

论著

克洛诺菌属(原阪崎肠杆菌)溯源数据库的建立

裴晓燕¹ 郭云昌¹ 周 正² 刘秀梅¹

- (1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050;
2. 河北省食品质量监督检验研究院,河北 石家庄 050051)

摘要:目的 建立克洛诺菌属溯源分析数据库。方法 应用 BioNumerics 软件,建立包括克洛诺菌属生物分型、抗生素敏感性、脉冲场凝胶电泳分型、核糖体分型、16S rDNA 全序列分析等方法的溯源分析数据库。结果 应用 BioNumerics 软件可以建立比较完整的克洛诺菌属溯源数据库,并可对所研究菌株进行系统分析,以及对各种分型方法进行比对分析。结论 利用该数据库的技术基础和不断完善的数据信息,可以及时有效地比较不同地域克洛诺菌属分离株的相似性,并估计种群内部变异程度等,为克洛诺菌属食源性疾病的散发、暴发事件及常规监测中的追踪和溯源等提供有效的科学研究资料。

关键词:克洛诺菌属;溯源;数据库

中图分类号:R155.5 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)02-0105-04

Establishment of a Source Tracing Database for *Cronobacter* spp.**(Former *Enterobacter sakazakii*)**

PEI Xiao-yan, GUO Yun-chang, ZHOU Zheng, LIU Xiu-mei

(National Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To establish a source tracing database for *Cronobacter* spp. **Method** Establishing a database, including biotyping, antimicrobial susceptibility, pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping and 16S rRNA gene sequence, of *Cronobacter* spp., with a BioNumerics software. **Results** The source tracing database for *Cronobacter* spp. can be used to develop systematic research about this pathogen and for comparative analysis of different typing methods. **Conclusion** Based on the techniques and constantly improved information, the database will be helpful to compare timely and effectively the similarity of isolates and estimate the population variations of *Cronobacter* spp.. The database will provide scientific information for tracing the source of sporadic cases, outbreaks and for active surveillance of foodborne disease caused by this pathogen.

Key words: *Cronobacter* spp.; Source Tracing; Database

克洛诺菌属(*Cronobacter* spp.)曾经一直被称为产黄色素阴沟肠杆菌,直到1980年,Farmer等根据DNA-DNA杂交、生化反应、色素产生和抗生素敏感性的不同将该菌从阴沟肠杆菌中分离出来,更名为阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)。近来,Iversen等^[1-3]根据16S rRNA基因序列、核糖体分型、荧光扩增片段长度多态性(fluorescent-amplified fragment length polymorphism, f-AFLP)和DNA-DNA杂交试验对阪崎肠杆菌重新进行系统学分类,建议将该菌定义为一个新的属,即克洛诺菌属。

作为一种肠道条件致病菌,克洛诺菌属在食品和环境广泛存在,该菌感染的大多数病例都是婴儿,特别是早产儿、出生体重偏低等身体状况较差的婴儿,可引起严重的新生儿脑膜炎、小肠结肠炎和菌血症,并且可能引起神经系统后遗症和死亡。虽然在许多病例中尚不能确定阪崎肠杆菌的宿主,但越来越多的报道证明婴儿配方粉是主要的传染源和传播媒介,此外,冲调环境和器皿的污染也是重要的传染源^[4]。

作为重要的食源性致病菌,迫切需要建立克洛诺菌属溯源分析技术和溯源数据库,以便对不同来源分离株的主要表型和基因型进行比对,及时有效地分析不同分离株之间的相似性、确定病原菌主要的食品污染来源。完善的溯源分析数据库应涵盖食源性病原菌分离株的相关流行病学、表型和基因型资料,这对正确评估食源性疾病的特点,估计种群内

收稿日期:2009-12-10

基金项目:“十一五”国家科技支撑资助项目(2006BAK02A1);国际科技合作项目(2006DFA31470)

