

动物源性食品中抗生素残留、耐药细菌的分布及耐药基因的水平传播

唐艳红¹, 罗双群¹, 杨梦冉¹, 许利娜¹, 万 峥¹, 曹志敏¹, 陈 红^{2,3}, 姜晓冰^{2*}

(1. 漯河食品职业学院食品检测系, 漯河 462021; 2. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007;
3. 河南双汇投资发展股份有限公司, 漯河 462000)

摘 要: 目的 考查动物源性食品中抗生素的残留、耐药细菌的分布及抗生素对耐药基因水平转移的影响。

方法 利用盐析辅助液萃取-高效液相色谱-串联质谱法对市售动物源性食品中 18 种抗生素的含量进行检测; 对样品中的需氧菌进行分离鉴定, 利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术调查耐药基因的分布, 以 *qnrS* 阳性菌株为供体菌、大肠杆菌 J53 为受体菌进行接合转移试验, 调查抗生素胁迫对耐药基因水平传播的影响。**结果** 50 份动物源性食品中检出环丙沙星、恩诺沙星、土霉素、金霉素、磺胺嘧啶和磺胺二甲嘧啶。从 50 份样品共筛选出 162 株细菌, 其中假单胞菌属、肠杆菌属、大肠杆菌和柠檬酸杆菌属所占比例较大, 分别为 17.28%、16.05%、14.81%和 13.58%。药敏试验结果显示 162 株分离株对 5 种受试抗生素均表现出不同程度的耐药性, 其中对四环素和磺胺甲基异恶唑的耐药率较高, 分别为 52.47%和 51.23%。在 3 种喹诺酮类耐药基因中, *qnrS* 检出率最高(15/162, 9.26%); 在 3 种磺胺类耐药基因中, *sulI* 检出率最高(38/162, 23.46%); 在 5 种四环素类耐药基因中, *tetM* 的检出率最高(28/162, 17.28%)。以 *qnrS* 阳性菌株为供体菌、大肠杆菌 J53 为受体菌进行接合转移试验。在环丙沙星胁迫下, 3 株供体菌中耐药基因, *qnrS* 的接合转移率均高于对照组。**结论** 动物源性食品中喹诺酮类、磺胺类和四环素类抗生素均有不同程度的残留, 耐药菌株和耐药基因在动物源性食品中分布较为广泛, 亚抑菌浓度抗生素促进耐药基因的接合转移。

关键词: 动物源性食品; 抗生素残留; 耐药细菌; 耐药基因; 水平转移

Antibiotic residue, distribution of antibiotic resistant isolates and horizontal transfer of resistance genes in foods of animal origin

TANG Yan-Hong¹, LUO Shuang-Qun¹, YANG Meng-Ran¹, XU Li-Na¹, WAN Zheng¹,
CAO Zhi-Min¹, CHEN Hong^{2,3}, JIANG Xiao-Bing^{2*}

(1. Department of Food Testing, Luohe Food Vocational College, Luohe 462021, China; 2. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 3. Henan Shuanghui Investment & Development Co., Ltd., Luohe 462000, China)

ABSTRACT: Objective To investigate antibiotic residue, distribution of antibiotic resistant isolates and horizontal transfer of antibiotic resistance genes in foods of animal origin. **Methods** Salting-out assisted liquid-liquid extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry were used to quantity 18 kinds of

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(23A550013)

Fund: Supported by the Key Project of Natural Science of the Education Department of Henan Province (23A550013)

*通信作者: 姜晓冰, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 2014001@htu.edu.cn

*Corresponding author: JIANG Xiao-Bing, Ph.D, Associate Professor, Henan Normal University, No.46, Jianshe Road, Muye District, Xinxiang 453007, China. E-mail: 2014001@htu.edu.cn

antibiotics in commercial foods of animal origin. Aerobic bacteria were identified from food samples and antibiotic genes were detected by polymerase chain reaction (PCR). Conjugative experiment was performed by using *qnrS* positive isolates as donors and *Escherichia coli* J53 as recipient to assess effects of antibiotic on horizontal transfer of antibiotic genes. **Results** Ciprofloxacin, enrofloxacin, oxytetracycline, chlortetracycline, sulfadiazine and sulfadimidine were detected in 50 food samples of animal origin. A total of 162 strains of bacteria were screened from 50 samples, among which, *Pseudomons*, *Enterobacter*, *Escherichia coli* and *Citrobacter* accounted for a larger proportion. Drug sensitivity testing results showed that 162 isolates exhibited varying degrees of resistance to 5 kinds of antibiotics tested in this study, with higher resistance to tetracycline and sulfamethoxazole. *qnrS* (15/162, 9.26%) was the most prevalent among 3 kinds of quinolone resistance genes; *sulI* (38/162, 23.46%) was the most prevalent among 3 kinds of sulfonamide resistance genes; and *tetM* (28/162, 17.28%) was the most prevalent among 5 kinds of tetracycline resistance genes. When exposed to ciprofloxacin, the conjugation frequency of *qnrS* from 3 donors was higher than that in control group. **Conclusions** There are different degrees of residues of quinolones, sulfonamides and tetracycline in foods of animal origin. Antibiotic resistance isolates and resistance genes are widely distributed in foods of animal origin. Antibiotic at sub-inhibitory concentrations can facilitate the transferability of resistance genes.

