

## 论著

## 上海市市售水产品中耐碳青霉烯类抗生素细菌分布及耐药基因谱研究

张红芝<sup>1</sup>,常兆玉<sup>1</sup>,於颖<sup>1</sup>,方芷昕<sup>1</sup>,陈雯杰<sup>1</sup>,陈泰尧<sup>1</sup>,汪静<sup>2</sup>,张曦<sup>1</sup>

(1. 上海市疾病预防控制中心,上海 200336;2. 闵行区疾病预防控制中心,上海 201101)

**摘要:**目的 了解上海市市售水产品中耐碳青霉烯类抗生素细菌的分布及抗生素耐药基因谱。方法 采用美洛培南抗性平板筛选上海市市售水产品中耐药性细菌,利用微生物质谱鉴定仪对其进行鉴定,同时对上述分离细菌进行药敏性实验,对多重耐药菌进行全基因组测序,分析耐药基因谱。结果 上海市市售水产品中耐碳青霉烯类抗生素的耐药细菌分离率较高(75.0%~90.5%),嗜麦芽窄食单胞菌为优势细菌,其次为假单胞菌属、气单胞菌和肠球菌;多重耐药现象比较严重,表现出对头孢类、四环素类、氨基西林较高的耐药性。全基因组测序结果显示共检测出64个耐药基因,耐碳青霉烯酶基因以  $bla_{NDM-1}$ 、 $bla_{OXA55}$  和  $bla_{OXA280}$  为主。结论 上海市市售水产品中耐碳青霉烯类细菌分布较为广泛,同时存在多重耐药现象,且携带的耐药基因谱呈多样性,提示应加强水产品中耐药细菌及耐药基因谱的监测,为食品安全评估提供依据。

**关键词:**水产品;耐碳青霉烯类细菌;耐药菌;耐药基因

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2022)06-1128-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.06.001

### The distribution characteristics of carbapenem-resistant bacteria in aquatic products in Shanghai markets and antibiotic resistant genes profiles

ZHANG Hongzhi<sup>1</sup>, CHANG Zhaoyu<sup>1</sup>, YU Ying<sup>1</sup>, FANG Zhixin<sup>1</sup>, CHEN Wenjie<sup>1</sup>, CHEN Taiyao<sup>1</sup>,  
WANG Jing<sup>2</sup>, ZHANG Xi<sup>1</sup>

(1. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China;

2. The Minhang District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 201101, China)

**Abstract: Objective** To study the distribution characteristics of carbapenem-resistant bacteria in aquatic products in Shanghai markets and antibiotic resistant genes profiles. **Methods** Carbapenem-resistant bacteria in aquatic products were isolated using TCBS and TSA plate containing antibiotics (meropenem). The bacteria was identified using matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass (MALDI-TOF MS) spectrometry. The antimicrobial susceptibility was investigated using minimum inhibitory concentration (MIC). Some antibiotic resistant bacteria were analyzed using whole-genome sequencing. BioNumerics software was used to analyze and assemble whole-genome sequencing data, which was used to analyze antibiotic resistant genes profiles. **Results** The positive rate of carbapenem-resistant bacteria in aquatic products in Shanghai was high (75.0%~90.5%). The prevalent bacteria was *Stenotrophomonas maltophilia*, followed by *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.* and *enterococcus spp.* The multi-drug resistance was serious. The antibiotics with higher resistance rate were cephalosporins, tetracycline and ampicillin. A total of 64 antibiotic resistant genes were detected. The carbapenemase-encoding genes were  $bla_{NDM-1}$ ,  $bla_{OXA55}$  and  $bla_{OXA280}$  in this study. **Conclusion** The carbapenem-resistant bacteria in aquatic products in Shanghai markets was widespread. Multi-drug resistance was serious. Furthermore, the antibiotic resistant genes profiles showed diversity, which might be mechanism of occurrence of resistance. These results suggested that surveillance of resistant bacteria and antibiotic resistant genes profiles should be strengthened, which would provide scientific data for food safety risk assessment.

