

调查研究

云南省生食蔬菜中致病菌污染状况及其耐药性与分子特征研究

汤晓召¹,陈春燕²,杨菁¹

(1. 云南省疾病预防控制中心卫生检验中心,云南昆明 650000;

2. 昆明市疾病预防控制中心麻风病防治科,云南昆明 650000)

摘要:目的 为分析云南省生食蔬菜中沙门菌、单核细胞增生李斯特菌、致泻性大肠埃希菌污染情况及菌株的耐药性和致病性,通过各污染菌的抗生素敏感性特征图谱及全基因组测序数据对菌株进行耐药和致病基因分析。方法 采用食品安全国家标准 GB 4789.4—2016、GB 4789.30—2016、GB 4789.6—2016 对 180 份生食蔬菜样品中的沙门菌、单核细胞增生李斯特菌、致泻大肠埃希菌进行检测和鉴定;采用肉汤稀释法对分离到的菌株进行药敏测定;同时对菌株进行全基因组测序,基因组序列经组装后通过相应的生物信息学流程进行数据分析。结果 180 份生食蔬菜中共有 12 份样品检出了致病菌,包括生菜、香菜、折耳根等。共检出了致病菌 13 株,其中沙门菌 7 株,共 7 种血清型,4 株存在多重耐药,耐药表型与耐药基因关联性良好,5 株携带有与多重耐药相关的 *IncHI* 和 *IncF* 型质粒;单核细胞增生李斯特菌 4 株,1 株存在多重耐药,2 株携带毒力岛 *LIPI-3*;肠聚集黏附性大肠埃希菌 2 株,1 株存在多重耐药。结论 折耳根等具有地域特色的生食蔬菜种类致病菌检出率较高,应该持续关注,部分单核细胞增生李斯特菌菌株因含有更多的毒力基因,而具有更高的致病性;沙门菌和致泻大肠埃希氏菌多重耐药情况较为严重。

关键词:生食蔬菜;沙门菌;单核细胞增生李斯特菌,致泻性大肠埃希菌,抗生素药敏试验;全基因组测序;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)05-0569-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.05.009

Pollution status, drug resistance and molecular characteristics of pathogenic bacteria in raw food vegetables in Yunnan Province

TANG Xiaozhao¹, CHEN Chunyan², YANG Jing¹

(1. Sanitation Test Center of Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Yunnan Kunming 650000, China; 2. Leprosy Prevention and Control Division of Kunming Center for Disease Control and Prevention, Yunnan Kunming 650000, China)

Abstract: Objective To analyze *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and diarrheagenic *Escherichia coli* in vegetables in Yunnan Province, the antibiotic susceptibilities and whole genome sequencing (WGS) were determined to characterize the antimicrobial resistance and virulence genotypes of these isolates. **Methods** *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and diarrheagenic *Escherichia coli* of 180 samples of vegetables that can be eaten raw were isolated and identified by National food safety standard Food GB 4789.4—2016, GB 4789.30—2016, GB 4789.6—2016. The susceptibilities of isolates were determined by broth microdilution. The whole genome of isolates was then sequenced. The corresponding genomes were assembled and further analysis was carried out using appropriate bioinformatics pipelines. **Results** Twelve of 180 samples of vegetables that can be eaten raw had isolates of pathogenic bacteria from *Lactuca sativa*, cilantro and *Houttuynia cordata* Thunb and so on. A total of 13 isolates were detected, including 7 strains of *Salmonella* which contain 7 serotypes, 4 strains of multi-drug resistance (drug resistance phenotype and drug resistance genes were well correlated), 5 strains carrying *IncHI* and *IncF* plasmids related to multi-drug resistance, 4 strains of *Listeria monocytogenes* which contain 1 strain of multi-drug resistance and 2 strains carrying the virulence island *LIPI-3*. 2 strains of enteroaggregative *Escherichia coli* in which 1 strain of multi-drug resistance. **Conclusion** More attention should be paid to vegetables that

收稿日期:2023-05-16

基金项目:云南省科技厅重大科技专项计划(2020-2022)

作者简介:汤晓召 女 主管技师 研究方向为食品安全 E-mail:xiaozhao200809@126.com

通信作者:杨菁 女 主管技师 研究方向为食品安全 E-mail:2015086662@qq.com

can be eaten raw with regional characteristics, such as *Houttuynia cordata* Thunb. Some strains of *Listeria monocytogenes* can be a potential public health risk due to high harboring rate of virulence genes. It is serious that of multidrug resistance of *Salmonella* and diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw vegetables.

