

致病性海洋弧菌对氨基糖苷类药物的耐药传递机制初步研究

王瑞旋¹, 王江勇², 李韵萍³, 郭子晗⁴, 李 炳², 李 云¹, 朱 慧¹

(1. 韩山师范学院, 广东 潮州 521041; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 3. 华南师范大学, 广东 广州 510631; 4. 加利福尼亚浸会大学, 美国 加利福尼亚 92504)

摘要: 随着抗菌药物在水产养殖中用量的增加及混合使用现象的出现, 水产病原菌表现出更强的耐药性甚至是多重耐药性, 大大增加了水产养殖中细菌性病害防治的难度。细菌耐药性最常见的传递方式是耐药质粒的转移。本研究通过对多个水产致病弧菌质粒上新霉素及卡那霉素的耐药基因 *aph(3')-IIa* 进行检测分析, 并利用电穿孔法将筛选得到的 3 个受试菌株上的质粒分别转入大肠杆菌中, 结果从 3 个转化子中检测到目的基因。进一步的药敏测试结果显示, 3 个转化子的最小抑菌浓度(MIC 值)以及最小杀菌浓度(MBC 值)均明显上升。可见, 在特定条件下, 水生致病性弧菌对氨基糖苷类(新霉素和卡那霉素)的耐药质粒可转移至大肠杆菌并参与介导其耐药性, 大大降低了受体菌对新霉素和卡那霉素的敏感性。本研究将为环境弧菌与临床细菌对氨基糖苷类药物的抗性传递研究提供数据基础和参考依据。

关键词: 致病弧菌; 耐药质粒; 新霉素; 卡那霉素; 耐药机制

中图分类号: Q931 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2020)10-0081-10

DOI: 10.11759/hyxx20191221002

随着水产养殖业的不断发展, 病害问题愈演愈烈。其中, 弧菌病作为最早被发现且危害最严重的水生传染性疾病之一, 已日渐成为人们关注的焦点。迄今为止, 已发现的病原弧菌有哈维弧菌 *Vibrio harveyi*、溶珊瑚弧菌 *V. alginolyticus*、鳗弧菌 *V. anguillarum*、副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus*、灿烂弧菌 *V. splendidus*、杀鲑弧菌 *V. salmonicida*、创伤弧菌 *V. vulnificus* 等。其中, 在海水养殖病害事件中, 哈维弧菌已成为出现频率最高的致病菌之一^[1-2], 或以病原的身份存在, 或扮演“帮凶”角色引起海水动物包括鱼、虾、贝类的感染^[3-9], 给养殖户带来了严重的经济损失, 同时也是人类的条件致病菌^[10], 其中有大约 5% 的哈维弧菌可同时引起人类感染发病^[11]。溶珊瑚弧菌是海水中的正常菌群之一, 其数量居于海洋弧菌之首, 它广泛分布于世界各地海水及河口处, 同时还大量分布于多种海洋动物中, 是多种海水养殖动物的条件致病菌。塔氏弧菌 *V. tubiashii* 也是典型的条件致病菌, 广泛分布于养殖环境中, 可引起牡蛎、象拔蚌、蛤蜊等软体动物甚至珊瑚等暴发疾病^[12-14], 如 Hasegawa 等发现塔氏弧菌可使太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* 幼虫致死^[15], 而 Séré 等则发现西印度洋中珊瑚所患的白斑综合征由塔氏弧菌所导致^[16]。目前抗菌药物治疗仍是防治水产养殖动物细菌性病害的主要措施。而养

殖生产实践中, 渔药的使用存在乱用、滥用等现象^[17], 药物残留及药物的选择压力致使细菌基因突变或耐药基因转移从而产生耐药性, 最终导致抗菌药物的治疗效果减弱甚至无效^[18], 抗生素的不科学使用正是导致耐药性的主要原因^[19]。菌株的耐药性不仅能通过基因水平传播, 还能在相同或不同种属的细菌之间传播, 从而增加了水产养殖鱼类细菌性病害的防治难度, 并可能使得水产养殖鱼类细菌性病害面临药物治疗无效的结果。细菌的耐药性不仅对水产养殖户造成经济损失, 而且对人类健康造成严重的威胁。研究表明, 水产养殖动物细菌有将耐药性传递给人类细菌的可能性, 耐药质粒的传递作用使得水产养殖鱼

收稿日期: 2019-12-21; 修回日期: 2020-03-01

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2017A030313112); 国家自然科学基金项目(31902416); 广东省现代农业产业技术体系岗位专家(粤财农[2019]73 号); 国家贝类产业技术体系岗位专家(CARS-49); 广东省教育厅特色创新科研项目(2016KTSCX086)

[Foundation: Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 2017A030313112; National Natural Science Foundation of China, No. 31902416; Modern Agricultural Industry Technical System Post Expert of Guangdong, Province, No. 2019-73; National Shellfish Industry Technical System Position Expert, No. CARS-49; the Innovative Scientific Research Project of Education Department of Guangdong Province, No. 2016KTSCX086]

作者简介: 王瑞旋(1979-), 女, 广东揭阳人, 副研究员, 博士, 主要从事海洋细菌耐药性研究, E-mail: wangruixuan@scsfri.ac.cn; 朱慧, 男, 通信作者, 教授, 主要研究方向: 生理生态学, E-mail: gdzhuhui@126.com

类病原菌与大肠杆菌可相互传递耐药质粒,威胁着人类健康^[20]。此外,食源性病原菌耐药同样威胁着人类健康,且已有研究表明水产品中食源性致病菌广泛存在耐药现象^[21]。

