DOI:10.12441/spyswjs.20240725003 [文章编号] 1673-1689(2025)11-0048-11

菜市场中食源性大肠杆菌耐药性及其传播风险分析

李思思[1] 周 炜[2] 周芷锦[2] 王 彬[2] 裘丞军[2] 张章晟[1] 张 琦[1] 孙 允[1]
徐 旭[1] 沈 涛[1] 韩剑众[1] 曲道峰[1*]

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院,浙江 杭州 310018; 2. 浙江省动物疫病预防控制中心,浙江 杭州 311199)

摘要:【目的】为评估菜市场中食源性大肠杆菌的耐药性及其传播风险,对浙江杭州3个菜市场市售猪肉、水产品、蔬菜以及污水进行大肠杆菌分离。**【方法】**通过16S rRNA测序鉴定菌株,纸片扩散法鉴定大肠杆菌的耐药表型,使用PCR技术检测分离株的耐药基因型和整合子,分析大肠杆菌耐药情况,并通过接合转移评估耐药传播特性,共现网络分析分离菌株耐药性传播风险。**【结果】**从180份样品中共分离得到68株大肠杆菌,K-B法药敏试验表明,大肠杆菌分离株大多数为多重耐药菌。其中阿莫西林、四环素和磺胺异噁唑的耐药率均在50%以上。PCR扩增耐药基因结果表明,四环素类耐药基因*tetA*的检出率最高,其次为*sul1*、*blaTEM*和*tetB*。此外,与菜市场A和菜市场C相比,菜市场B大肠杆菌耐药基因检出更严重。整合子检出率最高的基因是*intI1*(高达30.88%),整合子阳性菌中共8株菌携带基因盒。接合转移结果显示,3株菌株中四环素耐药基因*tetA*可通过质粒接合作用,转移到受体菌EC600中。共现网络分析显示,在大肠杆菌分离株中耐药基因和可移动元件之间有较高的共传播风险。**【结论】**作者调查了浙江杭州3个菜市场中大肠杆菌的耐药情况和传播风险,为保障菜市场食品安全提供理论依据。

关键词:菜市场;耐药;整合子;大肠杆菌;传播

Antimicrobial Resistance and Transmission Risk of Foodborne *Escherichia coli* in Wet Markets

LI Sisi[1] *ZHOU Wei*[2] *ZHOU Zhijin*[2] *WANG Bin*[2] *QIU Chengjun*[2] *ZHANG Zhangsheng*[1]
ZHANG Qi[1] *SUN Yun*[1] *XU Xu*[1] *SHEN Tao*[1] *HAN Jianzhong*[1] *QU Daofeng*[1*]

(1. School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China; 2. Zhejiang Center of Animal Disease Control, Hangzhou 311199, China)

Abstract: [**Objective**] To evaluate the antimicrobial resistance and transmission risk of foodborne *Escherichia coli* in wet markets, this study isolated *E. coli* from pork, aquatic products, vegetables, and wastewater collected from three wet markets in Hangzhou, Zhejiang. [**Method**] The isolates were identified by 16S rRNA sequencing, and their antimicrobial resistance phenotypes were determined *via* the disk diffusion method. PCR was employed to detect antimicrobial resistance genes and integrons in the isolates. The antimicrobial resistance characteristics of *E. coli* were analyzed, and conjugation experiments were performed to assess the potential for horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. Co-occurrence network analysis was conducted to evaluate the transmission risk of antimicrobial resistance among the isolates. [**Result**] A total of 68 *E. coli* strains were isolated from 180 samples. The Kirby-Bauer (K-B) test revealed that most *E. coli* isolates were multidrug-resistant (MDR). The resistance rates to amoxicillin, tetracycline, and sulfisoxazole exceeded 50%. PCR

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32172188);浙江省“三农九方”科技协作计划(2024SNJF043-1,2023SNJF051)。
通信作者:曲道峰(1983—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食源性微生物快速检测及耐药菌环境适应性研究。E-mail:daofeng@mail.zjgsu.edu.cn
收稿日期:2024-07-25 **修回日期:**2024-10-12

amplification revealed that the tetracycline resistance gene *tetA* had the highest detection rate, followed by *sul1*, *blaTEM*, and *tetB*. Moreover, *E. coli* isolates from the wet market B exhibited higher prevalence of antimicrobial resistance genes than those from wet markets A and C. The detection rate of the integrase gene *intI1* was the highest at 30.88%, and eight *intI1*-positive strains carried gene cassettes. Conjugation experiments demonstrated that in three donor strains, *tetA* could be transferred via plasmid-mediated conjugation into the recipient strain EC600. Co-occurrence network analysis revealed a strong co-transmission relationship between antimicrobial resistance genes and mobile genetic elements among *E. coli* isolates. [**Conclusion**] The author investigates the antimicrobial resistance profiles and dissemination risk of *E. coli* isolated from three wet markets in Hangzhou, Zhejiang, providing a theoretical basis for ensuring the food safety in wet markets.

Keywords: wet market; antimicrobial resistance; integron; *Escherichia coli*; transmission

抗生素耐药性在食品中的污染现象正日益成为一个备受关注的全球性问题[1]。随着国内畜牧业、水产养殖业与农业的迅速扩展，人们在动植物疾病防治过程中广泛地应用抗生素，这导致环境中细菌的耐药性呈现出连年增长的趋势[1-3]。当前，已在鸡肉、猪肉、海鲜、水果和蔬菜等多种食物中发现了抗生素耐药细菌，如沙门氏菌、大肠杆菌和副溶血性弧菌等[4-10]。其中大肠杆菌在人类和动物共患疾病中扮演着条件性致病菌的角色，能够感染多种宿主。此外，大肠杆菌能够产生对抗生素的抵抗力（AMR），并且将其耐药性传递给周围的易感细菌[11]。细菌可通过基因水平转移等途径获取外源抗性基因，经不断进化，形成耐药性。整合子作为可移动元件可以将抗药基因整合到染色体或质粒中，在同种或异种菌株之间进行传递，从而使抗药基因得以传播[10]。

