



浙江省养鳖场中细菌耐药性及 bla_{NDM} 传播特性

张琦, 李思思, 张章晟, 孙允, 储珊珊, 沈涛, 程莫然, 韩剑众, 曲道峰*

浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018

张琦, 李思思, 张章晟, 孙允, 储珊珊, 沈涛, 程莫然, 韩剑众, 曲道峰. 浙江省养鳖场中细菌耐药性及 bla_{NDM} 传播特性[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4388-4402.

ZHANG Qi, LI Sisi, ZHANG Zhangsheng, SUN Yun, CHU Shanshan, SHEN Tao, CHENG Moran, HAN Jianzhong, QU Daofeng. Antibiotic resistance and bla_{NDM} transmission characteristics of bacteria from turtle farms in Zhejiang Province[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4388-4402.

摘要: 【目的】调查浙江省不同地区 6 家养鳖场[浙江萧山(Xiaoshan, XS)和兰溪(Lanxi, LX)两地各 3 家]的细菌耐药情况,对养殖场细菌的耐药性进行监测并分析两地养鳖场细菌耐药特征和所携带耐药基因的差异;对养鳖场内 bla_{NDM} 的传播特性进行分析。【方法】通过 16S rRNA 基因进行菌株鉴定,使用 Kirby-Bauer (K-B)药敏试验测定分离菌的药物敏感性,使用 PCR 技术检测分离菌所携带的耐药基因,通过接合转移实验获得携 bla_{NDM} 质粒接合子并根据接合转移频率评价各供体菌的接合转移能力,通过改良 Carba NP 法产酶实验、质粒复制子分型和最小抑菌浓度测定进一步验证携 bla_{NDM} 质粒在细菌间传播的能力。【结果】共分离得到 244 株细菌,其中两地养殖场的菌群分布相似,均以肠杆菌科细菌为主。此外,对整合子的 PCR 扩增结果表明存在多种耐药基因,其中包括氨基糖苷类和甲氧苄啶嘧啶类耐药基因。实验还发现大量未形成完整整合子结构的耐药菌,具有整合更多外源耐药基因的潜力。所有分离菌对至少一种抗生素耐药,而且部分耐药菌对碳青霉烯类抗生素也表现出耐药性,其对应的碳青霉烯类耐药基因已在部分养殖场内传播。本研究证明 bla_{NDM} 存在于质粒上并可在细菌间传播,LX 携带 bla_{NDM} 质粒的接合转移频率显著高于 XS。【结论】水产养殖环境中的细菌耐药性问题日益严峻,特别是碳青霉烯类耐药基因 bla_{NDM} 在养鳖场中呈现出扩散趋势。

关键词: 养鳖场; 耐药性; 耐药基因; bla_{NDM} ; 传播

资助项目: 浙江省“三农九方”科技协作计划(2023SNJF051)

This work was supported by the “Three Rural Areas and Nine Parties” Scientific and Technological Cooperation Plan of Zhejiang Province (2023SNJF051).

*Corresponding author. E-mail: daofeng@mail.zjgsu.edu.cn

Received: 2024-06-14; Accepted: 2024-08-26; Published online: 2024-09-23

Antibiotic resistance and *bla*_{NDM} transmission characteristics of bacteria from turtle farms in Zhejiang Province

ZHANG Qi, LI Sisi, ZHANG Zhangsheng, SUN Yun, CHU Shanshan, SHEN Tao, CHENG Moran, HAN Jianzhong, QU Daofeng*

School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To investigate the antibiotic resistance profiles, resistance genes, and *bla*_{NDM} transmission characteristics of bacterial isolates from six turtle farms in two regions (three in Lanxi (LX) and three in Xiaoshan (XS)) of Zhejiang Province. [Methods] Bacterial strains were identified by 16S rRNA gene sequencing. The Kirby-Bauer method was employed to examine the antibiotic susceptibility of isolated bacteria. PCR was employed to detect resistance genes carried by the isolated bacteria. Conjugation transfer experiments were conducted to obtain *bla*_{NDM}-carrying plasmids, and the conjugation frequency was analyzed to assess the transfer capabilities of bacterial donors. Additionally, the modified Carba NP test, plasmid replicon typing, and minimum inhibitory concentration determination were carried out to evaluate the transmission of *bla*_{NDM}-carrying plasmids among bacteria. [Results] A total of 244 bacterial strains were isolated, with similar distribution between the two regions and *Enterobacteriaceae* being dominant. PCR amplification of integrons revealed various resistance genes, including those conferring resistance to aminoglycosides and trimethoprim. We identified numerous resistant bacteria capable of integrating additional exogenous resistance genes. All the isolated strains exhibited resistance to at least one antibiotic, with some displaying resistance to carbapenems. PCR detection of resistance genes indicated the dissemination of carbapenem resistance genes within some farms. This study confirmed the presence of *bla*_{NDM} on plasmids capable of inter-bacterial transmission. Moreover, the farms in LX exhibited significantly higher conjugation frequency of *bla*_{NDM}-carrying plasmids than the farms in XS. [Conclusion] Antibiotic resistance of bacteria in aquaculture environments is becoming increasingly serious. The carbapenem resistance gene *bla*_{NDM} has spread within turtle farms.

Keywords: turtle farms; antibiotic resistance; antibiotic resistance genes; *bla*_{NDM}; transmission

我国主要养殖的鳖品种为中华鳖(*Trionyx sinensis*)。根据中国渔业统计年鉴 2021 数据显示, 2020 年我国养殖鳖产量达到 33.3 万 t, 仅浙江省的鳖产量就已达 10.2 万 t, 占全国产量的 30.7%, 为全国单省份产量最高^[1-2]。由于集约化养殖的实施, 鳖苗的抗病能力降低, 导致大量抗生素被用于促进生长和预防细菌病, 形成了严重的耐药性问题^[3-7]。

新德里金属-β-内酰胺酶(new delhi metallo-

beta-lactamase NDM)是一种金属-β-内酰胺酶, 能够水解包括碳青霉烯类在内的大多数 β-内酰胺类抗生素^[8-12]。首次发现编码碳青霉烯酶 NDM-1 的耐药基因 *bla*_{NDM} 可追溯至 2009 年, 当时在新德里的一名瑞典患者的肺炎克雷伯菌中分离出^[8]。携带 *bla*_{NDM} 的细菌通常对几乎所有抗生素都具有耐药性, 因为它们同时存在其他耐药机制^[13]。这些细菌通过体液或食物的交叉污染传播, 并且

可能迅速传播到社区和医院环境中^[14]。研究表明, *bla*_{NDM} 耐药基因可能传播到水体细菌中, 例如河流^[15]。碳青霉烯类抗生素在临床上的使用也加快了耐药基因的突变和进化。

