

## 鱼源嗜水气单胞菌质粒的指纹图谱及其与耐药性的关系

洪 经, 潘连德\*

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 为了解国内各地嗜水气单胞菌的耐药性、质粒指纹图谱及质粒大小与其耐药性之间的关系, 分离、收集了 40 株不同时期来源于国内各地的鱼源嗜水气单胞菌, 通过 K-B 纸片法检测对 29 种抗生素的耐药性, 碱裂解法小量提取质粒后, 采用限制性内切酶 *EcoR* I 及 *Hind* III 对质粒 DNA 进行酶切并对质粒菌株采用溴化乙锭消除处理, 通过琼脂糖凝胶电泳获得质粒指纹图谱, 研究质粒与耐药性的关系。试验结果显示, 嗜水气单胞菌耐药情况严重, 且多重耐药普遍; 40 株嗜水气单胞菌的质粒检出率为 37.5%; 质粒指纹图谱与耐药相关性分析表明, 嗜水气单胞菌的耐药性与所携带质粒的数量和大小无直接关系, 来源相同、耐药类型相似的菌株质粒图谱及酶切质粒图谱相似; 质粒消除试验发现质粒消除率为 100%, 但都只能消除部分质粒; 其中 12 株菌部分耐药表型消失, 提示质粒和染色体分别编码耐药基因, 2.01 kb 的质粒与该菌对萘啶酸、万古霉素的耐药性有关。

**关键词:** 嗜水气单胞菌; 耐药性; 质粒图谱; 酶切图谱; 质粒消除

**中图分类号:** S 917.1

**文献标识码:** A

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 作为水产养殖的主要病原菌之一, 早在 20 世纪 80 年代末, 就发现全国范围内嗜水气单胞菌对多种抗生素产生耐药性<sup>[1]</sup>, 伴随着世界范围内抗生素的滥用, 嗜水气单胞菌的耐药性呈增长趋势, 并产生了多重耐药性菌株<sup>[2]</sup>, 这为嗜水气单胞菌病的防疫及治疗增加了难度。有研究表明, 部分病原菌的大质粒常携带编码对四环素、磺胺、氯霉素等抗性基因<sup>[3,4]</sup>。目前, 国内关于嗜水气单胞菌的研究主要集中在其致病性、致病机理、诊断与检测技术和疫苗制备方面。耐药性质粒方面仅见宋铁英等<sup>[5]</sup>研究了不同来源嗜水气单胞菌对 9 种抗生素的耐药性、质粒与抗药性的相关性及其不同保存、继代条件下菌株耐药稳定性分析, 关于鱼源嗜水气单胞菌的质粒指纹图谱、质粒大小与其耐药性的关系却未见研究。本文通过检测不同鱼源嗜水气单胞菌的耐药性及其质粒, 并结合质粒消除试验, 对质粒消除前后的指纹图谱进行对比分析, 从而

初步研究质粒大小与其耐药性的关系, 为嗜水气单胞菌耐药性的监控及有效防治提供科学依据, 同时也为从分子水平上探讨耐药性的传播打下基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株的来源及鉴定

40 株供试嗜水气单胞菌中, 2 株来源于中国水产科学研究院珠江水产研究所 (S12、S13), 2 株来源于吉林省水产科学研究院 (S6、S7), 1 株来源于江苏省水产技术推广站 (AH9052), 7 株来源于上海海洋大学病原库 (W2、J3、H5、E1、Ba、N2、MN1), 其余菌株为本实验室分离、鉴定保存, 菌株的具体来源及分离日期见表 1。菌株鉴定均采用 biolog ELX808™ 微生物自动分析仪进行鉴定, 通过革兰氏染色及氧化酶试验后, 将细菌接种至革兰氏阴性菌鉴定微平板 (GN2 板) 上, 30 ℃ 培养 16~24 h 后读取鉴定结果, 选用嗜水气单胞菌

收稿日期: 2010-04-12 修回日期: 2010-08-05

资助项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970582); 上海市教育委员会重点项目 (07ZZ135); 上海市长江口中华鲟自然保护区管理处; 上海市重点学科建设项目 (Y1101)

通讯作者: 潘连德, E-mail: ldpan@shou.edu.cn

ATCC7966 标准菌株作质控<sup>[6]</sup>。

## 1.2 菌株的药敏测定

采用 K-B 纸片法进行药敏试验。挑取单菌落接种至普通营养肉汤中,25 ℃、200 r/min 培养过夜后,配制菌悬液浓度为 0.5 号麦氏比浊管,吸取菌悬液 200 μL,涂布于水解酪蛋白琼脂(M-H)培养基上,将药敏纸片贴在培养基表面后,放置25 ℃温箱内培养 14~20 h,然后测量各种药敏纸片抑菌圈直径的大小(以 mm 表示)。参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2009 年抗菌药物敏感试验标准 M100-S19,判读结果,根据抑菌圈直径大小,将药物敏感性分为敏感(S)、中介(I)、耐药(R)三种,以大肠杆菌 ATCC25922,金黄葡萄球菌 ATCC25923 作为质控菌株。

