

## 论著

## 北京市集贸市场生鲜猪肉肠球菌种水平鉴定及耐药特征

彭子欣<sup>1</sup>,张思雨<sup>2</sup>,闫韶飞<sup>1</sup>,王帅<sup>2</sup>,王伟<sup>1</sup>,张建中<sup>3</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. 北京农学院食品科学与工程学院,北京 102206; 3. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,北京 102206)

**摘要:**目的 评价和比较不同肠球菌种水平鉴定方法的准确性,了解北京市集贸市场生鲜猪肉肠球菌的种水平分布及耐药特征。方法 利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和VITEK 2 COMPACT两种方法对北京市集贸市场生鲜猪肉肠球菌开展种水平鉴定,两种方法鉴定结果不一致的菌株使用API 20 Strep、16S rRNA和23S rRNA序列分析再次鉴定。比较不同种肠球菌对10种临床常用抗生素的药物敏感性。结果 在5种肠球菌种水平鉴定方法中,16S rRNA序列分析和最终结果的符合率最高,为100.0%;VITEK 2 COMPACT符合率最低,仅为4.0%(1/25)。在86株肠球菌中,粪肠球菌占82.6%(71/86),其次为希拉肠球菌占14.0%(12/86)。粪肠球菌对环丙沙星(CIP)的耐药率高于希拉肠球菌,差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.751, P < 0.01$ );对四环素(TET)、高浓度链霉素(HLSR)和高浓度庆大霉素(HLGR)的耐药率均高于希拉肠球菌,但差异无统计学意义(TET: $\chi^2 = 3.865, P > 0.05$ ;HLSR: $\chi^2 = 1.608, P > 0.05$ ;HLGR: $\chi^2 = 0.553, P > 0.05$ ),但对红霉素(ERY)和氯霉素(CHL)的耐药率明显低于希拉肠球菌,差异有统计学意义(ERY: $\chi^2 = 20.244, P < 0.01$ ;CHL: $\chi^2 = 14.139, P < 0.01$ )。结论 16S rRNA和MALDI-TOF-MS序列分析技术在肠球菌种水平快速鉴定上有较高准确性,不同种属肠球菌呈现不同耐药特征,本研究为有效监测食源性耐药肠球菌的传播和流行提供了科学数据。

**关键词:**肠球菌;种水平鉴定;药物敏感性;耐药;粪肠球菌;希拉肠球菌;生鲜猪肉;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)03-0283-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.03.006

**The species-level identification and antimicrobial susceptibility analysis of *Enterococcus* spp. of raw pork collected from a free trade market in Beijing**

PENG Zi-xin<sup>1</sup>, ZHANG Si-yu<sup>2</sup>, YAN Shao-fei<sup>1</sup>, WANG Shuai<sup>2</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>,  
ZHANG Jian-zhong<sup>3</sup>, LI Feng-qin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China; 2. Food Science and Engineering College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 3. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease and Prevention, Beijing 102206, China)

**Abstract: Objective** This study was to compare and assess the accuracy of species-level identification methods for *Enterococcus* spp., and to understand the species distribution and antimicrobial susceptibility characteristics of *Enterococcus* spp. collected of raw pork from a free trade market in Beijing. **Methods** By using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and 16S rRNA gene analysis, the species of *Enterococcus* spp. were identified, and the inconsistent results were further identified by API 20 Strep, 16S rRNA and 23S rRNA gene analysis. Moreover, the susceptibility of isolated *Enterococcus* spp. to 10 antibiotics was analyzed at species level. **Results** Among the five identification methods, 16S rRNA gene analysis showed 100.0% consistence with the final species identification results, but the VITEK 2 COMPACT showed the lowest consistence of only 4.0% (1/25). The most prevalent species in *Enterococcus* spp. was *Enterococcus faecalis*, accounting for 82.6% (71/86) followed by *Enterococcus hirae* 14.0% (12/86). *Enterococcus faecalis* strains showed higher antimicrobial susceptibility than *Enterococcus hirae* to

