

养殖龟鳖源气单胞菌耐药性与质粒介导 喹诺酮类耐药基因分析

谭爱萍¹, 邓玉婷¹, 姜 兰^{1*}, 吴雅丽¹,
冯永永^{1,2}, 黄玉萍^{1,2}, 罗 理¹, 王伟利¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部渔用药物创制重点实验室,
广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了解养殖龟鳖源气单胞菌的耐药情况及质粒介导的喹诺酮类耐药 (PMQR)、喹诺酮类耐药决定区 (QRDR) 与耐药表型之间的关系; 实验采用 K-B 纸片法测定了 1996—2013 年从广东地区患病龟鳖分离的 67 株气单胞菌对 23 种常见抗菌药物的耐药性, 并检测 5 种 PMQR 基因 *qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*qepA* 和 *aac(6')-Ib-cr*, 同时分析 PMQR 基因阳性菌株染色体上 *gyrA*、*parC* 基因 QRDR 的突变情况。结果显示, 67 株气单胞菌对氨苄西林、头孢噻吩和磺胺复合物的耐药率分别高达 100%、92.54% 和 83.58%, 对喹诺酮类药物呈现中等耐药, 耐药率介于 19.40%~64.18%, 而对亚胺培南、呋喃妥因、阿米卡星、头孢噻肟敏感性较高, 耐药率低于 10%; 79.10% (53/67) 的菌株对 3 类或以上抗菌药物具有耐药性。19.40% (13/67) 的菌株携带 PMQR 基因, 其中, 8.96% (6/67) 携带 *qnrS1* 基因、5.97% (4/67) 携带 *qnrS2* 基因、7.46% (5/67) 携带 *aac(6')-Ib-cr* 基因 [其中 2 株同时携带 *qnrS2* 和 *aac(6')-Ib-cr* 基因]。13 株 PMQR 基因阳性菌株均分别携带 1~4 个质粒, 大小介于 0.8~15 kb; 其中 6 株在 *gyrA* 基因及 *parC* 基因上均发生变异, 3 株仅在 *gyrA* 基因上发生变异, 另外 4 株未发现 QRDR 的基因突变。研究表明, 广东地区龟鳖源气单胞菌对多种抗菌药物耐药并存在多重耐药现象; 而且 PMQR 机制的存在预示着喹诺酮类耐药性很可能在水产临床上更加快速而广泛地传播, 应引起重视。

关键词: 龟鳖; 气单胞菌; 耐药; 质粒介导; 喹诺酮类

中图分类号: Q 938.8; S 966.5

文献标志码: A

龟、鳖作为我国主要的名特优水产养殖品种, 其养殖业起步于 20 世纪 70 年代末, 经过 40 多年的迅猛发展, 已逐步成为推动经济发展和农民致富的一项重要产业。但随着养殖密度的提高、养殖规模的扩大和养殖年份的增加, 养殖龟鳖的各种疾病频发, 特别是由气单胞菌引起的细菌性疾病, 如龟鳖的肠道出血性败血症、穿孔病、红脖子病、红底板病、腐皮病等^[1], 严重制约龟鳖养殖业的发展。

为控制病原菌对龟鳖养殖业造成的损失, 养殖者常使用各种抗菌药物对患病动物进行治疗;

喹诺酮类药物具有抗菌谱广、高效低毒, 副作用小等优点, 在龟鳖病害防治过程中发挥了重要作用; 但随着药物长期、大量、广泛的使用, 亦不可避免地导致了细菌耐药性的出现。长期以来人们认为细菌对喹诺酮类耐药主要由染色体上的靶基因突变或者主动外排机制所致^[2]; 近期的研究陆续发现了各种质粒介导的喹诺酮类耐药机制 (plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR), 其相关的基因包括 *qnr* (*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrR*), *aac(6')-Ib-cr*、*qepA* 和 *oqxAB*^[3], 其中 *qnr*

收稿日期: 2014-02-20 修回日期: 2014-03-30

资助项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203085); 国家自然科学基金青年科学基金 (31302228); 广东省科技计划项目 (2011B020307001)

通信作者: 姜 兰, E-mail: fanjianglan@hotmail.com

的存在能促进染色体上喹诺酮类耐药决定区 (quinolone resistance determining regions, QRDRs) 的靶基因突变, 导致高水平耐药^[4]。PMQR 耐药基因通常位于质粒上, 这不仅增强了细菌对药物的适应性, 而且耐药基因亦可在不同种属细菌之间水平传播。因此 PMQR 的研究已成为人类医学和畜牧兽医耐药研究的热点与焦点^[5-6]。目前水产养殖中已出现喹诺酮类药物的临床耐药菌株^[7-8], 开展水产动物源 PMQR 研究对于抑制喹诺酮类耐药性传播具有重要的意义。

