

## 论著

## 肉鸡养殖场中环丙沙星和头孢噻肟双重耐药沙门菌耐药机制的研究

白莉<sup>1</sup>,张秀丽<sup>2</sup>,甘辛<sup>1</sup>,王伟<sup>1</sup>,胡豫杰<sup>1</sup>,侯君<sup>3</sup>,李凤琴<sup>1</sup>,徐进<sup>1</sup>

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021;  
2. 河南省疾病预防控制中心,河南 郑州 450016; 3. 大连市疾病预防控制中心,辽宁 大连 116021)

**摘要:**目的 阐明养殖场肉鸡及其环境中环丙沙星和头孢噻肟耐药沙门菌的分布和耐药机制特点。方法 对河南省4个不同地区肉鸡养殖场及环境中分离的沙门菌进行环丙沙星和头孢噻肟双重耐药菌株的筛选和鉴定,并对分离株进行药敏试验、喹诺酮类和超广谱 $\beta$ 内酰胺酶耐药机制研究。结果 从52株养殖场肉鸡肛拭子及环境中筛选出5株耐环丙沙星和头孢噻肟的沙门菌,均为印第安纳沙门菌,有AMP-CAZ-CHL-CIP-CTX-GEN( $n=1$ )和AMP-CAZ-CHL-CIP-CTX-GEN-SXT-TET( $n=4$ )两种耐药谱。喹诺酮耐药机制研究显示,5株菌的拓扑异构酶编码基因 $gyrA$ 和 $parC$ 均有点突变出现,均携带了质粒介导的喹诺酮耐药基因,包括 $oqxAB$ 、 $aac(6')-Ib-cr$ 基因,而 $qnrA$ 、 $qnrB$ 、 $qnrS$ 、 $qnrC$ 、 $qnrD$ 和 $qepA$ 基因则未检出。超广谱 $\beta$ -内酰胺酶耐药机制显示,5株菌均为 $bla_{CTX-M-65}$ 型。结论 耐环丙沙星和头孢噻肟的菌株存在于肉鸡养殖环节及其环境中,并具有复杂的喹诺酮耐药机制和可传播的超广谱 $\beta$ 内酰胺酶耐药机制。为阐明农场-餐桌-感染者传递链条中耐药关联性,为社区感染防控、临床抗生素用药提供科学依据,我国应该加强肉鸡等养殖业沙门菌多重耐药菌株的监测。

**关键词:**肉鸡; 养殖场; 沙门菌; 环丙沙星; 头孢噻肟; 耐药机制; 抗生素; 食源性致病菌

中图分类号:R155.5;R978.1;R378.2<sup>+</sup>2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)05-0487-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.05.001

### Molecular characteristics of ciprofloxacin and cefotaxime co-resistant *Salmonella* isolates in broiler flocks

BAI Li, ZHANG Xiu-li, GAN Xin, WANG Wei, HU Yu-jie, HOU Jun, LI Feng-qin, XU Jin  
(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center  
for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To investigate the prevalence and characteristics of ciprofloxacin and cefotaxime co-resistant *Salmonella* isolates in broiler flocks. **Methods** Ciprofloxacin and cefotaxime co-resistant *Salmonella* isolates were selected from isolates recovered from cloaca or rectal swabs and environment samples collected from 4 different districts in Henan Province. Ciprofloxacin and cefotaxime co-resistant *Salmonella* isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing, phylogenetic analysis and further characterized by screening for  $\beta$ -lactamase genes and quinolone resistance determinants by PCR and followed by DNA sequence analysis. **Results** Totally, five ciprofloxacin and cefotaxime co-resistant *Salmonella* isolates were recovered from 52 isolates, which all belonged to *Salmonella* Indiana. There were two antimicrobial resistant profiles which were AMP-CAZ-CHL-CIP-CTX-GEN ( $n=1$ ) and AMP-CAZ-CHL-CIP-CTX-GEN-SXT-TET ( $n=4$ ). Point mutations in topoisomerase encoded genes  $gyrA$  and  $parC$  were identified, and all isolates carried plasmid-mediated quinolone resistance genes, including  $oqxAB$  and  $aac(6')-Ib-cr$ , but  $qnrA$ ,  $qnrB$ ,  $qnrS$ ,  $qnrC$ ,  $qnrD$  and  $qepA$  were not detected. All of the five cefotaxime-resistant *Salmonella* were due to the production of plasmid borne  $bla_{CTX-M-65}$ . **Conclusion** The extensive prevalence, complicated quinolone resistance mechanisms of isolates and the possible transmission of  $bla_{CTX-M-65}$  were existed in broiler flocks and environment. In order to clarify the farm-table-patient resistant relevance chain of infection transmission and to provide a scientific basis for antibiotic medication in clinical, the continuous surveillance of multidrug-resistant *Salmonella* in broiler flocks should be carried out.

