

研究报告

一批微生物超标面膜中日勾维多细菌源菌的分离鉴定及毒力与耐药性分析

王银环^{1,2,3}, 李珏^{*1,2,3}, 郑小玲^{1,2,3}, 王征南^{1,2,3}, 余佳珍^{1,2,3}

1 浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052

2 药品微生物检测与预警重点实验室, 浙江 杭州 310052

3 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室, 浙江 杭州 310052

王银环, 李珏, 郑小玲, 王征南, 余佳珍. 一批微生物超标面膜中日勾维多细菌源菌的分离鉴定及毒力与耐药性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1600-1613.

WANG Yinhuang, LI Jue, ZHENG Xiaoling, WANG Zhengnan, YU Jiazheng. Isolation, identification, and virulence and drug resistance examination of *Pluralibacter gergoviae* from a batch of facial masks with microorganisms out of limits[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1600-1613.

摘要:【背景】近年来, 由不可接受微生物污染引发的化妆品召回案件层出不穷, 现有法规《化妆品安全技术规范》(2015 年版)中微生物检测指标不完善, 难以满足化妆品产品质量控制和评价的需要。【目的】对 2022 年化妆品国家级监督抽检中一批微生物超标面膜中污染菌进行分离鉴定, 并探讨采用多种手段进行鉴定的准确性, 判断是否为不可接受微生物, 同时, 针对污染菌进一步开展安全性评价。【方法】参照《化妆品安全技术规范》(2015 年版)对微生物超标面膜中污染菌进行分离纯化后, 分别采用 VITEK 2 Compact 全自动生化鉴定系统、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)和 16S rRNA 基因测序技术对污染菌进行鉴定, 并进一步开展毒力基因、耐药基因安全性评价分析。【结果】3 种技术均可鉴定出面膜中污染菌为不可接受微生物——日勾维多细菌源菌。高通量测序发现该菌携带 52 种毒力基因, 预测含其他毒力相关基因 429 种, 提示该菌具有极大的安全隐患。同时检测到该菌携带 24 种耐药基因, 可能对青霉素、头孢菌素、万古霉素、四环素和氨基糖苷类等 24 种(类)抗生素耐药, 检测到多重耐药基因 10 种, 耐药机理多与产生外排泵有关。提示该菌存在一定的多重耐药安全风险。【结论】本研究从一批微生物超标面膜中分离到日勾维多细菌源菌, 为不可接受微生物。该菌具有极大的产毒能力, 且具有一定的多重耐药安全隐患, 应考虑经风险评估后将该菌纳入微生物检测指标。

资助项目: 浙江省药品监管系统科技计划(2022035); 内蒙古自治区药品监督管理局药品安全监管科研项目(NMYJ-KJ-202303)

This work was supported by the Science and Technology Program for Drug Regulatory System of Zhejiang Province (2022035), and the Medical Safety Supervision and Research Program of Inner Mongolia Autonomous Region Medical Products Administration (NMYJ-KJ-202303).

*Corresponding author. E-mail: 13858076285@163.com

Received: 2023-07-15; Accepted: 2023-12-28; Published online: 2024-03-19

关键词: 不可接受微生物; 微生物超标面膜; 日勾维多细菌源菌; 分离鉴定; 毒力基因; 耐药基因

Isolation, identification, and virulence and drug resistance examination of *Pluralibacter gergoviae* from a batch of facial masks with microorganisms out of limits

WANG Yinhuan^{1,2,3}, LI Jue^{*1,2,3}, ZHENG Xiaoling^{1,2,3}, WANG Zhengnan^{1,2,3}, YU Jiazhen^{1,2,3}

1 Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, Zhejiang, China

2 NMPA Key Laboratory for Testing and Risk Warning of Pharmaceutical Microbiology, Hangzhou 310052, Zhejiang, China

3 Key Laboratory of Drug Contacting Materials Quality Control of Zhejiang Province, Hangzhou 310052, Zhejiang, China

Abstract: [Background] In recent years, cosmetic recall cases caused by contamination with objectionable microorganisms have kept emerging. The microbial detection indicators in the *Cosmetic Safety Technical Specifications* (2015 Edition) are not perfect and difficult to meet the needs of quality control and evaluation of cosmetics products. **[Objective]** To isolate and identify the contaminant microorganisms in a batch of facial masks with microorganisms out of limits in the national sampling inspection of cosmetics in 2022, explore the performance of different identification methods, determine whether the contaminant microorganisms are objectionable microorganisms or not, and evaluate the safety of the contaminant microorganisms. **[Methods]** According to the *Cosmetic Safety Technical Specifications* (2015 Edition), the contaminant microorganisms in the facial masks were isolated and identified by VITEK 2 system, matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and 16S rRNA gene sequencing. Furthermore, the safety evaluation and detection of virulence genes and drug resistance genes were carried out for the contaminant microorganisms. **[Results]** The results obtained with the three identification techniques all showed that the contaminant microorganism in the facial masks was an objectionable microorganism, *Pluralibacter gergoviae*. High-throughput sequencing detected 52 virulence genes and predicted 429 other virulence-related genes, which suggested that this bacterium had great safety risks. At the same time, 24 drug resistance genes were detected, suggesting that the bacterium may be resistant to 24 antibiotics such as penicillin, cephalosporin, vancomycin, tetracycline, and aminoglycosides. Moreover, 10 multi-drug resistance genes were detected, and the resistance mechanism was associated with the production of efflux pumps. It is suggested that the bacterium have a certain risk of multi-drug resistance. **[Conclusion]** In this study, an objectionable microorganism *P. gergoviae* was isolated from a batch of facial masks with microorganisms out of limit. This bacterium is capable of producing toxins and has a potential safety risk of multidrug resistance. It should be considered to include this bacterium into the microbial detection after risk assessment.

