

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.18075

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

郭学中^{1,2}, 张瑞泉¹, 姜兰¹, 谭爱萍¹, 邓玉婷¹, 李金祥³, 赵飞¹,
刘付翠^{1,2}, 何山^{1,2}

1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村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;
3. 仲恺农业工程学院 广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东 广州 510225

摘要: 本研究旨在了解水产品中携带的细菌对喹诺酮类药物的耐药状况及耐药基因类型, 评估水产品中细菌耐药性风险。从广州市 14 家超市随机购买 100 条鲜活的罗非鱼, 高通量测序分析结果显示, 罗非鱼携带的优势菌群为大肠埃希菌(*Escherichia hydrophila*)和气单胞菌(*Aeromonas*)。采用大肠埃希菌和气单胞菌筛选培养方法, 分别从鳃、肌肉和肠内容物筛选分离出 182 株大肠埃希菌和 280 株气单胞菌; 运用琼脂二倍稀释法测定了恩诺沙星和环丙沙星对分离菌株的最小抑菌浓度; 通过 PCR 法扩增质粒介导的喹诺酮类耐药(PMQR)基因(*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrS*、*aac(6')-Ib-cr*、*qepA*、*oqxAB*)并进行测序和比对分析。结果显示, 分离的气单胞菌对恩诺沙星和环丙沙星的耐药率分别为 2.50% 和 2.14%; 分离的大肠埃希菌对恩诺沙星和环丙沙星的耐药率分别为 25.82% 和 18.13%。肌肉中分离的气单胞菌和大肠埃希菌对恩诺沙星和/或环丙沙星的耐药率均低于鳃和肠道的; 各组织分离的大肠埃希菌对氟喹诺酮类药物的耐药率均远高于气单胞菌。分离菌株中, 携带 PMQR 基因的大肠埃希菌占 59.89%, 且检出的耐药基因种类较多, 包括 *qnrB*、*qnrD*、*qnrS*、*aac(6')-Ib-cr* 和 *oqxAB*; 而携带 PMQR 基因的气单胞菌仅占 6.79%, 只检出耐药基因 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qnrS*。结论认为, 罗非鱼食用部分肌肉携带的耐药菌较少, 食品相对安全; 肠道和鳃组织携带的耐药菌以大肠埃希菌为主, 而且大部分菌株携带有不同类型的 PMQR 基因, 存在一定的耐药传播隐患。

关键词: 水产品; 气单胞菌; 大肠埃希菌; 喹诺酮类耐药; PMQR

中图分类号: S948

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)05-1032-08

近年来, 我国水产养殖业发展迅速, 养殖产量已稳居世界首位, 罗非鱼因其味道鲜美、营养丰富、生长快、产量高等优势已成为世界性养殖鱼类之一^[1]。由于食品动物养殖过程中会长期、大量使用抗菌药物, 不可避免地导致细菌产生耐药性, 细菌耐药(包括其耐药基因)引发的食品安全问题已成为全球关注的热点^[2]。动物性食品携带的耐药菌, 可以通过食物链的方式传播给人类, 细菌携带的耐药基因亦能以水平传播的方式到达人体肠道细菌^[3], 特别是人畜禽共患致病菌的耐

药给人类健康带来潜在的威胁^[4]。

喹诺酮类药物因具有良好的杀菌效果被广泛应用于人类临床治疗、畜禽及水产养殖业中, 目前水产养殖中已出现对喹诺酮类药物耐药的临床菌株^[5-7]。质粒介导的喹诺酮类耐药(plasmid mediated quinolone resistance, PMQR)是喹诺酮类药物耐药的重要机制之一, 其相关基因主要包括 *qnr*(*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrS*)、*aac(6')-Ib-cr*、*qepA* 和 *oqxAB*^[8]; PMQR 基因的存在能促进喹诺酮类耐药决定区的靶基因突变, 导致高水平耐

收稿日期: 2018-03-02; 修订日期: 2018-04-20.

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2015A030313701); 现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-46).