菜市场在为人们提供新鲜肉类、蔬菜和水果方面发挥着至关重要的作用。传统的菜市场通常较为脏乱且地面潮湿[12]。在潮湿环境下微生物易聚集转化为微菌落并产生生物膜。在生物膜保护下，微生物不受消毒剂影响，从而增加了它们存活的可能性，如未被及时处理将导致食物受到污染[13]。此外，菜市场屠宰家禽、水产等会产生大量的污水，这些污水通常被直接排放到地下管道中，可能导致病原体微生物进入水体造成生物性污染[14]。食物链被视为抗性细菌由动植物向人类传播的一个重要路径[15]。随着工农业的迅速发展，农产品的生产、加工、贮藏和销售都发生了很大的改变，抗性细菌的传播风险也随之增大[16]。了解市场上食源性大肠杆菌的分布与传播规律，对指导农贸市场中耐药菌的监测具有重要意义。目前针对食源性大肠杆菌耐药性及耐药基因传播机制的研究大多集中在屠宰端、运输端、种植端和养殖端，并且已经取得了巨大的成果。但对于菜市场这一终端销售环节，其耐药菌与耐药基因的分布、传播规律及相应的安全风险仍缺乏系统评估，需要深入探究。

作者以从浙江杭州3个菜市场采集分离的食源性大肠杆菌作为研究对象，对其表型和基因型进行检测，并通过接合转移试验探究其耐药性转移特点，揭示菜市场中大肠杆菌的耐药情况以及可能存在的传播途径，为菜市场大肠杆菌的耐药性监测提供参考，为保障菜市场食品安全提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

缓冲蛋白胨水（BPW）、BHI培养基、麦康凯培养基和细菌琼脂粉：浙江百世科学仪器有限公司；药敏纸片：杭州百望生物科技有限公司；细菌基因组DNA快速抽提试剂盒、50X TAE缓冲液、16S rRNA基因通用引物：生工生物工程（上海）股份有限公司；2X *Taq* PCR Master Mix、溴化乙锭（EB）、DL2000 DNA Marker、琼脂糖：BBI生命科学有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品采集及大肠杆菌分离

2023年5月从浙江杭州随机选取的3个大型菜市场共采集180份样本，涵盖猪肉、水产品、蔬菜和污水。猪肉样品采集：从各菜市场随机选择猪肉档口，在同一摊位3~5块胴体上取若干小块猪肉混为一份样品（每份500 g）置于无菌样品袋中

并编号。水产品样品采集：从各菜市场随机选择水产档口，选择外观正常的水产品，避免选择有明显腐败迹象的样品。用无菌袋从同一摊位采集3~5种水产品，使用无菌棉签轻轻擦拭水产品整个表面，剪下无菌棉置于无菌容器中，加入5 mL无菌生理盐水并编号。蔬菜样品采集：从各菜市场随机选择蔬菜档口，在同一摊位采集3~5种蔬菜样本，使用无菌采样器在各蔬菜不同部位取样，混合后放入一次性采样管，并在采样管中加入5 mL无菌生理盐水。每份样品采集50 g并编号。污水样品采集：选取与之前采集的猪肉、水产品和蔬菜样品来源相同的摊位，使用无菌棉拭子分别蘸取污水放入含有5 mL无菌生理盐水的采样管中并编号。以上所有采样管用封口膜密封后及时送回实验室进行大肠杆菌分离。样品经缓冲蛋白胨富集后，接种于麦康凯琼脂平板上，在37 ℃条件下过夜培养，随后挑取鲜红色单菌落进行纯化。所有分离株经革兰氏染色后用显微镜观察并进行16S rRNA测序鉴定[17]。菌株保存在甘油体积分数为30%的BHI液体培养基中。

1.2.2 耐药表型测定

采用Kindy-Bauer纸片扩散法，对大肠杆菌的耐药性表型进行测定。选取17种抗生素，涵盖9个不同类别（见表1），进行耐药性检测。测试结果判定及质量控制均遵循美国临床和实验室标准协会（CLSI）的指导标准。

表1 圆盘扩散法的区域直径折点

Table 1 Zone diameter breakpoints of the disc diffusion method

抗生素大类	抗生素	简写	药物含量/μg	判断折点/mm		
				R	I	S
β-内酰胺类	阿莫西林	AMX	20	≤13	14~17	≥18
	美罗培南	MEM	10	≤13	14~15	≥16
	亚胺培南	IPM	10	≤19	20~22	≥23
氨基糖苷类	庆大霉素	GM	10	≤12	13~14	≥15
	链霉素	S	10	≤11	12~14	≥15
	卡那霉素	K	30	≤14	15~16	≥17
喹诺酮类	环丙沙星	CIP	5	≤15	16~20	≥21
	恩诺沙星	ENR	10	≤14	15~19	≥20
	氧氟沙星	OFX	5	≤12	13~15	≥16
磺胺类	复方新诺明	SXT	250	≤10	11~13	≥14
	磺胺异噁唑	SIZ	300	≤12	13~16	≥17
氯霉素类	氯霉素	C	30	≤12	13~17	≥18
四环素类	四环素	TE	30	≤11	12~14	≥15
	米诺环素	MI	30	≤12	13~15	≥16
多黏菌素类	多黏菌素	PB	300	≤8	9~10	≥11
磷霉素类	磷霉素	FOS	200	≤12	13~15	≥16
大环内酯类	红霉素	E	15	≤12	12~23	≥24

注：R表示耐药；I表示中介；S表示敏感。

1.2.3 耐药基因及整合子检测

采用PCR技术，检测大肠杆菌分离株中19种耐药基因及3类整合酶基因的携带情况，并对阳性菌基因盒序列进行扩增与分析。相关耐药基因和整合酶基因引物序列见表2。将PCR扩增阳性产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，所得序列经Blast数据库比对分析[18]。

PCR扩增体系：2X *Taq* PCR Master Mix 25 μL，ddH_2O 18 μL，上、下游引物各1 μL，模板DNA 5 μL。PCR扩增步骤：96 ℃预变性5 min；95 ℃变性30 s，持续退火40 s，72 ℃延伸30 s（延伸时间随扩增片段长度改变），共计30次循环；72 ℃终延伸10 min；最后4 ℃保温。

1.2.4 大肠杆菌耐药性转移

选择含有耐药基因*tetA*的食源性大肠杆菌作为供体菌，大肠杆菌EC600作为受体菌，探究耐药

表2　耐药基因和整合酶基因的引物序列和扩增条件

Table 2　Primer sequences and amplification conditions for antimicrobial resistance genes and integrase genes