所用药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司:青霉素 G(PG,10 μg)、阿莫西林(AMX,10 μg)、头孢拉定(RAD,30 μg)、庆大霉素(GEN,10 μg)、丁胺卡那(AMK,30 μg)、妥布霉素(TOB,10 μg)、链霉素(STR,10 μg)、奈替米星(NTL,30 μg)、强力霉素(DOX,30 μg)、四环素(TET,30 μg)、米诺环素(MIN,30 μg)、红霉素(ERY,15 μg)、阿奇霉素(AZM,30 μg)、林可霉素(LIN,2 μg)、克林霉素(CLI,30 μg)、氧氟沙星(OFLX,5 μg)、左氧沙星(LEV,5 μg)、环丙沙星(CIP,5 μg)、诺氟沙星(NFL,10 μg)、恩诺沙星(ENR,30 μg)、复方新诺明(SMZ/TMP,23.75/1.25 μg)、呋喃妥因(NFT,300 μg)、呋喃唑酮(FUR,300 μg)、利福平(RFP,5 μg)、万古霉素(VAN,30 μg)、氯霉素(CHL,30 μg)、甲氧胺嘧啶(TMP,5 μg)、奈啶酸(NAL,30 μg)、新霉素(NEO,30 μg)。

## 1.3 质粒指纹图谱

**质粒的提取及检测** 质粒的提取采用宝生物工程(大连)有限公司生产的 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0 及天根生化科技(北京)有限公司生产 TIANprep Mini Plasmid Kit 试剂盒同时进行,按照试剂盒提供的方法进行操作。取 6 μL 质粒 DNA,0.8% 琼脂糖凝胶电泳,电压 105 V,69 min,在紫外透射反射分析仪下观察出现的 DNA 荧光条带,并用凝胶成像系统记录质粒电泳图谱。

**质粒的限制性内切酶试验** 分别将提取的质粒 DNA,用限制性内切酶 *EcoR* I 及 *Hind* III 同

时酶切,以 20 μL 作为一个反应体系,质粒 DNA 5 μL,10 × mol/L Buffer 4 μL,*EcoR* I 1 μL,*Hind* III 1 μL,无菌蒸馏水 9 μL,37 ℃酶切 3 h,以 λ-DNA/*Hind* III Marker 作为分子量标准,电泳方法同上。

## 1.4 质粒 DNA 酶切片段大小的测定

参照陈齐等<sup>[7]</sup>、Hansen 等<sup>[8]</sup>方法进行。以标准 λ-DNA/*Hind* III Marker(其分子量分别为 23.10 × 10<sup>3</sup>,9.40 × 10<sup>3</sup>,6.60 × 10<sup>3</sup>,4.40 × 10<sup>3</sup>,2.30 × 10<sup>3</sup>,2.00 × 10<sup>3</sup>,0.60 × 10<sup>3</sup> bp)的电泳结果为标准系统,以相对迁移率为自变量,建立回归方程,换算出质粒的碱基数。计算用 Quantity one 软件进行操作,每次电泳均设有 λ-DNA/*Hind* III Marker 作为标准。

## 1.5 质粒消除试验

参照 Majumdar 等<sup>[3]</sup>、杨春梅等<sup>[9]</sup>方法进行。将菌株接种于脑心浸液培养基(BHIB)中,25 ℃振荡培养 8 h。取 0.1 mL 接种于含溴化乙锭(EB)(浓度为 30 μg/mL)的 BHIB 中,继续振荡培养。细菌呈轻微浑浊生长时,取 0.1 mL 转接于含同样浓度 EB 的 BHIB 中,继续振荡培养 6 h,重复上述步骤,培养 48 h 后,提取质粒 DNA,电泳检测质粒消除情况并进行限制性内切酶试验。若质粒消除,做药敏试验,质粒未消除,则重复质粒消除试验,以未添加消除剂进行转接培养的菌株作为对照组。

# 2 结果与分析

## 2.1 药敏试验

40 株嗜水气单胞菌对 29 种抗生素药敏试验结果显示,嗜水气单胞菌对常用的抗生素呈现出不同程度的耐药性,在所试的抗生素中,所有的菌株都对 4 种以上的抗生素产生耐药性,35% 的菌株对 9 种以上抗生素耐药,12.5% 的菌株对 15 种以上的抗生素耐药,最多的耐 26 种抗生素。所有菌株均对林可霉素耐药,98% 的菌株对青霉素 G、阿莫西林、克林霉素耐药,85% 的菌株对万古霉素耐药,75% 的菌株对头孢拉定耐药,35% 的菌株对甲氧胺嘧啶、呋喃唑酮耐药,27.5% 的菌株对奈啶酸耐药,25% 的菌株对四环素、利福平耐药,22.5% 的菌株对复方新诺明、氯霉素耐药,17.5% 的菌株对红霉素耐药,15% 的菌株对强力霉素耐药,12.5% 的菌株对呋喃妥因耐药,10% 的菌株对

妥布霉素、链霉素、环丙沙星、诺氟沙星、恩诺沙星耐药,7.5%的菌株对庆大霉素、阿奇霉素、氧氟沙星、左氧沙星耐药,仅一株菌对奈替米星耐药,所有菌株均对丁胺卡那、米诺环素、新霉素高度敏感。嗜水气单胞菌的耐药特性可见图1及表1。