作者简介: 郭学中(1991-), 男, 硕士研究生. E-mail: xuezhong_guo@126.com

通信作者: 姜兰, 研究员. E-mail: jianglan@prfri.ac.cn

药^[9]。目前国内对水产动物源细菌氟喹诺酮类药物的耐药性研究主要是围绕水产动物病原菌耐药情况和耐药机制^[10-11],而市售水产品中携带的细菌对氟喹诺酮类药物的耐药性及耐药基因研究报告很少,所以开展水产品喹诺酮类耐药细菌和耐药基因检测对评估水产品质量安全具有重要意义。

本研究对水产品(罗非鱼)中携带的主要细菌种类,进行了喹诺酮类药物耐药率和 PMQR 基因携带率分析比较,旨在为水产品中携带的耐药细菌和耐药基因风险评估积累科学数据,为食品安全监测提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 样品及菌株来源

实验材料鱼为 2017 年从广州市 14 家超市随机购买的 100 条鲜活市售罗非鱼商品鱼,采样点信息见表 1。PMQR 阳性菌株由本实验室分离保存。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)模式菌株 ATCC 7966 由浙江省淡水水产研究所馈赠,质控菌大肠埃希菌(*Escherichia coli*)ATCC 25922 由华南农业大学兽医学院药理教研室赠送。

表 1 实验鱼采样地点信息
Tab. 1 Sampling location of fish used in this study

序号 no.	采样点 sampling position	采样区域 sampling district
1	超市 1(S1)	荔湾区 Liwan District
2	超市 2(S2)	荔湾区 Liwan District
3	超市 3(S3)	荔湾区 Liwan District
4	超市 4(S4)	海珠区 Liwan District
5	超市 5(S5)	海珠区 Haizhu District
6	超市 6(S6)	海珠区 Haizhu District
7	超市 7(S7)	天河区 Tianhe District
8	超市 8(S8)	海珠区 Haizhu District
9	超市 9(S9)	白云区 Baiyun District
10	超市 10(S10)	荔湾区 Liwan District
11	超市 11(S11)	越秀区 Yuexiu District
12	超市 12(S12)	海珠区 Haizhu District
13	超市 13(S13)	海珠区 Haizhu District
14	超市 14(S14)	白云区 Baiyun District

1.2 实验试剂

大豆酪蛋白琼脂培养基(tryptone soya agar, TSA)、麦康凯琼脂培养基、伊红美蓝琼脂培养基

(eosin-methylene blue medium, EMB)、MH 琼脂培养基(muller-hinton agar, MHA)购自广东环凯微生物科技有限公司;脑心浸液培养基(brain heart Infusion medium, BHI)、RS 琼脂培养基(rimler-shotts agar)购自英国 OXOID 公司;mTEC 琼脂购自美国 BD 公司。恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)购自德国 CNW Technologies GmbH 公司,乳酸环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,细菌基因组提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。PCR 反应试剂购自康为世纪公司。特异性引物合成由上海生工生物技术有限公司完成,DNA 测序由广州艾基生物技术有限公司完成。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备 分别取罗非鱼的鳃、背肌和肠组织(5~20 g),用无菌剪刀初步剪碎后置于拍打袋中,加入 150 mL 0.65%的无菌生理盐水,然后在拍打机上拍打 1~2 min,取过滤后的拍打液,制备 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³(1 mL 样品+9 mL 生理盐水)梯度稀释样品匀液,用于细菌分离。

1.3.2 优势菌群检测分析 分别取 100 μL 10⁻¹ 梯度稀释的鳃和肠道组织样品液,在不含药的 BHI 培养基和含 ENR(4 μg/mL)的 BHI 药板上涂布,30℃培养 18~20 h;用生理盐水洗脱平板上生长的细菌菌苔,用细菌基因组提取试剂盒分别提取细菌基因组总 DNA,参考邓冠华等^[12]和 Zhao 等^[13]的方法,以细菌 16S rDNA 的 V3~V4 区为目标片段,送样到广州基迪奥生物技术有限公司,在 Illumina MiSeq 系统测序平台上测序,并根据序列信息分析细菌菌落结构(细菌种类和优势菌群)。

1.3.3 菌株分离鉴定 分别取 100 μL 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 梯度稀释的样品液,采用细菌涂布法分别接种于 RS 琼脂平板和麦康凯琼脂平板上,分别置于 28℃和 37℃恒温培养过夜,每个组织样品分别挑选 1~3 个典型菌落,疑似气单胞菌接种于 TSA 培养基(结合氧化酶试验)进行分离纯化和鉴定,疑似大肠埃希菌接种于 EMB 培养基进一步分离纯化。分离纯化后的菌株,采用水煮法提取 DNA。根据 Borell 等^[14]和 Yafiez 等^[15]的方法分别合成气单胞菌 16S rRNA 基因序列和 *gyrB* 基因序