然而, 碳青霉烯类抗生素只能用于医院环境中的人类临床治疗, 不用于水产养殖。近年来, 在水产养殖环境中发现 *bla*_{NDM} 的报道逐渐增多, 提示水产养殖环境中的 *bla*_{NDM} 正在快速传播扩散。目前, 对 *bla*_{NDM} 传播机制的研究仍存在许多未知, 大部分研究集中在酶的特性、相关抑制剂和基因分型方面, 对其传播途径的研究还不够深入^[16-17], 而且针对携 *bla*_{NDM} 质粒适应性代价的研究更是缺乏。

本研究选择了浙江萧山(Xiaoshan, XS)和兰溪(Lanxi, LX)两地各 3 家规模相近的中华鳖养殖场进行采样调查。通过 16S rRNA 基因测序技术鉴定分离菌株, 以了解养鳖场中细菌的种属分布; 通过 Kirby-Bauer (K-B) 法药敏试验确定分离菌株的耐药表型; 通过 PCR 技术检测常用抗生素的耐药基因和整合子整合酶及基因盒, 通过接合转移等实验了解 *bla*_{NDM} 的传播特性。研究旨在更全面地评价两地鳖养殖环境中细菌的耐药表型和携带耐药基因的情况及其差异, 为鳖养殖过程中的病害防治提供预警。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

在 LX 和 XS 两地分别选择了 3 家规模相近的中华养鳖场, 共计 6 家养殖场(每家约 6.7 hm²), 并从这些养殖场的池底污泥、养殖池水、鳖体(鳖壳、鳖腔拭子)及周围土壤中分离得到样品共 224 份。

Brain Heart Infusion Broth、Mueller-Hinton Broth、细菌琼脂粉均购自青岛海博生物技术有限公司; 琼脂糖购自 OXOID 公司; 组合式药敏试盒购自天津市金章科技发展有限公司; 天根细菌 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有

限公司; PCR 引物、DL2000 DNA Marker 与 50×TAE 缓冲液均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 2×Taq PCR Master Mix、10 mg/mL 溴化乙锭均购自 BBI 生命科学有限公司。

1.2 菌株分离鉴定

使用 16S rRNA 基因测序技术对分离的微生物进行物种鉴定^[18]。

1.3 药敏试验

将检测到的 244 株菌按照 2020 年临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute 2020, CLSI 2020)中各类不同菌种肉汤微量稀释法(minimum inhibitory concentration, MIC)标准, 实验所测的菌株类别在 CLSI 2020 中均有标准。参考不同菌株的不同解释类别和区域直径断点进行实验。其中药敏试验方法未变动。不同类型的菌株按照药敏试验(判定折点)现有标准进行调整。结合养鳖用药和研究需要, 共选择 25 种抗生素进行敏感性测试。

1.4 耐药基因检测

采用 K-B 法进行药敏试验, 仅可观察到养鳖场细菌的耐药表型。研究关注养鳖场常用的五大类抗生素(包括氨基糖苷类、磺胺类、喹诺酮类、氯霉素类、四环素类), 以及耐药表型中检出率较高的碳青霉烯类抗生素, 共计 6 类抗生素。参考文献[19-26]的报道, 选择了 29 种耐药基因, 并委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成相应引物。随后, 通过 PCR 扩增养鳖场细菌中耐药基因的存在情况。

1.5 整合子及基因盒检测

为了研究整合子在养鳖场耐药基因传播中的作用, 利用整合子保守区序列合成相关引物, 检测 I 类、II 类和 III 类整合子的整合酶 *intI1*、*intI2* 和 *intI3*, 并对检测到整合子整合酶的菌株进行了相应基因盒的检测与分析。根据说明书使用天根细菌 DNA 提取试剂盒提取分离菌株 DNA。根

据文献[27-29], 设计了整合子和基因盒的引物, 具体信息见表 1。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 5 μ L, ddH₂O 18 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、对应引物退火温度持续 40 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s (每增加 250 bp 扩增片段长度, 延伸时间增加 15 s), 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。程序结束后, 取各菌株 PCR 扩增产物和 DL2000 DNA Marker 5 μ L 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳条件为电压 120 V, 时间 30 min。将 PCR 扩增出的整合子基因盒 PCR 产物割胶回收, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测得的序列进行拼接, 并上传至 NCBI 进行 BLAST 比对, 对基因盒进行进一步地分析。

1.6 接合转移实验

为了评估目标菌株的耐药基因 *bla*_{NDM} 是否存在于具有水平传播能力的可转移质粒上, 并确定其转移频率。选择 *bla*_{NDM} 阳性菌株作为供体菌, 而大肠杆菌 EC600 则作为受体菌。具有以下特征的菌株可以被确定为可转移质粒: 对美罗培南表现出抗性; PCR 扩增可检测到耐药基因 *bla*_{NDM}; 16S rRNA 基因菌种鉴定与受体菌一致; 在含有 8 μ g/mL 美罗培南和 2.5 mg/mL 利福平的 MH 双抗平板上转移后, 能够形成单个菌落。

1.7 最小抑菌浓度测定

表 1 整合子及其基因盒引物

Table 1 Primers of integron and gene cassettes

目的基因名称 Objective gene	引物序列 Primer sequences (5'→3')	扩增长度 Amplicon size (bp)
<i>intI1</i>	F: GGCTTCGTGATGCCTGCTT R: CATTCCTGGCCGTGGTTCT	149
<i>intI2</i>	F: CACGGATATGCGACAAAAAGGT R: GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	789
<i>intI3</i>	F: GCCTCCGGCAGCGACTTTTCAG R: ACGGATCTGCCAAACCTGACT	980
I类整合子基因盒 Class I integron	hep58: TCATGGCTTGTTATGACTGT hep59: GTAGGGCTTATTATGCACGC	Variable
II类整合子基因盒 Class II integron	hep51: GATGCCATCGCAAGTACGAG hep74: CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA	Variable

为了验证接合前后的耐药质粒和耐药基因的转移情况, 按照 CLSI 2020 的药物敏感性测定标准, 采用微量肉汤稀释法测定供体菌、受体菌和接合子的药物敏感性。

1.8 改良 Carba NP 法检测碳青霉烯酶类型

用改进后的 Carba NP 法进行实验, 以检测供体菌、受体菌和接合子的碳青霉烯酶产生情况。具体操作如下^[30]: 将 20 μ L 待测菌和阳性对照菌分别接种至 3 mL MH 肉汤中, 在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 下培养 12–18 h。其中, 产生 A 酶的对照菌为 ATCC BAA-1705, 产生 B 酶的对照菌为 ATCC BAA-2146。然后, 将上述菌液按 1:100 的体积比转接至新鲜的 100 mL MH 肉汤中进行继续培养(阳性菌接种至含有 200 μ g/mL 氨苄青霉素的 MH 肉汤), 直到菌液的 *OD*₆₀₀ 约为 1.0。接下来, 吸取 1 mL 上述菌液转移到 EP 管中, 4 $^{\circ}$ C、5 000 \times g 离心 5 min, 将菌体集中后, 弃去上清液, 并加入 1 mL pH 7.8 的 2 \times 10⁻⁵ mol/L Tris-HCl 溶液悬浮菌体。随后 4 $^{\circ}$ C、5 000 \times g 离心 5 min, 将菌体集中后, 弃去上清液。再次重复一次悬浮洗涤步骤, 最后用 800 μ L Tris-HCl 溶液悬浮菌体。将菌体进行超声裂解, 4 $^{\circ}$ C 水浴, 100 W, 每超声 20 s 间隔 5 s, 直至菌液清亮。经过超声后, 将菌液在 4 $^{\circ}$ C、5 000 \times g 离心 5 min, 上清液中含有所提取的碳青霉烯酶。接着, 吸取 50 μ L 提取物加入到各工作液中, 混匀后封膜在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 观察颜色变化。

