

浦口某养殖场气单胞菌的分离鉴定和耐药特性分析

吴亚锋, 陈 静, 方 苹*

(江苏省水生动物疫病预防控制中心, 南京 210036)

摘 要: 为了解浦口地区水产动物源气单胞菌的耐药情况和变化趋势, 以某渔场为试点, 在 2015 年 4 至 10 月、2016 年 4 至 9 月期间, 每月连续在该养殖场进行采样。共采集鲫鱼和草鱼样品 39 份, 采用平板培养、生化试验和种特异性 *gyrB* 基因扩增测序等方法进行细菌的分离鉴定, 同时进行体外药敏试验。结果显示, 共鉴定出 59 株气单胞菌, 菌株对恩诺沙星最敏感, 高达 84.75%; 比较 2015、2016 年抗生素 MIC 加权平均值, 发现恩诺沙星和强力霉素分别提高了 6.43 倍和 3.01 倍, 表明病原菌对这 2 种抗生素的耐药水平上升。多重耐药性试验结果表明, 大部分水产动物病原菌至少对一类药物耐药。综上, 通过连续性采样监测, 表明气单胞菌在该养殖场分布广泛, 且水产动物病原菌的耐药性问题十分严峻。

关键词: 气单胞菌; 分离; 鉴定; 耐药性

中图分类号: S941.42

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)04-0626-07

Isolation, identification and drug-resistance analysis of *Aeromonas* of a fishery in Pukou area

WU Yafeng, CHEN Jing, FANG Ping

(Jiangsu Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Disease, Nanjing 210036)

Abstract: In order to understand the drug resistance and trend of *Aeromonas* in aquatic animals in Nanjing, a fishery was set up as a pilot. A series of experiments were conducted in the fishery in Pukou area of Nanjing from April to October in 2015 and April to September in 2016. A total of 39 samples were collected from silver rpusian carp and grass carp. The bacteria were isolated and identified by means of bacterial culture, biochemical characterizations and *gyrB* gene sequencing. The susceptibility test to five kinds of antibiotics in vitro was carried out. The results showed that 59 strains isolated from the liver, spleen and kidney were identified to species. The drug sensitivity analysis showed that most isolates were sensitive to enrofloxacin, up to 84.75%. With the comparison of MIC values of five kinds of antibiotics in 2015 and 2016, it was found that the weighted average MIC values of enoxacin and doxycycline were increased by 6.43 and 3.01 times, respectively, indicating that the resistance levels of pathogens to these two antibiotics were increased. In conclusion, it was found that *Aeromonas* are widely distributed in the aquatic environment of Nanjing by the means of continuous monitoring, and the drug resistance of the aquatic animal pathogen has been very serious.

Key words: *Aeromonas*; isolation; identification; drug resistance

气单胞菌属 (*Aeromonas*) 在细菌分类学上属于气单胞菌科 (*Aeromonadaceae*), 是一种革兰阴性菌。该菌广泛分布于自然环境中和水生动物体内, 能导致鱼类的出血性败血症, 是一类危害极其严重的水产动物病原菌^[1-2]。同时, 该菌在健康人体内也有分布, 可引起人肠道感染和肠道外感染, 如败血症、伤口、眼、骨关节、腹腔感染及其他感染等, 因此

监测与研究气单胞菌的致病性和耐药率具有重要的公共卫生意义^[3-4]。

江苏省是我国水产养殖大省, 2016 年全省水产养殖面积 1 140 万亩, 水产品总产量 522 万 t, 渔业产值 1 700 亿元, 渔业经济总产值 3 020 亿元。但是, 随着水产养殖的集约化和产业化发展, 水产养殖过程中病害的发生越来越频繁, 全省每年渔业病害造

收稿日期: 2018-01-04

基金项目: 江苏省水产三新工程 (Y2017-21) 资助。

作者简介: 吴亚锋, 助理工程师。E-mail: 15850572675@163.com

* 通信作者: 方 苹, 高级工程师。E-mail: jsyzkxj@126.com

成的直接经济损失达 30 多亿元, 尤其是由某些病原细菌所引起的疾病, 常表现出较大的流行面积、较高的发病率和死亡率, 经济损失严重^[5-6]。一方面, 这些细菌性疾病的感染类型较复杂, 其病原细菌的种类也较多, 因此在生产实践中难以做到具有针对性地有效用药防治; 另一方面, 我国针对细菌性疾病进行科学用药的基础研究尚薄弱, 尤其是一些科学用药的基础数据和方法尚未被掌握, 导致在水产养殖中真正做到科学用药还非常困难, 致使这些疾病不能得到及时有效控制, 对水生动物的健康养殖构成了严重威胁^[7]。

