

论著

进口乳制品中克罗诺阪崎肠杆菌分离株耐药性研究

张西萌,曾静,魏海燕,付溥博,韩笑

(北京出入境检验检疫局,北京 100026)

摘要:目的 对进口乳制品中克罗诺阪崎肠杆菌分离株的耐药性进行研究。方法 采用纸片扩散法对99株克罗诺阪崎肠杆菌分离株和1株标准菌株进行药敏性试验,共选择7大类20种抗生素。结果 所测试的100株菌株对美洛西林、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、阿米卡星、卡那霉素、妥布霉素、氯霉素、头孢吡肟、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢他啶、环丙沙星和诺氟沙星敏感;对苯唑西林产生耐药;对头孢噻吩、氨苄西林、头孢唑啉、和四环素具有不同程度的耐药性,耐药率分别为65.0%、17.0%、3.0%和2.0%;对头孢唑啉、头孢噻吩、氨苄西林、头孢曲松和四环素中介率分别为25.0%、23.0%、6.0%、2.0%和1.0%;13株对3种抗生素耐药,4株表现多重耐药性。结论 进口乳制品中克罗诺阪崎肠杆菌分离株对所测试的大多数抗生素敏感,但对苯唑西林全部耐药,对部分抗生素出现较高的耐药和多重耐药性,因此克罗诺阪崎肠杆菌的耐药性应引起广泛的社会关注。

关键词:乳制品;克罗诺阪崎肠杆菌;耐药性;食源性致病菌

中图分类号:R155.5;TS201.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)04-0320-04

Study on antibiotic resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from imported dairy product

ZHANG Xi-meng, ZENG Jing, WEI Hai-yan, FU Pu-bo, HAN Xiao

(Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

Abstract: Objective To investigate antibiotic resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from imported dairy products.

Methods 100 strains of *Cronobacter sakazakii* were tested for antibiotic susceptibility by disk diffusion recommended by the National Committee of Clinical laboratory Standard. **Results** All strains were sensitive to Mezlocillin, Imipenem, Meropenem, Gentamicin, Amikacin, Kanamycin, Tobramycin, Chloramphenicol, Cefepime, Cefoperazone, Cefotaxime Sodium, Ceftazidime, Pentahydrate, Ciprofloxacin and Norfloxacin, while resistant to Proctaphlin Sodium. The ratio of resistant strains to Ampicillin, Cefalotin, Cefazolin Sodium, Sodium and Tetracycline was 65%, 17%, 3% and 2%, respectively. The ratio of intermediate resistant strains to Ampicillin, Cefazolin Sodium, Cefalotin Sodium, Ceftriaxone Sodium, Tetracycline was 25%, 23%, 6%, 2% and 1% respectively. 13 strains were multiresistant to 3 kinds of antibiotics and 4 strain was multiresistant. **Conclusion** *Cronobacter sakazakii* strains isolated from imported dairy products were susceptible to most of the tested antibiotics, but resistance were increasing. In this study, All drug resistant strains to oxacillin. Hereby, the issue of *Cronobacter sakazakii* multiresistance should arouse abroad attention worldwide.

Key words: Dairy products; *cronobacter sakazakii*; antibiotic resistance; food-borne pathogen

克罗诺阪崎肠杆菌(*Cronobacter sakazakii*)属肠杆菌科肠杆菌属,周生鞭毛、无芽孢、短杆状、产黄色素、兼性厌氧的革兰氏阴性杆菌。自1980年后,由阴沟肠杆菌更名为阪崎肠杆菌^[1]。2008年Icersen等^[2]研究发现阪崎肠杆菌原有的16种生物群在基因型上存在较大差异性,并将其重新划分成