Key words: Raw vegetables; *Salmonella*; *Listeria monocytogenes*; diarrheagenic *Escherichia coli*; antimicrobial susceptibility-testing; whole genome sequencing

生食蔬菜是指以未经加工的保持农产品原有完整形态的形式出售,消费者只需清洗或去皮而无需再经烹饪或其他特殊方式杀菌即可直接入口食用的蔬菜^[1]。生食蔬菜具有新鲜、营养、方便等特点,随着人们对健康和方便食品的追求,生食蔬菜作为一种新兴的食品也越来越受到消费者的青睐^[2]。但是由于其食用前无需再烹饪,其存在致病菌污染的风险较大,食用后引起食源性疾病的风险较大。

国内外已有因食用生食蔬菜而导致食源性疾病暴发的相关报道,2011年德国暴发毒黄瓜事件,导致20多人死亡,最终证实是由肠出血性大肠埃希氏菌(O104:H4)导致的食源性疾病暴发^[3]。2014年,美国27个州发生因食用被沙门菌污染的黄瓜而引起的食源性疾病暴发事件,导致300多人感染,1人死亡^[4]。2000—2005年,澳大利亚的由新鲜果蔬引起的微生物性食源性疾病占全部食源性疾病的4%^[5]。刘辉等^[6]报道的2018年全国食物中毒事件中,食用被污染的果蔬类及其制品而引起的中毒事件占全年食物中毒事件数的18.9%。福州、桂林、南宁等地均做过相应的调查研究,在生菜、香菜、香葱等中均有沙门菌检出,其中以生菜的污染较为严重^[7-9]。

在我国,已有从生食蔬菜中检测到食源性致病菌的文献报道,包括沙门菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌等^[10-12,9]。也有文献报道,很多病原菌牢固地附着在蔬菜表面,无法通过清洗来消除^[13-14]。生食蔬菜引起食源性疾病的风险较大,应引起重视。

国内外由生食蔬菜引发的食源性疾病暴发事件多由沙门菌和致泻大肠埃希菌引起,生食蔬菜检出单核细胞增生李斯特菌也有报道。云南少数民族

族众多,饮食习惯多样且有生食习惯,生食蔬菜的种类繁多,因此了解和掌握云南省生食蔬菜食源性致病菌的污染状况以及致病菌的特性,对于预防食源性疾病发生具有重要意义。本研究从云南省8个州(市)采集180份生食蔬菜样本进行沙门菌、致泻性大肠埃希菌、单核细胞增生李斯特菌检测,对分离菌株进行抗生素敏感试验及分析,并运用全基因组测序技术对菌株进行耐药基因和致病基因遗传分析,以期掌握云南省生食蔬菜致病菌污染的基本状况,以及相应分离菌株耐药表型和基因组特征,为预防食源性疾病的发生提供科学依据,为后续研究积累数据。

1 材料与方法

1.1 样品

2021年共采集云南省8个州(市)生食蔬菜180份,其中未经加工的新鲜蔬菜106份,经表面处理的新鲜蔬菜43份,去皮、切块或切丝的新鲜蔬菜31份。包括根、叶、茎、果实等种类。各类别生食蔬菜的采样数量和采样地点见表1。

1.2 主要仪器与试剂

电热恒温培养箱(Memmert, IF260 Plus260),生物显微镜(Leica, DM1000),全自动细菌鉴定和药敏分析系统(BioMerieux, VITEK 2 COMPACT, ATB, Bact/Alert 3D 120)。

缓冲蛋白胨水、亚硒酸盐胱氨酸增菌液、四硫磺酸盐煌绿增菌液基础、亚硫酸铋琼脂、HE琼脂、李氏增菌肉汤基础、李斯特氏菌显色培养基、PALCAM琼脂基础、营养肉汤、肠道增菌肉汤、麦康凯琼脂、伊红美蓝琼脂、营养琼脂(北京陆桥技术股份有限公司),革兰氏阳性菌鉴定卡、革兰氏阴性菌鉴定卡(法国梅里埃),沙门菌诊断血清(丹麦SSI),

表1 各类别生食蔬菜的采样数量及地点

Table 1 Sampling quantity and location of various types of raw vegetables

生食蔬菜样品种类	样品数量/份	采样地点及数量/份
未经加工的新鲜蔬菜	106	文山壮族苗族自治州(17)、红河哈尼族彝族自治州(6)、西双版纳傣族自治州(18)、德宏傣族景颇族自治州(9)、昆明市(15)、普洱市(18)、玉溪市(18)、丽江市(15)
经表面处理的新鲜蔬菜	43	文山壮族苗族自治州(1)、红河哈尼族彝族自治州(10)、德宏傣族景颇族自治州(9)、昆明市(15)、普洱市(2)、玉溪市(4)、丽江市(2)
去皮、切块或切丝的新鲜蔬菜	31	文山壮族苗族自治州(2)、红河哈尼族彝族自治州(4)、西双版纳傣族自治州(2)、德宏傣族景颇族自治州(2)、昆明市(10)、玉溪市(8)、丽江市(3)

药敏板(上海星佰生物技术有限公司),均在有效期内使用。

1.3 试验方法

1.3.1 检测方法依据

沙门菌的分离按照 GB 4789.4—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》进行^[15]。致泻大肠埃希氏菌的分离按照 GB 4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》进行^[16]。单核细胞增生李斯特菌的分离按照 GB 4789.30—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特菌检验》进行^[17]。

