

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (2) :174 - 182; 4 February 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.02.006

## 嗜水气单胞菌对喹诺酮类药物耐药的分子机制

方一风<sup>1,2</sup>, 潘晓艺<sup>2\*</sup>, 蔺凌云<sup>2</sup>, 沈锦玉<sup>1,2\*</sup>, 尹文林<sup>2</sup>, 姚嘉赞<sup>2</sup>, 郝贵杰<sup>2</sup>, 徐洋<sup>2</sup>

<sup>1</sup>温州医科大学生命科学院, 浙江 温州 325035

<sup>2</sup>浙江省淡水水产研究所, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 浙江 湖州 313001

**摘要:** 【目的】调查从浙、苏、皖等地水产动物中分离的 23 株致病性嗜水气单胞菌的耐药谱并探索喹诺酮类抗生素耐药菌株的耐药分子机制。【方法】根据美国临床实验室标准化协会药敏判断标准(2011 版)测定 23 株嗜水气单胞菌耐药谱并筛选喹诺酮类抗生素耐药株;对筛选的耐药菌株和体外诱导耐药菌株的 *gyrA* 和 *parC* 基因耐药决定区进行分析;用二倍稀释法测定加入多重耐药外排泵抑制剂碳酰氨基-对-氯苯胺前后耐药菌株对恩诺沙星最小抑菌浓度的变化,同时检测喹诺酮类药物相关的外排泵基因 *qepA*、*oqxA* 和 *mdfA*;并检测质粒介导的喹诺酮耐药的 *qnr* 家族基因 *qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD* 和 *qnrS*。【结果】所有菌株都存在对 5 种以上药物的耐药性;39.1% (9/23) 的嗜水气单胞菌对喹诺酮类药物耐药,其中 55.6% (5/9) 对恩诺沙星耐药。耐恩诺沙星的 5 株菌株均携带 *qnrS*,而不携带 *qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD* 基因,也不携带外排泵基因 *qepA*、*oqxA* 和 *mdfA*。其中耐药菌株 AH19 同时存在 *gyrA* 与 *parC* 基因双突变、质粒介导的耐药基因 *qnrS* 和主动外排泵三种耐药机制,菌株 AH4、AH7 和 AH20 存在 *gyrA* 与 *parC* 基因双突变和质粒介导的耐药基因 *qnrS* 两种耐药机制,AH6 存在 *gyrA* 基因突变和质粒介导的耐药基因 *qnrS* 机制,体外诱导耐药菌株 ATCC7966-QR 相对于原始菌株 ATCC7966 发生了 *gyrA* 与 *parC* 基因双突变。【结论】喹诺酮类药物作用靶位的改变和质粒介导的耐药基因 *qnrS* 的存在是本研究中涉及的嗜水气单胞菌对喹诺酮类药物耐药的主要作用机制,主动外排泵机制是个别菌株存在的耐药机制。

**关键词:**嗜水气单胞菌, 耐药机制, 喹诺酮类药物, 耐药谱

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2014)02-0174-09

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 属于弧菌科气单胞菌属,为条件致病菌,广泛存在于环境中,常引起鱼类<sup>[1-2]</sup>和虾类<sup>[3-4]</sup>严重疾病,是水产养殖的主要病原菌之一。喹诺酮类药物具有广谱、口服有效、副作用较少和良好的药代动力学等优点,在水产细菌性疾病的治疗中被广泛用于治疗细菌性疾病,其中恩诺沙星是目前气单胞菌病最为常用的喹

诺酮类治疗药物。但随着该药在水产养殖中被部分养殖户长期大量使用,以及错误使用,使得细菌产生喹诺酮类药物的耐药,特别是嗜水气单胞菌出现的耐药更趋普遍,并且多重耐药现象尤为严重<sup>[5]</sup>。这给嗜水气单胞菌引起的水产养殖动物疾病的治疗造成了困难。

细菌对喹诺酮类药物的耐药机制主要有 3 种:

基金项目:农业部公益性行业科研专项(201203085);浙江省科技厅重大科技项目(2012C12009-4);湖州市自然科学基金(2013YZ02)

\* 通信作者。沈锦玉, E-mail: sjinyu@126.com;潘晓艺, E-mail: panxiaoyi@163.com

作者简介:方一风(1989-),女,浙江衢州人,硕士研究生,主要从事水产病害防治研究。E-mail: fangyf321@yeah.net

收稿日期:2013-07-18;修回日期:2013-09-22

染色体介导的拓扑异构酶靶位点的改变,即喹诺酮类药物耐药性决定区(Quinolone Resistance-Determining Regions, QRDRs)氨基酸位点改变<sup>[6]</sup>;外排泵导致细胞内药物蓄积的减少<sup>[7]</sup>;以及最近提出的由可传递质粒所编码的 *qnr* 蛋白的保护机制<sup>[8]</sup>。在嗜水气单胞菌中,高水平耐药菌株普遍存在 QRDRs 的 *gyrA* 和 *parC* 双突变<sup>[9]</sup>。药物外排导致的耐药在大肠埃希菌和克雷伯氏肺炎菌中报道较多<sup>[10-11]</sup>,但在嗜水气单胞菌中未有报道。而质粒介导的 *qnr* 家族耐药基因,在嗜水气单胞菌仅报道 *qnrS* 基因<sup>[8]</sup>,其他类型的均未发现。特别是对水产动物中分离的嗜水气单胞菌以上3种耐药机制相互间的研究报道较少,因此本研究对嗜水气单胞菌耐喹诺酮类药物以上3种耐药机制同时进行检测分析具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验菌株

