

文章编号: 1674-7054(2021)01-0096-07

鳄鱼源气单胞菌的毒力基因与耐药特性分析

韩语¹, 王昕¹, 潘纪汶¹, 杨诺¹, 郭桂英²,

李迁³, 曾纪锋⁴, 郑继平¹

(1. 海南大学 生命科学与药学院, 海口 570228; 2. 海南大学 理学院, 海口 570228;
3. 海南大学 网络与技术中心, 海口 570228; 4. 海南大学 动物科技学院, 海口 570228)

摘要: 对海南地区患病暹罗鳄(*Crocodylus siamensis*)体内分离出的10株气单胞菌(5株嗜水气单胞菌、3株达卡气单胞菌、1株简达气单胞菌和1株维氏气单胞菌)进行了毒力基因、耐药基因的检测以及抗生素药物敏感性试验。结果表明:气溶素、肠毒素、蛋白酶等基因检出率较高,其中,*lip*和*ela*2种毒力基因检出率高达100%;喹诺酮类、四环素类、磺胺类、 β -内酰胺类、氨基糖苷类耐药基因检出率大于50%;气单胞菌对喹诺酮类抗生素、四环素类抗生素、氨基糖苷类抗生素、氯霉素类和碳青霉烯类抗生素的敏感率较高,而对于 β -内酰胺类抗生素、磺胺类抗生素和糖肽类抗生素耐药率较高。

关键词: 鳄鱼; 气单胞菌; 毒力基因; 耐药基因; 药物敏感性

中图分类号: S 852.61 **文献标志码:** A

引用格式: 韩语, 王昕, 潘纪汶, 等. 鳄鱼源气单胞菌的毒力基因与耐药特性分析 [J]. 热带生物学报, 2021, 12(1): 96-102. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2021.01.014

气单胞菌(*Aeromonas*)属于革兰氏阴性菌,主要存在于各种水生环境中,分为致病菌株和非致病菌株,致病菌株可感染两栖类、鱼类、鸟类、哺乳类、爬行类等动物,常引起水产养殖动物的细菌性败血症^[1],导致养殖的动物大量死亡,对水产养殖产业造成严重的危害。此外,气单胞菌还可引起人类的败血症、胃肠炎、伤口感染、腹腔感染、呼吸道感染等疾病^[2-3],引发严重的公共健康问题。因此,探讨鳄鱼源气单胞菌毒力基因携带和耐药特性的关系,对其致病机制的理解,控制气单胞菌对鳄鱼养殖的危害有着重要的意义。自2016年以来,海南陵水、文昌等地多家鳄鱼养殖场发生了多起暹罗鳄死亡事件,研究人员已从发病鳄鱼体内分离到多株气单胞菌^[4-6]。笔者对10株临床分离到的鳄鱼源气单胞菌菌株进行了相关的毒力基因和耐药基因的检测以及抗生素药物敏感性测定,旨在了解鳄鱼中气单胞菌毒力基因携带和耐药特性,为探讨鳄鱼源气单胞菌的致病机制,以及在鳄鱼养殖中该病的有效防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 酵母提取物,蛋白胨来自英国OXOID公司;抗菌药物药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒(Bacterial DNA Isolation Kit)购自北京华越洋生物科技有限公司;2×F8 Fast Long PCR Master mix为北京艾德莱生物科技有限公司产品;DNA 5000 Marker和DNA 2000 Marker来自广州东盛生物科技有限公司;琼脂糖凝胶为法国Biowest公司产品。

1.2 气单胞菌菌株 病料样品来自于2016—2018年间海南文昌、陵水地区鳄鱼养殖场的18月龄以内

收稿日期: 2020-11-20 修回日期: 2020-12-25

基金项目: 海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(2019RC084);国家自然科学基金项目(32060131)

第一作者: 韩语(1995-),女,海南大学生命科学与药学院2018级硕士研究生. E-mail: 1297108364@qq.com

通信作者: 郑继平(1973-),男,教授. 研究方向: 病原细菌. E-mail: jiping.zheng@hainu.edu.cn

的患病暹罗鳄鱼, 经过分离培养、生理生化及分子生物学鉴定, 获得了 10 株气单胞菌临床菌株, 其中, 包括 5 株嗜水气单胞菌, 3 株达卡气单胞菌, 1 株简达气单胞菌和 1 株维氏气单胞菌。

