

# 嗜水气单胞菌对四环素类 和氟喹诺酮类药物的耐药性研究

王美珍 陈昌福 刘振兴 谭晶晶 高宇 李革雷

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

**摘要** 在离体条件下进行患病鱼体内分离的嗜水气单胞菌3个菌株对四环素类和氟喹诺酮类药物的耐药性获得、稳定性、保存条件和交叉耐药性研究。结果表明:分别在含有盐酸多西环素、盐酸四环素、诺氟沙星和左氧氟沙星的药物培养基中连续传代9次(在28℃条件下培养72 h为1代)后,四环素类对3个菌株的最小抑菌浓度上升倍数为8~32倍,氟喹诺酮类组MIC上升倍数为125~7 997倍,且耐药获得后保持稳定。同时嗜水气单胞菌对四环素类和氟喹诺酮类药物存在交叉耐药。耐药菌4℃保存10和20 d耐药性保持稳定,30 d耐药性均有不同程度的下降。

**关键词** 嗜水气单胞菌; 四环素类; 氟喹诺酮类; 耐药性获得; 耐药稳定性; 交叉耐药; 保存

**中图分类号** S 917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)01-0089-05

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)隶属于气单胞菌科(Aeromonadaceae)、气单胞菌属(*Aeromonas*)。该菌呈世界性分布,能导致水产养殖动物细菌性败血症并引起大量死亡,也可以引起人的败血症、脑膜炎和肠炎腹泻,是人、畜及水生动物共患的条件致病菌<sup>[1-2]</sup>。*A. hydrophila*是我国水产养殖细菌性败血症的主要病原菌之一,每年造成极大的危害。水产养殖中常用的抗*A. hydrophila*药物主要有四环素类及氟喹诺酮类等。近年来,*A. hydrophila*耐药性问题日趋严重,而且产生了多重耐药性菌株,给水产养殖动物疾病防治造成了更大的困难,同时也严重影响水产动物源性食品的质量安全。

迄今为止,鲜见有关嗜水气单胞菌耐药性监测和耐药机制的研究报道。本研究离体条件下测定了从患病鱼体内分离的*A. hydrophila*3个菌株对四环素类和氟喹诺酮类药物耐药性研究,初步探讨嗜水气单胞菌对四环素类和喹诺酮类药物的耐药机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试药物

盐酸四环素(tetracycline, Tet)、盐酸多西环素

(doxycycline, Dox)、诺氟沙星(norfloxacin, Nor)和左氧氟沙星(levofloxacin, Lev)均为Sigma公司产品,编号分别为BF1087、D9891、N9890和28266。

### 1.2 供试菌株

淡水鱼类细菌性败血症的病原菌*A. hydrophila*的Ah640、Ah541和Ah28。菌株分离的时间、地点和病鱼器官详见表1。

表1 供试菌株的来源

Table 1 Strains for test

菌株 Strain	收集时间 Collection time	来源 Source	分离器官 Organ
Ah541	2009-05-06	湖北新洲 Xinzhou, Hubei	鲫鱼肝脏 Crucian liver
Ah640	2009-05-08	湖北洪湖 Honghu, Hubei	鲫鱼脾脏 Crucian spleen
Ah28	2009-03-10	湖北新洲 Xinzhou, Hubei	白鲢肝脏 Silver carp liver

### 1.3 原代菌MIC的测定

依日本化学疗法学会制定的标准法<sup>[3]</sup>,并参照孟小亮等<sup>[4]</sup>的方法进行。将各种供试抗菌药物分别用适宜溶酶溶解后,用灭菌生理盐水进行倍比稀释,然后用灭菌MH液体培养基将各浓度的药物稀释10倍,使1~20试管中的培养基(3.0 mL)中的药物浓度达到100~0.000 2 μg/mL,向第21支试管中加入灭菌MH液体培养基3.0 mL。向1~21试管

中加入 0.1 mL 浓度为  $1.2 \times 10^7$  cfu/mL 的 *A. hydrophila* 活菌悬液。1~20 试管中药物浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.0032、0.0016、0.0008、0.0004 和 0.0002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，第 21 支试管为阳性对照，同时设置对应药物浓度只加药不加 *A. hydrophila* 的 1~20 管为药物空白对照组。在 28 °C 恒温条件下培养 72 h 后，与药物空白对照管比较，肉眼观察证实无菌生长试管中最低药物浓度即为该药物的最小抑菌浓度(MIC)，每种试验药物设 2 组平行处理，MIC 结果取其平均值。