南京市浦口区是江苏省淡水养殖重要区县之一, 水生动物疫病检测面积占江苏省的 2.26%、占南京市的 40.06%。为了解水产动物源气单胞菌的耐药情况和变化趋势, 以浦口区某渔场为试点, 采集江苏省内养殖面积最大的品种——异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*), 分离水产常见条件致病菌——气单胞菌, 同时进行体外药敏试验, 为该地区水生动物细菌性疾病的科学用药提供理论基础, 为进一步了解整个江苏地区气单胞菌的分布和耐药情况奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集与参考菌株

在 2015 年 4 至 10 月, 及 2016 年 4 至 9 月, 每月连续在南京浦口地区某养殖场进行采样。共采集异育银鲫 (15~20 cm, 350 g 左右) 和草鱼 (30~

40 cm, 1.5 kg 左右) 样品 39 份, 分别取肝、肾和脾进行细菌培养分离。本试验所用参考菌株为嗜水气单胞菌 ATCC 7966^[8]。

1.2 主要试剂

PCR Mix 液, 购自 Vazyme 公司; DNA 提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒, 购自大连宝生物公司。5 种抗菌药物原料药: 硫酸新霉素 (华北制药集团有限责任公司, 批号: 20150126, 含量 98.0%)、盐酸多西环素 (浙江国邦药业有限公司, 批号: 20150220, 含量 98.8%)、甲砒霉素 (浙江国邦药业有限公司, 批号: 20150222, 含量 98.5%)、氟苯尼考 (华北制药集团有限责任公司, 批号: 20150214, 含量 98.0%)、盐酸恩诺沙星 (浙江国邦药业有限公司, 批号: 20150222, 含量 98.0%)。微量生化反应管购自杭州天和微生物试剂有限公司, 其余试剂为进口或国产分析纯。

1.3 细菌的分离培养与纯化

无菌采取鱼的脏器, 划线接种于 LB 固体培养基, 28℃ 培养 24 h; 挑取单个菌落, 再次划线接种于 LB 固体培养基进一步纯化。经 2 次分离纯化后的菌落, 进行革兰染色^[9]。

1.4 细菌形态特征观察和生化特性检查

用接种环挑取普通琼脂平板上单个菌落少许, 涂于氧化酶试纸片上, 观察颜色变化; 挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中, 28℃ 培养 8 h, 用接种环接种于葡萄糖、蔗糖、阿拉伯糖、七叶苷和鸟氨酸脱羧酶等多种微量生化反应管中, 28℃ 培养 18~24 h, 观察生化管中的颜色变化。

表 1 PCR 反应引物及目的片段大小

Table 1 The primer sequences and product sizes

目的基因 Target gene	引物序列 (5'-3') Primers sequence (5'-3')	退火温度/℃ Anneal temperature	目的片段大/bp Product size
<i>gyrB</i>	P1: TCCGGCGGTCTGCACGGCGT P2: TTGTCCGGG TTGTACTCGTC	64	1 100

1.5 分离菌株的分子鉴定

按试剂盒说明书, 提取细菌基因组 DNA, 作为扩增看家基因 *gyrB* 的 DNA 模板。采用 *gyrB* 种特异性引物^[10] (见表 1), 对分离菌株的 *gyrB* 基因片段进行扩增。引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成, 根据合成引物的 OD 值和 1 OD 引物的分子数 (nmol), 将引物稀释为 10 pmol, -20℃ 保存备用, 反应体系为 25 μL, 包括: Mix 12.5 μL, 上下游引物 (10 pmol) 各 1 μL, 模板 1 μL, 用 ddH₂O 调整终体积至 25 μL。反应参数为 94℃ 预变性 2

min, 94℃ 变性 30 s, 64℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 共进行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

取 5 μL PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。将 PCR 产物回收后送交生工生物工程股份有限公司进行序列测定, 所测序列使用 BLAST 软件进行同源性分析。