23株嗜水气单胞菌(表1)于2009-2012年分离自浙江、江苏、安徽等地重点养殖区域的患病淡水养殖水生动物,并保存于本实验室。标准质控菌株 ATCC7966 为本实验室保存菌株。

### 1.2 主要试剂和测序

PCR产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购于北京天恩泽基因科技有限公司, pEASY-T5 Zero Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司, 羧基氰基-对-氯苯胺(CCCP)购于Sigma公司, 药敏纸片购于杭州天和微生物试剂有限公司, 生化试剂都为国产分析纯。引物合成和测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

### 1.3 药物敏感性实验

用药敏纸片法,根据2011年美国临床实验室标准化协会颁布的药敏判断标准(CLSI)的耐药性和敏感性评判方法<sup>[12]</sup>,测定药敏结果,分析嗜水气单胞菌对不同药物的敏感分布情况。本实验选用的23种药物包括恩诺沙星(ENX)、萘啶酸(NAL)、依诺沙星(ENO)、诺氟沙星(NOR)、环丙沙星(CIP)、氟苯尼考(FF)、氯霉素(CAP)、头孢西丁(CFX)、头孢噻吩(CFT)、氨苄西林(AMP)、青霉素(PEN)、卡那霉素(KAN)、庆大霉素(GEN)、链霉素(STR)、四环素(TCY)、强力霉素(ASN)、复方新诺明(SXT)、

表1. 细菌的来源

Table 1. The source of 23 *A. hydrophila* strains

strain	name	source	isolate time
AH1	LAJ0904-2S	Anhui (安徽) - <i>Carassius cuvieri</i>	2009. 4
AH2	FDJ0907	Anhui (安徽) - <i>Carassius cuvieri</i>	2009. 7
AH3	FDL0907	Anhui (安徽) - <i>Carassius cuvieri</i>	2009. 7
AH4	SXB0909	Zhejiang (浙江) - <i>Parabramis pekinensis</i>	2009. 9
AH5	CZSL20907	Jiangsu (江苏) - <i>Parabramis pekinensis</i>	2009. 7
AH6	CZDS0907	Jiangsu (江苏) - <i>Parabramis pekinensis</i>	2009. 7
AH7	JSB0908K	Jiangsu (江苏) - <i>Parabramis pekinensis</i>	2009. 8
AH8	TLJ0905	Anhui (安徽) - <i>Carassius cuvieri</i>	2009. 5
AH9	TLJ0906	Anhui (安徽) - <i>Carassius cuvieri</i>	2009. 6
AH10	TLJ0907-1	Anhui (安徽) - <i>Carassius cuvieri</i>	2009. 7
AH11	TLJ0907-2	Anhui (安徽) - <i>Carassius cuvieri</i>	2009. 7
AH12	TLL0908	Anhui (安徽) - <i>Carassius cuvieri</i>	2009. 8
AH13	QZPPL0907	Zhejiang (浙江) - <i>Parabramis pekinensis</i>	2009. 7
AH14	QZPPK0907	Zhejiang (浙江) - <i>Parabramis pekinensis</i>	2009. 7
AH15	SXSZJK0906	Zhejiang (浙江) - <i>Carassius cuvieri</i>	2009. 6
AH16	SXXYHJK0908	Zhejiang (浙江) - <i>Carassius cuvieri</i>	2009. 8
AH17	TPS-30	Zhejiang (浙江) - <i>Parabramis pekinensis</i>	1991. 5
AH18	BSK-40	Zhejiang (浙江) - <i>Carassius cuvieri</i>	1990. 7
AH19	CZBL814-1	Jiangsu (江苏) - <i>Parabramis pekinensis</i>	2012. 8
AH20	CZBK814-3	Jiangsu (江苏) - <i>Parabramis pekinensis</i>	2012. 8
AH21	CZBK814-5	Jiangsu (江苏) - <i>Parabramis pekinensis</i>	2012. 8.
AH22	SRB-1	Jiangxi (江西) - <i>AmydaSinensis</i>	2011. 6
AH23	CZBYB-K	Jiangsu (江苏) - <i>Parabramis pekinensis</i>	2011. 10
ATCC 7966	ATCC7966	tin of milk with a fishy odor	1901

多粘菌素 B (PMB)、红霉素 (MXF)、阿莫西林 (AML)、克林霉素 (CLI)、利福平 (RIF)。

### 1.4 耐药菌株的诱导

由于标准质控菌株 ATCC7966 的基因组背景清楚,又因其对喹诺酮类药物敏感,特选取 ATCC7966,以 CLSI 2011 的临界浓度作为判断标准,应用体外逐渐增加药物浓度的方法诱导标准菌株 ATCC7966 对恩诺沙星药物产生耐药<sup>[13]</sup>。将 ATCC7966 接种到初始浓度为 1/2MIC 药物的 MH

培养基中传代培养,每隔 2 d 转种 1 次,将细菌接种到前次 2 倍药物浓度的 MH 培养基中,测定其 MIC,直至培养菌株的 MIC 上升至耐药判定浓度范围,然后转接于无药平板中培养,每天转种 1 次,连续传代 12 d,每 3 天测定药物对各菌株的 MIC,以判断耐药菌的稳定性。最后将获得稳定耐药的菌株保种备用。