收稿日期:2017-03-06

基金项目:国家自然科学基金(31601574);中国博士后基金(2016M590072);北京青年拔尖人才(2014000021223ZK46);北京市科技新星交叉学科合作项目(Z161100004916029)

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

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

ciprofloxacin, tetracycline, high-level streptomycin and high-level gentamicin ( ciprofloxacin:  $\chi^2 = 10.751$ ,  $P < 0.01$ ; tetracycline:  $\chi^2 = 3.865$ ,  $P > 0.05$ ; high-level streptomycin:  $\chi^2 = 1.608$ ,  $P > 0.05$ ; high-level gentamicin:  $\chi^2 = 0.553$ ,  $P > 0.05$ ), but showed apparently lower antimicrobial susceptibility on erythromycin and chloramphenicol than *Enterococcus hirae* (erythromycin:  $\chi^2 = 20.244$ ,  $P < 0.01$ ; chloramphenicol:  $\chi^2 = 14.139$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** The 16S rRNA gene analysis and MALDI-TOF-MS have higher accuracy at species level identification for *Enterococcus* spp.. Different species of *Enterococcus* spp. showed various antimicrobial susceptibility characteristics. This study was important for the effective monitoring of drug-resistant enterococci spread and prevalence.

**Key words:** *Enterococcus* spp.; species-level identification; antibiotic susceptibility; resistant to antibiotics; *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus hirae*; raw pork; foodborne pathogens

肠球菌中某些菌种可作为发酵剂和益生菌用于食品和药品生产中<sup>[1]</sup>,但是近几十年来发现,肠球菌中的一些菌株是条件致病菌,其引起的食品安全问题已引起相关专家的关注。食品中污染的肠球菌由于其环境耐受力强,难以通过加工手段杀灭,会在食品中快速繁殖,引起食物中毒<sup>[2]</sup>。更应注意的是,肠球菌是重要的耐药基因储存库,其携带的耐药基因可通过食物链传递给其他食源性致病菌<sup>[3]</sup>。

肠球菌属目前有 50 多个种,大部分肠球菌来源于人和动物的粪便,而少数菌种来源于非粪便基质,不同种肠球菌的生理、生化特性,乃至致病宿主和耐药特征均不同,因此准确了解肠球菌的种属分布,对于认知其流行趋势和遗传变异具有重要意义<sup>[1,4]</sup>。然而,由于没有肠球菌种水平鉴定显色培养基,一些肠球菌种水平特征基因序列又极为相似,肠球菌种水平的快速鉴定一直是微生物检验的一个难点,阻碍了相关实验室对肠球菌种属分布和流行特征的深入认识<sup>[4-5]</sup>。本研究对前期从北京市集贸市场环境和生鲜猪肉中分离的肠球菌开展种水平鉴定,评价不同鉴定方法的区分效果和准确性,分析不同种肠球菌的耐药分布,描述食品中不同种属肠球菌的耐药特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源

2015年5月从北京市某集贸市场分离肠球菌 86 株,其中来源于地面涂抹样品、墙壁涂抹样品、污水样品和生鲜猪肉样品的肠球菌数量分别为 29、14、21 和 22 株<sup>[2]</sup>,其药物敏感性检验方法和药敏特征参见文献[6]。质控菌株粪肠球菌(ATCC 29212)为本实验室保藏。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad, VITEK 2 COMPACT 全自动细菌鉴定仪、VITEK 革兰阳性细菌鉴定卡、API 20 Strep 试剂条和

VITEK® 2 Densi CHEK™ Plus 浊度仪均购自法国梅里埃, MALDI Biotyper(德国布鲁克)。

脑心浸液琼脂(BHA)和血琼脂平板均购自北京陆桥技术有限责任公司, 2 × Taq PCR MaterMix (KT201-02, 北京天根生化有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 质谱和生化鉴定

对 86 株肠球菌开展基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)质谱鉴定和 VITEK 2 COMPACT 生化鉴定,鉴定结果不一致的菌株,再分别开展 API 20 Strep 试剂条手工鉴定、16S rRNA 和 23S rRNA 分子鉴定。