1.9 接合子的质粒复制子分型

委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成相应引物进行 PCR 扩增。本研究中所使用的质粒复制子引物的具体信息详见表 2。然后进行 PCR 扩

增,最后在蛋白印迹成像系统下观察结果。将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,将测序结果上传至 PlasmidFinder 进行 BLAST 比对分析,以确定接合子中质粒的复制子分型。

表 2 质粒复制子分型引物

Table 2 Primers of plasmids typing

复制子类型 Replicon	引物序列 Primer sequences (5'→3')	扩增长度 Amplicon size (bp)
HI1	F: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC R: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	471
HI2	F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	644
I1	F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	139
L/M	F: GGATGAAAACATATCAGCATCTGAAG R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785
N	F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG R: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559
FIA	F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462
FIB	F: GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	702
W	F: CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG R: GGTGCGCGGCATAGAACCGT	242
Y	F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG R: GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	765
P	F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534
FIC	F: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG R: TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT	262
A/C	F: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465
T	F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT R: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750
FIIs	F: CTGTCGTAAGCTGATGGC R: CTCTGCCACAACTTCAGC	270
FrepB	F: TGATCGTTTAAGGAATTTTG R: GAAGATCAGTCACACCATCC	270
K	F: GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC R: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	160
B/O	F: GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC R: TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	159
X1	F: GCTTAGACTTTGTTTTATCGTT R: TAATGATCCTCAGCATGTGAT	461
X2	F: GCGAAGAAATCAAAGAAGCTA R: TGTTGAATGCCGTTCTTGTCAG	678
X3	F: GTTTTCTCCACGCCCTTGTTCA R: CTTTGTGCTTGGCTATCATAA	351
X4	F: AGCAAACAGGGAAAGGAGAAGACT R: TACCCCAAATCGTAACCTG	569

1.10 数据统计分析

使用 Origin 9.8 对实验数据进行单因素方差分析和作图, $P<0.05$ 时表示存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 分离鉴定

整理结果得到 XS 和 LX 两地菌株组成情况。如图 1 所示, 244 株分离菌中有 72 株被鉴定为爱德华氏菌属, 34 株为肠杆菌属, 33 株为摩根菌属, 13 株为枸橼酸杆菌属, 35 株为埃希氏属, 9 株为不动杆菌属, 16 株为气单胞菌属, 11 株为嗜冷杆菌属, 6 株为假单胞菌属, 5 株为葡萄球菌属, 4 株为克雷伯菌属, 2 株为乳球菌属, 4 株为肠球菌属。其中, 有 191 株分离菌(约 78.3%)被鉴定为肠杆菌科。从分离得到的属种类来看, 两地养殖环境的菌群分布总体相似, 不同之处在于 XS 养殖场中发现了克雷伯菌属, 而 LX 养殖场中仅分离出乳球菌属。然而, 从各种属菌株数量来看, 在 XS 养殖场环境中, 爱德华氏菌属和埃希氏属占据了分离株的主导地位; 而在 LX 养殖场环境中, 则是爱德华氏菌属和肠杆菌属处于主导地位。

2.2 耐药表型检测

本研究对两地共 244 株耐药菌进行了聚类

分析, 先将菌株的耐药重数进行统计, 将评分高且表达量大的抗生素进行聚类得到多重耐药数。然后进一步比较了 XS 养殖场和 LX 养殖场耐药菌的多重耐药性。如表 3、表 4 和图 2 所示, XS 养殖环境中, 耐药菌主要集中在 2R-7R (69 株)和 8R-13R (59 株), 仅有 10.5% (15 株)的耐药菌表现出 14R-20R 的高耐药性; LX 养殖环境中, 耐药菌则以 8R-13R (42 株)和 14R-20R (35 株)为主, 仅有 23.8% (24 株)的耐药菌属于 2R-7R 范畴, 显示出更严重的耐药情况。说明菌株已经发展出对多种抗生素的抵抗能力, 这可能是由于长期接触抗生素及其残留物或者环境中其他选择压力的结果。研究表明 LX 养殖场的耐药问题较为紧迫。

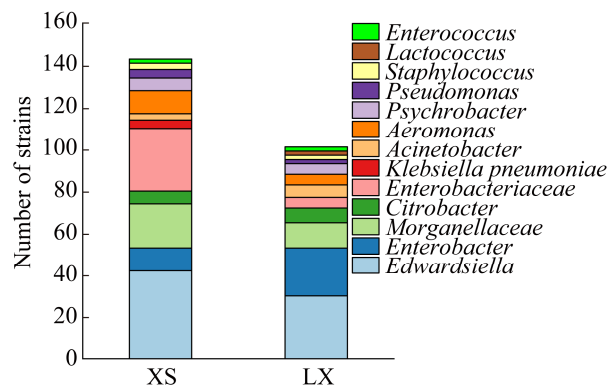


图 1 菌种鉴定结果
Figure 1 Identification result of bacteria.

表 3 XS 各样品来源耐药菌多重耐药情况

Table 3 Multidrug-resistance of antibiotic resistant bacteria from various sample sources in XS					
Drug resistance count	Bottom sludge	Pond water	Turtle body	Environmental soil	Totality
2R	/	/	3	2	5
3R	/	2	/	3	5
4R	5	2	/	6	13
5R	4	1	6	1	12
6R	3	2	5	4	14
7R	5	3	6	6	20
8R	2	4	10	11	27
9R	2	1	2	10	15
10R	/	/	1	1	2
11R	/	/	1	/	1
12R	5	2	4	1	12
13R	2	/	/	/	2
14R	5	/	1	2	8
15R	5	/	2	/	7

/: The detected value is 0.

表 4 LX 各样品来源耐药菌多重耐药情况

Table 4 Multidrug-resistance of resistant strains from various sample sources in LX

Drug resistance count	Bottom sludge	Pond water	Turtle body	Environmental soil	Totality
2R	/	1	/	1	2
3R	/	1	/	1	2
4R	/	1	2	1	4
5R	/	/	1	2	3
6R	/	3	/	3	6
7R	/	3	/	4	7
8R	/	3	/	/	3
9R	/	/	3	6	9
10R	/	2	2	4	8
11R	3	/	7	/	10
12R	/	/	2	/	2
13R	4	/	5	1	10
14R	5	1	1	3	10
15R	/	/	2	2	4
16R	/	/	2	4	6
17R	3	/	3	/	6
18R	4	/	/	/	4
19R	3	/	1	/	4
20R	1	/	/	/	1

/: The detected value is 0.