目前有 28 种以上抗菌药物被允许使用于水产养殖中,几乎囊括了所有抗菌素类药物。作为广谱抗生素,氨基糖苷类抗菌药物除了应用于人类疾病的治疗,还常被应用于家畜和水产养殖业。随着应用的增多,水生细菌对这类药物也产生了广泛的耐药性。有研究表明,来源于河口水体、沉积物或养殖鱼类的水生弧菌对庆大霉素和链霉素等氨基糖苷类药物表现耐药性^[22]。水生细菌耐药现象已不容忽视,由于水环境中微生物的复杂性及水流的动力,更利于细菌之间的接触从而使其更易于互相传递耐药性。耐药质粒的水平转移是自然界中细菌产生耐药性最主要、最常见的方式,由耐药质粒介导的耐药性正朝着多重耐药方向发展。本文通过对致病弧菌的氨基糖苷类耐药基因进行检测和分析,并将相关质粒转入大肠杆菌中使其对氨基糖苷类药物的敏感性大大降低,本研究将为环境弧菌与临床细菌对氨基糖苷类药物的抗性传递研究提供数据基础和参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

菌株来源:7 株受试菌由中国水产科学研究院南海水产研究所渔病室分离保存,均为革兰氏阴性菌,具体如下:编号 BBX1:致使方斑东风螺 *Babylonia areolata* 患“肿吻症”而急性死亡的哈维弧菌^[23-24],编号 BV2 和 9H7:均是引起鲍脓疱症的哈维弧菌^[8];编号 B2D:引起鲍肌肉萎缩症的哈维弧菌^[25];编号 BBXP1:使方斑东风螺死亡的塔氏弧菌;编号 NA0301:使杂色鲍鲍苗大规模脱落死亡的溶珊瑚弧菌^[26];编号 TO1:引起卵形鲳鲹 *Trachinotus ovatus* 结节病的美人鱼发光杆菌杀鱼亚种 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*^[27];受体菌株:大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922。同时以大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 为质控菌株。

培养基:水解酪蛋白(Mueller-Hinton,简称 MH)琼脂培养基、MH 液体培养基、营养琼脂培养基、营养肉汤培养基、硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖

(Thiosulfate citrate bile salts sucrose,简称 TCBS)琼脂培养基、细菌基础培养基(Luria-Bertani,简称 LB)液体培养基(购自环凯生物科技有限公司)。

抗生素纸片:青霉素(10 U/片)、呋喃唑酮(300 µg/片)、庆大霉素(10 µg/片)、卡那霉素(30 µg/片)、新霉素(30 µg/片)、红霉素(15 µg/片)、四环素(30 µg/片)、多西环素(30 µg/片)、利福平(5 µg/片)、诺氟沙星(10 µg/片)、恩诺沙星(10 µg/片)、氧氟沙星(5 µg/片)、氯霉素(30 µg/片)、复方新诺明(10 µg/片)均购自北京天坛药物生物技术开发公司;卡那霉素药粉、新霉素药粉均购自广州威佳科技有限公司。

试剂盒及 PCR 试剂及引物:高纯质粒 DNA 微量提取试剂盒(离心柱法)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱法)和 DNA 纯化试剂盒(离心柱法)(购自广州吉瑞基因科技有限公司),6×buffer、PCRmix、ddH₂O 和 Marker(购自宝生物工程(大连)有限公司)。

1.2 药敏测试

以实验室保存的受试菌为研究对象,采用纸片扩散法(Kirby-Bauer,简称 K-B 法),根据 CLSI 标准及相关文献进行操作^[28-29]。用无菌生理盐水洗脱于斜面培养基上于 28℃培养 24 h 的菌苔,稀释至菌悬液浓度约为 1×10^8 CFU/mL,吸取 100 µL 菌悬液均匀涂布在 MH 琼脂培养基上(培养皿直径 9 cm,培养基厚度约 4 mm),涂布后在室温下放置 15~30 min,待菌液被吸收,用无菌镊子夹取抗生素纸片贴在培养基表面,每个平板放置 5 张药敏纸片,纸片与培养皿边界距离>1.0 cm,相邻纸片距离≥2.0 cm,然后将平板在 28℃生化培养箱中倒置培养 24 h,测量抑菌圈直径,根据表 1 和表 2 判断不同菌株对不同抗菌药物的敏感程度:敏感(S)、中度耐药(I)、耐药(R)。

1.3 耐药基因的检测

挑取活化的受试菌单菌落分别接种于含有 2% NaCl 的 35 mL 营养肉汤培养基中,28℃摇床培养过夜,分别按照高纯质粒 DNA 微量提取试剂盒和细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作步骤进行操作,分别获得质粒 DNA 和基因组 DNA,进一步回收 DNA 后用纯化试剂盒进行纯化。根据 GENBANK 中 *aph(3')-IIa* 的碱基序列进行耐药基因扩增引物的设计,并采用聚合酶链式反应法对耐药基因进行扩增。引物序列见表 3,PCR 反应体系见表 4。PCR 反应条件为:94℃预变性 2 min,94℃变性 50 s,60℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,35 个循环,72℃保持 5 min,4℃保存。

表 1 非苛养细菌标准菌株纸片扩散法抗微生物药物敏感性实验抑菌环直径质控允许范围

Tab. 1 Bounds for diameter of antimicrobial susceptibility of heterotrophic bacteria (K-B diffusion method)

抗生素	纸片上药物含量/ μg	大肠杆菌/mm	金黄色葡萄球菌/mm
青霉素 Penicillin	10	-	-
呋喃唑酮 Furazolidone	300	20~25	18~22
庆大霉素 Gentamicin	10	19~26	19~27
卡那霉素 Kanamycin	30	17~25	19~26
新霉素 Neomycin	30	-	-
红霉素 Erythromycin	15	-	22~30
四环素 Tetracycline	30	18~25	24~30
多西环素 Doxycycline	30	18~24	23~29
利福平 Rifampicin	5	8~10	26~34
诺氟沙星 Norfloxacin	10	28~35	17~28
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	28~36	22~28
氧氟沙星 Ofloxacin	5	29~33	24~28
氯霉素 Chloramphenicol	30	21~27	19~26
复方新诺明 Sulfamethoxazole	30	24~32	24~32

