

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01092

淡水养殖动物致病性嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 分型与耐药性

肖丹, 曹海鹏, 胡鲲, 杨先乐

上海海洋大学 水产与生命学院, 国家水生动物病原库, 上海 201306

摘要: 以质控菌株 ATCC7966 为对照, 采用 ERIC-PCR 方法对 49 株分别采集于中国浙江、江苏、江西、广东、湖北、上海等主要淡水养殖区的致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)进行了基因分型, 并分析了嗜水气单胞菌对 12 种抗生素的耐药模式, 探讨了嗜水气单胞菌的基因型与区域性分布及其耐药性的关联性。实验结果表明, 50 株受试嗜水气单胞菌菌株可分为 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII 这 12 个基因型, 其中 VIII 型菌株最多, III 型和 X 型菌株最少。此外, 50 株受试菌株对氨基青霉素(AMP)的耐药率高达 100%, 对头孢氨苄(CX)的耐药率高达 98%, 94% 以上的菌株对氨基糖苷类及喹诺酮类抗生素未产生耐药性。受试菌株对 12 种抗生素呈现出 AMP、CX/AMP、CX/AMP/POL(多黏菌素)、CX/AMP/SMZ(复方新诺明)、CX/AMP/NM(新霉素)、CX/AMP/SMZ/POL、CX/AMP/SMZ/POL/GM(庆大霉素)、CX/AMP/SMZ/LOM(洛美沙星)/ENR(恩诺沙星)、CX/AMP/SMZ/LOM/ENR/OF(氧氟沙星)/LEV(左氧氟沙星)这 9 种不同的耐药模式, 其中 XII 型菌株的耐药谱均为 CX/AMP/POL 型, II 型和 XI 型菌株的耐药谱多为 CX/AMP/SMZ 型, IV 型、VI 型和 VIII 型菌株的耐药谱多为 CX/AMP 型, X 型菌株的耐药谱为 CX/AMP/NM 型。据此推测, 嗜水气单胞菌基因型与耐药性可能存在一定的相关性。

关键词: 嗜水气单胞菌; ERIC-PCR; 耐药性

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)05-1092-08

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是淡水养殖动物重要的病原菌之一, 可引起淡水鱼类细菌性败血症、鳖“红底板”病等多种病害^[1-2], 危害银鲫(*Carassius auratus gibelio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、花白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、鳊(*Siniperca chuatsi*)、中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)等多类经济养殖品种。然而, 近年来, 随着抗生素的广泛使用, 嗜水气单胞菌耐药问题日趋严重^[3], 增加了嗜水气单胞菌病的防治难度。因此, 开展水生动物嗜水气单胞菌的流行病学调查及其耐药性监测, 对有效防治该病具有重要意义。

目前, 嗜水气单胞菌流行病学调查的传统方法多以血清分型、生化分型等表型分析方法为主^[4-5], 这些传统的分型方法常常存在误检率高等缺陷。分子分型是一种新兴的流行病学调查手段, 它不仅克服了血清分型等传统方法的不足, 还能结合菌株的耐药特性, 从遗传学角度对耐药菌株的流行规律进行探讨^[6], 以丰富目前细菌耐药机制的研究理论^[7-8]。其中, ERIC-PCR 法作为一种半随机扩增多态 DNA 法, 与其他分子分型方法相比, 具有分型率较高、可比性强、准确性好、可重复性好、易于实现标准化、无需特殊仪器等优点, 被广泛应用于大肠杆菌(*Escherichia coli*)、副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*)、沙门菌(*Salmonella*)、

收稿日期: 2010-11-18; 修订日期: 2011-03-13.

基金项目: 国家 863 计划项目(2011AA10A216); 农业部行业专项(200803013); 国家公益性行业专项(nycytx-49-17).

作者简介: 肖丹(1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产病原微生物流行病学研究. E-mail: xiaodan86@yahoo.cn

通信作者: 杨先乐(1948-), 教授, 博士生导师, 主要从事水产动物免疫、鱼类药理学与渔药的检测与监控等研究.