1.3.2 抗生素敏感性试验

根据美国临床实验室标准研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的微量肉汤稀释法进行抗生素敏感试验。对沙门菌和致泻大肠埃希氏菌分离株进行 29 种抗生素的敏感试验,分别为:氨苄西林(AMP)、氨苄西林/舒巴坦(AMS)、头孢他啶/阿维巴坦(CAZ/T)、头孢他啶/克拉维酸(CAZ/C)、头孢噻肟/克拉维酸(CTX/C)、头孢唑啉(CFZ)、头孢噻肟(CTX)、头孢西丁(CFX)、头孢他啶(CAZ)、头孢呋辛(CXM)、头孢吡肟(CPM)、头孢噻呋(EFT)、亚胺培南(IMP)、厄他培南(ETP)、庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AMK)、链霉素(STR)、多黏菌素 E(CT)、多黏菌素 B(PB)、阿奇霉素(AZM)、氨基糖苷(ATM)、四环素(TET)、米诺环素(MIN)、替加环素(TGC)、萘啶酸(NAL)、环丙沙星(CIP)、氯霉素(CHL)、氟苯尼考(FFC)、复方新诺明(SXT)。对单核细胞增生李斯特菌分离株进行 14 种抗生素的敏感试验,分别为:青霉素(PEN)、苯唑西林(OXA)、氨苄西林(AMP)、头孢西丁(CFX)、万古霉素(VAN)、达托霉素(DAP)、庆大霉素(GEN)、红霉素(ERY)、四环素(TET)、环丙沙星(CIP)、克林霉素(CLI)、氯霉素(CHL)、复方新诺明(SXT)。耐药结果判读参照

CLSI M45 第三版^[18]。以大肠埃希氏菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)作为药敏板质控,且质控均合格。

1.3.3 全基因组测序

沙门菌和致泻大肠埃希菌接种营养琼脂平板,单核细胞增生李斯特菌接种血琼脂培养基,37℃培养 24 h 后,收集菌体,委托北京擎科生物科技有限公司昆明分公司使用 Illumina 平台进行二代测序。并使用 Bionumerics 7.6(Applied Maths)软件进行拼接组装。

1.3.4 多位点序列分析(MLST)

将组装完成的细菌基因组序列上传巴斯德实验室 BIGSdb 生物信息学分析平台得到菌株的多位点序列分析(Multilocus sequence typing, MLST)型别(<http://bigsdb.pasteur.fr>)。

1.3.5 耐药基因、毒力基因及质粒比对

将基因组序列与 ResFinder v4.0^[19]、VFDB v1.0^[20]、Plasmidfinder v2.1^[21-22]数据库中的耐药基因、毒力基因及质粒基因进行比对,为找到更多的相关基因,参数设置中基因覆盖度及一致性阈值均为 80%。

2 结果

2.1 生食蔬菜中微生物污染状况

对 180 份生食蔬菜样品进行了沙门菌、单核细胞增生李斯特菌、致泻大肠埃希菌的分离与检测。其中 6 份样品检出沙门菌,检出率为 3.33%,主要来自折耳根、芹菜、生菜、香菜;2 份样品检出了肠聚集黏附性大肠埃希氏菌(Enterotoxigenic *E. coli*, EAEC),检出率为 1.11%,分别来自生菜和香菜;4 份样品检出单核细胞增生李斯特菌,检出率为 2.22%,分别来自萝卜丝和生菜;未出现同一样品中同时检出两种致病菌的情况。各类生食蔬菜致病菌的检出情况见表 2。

表 2 各类生食蔬菜中致病菌的检出情况

Table 2 Detection of pathogenic bacteria in various types of raw vegetables

食品类别	样品数/份	阳性数/份		
		沙门菌	致泻大肠埃希氏菌	单核细胞增生李斯特菌
未经加工的新鲜蔬菜	106	4(生菜、芹菜、折耳根)	1(生菜)	2(生菜)
经表面处理的新鲜蔬菜	43	2(香菜、折耳根)	1(香菜)	1(生菜)
去皮、切块或切丝的新鲜蔬菜	31	0	0	1(白萝卜丝)

2.2 沙门菌分析

2.2.1 血清学鉴定及其遗传特征

从 6 件阳性样品中分离到的 7 株沙门菌经鉴定为 7 种血清型,分别为 SM-01:菲尔摩雷沙门菌(*S. fillmore*)、SM-02:伦敦沙门菌(*S. london*)、SM-03:火鸡沙门菌(*S. meleagridis*)、SM-04:坦那那雷夫

沙门菌(*S. tananarive*)、SM-05:韦太夫雷登沙门菌(*S. weltevreden*)、SM-06:德尔卑沙门菌(*S. derby*)、SM-07:肯塔基沙门菌(*S. kentucky*),其中一份采自昆明的香菜样品检出了两种血清型的沙门菌(SM-06、SM-07)。

