺醇类药物产生耐药,对转化子进行 PCR 鉴定发现,耐药基因 *B739_0036*、*G148_1774*、*G148_1769*、*G148_1775* 已经被转移至 RA ATCC 11845 的基因组。以上结果证明,不同耐药基因均能通过自然转化方式在鸭疫里默氏杆菌之间发生水平基因转移。

2.5 耐药基因在鸭疫里默氏杆菌临床株的分布

为进一步研究这些耐药基因在不同临床菌株的分布情况,本研究对在 2017–2023 年,自山东、四川等 7 个省份共 17 个地区分离到的 100 株分离株的耐药基因携带情况进行了鉴定(以上菌株均由本实验室分离并保存于–80 °C冰箱)。由于以上 13 个耐药基因中 *B739_0030* 与

B739_0035、*G148_1767* 与 *G148_1777*、*G148_1769* 与 *G148_1772* 为同源基因,因此对 10 个耐药基因进行了鉴定。结果表明,β-内酰胺类耐药基因 *B739_0031* (*bla_{OXA}*)的携带率为 43% (43/100), β-内酰胺类耐药基因 *B739_0036* (*bla_{RASA}*)的携带率为 12% (12/100), β-内酰胺类耐药基因 *G148_1768* (*bla_{OXA}*)的携带率为 3% (3/100), β-内酰胺类耐药基因 *G148_1774* (*bla_{RASA}*)的携带率为 39% (39/100),四环素类耐药基因 *B739_0030* [*tet*(X)]的携带率为 89% (89/100),四环素类耐药基因 *G148_1767* [*tet*(X)]的携带率为 68% (68/100),大环内酯类耐药基因 *B739_0033* [*erm*(F)]的携带率为 53% (53/100),红霉素耐药基因 *G148_1771* [*ere*(D)]的携带率为 14% (14/100),林可胺类耐