**Key words:** Broiler flock; *Salmonella*; ciprofloxacin; cefotaxime; mechanism of resistance; antibiotic; foodborne pathogenic bacteria

收稿日期:2014-12-15

作者简介:白莉 女 副研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail:baili@cfsa.net.cn

通讯作者:徐进 男 研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail:xujin@cfsa.net.cn

沙门菌是引起人类食物中毒主要的食源性致病菌,其导致的食源性疾病已成为全球重要公共卫生问题<sup>[1]</sup>。在美国,从1998—2002年大约有164 044例患者<sup>[2]</sup>。最新发布的全球非伤寒沙门菌疾病负担报告显示:每年因沙门菌导致的患病人数为94 000 000,其中155 000人死亡<sup>[3]</sup>。在我国,70%~80%的细菌性食物中毒是由沙门菌引起的,受沙门菌污染的肉鸡制品是导致人群食物中毒的重要因素<sup>[4]</sup>。尽管大多数的沙门菌感染病例不需要抗生素的治疗,但对于免疫能力低下的人群,特别是儿童和老人,侵袭性的感染可能会导致生命危险,因此需要抗生素治疗<sup>[5]</sup>。氟喹诺酮类(环丙沙星)和三代头孢类抗生素(头孢噻肟等)是治疗严重沙门菌感染的首选用药<sup>[6-7]</sup>。由于此类抗生素在动物饲养中的广泛应用,在世界范围内已经出现了氟喹诺酮类抗生素或三代头孢类耐药沙门菌<sup>[8-9]</sup>,耐药菌株作为耐药基因重要的储存库,通过中间载体的动物源性食品,可将耐药菌株传播至人体内,会对社区健康人群公共卫生安全造成巨大威胁<sup>[7,10]</sup>。喹诺酮耐药决定区(QRDRs)和质粒介导喹诺酮耐药(PMQR)在喹诺酮耐药机制中发挥重要的作用。在QRDRs中,拓扑异构酶编码基因 $gyrA$ 和 $parC$ 发生突变,将会增强沙门菌对喹诺酮类抗生素的耐药水平。而PMQR中则包括了Qnr决定子、Aac(6′)-Ib-cr、QepA和OqxAB等耐药元件,它们通过不同方式降低沙门菌对喹诺酮类抗生素的敏感性。自1983年在德国首次报道分离出SHV-2型超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)以来,全世界许多地方不断有新的ESBLs检出<sup>[11-14]</sup>。ESBLs多数是由质粒介导的,广泛存在于肠杆菌科细菌中,通过水平转移等方法在相同或不同的种属之间播散<sup>[15-16]</sup>。对于沙门菌,亚洲地区介导ESBLs最主要的型别是由CTX-M酶编码的<sup>[17]</sup>。在我国,从零售肉制品(猪肉、肉鸡)<sup>[9,15]</sup>、经济型动物(猪、鸭)<sup>[18]</sup>分离到同时对环丙沙星和头孢曲松耐药沙门菌的已有报道。但少有从食品链源头(动物养殖环境)中分离到耐氟喹诺酮类抗生素或三代头孢类药物的沙门菌的耐药性及其机制研究的报道。本研究从源头出发,对河南省肉鸡养殖场及其环境进行监测,分离环丙沙星和头孢噻肟双重耐药的沙门菌,并进行QRDRs、PMQR及ESBLs耐药机制的研究,阐明目前我国肉鸡养殖环节中环丙沙星和头孢噻肟耐药沙门菌的分布和耐药机制特点,为指导饲养环节合理使用抗生素提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源

2012年2~11月,在河南省的鹤壁市、开封市、漯河市和周口市4个城市的4个肉鸡养殖场进行采样,分别采集肉鸡的肛拭子和养殖场环境粪便共388份样品进行沙门菌的检测,分离到52株沙门菌。所有的菌株经过VITEK 2和PCR<sup>[19]</sup>方法确认,并完成血清分型。药敏质控菌株大肠埃希菌(ATCC 25922)、肺炎克雷伯杆菌(ATCC 700603)、布灵得卢柏沙门菌标准菌株(*Salmonella* Braenderup, H9812)均为本实验室保存。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

CHEF-mapper型脉冲场凝胶电泳仪、Gel Doc XR凝胶成像系统、高通量DNA Engine Tetrad 2 PCR仪、Sub-Cell<sup>®</sup> Model 96 Cell电泳仪均购自美国Bio-Rad,微量紫外分光光度计,细菌多点接种仪(日本佐久间),bioMérieux Vitek浊度计(法国梅里埃),恒温培养箱,小型高速离心机,恒温振荡器,纯水仪。

脑心浸液琼脂(BHA)、血琼脂平板及脑心浸液肉汤(BHI)均购自北京陆桥技术有限责任公司, Mueller-Hinton肉汤(MHB)、Mueller-Hinton琼脂(MHA)均购自英国Oxoid, SBG、XLT4琼脂均购自美国BD,沙门菌科玛嘉显色培养基(郑州博赛生物技术股份有限公司),2×Taq PCR Master Mix、pfu PCR Master Mix均购自北京天根生化科技有限公司,沙门菌诊断血清(丹麦国家血清研究院),试验用抗生素氯霉素(CHL)、头孢噻肟(CTX)、四环素(TET)、庆大霉素(GEN)、复方新诺明(SXT)、环丙沙星(CIP)、头孢他啶(CAZ)、氨苄西林(AMP)、亚胺培南(IMP)、替加环素(TGC)、克拉维酸(clavulanic)均购自美国Sigma,月桂酰肌氨酸钠(SLS)、十二烷基磺酸钠(SDS)、乙二胺四乙酸二钠(Na<sub>2</sub>EDTA)、Tris base、Tris-HCl均购自美国Promega,蛋白酶K(德国Merck),限制性内切酶Xba I(英国New England Biolabs),比浊管、SeaKem Gold琼脂糖均购自美国Bio-Rad,T-载体和感受态细胞均购自北京六合同经贸公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株鉴定和血清分型

VITEK 2生化鉴定及PCR鉴定:肉鸡肛拭子和粪便经SBG选择性增菌培养后,接种XLT4和科玛嘉显色培养基,挑取可疑菌落进行生化鉴定;并通过PCR方法确认<sup>[19]</sup>。