7 株沙门菌分属于 5 个 MLST 型别,分别为 SM-

01 (ST46)、SM-02 (ST463)、SM-03 (ST463)、SM-04 (ST1870)、SM-05 (ST65)、SM-06 (ST198)、SM-07 (ST198)。

2.2.2 抗生素敏感性试验结果

7株沙门菌均对CAZ、CTX、CTX/C、CPM、CZA、TGC、AMK、ATM、AMP、STR 10种抗生素敏感。7株

沙门菌中SM-04、SM-05对所有的抗生素均不耐药,其余菌株除SM-06仅对TET耐药外,都出现多重耐药现象。SM-07对11种抗生素表现出耐药,分离自香菜。PB的耐药仅出现于SM-01中,CXM、CFZ的耐药仅出现于SM-07中。各菌株的抗生素试验结果见表3。

表3 生食蔬菜中分离的7株沙门菌抗生素耐药试验结果

Table 3 Antibiotic resistance test of *Salmonella*

菌株编号	CIP	AMP	AMS	CT	CAZ	CAZ/C	CTX	CTX/C	CFX	CPM	CXM	CHL	CFZ	AZM	ETP	SXT	CZA	TGC	GEN	TET	MIN	AMK	ATM	PB	IMP	STR	FFC	EFT
SM-01	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SM-02	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SM-03	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SM-04	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SM-05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SM-06	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SM-07	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SM-07	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

注:红色代表耐药、绿色代表中介、黄色代表敏感

2.2.3 耐药基因、毒力基因及质粒比对情况分析

7株沙门菌的基因组与ResFinder v4.0数据库中的耐药基因进行比对之后,共识别出30个耐药基因,各菌株携带耐药基因的情况见表4。

通过与VFDB v1.0数据库比对,7株沙门菌均携带效应传递系统相关基因;几乎所有菌株都携带所有与细菌黏附相关的毒力基因,仅*ratB*(参与肠道定植)基因存在差异,仅SM-01、SM-04、SM-05携带该基因,其他菌株均未携带;所有菌株均未携带肠毒素相关基因;另有噬菌体溶原相关基因*sodCI*仅SM-01、SM-05携带。

通过与Plasmidfinder v2.1数据库比对,7株沙门菌中有6株携带有质粒基因,具体携带的质粒种类见表5。

2.3 单核细胞增生李斯特菌分析

2.3.1 遗传特征

4株单核细胞增生李斯特菌分属于4个MLST型别,分别为DZ-01(ST2)、DZ-02(ST515)、DZ-03(ST9)、DZ-04(ST308)。

2.3.2 耐药试验结果

4株单核细胞增生李斯特菌中有3株对OXA耐药(DZ-01、DZ-02、DZ-04)。其中DZ-02对OXA、SXT、TET多重耐药,分离自生菜。各菌株的抗生素试验结果见表6。

2.3.3 耐药基因、毒力基因及质粒分析

4株单核细胞增生李斯特菌的基因组与ResFinder v4.0数据库中的耐药基因进行比对之后,仅DZ-02携带耐药基因*tet(M)*(四环素类)、*dfzG*(甲氧苄氨嘧啶类)基因。

通过与VFDB v1.0数据库比对,4株单核细胞

增生李斯特菌均携带毒力岛*LIP1-1*,与其相关的6个基因(*prfA*、*plcA*、*hly*、*mpl*、*actA*、*plcB*)中,DZ-02、DZ-04缺乏*actA*基因。仅DZ-02、DZ-04携带毒力岛*LIP1-3*。所有菌株均未携带毒力岛*LIP1-4*。

通过与Plasmidfinder v2.1数据库比对,4株单核细胞增生李斯特菌中DZ-02携带质粒基因*repUS43*(DOP1),DZ-03携带质粒基因*rep25*(PLM33)。

2.4 致泻大肠埃希菌分析

2.4.1 分型及其遗传特征

对分离到的2株致泻大肠埃希菌进行基因分型,2株均为EAEC,基因分型结果为ZX-01(*aggR+*、*astA-*、*pic-*)、ZX-02(*aggR-*、*astA+*、*pic+*) ,分属2个MLST型别,分别为ZX-01(ST2253)、ZX-02(ST13)。

2.4.2 耐药试验结果

2株EAEC中,ZX-01仅对CAZ/C耐药,ZX-02对CFX、NAL、CFZ多重耐药,分离自香菜。抗生素试验结果见表7。

2.4.3 耐药基因、毒力基因及质粒基因分析

2株EAEC的基因组与ResFinder v4.0数据库中的耐药基因进行比对之后,ZX-01仅携带四环素耐药相关基因*tet(A)*,ZX-02携带β-内酰胺类耐药相关基因*blaCMY-83*和喹诺酮类耐药相关基因*QnrB47*。

通过与VFDB v1.0数据库比对,2株EAEC均含有聚集性粘连菌毛相关基因,分别为ZX-01(*aap*)、ZX-02(*astA*),除此之外ZX-02还携带*pic*、*sat*、*set1A*、*set1B*。

