

文章编号: 1000-0615(2018)08-1299-08

DOI: 10.11964/jfc.20170110697

外排泵抑制剂对海水养殖源弧菌酰胺醇类药物 耐药性的影响

李健^{1,2}, 赵姝¹, 王元¹, 马立才¹, 刘旭^{1,2}, 房文红^{1*}

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部东海渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 通过检测从海水养殖中分离的对氟苯尼考低敏感弧菌菌株中常见酰胺醇耐药基因的携带情况, 来分析外排泵抑制剂对弧菌酰胺醇耐药性的影响, 旨在研究主动外排机制在我国海水养殖源弧菌耐药中的作用。本研究从前期分离的海水养殖源弧菌中挑选出41株对氟苯尼考低敏感的菌株, 运用琼脂稀释法测定了这些菌株对酰胺醇类药物(氯霉素和氟苯尼考)的敏感性; 利用PCR方法检测了这些菌株的酰胺醇外排泵耐药基因和整合子的携带情况, 包括外排泵基因*floR*、*cmlA*、*pexA*、*fexA*、*fexB*和*optrA*, 以及*Int1*、*SXT*和*ISCR1*整合子相关基因; 同时研究4种外排泵抑制剂对弧菌氯霉素、氟苯尼考最小抑菌浓度(MIC)的影响, 利用琼脂稀释法检测41株弧菌分别加入甲基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)、利血平(reserpine)、羰基氰氯苯腈(carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone, CCCP)和苯丙氨酸-精氨酸-β萘酰胺(Phe-Arg-β-naphthylamide, PAβN)4种外排泵抑制剂前后对氯霉素和氟苯尼考的MIC值的变化情况。副溶血弧菌(14株)、溶藻弧菌(17株)、哈维氏弧菌(8株)、创伤弧菌(2株)共41株氟苯尼考低敏感弧菌敏感度检测结果显示, 氟苯尼考耐药菌株39株、氯霉素耐药菌株11株。41株氟苯尼考低敏感弧菌菌株中, 酰胺醇类外排泵基因*floR*检出率为100%, 而*cmlA*的检出率仅为17.1%, 其他4个外排泵基因均未检出; 整合子相关基因*Int1*、*SXT*和*ISCR1*的检出率分别为46.3% (19/41)、46.3% (19/41)和63.4% (26/41)。41株弧菌中, 添加NMP、利血平、CCCP和PAβN后, 分别有0株、2株、10株和2株弧菌为氯霉素外排阳性菌; 分别有1株、1株、15株和3株弧菌为氟苯尼考外排阳性菌。研究表明, CCCP被验证可以作为有效治疗酰胺醇类药物耐药弧菌的外排泵抑制剂。

关键词: 弧菌; 酰胺醇类药物; 耐药; 外排泵抑制剂; 整合子

中图分类号: Q 935; S 917.1

文献标志码: A

弧菌(*Vibrio* sp.)是引起海水养殖细菌性疾病最主要的病原菌之一, 已成为制约海水养殖发展的主要危害因素。弧菌病的治疗通常采用抗菌药物, 但是随着抗菌药物的大量和不规范使用, 弧菌抗菌药物耐药的发展形势日益严峻, 已成为威胁水产动物养殖和公共卫生安全的重

要隐患。酰胺醇类(amphenicols)药物是一类广谱抗菌药物, 包括氯霉素、氟苯尼考和甲砒霉素; 氯霉素因其严重的毒副作用已被禁用, 氟苯尼考和甲砒霉素是我国批准使用的水产养殖用抗菌兽药。酰胺醇类药物的大规模使用导致水产养殖源弧菌的耐药率逐年升高, 姚小娟^[1]和

收稿日期: 2017-01-21 修回日期: 2017-05-09

资助项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(2013A0603, 2017HY-ZD1006); 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2014)第3-4号]

