



嗜水气单胞菌对四环素类药物诱导耐药表型及机理研究

崔佳佳^{1,2}, 王荻¹, 卢彤岩¹, 李绍戊^{1*}

¹ 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070

² 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 【目的】初步探讨利用四环素类药物体外诱导嗜水气单胞菌耐药后, 嗜水气单胞菌对四环素类药物敏感性的变化及其耐药机制。【方法】筛选临床分离嗜水气单胞菌的四环素类敏感株, 从含有1/4×MIC的强力霉素的TSA固体培养基开始, 等比2倍提高诱导药物质量浓度对受试菌进行连续传代培养, 以获得高耐诱导株; 测定诱导菌对强力霉素和16种非诱导药物的最小抑菌浓度(MIC)及添加外排泵抑制剂N-甲基吡咯烷酮(NMP)后的MIC, 分析其敏感性变化与外排作用的关系; 提取诱导菌的DNA, PCR扩增其5个tet基因并测序。【结果】诱导后菌株对强力霉素的MIC显著升高, 对非诱导四环素类药物也有不同程度提高, 对氟喹诺酮类药物的MIC比诱导前增加几十至上千倍; 对氨基糖苷类药物和利福平的MIC则有不同程度的降低; 添加NMP后, 所有诱导菌株对强力霉素的MIC值均有不同程度的下降; 四环素类耐药基因的检测结果表明, 在诱导后7号菌株中同时检测到tetA和tetE; 在诱导前后的2号菌株中检测到tetC; 在诱导前后的1、3、4、5、6、7号菌株中均检测到tetE。【结论】本研究表明tetE基因可能是介导气单胞菌分离株对四环素类药物耐药的优势基因, 为阐明嗜水气单胞菌对四环素类药物耐药机制及耐药性与耐药基因之间的关系提供理论依据。

关键词: 嗜水气单胞菌, 四环素, 强力霉素, 体外诱导, 耐药基因

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属气单胞菌科(Aeromonadaceae)、气单胞菌属(*Aeromonas*), 是一种典型的人-兽-水生动物条件致病菌, 普遍存在于淡水、海水、淤泥以及土壤中, 可以感染多种水生动物^[1-3]。由嗜水气单胞菌引发的急性出血病, 发病急、传播快、流行广、死亡率高, 给

淡水养殖业造成了巨大损失, 成为制约淡水养殖业发展的重要因素之一^[4]。

四环素类药物是一种广谱抗生素, 通过干扰细菌蛋白质的合成而起到抑菌作用^[5], 可用于防治鱼类的多种细菌性疾病, 但因临床上对该类抗生素的不合理使用, 使得嗜水气单胞菌对该类抗

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划(2012BAD25B10); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2014A06XK05)

*通信作者。Tel: +86-451-84861322; Fax: +86-451-84604803; E-mail: swli_1982@163.com

收稿日期: 2015-10-12; 修回日期: 2015-12-14; 网络出版时间: 2016-01-11

生素的耐药性日益增强^[6-7]。

嗜水气单胞菌的耐药机制非常复杂,而单一条件变化即某一种抗生素诱导引起菌株耐药的分子机制易于分析,但对体外应用四环素类药物诱导使敏感菌耐药后的耐药机制的研究则未见报道。为探讨药物诱导引起嗜水气单胞菌耐药的反应机制,本文选用渔用常用药物——强力霉素作为四环素类药物的代表药物,以体外连续诱导的方式获得高度耐药菌,探索研究嗜水气单胞菌对四环素类药物的耐药机制,为阐明嗜水气单胞菌耐药的分子机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源:诱导受试菌株为中国水产科学研究院黑龙江水产研究所养殖室鱼病组分离保存的鱼源嗜水气单胞菌,参考株由珠江水产研究所邓玉婷博士馈赠。