列扩增引物,采用 Weisburg 等^[16]的方法合成大肠埃希菌 16S rRNA 基因序列扩增引物。分别对分离细菌 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1%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,并将测序结果上传至 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 的 Blast 检索系统进行序列分析,确定分离菌株的种类。

1.3.4 药物敏感性测定 采用美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)所推荐的琼脂二倍稀释法进行,测定 CIP 和

ENR 对分离菌株的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),同时用大肠埃希菌 ATCC 25922 和嗜水气单胞菌 ATCC 7966 做质控和对照,判定分离菌株对这两种抗菌药物的敏感性,计算分离菌株的耐药率。

1.3.5 PMQR 基因检测 参考相关文献设计 PMQR 基因引物序列,由上海生工生物技术有限公司合成。引物序列见表 2,PCR 扩增条件见表 3。PCR 扩增产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳检测,阳性菌株送至广州艾基生物技术有限公司测定,测序结果上传至 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列分析。

表 2 PCR 引物序列
Tab. 2 Sequences of primers used for PCR

基因 gene	引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	片段长/bp fragment size
<i>qnrA</i> ^[17]	<i>qnrA</i> -F	ATTCTCTACGCCAGGATTG	516
	<i>qnrA</i> -R	GATCGGCAAAGGTCAGGTCA	
<i>qnrB</i> ^[18]	<i>qnrB</i> -F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469
	<i>qnrB</i> -R	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	
<i>qnrS</i> ^[18]	<i>qnrS</i> -F	ACGACATTCGTCAACTGCAA	417
	<i>qnrS</i> -R	TAAATTGGCACCCGTAGGC	
<i>qnrC</i> ^[17]	<i>qnrC</i> -F	GGTGTGTACATTTATTGAATCG	307
	<i>qnrC</i> -R	CACCTACCCATTTATTTTCA	
<i>qnrD</i> ^[19]	<i>qnrD</i> -F	CGAGATCAATTTACGGAATA	465
	<i>qnrD</i> -R	AACAAGCTGAAGCGCCTG	
<i>aac</i> (6')-Ib-cr ^[20]	<i>aac</i> (6')-Ib-cr-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482
	<i>aac</i> (6')-Ib-cr-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	
<i>oqxAB</i> ^[21]	<i>oqxAB</i> -F	CCCTGGACCGCACATAAAG	523
	<i>oqxAB</i> -R	AAAGAACAAGATTCACCGCAAC	
<i>qepA</i> ^[17]	<i>qepA</i> -F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	306
	<i>qepA</i> -R	CTTCTGCCCCGAGTATCGTG	

表 3 PCR 扩增条件
Tab. 3 PCR amplification conditions

目的基因 gene	反应条件 reaction condition
<i>qnrA</i>	(95℃, 5 min)+{ (95℃, 30 s)+(58℃, 30 s)+(72℃, 30 s) }×30+(72℃, 5 min)
<i>qnrB</i>	(95℃, 5 min)+{ (95℃, 30 s)+(58℃, 30 s)+(72℃, 30 s) }×30+(72℃, 5 min)
<i>qnrS</i>	(95℃, 5 min)+{ (95℃, 30 s)+(56℃, 30 s)+(72℃, 30 s) }×30+(72℃, 5 min)
<i>qnrC</i>	(95℃, 5 min)+{ (95℃, 30 s)+(55℃, 30 s)+(72℃, 30 s) }×30+(72℃, 5 min)
<i>qnrD</i>	(95℃, 5 min)+{ (95℃, 30 s)+(50℃, 30 s)+(72℃, 30 s) }×30+(72℃, 5min)
<i>aac</i> (6')-Ib-cr	(95℃, 5 min)+{ (95℃, 30 s)+(55℃, 30 s)+(72℃, 30 s) }×30+(72℃, 5 min)
<i>oqxAB</i>	(95℃, 5 min)+{ (95℃, 30 s)+(57℃, 30 s)+(72℃, 30 s) }×30+(72℃, 5 min)
<i>qepA</i>	(95℃, 5 min)+{ (95℃, 30 s)+(60℃, 30 s)+(72℃, 30 s) }×30+(72℃, 5 min)