一个新属,即克罗诺杆菌属,因此将阪崎肠杆菌正式更名为克罗诺阪崎肠杆菌。克罗诺阪崎肠杆菌属肠道细菌,在一定条件下可引起人畜患病^[3],其在自然界中分布广泛,从水、土壤、乳制品中均可分离出该菌。由于克罗诺阪崎肠杆菌属于肠道正常菌群的一种,因此在临床上并未受到足够重视^[4],直至1961年英国人Urmenyi和Franklin^[5]首次报道由克罗诺阪崎肠杆菌引起的两例脑膜炎病例,随后美国、荷兰、加拿大、希腊、比利时等多国相继出现了新生儿克罗诺阪崎肠杆菌感染事件,克罗诺阪崎肠杆菌的危害性才逐步引起大家的重视。近几年,我国不断发生与克罗诺阪崎肠杆菌相关的乳

收稿日期:2013-05-09

基金项目:国家质量监督检验检疫总局科研项目(2010IK190)

作者简介:张西萌 女 工程师 研究方向为食品微生物检测

Email:zhangxm@bjciq.gov.cn

通讯作者:曾静 女 研究员 研究方向为食品微生物

E-mail:zengj@bjciq.gov.cn

制品安全事件,例如2004年安徽阜阳出现的“大头婴儿”事件,据该市县级以上医疗机构核查统计,从2003年5月以来,因食用劣质奶粉出现营养不良综合症共171例,死亡13例,病死率7.6%。从87份阜阳劣质奶粉样品中检测出11份克罗诺阪崎肠杆菌阳性样品,污染阳性率为12.6%。本文对从近几年进口乳制品中分离的100株克罗诺阪崎肠杆菌菌株进行针对7大类20种抗生素的耐药性研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

标准菌株:克罗诺阪崎肠杆菌(ATCC 29544),质控菌株为大肠埃希氏菌(ATCC 25922)均购自美国标准菌种保藏中心。

分离菌株:2007—2010年北京出入境检验检疫局食品实验室分离自进口乳制品的99株分离株,所有分离株均经法国梅里埃公司生产的VITEK微生物自动鉴定仪鉴定,菌株信息见表1。