**Key words:** Aquatic products; carbapenem-resistant bacteria; antibiotic resistant bacteria; antibiotic resistant genes

收稿日期:2021-08-25

基金项目:上海市自然科学基金(19ZR1451100);上海市公共卫生体系建设三年行动计划(GWV-2)

作者简介:张红芝 女 主任技师 研究方向食源性病原菌检测与食品安全 E-mail: zhanghongzhi@scdc.sh.cn

抗生素的滥用不断诱导细菌产生耐药性。随着水产养殖业的发展,养殖用药量也随之增加,水环境及水生动物体内的细菌已发展出耐药性,水产养殖成为耐药菌的重要储藏库<sup>[1-2]</sup>。

耐药基因在细菌间的转移是耐药性播撒的最

主要遗传基础,耐药基因不仅能在细菌菌群间转移,还能通过直接接触或食物链污染等多种途径转移至人体,增加人体的抗生素耐药性,从而增加细菌感染性疾病治疗的难度<sup>[3]</sup>。水产品作为耐药基因进入人体的直接载体,其耐药基因特征十分重要。目前国内对于水产品中耐药菌的分析主要是围绕水产动物病原菌以及主要的食源性致病菌的耐药性和耐药机制开展研究<sup>[4-5]</sup>,但整体而言,水产品中耐药基因的污染特征数据仍显不足。

碳青霉烯类抗生素具有抗菌活性强、抗菌谱广,能有效治疗产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶的革兰氏阴性杆菌。目前,医院是产碳青霉烯酶细菌的重要来源,院内流行的产碳青霉烯酶类细菌主要为肠杆菌科。随着监测范围的扩大,在动物食品产业链、畜禽、水产品养殖环境中均有检出产碳青霉烯酶细菌。目前国内外水产品中耐碳青霉烯类抗生素细菌污染状况鲜有报道,因此开展水产品中碳青霉烯类抗生素耐药菌和耐药基因的研究,对于评估水产品质量安全具有重要意义。

本研究拟对上海市市售水产品筛选碳青霉烯类抗生素耐药细菌,进行菌种鉴定及耐药性分析,并进一步利用全基因组测序技术分析其携带耐药基因谱,旨在全面了解水产品中耐碳青霉烯类抗生素细菌种类及耐药基因谱,积累科学数据,为水产品安全评估及抗生素在养殖业中的合理使用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源

质谱鉴定用参考菌株(大肠埃希氏菌 ATCC 8793)。药敏试验用标准质控菌株为大肠埃希氏菌(ATCC25922 和 ATCC35218)。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)(生物梅里埃公司,法国);显微镜(Olympus,日本)。

VITEK MS-CHCA 基质液(法国梅里埃),胰酪大豆胨琼脂培养基(Tryptic Soytone Agar, TSA)、营养肉汤增菌液(上海申启),美洛培南(Sigma),甲酸(Formic acid, FA)、乙腈(Acetonitrile, ACN)、无水乙醇(色谱纯,美国 Sigma 公司),VITEK MS-CHCA 基质液(法国梅里埃),革兰氏阴性菌药敏试验选用含 18 种抗生素的药敏平板(珠海美华):头孢哌酮(Cefoperazone, CFP)、头孢噻肟(Cefotaxime, CTX)、

头孢他啶(Ceftazidime, CAZ)、头孢吡肟(Cefepime, FEP)、米诺环素(Minocycline, MIN)、多西环素(Cefotetan, DOX)、替加环素(Tigecycline, TGC)、四环素(Tetracycline, TET)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、复方新诺明(Trimethoprim and sulphamethoxazole, SXT)、阿米卡星(Amikacin, AMK)、庆大霉素(Gentamicin, GEN)、头孢曲松(Ceftriaxone, CRO)、亚胺培南(Imipenem, IPM)、左氧氟沙星(Levofloxacin, LEV)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、美洛培南(Meropenem, MRP)、妥布霉素(Tobramycin, TOB);革兰氏阳性菌药敏试验选用 10 种抗生素的药敏板(珠海美华):红霉素(Erythromycin, ERY)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、达托霉素(Daptomycin, DAP)、万古霉素(Vancomycin, VAN)、四环素(Tetracycline, TET)、氨苄西林(Ampicillin, AMP)、替考拉宁(Teicoplanin, TEC)、左氧氟沙星(Levofloxacin, LEV)、利福平(Rifampin, RIF)、米诺环素(Minocycline, MIN)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株分离

水产品购自上海市农贸市场、网上门店、超市,样品置于无菌自封袋中,冷藏条件下运回实验室,并在 4 h 内进行微生物检测。

取 25 g 样品加入到含有美洛培南(终浓度 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的营养肉汤增菌液中进行增菌 18 h,无菌取 1 接种环增菌液接种于含有美洛培南(终浓度 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的营养琼脂平板和含有美洛培南(终浓度 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 TCBS 平板,于(36 $\pm$ 1)  $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。挑取不同形态的单菌落,纯化并进行菌种鉴定。

#### 1.2.2 MALDI-TOF MS 鉴定

参考文献[6]的操作。挑取适量(约 5~10 mg)菌落样品于 1.5 mL 离心管中,加入 900  $\mu\text{L}$  无水乙醇,混匀;12 000 r/min 离心 2 min,弃去上清液;加入 40  $\mu\text{L}$  70% 甲酸,混匀,再加入 40  $\mu\text{L}$  乙腈,混匀,12 000 r/min 离心 2 min,吸取 1  $\mu\text{L}$  上清液点在靶板上,自然晾干后再点加 1  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)基质覆盖,晾干后进行质谱分析,观察、记录结果。