表 2 药敏实验判定标准

Tab. 2 Performance standards for antibiotic susceptibility tests for bacteria

抗菌药物		判定标准-抑菌圈直径/mm		
		耐药(R)	中度耐药(I)	敏感(S)
β -内酰胺类	青霉素	-	-	-
硝基呋喃类	呋喃唑酮	≤ 15	15~16	≥ 16
	庆大霉素	≤ 12	13~14	≥ 15
氨基糖苷类	卡那霉素	≤ 13	14~17	≥ 18
	新霉素	≤ 12	13~16	≥ 17
大环内酯类	红霉素	≤ 14	14~22	≥ 22
四环素类	四环素	≤ 15	15~18	≥ 18
	多西环素	≤ 13	13~15	≥ 15
利福霉素类	利福平	≤ 17	17~19	≥ 19
	诺氟沙星	≤ 13	13~16	≥ 16
喹诺酮类	恩诺沙星	≤ 13	13~16	≥ 16
	氧氟沙星	≤ 13	13~15	≥ 15
氯霉素类	氯霉素	≤ 13	13~17	≥ 17
磺胺类	复方新诺明	≤ 13	13~16	≥ 16

表 3 耐药基因扩增引物及相关信息

Tab. 3 Primer sequences and relative information

耐药基因	引物名称	引物序列(5'-3')	Tm 值/ $^{\circ}\text{C}$	目的片段/bp	GenBank 登陆号
<i>aph(3')-IIa</i>	<i>aph(3')-IIaF</i>	TGACTGGGCACAACAGACAA	57.5	677	AY222814
	<i>aph(3')-IIaR</i>	CGGCGATACCGTAAAGCAC	59.2		

表 4 PCR 反应体系

Tab. 4 Polymerase Chain Reaction system

组成	用量/ μL
Mix	12.5
ddH ₂ O	9.5
For Primer	1
Rev Primer	1
Template	1
Total	25

1.4 耐药质粒的电击转化

将大肠杆菌标准株的新鲜菌落接种于 10 mL 的 LB 培养基中, 摇床 200 r/min、37℃ 培养过夜。按照 1:20 的比例, 将过夜培养菌液转接于 100 mL 的 LB 液体中, 摇床 200 r/min、37℃ 培养 3~5 小时, 至 OD₆₀₀ 吸光值为 0.5~0.8, 将菌液放置于冰上冷却 10 min。将冷却后的菌液于 4℃ 转速 5 000×g 离心 10 min, 弃上清, 用 35 mL 预冷的 ddH₂O 重悬细菌沉淀。将细菌悬液于 4℃ 转速 5 000×g 离心 10 min, 弃上清, 用 35 mL 预冷的甘油重悬细菌沉淀。将细菌悬液于 4℃ 转速 5 000×g 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 mL 10% 甘油, 用 1.5 mL 离心管分装成 100 μL /管, 由此获得大肠杆菌感受态细胞, 置于 -80℃ 保存备用。将 0.4 mL 电击杯放于冰上预冷, 冻存的感受态细胞于冰上冻融。在冰上将 5 μL 质粒 (4 ng/ μL) 加入到 30 μL 感受态细胞中, 并在冰上培育 5 min。将质粒与感受态细胞的混合液加入到预冷的电击杯中, 去除电击杯中的气泡, 冰浴 10 min。擦干电击杯外壁上的水, 电击。电击条件: 2.5 kV, 200 Ω , 25 μF 。听到蜂鸣声后迅速将 1 mL 37℃ 保温的 LB 培养基加入到电击杯中 (1 min 之内), 并在无菌操作台中将混合液转移到 1.5 mL EP 管中 (室温进行)。将混合液于 220 r/min 摇床 37℃ 培养 2 h, 吸取 100 μL 转化液均匀涂布在加入新霉素的营养琼脂平板上 (新霉素浓度: 10 ng/mL, 室温放置待液体吸收后, 在 37℃ 生化培养箱中倒置培养 24 h 后观察菌落生长状况。

重组质粒的鉴定: 挑取转化平板上的单菌落接种到 35 mL 含有新霉素的营养肉汤培养基中, 37℃ 摇床培养过夜。取 1~7 mL 菌悬液于 2 mL EP 管中, 10 000×g 离心 1 min, 收集菌体沉淀。使用高纯质粒 DNA 微量提取试剂盒获得质粒 DNA 并保存于 -20℃ 备用。利用聚合酶链式反应对重组质粒新霉素耐药基因 *aph(3')-IIa* 进行扩增以鉴定, 反应体系同表 5。

表 5 特异片段 (677 bp) 检出结果对比

Tab. 5 Specific fragment (677 bp) detections

样品类型	BBX1	BBXP1	TO1	NA0301	BV2	B2D	9H7
质粒 DNA	+	+	-	+	-	+	+
基因组 DNA	-	-	-	-	+	+	-

1.5 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度的测定

以新霉素对大肠杆菌的最小抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, 简称 MIC) 和最小杀菌浓度 (Minimum bactericidal concentration, 简称 MBC) 为对照组, 分别测定新霉素对三株受试菌 (BBX1、BBXP1、NA0301) 的 MIC 值和 MBC 值, 设平行组。方法如下: 取无菌 2 mL EP 管 13 支排成一排, 依次编号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13。向每支 EP 管中加入 1 mL MHA 液体培养基, 在 1 号管中加入浓度为 256 $\mu\text{g/mL}$ 新霉素 1 mL 混匀, 然后吸取 1 mL 匀液至 2 号管中, 混匀后再吸取 1 mL 匀液 1 至 3 号管中, 以此类推, 连续倍比稀释至 11 号管, 且从 11 号管吸取 1 mL 匀液弃去。12 号管为不含新霉素的生长对照管, 13 号管为阴性对照管。此时, 1—11 号管的药物浓度依次为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g/mL}$ 。然后在 1—12 号管加入浓度约为 10^7 CFU/mL 的菌液 10 μL , 使各管最终菌液浓度约 10^5 ~ 10^6 CFU/mL。将各管放置在 200 r/min 摇床 37℃ 培养 24 h 后观察结果。测定卡那霉素对受试菌的 MIC 的方法同上。然后, 取出肉眼观察到无细菌生长最低 3 个浓度 (包括 MIC) 的 EP 管, 用移液枪吹打 EP 管中的培养液使其混匀, 并吸取 100 μL 培养液均匀涂布在 MH 琼脂平板上, 在常温下放置 5~10 min 待培养液被培养基完全吸收, 将平板在 37℃ 下恒温倒置培养 24 h, 对平板进行菌落计数, 并与对照组比较, 以与对照组平板菌落数差异显著的药物梯度浓度判定为受试药物对相应测试菌株的 MIC 值, 以无菌生长对应的药物梯度浓度判定为受试药物对相应测试菌株的 MBC 值。