通过与Plasmidfinder v2.1数据库比对,ZX-01携带质粒基因*IncFIB*(AP001918)、*IncFII*(pCoo)。

表 4 生食蔬菜中分离的 7 株沙门菌耐药基因携带情况

Table 4 Carrier status of *Salmonella* resistance genes

菌株编号	氨基糖苷类										β-内酰胺			苯丙酮		甲氧苄氨嘧啶		大环内酯类		喹诺酮类		磺胺类		四环素类		利福平				
	<i>aac(3)-aac(3)-aac(6')</i>	<i>aac(3)-aac(6')</i>	<i>Ib-cr</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA16</i>	<i>aadA17</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA7</i>	<i>aph(3')</i>	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>blaTEM-1B</i>	<i>catA2</i>	<i>cmiA1</i>	<i>floR</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA14</i>	<i>dfrA27</i>	<i>lnt(F)</i>	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>	<i>QnrB6</i>	<i>QnrS1</i>	<i>suI1</i>	<i>suI2</i>	<i>suI3</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>ARR-3</i>
SM-01	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深
SM-02	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深
SM-03	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深
SM-04	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深
SM-05	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深
SM-06	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深
SM-07	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深	深

注:深蓝色代表携带,浅蓝色代表未携带

表 5 生食蔬菜中分离的 7 株沙门菌质粒携带情况

Table 5 Plasmid carrying status of 7 *Salmonellas*

菌株编号	质粒基因
SM-01	<i>IncFIB(K), IncFIB(pB171)</i>
SM-02	<i>IncFIA(HI1), IncHI1A, IncHI1B(R27)</i>
SM-03	<i>IncFIA(HI1), IncHI1A, IncHI1B(R27)</i>
SM-05	<i>IncFII(S)</i>
SM-06	<i>ColRNAI</i>
SM-07	<i>Col(pHAD28), IncHI2, IncHI2A, IncN</i>

表 6 生食蔬菜中分离到的 4 株单核细胞增生李斯特菌抗生素耐药试验结果

Table 6 Antibiotic resistance test for *Listeria monocytogenes*

菌株编号	AMP	PEN	OXA	CLI	SXT	TET	GEN	IPM
DZ-01	黄	黄	红	绿	黄	黄	黄	黄
DZ-02	黄	黄	红	绿	黄	红	黄	黄
DZ-03	黄	黄	黄	绿	黄	黄	黄	黄
DZ-04	黄	黄	红	绿	黄	黄	黄	黄

注:红色代表耐药,绿色代表中介,黄色代表敏感

3 讨论

本研究中共检测了 180 份生食蔬菜样品,包括生菜、芹菜、香菜、折耳根、白萝卜丝等,共检出 13 株致病菌,其中 7 株沙门菌、4 株单核细胞增生李斯特菌、2 株致泻大肠埃希氏菌。沙门菌可以通过污染食物感染包括人类在内的多种宿主,被世界卫生组织列为全球四大腹泻病因之一,根据 FDA 的统计显示,美国每年沙门菌感染人数已达 1 200 万人,每年造成 1.9 万人住院^[23],也是我国细菌性食物中毒的首要原因。单核细胞增生李斯特菌是主要的食源性致病菌,致死率高达 20%~40%^[24]。EAEC 是一类新发现的致泻大肠埃希氏菌,由其引起的食源性疾病事件越来越多^[25]。这三种食源性致病菌的检出提示云南省生食蔬菜中有可能存在微生物食品安全风险隐患。从样品类别分析,未经表面处理的蔬菜致病菌检出率高于经表面处理的蔬菜和去皮切丝的蔬菜,说明清洗可以一定程度降低蔬菜表面的微生物含量,潘妍等^[26]的研究也表明通过清洗,几种蔬菜表面的大肠杆菌都有不同程度的减少。从样品的种类分析,除常见的生菜、香菜有致病菌检出外,云贵川特有的折耳根致病菌检出率也较高,折耳根的食用具有较强的地域特色,在云贵川地区人们的食用量较大,了解其微生物污染状况具有重要的食品安全意义。从检出的致病菌种类分析,与福州、桂林、南宁^[7-9]的结果不同。本研究除检出沙门菌外,还检出单核细胞增生李斯特菌和致泻大肠埃希氏菌,云南省的生食蔬菜中检出的致病菌种类较其他地区的多,可能存在一定的食品安全风险。

本研究检出的 7 株沙门菌经鉴定为 6 种血清型,5 种 MLST 型别,并没有优势血清型和 ST 型,而李秀桂等^[8]的研究表明南宁生食蔬菜中以阿贡那沙

表7 生食蔬菜中分离到的2株致泻大肠埃希氏菌抗生素耐药试验结果

Table 7 Antibiotic resistance test of diarrheogenic *Escherichia coli*

菌株编号	CIP	AMP	AMS	CT	CAZ	CAZ/C	CTX	CTX/C	CFX	CPM	CXM	NAL	CHL	CFZ	ETP	SXT	CZA	TIG	GEN	TET	MIN	AMK	ATM	PB	IMP	STR	FFC	EF
ZX-01																												
ZX-02																												