#### 1.2.3 药敏试验

采用微量肉汤稀释法进行药敏试验<sup>[7]</sup>,利用革兰氏阳性药敏板和革兰氏阴性药敏板检测,依据说明书的检测原理及操作步骤完成:每种抗生素都设有一系列倍比稀释的浓度,通过加入待检细菌肉汤培养液稀释的菌悬液,经 18~20 h 孵育后,用肉眼对药敏板条进行判读,分析其最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)值,并根据

2020版美国临床实验室标准化委员会的标准获得相应敏感(S)、中介(I)和耐药(R)结果。共检测22种抗生素,分别是四环素(0.25~32 μg/mL)、环丙沙星(0.12~32 μg/mL)、复方新诺明(0.25/4.75~32/608 μg/mL)、阿米卡星(1~128 μg/mL)、庆大霉素(0.5~64 μg/mL)、多黏菌素B(0.25~32 μg/mL)、左氧氟沙星(1~32 μg/mL)、头孢曲松(1~4 μg/mL)、头孢哌酮(1~128 μg/mL)、头孢噻肟(1~128 μg/mL)、头孢他啶(1~128 μg/mL)、头孢曲松(1~128 μg/mL)、亚胺培南(0.25~32 μg/mL)、美洛培南(0.25~32 μg/mL)、米诺环素(0.5~64 μg/mL)、多西环素(0.25~32 μg/mL)、妥布霉素(0.5~64 μg/mL)、红霉素(0.25~16 μg/mL)、达托霉素(0.12~38 μg/mL)、万古霉素(0.5~32 μg/mL)、氨苄西林(0.25~8 μg/mL)、利福平(0.12~128 μg/mL)。

1.2.4 全基因组测序

取适量新鲜菌液,用细菌全基因组提取试剂盒(Takara,日本)提取细菌全基因组DNA。全基因组测序由生工生物工程公司完成,采用Illumina HiSeq2500 PE150测序仪(美国Illumina公司)进行全基因组分析。测序策略:先将样本DNA随机打断,构建350 bp小片段文库,然后分别进行平行测序,最终获数据量clean data 100 X。数据处理:测序获得原始数据,进行质控,将合格的数据clean data导入BioNumerics 7.6软件进行序列拼接。

利用BioNumerics 7.6软件拼接后的序列,通过序列比对分析获得耐药基因谱。参考官网:CARD(<https://card.mcmaster.ca/>)。

2 结果

2.1 水产品中耐碳青霉烯类抗生素细菌分离鉴定

本研究中,共采集水产品97份,包括鱼类42份,甲壳类30份,贝类17份,螺类4份,其它4份。分离到耐碳青霉烯类抗生素细菌共111株,其中38份鱼类检出50株,检出率为90.5%;26份甲壳类检出33株,检出率为86.7%;15份贝类检出20株,检出率为88.2%;3份螺类检出3株,检出率为75.0%;2份牛蛙和2份甲鱼分别检出5株,检出率100%。111株耐药菌分属于13个属(表2)。

2.2 耐药性分析

革兰氏阴性菌对抗生素的耐药性结果如图1所示,对CTX、FEP、CRO、IPM、MRP、MIN、TET、AMK、GEN、TOB显示较高的耐药性,耐药率超过70%,对CFP、CAZ、ERY耐药率为50%~60%;对LEV和SXT的耐药率分别为10.5%和5.3%,对DOX和TGC均敏感。