E-mail: xlyang@shou.edu.cn

绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)等^[9-13]人畜共患致病菌的分子流行病学调查。鉴于此,本实验以质控菌株 ATCC7966 为对照,采用 ERIC-PCR 法对 49 株分别采集于中国浙江、江苏、江西、广东、湖北、上海等 6 个主要淡水养殖区的致病性嗜水气单胞菌进行了基因分型,分析了各基因型嗜水气单胞菌的耐药模式,并探讨了嗜水气单胞菌的基因型与区域性分布及其耐药性的关联性,以期为中国水生动物嗜水气单胞菌病的有效防控提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

49 株嗜水气单胞菌分别分离于江苏、上海、浙江、广东、湖北、江西等地区患嗜水气单胞菌病的淡水养殖水生动物病变组织(表 1);质控菌株 ATCC 7966 为国家水生动物病原库提供。

1.2 菌株鉴定

根据国家标准《致病性嗜水气单胞菌检测方法(GB/T 18652-2002)》^[14],采用细菌微量生化鉴定管(杭州天和)对 49 株嗜水气单胞菌和质控菌株

ATCC7966 进行生理生化鉴定,确认为致病性嗜水气单胞菌后,再进行 ERIC-PCR 分型及药敏试验。

1.3 嗜水气单胞菌基因组 DNA 的提取

将各嗜水气单胞菌菌株分别接种于 LB 液体培养基中,28℃ 恒温培养过夜,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化)分别提取各菌株基因组 DNA。

1.4 嗜水气单胞菌的 ERIC-PCR 分型

1.4.1 引物设计 ERIC-PCR 引物参照 Biswajit 等^[15]的设计。其中 ERIC 正向引物(F): 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3', ERIC 反向引物(R): 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3',由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.4.2 PCR 方法 PCR 反应采用 20 μL 反应体系,其中含 DNA 模板 2 μL(30 μg/L),ERIC 正、反向引物各 1 μL (10mmol/L), Mix Buffer(TAKARA) 2 μL, Taq 酶(TAKARA)2 U,用超纯水补足至 20 μL。PCR 程序如下: 94℃ 预变性 7 min; 94℃ 30 s, 52℃ 1 min, 65℃ 8 min, 共循环 40 次;再 65℃ 维持 16 min。PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶 120 V 电压电泳 60 min。

表 1 菌株来源及背景
Tab.1 Source and background of the strains

地域 region	来源 source	菌株数 number of strains	菌株名称(分离时间/分离地点) name (isolation time/location) of stains
江苏 Jiangsu	淡水鱼 freshwater fish	15	JS01(2007/武进), JS02(2007/武进), JS03(2007/武进), JS04(2007/武进), JS05(2007/武进), JS06(2007/武进), JS07(2007/武进), JS08(2007/南通), JS09(2007/南通), JS10(2007/南通), JS12(2009/盐城), JS13(2009/盐城), JS14(2009/盐城), JS15(2009/盐城), JS16(2009/盐城)
	中华鳖 <i>Pelodiscus sinensis</i>	1	JS11(2006 南通)
广东 Guangdong	淡水鱼 freshwater fish	9	GD01(2004/广州), GD02(1992/广州), GD03(2009/广州), GD04(2008/广州), GD05(2004/佛山), GD06(2004/佛山), GD07(2008/佛山), GD08(2008/中山), GD09(2009/中山)
上海 Shanghai	淡水鱼 freshwater fish	7	SH01(2004/金山), SH02(2005/金山), SH03(2006/青浦), SH04(1991/金山), SH06(2002/青浦), SH09(2010/南汇), SH10(2010/南汇)
	中华鳖 <i>Pelodiscus sinensis</i>	1	SH05(2003/青浦)
	三角帆蚌 <i>Hyriopsis cumingii</i>	2	SH07(2010/南汇), SH08(2010/南汇)
浙江 Zhejiang	淡水鱼 freshwater fish	5	ZJ01(2009/湖州), ZJ02(2009/杭州), ZJ03(2009/杭州), ZJ04(2009/宁波), ZJ05(2009/宁波)
江西 Jiangxi	淡水鱼 freshwater fish	4	JX01(2008 彭泽), JX02(2009 彭泽), JX03(2008 南昌), JX04(2009 南昌)
湖北 Hubei	淡水鱼 freshwater fish	5	HB01(2008/洪湖), HB02(2009/洪湖), HB03(2009/丹江口), HB04(2009/丹江口), HB05(2009/丹江口)

1.4.3 结果分析 应用 Quantity one 4.6 对电泳图谱进行分析。采用“1”和“0”的方式记录在 Excel 中, 每个样品的扩增带存在时赋值为“1”, 不存在时赋值为“0”。采用 NTSYSpc 2.1 计算软件, 得到 Jaccard 的遗传相似性系数矩阵和遗传距离矩阵, 采用非加权配对法(UPGMA 法)做遗传分析的树状图。凡相似度大于 0.8 者为同一亚型, 小于 0.8 者为不同的基因型^[16]。

1.5 药物敏感性实验

将各嗜水气单胞菌菌株制备成 $10^5/\text{mL}$ 的菌悬液, 均匀涂布于 M-H 培养基平板上后, 用无菌镊子将药敏纸片(杭州天和)贴于平板上, 于 28°C 恒温培养 48 h 后测量抑菌圈直径, 并根据 NCCLS^[17]的判定标准进行药敏特性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

