

文章编号: 1000-0615(2016)01-0092-08

DOI: 10.11964/jfc.20150709975

## 猪-鱼复合养殖模式中气单胞菌I类整合子的流行情况及其耐药特征

冯永永<sup>1,2</sup>, 姜 兰<sup>1</sup>, 邓玉婷<sup>1\*</sup>, 谭爱萍<sup>1</sup>, 张瑞泉<sup>1</sup>, 罗 理<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部渔用药物创制重点实验室,  
广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 为了解广东地区猪-鱼复合养殖模式下气单胞菌整合子流行情况及其耐药特征, 从广东省5个不同猪-鱼复合养殖场采集分离猪粪、鱼、池塘水及池塘底泥的气单胞菌共317株, 通过微量二倍稀释法测定其对20种药物的敏感性; PCR扩增I类整合子整合酶基因*intI1*, 并分析其基因盒阵列结构。结果表明, 317株气单胞菌对20种药物耐药程度不一, 氨苄西林、磺胺间甲氧嘧啶、萘啶酸的耐药率相对较高。*intI1*的检出率为15.77%, 鱼源和猪源的整合子检出率高于环境源。整合子阳性菌对测试的12种药物的耐药率显著高于阴性菌, 且表现为多重耐药; 50个I类整合子共检测到16种耐药基因盒, 包括了编码氨基糖苷类耐药基因*aadA1*、*aadA2*、*aac6-II*、*aacA4*, 甲氧苄啶耐药基因*drfA1*、*dfrA12*、*dfrA15*、*dfrA17*、*dfrB4*,  $\beta$ 内酰胺类耐药基因*bla<sub>OXA-10</sub>*、*bla<sub>OXA-21</sub>*, 氯霉素耐药基因*catB3*、*catB8*, 利福平耐药基因*arr2*、*arr3*以及质粒介导的喹诺酮类耐药基因*aac(6)-Ib-cr*。携带了不同类耐药基因盒的整合子阳性菌还表现出所对应的对甲氧苄啶、链霉素、氯霉素类等的耐药表型, 由此推测整合子的存在与细菌的多重耐药密切相关。研究表明, I类整合子分布于广东地区猪-鱼复合养殖模式下不同来源气单胞菌, 并介导细菌对多种抗菌药物耐药。有必要开展畜禽-鱼复合养殖模式下细菌耐药性的传播机制研究, 为水产养殖合理用药提供依据。

**关键词:** 气单胞菌; 复合养殖模式; I类整合子; 耐药

**中图分类号:** S 941

**文献标志码:** A

气单胞菌(*Aeromonas*)属气单胞菌科(Aeromonadaceae), 是一类革兰氏阴性短杆菌, 广泛分布于自然界, 是我国流行最广泛的一种典型人-兽-水生动物共患病原菌, 可以导致多种水产动物疾病<sup>[1]</sup>。临床上常使用抗菌药物来治疗由气单胞菌等引起的细菌性疾病, 然而, 随着抗菌药物的使用, 气单胞菌耐药性的问题越来越突出。近几年来, 国内外学者已从不同品种的患病水产动物上检测到多重耐药的气单胞菌<sup>[2-5]</sup>。

整合子是近年来在细菌中发现的天然克隆表

达系统, 存在于细菌质粒或染色体上, 其介导的细菌耐药是细菌发生水平基因转移和产生多重耐药机制的主要途径<sup>[6]</sup>。根据整合酶的基因序列不同, 整合子可分为10类, 其中以I类整合子最常见。典型的I类整合子由5'端保守区(5'-CS)和3'端保守区(3'-CS)以及中间的可变区(基因盒)组成<sup>[7]</sup>。5'-CS携带编码整合酶基因*intI*、启动子以及重组位点*attI*。3'-CS一般含3个开放阅读框, 分别为季铵盐化合物和溴乙锭耐药基因*qacEΔ1*、磺胺耐药基因*sul1*以及功能不明的开放

收稿日期: 2015-07-15 修回日期: 2015-11-03

资助项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(S2013040013070); 国家自然科学基金青年基金(31302228)