通信作者: 房文红, E-mail: fwenhong@163.com

刘旭^[2]先后报道了2012—2013年、2014—2015年江苏等地分离到的弧菌对氟苯尼考的耐药率分别为12.1%和28.9%。

细菌对药物的主动外排作用是其产生耐药性的重要途径,细菌内存在的多种类型外排泵是介导外排作用的重要机制。多重耐药外排泵的底物谱广泛,可以外排大量结构不同的抗菌药物,包括CmlA外排蛋白、MexAB-OprM外排蛋白等,在革兰氏阴性菌耐药性方面发挥重要作用^[3]。目前已报道的酰胺醇类药物外排泵基因包括*floR*、*cmlA*、*fexA*、*fexB*和*pexA*等^[4],这些外排泵基因与整合子密切相关^[5]。目前,弧菌中研究发现的的外排泵基因有*floR*和*cmlA*^[6]。然而,外排泵抑制剂可降低细菌对抗菌药物耐药性,例如,使用外排泵抑制剂使氟苯尼考对鸡源大肠杆菌(*Escherichia coli*)的抗菌活性增强4倍^[7],加入利血平后鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)对氯霉素的MIC值降低到原值的1/4^[8]。目前,还未见外排泵抑制剂对弧菌酰胺醇类药物耐药性影响的研究报道。本实验室在开展海水养殖源弧菌耐药性监测的过程中获得了一批对氟苯尼考低敏感的弧菌菌株,本研究拟对这些氟苯尼考低敏感菌株进行酰胺醇类药物耐药表型和基因型的研究,以期揭示外排作用介导的弧菌酰胺醇类药物产生耐药的机理;并且通过比较不同外排泵抑制剂逆转弧菌酰胺醇类药物耐药的效果,为水产养殖过程中弧菌病的防治和酰胺醇类药物耐药的防控提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

41株对氟苯尼考低敏感的弧菌为本实验室于2014—2015年从上海、山东、海南和江苏等地患病水产动物体内分离所得,分别为溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)17株、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)14株、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)8株和创伤弧菌(*V. vulnificus*)2株。药敏实验质控菌株大肠埃希菌(*E. coli*)ATCC25922购自美国典型培养物保藏中心。

1.2 主要试剂

TCBS培养基、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)和2216E固体培养基均购自青岛海博生物技术有限

公司。PremixEx TaqTM(Version 2.0 plus dye)、DNA Maker DL2000、琼脂糖购于生工生物工程(上海)股份有限公司; Wizard基因组DNA纯化试剂盒购于普洛麦格(北京)生物技术有限公司。药敏实验所用抗菌药物标准品氯霉素和氟苯尼考购于中国药品生物制品检验所。外排泵抑制剂甲氨基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)、利血平(reserpine)、羰基氰氯苯腙(carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone, CCCC)和苯丙氨酸-精氨酸-β萘酰胺(Phe-Arg-β-naphthylamide, PABN)购于Sigma公司。

1.3 实验仪器

恒温培养箱, MIR-254, 日本Sanyo; 恒温摇床, SHKE5000-8CE, 美国Thermo; PCR仪, Mastercycler pro, 德国Eppendorf; 电泳仪, DYY-7C, 北京六一仪器厂; 凝胶成像仪, G05-7500, 美国BIO-RAD; 超微量分光光度计, ND5000; 微量移液器, 德国Eppendorf。

1.4 实验方法

菌株DNA的提取 在无菌环境下,将保存于-80℃的弧菌划线于TCBS琼脂平板,28℃培养16~24 h,然后挑取弧菌单菌落接种于2 mL的TSB肉汤(盐度25)中,28℃摇床中200 r/min振荡培养16~18 h,取1 mL菌液置于离心管中12 000 r/min离心2 min,收集菌体,参照Wizard[®]基因组DNA纯化试剂盒的操作说明提取PCR模板DNA。利用超微量分光光度计测定基因组DNA浓度,-20℃保存备用。

