

居民冰箱食源性致病菌病原学分析

郝 民, 宋衍燕, 王恒伟, 田 甜, 邵希凤, 孙灵利*

(北京市朝阳区疾病预防控制中心, 北京 100021)

摘要: 目的 了解北京市朝阳区居民冰箱卫生状况及食源性致病菌耐药与毒力分析。**方法** 采集居民冰箱拭子进行大肠菌群、葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌分离鉴定; 分离菌株采用微量肉汤稀释法、纸片法及 PCR 法进行耐药及毒力研究。**结果** 120 件棉签拭子, 大肠菌群、葡萄球菌阳性率 48.33%(58/120)、49.17%(59/120), 金黄色葡萄球菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌阳性率 2.50%(3/120)、1.67%(2/120), 未检出单核细胞增生李斯特氏菌。金黄色葡萄球菌红霉素耐药率 33.33%(1/3); 凝固酶阴性葡萄球菌青霉素、红霉素耐药率 23.21%(13/56)、21.43%(12/56)。小肠结肠炎耶尔森氏菌头孢唑林耐药率 50%(1/2)。金黄色葡萄球菌毒力基因 *seb* 阳性率 66.67%(2/3), *sea*、*sec*、*sed*、*see* 与耐药基因 *mecA*、*vanA* 阴性; 凝固酶阴性葡萄球菌 *mecA* 阳性率 1.69%(1/59), *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*、*vanA* 阴性。小肠结肠炎耶尔森氏菌毒力基因 *ail*、*ystA*、*virF*、*yadA* 阴性, *ystB* 阳性。**结论** 北京市朝阳区居民冰箱卫生状况差, 存在食源性疾病传播风险, 应加强冰箱正确使用宣传教育。

关键词: 居民冰箱; 食源性致病菌; 毒力基因; 耐药性

Etiological analysis of food-borne pathogenic bacteria in refrigerator of community residents

HAO Min, SONG Yan-Yan, WANG Heng-Wei, TIAN Tian, SHAO Xi-Feng, SUN Ling-Li*

(Chaoyang District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the hygienic status of community household refrigerators and the drug resistance and virulence of food-borne pathogens in Chaoyang district, Beijing. **Methods** The swabs of community household refrigerators were collected for isolation and identification of *Coliforms*, *Staphylococcus*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. The drug resistance and virulence of the isolated strains were detected by broth microdilution, K-B assay and PCR. **Results** The positive rates of coliforms and *Staphylococcus* were 48.33% (58/120) and 49.17% (59/120). The positive rates of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* were 2.50% (3/120) and 1.67% (2/120). *Listeria monocytogenes* were not detected. The resistance rate of *Staphylococcus aureus* to erythromycin was 33.33% (1/3). The resistance rate of coagulase negative *Staphylococcus* to penicillin and erythromycin were 23.21% (13/56), 21.43% (12/56). The resistance rate of *Yersinia enterocolitica* to cefazolin was 50% (1/2). The positive rate of *Staphylococcus aureus* virulence gene *seb* was 66.67% (2/3), *sea*, *sec*, *sed*, *see* and *mecA*、*vanA* were negative; the positive rate of coagulase negative *Staphylococcus* *mecA* was 1.69% (1/59), *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *vanA* were negative. The virulence genes of *Yersinia enterocolitica* *ail*、*ystA*、*virF*、*yadA* were negative, but *ystB* was positive. **Conclusion** The hygienic status of community household refrigerators in Chaoyang district,

*通信作者: 孙灵利, 副研究员, 主要研究方向为实验室管理和微生物检验技术。E-mail: sheguansun@126.com

*Corresponding author: SUN Ling-Li, Associate Professor, Chaoyang District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China. E-mail: sheguansun@126.com

Beijing is poor and there is a risk of food-borne diseases spreading. Therefore, the propaganda and education on the correct use of refrigerators publicity and education on the correct use of refrigerators should be strengthened.