1.6 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定

按照日本化学疗法学会制定的标准法, 首先将供试药物采用适宜的溶媒溶解后, 用灭菌生理盐水分别稀释至 1 000.0 μg·mL⁻¹ 的浓度。然后在无菌条

件下,用灭菌后的液体培养基将药物稀释 10 倍,从而使培养基中药物的浓度达到 $100.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度。再用定量移液枪向每支盛有 2.9 mL 胰蛋白胨液体培养基的试管中加入 2.9 mL 含有药物的培养基,将试管在混悬器上混合均匀后,从中吸取 2.9 mL 含有药物的胰蛋白胨液体培养基加到下一试管中,以此类推制作成药物浓度分别为 100.0、50.0、25.0……0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 2 倍稀释药物系列培养基试管。最后,定量吸取 0.1 mL 浓度约为 $1.2\times 10^6 \text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 活菌液(比浊法测定)加入上述每支试管中,摇匀。置于 28°C 条件下培养 72 h,经肉眼观察证实无细菌生长试管中的最低药物浓度,即为药物的最小抑菌浓度^[11]。根据美国国家临床实验室标准委员会 CLSI 颁布的判断标准记录结果,并以大肠埃希菌 ATCC 25922 作为质控菌株。

2 结果与分析

2.1 细菌鉴定

在 LB 固体培养基上,气单胞菌菌落呈圆形、中央微凸,表面光滑,淡黄色。镜检,革兰阴性,菌体呈粉红色短杆状。部分菌株生化试验结果见表 2,对分离菌株进行看家基因 *gyrB* 扩增,结果中条带大小跟预期目的条带大小一致(图 1)的送样测

序,NCBI 比对确定到种。从 39 份样品中,鉴定出气单胞菌菌株 59 株,说明该菌分布十分广泛。分离的气单胞菌主要有 6 个种:温和气单胞菌(*A.sobria*)、维氏气单胞菌(*A.veronii*)、嗜水气单胞菌(*A.hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*A.caviae*)、舒伯特气单胞菌(*A.schubertii*)和简达气单胞菌(*A.jandaiei*),检出率分别为 54.24%、30.51%、8.47%、3.39%、1.69%和 1.69%,具体结果见表 3。从脏器分布来看,各个脏器都有分离出细菌的情况,但肝脏检出率较高;从分离时间来看,检测期间每个月均能检出气单胞菌,证明该菌是一种重要的水产动物病原菌。

2.2 药敏试验

2.2.1 最小抑菌浓度的测定 59 株气单胞菌最小抑菌浓度的测定结果见表 4。总体来看,分离菌株对硫酸新霉素和甲砒霉素的 MIC 值远远高于其他抗生素,2 年加权平均值(MIC 加权平均值= $\sum(\text{菌株数}\times\text{对应的 MIC 值})/\text{菌株总数}$)分别为 39.75 和 $38.42 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,说明病原菌对这两种抗生素较耐药;恩诺沙星和强力霉素的 MIC 值较低,分别为 2.4 和 $6.13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,表明分离菌株对这 2 种抗生素较敏感。

表 2 部分菌株生化试验结果

Table 2 The biochemical characteristics of part bacterial strain

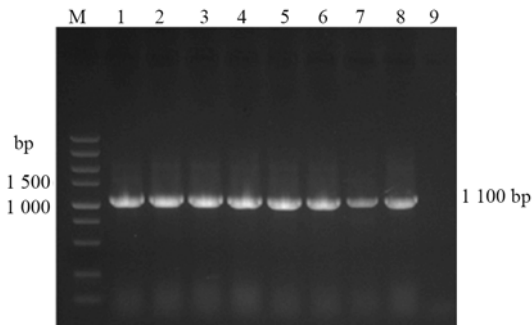
菌株 Strain	生化指标 Biochemical indicators									
	氧化酶 Oxidase	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	甘露醇 Mannitol	阿拉伯糖 Arabinose	乳糖 Lactose	枸橼酸钠 Sodium	水杨苷 Salicin	肌醇 Inositol	鸟氨酸 Ornithine
ATCC7966	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
150077	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
150226-2	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
50435-2	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
150488-2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
20160516JG2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示阴性;“+”表示阳性。Notes:“-”means the negative;“+” means the positive.