药物敏感性试验 本研究采用CLSI描述的琼脂稀释法^[9]测定了受试弧菌对酰胺醇类抗菌药物(氯霉素和氟苯尼考)的敏感性,以大肠杆菌ATCC 25922作为质控菌株。每个菌株做2个平行,共3次重复试验。药敏试验结果判定标准参考CLSI,氯霉素敏感、中介和耐药判定折点分别为≤8 μg/mL、16 μg/mL和≥32 μg/mL;氟苯尼考敏感、中介和耐药判定折点分别为≤2 μg/mL、4 μg/mL和≥8 μg/mL。

酰胺醇类外排泵耐药基因和整合子检测 利用PCR扩增的方法检测了受试菌株中6种外排泵基因的携带情况,包括*floR*^[10]、*cmlA*^[11]、*pexA*^[12]、*fexA*^[12]、*fexB*^[13]和*oprA*^[14],以及1类整合子*Int1*^[15]、4类超级整合子*SXT*^[16]和I型插入序列共同区*ISCR1*^[17]。PCR引物和扩增条件参考上述文

献;扩增产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果在GenBank数据库进行Blast比对分析。

外排泵抑制剂对各菌株氯霉素和氟苯尼考MIC影响的测定 实验前用MH培养基稀释外排泵抑制剂储存液,使甲基吡咯烷酮、利血平、羧基氯苯胺和苯丙氨酸-精氨酸-β萘酰胺终浓度分别为100、40、5和100 μg/mL。4种外排泵抑制剂浓度为本实验室经过预实验检测后确定,其他步骤参考“药物敏感性试验”部分。

2 结果

2.1 弧菌药物敏感性试验结果

药敏结果显示,41株氟苯尼考低敏感弧菌中,2株的MIC结果位于中介,其余39株为耐药菌;有11株弧菌耐氯霉素,23株处于中介,7株对氯霉素敏感。在41株受试弧菌中,11株弧菌同时表现出对氯霉素和氟苯尼考耐药(表1)。

表1 41株弧菌对氯霉素和氟苯尼考的MIC值分布

抗菌药物 antimicrobial agents	MIC值/(μg/mL) MIC value					
	4	8	16	32	64	128
氟苯尼考 florfenicol	2	3	4	10	16	6
氯霉素 chloramphenicol	2	5	23	6	3	2

2.2 酰胺醇类耐药基因的检测结果

酰胺醇类耐药相关外排泵基因的检测结果显示,在41株氟苯尼考低敏感弧菌中仅检测到*floR*、*cmlA*基因,而*pexA*、*fexA*、*fexB*和*optrA*均未被发现(表2)。值得注意的是,41株受试弧菌均为*floR*阳性,检出率高达100%,而*cmlA*的检出率仅为17.1%(7/41)。

2.3 整合子的检测结果

在41株酰胺醇类药物低敏感菌株中,共检测到含1类整合子*Int1*的菌株19株,含4类超级整合子*SXT*菌株19株,含I型插入序列共同区*ISCR1*菌株26株(表3)。其中,同时含有3种整合子相关的弧菌9株,*Int1*和*SXT*阳性的弧菌10株,*Int1*和*ISCR1*阳性的弧菌18株,*SXT*和*ISCR1*阳性的弧菌12株。

表2 41株弧菌外排泵基因检测结果

Tab. 2 The detection results of efflux pump genes in 41 *Vibrio* isolates

弧菌 <i>Vibrio</i> sp.	外排泵基因检出菌株数 efflux pump genes detected
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> (14)	<i>floR</i> (14) <i>cmlA</i> (3)
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> (17)	<i>floR</i> (17) <i>cmlA</i> (3)
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> (8)	<i>floR</i> (8) <i>cmlA</i> (1)
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i> (2)	<i>floR</i> (2)

