

养殖鱼源嗜水气单胞菌对氟喹诺酮类药物的耐药机制

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 2150070;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为研究体外诱导敏感嗜水气单胞菌耐药后, 其敏感性变化与基因突变、外排作用的关系, 实验选取对氟喹诺酮类药物敏感的养殖鱼源嗜水气单胞菌临床分离菌株为研究对象, 分别在含亚抑菌浓度恩诺沙星(EN)和诺氟沙星(NF)的培养基上逐步诱导培养, 以获得高耐药菌株; 对诱导菌株*gyrA*和*parC*基因进行扩增和测序分析; 测定诱导菌对诱导药物和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值变化; 并对诱导菌交叉耐药情况进行比较分析。结果发现, 诱导后菌株对EN和NF的MIC分别提高了409.6和4096倍, 对非诱导氟喹诺酮类药物和其他类药物的MIC也有较大变化; 药物诱导后各菌株*gyrA*基因和*parC*基因编码的氨基酸QRDRs区发生了典型的点突变: *GyrA*发生Ser83→Ile变化, *ParC*发生Ser87→Ile/Arg变化; 添加NMP后, 所有诱导菌株对两种药物的MIC值均有不同程度的下降; 诱导后菌株交叉耐药情况与菌株密切相关, 其中3和8号诱导菌株对16种非诱导药物均无交叉耐药反应, 而EN诱导菌株对氨基糖苷类和利福霉素类药物基本未产生交叉耐药反应, NF诱导菌株对除庆大霉素以外的氨基糖苷类和利福霉素类药物基本未产生交叉耐药反应, 所有诱导后菌株均对四环素类和氯霉素类药物产生较严重的交叉耐药。研究表明, 嗜水气单胞菌对氟喹诺酮类耐药存在靶基因位点突变及主动外排作用等多种耐药机制; 且应慎重考虑在防治耐药菌株引发病害时, 交叉耐药情况对选择治疗药物的影响。

关键词: 嗜水气单胞菌; 氟喹诺酮类; 诱导耐药; 基因突变; 交叉耐药

中图分类号: Q 935; S 941

文献标志码: A

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)属气单胞菌科(Aeromonadaceae)、气单胞菌属(*Aeromonas*), 是一种典型的人-兽-水生动物共患病的条件致病菌, 普遍存在于淡水、海水、淤泥以及土壤中, 可以感染多种水产动物^[1-3]。近年来由其引发的养殖水产动物细菌性败血症暴发性死亡在各地多有报道, 给水产养殖业造成巨大经济损失^[4]的同时, 也为产业健康持续发展造成严重困扰。

第三代喹诺酮类抗菌药在喹诺酮的6位引入氟原子, 称氟喹诺酮类药物, 诺氟沙星和恩诺

沙星是该类抗生素中的常用药物^[5], 不仅具有良好的组织渗透性, 且抗菌谱广、不良反应少、能快速杀灭细菌, 在人医、兽医和渔业等方面均有广泛应用^[6]。然而, 由于氟喹诺酮类药物在水产临床细菌性疾病防治过程中的不规范、不合理使用, 导致各地Ah耐药性的普遍产生, 引起药物药效下降甚至失效, 为临床治疗Ah引起的疾病造成极大困难。