2 结果与分析

2.1 罗非鱼水产品中的细菌种群特征

高通量测序结果显示,罗非鱼鳃组织和肠道内容物携带的总细菌和耐药细菌均以气单胞菌科和肠杆菌科细菌为主(表 4)。罗非鱼携带的气单胞菌和大肠埃希菌在鳃组织中分别占 40.30%和 22.00%,肠组织中分别占 57.10%和 18.70%;而耐恩诺沙星的气单胞菌和大肠埃希菌在鳃组织中分别占 46.70%和 10.10%,肠组织中分别占 45.20%和 6.70%。

2.2 菌株分离鉴定结果

从 100 条罗非鱼体组织中共分离出 280 株气单胞菌和 182 株大肠埃希菌。鳃、肌肉和肠组织

表 4 罗非鱼水产品中的菌群信息
Tab. 4 Bacterial flora distribution in aquatic products of tilapia

种类 species	可培养细菌 cultivable bacteria		耐恩诺沙星细菌 ENR resistant bacteria	
	鳃 gill	肠 intestinal	鳃 gill	肠 intestinal
气单胞菌科 Aeromonadaceae	40.30	57.10	46.70	45.20
肠杆菌科 Enterobacteriaceae	22.00	18.70	10.10	6.70
黄杆菌科 Flavobacteriaceae	5.10	4.80	1.30	2.90
希万氏菌科 Shewanellaceae	2.30	1.80	<1	<1
梭杆菌科 Fusobacteriaceae	<1	<1	—	<1
假单胞菌科 Pseudomonadaceae	<1	<1	<1	—
拟杆菌科 Bacteroidaceae	<1	<1	<1	<1
梭菌科 Clostridiaceae	<1	<1	—	—
莫拉氏菌科 Moraxellaceae	<1	<1	<1	<1
奈瑟氏菌科 Neisseriaceae	<1	<1	—	<1
动球菌科 Planococcaceae	<1	<1	<1	—
疣微菌科 Ruminococcaceae	<1	<1	<1	<1
葡萄球菌科 Staphylococcaceae	<1	<1	—	<1
链球菌科 Streptococcaceae	<1	—	<1	—
黄单胞菌科 Xanthomonadaceae	<1	<1	<1	<1
毛螺菌科 Lachnospiraceae	<1	<1	—	<1
乳杆菌科 Lactobacillaceae	—	<1	<1	—
海洋螺菌科 Oceanospirillaceae	<1	<1	<1	<1

注: 表中数据表示相应细菌占总细菌数量的百分比。
Note: Figures in the table denote percentage of bacteria of each family in total bacteria.

中分离的气单胞菌分别为 92 株(32.86%)、97 株(34.64%)和 91 株(32.50%), 不同组织分离的气单胞菌数量相差不大。鳃、肌肉和肠组织中分离的大肠埃希菌分别为 68 株(37.36%)、28 株(15.38%)和 86 株(47.25%) (表 5) 。

表 5 罗非鱼鳃、肌肉、肠组织中细菌分离情况
Tab. 5 Isolation of bacterium strains from gill, muscle and intestinal tissues of tilapia

细菌种类 species	菌株数(百分比) number of isolates (percentage)			总数(株) sum
	鳃 gill	肌肉 muscle	肠 intestinal	
气单胞菌 <i>Aeromonas</i>	92(32.86%)	97(34.64%)	91(32.50%)	280
大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	68(37.36%)	28(15.38%)	86(47.25%)	182

2.3 药物敏感性测定结果

根据 CLSI 的判定标准, CIP 和 ENR 对受试菌株在 MIC≤0.5 μg/mL、MIC≥4 μg/mL 条件下分别判定为敏感和耐药。280 株气单胞菌对 ENR 耐药的有 7 株(2.50%); 对 CIP 耐药的有 6 株(2.14%)。

182 株大肠埃希菌对 ENR 耐药的有 47 株(25.82%); 对 CIP 耐药的有 33 株(18.13%)。大肠埃希菌对受试药物的耐药率远高于气单胞菌(表 6)。而不同组织分离的耐药菌比例也存在差异, 从鳃、肌肉和肠组织中分离的气单胞菌耐药率分别为 3.26%、1.03%和 3.29%, 大肠埃希菌则分别为 33.82%、21.43%和 32.56%; 鳃和肠组织中分离的耐药菌株比例大于肌肉中分离的(表 7)。