KEY WORDS: foods of animal origin; antibiotic residue; antibiotic resistant isolates; antibiotic resistance genes; horizontal transfer

0 引言

抗生素不仅可以预防和治疗动物疾病,还可以促进动物生长,因此被广泛应用于畜禽养殖业。我国每年生产的抗生素有近一半是用于畜牧养殖业^[1-2]。严重依赖甚至过度使用抗生素导致了动物源性食品两大安全问题:抗生素残留和细菌耐药性。抗生素进入动物体后,一部分药物原形及其代谢产物会在动物机体内残留,而残留抗生素通过食物摄入进入人体后将对人类健康造成严重威胁^[3-5]。另一方面,抗生素在畜牧养殖业中的广泛应用也加剧了动物源性食品中细菌耐药性问题^[6-10]。近年来,国内外已陆续报道从生肉样品中分离到耐药甚至是多重耐药菌株^[11-14]。这些研究结果表明动物源性食品已经成为耐药菌株和耐药基因的潜在储蓄室,耐药菌株可以通过食物链进入人体,耐药菌株携带的耐药基因可以通过基因水平转移传递给其他菌株,从而导致耐药性在细菌之间传播^[11-13]。以往针对动物源性食品安全性的研究可分为两类,一类仅检测样品中的抗生素残留,另一类仅调查样品中耐药细菌和耐药基因的分布。这两类研究缺乏系统性,在全面评估食品样本安全性方面仍存在局限性。随着动物源性食品在我国居民膳食结构中的比重不断增加,消费者对此类食品的安全要求越来越高。因此,加强对动物源性食品中抗生素残留的监测对保障食品质量安全具有重要意义。调查发现,动物源性食品中残留的抗生素主要包括四环素类、磺胺类、喹诺酮类等^[15-17]。

目前,食品中抗生素残留的检测方法主要为高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和高效液相色谱-串联质谱法(high performance

liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[18-20]。与前者相比,HPLC-MS/MS 的灵敏度更高,特异性更强。食品样品的前处理技术主要有固相萃取(solid phase extraction, SPE)、液液萃取(liquid-liquid extraction, LLE)和盐析辅助液液萃取(salting-out assisted liquid-liquid extraction, SALLE)。其中 SALLE 是利用盐使均相混合溶液产生相转变分离现象同时萃取目标分析物的新型液液萃取法,该方法操作简单快速、萃取效率高^[21-23]。目前,SALLE 法已在牛奶、蜂蜜、环境水体中抗生素残留的检测方面得到应用^[22-23]。鉴于 SALLE 法的优越性,本研究将采用 SALLE 法对动物源性食品样品进行前处理,并结合 HPLC-MS/MS 检测动物源性食品样品中 18 种抗生素的残留。在此基础上,对动物源性食品样品中的需氧菌进行分离鉴定,检测菌株对四环素、磺胺甲基异恶唑、环丙沙星、诺氟沙星和氧氟沙星的耐药性,并调查 11 种耐药基因的分布情况及亚抑菌浓度抗生素对耐药基因水平传播的影响,为食品中抗生素残留风险监测评估提供数据支持,同时也为动物源性食品中耐药菌的预防和控制提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

动物源性食品:2020 年 1 月至 5 月从河南省某市不同超市和农贸市场随机采集市售新鲜猪肉 27 份、牛肉 23 份,每份样品不少于 100 g。接合转移试验中所用受体菌株大肠杆菌 J53Az^r由上海华山医院王明贵教授惠赠,供体菌株肺炎克雷伯菌 12-3、恶臭假单胞菌 8-5 和弗氏柠檬酸杆菌 32-4 由本研究从动物源性食品样品中分离得到。

环丙沙星(纯度 $\geq 98\%$)、恩诺沙星(纯度 $\geq 99\%$)、诺氟沙星(纯度 $\geq 98\%$)、氧氟沙星(纯度 $\geq 99\%$)、洛美沙星(纯度 $\geq 98\%$)、氟罗沙星(纯度 $\geq 98\%$)、培氟沙星(纯度 $\geq 98\%$)、磺胺嘧啶(纯度 $\geq 99\%$)、磺胺甲基异恶唑(纯度 $\geq 98\%$)、磺胺甲基嘧啶(纯度 $\geq 99\%$)、磺胺二甲嘧啶(纯度 $\geq 98\%$)、磺胺邻二甲氧嘧啶(纯度 $\geq 98\%$)、磺胺吡啶(纯度 $\geq 99\%$)、磺胺二甲氧(纯度 $\geq 98\%$)、磺胺甲氧嗪(纯度 $\geq 98\%$)、四环素(纯度 $\geq 98\%$)、土霉素(纯度 $\geq 95\%$)、金霉素(纯度 $\geq 98\%$)(美国 Sigma 公司); 甲醇、甲酸、乙腈(色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 乙酸乙酯、磷酸氢二钠、柠檬酸、乙二胺四乙酸二钠(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、硫酸铵、草酸铵(分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 营养琼脂培养基、脑心浸出液肉汤培养基、Luria-Bertani (LB)培养基、水解酪蛋白胨培养基、胰酪大豆胨琼脂(tryptic soy agar, TSA)培养基(广东环凯微生物技术有限公司); 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增试剂(大连宝生物工程有限公司); 扩增引物(上海英骏生物技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

BA-2S 拍击式均质器(上海本昂科学仪器有限公司); N-EVAP-45 氮吹仪(美国 Organomation 公司); PL303 电子天平(感量 0.0001 g, 瑞士 Mettler Toledo 公司); MX-S 漩涡混合器(大龙兴创实验仪器股份公司); KQ2200 超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); CHA-S 振荡器(江苏宏华仪器厂); CR22G 高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司); TSQ Quantum 高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ETC811 基因扩增仪(北京东胜创新生物科技有限公司); DYCP-32C 电泳仪(北京市六一仪器厂); ChemiDoc XRS+凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司); Waters Atlantis C₁₈ 色谱柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m, 美国 Waters 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的配制

准确称取喹诺酮类、磺胺类和四环素类抗生素标准品 10 mg, 用甲醇溶解并定容至 100 mL, 配制成 100 mg/L 的标准储备液。根据需要用体积分数 50%的乙腈水溶液稀释, 配制成不同质量浓度的混合标准工作液。