Keywords: objectionable microorganisms; facial mask with microorganisms out of limits; *Pluralibacter gergoviae*; isolation and identification; virulence genes; resistance genes

面膜中因含有较为丰富的液体营养物质和较高的水分活度,在生产、储存和使用过程中,极易受到多种微生物如日勾维多细菌源菌(*Pluralibacter gergoviae*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)和蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)等的污染^[1-3]。日勾维多细菌源菌是一种广泛存在于水、植物、人体和动物粪便等环境中的条件致病菌,属革兰氏阴性,短杆状,兼性厌氧,在化妆品生产过程中极易通过多途径,如原辅料、生产用水、人员和环境等带入产品中^[4-6]。日勾维多细菌源菌污染不仅能够影响化妆品质量,还可以通过伤口、黏膜和眼睛等进入人体,易引起免疫力低下、婴幼儿和儿童等特定人群的泌尿系统和呼吸道感染,严重时导致菌血症^[7-9]。该菌通常具有抗生素耐药性,影响后期治疗^[10-12]。近年来,有关身体乳、沐浴露、护手霜和面膜等产品因日勾维多细菌源菌污染导致的召回案件频发。有调查表明,日勾维多细菌源菌已成为全球化妆品行业中检出频率较高的微生物之一^[2,4,13-14]。因此,为了全面了解化妆品中日勾维多细菌源菌的污染状况和感染风险,亟须开展日勾维多细菌源菌的检查、鉴定和安全性评价研究。

对面膜中污染菌进行精准鉴定及其安全性评价,是实现对化妆品分离菌致病性分析、病原危害性预警和溯源分析的必备前提之一^[15-16]。然而,目前日勾维多细菌源菌尚不属于《化妆品安全技术规范》必检指标^[17],国内外尚未开发出针对日勾维多细菌源菌检测的特异性选择培养基,而分子检测手段不能区分菌的死活问题,容易造成假阳性的概率。目前有关日勾维多细菌源菌抗生素耐药性和消毒剂耐受性的报道较多,但耐药机理尚不明确,携带毒力基因状况、毒性代谢产物产生情况均不清晰。

因此,针对上述现状,本研究采用基于表型特性(如菌落形态)及关键生理生化反应等为基础的 VITEK 2 Compact 全自动生化鉴定系统,基于微生物菌体内高丰度、表达稳定和进化保守的核糖体蛋白指纹图谱的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)技术和基于细菌 16S rRNA 基因序列的测序技术,对一批微生物超标面膜中日勾维多细菌源菌开展精准鉴定,以期探索出针对日勾维多细菌源菌的精准鉴定手段。同时采用二代测序技术对该菌进行毒力基因检测和耐药性分析,为日勾维多细菌源菌的毒力机理研究和耐药机制研究奠定试验依据,为后续完善化妆品安全性评价指标、加强化妆品生产全生命周期微生物质量监管及风险预警提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 样品

2022 年国家监督抽检补水面膜,批号 MY20220303,抽样方式为网络抽检。

1.2 培养基

卵磷脂吐温-80 琼脂培养基(批号 1104541)、SCDLP 液体培养基(批号 1103861)和胰酪大豆胨琼脂(tryptose soya agar, TSA)培养基(批号 1105565)均购自广东环凯微生物科技有限公司,配方均符合《化妆品安全技术规范》(2015 年版)要求^[17],上述培养基均按使用说明书配制,培养基适用性检查均符合相关规定。

1.3 主要试剂和仪器

无菌生理盐水,南通凯恒生物科技发展有限公司;革兰氏阴性细菌鉴定卡(GN 鉴定卡)和革兰氏阴性细菌药敏卡(AST-N334 药敏鉴定卡),

梅里埃诊断产品(上海)有限公司; PrepMan Ultra 试剂盒, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 2×Phanta Max Master Mix 试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。电子天平, 梅特勒托利多科技(中国)有限公司; 生物安全柜, 上海力康医疗设备有限公司; 高压蒸汽灭菌器, 松下电器(中国)有限公司; 基因分析仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; VITEK 2 Compact 全自动生化鉴定系统, 梅里埃诊断产品(上海)有限公司; 全自动微生物质谱检测系统, 郑州安图生物工程股份有限公司; 超声波高性能样品处理系统, Covaris 公司。

1.4 面膜中污染菌的分离和纯化

无菌操作称取 10 g 面膜类样品, 加入 90 mL 无菌生理盐水, 振荡混匀, 制成 10^{-1} 稀释度供试液, 采用 10 倍倍比稀释法逐级稀释, 分别制成 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 稀释度供试液, 采用涂布法将 100 μ L 不同稀释度供试液分别接种至卵磷脂吐温-80 营养琼脂培养基中, 每个稀释度平行制备 2 个平皿。参照《化妆品安全技术规范》(2015 年版)^[17], 36 $^{\circ}$ C 倒置培养 48 h。

1.5 生化鉴定

取 TSA 平板上 3 株疑似不同种类菌落, 分别进行革兰氏染色。将分离菌经平板划线纯培养后分别取平板上的纯培养菌落用 0.45% 氯化钠溶液配制成 0.55–0.99 McF 菌悬液, 选择 GN 鉴定卡, 采用 VITEK 2 Compact 全自动生化鉴定系统进行鉴定。

1.6 MALDI-TOF MS 鉴定

采用甲酸萃取法制备检测样本。挑取 TSA 平板上单菌落加入 300 μ L 超纯水中, 混匀。添加 900 μ L 无水乙醇漩涡振荡 1 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 去除上清液后, 用 10 μ L 体积分数 70% 的甲酸重悬菌体细胞, 再加入 10 μ L 乙腈, 用移液枪反复吹打菌悬液, 离心后取上清液, 采用全自动微生物质谱检测系统 MALDI-TOF MS 进

行鉴定分析, 确定菌种分类学地位。

1.7 16S rRNA 基因序列鉴定

采用 PrepMan Ultra 试剂盒提取分离菌基因组 DNA, 采用引物 27F (5'-AGAGTT TGATCCT GGCTCAG-3') 和 1100R (5'-GGGTTGCGCTCGT TG-3') 进行 16S rRNA 基因全长扩增, PCR 反应体系和反应条件按照 2×Phanta Max Master Mix 试剂盒说明书操作。PCR 产物纯化后, 采用基因分析仪进行 Sanger sequencing 分析。

1.8 毒力基因检测与耐药性分析

采用二代 BGISEQ 测序平台, 通过超声波高性能样品处理系统随机打断质量合格的日勾维多细菌源菌分离菌基因组 DNA 样品, 片段选择后加上接头进行 DNA 纳米球制备, 后利用 Paired End 方法对插入片段进行测序, 原始数据经质控和数据过滤后得到高质量数据, 基因组组装后参照细菌致病菌毒力因子数据库(virulence factors of database, VFDB)和细菌抗生素耐药基因数据库(antibiotic resistance genes database, ARDB)进行毒力基因和耐药基因分析, 明确该菌所携带的毒力基因、产毒机理及携带的耐药基因名称, 以及耐受的抗生素种类等。同时将组装后的基因序列上传到 NCBI 网站, ID 号: PRJNA 1053282。

1.9 分离菌株的药物敏感性试验

采用对倍微量稀释法进行药敏试验。取日勾维多细菌源菌 18–24 h 新鲜培养物, 用 0.45% 无菌生理盐水制成 0.50–0.63 麦氏比浊浓度的菌悬液, 采用 AST-N334 药敏鉴定卡进行药敏检测。参照 2012 年美国临床实验室标准委员会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 最新标准进行试验^[18]。