1.1.2 实验试剂:强力霉素(Doxycycline, DO, 98.7%, C13084280)、诺氟沙星(Norfloxacin, NF, 99.1%, C15648000)和恩诺沙星(Enrofloxacin, EN, 98.5%, C13170000)购自Dr. Ehrenstorfer GmbH-Bgm.-Schlosser-Str.6A-86199 Augsburg-Germany;左氧氟沙星(Levofloxacin, LE, 98.5%, 130455-201005)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CP, 99.0%, 1134313-201405)与氧氟沙星(Ofloxacin, OFL, 99.5%, 130454-201206)购自中国药品检定研究院;庆大霉素(Gentamicin, GM, 63.0%, 130326-201015)购自中国食品药品检定研究院;链霉素(Streptomycin, SM, 72.9%, 130308-200713)、卡那霉素(Kanamycin, KM, 66.5%, 130556-200501)、阿米卡星(Amikacin, AM, 65.5%, 130335-200204)、新霉素(Neomycin, NEO, 64.5%, 130309-200811)、土霉素(Oxytetracycline, OTC, 88.8%, 130487-200703)、四环素(Tetracycline, TET, 97.5%,

130488-200403)、氯霉素(Chloramphenicol, 99%, CH, 130303-200614)、氟苯尼考(Florfenicol, 98.2%, FFC, C13665000-200205)、甲砒霉素(Thiamphenicol, 99.5%, THI, 130433-200502)和利福平(Rifampicin, RIF, 99.9%, 130496-200702)均购自中国药品生物制品检定所;N-甲基吡咯烷酮(1-Methyl-2-pyrrolidinone, NMP)购自美国Sigma公司。

实验用药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司,纸片药物-含量(μg)分别为:LE-5、CP-5、NF-10、EN-5、OFL-5、SM-10、KM-30、AM-30、GM-120、NEO-30、OTC-30、TET-30、DO-30、CH-30、FFC-30、THI-30、RIF-5。

实验用胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)、MH肉汤、Mueller-Hinton琼脂培养基均购自青岛科技园海博生物技术有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;实验所用引物的合成及基因目的片段序列测定由哈尔滨博仕生物技术有限公司完成。

1.2 药物敏感和体外诱导试验

采用K-B纸片扩散法进行药敏试验,以ATCC 7966为质控和对照菌株进行药敏试验,筛选出7株四环素类药物敏感的嗜水气单胞菌菌株,分别编号为1-7。

采用微量肉汤稀释法测定菌株对17种受试药物的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。依据菌株药物敏感性结果,将受试菌株分别接种在含有 $1/4 \times \text{MIC}$ 的强力霉素的TSA固体培养基中,28 °C培养传代,等比2倍提高诱导药物质量浓度对受试菌进行连续传代培养,以获得高耐诱导菌,分别编号为D1-D7,并保存每代诱导菌株。

测试诱导试验中所有培养浓度下的诱导菌株MIC值变化情况;测定在MH液体培养基中加入

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的外排泵抑制剂NMP诱导后菌株的MIC。每次试验设置阳性对照(培养基加菌液)和阴性对照(仅加培养基)。

1.3 交叉耐药试验

将诱导筛选出的耐药菌株在TSA固体培养基培养后,用微量稀释法测定菌株对非诱导药物的MIC,并比较诱导前后MIC的变化。若药物诱导后菌株对非诱导药物的MIC比诱导前升高4倍或以上,定为交叉耐药^[8]。

1.4 遗传稳定性试验

将诱导后的菌株在不含药物的TSA固体培养基上连续传代培养20次,每1–2 d接种传代1次,依次测定第5、10、15、20代传代菌株的MIC,以此判断诱导后菌株耐药的遗传稳定性。

1.5 耐药相关基因扩增

取诱导后菌株分离到的单菌落接种于3 mL TSB营养肉汤的试管中,28 $^{\circ}\text{C}$ 过夜振荡培养,无菌条件下取菌液在1.5 mL的EP管中12000 r/min离心收集菌沉淀,按照细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取细菌基因组DNA。

扩增四环素耐药相关基因所用引物^[9–10]信息见表1。PCR反应体系为DNA模板1.0 μL , dNTPs (10 mmol/L) 1.0 μL , 10 \times PCR buffer 5.0 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 3.0 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各2 μL , *Taq* DNA聚合酶(MBI) 4 U,用ddH₂O补足至50 μL 。将经1%琼脂糖凝胶电泳检测为阳性的PCR产物切胶纯化后测序。测序结果通过NCBI中的BLASTn系统进行序列相似性搜索,然后使用DNAMAN软件进行序列间相似性分析。

