

## 调查研究

## 2009—2018年广州市即食食品中金黄色葡萄球菌污染情况和菌型特征

周勇,吴新伟,胡玉山,伍业健,刘俊华,侯水平,张欣强,张健

(广州市疾病预防控制中心,广东广州 510440)

**摘要:**目的 分析2009—2018年广州市零售即食食品中金黄色葡萄球菌污染情况,以及菌株肠毒素基因、耐药表型特征。方法 从广州市辖11个区的农贸市场、超市随机购买零售即食食品,增菌后分离金黄色葡萄球菌。对所有菌株进行多位点序列分型(MLST)、抗生素敏感性试验,并检测24种肠毒素基因。对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)进行葡萄球菌染色体盒(SCCmec)分型。结果 2009—2018年广州市采集的1399份即食食品中共分离出157株金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)(检出率为11.22%),其中熟猪肉中金葡菌检出率(17.95%)相比非熟肉食品中金葡菌检出率(9.43%)差异有统计学意义( $P < 0.001$ );抗生素敏感性检测结果显示7株金葡菌为MRSA,检出率为0.5%;157株金葡菌对青霉素的耐药率高达83.43%,其次是四环素(55.41%)、红霉素(41.40%)、氯霉素(29.30%)、克林霉素(21.02%)、复方新诺明(20.40%)及庆大霉素(14.01%);对环丙沙星、苯唑西林及头孢西丁的耐药率均 $\leq 10.0\%$ ,对万古霉素、达托霉素、利奈唑胺均敏感。即食食品中优势克隆复合体(CC)为CC59(25.48%),其次为CC6(17.83%)、CC398(10.83%)。菌株特征分析结果发现对3种或3种以上抗菌药耐药的菌株占比,CC59和CC398大于CC6( $P < 0.001$ ),而所有CC6菌株都携带*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*及*seu*,远高于CC59( $P < 0.001$ )。结论 广州市即食食品中的优势菌群是CC59、CC6和CC398,这3种优势克隆群在国内临床患者和食物中毒分离株中也很常见,需要公共卫生部门引起重视,加强对市售即食食品中金葡菌的监测。

**关键词:**即食食品;金黄色葡萄球菌;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;肠毒素基因;多位点序列分型

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)04-0444-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.04.008

### Contamination status and characteristics of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat foods in Guangzhou from 2009 to 2018

ZHOU Yong, WU Xinwei, HU Yushan, WU Yejian, LIU Junhua,

HOU Shuiping, ZHANG Xinqiang, ZHANG Jian

(Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 510440, China)

**Abstract: Objective** To investigate the prevalence, antimicrobial susceptibility, and enterotoxin gene of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) isolates in ready-to-eat (RTE) foods in Guangzhou from 2008 to 2019. **Methods** RTE food samples were randomly collected from retail outlets and supermarkets in 11 districts of Guangzhou and the isolation and identification of *S. aureus* were performed. All isolated *S. aureus* were tested for antimicrobial susceptibility, enterotoxin genes and multilocus sequence typing (MLST). Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) isolates were further characterized by staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing. **Results** A total of 157 *S. aureus* isolates (11.22%) were detected from 1399 RTE food samples in Guangzhou from 2009 to 2018. The prevalence of *S. aureus* in cooked pork samples was significantly higher than those in non-meat samples (17.95% vs 9.43%,  $P < 0.001$ ). Of the 157 *S. aureus* isolates, seven were confirmed as MRSA by cefoxitin disc diffusion test. Among the 157 isolates, the highest resistance was to penicillin G (83.43%), followed by tetracycline (55.41%), erythromycin (41.40%), chloramphenicol (29.30%), clindamycin (21.02%), trimethoprim/sulphamethoxazole (20.40%) and gentamicin (14.01%), and 4.46%-10.83% isolates were resistant to cefoxitin, oxacillin and ciprofloxacin. All the isolates were sensitive to vancomycin, daptomycin and linezolid. Notably, 82.5% and 100% isolates were resistant to at least three antimicrobials in CC59 and CC398, respectively, and the resistance levels were significantly higher than that of CC6 isolates (14.81%)

收稿日期:2021-04-30

基金项目:广州市医学重点学科建设(2017-2019-07)

作者简介:周勇 男 副主任技师 研究方向为食源性致病微生物检验及细菌耐药 E-mail: coolzywin@163.com

通信作者:张健 女 主任技师 研究方向为微生物检验 E-mail: 915157821@qq.com

( $P < 0.001$ ). The positive rates of *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* and *seu* in CC6 and CC59 isolates were 100% and 42%, respectively ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** CC59, CC6 and CC398 were the predominant *S. aureus* isolates in RTE food samples in Guangzhou, and these isolates had been linked to human infections and Staphylococcal food poisoning outbreaks in China. It was a serious public health risk and highlights the need to implement good hygiene practices.