实验结果表明, 49 株受试菌株和质控菌株 ATCC7966 均为革兰氏阴性杆菌, 在 AHM 培养基上接种培养后, AHM 培养基顶部仍为紫色, 底部为淡黄色, 且 49 株受试菌株和质控菌株 ATCC7966 均沿穿刺线呈刷状生长。此外, 49 株受试菌株和质控菌株 ATCC7966 均可发酵葡萄糖、阿拉伯糖、蔗糖、七叶苷和水杨素, 氧化酶实验、吲哚实验、脱脂奶平板实验结果均为阳性。根据《致病性嗜水气单胞菌检验方法(GB/T 18652-2002)》^[14]中对

致病性嗜水气单胞菌的判定标准, 49 株受试菌株和质控菌株 ATCC7966 均为致病性嗜水气单胞菌。

2.2 嗜水气单胞菌的 ERIC-PCR 分型

实验结果表明, 49 株嗜水气单胞菌和质控菌株 ATCC7966 经 ERIC-PCR 扩增, 产生了 37 种不同的指纹图, 且指纹图谱呈现出多态性(图 1)。PCR 产物为 2~14 条, 主带为 2~8 条, 大小介于 0.08~3.2 kb 之间。

2.3 嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 指纹图谱聚类分析

实验结果表明, 50 株嗜水气单胞菌可分为 12 个基因型, 分别标记为 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI 及 XII 型(图 2)。其中 VIII 型菌株最多, 达 14 株; VII 型和 VI 型菌株略少, 分别为 8 株和 7 株; III 型和 X 型菌株最少, 分别为 1 株。根据 Hunter 等^[18]介绍的计算方法, 该分型方法的辨别指数值为 87%。此外, 采集自不同地域的致病性嗜水气单胞菌呈现出不同的聚类特征。其中, 除菌株 GD08、GD04 以外的广东分离株的基因型均为 VIII 型, 除菌株 JX04 以外的江西分离株均属 VI 型, 而上海、浙江等地分离株的基因型均呈现多态性; 而且不同基因型菌株的分布特点也有差异。例如, VII 型菌株在广东、江苏、上海、浙江均有出现, 而 IV 型、V 型、X 型菌株仅在上海出现(图 3)。

2.4 嗜水气单胞菌的耐药性分析

实验结果表明, 50 株嗜水气单胞菌对氨苄青霉素(AMP)完全耐药, 对头孢氨苄(CX)、复方新

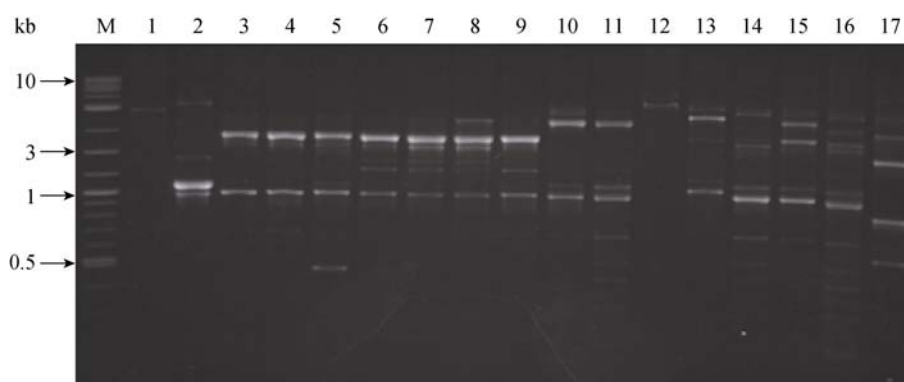


图 1 部分嗜水气单胞菌菌株 ERIC-PCR 指纹图

Fig.1 ERIC-PCR fingerprints of partial *Aeromonas hydrophila* strains

M: marker; 1. ATCC7966; 2. SH01; 3. JS01; 4. JS02; 5. JS03; 6. JS04; 7. JS05; 8. JS06; 9. JS07; 10. JS08; 11. JS09; 12. JS10; 13. JX01; 14. GD01; 15. JX02; 16. GD02; 17. JS11.