### 1.5 菌株基因组 DNA 模板制备

采用煮沸法制备细菌基因组 DNA 模板<sup>[14]</sup>,制备好后置 -20℃ 冰箱保存备用。

### 1.6 QRDRs 变异位点检测

QRDRs 存在于耐药菌株的 *gyrA* 和 *parC* 基因中,根据嗜水气单胞菌标准株 ATCC7966 基因组序列和已报道的 QRDRs 基因序列,在 QRDRs 上下游

设计引物 *gyrA*668 和 *parC*711 (引物序列见表 2),对耐药菌株 QRDRs 基因进行扩增与序列测定。

PCR 扩增条件为:95℃ 预变性 3 min;94℃ 30 s,退火 30 s,72℃ 延伸(各基因扩增引物的退火温度见表 2,延伸时间根据扩增片段长度按 1 k/min 换算),32 个循环;72℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳观察结果,目的条带进行割胶回收,并进行 TA 克隆,各基因选 3 个阳性克隆子送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。测序结果在 NCBI 中进行 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 同源性分析。将 *gyrA* 和 *parC* 基因测序得到的 DNA 序列转换为氨基酸序列后进行序列比较,寻找药物靶点氨基酸位点的变异情况。

表 2. PCR 扩增用引物

Table 2. Primers for PCR Amplification

gene	primer	sequence (5'→3')	PCR products/bp	annealing temperature/℃
<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> 668F	CCTATCTTGATTACGCCATGAG	668	56
	<i>gyrA</i> 668R	CACATAGACGGAGCCACGAC		
<i>parC</i>	<i>parC</i> 711F	TACCGAGCAGGCTTACTTGAA	711	56
	<i>ParC</i> 711R	CCATCCTCCTCGTTCCACA		
<i>qepA</i>	<i>qepA</i> 403F	CGTGTGCTGGAGTTCTTC	403	52
	<i>qepA</i> 403R	CTGCAGGTACTGCGTCATG		
<i>oqxA</i>	<i>oqxA</i> 392F	CTCGGCGCGATGATGCT	392	52
	<i>oqxA</i> 392R	CCACTTCTCACGGGAGACGA		
<i>mdfA</i> <sup>[15]</sup>	<i>mdfA</i> 103F	CATTGGCAGCGATCTCCTTT	103	50
	<i>mdfA</i> 103R	TTATAGTCACGACCGACTTCTTTCA		
<i>qnrA</i> <sup>[16]</sup>	<i>qnrA</i> 580F	AGAGGATTCTCACGCCAGG	580	50
	<i>qnrA</i> 580R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
<i>qnrB</i> <sup>[17]</sup>	<i>qnrB</i> 264F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	264	50
	<i>qnrB</i> 264R	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA		
<i>qnrC</i>	<i>qnrC</i> 447F	GGTTGTACATTATTGAATC	447	50
	<i>qnrC</i> 447R	TCCACTTTACGAGTTCT		
<i>qnrD</i>	<i>qnrD</i> 582F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	582	50
	<i>qnrD</i> 582R	AACAAGCTGAAGCGCCTG		
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> 657F	ATGGAAACCTACCGTCACACATAT	657	50
	<i>qnrS</i> 657R	CTAGTCAGGAAAAACAACAATACCC		

### 1.7 耐恩诺沙星菌株携带质粒图谱

为了寻找耐药菌株中携带的质粒与耐药性的相关性,按照质粒试剂盒说明书抽提耐恩诺沙星的嗜水气单胞菌中的质粒,并采用琼脂糖凝胶电泳分析不同耐药菌株间质粒的携带情况和图谱差异。

### 1.8 携带 *qnr* 家族耐药基因的质粒与耐药的相关性

纯化各质粒携带菌株中不同大小的质粒,采用 *qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD* 和 *qnrS* 基因检测引物(表 2),检测不同质粒中 *qnr* 家族耐药基因携带情况。

根据检测结果将 *qnr* 家族耐药基因阳性质粒转化大肠杆菌工程菌株 DH5 $\alpha$  中,采用菌落 PCR 筛选阳性转化株,并用药敏纸片法比较含有阳性菌株 DH5 $\alpha$ -P 与原始菌株 DH5 $\alpha$  对喹诺酮类药物的敏感性。

### 1.9 多重外排泵抑制剂对耐药菌株 MIC 的影响

参照 CLSI 2011 方法,采用二倍稀释法测定多重外排泵抑制剂羰基氰基-对-氯苯腴(CCCP)加入前后耐恩诺沙星对耐药菌株 MIC 的影响。将 5 株耐药菌株分别接种于 2 mL MH 液体培养基中,每个菌接种 13 管,接种细菌终浓度都为 10<sup>3</sup> CFU/mL,13 管

培养基中加入不同浓度的恩诺沙星,分别为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,留一试管不加药物作为空白对照,同时所有管中添加终浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的耐药泵抑制剂 CCCP,置 28 $^{\circ}\text{C}$  孵育 18 h 后观察结果,计算各菌株的 MIC。

### 1.10 外排泵相关基因检测

对耐恩诺沙星嗜水气单胞菌进行外排泵相关基因 *qepA*、*oqxA* 和 *mdfA* 检测,基因 *qepA* 以质粒为模板,基因 *oqxA* 和 *mdfA* 以 DNA 作为模板,基因检测用引物、退火温度见表 2,并对阳性扩增产物进行序列测定。