2 结果分析

2.1 水产致病性弧菌的耐药率及质粒检测结果

根据表 2 的药敏实验判定标准, 对 7 株受试菌株对 8 类共 14 种抗菌药物的敏感性进行判断, 7 株受试菌均表现耐药 (如图 1), 其中编号 B2D 的菌株对受试的 14 种药物均表现为耐药 (即对受试药物耐药比例

为 100%), 7 株受试菌均对 3 类以上抗生素表现耐药, 多重耐药率为 100%; 且 7 个菌株均对受试的氨基糖苷类药物(包括庆大霉素、新霉素和卡那霉素)表现中度耐药和完全耐药。

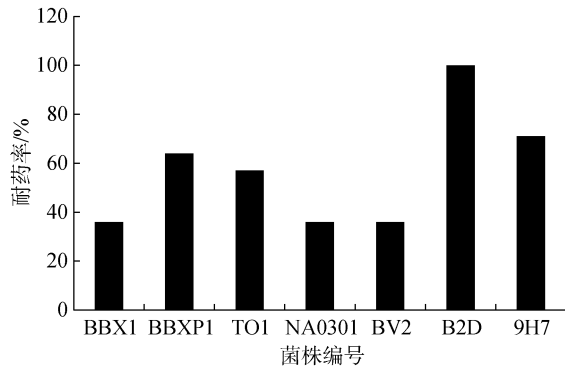


图 1 水产致病菌药物耐药率分析

Fig. 1 Antimicrobial susceptibility test for 7 bacteria from aquaculture

将药敏实验所筛选得到的耐药菌通过质粒提取试剂盒的处理, 分析质粒携带情况(如图 2)结果发现, 7 株受试菌均携带质粒, 质粒携带率为 100%, 每株受试菌携带质粒大小约为 1 kb, 均为小型质粒。

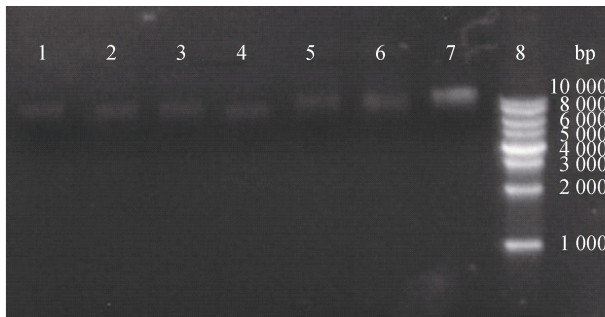


图 2 耐药菌质粒电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of resistant bacteria plasmid

注: 1: TO1, 2: BBXP1, 3: BBX1, 4: NA0301, 5: BV2, 6: B2D, 7: 9H7, 8: DNA Marker(10 000 bp)

用 ddH₂O 代替质粒 DNA 作为阴性对照, 以质粒 DNA 和基因组 DNA 作为模板, 对氨基糖苷类耐药基因 *aph(3')-IIa* 进行 PCR 扩增。质粒 DNA 耐药基因扩增结果如图 3 所示, 受试菌 BBX1、BBXP1、NA0301、9H7 均分别扩增出 677 bp 的特异性片段且无其他杂带出现。以相应菌株的基因组 DNA 为模板进行耐药基因的扩增, 如图 4 所示, 上述 4 株菌中的 BBX1、BBXP1 和 NA0301 未扩增出耐药基因片段。677 bp 的耐药基因在受试菌的质粒 DNA 及基因组

DNA 检出结果如表 5 所示。

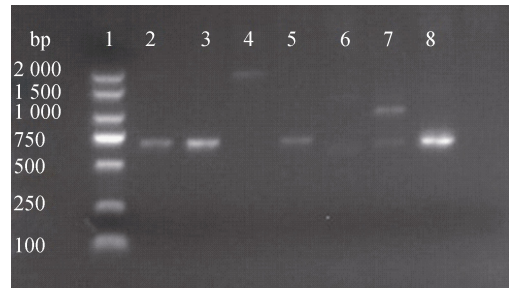


图 3 质粒 DNA 耐药基因 *aph(3')-IIa* PCR 产物电泳结果
Fig. 3 Electrophoresis of PCR-amplified resistant gene *aph(3')-IIa* in plasmid DNA

注: 1: DNA Marker (2 000 bp), 2: BBX1, 3: BBXP1, 4: TO1, 5: NA0301, 6: BV2, 7: B2D, 8: 9H7, 9: 空白对照)

对在质粒 DNA 上检测出特异片段同时在相应基因组 DNA 上未检出特异片段的 3 株受试菌(BBX1、BBXP1 和 NA0301)进行耐药基因测序, 用 DNASTAR MegAlign 软件对耐药基因测序结果进行分析, 结果表明 BBX1、BBXP1、NA0301 中的 *aph(3')-IIa* 耐药基因与 GenBank 中的序列(登录号: AY222814)同源性分别为 99.1%、99.5%、99.5%, 表明引物特异性较高, 所扩增到的片段为 *aph(3')-IIa* 基因(图 4), 提示受试菌 *aph(3')-IIa* 耐药基因位于质粒 DNA 上, 参与介导受试菌对新霉素的抗性。