表 3 来源于鱼样的气单胞菌分布情况

Table 3 Distribution of *Aeromonas* isolates obtained from the fish sample

种 Species	脏器 Organ			总计/% Total
	肝 Liver	脾 Spleen	肾 Kidney	
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	5	8	5	18(30.51)
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	4	0	1	5(8.47)
豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>	1	0	1	2(3.39)
温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	16	6	10	32(54.24)
舒氏气单胞菌 <i>A. schubertii</i>	1	0	0	1(1.69)
简达气单胞菌 <i>A. jandaiei</i>	1	0	0	1(1.69)
总计/% Subtotal	28(47.46)	14(23.73)	17(28.81)	59(100)



M: DNA 分子质量标准; 1~7: 菌株 150077; 菌株 150226-2; 菌株 150435-2; 菌株 150488-2; 菌株 20160425JS; 菌株 20160516JG2; 菌株 20160712JS; 8: 菌株 ATCC7966; 9: 阴性对照

M: Marker DL5000; 1-7: 150077; 150226-2; 150435-2; 150488-2; 20160425JS; 20160516JG2; 20160712JS; 8: ATCC7966; 9: negative control

图 1 不同菌株 *gyrB* 基因的 PCR 检测

Figure 1 PCR detection of *gyrB* in the different strain

比较 2015 年和 2016 年 5 种抗生素的 MIC 值, 发现恩诺沙星和强力霉素 MIC 加权平均值分别提高了 6.43 倍和 3.01 倍, 表明病原菌对这 2 种抗生素的耐药水平上升; 而硫酸新霉素和氟苯尼考的 MIC 加权平均值则分别下降了 62.28% 和 51.84%, 表明近 2 年内病原菌对这 2 种抗生素的耐药水平下降。

2.2.2 抗生素感受性测定 不同抗生素药敏试验敏感性结果判定标准有所不同, 参照 2012 年抗菌药物敏感性试验执行标准 (CLSI/NCCLS-M100-S22)^[12], 本研究将所有抗菌药物对各菌株的 MIC 值测定结果进行判定, 得出了分离菌株对各抗生素的感受性

结果, 如表 5 所示。

气单胞菌分离菌株对不同抗生素类药物表现出不同程度上的敏感性和耐药性。从敏感性角度分析, 分离菌株对恩诺沙星敏感性最高, 达 84.75%, 其次为氟苯尼考和强力霉素, 而对硫酸新霉素敏感性最低, 仅为 1.69%; 从耐药性角度分析, 结果正好相反, 对硫酸新霉素耐药性最高, 而对恩诺沙星耐药性最低。

对比表 4 和表 5, 可发现抗生素感受性检测结果和 MIC 测定结果完全一致。MIC 值上升的 3 种抗生素, 即恩诺沙星、甲砒霉素、强力霉素, 其耐药性也上升了; 相反, MIC 值下降的两种抗生素, 其耐药性也下降了, 只是二者变化幅度略有不同。

鉴于 2016 年恩诺沙星 MIC 加权平均值比 2015 年上升了 6.43 倍, 且在江苏水产养殖上大量使用, 因此本研究着重分析了该抗生素在近两年内的变化趋势 (图 2)。2 年内, 恩诺沙星 MIC 值从 2015 年 4 月份的 $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 上升到 2016 年 9 月份的 $5.49 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 总体呈上升趋势。但由于每月样本量较少, 这种趋势是否正确还有待进一步的观察。但纵观 2015 年 5 到 10 月份结果, 尽管病原菌对恩诺沙星的敏感率始终在 100%, 但其 MIC 值却上升了一倍, 表明其潜在耐药性显著提高。

2.2.3 多重耐药性分析 如表 6 所示, 至少对一类药物产生耐药性的菌株占 96.61%, 对两类及以上药物产生耐药性的菌株占 40.68%, 没有菌株对 5 种药物都有耐药性。

