

实验技术与方法

不同检样量下生食蔬菜沙门菌检测方法比对研究及应用

王学硕, 窦越, 刘娜, 瞿洪仁, 李景云, 崔生辉
(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要:目的 研究验证大检样量(500 g)生食蔬菜中沙门菌的高灵敏度检测方法, 分析北京市售生食蔬菜中沙门菌的多重特征。方法 分析不同检样量对生菜和香菜中沙门菌染菌回收的影响, 比较25 g和500 g检样量下北京市售样品中沙门菌的分离效果差异。测定沙门菌分离株对16种抗生素的敏感性, 并结合全基因组测序分析菌株血清型和耐药基因。结果 检样量增加能够有效降低每克蔬菜样品中沙门菌的最低染菌检出浓度(0.002 6 CFU/g), 且检出限可达到 10^0 CFU/500 g。对北京市售样品的检测结果显示, 500 g检样量的沙门菌检出率(8.1%)较25 g检样量的检出率(0.5%)显著提升($P < 0.05$)。生食蔬菜中沙门菌的污染分布存在区域与业态差异($P < 0.05$): 郊区(11.2%)高于城区(3.5%), 菜市场(11.4%)和露天市场(8.8%)高于超市(6.1%)与果蔬店(0%)。分离的18株沙门菌鉴定为12种血清型, 优势血清型S. Alachua为我国首次报告食品来源分离株。耐药分析显示, 33.3%的菌株对抗生素耐药, 22.2%为多重耐药株; 共检出20种耐药基因, 包含 β -内酰胺酶及喹诺酮类耐药基因。结论 针对生食蔬菜中的低水平沙门菌污染, 将检样量提升至500 g可有效解决漏检难题, 显著提高沙门菌检出率, 为高灵敏度筛查提供可靠解决方案。自北京地区生食蔬菜分离的沙门菌兼具血清型多样性和多重耐药性。

关键词: 生食蔬菜; 检样量; 沙门菌; 耐药性; 全基因组测序

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2025)09-0828-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2025.09.005

A comparative study and application of *Salmonella* detection methods for raw vegetables under different sample sizes

WANG Xueshuo, DOU Yue, LIU Na, QU Hongren, LI Jingyun, CUI Shenghui
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To develop and validate a high-sensitivity detection method for *Salmonella* in raw vegetables using a large sample size (500 g), and to characterize the isolates from retail raw vegetables in Beijing. **Methods** The effect of different sample sizes on *Salmonella* recovery from artificially contaminated lettuce and coriander was analyzed, and the isolation efficiency from retail samples in Beijing was compared between 25 g and 500 g sample sizes. The antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates to 16 antibiotics was tested, and serotypes and resistance genes were analyzed by whole genome sequencing (WGS). **Results** Increasing the sample size improved detection sensitivity (0.002 6 CFU/g) in raw vegetables, and achieving a limit of detection of 10^0 CFU/500 g. Testing of retail samples in Beijing demonstrated that the method using 500 g sample significantly increased the *Salmonella* detection rate (8.1%) compared to the standard method using 25 g sample (0.5%) ($P < 0.05$). The contamination distribution of *Salmonella* in raw vegetables exhibited significant regional and retail-type variations ($P < 0.05$), higher in suburban areas (11.2%) than in urban areas (3.5%), and higher in grocery (11.4%) and open markets (8.8%) than in supermarkets (6.1%) and greengrocers (0%). Among the 18 *Salmonella* isolates, 12 serotypes were identified. S. Alachua, the major serotype, represents the first food-borne isolate of this serotype reported in China. Overall, 33.3% of isolates were resistant to at least one antibiotic, and 22.2% were multidrug-resistant. WGS identified 20 resistance genes, including β -lactamase and quinolone resistance genes. **Conclusion** Increasing the sample size to 500 g overcomes the challenge of missing low-level *Salmonella* contamination

收稿日期: 2025-06-10

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFC2303900)

作者简介: 王学硕 女 助理研究员 研究方向为食品安全与微生物检验 E-mail: wangxs@nifdc.org.cn

通信作者: 崔生辉 男 研究员 研究方向为食品安全检测 E-mail: cuishenghui@aliyun.com

李景云 男 主任技师 研究方向为食品药品微生物检验 E-mail: Lijy@nifdc.org.cn

崔生辉和李景云为共同通信作者

in raw vegetables, significantly enhancing the detection rate and providing the high-sensitivity screening strategy. *Salmonella* isolates from raw vegetables in Beijing exhibited serotype diversity and multidrug resistance.

Key words: Raw vegetables; sample sizes; *Salmonella*; drug resistance; whole genome sequencing

近年来,源于健康饮食理念的普及和消费者对营养保留的追求,可生食蔬菜消费量不断增长,其引发的食源性疾病在全球范围内亦呈上升趋势^[1-2]。沙门菌作为果蔬污染的主要病原体之一^[3],可通过生物膜定植于植物表皮甚至侵入组织内部^[4-5],消费者购买后仅靠简单清洗难以彻底消除污染。由于生食蔬菜多经鲜切、凉拌等非热加工方式食用,使其成为仅次于肉类的沙门菌重要传播媒介,带来了巨大的健康风险和经济负担^[6-8]。全球数据显示,1980—2016年,即食农产品在全球范围内引发了571起食源性疾病暴发事件,其中绿叶菜占50%^[9]。1998—2021年,美国74.7%的食源性疾病暴发由沙门菌引起,其中17.9%与新鲜蔬菜相关^[10]。我国相关的报道较少,但也已将果蔬-沙门菌列为需要优先控制的食物-危害组合,急需开展系统性的研究。