MALDI-TOF-MS、VITEK 2 COMPACT 革兰阳性细菌鉴定和 API 20 Strep 试剂条的使用方法按说明书进行。

#### 1.2.2 分子鉴定

模板制备:用无菌接种环挑取 BHA 平板上培养的肠球菌菌苔,在 200 μl 无菌超纯水中混匀,加入 5 μl 玻璃珠涡旋振荡 5 min 后,于 100 °C 水浴中加热 10 min, 13 000 r/min 离心 2 min, 上清液即为制备好的 DNA 模板,将 DNA 模板转于另一无菌离心管中备用。

引物合成:根据细菌高度保守的 16S rRNA 和 23S rRNA<sup>[7]</sup> 序列分别设计引物 27F/1492R 和简并引物 23F/23R, 扩增片段长度分别为 1.5 kb 和 400 bp。16S rRNA 序列的引物信息为: 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTAC CTTGTTACGACTT-3'; 23S rRNA 序列的引物信息为: 23F: 5'-GCGATTCYGAAYGGGGRAACCC-3' (Y 代表 C 或 T, R 代表 A 或 G), 23R: 5'-TTCCGCT TTCCCTCACGGTACT-3'<sup>[8]</sup>。

PCR 反应体系(50 μl): PCR Mix 25 μl, 上下游引物各 1 μl, ddH<sub>2</sub>O 22 μl, DNA 模板 1 μl。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 6 min; 95 °C 变性 0.5 min, 55 °C 退火 0.5 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。16S rRNA 和 23S rRNA 基因的测序结果使用美国国家生物技术信息中心(NCBI)网

站的 BLAST 工具在数据库中进行序列比对,得分最高的比对结果认为是被检肠球菌所属菌种。

### 1.2.3 药敏检验

按照美国临床和实验室标准委员会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的微量肉汤稀释法<sup>[9]</sup>,测定受试菌株对氨苄西林 (AMP)、青霉素 (PEN)、红霉素 (ERY)、环丙沙星 (CIP)、达托霉素 (DAP)、万古霉素 (VAN)、四环素 (TET)、氯霉素 (CHL)、高浓度庆大霉素 (HLGR, 250 和 500  $\mu\text{g/ml}$ ) 和高浓度链霉素 (HLSR, 500 和 1 000  $\mu\text{g/ml}$ ) 等抗生素的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。并参照 CLSI M100-S25<sup>[9]</sup> 文件表 2D 推荐的标准进行结果判定和解释。药敏质控菌株为粪肠球菌 (ATCC 29212)。

## 2 结果与分析

### 2.1 肠球菌种水平鉴定方法比较

使用 MALDI-TOF-MS 和 VITEK 2 COMPACT 开展菌种鉴定的结果中,有 70.9% (61/86) 肠球菌的

鉴定结果一致,25 株鉴定结果不一致。对这 25 株菌分别使用 API 20 Strep、16S rRNA 和 23S rRNA 基因测序再次开展鉴定,鉴定结果如表 1 所示。在使用 5 种方法鉴定的 25 株菌中,1 株菌 (R16-C2) 出现了 4 种不同鉴定结果,6 株菌出现了 3 种不同鉴定结果,对这 7 株菌取鉴定一致结果,作为最终鉴定菌种。

如表 1 所示,使用 API 20 Strep 开展种水平鉴定的结果中,28.0% (7/25) 的鉴定结果分值低于 80%,即结果可疑,需要附加试验进一步确认。16S rRNA 和 23S rRNA 基因鉴定结果的符合率为 92.0% (23/25),16S rRNA 鉴定 W3-E1 和 R16-C2 的结果分别为希拉肠球菌和泰国肠球菌,但 23S rRNA 鉴定结果是坚韧肠球菌和屎肠球菌。MALDI-TOF-MS 和 VITEK 2 COMPACT 鉴定 D1-K1 的结果分别为德氏肠球菌和棉子糖肠球菌,16S rRNA 和 23S rRNA 分子鉴定结果为粪肠球菌,API 20 Strep 鉴定结果疑似粪肠球菌,最终取粪肠球菌鉴定结果。