1.3 细菌基因组提取 分别挑取 10 株气单胞菌单菌落于 LB 液体培养基中在 30 °C 下培养 16 h, 然后按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明分别对 10 株气单胞菌的基因组进行提取, 通过 Nanophotometer 仪器测定其浓度和纯度, 然后保存于-20 °C 冰箱中。

1.4 毒力基因的检测 以分离得到的 10 株气单胞菌的基因组为模板, 利用毒力基因检测引物(表 1)分别进行 PCR 扩增, 反应程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 47.4 ~ 55.4 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。9 种毒力基因分别为: III 型分泌系统内膜组分基因 (Type III secretion system inner membrane component, *ascV*)、ADP-核糖基化毒素基因 (ADP-ribosylating toxin, *aexT*)、胞外毒力因子气溶毒素基因 (Aerolysin, *aer*)、细胞兴奋性肠毒素基因 (Excitatory enterotoxin, *alt*)、细胞毒性肠毒素基因 (Cytotoxic enterotoxin, *act*)、热稳定肠毒素基因 (Heat stable enterotoxin, *ast*)、磷脂酶基因 (Lipase, *lip*)、弹性蛋白酶基因 (Elastase, *ela*)、鞭毛蛋白基因 (Flagella, *fla*)。

表 1 气单胞菌毒力基因引物

Tab. 1 Primers of *Aeromonas* virulence genes

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	长度/bp Length	退火温度/°C Annealing temperature	参考文献 References
<i>ascV</i>	CTCGAACTGGAAGAGCAGAATG	577	52.2	[7]
	GAACATCTGGCTCTCCTTCTCGATG			
<i>aexT</i>	ATGCAGATTCAAGCAAACAC	226	47.4	[7]
	TTGCCGATCCACTCTTTGAT			
<i>aer</i>	CCTATGGCCTGAGCGAGAAG	430	54.7	[8]
	CCAGTTCAGTCCCACCACT			
<i>act</i>	AGAAGGTGACCACCAAGAACA	232	52.3	[9]
	AAGTGCATCGGCCTTGAATC			
<i>ast</i>	TCTCCATGCTTCCCTTCCACT	331	52.5	[9]
	GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG			
<i>alt</i>	TGACCCAGTCCTGGCACGGC	442	55.4	[9]
	GGTGATCGATCACCACCAGC			
<i>lip</i>	ATCTTCTCCGACTGGTTCGG	382	53.3	[9]
	CCGTGCCAGGACTGGGTCTT			
<i>ela</i>	ACACGGTCAAGGAGATCAAC	513	51.0	[9]
	CGCTGGTGTTGGCCAGCAGG			
<i>fla</i>	TCCAACCGTYTGACCTC	608	50.0	[9]
	GMYTGTTGCGRATGGT			

注: 其中 *fla* 基因引物中的 Y, M, R 代表简并碱基, Y=C/T, M=A/C, R=A/G。

Note: Y, M and R in the *fla* gene primer represent degenerate bases; Y=C/T, M=A/C, R=A/G.

1.5 耐药基因的检测 以分离得到的 10 株气单胞菌的基因组为模板, 利用表 2 中的耐药基因检测引物分别进行 PCR 扩增, 反应程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 40.0 ~ 59.7 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。9 种耐药基因包括: 喹诺酮类药物耐药基因 *qnrA*、*qnrS*; 四环素类药物耐药基因 *tetA*、*tetC*; 氨基糖苷类药物耐药基因 *ant3*、*strA*; 磺胺类药物耐药基因 *sul1*; β -内酰胺类药物耐药基因 *tem*、*ctxM*。