1.3.2 样品前处理

取适量新鲜样品绞碎并使均质。称取 5 g 均质后的样品置于 50 mL 离心管中, 加入 EDTA $\cdot$ 2Na-McIlvaine 缓冲溶液 20 mL, 涡旋 1 min, 振荡 10 min。然后加入 5 mL 乙腈, 置于振荡器上振荡混匀 15 min。再加入 1.32 g 硫酸铵, 涡旋混匀后于 4500 r/min 离心 5 min, 将上清液转移至离心管中, 氮气吹干。加入 1 mL 50%乙腈水溶液, 混匀, 过 0.22 μ m 滤膜, 滤液待测定。

1.3.3 基质标准溶液的制备

制备空白基质溶液, 并以其为溶剂配制成质量浓度为 2、10、50、100、250 和 500 μ g/L 的系列混合基质标准溶液。

1.3.4 HPLC-MS/MS 检测条件

(1)色谱条件

色谱柱: Waters Atlantis C₁₈ (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m); 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 进样体积: 10 μ L; 流速: 0.3 mL/min; 流动相: A 为 0.1%甲酸水溶液, B 为甲醇: 乙腈(2:8, 含 0.1%甲酸, 体积比)溶液, 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions of mobile phase

时间/min	φ (A)/%	φ (B)/%
0	95	5
2.0	85	15
5.0	60	40
7.0	5	95
7.1	95	5
9.0	95	5

(2)质谱条件

电离方式: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测; 离子源温度: 100 $^{\circ}$ C, 详见表 2。

表 2 保留时间与质谱参数
Table 2 Retention time and mass spectrometry parameters

药物	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/eV
环丙沙星	7.63	332	314*, 231	19, 24
恩诺沙星	7.71	360	316*, 245	20, 26
诺氟沙星	7.52	320	276*, 233	24, 16
氧氟沙星	7.23	362	318*, 261	18, 27
洛美沙星	7.87	352	308*, 265	16, 22
氟罗沙星	6.97	370	326*, 269	19, 25
培氟沙星	7.39	334	316*, 290	20, 18
磺胺嘧啶	1.65	251	156*, 108	15, 20
磺胺甲基异恶唑	3.62	254	156*, 108	16, 22
磺胺甲基嘧啶	2.23	265	156*, 172	17, 16
磺胺二甲嘧啶	2.84	279	156*, 186	18, 16
磺胺邻二甲氧嘧啶	4.38	311	156*, 108	20, 24
磺胺吡啶	2.08	245	156*, 184	18, 17
磺胺二甲氧	3.84	311	245*, 156	18, 20
磺胺甲氧嗪	3.03	281	156*, 126	16, 19
四环素	3.33	445	410*, 427	19, 13
土霉素	3.29	461	426*, 443	20, 15
金霉素	4.31	479	442*, 462	22, 19

注: *代表定量离子。

1.3.5 动物源性食品中细菌的分离与鉴定

动物性食品样品中需氧菌的分离纯化参照文献进行^[24]。以菌株的基因组 DNA 为模板,选用细菌通用引物 27F/1492R 进行 PCR 鉴定^[25]。PCR 产物送至浙江尚亚生物技术有限公司进行 DNA 序列双向测序,测序结果登陆 GenBank 数据库进行比对确定菌株的种属,同时对菌株进行生理生化鉴定。

1.3.6 抗菌药物敏感性试验

采用琼脂二倍稀释法检测菌株对环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、磺胺甲异恶唑和四环素的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),按照美国临床实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI)推荐的标准判断药敏结果。菌株对抗生素的耐药折点见表 3。

1.3.7 耐药基因的检测

所有菌株分别经 PCR 扩增检测喹诺酮类、磺胺类和四环素类耐药基因,引物序列及扩增条件见表 4。喹诺酮类耐药菌株还需进一步扩增 *gyrA* 和 *parC* 基因,扩增产物经测序后与 GenBank 数据库进行同源性分析,以确定这两个基因喹诺酮耐药决定区(quinolone resistance-determining region, QRDR)的突变情况。

表 3 细菌对抗生素的耐药折点
Table 3 Breakpoints of antibiotics against bacteria

抗生素	耐药折点/(μg/mL)			
	肠杆菌科	假单胞菌科	弧菌科	革兰氏阳性菌
环丙沙星	4	4	4	4
氧氟沙星	16	8	8	4
诺氟沙星	8	16		16
磺胺甲异恶唑	512	512	512	512
四环素	16	16	16	16

1.3.8 亚抑菌浓度抗生素对耐药质粒接合转移的影响

供体菌包括肺炎克雷伯菌 12-3、恶臭假单胞菌 8-5 和弗氏柠檬酸杆菌 32-4,这 3 株供体菌均携带质粒介导喹诺酮耐药基因 *qnrS*。受体菌为大肠杆菌 J53Az⁺(叠氮钠耐药菌株)。分别吸取供体菌和受体菌各 0.5 mL,加入至 4 mL 含有环丙沙星(0.06 μg/mL)的 LB 液体培养基中,另设不含抗生素 LB 为对照组,37℃静止过夜培养。培养好的菌液涂布在含有叠氮钠(150 μg/mL)和环丙沙星(0.06 μg/mL)的 TSA 平板上筛选接合子并计数。筛选出的接合子还需 PCR 检测确认是否含有与供体菌相同的耐药基因以及 QRDR 突变情况。