注: 括号中表示对应的菌株数,下同

Notes: the number in parentheses indicates the number of bacterial strains, the same below

表3 41株弧菌整合子检测结果

Tab. 3 Integrons detected of 41 *Vibrio* isolates

弧菌 <i>Vibrio</i> sp.	整合子检出菌株数 number of isolates of integron detected
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> (14)	<i>Int1</i> (5) <i>SXT</i> (4) <i>ISCR1</i> (8)
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> (17)	<i>Int1</i> (11) <i>SXT</i> (8) <i>ISCR1</i> (13)
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> (8)	<i>Int1</i> (3) <i>SXT</i> (6) <i>ISCR1</i> (4)
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i> (2)	<i>Int1</i> (0) <i>SXT</i> (1) <i>ISCR1</i> (1)

2.4 外排泵抑制剂对酰胺醇类药物MIC值的影响

氯霉素MIC值的变化 在NMP、利血平、CCCP和PAβN的作用下,41株弧菌中分别有9株、7株、25株和9株弧菌的氯霉素MIC值降低(表4)。在4种抑制剂的作用下,弧菌氯霉素MIC值的下降以2倍为主。此外,CCCP和PAβN分别使6株和2株弧菌的氯霉素MIC值降低4倍,利血平和CCCP分别使2株和4株弧菌的氯霉素MIC值降低8倍。

氟苯尼考MIC值的变化 在NMP、利血平、CCCP和PAβN作用下,41株弧菌中分别有

表4 外排泵抑制剂对41株弧菌的氯霉素MIC值的影响

Tab. 4 Effects of efflux pump inhibitors on MICs of chloramphenicol in 41 *Vibrio* isolates

MIC下降倍数 folds of MIC decrease	菌株数/株 number of isolates			
	NMP	利血平 reserpine	CCCP	PAβN
0	32	34	16	32
2	9	5	15	7
4	0	0	6	2
8	0	2	4	0

表5 外排泵抑制剂对41株弧菌的氟苯尼考MIC值的影响

Tab. 5 Effects of efflux pump inhibitors on MICs of florfenicol in 41 *Vibrio* isolates

MIC下降倍数 folds of MIC decrease	菌株数/株 number of isolates			
	NMP	利血平 reserpine	CCCP	PAβN
0	27	26	16	19
2	13	14	10	19
4	1	1	2	2
8	0	0	2	1
16	0	0	2	0
32	0	0	5	0
64	0	0	1	0
128	0	0	3	0

14株、16株、25株和22株弧菌的氟苯尼考MIC值降低(表5)。在4种抑制剂的作用下,弧菌氯霉素MIC值的下降以2倍为主。值得注意的是,外排泵抑制剂CCCP使弧菌氟苯尼考MIC值的下降幅度范围较大(8~128倍)。

外排泵抑制剂对弧菌的氯霉素和氟苯尼考耐药性/敏感性的影响 在4种外排泵抑制剂中,CCCP作用效果最为显著,能明显地降低弧菌对氯霉素和氟苯尼考的耐药性,而其他3种外排泵抑制剂的作用效果相对较弱(表6)。CCCP分别使5株氯霉素耐药菌株和13株氟苯尼考耐药菌株变成敏感或中介菌株,还可以使11株氯霉素中介菌株变成敏感菌株。