本研究对 1996—2013 年从养殖患病龟鳖病灶或组织分离保存的气单胞菌进行药物敏感性分析、检测其 PMQR 基因携带情况及 PMQR 阳性菌 QRDR 的突变情况, 旨在为龟鳖源气单胞菌喹诺酮类药物耐药性控制研究及临床合理用药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

67 株气单胞菌为本实验室 1996—2013 年从患病龟鳖病灶或组织分离、纯化和保存, 依据参考文献^[9], 通过生理生化特性和分子生物学鉴定为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila* complex) 复合群 28 株、温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria* complex) 复合群 7 株和豚鼠气单胞菌 (*Aeromonas caviae* complex) 复合群 32 株。嗜水气单胞菌标准菌株 ATCC 7966 由浙江省淡水水产研究所馈赠, 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) ATCC 25922 由华南农业大学兽医学院药理教研室馈赠。

胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 购自北京陆桥技术有限责任公司, LB 肉汤、LB 琼脂、水解酪蛋白琼脂 (MH) 购自青岛海博生物技术有限公司。质粒提取试剂盒为 OMEGA 质粒小量提取试剂盒。PCR 所用试剂均为康为世纪生物有限公司产品。

实验室所需药敏试纸为英国 Oxoid 公司产品, -20 °C 冷冻保存。纸片药物及含量 (μg) 分别为氨苄西林 (AMP) 10、阿莫西林/克拉维酸 (AMC) 30、头孢噻吩 (KF) 30、头孢西丁 (FOX) 30、头孢噻肟 (CTX) 30、亚胺培南 (IPM) 10、磺胺复合物 (S3) 300、磺胺甲基异噁唑/甲氧苄啶 (SXT) 25、利福平 (RD) 5、萘啶酸 (NA) 10、恩诺沙星 (ENR) 5、环丙沙星 (CIP) 5、诺氟沙星 (NOR) 10、氧氟沙星 (OFL) 5、四环素 (TE) 30、多

西环素 (DO) 30、土霉素 (OTC) 30、氟苯尼考 (FFC) 30、氯霉素 (C) 30、呋喃妥因 (F) 300、阿米卡星 (AK) 30、庆大霉素 (CN) 10、新霉素 (N) 30。

1.2 实验方法

药物敏感性测定 采用 K-B 纸片扩散法, 以 ATCC 25922、ATCC 7966 作为质控菌和对照菌进行药敏实验。将实验菌株用 LB 肉汤复苏后接种于 TSA 平板, 28 °C 培养 18 ~ 20 h; 挑取单菌落接种于 2 mL LB 营养肉汤, 28 °C 振荡培养 3 ~ 4 h; 用无菌生理盐水将菌液浓度稀释至 0.5 麦氏比浊管的浊度, 用无菌棉拭子均匀涂抹至约 4 mm 厚度的 MH 培养基上, 贴上药敏纸片, 置 35 °C 培养 18 ~ 20 h 后观察结果。参照美国临床实验室标准化委员会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 标准判断实验菌株的药物敏感性^[10-11], 同时参照文献^[12]判断多重耐药结果。数据结果经 WHONE T5.6 耐药监测软件和 SPSS 18.0 软件开展分析。

细菌基因组 DNA 提取 采用水煮法制备细菌 DNA 模板。将实验菌株接种于 LB 琼脂平板, 28 °C 培养 12 ~ 16 h, 挑取适量菌苔放入含 500 μL 1 × TE 的 1.5 mL 灭菌离心管, 混匀后煮沸 10 min, 冰浴 5 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 提取上清液即为 DNA 模板。

PMQR 基因的 PCR 扩增及目的基因片段序列分析 以细菌基因组 DNA 为模板, 根据参考文献报道^[13]设计相应的引物序列及 PCR 反应退火温度 (表 1); 对 PCR 扩增产物进行测序 (引物合成及测序工作由上海博尚生物技术有限公司完成), 将测序结果用 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 在 GenBank 中对目的基因序列进行同源性检索分析。

PMQR 阳性菌质粒的提取 采用 OMEGA 质粒小量提取试剂盒提取。将实验菌株接种于 LB 营养肉汤, 28 °C 振荡培养 12 ~ 16 h, 按试剂盒使用说明进行质粒提取, 检测各菌株携带质粒的情况。