表 1 北京市集贸市场生鲜猪肉肠球菌种水平鉴定 ( $n=25$ )

Table 1 Species-level identification of *Enterococcus* spp. isolated from a raw pork farm market in Beijing

菌株	MALDI-TOF-MS	VITEK 2 COMPACT	API 20 Strep	16S rRNA	23S rRNA	确定菌种
D3-K3	粪肠球菌	粪肠球菌/鸪鸡肠球菌*	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌
D1-E3	粪肠球菌	屎肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌
D1-K1	德氏肠球菌	棉子糖肠球菌	粪肠球菌 (74.5%)	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌
D2-C1	希拉肠球菌	鸡肠球菌	坚韧肠球菌 (78.6%)	希拉肠球菌	希拉肠球菌	希拉肠球菌
D2-K1	希拉肠球菌	希拉肠球菌/坚韧肠球菌	屎肠球菌 (75.7%)	希拉肠球菌	希拉肠球菌	希拉肠球菌
W1-E3	希拉肠球菌	坚韧肠球菌	屎肠球菌 (78.4%)	希拉肠球菌	希拉肠球菌	希拉肠球菌
W2-E3	粪肠球菌	格式乳球菌	粪肠球菌 (54.6%)	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌
W2-E4	蒙氏肠球菌	鸡肠球菌	屎肠球菌	蒙氏肠球菌	蒙氏肠球菌	蒙氏肠球菌
W3-E1	粪肠球菌	希拉肠球菌	坚韧肠球菌 (78.6%)	希拉肠球菌	坚韧肠球菌	希拉肠球菌
R16-C2	泰国肠球菌	鸡肠球菌	粪肠球菌 (54.6%)	泰国肠球菌	屎肠球菌	泰国肠球菌
R16-E2	粪肠球菌	屎肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌
墙壁来源肠球菌	粪肠球菌	屎肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌

注: \* 表示两个菌种的可能性均占 50%; 括号中的数值低于 80% 表示该鉴定结果可疑; 墙壁来源肠球菌包括 Q1-C1 等 14 株菌

两两比较 25 株肠球菌用 5 种不同鉴定方法得到的结果,见表 2,一致性最高的是 MALDI-TOF-MS 和 16S rRNA,以及 16S rRNA 和 23S rRNA,符合率均为 92.0% (23/25),其次为 MALDI-TOF-MS 和 23S rRNA,符合率为 88.0% (22/25);一致性最低的是 VITEK 2 COMPACT 和 API 20 Strep,以及 VITEK 2 COMPACT 和 23S rRNA,符合率均为 0.0% (0/25)。和最终鉴定结果相比,16S rRNA 符合率最高,为 100.0% (25/25),VITEK 2 COMPACT 符合率最低,仅为 4.0% (1/25)。值得注意的是,VITEK 2 COMPACT 将 W2-E3 鉴定为格式乳球菌,出现了属水平的鉴定错误。

表 2 25 株肠球菌种水平鉴定方法的符合率/%

Table 2 Coincidence rate of species-level identification for

25 *Enterococcus* spp. strains

鉴定方法	API 20 Strep	16S rRNA	23S rRNA	确定菌种
MALDI-TOF-MS	68.0(17/25)	92.0(23/25)	88.0(22/25)	92.0(23/25)
VITEK 2 COMPACT	0.0(0/25)	4.0(1/25)	0.0(0/25)	4.0(1/25)
API 20 Strep	—	68.0(17/25)	68.0(17/25)	68.0(17/25)
16S rRNA	—	—	92.0(23/25)	100.0(25/25)
23S rRNA	—	—	—	92.0(23/25)

