



专论与综述

食品中蜡样芽孢杆菌耐药性及其机制研究进展

李玲 刘耀 魏元苗 易伦朝 商颖* 曹建新*

昆明理工大学农业与食品学院 云南 昆明 650500

摘要: 蜡样芽孢杆菌是常见的食源性致病菌之一,其产生的毒素会引起食物中毒。蜡样芽孢杆菌主要引起2种类型的食物中毒,即呕吐和腹泻综合征,并可造成各种局部和全身感染。随着抗生素的广泛、大量使用,蜡样芽孢杆菌的耐药性不断增强,现已有报道出现多重耐药性。本文对蜡样芽孢杆菌的耐药现状及耐药性机制进行了综述,以期正确理解蜡样芽孢杆菌耐药性的特点及其规律,从而为防治蜡样芽孢杆菌耐药性的产生及合理用药提供理论依据。

关键词: 蜡样芽孢杆菌, 耐药性, 耐药机制

Research progress on antibiotic resistance of *Bacillus cereus* in the food chain

LI Ling LIU Yao WEI Yuanmiao YI Lunzhao SHANG Ying* CAO Jianxin*

Faculty of Agriculture and Food, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China

Abstract: The toxin-producing *Bacillus cereus* is among the common foodborne pathogens. It elicits two types of gastrointestinal illness: vomiting and diarrhoeal syndrome, and causes a variety of local and systemic infections. Due to the extensive use of antibiotics, the resistance of *B. cereus* has been enhanced, and multiple-antibiotic resistance has been reported. To gain a clear insight into the characteristics and rules of the antibiotic resistance of *B. cereus*, this paper reviewed the resistance status quo and the mechanism, which is expected to lay a theoretical basis for prevention and control of antibiotic resistance of the bacteria and rational use of antibiotics.

Keywords: *Bacillus cereus*, antibiotic resistance, resistance mechanism

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是一种芽孢形成、需氧或兼性厌氧的革兰氏阳性杆菌,几乎存在于所有物体表面,如食物、土壤和人体皮肤^[1]。由于其在自然环境中普遍分布,这种细菌构成了各种生食食品中永久性微生物区系的一部分,如谷类制品、乳和乳制品、水果、蔬菜、香

料及方便膳食制品等^[2]。芽孢杆菌是食品工业中广为人知的腐败生物,蜡样芽孢杆菌引起的食物污染可能发生在食物收获、加工、储存、制备和消费的任何阶段。据估计,其可导致乳制品工业高达30%的严重经济损失^[3]。蜡样芽孢杆菌也是一种公认的食源性致病菌,可经口腔、胃肠道消

Foundation item: Science and Technology Program of Yunnan Province (2018BC006)

*Corresponding authors: E-mail: SHANG Ying: Shangying1986@163.com; CAO Jianxin: jxcao321@hotmail.com

Received: 15-03-2021; Accepted: 08-06-2021; Published online: 25-06-2021

基金项目: 云南省科技计划项目(2018BC006)

*通信作者: E-mail: 商颖: Shangying1986@163.com; 曹建新: jxcao321@hotmail.com

收稿日期: 2021-03-15; 接受日期: 2021-06-08; 网络首发日期: 2021-06-25

化未煮熟或受污染的食物传播给人类,可引起人类 2 种类型的胃肠道疾病,即呕吐和腹泻综合征^[4]。除此以外,其还可引起人和动物的各种局部和全身感染,如脑膜炎、眼内炎、心内膜炎、败血症、骨感染、呼吸道感染等^[5-6]。图1揭示了蜡样芽孢杆菌通过食物进行传播的途径及临床表现。

蜡样芽孢杆菌导致的食源性疾病主要是由溶血性腹泻毒素(Hemolysin BL, HBL)、非溶血性肠毒素(Nonhemolytic Enterotoxin, NHE)、细胞毒素 K (Cytotoxin K, CytK)和一种诱发呕吐的毒素谷氨酰胺引起的^[7]。在胃肠道(小肠),营养细胞作为活细胞或孢子被摄取,产生和分泌一种蛋白质

肠毒素,引起腹泻综合征^[8];而呕吐毒素,是一种由质粒编码的环肽(谷氨酰胺),在食品中预先产生并被食用摄取^[9],从而导致呕吐综合征。据报道,包括鞘磷脂酶、外蛋白酶和溶血素在内的许多毒力因子与蜡样芽孢杆菌的致病性相关^[10-11]。近年来,随着抗生素的广泛、大量使用,蜡样芽孢杆菌的耐药性不断增强,已出现多重耐药性的报道。据估计,蜡样芽孢杆菌占全球所有食物中毒事件的 1.4%–12.0%^[4]。因此,了解蜡样芽孢杆菌的耐药现状、掌握蜡样芽孢杆菌的耐药趋势、研究蜡样芽孢杆菌的耐药机制,对蜡样芽孢杆菌引起的食源性疾病的预防和控制具有十分重要的意义。