PMQR 阳性菌 QRDR 基因突变分析 参考文献报道^[14]设计相应的 *gyrA*、*parC* 基因扩增引物序列及 PCR 退火温度 (表 1), 对 PCR 扩增产物进行测序 (引物合成及测序工作由上海博尚生物技术有限公司完成), 分析各实验菌株 *gyrA*、*parC* 基因的氨基酸突变情况。

表 1 PMQR 基因与 QRDR 基因的相应引物序列
Tab.1 Primers for amplifying the PMQR and QRDR genes

引物 primers	序列(5'-3') sequence	扩增产物大小/bp size	退火温度/℃ annealing temperature
<i>qnrA</i> -F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	519	58
<i>qnrA</i> -R	GATCGGCAAAGGTCAGGTCA		
<i>qnrB</i> -F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469	58
<i>qnrB</i> -R	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
<i>qnrS</i> -F	ACGACATTCGTCAACTGCAA	417	56
<i>qnrS</i> -R	TAAATTGGCACCTGTAGGC		
<i>qepA</i> -F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	306	60
<i>qepA</i> -R	CTTCCTGCCCGAGTATCGTG		
<i>aac(6')-Ib</i> -F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	55
<i>aac(6')-Ib</i> -R	CTCGAATGCCTGGCGTGT		
<i>gyrA</i> -F	CCATGAGCGTGATCGTAGGA	665	62
<i>gyrA</i> -R	CTTTGGCACGCACATAGACG		
<i>parC</i> -F	GTTCAGCGCCGCATCATCTAC	245	56
<i>parC</i> -R	TTCGGTGTAAACGCATTGCCCGC		

2 结果与分析

2.1 药物敏感性测定

67 株受试菌株对氨基西林、头孢噻吩和磺胺复合物的耐药率较高,分别为 100%、92.54% 和 83.58%;对亚胺培南、呋喃妥因、阿米卡星、头孢噻肟敏感性较高,耐药率在 10% 以下;对喹诺酮

类药物呈现中等耐药,耐药率为 19.40% ~ 64.18% (表 2)。此外,有 53 株菌株(79.10%)对 3 类或以上抗菌药物耐药,其中 15 株(23.88%)对 6 类抗菌药物耐药、14 株(20.90%)对 7 类抗菌药物耐药、3 株(4.48%)对 8 类抗菌药物耐药,表现出较强的多重耐药性(表 3)。

表 2 67 株龟鳖源气单胞菌对 8 类 23 种抗菌药物的药敏实验
Tab.2 Susceptibility of 67 *Aeromonas* isolated from turtles to 8 type (23) antimicrobial agents

类别 type	药物 drug	菌株数(百分数) no. of isolates(percentage)		
		耐药 R	中等 M	敏感 S
β-内酰胺类 β-lactams	氨基西林(AMP)	67(100)	0(0)	0(0)
	阿莫西林/克拉维酸(AMC)	38(56.72)	25(37.31)	4(5.97)
	头孢噻吩(KF)	62(92.54)	0(0)	5(7.46)
	头孢西丁(FOX)	26(38.80)	10(14.93)	31(46.27)
	头孢噻肟(CTX)	3(4.48)	7(10.45)	57(85.07)
磺胺类 sulfonamides	亚胺培南(IPM)	6(8.96)	11(16.41)	50(74.63)
	磺胺复合物(S3)	56(83.58)	1(1.49)	10(14.93)
	磺胺甲基异噁唑/甲氧苄啶(SXT)	46(68.66)	4(5.97)	17(25.37)
喹诺酮类 quinolones	萘啶酸(NA)	43(64.18)	0(0)	24(35.82)
	恩诺沙星(ENR)	28(41.79)	10(14.93)	29(43.28)
	环丙沙星(CIP)	13(19.40)	16(23.88)	38(56.72)
	诺氟沙星(NOR)	15(22.39)	7(10.45)	45(67.16)
四环素类 tetracyclines	氧氟沙星(OFL)	35(52.24)	3(4.48)	29(43.28)
	四环素(TE)	37(55.22)	3(4.48)	27(40.30)
	多西环素(DO)	25(37.31)	1(1.49)	41(61.19)
	土霉素(OTC)	43(64.18)	0(0)	24(35.82)
氨基糖苷类 aminoglycosides	阿米卡星(AK)	4(5.97)	0(0)	63(94.03)
	庆大霉素(CN)	13(19.40)	2(2.99)	52(77.61)
	新霉素(N)	21(31.34)	2(2.99)	44(65.67)
酰胺醇类 amphenicols	氯霉素(C)	26(38.81)	4(5.97)	37(55.22)
	氟苯尼考(FFC)	18(26.87)	2(2.99)	47(70.15)
利福平类 rifampicins	利福平(RD)	47(70.15)	14(20.89)	6(8.96)
硝基呋喃类 nitrofurans	呋喃妥因(F)	5(7.46)	7(10.45)	55(82.09)