注:红色代表耐药、绿色代表中介、黄色代表敏感

门菌为优势血清型,云南省生食蔬菜中沙门菌的型别更加多样。7株沙门菌中,5株对抗生素耐药,4株存在多重耐药现象,SM-07对11种抗生素耐药。通过耐药基因比对共识别到30种耐药基因,与耐药表型关联性良好。通过质粒基因比对,6株沙门菌含有质粒基因,均与耐药相关,其中5株携带有与多重耐药密切相关的 *IncHI* 和 *IncF* 型质粒^[27-28]。对11种抗生素耐药的SM-07携带有肠杆菌科细菌中最为流行的不相容 *IncHI* 型质粒 *IncHI2*,其携带大量耐药基因,曾在多种肠杆菌科细菌中被发现^[27,29]。值得注意的是本研究中发现一株沙门菌(SM-01)存在多黏菌素B耐药,耐药浓度为4 μg/mL,但是并没有发现携带有多黏菌素相关的耐药基因。多黏菌素被认为是对抗多重耐药细菌的最后一道防线,我国非伤寒沙门菌的多黏菌素耐药尚处于低水平,加强不同来源沙门菌对多黏菌素的耐药监测具有重要意义^[30]。

本研究检出的4株单核细胞增生李斯特菌分属于4个MLST型别,其中3株对OXA耐药,1株对OXA、TET、SXT多重耐药(DZ-02),DZ-02所携带的2个耐药基因与其耐药表型有较好的关联性。本研究中分离到的单核细胞增生李斯特菌对OXA的耐药率较高,结果与临床样本中分离到的菌株一致^[31-32]。单核细胞增生李斯特菌对OXA、TET一定比例的耐药现象也在禽肉的研究中被发现^[33],TET耐药也提示了多重耐药的可能,应该引起重视。本研究中有2株单核细胞增生李斯特菌携带有李斯特氏菌毒力岛 *LIPI-3*,具有较高的致病性^[34]。

本研究分离出的2株致泻大肠埃希菌经过PCR分型菌为EAEC,分属2个ST型别。通过耐药基因比对共识别到3种耐药基因,与耐药表型关联性良好。其中ZX-01对四环素耐药,同时含有相关耐药基因 *tet(A)* 和 *IncF* 型质粒,均提示该菌有多重耐药的可能^[27-28]。

参考文献

[1] 夏枫,刘芳,何治,等.关于广元生食蔬菜产业发展的思考[J].长江蔬菜,2019(14):70-72.
XIA F, LIU F, HE Z, et al. Reflections on development of raw vegetable industry in Guangyuan [J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2019(14): 70-72.

[2] 张懋,马良.对我国鲜切果蔬微加工行业及安全性的思考[J].江南大学学报(人文社会科学版),2016,15(5):110-114.
ZHANG M, MA L. Reflection on the processing industry and safety of fresh-cut fruits and vegetables in China [J]. Journal of Jiangnan University (Humanities & Social Sciences), 2016, 15(5): 110-114.

[3] 谭敦民.致命“毒黄瓜”背后潜藏着更大危机[J].科学养生,2011,8:4-5.
TAN D M. There is a bigger crisis behind the deadly “poisonous cucumber” [J]. Science Regimen, 2011, 8: 4-5.

[4] BOTTICCHIO L, MEDUS C, SORENSON A, et al. Erratum: vol. 65, No. 50-51 outbreak of *Salmonella* Oslo infections linked to Persian cucumbers—United states, 2016 [J]. MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report, 2017, 66(2): 64.

[5] KESKINEN L A, BURKE A, ANNOUS B A. Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157: H7 from lettuce leaves [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 132(2-3): 134-140.

[6] 刘辉,任婧寰,伍雅婷,等.2018年全国食物中毒事件流行特征分析[J].中国食品卫生杂志,2022,34(1):147-153.
LIU H, REN J H, WU Y T, et al. Epidemic characteristics analysis for food poisoning events in China, 2018 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(1): 147-153.

[7] 吕新,陈丽华,李玥仁.福州市生食蔬菜沙门氏菌污染状况分析[J].福建农业学报,2016,31(3):297-300.
LYU X, CHEN L H, LI Y R. *Salmonella* contamination of raw vegetables in Fuzhou [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2016, 31(3): 297-300.

[8] 李秀桂,黄彦,唐振柱,等.南宁市生食蔬菜中病原菌污染监测[J].应用预防医学,2008,14(6):361-363.
LI X G, HUANG Y, TANG Z Z, et al. Monitoring of pathogenic bacteria pollution in raw vegetables in Nanning city [J]. Journal of Applied Preventive Medicine, 2008, 14(6): 361-363.