类型	基因名称	引物序列（5′—3′）	扩增片段/bp
四环素	*tetA*	F：GCTACATCCTGCTTGCCTTC R：CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210
	tetB	F：TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG R：GTAATGGGCCAATAACACCG	659
	tetC	F：AAACCATTACGGCATTCTGC R：GACCGGATACACCATCCATC	787
β-内酰胺类	*blaTEM*	F：CTCACCCAGAAACGCTGGTG R：ATCCGCCTCCATCCAGTCTA	569
	blaNDM	F：GGTTTGGCGATCTGGTTTTC R：CGGAATGGCTCATCACGATC	621
氨基糖苷类	*aac(6′)-Ib-cr*	F：TTGGAAGCGGGGACGGAM R：ACACGGCTGGACCATA	260
	aphA6	F：ATACAGAGACCACCATACAGT R：GGACAATCAATAATAGCAAT	235
喹诺酮类	*qnrA*	F：CAGCAAGAGGATTTCTCACG R：AATCCGGCAGCACTATTACTC	630
	qnrB	F：GGCTGTCAGTTCTATGATCG R：SAKCAACGATGCCTGGTAG	488
	qnrC	F：GCAGAATTCAGGGGTGTGAT R：AACTGCTCCAAAAGCTGCTC	118
磺胺类	*sul1*	F：TCATCTGCCAAACTCGTCGTTA R：GTCAAAGAACGCCGCAATGT	105
	sul2	F：CAGCGCTATGCGCTCAAG R：ATCCCGCTGCGCTGAGT	129
	folp1	F：CAGGCTCGTAAATTGATAGCAGAAG R：CTTTCCTTGCGAATCGCTTT	140
	folp2	F：GCGATTCGCAAGGAAAGTGA R：CACATGGGCCATTTTTTCATC	138
氯霉素类	*cmlA*	F：TAGGAAGCATCGGAACGTTGAT R：CAGACCGAGCACGACTGTTG	665
	catA1	F：GAATGCGTTGCATCAGGTTTAATT R：CGCCCATCCCCTTAAGTCTA	952
	catA2	F：GCCCAAGTTGAGTTACAAAA R：AGATCCCATCGATACGACTT	482
多黏菌素类	*mcr-1*	F：CGGTCAGTCCGTTTGTTC R：CTTGGTCGGTCTGTAGGG	309
	mcr-2	F：TGTTGCTTGTGCCGATTGGA R：CAGCAACCAACAATACCATCT	567
整合酶	*intI1*	F：GGCTTCGTGATGCCTGCTT R：CATTCCTGGCCGTGGTTCT	149
	intI2	F：CACGGATATGCGACAAAAAGGT R：GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	789
	intI3	F：GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG R：ACGGATCTGCCAAACCTGACT	980

基因是否可以借助可移动元件进行传播，具有以下特征的菌株可以被确定为可转移质粒：对四环素表现出抗性；检测到耐药基因*tetA*；菌种鉴定后与受体菌一致；在双抗板上长出单菌落。

1.2.5　数据分析

采用SPSS软件对数据进行统计分析，借助R

语言“vegan”与“psych”程序包分析耐药基因与可移动元件之间的相关性，利用 Origin 和 Gephi 绘图。

2 结果与讨论

2.1 大肠杆菌分离与鉴定

经平板培养和 16S rRNA 基因鉴定，从 180 份样品中分离出 68 株大肠杆菌，分离率为 37.78%，详见表 3。3 个菜市场大肠杆菌分离率从高到低依次为菜市场 B（41.67%）、菜市场 C（38.33%）、菜市场 A（33.33%）。根据样本类型，超过 50% 的大肠杆菌来源于猪肉样本，分离率达到 60%。此外，猪肉样本中大肠杆菌的分离率普遍高于水产品、污水和蔬菜样本。特别是菜市场 B 的猪肉样本中大肠杆菌的分离率高达 66.67%。蔬菜样品中大肠杆菌的分离率较低，处于 6.67%~13.33%。

表 3 菜市场大肠杆菌分离结果

Table 3 Isolation results of *Escherichia coli* from wet market

来源	分离率/%			
	猪肉	水产品	蔬菜	污水
菜市场 A	53.33（8/15）	33.33（5/15）	6.67（1/15）	40.00（6/15）
菜市场 B	66.67（10/15）	26.67（4/15）	13.33（2/15）	60.00（9/15）
菜市场 C	60.00（9/15）	40.00（6/15）	6.67（1/15）	46.67（7/15）
总计	60.00（27/45）	33.33（15/45）	8.89（4/45）	48.89（22/45）

2.2 耐药表型检测结果

依据 CLSI-2020 标准，分析 68 株大肠杆菌分离株的抗生素敏感性。如图 1 所示，大肠杆菌分离株对四环素、磺胺异噁唑和阿莫西林耐药率均超过了 60%，分别为 80.88%、72.06%、67.65%。大肠杆菌分离株对环丙沙星、恩诺沙星、庆大霉素、米诺环素和美罗培南的敏感度较高，耐药率均在 16% 以下。其中，环丙沙星耐药率为 0。此外，红霉素耐药率仅为 22.06%，但其中介率达到了 47.06%。如图 2 所示，3 个菜市场大肠杆菌分离株对四环素的耐药率均在 70% 以上，其中菜市场 B 大肠杆菌分离株的耐药率高达 86.67%，菜市场 C 和 A 大肠杆菌分离株的耐药率分别为 81.16%、76.67%。此外，阿莫西林与磺胺异噁唑的耐药率均高于 50%，其中，菜市场 C 大肠杆菌分离株对磺胺异噁唑的耐药率尤为突出，高达 97.22%。相比之下，菜市场 B 大肠杆菌分离株的耐药情况最为严重，其对四环素、阿莫西林和复方新诺明等抗生素耐药率最高，并检出对恩诺沙星耐药的大肠杆菌。菜市场 A 大肠杆菌分离株对多数抗生素表现出较好的敏感性，对环丙沙星、多黏菌素 B 和米诺环素均未检出耐药性，且除氧氟沙星外，其余抗生素的耐药率均低于其他菜市场。

