

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01015

鱼源嗜水气单胞菌多重耐药菌株整合子的分子特征

李绍戊, 王荻, 刘红柏, 尹家胜, 卢彤岩

中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070

摘要: 为研究嗜水气单胞菌多重耐药菌株整合子-基因盒分布及分子特征, 首先采用 K-B 纸片扩散法检测 28 株鱼源嗜水气单胞菌对 18 种抗生素的耐药性, 然后利用 PCR 方法检测菌株中 $\int$ 、 $\int_1$ 、 $\int_2$ 型整合酶基因并对其携带基因盒序列进行分析。结果表明, 分离到的鱼源嗜水气单胞菌呈多重耐药性, 对 β -内酰胺类、大环内酯类、氯霉素类和四环素类药物的耐药率超过 60%, 而对氟喹诺酮类药物较敏感, 且菌株间耐药谱差异较大。53.57% 的菌株 $\int$ 类整合子阳性, 21.43% 的菌株 $\int_1$ 类整合子阳性, 整合子阳性菌株对多种药物的耐药率均高于阴性株, 且 $\int$ 类整合子阳性株多重耐药率明显高于 $\int_1$ 类整合子阳性株, 表明整合子系统在嗜水气单胞菌多重耐药性中发挥重要作用。 $\int$ 类整合子基因盒以 *aadA*、*dfrA*、*catB* 家族为主, 分别介导氨基糖苷类、甲氧磺胺嘧啶类和氯霉素类药物耐药; 基因盒的排列以 *aadA2+dfrA12* 类型为主。此外, $\int$ 类整合子阳性的嗜水气单胞菌多重耐药性在不同个体间也存在较大差异, 提示多重耐药菌株的耐药表型与基因盒的类型无直接相关性。

关键词: 嗜水气单胞菌; 多重耐药性; 整合子-基因盒系统

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)05-1015-08

细菌耐药性以及多重耐药, 是当今国内外临床抗感染中遇到的重要难题和考验, 且呈现出耐药谱逐年上升和耐药性传播迅速的特点。耐药细菌的产生包括自然耐药和获得性耐药两种来源, 而后者主要通过细菌染色体基因突变、可移动遗传元件(质粒、转座子、整合子等)传递或捕获外源耐药基因从而使得细菌耐药^[1]。其中, 整合子-基因盒系统是近年来发现的细菌耐药性传播的主要机制之一^[2]。作为细菌的一种天然克隆与表达系统, 整合子通过对外源耐药基因的捕获、组合和排列, 借助于其强启动子使耐药基因表达; 同时, 一个整合子可整合多个不同的耐药基因盒, 从而使细菌具有多重耐药性^[3-4]。迄今为止, 已发现 80 余种基因盒, 且基因盒的种类、数量及分布均呈现出差异性^[5]。目前根据整合酶基因不同, 整合子至少可分为六类, 而以 $\int$ 、 $\int_1$ 、 $\int_2$ 类为多, 其

中 $\int$ 类整合子主要存在于革兰氏阴性杆菌中, 介导细菌对大部分临床抗菌药物的耐药^[6]。

嗜水气单胞菌(*Aeromonashydrophila*)属弧菌科气单胞菌属, 是淡水养殖动物细菌性败血症的重要病原菌之一, 可导致多种水生动物表现出不同临床症状, 如肌肉和内脏出血、烂鳃、坏死、腹部膨胀、水肿等; 另外, 因其常与其他致病菌混合感染使得病情加重, 从而给水产养殖业造成严重危害^[7]。近年来, 抗生素在鱼类细菌性疾病防治中得到广泛应用, 嗜水气单胞菌耐药问题日趋严重, 增加了嗜水气单胞菌病的防治难度^[8-9]。因此, 开展鱼源嗜水气单胞菌的流行病学调查及其耐药性监测, 并对其携带耐药基因的可转移遗传因子整合子-基因盒系统进行研究, 将具有重要的临床意义和流行病学价值。本研究采用 PCR 方法检测了 3 类整合子在 28 株鱼源嗜水气单胞菌分离株

收稿日期: 2013-01-18; 修订日期: 2013-03-25.

