

现制饮品中金黄色葡萄球菌耐药及遗传特征研究

李辉^{1#}, 包轶伦^{2#}, 田蕙珺³, 马鹏雪³, 胡豫杰¹, 王伟¹, 甘辛¹, 白瑶¹,
董银苹¹, 徐进¹, 李凤琴¹, 闫韶飞^{1*}

(1. 国家食品安全风险评估中心, 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021;
2. 伦敦帝国理工学院生命科学学院, 伦敦 SW7 2BX; 3. 北京联合大学生物化学与工程学院, 北京 100101)

摘要: **目的** 探究我国现制饮品中金黄色葡萄球菌抗生素耐药及遗传特征。**方法** 采用微量肉汤稀释法对金黄色葡萄球菌进行药敏测定, 同时提取菌株基因组 DNA 进行全基因组测序, 并使用生物信息学分析流程进行基因组特征数据挖掘。**结果** 现制饮品中 43 株金黄色葡萄球菌对 10 种抗生素的总体耐药率为 88.4%, 分属 9 种耐药谱, 其中 3 株为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)。多重耐药菌(multidrug resistant, MDR)占比 16.3%, 主要分离自含乳现制饮品。耐受 7 类及以上抗生素金黄色葡萄球菌 3 株, 其中 1 株为 MRSA。全基因组测序进化分析表明菌株耐药表型与基因型具有良好的相关性, MRSA 及多重耐药株出现明显聚集。43 株菌属于 16 种多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST), 其中 MRSA 菌株包括 1 株 ST45 型和 2 株 ST398 型。多重耐药株 ST 型分别为 ST5、7、15、59、121 和 398 型。多重耐药 MRSA 株为 ST398 型。葡萄球菌肠毒素基因整体携带率为 34.9%, 其中 *sea* 为主要基因型。MRSA 菌株均不携带毒力基因, 多重耐药株肠毒素基因携带率为 42.9%。3 株主要来自含水果类现制饮品的 ST1 型菌株同时携带 6 种肠毒素基因, 但其仅对青霉素耐药或为敏感株。**结论** 我国现制饮品中金黄色葡萄球菌存在 MRSA 及多重耐药菌, 且该类菌株在遗传进化中聚类明显, 虽然 MRSA 菌株致病性相对较弱, 然而 MDR 菌株肠毒素基因的高携带率提示耐药金黄色葡萄球菌的潜在危害不容忽视。因此, 应加强现制饮品中金黄色葡萄球菌的耐药监测与防控。

关键词: 现制饮品; 金黄色葡萄球菌; 耐药性; 全基因组测序

Study on antimicrobial resistance phenotype and genotype characterization of *Staphylococcus aureus* from freshly prepared beverages

LI Hui^{1#}, BAO Yi-Lun^{2#}, TIAN Hui-Jun³, MA Peng-Xue³, HU Yu-Jie¹, WANG Wei¹, GAN Xin¹,
BAI Yao¹, DONG Yin-Ping¹, XU Jin¹, LI Feng-Qin¹, YAN Shao-Fei^{1*}

(1. National Health Commission Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Health, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China; 2. Department of Life Science, Imperial College London, London SW7 2BX, UK; 3. College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100101, China)

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFE01500)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFE01500)

#李辉、包轶伦为共同第一作者

#LI Hui and BAO Yi-Lun are Co-first Authors

*通信作者: 闫韶飞, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: yanshaofei@cfsa.net.cn

*Corresponding author: YAN Shao-Fei, Ph.D, Associate Professor, National Health Commission Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Health, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, No.7 Panjiayuan Nanli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. E-mail: yanshaofei@cfsa.net.cn

ABSTRACT: Objective To explore the antimicrobial resistance phenotype and genotype characterization of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) from freshly prepared beverages. **Methods** The antimicrobial susceptibility testing of *S. aureus* was carried out following broth microdilution method. Meanwhile, the genomic DNA of the isolates were extracted for whole genome sequencing, and then the bioinformatics analysis pipelines were implemented for genomic analysis. **Results** The overall resistance rate of the 43 *S. aureus* isolates from freshly prepared beverages against 10 categories of antibiotics was 88.4%. All isolates belonged to 9 kinds of antimicrobial resistance profiles, of which 3 isolates were methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). The overall multidrug resistant (MDR) rate was 16.3%, while MDR isolates were mainly originated from beverages made of milk and milk product. Three *S. aureus* isolates were resistant against 7 or more classes of antibiotics, one of which was MRSA. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis showed that the antimicrobial resistance phenotypes and genotypes correlated well with each other. Moreover, the MRSA and MDR isolates showed obvious clustering in the phylogenetic tree. All of the 43 isolates belonged to 16 multilocus sequence types (MLST), from which MRSA isolates belonged to one ST45 and two ST398. The ST types of MDR isolates were ST5, 7, 15, 59, 121 and 398, respectively. The MDR-MRSA isolate was ST398. The 34.9% of all isolates harbored *Staphylococcal* enterotoxin genes, where *sea* was the main genotype. MRSA isolates did not harbor enterotoxin genes, while the harboring rate of enterotoxin genes of MDR isolates was 42.9%. All three ST1 isolates, which were mainly from freshly prepared beverages made of fruit, harbored 6 enterotoxin genes, however, they were only resistant to penicillin or being susceptible to all antibiotics tested. **Conclusion** MRSA and MDR *S. aureus* exist in freshly prepared beverages, and are closely correlated genetically. Although the pathogenicity of MRSA strains is relatively weak, high prevalence rate of enterotoxin genes in MDR isolates implicate that potent risk from resistant *S. aureus* should not be ignored. Therefore, the monitoring and prevention of antimicrobial resistant *S. aureus* in freshly prepared beverages should be strengthened in the future.