1.6 药敏试验 利用纸片扩散法 (Kirby-Bauer 法) 进行气单胞菌的抗生素药物敏感性测定, 通过产生的

表2 气单胞菌耐药基因引物

Tab. 2 Primers of antibiotic-resistant genes of *Aeromonas*

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	长度/bp Length	退火温度/°C Annealing temperature	参考文献 References
<i>qnrA</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTCAGGTCA	519	49.4	[10]
<i>qnrS</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	417	51.0	[10]
<i>tetA</i>	GTAATTCTGAGCACTGTCTGC CTGCCTGGACAACATTGCTT	956	50.2	[10]
<i>tetC</i>	TCTAACAATGCGCTCATCGT GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC	588	50.5	[10]
<i>ant3</i>	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC ATTGCCAGTCGGCAGCG	526	58.7	[10]
<i>sul1</i>	CGGCGTGGGCTACCTGAACG GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	433	59.1	[10]
<i>Tem</i>	AAAGATGCTGAAGATCA TTTGGTATGGCTTCATTC	425	45.0	[10]
<i>ctxM</i>	GTGCAGTACCAGTAAAGTTATGG CGCAATATCATTGGTGGTGCC	538	49.4	[10]
<i>strA</i>	TTGAATCGAACTAATAT CTAGTATGACGTCTGTCG	1640	40.0	[10]

抑菌圈直径大小判定病原菌对药物的敏感性,根据美国临床和实验室药敏操作标准^[11]可分为耐药(R)、中度敏感(I)和高度敏感(S)。抗菌药物药敏纸片主要包括 β -内酰胺类抗生素中青霉素类氨苄西林、阿莫西林以及头孢菌素类头孢噻吩、头孢唑啉、头孢曲松;氨基糖苷类抗生素卡那霉素、链霉素、庆大霉素;四环素类抗生素米诺环素、四环素;喹诺酮类抗生素依诺沙星、萘啶酸、恩诺沙星、环丙沙星;磺胺类抗生素磺胺异恶唑、甲氧苄啶;糖肽类抗生素万古霉素;氯霉素类抗生素氯霉素、氟苯尼考;碳青霉烯类抗生素亚胺培南。

2 结果与分析

2.1 毒力基因检测结果 以10株气单胞菌基因组为模板,利用9种毒力基因的引物分别进行PCR扩增,结果如表3所示,除*ascV*和*aexT*基因阳性检出率较低外,其余7种毒力基因检出率均大于50%,其中,*lip*和*ela*基因检出率高达100%。相比之下,嗜水气单胞菌中C1、C2、C3以及维氏气单胞菌C4这4株菌株毒力基因携带率较高,可以达到77.8%。

2.2 耐药基因检测结果 以10株气单胞菌基因组为模板,利用9种耐药基因的引物分别进行PCR扩增(表4)。从表4可知,9种耐药基因阳性检出率偏高,均大于50%。其中,嗜水气单胞菌C2和C3以及简达气单胞菌C7这3株菌里9种耐药基因携带率高达100%。

2.3 药物敏感性 从表5可知,10株气单胞菌对喹诺酮类抗生素、四环素类抗生素、氨基糖苷类抗生素、氯霉素类抗生素和碳青霉烯类抗生素的敏感率较高,均大于60%,其中对庆大霉素、四环素、卡那霉素、依诺沙星、环丙沙星和氟苯尼考的敏感率高达90%以上;而对于 β -内酰胺类抗生素、磺胺类抗生素

表 3 毒力基因鉴定结果

Tab. 3 Identification of virulence genes of *Aeromonas*

气单胞菌 <i>Aeromonas</i>	编号 Number	<i>ascV</i>	<i>aexT</i>	<i>aer</i>	<i>act</i>	<i>ast</i>	<i>alt</i>	<i>lip</i>	<i>ela</i>	<i>fla</i>
嗜水 <i>A. hydrophila</i>	C1	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	C2	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	C3	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	C6	-	-	+	-	+	+	+	+	+
	C10	-	-	+	-	+	+	+	+	+
达卡 <i>A. dhakensis</i>	C5	-	+	-	+	-	-	+	+	-
	C8	-	-	+	-	-	+	+	+	+
	C9	-	+	+	-	-	+	+	+	+
简达 <i>A. jandaei</i>	C7	-	-	-	-	+	+	+	+	+
维氏 <i>A. veronii</i>	C4	-	-	+	+	+	+	+	+	+
检出率/%		0	20	80	50	70	90	100	100	90

注：“+”表示检出，“-”表示未检出，下同。

Note: “+” represented detected, “-” represented non-detected, the same below.