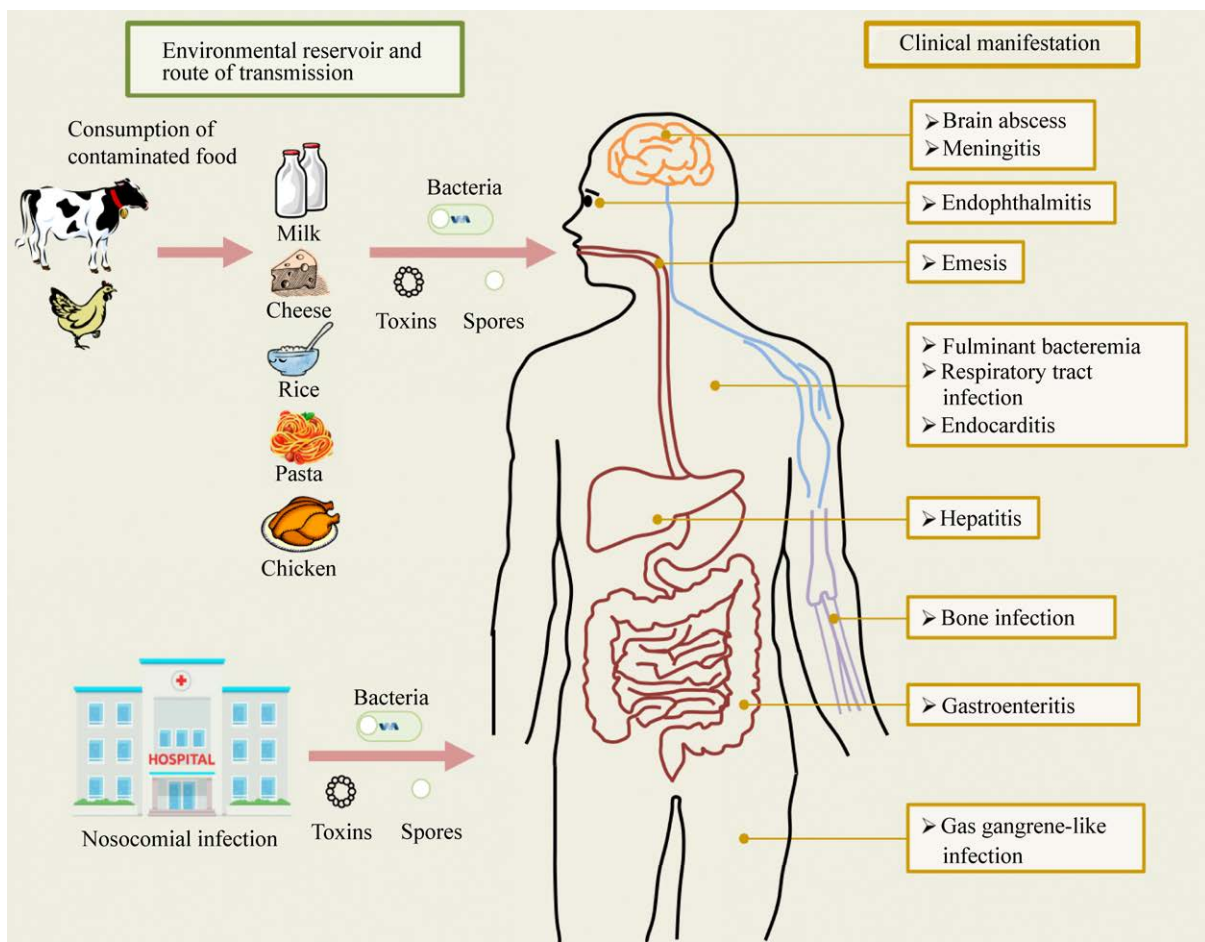


图1 蜡样芽孢杆菌传播途径及临床表现^[6]

Figure 1 Routes of transmission and clinical manifestations associated with *Bacillus cereus* infections^[6]

1 蜡样芽孢杆菌耐药性现状

抗生素的发现是世界医学史的一大进步,同时也是世界耐药性难题的开始。抗生素的过度使用,甚至不规范使用,导致细菌的耐药性随之出现,并形成了严峻的局面。耐药菌株的传播是一个严重的公共卫生问题,因为常规治疗的结果是无效的,这可能导致长期感染和增加患者的风险^[12]。因此,为了人类健康和食品安全,必须对食品中分离的蜡样芽孢杆菌的耐药性进行监测。国内外报道已从不同食品中检测到蜡样芽孢杆菌,并对这些病原菌进行了耐药谱系分析。

1.1 乳和乳制品中的耐药现状

因乳制品中含有较高的营养物质,使其特别适合各种细菌的生长,包括肠杆菌科、链球菌科和芽孢杆菌科。事实上,在奶牛场和牛奶加工过程中受到这些微生物污染后,可使菌落总数超标,特别是蜡样芽孢杆菌^[13]。蜡样芽孢杆菌易产生芽孢,而芽孢的高耐热性提高了其在热处理后的存活率;同时,芽孢较强的抗生素耐药性对抗生素和消毒剂的有效性产生了抑制作用,这可能是蜡样芽孢杆菌在奶制品中的污染率高于其他食源性病原体的重要原因^[14]。Yibar 等^[15]分析了2013年7月至12月期间从布尔萨省不同零售市场获得的259份全脂牛奶[原料、巴氏消毒法和超高温瞬时灭菌(Ultra-High Temperature Instantaneous Sterilization, UHT)法和奶酪];259份样品中有26份(10.04%)被蜡样芽孢杆菌污染,所有分离株对青霉素G耐药,但对奥霉素、红霉素和链霉素敏感;在研究中有7种不同模式的多重抗生素耐药性,并且84.2% ($n=16$)的蜡样芽孢杆菌分离株表现出多重耐药性。Ranjbar 等^[16]收集了300份婴幼儿乳制品进行检测,蜡样芽孢杆菌的检出率为3%,污染范围为12.5–41.5 CFU/g,细菌对青霉素、四环素和苯唑西林的耐药率最高,分别为100%、77.7%和66.6%。Gundogan 等^[17]对土耳其安卡拉3家不同乳制品加工厂的150份原料奶、

白奶酪和冰淇淋样品进行分析,蜡样芽孢杆菌的污染率分别为90%、70%和20%;蜡样芽孢杆菌对氨苄西林、青霉素、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑耐药,对头孢噻肟、氯霉素、环丙沙星、红霉素、庆大霉素、四环素敏感。Zhao 等^[18]从我国5个省市采集了500份样品进行分析,以期揭示从婴幼儿配方奶粉、原料奶、巴氏杀菌奶、超高温奶和奶酪等乳制品中分离出的蜡样芽孢杆菌的污染情况、分子特征和对抗生素的敏感性;检出蜡样芽孢杆菌54株,药敏试验表明,大部分蜡样芽孢杆菌对氨苄青霉素、青霉素、头孢吡肟、头孢菌素、苯唑西林耐药,对庆大霉素、氯霉素、亚胺培南、四环素、环丙沙星、甲氧苄胺嘧啶、红霉素、卡那霉素、头孢替坦敏感。