注: API 20 Strep 统计数据未包括疑似鉴定结果; — 表示该项不统计

2.2 北京市集贸市场生鲜猪肉肠球菌的种水平分布特征

根据鉴定结果,86 株分离自北京市集贸市场环

境和生鲜猪肉的肠球菌中,粪肠球菌占 82.6% (71/86),希拉肠球菌占 14.0% (12/86),屎肠球菌占 1.2% (1/86),蒙氏肠球菌占 1.2% (1/86),泰国肠球菌占 1.2% (1/86)。

北京市集贸市场地面涂抹样品来源的 29 株肠球菌中,粪肠球菌占 89.7% (26/29),希拉肠球菌占 10.3% (3/29);墙壁涂抹样品来源的 14 株菌全部是粪肠球菌;污水样品来源的 21 株菌中,粪肠球菌占 61.9% (13/21),希拉肠球菌占 28.6% (6/21),屎肠球菌和蒙氏肠球菌各占 4.8% (1/21);生鲜猪肉样品来源的 22 株菌中,粪肠球菌占 81.8% (18/22),希拉肠球菌占 13.6% (3/22),泰国肠球菌占 4.5% (1/22)。污水和生鲜猪肉中肠球菌种水平多样性高于墙壁和地面涂抹样品。

### 2.3 北京市集贸市场生鲜猪肉肠球菌种水平耐药特征

在受试的 10 种抗生素中,71 株粪肠球菌对 TET、ERY、HLSR、CIP、HLGR 和 CHL 的耐药率分别为 69.0% (49/71)、52.1% (37/71)、35.2% (25/71)、29.6% (21/71)、26.8% (19/71) 和 22.5% (16/71)。

所有受试粪肠球菌菌株对 AMP、PEN、DAP 和 VAN 均敏感,见表 3。可以看出,TET 抑制 50% 受试菌株生长所需抗生素浓度 ( $MIC_{50}$ ) > 32  $\mu\text{g/ml}$ ,已高于耐药折点,说明在 10 种受试抗生素中粪肠球菌对 TET 耐药最为严重。CIP、ERY、CHL、HLGR 和 HLSR 抑制 90% 受试菌株生长所需抗生素浓度 ( $MIC_{90}$ ) 均高于耐药折点,说明粪肠球菌对以上 5 种抗生素也已显示高耐药性。耐受 3 种及以上抗生素的菌株有 26 株,占有受试粪肠球菌的 36.6% (26/71),有 8 株粪肠球菌耐受 6 种抗生素,耐药谱为 ERY-CIP-TET-CHL-HLGR-HLSR。

12 株希拉肠球菌对 CHL、ERY、TET 的耐药率分别为 75.0% (9/12)、58.3% (7/12) 和 41.7% (5/12),对 CIP、HLSR 和 HLGR 的耐药率均为 16.7% (2/12),见表 4。另外,有 1 株分离自生鲜猪肉的希拉肠球菌对 DAP 耐药。12 株希拉肠球菌中,33.3% (4/12) 的菌株对 3 种及以上抗生素耐药,其中 1 株分离自地面涂抹样品的 D2-C2 对 5 种抗生素耐受,耐药谱为 ERY-TET-CHL-HLGR-HLSR。

表 3 71 株粪肠球菌对 10 种抗生素的耐药结果分析

Table 3 Analysis of antibiotic susceptibility to 10 antimicrobials of 71 *E. faecalis* isolates

抗生素	耐药	中介	敏感	MIC 范围/( $\mu\text{g/ml}$ )	$MIC_{50}$ /( $\mu\text{g/ml}$ )	$MIC_{90}$ /( $\mu\text{g/ml}$ )
	菌株数 (%)	菌株数 (%)	菌株数 (%)			
AMP	0(0.0)	—	71(100.0)	$\leq 0.5 \sim 1$	0.5	1
PEN	0(0.0)	—	71(100.0)	0.25 ~ 4	2	4
ERY	37(52.1)	31(43.7)	3(4.2)	0.5 ~ > 8	4	> 8
CIP	21(29.6)	35(49.3)	15(21.1)	1 ~ > 8	2	4
DAP	0(0.0)	—	71(100.0)	$\leq 0.125 \sim 4$	1	2
VAN	0(0.0)	0(0.0)	71(100.0)	$\leq 0.5 \sim 4$	1	2
TET	49(69.0)	1(1.4)	21(29.6)	1 ~ > 32	> 32	> 32
CHL	16(22.5)	5(7.0)	50(70.4)	8 ~ > 64	8	> 64
HLGR	19(26.8)	—	52(73.2)	250 ~ 500	$\leq 250$	> 500
HLSR	25(35.2)	—	46(64.8)	500 ~ 1 000	$\leq 500$	> 1 000