2.4 PMQR 基因的检测

采用 PCR 方法扩增分离菌株携带的 PMQR 基因, 结果显示, 280 株气单胞菌有 19 株(6.79%)携带 PMQR 基因, 其中 12 株(4.29%)携带 qnrS 基因, 8 株(2.86%)携带 aac(6')-Ib-cr 基因, 没有检测到其他 PMQR 基因; 182 株大肠埃希菌中检测出 109 株菌(59.89%)携带 PMQR 基因, 其中 23 株(12.64%)携带 qnrB 基因, 67 株(36.81%)携带 qnrS 基因, 18 株(9.89%)携带 aac(6')-Ib-cr 基因, 21 株(11.54%)携带 oqxAB 基因, 只有 1 株(0.55%)携带

表 6 分离菌株对恩诺沙星和环丙沙星的药敏结果
Tab. 6 Susceptibility of isolates from tilapias to ENR and CIP

药物 drug	菌种 species	菌株数(百分数) number of isolates (percentage)		
		耐药 resistant	中介 intermediate	敏感 sensitive
恩诺沙星 ENR	气单胞菌 <i>Aeromonas</i>	7 (2.50%)	18 (6.43%)	255 (91.07%)
	大肠埃希菌 <i>E.coli</i>	47 (25.82%)	47 (25.82%)	88 (48.36%)
	合计 total	54 (11.69%)	65 (14.07%)	242 (74.24%)
环丙沙星 CIP	气单胞菌 <i>Aeromonas</i>	6 (2.14%)	7 (2.50%)	267 (95.36%)
	大肠埃希菌 <i>E.coli</i>	33 (18.13%)	7 (3.85%)	142 (78.02%)
	合计 total	39 (8.44%)	14 (3.03%)	409 (88.53%)

表 7 罗非鱼鳃、肌肉和肠组织中耐药菌株的分布情况
Tab. 7 Distribution of resistant strains in gill, muscle and intestinal tissues of tilapia

菌种 species	指标 item	组织 tissue			
		鳃 gill	肌肉 muscle	肠 intestinal	总计 total
气单胞菌 <i>Aeromonas</i>	分离菌株数 sum	92	97	91	280
	耐 ENR 和/或 CIP resistance to ENR and/or CIP	3(3.26%)	1(1.03%)	3(3.29%)	7(2.50%)
大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	分离菌株数 sum	68	28	86	182
	耐 ENR 和/或 CIP resistance to ENR and/or CIP	23(33.82%)	6(21.43%)	28(32.56%)	57(31.32%)
合计 total	分离菌株数 sum	160	125	177	462
	耐 ENR 和/或 CIP resistance to ENR and/or CIP	26(16.25%)	7(5.60%)	31(17.51%)	64(13.85%)

qnrD 基因, 未检测出 *qnrC* 和 *qepA* 基因(表 8)。鳃、肌肉和肠组织中分离的携带 PMQR 基因的气单胞菌分别占相应组织分离菌株总数的 7.61%、5.15%和 7.69%; 鳃、肌肉和肠组织中分离的携带 PMQR 基因的大肠埃希菌分别占相应组织分离菌株总数的 60.29%、64.29%和 58.14%; 各组织中分离菌株携带 PMQR 基因的检出率差别不大(表 9)。

3 讨论

3.1 罗非鱼水产品中的细菌群落

气单胞菌是一种条件致病菌, 广泛分布于养殖环境中, 在淡水养殖水体和淡水养殖动物体中, 气单胞菌科均为主要的优势菌群。大肠埃希菌是引起人类细菌感染的最常见的肠杆菌科细菌, 多重耐药大肠埃希菌感染更是一个日益严重的问题。周金敏等^[22]对黄颡鱼(*Pseudobagrus fulridraco*)肠道及养殖水体中菌群的研究发现黄颡鱼各肠段的优势菌群均为气单胞菌科和肠杆菌科细菌。Michelle 等^[23]采用传统技术和现代分子生物学技

表 8 分离菌株 PMQR 基因检出率
Tab. 8 The detection rate of PMQR genes in the isolated strains

基因 gene	气单胞菌 <i>Aeromonas</i>		大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	
	数量 number	百分数/% percentage	数量 number	百分数/% percentage
<i>qnrA</i>	0	0	0	0
<i>qnrB</i>	0	0	23	12.64
<i>qnrS</i>	12	4.29	67	36.81
<i>qnrC</i>	0	0	0	0
<i>qnrD</i>	0	0	1	0.55
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	8	2.86	18	9.89
<i>oqxAB</i>	0	0	21	11.54
<i>qepA</i>	0	0	0	0