KEY WORDS: household refrigerator; food-borne pathogens; virulence gene; drug resistance

0 引言

冰箱作为现代家庭必备家用电器, 承担食品储存、保鲜的重要作用。羊和鹏等^[1]基于高通量测序来了解家用冰箱不同环境中的微生物菌群情况, 发现4 °C和冷凝水中, 假单胞菌属和不动杆菌属分别含量最多; 而-20 °C下, 不动杆菌属和巨型球菌数丰度最高; 同时还发现多种食源性致病菌, 包括李斯特菌属、沙门菌属及大肠菌属等。羊宋贞等^[2]对家庭冰箱中微生物种类进行调查发现, 发现致病菌主要为葡萄球菌。冰箱常用冷藏温度4~8 °C, 为嗜冷细菌如小肠结肠炎耶尔森氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌等^[3]适宜的生存环境。王丽丽等^[4]对北京市社区居民冰箱耶尔森菌污染状况及分子特征研究发现, 耶尔森菌检出率为6.67%, 其中一株菌对多达11种抗生素耐药, 毒力基因 $ystB$ 携带率25.00%。AGNES等^[5]在美国随机采集137台家庭冰箱, 分离到肺炎克雷伯菌(23.4%)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(0.7%)等多种致病菌。葡萄牙学者INES等^[6]的研究对象为86台家庭冰箱, 其中3台分离到单核细胞增生李斯特氏菌。

从以上研究结果可以看出, 冰箱的低温虽然有助于食品的储藏和保鲜, 但也为某些食源性致病菌提供适宜的生长环境。良好的冰箱卫生环境对于居民的食品安全起着重要的作用。鉴于此, 本研究对北京市朝阳区居民冰箱涂抹样品进行分离鉴定, 分离株进行药物敏感性试验及耐药基因、毒力基因检测, 以了解居民冰箱食源性致病菌污染状况、为针对性开展食品安全健康教育提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

LB增菌肉汤、7.5%氯化钠肉汤、月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤、煌绿乳糖胆盐肉汤(北京陆桥技术股份有限公司); 营养肉汤、Baird-Parker培养基、耶尔森选择培养基(英国OXOID公司); 李斯特显色培养基(上海科玛嘉微生物技术有限公司); 血平板(美国赛默飞世尔科技公司); 血浆凝固酶(美国BD公司); Vitek GN鉴定卡(法国梅里埃公司); 荚膜阳性需氧菌药敏鉴定板(上海星佰生物有限公司); 金黄色葡萄球菌 $mecA$ 、 $vanA$ 及5种肠毒素检测试剂盒(real-time PCR Taqman探针法)(北京中瑞恒达科技有限公司); 小肠结肠炎耶尔森菌毒力基因检测试剂盒(北京卓诚惠生生物科技有限公司);

VITEK-2COMPACT全自动微生物鉴定/药敏系统(法国梅里埃公司); 荧光Roche LightCycler480定量PCR仪(瑞士罗氏集团)。

1.2 样品来源

在2018年6月、8月和10月对北京市朝阳区居民家用冰箱进行入户采样, 每次采集40件共采集120件涂抹样品。冰箱均为使用状态。

1.3 方法

1.3.1 样品采集

参照GB/T 18204.4—2013《公共场所卫生检验第四部分: 公共用品用具微生物》^[7]规定物体表面采样方法, 使用无菌棉签涂抹冰箱冷藏室最底部与隔板, 面积5 cm×5 cm。将采样棉拭子分别无菌剪入生理盐水、LB增菌肉汤、7.5%氯化钠肉汤、营养肉汤; 采集的样品0~4 °C无菌保存, 4 h内送至实验室检测。

1.3.2 菌株鉴定

采集样品依据GB 4789.3—2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 大肠菌群计数》^[8]、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》^[9]、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氏菌检验》^[10]、GB 4789.8—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌》^[11]进行大肠菌群、葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌分离鉴定; 凝固酶阴性葡萄球菌参考GB 4789.10—2016使用全自动微生物鉴定/药敏系统鉴定菌种。