作者简介:裴晓燕 女 助理研究员 研究方向为营养与食品卫生

E-mail:pxycdc@sohu.com

通信作者:刘秀梅 女 研究员

部变异程度、定义具体的克隆株(尤其是中毒株)、比较不同地域分离株的相似性和同一种群的时间变迁,调查疾病暴发和散发案例的源头,构建处理食源性疾病的公共卫生基础系统具有极其重要的意义。目前美国利用溯源分析数据库对食源性疾病暴发的传染源、新发病原体进行溯源的实践中积累了大量的成功经验。本研究中使用常见的生物分型、抗生素敏感性分型(antibiotic susceptibility test,AST)、脉冲场凝胶电泳(pulse field gel electrophoresis,PFGE)和核糖体分型方法和16S rDNA全序列分析方法对克洛诺菌属标准株和分离株进行了系统研究,并建立相应的溯源分析数据库。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

2004-2006年从中国市售配方粉、奶粉、纯牛奶和其他来源的样品中分离到的28株克洛诺菌属ES 001~013、015、016、ES 019~031。所有菌株均经过API 20E、VITEK 32 GNI+生化鉴定和16S rDNA序列同源性分析。克洛诺菌属标准菌株为ATCC 51329和ATCC 29544。菌株编号和来源见表1。

表1 克洛诺菌属试验菌株

菌株编号	株数	样品来源
ATCC 29544	1	-
ATCC 51329	1	中国生物制品鉴定所
ES 016	1	纯牛奶
ES 029	1	原料粉
ES 024~027	4	全脂奶粉
其他	22	婴幼儿配方粉

1.2 主要仪器与试剂

API 20E生化鉴定试剂盒和VITEK全自动微生物鉴定系统(生物梅里埃公司,法国);微量细菌定量药敏测试盒(天津市金章科技发展有限公司);CHEF-mapper型脉冲场凝胶电泳仪(Bio-Rad,美国);Riboprinter™细菌指纹图谱分析仪(RP-411)(杜邦公司,美国);BioNumerics数据库分析软件(Applied Maths Inc.,比利时)等。

1.3 试验方法

生物型(API 20E和VITEK GNI+生化鉴定)、抗生素敏感性实验、自动化核糖体分型分别按照相应的产品操作指南(即,法国生物梅里埃公司操作指南、微量细菌定量药敏测试盒操作指南和杜邦Riboprinter™细菌指纹图谱分析仪操作程序)进行。PFGE分型和16S rDNA全序列分析的具体操作方法见文献^[5,6]。

1.4 克洛诺菌属溯源数据库的建立

系统整理菌株的生物学背景、生态学分布、

PFGE分型、核糖体分型、16S rDNA全序列等信息。数据库的建立步骤如下^[7]:

1) 利用BioNumerics数据库分析软件建立新的数据库,创建数据库信息字段,如菌株编号、样品名称、适宜人群、制造商、产地等,并录入相应的字段信息。

2) 创建指纹图谱类型的实验:①Riboprint,安装自动化核糖体分型数据输入软件(BNScripts60.exe),加载自动化核糖体分型数据(*.txt);②PFGE-Xba I,导入PFGE实验中Xba I酶切的图像文件(*.TIFF);③PFGE-Spe I,导入PFGE实验中Spe I酶切的图像文件(*.TIFF)。按照BioNumerics软件操作指南对上述指纹图谱分别进行处理和标准化。聚类分析使用非加权配对算术平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean,UPGMA),不同菌株之间的电泳条带的相似系数用Dice系数表示。

3) 分别创建字符型实验(API 20E、VITEK GNI+和AST)。对生物分型(API 20E和VITEK GNI+生化鉴定)和抗生素敏感性实验结果进行赋值,阳性生化反应以100表示,阴性生化反应以0表示;“耐药”以100表示,“敏感”以0表示,“中介”以50表示,并将最后的实验数据转化为文本格式(*.txt)。按照BioNumerics软件字符型数据处理操作指南导入生物分型和抗生素敏感性实验数据,聚类分析使用UPGMA法。

4) 创建序列类型的实验(16S rDNA)。将16S rDNA序列数据整理为FASTA序列格式(*.txt)。导入16S rDNA全序列数据信息,并根据BioNumerics软件系统发育聚类分析方法对导入序列进行校正和处理。