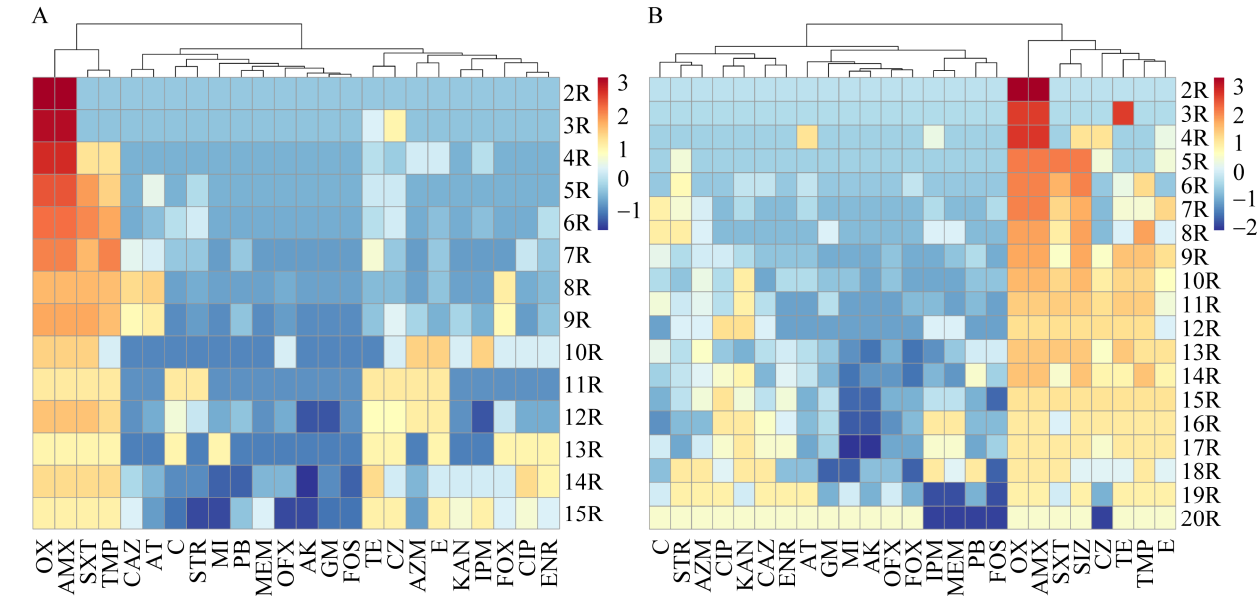


图 2 XS 与 LX 耐药菌多重耐药性热图

Figure 2 Heat map of multidrug-resistance of antibiotic resistant bacteria from XS and LX. A represents the heatmap of XS, B represents the heatmap of LX. 2R–15R represents the number of antibiotic resistances exhibited by the bacteria in question, where ‘2R’ indicates resistance to two types of antibiotics. After performing Z-value analysis, the color intensity is indicative of expression levels: with red hues denoting higher expression and blue hues denoting lower expression. AK: Amikacin; AMX: Amoxicillin; AT: Aztreonam; AZM: Azithromycin; C: Chloramphenicol; CAZ: Cefazidime; CIP: Ciprofloxacin; CZ: Cefazolin; E: Erythromycin; ENR: Enrofloxacin; FOS: Fosfomycin; FOX: Cefoxitin; GM: Gentamicin; IPM: Imipenem; KAN: Kanamycin; MEM: Meropenem; MI: Minocycline; OFX: Ofloxacin; OX: Oxacillin; PB: Polymyxin B; SIZ: Sulphafurazole; STR: Streptomycin; SXT: Sulphamethoxazole; TE: Tetracycline; TMP: Trimethoprim.

进一步比较了 XS 养殖环境和 LX 养殖环境的耐药率(图 3)。两地的耐药菌对青霉素类药物苯唑西林和阿莫西林,以及磺胺类药物磺胺异噁唑、复方新诺明和甲氧苄胺嘧啶的耐药率均超过 70%。在其他抗生素方面,两地的耐药情况存在显著差异($P<0.05$)。XS 养殖环境中,除了磷霉素外,其余 16 种抗生素的耐药率均低于 LX 养殖环境,尤其是对于亚胺培南、链霉素、环丙沙星、红霉素、阿奇霉素、四环素、氯霉素、多黏菌素等抗生素。LX 养殖环境的耐药率显著高于 XS 养殖环境,有的甚至超过了 10 倍。结果表明,与 XS 相比, LX 养蟹场的耐药问题更加严峻。

2.3 耐药菌的耐药基因检测

对两地耐药菌的总体耐药基因检出率进行比较,见图 4。在 16 种检测到的耐药基因中, XS 耐药菌检出了 13 种,而 LX 耐药菌检出了 15 种。其中, *qnrVC* 只在 XS 耐药菌中检出,而 *qnrB*、*tet(D)*和 *catA2* 这 3 种耐药基因则仅在 LX 耐药菌中发现。通过比较发现,除了各自独有的

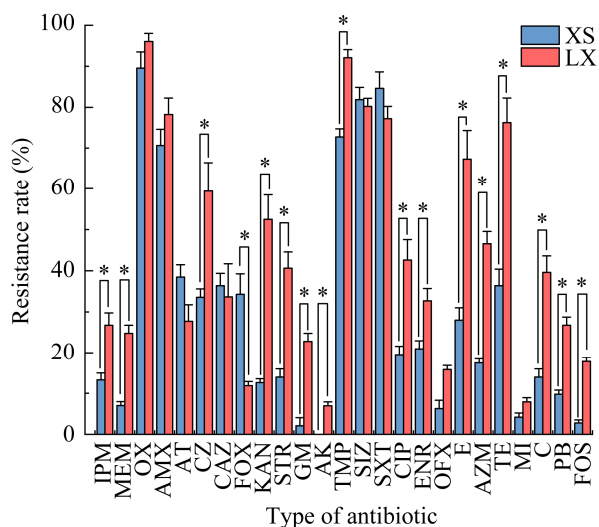


图 3 XS 和 LX 耐药菌的耐药率比较

Figure 3 Comparison of antibiotic resistance rate between antibiotic resistant bacteria from XS and LX. * indicates a significant difference ($P<0.05$).