血清鉴定:按照GB 4789.4—2010《食品微生物学检验 沙门氏菌检验》方法进行血清学试验<sup>[20]</sup>。

### 1.2.2 药敏试验

头孢噻肟和环丙沙星双耐菌株的筛选<sup>[21]</sup>:用 MHA 平板(头孢噻肟 8 μg/ml,环丙沙星 4 μg/ml)进行菌株筛选。挑取在抗生素平板上生长的单菌落,接种于 MHA 平板,次日挑取单菌落接种于 BHA 上,37 ℃过夜培养后取部分菌落于含有 50% 甘油脑心肉汤保菌管中,于 -70 ℃保存,用于后续研究。

抗生素最低抑菌浓度(MIC):参考美国临床实验室标准化委员会(CLSI)2012 版<sup>[21]</sup>,使用琼脂稀释法测定沙门菌 10 种抗生素(头孢噻肟、环丙沙星、头孢他啶、亚胺培南、庆大霉素、复方新诺明、氨苄西林、四环素、替加环素、氯霉素)的 MIC 值,并参照 CLSI 判断 MIC 结果是否为耐药或敏感,替加环素的判断标准参考美国食品和药物管理局和欧洲的抗生素药物敏感试验委员会<sup>[22-23]</sup>。

ESBLs 筛查:按照 CLSI 2012 年版的标准进行 ESBLs 表型确证试验。在抗生素 MIC 耐药检测中,菌株若对头孢噻肟或头孢他啶其中任何一种抗生素具有耐药性,则进一步使用头孢噻肟/克拉维酸或头孢他啶/克拉维酸进行超广谱 β-内酰胺酶检测;若菌株对头孢噻肟/克拉维酸或头孢他啶/克拉维酸的 MIC 值较头孢噻肟或头孢他啶降低了 8 倍,则判定为 ESBLs 阳性。

### 1.2.3 喹诺酮类耐药基因的检测

QRDRs 基因突变分析<sup>[24-25]</sup>:对头孢噻肟和环丙沙星双耐菌株的筛选试验筛选出的耐环丙沙星和三代头孢类抗生素耐药的沙门菌进行 *gyrA*、*gyrB*、*parC* 及 *parE* 基因 PCR 扩增,引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。扩增条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 1 min,退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 ℃ 10 min,退火温度见表 1。阳性扩增片段,送上海英俊公司测序。GenBank 下载 *Salmonella typhimurium* LT2 的 *gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE* 序列,使用 Sequencher 软件进行序列比对。

PMQR 机制分析<sup>[26-32]</sup>:对头孢噻肟和环丙沙星双耐菌株筛选试验筛选出的菌株进行 *qepA*、*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*qnrC*、*qnrD*、*aac(6′)-Ib-cr*、*oqxAB* 基因 PCR 扩增,引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列及退火温度见表 1。对阳性扩增的产物,送上海英俊公司测序,并将序列在 NCBI BLAST 上进行比对。

### 1.2.4 ESBLs 基因的检测

对头孢噻肟和环丙沙星双耐菌株筛选试验筛选出的菌株进行 ESBLs *bla*<sub>CTX-M</sub> 分析<sup>[33]</sup>,先确定 CTX 组别,再用 *bla*<sub>CTX-M</sub> subgroup<sup>[34-35]</sup> 进行分型。

表 1 引物序列及退火温度

引物名称	序列(5′-3′)	长度 /bp	退火温度/℃
<i>gyrA</i> -F	TGTCGGAGATGGCCTGAAGC	347	55
<i>gyrA</i> -R	TACCGTCATAGTTATCCACC		
<i>gyrB</i> -F	CAAACGTGGCGACTGTCAGG	345	55
<i>gyrB</i> -R	TTCCGGCATCTGACGATAGA		
<i>parC</i> -F	ATGAGCGATATGGCAGAGCG	412	55
<i>parC</i> -R	TGACCGAGTTCGCTTAACAG		
<i>parE</i> -F	GACCGAGCTGTTCTTGTGG	272	55
<i>parE</i> -R	AGCAGAGTAGCGATATGCAA		
<i>oqxA</i> -F	CTCGGCGCGATGATGCT	392	57
<i>oqxA</i> -R	CCACTCTTACGGGAGACGA		
<i>oqxB</i> -F	TTCTCCCGCGCGGAAAGTAC	512	64
<i>oqxB</i> -R	CTCGGCCATTTTGGCGCGTA		
<i>aac(6′)-Ib-cr</i> -F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	55
<i>aac(6′)-Ib-cr</i> -R	CTCGAATGCCTGGCGTGT		
<i>CTX-M7</i> -F	GCCTGATACCACTTCACCTC	260	55
<i>CTX-M8</i> -R	TGAAGTAAGTGACCAGAATC		
<i>CTX-M17</i> -F	TGATACCACCACGCCGCTC	341	55
<i>CTX-M18</i> -R	TATTGCATCAGAAACCGTGGG		
<i>CTX-M19</i> -F	CAATCTGACCTTGGCAATG	207	55
<i>CTX-M20</i> -R	ATAACCGTCGGTGACAATT		
<i>CTX-M11</i> -F	ATCAAGCCTGCCGATCTGGTTA	293	55
<i>CTX-M12</i> -R	GTAAGCTGACGCAACCTCTGC		
<i>M13</i> -F	GGTAAAAAATCACTGCGTC	863	55
<i>M13</i> -R	TTGGTGACGATTTTAGCCGC		
<i>M25</i> -F	ATGATGACTCAGAGCATTCC	865	55
<i>M25</i> -R	TGGTTACGATTTTCCGCCGC		
<i>M9</i> -F	ATGCTGACAAAGAGAGTGCA	870	55
<i>M9</i> -R	CCCTTCGGCGATGATTCTC		
<i>RV-M</i> -F	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	—	55
<i>M13-47</i> -R	CGCCAGGTTTTCCAGTCACGAC		
<i>qepA</i> -F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	199	60
<i>qepA</i> -R	CTTCTGCCCGAGTATCGTG		
<i>qnrA</i> -F	ATTTCTACGCCAGGATTTG	516	53
<i>qnrA</i> -R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
<i>qnrB</i> -F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469	53
<i>qnrB</i> -R	ACGATGCCTGTTAGTTGTC		
<i>qnrS</i> -F	ACGACATTCGTCACCTGCAA	417	53
<i>qnrS</i> -R	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC		
<i>qnrC</i> -F	GGTTGTACATTTATTGAATCG	307	55
<i>qnrC</i> -R	CACCTACCCATTTATTTCA		
<i>qnrD</i> -F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	583	55
<i>qnrD</i> -R	AACAAGCTGAAGCGCCTG		