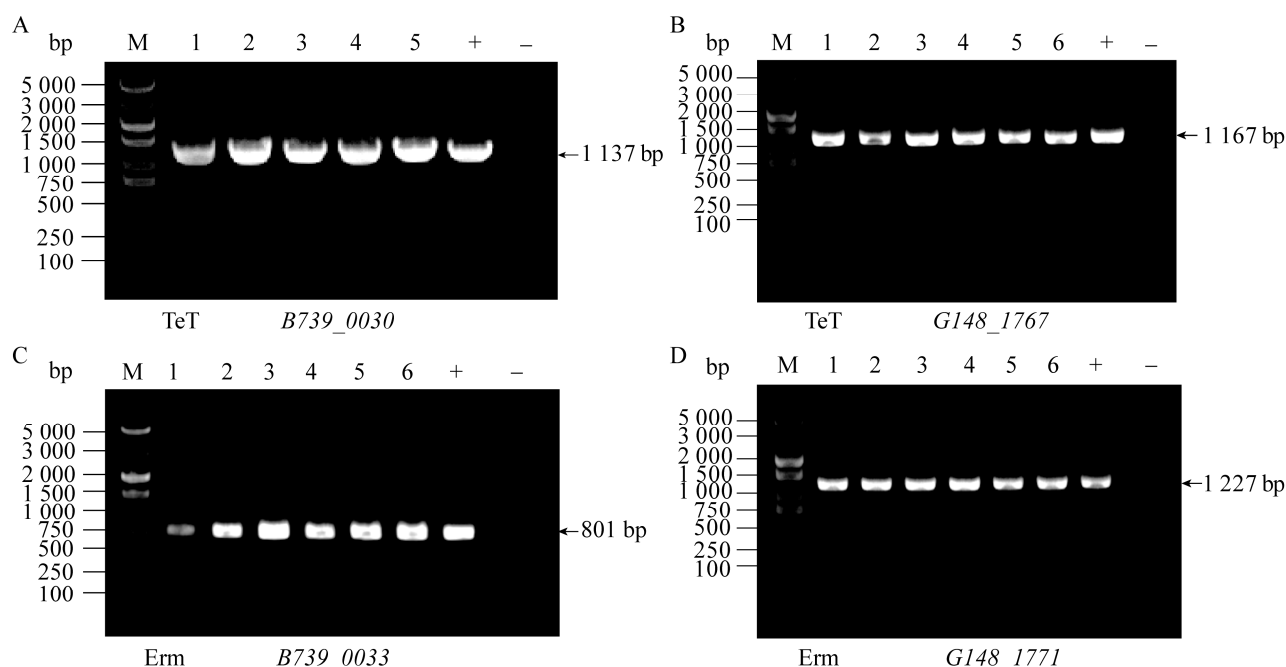


图2 PCR鉴定 *B739_0030*、*G148_1767*、*B739_0033*、*G148_1771* 抗性基因转化子凝胶电泳图

Figure 2 The identification of transformant carrying resistance genes (*B739_0030*, *G148_1767*, *B739_0033*, *G148_1771*) using PCR. A: PCR identification of transformant carrying *B739_0030* resistance gene. Lane M: DNA marker; Lane 1–5: *B739_0030* fragments were amplified from transformants; +: Positive control; -: Negative control. B: PCR identification of transformant carrying *G148_1767* resistance gene. Lane M: DNA marker; Lane 1–6: *G148_1767* fragments were amplified from transformants; +: Positive control; -: Negative control. C: PCR identification of transformant carrying *B739_0033* resistance gene. Lane M: DNA marker; Lane 1–6: *B739_0033* fragments were amplified from transformants; +: Positive control; -: Negative control. D: PCR identification of transformant carrying *G148_1771* resistance gene. Lane M: DNA marker; Lane 1–6: *G148_1771* fragments were amplified from transformants; +: Positive control; -: Negative control.

药基因 *G148_1775* [*lnu(H)*] 的携带率为 16% (16/100), 酰胺醇类耐药基因 *G148_1769* (*catB*) 的携带率为 22% (22/100)。其中, 携带 2 种以上耐药基因的菌株占比为 88%, 携带 3 种以上耐药基因的菌株占比为 73%, 携带 4 种以上耐药基因的菌株占比为 52%, 携带 5 种以上耐药基因的菌株占比为 29%, 携带 6 种以上耐药基因的菌株占比为 17%。

3 讨论与结论

我国是养鸭大国, 2023 年全国商品肉鸭出栏量超过 42 亿只^[27]。疫病的频发仍然是限制我国养鸭业快速健康发展的重要因素。鸭疫里默氏

杆菌是一种主要感染鸭和其他禽类的革兰氏阴性病原菌, 是危害我国养鸭业健康发展最为重要的细菌性病原之一^[13]。该菌感染雏鸭后导致纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎、脑膜炎等病变, 死亡率可达 75% 或更高^[28]。该菌血清型复杂, 目前至少发现有 21 种不同的血清型, 而且血清型之间无交叉保护作用^[13]。另一方面, 该菌的临床分离株表现出多重耐药, 在某些养殖场已达到无药可用的境地。

据目前报道, 该菌对 8 大类抗生素(β -内酰胺类、氨基糖苷类、大环内脂类、喹诺酮类、林可酰胺类、酰胺醇类、四环素类、多肽类)超过 30 种药物均具有耐药性^[15-24]。就单个菌株而言,

可对多达 7 大类抗生素耐药^[29]。综上所述,鸭疫里默氏杆菌耐药性与其携带耐药基因直接相关。然而,耐药基因在鸭疫里默氏杆菌是如何传播的未被系统研究。因此,本研究鉴定了鸭疫里默氏杆菌耐药基因传播的方式,并分析鸭疫里默氏杆菌中耐药基因的分布,为更好地防控耐药基因在该菌的传播奠定基础。

本研究首先分析鉴定了 RA CH-1、RA CH-2 及 RA ATCC 11845 的耐药表型,从多重耐药菌 RA CH-1、RA CH-2 的基因组中找到了已报道的 13 个耐药基因,包括了 β -内酰胺类耐药基因 *bla_{OXA}*、*bla_{RAS}*、四环素类耐药基因 *tet(X)*、大环内酯类耐药基因 *erm(F)*、*ere(D)*、林可胺类耐药基因 *lnu(H)*、酰胺醇类耐药基因 *catB*。构建以上耐药基因缺失株并对缺失株进行了药物敏感性测定,结果显示以上耐药基因均参与耐药。当菌株体内存在同类 2 个耐药基因时,它们之间可能协作互补,如四环素耐药基因仅缺失 1 个对耐药表型无显著影响,只有当 2 个基因均缺失后才会对相应药物敏感。