1.2 蔬菜类食品中的耐药现状

新鲜蔬菜富含维生素、矿物质、膳食纤维和多酚等物质;因此,食用新鲜蔬菜可以降低患糖尿病、肥胖症、心血管疾病和动脉粥样硬化等慢性病的风险^[19]。但国际上已报道多起食源性疾病暴发与生食新鲜蔬菜有关^[20]。在零售鲜菜产品微生物质量监测中,鲜菜中最常见的食源性致病菌是蜡样芽孢杆菌,污染率为37.5%^[21]。蔬菜一般种植在田间,与土壤接触,在运输和销售过程中与空气接触,因此,它们很容易被这种致病菌污染。Park 等^[22]报道了在韩国102份新鲜蔬菜样品中,有48份(47%)样品被蜡样芽孢杆菌污染(>10 CFU/g),其中7份(6.8%)样品污染大于 10^3 CFU/g;大多数新鲜蔬菜中分离的蜡样芽孢杆菌对青霉素(100%)、头孢噻肟(100%)和头孢曲松(77%–100%)具有耐药性。所有蜡样芽孢杆菌分离株对亚胺培南、万古霉素、庆大霉素、红霉素、环丙沙星和氯霉素敏感;而从紫苏叶中分离的19株(48.7%)、从生菜中分离的17株(40.5%)和从大蒜、韭菜中分离的11株(22.4%)蜡样芽孢杆菌对利福平产生抗性。3株从韭菜中分离的菌株对四环素和利福平均有抗性。Fiedler 等^[23]从德国市场的黄瓜、胡萝卜、中草药、沙拉叶和即食混合

沙拉叶中分离得到 147 株蜡样芽孢杆菌；菌株对 β -内酰胺类抗生素如青霉素 G (100%) 和头孢噻肟 (100%) 以及阿莫西林/克拉维酸联合用药 (99.3%)、氨苄西林 (99.3%) 表现出耐药性；大多数菌株对环丙沙星 (99.3%)、氯霉素 (98.6%)、阿米卡星 (98.0%)、亚胺培南 (93.9%)、红霉素 (91.8%)、庆大霉素 (88.4%)、四环素 (76.2%) 和甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲恶唑组合 (52.4%) 敏感。Yu 等^[24] 从我国不同城市采集的 211 份蔬菜样品中分离出了 294 株蜡样芽孢杆菌，其中 50% 的样品检出蜡样芽孢杆菌，9.95% 的样品污染水平大于 1 100 MPN/g；大多数菌株对利福平和 β -内酰胺类抗生素耐药，对亚胺培南、庆大霉素、环丙沙星、卡那霉素、特利霉素和氯霉素敏感；另外，95.6% 以上的菌株对 3 种抗生素表现出耐药性。

1.3 肉制品中的耐药现状

食用被蜡样芽孢杆菌污染的肉类及肉制品也是导致食源性疾病的重要原因之一。肉制品中蜡样芽孢杆菌的高发病率对消费者的健康构成严重威胁。Kursun 等^[25] 从 50 份兔肉中检出 18 份 (36%) 含有蜡样芽孢杆菌，其中 8 株 (44.4%) 蜡样芽孢杆菌能产生肠毒素；蜡样芽孢杆菌对青霉素 (100%)、氨苄西林 (94.4%)、链霉素 (27.7%)、庆大霉素 (22.2%) 和红霉素 (22.2%) 耐药，对氯霉素和万古霉素无耐药性。Rather 等^[26] 从 259 份生肉及肉制品中检出 97 份 (37.45%) 含有蜡样芽孢杆菌；对 10 种抗菌药的敏感性显示对庆大霉素 (100%)、环丙沙星 (98.97%)、氯霉素 (89.69%) 和链霉素 (85.56%) 敏感，而对青霉素 G 的耐药率最高 (91.75%)。Güven 等^[27] 对 100 份零售肉类及肉制品样品进行蜡样芽孢杆菌检测，检出率达 22.4%；分离株对苯唑西林和阿莫西林耐药率高，对其他抗菌药耐药率低，对万古霉素敏感，约 54% 的菌株表现出多重耐药。

1.4 其他食品中的耐药现状

除了乳及乳制品、蔬菜和肉制品中常被检出

蜡样芽孢杆菌外，其他食品如谷物类、即食食品、豆制品和香料等食品中也检出蜡样芽孢杆菌。Park 等^[28] 在检测韩国 293 份大米和谷类产品样品时，73 份 (25%) 含有蜡样芽孢杆菌菌株；所有菌株对庆大霉素、亚胺培南、氯霉素、万古霉素高度敏感，对头孢替坦、四环素、利福平、红霉素和克林霉素中度敏感，但对氨苄青霉素、头孢吡肟、苯唑西林和青霉素高度耐药。Chon 等^[29] 从韩国的 100 份商业即食混合谷粉样品中分离出 35 株蜡样芽孢杆菌菌株，所有菌株至少含有 1 个肠毒素基因，所有分离株对 β -内酰胺类抗生素高度耐药。Merzougui 等^[30] 对 2008–2010 年收集的 402 份来自摩洛哥不同食物样品进行微生物学分离分析，包括牛奶及乳制品、香料、米饭和沙拉，所有样品中有 64 份 (15.9%) 呈阳性，分离株对氨苄西林 (98.4%)、四环素 (90.6%)、奥西林 (100%)、头孢吡肟 (100%) 和青霉素 (100%) 耐药，对氯霉素 (67.2%)、红霉素 (84.4%) 和庆大霉素 (100%) 敏感。Yim 等^[31] 对从首尔零售店购买的 88 份韩国发酵豆制品样品进行了检测，其中有 47 份阳性标本，共分离出 87 株蜡样芽孢杆菌，耐药分析表明蜡样芽孢杆菌对氨苄青霉素、青霉素、头孢吡肟、亚胺培南、苯唑西林等 β -内酰胺类抗生素高度耐药。

综上，蜡样芽孢杆菌存在于各类食品中，乳及乳制品中的检出率为 3.0%–51.6%，蔬菜类食品中的检出率高达 50%，其他类别的食品中检出率在 15.9%–53.4% 之间。蜡样芽孢杆菌通常产生 β -内酰胺酶，对 β -内酰胺类抗生素，包括第三代头孢菌素耐药；耐药性分析也表明，蜡样芽孢杆菌在不同食品基质中的耐药性差异及选择特异性目前来说存在共性，即从不同食品中分离出的蜡样芽孢杆菌几乎都对 β -内酰胺类抗生素 (青霉素、氨苄西林、苯唑西林、头孢吡肟、头孢噻肟等) 高度耐药，对其他类抗生素 (四环素、氨基糖苷类、磺胺类、大环内酯类等) 处于中低度耐药或敏感^[5]。