2 结果与分析

2.1 面膜中污染菌的分离和纯化结果

将卵磷脂吐温-80 琼脂培养基平板 36 $^{\circ}$ C 倒

置培养 48 h 后, 可见 10^{-1} 和 10^{-2} 稀释度平板上菌落均不可计, 根据 10^{-3} 稀释度平板上菌落数, 换算出样品中菌落总数为 2.1×10^5 CFU/g。分别取 3 种疑似不同种类菌落, 划线至 TSA 平板上, 36°C 倒置培养 48 h。结果 3 株菌在 TSA 平板上均偏黄色, 圆形, 光滑, 湿润, 边缘整齐(图 1)。

2.2 生化鉴定结果

三株菌革兰氏染色结果均为革兰氏阴性杆菌(图 2), 鉴定结果均为日勾维多细菌源菌(*Pluralibacter gergoviae*), 可信度均为 99%。提示该批次面膜微生物超标原因为日勾维多细菌源菌污染。

2.3 MALDI-TOF MS 鉴定结果

结果再次证实该批次微生物超标面膜中污染菌为日勾维多细菌源菌(*Pluralibacter gergoviae*), 得分 9.622。

2.4 16S rRNA 基因序列鉴定结果

16S rRNA 基因序列鉴定结果显示, 该菌为日勾维多细菌源菌(*Pluralibacter gergoviae*), 同种细菌序列相似性 99.58%。进一步证实了该批次微生物超标面膜中污染菌为日勾维多细菌源菌。提示本研究采用的 VITEK 2 Compact 全自动生化鉴定系统、MALDI-TOF MS 和 16S rRNA 基因测序技术均可用于日勾维多细菌源菌的精准鉴定。

2.5 毒力基因分析结果

由表 1 可见, 本研究分离的日勾维多细菌源菌共检出 52 种毒力相关基因。同时预测到可能含有其他附着类毒力相关基因、抗吞噬类毒力相关基因、侵袭类毒力相关基因和调节内外毒素产生的相关毒力基因等约 429 种, 提示从微生物超标面膜中分离的日勾维多细菌源菌具有极大的安全隐患。

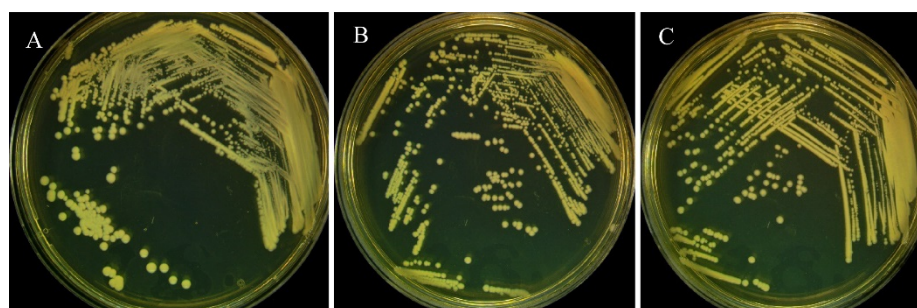


图 1 固体平板培养 3 株分离菌的菌落形态 A、B、C 代表 3 种疑似菌纯化后的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of three isolates on solid plate. A, B, and C represent the colony morphology of the three suspected bacteria after purification.

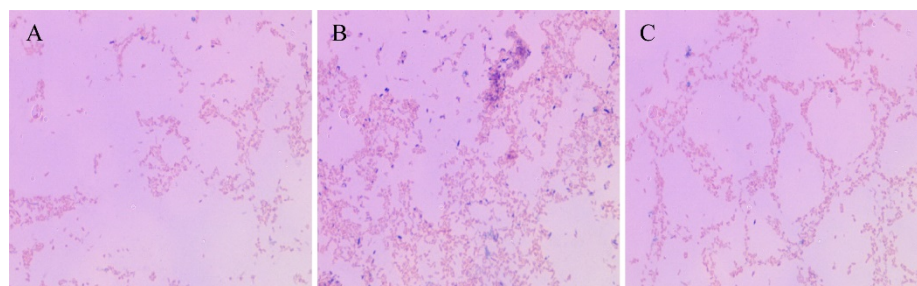


图 2 三株分离菌革兰氏染色镜检图 A、B、C 代表 3 种疑似菌革兰氏染色结果

Figure 2 Microscopy of three isolates by Gram staining (1 000×). A, B and C represent Gram staining results.