注:—为长度不确定

对阳性扩增产物,将纯化 PCR 产物连接至 T 载体,并转至感受态细胞,操作步骤参照试剂盒说明书,送上海英俊公司测序,将反馈的结果在 NCBI BLAST 上进行比对。

### 1.2.5 脉冲电场凝胶电泳(PFGE)分析

PFGE 方法:参照美国疾病预防控制中心 PulseNet 的统一方法<sup>[36]</sup>,PFGE 分型所用标准菌株为 *Salmonella* Braenderup 血清型参考菌株 H9812。电泳图像分析和结果聚类分析,PFGE 图像应用 Bionumerics v4.0 进行处理,识别图像条带。在图像

识别过程中,在 Marker 最小片段外的试验菌株条带因为不能为 Marker 校准而被舍去。图像通过统一的 Marker 进行校准,标定条带位置,必要时进行人工校正。聚类方法和参数选择:聚类图类型选择非加权组平均法(UPGMA),条带位置差异容许度选择 1.0%,优化值 0.5%。Band based/Dice 方法计算相似性系数,即 Dice 系数( $F$  值  $\times 100\%$ )。 $F = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$ ,  $n_x$ : 菌株  $x$  的总的片段数;  $n_y$ : 菌株  $y$  的总的片段数;  $n_{xy}$ : 菌株  $x$  和菌株  $y$  的相同的片段数。 $F$  值反映的是不同菌株电泳条带的相似性程度,范围在 0~1 之间,0 代表完全不相关,1 代表完全相同。在限制性内切酶的作用下,不同的菌株会呈现不同的条带数和片段大小,按照 PulseNet 的命名原则,对每一种不同的带型进行命名。

## 2 结果

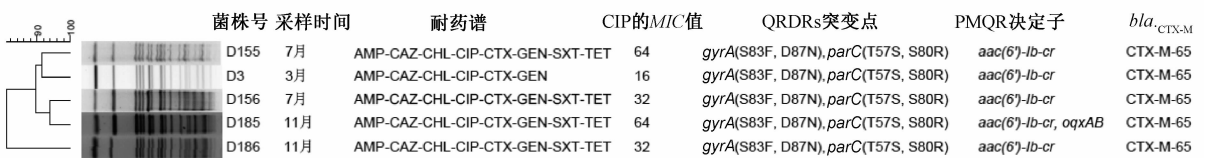
### 2.1 菌株情况

通过 VITEK2 和 PCR 双重方法鉴定,从肉鸡养殖场 338 份样品(肛拭子和环境粪便样品分别为 92 和 246 份)中共分离到 52 株沙门菌(肛拭子和粪便分别为 25 和 27 株),分离率为 15.38% (52/338)。其中鹤壁市、开封市、漯河市和周口市分离率分别为 17.86%、14.55%、8.33% 和 20.83%,4 个地区之间的分离率均差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。对分离菌株进行血清分型,其中有肠炎沙门菌 40 株,在 4 个地区均有检出;印第安纳沙门菌 8 株,在 3 个地区检出;其他血清型 4 株。各个地区菌株分离及血清分布情况见表 2、3。

表 2 河南省 4 个地区养殖场沙门菌分离率  
Table 2 Prevalence of *Salmonella* from broiler flocks in four different regions in Henan Province

地区	样品数/份	阳性数/份	分离率/%
鹤壁市	84	15	17.86
开封市	110	16	14.55
漯河市	72	6	8.33
周口市	72	15	20.83
合计	338	52	15.38

Dice (Opt:1.00%) (Tol:1.0%-1.0%) (H=0.0% S=0.0%) [0.0%-100.0%]  
PFGE *Xba*I PFGE *Xba*I



注: AMP: 氨基西林; CAZ: 头孢他啶; CHL: 氯霉素; CIP: 环丙沙星; CTX: 头孢噻肟; GEN: 庆大霉素; SXT: 复方新诺明; TET: 四环素;  
MIC: 最小抑菌浓度

图 1 5 株环丙沙星和头孢噻肟耐药的印第安纳沙门菌的 PFGE 聚类图

Figure 1 PFGE patterns of five *Salmonella* Indiana isolates that are resistant to both ciprofloxacin and cefotaxime

表 3 河南省 4 个地区养殖场沙门菌血清分布情况(株)

Table 3 Distribution of serotype of *Salmonella* from broiler flocks in four different regions in Henan Province