由于新鲜蔬菜中沙门菌的污染浓度很低(<1 MPN/g)^[11],且存在污染分布不均、背景菌复杂等问题影响分离效率^[12-13]。参照《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)针对25 g样本进行检测,检出率很低,难以体现新鲜蔬菜中沙门菌的真实污染水平^[14-15]。一项全球荟萃分析显示,叶类蔬菜中沙门菌的检出率仅为0.2%^[3],而根据国内外相关暴发事件数据推断,新鲜蔬菜中沙门菌的污染水平应远超出此^[9-10,16-18]。针对此问题,参考美国农业部对生牛肉中产志贺毒素大肠杆菌的检测方案^[19],通过增大检样量,可有效提升低浓度致病菌的检出率。目前,我国对沙门菌的研究主要集中于动物源性食品,生食蔬菜中沙门菌的污染研究很少,缺乏生食蔬菜来源沙门菌的血清型、耐药基因分布等遗传特征数据^[11],制约了针对性防控策略的制定。

本研究拟针对500 g检样量建立大样本量生食蔬菜中沙门菌的分离方法,并在北京地区采集市售生食蔬菜进行沙门菌检测应用验证。同时,结合抗生素敏感性实验和全基因组测序分析,对分离菌株的血清型、耐药性及基因特征进行深入分析,为生食蔬菜的沙门菌污染风险评估提供可靠的方法和科学数据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

鼠伤寒沙门菌 CMCC50920 和大肠杆菌 ATCC

25922 自中国医学细菌保藏管理中心(CMCC)获取。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要培养基与试剂

缓冲蛋白胨水(北京陆桥技术有限责任公司),四硫磺酸钠煌绿增菌液(TTB,北京陆桥技术有限责任公司);RV 增菌液(Rappaport-Vassiliadis,美国 BD 公司);XLT4 琼脂培养基(美国 BD 公司),Swarm 琼脂(美国 BD 公司);沙门氏菌显色培养基(广东环凯微生物科技有限公司);TSA 琼脂培养基(美国 BD 公司);葡萄糖(国药集团);沙门氏菌凝集诊断血清(泰国 S&A Reagents Lab 公司);革兰氏阴性杆菌鉴定卡(法国生物梅里埃公司);DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen 公司),氯化钠注射液(国药集团),Qubit dsBR Assay kit(美国 Thermo 公司)。

1.2.2 仪器

205050GC 恒温培养箱(美国 Thermo 公司);MIR262 恒温培养箱(日本 Sanyo 公司);EDDY JET/FLASH AND GO 全自动微生物平皿螺旋加样系统(西班牙 IUL 公司);ME204 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);VITEK[®] 2 Compact 全自动微生物分析系统(法国梅里埃公司);Qubit 1.0 荧光计(美国 Thermo 公司);基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)(Bruker 公司)。

1.2.3 软件

Bionumerics8.1 软件(比利时 AppliedMaths 公司),Ridom SeqSphere9.0.10 软件(德国 Ridom 公司)。

1.3 方法

1.3.1 方法评价用菌种样品制备

为确保样品染菌浓度的一致性,制备定量冻干沙门菌用于样品染菌处理。用无菌棉签取鼠伤寒沙门菌 CMCC50920 的 TSA 平板新鲜二代培养物,加入无菌生理盐水中,制备 1.5~2.0 麦氏浊度的菌悬液。冻干时,按 1:1 000 比例加入无菌 5% 蔗糖-5% 脱脂乳粉中,100 μ L/瓶分装西林瓶后真空冷冻干燥 22~24 h。取 10 个冻干样品,各加入 1 mL 无菌生理盐水复溶并涡旋混匀,取 50 μ L 螺旋涂布于 TSA 平板,36 $^{\circ}$ C 过夜培养并计数,确定冻干样品含菌量和均匀性,冻干菌种样品于 -20 $^{\circ}$ C 保存^[20]。

1.3.2 蔬菜样品检样量对沙门菌检出率的影响分析

分别称取 25、200、325 和 500 g 的新鲜生菜或

香菜样品,置于无菌均质袋中。取冷冻干燥的沙门菌标准菌株,复溶后进行梯度稀释,制备浓度为 10^1 CFU/mL和 10^0 CFU/mL的菌悬液。用加样器分别取1 mL上述菌悬液分散点在不同质量的蔬菜样品表面,使每个样品的接种量分别为 10^0 CFU($n=3$)和 10^1 CFU($n=3$)。另取相同质量的蔬菜样品作为阴性对照($n=3$)。向装有蔬菜样品的无菌均质袋中加入1 000 mL无菌缓冲蛋白胨水。用无菌手套轻柔揉搓均质袋1 min,确保液体与样品充分接触。随后,将均质袋置于拍打式均质器中,以600次/min的速度拍打1 min。使用1 mol/L NaOH或1 mol/L HCl溶液调节均质袋内混合液的pH值至 6.8 ± 0.2 。将均质袋置于 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养16~18 h。将预增菌后的液体充分混匀,分别取1 mL和0.1 mL菌液接种至10 mL TTB和RV培养基中,于 $(42\pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养22~24 h。将TTB和RV培养后的菌液充分混匀,分别取适量菌液划线接种于XLT4琼脂平板和沙门氏菌显色平板上。将平板置于 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养18~24 h。挑选XLT4琼脂平板和沙门菌显色平板上的可疑菌落进行MALDI-TOF-MS鉴定,并将鉴定为沙门菌的菌落划线接种于TSA平板纯化培养,并使用全自动生化鉴定系统进行确证^[20]。