目前, 研究已知的细菌对氟喹诺酮类药物耐药机制共分2类, 分别为特异性和非特异性耐药机制。特异性耐药机制包括靶点的改变和耐药

收稿日期: 2015-10-16 修回日期: 2016-01-27

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

通信作者: 李绍戊, E-mail: swli_1982@163.com

性质粒的出现；非特异性耐药机制包括外排泵系统的表达、膜通透性的改变以及生物被膜的产生^[7-8]。氟喹诺酮类药物的主要作用靶点是拓扑异构酶Ⅱ和拓扑异构酶Ⅳ。拓扑异构酶Ⅱ由2个GyrA亚基和2个GyrB亚基组成，拓扑异构酶Ⅳ由2个ParC亚基和2个ParE亚基组成。通过对耐药菌株与敏感菌株对比分析发现，耐药菌株的拓扑异构酶氨基酸序列中存在着不同的点突变，而这些点突变多集中在GyrA、GyrB、ParC和ParE亚基的功能区(GyrA: 67-106 aa, ParC: 71-110 aa)，通常称其为喹诺酮耐药决定区(quinolone resistance-determining regions, QRDRs)^[9]。目前研究认为，靶基因*gyrA*和*parC*发生突变，导致GyrA和ParC一个或多个结构发生改变，与Ah对氟喹诺酮类药物产生耐药性存在密切关系^[10-12]。

氟喹诺酮类药物耐药菌株的快速增加及菌株耐药性的广泛传播引起了国内外研究者对该类药物耐药机制的强烈关注。Ah耐药机制非常复杂，目前系统研究氟喹诺酮类物体外诱导敏感菌，并对诱导后耐药菌株耐药机制进行研究的相关报道较少^[13-14]。为探讨人工诱导引起Ah耐药的相关机制，本实验拟通过恩诺沙星和诺氟沙星对养殖鱼源Ah体外诱导耐药，并对其GyrA和ParC变异情况及主动外排系统对菌株药物敏感性的影响及诱导后交叉耐药情况进行研究，用以分析Ah对氟喹诺酮类药物的耐药机制，为阐明Ah耐药的分子机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌株 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Ah，分离株来源于东北地区养殖鲤鱼，参考株ATCC 7966由珠江水产研究所邓玉婷博士馈赠。

实验试剂 诺氟沙星(Norfloxacin, NF, 99.1%, C15648000)、恩诺沙星(Enrofloxacin, EN, 98.5%, C13170000)和强力霉素(Doxycycline, DO, 98.7%, C13084280)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)、甲砜霉素(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、MH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; 实验所用引物由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成。

1.2 方法

体外诱导及遗传稳定性试验 将EN、NF和NMP分别于无菌条件下用超纯水配成1.6、1.6和50 mg/mL的储存液，分装后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件保存备用，使用时再稀释成所需浓度。

以受试菌株在不含药物的培养基中同步传代培养为对照，依据菌株药物K-B纸片扩散法测定的敏感性结果，将受试菌株分别接种于含有 $1/4\times$ 最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的EN和NF的TSA固体培养基平板中， $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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，至诱导药物质量浓度达到 $128\text{ }\mu\text{g/mL}$ 为止，分别保存每代诱导菌株。

将诱导后的菌株在不含药物的TSA固体培养基中连续传代培养, 并依次测定第5、10、15和20代传代菌株的MIC, 用以判断诱导后菌株耐药的遗传稳定性。

药敏试验 采用K-B纸片扩散法, 以ATCC 7966为质控和对照菌株进行药敏试验, 用以筛选氟喹诺酮类药物敏感的Ah菌株。

微量肉汤稀释法测MIC: 采用灭菌的96孔聚苯乙烯板, 向1~12孔加100 μ L MH肉汤, 第1孔加入100 μ L药液, 倍比稀释至第10孔, 第12孔不加药作为阳性对照, 将培养的菌悬液经MH肉汤稀释后制备成相当于0.5麦氏比浊标准的菌悬液, 向除第11孔外的每孔中加5 μ L菌悬液, 第11孔不加菌作为阴性对照, 密封后置28 $^{\circ}$ C普通空气孵箱中, 孵育18~24 h判断结果。

以无药物添加接种受试菌为阳性对照, 无药物添加不接种受试菌为阴性对照, 采用微量肉汤稀释法、结合96孔细菌培养板对受试菌、各代

诱导菌株对17种受试药物的MIC。同时设置外排泵抑制剂实验组, 在培养基中加入NMP至终浓度为50 μ g/mL, 然后测定菌株MIC值变化。

交叉耐药试验 用微量稀释法测定诱导后的耐药菌株对非诱导药物的MIC值, 并比较诱导前后的MIC值变化。菌株诱导后比诱导前对非诱导药物的MIC升高4倍或以上, 定为交叉耐药^[15]。