表 1 日勾维多细菌源菌毒力基因分析结果

Table 1 Results of virulence gene analysis of *Pluralibacter gergoviae*

序号 Serial number	毒力基因 Virulence genes	描述 Description
1	<i>pilW</i>	IV 型菌毛合成蛋白 PilW [IV型菌毛(CVF049)] (耶尔森结肠炎菌小肠结肠炎亚种 8081) Type IV fimbriae synthesise protein PilW (type IV pili (CVF049)) (<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081)
2	<i>acpXL</i>	酰基载体蛋白[LPS (CVF383)] (羊种布鲁氏菌 bv.1 str.16M) Acyl carrier protein (LPS (CVF383)) (<i>Brucella melitensis</i> bv. 1 str. 16M)
3	<i>bfmR</i>	生物膜控制反应调节因子[BfmRS (VF0463)] (鲍曼不动杆菌 ACICU) Biofilm-controlling response regulator (BfmRS (VF0463)) (<i>Acinetobacter baumannii</i> ACICU)
4	<i>rfaF</i>	ADP-庚糖-LPS 庚糖基转移酶II [LOS (CVF494)] (流感嗜血杆菌 Rd KW20) ADP-heptose-LPS heptosyltransferase II (LOS (CVF494)) (<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20)
5	<i>waaP</i>	UDP-葡萄糖: (庚糖基) LPS α 1,3-葡糖基转移酶 WaaG [LPS (VF0085)] (铜绿假单胞菌 PAO1) UDP-glucose: (heptosyl) LPS alpha 1,3-glucosyltransferase WaaG (LPS (VF0085)) (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1)
6	<i>waaG</i>	B 带 O-抗原聚合酶[LPS (VF0085)] (铜绿假单胞菌 PAO1) B-band O-antigen polymerase (LPS (VF0085)) (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1)
7	<i>kdtB</i>	脂多糖核心生物合成蛋白[LPS (VF0056)] (幽门螺杆菌 26695) Lipopolysaccharide core biosynthesis protein (LPS (VF0056)) (<i>Helicobacter pylori</i> 26695)
8	<i>IlpA</i>	免疫原性脂蛋白 A [IlpA (VF0513)] (嗜盐弧菌 YJ016) Immunogenic lipoprotein A (IlpA (VF0513)) (<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016)
9	<i>clpP</i>	ATP 依赖的 Clp 蛋白酶蛋白水解亚基[ClpP (VF0074)] (单增李斯特菌 EGD-e) ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (ClpP (VF0074)) (<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e)
10	<i>hlyA</i>	溶血素 a [溶血素 HlyA (CVF792)] (嗜水气单胞菌嗜水亚种 ATCC 7966) Hemolysin A (hemolysin, HlyA (CVF792)) (<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966)
11	<i>cheD</i>	甲基接受趋化性蛋白 CheD [周生鞭毛(AI145)] (耶尔森结肠炎菌 subsp. <i>enterocolitica</i> 8081) Methyl-accepting chemotaxis protein CheD (peritrichous flagella (AI145)) (<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081)
12	<i>flhC</i>	鞭毛生物合成转录激活因子 FlhC [鞭毛(VF0394)] (结肠炎耶尔森杆菌小肠结肠炎亚种 8081) Flagellar biosynthesis transcription activator FlhC (flagella (VF0394)) (<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081)
13	<i>motA</i>	鞭毛运动蛋白 MotA [周生鞭毛(AI145)] (耶尔森结肠炎菌小肠结肠炎亚种 8081) Flagellar motor protein MotA (peritrichous flagella (AI145)) (<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081)
14	<i>motB</i>	鞭毛运动蛋白 MotB [包皮鞭毛(AI145)] (耶尔森结肠炎菌小肠结肠炎亚种 8081) Flagellar motor protein MotB (peritrichous flagella (AI145)) (<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081)
15	<i>cheY</i>	趋化调节蛋白 CheY [周生鞭毛(AI145)] (耶尔森结肠炎菌小肠结肠炎亚种 8081) Chemotaxis regulatory protein CheY (peritrichous flagella (AI145)) (<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081)
16	<i>cheB</i>	趋化特异性甲酯酶 CheB [周生鞭毛(AI145)] (耶尔森结肠炎菌小肠结肠炎亚种 8081) Chemotaxis-specific methylesterase CheB (peritrichous flagella (AI145)) (<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081)
17	<i>fliL</i>	鞭毛基体蛋白 FliL [鞭毛(VF0394)] (耶尔森结肠炎菌小肠结肠炎亚种 8081) Flagellar basal body protein FliL (flagella (VF0394)) (<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081)
18	<i>fliM</i>	鞭毛运动开关蛋白 FliM [鞭毛(VF0394)] (耶尔森结肠炎菌小肠结肠炎亚种 8081) Flagellar motor switch protein FliM (flagella (VF0394)) (<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081)

(待续)

(续表 1)

序号 Serial number	毒力基因 Virulence genes	描述 Description
19	<i>vgrG1a</i>	VI 型分泌系统底物 VgrG1 [HSI-I (VF0334)] (铜绿假单胞菌 PAO1) Type VI secretion system substrate VgrG1 (HSI-I (VF0334)) (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1)
20	<i>pvcC</i>	Paerucumarin 生物合成蛋白 PvcC [pyoverdine (IA001)] (铜绿假单胞菌 PAO1) Paerucumarin biosynthesis protein PvcC (pyoverdine (IA001)) (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1)
21	<i>ptxR</i>	转录调节因子 PtxR [pyoverdine (IA001)] (铜绿假单胞菌 PAO1) Transcriptional regulator PtxR (pyoverdine (IA001)) (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1)
22	<i>hsiJ1</i>	VI 型分泌系统 hcp 分泌岛蛋白 HsiJ1[HSI-I (VF0334)] (铜绿假单胞菌 PAO1) (hsiJ1) Type VI secretion system hcp secretion island protein HsiJ1 (HSI-I (VF0334)) (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1)
23	<i>allR</i>	DNA 结合转录抑制子 AllR [尿囊素利用(VF0572)] (肺炎克雷伯菌肺炎亚种 NTUH-K2044) DNA-binding transcriptional repressor AllR (allantoin utilization (VF0572)) (<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> NTUH-K2044)
24	<i>icl</i>	异柠檬酸裂合酶(异柠檬酸酶) [异柠檬酸裂合酶(VF0253)] (结核分枝杆菌 H37Rv) Isocitrate lyase Icl (isocitrate lyase (VF0253)) (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv)
25	<i>fepB</i>	Ferri 肠菌素 ABC 转运蛋白周质结合蛋白[肠菌素(VF0228)] (大肠杆菌 CFT073) Ferri enterobactin ABC transporter periplasmic binding protein (enterobactin (VF0228)) (<i>Escherichia coli</i> CFT073)
26	<i>mrkF</i>	3 型菌毛小亚基 MrkF [3 型菌毛(VF0567)] (肺炎克雷伯菌肺炎亚种 NTUH-K2044) Type 3 fimbrial minor pilin subunit MrkF (type 3 fimbriae (VF0567)) (<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> NTUH-K2044)
27	<i>mrkC</i>	菌毛生物发生外膜引座蛋白 mrkC 前体[3 型菌毛(VF0567)] (肺炎克雷伯菌肺炎亚种 NTUH-K2044) Fimbrial biogenesis outer membrane usher protein mrkC precursor (type 3 fimbriae (VF0567)) (<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> NTUH-K2044)
28	<i>sodB</i>	超氧化物歧化酶[sodB(VF0169)] (嗜肺军团菌嗜肺亚种) Superoxide dismutase (SodB (VF0169)) (<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> str. Philadelphia 1)
29	<i>sodCI</i>	Gifsy-2 噬菌体原: 超氧化物歧化酶前体(Cu-Zn) [SodCI (VF0109)] (鼠伤寒沙门菌肠炎亚种 LT2) Gifsy-2 prophage: superoxide dismutase precursor (Cu-Zn) (SodCI (VF0109)) (<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> str. LT2)
30	<i>ccmC</i>	细胞色素 c 型生物合成蛋白 CcmC, 推测为 CcmE 的血红素裂解酶[CcmC (VF0292)] (嗜肺军团菌亚种) Cytochrome c-type biogenesis protein CcmC, putative heme lyase for CcmE (CcmC (VF0292)) (<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> str. Philadelphia 1)
31	<i>ccmB</i>	参与细胞色素 c 生物合成的 ABC 转运蛋白, CcmB 亚基[细胞色素 c 突变(ccm)位点(CVF358)] (嗜肺军团菌亚种) ABC transporter involved in cytochrome c biogenesis, CcmB subunit (cytochrome c maturation (ccm) locus (CVF358)) (<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> str. Philadelphia 1)
32	<i>ast</i>	耐热细胞渗透性肠毒素[耐热细胞渗透性肠毒素, AST (CVF789)] (嗜水气单胞菌亚种嗜水气单胞菌 ATCC 7966) Thermostable cytotoxic enterotoxin (heat-stable cytotoxic enterotoxin, Ast (CVF789)) (<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966)
33	<i>cdpA</i>	环二鸟苷酸磷酸二酯酶[CdpA (VF0432)] (类鼻疽伯克霍尔德菌 K96243) Cyclic di-GMP phosphodiesterase (CdpA (VF0432)) (<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243)
34	<i>galE</i>	UDP 葡萄糖 4-差向异构酶[LOS (CVF494)] (流感嗜血杆菌 Rd KW20) UDP-glucose 4-epimerase (LOS (CVF494)) (<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20)