1.3.3 市售生食蔬菜中沙门菌的检验

2022年5~10月,在北京市城区和郊区开展采样。采样地点为居民主要购买场所,包括超市、果蔬专卖店、菜市场以及露天市场(露天农贸市场、集市、地摊)等,每个采样点采集香菜和不同品种生菜样品不超过3份,每个场所采集样品总数不超过6份。用无菌采样工具在不同部位现场采集样品不少于1 kg,于2 h内送回实验室。参照1.3.2方法,自每份样品中分别取500 g和25 g蔬菜进行沙门菌的检验。

1.3.4 抗生素敏感性实验

参照美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的微量肉汤稀释法,利用革兰氏阴性需氧菌药敏板对沙门菌分离株进行了9类16种抗菌药物的最低抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)测定,包括氨苄西林(Ampicillin, AMP)、氨苄西林/舒巴坦(Ampicillin-Sulbactam, AMS)、头孢他啶(Ceftazidime, CAZ)、头孢唑啉(Cefazolin, CFZ)、头孢西丁(Cefoxitin, FOX)、头孢噻肟(Cefotaxime, CTX)、亚胺培南(Imipenem, Imp)、四环素(Tetracycline, Tet)、萘啶酸(Nalidixic Acid, Nal)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、氯霉素(Chloramphenicol, CHI)、庆大霉素(Gentamicin, GEN)、

复方新诺明(Trimethoprim-Sulfamethoxazole, SXT)、多黏菌素E(Polymyxine, PE)、阿奇霉素(Azithromycin, AZM)和链霉素(Streptomycin, STR)。测试方法参照产品说明书,质控菌株为大肠埃希菌ATCC 25922,以CLSI M100-S32进行质控和药敏结果的判读。

1.3.5 分离菌株全基因组测序分析

经质谱确认的沙门菌分离株接种于TSB, $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养18~24 h,使用DNeasy Blood & Tissue Kit试剂盒提取基因组DNA,并使用Qubit 1.0荧光计进行定量,随后送至北京诺禾致源科技有限公司进行文库构建,使用Illumina NovaSeq 5000平台进行全基因组测序,下机数据经过预处理后使用SOAPdenovo(version 2.04)、SPAdes(version 3.10.0)和Abyss(version 1.3.7)软件进行组装,生成scaffold^[21-23],然后使用CISA(version 1.3)软件进行整合^[24],再利用Gapclose软件(version 1.12)优化配对得到最终组装后结果^[25]。使用基因组流行病学中心(CGЕ)网站(<https://www.genomicpidemiology.org>)对组装的contig进行分析,即通过在线工具ResFinder 4.6.0、SeqSero 1.2分别预测各菌株的耐药基因和血清型;使用Ridom SeqSphere软件中Salmonella cgMLST v1.0和Salmonella MLST Warwick v1.0的默认设置构建最小生成树(MST)^[20]。

1.3.6 统计学分析

采用SPSS软件进行数据的统计分析,计数结果用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蔬菜检样量对沙门菌染菌回收的影响

经螺旋涂布计数,冷冻干燥后鼠伤寒沙门菌CMCC50920的浓度为 $(1.3\pm 0.08)\times 10^5$ CFU/瓶($n=10$),该批次冷冻干燥样品的变异系数为6.2%,可用于生菜和香菜样品染菌。当沙门菌染菌浓度为13 CFU/样品时,在25、200、325和500 g染菌样本中,按方法1.3.2检验,分离平板上均检出了沙门菌;当沙门菌染菌浓度为1.3 CFU/样品时,除两份500 g香菜和1份25 g生菜样品外,其余染菌样品也均检出沙门菌(表1)。未添加沙门菌的蔬菜样品中均未检出沙门菌。上述检出的沙门菌经血清凝集试验确认,分离株均为鼠伤寒沙门菌,与染菌血清型一致。上述结果可见,当检样量增加至500 g时,方法对沙门菌的检出限仍可稳定在 10^0 CFU/样品,并将每克样品中沙门菌的最低可检出浓度降至0.002 6 CFU/g,有效提升了对样品中极低水平沙门菌污染的检测能力。

表1 检样量对生菜和香菜沙门菌染菌回收的影响

Table 1 Effect of sample sizes on *Salmonella* recovery from

lettuce and coriander

每样品染菌浓度/ (CFU/样品)	检样量/g	每克样品染菌浓度/ (CFU/g)	阳性样品数/ 总染菌样品数	
			生菜	香菜
13	25	0.52	3/3	3/3
	200	0.065	3/3	3/3
	325	0.04	3/3	3/3
	500	0.026	3/3	3/3
1.3	25	0.052	2/3	3/3
	200	0.006 5	3/3	3/3
	325	0.004	3/3	3/3
	500	0.002 6	3/3	1/3