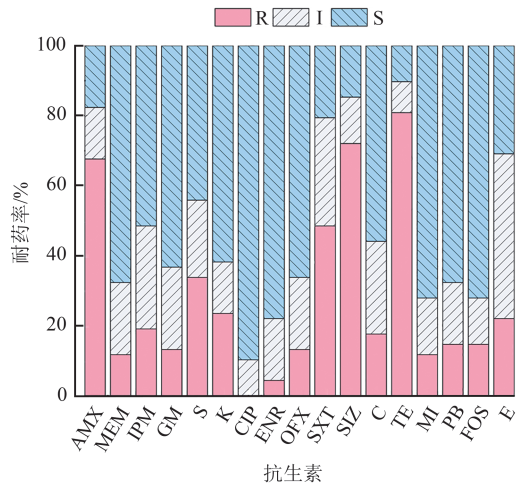


图 1 总体耐药情况

Fig. 1 Overall antimicrobial resistance

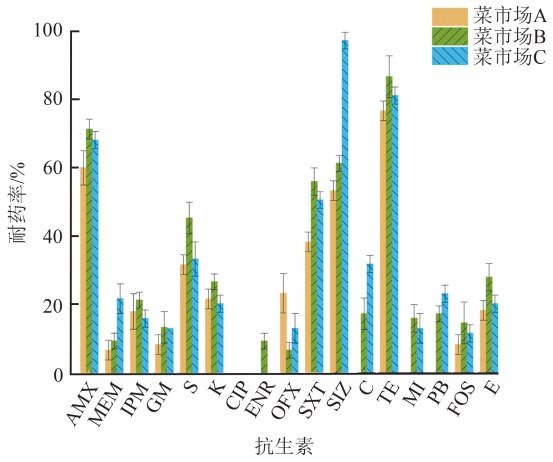


图 2 抗生素耐药率

Fig. 2 Antimicrobial resistance rate

由表 4 可知，3 个菜市场大肠杆菌分离株至少对 2 种抗生素耐药，至多表现出 9 重耐药性，主要耐药性集中在 3~5 重。耐药菌在新鲜猪肉中的耐药重数分布比较一致，从 3 重到 9 重不等，且高度耐药的多重耐药菌（≥5 重）比例达到了 59.26%。从污水样品中分离的大肠杆菌中有 10 株耐药菌是 5 重耐药，不存在 2 重、3 重和 9 重的耐药菌。而蔬菜大肠杆菌分离株只对 3~5 重抗生素耐受。

表4　菜市场大肠杆菌的多重耐药结果

Table 4　Multidrug resistance results in *Escherichia coli* from wet market

大肠杆菌分离源	菌株数量/株	耐药菌株数量/株							
		2重耐药	3重耐药	4重耐药	5重耐药	6重耐药	7重耐药	8重耐药	9重耐药
猪肉	27	2	4	5	7	3	2	2	2
水产品	15	1	3	2	4	3	1	1	0
污水	22	0	0	6	10	4	1	1	0
蔬菜	4	0	1	2	1	0	0	0	0

2.3　耐药基因型检测结果

对3个菜市场68株大肠杆菌进行19种耐药性基因检测，结果见表5。从整体检出情况看，四环素类耐药基因*tetA*在3个市场的大肠杆菌分离株中检出率最高，为80.89%。*tetB*和*tetC*的检出率相对较低，为39.71%和17.65%。*blaTEM*是检出率最高（44.12%）的*β*-内酰胺类耐药基因，而*blaNDM*的检出率较低（5.89%）。氨基糖苷类耐药基因*aac(6′)-Ib-cr*和*aphA6*的检出率差别不大，分别为14.71%和22.06%。在喹诺酮类抗生素耐药性基因的检测中，*qnrA*的检出率最高，达到了25.00%，其次是*qnrB*，检出率为19.12%，而*qnrC*未被检出。磺胺类耐药基因以*sul1*、*sul2*、*folp1*和*folp2*为主，*sul1*和*sul2*检出率分别为63.24%与26.47%，*folp1*和*folp2*均在10%以下。氯霉素类抗性基因中，*cmLA*检出率为13.24%，*catA1*检出率为4.41%，*catA2*未被检出。*mcr-1*在多黏菌素中的检出率很低，只有2.94%，*mcr-2*未被检出。

3个菜市场大肠杆菌分离株耐药基因检出情况如图3所示。3个菜市场中，四环素类抗性基因*tetA*、*β*-内酰胺酶类抗性基因*blaTEM*以及磺胺类抗性基因*sul1*的检出率相对较高，菜市场B和C检出率均高于菜市场A。*mcr-1*仅在菜市场B和A的大肠杆菌分离株中检出。与其他菜市场相比，菜市场B大肠杆菌分离株对*blaTEM*、*aphA6*、*qnrA*、*sul1*、*sul2*、*tetA*、*cmLA*、*tetB*和*folp1*这9种耐药基因普遍显示出较高的检出率，涉及*β*-内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类、氯霉素类、磺胺类和四环素类等多种抗生素类别。由此可见菜市场B大肠杆菌分离株的耐药情况相比于其他菜市场大肠杆菌分离株更严重，需进一步关注。耐药基因检出情况最好的是菜市场A大肠杆菌分离株，其耐药基因检出率有7种低于其他菜市场大肠杆菌分离株。

表5　总体耐药基因检出结果

Table 5　Overall prevalence of antibiotic resistance genes

抗生素大类	耐药基因	分离率/%
四环素类	*tetA*	80.89（55/68）
	tetB	39.71（27/68）
	tetC	17.65（12/68）
β-内酰胺类	*blaTEM*	44.12（30/68）
	blaNDM	5.89（4/68）
氨基糖苷类	*aac(6′)-Ib-cr*	14.71（10/68）
	aphA6	22.06（15/68）
喹诺酮类	*qnrA*	25.00（17/68）
	qnrB	19.12（13/68）
	qnrC	0（0/68）
磺胺类	*sul1*	63.24（43/68）
	sul2	26.47（18/68）
	folp1	8.82（6/68）
	folp2	2.94（2/68）
氯霉素类	*cmLA*	13.24（9/68）
	catA1	4.41（3/68）
	catA2	0（0/68）
多黏菌素类	*mcr-1*	2.94（2/68）
	mcr-2	0（0/68）