**Key words:** Ready-to-eat foods; *Staphylococcus aureus*; methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; enterotoxin genes; multilocus sequence typing

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*), 简称金葡菌, 是一种临床常见的条件致病菌, 由其引起的社区感染也正日益增多。金葡菌也是一种重要的食源性致病菌, 在适宜的基质和环境条件下极易产生葡萄球菌肠毒素, 人类摄入被金葡菌肠毒素污染的食品后可导致食物中毒<sup>[1]</sup>。

随着抗生素在临床的广泛使用, 不恰当使用甚至滥用抗生素的问题日益突显, 导致临床上出现了耐抗生素的致病菌。特别值得关注的是, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 呈高致病性和多重耐药性, 给临床治疗造成了极大困难。因此, MRSA 的流行已成为严重威胁人类健康的公共卫生问题<sup>[2]</sup>。

MRSA 从发现至今已成为院内 (Healthcare associated MRSA, HA-MRSA) 和社区 (Community associated MRSA, CA-MRSA) 感染的重要病原菌之一<sup>[3]</sup>。近期研究发现, 动物可能是 CA-MRSA 的重要来源之一。国内外许多文献报道从猪、牛、鸡等动物中分离到动物源性 MRSA (Livestock-associated MRSA, LA-MRSA), 并从其制品如肉类、牛奶、奶酪中也检测出食源性 MRSA (Food-associated MRSA, FA-MRSA)<sup>[4]</sup>。丹麦一项研究对超市零售肉类的调查发现, MRSA 检出率为 13%, 其中鸡肉、火鸡和猪肉的 MRSA 检出率分别是 4%、52% 和 15%<sup>[5]</sup>; 在美国的一项研究发现, 114 份零售新鲜鸡肉样品中 MRSA 的检出率为 1.8%<sup>[6]</sup>; 2019 年, 希腊对 40 个牛、羊养殖场的鲜奶样品进行金葡菌检测, MRSA 检出率为 4.1%<sup>[7]</sup>; 在我国, 2015 年国家食品安全风险评估中心检测了全国 24 省 203 个城市共 27 000 份各类食品, 结果从 7.2% 的生肉、6.5% 的肉制品、10% 的米面产品、1.2% 的蔬菜沙拉、7.2% 的三明治及 32.6% 的蛋和蛋制品中检出 MRSA<sup>[8]</sup>。

即食食品因为方便、快捷、美味, 一直以来都受到生活节奏快的城市人群所喜爱。即食食品的特性使其如果污染金葡菌或肠毒素将比生鲜食品引起食源性疾病的风险更高。2009—2018 年, 本研究对广州市市售的即食食品进行金葡菌监测, 并对分离菌株进行肠毒素检测、耐药性分析及多序列位点分型 (Multilocus sequence typing, MLST), 对了解即食食品中金葡菌的污染情况、追踪其污

染源、预防控制金葡菌引起的食源性疾病发生具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

7.5% 氯化钠肉汤培养基、Baird-Parker 琼脂平板、脑心浸出液肉汤、血平板、冻干兔血浆 (均购自广州环凯微生物科技有限公司); 革兰阳性细菌鉴定卡 (购自生物梅里埃法国股份有限公司); 抗生素药敏纸片 (购自 Oxoid 公司); Taq PCR Master Kit (购自 Promega 公司)。

### 1.2 采样方法

2008—2019 年, 从广州市 11 个区的农贸市场、超市购买零售即食食品, 包括熟猪肉 312 份、熟禽肉 300 份、熟牛肉 230 份、熟鱼肉 133 份、炒饭 109 份、蛋糕 78 份、三明治 45 份、冷面 41 份、寿司 51 份、沙拉 53 份及面包 47 份, 共计 1 399 份。每份样品单独包装和标记, 于 24 h 内运至实验室检测。

### 1.3 菌株的分离培养和鉴定

样品前处理和增菌富集方法与分离程序按照 GB 4789.10—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》进行。挑取 Baird-Parker 平板或血琼脂平板上可疑菌落经革兰染色镜检及血浆凝固酶试验, 阳性菌株再使用 Viteck2 compact 全自动细菌鉴定仪鉴定, 鉴定为金黄色葡萄球菌的菌株用 80% 甘油保存于 -80 °C 冰箱。细菌鉴定质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、大肠埃希菌 ATCC 25922。

### 1.4 药物敏感性检测

使用纸片扩散法对金黄色葡萄球菌进行药物敏感性检测, 选取 13 种抗菌药物进行测试: 青霉素 (PEN)、苯唑西林 (OXA)、头孢西丁 (CFX)、四环素 (TET)、氯霉素 (CHL)、利奈唑胺、红霉素 (ERY)、复方新诺明 (SXT)、庆大霉素 (GEN)、环丙沙星 (CIP)、克林霉素 (CLI)、达托霉素 (DAP) 和万古霉素 (VAN)。抗菌药折点判定参照美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2019 年推荐的 CLSI-M100-S29 标准, 金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC29213 作为药物敏感性实验的质控菌株。