表 3 67 株龟鳖源气单胞菌对 8 类 23 种抗菌药物的多重耐药情况
Tab. 3 Multidrug resistance of 67 *Aeromonas* isolated from turtles to 8 types (23) antimicrobial agents

耐药型 resistance types	药物种类 medicine types	菌株数 no. of isolates	百分比/% characteristic/total no. of isolates
3 耐 R	①②④;①②⑤;①③⑦	10	14.93
4 耐 R	①②④⑦;①③④⑦	4	5.97
5 耐 R	①②③④⑦;①②③⑥⑦;①②④⑥⑦	7	10.45
6 耐 R	①②③④⑤⑦;①②③④⑥⑦;①②③④⑦⑧;①②③⑤⑥⑦	15	23.88
7 耐 R	①②③④⑤⑥⑦;①②③④⑥⑦⑧	14	20.90
8 耐 R	①②③④⑤⑥⑦⑧	3	4.48

注:①β-内酰胺类 β-lactams;②磺胺类 sulfonamides;③喹诺酮类 quinolones;④四环素类 tetracyclines;⑤氨基糖苷类 aminoglycosides;⑥酰胺醇类 amphenicols;⑦利福平类 rifampicins;⑧硝基呋喃类 nitrofurans

2.2 PMQR 基因检测与序列分析

67 株受试菌株中,有 13 株 (19.40%) 携带了 PMQR 基因,部分菌株的 PCR 产物电泳结果见图 1 和图 2;所获得的 PMQR 基因序列与 BLAST 比对结果显示,有 6 株携带 *qnrS1* 基因 (8.96%)、4 株携带 *qnrS2* 基因 (5.97%)、5 株携带 *aac(6')-Ib-cr* 基因 (7.46%),其中 2 株同时携带 *qnrS2* 和 *aac(6')-Ib-cr* 基因 (2.99%);获得的基因序列均提交至 GenBank 并获取了序列号(表 4)。在本研究实验中没有检测到 *qnrA*、*qnrB* 和 *qepA* 基因。