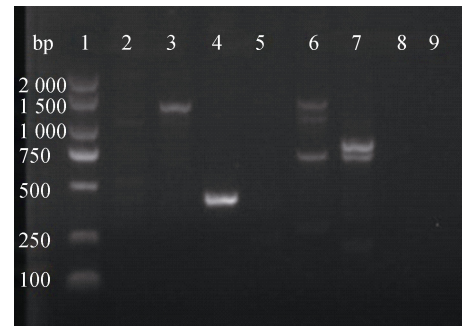


图 4 基因组 DNA 耐药基因 *aph(3')-IIa* PCR 产物电泳结果
Fig. 4 Electrophoresis of PCR-amplified resistant gene *aph(3')-IIa* in genome DNA

注: 1: DNA Marker (2 000 bp), 2: BBX1, 3: BBXP1, 4: TO1, 5: NA0301, 6: BV2, 7: B2D, 8: 9H7, 9: 空白对照)

2.2 重组质粒的鉴定

将 3 株受试菌的耐药质粒用电转化法分别转移进受体菌大肠杆菌中, 形成转化子。以弧菌质粒 DNA 为模板作为阳性对照, 以大肠杆菌质粒 DNA 为模板作为阴性对照, 以 ddH₂O 代替质粒 DNA 作为

空白对照,以转化子(分别命名为 BBX1-大肠、BBXP1-大肠、NA0301-大肠)的质粒 DNA 作为模板,对氨基糖苷类耐药基因 *aph(3')-IIa* 进行 PCR 扩增。扩增结果如图 5 所示,3 株转化子均扩增出 677 bp 的特异性片段。通过 DNASTar MegAlign 软件对耐药基因测序结果进行分析,结果表明转化子 BBX1-大肠、BBXP1-大肠、NA0301-大肠中的 *aph(3')-IIa* 耐药基因与 GenBank 中的序列(登录号: AY222814)同源性分别为 95.5%、99.2%、99.2%,可表明扩增到的片段为 *aph(3')-IIa* 基因。而以大肠杆菌标准株质粒 DNA 为模板的阴性对照未扩增出特异性片段(如图 5),说明受体菌大肠杆菌标准株不含有耐药基因 *aph(3')-IIa*,即 3 株受试菌中的耐药质粒成功转移到受体菌大肠杆菌标准株中。



图 5 耐药质粒电转产物电泳结果

Fig. 5 Electrophoresis of PCR-amplified resistant gene after electroporation

注: 1: DNA Marker(2 000 bp), 2: BBX1, 3: BBXP1, 4: NA0301, 5: BBX1-大肠, 6: BBXP1-大肠, 7: NA0301-大肠, 8: 大肠杆菌标准株, 9: 空白对照

2.3 肉汤稀释法测定 MIC 及 MBC

用肉汤稀释法测定 MIC 及 MBC, 结果如图 6 所示, 新霉素对大肠杆菌标准株及转化子(BBX1-大肠, BBXP1-大肠, NA0301-大肠)的 MIC 分别为 2 ng/ μ L、4 ng/ μ L、4 ng/ μ L、4 ng/ μ L, 新霉素对大肠杆菌标准株及转化子(BBX1-大肠, BBXP1-大肠, NA0301-大肠)的 MBC 分别为 4 ng/ μ L、16 ng/ μ L、6 $\pm$ 2 ng/ μ L、8 ng/ μ L; 卡那霉素对大肠杆菌标准株及其转化子(BBX1-大肠, BBXP1-大肠, NA0301-大肠)的 MIC 分别为 8 ng/ μ L、16 ng/ μ L 和 32 ng/ μ L、16 ng/ μ L, 卡那霉素对大肠杆菌标准株及转化子(BBX1-大肠, BBXP1-大肠, NA0301-大肠)的 MBC 分别为 16 ng/ μ L、32 ng/ μ L、32 ng/ μ L、32 ng/ μ L。结果显示, 新霉素和卡那霉素对大肠杆菌标准株的 MIC 及 MBC 均低于 3 株转化子对相

应抗菌药物的 MIC 及 MBC。大肠杆菌标准株和 3 株转化子对新霉素抗性的差异表明 3 株受试菌中的耐药质粒成功转移到大肠杆菌标准株中, 且介导大肠杆菌标准株对新霉素及卡那霉素的耐药机制, 使大肠杆菌标准株对新霉素及卡那霉素的敏感性降低。

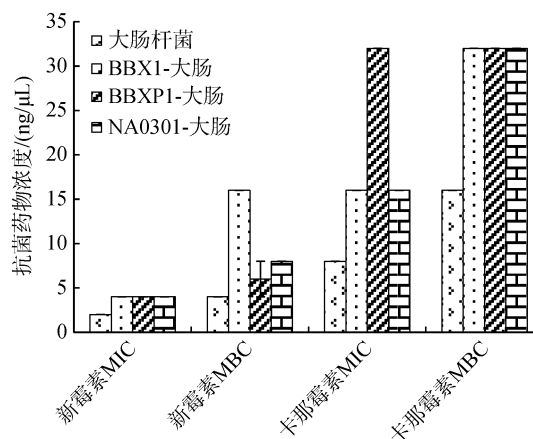


图 6 大肠杆菌电转前后对新霉素和卡那霉素抗性的对比
Fig. 6 Comparison of neomycin and kanamycin resistance between *E. coli* and the transformants