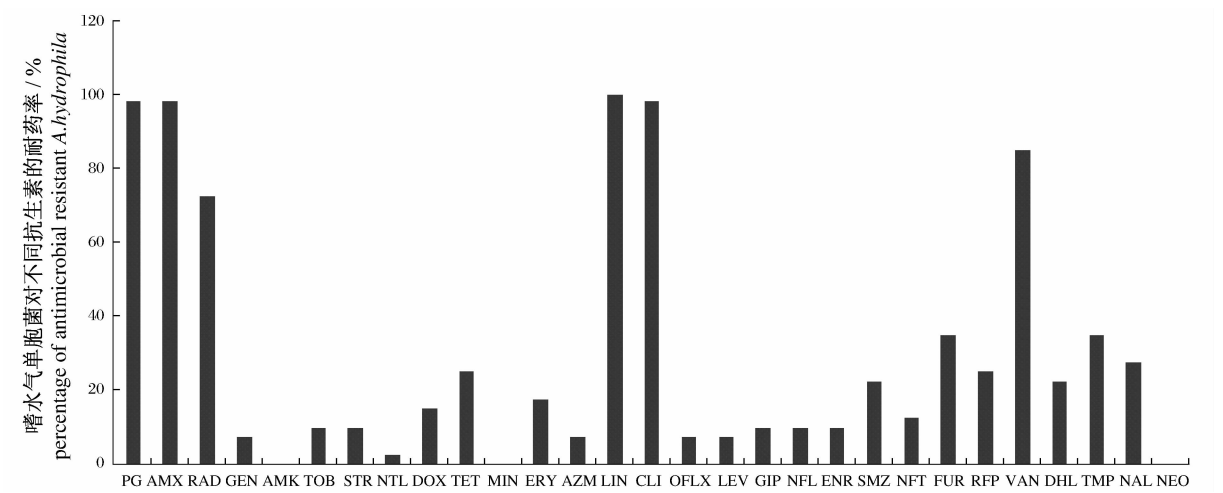


图1 嗜水气单胞菌的耐药特性

Fig. 1 Characterization of antimicrobial resistant *A. hydrophila*

表1 嗜水气单胞菌的分离来源及耐药谱

| Tab. 1 Source and antimicrobial susceptibility test results of <i>A. hydrophila</i> strains |             |              |              |                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|--------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 序号<br>array                                                                                 | 菌株编号<br>no. | 来源<br>source | 分离年份<br>year | 耐药谱<br>drug resistance                                                       |
| 1                                                                                           | S1 *        | 江苏射阳银鲫       | 2009         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, VAN, NAL                                             |
| 2                                                                                           | S2 *        | 江苏射阳银鲫       | 2009         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, VAN, NAL                                             |
| 3                                                                                           | S3 *        | 江苏射阳银鲫       | 2009         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, VAN, NAL                                             |
| 4                                                                                           | S4 *        | 江苏大丰银鲫       | 2009         | PG, AMX, LIN, CLI, VAN, NAL                                                  |
| 5                                                                                           | S5 *        | 江苏射阳银鲫       | 2009         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, VAN, NAL                                             |
| 6                                                                                           | S6          | 吉林永吉鲤鱼       | 2009         | PG, AMX, LIN, CLI                                                            |
| 7                                                                                           | S7          | 吉林永吉草鱼       | 2009         | PG, AMX, LIN, CLI, VAN                                                       |
| 8                                                                                           | S8          | 广东顺德太阳鱼      | 2009         | PG, AMX, LIN, CLI                                                            |
| 9                                                                                           | S9          | 广东广州鲢鱼       | 2009         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, FUR, VAN                                             |
| 10                                                                                          | S10         | 江西南康鲫鱼       | 2009         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, FUR, VAN                                             |
| 11                                                                                          | S11 *       | 广东广州鳊鱼       | 2009         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, FUR, VAN                                             |
| 12                                                                                          | S12 *       | 广东珠江所鳊鱼      | 2008         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, VAN                                                  |
| 13                                                                                          | S13         | 广东珠江所鲫鱼      | 2008         | PG, AMX, RAD, TET, LIN, CLI, RFP, VAN                                        |
| 14                                                                                          | S14         | 江西南昌鲢鱼       | 2008         | PG, AMX, RAD, ERY, LIN, CLI, FUR, RFP, VAN, TMP                              |
| 15                                                                                          | S15         | 广东广州鲢鱼       | 2008         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, FUR, VAN                                             |
| 16                                                                                          | S16 *       | 广东广州鲢鱼       | 2008         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, FUR                                                  |
| 17                                                                                          | S17         | 上海淡水水样       | 2007         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, NFT, FUR, RFP, VAN, CHL, TMP                         |
| 18                                                                                          | S18         | 广东佛山鳊鱼       | 2006         | PG, AMX, RAD, DOX, TET, LIN, CLI, SMZ/TMP, NFT, FUR, RFP, VAN, CHL, TMP, NAL |
| 19                                                                                          | S19         | 上海鳊鱼         | 2005         | PG, AMX, STR, DOX, TET, LIN, CLI, NFT, TUR, VAN, RFP, TMP                    |
| 20                                                                                          | S20         | 广东中山鲟鱼       | 2005         | PG, AMX, RAD, TET, LIN, CLI, SMZ/TMP, FUR, RFP, VAN, TMP, NAL                |