地区	肠炎沙门菌	印第安纳沙门菌	其他
鹤壁市	14	1	0
开封市	6	6	4
漯河市	6	0	0
周口市	14	1	0
合计	40	8	4

### 2.2 药敏结果

#### 2.2.1 双耐菌株的筛选

将 52 株分离纯化的沙门菌接种到具有环丙沙星和头孢噻肟双抗性的 MHA 上,有 5 株从养殖场环境粪便样品中分离的印第安纳沙门菌对以上两种抗生素耐药。双耐菌株仅在鹤壁市( $n = 1$ )和开封市( $n = 4$ )检出,在本次研究中的分离率为 1.48% (5/338),在分离菌株中的比例为 9.62% (5/52)。双耐菌株在各个地区的分布情况见表 4,菌株信息见图 1。

表 4 河南省 4 个地区耐环丙沙星和头孢噻肟菌株的分布情况  
Table 4 Distribution of cefotaxime and ciprofloxacin co-resistance of *Salmonella* from broiler flocks in four different regions in Henan Province

地区	双耐菌株/株	占样品数比例/%	占阳性数比例/%
鹤壁市	1	1.19(1/84)	6.67(1/15)
开封市	4	3.64(4/110)	25.00(4/16)
漯河市	0	0.00(0/72)	0.00(0/6)
周口市	0	0.00(0/72)	0.00(0/15)
合计	5	1.48(5/338)	9.62(5/52)

#### 2.2.2 双耐菌株的药敏结果

在检测的 10 种抗生素中,5 株沙门菌对替加环素和亚胺培南敏感,有 1 株对 6 种抗生素耐药,耐药谱为 AMP-CAZ-CHL-CIP-CTX-GEN,其余 4 株对其余 8 种抗生素均耐药,耐药谱为 AMP-CAZ-CHL-CIP-CTX-GEN-SXT-TET。其中对 CTX 的 MIC 值均  $> 128 \mu\text{g/ml}$ ,对 CIP 的 MIC 值菌株在  $16 \sim 64 \mu\text{g/ml}$  之间,具有较高的耐药浓度。结果见图 1。

### 2.2.3 ESBLs 筛选结果

添加了不可逆性竞争结合  $\beta$ -内酰胺酶的克拉维酸(4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )后,5株沙门菌的CTX的MIC均较没有添加克拉维酸降低了8倍以上的数值,可以确定这5株菌均为ESBLs菌株。

### 2.3 喹诺酮和ESBLs耐药机制分析结果

QRDRs突变分析结果显示:喹诺酮耐药决定区基因分析显示,5株沙门菌分离株,*gyrA*和*parC*均有点突变,*gyrB*和*parE*没有发生突变。5株菌的QRDRs都具有*gyrA*(S83F, D87N),*parC*(T57S, S80R)的4个突变位点,见图1。

PMQR分析结果显示:5株沙门菌都携带了质粒介导的喹诺酮耐药基因,包括*oqxAB*( $n=1$ )和*aac*(6')-*Ib-cr*( $n=5$ )。其中,1株分离菌的CIP的MIC为64 mg/L,其携带两种耐药基因[*oqxAB*、*aac*(6')-*Ib-cr*]。其余4株菌仅携带一种耐药基因[*aac*(6')-*Ib-cr*]。5株分离株均未检出*qepA*、*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*qnrC*、*qnrD*基因,见图1。

ESBLs耐药基因结果显示:5株沙门菌经CTX-M组分群均为CTX-M-group9,进一步测序分析为*bla*<sub>CTX-M-65</sub>,见图1。

### 2.4 PFGE 聚类结果

5株沙门菌分离株PFGE聚类后相似度在89.61%~93.75%。菌株之间差异很小,仅2~3条带的差异,见图1。

## 3 讨论

### 3.1 环丙沙星和头孢噻肟耐药沙门菌的现状

本研究对河南省4个地区环丙沙星和头孢噻肟耐药的沙门菌进行检测,耐药菌株占有分离菌株的9.62%,这与我国北京地区动物源性食品的分离率相似,主要的血清型也为印第安纳沙门菌<sup>[9]</sup>。而本次研究中并没有检测到耐环丙沙星和头孢噻肟优势血清型肠炎沙门菌,可能与某种血清型更容易发生突变或获得可转移的耐药质粒有关,这也是下一步研究的重点。我国广州地区分离的双耐沙门菌的血清型是奥拉宁堡沙门菌,且都来源于生猪肉,而没有从生鸡肉中分离到<sup>[15]</sup>。原因可能为以下两点:一是地域上的南北差异,对于不同动物种类来源,沙门菌存在不同污染优势血清型<sup>[37]</sup>;二是食品从农场到餐桌的食品安全控制体系中,屠宰场加工环节存在的交叉污染<sup>[38]</sup>,使得污染的菌相发生变化。本研究显示河南省养殖环节存在较高环丙沙星和头孢噻肟耐药沙门菌的分离率,同时河南省从临床腹泻感染者中已经分离到耐环丙沙星和头孢噻肟的沙门菌菌株<sup>[39]</sup>,说明耐药菌株可能已经在农

场-餐桌-感染者的传递链条中建立起了耐药相关性。因环丙沙星和头孢噻肟是临床治疗严重沙门菌感染者的主要抗生素,同时5株耐环丙沙星和头孢噻肟菌株均为多重耐药菌株,这将使临床用药更加困难,特别是对于免疫能力低下的儿童和老人,则有致命的危害<sup>[5]</sup>。因此针对相关抗生素在我国养殖业中可能存在滥用<sup>[40]</sup>,需要进一步深入研究全国养殖场动物源性致病菌中耐药菌株的分布特点及变化。本研究分离的5株耐药沙门菌对亚胺培南和替加环素敏感,提示这些近期上市的抗生素对沙门菌的抗菌效果较好。