### 1.5 MRSA 菌株筛查

在抗菌药物敏感性实验中发现对头孢西丁耐药的菌株,即抑菌圈直径 $\leq 21$  mm,再用聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)法检测 *mecA* 基因,阳性结果者判定为 MRSA。

### 1.6 肠毒素基因检测

参考 OMOE 等<sup>[9]</sup>使用多重 PCR 检测肠毒素基因,共分 4 组:①*sea*, *seb*, *sec*, *sed* 和 *see*;②*seg*, *seh*, *sei*, *sej* 和 *sep*;③*sek*, *sem* 和 *seo*;④*sel*, *sen*, *seq* 和 *ser*;反应条件为 95 °C 预变性 15 min, 95 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 90 s, 共循环 35 次,最后再 72 °C 延伸 10 min。使用单重 PCR 分别检测 *ses*, *set*, *seu*, *selw*, *selx*, *sely* 和 *selz*。反应条件为 95 °C 预变性 15 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共循环 30 次,最后再延伸 5 min<sup>[10-11]</sup>。

### 1.7 SCCmec 分型

采用多重 PCR 的方法对 MRSA 菌株进行 SCCmec 分型(I, II, III, IV 和 V), PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 65 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 扩增 10 个循环; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 扩增 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min<sup>[12]</sup>。

### 1.8 MLST 分型

PCR 扩增方法对金葡萄菌的 7 个管家基因(*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpiA*, *yqiL*) 分别进行扩增,引物设计参考 <http://www.mlst.net/>。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min。将扩增产物交广州昊天生物科技有限公司进行测序,目的序列提交 MLST 数据库(<http://www.mlst.net/>)进行序列分型(sequence type, ST)。通过 eBURST 程序(<http://eburst.mlst.net>)可以鉴定 ST 型的相关性, eBURST 将共享 7 个等位基因中 5 个以上的 ST 型分为同一克隆复合体(Clonal complex, CC), 显示出潜在的种群结构。

### 1.9 统计学分析

所有检测数据的统计分析使用 R 3.6.2 软件完成。率的比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确检验, 两两比较运用 Bonferroni 法调整  $\alpha$  水平判断成对比较的统计显著性;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 广州市即食食品中金葡萄菌检出情况

从广州市各农贸市场、超市采集的 1 399 份即食食品中共检出 157 株金葡萄菌, 检出率为 11.22% (157/1 399)。157 株金葡萄菌中, 117 株分离自熟肉

食品(12.00%, 117/975), 包括熟猪肉 56 株(17.95%, 56/312)、熟禽肉 44 株(14.67%, 44/300)、熟牛肉 13 株(5.65%, 13/230)以及熟鱼肉 4 株(3.01%, 4/133); 蛋糕 15 株(19.23%, 15/78); 沙拉 7 株(13.21%, 7/53); 炒饭 9 株(8.26%, 9/109); 三明治 3 株(6.67%, 3/45); 面包 3 株(6.38%, 3/47); 寿司 2 株(3.92%, 2/51)以及冷面 1 株(2.44%, 1/41), 详见表 1。

表 1 广州市即食食品中金葡萄菌检出情况( $n, \%$ )

Table 1 Prevalence of *S. aureus* in ready-to-eat foods in Guangzhou ( $n, \%$ )

食品类型	样品数	金葡阳性数(阳性率)
熟猪肉	312	56 (17.95)
熟禽肉	300	44 (14.67)
熟牛肉	230	13 (5.65)
熟鱼肉	133	4 (3.01)
炒饭	109	9 (8.26)
蛋糕	78	15 (19.23)
三明治	45	3 (6.67)
冷面	41	1 (2.44)
寿司	51	2 (3.92)
沙拉	53	7 (13.21)
面包	47	3 (6.38)
合计	1 399	157 (11.22)

熟肉食品金葡萄菌检出率(12.00%, 117/975)与非熟肉食品金葡萄菌检出率(9.43%, 40/424)相比差异无统计学意义( $P = 0.19$ ), 但熟猪肉金葡萄菌检出率(17.95%, 56/312)相比非熟肉食品金葡萄菌检出率(9.43%, 40/424)差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。熟肉食品中, 熟猪肉(17.95%, 56/312)和熟禽肉(14.67%, 44/300)金葡萄菌检出率相比熟牛肉(5.65%, 13/230)和熟鱼肉(3.01%, 4/133)金葡萄菌检出率的差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。

### 2.2 即食食品中 MRSA 检出情况

157 株金葡萄菌经进一步筛选与鉴定, 其中 7 株为 MRSA, 检出率为 0.50% (7/1 399)。7 株 MRSA 菌株在不同食品中的分布见表 2, 其中 3 株熟禽肉分离株、2 株熟牛肉分离株、1 株熟猪肉分离株及 1 株蛋糕分离株。