#### 1.4 次抑菌浓度药物诱导耐药突变菌

参照 Itzhak 等<sup>[5]</sup> 的方法，取次抑菌浓度(1/2 MIC)试管中的细菌为下次传代用的菌种，用灭菌生理盐水稀释成  $1.2 \times 10^7$  cfu/mL 活菌悬液，吸取 0.1 mL 的活菌悬液并将其接种在含有不同浓度抗菌药的 MH 液体培养基试管中，在 28 °C 条件下培养 72 h 为 1 代，相同的操作连续进行 9 次，使 *A. hydrophila* 分别在含盐酸多西环素、盐酸四环素、诺氟沙星和左氧氟沙星中传代 9 次。将最后测定的 MIC 与最初的 MIC 比较，评价菌株对药物的耐药性获得速率，药物诱导后  $\text{MIC} \geq 4$  倍诱导前 MIC 则定为耐药<sup>[6]</sup>。

#### 1.5 耐药突变菌对氟喹诺酮类和四环素类的交叉耐药

将左氧氟沙星第 10 代菌接种于不含药物的

BHI 固体培养基上，28 °C 培养 24 h，挑单个菌落按本文“1.3”方法测定其对盐酸多西环素、盐酸四环素和诺氟沙星的交叉耐药性。按本文“1.3”方法测定盐酸多西环素第 10 代菌对盐酸四环素、诺氟沙星和左氧氟沙星的交叉耐药性。

#### 1.6 突变菌耐药性的遗传稳定性

参照 Walsh 等<sup>[7]</sup> 的方法，将耐药菌接种于不含药物的 BHI 固体培养基中，28 °C 培养 24 h 为 1 代，连续传代 10 次后，按本文“1.3”方法分别测定第 5 代和第 10 代的 MIC，以判断耐药菌的稳定性。

#### 1.7 耐药菌的保存条件研究

将第 7 代耐药菌接种于不含药物的 BHI 固体培养基中，28 °C 培养 24 h 后，4 °C 保存 10 d、20 d 和 30 d 后分别接种于 MH 液体培养基，按本文“1.3”方法测定 MIC。

### 2 结果与分析

#### 2.1 供试菌株对四环素类和氟喹诺酮类的敏感性

供试药物对 3 株 *A. hydrophila* 的 MIC 测定结果如表 2 所示。由表 2 可知，除了 Ah28 对盐酸四环素为中介菌，3 株 *A. hydrophila* 菌株对本研究中的 4 种药物，同时氟喹诺酮类药物的抑菌效果比四环素类药物强，尤其是左氧氟沙星的抑菌能力，MIC 仅为 0.025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 2 嗜水气单胞菌对四环素类和氟喹诺酮类的敏感性<sup>1)</sup>

Table 2 Susceptibility of *Aeromonas hydrophila* to tetracyclines and fluoroquinolones

抗菌药物 Antibacterial	嗜水气单胞菌的 MIC/(\mathbf{\mu}g/mL)			敏感性结果 Result		
	Ah541	Ah640	Ah28	Ah541	Ah640	Ah28
盐酸四环素 Tetracycline	3.130	1.560	6.250	S	S	I
盐酸多西环素 Doxycycline	1.560	1.560	3.130	S	S	S
诺氟沙星 Norfloxacin	0.780	0.100	0.390	S	S	S
左氧氟沙星 Levofloxacin	0.025	0.002	0.100	S	S	S

1)S: 敏感 Sensitive; I: 中介 Intermediate.