### 3.2 喹诺酮和ESBLs耐药机制探讨

在沙门菌的喹诺酮耐药中,喹诺酮类抗生素的主要靶点是拓扑异构酶II(DNA促旋酶),由在QRDRs中*gyrA*和*gyrB*分别编码其两个亚单位A和B<sup>[41]</sup>;第二个靶点是拓扑异构酶IV,由*parC*和*parE*分别编码其亚单位。拓扑异构酶的改变,将会降低喹诺酮类抗生素对其的亲合力,从而降低微生物对抗生素的敏感性。报道资料显示<sup>[42]</sup>,喹诺酮类抗生素耐药机制以*gyrA*和*parC*的突变为主。本研究通过对分离株的*gyrA*和*parC*基因进行测序比较发现,耐环丙沙星和头孢噻肟的5株菌株均具有*gyrA*和*parC*各两个点突变,即*gyrA*的第83位密码子由亮氨酸替代丝氨酸和第87位密码子由天冬酰胺替代天冬氨酸,*parC*的第57位密码子由丝氨酸替代苏氨酸和第80位密码子由精氨酸替代丝氨酸,这可以看做是分离株获得喹诺酮耐药的第一步<sup>[43]</sup>。5株菌株均具有4个的突变位点,可能是由于拓扑异构酶编码基因的点突变从而导致了本研究中分离株对环丙沙星耐药表型的出现。同时,*gyrA*、*parC*出现4个突变位点时,表现出环丙沙星的高耐药(MIC $\geq 16$  mg/L),证实这些突变位点的出现,能够降低分离株对环丙沙星的敏感度。

自PMQR被提出以来,Qnr决定子(QnrA、QnrB、QnrC、QnrD和QnrS)、Aac(6')-Ib-cr、外排系统相关的QepA和OqxAB,作为喹诺酮质粒介导的耐药机制日益受到关注。本文初步研究表明耐环丙沙星和头孢噻肟的5株菌株都携带了*aac*(6')-*Ib-cr*,仅一株菌携带了*oqxAB*基因,没有菌株携带*qepA*基因,这与目前文献报道的一致<sup>[44-45]</sup>,该基因主要存在于大肠埃希菌中,仅有西班牙报道的文献中提到了首次从沙门菌中检测到该基因<sup>[46]</sup>,因此需要更进一步的研究阐明该基因在沙门菌的携带情况。综上所述,本研究中环丙沙星耐药沙门菌中的喹诺酮耐药机制具有一定的多样性。

产生 $\beta$ -内酰胺酶是革兰阴性杆菌对 $\beta$ -内酰胺

类抗生素耐药的主要机制,尤其自80年代中期发现ESBLs不仅能分解第一、二代头孢菌素和青霉素类抗生素,而且能分解广谱头孢菌素和单酰胺类抗生素,给临床感染性疾病的治疗造成极大的威胁。ESBLs主要由肠杆菌科细菌产生,肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌是其代表菌种。自1983年在德国首次报道分离出 $bla_{SHV-2}$ 编码的ESBLs以来,全世界许多地方不断有新的ESBLs检出<sup>[11-14]</sup>。由克拉维酸抑制的 $\beta$ -内酰胺酶由质粒介导产生,根据编码基因同源性的不同分为TEM、SHV、CTX-M、OXA和其他5类。本文耐环丙沙星和头孢噻肟的5株沙门菌均对三代头孢耐药,且ESBLs检测均产ESBLs酶。进一步分析编码基因,发现5株菌株质粒编码的耐药基因CTX-M型别均为 $bla_{CTX-M-65}$ 型。杨保伟等<sup>[16]</sup>对我国食品中分离的沙门菌进行ESBLs检测,发现主要为 $bla_{SHV-2}$ 、 $bla_{CYM-2}$ 等。本研究中编码的超广谱 $\beta$ -内酰胺酶质粒携带的均为 $bla_{CTX-M-65}$ 型,这与广州地区报道的双耐菌株的 $bla_{CTX-M-14}$ 型别不同<sup>[15]</sup>。但在广州地区已经发现了携带 $bla_{CTX-M-65}$ 基因型质粒的大肠埃希菌<sup>[47]</sup>,提示该型别可能已经存在我国某些地区。质粒分型技术是目前国际上比较常见用于耐药质粒的进化研究的方法,可以检测肠杆菌科耐药质粒的播散和进化,特别ESBLs的播散特点分析<sup>[48]</sup>,借助该技术可进一步研究确证 $bla_{CTX-M-65}$ 基因型质粒是否通过水平转移等方法在相同或不同的种属之间播散。

### 3.3 菌株相似性分析

PFGE分析发现耐环丙沙星和头孢噻肟的5株沙门菌具有高度的相似性,有4株菌株来源于同一个地区,说明该带型已经成为该地区的主要优势克隆株,相似性的产生可能是由酶切位点的点突变、缺失或者插入引起<sup>[49]</sup>,也可能是沙门菌基因组中质粒的稳定性导致<sup>[50]</sup>。

抗生素的发现和临床应用是20世纪医学史上最成功的典范,也是世界医学史上最辉煌的一页。但是,随着抗生素在畜牧养殖业、水产和医疗的大量使用,多重耐药菌大量涌现,甚至出现了对所有常用抗菌药物耐药的超级耐药菌,人类面临无抗生素可用的“后抗生素时代”的严重威胁。2011年世界卫生组织为此发出“今天不采取行动,明天就无药可用”的呼吁。近年来,氟喹诺酮耐药沙门菌在经济型动物中的分布在世界范围内已有广泛研究,在我国部分地区也开展了零售环节肉鸡制品氟喹诺酮和三代头孢耐药菌株的研究<sup>[9,15]</sup>。本研究在河南省肉鸡养殖中检出环丙沙星和头孢噻肟耐药沙门菌,特别是其还具有复杂的喹诺酮耐药机制和可