(待续)

(续表 1)

序号 Serial number	毒力基因 Virulence genes	描述 Description
35	<i>fleR</i>	双组分反应调节剂[Flagella(VF0273)] (铜绿假单胞菌 PAO1) Two-component response regulator (flagella (VF0273)) (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1)
36	<i>acrB</i>	吡啶黄抗性蛋白 B [AcrAB (VF0568)] (肺炎克雷伯菌肺炎亚种 NTUH-K2044) Acriflavine resistance protein B (AcrAB (VF0568)) (<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> NTUH-K2044)
37	<i>pilL</i>	IV型菌毛合成蛋白 PilL [IV型菌毛(VF0401)] (耶尔森结肠炎菌小肠结肠炎亚种 8081) Type IV pilus biosynthesis protein PilL (type IV pili (VF0401)) (<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081)
38	<i>fleQ</i>	转录调节因子 FleQ [极鞭毛(AI149)] (嗜肺嗜肺军团菌亚种) Transcriptional regulator FleQ (polar flagella (AI149)) (<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> str. Philadelphia 1)
39	<i>lpg2936</i>	Dot/Icm IV 型分泌系统效应器[Dot/Icm(VF0156)] (嗜肺军团菌嗜肺亚种) Dot/Icm type IV secretion system effector (Dot/Icm (VF0156)) (<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> str. Philadelphia 1)
40	<i>orfM</i>	脱氧核糖核苷酸三磷酸焦磷酸酶[LOS(CVF494)] (流感嗜血杆菌 Rd KW20) Deoxyribonucleotide triphosphate pyrophosphatase (LOS (CVF494)) (<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20)
41	<i>gnd</i>	6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶[胶囊(VF0560)] (肺炎克雷伯菌肺炎亚种 NTUH-K2044) 6-phosphogluconate dehydrogenase (capsule (VF0560)) (<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> NTUH-K2044)
42	<i>pilD</i>	IV 型前毛蛋白前导肽 M1 型[IV 型菌毛(VF0431)] (类鼻疽伯克氏菌 K96243) Type IV prepilin leader peptide type M1 (type IV pili (VF0431)) (<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243)
43	<i>lpxC</i>	UDP-3-O-(R-3-羟基肉豆蔻酰基)-N-乙酰氨基葡萄糖脱乙酰基酶[LOS (CVF494)] (流感嗜血杆菌 Rd KW20) UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase (LOS (CVF494)) (<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20)
44	<i>fepA</i>	外膜受体 FepA [Ent(VF0562)] (肺炎克雷伯菌肺炎亚种 NTUH-K2044) Outer membrane receptor FepA (Ent (VF0562)) (<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> NTUH-K2044)
45	<i>IlpA</i>	免疫原性脂蛋白 A [IlpA(VF0513)] (创伤弧菌 YJ016) Immunogenic lipoprotein A (IlpA (VF0513)) (<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016)
46	<i>wcbN</i>	D-甘油-D-甘露糖-庚糖 1,7-二磷酸磷酸酯酶[胶囊I (VF0436)] (类鼻疽伯克氏菌 K96243) D-glycero-D-manno-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase (capsule I (VF0436)) (<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243)
47	<i>trwM</i>	Trw IV 型分泌系统 TrwM 蛋白[Trw IV 型分泌系统(VF0372)] (翰斯勒巴东氏菌) Trw type IV secretion system TrwM protein (Trw type IV secretion system (VF0372)) (<i>Bartonella henselae</i> str. Houston-1)
48	<i>clpE</i>	ATP 依赖性蛋白酶[ClpE (VF0073)] (单增李斯特菌 EGD-e) ATP-dependent protease (ClpE (VF0073)) (<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e)
49	<i>lpxK</i>	四酰基二糖 4'-激酶[LOS (CVF494)] (流感嗜血杆菌 Rd KW20) Tetraacyldisaccharide 4'-kinase (LOS (CVF494)) (<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20)
50	<i>cheD</i>	甲基接受趋化蛋白 CheD [周围鞭毛(AI145)] (耶尔森结肠炎菌小肠结肠炎亚种 8081) Methyl-accepting chemotaxis protein CheD (peritrichous flagella (AI145)) (<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081)
51	<i>CBU-1566</i>	Coxiella Dot/Icm 型 IVB 分泌系统易位效应器[T4SS 效应器(CVF803)] (贝氏柯克斯体 RSA 493) Coxiella Dot/Icm type IVB secretion system translocated effector (T4SS effectors (CVF803)) (<i>Coxiella burnetii</i> RSA 493)
52	<i>hcp/tssD</i>	VI型分泌系统蛋白, Hcp 家族[T6SS (VF0569)] (肺炎克雷伯菌肺炎亚种 HS11286) Type VI Secretion system protein, Hcp family (T6SS (VF0569)) (<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> HS11286)

2.6 耐药基因分析结果

由表 2 可见,本研究分离的日勾维多细菌源菌共检测到 24 种耐药基因,提示该菌可能对青霉素、头孢菌素、万古霉素、四环素、大环内酯类抗生素和氨基糖苷类抗生素等约 25 类(种)抗生素耐药。同时检测到该菌携带 *emrd*、*acr*、*macab* 和 *mdtk* 等 10 种多重耐药基因,提示该菌具有多重耐药性。耐药机理与产生多重耐药外排泵有关。

耐药基因可能会从细菌转移到人体或环境中,若化妆品中污染了含多重耐药基因的日勾维

多细菌源菌,患者一旦感染,临床上可能出现无药可医的严峻局面,因此,为警惕微生物本身引起的毒害作用及耐药基因转移导致临床治疗更加困难,应从源头上加强化妆品中日勾维多细菌源菌的污染控制。