3 讨论

海水养殖环境源的弧菌群的耐药状况不容忽视, 部分地区海水弧菌对单种药物的耐药率最高达到 90%以上^[30], 部分养殖贝类中弧菌的多重耐药率高达 70%以上^[29]。众所周知, 海洋弧菌属于条件致病菌, 广泛存在于水环境中及养殖动物体内。有研究表明弧菌基因组上隐藏着随时可被插入耐药基因片段的整合子^[31], 加上水体环境非常利于微生物之间的接触, 更利于菌群间互相交换传递耐药因子^[32], 从而使弧菌更易表现多重耐药性。而致病菌的耐药性传播和扩散不仅严重影响多种药物在兽医临床的治疗效果, 且耐药菌群很可能借助动物宿主通过食物链、环境或直接接触等与人类临床病原菌进行传递, 特别是人畜/人鱼共患致病菌的耐药性, 更给人类医疗带来压力^[33]。本研究来源于重要养殖贝类的 7 株弧菌均表现多重耐药, 4 株弧菌对 6 类及以上抗菌药物耐药, 1 株弧菌对 8 类共 14 种抗菌药物耐药, 多重耐药率为 100%。

耐药质粒的转移不仅使得耐药菌的数量在世界范围急剧增加, 更介导着耐药菌往多重耐药方面发展。已有研究表明仅通过混合培养即可将耐药质粒从大肠杆菌向水生病原弧菌转移, 且可使四环素对

受体弧菌的 MIC 值大大提高^[34]。本研究中仍以大肠杆菌标准株为受体菌,以质粒上携带氨基糖苷类耐药基因 *aph(3')-IIa* 的哈维弧菌、溶珊瑚弧菌和塔氏弧菌为供体菌,采用电击转化的方法实现耐药质粒的转移,所测得转化子的 MIC 值和 MBC 值均提高了 2~4 倍,显示 3 株转化子对新霉素及卡那霉素敏感性均低于大肠杆菌对相应抗菌药物的敏感性,且在转化子质粒上检测到了目的片段,表明 3 株供体菌的耐药质粒成功转移到受体菌中,且质粒参与介导受体菌对新霉素和卡那霉素的抗性。然而,转化子并未到达完全耐药的表型。可能由于受试菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药性除了耐药质粒介导之外,还存在其他耐药机制的共同作用。另一方面,也可能是对受体菌做电转化后,未进行持续的诱导实验,使得耐药质粒上的耐药基因未能对作用底物(抗菌药物)产生修饰作用,抗菌药物仍能与细菌细胞中 16S rRNA 上的 A 位点相结合,从而抑制细菌蛋白的合成,使细菌对抗菌药物仍存在一定敏感性,可通过基因敲除、耐药质粒消除等手段进行进一步的验证。本研究中虽以电击转化方式进行实验以缩短反应时间,而笔者也曾通过混合培养方法(接合反应)将鲍病原哈维弧菌的耐质粒转入大肠杆菌中,使受体菌由初始对磺胺类药物高度敏感转变为完全耐药,并获得对应耐药质粒的全序列(全长 10 940 bp)^[35],提示水产养殖病原菌耐药株携带的耐药基因向大肠杆菌传递的过程中,转化方式不受限制。而已有报道在对志贺菌属细菌质粒的研究中发现了多重耐药的广宿主接合质粒,该质粒可介导大肠杆菌与志贺菌属细菌之间耐药性的水平传递,且具有头孢类及单环内酰胺类的耐药基因^[36]。相关研究表明能传递耐药基因的质粒中,存在能够在不同种类的细菌之间传递的广宿主接合质粒^[37-38]。值得关注的是,大肠杆菌常被作为模式菌株,与弧菌的生长条件差异较大,但二者之间可通过质粒传递耐药性,该结果提示环境菌群很可能在特定条件下将自身的耐药性传递至临床菌种,甚至包括部分人类病原菌。近年来,氨基糖苷类药物尤其是新霉素和卡那霉素被世界卫生组织认为是临床极其重要的药物^[39]。笔者在前期的耐药分析中发现了水产养殖病原菌对新霉素和卡那霉素存在较强的耐药性(7 个受试株均存在不同程度的耐药性),而氨基糖苷磷酸酶基因 *aph(3')-IIa* 主要抑制卡那霉素和新霉素的活性,虽然 *APH(3')-IIa* 的主要氨基糖苷底物是卡那霉素和新霉素,但这种磷酸转移酶在体

外也能灭活阿米卡星,即使其转化速度较慢^[40],依然存在耐药传播风险。以往的研究表明,*aph(3')-IIa* 最初被认为是转座子 Tn5 的组成部分^[41],由于 Tn5 不携带传递功能信息,因此通常遵循垂直遗传模式^[40],后期的研究认为氨基糖苷类修饰基因具有通过水平转移进行传播的潜力^[43]。然而,国内外对这种磷酸转移酶相关重要基因 *aph(3')-IIa* 的研究很不足,国内相关报道甚少,仍有很多问题未明晰。本研究不仅明确了 *aph(3')-IIa* 基因存在于受试水生病原弧菌的质粒上并参与介导菌株对新霉素和卡那霉素的耐药性,且首次确认了特定条件下(如通过电击转化)该基因可由水产病原菌传递至大肠杆菌,因此,本研究结果可为耐药菌中耐药质粒的消除提供依据,为预防水生环境病原菌与临床病原菌株之间耐药性的传递机制研究提供参考。

4 结论

本研究通过对多个水产致病弧菌(包括引起方斑东风螺、鲍发病的哈维弧菌、塔氏弧菌、溶珊瑚弧菌及卵形鲳鲹结节病病原美人鱼发光杆菌杀鱼亚种)质粒上新霉素和卡那霉素对应耐药基因 *aph(3')-IIa* 进行检测分析,并利用电穿孔法将筛选得到的哈维弧菌、塔氏弧菌和溶珊瑚弧菌 3 个受试病原菌株上的质粒分别转入大肠杆菌标准株中,进一步的药敏测试结果显示,3 株转化子对新霉素及卡那霉素敏感性均明显低于受试大肠杆菌标准株对相应抗菌药物的敏感性(转化子的 MIC 值和 MBC 值均提高了 2~4 倍),且在转化子质粒上检测到了目的片段。本研究明确了 *aph(3')-IIa* 基因存在于受试水生病原弧菌的质粒上并参与介导菌株对新霉素和卡那霉素的耐药性,且首次确认了特定条件下该基因可由水产病原菌传递至大肠杆菌。