表1. *tet*基因的相应引物序列
Table 1. Primers for amplifying the *tet* genes

Primers	Sequences (5'→3')	Product length/bp	Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$
<i>tetA</i>	F: GTAATTCTGAGCACTGTCGC / R: CTGCCTGGACAACATTGCTT	956	55
<i>tetB</i>	F: TCATTGCCGATACCACCTCAG / R: CCAACCATCATGCTATTCCATCC	391	55
<i>tetC</i>	F: CTGCTCGCTTCGCTACTTG / R: GCCTACAATCCATGCCAACC	897	55
<i>tetD</i>	F: TGTGCTGTGGATGTTGTATCTC / R: CAGTGCCGTGCCAATCAG	844	53
<i>tetE</i>	F: ATGAACCGCACTGTGATGATG / R: ACCGACCATTACGCCATCC	744	57

2 结果和分析

2.1 体外诱导菌株MIC的变化及交叉耐药情况

受试菌株用诱导药物DO从1/4 \times MIC开始,通过体外连续诱导培养方式获得了DO的高耐诱导菌。高耐诱导菌对DO的MIC与诱导前相比,高耐诱导菌对DO的MIC提高了6.4–102.4倍,加入外排泵抑制剂NMP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)后,高耐诱导菌对DO的MIC比未添加前均有显著下降,降低幅度达4–16倍。而高耐诱导菌在无药平板上连续传代培养20代后,对DO的MIC值基本一致,表明具有良好的遗传稳定性(表2)。

高耐诱导菌对非诱导的16种药物的MIC值均有所变化,对氟喹诺酮类药物LE、CP、NF、EN和OFL的MIC分别比诱导前增加了8–64倍、1–64倍、5–2560倍、2–64倍和1–64倍;对四环素类药物的MIC增加1–32倍;对氯霉素类药物的MIC增加1–64倍;对氨基糖苷类药物的MIC降低1–16倍;对RIF的MIC有小范围的降低(2–8倍)(表3)。

DO诱导后菌株D1–7对16种非诱导药物中的部分药物产生了交叉耐药,具体情况见表4。

由表4可见,高耐诱导菌分别对氟喹诺酮类(LE、CP、NF、EN和OFL)、四环素类(OTC和

表2. 诱导前后及加入NMP后和诱导后代过程中菌株对强力霉素的MIC变化

Table 2. MICs of doxycycline before and after induction as well as NMP added and after induction sub-cultured

Strains	Before selection	After selection	NMP added	5 generation	10 generation	15 generation	20 generation
1	2.50	64	16	64	64	64	32
2	5.00	128	32	128	128	128	64
3	1.25	64	32	64	64	64	64
4	1.25	128	16	128	128	128	128
5	2.50	128	8	64	64	64	64
6	5.00	128	16	128	128	128	64
7	5.00	32	4	32	16	16	16

表3. 诱导前后菌株对非诱导药物MIC的变化

Table 3. MICs of non-induced antibiotics before and after induction

Strains	LE	CP	NF	EN	OFL	SM	KM	AM	GM	NEO	OTC	TET	CH	FFC	THI	RIF
1	0.625	2.500	0.500	1.250	2.50	>128	>128	32	16	>64	>64	40	2	2	8	40
D1	5	20	80	40	20	>128	>128	8	2	32	>64	>80	4	32	8	10
2	0.625	2.500	1	1.250	2.500	>128	16	32	2	2	64	20	0.500	1	2	10
D2	20	40	160	40	40	128	8	8	2	4	64	80	32	64	2	5
3	0.300	0.300	0.125	0.300	0.625	64	32	64	1	2	16	2.500	>64	1	>64	80
D3	10	10	80	20	20	32	8	16	2	4	64	80	4	64	8	40
4	0.150	0.300	0.0625	0.150	0.300	64	32	32	4	4	64	10	1	1	2	10
D4	10	20	160	10	20	8	4	4	2	2	>64	>80	2	8	2	10
5	0.625	2.500	1	1.250	2.500	>128	16	32	2	>64	>64	10	32	64	>64	10
D5	20	20	160	80	40	>128	>128	8	2	64	64	80	64	>64	>64	5
6	0.625	2.500	2	1.250	1.250	>128	>128	64	64	32	>64	80	>64	64	>64	10
D6	20	80	160	40	40	>128	128	4	8	4	>64	>80	>64	>64	>64	1.25
7	0.300	0.625	0.250	0.625	0.625	32	32	16	2	2	64	20	16	>64	>64	>80
D7	0.150	0.625	1.250	1.250	0.625	16	32	8	2	2	>64	40	16	>64	>64	>80