2.7 药物敏感性试验结果

药敏试验结果显示日勾维多细菌源菌对头孢呋辛、头孢呋辛酯和头孢西丁等抗生素耐药,对亚胺培南中度耐药,对其他测试抗生素敏感,具体耐药性见表 3。

表 2 日勾维多细菌源菌耐药基因检测结果

Table 2 Results of drug resistance gene detection of *Pluralibacter gergoviae*

序号 Serial number	耐药基因 Resistance genes	耐受抗生素 Antibiotic resistance	耐药机理描述 Description of resistance mechanism
1	<i>pbp</i>	青霉素 Penicillin	该酶具有青霉素不敏感的转糖基化酶 N-末端结构域(形成线性聚糖链)和青霉素敏感的转肽酶 C-末端结构域(肽亚基的交联) The enzyme has a penicillin-insensitive transglycosylase N-terminal domain (formation of linear glycan strands) and a penicillin-sensitive transpeptidase C-terminal domain (cross-linking of the peptide subunits)
2	<i>vanA</i>	万古霉素、替考拉宁 Vancomycin, teicoplanin	VanA 型万古霉素抗性操纵子基因,可以将修饰的 C 端 D-Ala-D-Ala 合成肽聚糖,生成 D-丙氨酸-D-乳酸 VanA type vancomycin resistance operon genes, which can synthesize peptidoglycan with modified C-terminal D-Ala-D-Ala to D-alanine-D-lactate
3	<i>emrd</i>	氨基糖苷 Aminoglycoside	多药耐药外排泵 Multidrug resistance efflux pump
4	<i>arna</i>	多黏菌素 Polymyxin	双功能酶催化葡萄糖醛酸(UDP-glcUA)的氧化脱羧转化为 UDP-4-酮-阿拉伯糖(UDP-Ara4O),并在 UDP-4-氨基-4-脱氧-L-阿拉伯糖中加入甲酰基以形成 UDP-L-4-甲酰胺基阿拉伯糖。修饰后的阿拉伯糖附着在脂质 a 上,是抵抗多黏菌素和阳离子抗微生物肽所必需的 Bifunctional enzyme that catalyzes the oxidative decarboxylation of UDP-glucuronic acid (UDP-GlcUA) to UDP-4-keto-arabinose (UDP-Ara4O) and the addition of a formyl group to UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose (UDP-L-Ara4N) to form UDP-L-4-formamido-arabinose (UDP-L-Ara4FN). The modified arabinose is attached to lipid A and is required for resistance to polymyxin and cationic antimicrobial peptides
5	<i>acr</i>	氨基糖苷类、大环内酯、 β -内酰胺、丙烯黄素 Aminoglycoside, macrolide, beta-lactam, acriflavin	耐药结节化细胞分化(resistance-nodulation-cell, RND)超家族。多药耐药外排泵 Resistance-nodulation-cell division transporter system. Multidrug resistance efflux pump

(待续)

(续表 2)

序号 Serial number	耐药基因 Resistance genes	耐受抗生素 Antibiotic resistance	耐药机理描述 Description of resistance mechanism
6	<i>ykk</i>	抗菌药物 Antimicrobials	小多药耐药(small multidrug resistance, SMR)蛋白家族。由 2 个蛋白组成的多药耐药外排泵 Small multidrug resistance (SMR) protein family. Multidrug resistance efflux pump, which consists of two proteins
7	<i>macab</i>	大环内酯 Macrolide	耐药结节化细胞分化(RND)超家族。多药耐药外排泵。大环内酯特异性外排系统 Resistance-nodulation-cell division transporter system. Multidrug resistance efflux pump. Macrolide-specific efflux system
8	<i>mexab</i>	氨基糖苷、替加环素、氟喹诺酮、β-内酰胺、四环素 Aminoglycoside, tigecycline, fluoroquinolone, beta-lactam, tetracycline	耐药结节化细胞分化(RND)超家族。多药耐药外排泵 Resistance-nodulation-cell division transporter system. Multidrug resistance efflux pump
9	<i>baca</i>	杆菌肽 Bacitracin	十一烯基焦磷酸磷酸酶, 包括十一烯基焦磷酸的螯合的 Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase, which consists in the sequestration of undecaprenyl pyrophosphate
10	<i>tet_xprt</i>	四环素 Tetracycline	黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 Xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. Mechanism detail unknown
11	<i>mdtk</i>	依诺沙星、诺氟沙星 Enoxacin, norfloxacin	主要易化超家族转运蛋白。多药耐药外排泵 Major facilitator superfamily transporter. Multidrug resistance efflux pump
12	<i>vanC</i>	万古霉素 Vancomycin	VanC 型万古霉素耐药操纵子基因, 可以通过修饰的 C 端 D-Ala-D-Ala 将肽聚糖合成为 D-丙氨酸-D-丝氨酸 VanC type vancomycin resistance operon genes, which can synthesize peptidoglycan with modified C-terminal D-Ala-D-Ala to D-alanine-D-serine
13	<i>mdtnop</i>	T-氯化物、吡啶、嘌呤霉素 T-chloride, acriflavine, puromycin	耐药结节化细胞分化(RND)超家族。多药耐药外排泵 Resistance-nodulation-cell division transporter system. Multidrug resistance efflux pump
14	<i>fos</i>	磷霉素 Fosfomycin	谷胱甘肽转移酶、金属谷胱甘肽转移酶通过催化谷胱甘肽加成到磷霉素, 赋予磷霉素抗性 Glutathione transferase, metalloglutathione transferase which confers resistance to fosfomycin by catalyzing the addition of glutathione to fosfomycin
15	<i>ceo</i>	氯霉素 Chloramphenicol	耐药结节化细胞分化(RND)超家族, 多药耐药外排泵 Resistance-nodulation-cell division transporter system. Multidrug resistance efflux pump
16	<i>emre</i>	氨基糖苷 Aminoglycoside	多药耐药外排泵 Multidrug resistance efflux pump
17	<i>mdtg</i>	去氧胆酸、磷霉素 Deoxycholate, fosfomycin	主要易化超家族转运蛋白。多药耐药外排泵 Major facilitator superfamily transporter. Multidrug resistance efflux pump
18	<i>sta</i>	链霉素 Streptothricin	链丝菌素乙酰转移酶(streptothricin acetyltransferase, STAT) Streptothricin acetyltransferase (STAT)

(待续)

(续表 2)