表1 上海市市售水产品种类及数量

Table 1 Types and number of aquatic products sold in Shanghai in this study

| 鱼类  |    | 甲壳类 |    | 贝类  |    | 螺类 |    | 其他 |    |
|-----|----|-----|----|-----|----|----|----|----|----|
| 名称  | 数量 | 名称  | 数量 | 名称  | 数量 | 名称 | 数量 | 名称 | 数量 |
| 昂刺鱼 | 2  | 大头虾 | 2  | 扇贝  | 1  | 花螺 | 3  | 甲鱼 | 2  |
| 鲈鱼  | 2  | 皮皮虾 | 2  | 蛭子  | 1  | 海螺 | 1  | 牛蛙 | 2  |
| 鲫鱼  | 2  | 斑节虾 | 1  | 蛤蜊  | 4  |    |    |    |    |
| 鳊鱼  | 3  | 基围虾 | 5  | 蚬子  | 2  |    |    |    |    |
| 石斑鱼 | 2  | 沼虾  | 2  | 青口贝 | 2  |    |    |    |    |
| 带鱼  | 4  | 海虾  | 1  | 竹蛭  | 2  |    |    |    |    |
| 昌鱼  | 5  | 黑虾  | 1  | 白瓜子 | 1  |    |    |    |    |
| 黄鱼  | 3  | 草虾  | 3  | 花蛤  | 2  |    |    |    |    |
| 多宝鱼 | 2  | 白虾  | 3  | 白蛤  | 2  |    |    |    |    |
| 黑鱼  | 1  | 对虾  | 1  |     |    |    |    |    |    |
| 八爪鱼 | 6  | 青蟹  | 3  |     |    |    |    |    |    |
| 红鱼  | 1  | 梭子蟹 | 3  |     |    |    |    |    |    |
| 墨鱼  | 2  | 膏蟹  | 1  |     |    |    |    |    |    |
| 银鱼  | 1  | 大闸蟹 | 1  |     |    |    |    |    |    |
| 笋壳鱼 | 3  | 花蟹  | 1  |     |    |    |    |    |    |
| 笔管鱼 | 3  |     |    |     |    |    |    |    |    |
| 目鱼  | 1  |     |    |     |    |    |    |    |    |
| 童鱼  | 1  |     |    |     |    |    |    |    |    |

表2 97个市售水产品样品中分离的耐药菌鉴定结果

Table 2 Identification of resistant bacteria isolated from 97 aquatic products

| 菌属      | 菌种       | 数量     |
|---------|----------|--------|
| 窄食单胞菌属  | 嗜麦芽窄食单胞菌 | 48     |
|         | 产碱假单胞菌   | 1      |
| 假单胞菌属   | 恶臭假单胞菌   | 2      |
|         | 蒙氏假单胞菌   | 1      |
| 气单胞菌    | 温和气单胞菌   | 1      |
|         | 维氏气单胞菌   | 1      |
|         | 棉子糖肠球菌   | 13     |
| 肠球菌属    | 鸪鸡肠球菌    | 1      |
|         | 小肠肠球菌    | 2      |
|         | 鸟肠球菌     | 1      |
| 乳酸乳球菌   | 屎肠球菌     | 3      |
|         | 乳酸乳球菌    | 1      |
|         | 漫游球菌属    | 河流漫游球菌 |
| 伊丽莎白菌属  | 按蚊伊丽莎白菌  | 7      |
| 黄杆菌     | 吡啶黄杆菌    | 5      |
|         | 粘黄杆菌     | 1      |
| 非发酵黄杆菌属 | 短稳杆菌     | 4      |
|         | 皮特不动杆菌   | 1      |
| 不动杆菌    | 醋酸钙不动杆菌  | 1      |
|         | 约氏不动杆菌   | 1      |
|         | 香味菌属     | 类香味菌属  |
| 希瓦菌属    | 腐败希瓦菌    | 1      |
|         | 海藻希瓦菌    | 11     |
| 弧菌属     | 鳃弧菌      | 1      |

革兰氏阳性菌对抗生素的耐药性结果如图2所示,对AMP的耐药率为88%,对ERY、CIP、TET和LEV的耐药率为40%~60%,对DAP、VAN、RIF和MIN的耐药率为20%~40%。