| · 续表 1 ·    |             |              |              |                                                                                                                                      |
|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 序号<br>array | 菌株编号<br>no. | 来源<br>source | 分离年份<br>year | 耐药谱<br>drug resistance                                                                                                               |
| 21          | S21         | 上海草鱼         | 2004         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, FUR, RFP, VAN, TMP                                                                                           |
| 22          | S22         | 广东佛山鳊鱼       | 2004         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, FUR, VAN, TMP                                                                                                |
| 23          | AH9052      | 江苏扬州甲鱼       | 2004         | PG, AMX, RAD, STR, TET, LIN, CLI, SMZ/TMP, VAN, CHL, TMP                                                                             |
| 24          | S23         | 广东广州草鱼       | 2003         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, VAN                                                                                                          |
| 25          | S24         | 浙江杭州甲鱼       | 2002         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, VAN                                                                                                          |
| 26          | S25         | 上海南汇甲鱼       | 2002         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, VAN, TMP                                                                                                     |
| 27          | S26         | 浙江杭州乌鳢       | 2002         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, VAN                                                                                                          |
| 28          | S27 *       | 上海海大鲫鱼       | 2002         | PG, AMX, ERY, LIN, CLI                                                                                                               |
| 29          | S28         | 江苏宜兴鲫鱼       | 2001         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, TET, VAN                                                                                                     |
| 30          | J3          | 福建福清欧鳊       | 2000         | PG, AMX, RAD, GEN, TOB, STR, NTL, DOX, TET, ERY, AZM, LIN, CLI, OFLX, LEV, CIP, NFL, ENR, SMZ/TMP, NFT, FUR, RFP, VAN, CHL, TMP, NAL |
| 31          | MN1 *       | 福建福清欧鳊       | 2000         | PG, AMX, RAD, ERY, AZM, LIN, CLI, SMZ/TMP, VAN, CHL, TMP, NAL                                                                        |
| 32          | N2 *        | 福建长乐欧鳊       | 2000         | PG, AMX, RAD, GEN, TOB, DOX, TET, ERY, LIN, CLI, OFLX, LEV, CIP, NFL, ENR, SMZ/TMP, VAN, CHL, TMP, NAL                               |
| 33          | E1          | 福建福清欧鳊       | 2000         | STR, LIN, SMZ/TMP, NFT, VAN, CHL                                                                                                     |
| 34          | W2 *        | 福建长乐欧鳊       | 2000         | PG, AMX, RAD, GEN, TOB, DOX, TET, ERY, AZM, LIN, CLI, OFLX, LEV, CIP, NFL, ENR, SMZ/TMP, VAN, CHL                                    |
| 35          | H5 *        | 福建长乐欧鳊       | 2000         | PG, AMX, TOB, DOX, TET, ERY, LIN, CLI, CIP, NFL, ENR, SMZ/TMP, CHL, TMP, NAL                                                         |
| 36          | S29 *       | 上海海大鳊鱼       | 1999         | PG, AMX, LIN, CLI                                                                                                                    |
| 37          | S30 *       | 上海海大鲫鱼       | 1999         | PG, AMX, LIN, CLI, VAN                                                                                                               |
| 38          | Ba          | 上海崇明甲鱼       | 1996         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, VAN                                                                                                          |
| 39          | S31         | 广东广州剑尾鱼      | 1993         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, FUR, RFP, VAN                                                                                                |
| 40          | S32         | 广东珠江鲫鱼       | 1992         | PG, AMX, RAD, LIN, CLI, FUR, RFP, VAN, TMP                                                                                           |

注:菌株编号后标“\*”表示为检测出携带有质粒的菌株。  
Notes:“\*”indicates the strains that were detected carrying the plasmids.

2.2 质粒指纹图谱

通过质粒检测,结果发现有 15 株耐药菌携带质粒,检出率为 37.5%,分别采用 Takara 及 TIANprep 试剂盒提取质粒,都能够重复验证质粒提取结果。从图 2、图 3 中可以看出,携带质粒条带最少的为 3 条,最多的为 8 条,质粒 DNA 经 *EcoR* I 及 *Hind* III 双酶切后,条带位置发生了变化,且有些菌株的条带数量经酶切后减少,酶切后质粒大小以 12.60、5.67、4.31、3.10、2.01、1.59 及 1.41 kb 为主,所占比例分别为 8.6%、17.2%、6.9%、6.9%、15.5%、8.6% 及 8.6%,其中 80%、73.3%、33.3% 和 33.3% 的菌株分别含有 5.67、2.01、1.59 及 1.41 kb 大小的质粒(表 2)。试验发现一般来源相同且耐药类型相似的菌株,质粒图谱及酶切图谱基本相同,如菌株 S1、S2、S3、

