

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ *PSEUDOMONAS SPP.*, ПРОДУЦИРУЮЩИХ β-ЛАКТАМАЗУ, В ГОТОВОЙ К УПОТРЕБЛЕНИЮ СТОЛОВОЙ ЗЕЛЕНИ****Нгуэн Тан Чунг^{1,2}, Хонг Нгуэн Мин², Фам Ти Лоан¹, Ли Ти Хонг Хао¹, Та Ти Иен¹**¹Национальный институт контроля пищевой продукции, Вьетнам, Ханой, Фам Тан Дуат, 65²Институт биотехнологий Вьетнамской академии науки и технологии, Вьетнам, Ханой, Кау Джай, 18 Хоанг Куок Вьет, 1

Загрязнение продуктов питания, употребляемых в пищу сырыми, патогенами, которые обладают резистентностью к антибиотикам, становится серьезной проблемой, формирующей риски для здоровья во многих странах мира, включая Вьетнам, где свежая зелень и овощи ежедневно используются во многих блюдах как усилитель вкуса и источник витаминов и питательных веществ. Однако свежие (сырые) овощи могут быть источником различных пищевых патогенов, таких как *Pseudomonas spp.* и *Enterobacteriaceae*.

Осуществлена оценка загрязненности *Pseudomonas spp.* 180 образцов столовой зелени, отобранных в ресторанах Ханоя, их восприимчивости к антибиотикам и определена способность штаммов *Pseudomonas spp.* вырабатывать ферменты бета-лактамазы. Результаты исследования показали, что 21,67 % ($n = 39$) образцов столовой зелени, готовой к употреблению, были заражены *Pseudomonas spp.* В 16 образцах были обнаружены штаммы, вырабатывающие бета-лактамазу, включая *Pseudomonas putida*, *P. mendocina* и *P. aeruginosa*. Дальнейший анализ выявил шесть штаммов (37,5 %), вырабатывающих бета-лактамазу расширенного спектра (ESBL); пять штаммов (31,25 %), продуцирующих кодированную плазмидами β-лактамазу, и пять штаммов, продуцирующих оба этих фермента. Это позволяет сделать вывод, что готовая к употреблению свежая зелень, предлагаемая в ресторанах Ханоя, может быть источником загрязнения бактериями *Pseudomonas spp.*, продуцирующими бета-лактамазу, что представляет угрозу для здоровья населения.

Ключевые слова: продукты питания, столовая зелень, микробное загрязнение, *Pseudomonas spp.*, риски для здоровья.

Готовая к употреблению столовая зелень является любимым продуктом многих потребителей благодаря низкой калорийности и высокому содержанию витаминов. Во Вьетнаме столовая зелень является обычным продуктом ежедневного рациона. Согласно отчету Всемирного банка (2017) в стране ежедневная норма потребления данного продукта составляет 0,4 кг/день/чел. В Ханое ежедневно потребляется примерно 2800 т зелени [1]. С годовым потреблением в 1 млн т Ханой ориентирован на поставки продукта из близлежащих провинций в дельте Красной Реки (р. Хонгха). Однако следует принимать во внимание факт, что зелень может являться источником бактериальной опасности для животных и человека вследствие загрязнения воды, используемой для ирригации, или ненадле-

жащей промывки перед продажей. Следовательно, стоит задача адекватного контроля соблюдения безопасности.

Бактерии *Pseudomonas spp.* – это подвижные грамотрицательные бактерии, которые обнаруживаются во многих объектах: почве, воде, живых организмах, включая животных, насекомых и человека. Принадлежащие к данному роду бактерии *P. aeruginosa* формируют риск для здоровья, так как они вызывают такие серьезные заболевания, как сепсис, повреждение печени или некроз поврежденных участков. Другие образцы *Pseudomonas*, включая *P. fluorescens*, *P. luteola*, *P. putida* и *P. stutzeri*, менее токсичны, но они вызывают многие инфекции у пациентов с ослабленным иммунитетом [2, 3]. Бактерии *Pseudomonas spp.* часто проникают в ткани живого

© Нгуэн Тан Чунг, Хонг Нгуэн Мин, Фам Ти Лоан, Ли Ти Хонг Хао, Та Ти Иен, 2020

Нгуэн Тан Чунг – доцент, кандидат наук, глава лаборатории пищевой микробиологии (e-mail: trungnt@nifc.gov.vn; tel.: +8 (434) 936-32-69; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8732-9911>).