### 2.3 MLST 分型结果

157 株金葡萄菌经 MLST 分型共分为 21 个 ST 型, 依次是 ST59 ( $n = 30$ )、ST6 ( $n = 28$ )、ST398 ( $n = 17$ )、ST7 ( $n = 12$ )、ST1 ( $n = 12$ )、ST188 ( $n = 10$ )、ST338 ( $n = 10$ )、ST5 ( $n = 10$ ) 和 ST239 ( $n = 8$ ), 其余 12 种 ST 型分别有 1~5 株菌, 见表 3。

eBURST 分析把 21 个 ST 型分为 12 个克隆复合体(Clonal complex, CC)和 4 个独特型。CC59 (25.48%, 40/157)为优势 CC 群, 包括 30 株 ST59 和 10 株 ST338, 其次为 CC6 (17.83%, 28/157)、

表 2 7 株 MRSA 菌株特征

Table 2 Characteristics of 7 MRSA isolates

菌株号	年份	来源	ST	CC	SCCmec	肠毒素基因	耐药谱
SJ00161	2012	熟猪肉	338	CC59	Vb	<i>seb, sek, seq</i>	PEN-OXA-CFX-GEN-CLI-CHL-ERY-TET
AS010	2013	熟禽肉	764	CC5	II	<i>seb, seg, sei, sem, sen, seo, seu</i>	PEN-OXA-CFX-ERY-GEN-TET
GZ-F-01	2014	熟禽肉	45	CC45	IVA	<i>sec, seg, sei, sem, sen, seo, seu</i>	PEN-OXA-CFX
YX-BKF-14	2016	蛋糕	5	CC5	II	<i>seg, sei, sem, sen, seo, seu</i>	PEN-OXA-CFX-GEN
PY-01	2017	熟禽肉	59	CC59	IVA	ND	PEN-OXA-CFX-GEN-ERY-TET
T22	2018	熟牛肉	1	CC1	IVg	<i>sec, seh, sek, sel, seq</i>	PEN-OXA-CFX
T23	2018	熟牛肉	1	CC1	IVg	<i>sea, see, seg, sei, sel, sem, sen, seo, seu</i>	PEN-OXA-CFX-GEN-ERY-TET

注:ND 表示未检出。

表 3 157 株金葡菌 ST 型和 CC 型分布

Table 3 The CCs, STs types of the 157 *S. aureus* isolates

CC 群(n)	ST 型(n)	构成比/%
CC59(40)	ST59(30), ST338(10)	25.48
CC6(28)	ST6(28)	17.83
CC398(17)	ST398(17)	10.83
CC7(12)	ST7(12)	7.64
CC1(12)	ST1(12)	7.64
CC5(15)	ST5(10), ST764(4), ST403(1)	9.55
CC188(10)	ST188(10)	6.37
CC8(10)	ST8(1), ST239(8), ST630(1)	6.37
CC9(5)	ST9(5)	3.18
CC45(2)	ST45(2)	1.27
CC15(1)	ST15(1)	0.64
CC20(1)	ST20(1)	0.64
—	ST504(1)	0.64
—	ST906(1)	0.64
—	ST943(1)	0.64
—	ST2990(1)	0.64

注:“—”表示无所对应的克隆复合体(CC)。

CC398(10.83%, 17/157)、CC5(9.55%, 15/157)、CC7(7.64%, 12/157)、CC1(7.64%, 12/157)、CC8(6.37%, 10/157)、CC188(6.37%, 10/157)及 CC9(3.18%, 5/157),见表 3。7 株 MRSA 被分为 4 个 CC 群,2 株 CC59(ST59 和 ST338 各一株)、2 株 CC1(2 株 ST1)、2 株 CC5(ST5 和 ST764 各一株)、1 株 CC45(1 株 ST45),见表 2。

#### 2.4 抗菌药物敏感性检测结果

本研究对 157 株金葡菌进行了 13 种抗菌药物的药敏试验,具体的耐药情况见表 4。金葡菌对青霉素的耐药率高达 83.43%,其次是四环素(55.41%)、红霉素(41.40%)、氯霉素(29.30%)、克林霉素(21.02%)、复方新诺明(20.40%)及庆大霉素(14.01%)。此外,这些金葡菌对环丙沙星、苯唑西林及头孢西丁的耐药率均 $\leq 10.0\%$ ,对万古霉素、达托霉素、利奈唑胺均敏感。7 株 MRSA 均对 $\beta$ -内酰胺类抗生素(青霉素、苯唑西林、头孢西丁)耐药,其中 5 株对庆大霉素耐药,4 株对四环素、红霉素耐药,1 株对克林霉素、氯霉素耐药,所有 MRSA 菌株对环丙沙星、复方新诺明、万古霉素、达托霉素、利奈唑胺均敏感,见表 2。157 株金葡菌中对 1 种或 1 种以上抗菌药耐药的菌株高达 96.25%,对