此外, 在蔬菜制品中发现蜡样芽孢杆菌对利福平存在抗性, 可能是由于蔬菜多种植于施肥土壤中, 而土壤中耐药细菌更丰富, 其对利福平产生的耐药性由附近的其他细菌通过基因水平转移获得。

2 蜡样芽孢杆菌耐药机制

细菌在抗生素的选择性压力下, 为了在药物作用下能够生存下去, 通过不同的耐药机制与抗生素对抗, 细菌耐药机制主要是遗传机制与生化机制^[32]。遗传机制分为: (1) 固有耐药也称天然耐药性, 由细菌染色体上携带的基因导致, 对某种抗菌药物表现出天然的抗性, 可以代代相传下去; (2) 基因突变或获得新基因, 在增加抗生素用量的压力下会使细菌突变为具有耐药性, 同时, 细菌可以通过摄取另一种耐药细菌死亡后的抗性基因进而获得抗性; (3) 整合子介导耐药

性, 在整合酶的催化下, 整合子可以捕获和表达外源基因, 尤其是耐药基因, 因此可以在不同物种之间传播耐药基因^[33]。生化机制分为: (1) 产生灭活酶或修饰酶; (2) 靶位点发生改变或新靶位点的产生, 这使得抗生素难以结合细胞, 从而降低抗生素的抑制作用; (3) 外膜蛋白的改变, 长期药物作用可以刺激外膜蛋白改变细胞壁结构并降低渗透性, 从而阻碍抗生素的渗透; (4) 主动外排机制, 膜蛋白选择性或非选择性地从细胞中排出抗生素, 降低药物浓度并导致耐药性^[32,34]。图2和图3分别表示了这2种耐药机制图。由于长期不规范地使用抗生素或出现耐药基因, 导致基因水平转移, 已发现具有抗药性的蜡样芽孢杆菌菌株^[35], 特别是多重耐药菌株的出现, 增加了人类感染的机会, 导致抗生素治疗失效^[36], 因此研究蜡样芽孢杆菌的耐药机制很有必要。

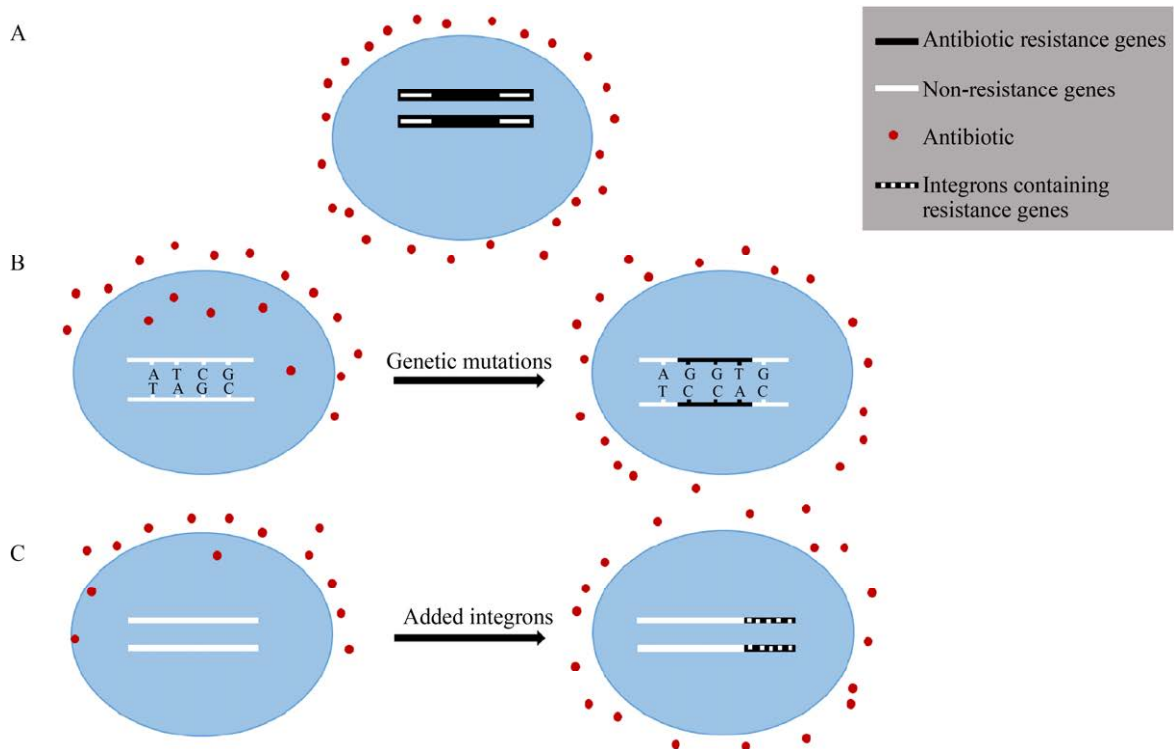


图2 细菌耐药机制的遗传机制^[32]

Figure 2 Genetic mechanism of bacterial resistance mechanism^[32]

注: A: 固有耐药; B: 基因突变或获得新基因; C: 整合子介导耐药性

Note: A: Inherent antibiotic resistance; B: Gene mutation or acquisition of new genes; C: Integrons mediate antibiotic resistance