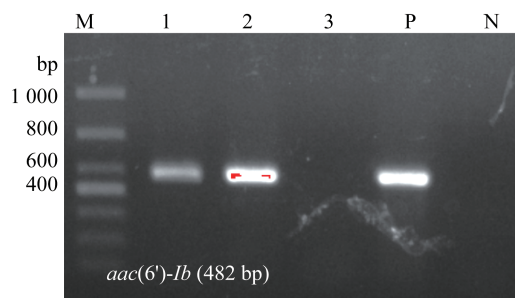


图 1 *aac(6')-Ib* 基因 PCR 电泳图

M. DL1000 分子量标准; 1~3. 样品; P. 阳性对照; N. 空白对照

Fig. 1 The PCR products of *aac(6')-Ib* gene

M. Markers (DL1000); 1-3. sample; P. positive control; N. blank control

2.3 PMQR 阳性菌质粒的提取

携带有 PMQR 基因的 13 株菌株的质粒提取结果显示,13 株菌株分别携带了 1~4 个质粒,最大的约 15 kb,最小的约 0.8 kb(图 3)。

2.4 PMQR 阳性菌株 QRDR 基因变异情况

携带了 PMQR 基因的 13 株菌株的 *gyrA* 和 *parC* 基因测序结果显示,有 6 株同时存在 *gyrA*

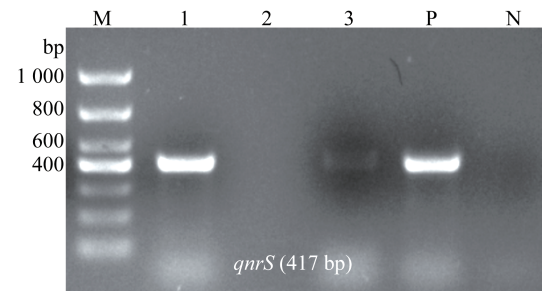


图 2 *qnrS* 基因 PCR 电泳图

M. DL1000 分子量标准; 1~3. 样品; P. 阳性对照; N. 空白对照

Fig. 2 The PCR products of *qnrS* gene

M. Markers (DL1000); 1-3. sample; P. positive control; N. blank control

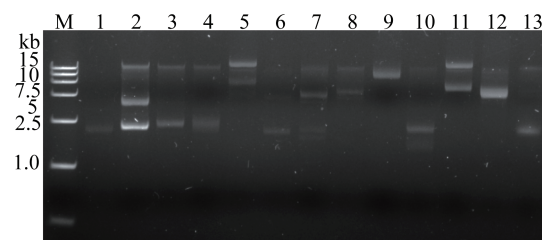


图 3 质粒图谱

Fig. 3 The restriction map of the plasmids

M. DL 15 000 marks; 1~13. 28A, 13036, 12013, 12014, 12087, 13002, 44A, 12015, 12044, liver, 17A, 12045, kidney

基因编码的第 83 位丝氨酸 Ser→异亮氨酸 Ile 和 *parC* 基因编码的第 87 位丝氨酸 Ser→异亮氨酸 Ile 的突变,有 3 株仅发生了 *gyrA* 基因靶位点的突变,另外 4 株未发生 *gyrA* 或 *parC* 基因 QRDR 靶位点的突变。发生 QRDR 靶基因突变的菌株均表现出对不同喹诺酮类药物耐药(表 4)。

表 4 PMQR 基因阳性菌的染色体 QRDR 变异情况及耐药谱
Tab. 4 Mutation of QRDR and quinolones resistance music in the PMQR positive strains

菌株 strains	分离年份 isolates year	PMQR	QRDR 突变 QRDR mutation		喹诺酮类耐药谱 quinolones resistance profiles
			<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	
28A	2003	<i>aac(6')-Ib-cr</i> [KC542812]	Ile83	Ile87	NA
17A	2005	<i>qnrS2</i> [KJ162344]			
44A	2007	<i>aac(6')-Ib-cr</i> [KC554068]	Ile83	Ile87	NA\ENR\CIP\NOR\OFL
12013	2012	<i>qnrS1</i> [KJ162351]			NA\ENR\OFL
12014	2012	<i>qnrS1</i> [KJ162347]	Ile83		NA\ENR\OFL
12015	2012	<i>aac(6')-Ib-cr</i> [KJ162339]	Ile83	Ile87	NA\ENR\OFL
12044	2012	<i>qnrS1</i> [KJ162348]	Ile83		NA\ENR\OFL
12045	2012	<i>qnrS1</i> [KJ162349]	Ile83		NA\ENR\CIP\NOR\OFL
12087	2012	<i>qnrS2</i> [KJ162345]			
肾 kidney	2013	<i>qnrS1</i> [KJ162350]	Ile83	Ile87	NA\ENR\OFL
13002	2013	<i>qnrS1</i> [KJ162346]			NA\ENR\OFL
13036	2013	<i>aac(6')-Ib-cr</i> [KJ162341], <i>qnrS2</i> [KJ162343]	Ile83	Ile87	NA\ENR\CIP\NOR\OFL
肝 liver	2013	<i>aac(6')-Ib-cr</i> [KJ162340], <i>qnrS2</i> [KJ162342]	Ile83	Ile87	NA\ENR\CIP\NOR\OFL

3 讨论

3.1 养殖龟鳖源气单胞菌耐药性分析

龟鳖疾病具有潜伏期长、病程长、易导致并发症等特点,严重阻碍了该类动物病害防治的开展。用于治疗龟鳖疾病的药物通常有消毒剂、抗菌药物、中草药等,但这些药物的选用基本上是套用鱼类的使用标准,效果不甚理想^[1],而临床上的不合理用药也使许多致病菌产生耐药性。吴雅丽等^[15]发现临床分离的 112 株水产源气单胞菌对常用抗菌药呈现不同程度的耐药性,爬行、两栖动物来源的分离菌株对氟喹诺酮类、头孢类等药物的耐药率比养殖鱼、虾类的高。蔡丽娟等^[16]发现甲鱼源的气单胞菌耐药率比鱼源的高。胡大胜等^[17]发现广西龟鳖源分离菌的耐药率最高。本研究所测定的 67 株龟鳖源气单胞菌对不同种类的抗菌药物耐药性不同,对氨苄西林、头孢噻吩耐药率高可能与其自身产 β 内酰胺酶天然耐药有关^[18];对头孢菌素类、氨基糖苷类、磺胺类、氟喹诺酮类药物等呈中等耐药或敏感。另外,本研究还发现 79.10% 的龟鳖源气单胞菌对 3 类或以上抗菌药物耐药,而且以耐 6 类和 7 类不同抗菌药物为主,显示龟鳖源气单胞菌对常见抗菌药物的耐药性和多重耐药性较为严重。临床上可考虑采取轮换用药方式以减轻药物的选择性压力,降低细菌耐药性产生的概率。