#### 2.2 供试菌株对四环素类和氟喹诺酮类的耐药性获得速率

3 株 *A. hydrophila* 经过连续 9 次在带有供试药物的培养基中传代培养，菌株耐药性变化的情况如表 3 所示，3 株菌在含药培养基中传代 9 次后，均获得了比较强的耐药性，其中喹诺酮类组 *A. hydrophila* 的耐药获得速率提高幅度很大，均超过 100 倍，Ah640 原代菌对左氧氟沙星最敏感，同时其 MIC 提高幅度也最大，从 0.002  $\mu\text{g}/\text{mL}$  上升到 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，MIC 上升 7 997 倍。四环素类对 *A. hydrophila* 原代菌的 MIC 值比喹诺酮类组高，但其耐

药性获得速率提高幅度比较小(8~32 倍)。

#### 2.3 耐药突变菌对氟喹诺酮类和四环素类的交叉耐药

*A. hydrophila* 对氟喹诺酮类和四环素类的交叉耐药结果见表 4 和表 5。高耐左氧氟沙星的第 10 代突变株(Lev-MIC<sub>10G</sub>)对同是氟喹诺酮类的诺氟沙星存在同类药交叉耐药，同时对不同类的四环素类药物也存在不同程度的交叉耐药；高耐盐酸多西环素的第 10 代突变株(Dox-MIC<sub>10G</sub>)对盐酸四环素、诺氟沙星和左氧氟沙星也存在不同程度的同类药物内和不同类药物间的交叉耐药。

表3 嗜水气单胞菌对四环素类和氟喹诺酮类的耐药性获得<sup>1)</sup>Table 3 Development of drug-resistance of *Aeromonas hydrophila* to tetracyclines and fluoroquinolones

抗菌药物 Antibacterial	菌株 Strain	各传代次数下的最小抑菌浓度/( $\mu$ g/mL) MIC of sequential subcultures										上升倍数 Multiple
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
盐酸四环素 Tetracycline	Ah541	3.13	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	25.00	50.00	50.00	50.00	16
	Ah640	1.56	1.56	1.56	3.13	12.50	12.50	12.50	50.00	50.00	50.00	32
	Ah28	6.25	6.25	12.50	12.50	12.50	12.50	25.00	50.00	50.00	50.00	8
盐酸多西环素 Doxycycline	Ah541	1.56	6.25	12.50	25.00	25.00	12.50	50.00	50.00	50.00	50.00	32
	Ah640	1.56	1.56	3.13	6.25	6.25	12.50	25.00	50.00	50.00	50.00	32
	Ah28	3.13	3.13	25.00	25.00	50.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	32
诺氟沙星 Norfloxacin	Ah541	0.78	6.25	25.00	25.00	25.00	50.00	100.00	100.00	200.00	200.00	256
	Ah640	0.10	0.20	6.25	25.00	50.00	100.00	100.00	100.00	200.00	200.00	2 000
	Ah28	0.39	1.56	3.13	3.13	12.50	12.50	25.00	200.00	200.00	200.00	513
左氧氟沙星 Levofloxacin	Ah541	0.025	0.100	0.390	0.780	0.780	0.780	1.560	3.130	12.500	25.000	1 000
	Ah640	0.002	0.025	0.100	0.200	0.390	0.780	1.560	1.560	6.250	12.500	7 997
	Ah28	0.100	0.200	0.390	0.390	0.390	0.390	0.780	0.780	3.130	12.500	125

1)上升倍数=MIC<sub>10G</sub>/MIC<sub>1G</sub>(MIC<sub>1G</sub>:第1代的MIC, MIC<sub>10G</sub>:第10代的MIC) Multiple=MIC<sub>10G</sub>/MIC<sub>1G</sub> (MIC<sub>1G</sub>:The MIC of the first generation, MIC<sub>10G</sub>:The MIC of the tenth generations). 下表同 The same as below.

表4 耐左氧氟沙星菌株对四环素类和氟喹诺酮类的交叉耐药

Table 4 Cross-resistance of levofloxacin-resistant strains to tetracyclines and fluoroquinolones

抗菌药物 Antibacterial	菌株 Ah541 Strain Ah541			菌株 Ah640 Strain Ah640			菌株 Ah28 Strain Ah28			$\mu$ g/mL
	原代 MIC <sub>1G</sub>	左第10代 Lev-MIC <sub>10G</sub>	上升倍数 Multiple	原代 MIC <sub>1G</sub>	左第10代 Lev-MIC <sub>10G</sub>	上升倍数 Multiple	原代 MIC <sub>1G</sub>	左第10代 Lev-MIC <sub>10G</sub>	上升倍数 Multiple	
诺氟沙星 Norfloxacin	0.78	25.0	32	0.10	12.5	125	0.39	12.5	32	
盐酸四环素 Tetracycline	3.13	25.0	8	1.56	25.0	16	6.25	50.0	8	
盐酸多西环素 Doxycycline	1.56	50.0	32	1.56	200.0	128	3.13	200.0	64	