3 讨论

3.1 弧菌酰胺醇类耐药相关的外排泵基因携带情况

主动外排作用是细菌耐药性形成的主要因

素之一,尤其是细菌的多重耐药。本研究对41株氟苯尼考低敏感弧菌的酰胺醇类耐药相关外排泵基因携带情况分析发现,*floR*基因和*cmlA*基因可存在于多种海水养殖源弧菌中,包括副溶血弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌和创伤弧菌。据报道,*floR*基因编码的外排泵广泛分布于多种细菌中,其可以通过主动泵出作用介导细菌的氯霉素和氟苯尼考耐药^[5]。此外,*cmlA*基因编码的*cmlA*蛋白仅能介导细菌的氯霉素耐药,而对细菌的氟苯尼考敏感性无影响。*cmlA*外排泵蛋白也是通过主动泵出作用来降低氯霉素在细菌细胞内的含量从而致使细菌耐药性的产生^[18]。通过酰胺醇类耐药相关外排泵基因携带情况的分析发现,*cmlA*基因和*floR*基因广泛存在于多种养殖源弧菌中,这提示需要对这些外排泵基因产生和传播的分子机制开展进一步的研究,以期为弧菌酰胺醇类及其他抗菌药物耐药的控制提供理论依据。此外,本研究发现外排泵耐药基因并不能完全解释弧菌酰胺醇类药物的耐药表型,是否还存在其他相关的酰胺醇类耐药基因及外排泵基因,则需要进一步的研究。

3.2 弧菌整合子的携带情况

整合子是一类重要的可移动遗传元件,其可以携带1个或多个耐药基因盒在同种/不同种菌株之间传播,整合子在细菌耐药性尤其是多重耐药性的转移扩散中起到了非常重要的作用。*floR*基因和*cmlA*基因同属于主要易化超家族系统(MFS)外排泵耐药性相关基因,可通过质粒、整合子、转座子等介导的基因水平转移导致细菌耐药性的传播扩散^[3]。其中,*SXT*元件宿主范围广泛,结合转移频率高,并且以弧菌中发现最多;*SXT*元件可长达100 kb以上,常携带耐药基因簇*floR*、*strB*、*sull*、*dfrA*和*bla_{CMY-2}*等^[19]。*SXT*元件介导的霍乱弧菌(*V. cholerae*)或灿烂弧菌

表6 外排泵抑制剂对氯霉素和氟苯尼考耐药菌株和中介菌株数量的改变

Tab. 6 The susceptibility changes of amphenicol resistant/intermediate isolates caused by efflux pump inhibitors 株

抗菌药物 antimicrobials	NMP			利血平 reserpine			CCCP			PAβN		
	R→S	R→I	I→S	R→S	R→I	I→S	R→S	R→I	I→S	R→S	R→I	I→S
氟苯尼考 florfenicol	0	4	0	0	0	0	11	2	0	0	2	0
氯霉素 chloramphenicol	0	1	5	1	1	3	3	2	11	1	1	5

注: R. 耐药, I. 中介, S. 敏感; R→S. 表示从耐药到敏感的菌株数, 以此类推

Notes: R. resistant, I. intermediate, S. susceptible; R→S. indicates the resistant isolates turn to be susceptible ones

(*V. splendidus*)基因向大肠杆菌的转移频率均可高达 10^{-5} ~ 10^{-6} /受体菌^[16]。宋雨泽^[20]在上海地区鱼源弧菌携带的*SXT*可变区内发现了外排泵基因*floR*的存在。本研究通过对41株氟苯尼考低敏感弧菌中整合子相关元件的研究表明,*Int1*、*SXT*和*ISCR1*的检出率分别达到了46.3%(19/41)、46.3%(19/41)和63.4%(26/41),整合子相关元件的存在可能是弧菌耐药性传播扩散的重要分子机制之一。关于整合子相关元件(如*SXT*、*Int1*和*ISCR1*等)介导弧菌*floR*基因的传播转移的分子机制还需进一步研究。

其中,对*Int1*阳性菌株的可变区进行LA PCR扩增,其中有一株菌得到一个1 308 bp的片段,测序结果经Blast比对后显示,该可变区包含2个耐药基因盒:利福平耐药基因*arr-3*与甲氧苄啶耐药基因*dfrA27*。此类基因盒在弧菌中的检出与以往的研究报道一致^[1],且与已报道的大肠杆菌耐药元件相同^[21],提示了弧菌在耐药机制上与大肠杆菌具有一定的相似性。