KEY WORDS: freshly prepared beverage; *Staphylococcus aureus*; antimicrobial resistance; whole genome sequencing

0 引 言

现制饮品是现场制作、销售和直接饮用的非定型包装饮品,主要包括鲜榨果汁和现场调制饮品。现制饮品深受我国消费者喜爱,根据饮品行业协会等发布的调查数据显示,2020 年我国现制饮品市场规模已达到 1100 亿元,消费者规模突破 3.4 亿人,并预计将持续上升^[1-2]。由于现制饮品制作过程多需手工操作,且通常不经过高温灭菌环节而直接饮用,若原料保存不当、现制及零售过程中卫生控制不规范等极易导致致病菌污染,给消费者带来健康风险。

我国相关监管部门对鲜榨果汁及手工调制饮料等现制饮品中微生物污染状况进行调查发现,微生物污染情况不容乐观^[3-4],其中金黄色葡萄球菌是在现制饮品中检出的主要食源性致病菌^[5]。随着抗生素在临床及养殖业中的广泛应用,金黄色葡萄球菌的耐药问题日益严重,特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)及多重耐药(multidrug resistant, MDR)菌的临床感染,极大限制了临床治疗中抗菌药物的选择,从而造成

金黄色葡萄球菌导致的死亡率上升^[6]。因此,现制饮品中金黄色葡萄球菌的耐药情况值得关注。

金黄色葡萄球菌是人类化脓性感染的常见致病菌,可引起皮肤及软组织感染、心内膜炎甚至菌血症、脓毒症等全身性感染^[7],同时又是造成细菌性食物中毒的主要致病菌之一^[8]。金黄色葡萄球菌能产生多种毒力因子如杀白细胞素(panton-valentine leukocidin, PVL)、中毒性休克综合征毒素(toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1)等,对金黄色葡萄球菌的侵袭感染有重要作用^[7]。此外,金黄色葡萄球菌分泌的葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxin, SE)与葡萄球菌食物中毒(staphylococcal food poisoning, SFP)密切相关^[9]。SFP 的临床特征表现为潜伏期短(平均 4.4 h),患者出现恶心、头痛、剧烈呕吐、腹部绞痛和腹泻等急性胃肠炎症状^[9]。目前,已报道的葡萄球菌肠毒素有 25 种(SEA~SEIZ)^[10],其中经典葡萄球菌肠毒素(SEA~SEE),仍是 SFP 事件中最常见的类型^[11],SEA 曾造成了全球最大的一起 SFP 暴发,即日本雪印奶粉事件,最终导致超过 14000 人食物中毒^[12]。

餐饮食品是介导金黄色葡萄球菌在医院、人群及动物

之间传播的重要媒介。作为一种新兴的餐饮食品,现制饮品中金黄色葡萄球菌的耐药及遗传特征研究十分匮乏,相关报道寥寥可数。本研究基于现制饮品中金黄色葡萄球菌的耐药表型和全基因组测序结果,针对其耐药及遗传特征开展研究,补充现制饮品中金黄色葡萄球菌特征数据,为该类食品安全风险监测和评估提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

2020年全国14省及直辖市(安徽、福建、广东、河北、黑龙江、湖北、湖南、江西、辽宁、陕西、上海、四川、浙江、重庆)现制饮品中金黄色葡萄球菌分离株43株。药敏质控菌株为本实验室保藏的金黄色葡萄球菌标准株(ATCC29213)。

1.1.2 主要试剂

脑心浸液琼脂培养基(北京陆桥技术股份有限公司);金黄色葡萄球菌药敏板(上海星佰生物技术有限公司);细菌基因组DNA提取试剂盒(美国Omega公司)。

1.2 仪器与设备

Esco class II BSC生物安全柜(新加坡艺思高科技有限公司);Milli-Q纯水仪(德国默克密理博公司);HVA-85高压蒸汽灭菌锅(日本平山制作所);Incucell隔水式恒温培养箱(德国MMM集团);IKA MS3涡旋仪(德国IKA集团);Sigma1-14小型离心机(德国Sigma公司);MK-10干式加热型恒温器(杭州奥盛仪器有限公司);NanoDrop-2000微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株活化