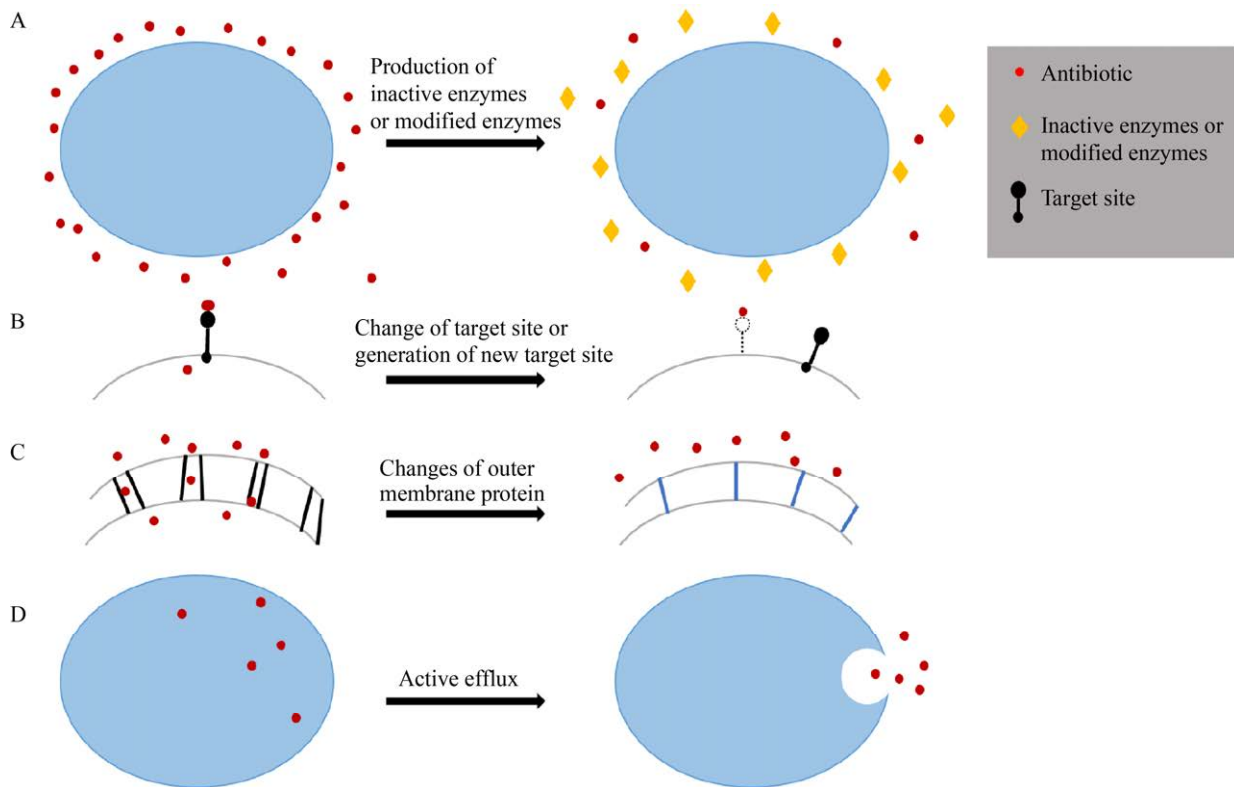


图3 细菌耐药机制的生化机制^[32]

Figure 3 Biochemical mechanism of bacterial resistance^[32]

注: A: 产生灭活酶或修饰酶; B: 靶位点发生改变或新靶位点的产生; C: 外膜蛋白的改变; D: 主动外排机制

Note: A: Production of inactivated or modified enzymes; B: Change of target site or generation of new target site; C: Changes of outer membrane protein; D: Active efflux mechanism

2.1 蜡样芽孢杆菌对 β -内酰胺类药物耐药机制

β -内酰胺是使用最广泛的抗生素, 蜡样芽孢杆菌对 β -内酰胺类药物的主要耐药机制是产生能水解 β -内酰胺环的 β -内酰胺酶, 使 β -内酰胺类抗生素失去活性^[37]。Ambler分类法根据酶分子结构的不同, 将 β -内酰胺酶分为4类, 活性位点丝氨酸 β -内酰胺酶(Seine B-Lactamase, SBL; A、C和D类)和依赖于锌的金属 β -内酰胺酶(Metallo-B-Lactamase, MBL; B类); SBL利用丝氨酸作为亲核试剂反应, 通过共价酰基酶中间体水解 β -内酰胺; MBL利用金属活化的水亲核试剂驱动水解反应^[38]。目前在蜡样芽孢杆菌菌株中已经报道了3种不同形式的 β -内酰胺酶。

蜡样芽孢杆菌569和569/H可产生2种胞外 β -内酰胺酶, 即 β -内酰胺酶I(BCI)和 β -内酰胺酶II(BCII)^[39]。 β -内酰胺酶I为A类同源蛋白, 其活性位点丝氨酸表示为Ser-70^[40]; β -内酰胺酶II是一种B类 β -内酰胺酶, 通过结合Zn(II)和Co(II)离子而被激活^[41]。在蜡样芽孢杆菌569中还发现了一种类似于A类 β -内酰胺酶的 β -内酰胺酶III(BCIII), 主要以2种形式出现, 一种是膜结合的甘油三酯-半胱氨酸脂蛋白, 另一种是亲水性分泌蛋白, 通过在修饰的半胱氨酸的羧基侧(即膜附着位点)裂解而形成^[42]。蜡样芽孢杆菌菌株通常对包括第三代头孢菌素在内的 β -内酰胺类抗生素具有耐药性^[5]。Torkar等^[43]对66株临床和

环境分离的蜡样芽孢杆菌进行敏感性试验, 所有菌株均对 β -内酰胺类耐药; 对来自 CTX 和 TEM 家族的蜡样芽孢杆菌 β -内酰胺酶 BCI、BCII、BCIII 和广谱 β -内酰胺酶基因以及 IMP 和 VIM 家族的碳青霉烯酶基因进行分析, 发现所有菌株均存在 *BlaII* 基因, 2 株菌株中检测到 *BlaIII* 的 PCR 产物, 68.2% 的分离株扩增出 *Bla_{CTX-M}* 家族基因, 21.2% 的样本检测出 *Bla_{VIM}* 类基因。这也揭示了蜡样芽孢杆菌对 β -内酰胺类药物高度耐药的原因。

2.2 蜡样芽孢杆菌对四环素类药物耐药机制

细菌对四环素类药物的耐药机制主要是主动外排作用和核糖体保护作用。与蜡样芽孢杆菌相关的耐药机制为核糖体保护作用, 四环素通过阻止蛋白质合成过程中氨酰基-tRNA 底物与核糖体的结合来抑制细菌细胞生长; 而核糖体保护蛋白通过与核糖体的可逆结合, 保护核糖体免受四环素的作用, 从而产生抗性^[44]。根据编码蛋白的氨基酸序列, 可以将核糖体保护蛋白分为 3 类: 第 I 类包括 Tet(M)、Tet(O)、Tet(S)和 Tet(W); 第 II 类包括 TetB(P)和 OTR(A), 第 III 类包括 Tet(Q)和 Tet(T)^[45]。目前已在蜡样芽孢杆菌中发现了核糖体保护蛋白 Tet(M)和 Tet(O)^[35,46-47]。