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(C201140); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(201104).

作者简介: 李绍戊(1982-), 男, 助理研究员. 从事水产动物病害研究. E-mail: swli_1982@163.com

通信作者: 卢彤岩(1967-), 研究员. Tel: 0451-84861322. E-mail: lutongyan@hotmail.com

中的分布情况,旨在探索整合子及耐药基因盒在嗜水气单胞菌多重耐药株中的分布和构成差异,了解整合子与鱼源嗜水气单胞菌多重耐药性之间的关系,以评价整合子-耐药基因盒系统在嗜水气单胞菌多重耐药机制中的作用和地位。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

28 株鱼源嗜水气单胞菌分别从黑龙江、吉林和辽宁等地区患出血病的鲤、鲫组织中分离。采用细菌微量生化鉴定管和 16S rRNA 基因序列对 28 株嗜水气单胞菌进行鉴定^[10-12],确认为嗜水气单胞菌后进行细菌药敏试验和整合子分布检测。

1.2 嗜水气单胞菌药敏实验

将嗜水气单胞菌分离株挑入 MH 肉汤培养基中,28℃震荡培养过夜。采用 K-B 纸片法,取 0.1 mL 培养菌液均匀涂板于 9 cm MH 琼脂平板上,然后等距贴上药敏纸片 4 片/平板,分别测定分离株对左氟沙星(Levofloxacin, LE)、氧氟沙星(Ofloxacin, OF)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CP)、诺氟沙星(Norfloxacin, NF)、恩诺沙星(Enoxacin, EN)、庆大霉素(Gentamicin, GM)、卡那霉素(Kanamycin, KM)、链霉素(Straptomycin, SM)、阿莫西林(Amoxicillin, AMP)、氨苄西林(Ampicillin, AP)、羧苄青霉素(Carbenicillin, CB)、头孢克肟(Cefixime, CFX)、头孢噻吩(Ceftofur, CFT)、头孢吡肟(Cefepime, CP)、氯霉素(Chloramphenicol, CHL)、红霉素(Erythromycin, ER)、四环素(Tetracycline, TE)和复方新诺明(Compound Sulfametho-

xazole, SMZ)共 18 种常见药物的敏感程度。将处理好的平板倒置于培养箱中,28℃培养 24 h,测定抑菌圈直径,并根据 CLSI 标准进行药敏结果判定^[13]。实验菌株对抗生素的耐药率按照公式:耐药菌株数目(Rn)/总实验菌株数目(n)×100%计算。

1.3 整合子-基因盒系统检测及鉴定

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒及质粒提取试剂盒(Tiagen)分别提取 28 株嗜水气单胞菌基因组 DNA 和质粒 DNA,检测纯度后用于 PCR 扩增。

参考已发表文献,利用下列引物(表 1)分别对嗜水气单胞菌、 $\int$ 、 γ 类整合子进行 PCR 检测,并对 $\int$ 类整合子扩增片段进行序列测定及 BLAST 比对分析。PCR 反应采用 20 μ L 反应体系,其中含 DNA 模板 0.5 μ L, dNTP(10 mmol/L)0.5 μ L, 10× PCR buffer 2.5 μ L, MgCl₂(25 mmol/L)1.5 μ L, 整合子引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, Taq DNA 聚合酶(MBI)2 U,用 ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 反应程序为:95℃预变性 3 min;95℃变性 30 s,68℃退火 30s,72℃延伸 1 min,40 个循环;72℃延伸 10 min;4℃。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统观察分析(Biorad, 美国)。利用 BLAST 软件在线比对 $\int$ 类整合子可变区序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。

2 结果与分析

2.1 嗜水气单胞菌药敏试验结果

如表 2 所示,本实验中鱼源嗜水气单胞菌对 18 种抗生素中耐药率最高的是 β -内酰胺类

表 1 整合子检测所用引物信息
Tab. 1 Primers used in the detection of integrons in this study

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence(5'-3')	长度/bp length	退火温度/℃ annealing temperature	参考文献 reference
Int1-F	CTGCGTTTCGGTCAAGGTTCT	882	68	[14]
Int1-R	GCAATGGCCGAGCAGATCCT			
Int2-F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	746	59	[14]
Int2-R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG			
Int3-F	GCAGGGTGTGGACGAATACG	760	55	[14]
Int3-R	ACAGACCGAGAAGGCTTATG			
5'CS	GCCATCCAAGCAGCAAG	Variable	60	[15]
3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA			