表5 耐多西环素菌株对四环素类和氟喹诺酮类的交叉耐药

Table 5 Cross-resistance of doxycycline-resistant strains to tetracyclines and fluoroquinolones

抗菌药物 Antibacterial	菌株 Ah541 Strain Ah541			菌株 Ah640 Strain Ah640			菌株 Ah28 Strain Ah28			$\mu$ g/mL
	原代 MIC <sub>1G</sub>	多第10代 Dox-MIC <sub>10G</sub>	上升倍数 Multiple	原代 MIC <sub>1G</sub>	多第10代 Dox-MIC <sub>10G</sub>	上升倍数 Multiple	原代 MIC <sub>1G</sub>	多第10代 Dox-MIC <sub>10G</sub>	上升倍数 Multiple	
盐酸四环素 Tetracycline	3.130	50.00	16	1.560	50.00	32	6.25	100.00	16	
诺氟沙星 Norfloxacin	0.780	1.56	2	0.100	1.56	16	0.39	1.56	4	
左氧氟沙星 Levofloxacin	0.025	0.78	31	0.002	0.78	499	0.10	1.56	16	

## 2.4 突变株耐药性的遗传稳定性

药物中传10代后获得的耐药菌在不含药物的BHI平板中传10代后的耐药稳定性结果见表6,与第10代突变株(0 d)相比,经过平板连续传代过程中四环素类耐药菌的敏感性有部分恢复,在5 d时下降到1/2,在10 d时下降到1/4。但与表2原代菌(MIC<sub>1G</sub>)相比,5、10 d菌株的MIC显著增加。喹

诺酮类突变株耐药性基本保持稳定(但左氧氟沙星Ah640下降到1/2)。

## 2.5 耐药菌的保存条件研究

第7代耐药菌(0 d)4℃冰箱保存后的药敏试验结果见表7, *A. hydrophila* 4℃保存10和20 d耐药性保持稳定,但保存30 d耐药性均有不同程度的下降,下降到1/2~1/4。

表 6 耐药菌的耐药稳定性试验

Table 6 Resistance stability test of resistant bacteria

μg/mL

菌株 Strain	盐酸四环素 Tetracycline			盐酸多西环素 Doxycycline			诺氟沙星 Norfloxacin			左氧氟沙星 Levofloxacin		
	0 d	5 d	10 d	0 d	5 d	10 d	0 d	5 d	10 d	0 d	5 d	10 d
Ah541	50	25	12.5	50	50	25	200	200	200	25	25	25
Ah640	50	25	25	50	25	25	200	200	200	12.5	6.25	6.25
Ah28	50	13	12.5	100	50	25	200	200	200	12.5	12.5	12.5

表 7 耐药菌 4℃ 冰箱保存后的药敏试验

Table 7 Antimicrobial susceptibility test of resistant bacteria stored at 4℃

μg/mL

菌株 Strain	盐酸四环素 Tetracycline				盐酸多西环素 Doxycycline				诺氟沙星 Norfloxacin				左氧氟沙星 Levofloxacin			
	0 d	10 d	20 d	30 d	0 d	10 d	20 d	30 d	0 d	10 d	20 d	30 d	0 d	10 d	20 d	30 d
Ah541	25.0	25.0	12.5	6.3	50	25	25	25	100	100	100	50	1.56	1.56	1.56	0.78
Ah640	12.5	12.5	12.5	6.3	25	25	25	25	100	100	100	50	1.56	1.56	0.78	0.39
Ah28	12.5	12.5	12.5	6.3	100	50	50	50	12.5	12.5	12.5	6.3	0.78	0.78	0.39	0.39

### 3 讨 论

氟喹诺酮类药物对 *A. hydrophila* 的抑菌效果强于四环素类药物,但是经过次抑菌浓度(1/2 MIC)的诱导后,氟喹诺酮类药物组菌株耐药获得速率提高幅度很大,暗示着如果达不到杀菌浓度越有效的药物将越容易诱导细菌产生耐药性,提示水产养殖上用药时应足量使用,避免抗菌药物低浓度与细菌长期接触产生耐药性而造成治疗失败<sup>[8]</sup>。同时治疗细菌性败血症应先做药敏实验,如果对四环素类和氟喹诺酮类都敏感时,应该首选四环素类来治疗。