Хонг Нгуэн Мин – доцент (e-mail: nguyen.huong.m@gmail.com; tel.: +8 (491) 556-24-85; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5302-2973>).

Та Ти Иен – магистр, научный сотрудник лаборатории пищевой микробиологии (e-mail: yenta@gmail.com; tel.: +8 (490) 495-90-50; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3364-4887>).

Фам Ти Лоан – научный сотрудник лаборатории пищевой микробиологии (e-mail: trang2103@gmail.com; tel.: +8 (498) 536-43-52; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2315-9722>).

Ли Ти Хонг Хао – кандидат наук, генеральный директор (e-mail: lethihonghao@yahoo.com; tel.: +8 (490) 424-81-67; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3570-8570>).

организма и вызывают инфекцию и сепсис в случае ослабленного иммунитета. Среди людей это пациенты, страдающие СПИДом, муковисцидозом, бронхоэктазией и тяжелой легочной обструкцией, лица с ожогами или после операций, к примеру, по удалению новообразований или почки [4]. В последнее время патогенные бактерии *Pseudomonas spp.* стали одной из основных проблем здравоохранения вследствие их стремительно развивающейся устойчивости к широкому спектру лекарственных препаратов. Исследования возможных вариантов лечения пациентов свидетельствуют о трудностях, связанных с борьбой с бактериями *Pseudomonas spp.*, устойчивыми ко многим препаратам [5].

В научной литературе уже сообщалось об исследованиях бактерий, извлеченных из зелени, продаваемой на рынках или предлагаемой посетителям в ресторанах, и обладающих устойчивостью к антибиотикам [5]. Бактерии *Pseudomonas spp.*, извлекаемые из данного вида пищевых продуктов, как раз относятся к группе потенциально устойчивых к антибиотикам. Хорошо известно, что они обладают устойчивостью к широкому спектру антибиотиков вследствие генетических факторов, обусловленных генетическим обменом с грамтрицательными семействами, такими, как *Enterobacteriaceae* [6]. Среди бактерий данной группы особый интерес представляют штаммы, продуцирующие β-лактамазу, особенно β-лактамазу расширенного спектра (ESBL) и кодированную плазмидами β-лактамазу (AmpC). Возникновение и распространение β-лактамазы стало значительной проблемой здравоохранения на глобальном уровне, так как она инактивирует широкую группу антибиотиков, используемых в различных вариантах лечения заболеваний [3]. Однако до настоящего времени не было получено никаких данных по наличию бактерий *Pseudomonas spp.* и продуцентов β-лактамазы из этой группы в готовых к употреблению овощах, предлагаемых потребителям во Вьетнаме.

Цель исследования – оценка наличия продуцирующих β-лактамазу бактерий *Pseudomonas spp.* в готовой зелени, отобранной в ресторанах г. Ханоя.

Материалы и методы. Отбор образцов для исследования. Образцы готовой к употреблению зелени ($n = 180$) были отобраны в ресторанах шести городских районов Ханоя в период с июля по октябрь 2018 г. Эти шесть районов, включая Cau Giay, Hoang Mai, Ha Dong, Dong Da, Hai Ba Trung и Long Bien, были выбраны вследствие их значительной населенности. После того как образцы зелени были приобретены в ресторанах, их тонко нарезали без всякого дальнейшего промыва, лишь с удалением коричневых листьев (при их наличии). 25 г каждого образца погружали в 225 мл водного раствора буферного пептона (BD, США). Затем смесь гомогенизировали в течение 30 с.

Выделение и идентификация бактерий. Бактерии *Pseudomonas spp.* выделены с помощью тра-

диционной методики согласно ISO 13720: 2010 [7]. В общем виде: 0,1 мл гомогенизированного образца было распределено на *Pseudomonas* агаре CFC/CN (Merck, Германия) с добавлением селективной добавки CFC (Merck, Германия); инкубация на пластинках происходила при аэробных условиях при температуре 25 °C в течение 44 ± 4 ч. После инкубации наличие колоний подтверждали с использованием Oxidase Strips (Merck, Германия). Оксидазоположительные колонии, определенные как *Pseudomonas spp.* *E. coli* ATCC25922 (ATCC, США), использовались в качестве отрицательного контроля, в то время как штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 (ATCC, США) применялся как положительный контроль. Подтвержденные штаммы *Pseudomonas spp.* подвергались дальнейшему анализу с помощью системы Vitek[®]MS (BioMerieux, Франция) для идентификации отдельных объектов. Процедура Vitek[®]MS выполнялась в соответствии с рекомендациями производителя.