表 4 本研究所用引物
Table 4 Primers used in this study

基因	引物	序列(5'-3')	来源
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	[25]
	1492R	GGTTACCTGTACGACTT	
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> -F	TCAGCAAGAGGATTCTCA	[26]
	<i>qnrA</i> -R	GGCAGCACTATTACTCCCA	
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> -F	ATGACGCCATTACTGTATAA	[26]
	<i>qnrB</i> -R	GATCGCAATGTGTGAAGTTT	
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> -F	ACCTTCACCGCTTGCACATT	[26]
	<i>qnrS</i> -R	CCAGTGCTTCGAGAATCAGT	
<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> -F	AGTGTAATTGTTGCCCG	本研究
	<i>gyrA</i> -R	ATATCGCCATCAACCGA	
<i>parC</i>	<i>parC</i> -F	GAACGTGCGCTTCCAGA	本研究
	<i>parC</i> -R	GTTGCATAACCAGCGGA	
<i>sul1</i>	<i>sul1</i> -F	TCACCGAGGACTCCTTCTTC	[27]
	<i>sul1</i> -R	CAGTCCGCCTCAGCAATATC	
<i>sul2</i>	<i>sul2</i> -F	CCTGTTTCGTCCGACACAGA	[27]
	<i>sul2</i> -R	GAAGCGCAGCCGCAATTCAT	
<i>sul3</i>	<i>sul3</i> -F	CGAGATTTACATCGGTTCC	[27]
	<i>sul3</i> -R	TTGCTGCTTTAGTTGAGGCT	
<i>tetA</i>	<i>tetA</i> -F	GGCCTCAATTCTCTGACG	[27]
	<i>tetA</i> -R	AAGCAGGATGTAGCCTGTGC	
<i>tetB</i>	<i>tetB</i> -F	GAGACGCAATCGAATTCGG	[27]
	<i>tetB</i> -R	TTTAGTGCTATTCTTCTGCC	
<i>tetC</i>	<i>tetC</i> -F	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	[27]
	<i>tetC</i> -R	ATGGTCGTCATCTACCTGCC	
<i>tetM</i>	<i>tetM</i> -F	GTGGACAAAGGTACAACGAG	[27]
	<i>tetM</i> -R	CGGTAAAGTTCGTCACACAC	
<i>tetS</i>	<i>tetS</i> -F	CATAGACAAGCCGTTGACC	[27]
	<i>tetS</i> -R	ATGTTTTTGAACGCCAGAG	

1.4 数据处理

利用 Excel 2010 软件对抗生素浓度与定量离子对色谱峰面积数据进行线性趋势分析, 并得到线性方程和相关系数。利用 Excel 2010 软件计算样品加标回收率数据的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。利用 Origin 8.0 软件对耐药基因检出率数据进行处理及绘图。

2 结果与分析

2.1 动物源性食品中抗生素检测方法学验证

分别称取适量抗生素系列混合基质标准溶液上机进行测定。以标准溶液的质量浓度为横坐标(X), 定量离子对色谱峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线并求得回归方程, 18 种抗生素的标准曲线方程和相关系数见表 5。结果表明, 抗生素的质量浓度在 0~500 ng/mL 范围内线性良好, 相关系数均大于 0.9900。根据国际纯粹与应用化学联合会对检出限的定义, 本研究在空白样品中添加低浓度的混合标准溶液上机检测, 以信噪比为 3 所对应的浓度计算检出限。结果显示, 本研究建立的检测方法对 18 种抗生素的检出限为 1~5 $\mu\text{g/kg}$ 。

取 5 g 不含抗生素药物的空白样品, 向样品中添加混合标准溶液, 终浓度分别为 5、10 和 50 $\mu\text{g/kg}$, 每个添加水平作 6 份平行测定。按照本研究建立的检测方法测定抗生素含量并计算该方法的回收率和精密度。由表 6 可知, 本

方法的平均回收率为 85.8%~104.1%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 2.21%~9.24%, 表明检测方法重现性很好, 满足残留分析的要求。

表 5 18 种抗生素的线性方程及检出限
表 5 Linear equations and limit of detection of 18 kinds of antibiotics

药物	线性方程	检出限/($\mu\text{g/kg}$)
环丙沙星	$Y=1711X+495$	2.0
恩诺沙星	$Y=1800X+3258$	1.0
诺氟沙星	$Y=1108X+4500$	1.0
氧氟沙星	$Y=232X+64$	2.0
洛美沙星	$Y=961X+78$	2.5
氟罗沙星	$Y=1087X-129$	1.0
培氟沙星	$Y=544X+469$	1.0
磺胺嘧啶	$Y=1536X-126$	1.5
磺胺甲基异恶唑	$Y=407X-82$	2.0
磺胺甲基嘧啶	$Y=780X-160$	2.0
磺胺二甲嘧啶	$Y=327X-85$	2.0
磺胺邻二甲氧嘧啶	$Y=257X+110$	5.0
磺胺吡啶	$Y=560X+62$	1.0
磺胺二甲氧	$Y=211X+18$	2.0
磺胺甲氧嗪	$Y=527X+93$	2.0
四环素	$Y=517X+92$	5.0
土霉素	$Y=132X+32$	5.0
金霉素	$Y=523X-17$	5.0

表 6 样品加标回收率和相对标准偏差($n=6$)
表 6 Recoveries of the spiked standard and relative standard deviation ($n=6$)

药物	5 $\mu\text{g/kg}$		10 $\mu\text{g/kg}$		50 $\mu\text{g/kg}$	
	平均回收率/%	RSDs/%	平均回收率/%	RSDs/%	平均回收率/%	RSDs/%
环丙沙星	91.8	7.25	93.6	6.78	92.8	6.88
恩诺沙星	97.1	6.57	96.2	5.78	98.2	3.59
诺氟沙星	92.1	4.32	95.8	2.34	94.3	3.09
氧氟沙星	88.3	9.24	91.2	5.63	94.3	6.15
洛美沙星	87.9	4.62	92.1	2.56	93.2	2.98
氟罗沙星	90.7	5.31	97.1	5.10	96.2	4.83
培氟沙星	88.5	6.72	91.4	5.23	97.5	2.56
磺胺嘧啶	85.8	6.71	92.1	4.98	98.2	2.89
磺胺甲基异恶唑	90.3	8.12	93.5	6.75	94.3	5.12
磺胺甲基嘧啶	90.5	5.23	97.1	5.03	96.4	4.78
磺胺二甲嘧啶	86.7	7.12	92.3	3.45	96.5	4.21
磺胺邻二甲氧嘧啶	91.2	6.12	102.4	4.62	104.1	3.75
磺胺吡啶	92.4	4.21	96.1	2.35	94.2	3.14
磺胺二甲氧	92.6	4.52	95.8	4.38	102.3	5.63
磺胺甲氧嗪	90.1	4.89	95.0	3.33	94.3	3.09
四环素	95.4	4.52	96.7	2.53	95.3	2.21
土霉素	98.1	4.92	93.4	2.81	98.7	2.39
金霉素	97.5	4.18	95.2	5.36	100.4	3.62