2 结果

在ES溯源数据库中,每一株细菌对应各自的菌株信息、API 20E和VITEK GNI+生化反应和抗生素敏感性特征、PFGE、自动化核糖体分型和16S rDNA全序列指纹图谱信息。通过BioNumerics软件数据化分析,表型特征或指纹图谱一致的菌株为同一型别,有差异的为不同型别,根据差异的多少,得出不同分型方法中各菌株亲缘关系远近的树状图,并根据该结果对其进行聚类分析(见表2)^[5,6],分别命名为A~E群,其中API 20E、PFGE(Xba I酶切)、PFGE(Spe I酶切)分为5个群(A、B、C、D、E)、VITEK GNI+和核糖体分型分为4个群(A、B、C、D)、AST分为2个群(A、B)、16S rDNA分为2个基因群(A、B)。在每个群中,又根据其分型特征的不

表 2 克洛诺菌属表型和分子特征

编号	样品品牌 ^a	生化谱			AST	核糖体分型	PFGE		16S rDNA
		产地 ^a	API 20E	VITEK GNI +			<i>Xba</i> I	<i>Spe</i> I	
ATCC29544	19	1	A	B1	A	A15	A3	C3	A1
ATCC51329	19	1	B	A1	A	D1	B1	E1	B1
ES 001	12	2	A	B2	A	C1	C7	C4	A2
ES 002	10	3	C	A2	B	A8	C9	C12	A24
ES 003	7	4	D	D	A	A6	C17	B1	A21
ES 004	23	3	C	A3	A	B3	A6	A4	A8
ES 005	23	3	C	A2	A	B3	A6	A4	A8
ES 006	16	5	A	B2	A	A11	C13	C1	A13
ES 007	6	8	A	A4	A	B1	A1	C10	A5
ES 008	14	19	A	A5	A	B7	C5	C13	A4
ES 009	14	19	A	A6	A	C2	C8	C5	A16
ES 010	11	11	A	A4	B	B2	C14	C8	A18
ES 011	17	9	A	A4	B	B4	A4	C14	A6
ES 012	4	6	A	B1	A	A1	C10	B3	A22
ES 013	5	12	C	A3	A	A10	D1	A3	A14
ES 015	4	6	E	A7	A	A12	A2	C16	A15
ES 016	22	17	A	B3	A	A16	E1	C9	A3
ES 019	2	7	C	A3	A	B5	D2	A1	A8
ES 020	13	20	C	A4	A	B6	C3	C17	A19
ES 021	3	10	A	B1	A	A4	C15	B4	A20
ES 022	21	18	A	C	A	A17	C1	C2	A11
ES 023	18	4	A	A8	A	A13	C2	C11	A17
ES 024	15	15	A	B2	A	A7	B2	C6	A10
ES 025	1	14	A	A4	A	A3	A5	B6	A25
ES 026	20	16	C	A2	B	A9	D3	A2	A12
ES 027	18	4	A	B2	A	A2	C11	B2	A23
ES 028	18	4	C	A2	A	A18	C6	D1	A9
ES 029	8	13	A	B1	A	A5	C16	B5	A20
ES 030	9	18	C	A3	A	A14	C4	C15	A7
ES 031	8	13	A	A9	A	A19	C12	C7	A26

注:^a相同样品品牌/产地即为同一编号,不同样品品牌/产地为不同编号。

同分为亚型(如 A1、A2、A3……),在 API 20E 和 AST 中,相同反应特征的即为一个群。

3 讨论

3.1 克洛诺菌属溯源数据库的分析

根据 BioNumerics 数据库的分析结果,将克洛诺菌属表型和分子特征进行分类汇总(表 2)。根据菌株来源的样品和产地信息,对各分离株的相关性进行分析。

来源于同品牌、同批次、不同包装的产品中的 ES 004 和 ES 005 分离株 PFGE (*Xba* I 和 *Spe* I 酶切)、自动化核糖体分型和 16S rDNA 全序列指纹图谱完全一致,API 20E 生化反应和抗生素敏感性特征相同。但 VITEK GNI + 鉴定中生化反应略有不同(生化试验 DP3:ES 004 阴性、ES 005 阳性),分析原因应该是 VITEK GNI + 生化鉴定所使用菌株是从冻存管(-80 °C 保存)中挑取的分离株接种 BHI,37 °C 过夜培养,然后划线接种 TSA 平板,挑取的纯菌落,而 API 20E 是从食品中首次分离得到的纯菌落。菌种的生化反应特征易受其反应能力的限制,

-80 °C 冻存后,再次复苏菌株的个别生化反应也可能发生改变。另外,也可能与微量生化实验的局限性有关,即不能保证高度的重复性、菌种的代谢反应并不是绝对的而是具有可变性^[8]。