术相结合的方法研究了虹鳟体内的细菌, 结果显示气单胞菌和肠杆菌科是肠道中的优势菌群。本研究采用高通量测序的方法对罗非鱼鳃和肠道的菌群结构分析发现, 气单胞菌和大肠埃希菌亦是罗非鱼水产品携带的主要细菌菌群, 在鳃组织中气单胞菌和大肠埃希菌占总细菌的比例分别为

表 9 罗非鱼鳃、肌肉和肠组织中携带 PMQR 基因菌株的分布情况
Tab. 9 Distribution of PMQR positive strains in gill, muscle and intestinal tissues of tilapia

菌种 species	指标 item	组织 tissue			总计 sum
		鳃 gill	肌肉 muscle	肠 intestinal	
气单胞菌 <i>Aeromonas</i>	菌株数 sum	92	97	91	280
	携带 PMQR 菌株数 number of PMQR positive strains	7(7.61%)	5(5.15%)	7(7.69%)	19(6.79%)
大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	菌株数 sum	68	28	86	182
	携带 PMQR 菌株数 number of PMQR positive strains	41(60.29%)	18(64.29%)	50(58.14%)	109(59.89%)
合计 total	菌株数 sum	160	125	177	462
	携带 PMQR 菌株数 number of PMQR positive strains	48(30.00%)	23(18.40%)	57(32.20%)	128(27.70%)

40.30%和 22.00%，肠道中为 57.10%和 18.70%；而对于耐药细菌，在鳃组织中气单胞菌和大肠埃希菌分别为 46.70%和 10.10%，肠道中为 45.20%和 6.70%。由此可见，气单胞菌和大肠埃希菌是罗非鱼产品中抗生素耐药性监测的重点细菌。

3.2 罗非鱼携带耐喹诺酮类药物细菌情况

食源性细菌耐药性对食品安全以及人类身体健康的影响已经引起了人们的重视^[21]。张梦寒等^[24]对甲鱼等水产品中大肠埃希菌耐药性研究发现，受试的大肠埃希菌对环丙沙星的耐药率高达 81.20%。本研究从罗非鱼产品中分离的大肠埃希菌对环丙沙星的耐药率仅为 18.13%，远低于甲鱼源的细菌耐药率，这可能与不同养殖品种的用药情况不同有关。本研究从罗非鱼水产品鳃、肠道和肌肉中共分离到 462 株菌株(气单胞菌 280 株、大肠埃希菌 182 株)，对恩诺沙星的耐药率(11.69%)略高于环丙沙星(8.44%)；气单胞菌的耐药率(最高 2.5%)明显低于大肠埃希菌(最低 18.13%)，大肠埃希菌对恩诺沙星和环丙沙星的耐药率均高于气单胞菌，可能与大肠埃希菌更容易对喹诺酮类药物产生耐药有关。而从不同组织分离的细菌对药物的耐药率亦存在差异，肌肉中分离的细菌耐药率(5.60%)明显低于鳃组织(16.25%)和肠道组织(17.51%)，显示水产品携带的细菌耐药性风险主要与大肠埃希菌相关。

3.3 分离菌株携带 PMQR 基因情况

PMQR 是细菌喹诺酮类耐药机制的重要组成部分。PMQR 基因单独存在时，只会引起细菌对喹诺酮类药物低水平耐药；但 PMQR 基因多位于

质粒上，可以在不同的细菌间进行耐药传播^[25]。张维秋等^[26]对禽源大肠埃希菌 PMQR 基因检测，发现近 20 年来，我国禽源大肠埃希菌对喹诺酮类药物的耐药性不断增加，已成为严重的公共卫生问题。Jiang 等^[27]2010 年对从鱼类水产品中分离的 218 株大肠埃希菌进行 PMQR 基因检测发现，其中有 55 株(25.23%)的菌株携带 PMQR 基因，主要是 *qnrB*、*qnrS*、*qnrD* 和 *aac(6′)-Ib-cr*。谭爱萍等^[28-29]对养殖龟鳖源临床气单胞菌的耐药基因分析发现 67 株菌中有 13 株(19.40%)携带 PMQR 基因，而 116 株水产动物源临床气单胞菌有 18 株菌(15.52%)携带 PMQR 基因，种类有 *qnrS1*、*qnrS2* 和 *aac(6′)-Ib-cr*。本研究中分离的 182 株大肠埃希菌有 109 株菌(59.89%)携带 PMQR 基因，种类为 *qnrB*、*qnrS*、*acc(6′)-Ib-cr*、*oqxAB* 和 *qnrD*；而分离的 280 株气单胞菌仅有 19 株(6.79%)携带 PMQR 基因，种类为 *qnrS* 和 *aac(6′)-Ib-cr*。由此可见，罗非鱼水产品中分离的大肠埃希菌 PMQR 基因携带率远高于气单胞菌，携带的耐药基因种类也较丰富，水产品中喹诺酮类耐药基因携带风险主要与大肠埃希菌有关。