2.3 蜡样芽孢杆菌对氨基糖苷类药物耐药机制

细菌通过产生氨基糖苷类修饰酶从而对氨基糖苷类抗菌药物耐药, 这种酶通过基团转移反应对氨基糖苷类抗生素进行化学修饰, 使其失活从而导致细菌产生耐氨基糖苷的现象。氨基糖苷类修饰酶主要分为 3 种类型, 即氨基糖苷乙酰基转移酶(Aminoglycoside Acetyltransferase, AAC)、氨基糖苷腺苷转移酶(Aminoglycoside Adenylytransferase, ANT)和氨基糖苷磷酸转移酶(Aminoglycoside Phosphotransferase, APH)^[48]。Parulekar 等^[49]对蜡样芽孢杆菌氨基糖苷磷酸转移酶进行了同源建模、分子对接、分子动力学(Molecular Dynamics, MD)和主成分分析等研

究, 揭示了蜡样芽孢杆菌氨基糖苷磷酸转移酶耐药性及抑制机制。

2.4 蜡样芽孢杆菌对氟喹诺酮类药物耐药机制

氟喹诺酮类药物以 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV 为靶标, 在不同的细菌中具有不同的效率, 并抑制它们对细胞内超螺旋的控制, 导致 DNA 复制受损严重时引起细胞死亡^[50-51]。从蜡样芽孢杆菌 ATCC 14579 的 BC4707 中鉴定出 DHA2 家族泵, 其属于主要协助转运蛋白超家族(Major Facilitator Superfamily, MFS)^[52], 促进了对诺氟沙星、卡那霉素和环丙沙星的耐药性, 起到了多药外排泵的作用^[53]。

2.5 蜡样芽孢杆菌对磺胺类药物耐药机制

磺胺类药物作用机制是与二氢叶酸合成酶(Dihydropteroate Synthase, DHPS)相互作用, 这种酶是产生胸腺嘧啶和细菌细胞生长所需的叶酸生物合成途径的重要酶^[54], 从而使细菌生长和繁殖受到抑制。磺胺类的耐药性主要与 DHPS 的突变基因 *sul1-3* 相关, 其调控表达二氢叶酸合成酶与磺胺类的结合能力^[55-56]。Gao 等^[47]在水产养殖环境中的蜡样芽孢杆菌内检测到磺胺类耐药基因 *sul1* 和 *sul2*。

2.6 蜡样芽孢杆菌对大环内酯类药物耐药机制

大环内酯类化合物通过与 50S 细菌核糖体亚基结合来抑制蛋白质合成^[57]。蜡样芽孢杆菌对大环内酯类药物的耐药机制主要为酶催化失活^[58]。Wang 等^[59]在蜡样芽孢杆菌中鉴定了 2 类大环内酯磷酸转移酶(Macrolide Phosphotransferase, MPH), A 簇 Mphs 使 14 元和 15 元大环内酯失活, 而 B 簇 Mphs 使 14 元、15 元和 16 元化合物失活; A 簇 *Mph* 基因位于所有蜡样芽孢杆菌群分离株的染色体保守区域, 被认为是一种内在抗性基因, 然而, 该基因本身并不存在于所有菌株中, 通过比较基因组学分析表明, 该基因通过同源重组在蜡样芽孢杆菌群的菌株之间进行了交换; B 簇 *Mph* 基因周围的基因组区域与多种质粒序列相

关,提示该基因为获得性抗性基因。

目前,蜡样芽孢杆菌的耐药机制研究仅对 β -内酰胺类抗生素比较深入,对其他类抗生素耐药性暂处于中度耐药或敏感阶段,所以对其耐药机制的研究少有文献报道。通过表1可以看出,蜡样芽孢杆菌的耐药机制主要为灭活酶或修饰酶的产生(β -内酰胺类、氨基糖苷类、磺胺类、大环内酯类)。

3 蜡样芽孢杆菌耐药性检测

目前,对蜡样芽孢杆菌耐药性的研究最常用的方法仍以表型试验为基础,包括肉汤药敏试验、琼脂平板稀释法和纸片扩散法。这些传统方法的特点是操作简单、成本低;但存在步骤烦琐、耗时长等缺点。随着基因组学的发展,许多引起抗生素耐药性的潜在基因修饰已经被描述出来,利用分子生物学方法检测抗生素耐药性逐步发展起来。Laflamme等^[60]以蜡样芽孢杆菌芽孢为模型,提出了渗透和原位信号扩增方法,以检测抗生素耐药基因;证明利用原位技术检测芽孢杆菌的抗药性基因是可行的。与传统的药敏实验相比,分子生物学技术能更加快速、准确地获得结果,但对一种抗生素的耐药性可能由多种不同的耐药机制介导的情况不能确定,而且分子方法只能用于先前检测和表征的抗性机制,对未知的或

新出现的抗生素耐药性不会被检测到^[61]。随着耐药机制研究的深入,未来分子生物学检测会为耐药性分析提供强有力的支撑。

4 小结

蜡样芽孢杆菌是食源性致病的重要原因,因为其污染了许多食品,包括婴儿配方奶粉、牛奶和奶粉、蔬菜、肉类、大米(包括米饭)和香料等。致病性蜡样芽孢杆菌可引起食物中毒甚至严重的人类传染病,其感染剂量低至 10^3 CFU/g。从不同食品中分离出的蜡样芽孢杆菌几乎都对 β -内酰胺类抗生素高度耐药,对其他类抗生素处于中低度耐药或敏感。在蔬菜制品中发现蜡样芽孢杆菌对利福平存在抗性,其产生原因可能是土壤中其他细菌的耐药性转移或是由于蜡样芽孢杆菌对不同食品基质存在选择差异性,在后续的研究中这是个值得深入研究的问题。然而,蜡样芽孢杆菌对各类抗生素的耐药机制主要为灭活酶或修饰酶的产生和主动外排机制。目前,蜡样芽孢杆菌的耐药现状尚不严重,但也不可忽视,对于其耐药机制研究还不够全面仍有盲区。蜡样芽孢杆菌的耐药性分析对于指导临床用药和患者感染治疗有重要意义,本文对蜡样芽孢杆菌耐药性和耐药机制进行简要概述,以期为新药开发和临床应用提供参考。