[9] 王春旭,贺漓漓,杨小养,等.某市2006—2011年生食蔬菜中病原菌污染监测分析[J].中国当代医药,2012,19(36):142-143.
WANG C X, HE L L, YANG X Y, et al. Analysis of pathogen contamination monitoring in the raw vegetables of one city from 2006 to 2011 [J]. China Modern Medicine, 2012, 19(36): 142-143.

[10] 容冬丽,吴清平,吴诗,等.我国部分地区即食食品和蔬菜中金黄色葡萄球菌污染分布及耐药和基因分型情况[J].微生物学报,2018,58(2):314-323.
RONG D L, WU Q P, WU S, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and genetic characteristics of *Staphylococcus aureus* from retail ready-to-eat foods and vegetables in some regions of China [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(2): 314-323.

- [11] 李秀桂, 吕素玲, 唐振柱, 等. 2002—2004年广西食品中单核细胞增生李斯特氏菌的监测[J]. 广西预防医学, 2005(3): 140-142.
LI X G, LYU S L, TANG Z Z, et al. Surveillance for *Listeria monocytogenes* in foods in Guangxi, 2002—2004[J]. Guangxi Journal of Preventive Medicine, 2005(3): 140-142.
- [12] 黄志广, 莫嘉延, 李凤贞. 佛山市高明区农贸市场中食源性沙门氏菌血清型与耐药性现状[J]. 公共卫生与预防医学, 2012, 23(6): 6-9.
HUANG Z G, MO J Y, LI F Z. Present situation of serum type and drug resistance of *Salmonella* in farmer's market, Gaoming district[J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2012, 23(6): 6-9.
- [13] UHLIG E, OLSSON C, HE J Y, et al. Effects of household washing on bacterial load and removal of *Escherichia coli* from lettuce and "ready-to-eat" salads[J]. Food Science & Nutrition, 2017, 5(6): 1215-1220.
- [14] 李沛生, 郑雯, 张晓银, 等. 清洗条件对整叶生菜大肠菌群数及菌落总数的影响[J]. 现代食品科技, 2013, 29(7): 1658-1663.
LI B S, ZHENG W, ZHANG X Y, et al. Effects of washing methods and conditions on coliform group and total bacterial count of whole leaf romaine lettuce[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1658-1663.
- [15] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验: GB 4789.4—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National food safety standard—Food microbiological examination: *Salmonella*; GB 4789.4—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [16] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验: GB 4789.6—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National food safety standard—Examination of diarrheogenic *Escherichia coli*; GB 4789.6—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [17] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验: GB 4789.30—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National food safety standard—Food microbiological examination: *Listeria monocytogenes*; GB 4789.30—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [18] CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. 3rd ed. CLSI guideline M45[M]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [19] ZANKARI E, HASMAN H, COSENTINO S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(11): 2640-2644.
- [20] CHEN L H, YANG J, YU J, et al. VFDB: A reference database for bacterial virulence factors[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(S1): D325-D328.
- [21] CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, et al. BLAST+: Architecture and applications [J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10: 421.
- [22] CARATTOLI A, ZANKARI E, GARCÍA-FERNANDEZ A, et al. PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(7): 3895-903.
- [23] MACHADO I, GARRIDO V, HERNANDEZ L I, et al. Rapid and specific detection of *Salmonella* infections using chemically modified nucleic acid probes [J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1054: 157-166.
- [24] 刘洪蕾, 王真. 食源性单核细胞增生李斯特氏菌检测方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2022, 43(10): 111-116.
LIU H L, WANG Z. Progress on detection methods of foodborne *Listeria monocytogenes* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2022, 43(10): 111-116.
- [25] WEINTRAUB A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: Epidemiology, virulence and detection [J]. Journal of Medical Microbiology, 2007, 56(1): 4-8.
- [26] 潘妍, 贾红亮, 林少华, 等. 常见生食蔬菜营养卫生指标分析[J]. 中国果菜, 2018, 38(3): 26-29.
PAN Y, JIA H L, LIN S H, et al. Analysis of nutritional and health ingredients of common salad vegetables [J]. China Fruit & Vegetable, 2018, 38(3): 26-29.
- [27] 梁权辉. 多药耐药 IncHI2 型和 IncHI5 型质粒的测序及比较基因组学分析[D]. 广州: 南方医科大学, 2017.
LIANG Q H. Sequencing and comparative genomics analysis of multidrug-resistant IncHI2 and IncHI5 plasmids [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2017.
- [28] 李曼莉, 王利君, 赵亚超, 等. IncFII-FIA-FIB 型多重耐药质粒 pBTR-CTXM 的结构基因组学分析[J]. 微生物学通报, 2019, 46(1): 139-150.
LI M L, WANG L J, ZHAO Y C, et al. Structural genomics of IncFII-FIA-FIB multidrug resistant plasmid pBTR-CTXM [J]. Microbiology China, 2019, 46(1): 139-150.
- [29] LI L, LIAO X P, YANG Y R, et al. Spread of oqxAB in *Salmonella enterica* serotype typhimurium predominantly by IncHI2 plasmids [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(10): 2263-2268.
- [30] 曹阳, 遇晓杰, 韩营营, 等. 我国非伤寒沙门菌对多粘菌素的耐药现状及 *mcr-1* 基因携带概况[J]. 疾病监测, 2017, 32(5): 365-371.
CAO Y, YU X J, HAN Y Y, et al. Polymyxin resistance and *mcr-1* prevalence in non-typhoid *Salmonella* isolates in China [J]. Disease Surveillance, 2017, 32(5): 365-371.
- [31] 吕素玲, 谭冬梅, 李秀桂. 广西食源性单核细胞增生李斯特氏菌耐药趋势分析[J]. 实用预防医学, 2013, 20(6): 734-735.
LYU S L, TAN D M, LI X G. Tendency analysis on drug resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* in Guangxi [J]. Practical Preventive Medicine, 2013, 20(6): 734-735.
- [32] 杨梅, 王志刚, 封志纯, 等. 单核细胞增生性李斯特菌感染临床特征及耐药性[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2014, 29(22): 1692-1695.