3 种或 3 种以上抗菌药耐药的菌株有 56.05%,对 6 种或 6 种以上抗菌药耐药的菌株则只有 5.73%。通过比较 3 种最常见克隆复合体(CC)的耐药率,发现青霉素、红霉素、克林霉素、四环素及氯霉素的耐药率差异有统计学意义。进行耐药率的两两比较,CC59 的青霉素耐药率大于 CC6(100.00% vs 75.00%,  $P=0.001$ ),红霉素耐药率 CC59 和 CC398 均大于的 CC6(55.00% vs 21.43%,  $P=0.005$ ; 64.71% vs 21.43%,  $P<0.005$ ),克林霉素的耐药率 CC59 和 CC398 均大于的 CC6(35.00% vs 0.00%,  $P<0.001$ ; 35.29% vs 0.00%,  $P<0.001$ ),CC398 的四环素、氯霉素耐药率均大于 CC6(94.12% vs 39.29%,  $P<0.001$ ; 76.47% vs 10.71%,  $P<0.001$ ),对 3 种或 3 种以上抗菌药耐药的菌株占比,CC59 和 CC398 也均大于 CC6(82.50% vs 14.81%,  $P<0.001$ ; 100.00% vs 14.81%,  $P<0.001$ ),见表 4。

#### 2.5 肠毒素基因检出结果

本研究检测了 157 株金葡菌携带 24 种肠毒素基因的情况,结果所有菌株均未检出 *ses, set, selw, selx, sely* 及 *selz*。检出率最高的是 *seg, sei, sem, sen, seo, sea* 及 *seu*,均超过 50%,见图 1 A。所有 CC6 菌株都携带 *seg, sei, sem, sen, seo* 及 *seu*,远高于 CC59 *seg, sei, sem, sen, seo*(100.00% vs 42.00%,  $P<0.001$ )和 *seu*(100.00% vs 40.00%,  $P<0.001$ )的检出率,见图 1B。

### 3 讨论

本研究对 2009—2018 年广州市市售即食食品中金葡菌的污染情况进行了调查研究,共检出 157 株金葡菌,检出率 11.22%,其中 MRSA 检出率 0.5%。3 项涉及国内多个城市的研究中即食食品金葡菌检出率 1.8%~12.5%<sup>[8,13-14]</sup>,MRSA 检出率 1.3%<sup>[14]</sup>,考虑不同研究中金葡菌及 MRSA 检出率的差异主要是不同地域差异所造成。