注:—表示 CLSI M100-S25 文件表 2D 中无中介判定标准

表 4 12 株希拉肠球菌对 10 种抗生素的耐药结果分析

Table 4 Analysis of antibiotic susceptibility to 10 antimicrobials of 12 *E. hirae* isolates

抗生素	耐药	中介	敏感	MIC 范围/( $\mu\text{g/ml}$ )	$MIC_{50}$ /( $\mu\text{g/ml}$ )	$MIC_{90}$ /( $\mu\text{g/ml}$ )
	菌株数 (%)	菌株数 (%)	菌株数 (%)			
AMP	0(0.0)	—	12(100.0)	$\leq 0.5 \sim 1$	0.5	1
PEN	0(0.0)	—	12(100.0)	1 ~ 2	2	2
ERY	7(58.3)	0(0.0)	5(41.7)	0.25 ~ > 8	> 8	> 8
CIP	2(16.7)	2(16.7)	8(66.7)	0.5 ~ > 8	0.5	4
DAP	1(8.3)	—	11(91.7)	1 ~ 8	2	4
VAN	0(0.0)	0(0.0)	12(100.0)	$\leq 0.5 \sim 1$	$\leq 0.5$	1
TET	5(41.7)	0(0.0)	7(58.3)	1 ~ > 32	> 32	> 32
CHL	9(75.0)	1(8.3)	2(16.7)	8 ~ > 64	8	64
HLGR	2(16.7)	—	10(83.3)	250 ~ 500	$\leq 250$	> 500
HLSR	2(16.7)	—	10(83.3)	500 ~ 1 000	$\leq 500$	> 1 000

注:—表示 CLSI M100-S25 文件表 2D 中无中介判定标准

粪肠球菌对 CIP 的耐药率高于希拉肠球菌,差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 10.751, P < 0.01$ ); TET、

HLSR 和 HLGR 的耐药率高于希拉肠球菌,但差异无统计学意义 (TET:  $\chi^2 = 3.865, P > 0.05$ ; HLSR:

$\chi^2 = 1.608, P > 0.05$ ; HLGR:  $\chi^2 = 0.553, P > 0.05$ )。但粪肠球菌对 ERY 和 CHL 的耐药率均低于希拉肠球菌, 差异有统计学意义 (ERY:  $\chi^2 = 20.244, P < 0.01$ ; CHL:  $\chi^2 = 14.139, P < 0.01$ )。

污水中分离的蒙氏肠球菌 W2-E4 对所有 10 种受试抗生素均敏感, 污水源屎肠球菌 W3-K1 和生鲜猪肉中分离泰国肠球菌 R16-C2 的耐药谱均为 ERY-TET。

### 3 讨论

不同种属肠球菌的分布特点、致病宿主以及耐药特征有较大差异, 因此了解不同基质中肠球菌的种属分布, 对于研究耐药肠球菌的流行规律和传播途径具有重要意义。然而, 传统肠球菌的种水平鉴定方法需要做一系列复杂的生理生化试验, 难以满足高通量菌种鉴定的要求<sup>[10]</sup>。国外常使用种特异 PCR 扩增和 16S rRNA 测序相结合对肠球菌开展种水平鉴定, 但种特异 PCR 目前仅局限于几种常见肠球菌, 且存在一定错误率<sup>[4]</sup>, 因此急需发展快速、准确、批量处理的种水平鉴定策略。