接种环蘸取菌液,三区划线法接种于脑心浸液琼脂平板上,36°C±1°C培养18~24 h,二次活化即挑取单菌落再次三区划线法接种于脑心浸液琼脂平板上,36°C±1°C培养18~24 h,用于后续试验。

1.3.2 药物敏感性试验

药物敏感性试验使用方法为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^[13]。检测的抗生素共9类10种,具体如下:青霉素(penicillin, PEN)、苯唑西林(oxacillin, OXA)、头孢西丁(cefotaxime, CFX)、四环素(tetracycline, TET)、红霉素(erythromycin, ERY)、克林霉素(clindamycin, CLI)、氯霉素(chloramphenicol, CHL)、庆大霉素(gentamicin, GEN)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)和万古霉素(vancomycin, VAN)。并参照CLSI抗微生物药物敏感性试验执行标准(CLSI M100 ED29—2019)进行结果判读。

1.3.3 基因组DNA提取与全基因组测序

无菌棉签刮取适量新鲜菌泥于1.5 mL离心管中,加入1 mL无菌生理盐水重悬菌体,离心机8000 r/min离心10 min,吸出上清并保留管底菌体,按照细菌基因组DNA提取试剂盒说明书进行后续操作。使用Nanodrop微量分光光度计检测DNA的浓度及质量。经检测合格的基因组DNA委托诺禾致源公司进行细菌全基因组测序(whole genome sequencing, WGS),测序平台为Illumina HiSeq,测序深度200×,序列拼接使用SPAdes v3.11.1^[14]软件完成。

1.3.4 核心基因比对及系统发育分析

细菌基因组DNA组装完成之后,对基因组进行注释,使用的注释工具为Prokka 1.14.5,获得GFF文件后使用Roary v3.11.233^[15]比对核心基因组序列,根据比对结果使用FastTree软件分析进化关系并构建进化树,并使用Figtree软件用于进化树的绘制。

1.3.5 多位点序列分析

菌株的基因组序列在PubMLST金黄色葡萄球菌多位点序列分析(multilocus sequence typing, MLST)平台^[16](<https://pubmlst.org/>)中进行分析,并获得相应的ST型别。

1.3.6 MRSA菌株检测

通过编码PEN结合蛋白2a(PBP2a),*mecA*基因介导金黄色葡萄球菌的甲氧西林耐药,将全基因序列在ResFinder v2.1^[17]数据库中比对,检测*mecA*基因确定MRSA菌株。此外,CLSI^[13]中推荐在药物敏感性试验中,可通过检测OXA和CFX耐药判断MRSA菌株。本研究将结合以上两种方法。

1.3.7 耐药基因检测

将获得的全基因组序列在ResFinder v2.1^[17]数据库中进行耐药基因比对,使用软件为ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>),基因覆盖度和一致性的阈值均设定为大于80%。

1.3.8 肠毒素基因检测

将获得的全基因组序列与(virulence factor database, VFDB)^[18]毒力因子数据库中的毒力基因进行序列比对,软件同上,基因覆盖度和一致性的阈值均设定为大于80%。

2 结果与分析

2.1 现制饮品中金黄色葡萄球菌耐药特征

43株金黄色葡萄球菌对10种抗生素的药物敏感性试验结果显示(图1),共计有38株至少对1种抗生素耐药,只有5株对所有抗生素均敏感,整体耐药率为88.4%,其中,对PEN的耐药率最高,为88.4%(38/47),其次是ERY,耐药率为30.2%(13/43),对TET的耐药率为16.3%(7/43)且存在7.0%(3/43)的中介率,对CLI的耐药率为11.6%(5/43),7株菌(16.3%,7/43)存在ERY诱导的CLI耐药。对CIP、OXA、CFX、GEN、CHL的耐药率均在10%以下,未检测到VAN耐药菌株。

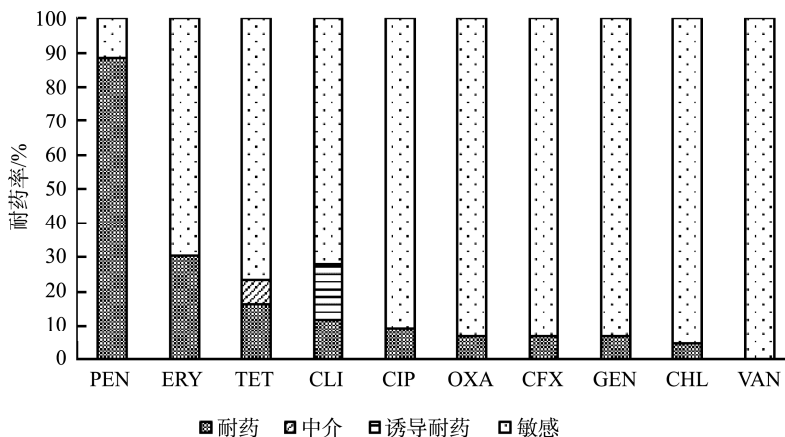


图 1 43 株金黄色葡萄球菌对 10 种抗生素的耐药率

Fig.1 Resistance rate of 43 strains of *S. aureus* isolates to 10 kinds of antibiotics