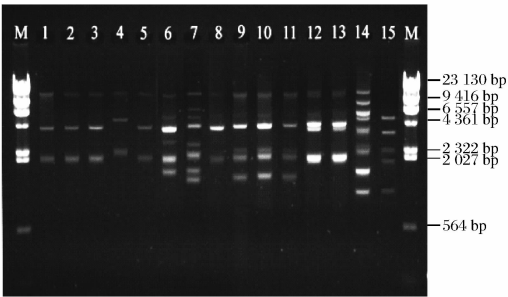


图 2 嗜水气单胞菌质粒图谱

从左到右依次为:M. λ - *Hind* III digest DNA Marker; 1. S1; 2. S2; 3. S3; 4. S4; 5. S5; 6. S11; 7. S12; 8. S16; 9. S27; 10. S29; 11. S30; 12. W2; 13. N2; 14. H5; 15. MN1。

Fig. 2 Plasmid profile of *A. hydrophila*

From left to right: M. λ - *Hind* III digest DNA Marker; 1. S1; 2. S2; 3. S3; 4. S4; 5. S5; 6. S11; 7. S12; 8. S16; 9. S27; 10. S29; 11. S30; 12. W2; 13. N2; 14. H5; 15. MN1.

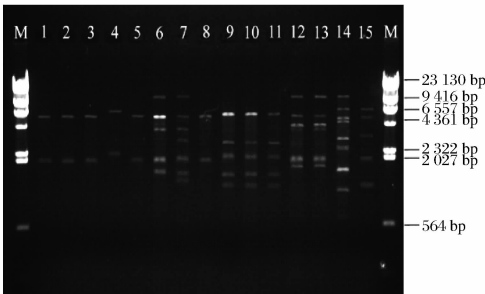


图3 嗜水气单胞菌酶切质粒图谱

从左到右依次为: M.  $\lambda$  - *Hind* III digest DNA Marker; 1. S1; 2. S2; 3. S3; 4. S4; 5. S5; 6. S11; 7. S12; 8. S16; 9. S27; 10. S29; 11. S30; 12. W2; 13. N2; 14. H5; 15. MN1。

Fig. 3 Plasmid macrorestriction map of *A. hydrophila*

From left to right: M.  $\lambda$  - *Hind* III digest DNA Marker; 1. S1; 2. S2; 3. S3; 4. S4; 5. S5; 6. S11; 7. S12; 8. S16; 9. S27; 10. S29; 11. S30; 12. W2; 13. N2; 14. H5; 15. MN1.

S5 均分离自江苏射阳银鲫, 菌株 W2、N2 均分离自福建长乐欧鳗。但是菌株 S1、S16 来源不相同, 耐药类型也不相似, 质粒图谱及酶切图谱基本相同, 可认为这两株菌之间有一定程度的遗传相关性。此外对于携带质粒的菌株, 耐药谱较窄的菌株携带的质粒条带并不一定少于耐药谱广的菌株, 如菌株 W2、N2、MN1 分别耐 19、20、12 种抗生素, 但均含 5 条质粒带, 而菌株 S11、S12、S27、S29、S30 分别耐 7、6、5、4、5 种抗生素, 但分别含 6~7 条质粒带(图 2), 表明其耐药性与质粒的数量和大小没有明显的直接关系。

2.3 质粒消除后的质粒指纹图谱及药敏试验

15 株携带质粒的耐药菌经 EB 处理 48 h 后, 进行质粒 DNA 检测、酶切及药敏试验, 检测发现所有菌株质粒部分条带消除, 质粒消除率为 100%, 质粒指纹图谱发生了明显的变化(图 4, 图 5)。其中有 3 株菌(S29、N2、H5)质粒发生消除现象, 但耐药表型未发生变化; 另有 12 株细菌部分耐药表型消失, 提示质粒和染色体分别编码耐药基因; 未经消除剂处理的菌株质粒指纹图谱未发生变化。采用 EB 处理的菌株主要表现在对萘啶酸、呋喃唑酮、林可霉素、万古霉素、红霉素、阿奇霉素的耐药性丢失及对利福平、万古霉素药物敏感性的增强, 其中萘啶酸、万古霉素的耐药率均降低了 15%; 缺失的质粒大小为 12.60、4.31、3.06、2.42、2.34、2.01、1.80、1.59 及 1.41 kb(表 2, 表 3)。分别采用 Takara 及 TIANprep 试剂盒提取质粒, 经过 5 次重复消除实验, 结果可重复验

证, 说明 EB 对嗜水气单胞菌质粒消除率非常稳定。耐药性质粒消除试验结果表明, 同一质粒消除剂对不同嗜水气单胞菌具有不同的消除效果。

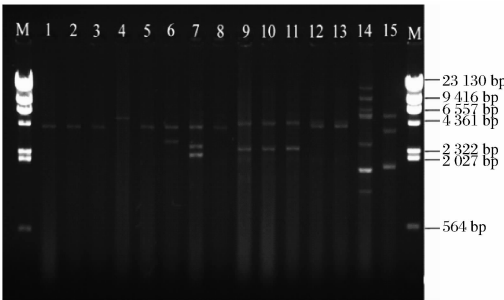


图4 消除后的质粒图谱

从左到右依次为: M.  $\lambda$  - *Hind* III digest DNA Marker; 1. S1; 2. S2; 3. S3; 4. S4; 5. S5; 6. S11; 7. S12; 8. S16; 9. S27; 10. S29; 11. S30; 12. W2; 13. N2; 14. H5; 15. MN1。