通信作者: 邓玉婷, Email: fourdeng@163.com

读码框ORF5。可变区含有1个或多个基因盒,可携带多种不同类型的耐药基因。细菌通过捕获不同类型的基因盒,从而获得对某些药物的耐药性。目前,多个国家和地区已在不同来源(包括病人、家畜、鱼类以及水环境等)的样品中检测到携带整合子的多重耐药气单胞菌<sup>[4,5,8-11]</sup>,而国内只对污水样品和病鱼样品分离气单胞菌的整合子流行情况作过报道<sup>[3,12]</sup>。

广东是淡水鱼养殖大省,珠三角地区存在畜禽-鱼[四大家鱼、麦瑞加拉鲮(*Cirrhina mrigola*)]养殖模式<sup>[13]</sup>。在这种模式下,畜牧和水产养殖中使用的抗菌药物不可避免地对水环境造成一定的影响,同时养殖水域营养丰富且交换缓慢的特点,亦使得水产养殖环境成为耐药菌及耐药基因的临时存储库。水产养殖细菌病原耐药菌株的出现不仅增加了疾病防治的成本,亦存在耐药性传播的风险,威胁到水环境乃至人类健康安全。本研究通过采集猪-鱼复合养殖模式下不同来源的气单胞菌,测定分离菌株对不同类抗菌药物的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),了解其耐药情况;进而检测整合子及其耐药基因盒的携带情况,分析整合子与多重耐药之间的相关性,为水产养殖合理使用药物及水产品安全风险分析提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集及菌株的分离培养

本实验样品于2014年10月采自广东省佛山市3个和肇庆市2个不同的猪-鱼复合养殖场。每池塘选取10条鱼,每条鱼采集鱼鳃及内脏组织约20 g加入200 mL 1%蛋白胨水溶液于拍打袋中拍打,取过滤后的拍打液梯度稀释后涂布于RS(Rimler-Shotts)培养基,30℃恒温培养过夜,挑选3~5个特征单菌落接种于RS培养基纯化培养,再经氧化酶鉴定,呈阳性者于-20℃保存备用。每池塘选取5个采水点,每个采水点用采水器采集鱼塘表面水下10~15 cm处水体2 L,然后用灭菌枪头吸取1 mL,梯度稀释后涂布于RS培养基,后续菌株分离培养同上。每个采水点采集鱼塘底泥20 g,加入200 mL 1%蛋白胨水溶液拍打,后续菌株分离培养同上。每个猪场选取10头猪,用灭菌棉拭子擦拭猪肛门,将沾有粪便的棉拭子置于无菌碱性蛋白胨水中,后续菌株分离培养同上。从

上述样品中共采集分离到317株气单胞菌,分别来源于猪肛门粪便(18株)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)或麦瑞加拉鲮(127株)、池塘水(94株)和池塘底泥(78株)。大肠埃希菌(*Escherichia coli*)ATCC 25922由华南农业大学兽医学院药理教研室惠赠。

### 1.2 菌株鉴定

根据革兰氏染色及氧化酶实验结果,取过夜培养的细菌培养液,按照细菌基因组试剂盒(Omega,美国)说明书进行提取和纯化细菌基因组DNA。根据Borrell等<sup>[14]</sup>和Yanez等<sup>[15]</sup>方法分别合成16S rRNA基因序列和*gyrB*基因序列扩增引物,分别进行PCR扩增,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后送广州艾基生物技术有限公司进行基因序列测定,并将测序结果上传NCBI的Blast检索系统进行序列同源性分析。