## 2 结果

### 2.1 菌株的药敏测定结果

按药敏纸片法,根据 CLSI 2011 版判定标准,计算 23 株嗜水气单胞菌对不同药物的敏感程度,并按耐药、中介、敏感分类统计百分比,结果见表 3。由表 3 可知,各抗生素的耐药率存在较大的差别,嗜水气单胞菌对氨苄西林、阿莫西林、头孢噻吩、克林霉素、青霉素都有很高的耐药率,而对强力霉素、四环素、头孢西丁、氯霉素、氟苯尼考、利福平、红霉素的耐药率很低,敏感性很高;喹诺酮类药物中,对依诺沙星和诺氟沙星的耐药率达到 39.1%,对萘啶酸的耐药率为 34.8%,而对恩诺沙星和环丙沙星的耐药率较低,分别为 21.7% 和 17.4%,其中仅有 5 株菌株(AH4、AH6、AH7、AH19、AH20)对恩诺沙星有耐药性,其中 AH19 对喹诺酮类药物耐药性最高,5 株耐药菌株对喹诺酮类药物的耐药程度见表 4。临床应用中,由于第三代喹诺酮类药物恩诺沙星(ENX)使用的广泛性,特选取恩诺沙星作为本研究中的代表药物。

### 2.2 敏感菌株体外诱导结果

敏感菌株 ATCC7966 初始 MIC 为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,经过连续传代的恩诺沙星浓度递增诱导后,传代至第 9 代时,其 MIC 升至 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,诱导后获得的最终耐药菌株命名为 ATCC7966-QR。ATCC7966-QR 经过在无药物压力下培养传代 12 代后,其 MIC 未变,说明诱导后获得耐药能力的菌株 ATCC7966-QR 其耐药性稳定。

表 3. 23 株嗜水气单胞菌的药敏统计结果

Table 3. The antibiotic sensitivities of 23 *A. hydrophila* strains

antibiotics	disk content/ $\mu\text{g}$	resistant /%	intermediate /%	susceptible /%
ENX	5	21.7	8.7	69.6
NAL	30	34.8	13.0	52.2
ENO	10	39.2	4.3	56.5
NOR	10	39.1	0.0	60.9
CIP	5	17.4	13.0	69.6
FF	75	4.3	0.0	95.7
CAP	30	4.3	0.0	95.7
CFX	30	4.3	4.3	91.4
CFT	30	87.0	0.0	13.0
AMP	30	87.0	13.0	0.0
PEN	10	100.0	0.0	0.0
KAN	30	21.8	39.1	39.1
GEN	10	4.3	4.3	91.3
STR	10	26.1	13.0	60.9
TCY	30	4.3	8.7	87.0
ASN	30	0.0	0.0	100.0
SXT	23.75	17.4	0.0	82.6
PMB	30	39.1	60.9	0.0
MXF	15	13.0	13.0	74.0
AML	30	100.0	0.0	0.0
RIF	5	13.0	4.4	82.6
CLI	5	100.0	0.0	0.0

表 4. 5 株嗜水气单胞菌对喹诺酮类药物的耐药程度

Table 4. The resistance to quinolones of 5 *A. hydrophila* strains

strain	zone diameter breakpoints/mm				
	ENX	NAL	CIP	ENO	NOR
AH4	18	14	17	0	11
AH6	15	14	21	0	11
AH7	16	16	14	11	9
AH19	9	0	0	0	0
AH20	12	0	0	0	9

### 2.3 耐药菌株拓扑异构酶 QRDRs 变异情况

采用引物组 *gyrA*668 和 *parC* 711 对 5 株耐药菌株、ATCC7966-QR 和 ATCC7966 的 QRDRs 基因进行扩增,扩增产物电泳结果见图 1,目的产物测序得到的 DNA 序列根据编码区密码子顺序转为氨基酸序列后,与嗜水气单胞菌标准菌株 ATCC7966 株的 *gyrA* 基因和 *parC* 基因编码的氨基酸分别进行序列比对,发现 5 株恩诺沙星耐药菌株全部在 *gyrA* 基因 QRDRs 发生了点突变,第 83 位点氨基酸密码子 ACC 突变为 ATC,相应氨基酸 Ser 突变为 Ile。ATCC7966-QR 同样在该位点发生突变,氨基酸从 Ser 突变为 Val。标准质控菌株 ATCC7966 及敏感菌株 AH14 在相应位点未发生突变。

5 株耐药菌株有 4 株菌株在 *parC* 基因 QRDRs

第 87 位点氨基酸密码子发生了突变,从 AGC 突变为 ATC,氨基酸由 Ser 突变为 Ile, ATCC7966-QR 也在同一位点发生相同的突变,结果见表 5。

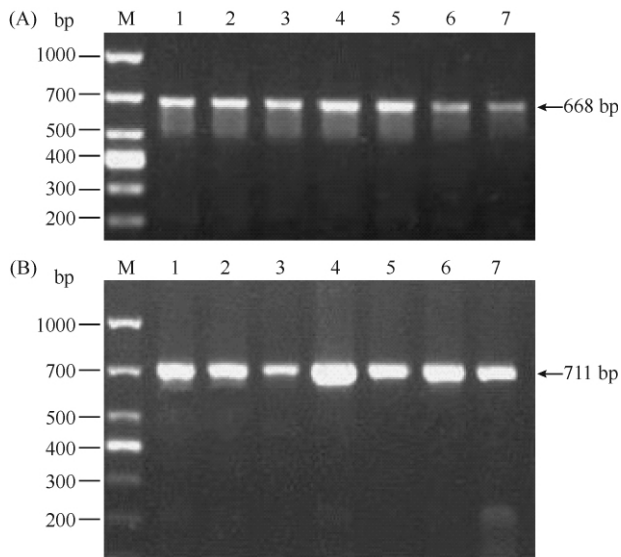


图 1. 7 株细菌 *gyrA* 基因 (A) 和 *parC* 基因 (B) 的 PCR 扩增产物电泳图

Figure 1. PCR amplification of the *gyrA* (A) and *parC* (B) sequences from 7 strains of *A. hydrophilia*. M: DL1000 DNA ladder; lane 1 - 5: AH4, AH6, AH7, AH19, AH20; lane 6: ATCC7966-QR; lane 7: AH 14.