表1 99株克罗诺阪崎肠杆菌分离株信息表

Table 1 99 strains of *C. sakazakii* isolates information table

菌种编号	样品名称	保存日期	菌种编号	样品名称	保存日期
BJ-E. sa-11	奶粉	2007-07-27	BJ-E. sa-115	彩虹露冰激凌	2009-11-03
BJ-E. sa-16	婴儿配方奶粉	2007-09-14	BJ-E. sa-116	芒果狂热冰激凌	2009-11-03
BJ-E. sa-17	婴儿配方奶粉	2007-09-14	BJ-E. sa-117	芝士碎	2009-11-12
BJ-E. sa-18	高钙低脂营养奶粉	2007-09-14	BJ-E. sa-118	烹饪奶油	2009-11-12
BJ-E. sa-20	全脂奶粉	2007-09-14	BJ-E. sa-119	淡奶油	2009-11-12
BJ-E. sa-22	脱脂奶粉	2007-09-14	BJ-E. sa-120	车达芝士	2009-11-12
BJ-E. sa-25	香草种籽粉	2007-11-17	BJ-E. sa-121	淡奶油	2009-11-12
BJ-E. sa-38	奶粉	2007-12-29	BJ-E. sa-122	鲜奶油	2009-11-17
BJ-E. sa-39	奶粉	2007-12-29	BJ-E. sa-125	干酪	2009-11-17
BJ-E. sa-40	奶粉	2007-12-29	BJ-E. sa-127	黄波奶酪	2009-11-19
BJ-E. sa-41	奶粉	2007-12-29	BJ-E. sa-128	黄波奶酪	2009-11-19
BJ-E. sa-46	蛋白质粉	2008-07-11	BJ-E. sa-129	红波奶酪	2009-11-19
BJ-E. sa-47	蛋白质粉	2008-07-11	BJ-E. sa-133	冰激凌	2009-11-24
BJ-E. sa-48	精炼乳清蛋白粉	2008-07-17	BJ-E. sa-131	花生奶油冰激凌	2009-11-20
BJ-E. sa-49	乳清蛋白粉(巧克力味)	2008-07-17	BJ-E. sa-132	摩卡冰激凌	2009-11-20
BJ-E. sa-50	乳清蛋白粉(香草味)	2008-07-17	BJ-E. sa-135	草莓乳酪奶米粉	2009-11-24
BJ-E. sa-51	香草奶昔粉	2008-08-07	BJ-E. sa-146	乳酪(熏制芝士片)	2009-11-26
BJ-E. sa-54	奶酪粉	2008-11-04	BJ-E. sa-147	碎芝士	2009-11-26
BJ-E. sa-56	全盐混合面包粉	2008-11-04	BJ-E. sa-150	可动物饼干	2009-11-27
BJ-E. sa-57	半盐混合面包粉	2008-11-04	BJ-E. sa-151	什锦饼干	2009-11-27
BJ-E. sa-60	巧克力装饰	2008-11-21	BJ-E. sa-152	奶油可可椰蓉曲奇	2009-11-27
BJ-E. sa-62	巧克力装饰	2008-11-21	BJ-E. sa-153	迷你可可牛角饼干	2009-11-27
BJ-E. sa-64	巧克力装饰	2008-11-21	BJ-E. sa-154	奶油可可花生曲奇	2009-11-27
BJ-E. sa-68	脱脂牛奶	2008-12-18	BJ-E. sa-155	奶油夹心饼干	2009-11-27
BJ-E. sa-72	分离乳清	2009-01-21	BJ-E. sa-156	香香味夹心可可饼干	2009-11-27
BJ-E. sa-73	植物黄油(原味)	2009-01-21	BJ-E. sa-157	有机较大婴儿配方奶粉2	2009-11-27
BJ-E. sa-74	植物黄油(原味)	2009-01-21	BJ-E. sa-163	无盐黄油10G装	2010-01-21
BJ-E. sa-75	植物黄油(低盐)	2009-01-21	BJ-E. sa-165	全脂奶粉	2010-02-09
BJ-E. sa-76	植物软滑黄油	2009-01-21	BJ-E. sa-166	牛奶糖(黑芝麻)	2010-03-02
BJ-E. sa-77	植物软滑黄油	2009-01-21	BJ-E. sa-168	黑糖牛奶糖	2010-03-02
BJ-E. sa-78	芥花籽植物黄油	2009-01-21	BJ-E. sa-170	红豆牛奶糖	2010-03-02
BJ-E. sa-79	植物黄油	2009-01-21	BJ-E. sa-172	甜酒葡萄干冰激凌	2010-03-02
BJ-E. sa-80	植物黄油	2009-01-21	BJ-E. sa-174	花生牛奶巧克力冰激凌	2010-03-02
BJ-E. sa-81	浓缩乳清蛋白	2009-01-21	BJ-E. sa-176	蓝山莓露冰激凌	2010-03-02
BJ-E. sa-82	婴儿配方奶粉I段	2009-03-12	BJ-E. sa-183	奶油乳酪	2010-03-11
BJ-E. sa-83	婴儿配方奶粉(山羊奶)	2009-03-12	BJ-E. sa-191	全脂奶粉	2010-03-30
BJ-E. sa-84	婴儿配方奶粉II段	2009-03-12	BJ-E. sa-194	干乳酪	2010-04-01
BJ-E. sa-85	婴儿牛奶香蕉全麦粉	2009-03-12	BJ-E. sa-196	干乳酪	2010-04-01
BJ-E. sa-86	婴儿米粉	2009-03-12	BJ-E. sa-198	马苏里拉乳酪	2010-04-01
BJ-E. sa-88	婴儿什锦水果味全麦粉	2009-03-12	BJ-E. sa-208	全脂奶粉	2010-04-19
BJ-E. sa-89	婴儿小米粉	2009-03-12	BJ-E. sa-210	奶油糖果香草冰激凌	2010-04-20
BJ-E. sa-90	婴儿粗麦粉	2009-03-12	BJ-E. sa-212	碎花摩卡冰激凌	2010-04-20
BJ-E. sa-93	全脂牛奶	2009-03-23	BJ-E. sa-215	无盐黄油	2010-05-13
BJ-E. sa-94	婴儿奶粉I段	2009-03-24	BJ-E. sa-217	较大婴儿配方奶粉	2010-05-13
BJ-E. sa-95	婴儿奶粉II段	2009-03-24	BJ-E. sa-218	车达乳酪	2010-05-13
BJ-E. sa-106	奶油冰激凌	2009-08-05	BJ-E. sa-219	幼儿成长型配方奶粉	2010-05-13
BJ-E. sa-107	巧克力冰激凌	2009-08-05	BJ-E. sa-231	冰激凌原料粉	2010-07-15
BJ-E. sa-111	干奶酪	2009-10-29	BJ-E. sa-232	原味冰激凌原料粉	2010-07-15
BJ-E. sa-112	芝士碎	2009-10-29	BJ-E. sa-233	慕斯冰激凌原料粉	2010-07-15
BJ-E. sa-114	淡奶油	2009-10-29			