Идентификация продуцирующих β-лактамазу бактерий *Pseudomonas spp.* Для определения бактерий *Pseudomonas spp.*, продуцирующих β-лактамазу, был выполнен тест чувствительности с помощью диффузии. Результаты интерпретированы согласно методике, рекомендованной ВОЗ, и указаниям Института клинических и лабораторных стандартов (США) [8, 9]. Исследованные антибиотики включали цефотаксим (CTX, Liofilchem, Италия), цефотаксим с клавулановой кислотой (CTL, Liofilchem, Италия), цефтазидим (CAZ, Liofilchem, Италия) и цефтазидим с клавулановой кислотой (CAL, Liofilchem, Италия). Подтверждено, что полученные штаммы производят β-лактамазу расширенного спектра (ESBL) при наблюдаемых зонах устойчивости к CTL или/i CAL, как минимум на 5 мм превышающих зоны устойчивости к CTX и CAZ.

Присутствие AmpC энзима β-лактамазы было определено путем тестирования штаммов на предмет устойчивости к цефотаксиму, цефотаксиму в комбинации с клаксациллином, цефтазидиму и цефтазидиму в комбинации с клаксациллином согласно рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов (США). Когда наблюдаемые зоны устойчивости к CTC или/i SAC как минимум на 5 мм превышали наблюдаемые зоны устойчивости к CTX и CAZ, это расценивалось как подтверждение того, что тестируемые бактерии являются продуцентами кодированной плазмидами β-лактамазы.

Результаты и их обсуждение. *Pseudomonas spp.* в сырых овощах. Полученные результаты показали, что 39 из 180 образцов готовой к употреблению зелени, приобретенной в ресторанах (как часть таких блюд, как утка на гриле, bun cha, фаршированные блинчики, pho, макароны и лапша), содержали *Pseudomonas spp.*, предположительно с наличием оксидазоположительных колоний; *Pseudomonas spp.* были основным штаммом (рис. 1). Различия

в количестве бактерий *Pseudomonas spp.*, обнаруженных в образцах, полученных в разных районах, были незначительными ($p > 0,05$).

Результаты, сходные с нашим исследованием относительно наличия бактерий *Pseudomonas spp.* в готовой к употреблению зелени, были также получены в исследованиях, проведенных в других странах, таких как Италия ($n = 24$), Индия ($n = 12$, культуры были собраны из помидоров, огурцов и картофеля) и Нигерия ($n = 82$) [5, 10, 11]. Как известно, бактерии *Pseudomonas spp.* являются наиболее распространенными, вызывающими порчу многих пищевых продуктов. Это определяется их крайне простыми пищевыми запросами и метаболической изменчивостью, что позволяет им существовать в самой разной среде. Загрязнение почв и воды, используемой для ирригации, могут привести к появлению бактерий *Pseudomonas spp.* в овощах, готовых к употреблению. Многочисленные исследования показали, что вода играет важную роль в прямом проникновении бактерий в продукты питания как до, так и после сбора урожая [12–14]. И именно в период, предшествующий сбору урожая, овощи могут быть загрязнены бактериями *Pseudomonas spp.* вследствие их присутствия в воде, используемой для ирригации. Заражение также может произойти и в период уже после сбора урожая, особенно во время промыва или хранения.

Идентификация бактерий *Pseudomonas spp.* с помощью Vitek®MS. Полученные колонии были идентифицированы с помощью Vitek®MS. Мы определили три штамма *Pseudomonas spp.*, включая условно патогенные организмы (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina* и *Pseudomonas putida*). Среди них большую часть составляли бактерии *P. putida* (36 из 39 штаммов, или 92 %). Также присутствовали два штамма *P. aeruginosa* (5 %) и один штамм *P. Mendocina* (3 %) (рис. 2).