共检测到 3 株 MRSA, 检出率为 7.0% (3/43), 从含乳现制饮品、水果类现制饮品和其他类现制饮品中各分离到 1 株, 其中 2 株属于 ST398 型, 1 株 ST45 型, MRSA 均未携带肠毒素基因。其中 1 株 ST398 可耐受 7 类(8 种)抗生素, 耐药谱为 PEN-OXA-ERY-CLI-CIP-TET-GEN-CFX(表 1), 样品来源为含乳现制饮品(芋球芋圆芋泥厚奶), 采集地为上海市。

表 1 43 株金黄色葡萄球菌的耐药谱(n=9)
Table 1 Resistance profiles of 43 strains of *S. aureus* (n=9)

编号	耐药谱	耐药种类	菌株数	占比/%
1	PEN-ERY-CLI-CIP-SXT-TET-CHL-GEN	8	2	4.7
2	PEN-OXA-ERY-CLI-CIP-TET-GEN-CFX*	7	1	2.3
3	PEN-ERY-CLI	3	2	4.7
4	PEN-ERY-CIP	3	1	2.3
5	PEN-ERY-TET	3	1	2.3
6	PEN-OXA-CFX*	2	2	4.7
7	PEN-ERY	2	6	14.0
8	PEN-TET	2	3	7.0
9	PEN	1	20	46.5

注: *代表 MRSA 菌株耐药谱。

43 株金黄色葡萄球菌中多重耐药(耐受 3 或 3 类以上抗生素, $R \geq 3$)菌株共有 7 株, 占总菌株数的 16.3% (7/43), 见图 2。其中包含耐受 3 类抗生素的 MDR 菌株 4 株, 耐受 7 类(8 种)抗生素(R7)的 MDR 菌株 1 株和耐受 8 类抗生素(R8)的 MDR 菌株 2 株。2 株 R8 金黄色葡萄球菌的耐药谱相同, 均为 PEN-ERY-CLI-CIP-SXT-TET-CHL-GEN(表 1), 且均属于 ST398 型, 样品来源为黑龙江省同一家冷饮店的含乳饮品(草莓西米露)和鲜榨果汁(冰西瓜汁)。含乳制品的现制饮

品中 MDR 比例最高为 38.5% (5/13), 其次为其他类现制饮品为 11.1% (1/9), 果汁类现制饮品最低为 4.8% (1/21)。

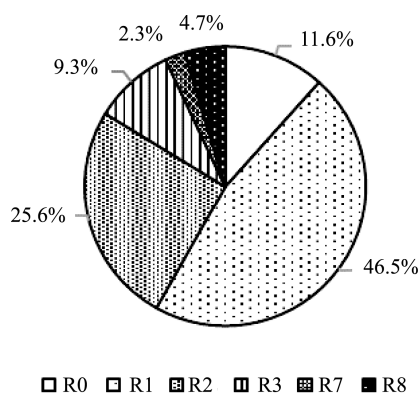


图 2 43 株金黄色葡萄球菌的多重耐药情况

Fig.2 Multidrug resistance of 43 strains of *S. aureus* isolates

根据 Resfinder 耐药基因数据库中的注释结果(图 3), 中介对 OXA、CFX 耐药的 *mecA* 基因携带情况与 MRSA 耐药表型完全对应。PEN 耐药株均携带 *blaZ*、*blaR1* 和 *blaI* 等 PEN 耐药相关基因。TET 中介或耐药株携带 *tet(K)*、*tet(L)* 和 *tet(M)* TET 类耐药基因的其中一种或多种。ERY 及 CLI 耐药株携带大环内酯-林可霉素-链阳性菌素 B (macrolides-lincosamides-streptogramin B, MLS_B)等相关抗生素的耐药基因 *erm(B)*、*erm(C)*、*msr(A)*、*lnu(A)*、*lnu(G)* 和 *vga(A)*, 且携带有 *erm(C)* 基因的菌株均对 ERY 诱导的 CLI 耐药。CHL 耐药株携带氯霉素外排泵相关基因 *fexA*。氨基糖苷类抗生素耐药基因 *aph(3')-IIIa*、*aph(2'')-Ih*、*ant(6)-Ia* 和 *ant(4')-Ia* 的携带情况与耐药表型不完全一致。此外, *sat4*、*fosB-Saur*、*fosD*、*bleO* 等基因与链丝霉素、磷霉素、博来霉素等的耐药有关, 但本研究中未涉及相应药物的耐药试验。