2.3 耐药基因谱分析

本研究选取14株多重耐药菌进行全基因组测序,分析其携带的耐药基因种类,包括12株革兰氏

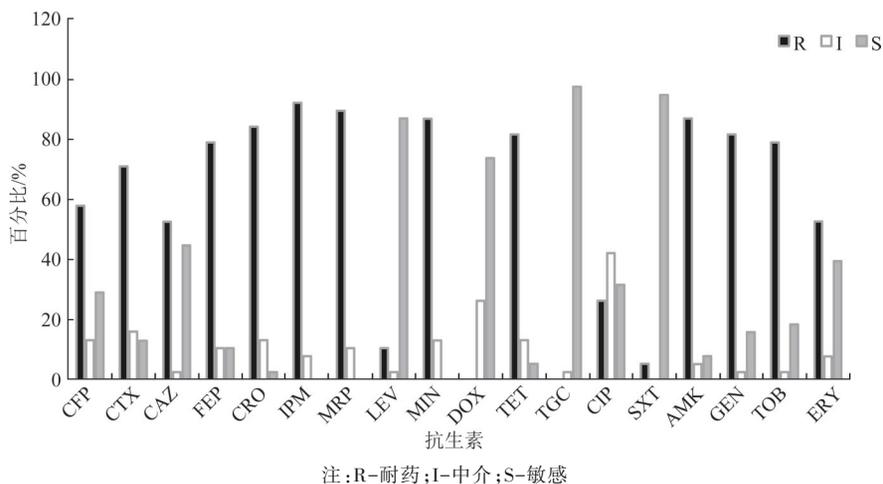


图1 革兰氏阴性菌对抗生素的耐药性

Figure 1 Antibiotic resistance of the gram negative bacteria

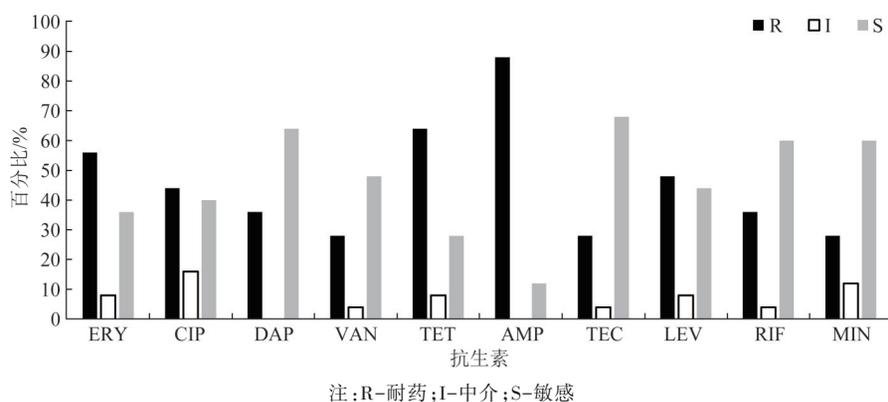


图2 革兰氏阳性菌对抗生素的耐药性

Figure 2 Antibiotic resistance of the gram positive bacteria

阴性菌和 2 株革兰氏阳性菌。全基因组测序分析结果显示 14 株菌共检测到耐药基因 30 种,共计 64 个,分别为  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类、磺胺类、四环素类和大环内酯类。 $\beta$ -内酰胺类耐药基因数量最多,占 50.0%(32/64);其次是氨基糖苷类耐药基因,占 18.8%(12/64);磺胺类耐药基因占 14.1%(9/64);大环内酯类耐药基因占 9.4%(6/64);喹诺酮类占 6.3%(4/64);四环素类耐药基因占 1.6%(1/64),见表 3。

### 3 讨论

本研究利用含美洛培南抗生素的 TCBS 和营养琼脂平板筛选耐药菌<sup>[8]</sup>,耐药菌检测率较高(75.0%~90.5%),提示上海市市售水产品中细菌的耐药现象较为普遍,这可能与养殖水体污染、养殖过程中不规范使用抗生素以及储藏、销售过程中耐药基因的传播有关。

本研究中检测到耐药菌共分为 11 个属,其中嗜麦芽窄食单胞菌分布最为广泛,此菌在 2021 年中国细菌耐药监测中排在第 10 位,是重要的医疗

机构耐药菌。假单胞菌属、黄杆菌属、不动杆菌属、希瓦菌属、气单胞菌属、类香味菌属是水产品中比较常见的耐药菌<sup>[9]</sup>。郭学中等<sup>[10]</sup>对广东省水产品中的细菌群落分析显示气单胞菌和肠杆菌科是优势菌群,这与本研究中优势菌群不同,这可能与研究方法不同有关,本研究中使用美洛培南抗性平板筛选耐药菌株,嗜麦芽窄食单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药性较强,因此在耐碳青霉烯类抗生素压力条件下比较容易分离到此菌。本研究中,水产品中分离到 7 株伊丽莎白菌属的按蚊伊丽莎白金菌,属于黄杆菌科,此菌在水产品中报道较少,临床分离报道较多,其可引起脑膜炎、肺炎、骨髓炎、心内膜炎、皮肤组织感染等多种疾病<sup>[11]</sup>。值得注意的是,利用含美洛培南的 TCBS 只筛选到一株弧菌(鳗弧菌),并没有检测到其他食源性致病性弧菌,如副溶血性弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌等,提示目前上海市市售水产品中食源性致病性弧菌对碳青霉烯类抗生素耐药性不高,这与我们长期对上海市食源性致病弧菌耐药性监测结果一致,国家食品污染物监测数据显示食源性副溶血性弧菌对碳青霉烯类抗生素,如