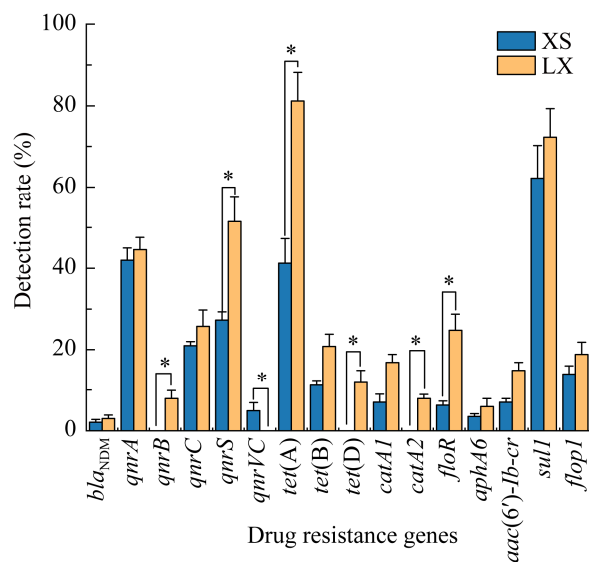


图 4 XS 和 LX 耐药菌耐药基因检出率的比较

Figure 4 Comparison of detection rate of antibiotic resistance genes between antibiotic resistant bacteria from XS and LX. * indicates a significant difference ($P<0.05$).

耐药基因外,其余 12 种耐药基因的检出率在 LX 耐药菌中均高于 XS 耐药菌。其中, *qnrS*、*tet(A)*和 *floR* 这 3 种耐药基因的检出率存在显著差异($P<0.05$),特别是 *tet(A)*的检出率在 LX 耐药菌中已经达到了 81%。

2.4 整合子及基因盒检测结果

244 株耐药菌进行了 I 型整合子整合酶 *intI1*, II 型整合子整合酶 *intI2* 和 III 型整合子整合酶 *intI3* 的 PCR 扩增检测,详细结果见图 5。在 XS 和 LX 的蟹养殖环境中, I 型整合子整合酶 *intI1* 的检出率分别为 69.2%和 79.2%; II 型整合子整合酶 *intI2* 的检出率分别为 6.3%和 12.8%; III 型整合子整合酶 *intI3* 在两地均未检出。表明蟹养殖环境中主要存在 I 型整合子。值得一提的是,两地的部分耐药菌同时携带了 I 型整合子整合酶 *intI1* 和 II 型整合子整合酶 *intI2*,表明可能存在多种整合子结构。

表 5 中共检出了 5 种 I 型整合子基因盒,其

中所含的耐药基因序列包括 *aadA1-aadA22-aadA23* 和 *dfrA17-aadA5*; LX 养殖场检出了全部 5 种 I 型整合子基因盒。在 LX 养殖场的 4 株耐药菌中, 仅检出了 1 种 II 型整合子基因盒。在检出的整合子基因盒中, 大部分包含的耐药基因针对氨基糖苷类抗生素和甲氧苄胺嘧啶类抗生素, 只有 1 种 I 型整合子中含有耐药基因 *cmlA6* (针对氯霉素类抗生素), 而仅有 1 种 II 型整合子中含有耐药基因 *sat2* (针对链霉素类抗生素)。在本研究中, 整合子整合酶阳性菌的基因盒综合检出率为 15.9% (32/201), 其中 I 型整合子整合酶阳性菌的基因盒检出率为 19.6%, II 型整合子整合酶阳性菌的基因盒检出率为 16.7%, 而其余检出整合子整合酶阳性的耐药菌未获得 PCR 扩增产物。

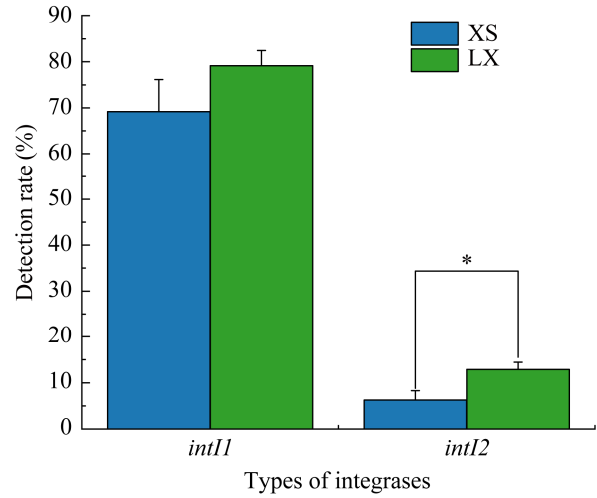


图 5 LX 和 XS 耐药菌的整合子整合酶检出率
Figure 5 Detection rate of integron integrase between antibiotic resistant bacteria from XS and LX. * indicates a significant difference ($P<0.05$).

表 5 耐药菌中整合子基因盒的检出情况

Table 5 Detection of integron gene cassette in antibiotic resistant bacteria

Genotype	Drug resistance type	Source of strain	Number of bacterial strains
Class I integron			
<i>aadA1-aadA22-aadA23</i>	Aminoglycosides	XS farm B	2
		LX farm B	3
<i>aac3-Id-aadA7</i>	Aminoglycosides	LX farm C	4
<i>aadA1-aadA2-dfrA1-dfrA12-dfrA15</i>	Aminoglycosides-trimethoprim	LX farm C	3
<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>	Aminoglycosides-chloramphenicol	LX farm C	5
<i>dfrA17-aadA5</i>	Trimethoprim-aminoglycosides	XS farm A	4
		XS farm C	4
		LX farm B	3
Class II integron			
<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	Trimethoprim-streptomycin-aminoglycosides	LX farm A	2
		LX farm C	2

2.5 接合转移实验结果

在本研究中, 6 株目标菌株均达到了预实验要求, 并成功通过接合转移和接合子验证获得了含 *bla_{NDM}* 阳性质粒的接合子。各目标菌株的接合转移情况详见表 6。XS 分离株的接合频率为 10^{-4} – 10^{-5} 之间, 而 LX 分离株的接合频率均在 10^{-3} , 接合频率结果表明 LX 分离株的接合转移能力显著强于 XS 分离株($P<0.05$)。

2.6 改良 Carba NP 法检测碳青霉烯酶类型结果

改良 Carba NP 法检测的产酶结果见图 6。结果表明, 受体菌 EC600 经接合转移成功获得了产碳青霉烯酶的能力, 6 株供体菌和 6 株接合子均产生 B 类碳青霉烯酶。

通过微量肉汤稀释法评估了供体菌和受体菌大肠杆菌 EC600 在接合前后的药物敏感性变化, 结果如表 7 所示。接合前后菌株对包括美罗

培南在内的 β -内酰胺类抗生素的药物敏感性均发生了转变, 从敏感变为耐药, 证明 bla_{NDM} 阳性质粒成功地接合转移至受体菌 EC600 中。此外, XS 分离株的接合转移也导致受体菌 EC600 对磺胺甲基噁唑、庆大霉素、阿奇霉素和卡那霉素的药物敏感性由敏感转变为耐药。这些抗生素的药物敏感性变化可能是由于接合转移的质粒携带了相关的耐药基因。此外, 供体菌通过微量肉汤稀释法得到的药物敏感性情况与 K-B 法药敏试验的结果相一致。