参考文献:

- [1] Cano-gomez A, Højb L, Owensa L, et al. A multiplex PCR-based protocol for identification and quantification of *Vibrio harveyi*-related species[J]. *Aquaculture*, 2015, 437: 195-200.
- [2] Cardinaud M, Dheilily N M, Huchette S, et al. The early stages of the immune response of the European abalone *Haliotis tuberculata* to a *Vibrio harveyi* infection[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 51: 287-297.
- [3] Travers M A, Lego'icn, Huchette S. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the

- European abalone, *Haliotis tiiberciilata* to *Vibrio harveyi* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 800-808.
- [4] Haldar S, Maharajan A, Chatterjee S, et al. Identification of *Vibrio harveyi* as a causative bacterium for a tail rot disease of sea bream *Sparus aurata* from research hatchery in Malta[J]. Microbiology Research, 2010, 165: 639-648.
- [5] Hashem M, El-barbary M. *Vibrio harveyi* infection in Arabian Surgeon fish (*Acanthurus sohal*) of Red Sea at Hurgada, Egypt[J]. Egyptian Journal of Aquatic Research, 2013, 39(3): 199-203.
- [6] Li Y Z, Wang L, Yang Y M, et al. Genetic analysis of disease resistance to *Vibrio harveyi* by challenge test in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Aquaculture, 2019, 503: 430-435.
- [7] Li M F, Wang C L, Sun L. A pathogenic *Vibrio harveyi* lineage causes recurrent disease outbreaks in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and induces apoptosis in host cells[J]. Aquaculture, 2011, 319: 30-36.
- [8] Wang R X, Yao T, Liu X J, et al. Isolation and characterisation of *Vibrio harveyi* as etiological agent of foot pustule disease in the abalone *Haliotis discus hannai* Ino 1953[J]. Indian Journal of Fisheries, 2018, 65(1): 79-85.
- [9] Zhou J, Fang W, Yang X, et al. An nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with "bacterial white tail disease" of *Litopenaeus vannamei* shrimp[J]. PloS One, 2012, 7(2): 1-6.
- [10] Singer A C, Shaw H, Rhodes V. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1-22.
- [11] Kang C H, Kim Y G, Oh S G, et al. Antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* isolated from seawater in Korea[J]. Marine Pollution Bulletin, 2014, 86(1-2): 261-265.
- [12] 杨求华, 葛辉, 方旅平, 等. 池塘养殖刺参病原菌塔氏弧菌的分离与鉴定[J]. 南方水产科学, 2014, (4): 45-51.
Yang Qiuhua, Ge Hui, Fang Lyping, et al. Identification of *Vibrio tubiashii* isolated from diseased pond cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*)[J]. South China Fisheries Science, 2014, (4): 45-51.
- [13] Haskell S, Tubiash, Paul E. Chanley, Einar Leifson. Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks I. Etiology and Epizootiology[J]. Journal of Bacteriology, 1965, 90(4): 1036-1044.
- [14] Biel F M, Allen F A, Häse C C. Autolysis in *Vibrio tubiashii* and *Vibrio coralliilyticus*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2014, 60(2): 57-63.
- [15] Hasegawa H, Gharaibeh D N, Lind E J, et al. Virulence of metalloproteases produced by *Vibrio* species on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2009, 85(2): 123-131.
- [16] Séré M G, Tortosa P, Chabanet P, et al. Identification of a bacterial pathogen associated with Porites white patch syndrome in the Western Indian Ocean[J]. Molecular Ecology, 2015, 24(17): 4570-4581.
- [17] 杨先乐, 郭微微, 孙琪. 水产品质量安全与渔药的规范使用[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(4): 1-6.
Yang Xianle, Guo Weiwei, Sun Qi. The quality and safety of aquatic products and the standard use of fishery drugs[J]. Fishery Quality and Standards in China, 2013, 3(4): 1-6.
- [18] Lu J, Jin M, Nguyen S H, Mao L K, et al. Non-antibiotic antimicrobial triclosan induces multiple antibiotic resistance through genetic mutation[J]. Environment International, 2018, 118: 257-265.
- [19] Voigt A M, Zacharias Timm C, Wasser F, et al. Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater-An evaluation of clinical influences[J]. Chemosphere, 2020, 241: 125032.
- [20] Clark C G, Kravetz A N, Alekseenko V V, et al. Microbiological and epidemiological investigation of cholera epidemic in Ukraine during 1994 and 1995[J]. Epidemiology & Infection, 1998, 121(1): 1-13.
- [21] 杨娟, 马智龙, 蔡震. 泰州市 112 份水产品中副溶血性弧菌检出状况及耐药性分析[J]. 现代预防医学, 2016, 43(20): 3699-3702.
Yang Juan, Ma Zhilong, Cai Zhen. Analysis on the contamination and drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in 112 aquatic products in Taizhou[J]. Modern Preventive Medicine, 2016, 43(20): 3699-3702.
- [22] Rocha R D S, Sousa O V D. Multidrug-resistant *Vibrio*, associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil[J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 105(1): 337-340.
- [23] 王江勇, 王瑞旋, 苏友禄, 等. 方斑东风螺“急性死亡症”的病原病理研究[J]. 南方水产科学, 2013, 9(5): 93-99.
Wang Jiangyong, Wang Ruixuan, Su Youlu, et al. Pathogen and pathology of "acute death syndrome" of *Babylonia areolata*[J]. South China Fisheries Science, 2013, 9(5): 93-99.
- [24] 刘晓靖, 王瑞旋, 凌慧, 等. 方斑东风螺“急性死亡症”病原及其毒力基因研究[J]. 海洋环境科学, 2019, (1): 7-15.
Liu Xiaojing, Wang Ruixuan, Ling Hui, et al. Studies on the pathogenic bacteria and their virulence factors of "acute death syndrome" in *Babylonia Areolata*[J]. Marine Environment Science, 2019, (1): 7-15.
- [25] 王江勇, 孙秀秀, 王瑞旋, 等. 杂色鲍肌肉萎缩症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 南方水产科学,