### 1.3 菌株药物敏感性测定

药物敏感性测定采用微量二倍稀释法,参照美国国家临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准<sup>[16-17]</sup>判断实验菌株的药物敏感性,并以大肠埃希菌ATCC25922作为质控菌株。选取7大类20种广谱抗菌药物,包括磺胺及其增效剂:磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、磺胺二甲嘧啶/甲氧苄啶(SM2/TMP)、磺胺嘧啶/甲氧苄啶(SD/TMP)、磺胺甲噁唑/甲氧苄啶(SXT);四环素类:四环素(TE)、多西环素(DO);喹诺酮类:萘啶酸(NA)、诺氟沙星(NOR)、恩诺沙星(ENR)、环丙沙星(CIP);氨基糖苷类:新霉素(N)、庆大霉素(CN)、阿米卡星(AK)、链霉素(S);β内酰胺类:氨苄西林(AMP)、头孢噻肟(CTX);酰胺醇类:甲砒霉素(THI)、氟苯尼考(FFC)、氯霉素(C);唑啉类:唑啉妥因(F)。同时设无药无菌阴性对照和无药有菌的阳性对照。于每孔中加入上述稀释到 $1 \times 10^6$  CFU/mL的菌液100 μL。置于35℃培养箱中静置培养16~24 h,取出观察结果。对照组细菌生长良好时,以肉眼观察到能够抑制细菌生长的最低药物浓度作为该药物对气单胞菌的MIC。根据MIC结果,统计菌株对各药物的MIC<sub>50</sub>及MIC<sub>90</sub>(分别是抑制50%及90%实验菌株生长所需要的最低药物浓度)。

### 1.4 整合子-基因盒分析

根据Jacobs等<sup>[5]</sup>的方法设计及合成相关引

物,通过PCR扩增*intI1*、*sul1*和*qacEΔ1*基因及可变区(基因盒),PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,对于单一条带的PCR产物,经纯化后送到广州艾基生物技术有限公司进行基因序列测定。对于具有多条条带的PCR产物,采用胶回收试剂盒(Omega,美国)分别对每条条带进行切胶回收,回收产物与pEAZY-T1克隆载体(北京全式金生物技术有限公司,北京)连接,转化到感受态细胞后,挑取阳性克隆,送广州艾基生物技术有限公司进行基因序列测定,并将测序结果上传

至NCBI的Blast检索系统进行序列同源性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌分离鉴定结果

317株气单胞菌通过分子鉴定为8个种,分别为维氏气单胞菌(*A. veronii*)(178株)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)(48株)、简达气单胞菌(*A. jandaei*)(36株)、温和气单胞菌(*A. sobria*)(29株)、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)(23株)、*A. simiae*(2株)以及舒伯特气单胞菌(*A. schubertii*)(1株)。

表 1 317株分离菌对20种药物的耐药率以及I类整合子阳性菌与阴性菌耐药性情况比较

Tab. 1 Susceptibility of 317 isolates to 20 antimicrobial agents and comparison of resistance to positive and negative strains of class I integron

药物 drug	折点/(mg/L) breakpoint		耐药菌株数 (耐药率/%) resistance isolates (resistance rates/%)	MIC <sub>50</sub> (mg/L)	MIC <sub>90</sub> (mg/L)	整合酶阳性 (耐药率/%) integron positive (resistance rates/%)	整合酶阴性 (耐药率/%) integron negative (resistance rates/%)	卡方值 $\chi^2$	P值 P-value
	敏感 sensitive	耐药 resistant				positive (resistance rates/%)	negative (resistance rates/%)		
磺胺间甲氧嘧啶 SMM	≤256	≥512	197(62.15%)	512	>512	49(98.00%)	148(55.43%)	30.656	0.000**
磺胺甲噁唑/甲氧苄啶 SXT	≤2/38	≥4/76	58(18.3%)	≤9.5/0.5	9.5/0.5	48(96.00%)	10(3.74%)	233.635	0.000**
磺胺二甲嘧啶/甲氧苄啶 SM2/TMP	-	-	-	≤2.5/0.5	5/1	-	-	-	-
磺胺嘧啶/甲氧苄啶 SD/TMP	-	-	-	≤2.5/0.5	5/1	-	-	-	-
多西环素 DO	≤4	≥16	15(4.74%)	1	8	9(18.00%)	6(2.24%)	19.82	0.000**
四环素 TE	≤4	≥16	9(2.84%)	≤0.5	8	8(16.00%)	1(0.37%)	31.825	0.000**
萘啶酸 NA	≤8	≥32	171(53.95%)	>128	>128	46(92.00%)	125(46.82%)	32.811	0.000**
环丙沙星 CIP	≤1	≥4	14(4.42%)	0.06	0.5	13(26.00%)	1(0.37%)	59.581	0.000**
诺氟沙星 NOR	≤4	≥16	11(3.48%)	0.12	2	10(20.00%)	1(0.37%)	42.743	0.000**
恩诺沙星 ENR	≤0.5	≥4	3(0.95%)	0.06	0.5	3(6.00%)	0	10.406	0.001**
新霉素 N	≤4	≥16	4(1.27%)	≤1	2	4(8.00%)	0	15.688	0.000**
庆大霉素 CN	≤4	≥16	1(0.32%)	0.5	2	1(2.00%)	0	0.885	0.147
阿米卡星 AK	≤16	≥64	0	1	2	0	0	-	-
链霉素 S	-	-	-	4	16	-	-	-	-
氨苄西林 AMP	≤8	≥32	307(96.85%)	>128	>128	48(96.00%)	259(97.00%)	0.000	0.987
头孢噻肟 CTX	≤8	≥64	11(3.48%)	0.06	0.25	11(22.00%)	0	54.461	0.000**
氯霉素 C	≤32	≥32	26(8.21%)	≤2	16	22(44.00%)	4(1.50%)	95.473	0.000**
氟苯尼考 FFC	≤2	≥8	43(13.57%)	≤1	32	31(62.00%)	12(4.49%)	113.925	0.000**
甲砷霉素 THI	-	-	-	≤2	>32	-	-	-	-
呋喃妥因 F	≤32	≥128	0	≤4	≤4	0	0	-	-