3.2 养殖龟鳖源气单胞菌喹诺酮类耐药性及其耐药基因分析

本研究结果显示,受试菌株对不同的喹诺酮

类药物的耐药程度不一,对萘啶酸、氧氟沙星和恩诺沙星呈中等耐药,而对诺氟沙星和环丙沙星较敏感,与 Han 等^[19]、吴雅丽等^[15]和薛慧娟等^[20]报道的相似。这与细菌对不同喹诺酮类药物产生耐药的机制不同有关,萘啶酸的作用机制简单,靶位点单一,只作用于 DNA 回旋酶的 A 亚单位 (*gyrA*),容易产生高水平耐药,而其他喹诺酮类药物(氟喹诺酮类)在基本结构上引进氟原子或其他不同基因后,与靶位点的结合能力增强,并介入了其他作用机制,不容易产生高水平耐药^[2]。

1998 年 Martinez 等^[21]首次报道了质粒上 *qnr* (quinolone resistance) 基因介导的氟喹诺酮类药物耐药机制,并发现 *qnr* 基因可在不同细菌间迅速水平传播。随后,在世界多个国家和地区均发现携带 *qnr* 基因的不同种属的细菌。耐药基因 *qnr* 表达的产物可与 DNA 旋转酶及拓扑异构酶 IV 结合,对氟喹诺酮类抗菌药的作用靶位具有保护作用,现已发现有多种类似基因: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrR* 和 *qnrS* 等。目前气单胞菌中已报道的 *qnr* 基因有 *qnrS2*^[7], *qnrS5*^[8] 和 *qnrB1*^[22]; 本研究的 67 株龟鳖源气单胞菌,8 株携带 *qnrS* 基因(其中 6 株携带 *qnrS1*、2 株携带 *qnrS2*),且 *qnrS1* 还未见在气单胞菌中被发现的报道。*aac(6')-Ib-cr* 基因是一种由质粒携带的氨基糖苷乙酰化转移酶的变异基因,它可使细菌对环丙沙星及诺氟沙星的敏感性降低,也能引起对阿米卡星、卡那霉素等氨基糖苷类耐药^[23]; 在本研究检出的 5 株携带 *aac(6')-Ib-cr* 基因的菌株中,有 4 株对

环丙沙星或恩诺沙星耐药,由于环丙沙星是恩诺沙星的代谢产物,由此可见该基因的存在有可能影响了恩诺沙星和诺氟沙星的作用效果。*qepA* 基因是由日本学者在大肠埃希菌株中发现的一种由质粒介导的耐喹诺酮类药物外排泵基因,已被证实位于可转移质粒上,包括一个 1 536 bp 的开放阅读框,含有丰富的 G-C 序列(72%),并可被两端带有 2 拷贝的 IS26 的转座子所介导,在其附近还连接着其他一些耐药基因,如 *rmtB*、*bla_{TEM-1}* 等^[24];本研究中未发现 *qepA* 基因,但由于其所在的质粒可携带多种耐药基因且可水平传播,应引起广大研究者的重视。

PMQR 是喹诺酮类耐药机制的重要组成部分,虽然 PMQR 基因的存在往往仅导致细菌对喹诺酮类药物的敏感性下降,表现为低水平耐药,但 PMQR 基因常与其他耐药机制如超广谱 β 内酰胺酶基因、16SrRNA 甲基化酶基因位于相同的质粒或转座子上,这些耐药元件使细菌耐药性传播更快、范围更广。本研究结果显示 PMQR 基因已逐渐扩散在气单胞菌中,并且携带 PMQR 基因的耐药菌株携带了不同大小的质粒,因而有必要进一步深入开展质粒介导的喹诺酮类药物耐药性在气单胞菌中产生及传播机制的研究。

喹诺酮类耐药决定区(QRDR)的靶基因突变是目前报道的气单胞菌对喹诺酮类耐药的主要机制^[14,20],其中 *gyrA* 基因 QRDR 的突变对喹诺酮类药物耐药的意义最大,其次是 *parC*、*gyrB* 和 *parE*。研究发现,耐药性与突变位点存在一定的关联,苑青艳^[25]通过耐药基因的扩增和测序发现,低水平氟喹诺酮类耐药是由 *gyrA* 改变引起,而高水平耐药是由 *gyrA* 和 *parC* 共同改变引起,且突变位点越多耐药性越强。本研究所检测的携带 PMQR 基因的 13 株龟鳖源气单胞菌中,发生 *gyrA* 或 *gyrA* 和 *parC* 靶位点突变的菌株对 1 种或多种喹诺酮类耐药,而未发生靶基因突变的 2 株菌株亦表现出喹诺酮类药物耐药表型,由此可见喹诺酮类耐药性的产生可能与多种耐药机制的共同作用有关。