2.2 市售生菜和香菜样品中沙门菌的污染分析

自28家菜市场、18家果蔬专卖店、15家超市和10个露天市场共计采集210份蔬菜样品,其中生菜157份,香菜53份。当蔬菜检样量为500g时,从11份生菜样品(11/157,7.0%)和6份香菜样品(6/53,11.3%)中检出沙门菌;当检样量为25g时,仅1份生菜样品(1/210,0.5%)中检出沙门菌,该份生菜样品在500g检样量水平也同时检出沙门菌。生菜和香菜(500g)中沙门菌的检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.927, P>0.05$),不同检样量蔬菜样品中沙门菌的检出率存在显著性差异($\chi^2=14.859, P<0.05$)。

表2 检样量对生菜和香菜中沙门菌检出影响分析

Table 2 Effect of sample size on *Salmonella* detection in

lettuce and coriander

品种	样品数	25g检样量	500g检样量
生菜	157	1(0.6%)	11(7.0%)
香菜	53	0(0%)	6(11.3%)
合计	210	1(0.5%)	17(8.1%)

对采样区域和业态的分析显示,郊区来源蔬菜样品中的沙门菌检出率(11.2%,14/125)显著高于城区(3.5%,3/85)($\chi^2=4.001, P<0.05$);菜市场来源蔬菜样品中的沙门菌检出率最高(11.4%,12/105),其次为露天市场(8.8%,3/34)、超市(6.1%,2/33),果蔬专卖店来源的38份样品中均未检出沙门菌。不同业态来源蔬菜样品中沙门菌检出率差异有统计学意义($\chi^2=8.044, P<0.05$)。

2.3 抗生素敏感性测试结果

由表4可见,分离的18株沙门菌中有6株(33.3%)对至少1种抗生素耐药。其中,对氨苄西林的耐药率最高(27.8%,5/18),对头孢唑啉、复方新诺明、四环素、链霉素和氯霉素的耐药率均为22.2%(4/18),对氨苄西林/舒巴坦的耐药率为16.7%(3/18),对萘啶酸的耐药率为11.1%(2/18),1株菌对头孢他啶和头孢噻肟同时耐药。此外,蔬菜分离

表3 北京市不同区域和业态生菜和香菜中沙门菌检出情况分析

Table 3 Prevalence of *Salmonella* in lettuce and coriander

from different regions and retail formats in Beijing

样品来源	阳性样品数/样品总数(检出率)			
	生菜	香菜	合计	
区域	城区	3/74(4.1%)	0/11(0%)	3/85(3.5%)
	郊区	8/83(9.6%)	6/42(14.3%)	14/125(11.2%)
	菜市场	9/87(10.3%)	3/18(16.7%)	12/105(11.4%)
业态	露天市场	1/10(10.0%)	2/24(8.3%)	3/34(8.8%)
	超市	1/29(3.5%)	1/4(25.0%)	2/33(6.1%)
	果蔬专卖店	0/31(0%)	0/7(0%)	0/38(0%)

沙门菌对环丙沙星的中介率较高,为33.3%(6/18)。18株沙门菌共有4种耐药谱,占比最高的为AMP-AMS-TET-CHL-CFZ-SXT-STR(16.7,3/18),其中4株菌(22.2%)对3类以上抗生素耐药,为多重耐药菌株(图1)。

2.4 分离菌株遗传特征分析

对全基因组测序数据分析后发现,18株沙门菌可分为12种血清型和12种MLST型(图1),血清型与MLST分型结果高度匹配。其中多见的血清型为S. Alachua(16.7%,3/18)、S. Rissen(16.7%,3/18)、S. Infantis(11.1%,2/18)和S. Mbandaka(11.1%,2/18)。cgMLST分析显示,相同血清型的各菌株差异位点数均为0,呈现高度同源性。在18株沙门菌中,共计检出20种抗生素耐药基因,其中S. Rissen(n=3)和S. Indiana(n=1)分离株携带了8类以上耐药基因,包括典型的质粒介导喹诺酮类耐药基因(*qnrS1*、*qnrVC4*)、喹诺酮耐药决定区基因突变(*gyrA* Asp87Tyr、*gyrA* Asp87Asn和*parC* Thr57Ser)、 β -内酰胺类耐药基因(*bla*_{OXA-10}、*bla*_{VEB-1})、氨基糖苷类耐药基因(*aac*(6')-*Iaa*、*aadA1*、*aadA2*、*ant*(2'')-*Ia*、*ant*(3'')-*Ia*)、酰胺醇类耐药基因(*cmlA1*、*floR*)、磺胺类耐药基因(*sul2*、*sul3*)、甲氧苄啶类耐药基因(*dfrA12*、*dfrA14*)、四环素类耐药基因[*tet*(A)、*tet*(M)]以及利福酶类耐药基因(*arr-2*)(图1)。