Itzhak 等<sup>[5]</sup>报道 *Bacillus anthracis* 对喹诺酮类同类药物内存在交叉耐药但是对多西环素不产生交叉耐药,同时多西环素耐药菌对喹诺酮类也不存在交叉耐药。本研究获得的高耐左氧氟沙星突变株对诺氟沙星存在同类药交叉耐药,同时对四环素类也存在不同程度的不同类药物间交叉耐药;获得高耐药性多西环素突变株对盐酸四环素、诺氟沙星和左氧氟沙星也存在不同程度的交叉耐药。这与陈宜鸿等<sup>[9]</sup>研究结果一致。这暗示着 *A. hydrophila* 可能对这 2 类药物存在共同的膜渗透性改变和药物主动外排等非特异性耐药机制,从而产生多重耐药菌。

细菌的耐药性分为遗传耐药性和非遗传耐药性。遗传耐药性由质粒、转座子、噬菌体、整合子和基因盒等可动遗传因子和染色体基因突变和传递引起<sup>[10]</sup>。细菌耐四环素类的耐药机制目前认为是由可动遗传因子尤其是耐药性质粒介导的耐药<sup>[11]</sup>。李爱华<sup>[1]</sup>从 *A. hydrophila* 耐药株中检测到 1 株耐四环素和磺胺的可自身传递的 R<sup>+</sup> 质粒,发现它对四环素的抗性可被四环素类药物所诱导。过去一些

学者认为细菌耐喹诺酮类的耐药机制主要由染色体介导,与质粒无关,且在体内或体外的适当环境中该药可使细菌的质粒破损<sup>[12]</sup>。近年来发现,在革兰阴性杆菌中存在着由质粒介导的喹诺酮类药耐药现象<sup>[13]</sup>,Robicsek 等<sup>[14]</sup>发现由质粒携带的 1 个氨基糖苷乙酰转移酶的变异基因可使环丙沙星及诺氟沙星中的氨基乙酰化,导致细菌对环丙沙星及诺氟沙星的耐药性上升。本研究中获得的高耐药菌在不含药物的平板中传 10 代后,氟喹诺酮类组和四环素类组耐药性均保持稳定,也说明了其耐药性获得具有遗传稳定性,少数耐药性下降可能是由非遗传稳定性耐药机制导致。很多学者研究发现耐药菌产生多重耐药性的重要机制就是外膜通透屏障改变和主动外排泵系统,外膜通透屏障改变主要由于脂多糖变异和孔蛋白通道关闭,主动外排泵系统由胞质膜转运蛋白、膜融合蛋白和外膜蛋白组成<sup>[15]</sup>。

许多试验证明,脂多糖和外膜蛋白具有良好的免疫原性<sup>[16-17]</sup>,但目前病原菌的脂多糖和外膜蛋白疫苗方面的研究还处于起步阶段。耐药菌的药物治疗是世界大难题,寻求耐药菌的疫苗是全世界的共同目标,是当前研究热点。雷连成等<sup>[18]</sup>发现耐药大肠杆菌具有较强致病性,且耐药特性与其免疫保护效果相关,多重耐药株对当前流行菌株具有更好的免疫保护作用。但是耐药菌在保存过程中常发生耐药性消失,从而影响耐药菌有效外膜蛋白和脂多糖等的提取,给耐药菌的疫苗研究造成一定的困难。孟小亮等<sup>[4]</sup>研究发现耐药菌在保存过程中耐药性逐渐消失,甚至恢复到原代水平。本文研究了耐药菌在 4℃ 保存不同时间后的耐药性变化,发现耐药菌 4℃ 保存 20 d 耐药性保持不变,但是 30 d 耐药性有所下降,这提示我们进行疫苗研究时要进行细菌耐药性保