- 2010, 6(5): 21-26.
- Wang Jiangyong, Sun Xiuxiu, Wang Ruixuan, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of pathogen from *Haliotis diversicolor* Reeve with withering syndrome[J]. South China Fisheries Science, 2010, 6(5): 21-26.
- [26] 王瑞旋, 刘广锋, 徐力文, 等. 杂色鲍苗大规模脱落死亡的初步研究[J]. 海洋科学, 2007, 31(4): 53-57.
- Wang Ruixuan, Liu Guangfeng, Xu Liwen, et al. Studies on the stripping off and death of larvae of *Haliotis diversicolor* Reeve[J]. Marine Sciences, 2007, 31(4): 53-57.
- [27] Wang R X, Feng J, Su Y L, et al. Studies on the isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and antibacterial agents sensitivity[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162: 957-963.
- [28] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: approved guideline, second edition (M45-A2)[S]. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2010: 7.
- [29] Wang R X, Wang J Y, Sun Y C, et al. Antibiotic resistance monitoring in *Vibrio* spp. isolated from rearing environment and intestines of abalone *Haliotis diversicolor*[J]. Marine Pollution Bulletin, 2015, 101: 701-706.
- [30] 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 Xiaojuan. Drug resistance detection and integrons analysis of *Vibrios* from mariculture source[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014.
- [31] Kang C H, Kim Y G, Oh S G, et al. Antibiotic resistance of *vibrio harveyi* isolated from seawater in Korea[J]. Marine Pollution Bulletin, 2014, 86(1-2): 261-265.
- [32] Chen H Y, Chen R H, Jing L J, et al. A metagenomic analysis framework for characterization of antibiotic resistomes in river environment: Application to an urban river in Beijing[J]. Environmental Pollution, 2019, 245: 398-407.
- [33] Danner M C, Robertson A, Behrends V, et al. Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects[J]. Science of the Total Environment, 2019, 664: 793-804.
- [34] 鄢庆彬, 方恩华, 苏永全, 等. 大黄鱼病原弧菌耐药质粒转移研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(3): 44-49.
- Yan Qingpi, Fang Enhua, Su Yongquan, et al. Transfer of drug resistance plasmids from *Escherichia coli* to pathogenic vibrio[J]. Marine Sciences, 2004, 28(3): 44-49.
- [35] 王瑞旋, 耿玉静, 冯娟, 等. 杂色鲍哈维弧菌耐药质粒的鉴定和分析[J]. 南方水产科学, 2012, 8(2): 1-6.
- Wang Ruixuan, Geng Yujing, Feng Juan, et al. Identification and analysis of resistant plasmid of pathogenic bacteria *Vibrio harveyi* isolated from *Haliotis diversicolor*[J]. South China Fisheries Science, 2012, 8(2): 1-6.
- [36] 侯瑞娟. 志贺菌属细菌耐药相关质粒的耐药性研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2012.
- Hou Ruijuan. Research on the resistance of plasmid mediated *Shigella* spp. Resistance[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2012.
- [37] 高丽丽. 猪源产 ESBL 大肠杆菌的扩散及膨润土促其耐药基因转移机制的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- Gao Lili. Spread of animal original ESBL-producing *Escherichia coli* and the promotion effect and mechanism of bentonite on ESBL gene transfer[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2015.
- [38] Yu Z, Gunn L, Wall P, et al. Antimicrobial resistance and its association with tolerance heavy metals in agriculture production[J]. Food Microbiology, 2017, 64: 23-32.
- [39] World Health Organization (WHO). Critically important antimicrobials for human medicine, 3rd revision 2011[R]. Geneva: WHO, 2012.
- [40] Woegerbauer M, Zeinzinger J, Springer B, et al. Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes *aph(3')-IIIa* and *aph(3')-IIa* in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Staphylococcus aureus* isolates in Austria[J]. Journal of Medical Microbiology, 2014, 63: 210-217.
- [41] Beck E, Ludwig G, Auerswald E, et al. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5[J]. Gene, 1982, 19: 327-336.
- [42] Thomas C M, Nielsen K M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3: 711-721.

Primary research on the transmission mechanism of resistance to aminoglycoside for pathogenic marine *Vibrio* strains

WANG Rui-xuan¹, WANG Jiang-yong², LI Yun-ping³, GUO Zi-han⁴, LI Bing², LI Yun¹, ZHU Hui¹

(1. Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Guangzhou 510300, China; 3. South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 4. California Baptist University, California 92504, USA)

Received: Dec. 21, 2019

Key words: pathogenic vibrio; antibiotic-resistant plasmid; neomycin; kanamycin; drug resistance mechanism

Abstract: The growing number of antimicrobial agents in aquaculture and the development of multi-antibiotics use have led to significant antibiotic-resistances and multi-resistance, which has increased the prevention and control of bacterial diseases in aquaculture. The most effective way for bacteria to spread antibiotic resistance is through the transfer of resistant plasmids. In the present study, the *aph(3')-IIa* aminoglycoside-resistant gene located on plasmid DNA was amplified by polymerase chain reaction and then three resistant plasmids were sequenced and transformed into *Escherichia coli* by electroporation. It has been shown that the target gene sequence of three mutants was detected. The result of resistance analysis suggested that the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal concentration (MBC) of three transformants were all much higher than the MIC and the MBC of standard strain *E. coli*. It suggested that drug-resistant plasmids in *vibrio* spp. could be transferred to *E. coli*, and the resistant plasmid had participated in the resistance mechanism to control the resistance of strains to aminoglycosides, such as neomycin and kanamycin. This study will provide important data and be a reference for the study on the transmission of resistance to aminoglycoside between environmental vibrios and clinical bacteria.

(本文编辑: 杨 悦)