表 2 鱼源嗜水气单胞菌分离株耐药率分析
Tab. 2 The Antibiotic resistance rate of *Aeromonas hydrophila* isolates from fish

抗生素类别 antibiotic type		药敏判定标准折点/mm breakpoint for antimicrobial susceptibility testing	菌株类别 strain type		
			R	I	S
氟喹诺酮类 quinolone	左氟沙星 levofloxacin, LF	16–18	9	0	19
	氧氟沙星 ofloxacin, OF	13–15	6	1	21
	环丙沙星 ciprofloxacin, CIP	16–20	6	4	18
	诺氟沙星 norfloxacin, NF	13–16	10	9	9
	恩诺沙星 enrofloxacin, EN	16–18	8	0	20
氨基糖苷类 aminoglycoside	庆大霉素 gentamicin, GEN	13–14	8	7	13
	卡那霉素 kanamycin, KN	14–17	15	10	3
	链霉素 streptomycin, STP	12–14	12	5	11
β -内酰胺类 β -lactam	青霉素类 penicillins	阿莫西林 amoxicillin, AMC	14–17	22	3
		氨苄西林 ampicillin, AMP	14–16	28	0
		羧苄青霉素 carbenicillin, CB	20–22	23	5
	头孢菌素类 cephalosporin	头孢克肟 cefixime, CFX	16–18	19	3
		头孢噻吩 cephalothin, CFT	15–17	27	0
单一药物类 single drug class	氯霉素类 chloramphenicol	头孢吡肟 cefepime, CP	15–17	3	3
		氯霉素 chloromycetin, CHL	13–17	18	1
		红霉素 erythromycin, EM	14–22	25	3
		四环素 tetracycline, TE	15–18	20	6
	磺胺类 sulfonamides	复方新诺明 sulfamethoxazole compound, SXT	13–16	12	0

注: R 表示耐受; I 表示中度敏感; S 表示敏感。
Note: R, resistant; I, intermediate; S, susceptible.

(67.9%~100%)、大环内酯类(89.3%)、氯霉素类(64.3%)和四环素类(71.4%)药物, 次之是氨基糖苷类(28.6%~53.6%)和磺胺类药物(42.8%), 最低是氟喹诺酮类药物(21.4%~35.7%)。

耐药谱分析表明, 28 株嗜水气单胞菌耐药谱差异较大, AH-43 分离株同时对 17 种抗生素耐药, 其耐药谱为 LE-OF-CIP-NF-EN-GEN-KN-STP-AMC-AMP-CB-CFX-CFT-CHL-EM-TE-SXT, AH-4 分离株仅对 2 种抗生素有耐药性(CFT-EM)。

2.2 嗜水气单胞菌 3 类整合子的 PCR 扩增及检测结果

28 株嗜水气单胞菌中整合子的检出情况见表 3。Ⅰ类整合子检出率为 53.57%(15/28), Ⅱ类整合子检出率为 21.43%(6/28), 另外 25%菌株(7/28)整合子阴性。为初步研究整合子的定位, 分别以嗜水气单胞菌菌株基因组 DNA 和质粒 DNA 为模板,

使用 3 类整合子特异性引物扩增其整合酶基因。结果表明, Ⅰ型整合酶基因的 PCR 扩增条带大小为 882 bp(图 1), 初步表明 Ⅰ类整合子可定位于染色体、质粒或者两者都存在; Ⅱ型整合酶基因的 PCR 扩增条带大小为 746 bp, 表明 Ⅱ类整合子均位于染色体上。