Результаты идентификации более чем на 90 % схожи с таковыми, содержащимися в библиотеке

системы идентификации VITEK MS, на 99,4–99,9 % – для *P. putida* и на 99,9 % – для *P. aeruginosa* и *P. Mendocina* (рис. 3).

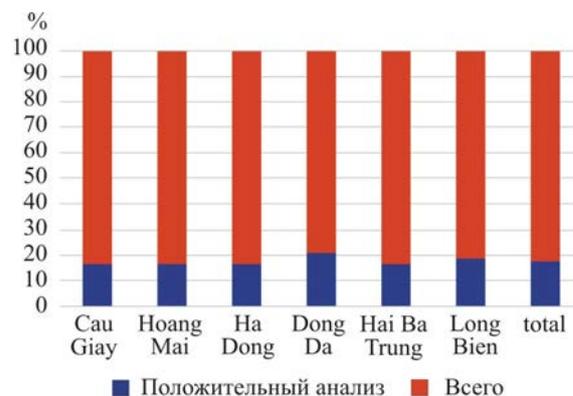


Рис. 1. Гистограмма, иллюстрирующая присутствие бактерий *Pseudomonas spp.* в готовой к употреблению зелени, приобретенной в ресторанах в разных районах Ханоя

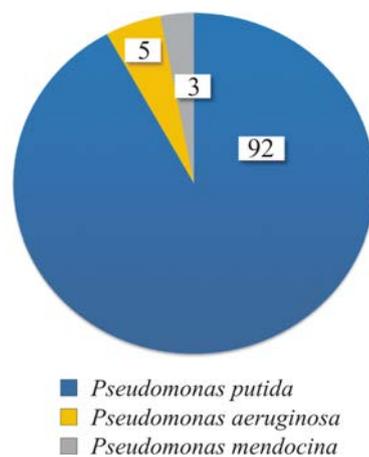


Рис. 2. Доли различных штаммов *Pseudomonas spp.*, выделенных в данном исследовании, %

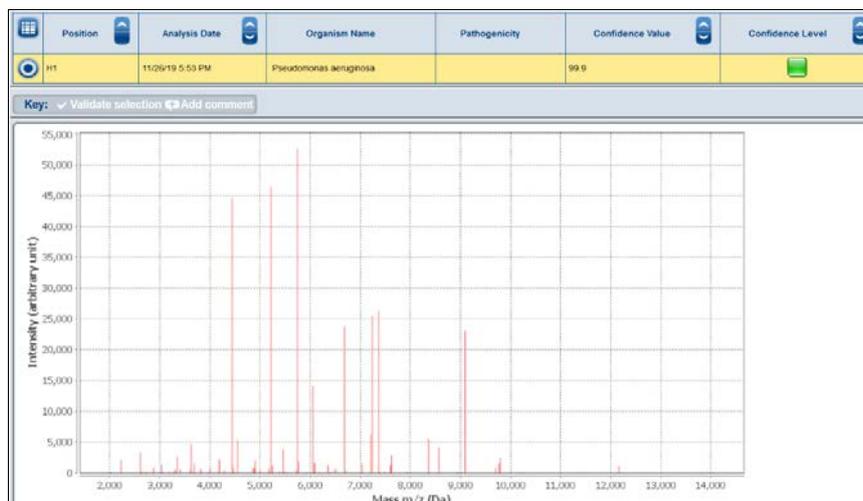


Рис. 3. Спектр *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из овощей, готовых употреблению

Штаммы *Pseudomonas spp.*, производящие ферменты β-лактамазы

<i>Pseudomonas spp.</i>	Район	Продукт	ESBL	AmpC	ESBL & AmpC
<i>P. aeruginosa</i>	Cau Giay	Полынь, листья Perilla, вьетнамский базилик	+	+	+
<i>P. putida</i>		Тайский базилик	+	–	–
<i>P. putida</i>		Латук, вьетнамский базилик, мята	+	+	+
<i>P. putida</i>	Hoang Mai	Листья Perilla, мята	–	+	–
<i>P. putida</i>		Вьетнамский базилик, листья Perilla, мята, огурец	+	–	–
<i>P. putida</i>		Кинза, вьетнамский базилик, латук, салат	–	+	–
<i>P. putida</i>	Ha Dong	Мята, латук	+	–	–
<i>P. putida</i>		Вьетнамский бальзам, латук	–	+	–
<i>P. putida</i>	Dong Da	Мята, салат, вьетнамский бальзам	+	–	–
<i>P. putida</i>		Латук, листья Perilla, кинза	–	+	–
<i>P. putida</i>		Зеленый лук, мята	+	+	+
<i>P. putida</i>	Hai Ba Trung	Тайский базилик, полынь	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>		Тайский базилик, полынь	+	+	+
<i>P. putida</i>	Long Bien	Кинза, зеленый лук	+	–	–
<i>P. putida</i>		Латук	–	+	–
<i>P. putida</i>		Латук, листья Perilla	+	–	–