Fig. 4 Plasmid profile after curing

From left to right: M.  $\lambda$  - *Hind* III digest DNA Marker; 1. S1; 2. S2; 3. S3; 4. S4; 5. S5; 6. S11; 7. S12; 8. S16; 9. S27; 10. S29; 11. S30; 12. W2; 13. N2; 14. H5; 15. MN1.



图5 消除后的质粒酶切图谱

从左到右依次为: M.  $\lambda$  - *Hind* III digest DNA Marker; 1. S1; 2. S2; 3. S3; 4. S4; 5. S5; 6. S11; 7. S12; 8. S16; 9. S27; 10. S29; 11. S30; 12. W2; 13. N2; 14. H5; 15. MN1。

Fig. 5 Plasmid macrorestriction map after curing

From left to right: M.  $\lambda$  - *Hind* III digest DNA Marker; 1. S1; 2. S2; 3. S3; 4. S4; 5. S5; 6. S11; 7. S12; 8. S16; 9. S27; 10. S29; 11. S30; 12. W2; 13. N2; 14. H5; 15. MN1.

3 讨论

3.1 嗜水气单胞菌的耐药性问题值得重视

关于嗜水气单胞菌对抗生素敏感性的研究, 已有不少报道, 但是各地菌株耐药状况因不同时间、不同来源而存在差异<sup>[2-5, 10-13]</sup>。本次试验的 40 株菌对  $\beta$ -内酰胺类药物(青霉素 G、阿莫西林、头孢拉定)耐药率分别为 98%、98% 及 75%, 与林居纯等<sup>[14]</sup>报道的嗜水气单胞菌对阿莫

表 2 质粒消除前后的质粒酶切图谱及对抗生素的敏感性变化  
Tab.2 Reversal of macrorestriction map and antimicrobial resistance after treatment with EB

| 菌株编号<br>isolate no. | 酶切质粒所含的碱基数( ×10 <sup>3</sup> bp)<br>plasmids size            | 耐药性变化<br>changes in antibiotic resistance                                            |
|---------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| S1,S5               | 5.67, <u>2.01</u>                                            | PG,AMX,RAD,LIN,CLI,VAN,NAL,(RFP)                                                     |
| S2,S3               | 5.67, <u>2.01</u>                                            | PG,AMX,RAD,LIN,CLI,VAN,NAL,(RFP)                                                     |
| S16                 | 5.67, <u>2.01</u>                                            | PG,AMX,RAD,LIN,CLI,FUR                                                               |
| S4                  | 6.56, <u>2.34</u>                                            | PG,AMX,LIN,CLI,VAN,NAL                                                               |
| S11                 | <u>12.60</u> ,5.67,4.31, <u>2.01</u> , <u>1.59</u>           | PG,AMX,RAD,LIN,CLI,FUR,VAN                                                           |
| S12                 | <u>12.60</u> ,5.67,4.31,3.10,2.25, <u>1.59</u> , <u>1.41</u> | PG,AMX,RAD,LIN,CLI,VAN                                                               |
| S27                 | 5.67,3.10, <u>2.01</u> , <u>1.59</u> , <u>1.41</u>           | PG,AMX,ERY,LIN,CLI,(RFP,VAN)                                                         |
| S29                 | 5.67,3.10, <u>2.01</u> , <u>1.59</u> , <u>1.41</u>           | PG,AMX,LIN,CLI(无变化)                                                                  |
| S30                 | 5.67,3.10, <u>2.01</u> , <u>1.59</u> , <u>1.41</u>           | PG,AMX,LIN,CLI,VAN                                                                   |
| W2                  | <u>12.60</u> ,5.67,4.31, <u>2.01</u> , <u>1.80</u>           | PG,AMX,RAD,GEN,TOB,KAN,DOX,TET,ERY,AZM,LIN,CLI,OFLX,LEV,CIP,ENR,SMZ,VAN,CHL          |
| N2                  | <u>12.60</u> ,5.67,4.31, <u>2.01</u> , <u>1.80</u>           | PG,AMX,RAD,GEN,TOB,KAN,DOX,TET,ERY,LIN,CLI,OFLX,LEV,CIP,ENR,SMZ,VAN,CHL,TMP,NAL(无变化) |
| H5                  | 12.60,7.21,5.42,4.86,3.20, <u>2.42</u> ,1.63,1.05            | PG,AMX,TOB,DOX,TET,ERY,LIN,CLI,CIP,NFL,ENR,SMZ,CHL,TMP,NAL(无变化)                      |
| MN1                 | 7.21,5.42, <u>3.06</u> ,1.80, <u>1.41</u>                    | PG,AMX,RAD,ERY,AZM,LIN,CLI,SMZ,VAN,CHL,TMP,NAL                                       |

注:下划线代表质粒消除试验后质粒及耐药性丢失,括号内代表药物敏感性由中介变为敏感。  
Notes:Underlining indicates loss of plasmid and resistance after plasmid elimination treatment, bracket indicates the susceptibility from intermediary to sensitive.