喹诺酮类药物耐药机制复杂,存在包括 PMQR 和 QRDR 突变在内的多种耐药机制;PMQR 往往仅导致喹诺酮类低水平的耐药,但 PMQR 基因的存在可以促进细菌染色体 QRDR 的变异,从而导致具有稳定遗传性的高水平耐药性产生。如何控

制 PMQR 基因导致的耐药性产生及传播以及弄清 PMQR 与 QRDR 变异之间的关系还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Hong M L, Fu L R, Wang R P, *et al.* The advances in the research of the turtle's disease [J]. Chinese Journal of Zoology, 2003, 38 (6): 115 - 119. [洪美玲, 付丽容, 王锐萍, 等. 龟鳖动物疾病的研究进展. 动物学杂志, 2003, 38 (6): 115 - 119.]
- [2] Fabrega A, Madurga S, Giralt E, *et al.* Mechanism of action of and resistance to quinolones [J]. Microbial Biotechnology, 2009, 2 (1): 40 - 61.
- [3] Strahilevitz J, Jacoby G A, Hooper D C, *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2009, 22 (4): 664 - 689.
- [4] Martinez-Martinez L, Pascual A, Garcia I, *et al.* Interaction of plasmid and host quinolone resistance [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 51 (4): 1037 - 1039.
- [5] Qu F, Li J, Zhang J L, *et al.* Occurrence of new resistance genes *aac* (6') - *Ib-Cr* and *qnrS* in *Aeromonas* [J]. Infectious Disease Information, 2013, 26 (3): 175 - 177. [曲芬, 李军, 张鞠玲, 等. 气单胞菌中检测到新的耐药基因 *aac* (6') - *Ib-cr* 和 *qnrS*. 传染病信息, 2013, 26 (3): 175 - 177.]
- [6] Yue L, Jiang H X, Liu J H, *et al.* Detection of plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from avian [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42 (8): 2966 - 2971. [岳磊, 蒋红霞, 刘健华, 等. 鸡源肠杆菌质粒介导喹诺酮类耐药基因检测. 中国农业科学, 2009, 42 (8): 2966 - 2971.]
- [7] Majumdar T, Das B, Bhadra R K, *et al.* Complete nucleotide sequence of a quinolone resistance gene (*qnrS2*) carrying plasmid of *Aeromonas hydrophila* isolated from fish [J]. Plasmid, 2011, 66 (2): 79 - 84.
- [8] Han J E, Kim J H, Choresca 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.
- [9] Abbott S L, Cheung W K, Janda J M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes [J].

- Journal of Clinical Microbiology. 2003, 41 (6): 2348 – 2357.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement; M100-S22 [M]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012: 68 – 69.
- [11] Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; M45A-A2 [M]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010: 12 – 13.
- [12] Magiorakos A P, Srinivasan A, Carey R B, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria; an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2012, 18 (3): 268 – 281.
- [13] Liu J H, Deng Y T, Zeng Z L, *et al.* Copevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC (6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52 (8): 2992 – 2993.
- [14] 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. [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. 华南农业大学学报, 2014, 35 (1): 12 – 16.]
- [15] Wu Y L, Deng Y T, Jiang L, *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from various aquatic animals in Guangdong Province [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22 (2): 219 – 224. [吴雅丽, 邓玉婷, 姜兰, 等. 广东省水产动物源气单胞菌对抗菌药物的耐药分析. 上海海洋大学学报, 2013, 22 (2): 219 – 224.]
- [16] Cai L J, Xu B Q, Lin Q C, *et al.* Comparison and Analysis of Drug Resistance to Morbific Bacterium *Aeromonas hydrophila* Isolated from Aquatic Animals [J]. Fisheries Science, 2011, 30 (1): 42 – 45. [蔡丽娟, 许宝青, 林启存. 水产致病性嗜水气单胞菌耐药性比较与分析. 水产科学, 2011, 30 (1): 42 – 45.]
- [17] Hu D S, Huang J, Luo Z H. *et al.* Bacterial disease monitoring and Antimicrobial susceptibilities investigation of Guangxi aquaculture [J]. China Science and Technology Achievements, 2010, (13): 49 – 51. [胡大胜, 黄钧, 罗振海, 等. 广西水产养殖主要细菌病的监测与耐药性调查. 中国科技成果, 2010, (13): 49 – 51.]
- [18] Janda J M, Abbott S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2010, 23 (1): 35 – 73.
- [19] Han J E, Kim J H, Choresca Jr C H, *et al.* A small IncQ-type plasmid carrying the quinolone resistance (*qnrS2*) gene from *Aeromonas hydrophila* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 54 (4): 374 – 376.
- [20] Xue H J, Deng Y T, Jiang L, *et al.* Antimicrobial susceptibility and mutations of QRDR in *Aeromonas hydrophila* isolated from aquatic animals [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39 (23): 149 – 153. [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其 QRDR 基因突变分析. 广东农业科学, 2012, 39 (23): 149 – 153.]
- [21] Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby G A. Quinolone resistance from a transferable plasmid [J]. The Lancet, 1998, 351 (9105): 797 – 799.
- [22] Takasu H, Suzuki S, Reungsang A, *et al.* Fluoroquinolone (FQ) contamination does not correlate with occurrence of FQ-resistant bacteria in aquatic environments of Vietnam and Thailand [J]. Microbes and Environments, 2011, 26 (2): 135 – 143.
- [23] Robicsek A, Strahilevita J, Jacoby G, *et al.* Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase [J]. Nature Medicine, 2006, 12 (1): 83 – 88.
- [24] Kunikazu Y, Junichi W, Satowa S, *et al.* New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *qepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51 (9): 3354 – 3360.
- [25] Yuan Q Y. Study on the Relationship between Fluoroquinolone Sensitivity and Gene Mutations of *Streptococcus suis* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, College of Veterinary Medicine, 2009. [苑青艳. 猪链球菌对氟喹诺酮类药物耐药性与耐药基因的研究. 哈尔滨: 东北农业大学动物医学院, 2009.]