表4. D1-7交叉耐药情况

Table 4. Cross-resistance of D1-7

Strains	LE	CP	NF	EN	OFL	OTC	TET	KM	CH	FFC
D1	+	+	+	+	+					+
D2	+	+	+	+	+		+		+	+
D3	+	+	+	+	+	+	+			+
D4							+			+
D5	+	+	+	+	+		+	+		
D6	+	+	+	+	+	+				
D7										

TET)、氨基糖苷类(KM)和氯霉素类(CH和FFC)药物产生了不同程度的交叉耐药。其中,对KM和CH产生交叉耐药的菌株最少,仅为12.49%;而对5种氟喹诺酮类药物产生交叉耐药的菌株最多,高达71.43%。而D7未对任何1种药物产生交叉耐药现象,但D2和D3对测试的16种非诱导药物中的一半均产生了交叉耐药。

2.2 耐药相关基因扩增结果

对诱导前菌株1-7和诱导后菌株D1-7进行了四环素类耐药基因 $tetA$ 、 $tetB$ 、 $tetC$ 、 $tetD$ 和 $tetE$ 的检测,结果如图1所示:检测结果为阳性的菌株数量分别是1、0、2、0和12;其中, $tetA$ 仅在诱导后D7菌株中检出, $tetC$ 仅在2和D2菌株中检出,而 $tetE$ 在诱导前后的1、3、4、5、6、7号菌株中均可检测到, $tetB$ 和 $tetD$ 在所有受试菌株中均未检测到。

2.3 耐药相关基因序列分析

将扩增得到的阳性目的片段切胶回收测序后,使用DNAMAN软件分别对2个 $tetC$ 和12个

$tetE$ 基因片段进行多序列比对分析,结果显示其一致性均为100%。将所得序列信息经NCBI中BLASTn系统序列同源性分析,并构建系统发育树(图2)。

结果显示, $tetA$ 基因与存在于气单胞菌(*Aeromonas*) (GenBank登录号: EF471998.1)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) (GenBank登录号: KP294351.1)、沙门氏菌(*Salmonella enterica* subsp.) (GenBank登录号: KR091911.1)、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) (GenBank登录号: KF483599.2)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) (GenBank登录号: CP011314.1)、大肠杆菌(GenBank登录号: KM023153.1)中的 $tetA$ 基因聚为一簇; $tetC$ 基因与来自嗜水气单胞菌(GenBank登录号: CP010947.1)、克隆载体pLG338 (GenBank登录号: KM604642.1)、大肠杆菌(GenBank登录号为: EU751613.1)以及沙门氏菌(GenBank登录号分别为: AY046276.1、GU987054.1)中的 $tetC$ 基因聚为一簇; $tetE$ 基因则与来自中间气单胞菌(*Aeromonas media*) (GenBank登录号: CP007567.1)、嗜水气单胞菌pAHH01质粒(GenBank登录号: JN315882.1)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida* subsp.) (GenBank登录号: CP000645.1)、杀鲑弧菌(*Vibrio salmonicida*)中质粒pRVS1 (GenBank登录号: NG_035496.1)中的 $tetE$ 基因聚为一簇。

3 讨论

本研究选取渔用常用四环素类药物—DO对临床分离的敏感嗜水气单胞菌分离株从1/4×MIC开始进行逐级诱导,诱导后的菌株对DO耐药性显著增高,对非诱导的四环素类药物—四环素的耐药性也明显上升,四环素类药物MIC上升的幅度达1-32倍,可能与四环素类药物之间结构相似,作用位点相同有关;诱导后菌株对氟喹诺酮类药物