表1 蜡样芽孢杆菌对各类抗生素的耐药性分析

Table 1 Antibiotic resistance analysis of *Bacillus cereus* to various antibiotics

Antibiotic types	Resistance mechanism	Resistance gene or resistance factor	Strains	References
Tetracyclines	Ribosome protection	<i>Tet(M)</i> , <i>Tet(O)</i>	<i>B. cereus</i> (<i>sensu stricto</i>), EU621383.1, DQ420176.1	[46-47]
β -lactam	Production of inactivated or modified enzymes	β -lactamase I, II, III	<i>B. cereus</i> 569	[42]
Aminoglycosides		Aminoglycoside phosphotransferases (APHs)	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	[49]
Sulfonamides		<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>B. cereus</i> (EU621383.1, DQ420176.1)	[47]
Macrolides		Macrolide phosphotransferases (MPHs)	<i>B. cereus</i> VD156, Rock 3-29, K-5975c	[59]
Fluoroquinolones	Active efflux mechanism	Major facilitator superfamily (MFS)	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	[52]

REFERENCES

- [1] Jessberger N, Dietrich R, Granum PE, Märtlbauer E. The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process[J]. *Toxins*, 2020, 12(11): 701
- [2] Berthold-Pluta A, Pluta A, Garbowska M, Stefanska I. Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland[J]. *Foods*, 2019, 8(7): 269
- [3] Majed R, Faille C, Kallassy M, Gohar M. *Bacillus cereus* biofilms-same, only different[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1054
- [4] Dietrich R, Jessberger N, Ehling-Schulz M, Märtlbauer E, Granum PE. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*[J]. *Toxins*, 2021, 13(2): 98
- [5] Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(2): 382-398
- [6] Enosi Tuipulotu D, Mathur A, Ngo C, Man SM. *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host-pathogen interactions[J]. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(5): 458-471
- [7] Huang YY, Flint SH, Palmer JS. *Bacillus cereus* spores and toxins: the potential role of biofilms[J]. *Food Microbiology*, 2020, 90: 103493
- [8] Ceuppens S, Uyttendaele M, Drieskens K, Heyndrickx M, Rajkovic A, Boon N, Van De Wiele T. Survival and germination of *Bacillus cereus* spores without outgrowth or enterotoxin production during *In Vitro* Simulation of gastrointestinal transit[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(21): 7698-7705
- [9] Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2004, 48(7): 479-487
- [10] Jeßberger N, Krey VM, Rademacher C, Böhm ME, Mohr AK, Ehling-Schulz M, Scherer S, Märtlbauer E. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 560
- [11] Doll VM, Ehling-Schulz M, Vogelmann R. Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61404
- [12] Berthold-Pluta A, Garbowska M, Stefańska I, Pluta A. Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp.[J]. *Food Microbiology*, 2017, 65: 221-230
- [13] Bartoszewicz M, Hansen BM, Swiecicka I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk[J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(4): 588-596
- [14] Johnson KM, Nelson CL, Busta FF. Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illnesses[J]. *Journal of Food Science*, 1982, 47(4): 1268-1271
- [15] Yibar A, Cetinkaya F, Soyutemiz E, Yaman G. Prevalence, enterotoxin production and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolated from milk and cheese[J]. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 2017, 23(4): 635-642
- [16] Ranjbar R, Shahreza MHS. Prevalence, antibiotic-resistance properties and enterotoxin gene profile of *Bacillus cereus* strains isolated from milk-based baby foods[J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2017, 16(8): 1931
- [17] Gundogan N, Avci E. Occurrence and antibiotic resistance of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in raw milk and dairy products in Turkey[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2014, 67(4): 562-569
- [18] Zhao SJ, Chen JL, Fei P, Feng HX, Wang Y, Ali MA, Li SZ, Jing HN, Yang WW. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from dairy products in China[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(5): 3994-4001
- [19] Su LJ, Arab L. Salad and raw vegetable consumption and nutritional status in the adult US population: results from the third national health and nutrition examination survey[J]. *Journal of the American Dietetic Association*, 2006, 106(9): 1394-1404
- [20] Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P, Frankel G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(9): 2385-2397
- [21] Jo MJ, Jeong AR, Kim HJ, Lee NR, Oh SW, Kim YJ, Chun HS, Koo MS. Microbiological quality of fresh-cut produce and organic vegetables[J]. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 2011, 43(1): 91-97
- [22] Park KM, Jeong M, Park KJ, Koo M. Prevalence, enterotoxin genes, and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolated from raw vegetables in Korea[J]. *Journal of Food Protection*, 2018, 81(10): 1590-1597
- [23] Fiedler G, Schneider C, Igbino EO, Kabisch J, Brinks E, Becker B, Stoll DA, Cho GS, Huch M, Franz CMAP. Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets[J]. *BMC Microbiology*, 2019, 19(1): 1-13
- [24] Yu PF, Yu SB, Wang J, Guo H, Zhang Y, Liao XY, Zhang JH, Wu S, Gu QH, Xue L, et al. *Bacillus cereus* isolated from vegetables in China: incidence, genetic diversity, virulence genes, and antimicrobial resistance[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 948
- [25] Kursun O, Guner A, Ozmen G. Prevalence of *Bacillus cereus* in rabbit meat consumed in burdur-Turkey, its enterotoxin producing ability and antibiotic susceptibility[J]. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 2011, 17: S31-S35