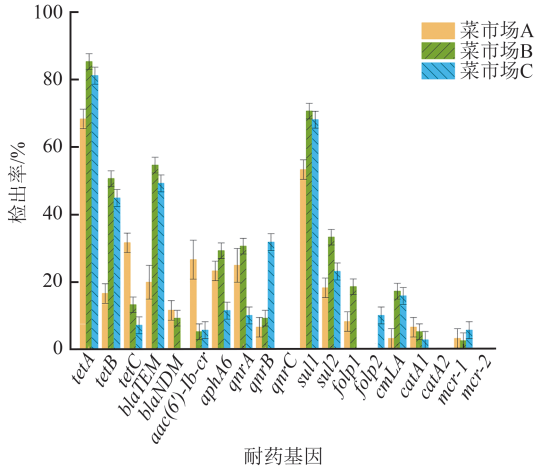


图3　不同菜市场大肠杆菌的耐药基因检出结果

Fig. 3　Prevalence of antibiotic resistance genes among *Escherichia coli* isolates in different wet markets

2.4 整合子检出结果及共线网络分析

对 3 个菜市场分离得到的 68 株菌株的整合酶基因进行 PCR 扩增检测。在 3 个菜市场中，I型整合子 *intI1* 和II型整合子 *intI2* 检出率分别为 30.88% 和 5.88%，未检出 *intI3*，且未发现同时含有 *intI1* 与 *intI2* 的大肠杆菌。如图 4 所示，*intI1* 在菜市场 B 大肠杆菌分离株的检出率最高，其次是菜市场 A 大肠杆菌分离株。而 *intI2* 在 3 个菜市场大肠杆菌分离株的检出率均较低，均不超过 5%。以上数据表明，3 个菜市场中整合子类型检出率最高的是I型整合子。基因盒 PCR 扩增与测序结果显示，在 25 株整合酶阳性菌株中，共有 8 株携带基因盒，分别为菜市场 A 大肠杆菌分离株（*n*=3）、菜市场 B 大肠杆菌分离株（*n*=4）和菜市场 C 大肠杆菌分离株（*n*=1）。其中检出I型整合子基因盒 6 株，涵盖 3 种类型，分别是 *dfrA1-aadA1*、*aadA1-aadA22-aadA23* 和 *dfrA17-aadA5*，可赋予细菌对甲氧苄啶（由耐药基因 *dfrA1*、*dfrA17* 介导）和氨基糖苷类（由耐药基因 *aadA1*、*aadA22*、*aadA23*、*aadA5* 介导）抗生素的抗性。此外，检出 2 株II型整合子携带 *dfrA1-sat2-aadA1* 基因盒，主要介导氨基糖苷类、甲氧苄啶以及链霉素的抗性。

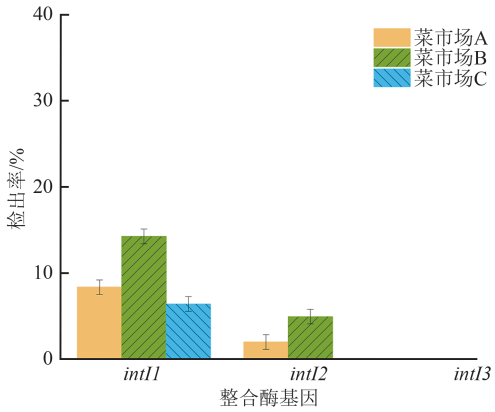


图 4 整合子检出结果

Fig. 4 Integrator detection results

此外，为分析耐药基因与可移动元件之间的相关性，对 19 种耐药基因（ARGS）和 2 种整合子进行相关性网络分析。如图 5 所示，*tetA*、*sul1*、*blaTEM* 等耐药基因不仅位于中间且连线较多，说明这些耐药基因与其他基因或者可移动元件之间的相关性较强，需要重点关注。而I型整合子与 *tetA*、*sul1* 和 *tetB* 等多种抗性基因存在共现关系，

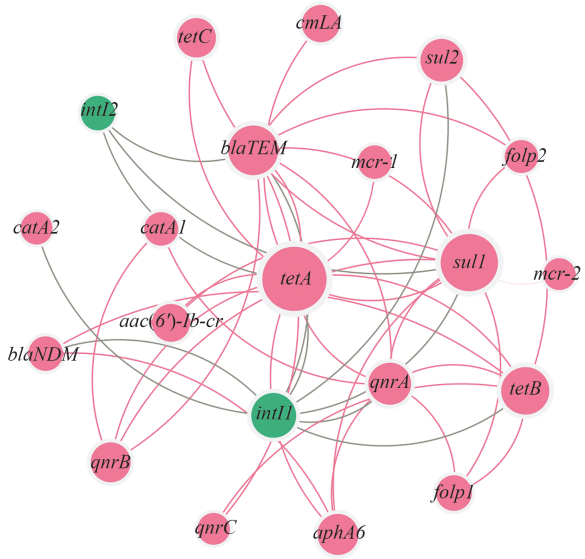


图 5 耐药基因与可移动元件相关性网络分析

Fig. 5 Correlation network of antimicrobial resistance genes and mobile elements

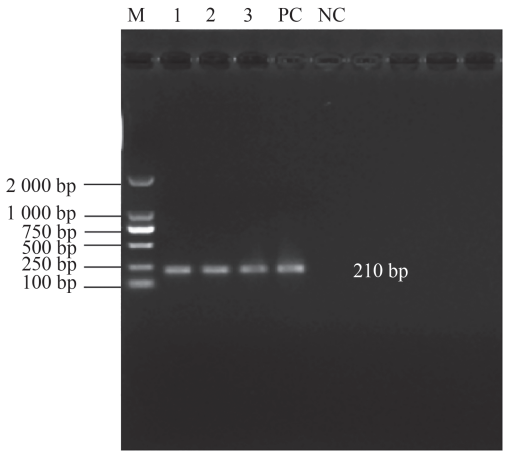
表明这些基因可能会借助可移动元件整合子进行传播。

2.5 耐药性基因转移结果

由预试验筛选出 13 株阳性供体菌进行接合转移正式试验，并测定菌株的最小抑菌质量浓度（MIC）以及 PCR 扩增接合子的耐药基因 *tetA*，结果如表 6 和图 6 所示。经质粒接合转移试验发现，13 株 *tetA* 大肠杆菌阳性菌中有 3 株接合转移成功。由表 6 可知，在一定程度上，四环素抗性基因发生了转移，受体菌在经过接合转移后，其对四环素的敏感性从敏感变成了耐药，说明 *tetA* 耐药基因在受体菌中能发挥功能。同时在 3 株接合子中检测出耐药基因 *tetA*（见图 6），说明部分 *tetA* 耐药基因可能位于大肠杆菌的质粒上，能够在不同种属间进行传播。