靶基因扩增 挑取纯化后单菌落接种于3 mL TSB营养肉汤的试管中, 于气浴摇床中28 $^{\circ}$ C振荡过夜培养, 无菌条件下12 000 r/min离心收集菌体于1.5 mL的EP管中, 按照细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取细菌基因组DNA。

根据参考文献[13, 16]报道的相应引物, 对 *gyrA* 和 *parC* 基因QRDR区及外排泵相关基因 *qepA*、*oqxA* 和 *mdfA* 进行扩增检测, 并经1%琼脂糖凝胶电泳检测目的基因扩增情况。引物具体信息详见表1。

序列测定及分析 PCR阳性扩增产物经哈

表1 扩增基因的相应引物序列

Tab. 1 Primers for amplifying genes

引物名称 primers	引物序列(5'-3') sequences(5'-3')	目的片段长度/bp fragment length	退火温度/ $^{\circ}$ C annealing temperature
<i>gyrA</i>	F:CCTATCTTGATTACGCCATGAG R:CACATAGACGGAGCCACGAC	668	56
<i>parC</i>	F:TACCGAGCAGGCTTACTTGAA R:CCATCCTCCTCGTTCCACA	711	56
<i>qepA</i>	F:CGTGTGCTGGAGTCTTC R:CTGCAGGTACTGCGTCATG	403	52
<i>oqxA</i>	F:CTCGGCGCGATGATGCT R:CCACTCTTCACGGGAGACGA	392	52
<i>mdfA</i>	F:CATTGGCAGCGATCTCCTTT R:TTATAGTCACGACCGACTTCTTCA	103	50

尔滨博仕生物技术有限公司进行序列测定。采用BLUST方法, 测序结果与GenBank上标准Ah序列进行比对分析, 找出氨基酸序列突变位点。

2 结果

2.1 受试、诱导菌株 MIC 变化及稳定性

根据K-B药敏纸片法结果, 共筛选鱼源氟喹诺酮类药物敏感Ah菌株9株为受试菌株, 分别编号为1~9。受试菌经不同浓度EN及NF体外连续诱导, 获得高耐药诱导菌株, 分别编号为E1~9和N1~9。

与诱导前相比, E1~9对EN的MIC提高了6.4~409.6倍, 对非诱导的氟喹诺酮类药物LE、CP、NF和OF的MIC分别比诱导前增加了

32~512倍、8~256倍、1~64倍和8~256倍; 而N1~9对NF的MIC提高了32~4096倍, 对非诱导的氟喹诺酮类药物LE、CP、EN和OF的MIC分别比诱导前增加了2~128倍、8~256倍、40~1280倍和4~128倍; 同时, 个别菌株对氨基糖苷类SM、GM、NEO, 四环素类TET及利福霉素类GIF等其他类药物的MIC略有增加(2~4倍), 但多数菌株对氟喹诺酮类以外药物的MIC略有降低或无显著性变化(表2)。

加入外排泵抑制剂NMP(50 μ g/mL)后, 诱导菌对EN和NF的MIC比未添加前均有所降低, 降低幅度分别为2~16倍和1~16倍; 而诱导菌株在无药平板上连续传代培养20代后, 对EN和NF的MIC值基本不变, 表明诱导菌株具有较好的遗传稳定性(表2)。

表2 诱导前后及加入NMP后和诱导后传代过程中菌株对NF与EN的MIC变化

Tab. 2 MICs of Norfloxacin and Enrofloxacin before and after selection as well as NMP added and after selection subcultured