本研究中蛋糕、熟猪肉、熟禽肉和沙拉中金葡菌检出率较高,由于这类食品都是消费者购买后不再进行二次加工即食用的产品,因此这类食物存

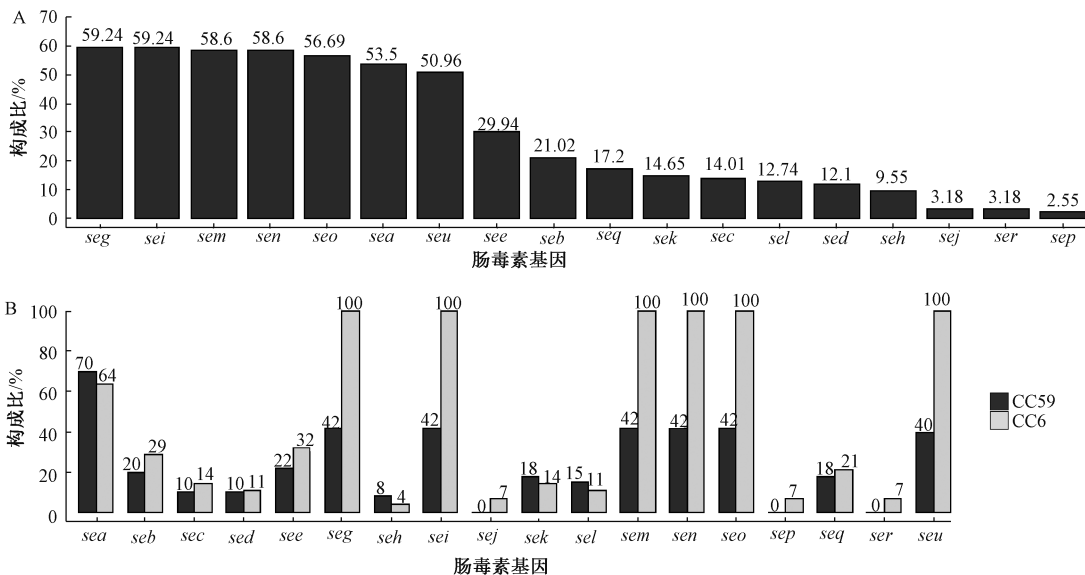


表4 即食食品中金葡萄菌的抗菌药检测结果

Table 4 Antimicrobial resistance of *S. aureus* isolated from RTE foods

抗生素	耐药菌株(耐药率)	CC59(n=40)	CC6(n=28)	CC398(n=17)	$\chi^2$ 值	P 值
青霉素	131 (83.44)	40 (100.00) <sup>a</sup>	21 (75.00) <sup>a</sup>	16 (94.12)	—	0.001 <sup>*</sup>
苯唑西林	10 (6.37)	4 (10.00)	0 (0.00)	1 (5.88)	—	0.2129 <sup>*</sup>
头孢西丁	7 (4.46)	2 (5.00)	0 (0.00)	1 (5.88)	—	0.433
万古霉素	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	—	—
达托霉素	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	—	—
红霉素	65 (41.40)	22 (55.00)	6 (21.43) <sup>#</sup>	11 (64.71)	10.51	0.005
庆大霉素	22 (14.01)	8 (20.00)	2 (7.14)	4 (23.53)	—	0.2006 <sup>*</sup>
克林霉素	33 (21.02)	14 (35.00)	0 (0.00) <sup>#</sup>	6 (35.29)	—	0.015 <sup>*</sup>
环丙沙星	17 (10.83)	7 (17.50)	0 (0.00)	1 (5.88)	—	0.043 <sup>*</sup>
四环素	87 (55.41)	24 (60.00)	11 (39.29) <sup>a</sup>	16 (94.12) <sup>a</sup>	13.25	0.001
复方新诺明	32 (20.38)	12 (30.00)	2 (7.14)	4 (23.53)	—	0.067 <sup>*</sup>
氯霉素	46 (29.30)	14 (35.00)	3 (10.71) <sup>a</sup>	13 (76.47) <sup>a</sup>	20.03	<0.001
利奈唑胺	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	—	—
≥1 抗生素耐药	152 (96.82)	40 (100.00)	27 (96.43)	17 (100.00)	—	0.5294 <sup>*</sup>
≥3 抗生素耐药	88 (56.05)	33 (82.50)	4 (14.27) <sup>#</sup>	17 (100.00)	45.28	<0.001
≥6 抗生素耐药	9 (5.73)	3 (7.50)	0 (0.00)	2 (11.76)	—	0.1655 <sup>*</sup>

注：\*表示采用 Fisher 确切概率法；加粗数字表示三组总体率的差异有统计学意义，各组之间的两两对比需调整  $\alpha$  水平为 0.0166 67，即原  $\alpha$  水平(0.05)与分组数量(3)的比值；a 表示此两组率的差异有统计学意义；# 表示该组与其他两组率的差异有统计学意义



A. 157 株金葡萄菌分离株肠毒素基因图谱; B. CC59 和 CC6 金葡萄菌肠毒素基因图谱

A. Distribution of enterotoxin genes of 157 *S. aureus* isolates; B. Distribution of enterotoxin genes of CC59 and CC6 *S. aureus* isolates

图1 即食食品中金葡萄菌肠毒素基因分布

Figure 1 Distribution of enterotoxin genes of *S. aureus* isolates from RTE foods

在金葡萄菌污染有较高风险造成食源性疾病。但本研究没有对这些食品进行金葡萄菌计数和金葡萄菌肠毒素检测,因此对这些食品存在金葡萄菌污染的风险评估有待进一步去研究和探讨。

MLST 结果显示从即食食品中分离的金葡萄菌最常见的 ST 序列型分别是 ST59 (30)、ST6 (28) 和 ST398 (17)。eBURST 分析显示 CC59 (ST59 和 ST338) 是优势克隆复合体 (Clonal complex, CC), 同时在 7 株 MRSA 中 ST59 和 ST338 也各占一株。CC59 是亚太地区医院患者感染 CA-MRSA 最常见

的克隆复合体。根据 SCCmec 分型 ST59-MRSA-V 和 ST59-MRSA-IVa 是亚太地区医院优势菌群, ST59-MRSA-IVa 常见于儿童患者, ST59-MRSA-V 毒力较 ST59-MRSA-IVa 强, 多分离自严重感染患者<sup>[15-16]</sup>。国内研究表明在食品中 CC59 检出率也最高, 本研究分离的 ST59-MRSA-IVa 和 ST338-MRSA-V 在国内的食品调查中也常检出<sup>[14,17]</sup>。国内 DAI 等<sup>[18]</sup>对 2008—2017 年上海某医院分离的 MRSA 分析中发现, 既往医院中占明显优势的 HA-MRSA ST239 逐渐减少, 随之增加的是 HA-MRSA ST5 和

CA-MRSA ST59。本研究每年检出的菌株较少并不能分析各 ST 型每年的趋势,目前国内外对食品中金葡菌的研究也没有涉及优势菌株的变化,在食品中金葡菌的优势菌群是否存在变化需要更多研究去分析。本研究证实即食食品中 CC59 是优势克隆复合体,符合目前 CC59 在医院患者、普通健康人群和各类食品中分离率最高的现状,说明即食食品中 CC59 菌株的污染仍是来源于人群,推测可能是由食品从业人员在食品加工过程中污染食品导致的。