本研究使用的 5 种肠球菌种水平鉴定方法各有优缺点。MALDI-TOF-MS 适合于高通量菌种鉴定, 速度快、耗材少、准确性较高<sup>[5]</sup>, 但缺点是仪器昂贵、维护费用高, 不适合在基层单位推广。VITEK 2 COMPACT 鉴定自动化程度高, 但用于肠球菌种水平鉴定准确性较低。本研究中, 使用 VITEK 2 COMPACT 鉴定肠球菌的准确率仅为 4.0% (1/25), 与文献报道<sup>[8,11]</sup>相似, 这可能是由于 VITEK 2 COMPACT 是根据一套生化反应结果鉴定菌种, 如果菌株在培养过程中生化特性发生改变, 必然导致鉴定结果不同。API 20 Strep 试剂条虽然鉴定结果准确, 但菌种鉴定范围有限, 只能用于粪肠球菌、屎肠球菌、铅黄肠球菌、坚韧肠球菌、鹌鸡肠球菌、鸟肠球菌等 6 种肠球菌的种鉴定, 且手工操作复杂, 有时还需做补充生化试验, 在本研究中就出现了较多 (28.0%, 7/25) 可疑鉴定结果。有文献<sup>[8,12]</sup>报道, 16S rRNA 序列难以把粪肠球菌和屎肠球菌区分, 应使用 23S rRNA 进行肠球菌种水平鉴定。但从本研究结果看, 16S rRNA 序列分析对肠球菌有准确的区分度; 因此, 优化的肠球菌种水平鉴定策略是, 先用 MALDI-TOF-MS 和 16S rRNA 序列分析技术对肠球菌进行种鉴定, 二者不一致的结果再使用其他方法进一步确认。

北京市集贸市场生鲜猪肉源肠球菌中, 粪肠球菌占绝对优势, 其次是希拉肠球菌, 只发现了 1 株屎肠球菌, 这一结果和人与动物消化道、粪便、医院、

食品分离肠球菌中, 粪肠球菌和屎肠球菌是主要优势菌种的报道<sup>[13-14]</sup>不符。2014 年中国细菌耐药性监测网收集的 6 891 株肠球菌中, 粪肠球菌和屎肠球菌分别占 45.4% 和 48.1%, 其他肠球菌占 6.5%<sup>[15]</sup>。但在美国环境水样品中, 铅黄肠球菌占 34%, 粪肠球菌占 25%, 蒙氏肠球菌占 15%, 屎肠球菌仅占 5%<sup>[4]</sup>。这说明不同来源样品中肠球菌的种属分布特征不同。而且, 本研究中来自污水和生鲜猪肉的肠球菌显示了种水平的多样性, 这可能与市场环境开放, 污水和生鲜猪肉污染途径多渠道有关。

粪肠球菌对 CIP、TET、HLSR 和 HLGR 的耐药率均高于希拉肠球菌, 但对 ERY 和 CHL 的耐药率均低于希拉肠球菌, 尤其是对 CHL 的耐药率远低于希拉肠球菌。另外, 在希拉肠球菌中还发现了 1 株对 DAP 耐药的肠球菌, 是较为罕见的耐药表型, 提示今后应加强关注希拉肠球菌耐药性。2014 年中国细菌耐药性监测网统计数据 displays, 粪肠球菌对抗生素的耐药率明显低于屎肠球菌, 但对 CHL 的耐药率高于屎肠球菌, 粪肠球菌和屎肠球菌均对 HLGR 表现出较高耐药率<sup>[15]</sup>。目前国内外对除粪肠球菌和屎肠球菌以外的肠球菌的耐药性研究较少, 本研究中分离的蒙氏肠球菌和泰国肠球菌均未呈现较强耐药性。

本研究评价和比较了肠球菌种水平快速鉴定方法, 初步阐述了北京市集贸市场肠球菌种属分布特征, 分析了不同种肠球菌的耐药特征, 为控制食源性耐药肠球菌的产生和传播积累了基础数据和信息支持。