表 3 EB 处理前后菌株耐药率的变化  
Tab.3 Percentage of resistant strains before and after treatment with EB

| 抗生素<br>antibiotics | 耐药率的变化(%)<br>changes in resistance rates |                        |
|--------------------|------------------------------------------|------------------------|
|                    | 处理前<br>before treatment                  | 处理后<br>after treatment |
| LIN                | 100                                      | 97.5                   |
| AZM                | 7.5                                      | 5                      |
| FUR                | 35                                       | 30                     |
| VAN                | 85                                       | 70                     |
| ERY                | 17.5                                     | 15                     |
| NAL                | 27.5                                     | 12.5                   |

西林的耐药率 90% 及其他学者报道的相近<sup>[15-16]</sup>,说明这些菌株对 β-内酰胺类药物已产生严重的耐药性,也有学者认为嗜水气单胞菌对青霉素类药物耐药是一种固有的特性<sup>[13]</sup>。基于林可酰胺类药物(林可霉素、克林霉素)及万古霉素主要作用于革兰氏阳性菌,本次试验菌株为革兰氏阴性菌,对以上药物耐药率达 85% 以上。

本试验嗜水气单胞菌对氨基糖甙类药物具有

较低的耐药率(7.5% ~ 10%),且均对丁胺卡那敏感,这与徐景野等<sup>[17]</sup>和周碧君等<sup>[18]</sup>报道的结果相近,可能是该菌对多数氨基糖甙酶稳定,不易诱导耐药性的产生。这个结果也可以作为临床用药的参考。但源于 2000 年分离的福建欧鳗嗜水气单胞菌,耐药现象特别严重,并且对过去认为抗菌效力强、不易产生耐药性的氟喹诺酮类药物也产生了耐药性,这与养殖过程爆发的红头病、败血症、脱粘病比较严重,抗生素药物的频繁使用有关<sup>[19]</sup>。Jennifer 等<sup>[20]</sup>试验证实从自然环境中分离的细菌,其耐药性明显低于经过抗生素筛选的菌株。这也提示药物污染和长期临界选择是导致嗜水气单胞耐药和多重耐药的主要原因。

3.2 嗜水气单胞菌的质粒与耐药性的关系

质粒是最早发现的染色体外 DNA,常携带多种耐药基因,在细菌耐药性传播中起着非常重要的作用。本次试验结果表明嗜水气单胞菌耐药性与质粒的数量和大小没有明显的直接关系,这与方梅等<sup>[21]</sup>研究的结论一致。但与宋铁英等<sup>[5]</sup>研究认为嗜水气单胞菌耐药性与多拷贝质粒存在相关性,但无质粒或仅有低拷贝质粒的菌株,其耐药

性强弱与质粒无相关性的结论却存在差异。由于质粒在提取过程中呈现出不同的结构特征,如仅仅对提取的质粒图谱进行分析往往产生很大的误差,因此采用质粒酶切图谱可更精确的分析质粒的大小。本试验通过对质粒 DNA 进行双酶切,发现来源相同且耐药类型相似的菌株,质粒图谱及酶切图谱基本相同,这与张莉平等<sup>[22]</sup>研究的结论一致。质粒 DNA 经过双酶切后,不同质粒谱的菌株间也有少数几条相同大小的的质粒条带,如 80% 的菌株含有大小为 5.67 kb 的质粒,73.3% 的菌株含有大小为 2.01 kb 的质粒,可认为 5.67 kb 及 2.01 kb 的质粒为嗜水气单胞菌的流行质粒。