表3 水产品中分离耐药细菌携带耐药基因种类及其分布百分比  
Table 3 Antibiotic resistant genes and prevalence in aquatic products

| 种类     | 抗生素                                    | 耐药基因种类              | 基因                            | 数量    | 百分比          |                             |   |            |
|--------|--|---------------------|-------------------------------|-------|--------------|-----------------------------|---|------------|
| β-内酰胺类 | 头孢唑林、头孢曲松、头孢吡肟、头孢替坦、头孢噻肟、头孢哌酮、<br>头孢他啶 | 超广谱β-内酰胺酶           | <i>bla<sub>B-14</sub></i>     | 2     | 42.2%(27/64) |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>bla<sub>GOB-1</sub></i>    | 3     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>bla<sub>GOB-6</sub></i>    | 3     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>bla<sub>GOB-10</sub></i>   | 4     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>bla<sub>B-11</sub></i>     | 8     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>bla<sub>EBR-1</sub></i>    | 1     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>bla<sub>CME-1</sub></i>    | 6     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>bla<sub>NDM-1</sub></i>    | 2     |              | 3.1%(2/64)                  |   |            |
|        |  |                     | 亚胺培南、美洛培南                     | 碳青霉烯酶 |              | <i>bla<sub>OXA55</sub></i>  | 1 | 4.7%(3/64) |
|        |  |                     |                               |       |              | <i>bla<sub>OXA280</sub></i> | 2 |            |
| 氨基糖苷类  | 庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星                         | 氨基糖苷类修饰酶            | <i>aadA16</i>                 | 1     | 18.8%(12/64) |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>aph(6)-Id</i>              | 3     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>aph(3')-Ib</i>             | 3     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>aac(6')-Ib3</i>            | 2     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>aph(3')-VI</i>             | 1     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>aac(6')-Ib-cr</i>          | 2     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>qnrS2</i>                  | 1     |              |                             |   |            |
| 喹诺酮类   | 环丙沙星、左氧氟沙星                             |                     | <i>qnrA5</i>                  | 1     | 6.3%(4/64)   |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>qnrA4</i>                  | 1     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>qnrA3</i>                  | 1     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>qnrA3</i>                  | 1     |              |                             |   |            |
| 磺胺类    | 复方新诺明                                  | 二氢叶酸合成酶、二氢叶酸还<br>原酶 | <i>sul1</i>                   | 4     | 14.1%(9/64)  |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>sul2/</i><br><i>dfrA27</i> | 4     |              |                             |   |            |
| 四环素类   | 四环素、替加环素、米诺环素、多西环素                     |                     | <i>tet(A)</i>                 | 1     | 1.6%(1/64)   |                             |   |            |
| 大环内酯类  | 红霉素                                    | 2'-磷酸转移酶            | <i>mef(C)/1</i>               | 1     | 9.4%(6/64)   |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>mph(G)/1</i>               | 1     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>msr(E)/2</i>               | 2     |              |                             |   |            |
|        |  |                     | <i>mph(E)/2</i>               | 2     |              |                             |   |            |

亚胺培南均显示敏感<sup>[12]</sup>。

食源性细菌耐药性对食品安全及人类健康的影响已经引起了人们的重视<sup>[13]</sup>。本研究分离的耐药性细菌表现出多重耐药性,革兰氏阴性菌对头孢噻肟、头孢吡肟、头孢曲松、亚胺培南、美洛培南、米诺环素、四环素、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素显示较高的耐药性;革兰氏阳性菌对氨基糖苷类、红霉素、环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率较高。不同地区使用的抗生素种类不同会导致分离菌株的耐药性不同,叶蕾<sup>[14]</sup>监测广州市水产养殖品时发现耐四环素菌株占优势;张梦寒等<sup>[15]</sup>研究发现甲鱼中的大肠埃希氏菌对环丙沙星的耐药率高达81.2%;郭学中等<sup>[10]</sup>报道广东省市售罗非鱼中分离大肠埃希氏菌对环丙沙星的耐药率仅为18.13%。

很多研究证实耐药基因与抗生素使用之间呈现较好的相关性<sup>[16]</sup>。本研究中检测到6种不同的耐药机制相关的耐药基因,其中β-内酰胺类耐药基因占比最高(50.0%),这与本研究的检测方法有关,耐药菌是在含有美洛培南的抗性平板上筛选的。此结果与水产养殖环境监测结果一致,ZHANG等<sup>[17]</sup>对我国南部淡水养殖环境中耐药基因监测发现β-内酰胺类耐药基因检出率较高。本研究中耐碳青霉烯类抗生素基因主要是编码B类金属酶的