- YANG M, WANG Z G, FENG Z C, et al. Clinical features and drug resistance of *Listeria monocytogenes* infection in neonates[J]. Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2014, 29(22): 1692-1695.
- [33] 陈培超, 黄强, 孙攀, 等. 2019年—2021年上海市嘉定区市售禽肉中单核细胞增生李斯特菌的污染状况及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(13): 1635-1638.
- CHEN P C, HUANG Q, SUN P, et al. *Listeria monocytogenes* contamination and drug resistance analysis in poultry sold in Jiading district, Shanghai from 2019 to 2021[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2022, 32(13): 1635-1638.
- [34] MAURY M M, TSAI Y H, CHARLIER C, et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity[J]. Nature Genetics, 2016, 48(3): 308-313.

[上接第563页]

著作或编著:[序号] 主要责任者. 文献题名[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项(版次为第一版的不用标明). 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

举例 图书:[3] 吴阶平, 裘法祖, 黄家驹. 外科学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 82-93.

译著:[4] ZIEGLER E E, FILER L J. 现代营养学[M]. 闻之梅, 陈君石, 译. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 126-129.

著作中的析出文献:[序号] 析出文献主要责任者. 析出文献题名[文献类型标志]//原文献主要责任者. 原文献题名. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年: 析出文献起页-止页.

举例 [5] 白书农. 植物开花研究[M] // 李承森. 植物科学进展. 北京: 高等教育出版社, 1998: 146-163.

会议文献中的析出文献:[序号] 析出文献主要责任者. 析出文献题名[文献类型标志/文献载体标志]//会议文献主要责任者. 会议文献题名: 其他题名信息. 出版地: 出版者, 出版年: 析出文献起页-止页[引用日期] 获取和访问路径.

举例 [6] 董家祥, 关仲英, 王兆奎, 等. 重症肝炎的综合基础治疗[C]//张定凤. 第三届全国病毒性肝炎专题学术会议论文汇编, 南宁, 1984. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 203-212.

科技报告: 著录格式同著作或编著.

举例 [7] World Health Organization. Factors regulating the immune response: report of WHO Scientific Group [R]. Geneva: WHO, 1970: 1-74.

法令、条例:[序号] 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 公布日期.

举例 [8] 中华人民共和国全国人民代表大会. 中华人民共和国著作权法[A]. 2012-03-31.

标准:[序号] 主要责任者. 标准名称: 标准编号[文献类型标志]. 出版地: 出版者, 出版年.

举例 [9] 全国文献工作标准化技术委员会第七分委员会. 科学技术期刊编排格式: GB/T 3179—1992 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1992.

电子文献:[序号] 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 出版地: 出版者, 出版年(更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径.

举例 [10] 肖钰. 出版业信息迈入快道 [EB/OL]. (2001-12-19) [2002-04-15]. <http://www.creader.com/news/20011219/200112190019.html>.

专利文献:[序号] 专利申请者. 题名: 专利国别, 专利号 [P]. 公告或公开日期.

3 声明

本刊已进入中国所有主要期刊数据库, 本刊所付稿酬已包含这些数据库的稿酬。编辑部对来稿将作文字性修改, 若涉及内容修改会与作者商榷。编辑部收到稿件后, 于3个月内通知处理意见。投稿6个月后如未收到修稿或录用通知, 作者可自行处理稿件, 所收稿件纸质版概不退还。来稿一经采用, 即收取版面费, 按规定向作者支付稿酬, 并赠送杂志。

4 投稿

投稿请登录《中国食品卫生杂志》网站 <http://www.zgspws.com>, 并同时邮寄单位介绍信和稿件纸版1份(需第一作者、通信作者和副高以上作者签名)。来稿中应有清楚完整的作者通信地址、联系电话和 E-mail 地址。编辑部地址: 北京市朝阳区广渠路37号院2号楼802室《中国食品卫生杂志》编辑部 邮政编码: 100021 电话: 010-52165596 E-mail: spws462@163.com