Примечания: «+» – положительный результат; «–» – отрицательный результат.

Результаты данного исследования сходны с таковыми, полученными в исследовании Caldera et al. (2016), посвященном присутствию бактерий *Pseudomonas spp.* в зелени, и исследовании Franzetti et al., которые анализировали образцы зелени, собранные в Милане в 2007 г. [10, 15]. Еще одно исследование, проведенное Devarajan et al. (2017) в Конго, Индии и Швейцарии, выявило наличие 141 штамма *Pseudomonas spp.* в образцах неочищенных сточных вод из больниц и домашних хозяйств; штаммы *P. putida* (42 %) и *P. aeruginosa* (39 %) были основными среди обнаруженных бактерий *Pseudomonas spp.* Еще одно исследование воды из реки Дунай (Австрия), проведенное Kittinger et al. в 2016 г., показало, что 66,0 % ($n = 520$) выделенных штаммов являлись *Pseudomonas putida*, а 27,1 % – *Pseudomonas fluorescens*, также были обнаружены два штамма *Pseudomonas aeruginosa* и менее пяти других штаммов *Pseudomonas*. Большое количество бактерий *Pseudomonas spp.* также было обнаружено в сырых и ферментированных овощах, как показывают более ранние исследования [16, 17]. Использование навоза, загрязненного бактериями *Pseudomonas spp.*, в качестве удобрения или проникновение загрязненного кала животных в почву может стать источником загрязнения овощей бактериями *Pseudomonas spp.* Более того, в большинстве развивающихся стран, таких как Вьетнам, сточные воды напрямую сливаются из канализации в реки и озера, используемые для ирригации посевов, что приводит к появлению бактерий *Pseudomonas spp.* в сырых овощах. Между тем, если в ресторанах овощи должным образом не промываются, то обработка недостаточно эффективна с точки зрения удаления бактерий с поверхности пищевых продуктов, и вероятность заражения сохраняется.

Pseudomonas spp., продуцирующие β-лактамазу. 39 идентифицированных штаммов *Pseudomonas spp.* использовались для антимикробного тестирования в соответствии с каждой β-лактамазой. Результаты показали, что 16 штаммов *Pseudomonas spp.*, обнаруженных в овощах, приобретенных в ресторанах в шесть районах, производили ферменты β-лактамазы; из них шесть штаммов – β-лактамазу расширенного спектра (ESBL), пять штаммов *Pseudomonas* производили кодированную плазмиды β-лактамазу AmpC, а пять штаммов – оба типа. Производили ее и все 16 штаммов, принадлежащих к *P. putida* и *P. aeruginosa*, из них два штамма *P. aeruginosa* и три – *Pseudomonas putida* производили оба фермента (таблица).

В исследовании, проведенном в Нигерии в 2016 г. Odumosu et al., штаммы *P. aeruginosa* были обнаружены в 54 из 82 образцов зелени; 10 из этих 54 штаммов продуцировали лактамазу расширенного спектра (ESBL) [5]. Результаты, полученные Odumosu, превосходят данные нашего исследования вследствие географических различий, размера образца, условий выращивания, а также санитарных условий. Несмотря на то что готовая к употреблению зелень является превосходным источником витаминов и питательных веществ, она также может стать источником патогенного загрязнения, опасного для здоровья, служа источником бактерий, устойчивых к антибиотикам.

Выводы. В данном исследовании в 180 образцах готовой к употреблению зелени, приобретенных в ресторанах Ханоя, выявили наличие 16 штаммов *Pseudomonas spp.*, продуцирующих β-лактамазу. Количество бактерий *Pseudomonas*, обнаруженных в готовой к употреблению зелени, было ниже в нашем исследовании, чем в исследованиях, осуществленных в других странах мира.