3 讨论

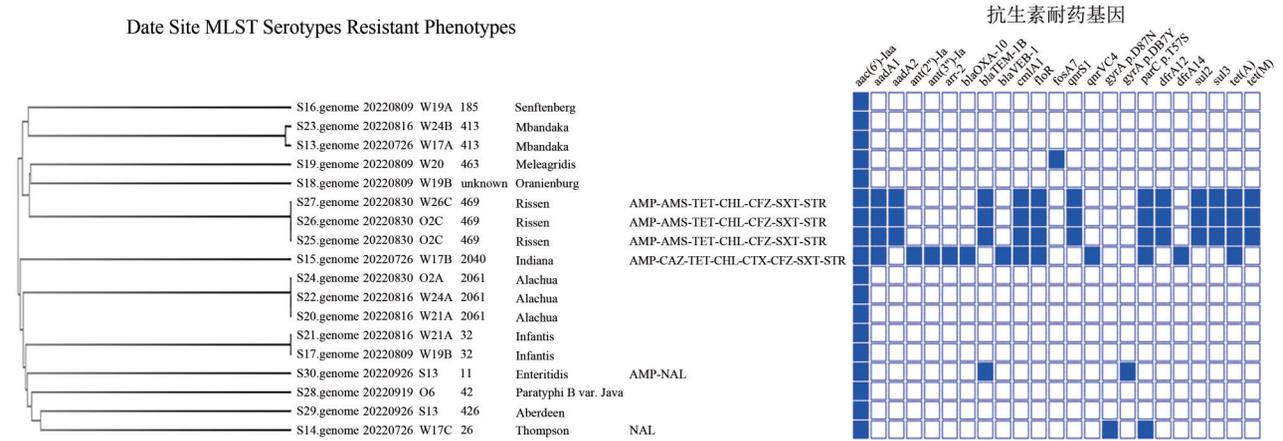
本研究针对生菜和香菜样品,探索了检样量对沙门菌染菌检出率的影响,结果显示,大检样量方法的沙门菌检出限仍可达到10⁰CFU/样品,并将每克样品中沙门菌的最低可检出浓度降至0.0026CFU/g,有效提升了对样品中极低水平沙门菌污染的检测能力。对北京市售生菜和香菜进行采样检测发现,相较于国标方法25g检样量(检出率0.5%),500g检样量可显著提升样本中沙门菌的检出率(8.1%, $P<0.05$)。这些结果提示,对于沙门菌污染水平极低的生菜和香菜样品,通过增大检样量方式,可大

表4 生菜和香菜分离沙门菌的耐药情况

Table 4 Drug resistance of *Salmonella* isolates from lettuce and coriander

抗生素类别	抗生素名称	英文缩写	菌株数(占比/%)		
			敏感(S)	中介(I)	耐药(R)
β-内酰胺酶类	氨苄西林	AMP	13(72.2)	0(0)	5(27.8)
	氨苄西林/舒巴坦	AMS	10(55.6)	2(11.1)	3(16.7)
	头孢他啶	CAZ	17(94.4)	0(0)	1(5.6)
	头孢唑啉	CFZ	13(72.2)	1(5.6)	4(22.2)
	头孢噻肟	CTX	17(94.4)	0(0)	1(5.6)
喹诺酮类	环丙沙星	CIP	12(66.7)	6(33.3)	0(0)
叶酸代谢途径抑制剂	萘啶酸	NAL	16(88.9)	0(0)	2(11.1)
四环素类	复方新诺明	SXT	14(77.8)	0(0)	4(22.2)
氨基糖苷类	链霉素	STR	14(77.8)	0(0)	4(22.2)
苯酚类	氯霉素	CHL	14(77.8)	0(0)	4(22.2)

注:上述菌株对头孢西丁、阿奇霉素、庆大霉素、亚胺培南和多黏菌素E均敏感



注:菜市场(Wet Market, W),露天市场(Open Market, O),超市(Supermarket, S); A、B、C代表在同一采样场所的不同摊位编号

图1 18株生菜和香菜分离沙门菌的特征分析

Figure 1 Multiple characteristics of 18 *Salmonella* isolates from lettuce and coriander

幅提升沙门菌的检出率,进而高效获得更为准确的沙门菌污染数据,为生菜和香菜沙门菌污染风险评估提供实验数据支撑。

本研究过程中采用了同批次即用型定量冻干沙门菌进行样品染菌处理,客观上保证了研究过程中不同时间点、不同样品染菌浓度的一致性,同时也提高了实验效率。另外,细菌在冷冻干燥过程中会受到一定损伤,使其更接近自然条件下样品中污染沙门菌的状态^[26-27]。本染菌实验方案也为后续相关染菌研究提供了有效的技术参考。

当微生物在食品样品中呈低浓度、非均匀分布时,其不同小份样品中的分布通常遵循泊松分布或随机分布^[28]。即使总体样品中存在沙门菌,小检样量可能无法捕获到所有受污染的区域,从而导致假阴性结果。在非均匀污染的情况下,增加检样量能显著提高捕获目标微生物的概率,从而提升检出率,降低假阴性风险^[29-30],这也是我国的标准和世界各国以及国际食品微生物标准对低污染水平样品中的致病菌检测普遍采取增大检样量和多份采样策略的重要原因。一项荷兰的定量评估研究发现,沙门

菌阳性生菜中的污染浓度仅为0.019~0.052 CFU/g,当检样量达到500 g时,每份沙门菌阳性检样中的污染量为9.5~26 CFU^[31],针对这一浓度,如使用适宜的增菌检测方法,可高效、准确的检出沙门菌。本研究显示,当生菜和香菜的检样量增加到500 g时,与国标方法25 g检样量(检出率0.5%)相比,可显著性提升样本中沙门菌的检出率(8.1%, $P < 0.05$),进一步提高了沙门菌的分离效率,高效获取蔬菜风险评估所需菌株,大幅降低采样和检测成本。

本研究发现,生食蔬菜中沙门菌的污染呈现显著的地域与业态差异。郊区来源蔬菜样品中沙门菌阳性率(10.77%)显著高于城区(3.75%)样品,这可能与郊区和城区蔬菜的供给模式密切相关。郊区蔬菜多为小农户分散种植、销售,初级加工和包装简陋,且流通环节多样、监管不严,易受不洁水源、土壤、人畜粪便及病媒生物污染^[32]。相反,城区蔬菜主要来自大型供应商,采用标准化种植、采购和集中化加工、包装,辅以完善的物流和清洁的销售环境,以及更严格的市场准入与监管,有效降低