编号 no.	诱导前 before selection		诱导后 after selection		加NMP后 NMP added		5代 5 generation		10代 10 generation		15代 15 generation		20代 20 generation	
	NF	EN	NF	EN	NF	EN	NF	EN	NF	EN	NF	EN	NF	EN
1	0.500	1.250	128	128	32	64	256	128	128	128	128	128	256	128
2	0.500	2.500	256	64	64	32	256	64	256	64	128	64	128	64
3	4.000	5.000	128	64	8	4	128	32	128	64	64	64	256	64
4	1.000	1.250	128	64	64	64	256	16	256	32	128	16	128	32
5	0.125	0.300	64	32	16	32	128	32	128	32	32	32	32	32
6	0.063	0.150	256	8	32	1	256	8	256	32	128	16	32	16
7	1.000	1.250	64	8	8	4	64	8	128	8	64	8	64	16
8	2.000	1.250	256	128	16	64	256	128	256	8	128	8	256	8
9	0.125	0.300	256	128	32	128	256	128	256	64	128	64	128	64

注: NF. 诺氟沙星; EN. 恩诺沙星

Notes: NF. Norfloxacin; EN. En

2.2 交叉耐药情况

经EN连续诱导至高耐药后的菌株E1~9分别对GM、NEO、OTC、TET、DO、CHL、FFC和THI中的一种或多种产生了交叉耐药。E1~9对GM, ENO, OTC, TET, DO, CHL, FFC和THI产生了不同的交叉耐药情况, 77.78%的菌株对四环素类药物DO产生了交叉耐药; 而仅有12.5%的菌株对氨基糖苷类药物GM和NEO产生了交叉耐药(表3)。E3和E8未对16种非诱导药物中的任何1种产生交叉耐药, 而E6和E9分别对16种非诱导药物中的37.5%和31.25%都产生了交叉耐药现象。

经NF连续诱导至高耐药后的菌株N1~9分别对KM、GM、TET、DO、CHL、FFC、THI和RF中的一种或多种产生了交叉耐药, N1~9对表中8种药物产生了不同的交叉耐药情况, 75%的菌株对氨基糖苷类药物GM和四环素类药物TET产生了交叉耐药; 而仅有12.5%的菌株对氨基糖苷类药物KM和利福霉素类药物RF产生了交叉耐药(表3)。N3和N8未对16种非诱导药物中的任何1种产生交叉耐药, 而N9对16种非诱导药物中的43.75%都产生了交叉耐药现象。

2.3 诱导菌株拓扑异构酶氨基酸序列突变情况

PCR扩增所得*gyrA*和*parC*基因片段测序后比对分析, 结果表明: E1~9和N1~9菌株*gyrA*基因编码的QRDR区第83个氨基酸均发生Ser83→Ile的

表3 E1~9与N1~9交叉耐药情况

Tab. 3 Cross-resistance of E1-9 and N1-9

	KM	GM	NEO	OTC	TET	DO	CHL	FFC	THI	RIF
E1						+	+	+	+	
E2					+	+				
E3										
E4						+	+	+	+	
E5		+		+	+	+				
E6			+		+	+	+	+	+	
E7					+	+				
E8										
E9				+	+	+		+	+	
N1		+								
N2					+	+				
N3										
N4		+			+		+		+	
N5		+			+	+		+		
N6		+			+	+	+	+	+	
N7		+	+		+	+				
N8										
N9		+			+	+	+	+	+	+

注: +. 交叉耐药

Notes: +. cross-resistance

变化; 且E/N1~4及7~8菌株*parC*基因编码的

QRDR区第87个氨基酸发生Ser87→Ile的变化, 而E5菌株的Ser87→Arg。

另外, 部分菌株*gyrA*和*parC*基因编码的非QRDR区氨基酸序列也有点突变的现象发生, 包括*gyrA*基因编码区的Ser116→Asn, Ala137→Ser, Asp202→Ala, Ile212→Val, Gly221→Ala, Val230→Ile; *parC*基因编码区His197→Leu/Tyr, Val200→Ala, Ala212→Val, Ala215→Thr/Val, Val217→Ile, Pro231→Ser的突变。

2.4 诱导菌株的外排泵相关基因的检测结果

诱导后18株耐药菌株的外排泵相关基因*oqxA*、*qepA*和*mdfA*的检测结果都为阴性。

3 讨论

本研究分别选取氟喹诺酮类渔用常用药物EN和NF对临床分离的养殖鱼源敏感Ah菌株从1/4×MIC逐级诱导至高耐药, 表明Ah敏感菌株在逐渐升高浓度的氟喹诺酮类药物的培养基中培养时, 逐步筛选出了高度耐药菌, 与马传玲^[17]等报道的情况一致, 应尽量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^[18]。