2.7 接合子的质粒复制子分型

对 6 株接合子进行了质粒复制子的 PCR 扩增, 随后对产物进行了测序, 并将结果上传至 PlasmidFinder 进行复制子分型。分析结果显示, XS 分离株接合子 XS210704-EC600、XS210741-EC600 和 XS210755-EC600 所携带的质粒复制子类型均为 IncC 型, 而 LX 分离株接合子 LX210744-EC600、LX210756-EC600 和 LX210781-EC600 所携带的质粒复制子类型均为 IncX3 型。研究表明同一地区的接合子可能携带相同类型的 bla_{NDM} 阳性质粒。

3 讨论

本研究通过 16S rRNA 基因鉴定共发现了 13 种菌属, 其中爱德华氏菌属在养鳖场中占据主导地位。K-B 药敏试验显示, 分离的细菌中至少对一种抗生素表现出耐药性。这一结果可能与

过去水产养殖中大量使用青霉素类和磺胺类抗生素有关^[31]。从分离来源来看, 两地池底污泥中的耐药菌情况最为严重, 其耐药率大多高于其他来源。整体来源的耐药情况主要体现在池底污泥中。这可能是由于鳖在活动中频繁接触池底污泥, 促使两者的耐药菌发生交流和交换。吴甘林^[32]研究指出, 在其他水产养殖中, 池底污泥中的耐药情况同样严重。这些结果表明池底污泥是养鳖场中最重要的耐药菌和耐药基因的储存库, 因此需要定期处理以控制耐药菌和耐药基因的传播。

对比两地各种抗生素的耐药率发现, LX 养殖场除了磷霉素外, 对其他 16 种抗生素的耐药率均显著高于 XS 养殖场($P<0.05$), 表明 LX 养殖场的耐药情况比 XS 养殖场更为严峻, 因此需要采取更严格的抗生素使用和养殖场管理来缓解其耐药问题。例如严格执行抗生素使用指南, 确保只在必要时才使用抗生素, 建立和实施养鳖场内外的抗生素耐药性监测系统, 定期监测抗生素使用与耐药性发展的关系以及与相关部门和研究机构共享数据, 加强耐药性相关信息的报告和分析等。除了碳青霉烯类外的其他抗生素的耐药率与其他水产相关研究结果一致, 但多黏菌素 B、四环素和喹诺酮类抗生素的耐药率存在差异^[31]。其中多黏菌素 B 的耐药率要比其他研究相对较低, 这可能是因为其他研究中对多黏菌素

表 6 bla_{NDM} 阳性菌株的接合转移情况

Table 6 Conjugation of bla_{NDM} positive strains

Sample number	Sample source	Strain	Conjugative transfer rate
XS210704	XS farm B bottom sludge	<i>Escherichia coli</i>	7.41×10^{-5} (0.001)
XS210741	XS farm B bottom sludge	<i>Edwardsiella</i>	3.14×10^{-4} (0.000)
XS210755	XS farm B turtle body	<i>Escherichia coli</i>	3.73×10^{-4} (0.002)
LX210744	LX farm C bottom sludge	<i>Escherichia coli</i>	6.09×10^{-3} (0.001)
LX210756	LX farm C turtle body	<i>Escherichia coli</i>	5.43×10^{-3} (0.000)
LX210781	LX farm C environmental soil	<i>Escherichia coli</i>	3.77×10^{-3} (0.001)

表 7 接合转移前后的药物敏感性

Table 7 Antimicrobial susceptibility before and after conjugation MIC (mg/mL)

Bacterial strain	美罗培南 Meropenem	头孢他啶 Ceftazidime	阿莫西林 Amoxicillin	氨苄西林 Ampicillin	磺胺甲噁唑 Sulfamethoxazole	庆大霉素 Gentamicin	环丙沙星 Ciprofloxacin	阿奇霉素 Azithromycin	卡那霉素 Kanamycin	四环素 Tetracycline
XS210704	≥16/R	≥64/R	≥256/R	≥256/R	≥320/R	≥16/R	4/R	64/R	≥128/R	≥128/R
XS210704-EC600	≥16/R	≥64/R	≥256/R	≥256/R	≥320/R	≥16/R	≤0.25/S	64/R	≥128/R	4/S
XS210741	≥16/R	≥64/R	≥256/R	≥256/R	≥320/R	≥16/R	4/R	64/R	≥128/R	≥128/R
XS210741-EC600	≥16/R	≥64/R	≥256/R	≥256/R	≥320/R	≥16/R	≤0.25/S	64/R	≥128/R	4/S
XS210755	≥16/R	≥64/R	≥256/R	≥256/R	≥320/R	≥16/R	4/R	64/R	≥128/R	≥128/R
XS210755-EC600	≥16/R	≥64/R	≥256/R	≥256/R	≥320/R	≥16/R	≤0.25/S	64/R	≥128/R	4/S
LX210744	≥16/R	≥32/R	≥256/R	≥256/R	≥320/R	≥16/R	0.5/S	8/S	16/S	≥128/R
LX210744-EC600	≥16/R	≥32/R	≥256/R	≥256/R	≤20/S	≤1/S	≤0.25/S	4/S	16/S	4/S
LX210756	≥16/R	≥32/R	≥256/R	≥256/R	≥320/R	≥16/R	4/R	4/S	16/S	≥128/R
LX210756-EC600	≥16/R	≥32/R	≥256/R	≥256/R	≤20/S	≤1/S	≤0.25/S	4/S	16/S	4/S
LX210781	≥16/R	≥32/R	≥256/R	≥256/R	≤20/S	≥16/R	4/R	8/S	16/S	≥128/R
LX210781-EC600	≥16/R	≥32/R	≥256/R	≥256/R	≤20/S	≤1/S	≤0.25/S	4/S	16/S	4/S
EC600	≤1/S	≤4/S	≤4/S	8/S	≤20/S	≤1/S	≤0.25/S	4/S	8/S	4/S

S: Susceptible; I: Intermediate; R: Resistant.

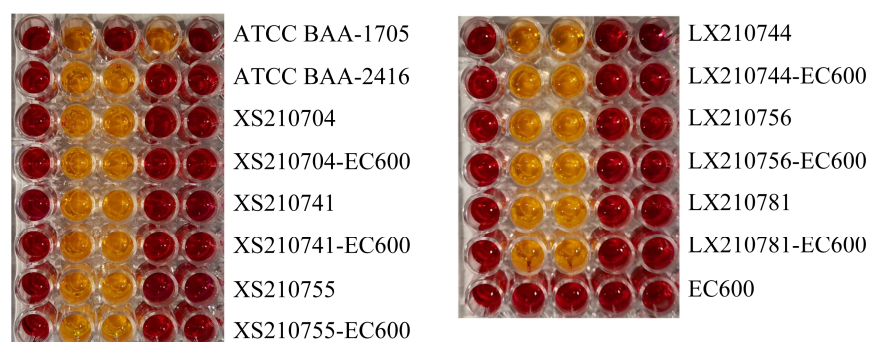


图 6 改良 Carba NP 法检测结果

Figure 6 Detection results of improved Carba NP.