1.3.3 药敏敏感性检测

依据2018年美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)颁布抗菌药物敏感性实验执行标准^[12], 葡萄球菌药物敏感性实验方法: 头孢西丁采用纸片法、其它17种抗生素使用微量肉汤稀释法, 质控菌株为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC29213; 小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)采用微量肉汤稀释法对20种抗生素进行药物敏感性试验, 质控菌株为大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)ATCC25922。

1.3.4 毒力基因与耐药基因PCR检测

葡萄球菌毒力基因 sea 、 seb 、 sec 、 sed 、 see 与耐药基因 $mecA$ 、 $vanA$ 检测反应条件为37 °C, 2 min, 1个循环; 95 °C, 10 min, 1个循环; 95 °C, 15 s, 58 °C, 30 s, 40个循环,

结果判读参照试剂盒金黄色葡萄球菌 *mecA*、*vanA* 及 5 种肠毒素检测试剂盒(real time PCR Taqman 探针法)说明书进行。小肠结肠炎耶尔森氏菌毒力基因 *ail*、*ystB*、*ystA*、*virF*、*yadA*、*O:3* 检测反应条件为 95 °C, 5 min, 1 个循环; 95 °C, 15 s, 60 °C, 30 s, 40 个循环, 结果判读参照试剂盒小肠结肠炎耶尔森氏菌毒力基因多重实时荧光 PCR 检测试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 菌 株

采集涂抹样品 120 件, 大肠菌群、葡萄球菌阳性率分别为 48.33%(58/120)、49.17%(59/120), 金黄色葡萄球菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌阳性率分别为 2.50%(3/120)、阳性率 1.67%(2/120)(见表 1), 未检出单核细胞增生李斯特氏菌。大肠菌群、葡萄球菌同时阳性的涂抹样品 21 件, 其中 3 件分离到 2 种葡萄球菌; 大肠菌群、小肠结肠炎耶尔森氏菌同时阳性的涂抹样品 1 件。

2.2 药物敏感性检测

金黄色葡萄球菌对红霉素耐药率为 33.33%(1/3), 其余抗生素均 100% 敏感。凝固酶阴性葡萄球菌对青霉素、红霉素耐药率较高, 为 23.21%(13/56)、21.43%(12/56); 对头孢西丁、替加环素、万古霉素、利奈唑烷、利福平和莫西沙星 100% 敏感。松鼠葡萄球菌青霉素、四环素耐药率较高, 分别为 16.67%(3/18)、11.11%(2/18); 人葡萄球菌人亚种、表皮葡萄球菌、沃氏葡萄球菌对红霉素耐药率分别为 100%(2/2)、80.00%(4/5)、62.50%(5/8)(见表 2)。2 株小肠结肠耶尔森氏菌头孢唑林耐药率 50%(1/2), 100%

敏感抗生素为: 氨苄西林、四环素、氯霉素、复方新诺明、头孢噻肟、头孢西丁、庆大霉素、亚胺培南、萘啶酸、磺胺异恶唑、环丙沙星、多粘菌素 B、米诺环素、阿米卡星、美罗培南、左氧氟沙星、多西环素、卡那霉素及链霉素。

2.3 毒力基因与耐药基因检测

金黄色葡萄球菌毒力基因 *seb* 阳性率 66.67%(2/3), *sea*、*sec*、*sed*、*see* 与耐药基因 *meca*、*vanA* 均阴性; 凝固酶阴性葡萄球菌 *mecA* 阳性率 1.69%(1/59), *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see* 与耐药基因 *vanA* 均阴性。小肠结肠炎耶尔森氏菌毒力基因 *ail*、*ystA*、*virF*、*yadA* 阴性, *ystB* 阳性。