1.1.2 仪器与试剂

恒温培养箱(36 ± 1)℃、气浴摇床(36 ± 1)℃、振荡器、McFarland 标准比浊仪、电子数显卡尺(LINKS, 中国)。

MH 琼脂(梅里埃, 法国), 20 种药敏纸片、脑心浸液(BHI)肉汤、胰蛋白胨大琼脂(TSA)(OXOID, 英国)。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验

按照美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐的肠杆菌药敏试验抗生素选择原则, 选择7类共20种抗生素, 名称及使用浓度见表2。采用NCCLS推荐的纸片扩散法进行药敏性试验。

表2 克罗诺阪崎肠杆菌药敏实验所用抗生素及浓度

Table 2 Antibiotics used in the susceptibility testing

of <i>C. sakazakii</i>		
抗生素	代码	浓度/μg
青霉素类		
氨苄西林	AMP	10
美洛西林	MEZ	75
苯唑西林	OXA	1
碳青霉烯类		
亚胺培南	IPM	10
美罗培南	MEM	10
氨基糖苷类		
庆大霉素	GEN	10
阿米卡星	AK	30
卡那霉素	KAN	30
妥布霉素	TOB	10
氯霉素类		
氯霉素	C	30
头孢类		
头孢唑啉	CFZ	30
头孢噻吩	KF	30
头孢吡肟	FEP	30
头孢哌酮	CFP	75
头孢噻肟	CTX	30
头孢曲松	CRO	30
头孢他啶	CAZ	30
喹诺酮类		
环丙沙星	CIP	5
诺氟沙星	NOR	10
四环素类		
四环素	TE	30

1.2.2 菌株复苏

将保存在-80℃低温冰箱中的实验菌株取出, 接种于BHI肉汤中, 37℃过夜培养, 将肉汤培养物划线接种于TSA琼脂上, (36 ± 1)℃培养24 h 复苏菌株。

1.2.3 菌悬液制备

用灭菌接种环接种一个单独菌落加入10 ml BHI肉汤中, 放入气浴摇床中, 倾斜45°, 200 r/min, 8~10 h 过夜培养。其后用0.85%生理盐水稀释

BHI肉汤, 配制成0.5 McFarland(麦氏标准)的菌悬液, 即相当于菌液浓度为 1.5×10^8 cfu/ml。

1.2.4 接种与贴片

用无菌棉拭子取浓度为0.5麦氏的菌液, 挤压去多余水分, 并均匀划线涂抹在MH琼脂上, 60°旋转共涂抹3次, 最后涂抹琼脂边缘, 用无菌眼科镊将药敏纸片均匀贴在表面无多余水分的平皿上, 15 min内贴完药片, 碰触平皿后不再挪动, (36 ± 1)℃培养16~20 h。