注: -表示磺胺二甲嘧啶/甲氧苄啶、磺胺嘧啶/甲氧苄啶、链霉素和甲砷霉素在CLSI中没有相关的耐药判定标准; \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )  
Notes: -represented for no interpretive criteria provided for sulphamethazine/trimethoprim, sulfadiazine/ trimethoprim, streptomycin and thiamphenicol in CLSI; \*\* represented for significant differences( $P < 0.01$ )

## 2.2 分离菌株耐药性分析

317株受试菌株对20种抗菌药物的敏感性表现不一(表1)。其中氨苄西林的耐药率最高,为96.85%,与气单胞菌对氨苄西林天然耐药有关;对磺胺间甲氧嘧啶、萘啶酸中度耐药,分别为62.15%和53.95%,对氟喹诺酮类、氨基糖苷类、四环素类、酰胺醇类、磺胺甲噁唑/甲氧苄啶、头孢噻肟相对敏感,均在20%以下,所有菌株对呋喃妥因和阿米卡星完全敏感。

## 2.3 整合酶基因检测及其耐药性比较

对317株受试菌株PCR扩增I类整合子整合酶基因*intI1*,结果有15.77%(50/317)菌株携带了*intI1*基因。比较不同来源气单胞菌的整合子检出率,猪源和鱼源的检出率比环境源(池塘水和底泥)的高(表2)。

比较整合子阳性菌株和整合子阴性菌株发现,整合子阳性菌对酰胺醇类、磺胺甲噁唑/甲氧苄啶、四环素类、氟喹诺酮类、新霉素、链霉素、头孢噻肟的耐药率均比整合子阴性菌高( $P < 0.01$ )(表1)。

## 2.4 整合子-基因盒分析结果

50株整合子阳性菌株中,共检出10种基因盒阵列结构,基因盒阵列的片段大小为750~3000(表3)。整合子中携带的基因盒主要以耐氨基糖苷类的*aadA*、*aac6-II*,耐甲氧苄啶类的*drfA*和

*drfB*以及耐氯霉素类的*catB*为主。 $\beta$ 内酰胺类耐药基因*bla<sub>OXA-10</sub>*和*bla<sub>OXA-21</sub>*主要在猪源气单胞菌中检出。质粒介导的喹诺酮类耐药(plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR)基因*aac(6)-Ib-cr*主要在鱼源气单胞菌整合子中检出。

## 3 讨论

### 3.1 气单胞菌耐药性分析

农业部1997号公告批准<sup>[8]</sup>水产养殖中使用的药物有5大类10种,包括磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑/甲氧苄啶、磺胺二甲嘧啶/甲氧苄啶、磺胺嘧啶/甲氧苄啶、多西环素、诺氟沙星、恩诺沙星、新霉素、氟苯尼考和甲砒霉素。本实验