表 5. CCCP 对耐药菌株 MIC 的影响及 *gyrA*, *parC* 基因突变位点

Table 5. The effect of CCCP on minimal inhibitory concentrations (MICs) of enrofloxacin and mutation in *gyrA*, *parC* of quinolone-resistant *A. hydrophilia* stains

strain	MIC/ (μg/mL)		<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
	ENX	ENX + CCCP	83 Ser	87 Ser
AH4	8	no grow	Ile	Ile
AH6	8	no grow	Ile	-
AH7	8	4	Ile	Ile
AH19	32	8	Ile	Ile
AH20	16	8	Ile	Ile
ATCC7966-QR	128	128	val	Ile

Denotes “-”: no mutation

2.4 质粒图谱分析结果

5 株耐药菌株和转化菌株 DH5α-P 抽提质粒的电泳图谱见图 2, 根据质粒大小分别标记为 a、b、c、d 和 e, 其中质粒 b 和 c 分布最广, 对各质粒进行割胶回收, 以备分析质粒中耐药基因 *qnr* 的携带情况。

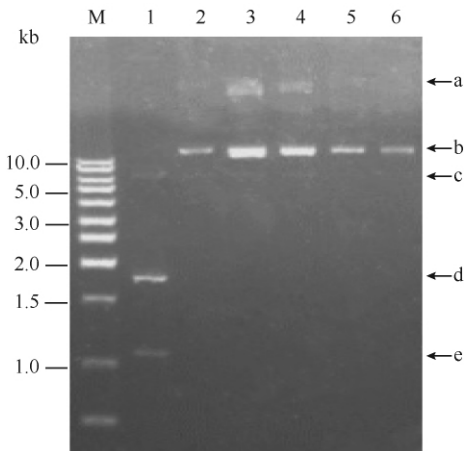


图 2. 耐药菌株质粒图谱

Figure 2. The restriction map of the plasmids from resistant strains. M: 1 kb DNA ladder; lane 1 - 5: AH4, AH6, AH7, AH19, AH20; lane 6: DH5α-P; a-e: plasmids of different size.

2.5 质粒介导的耐药基因 *qnr* 检测结果

通过对 5 株耐药菌株中所带质粒的 *qnr* 基因检测, 发现 5 株耐药菌株中的质粒均不携带 *qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD* 基因, 但都携带含 *qnrS* 耐药基因的质粒, 结果见图 3。

根据各菌株的耐药性差异和携带质粒的情况, 表明质粒 b (见图 2) 在菌株产生耐药性过程中起更重要的作用, 因此选取强耐药菌株 AH19 的质粒 b 转化工程菌株 DH5α, 获得质粒 b 携带菌株 DH5α-P。菌株 DH5α 和 DH5α-P 药敏结果显示, 菌株 DH5α-P 对喹诺酮类药物敏感性明显比初始的 DH5α 低, 药敏结果见表 6。说明 *qnrS* 耐药基因阳性质粒与菌株耐喹诺酮类药物密切相关。

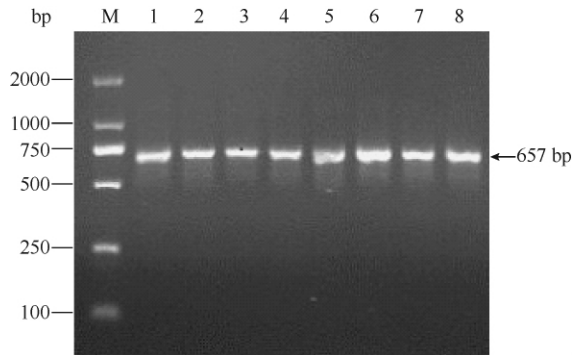


图 3. *qnrS* 基因的 PCR 扩增产物电泳图

Figure 3. PCR amplification of the *qnrS* sequences. M: DL2000 DNA ladder; lane 1 - 4: AH6, AH7, AH19, AH20 from a template of plasmid b; lane 5 - 8: AH4, AH6, AH7, AH19 from a template of plasmid c.

表 6. DH5 $\alpha$  和 DH5 $\alpha$ -P 对喹诺酮类药物敏感性比较Table 6. The quinolone sensitivities of DH5 $\alpha$  and DH5 $\alpha$ -P

strain	zone diameter breakpoints/mm				
	ENX	NAL	CIP	ENO	NOR
DH5 $\alpha$	38	30	40	26	41
DH5 $\alpha$ -P	20	14	26	18	21

## 2.6 外排泵机制检测结果

采用多重外排泵抑制剂 CCCP 对 5 株耐药菌株和 ATCC7966-QR 作用,检测 CCCP 对各耐药菌株 MIC 的影响情况,结果发现只有 AH19 菌株的 MIC 值受 CCCP 的影响, MIC 下降 4 倍,说明其可能存在喹诺酮类药物外排泵; AH4、AH6 两株菌株在 CCCP 的作用下不生长;其它在 CCCP 作用下, MIC 下降倍数都小于 4 倍,说明都不存在主动喹诺酮类药物外排泵,结果见表 5。