2.3 嗜水气单胞菌多重耐药与整合子相关性

研究结果表明, 整合子阴性嗜水气单胞菌主要对 β -内酰胺类、氯霉素类和大环内酯类药物耐药, 而对氟喹诺酮类、氨基糖苷类以及磺胺类药物敏感(表 4)。含有 Ⅰ类和 Ⅱ类整合子的嗜水气单胞菌其多重耐药性明显要高于整合子阴性菌株, 且整合子的有无对 28 株嗜水气单胞菌菌株的影响主要表现在对喹诺酮类、氨基糖苷类、 β -内酰胺类和磺胺类药物的耐药性。由表 4 也可以看出, Ⅰ类整合子对嗜水气单胞菌多重耐药性的贡献要

高于 I 类整合子, 显示出 I 类整合子的存在与细菌多重耐药性之间具有十分密切的关系。另外, 在含有 I 类整合子的 15 株嗜水气单胞菌中, 菌株之间的多重耐药谱也不尽相同。

2.4 I 类整合子可变区序列分析

对含有 I 类整合子的 15 株嗜水气单胞菌菌株使用 5'CS 和 3'CS 引物扩增其整合子可变区, 并将 PCR 产物纯化后送测序。序列分析结果表明, 15 株嗜水气单胞菌携带的基因盒以 *aadA*、*dfrA*、*catB* 家族为主, 分别介导氨基糖苷类、甲氧磺胺嘧啶类和氯霉素类药物耐药; 基因盒的排列以 *aadA2+dfrA12* 类型为主(表 5)。

I 类整合子阳性的嗜水气单胞菌耐药性在个体间也存在较大差异。如表 6 所示, AH-3、5、8、

10 的耐药谱与其他菌株差异较大, 尤其在对氟喹诺酮类药物的耐药性上, 提示多重耐药菌株的耐药表型与基因盒类型不存在密切关系。

3 讨论

作为一种人畜鱼共患致病菌, 嗜水气单胞菌的耐药性问题已成为全球共同关注的卫生问题之一。近年来, 鱼源嗜水气单胞菌临床分离株的多重耐药情况日益严峻, 其对阿莫西林、四环素、复方新诺明、氟苯尼考等常用药物均表现出严重的耐药性。肖丹等^[16]对 49 株嗜水气单胞菌耐药性调查表明, 试验菌株对氨基青霉素和头孢氨苄几乎 100% 耐药, 而对氨基糖苷类和喹诺酮类药物未产生耐药性。林居纯等^[17]研究发现 62% 的菌

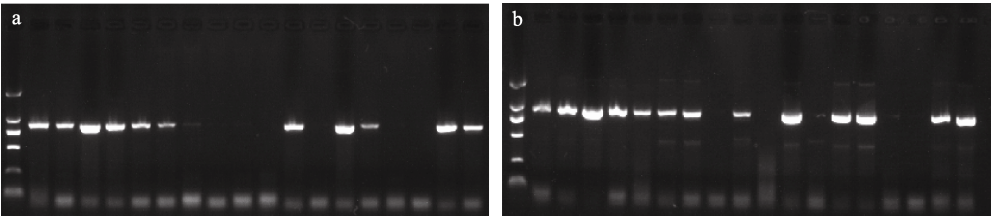


图 1 嗜水气单胞菌 I 类整合酶基因 *intI* 的 PCR 扩增结果

a: 以细菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增; b: 以细菌质粒为模板进行 PCR 扩增。

Fig. 1 PCR amplification of class I integron integrase (*intI*) in *Aeromonas hydrophila*

a: PCR amplification using genome DNA as template; b: PCR amplification using plasmid DNA as template.

表 3 嗜水气单胞菌整合子分布情况分析

Tab. 3 Distribution of integrons in *Aeromonas hydrophila*

菌株编号 strain number	整合子类型 integron type	分布 distribution	菌株编号 strain number	整合子类型 integron type	分布 distribution
AH-3		C	AH-34		C
AH-4	N		AH-38		C
AH-5		P/C	AH-39		C
AH-8		P/C	AH-43		C
AH-9	N		AH-49		C
AH-10		P/C	AH-50	N	
AH-13	N		AH-52	N	
AH-15		P/C	AH-53		P/C
AH-17		P/C	AH-56		C
AH-18	N		AH-58		P/C
AH-19		C	AH-59		P/C
AH-20		P/C	AH-61		C
AH-23		P	AH-63	N	
AH-32		C	AH-66		C

注: N 指整合子阴性; P 指质粒; C 指染色体。

Note: N, negative; P, plasmid; C, chromosome.