表2 不同来源气单胞菌分离菌I类整合子检出情况

菌株来源 origins	分离菌株数/株 no. of isolates	I类整合子检出数(检出率/%) no. (percentage) of integron
鱼 fish	127	26(20.5%)
池塘水 pond water	94	12(12.8%)
池塘底泥 sediment	78	6(7.7%)
猪粪 pig feces	18	6(33.3%)
合计 total	317	50(15.8%)

表3 50株整合子阳性菌基因盒阵列类型及其在不同来源菌株中的分布情况

基因盒种类 types of gene cassettes	基因盒阵列 gene cassette arrays	GenBank登录号 GenBank accession no.	总菌株数 strains	鱼 fish	池塘水 pond water	池塘底泥 sediment	猪粪 pig feces
A	<i>dfrA17</i>	KR067581	7	3	4		
B	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	KR067578	6	3	2	1	
C	<i>dfrB4-catB3-aadA1</i>	KR067582	6	4	2		
D	<i>catB8</i>	KR067580	5	2	2	1	
E	<i>aac(6)-Ib-cr-arr-3</i>	KR868994	5	5			
F	<i>aac6-II-bla<sub>OXA-21</sub>-catB3</i>	KR067583	3			1	2
G	<i>aar2-aacA4-drfA1-orfC</i>	KR067585	1			1	
H	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	KR868995	1	1			
I	<i>dfrA15</i>	KR868993	1	1			
J	<i>dfrB4-catB3-bla<sub>OXA-10</sub>-aadA1</i>	KR067584	1				1
K	空基因盒		14	7	2	2	3
	合计 total		50	26	12	6	6

测试的水产养殖中批准使用的10种药物中,除了磺胺间甲氧嘧啶为中等程度耐药外,其余几种的耐药率均在20%以下,说明大部分药物都具有良好的疗效。尽管如此,分离菌株除了对阿米卡星和呋喃妥因完全敏感外,对其余18种测试药物(包括畜牧养殖常用的药物)均检测到有耐药菌株存在;这些耐药菌出现的原因可能是多方面的:第一,水产养殖使用抗菌药物进行细菌病害防治,可能是细菌耐药性产生的主要原因;第二,在复合养殖模式下,畜禽粪便、饵料在冲栏后直接排入池塘,残留在其中的抗菌药物会对池塘菌群产生影响,此外畜禽肠道的耐药菌也可随污水进入池塘,从而诱导和传播耐药;第三,养殖水体与外界环境相连,环境中残留的抗菌药物和耐药菌也可能进入养殖水体,由于池塘养殖水体的流动性较差且营养物质丰富,也为耐药性传播提供了便利条件。

水产养殖中细菌的耐药性是国内外众多研究者关注的热点之一,尤其在畜禽-鱼复合养殖模式下,细菌耐药性的问题也不容忽视。Shah等<sup>[19]</sup>从复合养殖场的鱼、池塘水和池塘底泥分离的多种细菌中发现84%的细菌为多重耐药菌。Su等<sup>[20]</sup>从广东中山4个复合养殖场分离的203株肠杆菌中发现,37.9%的菌株至少对12种检测药物中的7种以上耐药。复合养殖模式下,池塘养殖水体给来自不同环境的细菌提供了相互接触的条件,亦增加了耐药基因在不同来源菌群之间传播的可能性。本课题组前期研究对来自广东4个复合养殖场分离的气单胞菌通过分子分型进行亲缘关系分析,发现来源于同一养殖场的猪源、鱼源和环境源菌株存在相同或相似图谱的分离株,表明复合水产养殖环境有可能便于耐药菌株从畜禽向水产养殖环境转移<sup>[21]</sup>。

### 3.2 气单胞菌整合子分析

整合子能够介导细菌捕获外源基因,是细菌发生水平基因转移和产生多重耐药机制的主要途径。目前,整合子在多种革兰氏阴性杆菌中都有报道<sup>[22]</sup>;对于气单胞菌,多个国家和地区也已在不同来源(包括病人、家畜、鱼类以及水环境等)的样品中检测到<sup>[4-5,8-11]</sup>。国外已报道的水产动物源气单胞菌中整合子的类型有3种,包括I、II、III类整合子,以I类整合子为主,其检测率在15%~50%<sup>[4-5,8-11]</sup>。Chang等<sup>[23]</sup>报道食品源(水产品、禽类)气单胞菌I类整合子的检出率为