表 4 耐药基因鉴定结果

Tab. 4 Identification of antibiotic resistant genes of *Aeromonas*

气单胞菌 <i>Aeromonas</i>	编号 Number	<i>qnrA</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>tetC</i>	<i>ant3</i>	<i>strA</i>	<i>sul1</i>	<i>tem</i>	<i>ctxM</i>
嗜水 <i>A. hydrophila</i>	C1	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	C2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C6	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	C10	+	-	+	-	+	+	+	+	+
达卡 <i>A. dhakensis</i>	C5	+	+	+	-	+	+	-	+	+
	C8	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	C9	+	-	+	+	+	+	+	+	+
简达 <i>A. jandaei</i>	C7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
维氏 <i>A. veronii</i>	C4	+	+	+	-	+	+	+	+	-
检出率/%		100	80	100	50	90	90	90	100	90

表 5 药物敏感性鉴定

Tab. 5 Identification of antibiotic sensitivity

抗生素种类 Class of antibiotics	药品名称 Antibiotics	嗜水 <i>A. hydrophila</i>					达卡 <i>A. dhakensis</i>			简达 <i>A. jandaei</i>	维氏 <i>A. veronii</i>
		C1	C2	C3	C6	C10	C5	C8	C9	C7	C4
β -内酰胺类	头孢噻吩(30 $\mu\text{g}\cdot\text{片}^{-1}$)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
	头孢唑啉(30 $\mu\text{g}\cdot\text{片}^{-1}$)	R	R	I	R	R	R	R	R	I	R
	阿莫西林(20 $\mu\text{g}\cdot\text{片}^{-1}$)	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R
	氨苄西林(10 $\mu\text{g}\cdot\text{片}^{-1}$)	R	R	R	R	I	I	I	R	R	I
	头孢曲松(30 $\mu\text{g}\cdot\text{片}^{-1}$)	S	I	I	S	S	S	I	S	S	S

续表5 Tab. 5 continued

抗生素种类 Class of antibiotics	药品名称 Antibiotics	嗜水 <i>A. hydrophila</i>					达卡 <i>A. dhakensis</i>			简达 <i>A. jandaei</i>	维氏 <i>A. veronii</i>
		C1	C2	C3	C6	C10	C5	C8	C9	C7	C4
氨基糖苷类	链霉素(10 μg·片 ⁻¹)	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
	庆大霉素(10 μg·片 ⁻¹)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	卡那霉素(30 μg·片 ⁻¹)	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
四环素类	米诺环素(30 μg·片 ⁻¹)	S	I	S	S	S	I	R	I	S	S
	四环素(30 μg·片 ⁻¹)	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
喹诺酮类	依诺沙星(10 μg·片 ⁻¹)	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
	萘啶酸(30 μg·片 ⁻¹)	R	I	I	I	R	S	S	S	S	S
	环丙沙星(10 μg·片 ⁻¹)	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S
	恩诺沙星(10 μg·片 ⁻¹)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
磺胺类	磺胺异恶唑(30 μg·片 ⁻¹)	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R
	甲氧苄啶(5 μg·片 ⁻¹)	I	R	R	R	R	R	R	S	I	R
糖肽类	万古霉素(30 μg·片 ⁻¹)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
氯霉素类	氯霉素(30 μg·片 ⁻¹)	S	S	S	I	I	S	S	S	S	I
	氟苯尼考(30 μg·片 ⁻¹)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
碳青霉烯类	亚胺培南(10 μg·片 ⁻¹)	S	S	S	S	I	S	S	I	R	S

注: S. 高度敏感; I. 中介; R. 耐药。

Note: S: Sensitive; I: Intermediary; R: Resistant.

和糖肽类抗生素耐药率较高,其中,对于阿莫西林、头孢噻吩、头孢唑啉和万古霉素的耐药率超过 80%,但对三代头孢中的头孢曲松敏感率较高。

3 讨论

目前,普遍认为气单胞菌致病机制主要通过伤口与黏膜系统感染,参与感染的致病因子主要是具粘附作用的鞭毛、菌毛、外膜蛋白。气单胞菌的致病性强弱与其携带的多种毒力因子有关,毒力因子主要包括胞外毒素(气溶素、溶血素、细胞兴奋性肠毒素、细胞毒性肠毒素)、胞外蛋白酶、S 层、菌毛、外膜蛋白、脂多糖等^[12]。本研究中,10 株气单胞菌中的 *ascV* 和 *aexT* 基因检出率较低,而另外 7 种毒力基因检出率均大于 50%,其中,磷脂酶基因 *lip* 和弹性蛋白酶基因 *ela* 检出率高达 100%,不同种的气单胞菌毒力基因携带率均偏高。