表 4 整合子-基因盒系统与嗜水气单胞菌多重耐药的相关性

Tab. 4 Correlation between integron-gene cassette system and multi-drug resistance in *Aeromonas hydrophila*

抗生素类别 antibiotic type	名称 name	整合子类型 integron type								
		无整合子(n=7) no integron			类整合子(n=15) class integron			类整合子(n=6) class integron		
		%R	%I	%S	%R	%I	%S	%R	%I	%S
氟喹诺酮类 quinolone	LF	0	0	100	60	0	40	0	0	100
	OF	0	0	100	40	6.67	53.33	0	0	100
	CIP	0	0	100	40	26.67	33.33	0	0	100
	NF	0	57.14	42.86	60	20	20	16.67	33.33	50
	EN	0	0	100	53.33	0	46.67	0	0	100
氨基糖苷类 aminoglycoside	GEN	0	28.57	71.43	40	33.33	26.67	33.33	0	66.67
	KN	0	71.43	28.57	60	33.33	6.67	100	0	0
	STP	0	28.57	71.43	73.33	20	6.67	16.67	0	83.33
青霉素类 penicillins	AMC	28.57	42.86	28.57	100	0	0	83.33	0	16.67
	AMP	85.71	14.29	0	100	0	0	100	0	0
	CB	57.14	42.86	0	93.33	6.67	0	83.33	16.67	0
头孢菌素类 cephalosporin	CFX	57.14	14.29	28.57	60	13.33	26.67	83.33	0	16.67
	CFT	85.71	0	14.29	100	0	0	100	0	0
	CP	0	28.57	42.86	20	0	80	16.67	16.67	66.67
氯霉素类 chloramphenicol	CHL	57.14	0	42.86	73.33	6.67	20	50	0	50
大环内酯类 macrolides	EM	85.71	14.29	0	93.33	6.67	0	83.33	16.67	0
四环素类 tetracyclines	TE	28.57	57.14	14.29	86.66	6.67	6.67	83.33	16.67	0
磺胺类 sulfonamides	SXT	0	0	100	73.33	0	26.67	16.67	0	83.33

注: 抗生素名称见表 2. R 表示耐受; I 表示中度敏感; S 表示敏感.

Note: Explanation for the name of antibiotic is shown in tab.2. R, resistant; I, intermediate; S, susceptible.

表 5 28 株嗜水气单胞菌 I 类整合子可变区序列分析

Tab. 5 Sequence analysis of variable region in class I integrons in 28 *Aeromonas hydrophila* isolates

菌株编号 strain	耐药谱 drug resistant spectrum	基因盒 gene cassette
AH-3	STP-AMC-AMP-CB-CFT-TE-SXT	aadA2+dfrA12
AH-5	AMC-AMP-CB-CFT-EM	aadA2+dfrA27
AH-8	STP-AMC-AMP-CB-CFT-CHL-EM-TE-SXT	aadA2+dfrA12
AH-10	STP-AMC-AMP-CB-CFT-CHL-EM-TE-SXT	aadA2+aadA4a
AH-15	LF-NF-GEN-KN-STP-AMC-AMP-CB-CFX-CP-CHL-EM-TE-SXT	aadA2
AH-17	NF-KN-STP-AMC-AMP-CB-CFX-CP-CHL-EM-TE-SXT	aadB
AH-20	LF-CIP-EN-GEN-KN-AMC-AMP-CB-CFX-CFT-CHL-EM-TE	dfrA1+orfC
AH-23	LF-OF-CIP-EN-GEN-KN-STP-AMC-AMP-CB-CFX-CFT-CHL-EM-TE-SXT	catB3+aadA2
AH-32	LF-OF-CIP-NF-EN-GEN-KN-STP-AMC-AMP-CB-CFX-CHL-EM-TE-SXT	catB3+aadA2
AH-39	LF-NF-EN-GEN-KN-AMC-AMP-CB-CFX-CHL-EM	blaOXA21+catB3
AH-43	LF-OF-CIP-NF-EN-GEN-KN-STP-AMC-AMP-CB-CFX-CFT-CHL-EM-TE-SXT	aadA2+dfrA12
AH-49	NF-EN-AMC-AMP-CB-CFX-CFT-CHL-EM-TE	aadB+catB3
AH-53	LF-OF-CIP-NF-EN-KN-STP-AMC-AMP-CFX-CFT-EM-TE-SXT	dfrA12+orfC
AH-58	LF-OF-NF-STP-AMC-AMP-CB-CFT-EM-TE-SXT	aadA2
AH-59	LF-OF-CIP-NF-EN-KN-STP-AMC-AMP-CB-CFX-CFT-CHL-EM-TE-SXT	aadA2+dfrA12