动物源性食品样品成分复杂, 基质干扰大, 因此选择合适的样品前处理方法将直接影响样品中抗生素残留检测结果的准确度。本研究利用 SALLE 技术提取动物源性食品样品中的抗生素, 同时结合 HPLC-MS/MS 检测样品中抗生素的残留。本方法大大减少了有机溶剂的用量, 操作简单快速且灵敏度高, 能满足国内各项技术指标, 可用于动物源性食品中抗生素残留的验证检测。

2.2 动物源性食品样品中抗生素残留测定结果

本研究共检测 27 份猪肉及 23 份牛肉样品。18 种抗生素中环丙沙星、恩诺沙星、土霉素、金霉素、磺胺嘧啶和磺胺二甲嘧啶的总检出率分别为 4.0% (2/50)、6.0% (3/50)、10.0% (5/50)、12.0% (6/50)、8.0% (4/50) 和 16.0% (8/50), 浓度范围为 2.11~8.75 $\mu\text{g/kg}$, 其余抗生素均未检出。按照 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》规定, 所有样品中抗生素含量均未超标。其中猪肉中环丙沙星、恩诺沙星、土霉素、金霉素、磺胺嘧啶和磺胺二甲嘧啶的检出率分别为 7.4% (2/27)、7.4% (2/27)、11.1% (3/27)、7.4% (2/27)、7.4% (2/27) 和 18.5% (5/27); 牛肉中恩诺沙星、土霉素、金霉素、磺胺嘧啶和磺胺二甲嘧啶的检出率分别为 4.3% (1/23)、8.7% (2/23)、17.4% (4/23)、8.7% (2/23) 和 13.0% (3/23)。

畜禽养殖业中抗生素的广泛应用被认为是动物源性食品中抗生素残留的主要来源之一。本研究检测的 18 种抗生素分别属于四环素类、磺胺类和喹诺酮类, 其中磺胺类药物残留的检出率最高, 远高于上海市肉与肉制品中的检出率 3.16%^[28]。受检的 7 种喹诺酮类药物中仅有环丙沙星和恩诺沙星在样品中检出。卫瑾瑾等^[29]利用高效液相色谱-串联质谱法对 2019—2020 年河南省市售 345 份动物源性食品中喹诺酮类抗生素的残留量进行检测, 结果显示恩诺沙星和环丙沙星在生猪肉中的检出率分别为 11.1% 和 4.2%, 与本研究结果接近。

2.3 动物源性食品中细菌的分离与鉴定

动物源性食品中抗生素残留可能会影响食品中耐药细菌及耐药基因的分布^[6,8-9]。因此本研究对采集的动物源性食品样品中的细菌进行分离鉴定, 检测分离株对抗生素的耐药性以及耐药基因的分布情况。50 份样品共得到 162 株分离株(表 7)。这些分离株分别属于 11 个属, 其中有 16 株(9.88%)为革兰氏阳性菌, 包括 6 株芽孢杆菌和 10 株葡萄球菌属。在所有菌株中, 假单胞菌属(28 株, 17.28%)、肠杆菌属(26 株, 16.05%)、大肠杆菌(24 株, 14.81%)和柠檬酸杆菌属(22 株, 13.58%)所占比例较大, 为优势菌株。

2.4 药敏试验结果

从 18 种抗生素中选择分别代表喹诺酮类、磺胺类和四环素类抗生素的环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、磺胺

甲基异恶唑和四环素这 5 种用于药敏试验的检测, 这 5 种抗生素在养殖业中的应用时间长、应用范围广, 具有代表性。结果显示, 受试菌株对 5 种抗生素的耐药率依次为: 四环素(52.47%)、磺胺甲基异恶唑(51.23%)、环丙沙星(38.89%)、诺氟沙星(30.86%)和氧氟沙星(26.54%)(表 7)。本研究中受试菌株对四环素和磺胺甲基异恶唑的耐药率均超过 50%, 这可能与这两种抗生素在养殖业中长期大量使用有关。

本研究对抗生素残留阳性样品和阴性样品中细菌的耐药性进行分析对比, 发现两组样品中耐药菌的分布没有明显差异。尽管有研究者推测抗生素残留会影响细菌耐药性, 但是关于两者之间的相关性目前尚无定论。TENDENCIA 等^[30]的研究发现使用恶唑酸的池塘水体和沉积物中多重耐药菌的占比(24%)明显高于未使用过抗生素的池塘(17%), 表明环境中抗生素的残留与细菌耐药性呈现正相关。而 ZHANG 等^[31]对我国高桥红树林区各站点水体和沉积物中抗生素残留和细菌耐药性之间的关系进行调查发现, 环境中残留量较高的抗生素, 细菌对其耐药性不一定高, 反之亦然。李艳芬等^[32]对河南省市售鸡肉中抗生素残留及大肠埃希菌耐药性进行调查, 结果显示所有样品均未检出抗生素残留, 但样品中分离的 300 株大肠埃希菌对 14 种抗生素却表现出不同程度的耐药(8.00%~86.33%), 其中多重耐药菌株的检出率高达 81.75%。