1.2.5 结果判读

用电子数显卡尺测量平皿抑菌环直径, 其边缘以肉眼看不到细菌明显生长为限。参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)药敏标准判读表对克罗诺阪崎肠杆菌进行结果判定。

2 结果

2.1 药敏性试验结果

99株克罗诺阪崎肠杆菌和1株标准菌株对20种抗生素中的14种表现敏感, 分别为美洛西林、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、阿米卡星、卡那霉素、妥布霉素、氯霉素、头孢吡肟、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢他啶、环丙沙星和诺氟沙星。5种表现出不同程度的耐药性, 分别为苯唑西林、头孢噻吩、氨苄西林、头孢唑啉和四环素; 5种出现中介情况, 分别为头孢唑啉、头孢噻吩、氨苄西林、四环素和头孢曲松。具体结果见表3。

表3 抗生素敏感性试验结果

Table 3 Antibiotic susceptibility of *C. sakazakii*

抗生素	耐药		中介		敏感	
	菌株数	耐药率/%	菌株数	中介率/%	菌株数	敏感率/%
氨苄西林	17	17	6	6	77	77
美洛西林	0	0	0	0	100	100
苯唑西林	100	100	0	0	0	0
亚胺培南	0	0	0	0	100	100
美罗培南	0	0	0	0	100	100
庆大霉素	0	0	0	0	100	100
阿米卡星	0	0	0	0	100	100
卡那霉素	0	0	0	0	100	100
妥布霉素	0	0	0	0	100	100
氯霉素	0	0	0	0	100	100
头孢唑啉	3	3	25	25	74	74
头孢噻吩	65	65	23	23	12	12
头孢吡肟	0	0	0	0	100	100
头孢哌酮	0	0	0	0	100	100
头孢噻肟	0	0	0	0	100	100
头孢曲松	0	0	1	1	99	99
头孢他啶	0	0	0	0	100	100
环丙沙星	0	0	0	0	100	100
诺氟沙星	0	0	0	0	100	100
四环素	2	2	2	2	96	96

2.2 菌株耐药谱分布

有 17 株分离菌株表现出对抗生素的多重耐药性,其中 13 株表现出对苯唑西林、氨苄西林和头孢噻吩多种耐药性,1 株表现出对苯唑西林、氨苄西林和头孢唑啉耐药性,1 株表现对苯唑西林、四环素和头孢唑啉多重耐药性,2 株表现出对苯唑西林、头孢噻吩和头孢唑啉多重耐药性,1 株表现对苯唑西林、四环素、头孢噻吩和头孢唑啉多重耐药性。耐药谱分布见表 4。

表 4 耐药谱分析

Table 4 Antibiotic-resistant of *C. sakazakii*

耐药谱	耐药菌株数
OXA	100
OXA-KF	61
OXA-AMP	4
OXA-AMP-KF	13
OXA-KF-CFZ	2
OXA-TE-KF	1
OXA-TE-KF-CFZ	1

2.3 婴幼儿配方乳中分离株的敏感性结果

15 株来自婴幼儿配方乳中分离株的抗生素敏感试验结果表明,15 株对苯唑西林、氨苄西林和头孢噻吩耐药率分别达到 100%、60% 和 73.3%,表现中介的抗生素有 3 种,氨苄西林 0.07%、头孢噻吩 26.7%、头孢唑啉 60%,对其他 16 种抗生素均 100% 敏感。药物敏感菌株对碳青霉烯类的亚胺培南、美罗培南以及喹诺酮类的环丙沙星、诺佛沙星高度敏感,抑菌环直径均达到 30 cm 以上。