2.2 现制饮品中金黄色葡萄球菌毒力基因携带特征

根据 VFDB 毒力因子数据库中的注释结果, 共检测到 8 种肠毒素基因, 分别为 *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*seh*、*selk*、*sell*、*selq*(图 3), 15 株菌至少携带一种金黄色葡萄球菌肠毒素基因, 阳性率为 34.9% (15/43), 共检测到 6 种肠毒素基因谱。经典肠毒素基因中, *sea* 基因的检出率最高为 23.3% (10/43), 之后依次为 *sec* 9.3% (4/43)、*seb* 4.7% (2/43) 和 *sed* 4.7% (2/43)。3 株菌同时携带 *sea* 和 *sec* 基因。含水果类的现制饮品中分离的金黄色葡萄球菌肠毒素基因携带率最高为 42.9% (9/21), 其次为含乳现制饮品的 30.8% (4/13), MDR 菌株肠毒素基因携带率为 42.9% (3/7)。未检测到 *lukS-PV*、*lukF-PV*、*tsst-1* 等毒力基因。

2.3 现制饮品中金黄色葡萄球菌分子分型及地域分布特征

2.3.1 MLST 分子分型特征

MLST 分型结果显示(图 3), 43 株菌株分属 16 个 ST 型较分散, 按检出率依次为 ST6 18.6% (8/43)、ST15 11.6% (5/43)、ST398 和 ST2114 均为 9.3% (4/43), ST1、ST5、ST7 和 ST1281 均为 7.0% (3/43), ST88 和 ST188 均为 4.7% (2/43), ST59、ST45、ST121、ST950、ST2990 及 ST4562 均为 2.3% (1/43)。其中, ST6 型菌株数最多; ST398 型菌株耐受抗生素种类最多, 其中 3 株可耐受 7 类或以上抗生素的金黄色葡萄球菌均为 ST398 型; ST1 型菌株中携带的肠毒素基因种类最多, 3 株 ST1 菌株均携带 *sea-sec-she-selk-sell-selq*。

全基因组序列进化分析显示, MRSA 菌株全部位于同一个进化分支。多重耐药菌位于 3 个分支。其中一个多重耐药菌所在分支与 MRSA 菌株所在分支重合。

2.3.2 地域分布特征

北方地区(黑龙江、辽宁、河北、陕西)现制饮品中分离的金黄色葡萄球菌株共有 6 种 ST 型, 其中 ST15 占比最高为 33.3% (4/12), 其次 ST6、ST7 和 ST398 均为 16.7% (2/12), 最后 ST5 和 ST121 均占 8.3% (1/12)。多重耐药率为 33.3% (4/12) 多重耐药最严重的为 ST398 型。肠毒素基因携带率为 33.3% (4/12), 携带肠毒素类型为 *sea* 的 3 株、*sed* 的 1 株, 均未携带新型肠毒素基因。携带肠毒素基因的 ST 型为 ST7 (2 株)、ST6 和 ST5 (各 1 株)。

南方地区(广东、福建、江西、四川、重庆、湖北、湖南、浙江、上海、安徽)分离金黄色葡萄球菌株共有 15 种 ST 型, 其中 ST6 占比最高为 19.4% (6/31), 次之为 ST2114 占 12.9% (4/31), 再次为 ST1 和 ST1281 均占 9.7% (3/31), ST5、ST88、ST188、ST398 均占 6.5% (2/31), ST7、ST15、ST45、ST59、ST950、ST2990、ST4562 最少为 3.2% (1/31)。多重耐药率为 9.7% (3/31), 多重耐药最严重菌株也属于 ST398 型, 且本研究中所有的 3 株 MRSA 均来自南方地区(鄂、赣、沪)。肠毒素基因携带率为 35.5% (11/31), 携带肠毒素类型为 *sea* 的 4 株、*sea-sec-she-selk-sell-selq* 的 3

株、*seb* 的 1 株、*seb-selk-selq* 的 1 株、*sec-sell* 的 1 株、*sed* 的 1 株。携带肠毒素基因的 ST 型依次为 ST1 (3 株), ST6 和 ST88 (各 2 株), ST5、ST59、ST188 和 ST2990 (各 1 株)。

3 讨论与结论

近年来, 随着健康理念的深入, 现制饮品作为一种新型健康饮品的代表, 越来越受消费者的青睐。现制饮品因其丰富的品类和口感, 常加入新鲜水果、蔬菜、鲜奶、豆奶、茶叶等多种原材料, 这也导致了污染来源的多样性, 同时由于其特有的现制即食以及非高温处理的特点, 增加了该类食品中食源性致病菌的污染风险。