## 2.7 外排泵相关基因 *qepA*、*oqxA* 和 *mdfA* 基因检测结果

5 株耐药菌株的 *oqxA*、*qepA* 和 *mdfA* 基因检测结果都为阴性,说明外排泵阳性耐药菌株 AH19 存在其它未被报道的外排泵耐药机制。

## 3 讨论

嗜水气单胞菌引起的鱼类疾病是水产养殖中最为常见的细菌性疾病之一。我们对 23 株不同时间、不同地域分离的嗜水气单胞菌的耐药性进行检测,发现该组菌株对不同种喹诺酮类药物表现出不同的耐药性,其中萘啶酸、依诺沙星和诺氟沙星表现出很高的耐药率,说明耐喹诺酮类药物的嗜水气单胞菌已经在这些地区大量存在。

目前,国内外报道的关于喹诺酮类药物耐药机制的研究结果主要集中在喹诺酮类药物作用靶位拓扑异构酶关键位点的突变,主要有 *gyrA* 的 83 位点氨基酸 Ser $\rightarrow$ Ile; *parC* 的 87 位点 Ser $\rightarrow$ Ile 等<sup>[18]</sup>。Hanne 等<sup>[19]</sup>通过实验室诱导,发现杀鲑气单胞菌中 *gyrA* 83 位点的 Ser $\rightarrow$ Ile 和 67 位点的 Ala $\rightarrow$ Gly 氨基酸发生突变而产生耐药。Alcaide 等<sup>[20]</sup>也在耐药气单胞菌中发现 *gyrA* 基因 83 位点的氨基酸突变。在众多报道中,83 位点 Ser 突变出现最为频繁。本研究结果显示 100% 的耐喹诺酮类药物的菌株发生 *gyrA* 83 位点 Ser 突变,80.0% 的耐药菌株同时表现为 *parC* 87 位点 Ser 突变,药敏结果显示双基因突变菌株比单基因突变菌株的 MIC 值高,其中对喹诺酮

类药物表现出更高的耐药性。该结果表明 *gyrA* 基因第 83 位点的氨基酸突变是本研究中各区域嗜水气单胞菌耐喹诺酮类药物的主要耐药机制之一,而 *parC* 或其他基因的突变能使耐药性增强,这也与有关报道一致<sup>[21]</sup>。

通过在恩诺沙星压力下培养敏感菌株 ATCC7966,其在短时间内便产生了对恩诺沙星的耐药。基因检测发现诱导后的耐药菌株 ATCC7966-QR 在 *gyrA* 和 *parC* 的喹诺酮类药物作用靶位发生了氨基酸突变,说明恩诺沙星的长期使用会导致嗜水气单胞菌基因组中基因的突变,并且这种突变具有遗传性,在短期传代过程中并不能被自身修复,说明长期连续使用抗生素具有诱导产生顽固耐药菌株的风险。并在研究过程中发现,采用接近杀菌浓度的药物浓度诱导敏感菌株,将会越容易诱导其产生耐药性,提示水产养殖上用药时应足量使用,避免抗菌药物低浓度与细菌长期接触产生耐药性而造成治疗失败,这也与有关报道一致<sup>[22]</sup>。

近年来研究显示,细菌对药物的主动外排是导致菌体内药物浓度下降的主要机制,而且是导致细菌发生高水平耐药的一个重要因素<sup>[23]</sup>。CCCP 是最典型的外排泵抑制剂,能够阻断主动外排泵能量来源,使药物在细菌体内的蓄积浓度增加。一般认为,CCCP 作用耐药菌株后, MIC 值比作用前下降 4 倍的认为其存在主动外排泵耐药机制<sup>[24]</sup>。本研究检测的 3 个与外排泵相关的基因 *qepA*、*oqxA* 和 *mdfA* 都与喹诺酮类药物外排相关。*qepA* 基因是一种新型的质粒介导喹诺酮类药物的外排泵相关基因,属于促进剂超家族 (major facilitator superfamily, MFS),促进亲水性喹诺酮类药物外排<sup>[25-26]</sup>; *oqxA* 基因属于耐受-生节-分裂家族 (RND),其编码的蛋白可外排灭菌剂、抗菌药物等<sup>[27]</sup>; *mdfA* 属于主要易化子家族类,编码一种具有 12 个跨膜结构域的内膜蛋白,将恩诺沙星、环丙沙星等喹诺酮类药物泵入周浆间隙, *mdfA* 基因过度表达可引起细菌对喹诺酮类药物耐药性增加 2-4 倍<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,仅有一株耐药菌株 AH19 在 CCCP 作用后 MIC 下降了 4 倍,表明其可能存在喹诺酮类药物外排泵,然而外排泵相关基因检测发现,5 株耐喹诺酮类药物的菌株均不携带与外排泵机制相关的基因 *qepA*、*oqxA* 和 *mdfA*。该结果表明菌株 AH19 可能存在其它外排泵耐药机制。在外排泵抑制剂试验过程中,出现了 2

株耐药菌株 AH4 和 AH6 在 CCCP 的作用下不生长, 表明菌株 AH4 和 AH6 可能存在一种必需基因受到 CCCP 的抑制, 从而导致其生长的抑制, 其受 CCCP 的抑制机制有待进一步研究。