了致病菌污染风险。此外,本研究中菜市场(11.4%)和露天市场(8.8%)来源样品的沙门菌污染率显著高于超市(6.1%)和果蔬专卖店(0%)来源样品,进一步印证了上述推论。为保障消费者健康,应全面加强蔬菜在生产、加工、流通和监管各环节的微生物污染控制。

本研究从北京地区市售生食蔬菜中分离出的18株沙门菌分属于12种不同的血清型,提示该地区生食蔬菜沙门菌污染来源的多样性。其中 *S. Enteritidis*、*S. Thompson*、*S. Rissen*、*S. Meleagridis*、*S. Senftenberg* 和 *S. Infantis* 均为中国临床感染的常见血清型^[33],而 *S. Mbandaka* 和 *S. Paratyphi B var. Java* 也分别是欧盟和全球多地报告的致病血清型^[34-35]。这些发现进一步表明,生食蔬菜中检出的沙门菌与人类感染风险之间存在密切关联。尤其引人关注的是,沙门菌属肠道亚种 I 中的罕见血清型 *S. Alachua* 占比较高(16.7%),经文献检索,该血清型仅在我国临床病例中有所报告^[36],本研究为该血清型首次在食品中检出。蔬菜中分离的3株 *S. Alachua* 均为 ST2061 型,国外有报道该型别与禽肉食物链相关^[37]。这提示蔬菜可能作为 *S. Alachua* 的传播媒介,构成潜在的公共卫生风险。不同血清型的沙门菌常具有宿主特异性,例如 *S. Enteritidis* 和 *S. Indiana* 在我国是动物源尤其是禽源沙门菌的优势血清型,*S. Rissen* 和 *S. Meleagridis* 是我国猪源沙门菌的优势血清型,而 *S. Aberdeen* 和 *S. Thompson* 则常见于水产品中^[33]。蔬菜分离沙门菌的耐药性存在地域差异,柬埔寨、埃塞俄比亚、墨西哥和印度样本分离沙门菌的耐药率超过20%,某些抗生素的耐药率甚至超过40%,而美国蔬菜沙门菌分离株的耐药率要低得多(6.5%)^[38-39]。本研究中,生食蔬菜分离沙门菌的耐药率为33.3%,菌株对萘啶酸、四环素、链霉素、氨苄西林和复方新诺明的耐药比例较高并携带相应耐药基因,这与我国养殖业及其他食品源沙门菌的耐药特征一致^[40]。本研究聚焦于不同检样量下生食蔬菜沙门菌检测效果的比对研究,应用验证的采样规模和地域存在一定局限性。为应对蔬菜致病菌造成的公共卫生风险,建议进一步开展多品种、大范围的污染监测,以全面、准确地了解生食蔬菜的沙门菌污染特征。

4 结论

针对生菜和香菜中可能存在的低水平沙门菌污染,增加检样量可大幅提升沙门菌的检出率,显著降低假阴性风险。对北京市售样品的检测结果显示,生食蔬菜存在一定程度的沙门菌污染,分离

菌株具有血清型多样性和多重耐药的特点。本研究为生菜和香菜的沙门菌污染风险评估提供了可靠的实验基础数据,对于制定更精准、有效的风险管理策略具有重要实践意义。

参考文献

- [1] ANDREOLETTI O, BAGGESEN D L, BOLTON D, et al. Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of nonanimal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations)[J]. *EFSA Journal*, 2013, 11(1): 3025
- [2] CASTRO-IBÁÑEZ I, GIL M I, ALLENDE A. Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2017, 85: 284-292.
- [3] CORREDOR-GARCÍA D, GARCÍA-PINILLA S, BLANCO-LIZARAZO C M. Systematic Review and Meta-analysis: *Salmonella* spp. prevalence in vegetables and fruits [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(3): 47
- [4] GOLBERG D, KROUPITSKI Y, BELAUSOV E, et al. *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145(1): 250-257.
- [5] AMRUTHA B, SUNDAR K, SHETTY P H. Study on *E. coli* and *Salmonella* biofilms from fresh fruits and vegetables[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 54(5): 1091-1097.
- [6] RAHMAN M, ALAM M.-U, LUIES S K, et al. Contamination of fresh produce with antibiotic-resistant bacteria and associated risks to human health: a scoping review [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(1): 360.
- [7] NGUYEN T K, HIEN T B, THY A T, et al. Retail fresh vegetables as a potential source of *Salmonella* infection in the Mekong Delta, Vietnam [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 341: 109049.
- [8] BERGER C N, SODHA SAMIR V, SHAW R K, et al. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens [J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(9): 2385-2397.
- [9] BERNARDINO MC, RICHARDS K, BRENNAN F, et al. Microbial contamination of fresh produce: what, where, and how? [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(6): 1727-1750.
- [10] The Interagency Food Safety Analytics Collaboration (IFSAC). Foodborne illness source attribution estimates for *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes*-United States, 2021 [EB/OL]. (2023-11-01) [2025-04-15]. <https://www.cdc.gov/ifsac/media/pdfs/p19-2021-report-triagency-508.pdf>.
- [11] YANG X J, WU Q P, HUANG J H, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella* isolated from raw vegetables in China [J]. *Food Control*, 2019, 109: 106915.
- [12] 代晓航, 郭灵安, 魏超. 肠炎沙门氏菌对新鲜番茄的附着和渗透 [J]. *中国测试*, 2016, 42(1): 45-50.
DAI X H, GUO L A, WEI C. Attachment and infiltration of *Salmonella enterica* to fresh tomatoes [J]. *China Measure & Test Technology*, 2016, 42(1): 45-50.