2.6 分析

作者从浙江杭州随机抽取 3 个菜市场采集热鲜肉、新鲜蔬菜、水产品以及污水样品共 180 份，共分离出 68 株大肠杆菌。研究其对阿莫西林、庆大霉素、红霉素等 17 种抗生素耐药情况，发现这 68 株大肠杆菌分离株对磺胺异噁唑和四环素表现出较强的耐药性。Zhang 等[19]对鸡和猪体内分离的 15 130 株大肠杆菌的耐药性进行了研究，结果显示，这些大肠杆菌对氨苄青霉素、四环素和磺胺异噁唑的耐药率超过 80%。Bass 等[20]发现，禽源



M—DNA Marker；1～3—接合子 *tetA* 基因 PCR 扩增产物；PC—阳性对照；NC—阴性对照。

图 6　*tetA* PCR 电泳图

Fig. 6　PCR electropherogram of *tetA*

表 6　接合转移后的 MIC 情况

Table 6　MIC before and after conjugation

菌株	MIC/（μg/mL）	
	四环素	利福平
ZR-2	≥16/R	≤1/S
ZR-2-EC600	≤4/S	≥4/R
ZR4-1	≥16/R	≤1/S
ZR-4-1-EC600	≥16/R	≥4/R
SC-8-1	≥16/R	≤1/S
SC-8-1-EC600	≤4/S	≥4/R
SC-11	≥16/R	≤1/S
SC-11-EC600	≤4/S	≥4/R
SC-13-1	≥16/R	≤1/S
SC-13-1-EC600	≤4/S	≥4/R
SC-18-2	≥16/R	≤1/S
SC-18-2-EC600	≥16/R	≥4/R
WS-6-1	≥16/R	≤1/S
WS-6-1-EC600	≤4/S	≥4/R
WS-9	≥16/R	≤1/S
WS-9-EC600	≥16/R	≥4/R
WS-12	≥16/R	≤1/S
WS-12-EC600	≤4/S	≥4/R
WS-19	≥16/R	≤1/S
WS-19-EC600	≤4/S	≥4/R
SHC-3-1	≥16/R	≤1/S
SHC-3-1-EC600	≤4/S	≥4/R
SHC-7-1	≥16/R	≤1/S
SHC-7-1-EC600	≤4/S	≥4/R
SHC-4-2	≥16/R	≤1/S
SHC-4-2-EC600	≤4/S	≥4/R
EC600	≤4/S	≥4/R

大肠杆菌分离株对四环素类和磺胺类药物的耐药率分别高达 86% 和 97%。叶蕾[21]在对广州市水产品进行检测时发现，分离大肠杆菌对四环素表现出一定的抗性。Walia 等[22]报道称，来自美国密歇根罗切斯特农贸市场的菠菜中的 *E. coli* 对四环素、氨苄青霉素和氯霉素拮抗性最强。同样的，本研究在菜市场样本中也观察到了四环素类抗生素高水平耐药性。Tadesse 等[23]研究发现，1950—2002 年，大肠杆菌的多重耐药率（≥3 类抗生素）从 7.2% 增加到 63.6%。Davis 等[24]在农贸市场发现，超过 50% 的鸡肉源大肠杆菌分离株对氨苄西林（62%）、氨苄西林-舒巴坦（51%）、头孢唑林（52%）和四环素（76%）表现出耐药性，48% 的火鸡大肠杆菌分离株具有多重耐药性。本研究发现，大肠杆菌分离株对多种抗生素产生耐药性，4~6 重耐药的达到 69.12%。这可能是因为细菌在多种药物的筛选影响下，其抗性基因能够经染色体和质粒途径，在整个细菌群中扩散表达。检查出的耐药抗生素，主要为 *β*-内酰胺类和四环素类药物，可能是氨卡西林和四环素长期应用于临床，导致其对 *β*-内酰胺、四环素等抗生素产生了极高的耐药性。

本研究结果显示，四环素耐药基因 *tetA* 和磺胺类耐药基因 *sul1* 总体发生率较高；四环素类外排泵是最常见的一类外排泵，其主要功能是通过 *tet* 基因所编码的膜蛋白来保护核糖体免受耐药性[25]。四环素耐药基因 *tetA* 整体检出率达到了 80.89%，在各个来源的样本中均被检测出，也表明了 *tetA* 的宿主菌株对不同环境条件下的耐受性都很好，有利于耐药基因在环境中的广泛传播。Lyu 等[26]从韩国一家水产养殖场的鱼类中分离出一株具有四环素抗性的爱德华细菌，它们都具有 *tetA*、*tetB* 和 *tetD* 的 1~2 个基因。磺胺类药物的抗菌作用机制涉及竞争性抑制叶酸合成，从而阻止微生物的生长和繁殖。在细菌中，二氢叶酸合成酶是一类重要的抗菌物质，而 *sul1*、*sul2* 和 *sul3* 则能促进该酶的表达，并与质粒、转座子、整合子基因盒等元件一起传播[27]，*sul* 基因的水平转移主要由移动遗传元件介导。高远等[28]发现，伦敦农贸市场猪肉沙门氏菌分离株 *sul1* 和 *sul2* 基因检出率均为 60.7%，携带 *tetA* 和 *tetB* 的四环素抗性基因占 78.6%。Jiang 等[29]发现，南美白对虾和猪肉样品磺胺类耐药大肠杆菌分离株 *sul* 基因的检出率分

别为90.0%和88.6%，其中*sul1*和*sul2*的检出率显著高于*sul3*。而本研究结果显示，菜市场大肠杆菌分离菌*sul1*基因的检出率已达到了63.24%，不同耐药基因间的相互作用以及菌株的其他耐药机制，可能共同导致了菌株对磺胺类抗生素的耐药性[30]。