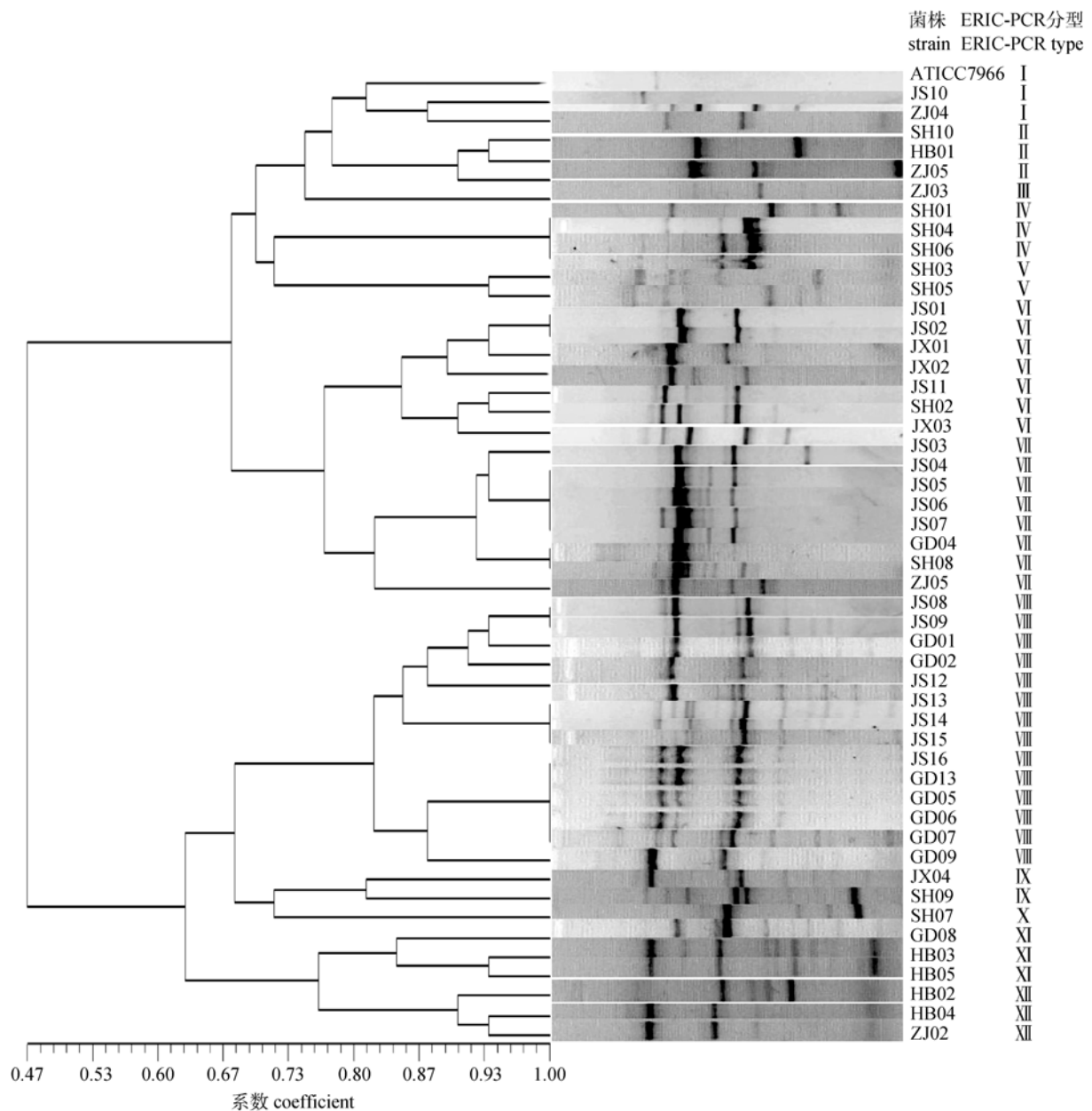


图 2 50 株嗜水气单胞菌指纹图谱聚类分析图

Fig 2 Results of ERIC-PCR genotyping and UPGMA clustering of fifty strains

诺明(SMZ)、多黏菌素(POL)不同程度耐药, 94% 以上的菌株对左氟沙星(LEV)、氟哌酸(NOR)、氧氟沙星(OF)、阿米卡星(AMK)、恩诺沙星(ENR)、庆大霉素(GM)及新霉素(NM)敏感(图 4、5)。此外, 50 株嗜水气单胞菌对 12 种抗生素表现 AMP、CX/AMP、CX/AMP/POL、CX/AMP/SMZ、CX/AMP/NM、CX/AMP/SMZ/POL、CX/AMP/SMZ/POL/GM、CX/AMP/SMZ/LOM/ENR、CX/AMP/SMZ/LOM/ENR/OF/LEV 这 9 种耐药谱型。