2.5 耐药基因检测结果

在 162 株分离株中, 1 株携带 *qnrA*, 4 株携带 *qnrB*, 15 株携带 *qnrS*。60 株喹诺酮耐药菌株的 *GyrA* 亚基均发生突变, 其中 38 株的 *ParC* 亚基发生突变。3 种磺胺类耐药基因中, *sulI* 的检出率最高(38/162, 23.46%); 四环素类耐药基因中, *tetM* 的检出率最高(28/162, 17.28%)(图 1)。

细菌对喹诺酮类药物的耐药机制主要包括 3 种: (1) DNA 促旋酶和拓扑异构酶 IV 的 QRDR 突变; (2) 主动外排系统表达增强; (3) 质粒介导的喹诺酮耐药(plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR)^[33]。已有的研究发现, DNA 促旋酶 *GyrA* 亚基和拓扑异构酶 IV *ParC* 亚基的 QRDR 突变介导细菌对喹诺酮类药物高水平耐药, 而 PMQR 基因的存在仅能使细菌对喹诺酮类药物产生低水平耐药。PMQR 基因的种类很多, 其中 *qnrA*、*qnrB* 和 *qnrS* 在食品样品中最为常见^[34]。本研究中 *qnrA*、*qnrB* 和 *qnrS* 均有检出, 其中 *qnrS* 的检出率最高。磺胺类和四环素类是畜禽养殖中常用的抗生素, 本研究中从动物源性食品中分离的菌株对这两类抗生素的耐药率最高, 这可能与长时间的药物暴露有关。在磺胺类和四环素类耐药基因中, *sulI* 和 *tetM* 的检出率较高, 这与 JIANG 等^[27]对肉制品样品的检测结果一致。

表 7 动物源性食品分离株对抗生素的药物敏感性
Table 7 Antibiotic susceptibility of isolates from foods of animal origin

菌株名称(数量)	耐药菌株数				
	环丙沙星	氧氟沙星	诺氟沙星	磺胺甲基异恶唑	四环素
肠杆菌科(105)	56	36	43	66	67
柠檬酸杆菌属(22)	12	7	10	10	14
肠杆菌属(26)	14	6	9	15	16
大肠杆菌(24)	12	7	8	20	18
肺炎克雷伯菌(15)	8	7	7	8	6
变形杆菌属(14)	8	8	8	9	9
志贺氏菌属(4)	2	1	1	4	4
假单胞菌科(28)	7	7	7	10	12
假单胞菌属(28)	7	7	7	10	12
弧菌科(13)	0	0	0	4	3
气单胞菌属(3)	0	0	0	1	0
弧菌属(10)	0	0	0	3	3
革兰氏阳性菌(16)	0	0	0	3	3
芽孢杆菌属(6)	0	0	0	0	0
葡萄球菌属(10)	0	0	0	3	3
合计	63	43	50	83	85

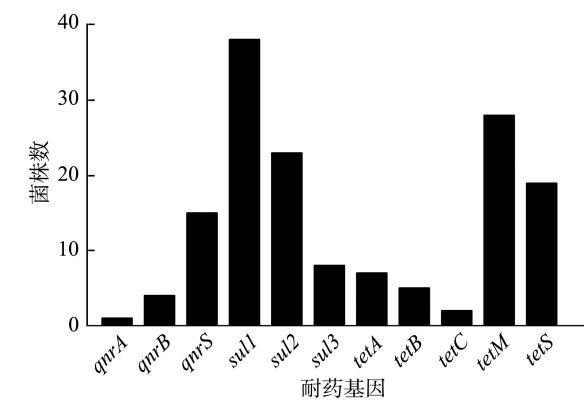


图1 耐药基因的检出率
Fig.1 Detection rates of antibiotic resistance genes

2.6 耐药基因的水平转移

细菌通过基因水平转移获得外源性耐药基因的方式称为获得性耐药。耐药基因能在质粒、转座子、整合子等可移动遗传元件的介导下进行水平转移并传播。而环境或

食品中残留的抗生素产生的选择压力被认为是抗生素耐药基因传播的主要原因^[10]。因此,本研究通过接合转移试验调查环丙沙星对质粒介导的喹诺酮耐药基因 *qnrS* 水平转移的影响。由表 8 可知,在环丙沙星胁迫下,肺炎克雷伯菌 12-3、恶臭假单胞菌 8-5 和弗氏柠檬酸杆菌 32-4 中耐药基因 *qnrS* 的接合转移率分别是无环丙沙星胁迫时的 71.3 倍、23.7 倍和 13.9 倍,表明环丙沙星的存在可提高耐药基因的接合转移效率。3 株供体菌的接合子分别记为 12-3T、8-5T 和 32-4T。PCR 检测结果显示,3 株接合子中均含有 *qnrS* 基因。接合转移是细菌耐药基因水平转移最容易发生、转移效率最高的方式,耐药基因的接合转移主要是由具有自主转移功能的接合质粒介导^[35]。本研究中,3 株 *qnrS* 阳性菌株均接合转移成功,表明在这些菌株中 *qnrS* 位于可接合性质粒上。更重要的是,在环丙沙星的胁迫下,供体菌的接合转移率明显升高,表明抗生素胁迫促进接合转移的发生,加剧耐药基因的传播。

表 8 耐药基因接合转移率
表 8 Conjugation frequency of antibiotic resistance genes

菌株	接合转移率		MIC/(μg/mL)			QRDR 突变	
	无环丙沙星	环丙沙星	环丙沙星	氧氟沙星	诺氟沙星	GyrA	ParC
肺炎克雷伯菌 12-3	8.17×10 ⁻⁵	5.83×10 ⁻³	4	8	8	S83L	WT
12-3T			0.5	0.5	0.5	WT	WT
恶臭假单胞菌 8-5	3.21×10 ⁻⁶	7.61×10 ⁻⁵	4	16	16	S83L	WT
8-5T			0.5	0.5	1	WT	WT
弗氏柠檬酸杆菌 32-4	4.53×10 ⁻⁵	6.28×10 ⁻⁴	16	32	16	S83L	S80I
32-4T			1	1	1	WT	WT
大肠杆菌 J53			0.008	0.016	0.016	WT	WT