表 4 气单胞菌对各种抗菌药物最小抑菌浓度的测定

Table 4 Determination of the MIC of *Aeromonas* to Various Antimicrobial Agents

药物 Drug	年份 Year	药物浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和菌株数 (株) Drug concentration and the strains										MIC 加权平均值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MIC weighted average
		100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	
恩诺沙星 Enrofloxacin	2015						1		7	4	13	0.51
	2016			2	1	4	6	10	7	3	1	3.79
	总计			2	1	4	7	10	14	7	14	2.40
硫酸新霉素 Neomycin sulfate	2015	11	5	7	2							62.00
	2016	1	6	9	11	4	2	1				23.39
	总计	12	11	16	13	4	2	1				39.75
甲砒霉素 Thiamphenicol	2015	9				1	4		1	8	2	36.92
	2016	12	1		3	2	12	4				39.52
	总计	21	1		3	3	16	4	1	8	2	38.42
氟苯尼考 Florfenicol	2015	2	2	1	1	2	2	5	6	2	2	14.80
	2016	1	1	1	5	1	1	3	7	5	9	7.67
	总计	3	3	2	6	3	3	8	13	7	11	10.69
强力霉素 Doxycycline	2015			1		2	2	3	6	4	7	2.24
	2016			3	13	8	4	2	3		1	8.99
	总计			4	13	10	6	5	9	4	8	6.13

表 5 气单胞菌对抗生素感受性测定结果

Table 5 Determination of antibiotic susceptibility of *Aeromonas*

药物 Drug	年份 Year	菌株数 (百分数) Number of isolates(percentage)		
		敏感/% Sensitive	中介/% Intermediate	耐药/% Resistant
恩诺沙星 Enrofloxacin	2015	100.00	0.00	0.00
	2016	73.53	20.59	5.58
	2015—2016	84.75	11.86	3.39
硫酸新霉素 Neomycin sulfate	2015	0.00	0.00	100.00
	2016	2.94	17.65	79.41
	2015—2016	1.69	10.17	88.14
甲砒霉素 Thiamphenicol	2015	64.00	0.00	36.00
	2016	38.24	8.82	52.94
	2015—2016	49.15	5.08	45.76
氟苯尼考 Florfenicol	2015	60.00	16.00	24.00
	2016	70.59	5.88	23.53
	2015—2016	66.10	10.17	23.73
强力霉素 Doxycycline	2015	88.00	8.00	4.00
	2016	29.41	61.76	8.82
	2015—2016	54.24	38.98	6.78

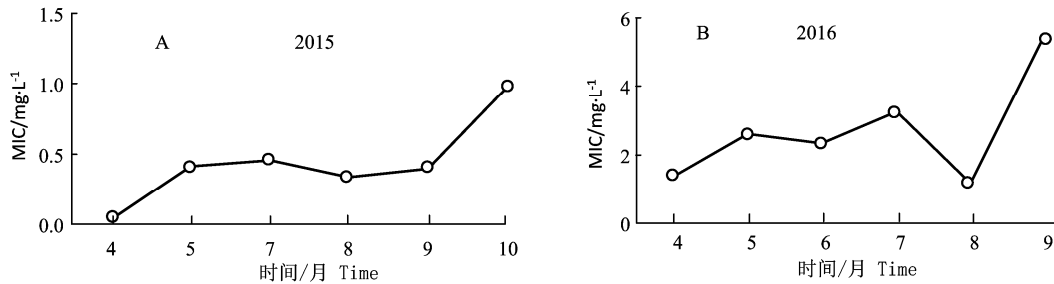


图 2 2015(A)、2016 (B) 年分离菌株对恩诺沙星 MIC 加权平均值
Figure 2 MIC weighted average of the isolates against enrofloxacin in 2015 (A) and 2016 (B)

表 6 气单胞菌耐药谱

Table 6 Resistance spectrum of *Aeromonas*

耐药标记数 Drug resistance markers	菌株数(百分数) No.of isolates(percentage)	耐药谱 Drug resistance spectrum
0	2 (3.39)	—
1	30 (50.85)	硫酸新霉素 Neomycin sulfate
1	3 (5.08)	甲砒霉素 Thiamphenicol
2	2 (3.39)	恩诺沙星, 硫酸新霉素 Enrofloxacin, Neomycin sulfate
2	5 (8.47)	硫酸新霉素, 甲砒霉素 Neomycin sulfate, Thiamphenicol
2	3 (5.08)	硫酸新霉素, 氟苯尼考 Neomycin sulfate, Florfenicol
2	1 (1.69)	硫酸新霉素, 强力霉素 Neomycin sulfate, Doxycycline
2	2 (3.39)	甲砒霉素, 氟苯尼考 Thiamphenicol, Florfenicol
3	9 (15.25)	硫酸新霉素, 甲砒霉素, 氟苯尼考 Neomycin sulfate, Thiamphenicol, Florfenicol
3	1 (1.69)	硫酸新霉素, 甲砒霉素, 强力霉素 Neomycin sulfate, Thiamphenicol, Doxycycline
4	1 (1.69)	硫酸新霉素, 甲砒霉素, 氟苯尼考, 强力霉素 Neomycin sulfate, Thiamphenicol, Florfenicol, Doxycycline