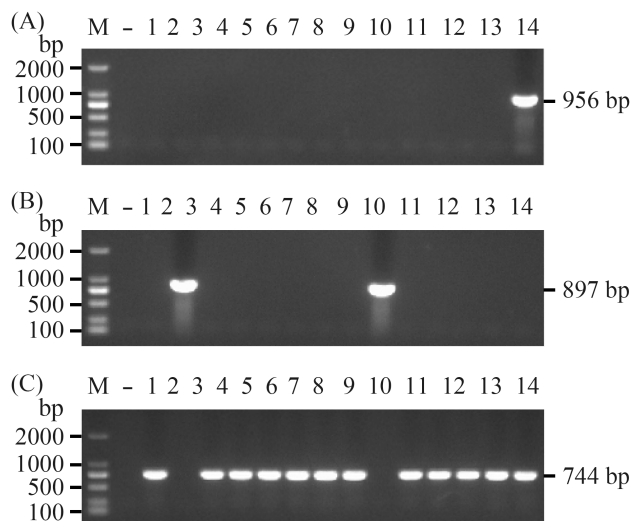


图1. 嗜水气单胞菌 tet 基因PCR扩增结果

Figure 1. PCR amplification of tet genes in *Aeromonas hydrophila*. A, B, C: PCR amplification of $tetA$, $tetC$, $tetE$ genes. M: 2000 bp DNA ladder marker; -: negative control; 1-7: isolates before induction 1-7; 8-14: isolates after induction D1-7.