鸭疫里默氏杆菌具有自然转化的能力,因此本研究鉴定了是否耐药基因可以从耐药菌株通过自然转化方式转移至敏感菌株。本研究的受体菌选择了对多种药物敏感的 RA ATCC 11845,供体基因选择了携带不同耐药基因的 RA CH-1 和 RA CH-2 基因组。结果表明,耐药基因均可以从 RA CH-1 和 RA CH-2 基因组转移并整合至 RA ATCC 11845 的基因组并表现出耐药表型。

对 100 株自 2017–2023 年分离,来自山东、四川等地的菌株的耐药基因携带情况进行了鉴定。结果表明,不同耐药基因的携带率差异较大,这一结果可能由多种原因导致,既有可能是在不同地区中耐药基因各自的流行率不同,也可能是临床株本身自然转化能力的不同导致接受外源耐药基因的难易程度不同所致。

综上所述,本研究鉴定了鸭疫里默氏杆菌耐药基因可通过自然转化的形式进行水平传播,而且各类耐药基因在临床分离株中携带情况不同,其中四环素类耐药基因、大环内酯类耐药基因、 β -内酰胺类耐药基因的携带率相对较高,为下一步有效防控耐药基因的传播和临床用药选择提供依据。

参考文献

- [1] MACKENZIE JS, JEGGO M. The one health approach-why is it so important?[J]. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 2019, 4(2): 88.
- [2] BUSCHHARDT T, GÜNTHER T, SKJERDAL T, TORPDAHL M, GETHMANN J, FILIPPITZI ME, MAASSEN C, JORE S, ELLIS-IVERSEN J, FILTER M. A one health glossary to support communication and information exchange between the human health, animal health and food safety sectors[J]. *One Health*, 2021, 13: 100263.
- [3] LARSSON DGJ, FLACH CF. Antibiotic resistance in the environment[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(5): 257-269.
- [4] BHULLAR K, WAGLECHNER N, PAWLOWSKI A, KOTEVA K, BANKS ED, JOHNSTON MD, BARTON HA, WRIGHT GD. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34953.
- [5] VIROLLE C, GOLDLUST K, DJERMOUN S, BIGOT S, LESTERLIN C. Plasmid transfer by conjugation in Gram-negative bacteria: from the cellular to the community level[J]. *Genes*, 2020, 11(11): 1239.
- [6] TOUCHON M, MOURA de SOUSA JA, ROCHA EP. Embracing the enemy: the diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 38: 66-73.
- [7] GRIFFITH F. The significance of pneumococcal types[J]. *The Journal of Hygiene*, 1928, 27(2): 113-159.
- [8] SMILLIE C, GARCILLÁN-BARCIA MP, FRANCIA MV, ROCHA EP, DE LA CRUZ F. Mobility of plasmids[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(3): 434-452.
- [9] CARATTOLI A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(6): 2227-2238.
- [10] TORRES-BARCELÓ C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7(1): 168.