3 讨论和结论

目前, 对于水产源细菌耐药性的研究主要集中在 3 个层面: 一是分子层面, 主要是对于细菌耐药基因及其耐药机制的研究; 二是结构层面, 主要是外膜通透性、细胞内膜结构蛋白等方面研究。据报道^[13], 嗜水气单胞菌能生成生物被膜(biofilm, BF), 形成耐药屏障; 三是整体宏观层面, 主要指国内外对于不同水域环境、不同养殖品种、不同菌种耐药性的普查。本研究在整体宏观层面对于南京浦口地区某渔场气单胞菌的耐药情况和变化趋势做了调查, 通过看家基因 *gyrB* 基因测序将气单胞菌鉴定到种的水平, 共鉴定出 6 个种。其中温和气单胞菌和维氏气单胞菌在水生环境中最常分离到, 共占分离菌株总数的 84.75%, 与 Beaz-Hidalgo 等^[14]在西班牙病鱼中的分离结果相符。Ghenghesh 等^[15]也认为在水环境中气单胞菌的组成里温和气单胞菌占很大比重。而 Ottaviani^[16]和 Figueras^[17]等人的研究结果显示维氏气单胞菌和嗜水气单胞菌在水生环境中最为普遍。Li 等^[18]检测了闽江流域中气单胞菌的含量, 发现豚鼠气单胞菌和水族箱气单胞菌占很大的比重, 而维氏气单胞菌几乎没有分离到, 这些差异可能是由于地域以及样品来源的不同造成的。本研究中, 只分离到 5 株嗜水气单胞菌, 这可能是由于该水体中渔源嗜水气单胞菌比例较小。

药敏试验结果表明气单胞菌分离菌株对 5 种抗菌药物呈现出不同程度的耐药性。其中, 分离菌株对硫酸新霉素和甲砒霉素耐药率相对较高, 与王静波等^[19]和李靖等^[20]分别在北京和青岛检测嗜水气单胞菌和维氏气单胞菌的报道相一致, 这可能与现阶段水产养殖过程中频繁使用这些药物有关。分离菌株对恩诺沙星的敏感率极高, 对氟苯尼考和强力霉素敏感性相对较高。崔佳佳等^[21]和吴雅丽等^[22]在黑龙江和广东也得出相似的结论, 这表明这 3 种药物对于对一些水生动物病原菌有较好的抗菌效果。需要说明的是, 2016 年分离的气单胞菌对氟苯尼考的耐药性远远低于 2015 年, 因为在 2015 年分离菌株对氟苯尼考有较高耐药性的情况下, 该养殖场改用恩诺沙星进行病害防控, 这也导致 2016 年分离菌株对恩诺沙星耐药率的显著提高。这再次说明, 致病菌对抗菌素类药物的敏感性是可以随着接触其药物次数而变化的, 接触某种抗菌素的次数越多, 致病菌对这种抗菌素产生耐药性就越强。

本研究根据病原菌药物敏感性情况绘制了耐药谱, 结果表明江苏省水产动物大部分病原菌至少对

一类药物耐药, 交叉耐药性、多重耐药性突出。丁正峰等^[23]对采集自江苏省 2006—2009 年间的 480 株菌进行药物敏感性分析, 也得到了类似的结果。这表明江苏省水产动物病原菌耐药性问题已经十分严峻, 进行耐药性监测十分必要。MIC 值能更准确、更全面地反映抗生素感受性结果, 因此在监测耐药性时, 要将 MIC 值同时作为监测数据。