*bla<sub>NDM-1</sub>*和D类丝氨酸酶的*bla<sub>OXA-55</sub>*和*bla<sub>OXA-280</sub>*,*bla<sub>NDM-1</sub>*分离自海藻西瓦菌,*bla<sub>OXA-55</sub>*和*bla<sub>OXA-280</sub>*分离自海藻西瓦菌、约氏不动杆菌、按蚊伊丽莎白金菌。*NDM-1*是临床上重要的金属碳青霉烯酶,2010年英国科学家在肺炎克雷伯菌和大肠杆菌中检测到<sup>[18]</sup>,随后在不动杆菌、屎肠球菌发现了此耐药基因,引起了广泛关注。本研究首次在水产品中分离的海藻西瓦菌中检测到*NDM-1*,*bla<sub>NDM-1</sub>*基因易与其他耐药基因接合<sup>[19]</sup>,大幅度增加其耐药能力。*bla<sub>OXA</sub>*基因在水产品中很少检出<sup>[20]</sup>,此类基因多数位于可移动元件——转座子内,后者与接合型质粒IncL/M型相关,利于耐药基因的转移<sup>[21]</sup>。这些结果提示水产品中可能存在耐碳青霉烯酶耐药基因的传播途径,应加强监测,掌握耐碳青霉烯酶基因的污染状况,为预防控制耐碳青霉烯类抗生素细菌的产生和传播提供科学依据。

磺胺类耐药基因检出率较高,由于磺胺类抗生素的使用使得磺胺类耐药基因在水产环境和水产品中的检出频率也较高,*sul1*和*sul2*在水产养殖环境中常被同时检出<sup>[22]</sup>。CHEN等<sup>[23]</sup>研究证实*sul1*的扩散传播与整合子密切相关,这些研究结果提示这两个耐药基因对环境的耐受性强,更易引起广泛的传播,需要引起足够的重视。本研究中检测到四环素

耐药基因 *tetA*, 其编码外排泵是 *tet* 类抗性基因的主要抗药机制<sup>[24]</sup>, *tetA* 基因在水产环境中检测频率均高于其他四环素耐药基因<sup>[24-25]</sup>。但是 HONG 等<sup>[26]</sup> 的研究显示 *tetS* 和 *tetK* 在我国东南沿海地区的市售水产品中分布更广。本研究中检测到氯霉素耐药基因 *floR*, 与巴永兵<sup>[22]</sup> 的研究结果一致, 但是 DANG 等<sup>[27]</sup> 在水产品养殖环境中检测到氯霉素耐药基因 *cat*。喹诺酮类耐药基因 *qnrA*、*qnrS* 与国内外文献报道一致<sup>[28]</sup>。耐药性细菌携带的耐药基因类型不同可能是因为不同地区使用的抗生素不同, 耐药基因从水产养殖环境到水产批发市场的耐药基因的传播机制不同, 需要进一步研究。

耐药基因是细菌耐药性产生和传播的主要遗传基础。RHODES 等<sup>[29]</sup> 研究证实编码四环素的耐药基因的相关质粒能在气单胞菌和大肠杆菌以及处在不同环境的人和水产养殖环境之间进行传播。进一步深入分析耐药基因在水产品中的传播机制, 为食品安全评估提供科学依据是今后研究的方向。