3.3 外排泵抑制剂对酰胺醇类药物MIC值的影响

细菌外排泵抑制剂的作用机制主要包括阻断外排泵的能量来源、阻碍底物通过外排泵通道、干扰外排泵组装等。CCCP是抑制质子转运的强解偶联剂,可自由扩散于磷脂膜两侧,破坏质子跨膜梯度,阻断外排转运系统的能量供应^[22]。目前研究已证实CCCP作为外排泵抑制剂,可降低铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌等的MIC值,抑制其外排泵的作用^[23]。本研究发现,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CCCP可有效逆转部分弧菌酰胺醇类药物的耐药表型,并且CCCP对氯霉素外排的抑制作用强于氟苯尼考。受试弧菌所携带的*floR*基因和*cmlA*基因编码的外排泵均属于MFS超家族,其通过质子交换提供主动外排抗菌药物所需的能量,而CCCP恰是阻断质子转运的外排泵抑制剂。

利血平是ATP水解能驱动型的外排泵抑制剂,另外其本身是某些外排泵的底物,可与抗菌药物竞争结合外排泵蛋白,进而对外排抗菌药物产生抑制作用^[24]。周云^[8]在实验中发现,在40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利血平条件下,46.6%的鲍曼不动杆菌对庆大霉素和氯霉素的MIC降为原值的1/4。王玉宝等^[25]发现,终浓度为20 mg/L的利血平使得

66株人源粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和35株人源屎肠球菌(*E. faecium*)对喹诺酮类药物的MIC值均降低,其中诺氟沙星MIC值下降最为显著。本研究表明,添加40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利血平,41株弧菌中有5株弧菌的氯霉素耐药性发生改变,但对弧菌的氟苯尼考耐药性没有显著变化。依据上述现象,推测可能是由于弧菌携带氯霉素特异性的外排泵,利血平能够抑制该外排泵对氯霉素的外排作用,但其对氟苯尼考的外排无影响。

PA β N和NMP均属于RND特异性外排泵抑制剂,是一类阻碍药物通过外排泵通道的抑制剂,其作用机制为结合外排泵相应位点以阻止其他物质与之结合^[26],从而抑制外排泵底物发生外排。据报道,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PA β N能有效降低铜绿假单胞菌对左氧氟沙星的MIC值^[27]。本研究中,在100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PA β N的作用下,分别有2株和3株弧菌的氯霉素与氟苯尼考的MIC值下降;在100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NMP的作用下,仅有1株弧菌的氟苯尼考MIC值下降,而所有弧菌的氯霉素MIC值均未发生变化。本研究得到结果与Malléa等^[28]的报道一致:PA β N或NMP的添加对霍乱弧菌的氯霉素MIC值(0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)无影响。

研究表明,分离自我国海水动物的氟苯尼考低敏感弧菌普遍呈现*floR*外排泵基因和*cmlA*外排泵基因阳性,且多数弧菌同时携带整合子相关元件,如*Int1*、*SXT*和*ISCR1*。这提示,整合子相关元件可能是酰胺醇类外排泵基因在弧菌中广泛传播的重要手段之一。实验的结果显示,外排泵抑制剂CCCP能够有效抑制弧菌对酰胺醇类药物的外排,从而提高弧菌对酰胺醇类药物的敏感性。本研究的开展为水产养殖源弧菌酰胺类药物耐药的控制提供了一种新的思路,对其他种类抗菌药物耐药的管控也具有一定的借鉴意义。

参考文献:

- [1] 姚小娟. 海水养殖源弧菌耐药性检测与整合子分析[D]. 上海:上海海洋大学,2014.
Yao X J. Drug resistance detection and integrons analysis of *Vibrios* from mariculture source[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014 (in Chinese).
- [2] 刘旭. 海水养殖源弧菌耐药性调查及*qnrVC*基因在弧菌中的流行情况研究[D]. 上海:上海海洋大学,2016.
Liu X. Investigation on antimicrobial resistance and the