根据样品的品牌、产地、生产日期、适宜人群等信息,对不同来源分离株的各种表型和基因型特征进行比较分析,可见,除 ES 004 和 ES 005 之外,其他分离株的表型、尤其是基因型均存在不同程度的差异。根据以上研究,不能证明其他菌株之间存在显著相关关系。

3.2 各种方法分型效果的比较

由于表型分型方法稳定性较差,不同的环境和培养条件下都可能影响结果的判断。生物分型和抗生素敏感性分型分辨率低、稳定性差,任何一种都不能独立应用于菌种分型和流行病学调查,必须与一种或数种方法联合应用。与表型分型相比,分子分型技术具有较高的可靠性、重复性、高分型率和高分辨力。从本研究可见,PFGE 是分辨率最高的克洛诺菌属分型方法,其次是核糖体分型、生物分型、抗生素敏感性分型。16S rDNA 序列分析费用较高且

序列保守性较高,不能有效分型,但可应用于细菌的鉴定和系统发育学分析。

理想情况下,所有分型方法的分型能力应该是100%。高度分辨能力的方法常作为细菌亚型分型的最好方法。理论上,稍微不同的遗传背景的微生物可以产生难以分辨的带型,有些分辨度过高的方法会将其他分型方法和流行病学研究证明为一类的菌株分为不同的种群。因此任何一种分型/指纹图谱分析必须谨慎解释,实践中必须根据其他流行病学资料进行合理的解释^[9]。许多从事分型和指纹图谱研究的专家推荐同时应用多种分型方法研究大多数微生物的特征。

3.3 克洛诺菌属溯源数据库的建立

本研究将不同类型的分析数据和菌株相关信息作为构建数据库的内容和基础信息,采用BioNumerics分析和数据库软件,建立了比较完整的克洛诺菌属(生物分型、抗生素敏感性分型、PFGE分型、自动化核糖体分型和16S rDNA序列)溯源分析数据库,为建立我国重要食源性致病菌溯源分析数据库提供了技术储备。但本数据库中的分离株均为食品(如纯牛奶、原料粉、全脂奶粉、婴幼儿配方粉等)分离株,尚缺乏环境和临床分离株,随着对该菌研究的深入和扩展,中心实验室将在国家食源性疾病监测网的网络实验室和临床监测点逐渐加强对该菌的监测,以便得到更加完善的克洛诺菌属污染和食源性疾病溯源的有效信息。

参考文献

[1] IVERSEN C, LEHNER A, MULLANE N, et al. Identification of

'*Cronobacter*' spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(11):3814-3816.

[2] IVERSEN C, LEHNER A, MULLANE N, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies 1* [J]. *BMC Evol Biol*, 2007, 7:64.

[3] IVERSEN 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 malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies 1*, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58(6):1442-1447.

[4] Joint FAO/WHO Workshop. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula [M]. Rome: FAO, 2006.

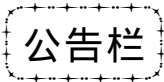
[5] 裴晓燕, 郭云昌, 刘秀梅. 阪崎肠杆菌脉冲场凝胶电泳分型方法的研究 [J]. *卫生研究*, 2008, 37(2):179-182.

[6] 裴晓燕, 刘秀梅. 阪崎肠杆菌分离株 16S rDNA 序列分析 [J]. *卫生研究*, 2010, 39(1):36-39.

[7] Bionumerics manual [DB/OL]. [2009-06-06]. http://www.applied-maths.com/download/brochures/brochure_bn.pdf.

[8] TANG Y W, ELLIS N M, HOPKINS M K, et al. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(12):3674-3679.

[9] 杨瑞馥, 宋亚军. 微生物法医学:理论与技术 [M]. 北京:化学工业出版社, 2005.



中华人民共和国卫生部公告

2009 年 第 19 号

根据《中华人民共和国食品安全法》规定,经全国食品添加剂标准化技术委员会审核,现批准琥珀酸单甘油酯等 16 种食品添加剂和低聚果糖等 4 种营养强化剂扩大使用范围及使用量。

我部 2006 年第 5 号公告中所列香料品种允许继续使用。

特此公告。

附件: 扩大使用范围及使用量的食品添加剂、营养强化剂品种(略)

二〇〇九年十二月二十九日