序号 Serial number	耐药基因 Resistance genes	耐受抗生素 Antibiotic resistance	耐药机理描述 Description of resistance mechanism
19	<i>dfra</i>	甲氧苄啶 Trimethoprim	A 组药物不敏感的二氢叶酸还原酶, 不能被甲氧苄啶抑制 Group A drug-insensitive dihydrofolate reductase, which can not be inhibited by trimethoprim
20	<i>ksga</i>	春雷霉素 Kasugamycin	在 30S 中 16S rRNA 基因的 3' 端附近的保守发夹环中, 2 个相邻的腺苷被二甲基化。其失活导致春雷霉素耐药 Specifically dimethylates two adjacent adenosines in the loop of a conserved hairpin near the 3' end of 16S rRNA gene in the 30S particle. Its inactivation leads to kasugamycin resistance
21	<i>bla_c</i>	头孢菌素 Cephalosporin	C 类 β -内酰胺酶。该酶使 β -内酰胺类抗生素开环, 使分子的抗菌性能失活 Class C beta-lactamase. This enzyme breaks the beta-lactam antibiotic ring open and deactivates the molecule's antibacterial properties
22	<i>vanG</i>	万古霉素 Vancomycin	VanG 型万古霉素抗性操纵子基因, 可以将修饰的 C 端 D-Ala-D-Ala 合成肽聚糖为 D-丙氨酸-D-丝氨酸 VanG type vancomycin resistance operon genes, which can synthesize peptidoglycan with modified C-terminal D-Ala-D-Ala to D-alanine-D-serine
23	<i>rosab</i>	磷霉素 Fosmidomycin	外排泵/钾逆向转运蛋白系统。RosA: 主要促进剂超家族转运蛋白。RosB: 钾逆向转运蛋白 Efflux pump/potassium antiporter system. RosA: Major facilitator superfamily transporter. RosB: Potassium antiporter
24	<i>smedef</i>	氟喹诺酮 Fluoroquinolone	耐药结节化细胞分化(RND)超家族, 多药耐药外排泵 Resistance-nodulation-cell division transporter system. Multidrug resistance efflux pump

表 3 日勾维多细菌源菌药物敏感性试验结果

Table 3 Drug sensitivity test results of *Pluralibacter gergoviae*

抗生素 Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Interpretation
阿莫西林/棒酸 Amoxicillin/Clavulanic acid	≤ 2	S
哌拉西林/他唑巴坦 Piperacillin/Tazobactam	≤ 4	S
头孢呋辛 Cefuroxime	8	R
头孢呋辛酯 Cefuroxime axetil	8	R
头孢西丁 Cefoxitin	≤ 4	R
头孢他啶 Ceftazidime	0.25	S
头孢曲松 Ceftriaxone	≤ 0.25	S
头孢哌酮/舒巴坦 Cefoperazone/Sulbactam	≤ 8	S
头孢吡肟 Cefepime	≤ 0.12	S
厄他培南 Ertapenem	≤ 0.12	S
亚胺培南 Imipenem	2	I
阿米卡星 Amikacin	≤ 2	S
左氧氟沙星 Levofloxacin	≤ 0.12	S
替加环素 Tigecycline	≤ 0.5	S
甲氧苄啶/磺胺甲恶唑 Trimethoprim/Sulfamethoxazole	≤ 20	S

R: 耐药; I: 中度耐药; S: 敏感

R: Resistance; I: Moderate resistance; S: Sensitivity.

3 讨论与结论

近年来,国家药监局药品评价中心、美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)和欧盟消费者安全科学委员会(Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS)等机构多次通报美国、加拿大、德国等地发生多起因日勾维多细菌源菌污染导致的化妆品召回事件,产品涉及身体乳、护手霜、沐浴露等多个类别。目前,国内也有化妆品中检出日勾维多细菌源菌的报道。钟瑜等^[19]从一客户送检的眼霜中检出日勾维多细菌源菌,仅针对该菌进行了初步鉴定,未对耐药基因和毒力基因携带情况进行分析。谭慧敏等^[13]从4批菌落总数超标面膜产品中分离到4株日勾维多细菌源菌,采用MALDI-TOF MS、16S rRNA基因测序和VITEK 2生化试验3种方法进行鉴定,鉴定结果均为日勾维多细菌源菌,与本研究鉴定结果一致,但未开展毒力基因与耐药性分析。本研究重点针对从一批微生物超标面膜中分离的日勾维多细菌源菌开展研究,证实了MALDI-TOF MS、16S rRNA基因测序和VITEK 2均可用于该菌的精准鉴定,通过对其耐药基因和毒力基因携带状况进行分析,为化妆品质量安全评价及临床用药奠定基础。本研究中目标菌来源于化妆品终产品,化妆品终产品中的微生物污染可能来源于原辅料、水系统、中间产品、成品、人员和环境等,因此为提高化妆品产品质量,应加强化妆品生产全生命周期的微生物管控,以提升化妆品整体质量水平。

日勾维多细菌源菌污染已成为全球化妆品生产中具有普遍性的重大风险点,不容小觑。然而,目前国家级和省级化妆品监督抽检中化妆品微生物检验标准和判定依据均为《化妆品安全技术规范》(2015年版),检测指标仅包括菌落总数(aerobic bacterial count)、霉菌和酵母菌(molds and

yeasts)、耐热大肠菌群(*Thermotolerant eoliforms*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。我们将本实验室近8年来微生物检测不合格化妆品中污染菌分离鉴定结果进行汇总后发现,耐热大肠菌群、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌检出率均为0,而日勾维多细菌源菌的检出率较高,即使产品中检出日勾维多细菌源菌,若菌落总数未超过限度标准,产品仍然被放行,此类产品对使用者具有极大的安全隐患。因此,鉴于日勾维多细菌源菌在化妆品中污染率高、潜在危害性大,建议尽快修订《化妆品安全技术规范》,将日勾维多细菌源菌纳入指定检测菌,补充完善日勾维多细菌源菌的检测方法和判定标准,以更好地提升化妆品监管质量,降低污染危害。

本研究采用二代测序技术检测到52种微生物超标面膜中污染的日勾维多细菌源菌携带毒力基因,基于二代测序数据,通过分析预测含其他毒力相关基因429种,提示该菌具有极大的安全隐患。同时检测到该菌携带24种耐药基因,提示该菌可能对青霉素、头孢菌素、万古霉素、四环素、大环内酯类抗生素和氨基糖苷类抗生素等约24种(类)抗生素耐药。此外还检测到10种多重耐药基因,耐药机理多与产生外排泵有关。提示该菌存在一定的多重耐药安全风险。药敏结果显示,该菌对头孢呋辛、头孢呋辛酯和头孢西丁等抗生素耐药,对亚胺培南中度耐药。导致出现药敏检测结果与耐药基因检出情况不一致的原因,一方面可能是由于部分耐药基因未表达或存在其他耐药机制;另一方面可能是由于本研究采用的AST-N334药敏鉴定卡中包埋的抗生素种类不足。另外,本批次面膜的配方成分表显示,该面膜未添加任何《化妆品安全技术规范》允许添加的防腐剂,因此,该菌在面膜中的潜在风险