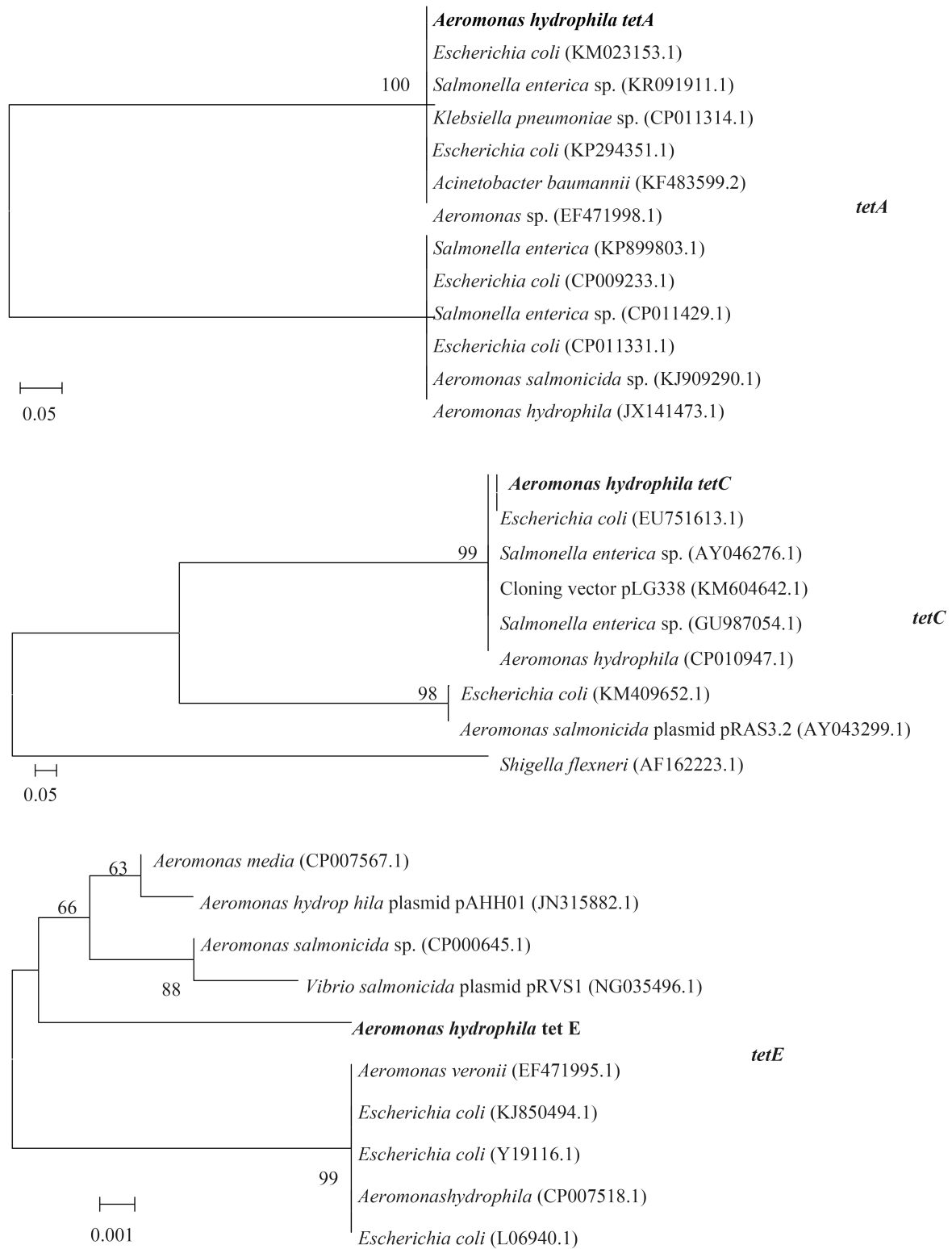


图 2. *tetA*、*tetC*、*tetE*基因系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of *tetA*, *tetC*, *tetE* gene. The serial numbers in brackets mean GenBank accession number; the numbers on branch point mean bootstrap support; the scale means genetic distance.

的MIC增高几十到几千倍, 与氟喹诺酮类药物存在严重的交叉耐药情况; 诱导后菌株对氨基糖苷类和RIF的敏感性有不同程度的增强, 推测其原因可能是菌株在外界环境改变时, 通过改变自身对药物的耐受性以适应环境。但7号菌株诱导为高耐诱导菌D7后, 未与任何非诱导药物产生交叉耐药, 因而推断产生交叉耐药的情况可能与菌株自身特性相关, 需要我们进一步进行研究验证。

诱导菌株药敏试验过程中添加NMP后, 所有诱导菌对被测药物的敏感性均存在不同程度的增高, 提示嗜水气单胞菌中存在1种以四环素类为作用底物的外排泵; 同时也存在其他类型的外排泵。Hernould等^[11]首次报道了嗜水气单胞菌存在引起内源性多重耐药的外排泵*AheABC*, 属于耐药节结化细胞分化(resistance nodulation division, RND)家族, 其作用底物最少有13种, 其中9种为抗生素, 但对四环素类无作用。至于哪一类家族的外排泵对四环素类药物发挥了重要作用, 目前国内外仍在探索之中, 本试验为进一步对嗜水气单胞菌外排泵的耐药机制研究打下了基础。诱导后菌株对多种非四环素类药物耐药, 且在外排泵抑制剂存在时降低DO的MIC, 说明诱导导致了染色体上外排泵基因的强表达, 目前嗜水气单胞菌耐四环素类药物机制中, 已发现*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetH*、*tetG*和*tetM*等, 他们中的大多数编码外排泵蛋白, 但就本实验所做的研究还无法说明哪些基因可能出现突变, 该问题也可作为未来研究的一个方向。

在革兰氏阴性菌中, 两组*tet*基因已经在多种细菌中被检出, 它们分别编码核糖体保护蛋白和外排泵蛋白^[12], 而细菌对四环素类药物的耐药机制主要有2种: 一种是通过核糖体保护蛋白保护核糖体免受四环素类药物的作用从而产生耐药^[13]; 另一种是最早被研究的一种耐药机制^[14], 通过外

排蛋白将四环素主动排出胞外, 降低细胞内的药物浓度, 从而保护了核糖体, 使细菌产生了耐药性。本研究中诱导菌株在药敏试验中添加NMP后, 诱导菌对所有被测药物的敏感性均存在不同程度的增高, 证明嗜水气单胞菌中存在主动外排作用的一种耐药机制。