抗生素耐药基因可以通过环境内的水平基因转移广泛传播。水平基因通过属间遗传物质的交换促进了抗生素耐药性的传播，从而增加了有害的抗生素耐药菌的传播风险[31]。革兰氏阴性细菌中抗生素耐药性的传播在很大程度上是借助整合子完成的。大肠杆菌I型整合子是一种可转移的遗传因素，它能将多种抗性基因整合到遗传物质中，如质粒或染色体，并通过表达使其对*E. coli*具有高度的抗性[32-33]，对治疗和预防细菌性疾病带来了巨大挑战[34]。本研究中大肠杆菌的I型整合子检出率远高于II型整合子，且检出I型整合子的阳性菌株具有多重耐药性。Langata等[35]研究表明，I类整合子上携带了大部分已知的抗生素抗性基因，可介导*β*-内酰胺类、氨基糖苷类和氯霉素等多种药物的耐药性。陆光武[36]通过对48株猪源大肠杆菌的耐药基因和I型基因整合子的检测，发现I型整合子阳性率达72.9%，并发现所有的基因突变株均存在多重耐药现象。质粒是能够自主复制的染色体外DNA分子，它不仅能赋予细菌对多种抗生素（如*β*-内酰胺类、氨基糖苷类和四环素类等）的耐药性，还可在不同菌种间复制并通过接合转移进行传播，是一种理想的传播媒介[37]。本研究对13株*tetA*阳性菌株进行质粒接合转移试验，发现有3株菌株成功转移，分别来自热鲜肉、水产品以及污水样品。Hummel等[38]研究发现，81.3%的四环素耐药株中存在整合酶，推测*tetA*等基因可能是由转座子介导的；此外，质粒与整合子、转座子等其他可移动遗传元件的协同作用，加速了多重耐药基因在菌株间的传播，从而导致耐药性问题日益严峻[39]。根据耐药基因与可移动元件相关性网络分析，发现四环素耐药基因与多个耐药基因连线，且处于网络的中心，由此可以推测，其可能会与多种耐药基因一起传播，这与耐药基因的高检出率有关。上述结果表明，质粒与整合子等可移动遗传元件可能是驱动耐药基因水平转移的关键因素，售卖场所卫生安全可能会促进水平移动元件将耐药基因传播于食品中，进而影响人类的身体健康。因此，在运输、贮藏及销售过程中，需对热鲜肉、水产品、蔬菜及污水进行有效隔离，以降低通过基因水平转移引发交叉污染及公共卫生风险的可能性。

3 结论

作者在从菜市场采集的180份样本中，成功鉴定并分离出68株大肠杆菌。纸片药敏法鉴定表型发现，菜市场大肠杆菌分离株大部分为多重耐药菌，对四环素、磺胺异噁唑和阿莫西林的耐药率均在50%以上；耐药基因*tetA*、*blaTEM*和*sul1*的检出率较高，其中四环素类耐药基因*tetA*的检出率最高。接合转移结果显示，3株菌株中四环素耐药基因*tetA*可通过质粒接合作用，转移到受体菌EC600中。网络共现分析表明，耐药基因之间、耐药基因和可移动元件之间存在显著相关性，存在耐药基因在不同食品中传播的风险。

参考文献

[1] DUAN M L，GU J，WANG X J，et al. Factors that affect the occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in soils from livestock and poultry farms[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety，2019，180：114-122.

[2] BADI S，CREMONESI P，ABBASSI M S，et al. Antibiotic resistance phenotypes and virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolated from animals and animal food products in Tunisia[J]. FEMS Microbiology Letters，2018，365（10）：fny088.

[3] CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA W，ZADERNOWSKA A，NALEPA B，et al. Coagulase-negative staphylococci（CoNS）isolated from ready-to-eat food of animal origin-phenotypic and genotypic antibiotic resistance[J]. Food Microbiology，2015，46：222-226.

[4] CHEN J，YING G G，DENG W J. Antibiotic residues in food：extraction，analysis，and human health concerns[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2019，67（27）：7569-7586.

[5] 杨承霖，舒刚，赵小玲，等. 2010—2016年四川省食品动物源大肠杆菌的耐药性研究[J]. 西北农林科技大学学报（自然科学版），2020，48（9）：24-30，36.
YANG C L，SHU G，ZHAO X L，et al. Drug resistance of *Escherichia coli* isolates from food-animals obtained from 2010 to 2016 in Sichuan[J]. Journal of Northwest A & F University（Natural Science Edition），2020，48（9）：24-30，

36.(in Chinese)

[6] 陈伟冰，李柏生，卢向明，等. 2012—2018年茂名市食品中食源性致病菌污染监测结果分析[J]. 应用预防医学，2020，26(2)：150-152.
CHEN W B，LI B S，LU X M，et al. Analysis of monitoring results of food-borne pathogenic bacteria pollution in Maoming City from 2012 to 2018 [J]. Applied Preventive Medicine，2020，26(2)：150-152.(in Chinese)

[7] 邹志云，严昕宇，朱惠芳. 2017年无锡地区食品从业人员及食源性疾病患者中分离沙门菌耐药情况[J]. 江苏预防医学，2020，31(5)：578-581.
ZOU Z Y，YAN X Y，ZHU H F. Drug resistance of *Salmonella* isolated from food practitioners and patients with food-borne diseases in Wuxi in 2017[J]. Jiangsu Journal of Preventive Medicine，2020，31(5)：578-581.(in Chinese)

[8] 李可维，刘思洁，赵薇，等. 9274份肉及肉制品食源性致病菌监测结果分析[J]. 食品安全质量检测学报，2020，11(23)：9033-9038.
LI K W，LIU S J，ZHAO W，et al. Analysis of monitoring results of foodborne pathogens in 9274 meat and meat products[J]. Journal of Food Safety & Quality，2020，11(23)：9033-9038.(in Chinese)

[9] 陈伟冰，李柏生，李振翠，等. 广东省茂名市2017—2018年空肠弯曲菌食品分离株病原特征[J]. 中国热带医学，2020，20(5)：452-455.
CHEN W B，LI B S，LI Z C，et al. Pathogenic characteristics of food isolates of *Campylobacter jejuni* in Maoming，Guangdong，2017-2018 [J]. China Tropical Medicine，2020，20(5)：452-455.(in Chinese)

[10] 冯志宽，殷文政，杨荣杰，等. 乳源性金黄色葡萄球菌的分离及耐药特性[J]. 食品工业，2012，33(6)：102-104.
FENG Z K，YIN W Z，YANG R J，et al. Isolations of the *Staphylococcus aureus* from milk and their resistance characteristics to given antibacterial drugs[J]. The Food Industry，2012，33(6)：102-104.(in Chinese)

[11] NOLIVOS S，CAYRON J，DEDIEU A，et al. Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer[J]. Science，2019，364(6442)：778-782.