18.0%。环境源气单胞菌I类整合子的检出率普遍低于动物源,约为20%左右<sup>[10,12,24]</sup>。在本研究中,动物源菌株(鱼源和猪源)的整合子检出率亦比环境源的高;鱼源气单胞菌I类整合子的检出率为20.5%,低于李绍戊等<sup>[3]</sup>从病鱼分离的28株嗜水气单胞菌中I类整合子53.57%的检出率。由于分离菌株来源于未发病的养殖动物和水环境,因而整合子的总体检出率相对其他文献报道较低。

已有的研究发现,I类整合子携带多种类型的耐药基因盒,如*aad*、*aac*、*str*、*dfr*、*bla*、*cat*和*arr*基因等,主要介导对氨基糖苷类、甲氧苄啶、 $\beta$ -内酰胺类、氯霉素和利福平等药物的耐药性<sup>[4-5,8,11]</sup>;李绍戊等<sup>[3]</sup>从病鱼分离的嗜水气单胞菌I类整合子基因盒也是以*aadA*、*dfrA*和*catB*家族为主。本实验中共检测到16种耐药基因盒,以*aadA*、*dfrA*、*dfrB*和*catB*组合的基因盒阵列占了69.4%(25/36)。另外,携带了不同类耐药基因盒的整合子阳性菌还表现出所对应的对链霉素、甲氧苄啶、氯霉素类等的耐药表型。整体来看,整合子阳性菌株大多对3类以上药物耐药,而整合子阴性菌对不同类药物较敏感。由此推测整合子的存在与细菌的多重耐药密切相关。

本实验在6株鱼源分离菌株的整合子中发现了PMQR基因*aac(6')-Ib-cr*并表现出对氟喹诺酮类耐药,其中有5株菌的*aac(6')-Ib-cr*与利福平耐药基因*arr-3*组成了基因盒阵列,该阵列与Marti等<sup>[25]</sup>在河流中分离的气单胞菌整合子携带的阵列相似,只是比Marti等<sup>[25]</sup>报道的阵列中缺少了*bla<sub>OXA-1</sub>*和*catB3*基因。*aac6(6')-Ib-cr*基因是一种由质粒携带的氨基糖苷乙酰化转移酶的变异基因,它可使细菌对环丙沙星及诺氟沙星的敏感性降低,也能引起对阿米卡星、卡那霉素等氨基糖苷类耐药<sup>[26]</sup>。*aac6(6')-Ib-cr*基因常位于整合子中,并通过耐药质粒在不同细菌之间进行耐药性传递<sup>[27]</sup>。由此可见,整合子耐药基因盒组合及其耐药表型的复杂性,可能与畜牧和水产养殖上广泛使用抗菌药物有关。在抗菌药物的选择压力下,整合子不断进化,产生新的耐药形式,使细菌更适应抗菌药物的环境,并可能为基因盒在不同菌群中的存在提供了稳定的贮存库。

复合养殖模式下,整合子介导耐药基因的水平传播可以增加耐药性在不同来源菌株间快速传播和扩散的风险,因此,为了减少细菌多重

耐药性的产生,需要减少复合养殖模式或者在复合养殖模式中畜禽粪便和饲料残渣经处理后,再排入池塘。轮换用药和合理使用药物也是减少细菌耐药性产生的方法之一。另外,进一步开展畜禽-鱼复合养殖模式下细菌耐药性传播机制研究,对水产养殖合理用药、阻断耐药性的扩散,甚至对人类公共卫生事业都有着重要作用。