从细菌群落结构分析看，水产品中气单胞菌比大肠埃希菌显优势，但无论是细菌耐药率还是耐药基因携带率，大肠埃希菌均高于气单胞菌，大肠埃希菌是水产品耐药性监测需关注的细菌种类。而从不同组织分离的细菌耐药率和耐药基因携带率比较看，肌肉分离的耐药细菌和耐药基因携带率均低于鳃组织和肠道组织，而罗非鱼水产品可食用部位为肌肉，作为动物源食品还是相对

安全的。加强水产品食品加工和流通方式的监管,将有助于降低细菌耐药性传播风险。

参考文献:

- [1] Zhou Y Y, Wang Y M, Chao J M, et al. Development situation and countermeasures of Guangdong tilapia industry in 2015[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2016, 43(6): 16-21. [周远扬, 王玉梅, 曹俊明, 等. 2015 年广东罗非鱼产业发展形势与对策建议[J]. 广东农业科学, 2016, 43 (6): 16-21.]
- [2] Hheuretzbacher U. Global antibacterial resistance: the never-ending story[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2013, 1 (2): 63-69.
- [3] Wielinga P R, Jensen V F, Aarestrup F M. et al. Evidence based policy for controlling antimicrobial resistance in the food chain in Denmark[J]. Food Control, 2014, 40(1): 185-192.
- [4] Barriere S L. Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance[J]. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2015, 16(2): 151-153.
- [5] Deng Y, Wu Y, Jiang L, et al. Multi-drug resistance mediated by class 1 integrons in *Aeromonas* isolated from farmed freshwater animals in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(935): 1-7.
- [6] Majumdar T, Das B, Bhadra R K, et al. Complete nucleotide sequence of a quinolone resistance gene (*qnrS2*) carrying plasmid of *Aeromonas hydrophila* isolated from fish[J]. Plasmid, 2011, 66(2): 79-84.
- [7] Han J E, Kim J H, Choresca Jr C H, et al. First description of the *qnrS*-like (*qnrS5*) gene and analysis of quinolone resistance-determining regions in motile *Aeromonas* spp. from diseased fish and water[J]. Research in Microbiology, 2012, 163(1): 73-79.
- [8] Strahilevitz J, Jacoby G A, Hooper D C, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted treat[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2009, 22(4): 664-689.
- [9] Martinez-Martinez L, Pascual A, Garcia I, et al. Interaction of plasmid and host quinolone resistance[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 51(4): 1037-1039.
- [10] 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. [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.]
- [11] 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. [崔佳佳, 王荻, 卢彤岩, 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.]
- [12] Deng G H, Zha L Y, Zhang G X, et al. Comparison of human and animal fecal microbiota with illumina sequencing of 16S rRNA tags[J]. Ecological Science, 2014, 33(5): 851- 857. [邓冠华, 查龙应, 张国霞, 等. 高通量 16S rRNA 标签测序法比较人与不同动物肠道微生物组多样性[J]. 生态科学, 2014, 33(5): 851-857.]
- [13] Zhao L, Wang G, Siegel P, et al. Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens[J]. Scientific Reports, 2013, 3(5): 1163.
- [14] Borell N, Cinas 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] Yafiez M, Catalan V, Apraiz 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] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [17] Kim H B, Park C H, Kim C J, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(2): 639-645.
- [18] O'Connor J, Morris D, DeLappe N, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-typhi serotypes of *Salmonella enterica* in Ireland in 2001-May 2006[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2007, 29(Suppl.): 78.
- [19] Cavaco L M, Hasman H, Xia S, et al. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53: 603-608.
- [20] Park C H, Robicsek A, Jacoby G A, et al. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50: 3953-3955.
- [21] Zhao J J, Chen Z G, 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.
- [22] Zhou J M, Wu Z X, Zeng L B, et al. Microflora in digestive tract of yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*) and in the water[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2010(5): 613-617. [周金敏, 吴志新, 曾令兵, 等. 黄颡鱼肠道及养殖水体中菌群的分析[J]. 华中农业大学学报, 2010(5): 613-617.]
- [23] Michelle J P, David M S, David J A. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquaculture, 2006, 261: 94-203
- [24] 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): 2543-2548. [张梦寒, 沈强, 朱莉强, 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): 2543-2548.]
- [25] Allen H K, Donato J, Wang H H, et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(4): 251-259.
- [26] Zhang W Q, Pan W J, Chen Q, et al. Detection of plasmid-