[12] NIDAULLAH H，ABIRAMI N，SHAMILA-SYUHADA A K，et al. Prevalence of *Salmonella* in poultry processing environments in wet markets in Penang and Perlis，Malaysia[J]. Veterinary World，2017，10(3)：286-292.

[13] CHMIELEWSKI R A N，FRANK J F. Biofilm formation and control in food processing facilities [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety，2003，2(1)：22-32.

[14] 许小红，吴春笃，宁德刚，等. 菜市场污水中细菌多样性检测分析[J]. 中国公共卫生，2009，25(6)：731-733.
XU X H，WU C D，NING D G，et al. Technique for bacterial detection in food market sewage[J]. Chinese Journal of Public Health，2009，25(6)：731-733.(in Chinese)

[15] GIBSON M K，CROFTS T S，DANTAS G. Antibiotics and the developing infant gut microbiota and resistome [J]. Current Opinion in Microbiology，2015，27：51-56.

[16] WANG Y T，LIN Y T，WAN T W，et al. Distribution of antibiotic resistance genes among *Staphylococcus* species isolated from ready-to-eat foods[J]. Journal of Food and Drug Analysis，2019，27(4)：841-848.

[17] KIM T W，KIM Y H，KIM S E，et al. Identification and distribution of *Bacillus* species in doenjang by whole-cell protein patterns and 16S rRNA gene sequence analysis [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology，2010，20(8)：1210-1214.

[18] ALTSCHUL S F，GISH W，MILLER W，et al. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology，1990，215(3)：403-410.

[19] ZHANG P，SHEN Z Q，ZHANG C P，et al. Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* from chicken and swine，China，2008-2015[J]. Veterinary Microbiology，2017，203：49-55.

[20] BASS L，LIEBERT C A，LEE M D，et al. Incidence and characterization of integrons，genetic elements mediating multiple-drug resistance，in avian *Escherichia coli*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy，1999，43(12)：2925-2929.

[21] 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.

[22] WALIA S，RANA S W，MAUE D，et al. Prevalence of multiple antibiotic-resistant Gram-negative bacteria on bagged，ready-to-eat baby spinach [J]. International Journal of Environmental Health Research，2013，23(2)：108-118.

[23] TADESSE D A，ZHAO S H，TONG E，et al. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals，United States，1950-2002[J]. Emerging Infectious Diseases，2012，18(5)：741-749.

[24] DAVIS G S，WAITS K，NORDSTROM L，et al. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims [J]. BMC Microbiology，2018，18(1)：174.

[25] ONAKOYA O M，SABA A B. Bacterial resistance to the tetracyclines and antimicrobial therapeutics：a review[J].

Tropical Veterinarian，2012，30(1)：1-16.

[26] LYU J J，JEONG J B，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(1/2/3/4)：89-100.

[27] COURVALIN P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy，1994，38(7)：1447-1451.

[28] 高远，王兰茜，张丽娜，等. 广州市农贸市场猪肉源伦敦沙门菌的流行情况及耐药性分析[J]. 畜牧兽医学报，2021，52(2)：488-497.
GAO Y，WANG L X，ZHANG L N，et al. Characterization of prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* enterica serovar London from markets in Guangzhou [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica，2021，52(2)：488-497.(in Chinese)

[29] JIANG H，CHENG H，LIANG Y，et al. Diverse mobile genetic elements and conjugal transferability of sulfonamide resistance genes (*sul1*，*sul2*，and *sul3*) in *Escherichia coli* isolates from *Penaeus vannamei* and pork from large markets in Zhejiang，China[J]. Frontiers in Microbiology，2019，10：1787.

[30] 冯涛. 狐源大肠杆菌耐药性及耐药基因的研究[D]. 哈尔滨：东北林业大学，2021.

[31] ROY P H. Horizontal transfer of genes in bacteria[J]. Microbiology Today，1999，26：168-171.

[32] 段玉平，徐兴然，曾忠良，等. 猪源大肠杆菌整合子与耐药性的相关性研究[J]. 中国兽药杂志，2009，43(5)：24-26.
DUAN Y P，XU X R，ZENG Z L，et al. Investigation of the relationship between integrons and resistance of *E. coli* from swine farms [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug，2009，43(5)：24-26.(in Chinese)

[33] CAVICCHIO L，DOTTO G，GIACOMELLI M，et al. Class 1 and class 2 integrons in avian pathogenic *Escherichia coli* from poultry in Italy [J]. Poultry Science，2015，94(6)：1202-1208.

[34] 李成忠，王红宁，黄勇，等. 多重耐药鸡致病性沙门氏菌I类整合子的检测研究[J]. 中国畜牧兽医，2007，34(1)：119-123.
LI C Z，WANG H N，HUANG Y，et al. Study on detection I integron of multidrug resistace pathogenic *Salmonella* from chicken [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine，2007，34(1)：119-123.(in Chinese)

[35] LANGATA L M，MAINGI J M，MUSONYE H A，et al. Antimicrobial resistance genes in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from chicken droppings in Nairobi，Kenya[J]. BMC Research Notes，2019，12(1)：22.

[36] 陆光武. 鸡、猪、奶牛源大肠杆菌的耐药性与其I类整合子和质粒相关性研究[D]. 扬州：扬州大学，2016.

[37] LIU Y Y，CHEN S，BURRUS V，et al. Editorial：Globally or regionally spread of epidemic plasmids carrying clinically important resistance genes：epidemiology，molecular mechanism，and drivers [J]. Frontiers in Microbiology，2021，12：822802.

[38] HUMMEL A，HOLZAPFEL W H，FRANZ C M A P. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from *Enterococci* isolated from food[J]. Systematic and Applied Microbiology，2007，30(1)：1-7.

[39] 刘秘，李万翔，李世荣. 整合子与细菌耐药性的相关研究进展[J]. 中国微生态学杂志，2020，32(4)：465-468.
LIU M，LI W X，LI S R. Progress in researches on bacterial integrons in antibiotic resistance [J]. Chinese Journal of Microecology，2020，32(4)：465-468.(in Chinese)