2.5 嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 基因型和耐药性之间的关系

50 株嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 基因型与其对 12 种抗生素耐药性之间的分布关系结果见图 5。实验结果表明, 耐 CX、AMP 的嗜水气单胞菌菌株在每种基因型中均有分布, 耐 SMZ、POL 的嗜水气单胞菌菌株的基因型呈现多样性。此外, XII 型嗜水气单胞菌菌株的耐药谱均为 CX/AMP/POL, XI、II 型嗜水气单胞菌菌株的耐药谱主要为

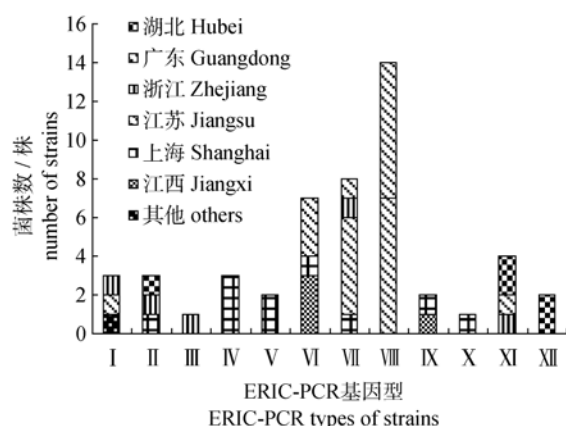


图 3 嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 基因型与分离地域间的关系

Fig.3 Relationship between *Aeromonas hydrophila* strains' sources and ERIC-PCR genotypes

CX/AMP/SMZ, IV型、VI型、VIII型嗜水气单胞菌菌株的耐药谱主要为 CX/AMP, X型嗜水气单胞菌菌株的耐药谱为 CX/AMP/NM 型。10%的菌株对 3 种以上抗生素耐药, 它们分布在 V 型、VI型、VIII型、IX型等基因型中。

3 讨论

3.1 关于嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 基因分型

不同的嗜水气单胞菌菌株在地理分布、流行病学特征以及致病性、耐药性等方面均存在一定的差异, 因此对其进行分子分型研究具有重要的

意义^[19]。目前, 细菌基因分型的方法较多, 如脉冲场凝胶电泳法(PFGE)、随机扩增多态性 DNA 法(RAPD)、重复序列 PCR 法(REP-PCR)、肠杆菌重复序列 PCR 法(ERIC-PCR)和限制性片段长度多态性分析法(RFLP)等。其中, PFGE 法准确性最高, 但操作步骤繁杂, 且需要特殊仪器, 在普通实验室难以开展; 而 ERIC-PCR 法操作简便, 无需特殊仪器, 且重复性和区分能力同 PFGE 非常相近, 更易于在普通实验室中推广^[20]。因此, 本实验选用 ERIC-PCR 法对嗜水气单胞菌进行了基因分型。本实验结果表明, 受试菌株通过 ERIC-PCR 法能够扩增出 2~14 条带, 可分为 12 个基因型, 且质控菌株 ATCC7966 的扩增图谱与 Biswajit 等^[15]及 Ma 等^[21]对质控菌株 ATCC7966 的扩增图谱相似, 说明本实验选用的基因分型方法适宜, 分型能力也较强, 分型结果可信。此外, Aguilera-Arreola 等^[21]通过 ERIC-PCR 法证实, 背景来源相似的嗜水气单胞菌菌株有聚类趋势。然而, 本实验结果表明, 部分背景来源相似的致病性嗜水气单胞菌却呈现出不同的聚类特征, 这可能与两项研究菌株来源不同有关。因此, 在防控嗜水气单胞菌引起的地域性流行病时, 必须有针对性地根据其不同的流行规律制定相应的防控方案。

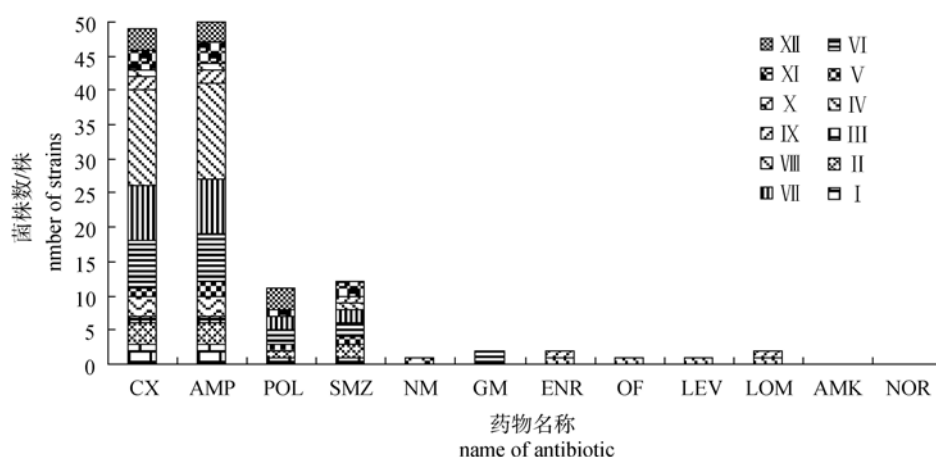


图 4 50 株嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 基因型与对 12 种抗生素耐药性间的关系