К подобному различию между результатами исследований могут привести географические различия, размер выборки, а также место отбора проб.

Необходимо осуществлять дальнейшие исследования генетических характеристик и способности передавать гены, определяющие устойчивость к антибиотикам, другим грамотрицатель-

ным бактериям в сходных условиях окружающей среды.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Vietnam food safety risks management: challenges and opportunities. Technical working paper [Электронный ресурс]. – Hanoi, Vietnam: The World Bank, 2017. – URL: <http://documents.worldbank.org/curated/en/415551490718806138/technical-working-paper> (дата обращения: 04.01.2020).
2. Wisplinghoff H. *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* and *Miscellaneous Gram-Negative Bacilli* // Infectious Disease. – 2017. – P. 1579–1599. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00181-7
3. Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas spp.* Isolated from the River Danube / C. Kittinger, M. Lipp, R. Baumert, B. Folli, G. Koraimann, D. Toplitsch, A. Liebmann, A. Grisold [et al.] // Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 3, № 7. – P. 586. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00586
4. Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances – *Pseudomonas spp.* Pathogen safety data sheet – infectious substances [Электронный ресурс] // The official website of the Government of Canada. – URL: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/pseudomonas.html> (дата обращения: 04.01.2020).
5. Antibiotic susceptibility pattern and analysis of plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* from human, animal and plant sources / B.T. Odumosu, O. Ajetunmobi, H. Dada-Adegbola, I. Odutayo // Springer Plus. – 2016. – Vol. 22, № 5 (1). – P. 1381. DOI: 10.1186/s40064-016-3073-9
6. Pfeifer Y., Cullik A., Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens // Int. J. Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 300, № 6. – P. 371–379. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.04.005
7. Meat and meat products – Enumeration of presumptive *Pseudomonas spp.* Irish Standard. I.S. EN ISO 13720: 2010 [Электронный ресурс]. – 2010. – 11 p. – URL: https://infostore.saiglobal.com/preview/98699262082.pdf?sku=874780_SAIG_NSAI_NSAI_2079666 (дата обращения: 04.01.2020).
8. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing / M.P. Weinstein, J.B. Patel, A.M. Bobenchik, S. Campeau, S.K. Cullen, M.F. Galas, H. Gold, R.M. Humphries [et al.] // Clinical and Laboratory Standards Institute. – 2019. – Vol. 39, № 1. – P. 25.
9. WHO Global Foodborne Infections Network (formerly WHO Global Salm-Surv). Laboratory Protocol: «Susceptibility testing of Enterobacteriaceae using disk diffusion» / S. Karlsomse ed. // World Health Organization. – Department for Microbiology and Risk Assessment National Food Institute Technical University of Denmark, Copenhagen, 2010. – 11 p.
10. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas spp.* isolated from different foods / L. Caldera, L. Franzetti, E. Van Coillie, P. De Vos, P. Stragier, J. De Block, M. Heyndrickx // Food Microbiology. – 2016. – Vol. 54. – P. 142–153. DOI: 10.1016/j.fm.2015.10.004
11. Thapar P., Garcha S. Incidence and characterization of *Pseudomonas* species isolated from spoiled fresh produce // Indian Journal of Experimental Biology. – 2017. – Vol. 55. – P. 372–376.
12. Antibiotic resistant *Pseudomonas spp.* in the aquatic environment: A prevalence study under tropical and temperate climate conditions / D. Naresh, T. Kohler, P. Sivalingam, C. Van Delden, C.K. Mulaji, P.T. Mpiana, B.W. Ibelings, J. Poté // Water Research. – 2017. – Vol. 115. – P. 256–265. DOI: 10.1016/j.watres.2017.02.058
13. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water / A.J. Hamilton, F. Stagnitti, R. Premier, A.M. Boland, G. Hale // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72, № 5. – P. 3284–3290. DOI: 10.1128/AEM.72.5.3284-3290.2006
14. Tyrrel S.F., Knox J.W., Weatherhead E.K. Microbiological water quality requirements for salad irrigation in the United Kingdom // Journal of Food Protection. – 2006. – Vol. 69, № 8. – P. 2029–2035. DOI: 10.4315/0362-028x-69.8.2029
15. Franzetti L., Scarpellini M. Characterisation of *Pseudomonas spp.* isolated from foods // Annals of Microbiology. – 2007. – Vol. 57, № 1. – P. 39–47. DOI: 10.1007/BF03175048
16. Kashina A.-F., Brown P.D. Diversity of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Fresh Vegetables // International Journal of Microbiology. – 2012. – № 6. – P. 426241. DOI: 10.1155/2012/426241
17. Liu D., Tong C. Bacterial community diversity of traditional fermented vegetables in China // LWT – Food Science and Technology. – 2017. – № 86. – P. 40–48. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.07.040