注: T 表示接合子; 接合转移率=接合子菌落数/受体菌菌落数; S, 丝氨酸; L, 亮氨酸; I, 异亮氨酸。

3 结 论

抗生素在养殖业中的广泛应用导致动物源性食品中抗生素残留问题日益严重。抗生素选择性压力是导致和加速细菌耐药性产生的重要因素,因此动物源性食品中抗生素的残留与耐药细菌的分布关系密切。耐药细菌携带的一些耐药基因位于质粒、转座子等可移动遗传元件上,并且可以通过基因水平转移在不同菌株之间广泛传播。动物源性食品中残留的低浓度抗生素可能会促进耐药基因的水平传播,加剧细菌耐药性,严重威胁食品安全。本研究调查了 50 份动物源性食品中 18 种抗生素的残留、耐药细菌的分布及抗生素对耐药基因水平转移的影响,发现动物源性食品中喹诺酮类、磺胺类和四环素类抗生素均有不同程度的残留。50 份样品中共筛选出 162 株菌,这些菌株对 5 种抗生素的耐药率依次为:四环素、磺胺甲基异恶唑、环丙沙星、诺氟沙星和氧氟沙星。目前关于抗生素残留与细菌耐药性之间是否存在正相关关系尚无定论,本研究的结果显示两者之间并没有相关性。当菌株暴露在低浓度抗生素环境中时,其携带的耐药基因在不同种属细菌间的接合转移率提高,促进耐药基因和耐药性的传播。因此应严格控制动物源性食品中抗生素的残留,降低细菌耐药性传播的风险。

参考文献

- [1] ZHANG Q, ZHANG Y, ZHANG X, *et al.* Effects of dietary florfenicol contained feeds on growth and immunity of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) in flow-through and recirculating aquaculture system [J]. *Aquac Rep*, 2021, 19: 100602.
- [2] 姬书会, 邱孜博. 我国畜牧业中滥用抗生素的危害和对策[J]. *中国畜禽种业*, 2022, 18(12): 59–62.
JI SH, QIU ZB. Harm and countermeasures of antibiotic overuse in animal husbandry in China [J]. *J Chin Livest Poultry Breed* 2022, 18(12): 59–62.
- [3] GEORGAKAKOS C, HICKS B. Milk, meat, and manure: Farmer perceptions of antibiotic residue reservoirs [J]. *Hoard's Dairyman*, 2021, 166(12): 590–591.
- [4] RAHMAN MS, HASSAN MM, CHOWDHURY S. Determination of antibiotic residues in milk and assessment of human health risk in Bangladesh [J]. *Heliyon*, 2021, 7(8): e07739.
- [5] GAMBOA-CRUZ C, BARROS S, POUCA ASV, *et al.* Assessing antibiotic residues in piglet liver and kidney samples: How to manage the results obtained [J]. *Food Control*, 2021, 122: 107819.
- [6] HEMAMALINI N, SHANMUGAM SA, KATHIRVELPANDIAN A, *et al.* A critical review on the antimicrobial resistance, antibiotic residue and metagenomics-assisted antimicrobial resistance gene detection in freshwater aquaculture environment [J]. *Aquac Res*, 2022, 53(2): 344–366.
- [7] COSTA M, CARDO M, DANJO MC, *et al.* Assessing antimicrobial resistance occurrence in the Portuguese food system: Poultry, pigs and derived food, 2014–2018 [J]. *Zoonoses Public Health*, 2022, 69(4): 312–324.
- [8] CHOWDHURY S, GHOSH S, ALEEM MA, *et al.* Antibiotic usage and resistance in food animal production: What have we learned from Bangladesh? [J]. *Antibiotics*, 2021, 10(9): 1032.
- [9] 韩秉君, 牟美睿, 杨凤霞, 等. 畜禽养殖环境中抗生素抗性基因污染与扩散研究进展[J]. *农业环境与发展*, 2022, 39(3): 446–455.
HAN BJ, MU MR, YANG FX, *et al.* Progress of antibiotic resistance gene contamination and diffusion in livestock and poultry farming environments [J]. *Agro-Environ Dev*, 2022, 39(3): 446–455.
- [10] WINTERSDORFF CJ, PENDERS J, VAN NIEKERK JM, *et al.* Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 173.
- [11] HEIR E, MOEN B, ASLI AW, *et al.* Antibiotic resistance and phylogeny of *Pseudomonas* spp. isolated over three decades from chicken meat in the Norwegian food chain [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(2): 207.
- [12] YIN X, MIKANATHA NM, NYIRABAHIZI E, *et al.* Antimicrobial resistance in non-typhoidal *Salmonella* from retail poultry meat by antibiotic usage-related production claims—United States, 2008–2017 [J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 342: 109044.
- [13] FAYEMI OE, AKANNI GB, ELEGBELEYE JA, *et al.* Prevalence, characterization and antibiotic resistance of Shiga toxigenic *Escherichia coli* serogroups isolated from fresh beef and locally processed ready-to-eat meat products in Lagos, Nigeria [J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 347: 109191.
- [14] PAKBIN B, AMANI Z, ALLAHYARI S, *et al.* Genetic diversity and antibiotic resistance of *Shigella* spp. isolates from food products [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(11): 6362–6371.
- [15] 谭荣霞, 胡玉斐, 李攻科. 动物源性食品磺胺类抗生素残留快速前处理与检测方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(14): 4543–4549.
TAN RX, HU YF, LI GK. Research progress on rapid pretreatment and detection methods of sulfonamide antibiotic residues in animal-derived food [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(14): 4543–4549.
- [16] 李倩, 王甲, 张玉洁, 等. 动物性食品中喹诺酮类药物残留检测方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(8): 3016–3022.
LI Q, WANG J, ZHANG YJ, *et al.* Research progress on determination methods of quinolone residues in animal food [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(8): 3016–3022.
- [17] GIRMATSION M, MAHMUD A, ABRAHA B, *et al.* Rapid detection of antibiotic residues in animal products using surface-enhanced Raman spectroscopy: A review [J]. *Food Control*, 2021, 126: 108019.
- [18] CUI H, XIN K, YANG G. Determination of veterinary drug residues in animal-derived foods by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Agric Biotechnol*, 2023, 12(1): 84–86, 93.
- [19] 曹慧, 陈小珍, 朱岩, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱技术同时测定乳制品中磺胺类和喹诺酮类抗生素残留[J]. *食品科技*, 2013, 38(6): 323–329.
CAO H, CHEN XZ, ZHU Y, *et al.* Determination of sulfonamides and quinolones in milk by QuEChERS and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci Technol*, 2013, 38(6): 323–329.
- [20] 林津, 范小龙, 江丰, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定动物源食品中万古霉素类抗生素残留量[J]. *食品与机械*, 2020, 36(9): 67–71.