与其他食品类别相比, 现制饮品中金黄色葡萄球菌的耐药特征有所不同: (1) 对不同抗生素的耐药率不同。本研究中金黄色葡萄球菌对 PEN 耐药率为 88.4%, 略低于白瑶等^[19]报道的鲜切果蔬中金黄色葡萄球菌对 PEN 的耐药率 90%, 略高于巴氏乳中金黄色葡萄球菌 PEN 的耐药率 83.3% 和零售肉及肉制品的 84.6%^[20-21]。43 株金黄色葡萄球菌对 ERY 的耐药率仅次于 PEN 为 30.2%, 略高于鲜切果蔬中 ERY 耐药率 22%, 略低于巴氏奶中的 50% 和零售肉及肉制品的 52.7%^[19-21], 此外, 对 TET、CLI、CIP 等的耐药率则低于巴氏奶及零售肉及肉制品中金黄色葡萄球菌株耐药率^[20-21]。(2) 现制饮品中金黄色葡萄球菌多重耐药率较低。本研究中金黄色葡萄球菌的多重耐药率为 16.3% (7/43), 与文献^[19]报道鲜切果蔬中金黄色葡萄球菌多重耐药率(20%)较为接近, 而远低于巴氏奶中的 75%^[20], 可能因为现制饮品的食品原料来源较为多样, 导致金黄色葡萄球菌污染来源的多样化, 总体耐药率被平均。

本研究中, 含乳现制饮品来源的金黄色葡萄球菌的多重耐药情况更为严重, 多重耐药率为 38.5% (5/13), 高于整体水平 16.3% (7/43)。本研究现制饮品多重耐药金黄色葡萄球菌中存在 3 株耐受 7 类以上抗生素($R \geq 7$), 且均属于 ST398 型, 2 株菌(R7 和 R8 各 1 株)的样品来源为含乳现制饮品(草莓西米露和球芋圆芋泥厚奶), 1 株 R8 金黄色葡萄球菌的样品来源为冰西瓜汁, 与前述含乳现制饮品草莓西米露均来自同一家店铺, 且采样时间接近, 经全基因组分析 2 株 R8 亲缘关系高度接近, 可能是同一菌株在不同产品间交叉污染所致。ST398 型金黄色葡萄球菌是广泛流行于欧洲、北美洲以及亚洲养殖家畜中的主要 ST 型^[22-24], 其高耐药性可能来自家畜养殖中大量使用抗生素的环境选择压力。综上所述, 现制饮品中多重耐药菌株的主要来源可能为现制饮品中的牛奶或含乳原料, 因此应加强含乳制品中金黄色葡萄球菌的耐药监测与防控。

sea 基因编码的葡萄球菌肠毒素蛋白 SEA 被认为是全球葡萄球菌食物中毒中最常见的肠毒素, 现制饮品分离的金黄色葡萄球菌中 *sea* 的检出率为 23.3%, 与文献中报道