#### 参考文献:

- [1] Janda J M, Abbott S L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35-73.
- [2] 吴雅丽, 邓玉婷, 姜兰, 等. 广东省水产动物源气单胞菌对抗菌药物的耐药分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2013, 22 (2): 219-224.  
Wu Y L, Deng Y T, Jiang L, *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from various aquatic animals in Guangdong Province [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22 (2): 219-224 (in Chinese).
- [3] 李绍戊, 王荻, 刘红柏, 等. 鱼源嗜水气单胞菌多重耐药菌株整合子的分子特征[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(5): 1015-1022.  
Li S W, Wang D, Liu H P, *et al.* Molecular characterization of integron-gene cassettes in multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* from fish [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(5): 1015-1022 (in Chinese).
- [4] Kadlec K, Von Czapiewski E, Kaspar H, *et al.* Molecular basis of sulfonamide and trimethoprim resistance in fish-pathogenic *Aeromonas* isolates [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(20): 7147-7150.
- [5] Jacobs L, Chenia H Y. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 114(3): 295-306.
- [6] Mazel D. Integrons: Agents of bacterial evolution [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(8): 608-620.
- [7] Hall R M. Integrons and gene cassettes: Hotspots of diversity in bacterial genomes [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012, 1267(1): 71-78.
- [8] Ndi O L, Barton M D. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(8): 589-599.
- [9] Pérez-Valdespino A, Fernández-Rendón E, Curiel-Quesada E. Detection and characterization of class 1 integrons in *Aeromonas* spp. isolated from human diarrheic stool in Mexico [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2009, 49(6): 572-578.
- [10] João Carvalho M, Martínez M A, Cristina Esteves A, *et al.* Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 159(3): 230-239.
- [11] Lukkana M, Wongtavatchai J, Chuanchuen R. Class 1 integrons in *Aeromonas hydrophila* isolates from farmed Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*) [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2012, 74(4): 435-440.
- [12] Ma L P, Zhang X X, Cheng S P, *et al.* Occurrence, abundance and elimination of class 1 integrons in one municipal sewage treatment Plant [J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(5): 968-973.
- [13] 朱华平, 黄樟翰, 卢迈新, 等. 广东省淡水养殖的现状、问题以及发展对策[J]. *水产科技*, 2008(2): 1-6.  
Zhu H P, Huang Z H, Lu M X, *et al.* Current situation, problem and development strategy of freshwater animal farming in Guangdong province [J]. *Fisheries Science & Technology*, 2008(2): 1-6 (in Chinese).
- [14] Borrell N, Acinas S G, Figueras M J, *et al.* Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(7): 1671-1674.
- [15] Yáñez M, Catalán V, Apráiz D, *et al.* Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(3): 875-883.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S25: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fifth informational supplement [S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [17] Clinical and Laboratory Standard Institute. M45A-A2: Methods for antimicrobial dilution and disk

- susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria [S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
- [18] 中华人民共和国农业部公告第1997号. 兽用处方药品种目录(第一批)[EB/OL]. (2013-09-30)[2013-10-10]. [http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201310/t20131010\\_3625542.htm#](http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201310/t20131010_3625542.htm#) Announcement No. 1997 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Catalog of prescription veterinary medicine (the first) [EB/OL]. (2013-09-30)[2013-10-10]. [http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201310/t20131010\\_3625542.htm#](http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201310/t20131010_3625542.htm#)(in Chinese)
- [19] Shah S Q A, Colquhoun D J, Nikuli H L, *et al.* Prevalence of antibiotic resistance genes in the bacterial flora of integrated fish farming environments of Pakistan and Tanzania [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(16): 8672–8679.
- [20] Su H C, Ying G G, Tao R, *et al.* Occurrence of antibiotic resistance and characterization of resistance genes and integrons in enterobacteriaceae isolated from integrated fish farms in South China[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13(11): 3229–3236.
- [21] 黄玉萍, 邓玉婷, 姜兰, 等. 复合水产养殖环境中气单胞菌耐药性及其同源性分析[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 777–785.
- Huang Y P, Deng Y T, Jiang L, *et al.* Antimicrobial resistance and homology analysis in *Aeromonas* isolated from integrated fish farms [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 777–785 (in Chinese).
- [22] Partridge S R, Tsafnat G, Coiera E, *et al.* Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons[J]. *FEMs Microbiology Reviews*, 2009, 33(4): 757–784.
- [23] Chang Y C, Shih D Y C, Wang J Y, *et al.* Molecular characterization of class I integrons and antimicrobial resistance in *Aeromonas* strains from foodborne outbreak-suspect samples and environmental sources in Taiwan [J]. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 2007, 59(2): 191–197.
- [24] Igbinsosa I H, Okoh A I. Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* species isolated from wastewater treatment plant [J]. *The Scientific World Journal*, 2012, 2012: 764563.
- [25] Marti E, Balcázar J L. Multidrug resistance-encoding plasmid from *Aeromonas* sp. strain p2G1 [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 18(9): E366–E368.
- [26] Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G A. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase [J]. *Nature Medicine*, 2005, 12(1): 83–88.
- [27] Jacoby G A, Strahilevitz J, Hooper D C. Plasmid-mediated quinolone resistance [J]. *Microbiology Spectrum*, 2014, 2(2): 207–210.