- mediated quinolone resistance among *Escherichia coli* from avian in China[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 31(S): 78-81. [张维秋, 潘浪涓, 陈祥, 等. 禽源大肠埃希菌质粒介导的喹诺酮类药物耐药基因的检测[J]. 动物医学进展, 2010, 31(S): 78-81.]
- [27] Jiang H X, Tang D, Liu Y H, et al. Prevalence and characteristics of β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 67: 2350-2353.
- [28] Tan A P, Deng Y T, Jiang L, et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Aeromonas* isolated from turtles[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(7): 1018-1025. [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.]
- [29] Tan A P. Surveillance of antimicrobial resistance and study of plasmid-mediated quinolone resistance among *Aeromonas* isolates from different aquatic animals[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016. [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, 2016.]

Detection and analysis of quinolone resistance and resistance-associated genes in bacteria isolated from tilapias sold in the supermarkets

GUO Xuezhong^{1,2}, ZHANG Ruiquan¹, JIANG Lan¹, TAN Aiping¹, DENG Yuting¹, LI Jinxiang³, ZHAO Fei¹, LIUFU Cui^{1,2}, HE Shan^{1,2}

1. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province; Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Key Laboratory of Aquatic Disease & Waterfowl Breeding of Guangzhou, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China

Abstract: The aim of this study was to investigate and analyze quinolone resistance and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in *Aeromonas* and *Escherichia coli* isolated from the commercial aquatic products sold in Guangzhou's supermarkets, and to assess the quality and safety of these aquatic products. One hundred live tilapias were collected from 14 supermarkets in Guangzhou. The results of high-throughput sequencing analysis indicated that *Escherichia coli* and *Aeromonas* were the dominant bacteria. According to bacterial screening culture methods, 280 *Aeromonas* and 182 *E. coli* strains were isolated from the gills, muscles, and intestinal contents, respectively. All the isolates were evaluated for resistance to enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIP) by agar dilution method. All of the 280 *Aeromonas* and 182 *E. coli* strains were also screened for the *qnr*, *qepA*, *aac(6')-Ib-cr*, and *oqxAB* genes using PCR. The results showed that 7 (2.50%) *Aeromonas* and 47 (25.82%) *E. coli* isolates were resistant to ENR, while 6 (2.14%) *Aeromonas* and 33 (18.13%) *E. coli* isolates were resistant to CIP. The resistance rates of ENR and/or CIP in *Aeromonas* and *E. coli* isolates obtained from the muscles were much lower than those in the microorganisms isolated from the gills and intestinal contents. All the *E. coli* isolates obtained from different tissues were much more resistant to fluoroquinolones than the *Aeromonas* isolates. Of these 182 *E. coli* isolates, 59.89% isolates harbored PMQR genes, and 5 types of PMQR genes were detected, including *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, and *oqxAB*. Of the 280 *Aeromonas* isolates, 6.79% harbored PMQR genes, and only *aac(6')-Ib-cr* and *qnrS* were detected. Only a few resistant bacteria were screened in the muscles, which form the edible part of the tilapia; so, the food products were considered relatively safe. However, resistant *E. coli* was predominantly isolated from the intestinal contents and gills, and most of the *E. coli* isolates carried various types of PMQR genes, suggesting a potential risk of drug-resistant *E. coli* transmission from these tissues. Therefore, it is important to strengthen monitoring of antimicrobial resistance of bacteria in aquatic products.

Key words: aquatic product; *Aeromonas*; *Escherichia coli*; quinolone resistance; PMQR

Corresponding author: JIANG Lan. E-mail: jianglan@prfri.ac.cn