- prevalence of *qnrVC* gene in *Vibrios* from mariculture sources[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016 (in Chinese).
- [3] 龚风云. siRNA分子干扰铜绿假单胞菌MexAB-OprM外排泵MexB基因表达的效应研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- Gong F Y. siRNA-mediated gene silencing of MexB from the MexAB-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2012 (in Chinese).
- [4] 刘忆霜, 肖春玲. 细菌多重耐药外排泵抑制剂研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 432(4): 211-216, 244.
- Liu Y S, Xiao C L. Advances in the research on bacterial multi-drug resistance efflux pump inhibitors[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2007, 432(4): 211-216, 244(in Chinese).
- [5] 李鹏. 藏猪源大肠杆菌和肠球菌耐药性调查及其耐药机制的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- Li P. Antimicrobial resistance characteristics and mechanisms of *Escherichia coli* & *Enterococcus* from Tibetan pigs[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [6] 赵敏. 四川地区斑点叉尾鲷源维氏气单胞菌的耐药性以及耐药基因检测分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- Zhao M. Antimicrobial agents resistance and its genetic determinants in *Aeromonas veronii* isolated from Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*)[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [7] 裴亚玲, 袁业友, 胡功政, 等. 外排泵抑制剂小肽1号对抗菌药抗菌活性的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(5): 32-35.
- Pei Y L, Yuan Y Y, Hu G Z, *et al.* The effects of efflux pump inhibitor No. 1 small peptide on antibacterial activity of antiseptic drug[J]. Chinese Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2009, 36(5): 32-35(in Chinese).
- [8] 周云. 多种外排泵抑制剂逆转鲍曼不动杆菌耐药性的研究[D]. 南充: 川北医学院, 2011.
- Zhou Y. Study on reversal of resistance in *Acinetobacter baumannii* by efflux pump inhibitors[D]. Nanchong: North Sichuan Medical College, 2011 (in Chinese).
- [9] CLSI. M45-A2 Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline-2nd edition[S]. Wayne, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2010.
- [10] Kim E H, Aoki T. Sequence analysis of the florfenicol resistance gene encoded in the transferable R-plasmid of a fish pathogen, *Pasteurella piscicida*[J]. *Microbiology and Immunology*, 1996, 40(9): 665-669.
- [11] 郑朝朝. 大肠杆菌氟苯尼考耐药性在不同动物间的传播研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
- Zheng Z Z. The prevalence of florfenicol resistance to *Escherichia coli* among different animals[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei Province, 2010 (in Chinese).
- [12] Kehrenberg C, Schwarz S. *FexA*, a novel *Staphylococcus lentus* gene encoding resistance to florfenicol and chloramphenicol[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(2): 615-618.
- [13] Liu H B, Wang Y, Wu C M, *et al.* A novel phenicol exporter gene, *fexB*, found in enterococci of animal origin[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(2): 322-325.
- [14] Wang Y, Lv Y, Cai J C, *et al.* A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70(8): 2182-2190.
- [15] Hall R M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 15(4): 593-600.
- [16] Vaisvila R, Morgan R D, Posfai J, *et al.* Discovery and distribution of super-integrins among pseudomonads[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 42(3): 587-601.
- [17] Toleman M A, Bennett P M, Walsh T R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century?[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(2): 296-316.
- [18] George A M, Hall R M. Efflux of chloramphenicol by the CmlA1 protein[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 209(2): 209-213.
- [19] Waldor M K, Tschäpe H, Mekalanos J J. A New type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(14):