注: 抗生素名称见表 2.

Note: Explanation for the name of antibiotic is show in tab.2.

表 6 15 个 I 类整合子阳性嗜水气单胞菌菌株耐药性分析
Tab. 6 Detection of drug resistance in 15 *Aeromonas hydrophila* strains containing class I integron

抗生素 antibiotic	I 类整合子 class I integron														
	AH-3	AH-5	AH-8	AH-10	AH-15	AH-17	AH-20	AH-23	AH-32	AH-39	AH-43	AH-49	AH-53	AH-58	AH-59
LF	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
OF	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R
CIP	S	S	S	S	I	I	R	R	R	I	R	S	R	I	R
NF	S	S	I	I	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R
EN	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
GEN	S	S	S	I	R	S	R	R	R	R	R	I	I	I	I
KN	S	I	I	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R
STP	R	S	R	R	R	R	I	R	R	I	R	I	R	R	R
AMC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AMP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R
CFX	S	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R
CFT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CP	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
CHL	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R
EM	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TE	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
SXT	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R

注：抗生素名称见表 2。R 表示耐受；I 表示中间；S 表示敏感。
Note: Explanation for the name of antibiotic is shown in tab.2. R, resistant; I, intermediate; S, susceptible.

株对复方新诺明耐药，38%~90%菌株对 β -内酰胺类药物耐药。本实验结果则表明，分离到的 28 株嗜水气单胞菌主要对 β -内酰胺类、大环内脂类、氯霉素类和四环素类药物耐药严重，其耐药率均超过 60%；其次是氨基糖苷类药物(如庆大霉素、卡那霉素和链霉素等)和磺胺类药物，耐药率最低的是氟喹诺酮类药物，包括恩诺沙星、诺氟沙星、左氟沙星、氧氟沙星和环丙沙星等。另外，嗜水气单胞菌分离株对氨苄西林和头孢噻吩的耐药率达到 96%以上。这些结果表明，从东北地区淡水鱼主养区分离到的嗜水气单胞菌已经逐步表现出对氟喹诺酮类药物的耐药性，推测其可能与该类药物的滥用以及耐药菌株的流通相关。因此，对细菌性疾病的防治要正确合理地选用抗生素类药物，严格把握用药剂量、方式等，同时加强对耐药菌株的监测。

目前，对嗜水气单胞菌的耐药机制研究不多，主要从耐药质粒、染色体基因突变方面进行。洪

经等^[18]通过分析质粒指纹图谱与耐药的相关性发现，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。肖丹等^[16]通过 ERIC-PCR 分型结合菌株耐药性分析研究表明，嗜水气单胞菌基因型与耐药性可能存在一定的相关性。王晓丰等^[19]研究了嗜水气单胞菌对氟喹诺酮类药物的敏感性及其耐药相关基因，结果表明喹诺酮抗性决定区 QRDR 的 *gyrA* 基因和 *parC* 基因发生氨基酸突变，但是同时指出菌株的耐药性与药物靶位基因 QRDR 区域是否发生突变并不存在线性关联，提示药物靶位的变化并非是氟喹诺酮类耐药菌株唯一的抗性机制。整合子作为一种可以捕获外源基因的可移动遗传元件，在嗜水气单胞菌的多重耐药机制中也发挥着重要作用。由于整合子携带位点特异性重组系统，因而可以整合不同的耐药基因盒，使细菌具有多重耐药性。当耐药基因成为可移动单元的一部分时，其