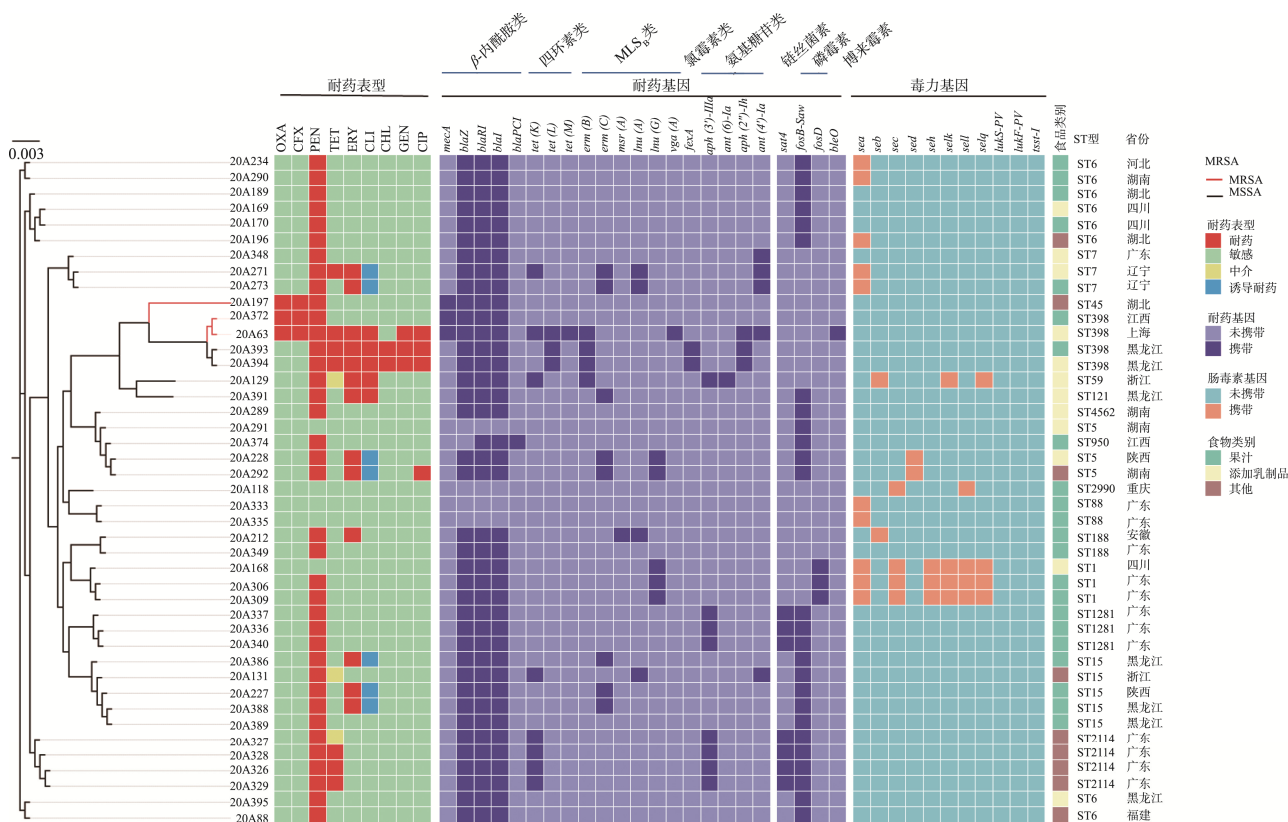


图 3 43 株金黄色葡萄球菌耐药表型、耐药基因及肠毒素基因等遗传特征
 Fig.3 Antimicrobial resistance phenotype and genotype characterization of 43 strains of *S. aureus* isolates

一致^[11,25]。此外,金黄色葡萄球菌的 ST 型与肠毒素的毒力基因谱之间存在关联,本研究中携带肠毒素毒力基因谱 *sea-sec-seh-selk-sell-selq* 的金黄色葡萄球菌均为 ST1 型,而 *sed* 基因阳性菌株均属于 ST5 型。本研究发现 MRSA 菌株均不携带毒力基因,而多重耐药株肠毒素基因携带率较高。虽然 MRSA 菌株致病性相对较弱,然而 MDR 菌株肠毒素基因的高携带率提示耐药金黄色葡萄球菌的潜在危害不容忽视。ST6 和 ST59 是引起我国 SFP 疫情的常见 MLST 型别^[26-30]。本研究中 ST6 是占比最高的 ST 型,且 37.5% (3/8) 的 ST6 型菌株含有 *sea* 基因,检测到 1 株 ST59 携带毒力基因 *seb-selk-selq*,因此现制饮品中的 SFP 风险需要引起高度重视,并加强监管以保障消费者食品安全。

现制饮品中金黄色葡萄球菌地域分布与耐药、致病相关性分析表明,现制饮品中分离的金黄色葡萄球菌在南方和北方流行的主要 ST 型不同,分别为 ST6 和 ST15。北方分离株的多重耐药情况更为严重,而南方分离株的 MRSA 更为集中。南北方分离株的肠毒素基因携带率比较接近且均以 *sea* 为主。北方分离株中仅检测到 2 种肠毒素基因 *sea* 和 *sed*,而南方分离株所携带的肠毒素基因种类更为丰富,不仅检测出 *sea-sed* 4 种经典肠毒素基因,还检测到 *seh*、*selk*、*sell* 和 *selq* 4 种新型肠毒素基因。其中,新型肠毒素中的 *seh* 基因编码的 SEH 型肠毒素已被明确证实与食物中

毒相关^[6],而 *selk*、*sell* 和 *selq* 编码的产物尚未被证实具有致吐功能。同一株金黄色葡萄球菌中,多种 *sel* 基因冗余共存的原因值得进一步关注,可能与 *sel* 基因的持续进化有一定关系^[11]。

综上,通过对 2020 年我国 14 个省(直辖市/自治区)现制饮品中分离的 43 株金黄色葡萄球菌的耐药特征进行研究,为我国现制饮品中金黄色葡萄球菌的耐药监测及致病风险评估提供了数据支撑,提示应加强现制饮品中金黄色葡萄球菌的耐药监测与防控。

参考文献

[1] 李荣. 二〇二〇年现制饮品市场发展迅速[N]. 中国食品报, 2021-7-5(4).
 LI R. The market of fresh-made beverages developed rapidly in 2020 [N]. China Food Newspaper, 2021-7-5(4).
 [2] 第一财经商业数据中心(CBNDData), 奈雪的茶.“数字化进阶”—2020 新式茶饮白皮书[Z]. 2020. <https://www.cbndata.com/report/2486/detail?isReading=report&page=1>.
 CBNDData, Naixue's tea. "Digital advancement"-white paper of new tea beverages in 2020 [Z]. 2020. <https://www.cbndata.com/report/2486/detail?isReading=report&page=1>.
 [3] 许秋贝. 厦门市现制和自制饮品卫生状况调查与分析[J]. 食品安全导刊, 2021, (29): 117-118, 120.
 XU QB. Investigation and analysis on the hygienic status of freshly prepared beverages in Xiamen [J]. Chin Food Saf Magaz, 2021, (29): 117-118, 120.