- [13] 马晨, 陈雪华, 钱程. 海口市市售新鲜蔬菜微生物污染分析[J]. 浙江农业科学, 2015, 56(3): 396-401.
MA C, CHEN X H, QIAN C. Analysis of microbial contamination in fresh vegetables for sale in Haikou [J]. Journal of Zhejiang Agriculture Science, 2015, 56(3): 396-401.
- [14] 秦晓杰, 李嘉铭, 孙天妹, 等. 2021年上海市部分即食果蔬食源性致病菌的监测[J]. 上海预防医学, 2023, 1(35): 42-46.
QIAO X J, LI J M, SUN T M, et al. Monitoring of foodborne pathogens in some ready-to-eat fruits and vegetables in Shanghai in 2021 [J]. Shanghai Journal of Preventive Medicine, 2023, 1(35): 42-46.
- [15] 汤晓召, 陈春燕, 杨菁. 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[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(5): 569-576.
TANG X Z, CHEN C Y, YANG J. Pollution status, drug resistance and molecular characteristics of pathogenic bacteria in raw food vegetables in Yunnan Province [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(5): 569-576.
- [16] Center for Disease Control and Prevention (CDC). Reports of selected *Salmonella* outbreak investigations [EB/OL]. (2024-11-26) [2025-01-02] <https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks/>.
- [17] NGUYEN D T A, AWASTHI S P, HOANG P H, et al. Prevalence, serovar, and antimicrobial resistance of nontyphoidal *Salmonella* in vegetable, fruit, and water samples in Ho Chi Minh City, Vietnam [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2021, 18(5): 354-363.
- [18] KRISHNASAMY V P, MARSHALL K, DEWEY-MATTIA D, et al. Outbreak characteristics and epidemic curves for multistate outbreaks of *Salmonella* infections associated with produce: United States, 2009—2015 [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2020, 17(1): 15-22.
- [19] FSIS Directive. Sampling verification activities for *Shiga* toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in raw beef products [EB/OL]. (2020-07-01) [2025-01-15] https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2020-07/10010.1.pdf.
- [20] 王学硕, 窦越, 瞿洪仁, 等. 富集检测法在大样本量生食果蔬沙门氏菌检测中的验证与应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(22): 11-17.
WANG X S, DOU Y, QU H R, et al. Validation and application of enrichment-based detection for *Salmonella* in large sample size raw fruits and vegetables [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(22): 11-17.
- [21] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing [J]. Journal of Computational Biology, 2012, 19: 455-477.
- [22] LI R, LI Y, KRISTIANSEN K, et al. SOAP: short oligonucleotide alignment program [J]. Bioinformatics, 2008, 24: 713-714.
- [23] SIMPSON J T, WONG K, JACKMAN S D, et al. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data [J]. Genome Research, 2009, 19, 1117-1123.
- [24] LIN S H, LIAO Y C. CISA: contig integrator for sequence assembly of bacterial genomes [J]. PLoS One, 2013, 8: e60843.
- [25] LUO R, LIU B, XIE Y, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler [J]. Gigascience, 2012, 4: 30.
- [26] LUPKOWSKA, ADRIANNA M, SOROOSH D, et al. Protein aggregation and glycation in *Escherichia coli* exposed to desiccation-rehydration stress [J]. Microbiological Research, 2023, 270: 127335.
- [27] ABDELHAMID A G, YOUSEF A E. Collateral adaptive responses induced by desiccation stress in *Salmonella enterica* [J]. LWT - Food Science and Technology, 2020, 133: 110089.
- [28] 钟雨婷, 张立实, 王君. 食品中微生物的分布[J]. 卫生研究, 2016, 45(2): 310-314.
ZHONG Y T, ZHANG L S, WANG J. Distribution of microorganisms in food [J]. Journal of Hygiene Research, 2016, 45(2): 310-314.
- [29] U. S. Food & Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual Chapter 5: *Salmonella*: May 2024 Edition [EB/OL]. (2020-01-21) [2025-08-20]. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>.
- [30] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验: GB 4789.40—2024 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.
National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. Food Microbiological Examination—Examination of Cronobacter (*Enterobacter Sakazakii*): GB 4789.40—2024 [S]. Beijing: Standard Press of China, 2024.
- [31] WIJNANDS L M, DELFGOU-VAN A E H. M., BEEREPOOT-MENSINK M E, et al. Prevalence and concentration of bacterial pathogens in raw produce and minimally processed packaged salads produced in and for the Netherlands [J]. Journal of Food Protection, 2014, 77(3): 388-394.
- [32] NORDHAGEN S, HAGOS S, GEBREMEDHIN G, et al. Capacity and incentives to supply safer food: a perspective from urban Ethiopia [J]. Food Security, 2025, 2(17): 331-344.
- [33] WANG Y N, LIU Y, LIU N, et al. The temporal dynamics of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* and predominant serovars in China [J]. National science review, 2023, 3(10): 60-76.
- [34] LYU N, NI J, FANG S, et al. Potential convergence to accommodate pathogenicity determinants and antibiotic resistance revealed in *salmonella* Mbandaka [J]. Microorganisms, 2024, 12: 1667.
- [35] PENG J F, FENG J C, JI H, et al. Emergence of rarely reported extensively drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B among patients in east China [J]. Antibiotics, 2024, 13: 519.
- [36] MA W H, CUI X D, DONG X T, et al. Characterization of nontyphoidal *Salmonella* strains from a tertiary hospital in China: serotype diversity, multidrug resistance, and genetic insights [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2024, 13: 1327092.
- [37] ALMEIDA IAZC, MACRUZ PERESI J T, ALVES E C, et al. *Salmonella* Alachua: causative agent of a foodborne disease outbreak [J]. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2015, 19(3): 233-238.
- [38] MA J Q, DAI J H, CAO C Y, et al. Prevalence, serotype, antimicrobial susceptibility, contamination factors, and control methods of *Salmonella* spp. in retail fresh fruits and vegetables: a systematic review and meta-analysis [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2024, 23: e13407.