扩散机会大大增强。目前已发现了多个基因盒家族,包括 *aad* 基因家族、*dfr* 基因家族、*cat* 基因家族、*oxa* 基因家族等,可分别介导细菌对氨基糖苷类、甲氧嘧啶类、氯霉素类和苯唑西林类药物的耐药^[20]。Mintra 等^[21]研究指出,从尼罗罗非鱼中分离到的嗜水气单胞菌 46%含有 类整合子,其基因盒类型以 *dfrA12-aadA2* 为主,而未检出 类整合子。本研究在 28 株嗜水气单胞菌中 类和 类整合子的检出率分别为 53.57%和 21.43%,且 类整合子主要位于细菌染色体上, 类整合子可同时位于染色体或质粒上。本研究通过对 类整合子可变区序列分析表明,基因盒以 *aadA*、*dfrA*、*catB* 家族为主,分别介导氨基糖苷类、甲氧嘧啶类和氯霉素类药物耐药;基因盒的组合以 *aadA2+dfrA12* 类型为主,这也与 Mintra 等^[21]的研究结果相类似。

对整合子阳性和阴性菌株的耐药情况进行比较分析,可以发现,含 类和 类整合子的嗜水气单胞菌的耐药率明显高于整合子阴性菌株,且整合子的有无对 28 株嗜水气单胞菌菌株的影响主要表现在氟喹诺酮类药物、氨基糖苷类药物、 β -内酰胺类和磺胺类药物的耐药性。有研究指出,含整合子的菌株比不含有整合子的菌株更倾向于对各种抗菌药物产生耐药性^[22]。在含有 类整合子的嗜水气单胞菌菌株中,个体间耐药谱差异也较大(表 6),AH-3、5、8、10 均对氟喹诺酮类药物敏感,而其他菌株则相对耐药。结合嗜水气单胞菌 类整合子携带基因盒的序列分析,可以看出多重耐药菌株的耐药表型与基因盒的类型无直接相关性。含有整合子的细菌并不意味着就一定耐药,其耐药性还与基因盒的表达强弱及其他一些尚不清楚的机制有关。此外,细菌耐药性的产生是多个调控机制共同发挥作用的,其模式非常复杂,且不符合简单的突变模型。

整合子-基因盒系统的研究为细菌耐药机制的探讨提供了新的研究方向,但仍需要结合其他研究如药物作用机理、细菌代谢途径等综合考虑细菌耐药产生机制。面对由整合子系统及其他耐药机制引起的细菌耐药日益严重的情况,必须积

极探索有效的抗耐药途径,克服细菌耐药。

参考文献:

- [1] Bennett P M. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria [J]. Br J Pharmacol, 2008, 153: 347-357.
- [2] Hall R M, Brookes D E, Stokes H W. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point [J]. Mol Microbiol, 1991, 5(8): 1941-1959.
- [3] Rowe-magnus D A, Mazel D. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution [J]. Curr Opin Microbiol, 2001, 4(5): 565-569.
- [4] Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution [J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(8): 608-620.
- [5] 国宪虎, 夏蕊蕊, 徐海. 整合子基因盒系统及 β -内酰胺酶介导的细菌耐药[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 289-294.
- [6] Partridge S R, Tsafnat G, Coiera E, et al. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons[J]. FEMS Microb Rev, 2009, 33(4): 757-784.
- [7] 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.
- [8] 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]. Int J Food Microbiol, 2002, 76: 165-168.
- [9] 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.
- [10] 司力娜, 李绍戊, 王荻, 等. 东北三省 15 株致病性嗜水气单胞菌分离株的药敏实验分析[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(4): 786-790.
- [11] 朱成科, 周晓扬, 张其中. 南方鲇幼鱼细菌性败血症病原与组织病理[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 360-370.
- [12] 樊海平, 吴斌, 曾占壮, 等. 日本鳊体表溃疡病原菌的分离、鉴定及单克隆抗体制备[J]. 中国水产科学, 2009, 16(2): 295-302.
- [13] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests [S]. Approved Standard NCCLS Publications M2-A5. Villanova, PA, USA. 1993.
- [14] Ryu S H, Park S G, Choi S M, et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood [J]. Int J Food Microbiol, 2012, 152(1-2): 14-18.