近些年, 气单胞菌作为一种条件致病菌在淡水鱼鱼病上扮演着重要角色。气单胞菌广泛分布于水环境中, 与鱼之间的相互影响是持续且不可避免的。值得注意的是, 对水产养殖动物使用抗生素, 不仅增加其体内致病菌的耐药性, 且这些耐药菌株可通过直接与人接触, 或是通过间接的方式如食物、水等将耐药基因传递到人体, 导致该类药物在人临床上的治疗效果降低, 对人类生存健康造成威胁^[24]。本研究首次在南京地区某养殖场对气单胞菌的耐药性进行持续性检测, 通过 2 年的追踪监测清晰地展示了分离自南京部分地区不同水生环境中气单胞菌种的分布, 并了解和掌握南京部分养殖品种的重要病原菌的耐药性及其变化规律, 为指导水产养殖业者规范使用渔用抗生素提供科学依据。

参考文献:

- [1] SECHI L A, DERIU A, FALCHI M P, et al. Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea[J]. J Appl Microbiol, 2002, 92(2): 221-227.
- [2] 谭爱萍, 邓玉婷, 姜兰, 等. 养殖龟鳖源气单胞菌耐药性与质粒介导喹诺酮类耐药基因分析[J]. 水产学报, 2014, 38(7):1018-1025.
- [3] JANDA J M, ABBOTT S L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(1):35-73.
- [4] PARKER J L, SHAW J G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease [J]. J Infect, 2011, 62(2): 109-118.
- [5] 曹青, 张向阳, 庞茂达, 等. 南京地区某渔场嗜水气单胞菌流行菌株的鉴定及分子分型[J]. 水产学报, 2017, 41(1):134-141.
- [6] 刘韬, 汪开毓, 陈俊杰, 等. 江苏盐城地区异育银鲫大红鳃疾病病原学研究及病理学观察[J]. 水生生物学报, 2016, 40(5):928-934.
- [7] 焦雪, 安俊花, 张翔宇, 等. 3 种气单胞菌耐药性及致病性的研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(9):69-71.
- [8] HU M, WANG N, PAN Z H, et al. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China[J]. Lett Appl Microbiol, 2012, 55(3):224-233.
- [9] 吴亚锋, 王旭远, 庞茂达, 等. 水族箱气单胞菌的鉴定及致病特性分析[J]. 水产学报, 2015, 39(4):573-579.

- [10] YANEZ M A, CATALAN V, APRAIZ D, et al. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences[J]. *Int J Syst Evol Micr*, 2003, 53(3): 875-883.
- [11] 陈昌福, 陈辉, 冯东岳, 等. 温和气单胞菌对氟苯尼考的耐药性获得和消失速率[J]. *当代水产*, 2015, 8(1): 90-91.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-second Informational Supplement: CLSI/NCCLS M100-S22. [S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [13] 崔佳佳, 王荻, 卢彤岩, 等. 嗜水气单胞菌对四环素类药物诱导耐药表型及机理研究[J]. *微生物学报*, 2016, 56(7): 1149-1158.
- [14] BEAZ-HIDALGO R, ALPERI A, BUJÁN N, et al. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2010, 33(3): 149-153.
- [15] GHENGHESH K S, EL-GHODBAN A, DKAKNI R, et al. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2001, 96(2): 169-173.
- [16] OTTAVIANI D, PARLANI C, CITTERIO B, et al. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study[J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 144(3): 538-545.
- [17] FIGUERAS M J. Clinical relevance of *Aeromonas* sM503 [J]. *Rev Med Microbiol*, 2005, 16(4): 145-153.
- [18] LI F J, WANG W Q, ZHU Z Q, et al. Distribution, virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolates from diarrheal patients and water, China[J]. *J Infection*, 2015, 70(6): 600-608.
- [19] 王静波, 徐立蒲, 王小亮, 等. 北京地区养殖鱼类来源嗜水气单胞菌耐药性研究[J]. *北京农业*, 2012, 33(30): 77-80.
- [20] 李靖, 王桂青. 病原维氏气单胞菌的分离鉴定研究[J]. *水产学杂志*, 2011, 24(4): 33-36.
- [21] 崔佳佳, 李绍戊, 王荻, 等. 三北地区鱼源气单胞菌的分离鉴定与药敏试验[J]. *江西农业大学学报*, 2016, 38(1): 152-159.
- [22] 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.
- [23] 丁正峰, 薛晖, 王晓丰, 等. 江苏主要水产病原菌耐药谱系监测[J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(2): 344-347.
- [24] 乔毅, 万夕和, 沈辉. 我国水产用抗菌药物耐药性研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2015, 40(5): 389-395.