- [4] 刘洋, 王雪涵. 鲜榨果汁及手工调制饮料微生物检测分析[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(4): 97-101.
LIU Y, WANG XH. Analysis of detection results of microbial contamination in handmade beverages and fresh squeezed juice [J]. Food Ferment Technol, 2018, 54(4): 97-101.
- [5] 袁瑞, 付云, 宋臻鹏, 等. 湖州市餐饮业现榨果汁微生物污染状况评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(21): 2659-2662.
YUAN R, FU Y, SONG ZP, et al. A survey on microbial contamination of freshly prepared fruit juice in catering in Huzhou [J]. Chin J Health Lab Technol, 2020, 30(21): 2659-2662.
- [6] CHAMBERS HF, DELEO FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 7(9): 629-641.
- [7] CHEUNG GYC, BAE JS, OTTO M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus* [J]. Virulence, 2021, 12(1): 547-569.
- [8] KADARIVA J, SMITH TC, THAPALIYA D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 827965.
- [9] HU DL, NAKANE A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 722: 95-107.
- [10] ETTER D, SCHELIN J, SCHUPPLER M, et al. Staphylococcal enterotoxin C-An update on SEC variants, their structure and properties, and their role in foodborne intoxications [J]. Toxins (Basel), 2020, 12(9): 584.
- [11] ARGUDIN MÁ, MENDOZA MC, RODICIO MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins [J]. Toxins (Basel), 2010, 2: 1751-1773.
- [12] HENNEKINNE JA, DE BML, DRAGACCI S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation [J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36: 815-836.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antimicrobial disk and dilution susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline [Z]. 2019.
- [14] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing [J]. J Comput Biol, 2012, 19(5): 455-477.
- [15] PAGE AJ, CUMMINS CA, HUNT M, et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis [J]. Bioinformatics, 2015, 31(22): 3691-3693.
- [16] JOLLEY K, BRAY J, MAIDEN M. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [J]. Wellcome Open Res, 2018, 3: 124.
- [17] ZANKARI E, HASMAN H, COSENTINO S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(11): 2640-2644.
- [18] LIU B, ZHENG D, JIN Q, et al. VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47: 687-692.
- [19] 白瑶, 马金晶, 黄敏毅, 等. 北京五城区零售鲜切果蔬中重要食源性致病菌污染与耐药性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(6): 692-697.
BAI Y, MA JJ, HUANG MY, et al. Study on contamination and drug resistance of important foodborne pathogens in fresh cut fruits and vegetables retailed in five districts of Beijing [J]. Chin J Food Hyg, 2021, 33(6): 692-697.
- [20] DAI JS, WU S, HUANG JH, et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from pasteurized milk in China [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 641.
- [21] WU S, HUANG J, ZHANG J, et al. *Staphylococcus aureus* isolated from retail meat and meat products in China: Incidence, antibiotic resistance and genetic diversity [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2767.
- [22] SMITH TC, PEARSON N. The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398 [J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2011, 11(4): 327-339.
- [23] CUI MQ, LI JY, ALI T, et al. Emergence of livestock-associated MRSA ST398 from bulk tank milk, China [J]. J Antimicrob Chemother, 2020, 75(12): 3471-3474.
- [24] BOUCHAMI O, FRAQUEZA MJ, FARIA NA, et al. Evidence for the dissemination to humans of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 through the pork production chain: A study in a portuguese slaughterhouse [J]. Microorganisms, 2020, 8(12): 1892.
- [25] 王琦, 郝民, 王恒伟, 等. 2009—2020年北京市朝阳区113株食源性金黄色葡萄球菌耐甲氧西林和肠毒素/类肠毒素基因携带与分子分型分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(5): 1670-1677.
WANG Q, HAO M, WANG HW, et al. Diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and enterotoxins/enterotoxin-like and molecular typing of 113 strains *Staphylococcus aureus* from foodborne in Chaoyang district of Beijing from 2009 to 2020 [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(5): 1670-1677.
- [26] 李光辉, 郭卫芸, 高雪丽, 等. 2003-2015年金黄色葡萄球菌食物中毒事件特征分析[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(6): 200-203.
LI GH, GUO WY, GAO XL, et al. Epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* food poisoning events in China during 2003-2015 [J]. Food Res Dev, 2018, 39(6): 200-203.
- [27] CHEN Q, XIE SM. Genotypes, enterotoxin gene profiles, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* associated with foodborne outbreaks in Hangzhou, China [J]. Toxins (Basel), 2019, 11(6): 307.
- [28] YAN XM, WANG B, TAO XX, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(18): 6637-6642.
- [29] LV GP, JIANG RP, ZHANG H, et al. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* from food samples and food poisoning outbreaks in Shijiazhuang, China [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 652276.
- [30] ZHANG PF, MIAO X, ZHOU LH, et al. Characterization of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* from food poisoning outbreaks and retail foods in China [J]. Foodborne Pathog Dis, 2020, 17(11): 728-734.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



李辉, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: lihui@cfsa.net.cn



包轶伦, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物学。

E-mail: yilunbao2@gmail.com



闫韶飞, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: yanshaofei@cfsa.net.cn