- [15] Levesque C, Piche L, Larose C, et al. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39: 185–191.
- [16] 肖丹, 曹海鹏, 胡鲲, 等. 淡水养殖动物致病性嗜水气单胞菌 ERIC-PCR 分型与耐药性[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(5): 1092–1099.
- [17] 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.
- [18] 洪经, 潘连德. 鱼源嗜水气单胞菌质粒的指纹图谱及其与耐药性的关系[J]. *水产学报*, 2010, 34(12): 1908–1915.
- [19] 王晓丰, 薛晖, 丁正峰, 等. 嗜水气单胞菌对氟喹诺酮类药物的敏感性及耐药相关基因分析[J]. *江苏农业学报*, 2010, 26(6): 1298–1303.
- [20] 蒋宏, 刘继芬, 刘蓉. 整合子-基因盒系统与细菌多重耐药研究进展[J]. *四川省卫生管理干部学院学报*, 2008, 27(2): 122–125.
- [21] Lukkana M, Wongtavatchai J, Chuanchuen R. Class 1 integrons in *Aeromonas hydrophila* isolates from farmed Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*) [J]. *J Vet Med Sci*, 2012, 74(4): 435–440.
- [22] Rowe-Magnus D A, Guerout A M, Mazel D. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1657–1669.

Molecular characterization of integron-gene cassettes in multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* from fish

LI Shaowu, WANG Di, LIU Hongbai, YIN Jiasheng, LU Tongyan

Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China

Abstract: The aim of this study was to explore the distribution and composition of integron-gene cassettes in multi-drug resistant (MDR) *Aeromonas hydrophila*, and to understand the relationship between integrons and MDR, so that we can accurately evaluate the status of integron-gene cassette systems in the MDR mechanisms of *A. hydrophila*. To determine the distribution and molecular characterization of integron-gene cassettes in 28 multi-drug resistant *A. hydrophila* isolates from fish, the K-B disk diffusion method was employed to determine the antimicrobial susceptibility of the isolates to 18 different antibiotics. PCR amplification was then performed to detect class I, II, and III integrons and their gene cassettes in *A. hydrophila*. The results indicate that *A. hydrophila* isolated from fish exhibited multi-drug resistance, with an antibiotic resistance rate of more than 60% to β -lactams, macrolides, chloramphenicols, and tetracycline antibiotics, while it was more sensitive to fluoroquinolones. The drug resistant spectrum also differed greatly among the isolates. The PCR amplification results showed that out of 28 isolates, 15 (53.57%) harbored *intI* I and 6 (21.43%) harbored *intI* II, however, no *intI* III was detected in the isolates. Combined with the antimicrobial susceptibility results, the drug resistant rate of the integron positive strains was higher than that of the integron negative ones. In addition, class I integron positive strains exhibited a higher multi-drug resistant rate than those harboring class II integrons, which indicates that the integron-gene cassette system plays an important role in the occurrence of multi-drug resistance in *A. hydrophila*. The main cassettes were those encoding aminoglycoside adenylyltransferase A (*aadA*), dihydrofolate reductase A (*dfrA*), and chloramphenicol acetyltransferase B (*catB*). The most prevalent gene cassette array was *aadA2+dfrA12*. In addition, there was an obvious difference in MDR among individuals containing class I integrons, hinting that no direct relationship exists between the MDR phenotype and gene cassettes in the *A. hydrophila* isolates. These findings suggest that the transfer of antibiotic resistance genes can occur through integron-gene cassettes among *A. hydrophila*.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; multi-drug resistance; integron-gene cassettes system

Corresponding author: LU Tongyan. E-mail: lutongyan@hotmail.com