EN和NF对受试菌诱导后, 对非诱导的氟喹诺酮类药物的敏感性均出现不同程度的降低, 可能与氟喹诺酮类药物有相似的结构和作用位点有关; 而对其他类药物的敏感性除个别菌株降低外, 大多数菌株均表现为增高趋势。

Hernould等^[19]首次报道了Ah存在引起内源性多重耐药的外排泵*AheABC*, 属于耐药结节化细胞分化超家族(resistance-nodulation-division superfamily, RND), 其作用底物最少有13种, 其中9种为抗生素, 但对氟喹诺酮类无作用。诱导后菌株的药敏试验中添加外排泵抑制剂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, 提示外排泵系统可能在受试Ah菌株耐药机制中起到一定作用。但采用目前已报道的外排泵相关基因*oqxA*、*qepA*和*mdfA*的检测方法, 其检测结果均为阴性, 推测受试Ah菌株外排泵系统可能还存在其他作用机制, 仍需进一步深入研究。

染色体拓扑异构酶基因点突变是引起氟喹诺酮类耐药性的主要原因, 单基因自发突变可导致细菌低水平耐药性, 而双突变则产生高水平耐药性^[20]。有研究表明, 细菌对氟喹诺酮类药物

耐药性的演变多是由单点突变向多点突变进行^[20-21]。薛慧娟等^[22]对临床分离的喹诺酮类耐药Ah的QRDR突变研究发现, 萘啶酸耐药菌株的GyrA均发生突变, 为Ser83→Ile, 而环丙沙星耐药菌株除了GyrA突变外, 其ParC亦同时发生突变, 为Ser87→Ile或Ser87→Arg。国内外研究报告, 临床分离的喹诺酮类耐药气单胞菌在GyrA第83位氨基酸多发生Ser→Ile突变, 也有部分突变为Arg、Val或Asn; 而ParC在第87位变异最多, 为Ser→Ile, 也有突变为Thr及Arg^[11-12]。本研究发现诱导后各菌株GyrA和ParC的氨基酸序列都有发生突变, 虽然各菌株之间的突变位点和突变数目有差异, 但与Ah对氟喹诺酮类药物产生耐药性密切相关的QRDRs区位点均出现了较一致的点突变, 均表现为Ser83→Ile和Ser87→Ile/Arg, 与上述报道结果一致。而诱导后菌株QRDRs区以外的突变位点与突变数目的不同与Ah对氟喹诺酮类药物的MIC值高低无线性关系, 推测*gyrA*基因和*parC*基因QRDRs区以外位点与Ah耐药性无直接联系, 或受其他机制调节; 且部分诱导菌株只在GyrA发生了点突变, 而ParC未发生点突变, 推测可能与氟喹诺酮类药物选择压力下, Ah对氟喹诺酮类耐药性的增加, 除了靶位点突变外, 其他机制可能发挥了重要作用^[14]相关。

同时, 研究结果还表明诱导耐药后的Ah菌株产生了较严重的交叉耐药情况, 其中E9和N9产生交叉耐药的药物种类最多, 而E3、E8、N3和N8无交叉耐药, 由此可见, 不同菌株诱导耐药后对其他非诱导药物的敏感性变化较大, 且与诱导前菌株自身情况密切相关, 如3、8和9号菌株, 值得注意的是, 3和8号菌株诱导前对EN和NF敏感性均较差, 而9号菌株极敏感。另外, 诱导后菌株对四环素类药物产生交叉耐药的, 其次是氯霉素类药物。且EN诱导菌对氨基糖苷类和利福霉素类药物基本未产生交叉耐药反应, NF诱导菌对除庆大霉素以外的氨基糖苷类和利福霉素类药物基本未产生交叉耐药反应, EN和NF所有诱导后菌株均对四环素类和氯霉素类药物产生较严重的交叉耐药。