- [39] REDDY S P, WANG H, ADAMS J K, et al. Prevalence and characteristics of *Salmonella* serotypes isolated from fresh produce marketed in the United States [J]. *Journal of Food Protection*, 2016, 79: 6-16.
- [40] YANG B, QIAO L, ZHANG X, et al. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in He'nan Province, China [J]. *Food Control*, 2013, 32: 228-235.

(上接第 804 页)

- 王 茵(浙江省医学科学院)
- 王 涛(浙江清华长三角研究院)
- 王 硕(南开大学医学院)
- 王 慧(上海交通大学公共卫生学院)
- 王永芳(国家卫生健康委员会卫生健康监督中心)
- 王竹天(国家食品安全风险评估中心)
- 王松雪(国家粮食和物资储备局科学研究院)
- 王晓英(中国动物疫病预防控制中心)
- 计 融(国家食品安全风险评估中心)
- 邓小玲(广东省疾病预防控制中心)
- 卢 江(国家食品安全风险评估中心)
- 匡 华(江南大学食品学院)
- 朱心强(浙江大学医学院)
- 刘 弘(上海市疾病预防控制中心)
- 刘长青(河北省疾病预防控制中心)
- 刘成伟(江西省疾病预防控制中心)
- 刘兆平(国家食品安全风险评估中心)
- 刘守钦(济南市疾病预防控制中心)
- 刘烈刚(华中科技大学公共卫生学院)
- 刘爱东(国家食品安全风险评估中心)
- 孙长颢(哈尔滨医科大学)
- 李 宁(国家食品安全风险评估中心)
- 李 黎(中华预防医学会)
- 李凤琴(国家食品安全风险评估中心)
- 李业鹏(国家食品安全风险评估中心)
- 李国梁(陕西科技大学食品与生物工程学院)
- 李静娜(武汉市疾病预防控制中心)
- 杨 方(福州海关技术中心)
- 杨 钧(青海省卫生健康委员会卫生监督所)
- 杨大进(国家食品安全风险评估中心)
- 杨小蓉(四川省疾病预防控制中心)
- 杨杏芬(南方医科大学公共卫生学院)
- 肖 荣(首都医科大学公共卫生学院)
- 吴永宁(国家食品安全风险评估中心)
- 何更生(复旦大学公共卫生学院)
- 何来英(国家食品安全风险评估中心)
- 何洁仪(广州市疾病预防控制中心)
- 张剑峰(黑龙江省疾病预防控制中心)
- 张朝晖(中国海关科学技术研究中心)
- 张惠媛(中国海关科学技术研究中心)
- 张遵真(四川大学华西公共卫生学院)
- 陈 波(湖南师范大学化学化工学院)
- 陈 颖(中国检验检疫科学研究院)
- 陈卫东(广东省市场监督管理局)
- 邵 兵(北京市疾病预防控制中心)
- 武爱波(中国科学院上海营养与健康所)
- 赵 舰(重庆市疾病预防控制中心)
- 赵云峰(国家食品安全风险评估中心)
- 赵贵明(中国检验检疫科学研究院)
- 钟 凯(科信食品与营养信息交流中心)
- 姜毓君(东北农业大学食品学院)
- 聂俊雄(常德市疾病预防控制中心)
- 贾旭东(国家食品安全风险评估中心)
- 徐 娇(国家食品安全风险评估中心)
- 徐海滨(国家食品安全风险评估中心)
- 高志贤(军事科学院军事医学研究院)
- 郭云昌(国家食品安全风险评估中心)
- 郭丽霞(国家食品安全风险评估中心)
- 唐振柱(广西壮族自治区疾病预防控制中心)
- 黄 薇(深圳市疾病预防控制中心)
- 黄锁义(右江民族医学院药学院)
- 常凤启(河北省疾病预防控制中心)
- 崔生辉(中国食品药品检定研究院)
- 章 宇(浙江大学生物工程与食品学院)
- 章荣华(浙江省疾病预防控制中心)
- 梁进军(湖南省疾病预防控制中心)
- 程树军(广州海关技术中心)
- 傅武胜(福建省疾病预防控制中心)
- 谢剑炜(军事科学院军事医学研究院)
- 赖卫华(南昌大学食品学院)
- 裴晓方(四川大学华西公共卫生学院)
- 廖兴广(河南省疾病预防控制中心)
- 熊丽蓓(上海市疾病预防控制中心)
- 樊永祥(国家食品安全风险评估中心)