3 结论与讨论

需氧及兼性厌氧、37 °C 分解乳糖产气革兰氏阴性无芽孢杆菌为大肠菌群, 主要来源于人类和牲畜粪便, 通常作为食品受粪便污染程度和食品卫生质量指标菌^[13-14]。本研究采集北京市朝阳区居民冰箱冷藏室 120 件涂抹样品, 大肠菌群阳性率为 48.33%(58/120), 其中 37.93%(22/58) 阳性样本同时分离到致病菌。白咏梅等^[15]对新疆石河子市居民冰箱采样, 发现大肠菌群阳性率为 35.40%。钟瑞美等^[16]采集江门市居民冰箱冷藏室 46 件样品, 大肠菌群阳性率为 39.13%。本研究中朝阳区居民冰箱大肠菌群阳性率显著高于以上研究结果, 并有较高比率污染了致病菌。因此, 若未经充分清洗、加热直接进食冰箱内食品, 人体极有可能通过被污染食品感染食源性疾病, 提示居民应该加强冰箱环境清洁消毒, 注意冰箱内食品取用时手的清洁卫生, 并且食用煮熟后食品。

表 1 食源性致病菌分离概况

Table 1 Overview of food-borne pathogenic bacteria isolation

菌属名称(n)	菌种名称	菌株数量 n(比例/%)
葡萄球菌属(59)	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	3(5.08)
	松鼠葡萄球菌(<i>Staphylococcus sciuri</i>)	18(30.51)
	木糖葡萄球菌(<i>Staphylococcus xylosus</i>)	9(15.25)
	沃氏葡萄球菌(<i>Staphylococcus warneri</i>)	8(13.56)
	表皮葡萄球菌(<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	5(8.47)
	腐生葡萄球菌(<i>Staphylococcus saprophyticus</i>)	4(6.78)
	小牛葡萄球菌(<i>Staphylococcus vitulinus</i>)	4(6.78)
	缓慢葡萄球菌(<i>Staphylococcus lentus</i>)	3(5.08)
	鸡葡萄球菌(<i>Staphylococcus gallinarum</i>)	3(5.08)
	人葡萄球菌人亚种(<i>Staphylococcus hominis</i>)	2(3.39)
耶尔森菌属(2)	小肠结肠炎耶尔森氏菌(<i>Yersinia enterocolitica</i>)	2(100.00)