传播的超广谱 $\beta$ -内酰胺酶耐药机制,结合报道的临床资料,表明耐药菌株可能已经在农场-餐桌-感染者的传递链条中建立起了耐药关联性。因此,应对其传播途径和机制开展深入研究,阐明农场-餐桌食品控制链的源头,即养殖环节中耐药菌株分布的基本情况以及耐药可能传播的途径,评估此类耐药菌株对社区人群、医院感染带来的健康风险,从而为社区感染防控提供技术支持。

### 参考文献

- [1] Olsen S J, Bishop R, Brenner F W, et al. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997 [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2001, 183(5): 753-761.
- [2] Lynch M, Painter J, Woodruff R, et al. Surveillance for foodborne-disease outbreaks: United States, 1998-2002 [J]. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2006, 55(SS10): 1-34.
- [3] Majowicz S E, Musto J, Scallan E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis [J]. *Clinical Infectious Diseases* 2010, 50(6): 882-889.
- [4] 王军,郑增忍,王晶钰. 动物源性食品中沙门菌的风险评估[J]. *中国动物检疫*, 2007, 24(4): 23-25.
- [5] LIU H H. Safety profile of the fluoroquinolones [J]. *Drug Safety*, 2010, 33(5): 353-369.
- [6] CHANG C M, Lee H C, Lee N Y, et al. Cefotaxime-ciprofloxacin combination therapy for nontyphoid *Salmonella* bacteremia and paravertebral abscess after failure of monotherapy [J]. *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 2006, 26(11): 1671-1674.
- [7] Fey P D, Safranek T J, Rupp M E, et al. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle [J]. *New England Journal of Medicine*, 2000, 342(17): 1242-1249.
- [8] XU X, CUI S, ZHANG F, et al. Prevalence and characterization of cefotaxime and ciprofloxacin co-resistant *Escherichia coli* isolates in retail chicken carcasses and ground pork, China [J]. *Microbial Drug Resistance*, 2014, 20(1): 73-81.
- [9] WANG Y, CHEN Q, CUI S, et al. Enumeration and characterization of *Salmonella* isolates from retail chicken carcasses in Beijing, China [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2014, 11(2): 126-132.
- [10] White D G, ZHAO S, Sudler R, et al. The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats [J]. *New England Journal of Medicine*, 2001, 345(16): 1147-1154.
- [11] Livermore D M, Hawkey P M. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 56(3): 451-454.
- [12] Livermore D M, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 59(2): 165-174.
- [13] Baudry P J, Nichol K, De Corby M, et al. Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of QepA in North America [J]. *Diagnostic Microbiology*

- and Infectious Disease,2009,63(3):319-326.
- [14] Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms[J]. Clinical Microbiology and Infection,2001,7(11):597-608.
- [15] WONG M H Y, ZENG L, LIU J H, et al. Characterization of *Salmonella* food isolates with concurrent resistance to ceftriaxone and ciprofloxacin[J]. Foodborne Pathogens and Disease,2013,10(1):42-46.
- [16] 杨保伟,盛敏,席美丽,等.沙门氏菌抗生素抗性机理研究进展[J].微生物学通报,2008,35(9):1479-1484.
- [17] Hawkey P M. Prevalence and clonality of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Asia [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2008,14(Supplement 1):159-165
- [18] JIANG H X, SONG L, LIU J, et al. Multiple transmissible genes encoding fluoroquinolone and third-generation cephalosporin resistance co-located in non-typhoidal *Salmonella* isolated from food-producing animals in China [J]. International Journal of Antimicrobial Agents,2014,43(3):242-247.
- [19] Rahn K, De Grandis S A, Clarke R C, et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella* [J]. Mol Cell Probes,1992,6(4):271-279.
- [20] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB 4789.4—2010 食品微生物学检验 沙门氏菌检验方法[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [21] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement M100-S23 [S]. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute,2013.
- [22] CHEN Y H, LU P L, HUANG C H, et al. Trends in the susceptibility of clinically important resistant bacteria to tigecycline: results from the Tigecycline In Vitro Surveillance in Taiwan study,2006 to 2010 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012,56(3):1452-1457.
- [23] Sader H S, Farrell D J, Jones R N, et al. Tigecycline activity tested against multidrug-resistant Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* spp. isolated in US medical centers (2005-2009) [J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2011,69(2):223-227.
- [24] LING J M, CHAN E W, Lam A W, et al. Mutations in topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant *Salmonellae* in Hong Kong [J]. Antimicrob Agents Chemother,2003,47(11):3567-3573.
- [25] CHEN S, CUI S, Mc Dermott P F, et al. Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of *Salmonella enterica* serovar typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007,51(2):535-542.
- [26] Yamane K, Wachino J, Suzuki S, et al. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan [J]. Antimicrob Agents Chemother,2008,52(4):1564-1566.
- [27] LIU J H, DENG Y T, ZENG Z L, et al. Copevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *QepA*, *Qnr*, and *Aac* ( $6'$ )-*Ib-cr* among 16S rRNA methylase *RmtB*-producing *Escherichia coli* isolates from pigs [J]. Antimicrob Agents Chemother,2008,52(8):2992-2993.
- [28] Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, et al. *qnr* gene nomenclature [J]. Antimicrob Agents Chemother,2008,52(7):2297-2299.
- [29] Kim H B, Park C H, Kim C J, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period [J]. Antimicrob Agents Chemother,2009,53(2):639-645.
- [30] 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]. Antimicrob Agents Chemother,2009,53(2):603-608.
- [31] 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(11):3953-3955.
- [32] Kim H B, WANG M H, Park C H, et al. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009,53(8):3582-3584.
- [33] XU L, Ensor V, Gossain S, et al. Rapid and simple detection of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes by multiplex PCR assay [J]. J Med Microbiol, 2005,54(12):1183-1187.
- [34] Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, et al. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France [J]. Antimicrob Agents Chemother,2004,48(4):1249-1255.
- [35] JIANG X, ZHANG Z, LI M, et al. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother,2006,50(9):2990-2995.
- [36] Ribot E M, Fair M, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet [J]. Foodborne Pathogens and Disease,2006,3(1):59-67.
- [37] Glenn L M, Lindsey R L, Folster J P, et al. Antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from animals, retail meats, and humans in the United States and Canada [J]. Microbial Drug Resistance,2013,19(3):175-184.
- [38] 白莉,李薇薇,王岗,等.我国4省肉鸡屠宰场沙门菌脉冲场凝胶电泳分子分型[J].中国食品卫生杂志,2013,25(4):303-308.
- [39] XIA S, Hendriksen R S, XIE Z, et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from infections in humans in Henan Province, China [J]. Journal of Clinical Microbiology,2009,47(2):401-409.
- [40] ZHAO S, Maurer J J, Hubert S, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates [J]. Veterinary Microbiology,2005,107(3):215-224.
- [41] Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea M H, et al. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977,74(11):4772-4776.
- [42] Morgan-Linnell S K, Boyd L B, Steffen D, et al. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009,53(1):235-241.
- [43] Everett M J, JIN Y F, Ricci V, et al. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli*