Выделение и идентификация Pseudomonas spp., продуцирующих β-лактамазу, в готовой к употреблению столовой зелени / Нгуэн Тан Чунг, Хонг Нгуэн Мин, Фам Ти Лоан, Ли Ти Хонг Хао, Та Ти Иен // Анализ риска здоровью. – 2020. – № 1. – С. 101–107. DOI: 10.21668/health.risk/2020.1.11

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF β -LACTAMASE PRODUCING PSEUDOMONAS SPP. IN READY-TO-EAT RAW VEGETABLES**Nguyen Thanh Trung^{1,2}, Huong Nguyen Minh², Pham Thi Loan¹,
Le Thi Hong Hao¹, Ta Thi Yen¹**¹National Institute for Food Control, 65 Pham Than Duat Str., Hanoi, Vietnam²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet 1, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Contamination of antibiotic-resistant bacterial pathogens in raw food is becoming an increased health risk in numerous countries, including Vietnam where raw herbs and vegetables are used daily in many dishes as a flavor enhancer and a source of vitamin and nutrients. However, raw vegetables can also be a reservoir of various foodborne pathogens such as *Pseudomonas* spp. and *Enterobacteriaceae*. In this study, we evaluated the extent of *Pseudomonas* spp. contamination in 180 ready-to-eat (RTE) vegetables samples from restaurants in Hanoi, examined their antibiotic susceptibility profiles and determined the ability to produce β -lactamase enzymes of *Pseudomonas* spp. strains. Our results showed that 21.67 % (n = 39) of ready-to-eat vegetables samples in Hanoi were contaminated with *Pseudomonas* spp.. Of those, sixteen samples were determined to be β -lactamase producing strains including *Pseudomonas putida*, *P. mendocina* and *P. aeruginosa*. Further analysis revealed six strains (37.50 %) producing extended spectrum β -lactamase (ESBL) enzyme, five strains (31.25 %) producing ampC β -lactamase enzyme and five strain (31.25 %) producing both ESBL and ampC β -lactamases. It can be concluded that ready-to-eat vegetables in Hanoi would be a source of contamination of β -lactamase producing *Pseudomonas* spp. that could pose a threat to public health in the community.

Keywords: food, ready-to-eat vegetables, contamination of antibiotic-resistant bacterial pathogens, *Pseudomonas* spp., health risks.

References

1. Vietnam food safety risks management: challenges and opportunities. Technical working paper. Hanoi, Vietnam: The World Bank, 2017. Available at: <http://documents.worldbank.org/curated/en/415551490718806138/technical-working-paper> (04.01.2020).
2. Wisplinghoff H. *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and *Miscellaneous Gram-Negative Bacilli*. *Infectious Disease*, 2017, pp. 1579–1599. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00181-7
3. Kittinger C., Lipp M., Baumert R., Folli B., Koraimann G., Toplitsch D., Liebmann A., Grisold A. [et al.]. Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube. *Front. Microbiol*, 2016, vol. 3, no. 7, pp. 586. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00586
4. Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances – *Pseudomonas* spp. Pathogen safety data sheet – infectious substances. *The official website of the Government of Canada*. Available at: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/pseudomonas.html> (04.01.2020).
5. Odumosu B.T., Ajetunmobi O., Dada-Adegbola H., Odutayo I. Antibiotic susceptibility pattern and analysis of plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* from human, animal and plant sources. *Springer Plus*, 2016, vol. 22, no. 5 (1), pp. 1381. DOI: 10.1186/s40064-016-3073-9
6. Pfeifer Y., Cullik A., Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int. J. Med. Microbiol*, 2010, vol. 300, no. 6, pp. 371–379. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.04.005
7. Meat and meat products – Enumeration of presumptive *Pseudomonas* spp. Irish Standard. I.S. EN ISO 13720:2010. 2010, 11 p. Available at: https://infostore.saiglobal.com/preview/98699262082.pdf?sku=874780_SAIG_NSAI_NSAI_2079666 (04.01.2020).