天然耐药的菌属比例较高^[33]。特别需要关注的是, LX 养殖场的碳青霉烯类抗生素的耐药率较其他研究偏高^[34-35]。虽然本研究检测到了 5 种碳青霉烯类耐药基因, 但仅检出了 6 株 *bla*_{NDM} 阳性耐药菌, 这与碳青霉烯类抗生素的表型耐药率相差较大, 可能存在其他未检测的超广谱 β -内酰胺类耐药基因或碳青霉烯类耐药基因。然而, 碳青霉烯类抗生素的耐药率和 *bla*_{NDM} 的检出结果表明, 碳青霉烯类耐药基因在调查的养殖场内已经传播, 而这类抗生素禁止用于水产养殖, 因此需要引起更多关注。

目前已经发现了 6 种整合子亚型, 但仅 I 型、II 型和 III 型整合子与耐药基因的传播有关。本研究检测到的只有 I 型和 II 型整合子, 并且检出的耐药基因主要是氨基糖苷类和甲氧苄胺嘧啶类耐药基因, 与先前的研究结果相似^[27]。整合子基因盒内携带的耐药基因类型表明, 在蟹养殖中应更加严格地控制氨基糖苷类和甲氧苄胺嘧啶类抗生素的使用。比较 2 个养殖场的基因盒检出种类和菌株数量发现, LX 养殖场检出了全部 5 种 I 型整合子和 1 种 II 型整合子, 而 XS 养殖场只检出了 2 种 I 型整合子。表明 LX 养殖场的耐药情况可能更为严重。此外, 综合整合酶阳性菌的基因盒检出率为 15.9% (32/201), 说明存在大量未形成完整整合子结构的耐药菌, 它们的基

因组中可能存在整合其他耐药基因的结构, 从而使宿主获得更多耐药基因。最小抑菌浓度测定结果显示, XS 接合子中的质粒除了携带 *bla*_{NDM} 外, 还携带了部分其他抗生素类型的耐药基因, 而且接合子的药物敏感性变化与该地区其他接合子相似。

目前, *bla*_{NDM} 耐药基因已在世界各地的环境、医院和社区细菌中广泛分布, 已被证实可通过质粒在不同细菌株之间传播。临床数据显示, 从临床样品中分离和检测 *bla*_{NDM} 阳性细菌, 显示了这些耐药基因在医院和社区环境中的存在和传播^[13-14]。对于抗生素耐药性, *bla*_{NDM} 编码的 NDM 酶能够水解多种 β -内酰胺类抗生素, 包括第三代和第四代头孢菌素、青霉素类药物, 甚至部分卡那霉素。利用 PCR 技术检测和鉴定 *bla*_{NDM} 基因, 确认其在不同细菌株中的存在和分布, 进一步证实了其通过质粒的水平传播。可通过质粒测序和比较分析, 确定了质粒上 *bla*_{NDM} 的结构和种类, 揭示了不同质粒介导的耐药性传播机制。然而, 不同地区和环节中的碳青霉烯类耐药基因阳性菌株是否具有同源性, 以及这些菌株的传播历程还需进一步研究。

4 结论

分离菌的鉴定结果表明蟹养殖场细菌以肠

杆菌科为主, XS 和 LX 两地 6 家蟹养殖场的菌属分布情况相似。两地耐药菌对四环素、青霉素类抗生素和磺胺类抗生素等传统抗生素的耐药率和耐药基因检出率较高。LX 耐药菌大多数抗生素耐药率和耐药基因检出率比 XS 高。池底污泥是蟹养殖场中重要的耐药菌和耐药基因的储存库。与此同时, 整合子整合酶的高检出率和基因盒的低检出率说明许多耐药菌存在潜力整合外源耐药基因从而获得更多的抗生素抗性。耐药基因 *bla*_{NDM} 阳性的 6 株分离株的 *bla*_{NDM} 阳性质粒均可接合转移, 而且 LX 分离株的 IncX3 型质粒的接合转移频率高于 XS 分离株的 IncC 型质粒。表明同地区的接合子可能携带同一类型的 *bla*_{NDM} 阳性质粒。携带 *bla*_{NDM} 质粒通过接合转移进行的水平传播是 *bla*_{NDM} 在各种环境中广泛传播的主要原因。

参考文献

- [1] 农业部渔业渔政管理局编制. 2017 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
Ministry of Agriculture, Bureau of Fisheries and Fisheries Administration. China Fishery Statistical Yearbook, 2017[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017 (in Chinese).
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会编制. 2021 中国渔业统计年鉴-2021[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
Ministry of Agriculture, Bureau of Fisheries and Fisheries Administration. China Fishery Statistical Yearbook, 2021[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021 (in Chinese).
- [3] LE TX, MUNEKAGE Y. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam[J]. Marine Pollution Bulletin, 2004, 49(11/12): 922-929.
- [4] SCHMIDT AS, BRUUN MS, DALSGAARD I, PEDERSEN K, LARSEN J L. Occurrence of antimicrobial resistance in fish pathogenic and environmental bacteria associated with four danish rainbow trout farms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(11): 4908-4915.
- [5] 梁倩蓉, 朱凝瑜, 郑晓叶, 陈小明, 丁雪燕, 周凡, 马文君. 2019 年浙江省水生动物病原菌耐药情况分析[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(3): 95-99.
LIANG QR, ZHU NY, ZHENG XY, CHENG XM, DING XY, ZHOU F, MA WJ. Analysis on the antibiotic resistance of pathogenic bacteria separated from the diseased aquatic animals of Zhejiang Province in 2019[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2021, 49(3): 95-99 (in Chinese).
- [6] 谭爱萍. 水产动物源气单胞菌耐药性与质粒介导喹诺酮类耐药研究[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2016.
TAN AP. Study on drug resistance of *Aeromonas* from aquatic animals and plasmid-mediated quinolone resistance[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [7] 崔佳佳, 王荻, 卢彤岩, 李绍戊. 养殖鱼源嗜水气单胞菌对氟喹诺酮类药物的耐药机制[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 495-502.
CUI JJ, WANG D, LU TY, LI SW. *In vitro* study on fluoroquinolone resistance mechanism of *Aeromonas hydrophila* from cultured fish[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 495-502 (in Chinese).
- [8] YONG D, TOLEMAN MA, GISKE CG, CHO HS, SUNDMAN K, LEE K, WALSH TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2009, 53(12): 5046-5054.
- [9] MOLLENKOPF DF, STULL JW, MATHYS DA, BOWMAN AS, FEICHT SM, GROOTERS SV, DANIELS JB, WITTUN TE. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* recovered from the environment of a swine farrow-to-finish operation in the United States[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(2): e01298-16.
- [10] POTRON A, POIREL L, NORDMANN P. Plasmid-mediated transfer of the *bla*_{NDM-1} gene in Gram-negative rods[J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 324(2): 111-116.
- [11] TIBBETTS R, FRYE JG, MARSCHALL J, WARREN D, DUNNE W. Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC β -lactamase in *P. mirabilis*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(9): 3080-3083.