Ah对氟喹诺酮类药物的耐药机制较复杂, 本研究结果表明, Ah诱导菌株的GyrA和ParC均在QRDRs区发生较一致的点突变, 可能是引起菌株对氟喹诺酮类药物耐药的主要原因; 而外

排泵系统在耐药性变化中也起到了一定作用。且不同菌株耐药后易对四环素类和利福霉素类药物产生交叉耐药。因而,在指导氟喹诺酮类药物临床用药时,应严格按照科学用药指导足量用药以保证药效;同时应严格避免养殖水体中长期、低水平药物残留以避免耐药菌的产生,保证药物治疗效果,遇到氟喹诺酮类耐药菌时应注意耐药菌交叉耐药对后期选择药物治疗的影响。

参考文献:

- [1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.
Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it [J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(3): 282-288 (in Chinese).
- [2] Cantas L, Middlyng P J, 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*) [J]. BMC Microbiology, 2012, 12: 37.
- [3] Janda J M, Abbott S L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2010, 23(1): 35-73.
- [4] 李绍戊, 王荻, 连浩淼, 等. 大西洋鲑杀鲑气单胞菌无色亚种的分离鉴定和致病性研究[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 234-240.
Li S W, Wang D, Lian H M, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Achromogenes* from Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(1): 234-240 (in Chinese).
- [5] Xu H Y, Wang T Y, Zhao Q, et al. Analysis of fluoroquinolones in animal feed based on microwave-assisted extraction by LC-MS-MS determination [J]. Chromatographia, 2011, 74(3-4): 267-274.
- [6] 杨先乐. 新编渔药手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 183-184.
Yang X L. Newfishery medicine manual [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 183-184 (in Chinese).
- [7] Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G A, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase [J]. Nature Medicine, 2005, 12(1): 83-88.
- [8] Seeger M A, Diederichs K, Eicher T, et al. The *AcrB* efflux pump: Conformational cycling and peristalsis lead to multidrug resistance [J]. Current Drug Targets, 2008, 9(9): 729-749.
- [9] Hooper D C. New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance [J]. Clinical Infectious Diseases, 2000, 30(2): 243-254.
- [10] Alcaide E, Blasco M D, Esteve C. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels [J]. Research in Microbiology, 2010, 161(1): 40-45.
- [11] Kim J H, Hwang S Y, Son J S, et al. Molecular characterization of tetracycline- and quinolone-resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea [J]. Journal of Veterinary Science, 2011, 12(1): 41-48.
- [12] Han J E, Kim J H, Cheresca Jr C H, et al. First description of the *qnrS*-like (*qnrS5*) gene and analysis of quinolone resistance-determining regions in motile *Aeromonas* spp. from diseased fish and water [J]. Research in Microbiology, 2012, 163(1): 73-79.
- [13] 邓玉婷, 薛慧娟, 姜兰, 等. 体外诱导嗜水气单胞菌对喹诺酮类耐药及其耐药机制研究[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(1): 12-16.
Deng Y T, Xue H J, Jiang L, et al. Characterization of quinolone resistance mechanism of *Aeromonas hydrophila* selected in vitro [J]. Journal of South China Agricultural University, 2014, 35(1): 12-16 (in Chinese).
- [14] 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[D]. 厦门: 厦门大学, 2007, 43-44.
Zhang Y J. Functional proteomic on antibiotic resistance and protective immunogen of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane proteins [D]. Xiamen: Xiamen University, 2007, 43-44 (in Chinese).
- [15] 方一风, 潘晓艺, 蔺凌云, 等. 嗜水气单胞菌对喹诺酮类药物耐药的分子机制[J]. 微生物学报, 2014, 54(2): 174-182.
Fang Y F, Pan X Y, Lin L Y. Molecular mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas hydrophila* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(2): 174-182 (in Chinese).
- [16] Swick M C, Morgan-Linnell S K, Carlson K M, et al. Expression of multidrug efflux pump genes *arcAB-tolC*, *mdfA*, and *andnorE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance [J].