近年来的研究表明,ST6 是国内多个城市金葡菌食物中毒的优势型别<sup>[19-21]</sup>,同时几项研究发现在广东省的食品、健康人群鼻咽拭子及机场火车站环境中 ST6 金葡菌也较常见,提示 ST6 金葡菌易在社区人群和公共环境中播散<sup>[22-24]</sup>。目前报道的 ST6 金葡菌主要是 MSSA (Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*) 菌株,这与本研究结果相符,本研究即食食品中 ST6 菌株耐药率低于 ST59 和 ST398,但其肠毒素基因 *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* 和 *seu* 携带率为 100%,远高于 CC59 (ST59 和 ST338) 菌株,肠毒素编码基因 *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* 和 *seu* 连锁共存于金葡菌染色体基因岛  $\nu$ Sa $\beta$  上,被命名为肠毒素基因簇 (Enterotoxin gene cluster, *egc*)。国外报道几起食物中毒的金葡菌未检出经典的金葡菌肠毒素基因 (*sea*~*see*),仅检出 *egc* 肠毒素基因簇,通过动物实验证实了 *egc* 编码的肠毒素也能引起动物呕吐,从而认为 *egc* 编码的肠毒素具有与经典肠毒素一样的生物活性<sup>[25]</sup>。进一步研究证实 *egc* 编码的肠毒素和 5 种经典肠毒素 (SEA~SEE) 都属于超抗原,超抗原是一种主要由金黄色葡萄球菌和链球菌产生的蛋白毒素,其与抗原提呈细胞的主要组织相容性复合体 II 类分子和 T 细胞受体结合,在极低浓度下即可非特异地激活大量 T 细胞,产生细胞因子风暴并导致宿主毒素休克综合征和免疫抑制<sup>[26]</sup>。依据 *egc* 携带肠毒素编码基因的多样性,目前发现多种类型的肠毒素基因簇,常见的为:①*egc1* (*seo*, *sem*, *sei*,  $\Psi$ ent1,  $\Psi$ ent2, *sen*, *seg*),②*egc2* (*seo*, *sem*, *sei*, *seu*, *sen*, *seg*),③*egc3* (*seov*, *semv*, *seiv*, *seuv*, *senv*, *segv*),④*egc4* (*seo*, *selv*, *seu2*, *sen*, *seg*),本研究检出的 ST6 金葡菌全部携带 *egc2* 型。目前缺少对于 ST6 金葡菌的全面研究,此型菌株为何常见于国内食物中毒的原因和机制还不清楚,以及其在社区人群和公共环境中播散的途径也需要探索。

CC398 MRSA 是欧美最常见报道的 LA-MRSA,主要分离自猪和饲养人员,过去很多检出 CC398 MRSA 的住院患者都与饲养猪或者在养猪场工作相关<sup>[27]</sup>,认为该型 MRSA 主要从动物传播给人,但也

有研究发现感染 CC398 的患者并无接触动物史,因此认为其也能人传人感染。CC398 MRSA 在临床上常引起心内膜炎、肺炎及化脓性关节炎,并且有较高的并发症发生率及病死率。CC398 可分为两个亚群,分别是动物亚群和人亚群,人亚群菌株特征是染色体上插入前噬菌体  $\phi$ Sa3,从而获得免疫逃逸基因簇 (Immune evasion cluster, IEC) 和红霉素耐药基因,而动物亚群菌株特征是无前噬菌体  $\phi$ Sa3,但菌株普遍对甲氧西林和四环素耐药。PRICE 等<sup>[27]</sup>应用全基因组测序技术对人源 CC398 和动物源 CC398 进行种系分析,发现动物源 CC398 起源自人 CC398,人源 CC398 多数为 MSSA,其播散给动物后丢失 IEC,但在动物养殖过程中抗生素使用压力下获得甲氧西林和四环素耐药基因从而进化成 CC398 MRSA。不过也有学者研究发现动物亚群和人亚群 CC398 早在 20 世纪 70 年代即同时出现,认为两者之间是互相传播扩散而不是动物源 CC398 起源自人 CC398<sup>[28]</sup>。

本研究虽未分离到 CC398 MRSA 菌株,但 17 株 CC398 MSSA 菌株对青霉素、红霉素、四环素及氯霉素的耐药率都超过 60%,对克林霉素耐药率也达 35%。国内 LI 等<sup>[29]</sup>从 5 103 份食品中分离出 14 株 CC398 MSSA,对青霉素、红霉素及克林霉素的耐药率均超过 80%,对四环素的耐药率超过 26%,说明食品中 CC398 MSSA 菌株大多为多重耐药菌株。CC398 MSSA 在临床上和 CC398 MRSA 都可引起重症感染,因此食品中的 CC398 MSSA 有通过食物链传播给人群从而引起重症感染的风险。

综上,2009—2018 年广州市即食食品中熟猪肉制品的金葡菌检出率最高。即食食品中的优势菌群是 CC59, CC6 和 CC398,对这 3 种优势克隆群的菌株特征分析显示 CC59 和 CC398 对多种抗生素的耐药率较高,多药耐药的现象比 CC6 普遍;而 CC6 携带 *egc* 肠毒素基因簇的比率较 CC59 高。

## 参考文献

- [1] ZEAKI N, JOHLER S, SKANDAMIS P N, et al. The role of regulatory mechanisms and environmental parameters in *Staphylococcal* food poisoning and resulting challenges to risk assessment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1307.
- [2] LAKHUNDI S, ZHANG K Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2018, 31 (4): e00020-18.
- [3] TURNER N A, SHARMA-KUINKEL B K, Maskarinec S A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An overview of basic and clinical research[J]. *Nature Reviews Microbiology*,