位于质粒上的 *qnr* 基因可编码保护细菌 DNA 解旋酶和拓扑异构酶  $\Omega$  保护蛋白, 从而起到拮抗喹诺酮类药物的作用, 导致喹诺酮类药物失去效果<sup>[28]</sup>。该基因家族与多种酶基因相关, 虽然单纯由其介导的耐药性水平较低, 但质粒可在细菌间发生水平转移并引起其他基因突变<sup>[29]</sup>。该基因家族变体主要包括 *qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD* 和 *qnrS*<sup>[30]</sup>。本实验结果可见, 5 株耐药菌株均携带含有 *qnrS* 基因的质粒, 而 *qnrA*、*qnrB*、*qnrC* 和 *qnrD* 基因未发现。将携带有 *qnrS* 基因的质粒 b 导入大肠杆菌工程菌 DH5 $\alpha$  获得 DH5 $\alpha$ -P, 药敏结果显示菌株 DH5 $\alpha$ -P 对恩诺沙星等喹诺酮类药物的敏感性明显降低, 对其他种类的抗生素没有明显的影响。说明嗜水气单胞菌携带含有 *qnrS* 基因的质粒也是造成其对喹诺酮类药物耐药的原因之一。

嗜水气单胞菌对喹诺酮类药物的耐药机制非常复杂, 通过以上 3 种机制的研究表明, 来自于浙江绍兴和江苏常州的耐药菌株对喹诺酮类药物的耐药机制主要为拓扑异构酶基因关键药物作用靶位的突变和携带耐药基因 *qnrS* 质粒介导的靶位保护, 而外排泵耐药机制在江苏常州的耐药菌株中起到了一定的作用。嗜水气单胞菌在耐喹诺酮类药物过程中, 多种机制共同作用导致的耐药程度显著高于单一作用机制产生的耐药。

## 参考文献

- [1] Hong J, Pan L. Analysing plasmid fingerprinting and relationship between plasmids and resistance in *Aeromonas hydrophila* from fish. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(12): 1908-1915. (in Chinese)  
洪经, 潘连德. 渔源嗜水气单胞菌质粒的指纹图谱及其耐药性的关系. *水产学报*, 2010, 34(12): 1908-1915.
- [2] Cantas L, Midtlyng PJ, Sørnum H. Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmidtra genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Microbiology*, 2012, 19: 3-10.
- [3] Sahoo PK, Pillai BR, Mohanty J, Kumari J, Mohanty S,

- Mishra BK. In vivo humoral and cellular reactions, and fate of injected bacteria *Aeromonas hydrophila* in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(2): 327-340.
- [4] Shen J, Qian D, Liu W, Yin W, Shen Z, Cao Z, Wu Y, Zhang N. Studies on the pathogens of bacterial diseases of macrobrachium nipponense. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2000, 19(3): 222-224. (in Chinese)  
沈锦玉, 钱冬, 刘问, 尹文林, 沈智华, 曹铮, 吴颖蕾, 张念慈. 养殖青虾“红鳃病”病原的研究. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2000, 19(3): 222-224.
- [5] Del Castillo CS, Hikima J, Jang HB, Nho SW, Jung TS, Wongtavatchai J, Kondo H, Hirono I, Takeyama H, Aoki T. Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(1): 120-129.
- [6] Shakir Z, Khan S, Sung K, Khare S, Khan A, Steele R, Nawaz M. Molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Aeromonas* spp. isolated from imported shrimp. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(22): 8137-8141.
- [7] Li J, Wang T, Shao B, Shen J, Wang S, Wu Y. Plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic residues in wastewater and soil adjacent to swine feedlots: potential transfer to agricultural lands. *Environmental Health Perspectives*, 2012, 120(8): 1144-1149.
- [8] Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(2): 231-237.
- [9] Shakir Z, Khan S, Sung K, Khare S, Khan A, Steele R, Nawaz M. Molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Aeromonas* spp. isolated from imported shrimp. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(22): 8137-8141.
- [10] Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(9): 3354-3360.
- [11] Asai T, Sato C, Masani K, Usui M, Ozawa M, Ogino T, Aoki H, Sawada T, Izumiya H, Watanabe H. Epidemiology of plasmid-mediated quinolone resistance in salmonella enterica serovar typhimurium isolates from food-producing animals in Japan. *Gut Pathogens*, 2010, 2

(17): 2-5.

- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- [13] Kawamura Y, Fujiwara H, Mishima N, Tanaka Y, Tanimoto A, Ikawa S, Itoh Y, Ezaki T. First *Streptococcus agalactiae* isolates highly resistant to quinolones with point mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47 (3): 3605-3609.
- [14] Pan X, Hao G, Yao J, Xu Y, Yin W, Shen J. Fusion expression of *Spe* gene with *Hly* gene of *Aeromonas Hydrophila* strain TPS-30 in *Escherichia coli*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34 (3): 591-597. (in Chinese)  
潘晓艺,郝贵杰,姚嘉赟,徐洋,尹文林,沈锦玉.嗜水气单胞菌 TPS-30 株丝氨酸蛋白酶基因与溶血素基因在大肠杆菌中的融合表达.水生生物学报,2010,34(3):591-597.
- [15] Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 50 (2): 921-924.
- [16] Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 60 (2): 394-397.
- [17] Cattoir V, Weill FX, Poirel L, Fabre L, Soussy CJ, Nordmann P. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 59 (4): 751-754.
- [18] Wang X, Xue H, Ding Z, Yang L. Fluoroquinolone Susceptibility and Resistance-associated Genes in Clinical Isolates of *Aeromonas hydrophila*. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2010, 26 (6): 1298-1303. (in Chinese)  
王晓丰,薛晖,丁正峰,杨林.嗜水气单胞菌对氟喹诺酮类药物的敏感性及其耐药相关基因分析.江苏农业学报,2010,26(6):1298-1303.
- [19] Hanne O, Henning S. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase *gyrA* gene from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40 (5): 21-32.
- [20] Alcaide E, Blasco MD, Esteve C. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Research in Microbiology*, 2010, 161 (1): 40-45.
- [21] Hegde SS, Vetting MW, Mitchenall LA, Maxwell A, Blanchard JS. Structural and biochemical analysis of the pentapeptide repeat protein EfsQnr, a potent DNA gyrase inhibitor. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2011, 55 (1): 110-117.
- [22] Liu G, Xu S, Ma J, Zhang S. Enterococcus induced resistance: a laboratory study of antibacterial agents by multiple-step method. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2005, 15 (6): 601-604. (in Chinese)  
刘贵建,许淑珍,马纪平,张淑兰.多步法抗菌药物诱导性肠球菌耐药的实验研究.中华医院感染学杂志,2005,15(6):601-604.
- [23] Dunham SA, Mcpherson CJ, Miller AA. The relative contribution of efflux and target gene mutations to fluoroquinolone resistance in recent clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2010, 29 (3): 279-288.
- [24] Valdezate S, Vindel A, Echeita A, Baquero F, Canto R. Topoisomerase II and IV quinolone resistance-determining regions in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates with different levels of quinolone susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46 (3): 665-671.
- [25] Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2008, 52 (4): 1564-1566.
- [26] Kim ES, Jeong JY, Choi SH, Lee SO, Kim SH, Kim MN, Woo JH, Kim YS. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *qepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate in Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2009, 65 (3): 335-338.
- [27] Rodríguez-Martínez JM, Díaz de Alba P, Briales A, Machuca J, Lossa M, Fernández-Cuenca F, Rodríguez Baño J, Martínez-Martínez L, Pascual Á. Contribution of *OqxAB* efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68 (1): 68-73.
- [28] Xiong X, Bromley EH, Oelschlaeger P, Woolfson DN, Spencer J. Structural insights into quinolone antibiotic



resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a *Qnr* protein from a gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39 (9) : 3917-3927.

- [29] Majumdar T, Das B, Bhadra RK, Dam B, Mazumder S. Complete nucleotide sequence of a quinolone resistance gene (*qnrS2*) carrying plasmid of *Aeromonas hydrophila*

isolated from fish. *Plasmid*, 2011, 66: 79-84.

- [30] Han JE, Kim JH, Cheresca CH, Shin SP, Jun JW, Chai JY, Han SY, Park SC. First description of the *qnrS-like* (*qnrS5*) gene and analysis of quinolone resistance-determining regions in motile *Aeromonas* spp. from diseased fish and water. *Research in Microbiology*, 2012, 163: 73-79.

## Molecular mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas hydrophila*

Yifeng Fang<sup>1,2</sup>, Xiaoyi Pan<sup>2\*</sup>, Lingyun Lin<sup>2</sup>, Jinyu Shen<sup>1,2\*</sup>, Wenlin Yin<sup>2</sup>, Jiayun Yao<sup>2</sup>, Guijie Hao<sup>2</sup>, Yang Xu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China

<sup>2</sup>Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, Zhejiang Province, China

**Abstract:** [Object] To study the resistance mechanisms to quinolones in *Aeromonas hydrophila* isolated from aquatic animals. [Methods] The drug-resistant spectrum of 23 strains was determined. Quinolone-resistance determining regions of *gyrA* and *parC* genes in both screened and *in-vitro* induction drug-resistant strains were analyzed. Then the detection of quinolone drugs relative efflux pump genes *qepA*, *oqxA* and *mdfA* was performed. The *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* and *qnrS* genes were also analyzed at the same time. [Results] All organisms were resistant to more than 5 drugs; 39.1% (9/23) of the isolates were quinolone resistant, of which 55.6% (5/9) were enrofloxacin resistant. All the enrofloxacin-resistant isolates harbored *qnrS* gene, but none of the enrofloxacin-resistant strains harbored *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* genes and the efflux pump genes of *qepA*, *oqxA* and *mdfA*. AH19 possessed the *gyrA* and *parC* genes double mutation, plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS* and efflux pump, 3 drug resistance mechanisms simultaneously, while the two drug-resistant mechanisms of AH4, AH7 and AH20 were *gyrA* and *parC* genes double mutation and *qnrS* gene. *GyrA* gene mutation and *qnrS* gene occurred in AH6. Compared to the strain ATCC7966, the *in-vitro* induction drug-resistant strain ATCC7966-QR had both the *gyrA* and *parC* genes mutation. [Conclusion] The mechanisms of resistance to quinolones in the *A. hydrophila* isolates of this study mainly depended on the existence of plasmid-mediated gene *qnrS* and the variation of the target site of quinolone drugs, whereas, the drug resistance mechanism relying on the efflux pump system only existed in individual strains.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila*, resistance mechanisms, quinolones, drug-resistance spectrum

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest of China (201203085), by the Key Program of Science and Technology of Zhejiang Province of China (2012C12009-4) and by the Natural Science Foundation of Huzhou (2013YZ02)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-572-2046195; E-mail: sjinyu@126.com, panxiaoyi@163.com

Received: 18 July 2013/Revised: 22 September 2013