3 讨论

克罗诺阪崎肠杆菌的易感人群主要是 1 岁以下的婴幼儿,特别是出生 28 d 内的早产儿、低体重儿或免疫力有缺陷的婴幼儿。该菌主要引起新生儿脑膜炎、小肠结肠炎和菌血症等疾病,并可能引起神经功能紊乱,造成严重的后遗症或死亡,死亡率高达 20% ~ 50%^[2]。大部分国家乳制品标准中明确规定适合 0 ~ 6 月龄婴儿食用的配方食品必须检测该项目。本研究针对 99 株分离自进口乳制品的克罗诺阪崎肠杆菌的耐药性进行了测试,结果表明绝大多数菌株对所测试的抗生素敏感,对革兰氏阴性菌有抑制作用的抗生素(如诺氟沙星、庆大霉素、美洛培南、亚胺培南等)对克罗诺阪崎肠杆菌都具有较强的抑制作用。有 4 株分离株表现出 3 ~ 4 重的多重耐药性,起抗生素种类为苯唑西林、氨苄西林、头孢噻吩、头孢唑啉和四环素。

流行病学研究表明婴幼儿配方食品是主要的污染来源。本研究表明,所有分离株对美洛西林敏感,这与裴晓燕^[6]等人、陆峥^[7]等人的婴儿配方奶

粉中阪崎肠杆菌耐药性结果有很大出入,分析原因,本研究采用的均为进口婴儿食品中的分离株,与国内奶粉因地域不同产生了差异性。由于美洛西林对产 β -内酰胺酶的肠杆菌不稳定,也是可能造成结果偏差的原因。

本研究采用的 7 种头孢类抗生素的药敏试验结果表明,克罗诺阪崎肠杆菌对其中 5 种抗生素的敏感性均为 10%,且这 5 种抗生素均为头孢类广谱抗生素;头孢唑啉和头孢噻吩均为头孢 1 代抗生素,属窄谱抗生素,出现了不同程度的耐药性。结果表明广谱抗生素对于克罗诺阪崎肠杆菌的抑制作用比窄谱抗生素更为明显,但不能盲目采用广谱抗生素,大剂量的使用可能会导致细菌的耐药性。与此同时,头孢类抗生素对肾脏有一定损伤作用,因此在使用时应注意剂量^[8]。

近年来,由于抗生素的滥用,使得耐药性微生物尤其是多重耐药性微生物的数量不断上升,一旦造成院内感染,甚至无药可医。滥用抗生素会严重损害动物机体免疫细胞的功能,可造成机体二重污染^[9]。近年来“超级细菌”的出现给医务工作者敲醒了警钟,如何正确使用抗生素是值得大家重新审视的问题。

参考文献

- [1] Famer J J., Asbury M A., Brenner D J., et al. *Enterobacter sakazakii*: a new species of “Enterobacteriaceae” isolated from clinical specimens [J]. *Int J System Bacteriol*, 1980, 30: 569-584.
- [2] Ieersen C, Mullane N, McCardell B, et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonicus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* sub sp. lausannensis sub sp. Nov. and *Cronobacter dublinensis* sub sp. lactaridi sub sp. Nov [J]. *Intl J System Evol Microbiol*, 2008, 58(6): 1442-1447.
- [3] 裴晓燕, 刘秀梅. 阪崎肠杆菌的生物学性状与健康危害 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2004, 16(4): 550-555.
- [4] 梁鹰, 王红戟. 阪崎肠杆菌研究进展 [J]. *中国微生物学杂志*, 2003, 20(4): 418-420.
- [5] Urmenyi A M, Franklin A W. A White-Franklin A Neonatal death from pigmented coliform infection [J]. *Lancet*, 1961, 1: 313-315.
- [6] 裴晓燕, 郭云昌, 徐进, 等. 婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌分离株的药敏分析 [J]. *卫生研究*, 2006, 36(1): 63-65.
- [7] 陆峥, 王丽丽, 王迪, 等. 国产婴幼儿配方奶粉及婴幼儿米粉中阪崎肠杆菌分离株的药敏分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(11): 2301-2302, 2310.
- [8] 神芳祥, 王燕. 浅谈抗生素的不合理应用 [J]. *中国实用医药*, 2011, 6(8): 158-159.
- [9] 万遂如. “超级细菌”出现后的反思 [J]. *中国家禽*, 2011, 33(22): 36-37.