胡萌^[13]和吴亚锋^[14]报道了气单胞菌中经检测发现肠毒素相关基因 *alt*、*act* 阳性率在 68% 以上,携带率也较高,而气溶素基因 *aer* 检出率为 47%;范腾飞^[15]发现,58 株气单胞菌中含肠毒素相关基因的菌株占 24.1%~81%,磷脂酶基因 *lip* 检出率为 75.9%,气溶素基因 *aer* 为 41.4%;SEN 等^[9]研究发现,气单胞菌中 *lip* 基因检出率为 88%,*alt*、*act*、*ast* 基因检出率在 30%~70%。笔者在本次研究中发现,气溶素、肠毒素、蛋白酶等几种主要毒力基因检出率较高,都在 50% 以上,有些甚至达到 100%。多种毒力基因的存在会大大增强气单胞菌病原菌的致病性,很可能对鳄鱼养殖业造成严重危害,应当引起高度重视。

本研究中,耐药基因检测结果表明,气单胞菌中 9 种耐药基因阳性率都大于 50%,其中嗜水气单胞菌 C2 和 C3 以及简达气单胞菌 C7 耐药基因检出率高达 100%。对应的抗生素药物敏感性检测结果与耐药基因结果有所不同,药敏试验中 10 株气单胞菌对喹诺酮类抗生素、四环素类抗生素、氨基糖苷类抗生素、氯霉素类和碳青霉烯类抗生素的敏感率较高,但在耐药基因检测中,均有检测出 10 株气单胞菌对这

几类抗生素的耐药基因。这可能是由于细菌体内复杂的作用机制, 耐药基因并没有得到顺利表达, 这种情况在 TRUDEL 等^[16]的研究中也有相似的结果。马辰婕等^[1]通过检测气单胞菌的耐药基因, 发现检出率最高的是 β -内酰胺类耐药基因, 阳性率高达 83.7%, 其次是磺胺类、氨基糖苷类和四环素类耐药基因, 均高于 40%, 而喹诺酮类耐药基因 *qnrB* 和 *qnrS* 未检测到。在本次实验中, 5 类耐药基因检出率都偏高, 除 *tetC* 外, 其余 8 种耐药基因阳性率都高于 80%。

由于气单胞菌种类繁多, 水产养殖动物受外界环境以及所用的抗菌药物种类和频率不同, 所以即使同一种气单胞菌对药物的敏感性也有差异。何秋丽^[17]发现, 气单胞菌对阿莫西林、氨苄西林等耐药性强, 对二、三代头孢和碳青霉烯类抗生素敏感; 李皇^[18]等的研究表明, 大多数气单胞菌对青霉素耐药, 对氨基糖苷类、碳青霉烯类、四环素类、喹诺酮类和氯霉素类抗生素敏感; CARNAHAN 等^[19]报道了气单胞菌对氨苄西林、头孢唑啉以及头孢噻吩耐药, 这些研究结果与本次实验结果基本一致。暹罗鳄的养殖环境以及抗生素使用的种类和次数都会影响到气单胞菌的药物敏感性。因此, 在鳄鱼细菌性疾病的防治中, 应加强耐药情况的监测, 选择有效的抗菌药物并交替使用, 以减少病原细菌耐药率的发生。

在国内, 鳄鱼养殖还是一个新兴产业, 暹罗鳄病原菌方面的研究报道很有限, 鳄鱼养殖业要健康发展, 鳄鱼病害研究的重要性不言而喻。本研究从患病暹罗鳄体内分离出的 10 株气单胞菌进行毒力基因、耐药基因以及药物敏感性的检测和分析, 可为暹罗鳄病害防治及有效的抗菌药物筛选提供参考。

参考文献:

- [1] 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, 2017.
- [2] 杨守明, 王民生. 嗜水气单胞菌及其对人的致病性[J]. *疾病控制杂志*, 2006(5): 511 - 514.
- [3] 唐锡尔, 吴立奇, 车财妍, 等. 肝硬化并发气单胞菌属细菌性腹膜炎临床分析[J]. *肝脏*, 2001(4): 281.
- [4] PU W Y, GUO G Y, YANG N, et al. Three species of *Aeromonas* (*A. dhakensis*, *A. hydrophila* and *A. jandaei*) isolated from freshwater crocodiles (*Crocodylus siamensis*) with pneumonia and septicemia [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 68(3): 212 - 218.
- [5] 蒲文渊, 曾纪锋, 郑挺, 等. 幼年暹罗鳄致病性简达气单胞菌的分离鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2018(12): 1181 - 1184.
- [6] 曾纪锋, 蒲文渊, 郭桂英, 等. 暹罗鳄致病性嗜水气单胞菌嗜水亚种的分离鉴定[J]. *热带生物学报*, 2018, 9(2): 136 - 141.
- [7] MARTINO M E, FASOLATO L, MONTEMURRO F, et al. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype and presence of putative virulence genes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(14): 4986 - 5000.
- [8] CHACÓN M R, FIGUERAS M J, CASTRO-ESCARPULLI G, et al. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2003, 84(4): 269 - 278.
- [9] SEN K, RODGERS M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97(5): 1077 - 1086.
- [10] DENG Y T, WU Y L, TAN A P, et al. Analysis of antimicrobial resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from cultured freshwater animals in China [J]. *Microbial Drug Resistance*, 2014, 20(4): 350 - 356.
- [11] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100-S24[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
- [12] IGBINOSA I H, IGBINOSA E O, OKOH A I. Detection of antibiotic resistance, virulence gene determinants and biofilm formation in *Aeromonas* species isolated from cattle [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(22): 17596 - 17605.
- [13] 胡萌. 江苏地区气单胞菌分离鉴定及强毒株生物学特性分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [14] 吴亚锋. 南京地区气单胞菌的分离鉴定及嗜水气单胞菌菌株分型研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [15] 范腾飞. 气单胞菌的毒力基因检测及环境因子对毒力基因表达的影响[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2013.
- [16] TRUDEL M V, VINCENT A T, ATTÉRÉ S A, et al. Diversity of antibiotic-resistance genes in Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: dominance of pSN254b and discovery of pAsa8 [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 35617.
- [17] 何秋丽. 气单胞菌的耐药现状及对喹诺酮类抗生素耐药机制的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [18] 李皇. 气单胞菌及其感染研究进展[J]. *华北煤炭医学院学报*, 2008(6): 769 - 771.

- [19] CARNAHAN A M, BEHRAM S, JOSEPH S W. Aerokey II : a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, 29(12): 2843 – 2849.

Characteristics of Virulence Genes and Antibiotic Resistance of *Aeromonas* spp. Isolated from *Siamese crocodile*

HAN Yu¹, WANG Xin¹, Pan Jiwen¹, YANG Nuo¹, GUO Guiying²,
LI Qian³, ZENG Jifeng⁴, ZHENG Jiping¹

(1. Institute of Life Sciences and Pharmacy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. College of Science, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 3. Network and Technology Center, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 4. College of Animal Science and Technology, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: A total of 10 strains of *Aeromonas* spp. were isolated from sick *Siamese crocodile* in Hainan, including 5 strains of *Aeromonas hydrophila*, 3 strains of *Aeromonas dhakensis*, 1 strain of *Aeromonas veronii* and 1 strain of *Aeromonas jandaei*, and tested for virulence genes, antibiotic resistance genes, and antibiotic susceptibility. The results showed that aerosol genes, enterotoxin genes and protease genes had a higher detection rate, of which two virulence genes, *lip* and *ela*, had a detection rate of up to 100% and the genes resistant to quinolones, tetracyclines, sulfonamides, β -lactams, and aminoglycoside had a detection rate of higher than 50%. Antibiotic susceptibility testing showed that *Aeromonas* spp. were more sensitive to quinolone, tetracycline, aminoglycoside, chloramphenicol and carbapenem antibiotics, and more resistant to β -lactam, sulfonamides and glycopeptide antibiotics.

Keywords: *Siamese crocodile*; *Aeromonas* spp.; virulence gene; antibiotic resistance gene; antibiotic sensitivity

(责任编辑:潘学峰)