© Nguyen Thanh Trung, Huong Nguyen Minh, Pham Thi Loan, Le Thi Hong Hao, Ta Thi Yen, 2020

Nguyen Thanh Trung – Associate Professor, PhD, Head of Laboratory of food microbiology and genetically modified food (e-mail: trungnt@nifc.gov.vn; tel.: +8 (434) 936-32-69; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8732-9911>).

Huong Nguyen Minh – Associate Professor (e-mail: nguyen.huong.m@gmail.com; tel.: +8 (491) 556-24-85; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5302-2973>).

Pham Thi Loan – Researcher at the Laboratory of food microbiology (e-mail: trang2103@gmail.com; tel.: +8 (498) 536-43-52; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2315-9722>).

Le Thi Hong Hao – PhD, Managing Director (e-mail: lethihonghao@yahoo.com; tel.: +8 (490) 424-81-67; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3570-8570>).

Ta Thi Yen – Researcher at the Laboratory of food microbiology (e-mail: yenta@gmail.com; tel.: +8 (490) 495-90-50; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3364-4887>).

8. Weinstein M.P., Patel J.B., Bobenchik A.M., Campeau S., Cullen S.K., Galas M.F., Gold H., Humphries R.M. [et al.]. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2019, vol. 39, no. 1, pp. 25.
9. WHO Global Foodborne Infections Network (formerly WHO Global Salm-Surv). Laboratory Protocol: «Susceptibility testing of Enterobacteriaceae using disk diffusion». In: S. Karlsmose ed. *World Health Organization*, Department for Microbiology and Risk Assessment National Food Institute Technical University of Denmark, Copenhagen, 2010, 11 p.
10. Caldera L., Franzetti L., Van Coillie E., De Vos P., Stragier P., De Block J., Heyndrickx M. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas spp.* isolated from different foods. *Food Microbiology*, 2016, vol. 54, pp. 142–153. DOI: 10.1016/j.fm.2015.10.004
11. Thapar P., Garcha S. Incidence and characterization of *Pseudomonas* species isolated from spoiled fresh produce. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2017, vol. 55, pp. 372–376.
12. Naresh D., Kohler T., Sivalingam P., Van Delden C., Mulaji C.K., Mpiana P.T., Ibelings B.W., Poté J. Antibiotic resistant *Pseudomonas spp.* in the aquatic environment: A prevalence study under tropical and temperate climate conditions. *Water Research*, 2017, vol. 115, pp. 256–265. DOI: 10.1016/j.watres.2017.02.058
13. Hamilton A.J., Stagnitti F., Premier R., Boland A.M., Hale G. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, vol. 72, no. 5, pp. 3284–3290. DOI: 10.1128/AEM.72.5.3284-3290.2006
14. Tyrrel S.F., Knox J.W., Weatherhead E.K. Microbiological water quality requirements for salad irrigation in the United Kingdom. *Journal of Food Protection*, 2006, vol. 69, no. 8, pp. 2029–2035. DOI: 10.4315/0362-028x-69.8.2029
15. Franzetti L., Scarpellini M. Characterisation of *Pseudomonas spp.* isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 2007, vol. 57, no. 1, pp. 39–47. DOI: 10.1007/BF03175048
16. Kashina A.-F., Brown P.D. Diversity of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Fresh Vegetables. *International Journal of Microbiology*, 2012, no. 6, pp. 426241. DOI: 10.1155/2012/426241
17. Liu D., Tong C. Bacterial community diversity of traditional fermented vegetables in China. *LWT – Food Science and Technology*, 2017, no. 86, pp. 40–48. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.07.040

Nguyen Thanh Trung, Huong Nguyen Minh, Pham Thi Loan, Le Thi Hong Hao, Ta Thi Yen Isolation and identification of β -lactamase producing *pseudomonas spp.* in ready-to-eat raw vegetables. *Health Risk Analysis*, 2020, no. 1, pp. 101–107. DOI: 10.21668/health.risk/2020.1.11.eng

Получена: 09.01.2020.

Принята: 09.02.2020

Опубликована: 30.03.2020