## Prevalence and characterization of class I integron in *Aeromonas* from pig-fish integrated farm

FENG Yongyong<sup>1,2</sup>, JIANG Lan<sup>1</sup>, DENG Yuting<sup>1\*</sup>, TAN Aiping<sup>1</sup>, ZHANG Ruiquan<sup>1</sup>, LUO Li<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Academy of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** *Aeromonas* is regarded as an important pathogen of freshwater animals. However, little is known about genetics of antimicrobial resistance in *Aeromonas* sp. in Chinese aquaculture. The aim of this study was to investigate the presence of class I integron and characterize multidrug-resistant *Aeromonas* sp. isolated from integrated farms. Three hundred and seventeen *Aeromonas* strains were isolated from pig feces, fish, pond water and sediments. These samples were collected from 5 pig-fish integrated farms in Foshan and Zhaoqing of Guangdong province. All strains were evaluated for resistance to 20 antimicrobials of 7 classes by two fold dilution method. Genomic DNA was extracted with the Omega DNA mini kit. All the isolates were screened for the presence of *intI1*. All the *intI1*-positive strains were also amplified *sulI*, *qacE1* fragment and gene cassette region by PCR. Gene cassettes arrays were analyzed by BLAST. Percentages of isolates resistant to 20 antimicrobials were variable. Resistance was most prevalent for ampicillin, sulfamonomethoxine and nalidixic acid. Among 317 *Aeromonas* isolates, 50 (15.77%) isolates were positive for *intI1*. The incidence of class I integron was more prevalent in *Aeromonas* from fish and pig than that from environmental sources. Comparing the resistance phenotypes represented in integron-positive and integron-negative strains, the results showed that the resistance rates of trimethoprim/sulfamethoxazole, doxycycline, enrofloxacin, neomycin and florfenicol among integron-positive isolates are higher than those from integron-negative strains. All of the integron-positive strains were resistant to more than three classes of agents. There were 16 different gene cassettes encoding resistance to aminoglycosides (*aadA1*, *aadA2*, *aac6-*, *aacA4*), trimethoprim (*drfA1*, *dfrA12*, *dfrA15*, *dfrA17*, *dfrB4*),  $\beta$ -lactams (*bla<sub>OXA-10</sub>*, *bla<sub>OXA-21</sub>*), chloramphenicol (*catB3*, *catB8*), rifampicin (*arr-2*, *arr-3*) and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) gene *aac(6')-Ib-cr*. Most of the integron-positive isolates carrying gene cassettes mentioned above corresponded to the resistance profile of antimicrobial agents such as trimethoprim, streptomycin, chloramphenicol. It indicated that there was a close relationship between class I integron and multi-drug resistance in *Aeromonas* isolates. It is concluded that class I integron mediated multi-drug resistance was wide spread in *Aeromonas* from different origins of pig-fish integrated farms. Further study on resistance mechanism should be undertaken so as to provide a basis for rational usage of antimicrobial agents in Chinese aquaculture.

**Key words:** *Aeromonas*; integrated farm; class I integron; antimicrobial resistance

**Corresponding author:** DENG Yuting. E-mail: fourdeng@163.com

**Funding projects:** PhD Start-up Fund of Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (S2013040013070); Young Scientists Fund in National Natural Science Foundation of China (31302228)