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 50(2): 921–924.
- [17] 马传玲, 温鸿, 尉骁, 等. 氟喹诺酮类药物对粪肠球菌的防耐药突变浓度研究[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(1): 56–60.
- Ma C L, Wen H, Yu X, *et al.* Mutant prevention concentration of fluoroquinolones for *Enterococcus faecalis* [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2015, 40(1): 56–60 (in Chinese).
- [18] Pallares R, Fenoll A, Liñares J. The epidemiology of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and the clinical relevance of resistance to cephalosporins, macrolides and quinolones [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2003, 22(S1): 15–24.
- [19] Hernould M, Gagné S, Fournier M, *et al.* Role of the AheABCefflux pump in *Aeromonas hydrophila* intrinsic multidrug resistance [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52(3): 1559–1563 (in Chinese).
- [20] 夏蕊蕊, 国宪虎, 张玉臻, 等. 喹诺酮类药物及细菌对其耐药性机制研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(4): 255–261.
- Xia R R, Guo X H, Zhang Y Z, *et al.* Quinolones and the mechanism of quinolone resistance in bacteria [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2010, 35(4): 255–261 (in Chinese).
- [21] Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, *et al.* Mechanism of action of and resistance to quinolones [J]. Microbial Biotechnology, 2009, 2(1): 40–61.
- [22] 薛慧娟, 邓玉婷, 姜兰, 等. 水产动物源嗜水气单胞菌药物敏感性及QRDR基因突变分析[J]. 广东农业科学, 2012, 39(23): 149–153.
- Xue H J, Deng Y T, Jiang L, *et al.* Antimicrobial susceptibility and mutations of QROR in *Aeromonas hydrophila* isolated from aquatic animals [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(23): 149–153 (in Chinese).

***In vitro* study on fluoroquinolone resistance mechanism of *Aeromonas hydrophila* from cultured fish**

CUI Jiajia^{1,2}, WANG Di¹, LU Tongyan¹, LI Shaowu^{1*}

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

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

Abstract: To investigate the relationship between sensitivity varieties, mutations, efflux pump activities and cross-resistance of selected strains after they were selected. The strains of *Aeromonas hydrophila* (Ah) from cultured fish sensitive to fluoroquinolone were selected *in vitro* stepwise exposure to increasing concentration of Norfloxacin (NF) and Enrofloxacin (EN) on solid medium, aiming to gain the fluoroquinolone-resistant isolates. Then genes of *gyrA* and *parC* from selected strains were amplified and sequenced. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of selected and non-selected antimicrobials as well as the MICs after efflux pump inhibition 1-Methyl-2-pyrrolidinone (NMP) was added to each strain were determined by broth microdilution method. Results shows the MICs of EN and NF increased 409.6- and 4096-fold after selection, respectively, while the MICs of non-selected fluoroquinolone and other antimicrobials also changed greatly. Mutations happened in the quinolone resistance-determining region (QRDR) encoded by *gyrA* and *parC* genes after being selected: Ser83→Ile mutations of *GyrA* and Ser87→Ile/Arg mutations of *ParC* were identified. After NMP was added, MICs of all selected strains have declined in different degrees. Cross-resistance of selected strains is closely related to the strain, among the selected strains No. 3 and 8 have no cross-resistance to 16 kinds of non-selected antibiotics, and the strains selected by EN and NF have nearly no cross-resistance to aminoglycosides, rifamycins and aminoglycosides (except GM), rifamycins, separately. All selected strains have great cross-resistance to tetracyclines and chloramphenicols. The resistant mechanisms of Ah to fluoroquinolone might include the target gene mutations and an active efflux system, and we should also pay more attention to the cross-resistance when choosing antimicrobials.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; fluoroquinolone; selection *in vitro*; mutation; cross-resistance

Corresponding author: LI Shaowu. E-mail: swli_1982@163.com

Funding projects: National Key Technology R & D Program of China (2012BAD25B10); Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2014A06XK05)