### 参考文献

- [1] BONACINA J, SUAREZ N, HORMIGO R, et al. A genomic view of food-related and probiotic *Enterococcus* strains[J]. DNA Res, 2016, 24(1):1-14.
- [2] 彭子欣, 王伟, 胡豫杰, 等. 食品及环境样品中肠球菌快速检验方法的建立及优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(6): 2240-2246.
- [3] GIRAFFA G. *Enterococci* from foods[J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26(2): 163-171.
- [4] RYU H, HENSON M, ELK M, et al. Development of quantitative PCR assays targeting the 16S rRNA genes of *Enterococcus* spp. and their application to the identification of *Enterococcus* species in environmental samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(1):196-204.
- [5] 周春妹. Vitek MS 在临床常见细菌鉴定中的应用评价[D]. 上海: 复旦大学, 2014.
- [6] 彭子欣, 张爽, 王伟, 等. 北京市集贸市场生鲜猪肉肠球菌的耐药特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(6): 736-741.
- [7] 李爽, 张正. 肠球菌 API、VITEK 2、23S rRNA 鉴定结果的比

- 较与分析[J]. 北京医学, 2006, 28(5):288, 294.
- [8] ANTHONY M, BROWN J, FRENCH L. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2):781-788.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement: M100-S24 [S]. Wayne: CLSI, 2016.
- [10] 江希武, 郭素琴, 胡克雨, 等. 130株肠球菌属(种)的分离鉴定[J]. 中华预防医学杂志, 1994, 28(1):55-56.
- [11] 王亚宾, 张红英, 陈丽颖, 等. 16S rRNA与Vitek-32对临床感染猪肠球菌鉴定结果比较[J]. 中国农学通报, 2009, 25(6):9-12.
- [12] 李梅花, 王芳, 孙婷, 等. 自然发酵乳中粪肠球菌和屎肠球菌的4种鉴定方法的比较[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(9):98-103.
- [13] 刘佳, 陈霞, 雷红, 等. 肠球菌种属鉴定及万古霉素耐药基因型检测的多重聚合酶链反应方法的建立及应用[J]. 疾病监测, 2015, 30(4):332-336.
- [14] 李东冬, 陈荣, 沈定霞, 等. 致血流感染的肠球菌耐药现状及分子流行特征的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(5):370-374.
- [15] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2014年CHINET中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(5):401-410.

## · 资讯 ·

## 南非发布农药最大残留限量标准修订草案

2017年4月18日,南非共和国发布G/SPS/N/ZAF/51通报,发布食品中农药最大残留限量标准修订草案,拟修订部分产品中阿维菌素等农药最大残留限量见下表,该草案评议时间截止2017年6月12日。

序号	农药名称	商品名称	拟修订限量标准/(mg/kg)
1	阿维菌素	十字花科芸苔属蔬菜	0.01
2	胺唑草酮	糖蔗	0.01
3	噻菌酯	芹菜	5

(摘自食品伙伴网,相关链接:<http://news.foodmate.net/2017/04/426439.html>)

## · 资讯 ·

## 欧盟允许丁烷等3种物质用于色素制剂并制定限量规定

欧盟官方公报2017年5月23日消息,欧盟委员会5月22日发布(EU)2017/874法规,对法规(EC)No 1333/2008附录III批准用于食品添加剂、食品酶、食用香精、食品营养成分及使用条件下的食品添加剂联合目录进行修订,新增丁烷(E943A)、异丁烷(E943B)、丙烷(E944)为色素制剂。该法规自官方公报发布后20日生效。使用规定见下表:

食品添加剂编号	食品添加剂名称	最大使用量
E943a	丁烷	在最终产品中不超过1 mg/kg
E943b	异丁烷	在最终产品中不超过1 mg/kg
E944	丙烷	在最终产品中不超过1 mg/kg

(相关链接:[http://www.aqsiq.gov.cn/xxgk\\_13386/ywxx/spjhzp/201705/t20170525\\_489561.htm](http://www.aqsiq.gov.cn/xxgk_13386/ywxx/spjhzp/201705/t20170525_489561.htm))