- HE P, HOU SP, CHEN HL, et al. Analysis of microbial flora in domestic refrigerators based on high-throughput sequencing [J]. Pract Prev Med, 2020, 27(8): 950–953.
- [2] 羊宋贞, 冯广达, 姚青, 等. 家庭冰箱中的微生物种类调查[J]. 生物技术通报, 2013, 247(2): 195–200.
- YANG SZ, FENG GD, YAO Q, et al. Investigation of microbial species in domestic refrigerator [J]. Biotechnol Bull, 2013, 247(2): 195–200.
- [3] 朱美娟, 邵占涛, 李颖, 等. 北京市顺义区家用冰箱中嗜冷菌的检测分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(2):173–174, 180.
- ZHU MJ, SHAO ZT, LI Y, et al. Detection of psychrophilic bacteria in household refrigerators in Shunyi district, Beijing [J]. Pract Prev Med, 2016, 23(2): 173–174, 180.
- [4] 王丽丽, 张寻, 段然, 等. 北京市售生禽肉及社区居民冰箱耶尔森菌污染状况及分子特征研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(9): 752–757.
- WANG LL, ZHANG X, DUAN R, et al. Contamination status and molecular characteristics of *Yersinia* bacteria in raw meat and community refrigerators in Beijing [J]. Chin J Zoono, 2020, 36(9): 752–757.
- [5] AGNES KN, FUR-CHI C, SANDRIA L, et al. Occurrence of *Listeria* and *Enterobacteriaceae* in domestic refrigerators [J]. J Food Prot, 2008, 71(3): 608–612.
- [6] INÉS A, REGALO M, MENA C, et al. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal [J]. Food Control, 2005, 16(2): 121–124.
- [7] GB/T 18204.4—2013 公共场所卫生检验第 4 部分 公共用品用具微生物[S].
GB/T 18204.4—2013 Examination methods for public places Part 4: Microorganism on a surface of public articles [S].
- [8] GB 4789.3—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数[S]
GB 4789.3—2016 National food safety standard-Food microbiological test-Coliforms count [S].
- [9] 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[S].
GB 4789.10—2016 National food safety standard-Food microbiological test-Staphylococcus aureus [S].
- [10] 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氏菌检验[S].
GB 4789.30—2016 National food safety standard-Food microbiological test-Listeria monocytogenes [S].
- [11] GB 4789.8—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌[S]
GB 4789.8—2016 National food safety standard-Food microbiological test-Yersinia enterocolitica [S].
- [12] CLSI. M100: Performance standards for antimicrobial susceptibility test: 28th edition [S].
- [13] 苏涛, 毛永杨, 田金兰, 等. 食品安全标准中微生物检验指标的问题分析及建议[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9): 2801–2807.
SU T, MAO YY, TIAN JL, et al. Analysis and suggestion on microbiological examination index in food safety standard [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(9): 2801–2807.
- [14] 许珂. 食品微生物检验内容及检测技术探讨[J]. 医学信息, 2015, (26): 185.
- XU K. Discussion on the content and technology of food microbiological examination [J]. Med Inform, 2015, (26): 185.
- [15] 白咏梅, 唐怀良. 冰箱保存食品大肠菌群污染状况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(6): 706.
- BAI YM, TANG HL. Investigation on coliform contamination of food stored in refrigerator [J]. Chin J Health Lab Technol, 2001, 11(6): 706.
- [16] 钟瑞美, 尹本康, 梁柏年, 等. 江门市区 2014–2015 年学校、家庭、酒店冰箱内表面微生物污染状况调查[J]. 社区医学杂志, 2016, 14(19): 13–16.
- ZHONG RM, YIN BK, LIANG BN, et al. An investigation on the status of microbial contamination on the inner surface of refrigerator of the school, family, and hotel in Jiangmen from 2014 to 2015 [J]. J Commun Med, 2016, 14(19): 13–16.
- [17] 王迪, 张晓媛, 陈倩, 等. 北京市食源性金黄色葡萄球菌耐药及分子分型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(5): 428–434.
- WANG D, ZHANG XY, CHEN Q, et al. Study of antimicrobial resistance and molecular characteristics in foodborne *Staphylococcus aureus* in Beijing [J]. Chin J Food Hyg, 2014, 26(5): 428–434.
- [18] IVANA D, DONALD M, DRAGANA V, et al. Isolation and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital environment [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(6): 2782–2785.
- [19] 韩乃寒, 刘映, 赵燕英, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(1): 181–187.
- HAN NH, LIU Y, ZHAO YY, et al. Review on *Staphylococcus aureus* enterotoxin [J]. Prog Mod Biomed, 2015, 15(1): 181–187.
- [20] 徐勤, 高金彬, 孙翔, 等. 2018 年扬州市高邮地区小肠结肠炎耶尔森菌监测结果分析[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2020, 41(2): 95–99.
- XU Q, GAO JB, SUN X, et al. Surveillance analysis of *Yersinia enterocolitica* in Gaoyou area of Yangzhou in 2018 [J]. J Yangzhou Univ (Human Soc Sci Edit), 2020, 41(2): 95–99.
- [21] 王闻卿, 崔琪奇, 王筱, 等. 上海市浦东新区食源性小肠结肠炎耶尔森菌耐药及分子流行病学特征[J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(3): 354–359.
- WANG WQ, CUI QQ, WANG X, et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of foodborne *Yersinia enterocolitica* in Pudong new district, Shanghai [J]. Chin J Epidemiol, 2019, 40(3): 354–359.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



郝民, 硕士, 主管级技师, 主要研究方向为食品、公共场所与环境卫生检测。
E-mail: shandonghaomin@126.com

孙灵利, 副研究员, 主要研究方向为实验室管理和微生物检验技术。
E-mail: sheguansun@126.com