- [11] HAMILTON HL, DILLARD JP. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(2): 376-385.
- [12] JUTKINA J, MARATHE NP, FLACH CF, LARSSON DGJ. Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations[J]. Science of the Total Environment, 2018, 616: 172-178.
- [13] 程安春, 汪铭书, 陈孝跃, 朱德康, 黄城, 刘菲, 周毅, 郭宇飞, 刘兆宇, 方鹏飞. 我国鸭疫里默氏杆菌血清型调查及新血清型的发现和病原特性[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 320-323.
- CHENG AC, WANG MS, CHEN XY, ZHU DK, HUANG C, LIU F, ZHOU Y, GUO YF, LIU ZY, FANG PF. Epidemiology and new serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in China and studies on their pathogenic characteristics[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2003, 23(4): 320-323 (in Chinese).
- [14] 刘马峰, 田琇, 程安春. 鸭疫里默氏杆菌毒力及耐药机制研究进展[J]. 微生物学报, 2019, 59(7): 1222-1231.
- LIU MF, TIAN X, CHENG AC. Research advances in the virulence and antibiotics resistance mechanism of *Riemerella anatipestifer*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(7): 1222-1231 (in Chinese).
- [15] SUN N, LIU JH, YANG F, LIN DC, LI GH, CHEN ZL, ZENG ZL. Molecular characterization of the antimicrobial resistance of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 158(3/4): 376-383.
- [16] CHEN YP, LEE SH, CHOU CH, TSAI HJ. Detection of florfenicol resistance genes in *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and geese[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 154(3/4): 325-331.
- [17] LUO HY, ZHU DK, LI MR, TANG YH, ZHANG WY, WANG HJ, LI P. Raa enzyme is a new family of class a extended-spectrum β -lactamase from *Riemerella anatipestifer* strain RCAD0122[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2022, 66(3): e0175721.
- [18] LUO HY, LI MR, YANG ZS, ZHU DK, LI P. Characterization of RASA-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase from *Riemerella anatipestifer*[J]. Veterinary Microbiology, 2022, 270: 109456.
- [19] LI P, YANG ZS, LEI T, DAI YJ, ZHOU Y, ZHU DK, LUO HY. Identification of a novel carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase RAD-1 in *Riemerella anatipestifer*[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2023, 78(4): 1117-1124.
- [20] YANG FF, SUN YN, LI JX, WANG H, ZHAO MJ, SU J, ZHANG ZJ, LIU HJ, JIANG SJ. Detection of aminoglycoside resistance genes in *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 158(3/4): 451-452.
- [21] HUANG L, YUAN H, LIU MF, ZHAO XX, WANG MS, JIA RY, CHEN S, SUN KF, YANG Q, WU Y, CHEN XY, CHENG AC, ZHU DK. Type B chloramphenicol acetyltransferases are responsible for chloramphenicol resistance in *Riemerella anatipestifer*, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 297.
- [22] LUO HY, LIU MF, WANG MS, ZHAO XX, JIA RY, CHEN S, SUN KF, YANG Q, WU Y, CHEN XY, BIVILLE F, ZOU YF, JING B, CHENG AC, ZHU DK. A novel resistance gene, *lnu*(H), conferring resistance to lincosamides in *Riemerella anatipestifer* CH-2[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2018, 51(1): 136-139.
- [23] YANG ZS, LAN TJ, LUO HY, LI P, WANG MS, JIA RY, CHEN S, LIU MF, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, OU XM, MAO S, GAO Q, SUN D, TIAN B, CHENG AC, ZHU DK. Emergence and mobilization of a novel lincosamide resistance gene *lnu*(I): from environmental reservoirs to pathogenic bacteria[J]. Science of the Total Environment, 2024, 906: 167400.
- [24] LI RC, JIANG YJ, PENG K, WANG YH, WANG MZ, LIU Y, WANG ZQ. Phenotypic and genomic analysis reveals *Riemerella anatipestifer* as the potential reservoir of *tet*(X) variants[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2022, 77(2): 374-380.
- [25] 刘思齐, 时春风, 刘马峰. 鸭疫里默氏杆菌自然转化的发现及机制研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 483-493.
- LIU SQ, SHI CF, LIU MF. Advances in discovery and mechanism of natural transformation in *Riemerella anatipestifer*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 483-493 (in Chinese).
- [26] LIU MF, ZHANG L, HUANG L, BIVILLE F, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, SUN KF, YANG Q, WU Y, CHEN XY, CHENG AC. Use of natural transformation to establish an easy knockout method in *Riemerella anatipestifer*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(9): e00127-17.
- [27] 侯水生, 刘灵芝. 2023 年水禽产业与技术发展报告[J]. 中国畜牧杂志, 2024, 60(3): 318-321.
- HOU SS, LIU LZ. Chinese Journal of Animal Science, 2024, 60(3): 318-321 (in Chinese).
- [28] 张大丙, 郭玉璞. 鸭传染性浆膜炎的流行病学调查[J]. 中国兽医杂志, 1999, 35(12): 25.
- ZHANG DB, GUO YP. Epidemiological investigation of infectious serositis in ducks[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1999, 35(12): 25 (in Chinese).
- [29] ZHU XH, LI YL, WANG ZW, PANG ZY, SI ZS, LIU C, LU JB, CAO SL, PEI LY, LI YB. Antibiotic resistance of *Riemerella anatipestifer* and comparative analysis of antibiotic-resistance gene detection methods[J]. Poultry Science, 2023, 102(3): 102405.