- [12] NORDMANN P, POIREL L, WALSH TR, LIVERMORE DM. The emerging NDM carbapenemases[J]. Trends in Microbiology, 2011, 19(12): 588-595.
- [13] KHAN AU, NORDMANN P. NDM-1-producing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* from diabetic foot ulcers in India[J]. Journal of Medical Microbiology, 2012, 61(Pt 3): 454-456.
- [14] BOGAERTS P, VERROKEN A, JANS B, DENIS O, GLUPCZYNSKI Y. Global spread of new Delhi metallo- β -lactamase 1[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2010, 10(12): 831-832.
- [15] LUO Y, YANG FX, MATHIEU J, MAO DQ, WANG Q, ALVAREZ PJJ. Proliferation of multidrug-resistant new Delhi metallo- β -lactamase genes in municipal wastewater treatment plants in Northern China[J]. Environmental Science & Technology Letters, 2014, 1(1): 26-30.
- [16] 徐丽, 吕瑞辰, 王海燕, 胡红焱, 赵向娜, 杨瑞馥, 赵建宏, 宋亚军. 携带 blaNDM-1 的质粒 pNDM-BJ01 在鲁氏不动杆菌中的适应度代价[J]. 微生物学报, 2013, 53(1): 99-104.
- XU L, LÜ RC, WANG HY, HU HY, ZHAO XN, YANG RF, ZHAO JH, SONG YJ. Fitness costs of blaNDM-1 bearing plasmid pNDM-BJ01 in *Acinetobacter lwoffii*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(1): 99-104 (in Chinese).
- [17] WU RJ, YI LX, YU LF, WANG J, LIU YY, CHEN XJ, LV LC, YANG J, LIU JH. Fitness advantage of *mcr-1*-bearing IncI2 and IncX4 plasmids *in vitro*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 331.
- [18] O'NEILL SL, GIORDANO R, COLBERT AM, KARR TL, ROBERTSON HM. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(7): 2699-2702.
- [19] HONG SS, KIM K, HUH JY, JUNG B, KANG MS, HONG SG. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class A carbapenemases[J]. Annals of Laboratory Medicine, 2012, 32(5): 359-361.
- [20] POIREL L, WALSH TR, CUVILLIER V, NORDMANN P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2011, 70(1): 119-123.
- [21] DALLEENNE C, da COSTA A, DECRÉ D, FAVIER C, ARLET G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65(3): 490-495.
- [22] CIESIELCZUK H, HORNSEY M, CHOI V, WOODFORD N, WAREHAM DW. Development and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance determinants[J]. Journal of Medical Microbiology, 2013, 62(Pt 12): 1823-1827.
- [23] SEIFI S, KHOSHBAKHT R. Prevalence of tetracycline resistance determinants in broiler isolated *Escherichia coli* in Iran[J]. British Poultry Science, 2016, 57(6): 729-733.
- [24] 陆彦, 晏志勋, 赵红玉, 侯晓林, 吴国娟. 印第安纳沙门氏菌对氯霉素类药物耐药性分析[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1225-1230.
- LU Y, YAN ZX, ZHAO HY, HOU XL, WU GJ. Resistance analysis of *Salmonella indiana* to the chlmpenicols[J]. Microbiology China, 2013, 40(7): 1225-1230 (in Chinese).
- [25] VILA J, RUIZ J, NAVIA M, BECERRIL B, GARCIA I, PEREA S, LOPEZ-HERNANDEZ I, ALAMO I, BALLESTER F, PLANES AM, MARTINEZ-BELTRAN J, de ANTA TJ. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(3): 758-761.
- [26] 羊云飞, 王红宁, 谭雪梅, 张安云, 杨鑫, 夏青青, 曾博. 二重 PCR 检测猪、鸡源致病性大肠杆菌、沙门氏菌磺胺类耐药基因(*Sul1*、*Sul2*、*Sul3*)的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(10): 1088-1092.
- YANG YF, WANG HN, TAN XM, ZHANG AY, YANG X, XIA QQ, ZENG B. Detection of sulfonamides-resistant genes of pathogenic *Salmonella* and *E. coli* by duplex PCR[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2007, 38(10): 1088-1092 (in Chinese).
- [27] LUO Y, MAO DQ, RYSZ M, ZHOU QX, ZHANG HJ, XU L, ALVAREZ PJJ. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(19): 7220-7225.
- [28] ODUMOSU BT, ADENIYI B A, CHANDRA R. Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2013, 12: 29.

- [29] WHITE PA, McIVER CJ, RAWLINSON WD. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(9): 2658-2661.
- [30] NORDMANN P, POIREL L, DORTET L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(9): 1503-1507.
- [31] 马辰婕. 水产养殖源气单胞菌耐药基因的分布特征和传播机制[D]. 厦门: 集美大学硕士学位论文, 2017.
MA CJ. Distribution characteristics and transmission mechanism of drug resistance genes of *Aeromonas* from aquaculture[D]. Xiamen: Master's Thesis of Jimei University, 2017 (in Chinese).
- [32] 吴甘林. 喹诺酮类耐药菌及耐药基因在罗非鱼和杂交鳢养殖中的分布特征[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2020.
WU GL. Distribution characteristics of quinolone-resistant bacteria and drug-resistant genes in tilapia and hybrid snakehead culture[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [33] 施礼科. 杭州市若干渔业水域中大肠杆菌耐药性调查与分析[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2016.
SHI LK. Investigation and analysis of drug resistance of *Escherichia coli* in some fishery waters in Hangzhou[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2016 (in Chinese).
- [34] 庞梦婷, 高巍, 负庆茹, 解英波, 刘欣, 彭景贤. 2018–2019 年包头市市售水产品中副溶血性弧菌监测结果及病原学特征分析[J]. *现代预防医学*, 2021, 48(22): 4201-4205.
PANG MT, GAO W, (YUAN/YUN) QR, XIE YB, LIU X, PENG JX. Surveillance and pathogenic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from aquatic products in Baotou city from 2018 to 2019[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2021, 48(22): 4201-4205 (in Chinese).
- [35] 张瑜. 医院周边水环境中美罗培南耐药菌的分布及其污染特征研究[D]. 济南: 山东建筑大学硕士学位论文, 2018.
ZHANG Y. Study on distribution and pollution characteristics of meropenem-resistant bacteria in water environment around hospitals[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Jianzhu University, 2018 (in Chinese).