极大。鉴于日沟维多细菌源菌的抗生素耐药性,为提升化妆品产品质量,在化妆品处方筛查阶段,亟须进行防腐挑战测试,筛选最优防腐配方体系,最大可能预防化妆品生产、贮存和使用过程中的日沟维多细菌源菌污染。

REFERENCES

- [1] 吴环, 聂炎炎, 张慧, 刘冬虹. 面膜粉霉菌污染情况分析及其霉菌总数的不确定评定[J]. 广东化工, 2016, 43(13): 76, 93.
WU H, NIE YY, ZHANG H, LIU DH. Investigation on molds contamination and the uncertainty evaluation for molds enumeration of facial mask powder[J]. Guangdong Chemical Industry, 2016, 43(13): 76, 93 (in Chinese).
- [2] 刘红, 张静雅, 胡贝, 黄伟, 刘杰, 柳艳云, 孙春艳, 易旋. 湖北省 2015–2018 年 478 批面膜监督抽检结果分析[J]. 香料香精化妆品, 2020(4): 83–86.
LIU H, ZHANG JY, HU B, HUANG W, LIU J, LIU YY, SUN CY, YI X. Analysis on results of test and supervision for 478 batches of facial mask in Hubei Province during 2015–2018[J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2020(4): 83–86 (in Chinese).
- [3] 林萍, 黎薇, 张万里, 谢韶英, 刘美真. 5 867 份化妆品微生物污染情况分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(7): 843–853.
LIN P, LI W, ZHANG WL, XIE SY, LIU MZ. Analysis of microbial contamination of 5 867 cosmetics[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2005, 15(7): 843–853 (in Chinese).
- [4] 黄依雯, 张珊珊, 王星月, 沈海英. 一例日沟维多杆菌污染化妆品情况分析[J]. 日用化学工业(中英文), 2023, 53(4): 408–413.
HUANG YW, ZHANG SS, WANG XY, SHEN HY. Analysis of a case of cosmetics contaminated by *Enterobacter gergoviae*[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2023, 53(4): 408–413 (in Chinese).
- [5] BRADY C, CLEENWERCK I, VENTER S, COUTINHO T, de VOS P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2013, 36(5): 309–319.
- [6] 唐慧琴, 吴建飞, 罗姣, 孟庆浩. 日沟维多杆菌的生物学特性[J]. 香料香精化妆品, 2021(6): 32–35.
TANG HQ, WU JF, LUO J, MENG QH. Biological characteristics of *Pluralibacter gergoviae*[J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2021(6): 32–35 (in Chinese).
- [7] JIE TTZ, JUNNARKAR SP, SHELAT VG. *Pluralibacter georgoviae* causing acute cholecystitis with perforation[J]. Surgical Infections, 2021, 22(3): 353.
- [8] 董崇林, 孙铭晓. 日沟维多杆菌引起尿道感染 1 例[J]. 华北煤炭医学院学报, 2008, 10(4): 439.
DONG CL, SUN MX. A case of urinary tract infection caused by *Enterobacter rii*[J]. Journal of North China Coal Medical University, 2008, 10(4): 439 (in Chinese).
- [9] COATE E, MERCHEN T, CYBULSKI R, COLLIER R, GANN PM, MILLS E. Novel discovery of extended spectrum β -lactamase (ESBL) *Pluralibacter gergoviae* in acute urinary tract infection and urolithiasis[J]. American Journal of Clinical Pathology, 2021, 156(supplement_1): S128.
- [10] 孙明洁, 李轶, 许俊红. 产 KPC-2 型碳青霉烯酶日沟维多杆菌的耐药性及机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(18): 4345–4347.
SUN MJ, LI Y, XU JH. Study of drug resistance mechanism of KPC-2-type carbapenemase-producing *Enterobacter gergoviae*[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2013, 23(18): 4345–4347 (in Chinese).
- [11] WEISS ZF, HOFFMANN M, SEETHARAMAN S, TAFFNER S, ALLERD M, LUO Y, PEARSON Z, BAKER MA, KLOMPAS M, BRY L, PECORA N. Nosocomial *Pluralibacter gergoviae* isolates expressing NDM and KPC carbapenemases characterized using

- whole-genome sequencing[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2022, 66(10): e0109322.
- [12] 刘净滨, 资捷, 陈菊. 婴幼儿下呼吸道感染常见病原菌分布及耐药分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(A02): 21-23.
- LIU JB, ZI J, CHEN J. Distribution and drug resistance analysis of common pathogens in infants with lower respiratory tract infection[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2014, 35(A02): 21-23 (in Chinese).
- [13] 谭慧敏, 王涛, 朱斌, 零文超, 樊兰艳. 基于 MALDI-TOF MS 技术对面膜中污染日勾维多细菌源菌的鉴定分析[J]. *日用化学工业(中英文)*, 2022, 52(10): 1107-1112.
- TAN HM, WANG T, ZHU B, LING WC, FAN LY. Identification and analysis of *Pluralibacter gergoviae* in facial masks based on MALDI-TOF MS[J]. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 2022, 52(10): 1107-1112 (in Chinese).
- [14] 郑萍, 陈西平. 化妆品的微生物污染问题及防腐效能评价方法[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(11): 2122-2124.
- ZHENG P, CHEN XP. Microbial contamination of cosmetics and evaluation method of antiseptic efficiency[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2007, 17(11): 2122-2124 (in Chinese).
- [15] CHAN KG, TEE KK, YIN WF, TAN JY. Complete genome sequence of *Pluralibacter gergoviae* FB2, an N-acyl homoserine lactone-degrading strain isolated from packed fish paste[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(6): e01276-e01214.
- [16] CUNNINGHAM-OAKES E, POINTON T, MURPHY B, CONNOR TR, MAHENTHIRALINGAM E. Genome sequence of *Pluralibacter gergoviae* ECO77, a multireplicon isolate of industrial origin[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2020, 9(9): e01561-e01519.
- [17] 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范(2015年版)[S]. 2015: 469-484.
- Safety and technical standards for cosmetics (2015 edition)[S]. State Food and Drug Administration Promulgated. 2015: 469-484 (in Chinese).
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty second Informational Supplement. CLSI document M100-S22[S]. 2012.
- [19] 钟瑜, 石笛, 朱小娜. 眼霜中一株污染菌的分离鉴定[J]. *轻工科技*, 2018, 34(8): 126-127.
- ZHONG Y, SHI D, ZHU XN. Isolation and identification of a contaminated bacterium from eye cream[J]. *Light Industry Science and Technology*, 2018, 34(8): 126-127 (in Chinese).