CX: 头孢氨苄; AMP: 氨苄青霉素; POL: 多黏菌素; SMZ: 复方新诺明; NM: 新霉素; GM: 庆大霉素; ENR: 恩诺沙星; OF: 氧氟沙星; LEV: 左氧氟沙星; NOR: 氟哌酸; AMK: 阿米卡星; LOM: 洛美沙星。

Fig.4 Relationship between fifty *Aeromonas hydrophila* strains' antibiotic susceptibility and ERIC-PCR genotypes

CX: Cephalexin; AMP: Ampicillin; POL: Polymyxin; SMZ: Cotrimoxazole; NM: Neomycin; GM: Gentamicin; ENR: Enrofloxacin; OF: Ofloxacin; LEV: Levofloxacin; NOR: Norfloxacin; AMK: Amikacin; LOM: Lomefloxacin.

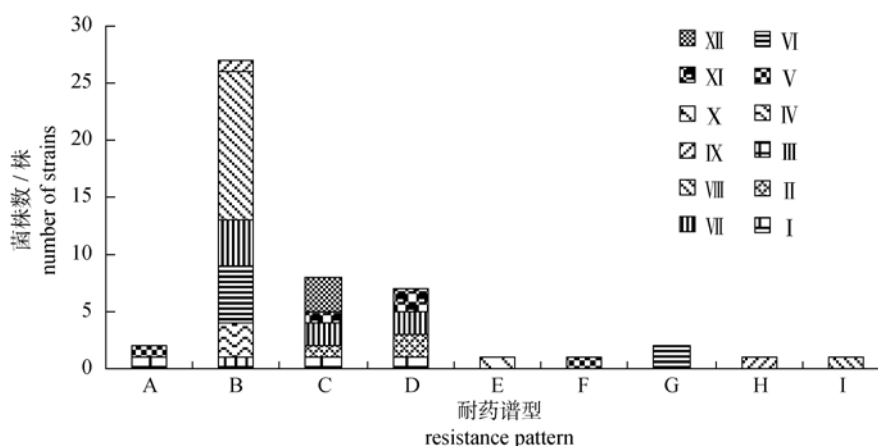


图 5 50 株嗜水气单胞菌菌株的耐药谱型与 ERIC-PCR 基因型关系

Fig.5 Relationship between fifty *Aeromonas hydrophila* strains' resistance patterns and ERIC-PCR genotypes

A: AMP; B: CX/AMP; C: CX/AMP/POL; D: CX/AMP/SMZ; E: CX/AMP/NM; F: CX/AMP/SMZ/POL; G: CX/AMP/SMZ/POL/GM; H: CX/AMP/SMZ/LOM/ENR; I: CX/AMP/SMZ/LOM/ENR/OF/LEV.

3.2 关于嗜水气单胞菌的耐药性

继 2010 年“超级耐药细菌”对人类健康造成了巨大危害后,人畜共患致病菌的耐药性问题已经成为全球共同关注的卫生问题之一。嗜水气单胞菌作为人畜共患致病菌,除对水产动物有致病作用外,还能引起鸭败血症、人类腹泻及败血症等疾病^[22]。然而,目前有研究表明,嗜水气单胞菌的耐药性问题已经相当严峻,对复方新诺明、阿莫西林、氟苯尼考等常用药物均表现出严重的耐药性^[3, 23-24]。林居纯等^[3]对 120 株嗜水气单胞菌的耐药性进行调查后发现,62%的菌株对复方新诺明耐药,38%~90%的菌株对 β -内酰胺类药物耐药。本实验结果也显示,约 30%嗜水气单胞菌菌株对复方新诺明、多黏菌素等常用兽药也产生了耐药性,而且少数嗜水气单胞菌菌株对氧氟沙星、左氟沙星等也产生了耐药性。这除了与养殖户在养殖过程中滥用、乱用药物有关外,还与耐药菌株在全国各地的流通不无关系。因此,在解决嗜水气单胞菌的耐药问题时,不仅应在养殖过程中正确合理地选择和使用药物,而且还要进一步加强对耐药菌株的监测与流通控制。

3.3 关于嗜水气单胞菌基因型与耐药性之间的关系

据报道,发生在细菌基因组相关基因上的碱基突变、片段插入或缺失、基因转化、等位基因缺失等变化都有可能引起细菌的耐药性^[25]。因此,如果能在细菌耐药表型和基因型之间找到某种客