## 参考文献

- [ 1 ] GAO P P, MAO D Q, LUO Y, et al. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment [J]. *Water Research*, 2012, 46(7): 2355-2364.
- [ 2 ] XIONG W G, SUN Y X, ZHANG T, et al. Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China [J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70(2): 425-432.
- [ 3 ] 崔泽林, 郭晓奎. 食物链中抗生素耐药性基因的转移 [J]. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(1): 89-92, 97.  
CUI Z L, GUO X K. The transfer of antibiotic resistance genes in food chain [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(1): 89-92, 97.
- [ 4 ] 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.
- [ 5 ] 崔佳佳, 王获, 卢彬岩, 等. 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 J J, WANG D, LU T Y, et al. In vitro study on fluoroquinolone resistance mechanism of *Aeromonas hydrophila* from cultured fish [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(3): 495-502.
- [ 6 ] 张红芝, 陈雯杰, 刘雪薇, 等. 基于全基因组测序的阪崎克罗诺杆菌婴幼儿食品分离株分子特征研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2021, 33(2): 138-143.  
ZHANG H Z, CHEN W J, LIU X W, et al. Molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* from infant foods using whole genome sequencing [J]. *Chinese Journal of Food and Hygiene*, 2021, 33(2): 138-143.
- [ 7 ] ZHANG H Z, YE Y L, YANG B W, et al. Characterization of an unusual foodborne illness including an outbreak and sporadic illness caused by three bacterial pathogens via a takeaway service [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2019, 16(9): 616-621.
- [ 8 ] 夏蕊蕊. 山东省济南市废水环境中整合子细菌筛选及耐药性机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2010.  
XIA R R. Study on the integron bacteria and the related resistance mechanisms in aquatic environment in Ji'nan, Shandong province [D]. Ji'nan: Shandong University, 2010.
- [ 9 ] 吴小梅. 美洲鳗鲡与其养殖水体细菌的耐药性、抗性基因及整合子的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2016.  
WU X M. Occurrence of antibiotic resistance and incidence of antimicrobial-resistance genes and integrons in bacteria isolated from *Anguilla rostrata* and farming water [D]. Xiamen: Jimei University, 2016.
- [ 10 ] 郭学中, 张瑞泉, 姜兰, 等. 罗非鱼水产品中的喹诺酮类药物耐药菌和耐药基因检测分析 [J]. *中国水产科学*, 2018, 25(5): 1032-1039.  
GUO X Z, ZHANG R Q, JIANG L, et al. Detection and analysis of quinolone resistance and resistance-associated genes in bacteria isolated from tilapias sold in the supermarkets [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(5): 1032-1039.
- [ 11 ] 王蕾蕾, 郭庆兰, 杨帆. 伊丽莎白白菌属细菌生物学特征及耐药性研究进展 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(6): 711-715.  
WANG L L, GUO Q L, YANG F. Research advances on biological characteristics and drug resistance pattern of *Elizabethkingia* [J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2020, 20(6): 711-715.
- [ 12 ] 白瑶, 叶淑瑶, 闫韶飞, 等. 2015 年我国食源性副溶血性弧菌毒力基因及耐药特征研究 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(6): 2318-2324.  
BAI Y, YE S Y, YAN S F, et al. Virulence and antimicrobial characteristics of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* strains in China in 2015 [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(6): 2318-2324.
- [ 13 ] ZHAO J J, CHEN Z L, CHEN S, et al. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(10): 4219-4224.
- [ 14 ] 叶蕾. 广州市水产养殖品中耐药共生菌分布及耐药基因传播机制的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2012.  
YE L. Prevalence of antibiotic resistant commensal bacteria associated with aquaculture products and the dissemination of antibiotic resistant gene from Guangzhou, China [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [ 15 ] 张梦寒, 沈强, 朱莉勤, 等. 水产品中大肠埃希菌耐药性研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(10): 2543-2545, 2548.  
ZHANG M H, SHEN Q, ZHU L Q, et al. Study on antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from fishery products [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2011, 21

- (10): 2543-2545, 2548.
- [16] PRUDEN A, PEI R T, STORTEBOOM H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450.
- [17] ZHANG R Q, YING G G, SU H C, et al. Antibiotic resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from traditional and integrated aquaculture in South China [J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2013, 48(11): 999-1013.
- [18] KUMARASAMY K K, TOLEMAN M A, WALSH T R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2010, 10(9): 597-602.
- [19] ZHENG R, ZHANG Q, GUO Y D, et al. Outbreak of plasmid-mediated NDM-1-producing klebsiella pneumoniae ST105 among neonatal patients in Yunnan, China [J]. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2016, 15: 10.
- [20] 丁秀琼, 黄武, 刘建芳, 等. 湛江水产品中大肠埃希氏菌耐药性检测与分析[J]. *水产科学*, 2021, 40(4): 561-570.  
DING X Q, HUANG W, LIU J F, et al. Antimicrobial Susceptibility in *Escherichia coli* Isolated from Fishery Products in Zhanjiang [J]. *Fisheries Science*, 2021, 40(4): 561-570.
- [21] POIREL L, POTRON A, NORDMANN P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(7): 1597-1606.
- [22] 巴永兵. 水产品中抗生素抗性基因的污染特征研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.  
BA Y B. Pollution characteristics of antibiotic resistance genes in aquatic products [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.
- [23] CHEN B W, LIANG X M, NIE X P, et al. The role of class I integrons in the dissemination of sulfonamide resistance genes in the Pearl River and Pearl River Estuary, South China [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 282: 61-67.
- [24] AKINBOWALE O L, PENG H, BARTON M D. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(5): 2016-2025.
- [25] LYU J J, BUM JEONG J, HUH M D, et al. Detection of tetracycline-resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea [J]. *Aquaculture*, 2004, 240(1-4): 89-100.
- [26] HONG B, BA Y B, NIU L, et al. A comprehensive research on antibiotic resistance genes in microbiota of aquatic animals [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9.
- [27] DANG H Y, SONG L S, CHEN M N, et al. Concurrence of cat and *Tet* genes in multiple antibiotic-resistant bacteria isolated from a sea cucumber and sea urchin mariculture farm in China [J]. *Microbial Ecology*, 2006, 52(4): 634-643.
- [28] JIANG H X, TANG D, LIU Y H, et al. Prevalence and characteristics of  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(10): 2350-2353.
- [29] RHODES G, HUYS G, SWINGS J, et al. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant *Tet A* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(9): 3883-3890.