- strains isolated from humans and animals [ J ]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40(10):2380-2386.
- [44] Yamane K, Wachino J-i, Suzuki S, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate [ J ]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(9):3354-3360.
- [45] Yamane K, Wachino J-i, Suzuki S, et al. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan [ J ]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(4):1564-1566.
- [46] Lunn A D, Fàbrega A, Sánchez-Céspedes J, et al. Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among *Salmonella* spp. clinical isolates [ J ]. *International Microbiology*, 2010, 13(1):15-20.
- [47] HE L, Partridge S R, YANG X, et al. Complete nucleotide sequence of pHN7A8, an F33; A-; B- type epidemic plasmid carrying *bla*<sub>CTX-M-65</sub>, *fosA3* and *rmtB* from China [ J ]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(1):46-50.
- [48] Carattoli A, Bertini A, Villa L, et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing [ J ]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 63(3):219-228.
- [49] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis; criteria for bacterial strain typing [ J ]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(9):2233.
- [50] Barrett T J, Gerner-Smith P, Swaminathan B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance [ J ]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2006, 3(1):20-31.

## 论著

# 浓缩乳清蛋白粉及其制品中梭状芽胞杆菌的分离及鉴定

董银苹<sup>1</sup>, 徐进<sup>1</sup>, 王伟<sup>1</sup>, 白莉<sup>1</sup>, 胡晓<sup>2</sup>, 甘辛<sup>1</sup>, 闫韶飞<sup>1</sup>, 李志刚<sup>1</sup>, 余东敏<sup>1</sup>, 李凤琴<sup>1</sup>

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021;

2. 中国人民武装警察部队后勤学院 天津市职业与环境危害防制重点实验室, 天津 300162)

**摘要:**目的 采用多种方法对新西兰进口浓缩乳清蛋白粉及其制品、市售婴幼儿配方粉样品中分离的梭状芽胞杆菌进行鉴定。方法 根据分离菌株的生长特性、革兰氏染色、生化反应、普通显微镜和电子显微镜下形态特征等表型特征, 结合 16S rRNA 基因克隆测序及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱等结果, 对分离菌株进行综合鉴定。结果 78 份样品中有 16 份(20.5%)被梭状芽胞杆菌污染, 其中 2 份为浓缩乳清蛋白粉及其制品, 14 份为婴幼儿配方粉样品。共分离到梭状芽胞杆菌 17 株, 包括生孢梭菌 12 株、拜氏梭菌 2 株、丁酸梭菌 2 株和第三梭菌 1 株。结论 新西兰进口浓缩乳清蛋白粉及其制品中厌氧微生物污染严重, 经鉴定污染的主要微生物为生孢梭菌。  
**关键词:** 浓缩乳清蛋白粉; 生孢梭菌; 鉴定; 16S rRNA; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 婴幼儿配方乳粉; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号: R155; Q93-3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015) 05-0494-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.05.002

## Isolation and identification of *Clostridium* from whey protein concentrate and its products

DONG Yin-ping, XU Jin, WANG Wei, BAI Li, HU Xiao, GAN Xin, YAN Shao-fei,

LI Zhi-gang, YU Dong-min, LI Feng-qin

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** *Clostridium* was isolated and characterized from powdered infant formula (PIF), whey protein concentrate (WPC) suspected to be contaminated with *C. botulinum* and WPC-based products, as well as PIF collected from Beijing market. **Methods** *Clostridium* isolates were characterized by morphological characteristics, gram's stain, microscopic and electron microscopy characteristics, biochemical test, 16S rRNA sequencing and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) methods. **Results** Among 78 samples, 16

收稿日期: 2015-03-06

作者简介: 董银苹 女 助理研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail: dongyinping@cfsa.net.cn

通讯作者: 李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail: lifengqin@cfsa.net.cn