- 2019, 17 (4): 203-218.
- [4] SERGELIDIS D, ANGELIDIS A S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A controversial food-borne pathogen[J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 64 (6): 409-418.
- [5] TANG Y Y, LARSEN J, KJELDGAARD J, et al. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* from retail meat in Denmark [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 249: 72-76.
- [6] ABDALRAHMAN L S, STANLEY A, WELLS H, et al. Isolation, virulence, and antimicrobial resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) strains from Oklahoma retail poultry meats [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2015, 12 (6): 6148-6161.
- [7] PAPAPOULOS P, ANGELIDIS A S, PAPAPOULOS T, et al. *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in bulk tank milk, livestock and dairy-farm personnel in north-central and north-eastern Greece: Prevalence, characterization and genetic relatedness[J]. Food Microbiology, 2019, 84: 103249.
- [8] WANG W, BALOCH Z, JIANG T, et al. Enterotoxigenicity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from retail food in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2256.
- [9] OMOE K, HU D L, TAKAHASHI-OMOE H, et al. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 246 (2): 191-198.
- [10] ONO H K, OMOE K, IMANISHI K, et al. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T [J]. Infection and Immunity, 2008, 76 (11): 4999-5005.
- [11] AUNG M S, URUSHIBARA N, KAWAGUCHIYA M, et al. Prevalence and genetic diversity of sStaphylococcal enterotoxin (-like) genes *sey*, *selw*, *selx*, *selz*, *sel26* and *sel27* in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Toxins, 2020, 12 (5): 347.
- [12] ZHANG K, MCCLURE J A, ELSAYED S, et al. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43 (10): 5026-5033.
- [13] WU S, HUANG J H, WU Q P, et al. *Staphylococcus aureus* isolated from retail meat and meat products in China: Incidence, antibiotic resistance and genetic diversity [J]. Frontiers in Microbiology, 2018 15 (9): 2767.
- [14] YANG X J, ZHANG J M, YU S B, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail ready-to-eat foods in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7 (7): 816.
- [15] 耿文静,董世霄,靳绯,等. 新生儿金黄色葡萄球菌临床分离株分子分型及毒力基因研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2020, 40 (6): 429-436.
- [16] CHEN C J, UNGER C, HOFFMANN W, et al. Characterization and comparison of 2 distinct epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones of ST59 lineage [J]. PLoS One, 2013, 8 (9): e63210.
- [17] WU S, HUANG J H, ZHANG F, et al. Prevalence and characterization of food-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 20 (10): 304.
- [18] DAI Y X, LIU J L, GUO W, et al. Decreasing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections is attributable to the disappearance of predominant MRSA ST239 clones, Shanghai, 2008-2017 [J]. Emerging Microbes & Infections, 2019, 8 (1): 471-478.
- [19] YAN X M, WANG B, TAO X X, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78 (18): 6637-6642.
- [20] CHEN Q, XIE S M. Genotypes, enterotoxin gene profiles, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* associated with foodborne outbreaks in Hangzhou, China [J]. Toxins, 2019, 11 (6): 307.
- [21] LI G H, WU S Z, LUO W, et al. *Staphylococcus aureus* ST6-t701 isolates from food-poisoning outbreaks (2006-2013) in Xi'an, China [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2015, 12 (3): 203-206.
- [22] FAN Y P, WANG X L, LI L, et al. Potential relationship between phenotypic and molecular characteristics in revealing livestock-associated *Staphylococcus aureus* in Chinese humans without occupational livestock contact [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1517.
- [23] CHEN Z Y, HAN C L, HUANG X B, et al. A molecular epidemiological study of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* contamination in the airport environment [J]. Infection and Drug Resistance, 2018, 11: 2363-2375.
- [24] LIN J L, PENG Y, OU Q T, et al. A molecular epidemiological study of methicillin-resistant *Staphylococci* environmental contamination in railway stations and coach stations in Guangzhou of China [J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 64 (2): 131-137.
- [25] JOHLER S, GIANNINI P, JERMINI M, et al. Further evidence for *staphylococcal* food poisoning outbreaks caused by *egc*-encoded enterotoxins [J]. Toxins, 2015, 7 (3): 997-1004.
- [26] NOLI TRUANT S, DE MARZI M C, SARRATEA M B, et al. *egc* Superantigens impair monocytes/macrophages inducing cell death and inefficient activation [J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 3008.
- [27] PRICE L B, STEGGER M, HASMAN H, et al. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock [J]. mBio, 2012, 3 (1): e00305-11.
- [28] BOUILLER K, BERTRAND X, HOCQUET D, et al. Human infection of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* CC398: A review [J]. Microorganisms, 2020, 8 (11): 1737.
- [29] LI G, WU C, WANG X, et al. Prevalence and characterization of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from retail foods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 196: 94-97.