tetA、*tetB*、*tetC*、*tetD*和*tetE*基因编码四环素的外排蛋白, 外排蛋白是主要异化超家族(Major facilitato superfamily, MFS)中的一员^[15]。研究已经证明, 在气单胞菌中存在以上5个基因, 且*tetE*基因在该5种耐药基因中检出率最高^[16-19]; Nawaz等^[10]对分离自鲶鱼的81株耐四环素的维氏气单胞菌进行了相关研究, 发现*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*和*tetE*基因检出率分别为3.70%、28.40%、2.47%、2.47%和90.12%, 其中*tetE*基因的检出率显著高于其他4个基因, 为其优势基因; 以上结果均与本实验研究结果一致。然而, 赵敏等^[20]研究分离自斑点叉尾鲷的42株维氏气单胞菌, Jacobs^[21]等在对37株分离自南非水产养殖环境中的气单胞菌的研究中, 以及Kim等^[22]对8株分离自韩国的耐四环素杀鲑气单胞菌的研究中都发现*tetA*基因在这些菌株中检出率最高。本研究中诱导前后共14株菌中, 有12株检出*tetE*基因, 占86%; 有2株检出*tetC*基因, 占14%; 1株检出有*tetA*基因, 占7%, 验证了以上研究中*tetE*基因是介导气单胞菌分离株对四环素类药物耐药的优势基因的研究结论。

Nawaz等^[10]和Han等^[23]研究表明*tetA*和*tetE*基因是主要的四环素耐药基因。1株菌中同时检测出2种或2种以上四环素类耐药基因的情况, 在Nawaz等^[10], Schmidt等^[17], Cižek等^[19]以及赵敏等^[20]各自的研究中都已报道, 但本研究选取的7个嗜水气单胞菌分离株及诱导后高耐诱导株仅D7出现了同时含有2个*tet*耐药基因的情况, 也有研究发现, 气单胞菌*tet*基因检出的多少与菌株

MIC的高低没有对应关系^[9]。此外, 我们的研究还发现1号菌株在诱导前未检测到*tetA*, 诱导后的耐药株中检测到*tetA*, 是否是导致1号菌株耐药性升高的直接原因还需进一步深入研究, 但同时说明了*tetA*基因在嗜水气单胞菌耐药机制中可能起到极其重要的作用。

参考文献

- [1] Lu CP. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it. *Journal of Fisheries of China*, 1992, 16(3): 282–288. (in Chinese)
陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报, 1992, 16(3): 282–288.
- [2] Cantas L, Midtlyng PJ, Sørum H. Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid *tra* genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Microbiology*, 2012, 12(1): 37.
- [3] Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35–73.
- [4] Li SW, Wang D, Liu HB, Yin JS, Lu TY. Molecular characterization of integron-gene cassettes in multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* from fish. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(5): 1015–1022. (in Chinese)
李绍戊, 王荻, 刘红柏, 尹家胜, 卢彤岩. 鱼源嗜水气单胞菌多重耐药菌株整合子的分子特征. 中国水产科学, 2013, 20(5): 1015–1022.
- [5] CLSI. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; approved guideline. CLSI document M49-A. Wayne, PA: CLSI, 2006.
- [6] Li AH, Cai TZ, Wu YS, Wang WJ. Investigation on drug resistance of fish bacterial pathogen-*Aeromonas hydrophila* in China. *Microbiology China*, 2001, 28(1): 58–63. (in Chinese)
李爱华, 蔡桃珍, 吴玉深, 王伟俊. 我国鱼类病原——嗜水气单胞的耐药性研究. 微生物学通报, 2001, 28(1): 58–63.
- [7] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(2): 232–260.
- [8] Zhang YJ. Functional proteomic on antibiotic resistance and protective immunogen of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane proteins. *Master Dissertation of Xiamen University*, 2007: 43–44. (in Chinese)
章喻军. 铜绿假单胞菌外膜耐药和保护原功能蛋白组学的研究. 厦门大学硕士学位论文, 2007: 43–44.
- [9] Ndi OL, Barton MD. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(8): 589–599.
- [10] Nawaz M, Sung K, Khan SA, Khan AA, Steele R. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(10): 6461–6466.
- [11] Hernould M, Gagné S, Fournier M, Quentin C, Arpin C. Role of the AheABC efflux pump in *Aeromonas hydrophila* intrinsic multidrug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(4): 1559–1563.
- [12] Zhang XX, Zhang T, Fang HH. Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(3): 397–414.
- [13] Kobayashi T, Suehiro F, Cach Tuyen B, Suzuki S. Distribution and diversity of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins in Mekong river sediments in Vietnam. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59(3): 729–737.
- [14] Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 2007, 128(6): 1037–1050.
- [15] Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57(10): 1486–1513.
- [16] Agersø Y, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen JL. The tetracycline