Analysis of antimicrobial susceptibility and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Aeromonas* isolated from turtles

TAN Aiping¹, DENG Yuting¹, JIANG Lan^{1*}, WU Yali^{1,2}, FENG Yongyong^{1,2},
HUANG Yuping^{1,2}, LUO Li¹, WANG Weili¹

(1. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, P. R. China. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

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

Abstract: *Aeromonas* are known to cause several diseases in turtles. Antimicrobial agents, such as fluoroquinolones, are used to prevent and curtail bacterial infections. However, prolonged abuse of antimicrobials agents could result in the selection of fluoroquinolone-resistant *Aeromonas*. Quinolone resistance is due principally to chromosomal mutations or efflux pump. Mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of the *gyrA* and *parC* genes have been shown to be related to quinolone resistance in *Aeromonas* spp. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr*) have been identified exclusively in *Enterobacteriaceae*, but have very rarely been identified in *Aeromonas*. In order to determine antimicrobial susceptibility, the relationship of PMQR, QRDR and resistance profiles in clinical isolates of *Aeromonas* from turtles in Guangdong province, 67 isolates were collected from diseased turtles in 1996 – 2013. All the isolates were tested for resistance to 23 antimicrobial agents by K-B agar disc diffusion method. The PMQR genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* and *aac(6')-Ib-cr* in all these strains were screened by PCR. Then, mutations in QRDR of the *gyrA* and *parC* genes and the plasmids were detected in the PMQR positive strains. All the 67 strains were highly resistant to ampicillin, cephalothin and sulfonamides, the resistance rates of which were 100%, 92.54% and 83.58%, respectively; it showed medium resistance to quinolones, whose rates were 19.40% – 64.18%; the isolates were more susceptible to imipenem, nitrofurantoin, amikacin and cefotaxime, with the resistance rates below 10%. 79.10% (53/67) strains showed multiple-resistance to at least three classes of agents. Of these 67 *Aeromonas* isolates, 19.40% (13/67) harbored PMQR genes. PCR and DNA sequence results showed that 8.96%, 5.97% and 7.46% were positive for genes *qnrS1*, *qnrS2* and *aac(6')-Ib-cr*, respectively, and two strains carried both *qnrS2* and *aac(6')-Ib-cr*. All the 13 PMQR positive strains carried 1 – 4 plasmids, the sizes of which were between 0.8 kb to 15 kb. Among the 13 isolates with PMQR genes, 6 strains showed mutations in both *gyrA* and *parC* genes, 3 strains carried point mutation in *gyrA* gene, and no mutations of both genes were found in 4 strains. These results indicated that *Aeromonas* isolated from turtles in Guangdong were of high level multiple-resistance to widely used drugs. The existence of PMQR genes implied a more widespread dissemination of resistance to quinolones in aquaculture, and this should attract more attention.

Key words: turtles; *Aeromonas*; resistance; plasmid-mediated; quinolones

Corresponding author: JIANG Lan. E-mail: fanjianglan@hotmail.com