- 4157-4165.
- [20] 宋雨泽. 弧菌中整合接合元件的分子生物学特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- Song Y Z. The molecular biology research of integrative conjugative elements in the vibrios[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [21] Park K S, Iida T, Yamaichi Y, *et al.* Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(10): 5742-5748.
- [22] 李方去, 杨爱平, 蒋伟燕, 等. 外排泵adeB基因高表达在鲍氏不动杆菌临床分离株产生泛耐药中的作用[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(19): 2904-2906.
- Li F Q, Yang A P, Jiang W Y, *et al.* Over expression of *adeB* gene mediated multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2010, 20(19): 2904-2906(in Chinese).
- [23] Ribera A, Ruiz J, Jimenez de Anta M T, *et al.* Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002, 49(4): 697-698.
- [24] 王二兵, 马淑涛. 药物耐药性外排泵抑制剂的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2005, 15(3): 188-192.
- Wang E B, Ma S T. Advance in efflux pump inhibitors for multidrug resistance[J]. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, 15(3): 188-192(in Chinese).
- [25] 王玉宝, 宋诗铎, 刘德梦, 等. 六种氟喹诺酮对肠球菌的体外抗菌活性及利血平的影响[J]. 天津医药, 2006, 34(9): 596-598.
- Wang Y B, Song S D, Liu D M, *et al.* Antibacterial activities of six fluoroquinolones against enterococcus in vitro and the effect of reserpine on antibacterial activities[J]. *Tianjin Medical Journal*, 2006, 34(9): 596-598(in Chinese).
- [26] Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, *et al.* Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28(5): 519-542.
- [27] Lomovskaya O, Warren M S, Lee A, *et al.* Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(1): 105-116.
- [28] Malléa M, Chevalier J, Eyraud A, *et al.* Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293(5): 1370-1373.

Effects of efflux pump inhibitors on the amphenicols resistance of *Vibrio* strains isolated from marine aquaculture

LI Jian^{1,2}, ZHAO Shu¹, WANG Yuan¹, MA Licai¹, LIU Xu^{1,2}, FANG Wenhong^{1*}

(1. Key Laboratory of East China Sea Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture;
East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

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

Abstract: This study was conducted to determine the role of efflux pump inhibitors in amphenicols resistance of *Vibrio* species from mariculture. A total of 41 intermediate/high-level florfenicol-resistant *Vibrio* isolates were tested, including *V. parahaemolyticus* (14), *V. alginolyticus* (17), *V. harveyi* (8), and *V. vulnificus* (2). To investigate the effect of efflux pump on amphenicols resistance, minimal inhibitory concentrations of chloramphenicol and florfenicol with/without efflux pump inhibitors were determined using the agar dilution method. NMP, reserpine, CCCP and PAβN were used as efflux pump inhibitors in this study. PCR amplification method was used to detect the efflux pump genes and integron-related genes. The results showed that 39 strains and 11 strains were resistant to florfenicol and chloramphenicol, respectively. As is shown, 100% (41/41) of the 41 *Vibrio* isolates tested were detected positive for amphenicols efflux pump genes *floR*, but only 17.1% (7/41) for *cmlA* gene, and *pexA*, *fexA*, *fexB* and *oprA* could not be detected. Furthermore, *Int1*, *SXT*, and *ISCR1* were found in 46.3% (19/41), 46.3% (19/41), and 63.4% (26/41) of the 41 *Vibrio* isolates tested, respectively. Antibiotic susceptibility testing suggested that CCCP was an effective efflux pump inhibitor in the treatment for the amphenicol resistance of *Vibrio* species. The prevalence of amphenicol resistance, efflux pump genes and integron-related elements in *Vibrio* sp. derived from marine aquaculture in China was observed and was likely due to the extensive use of amphenicols. The use of efflux pump inhibitors, e.g. CCCP, might be an effective tool to control the amphenicol resistance in *Vibrio* species.

Key words: *Vibrio* sp.; amphenicols; drug resistance; efflux pump inhibitors; integrons

Corresponding author: FANG Wenhong. E-mail: fwenhong@163.com

Funding projects: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2013A0603, 2017HY-ZD1006); Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program, China (G20140304)