- LIN J, FAN XL, JIANG F, *et al.* Determination of vancomycin antibiotics residues in animal derived food by solid phase extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Mach, 2020, 36(9): 67–71.
- [21] KHATAEI MM, EPI SBH, LOOD R, *et al.* A review of green solvent extraction techniques and their use in antibiotic residue analysis [J]. J Pharmaceut Biomed, 2022, 209: 114487.
- [22] JAIN A, GUPTA M, VERMA KK. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for the determination of biogenic amines in fruit juices and alcoholic beverages after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate and high performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2015, 1422: 60–72.
- [23] GURE A, LARA FJ, MORENO-GONZÁLEZ D, *et al.* Salting-out assisted liquid-liquid extraction combined with capillary HPLC for the determination of sulfonyleurea herbicides in environmental water and banana juice samples [J]. Talanta, 2014, 127: 51–58.
- [24] 姜晓冰, 于涛, 孟赫诚, 等. 广州市售散装熟肉制品中细菌的耐药性及耐药基因研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(7): 63–68.
- JIANG XB, YU T, MENG HC, *et al.* The antimicrobial resistance and resistant genes in bacteria from bulk cooked meats in Guangzhou [J]. Mod Food Sci Technol, 2014, 30(7): 63–68.
- [25] HARUM H, YAN W, PURWANTO B, *et al.* Characterization of lactic acid bacteria and determination of antimicrobial activity in Dadih from Air Dingin Alahan Panjang District, Solok Regency-West Sumatera [J]. Sys Rev Pharm, 2020, 11(3): 583–586.
- [26] ROSHANI M, GOODARZI A, HASHEMI A, *et al.* Detection of *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* genes in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from leukemia patients [J]. Rev Res Med Microbiol, 2022, 33(1): 14–19.
- [27] JIANG X, SHI L. Distribution of tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance genes in aerobic bacteria isolated from cooked meat products in Guangzhou, China [J]. Food Control, 2012, 30(1): 30–34.
- [28] 罗宝章, 秦璐昕, 蔡华, 等. 上海市 2016—2020 年肉与肉制品中多种抗生素残留及风险[J]. 上海预防医学, 2021, 33(5): 377–379.
- LUO BZ, QIN LX, CAI H, *et al.* Health risk assessment of multiple antibiotic residues in meat and meat products in Shanghai from 2016 to 2020 [J]. Shanghai J Prev Med, 2021, 33(5): 377–379.
- [29] 卫瑾瑾, 鹿尘, 张正尧, 等. 河南省 2019 年-2020 年动物源性食品中喹诺酮类抗生素残留的监测分析及健康风险评估[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(9): 1138–1141.
- WEI JJ, LU C, ZHANG ZY, *et al.* Analysis of monitoring results and health risk assessment of quinolone antibiotic residues in animal-derived food from 2019 to 2020 in Henan Province [J]. Chin Health Lab Technol, 2022, 32(9): 1138–1141.
- [30] TENDENCIA EA, PENA LD. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds [J]. Aquaculture, 2001, 195(3–4): 193–204.
- [31] ZHANG Y, LI Y, SUN X. Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp hatcheries and cultural ponds on Donghai Island, China [J]. Mar Pollut Bull, 2011, 62(11): 2299–2307.
- [32] 李艳芬, 戚浩斌, 刘越, 等. 河南省市售鸡肉中抗生素残留及大肠埃希菌耐药性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(3): 432–436.
- LI YF, QI HY, LIU Y, *et al.* Identification of antibiotic residues, antibiotic resistant *Escherichia coli* in retail chicken of Henan Province [J]. Chin J Food Hyg, 2022, 34(3): 432–436.
- [33] KIM EY, KIM SH, KIM GR, *et al.* Characteristics of clonal complex changes and quinolone resistance-determining region mutations of levofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in South Korea [J]. Microbial Drug Resist, 2022, 28(5): 559–565.
- [34] YIN X, DUDLEY EG, PINTO CN, *et al.* Fluoroquinolone sales in food animals and quinolone resistance in non-typhoidal *Salmonella* from retail meats: United States, 2009–2018 [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2022, 29: 163–167.
- [35] WU S, WU Y, HUANG Q, *et al.* Insights into conjugative transfer of antibiotic resistance genes affected by soil minerals [J]. Eur J Soil Sci, 2021, 72(3): 1143–1153.

(责任编辑: 郑 丽 韩晓红)

作者简介



唐艳红, 副教授, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: tyh_2022@126.com



姜晓冰, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 2014001@htu.edu.cn