- [26] Rather MA, Aulakh RS, Gill JPS, Ghatak S. Enterotoxin gene profile and antibiogram of *Bacillus cereus* strains isolated from raw meats and meat products[J]. Journal of Food Safety, 2012, 32(1): 22-28
- [27] Guven K, Mutlu MB, Avci O. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products consumed in Turkey[J]. Journal of Food Safety, 2006, 26(1): 30-40
- [28] Park YB, Kim JB, Shin SW, Kim JC, Cho SH, Lee BK, Ahn J, Kim JM, Oh DH. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea[J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(3): 612-617
- [29] Chon JW, Kim JH, Lee SJ, Hyeon JY, Seo KH. Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in Sunsik[J]. Food Microbiology, 2012, 32(1): 217-222
- [30] Merzougui S, Lkhider M, Grosset N, Gautier M, Cohen N. Prevalence, PFGE typing, and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* group isolated from food in Morocco[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(2): 145-149
- [31] Yim JH, Kim KY, Chon JW, Kim DH, Kim HS, Choi DS, Choi IS, Seo KH. Incidence, antibiotic susceptibility, and toxin profiles of *Bacillus cereus sensu lato* isolated from Korean fermented soybean products[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(6): M1266-M1270
- [32] Li YJ, Shan LY, Zhang C, Lei Z, Shang Y. Isolation and antibiotic resistant research of *Tetragenococcus halophilus* from Xuanwei ham, A China high-salt-fermented meat products[J]. Antibiotics, 2019, 8(3): 151
- [33] Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance[J]. Microbiology Spectrum, 2016, 4(2): VMBF-0016-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015
- [34] Aygül A. The importance of efflux systems in antibiotic resistance and efflux pump inhibitors in the management of resistance[J]. Mikrobiyoloji Bulteni, 2015, 49(2): 278-291
- [35] Agersø Y, Jensen LB, Givskov M, Roberts MC. The identification of a tetracycline resistance gene Tet(M), on a Tn916-like transposon, in the *Bacillus cereus* group[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 214(2): 251-256
- [36] Ali MMM, Aburowes AH, Albakush AM, Rzeg MM, Alrtail A, Ghenghesh KS. Identification of multidrug-resistant bacteria and *Bacillus cereus* from healthcare workers and environmental surfaces in a hospital[J]. Libyan Journal of Medicine, 2014, 9(1): 25794
- [37] Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2018, 62(10): e01076-18
- [38] Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, Spencer J. B-lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century[J]. Journal of Molecular Biology, 2019, 431(18): 3472-3500
- [39] Davies RB, Abraham EP. Separation, purification and properties of beta-lactamase I and beta-lactamase II from *Bacillus cereus* 569/H/9[J]. The Biochemical Journal, 1974, 143(1): 115-127
- [40] Madgwick PJ, Waley SG. B-lactamase I from *Bacillus cereus*. Structure and site-directed mutagenesis[J]. Biochemical Journal, 1987, 248(3): 657-662
- [41] Orellano EG, Girardini JE, Cricco JA, Ceccarelli EA, Vila AJ. Spectroscopic characterization of a binuclear metal site in *Bacillus cereus* β -lactamase II[J]. Biochemistry, 1998, 37(28): 10173-10180
- [42] Nielsen JBK, Lampen JO. Beta-lactamase III of *Bacillus cereus* 569: membrane lipoprotein and secreted protein[J]. Biochemistry, 1983, 22(20): 4652-4656
- [43] Torkar KG, Bedenić B. Antimicrobial susceptibility and characterization of metallo- β -lactamases, extended-spectrum β -lactamases, and carbapenemases of *Bacillus cereus* isolates[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 118: 140-145
- [44] Michalova E, PNovotna, Schlegelova J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them[J]. Veterinárni Medicína, 2012, 49(3): 79-100
- [45] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(2): 232-260
- [46] Glenwright H, Pohl S, Navarro F, Miro E, Jiménez G, Blanch AR, Harwood CR. The identification of intrinsic chloramphenicol and tetracycline resistance genes in members of the *Bacillus cereus* group (*sensu lato*)[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 7: 2122
- [47] Gao PP, Mao DQ, Luo Y, Wang LM, Xu BJ, Xu L. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment[J]. Water Research, 2012, 46(7): 2355-2364
- [48] Wright GD. Aminoglycoside-modifying enzymes[J]. Current Opinion in Microbiology, 1999, 2(5): 499-503
- [49] Parulekar RS, Sonawane KD. Insights into the antibiotic resistance and inhibition mechanism of aminoglycoside phosphotransferase from *Bacillus cereus*: *in silico* and *in vitro* perspective[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 119(11): 9444-9461
- [50] Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao XL. Quinolones: action and resistance updated[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2009, 9(11): 981-998
- [51] Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success[J]. Trends in Microbiology, 2014, 22(8): 438-445
- [52] Kristoffersen SM, Ravnum S, Tourasse NJ, Økstad OA, Kolstø AB, Davies W. Low concentrations of bile salts

- induce stress responses and reduce motility in *Bacillus cereus* ATCC 14570[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(14): 5302-5313
- [53] Simm R, Vörös A, Ekman JV, Sødring M, Nes I, Kroeger JK, Saidijam M, Bettaney KE, Henderson PJF, Salkinoja-Salonen M, et al. BC4707 is a major facilitator superfamily multidrug resistance transport protein from *Bacillus cereus* implicated in fluoroquinolone tolerance[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36720
- [54] Yun MK, Wu Y, Li Z, Zhao Y, Waddell MB, Ferreira AM, Lee RE, Bashford D, White SW. Catalysis and sulfa drug resistance in dihydropteroate synthase[J]. *Science*, 2012, 335(6072): 1110-1114
- [55] Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends[J]. *Drug Resistance Updates*, 2000, 3(3): 155-160
- [56] Perreten V, Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (Sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(3): 1169-1172
- [57] Roberts MC. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes[J]. *Molecular Biotechnology*, 2002, 20(3): 261-283
- [58] Morar M, Pengelly K, Koteva K, Wright GD. Mechanism and diversity of the erythromycin esterase family of enzymes[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(8): 1740-1751
- [59] Wang C, Sui ZH, Leclercq SO, Zhang G, Zhao ML, Chen WQ, Feng J. Functional characterization and phylogenetic analysis of acquired and intrinsic macrolide phosphotransferases in the *Bacillus cereus* group[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(5): 1560-1573
- [60] Laflamme C, Gendron L, Turgeon N, Filion G, Ho J, Duchaine C. *In situ* detection of antibiotic-resistance elements in single *Bacillus cereus* spores[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(5): 323-333
- [61] Anjum MF, Zankari EA, Hasman H. Molecular methods for detection of antimicrobial resistance[J]. *Microbiology Spectrum*, 2017, 5(6): ARBA-0011-2017