观的联系,或直接运用基因分型的方法找出导致耐药表型产生的单一多态性,就有可能对该表型相对应的基因进行定位,从而可以在分子水平上对细菌的耐药性进行检测,为耐药细菌的分子流行病学提供科学依据^[26]。例如,陈俭等^[6]对 47 株大肠杆菌的 ERIC-PCR 基因型与耐药表型进行了研究,认为菌株产生耐药性可能与特定的 ERIC 指纹图谱相关。目前,国内关于嗜水气单胞菌基因型与耐药表型之间的关系研究还鲜见报道。本实验发现, XII 型嗜水气单胞菌菌株的耐药谱型为 CX/AMP/POL, 74.1%~100%的 IV 型、VI 型和 VIII 型嗜水气单胞菌菌株的耐药谱型为 CX/AMP, 66.6%的 XI、II 型嗜水气单胞菌菌株的耐药谱型为 CX/AMP/SMZ, 说明嗜水气单胞菌的基因型与耐药谱型间可能存在一定的联系,这与陈俭等^[6]的研究发现基本相同。此外,本实验结果还表明,少数基因型相同的菌株表现了不同的耐药性,少数耐药谱相同菌株的基因型也呈现出多态性,这可能是因为 ERIC-PCR 分型是一种以扩增条带多态性为主要依据的分型方法,相同大小的片段可能存在序列上的差异,而且耐药性的发生机制极其复杂,受基因组靶基因突变、环境的选择压力、耐药质粒传递^[27-28]等多种因素的影响。

参考文献:

[1] 沈锦玉. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 浙江海洋学院学报:

- 自然科学版, 2008, 1(27): 78–86.
- [2] 文祝友, 刘晓燕, 金燮理. 三角帆蚌嗜水气单胞菌病的病理研究[J]. 湖南农业大学学报, 2001, 1(27): 57–59.
- [3] 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.
- [4] 钱冬, 陈月英, 沈锦玉, 等. 引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型、毒力及溶血性[J]. 微生物学报, 1995, 35(6): 460–464.
- [5] 朱芝秀, 曾志明, 何后军, 等. 江西地区嗜水气单胞菌流行株的生物学特性[J]. 江西农业大学学报, 2007, 4(25): 623–627.
- [6] 陈俭, 姜中其, 唐一鸣. 仔猪黄白痢大肠杆菌耐药性检测及 ERIC 图谱分析[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2010, 36(2): 125–132.
- [7] 卢强, 郑伟, 李莲瑞, 等. 嗜水气单胞菌喹诺酮类药物抗性决定区基因片段的克隆与突变分析[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(1): 95–96, 101.
- [8] 朱建萍, 叶展翔, 朱烨. 嗜水气单胞菌多重耐药性与质粒的关系分析[J]. 社区医学杂志, 2009, 23(7): 83–83.
- [9] 张美玲, 周志华, 赵立平. 粪便样品中大肠杆菌多态性分子研究[J]. 微生物学通报, 2005(2): 5–9.
- [10] 李鹏, 李军星, 李玉峰. 中国东南部地区副猪嗜血杆菌分离株 ERIC-PCR 指纹图谱分析[J]. 中国兽医学报, 2009 (12): 1566–1570.
- [11] 张宏梅, 石磊, 李琳. 沙门氏菌 ERIC 指纹分析[J]. 云南农业大学学报, 2007(7): 467–470.
- [12] 周俊英, 周新, 付有荣, 等. 铜绿假单胞菌采用肠杆菌属重复基因间隔共有序列-PCR 的分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2006(8): 846–849.
- [13] 金莉莉, 董雪, 王秋雨, 等. 沈阳市副溶血弧菌重复序列 PCR 分型[J]. 中国公共卫生, 2008(3): 351–353.
- [14] 南京农业大学动物医学院. GB/T 18652-2002 致病性嗜水气单胞菌检验方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [15] Biswajit M, Pendru R, Iddya K, et al. Typing of clinical and environmental strains of *Aeromonas* spp. using two PCR based methods and whole cell protein analysis[J]. J Microbiol Methods, 2009, 78: 312–318.
- [16] 伍晓锋, 黎毅敏, 卓超, 等. 18 株铜绿假单胞菌的耐药谱和 ERIC-PCR 分型[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 9(32): 560–563.
- [17] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. Eighteenth informational supplement. NCCLS document M100-S18, 2008: 25–61.
- [18] Hunter R P, Gaston A M. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpsons index of diversity[J]. J Clin Microbiol, 1988, 6: 2465–2466.
- [19] 卢强, 任瑞文, 胡岩, 等. 嗜水气单胞菌的随机扩增多态 DNA 分型[J]. 中国兽医学报, 2002, 1(22): 34–36.
- [20] Liu P Y, Shi Z Y, Lau Y J, et al. Comparison of different PCR approaches for characterization of *Burkholderia cepacia* isolates (*Pseudomonas*) [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(12): 3304–3307.
- [21] Aguilera-Arreola M G, Hernández-Rodríguez C, Zúñiga G, et al. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 2(242): 112–118.
- [22] 张运强, 李庆乐. 嗜水气单胞菌的致病性及其防治方法[J]. 广西农业科学, 2007, 5(38): 565–568.
- [23] 童照威, 张龙琪, 王伟洪, 等. 嗜水气单胞菌感染现状及耐药药分析[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 1(20): 75–76.
- [24] 李焕荣, 田丽英, 崔德凤, 等. 致病性嗜水气单胞菌对 31 种抗菌药物的敏感试验[J]. 北京农学院学报, 2001, 3(16): 34–37.
- [25] 赵冰开. 细菌耐药性的产生机理与控制对策[J]. 辽宁畜牧兽医, 2002(3): 15–16.
- [26] 黄静, 刘慧, 朱家馨, 等. 白念珠菌基因多态性与耐药性关系[J]. 中山大学学报, 2007, 1(28): 35–39.
- [27] 杨向江. 嗜水气单胞菌对几种抗生素耐药性的形成及消失速率[J]. 内陆水产, 1997(6): 6–7.
- [28] 宋铁英, 陈强, 郑在予, 等. 不同来源嗜水气单胞菌的抗菌素耐药性及耐药机制分析[J]. 福建农业学报, 2007, 23(2): 119–124.