本次试验采用 EB 进行质粒消除来研究质粒大小与耐药性的关系,但由于质粒未完全消除掉,质粒消除前后的质粒谱(表 2)不能简单匹配所预期的质粒缺失和耐药表型消失。结果显示,大小为 2.01 kb 质粒消除后有 4 株菌对萘啶酸、万古霉素的耐药性丢失,可初步认为萘啶酸、万古霉素的耐药性主要由大小为 2.01 kb 的质粒介导,但并不是所有含 2.01 kb 质粒条带的菌株都携带这种耐药性,可能(1)与质粒的小部分基因丢失有关;(2)不同菌株质粒 DNA 经过酶切后,只是切出了同样大小的条带,但条带上所携带的基因则完全不同。细菌的耐药机制十分复杂,要清楚地了解各质粒大小与所编码的耐药表型的对应关系,还需摸索出消除率高、消除稳定性强的消除剂以获得最佳效果,并通过质粒结合试验,找出质粒所编码的耐药性。这些问题还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 陈怀青,陆承平. 家养鲤科鱼暴发传染病的病原研究[J]. 南京农业大学学报,1991,14(4):87-91.
- [2] Vivekanandhan G, Savithamani K, Hatha A A M, et al. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002,76(1-2):165-168.
- [3] Majumdar T, Ghosh S, Joydeb Pal, et al. Possible role of a plasmid in the pathogenesis of a fish disease caused by *Aeromonas hydrophila* [J]. Aquaculture, 2006,256:95-104.
- [4] Jacobs L,Chenia H Y. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems [J]. International Journal of Food Microbiology,2007,114:295-306.
- [5] 宋铁英,陈强,郑在予,等. 不同来源嗜水气单胞菌的抗生素耐药性及耐药机制分析[J]. 福建农业学报,2007,23(2):119-124.
- [6] Praphailong W, Van Gestel M, Fleet G H, et al. Evaluation of the biology system for the identification of food and beverage yeasts [J]. Letters in Applied Microbiology,1997,24:455-459.
- [7] 陈齐,陈小英. 不同线性回归方程计算细菌质粒的分子量 [J]. 中国药科大学学报,1995,26(4):242-245.
- [8] Hansen J B, Olsen B H. Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5 [J]. J Bacteriology,1978,135(1):227-238.
- [9] 杨春梅,马治平,王志鹏,等. 黄连素、溴化乙锭、十二烷基硫酸钠对痢疾杆菌耐药质粒的消除作用 [J]. 西北药学杂志,2000,2(15):64-65.
- [10] Son R, Rusul G, Sahilah A M, et al. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia* (*Telapia mossambica*) [J]. Letters in Applied Microbiology,1997,24:479-482.
- [11] Chang B J, Bolton S M. Plasmids and resistance to anti-microbial agents in *Aeromonas hydrophila* clinical isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1987,31:1281-1282.
- [12] Boonyaratpalin S. Bacterial pathogens involved in epizootic ulcerative syndrome of fish in Southeast Asia [J]. Journal of Aquatic Animal Health,1989,1:272-276.
- [13] 李爱华,蔡桃珍,吴玉深,等. 我国鱼类病原——嗜水气单胞菌的耐药性研究 [J]. 微生物学通报,2001,28(1):58-63.
- [14] 林居纯,罗忠俊,舒刚,等. 嗜水气单胞菌临床分离菌对抗菌药物的耐药性调查 [J]. 安徽农业科学,2009,37(15):7024-7025.
- [15] Saavedra M J, Guedes N S, Alves A, et al. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. International Microbiology,2004,7:207-211.
- [16] 童照威,张龙琪,王伟洪,等. 嗜水气单胞菌感染现状与耐药分析 [J]. 中国微生态学杂志,2008,20(1):75-76.
- [17] 徐景野,许国章,金春光,等. 贝(甲)壳类海产品中检出致病性气单胞菌的耐药性分析 [J]. 中国预防

医学杂志,2007,8(5):513-515.

[18] 周碧君,李永明,温贵兰,等. 斑点叉尾鮰致病性嗜水气单胞菌的分离[J]. 水产科学,2004,23(12):9-12.

[19] 林天龙,陈日升,董传甫,等. 欧鳗嗜水气单胞菌的分离、鉴定和特性分析[J]. 福建农业学报,2001,16(4):34-40.

[20] Jennifer R H, John C Z, Randall M J. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* spp. isolated from environmental sources [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 ( 11 ): 7036-7042.

[21] 方梅,刘衡川,刘渠. 健康人肠道大肠埃希菌耐药性与质粒图谱的研究[J]. 四川大学学报:医学版,2007,38(6):1002-1004.

[22] 张莉平,田兆菊,张西雷,等. 鸡致病性大肠杆菌的质粒 DNA 指纹图谱分析[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2007,38(4):524-528.



## Analysing plasmid fingerprinting and relationship between plasmids and resistance in *Aeromonas hydrophila* from fish

HONG Jing, PAN Lian-de \*

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** To survey antimicrobial resistance, plasmid fingerprinting and relationship between the size of plasmids and resistance in *Aeromonas hydrophila* strains which were isolated and collected from fish at different time and in different areas in China. Antimicrobial susceptibility of 40 strains to 29 different antimicrobials were tested by K-B; plasmids DNA were obtained by alkaline lysis and digested by *EcoR* I and *Hind* III, plasmids elimination were treated by EB, then analyzed by agarose gel electrophoresis. Results showed that *Aeromonas hydrophila* exhibited high antimicrobial resistance, almost was multi-drug resistance; Out of 40 strains, 15 strains (37.5%) contained plasmids; The relationship between the antimicrobial resistance and plasmid fingerprinting showed that the number and size of plasmids the strain carried had no significant correlation with its antimicrobial resistance. Plasmid fingerprinting indicated that the strain with the same source and similar antimicrobial resistance would have similar plasmid profile and macrorestriction map. The rate of plasmid elimination for 15 isolates was 100%, but partially eliminated; meanwhile, the resistance phenotype of 12 isolates partially disappeared, suggesting that plasmid and chromosome encoding the resistance genes, 2.01 kb plasmid was associated with the resistance to Nalidixic acid and Vancomycin.

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*; antimicrobial resistance; plasmid profiles; macrorestriction map; plasmid elimination

**Corresponding author:** PAN Lian-de. E-mail: ldpan@shou.edu.cn