存条件研究,在耐药性不变的时期内提取有效抗原。

## 参 考 文 献

- [1] 李爱华. 我国鱼类病原菌耐药性、耐药质粒及几种药物抗菌作用的研究[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所,1998.
- [2] 田甜,胡火庚,陈昌福. 团头鲂细菌性败血症病原菌分离鉴定及致病力研究[J]. 华中农业大学学报,2010,29(3):341-345.
- [3] 日本化学疗法学会. 最小发育阻止浓度的测定方法[J]. 化学疗法,1975,23(8):1-2.
- [4] 孟小亮,陈昌福,吴志新,等. 嗜水气单胞菌对盐酸多西环素的耐药性获得与消失速率研究[J]. 长江大学学报:自然科学版,2009,6(1):42-46.
- [5] BROOK I, ELLIOTT T B, PRYOR II H I, et al. *In vitro* resistance of *Bacillus anthracis* Sterne to doxycycline, macrolides and quinolones[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2001, 18:559-562.
- [6] 章喻军. 铜绿假单胞菌外膜耐药和保护原功能蛋白组学的研究[D]. 厦门:厦门大学图书馆,2007:43-44.
- [7] WALSH S, MAILLARD R, RUSSELL A D, et al. Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility[J]. Journal of Hospital Infection, 2003, 55: 98-107.
- [8] PALLARES R, FENOLL A, LINARES J. The epidemiology of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and the clinical relevance of resistance to cephalosporins, macrolides and quinolones[J]. International Journal of Antimicrobial Agents,
- 2003, 22:15-24.
- [9] 陈宜鸿,刘敏阳,陈世铭. 四环素诱导表皮葡萄球菌对氟喹诺酮类耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志,1999,9(4):199-201.
- [10] 吴聪明,陈枝榴. 细菌耐药性扩散的机制[J]. 动物医学进展, 2003, 24(4): 6-11.
- [11] 陈代杰. 抗菌药物与细菌耐药性[M]. 上海:华东理工大学出版社,2001:1-17.
- [12] 刘好文. 喹诺酮类抗菌药的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 1999, 24(增刊):41-44.
- [13] JACOBY G A. Mechanisms of resistance to quinolone [J]. Clin Infect Dis, 2005, 41(Suppl 2):120-126.
- [14] ROBICSEK A, STRAHILEVITZ J, JACOBY G A, et al. Fluoroquinolone modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase[J]. Nat Med, 2006, 12(1): 83-88.
- [15] DELCOUR H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1794: 808-816.
- [16] 董传甫,林天龙,龚晖,等. 嗜水气单胞菌主要外膜蛋白对欧洲鳗鲡的免疫保护试验[J]. 水生生物学报,2005,29(3):285-290.
- [17] 贾亚东,汪成竹,陈昌福. 中华鳖对嗜水气单胞菌粗脂多糖(LPS)的免疫应答[J]. 华中农业大学学报,2007,26(2):228-232.
- [18] 雷连成,韩文瑜,郑丹,等. 耐药大肠杆菌的致病性与免疫原性[J]. 中国生物制品学杂志,2006,19(4):340-343.

## *In vitro* study on drug-resistance characteristics of *Aeromonas hydrophila* to tetracyclines and fluoroquinolones

WANG Mei-zhen CHEN Chang-fu LIU Zhen-xing TAN Jing-jing GAO Yu LI Ge-lei

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** The aims of this study were to investigate the development, stability, cross-resistance and preservation of *Aeromonas hydrophila* resistance to tetracyclines and fluoroquinolones. *A. hydrophila* was grown at 28 °C for 72 h and used it to test for the development of resistance after 9 sequential subcultures in sub-inhibitory concentrations of two tetracyclines (doxycycline and tetracycline) and two fluoroquinolones (norfloxacin and levofloxacin). After 9 subcultures the minimal inhibitory concentrations (MIC) to tetracyclines were 8-32 times greater than the initial values, MIC values to fluoroquinolones were 125-7 997 times greater than the initial values, and drug-resistance were stable. The doxycycline-resistant isolate was resistant to tetracycline and fluoroquinolones, and the levofloxacin-resistant isolate was resistant to tetracyclines and norfloxacin. The drug-resistance stability test indicated that long-term storage of the bacteria at 4 °C could reduce their resistance to antimicrobials.

**Key words** *Aeromonas hydrophila*; tetracyclines; fluoroquinolones; drug-resistance development; drug-resistance stability; cross-resistance; preservation

(责任编辑:边书京)