ERIC-PCR genotyping and drug resistant analysis of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from freshwater animals

XIAO Dan, CAO Haipeng, HU Kun, YANG Xianle

College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, State Collection Centre of Aquatic Pathogen, Shanghai 201306, China

Abstract: The freshwater aquaculture industry has developed rapidly in China. As a result, China has become the largest producer of freshwater cultured fish in the world. However, production is threatened by *Aeromonas hydrophila*, a widely distributed freshwater bacterial pathogen that is thought to cause disease in a range of aquatic animals. For example, *A. hydrophila* is thought to cause bacterial septicemia in fish and red abdominal shell diseases in soft-shelled turtles. Outbreaks of *A. hydrophila* have resulted in significant economic losses to the aquaculture industry. In addition, *A. hydrophila* is a zoonotic pathogen, sometimes causing gastroenteritis and septicemia in humans. Our objective was to document the epidemiological characteristics of pathogenic *A. hydrophila* to provide insight into potential measures to prevent and control infections. We genotyped pathogenic *Aeromonas hydrophila* strains collected from a variety of sources, determined their drug susceptibility, and evaluated the relationship between genotype and antimicrobial resistance patterns. We used enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence (ERIC)-PCR to genotype 50 strains of *Aeromonas hydrophila* collected from freshwater culture sites in Shanghai, Zhejiang, Jiangsu, Jiangxi, Hubei, and Guangdong. ERIC-PCR is a more rapid, efficient, and accurate molecular typing method than the traditional serotyping methods. In addition, we evaluated the susceptibility of each isolate to 12 antibacterial drugs and determined the relationship between the genotype and the antimicrobial resistance pattern. We identified 12 special genotypes (I–XII) from the 50 isolates. Among these, genotype VII was the dominant genotype, consisting of 14 strains, whereas genotype III and X contained only one strain. All strains were resistant to ampicillin and 98% of the strains were resistant to cefalexin. However, >94% of the strains were susceptible to aminoglycosides and quinolones. We identified 9 patterns of drug-resistance: AMP, CX/AMP, CX/AMP/POL, CX/AMP/SMZ, CX/AMP/NM, CX/AMP/SMZ/POL, CX/AMP/SMZ/POL/GM, CX/AMP/SMZ/LOM/ENR, and CX/AMP/SMZ/LOM/ENR/OF/LEV. The twelve strain genotypes shared a common pattern of drug resistance (CX/AMP/POL). Similarly, the majority of genotypes within strain II and XI shared a common pattern of drug resistance (CX/AMP/SMZ). The drug-resistant pattern of most genotypes within strains IV, VI, and VIII was CX/AMP and for strain X the pattern was CX/AMP/NM. Thus, our results suggest that there is likely a correlation between the genotype and drug-resistance among *A. hydrophila* strains.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; ERIC-PCR; resistant spectrum

Corresponding author: YANG Xianle. E-mail: xlyang@shou.edu.cn