- resistance gene *tet* (E) is frequently occurring and present on large horizontally transferable plasmids in *Aeromonas* spp. from fish farms. *Aquaculture*, 2007, 266(1/4): 47–52.
- [17] Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen JL. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5675–5682.
- [18] Jun JW, Kim JH, Gomez DK, Choresca CH Jr, Han JE, Shin SP, Park SC. Occurrence of tetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* infection in Korean cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4(9): 849–855.
- [19] Čížek A, Dolejská M, Sochorová R, Strachotová K, Piačková V, Veselý T. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Microbiology*, 2010, 142(3/4): 435–439.
- [20] Zhao M, Wang KY, Wang J, Chen DF, Huang LY, Wang HC. Tetracycline antibiotics resistance and its genetic determinants in *Aeromonas veronii* isolated from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(2): 386–392. (in Chinese)
- 赵敏, 汪开毓, 王均, 陈德芳, 黄凌远, 王浩丞. 斑点叉尾源维氏气单胞菌对四环素类抗生素的耐药性及耐药基因的检测. *水生生物学报*, 2014, 38(2): 386–392.
- [21] Jacobs L, Chenia HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 114(3): 295–306.
- [22] Kim JH, Hwang SY, Son JS, Han JE, Jun JW, Shin SP, Choresca CH Jr, Choi YJ, Park YH, Park SC. Molecular characterization of tetracycline-and quinolone-resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea. *Journal of Veterinary Science*, 2011, 12(1): 41–48.
- [23] Han JE, Kim JH, Choresca CH Jr, Shin SP, Jun JW, Chai JY, Park SC. First description of ColE-type plasmid in *Aeromonas* spp. carrying quinolone resistance (*qnrS2*) gene. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55(4): 290–294.

Tetracyclines-induced phenotype and resistance mechanism in *Aeromonas hydrophila*

Jiajia Cui^{1,2}, Di Wang¹, Tongyan Lu¹, Shaowu Li^{1*}

¹ Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, Heilongjiang Province, China

² College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: [Objective] The aim of this study is to explore the changes of sensitivity to tetracyclines and the resistance mechanism of *Aeromonas hydrophila* (Ah) after *in vitro* induction by exposure Ah to the increasing concentration of Doxycycline (DO). [Methods] The sensitive Ah isolates were first screened from clinical isolates and then incubated on TSA solid medium containing DO of 1/4×MIC value. The resistant strains were obtained through continuous subculture by increasing the concentration of DO in the medium for geometric series. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of induced strains to DO and 16 other non-selected antimicrobials were determined. Meanwhile, MICs were also determined after adding efflux pump inhibitor 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP) to the medium. The relationship between sensitivity changes and efflux function were analyzed. Then five genes of *tet* from induced strains were amplified and sequenced. [Results] The MICs of induced strains to DO increased significantly after induction, whereas the MICs of strains to those non-selected tetracyclines also increased. The MICs of induced strains to fluoroquinolone increased much more than that of control. The induced strains exhibited a little higher sensitivity to aminoglycoside and rifampicin. However, the MICs of all induced strains to DO decreased after adding NMP to the medium. The detection of *tet* genes indicated that *tetA* and *tetE* were positive in No. 7 after induction and the *tetC* gene was positive in No. 2 before and after induction. The *tetE* gene was detected in strains No. 1, 3, 4, 5, 6 and 7 no matter whether it was induced or not. [Conclusion] This study suggested that *tetE* gene may be the predominant gene mediating tetracyclines-resistance of Ah, which would provide theoretical basis to clarify the resistance mechanism of Ah to tetracyclines.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, tetracyclines, doxycycline, induction *in vitro*, resistant genes

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Science & Technology Pillar Program during the 12th Five-year Plan Period (2012BAD25B10) and by the Fundamental Research Funds for Chinese Academy of Fishery Sciences (2014A06XK05)

*Corresponding author. Tel: +86-451-84861322; Fax: +86-451-84604803; E-mail: swli_1982@163.com

Received: 12 October 2015; Revised: 14 December 2015; Published online: 11 January 2016