

着培养时间的延长,毒力基因 *tdh2* 和鉴定基因 *toxR* 表达水平持续下降,但即使细菌进入 VBNC 状态,这两个基因也能够得到很好的扩增,检测灵敏度试验表明,进入 VBNC 状态后,鉴定基因 *toxR* 的最低检测限可达到 48 cfu/ml,毒力基因 *tdh2* 表达的最低检测限可达到 4.8×10^2 cfu/ml。在常规培养方法无法检测的情况下,该方法可特异、快速的检测出 VBNC 状态下的副溶血性弧菌,提高食品中副溶血性弧菌检验的准确性和可重复性,更加科学准确地评价食品的卫生状况,保障食品安全。

根据我们的研究结果将副溶血性弧菌在 4 ℃ 陈化海水中培养后,虽然毒力基因 *tdh2* 的表达水平大幅度下降,但即使进入 VBNC 状态 20 多天后,仍可检测出毒力基因 *tdh2* 有表达,这一点与 Coutard^[9] 在 2005 年发布的研究结果不符,Coutard 的研究表明进入 VBNC 状态的副溶血性弧菌中检测不到毒力基因 *tdh2* 的表达,对于两个不同的研究结果进行分析,认为可能有如下原因:一是我们与 Coutard 选择的副溶血性弧菌菌株不同,Coutard 使用的是 VP4 菌株,我们使用的是副溶血性弧菌 AS079 菌株,菌株的差异有可能造成实验结果的不同。第二个原因可能是 Coutard 采用的是普通逆转录 PCR 方法,用凝胶电泳的方式检测结果,灵敏度不高,而我们采用的灵敏度大大高于普通逆转录 PCR 方法的实时荧光逆转录 PCR 方法,有可能检出普通逆转录 PCR 检测不出的毒力基因 *tdh2* 的低水平表达。

参考文献

[1] 陈道利,冉陆.“活的非培养态”致病菌研究进展[J]. 卫生研究,2008,37(3):372-376.

[2] 陈瑞英,鲁建章,等. 食品中副溶血性弧菌的危害分析、检测与预防控制[J]. 食品科学,2007,28(1):341-346.

[3] 寇运同,李伟才,顾绍平. 细菌的活的非可培养状态及其研究进展[J]. 四川食品与发酵,1999(3):13-18.

[4] 谭胜兵,朱兰兰. 细菌活的非可培养状态的研究现状及发展趋势[J]. 食品研究与开发,2007,28(4):182-187.

[5] Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ S (RpoS) subunit of RNA polymerase [J]. Microbiol Mol Biol Rev,2002,66(3):373-395.

[6] Leo M M, Pierobon S, Tafi M C, et al. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm [J]. App Environ Microbiol,2000,66(10):4564-4567.

[7] 王秀娟,朱琳,陈中智,等. 细菌“活的不可培养状态”的生态意义及研究进展[J]. 微生物学通报,2008,35(12):1938-1942.

[8] Fischer-Le S M, Hervio-Heath D, Loaec S, et al. Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (11): 5641-5646.

[9] Coutard F, Pommepuy M, Loaec S, et al. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state [J]. Journal of applied microbiology,2005,98:951-961.

论著

台州市食源性沙门菌耐药性、毒力因子及分子分型研究

沈伟伟¹, 裘丹红¹, 盛莹¹, 罗芸²

(1. 台州市疾病预防控制中心, 浙江 台州 318000; 2. 浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051)

摘要:目的 了解台州市食品中分离的沙门菌耐药性、毒力因子以及基因分型情况,建立食源性沙门菌的分子特征本底信息,为食源性疾病的防治提供技术支持。**方法** 对近几年从食品中分离的 22 株沙门菌进行 12 种抗生素药敏试验、10 种毒力基因 PCR 检测、脉冲电场凝胶电泳(PFGE)基因分型,用 BioNumerics 5.0 软件对分型数据进行聚类分析。**结果** 22 株食源性沙门菌的总耐药率为 59.1%,耐药率居前三位的抗生素分别是复方新诺明(36%)、四环素(27%)、茶啉酸(27%);所有菌株均检出 6 种以上毒力因子,1 株肠炎沙门菌存在毒力岛、质粒及噬菌体等多种毒力因子;PFGE 分型共得到 21 个条带,可分为 5 个基因型别,包括 18 种指纹图谱,各基因型别间同源性小于 70%。**结论** 台州市食源性沙门菌存在致病风险,建立的指纹图谱数据库可为食源性疾病的防治提供技术支持。

关键词:食源性致病菌;沙门菌;耐药性;毒力因子;基因分型

中图分类号:R117;Q503 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)04-0315-05

收稿日期:2013-04-18

基金项目:台州市科技资金资助项目(111KY10)

作者简介:沈伟伟 男 主管技师 研究方向为食源性致病菌 E-mail:shengo8899@126.com

Antimicrobial resistance and molecular characterization of the *Salmonella*
isolates from food in Taizhou

SHEN Wei-wei, QIU Dan-hong, SHENG Ying, LUO Yun
(Taizhou Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Taizhou 318000, China)

Abstract: Objective To investigate the antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella* isolates from food in Taizhou, establish the molecular characteristics background of foodborne *Salmonella*, and provide science basis for foodborne diseases prevention and control. **Methods** 22 *Salmonella* strains isolated from food in recent years were tested for 12 kinds of antibiotics susceptibility and were screened for 10 potential virulence factors by polymerase chain reaction. All strains were genotyped by PFGE and analyzed with BioNumerics 5.0 software. **Results** The general resistant rate of 22 *Salmonella* strains was 59.1%. The strains were most resistant to co-trimoxazole (36%), tetracycline (27%) and nalidixic acid (27%). All strains were detected more than 6 kinds of virulence factors. One strain of *S. enteritidis* was found harboring virulence islands, plasmid and phages. 21 bands were separated by PFGE, which could be divided into five genotypes including 18 kinds of fingerprints. The homology between genotypes was less than 70%. **Conclusion** Foodborne *Salmonella* could be a food risk, and the fingerprint databases could provide technical supports for foodborne disease prevention and control.

Key words: Food-borne pathogens; *Salmonella*; antimicrobial resistance; virulent factors; genotyping

沙门菌是一种常见的食源性致病菌,在人群中可引起散发或爆发的胃肠炎疫情^[1]。食品是沙门菌传播的主要媒介,研究食品中分离的沙门菌的相关分子特征在公共卫生领域有重要意义。随着抗生素在临床和禽畜饲养中的广泛应用,食源性沙门菌的耐药性对食品安全造成了一定的危害^[2]。食源性沙门菌的耐药性、潜在的毒力因子一定程度上可反应该菌的致病性,而基于分子分型方法的技术手段可为食源性沙门菌所致疾病爆发提供实验室的溯源支持。

为对台州市食品中分离的沙门菌进行分子生物学特性研究,掌握本市食源性沙门菌在耐药性、毒力因子、基因分型等方面的特征,本研究通过对近几年食品风险监测中分离的沙门菌进行相关性分析,初步积累了本市食源性沙门菌的本底特征及基因分型信息,为该菌可能引起的食源性疾病溯源提供本底资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

食源性沙门菌共 22 株,均来自 2006—2011 年食品风险监测项目,所有菌株均经过生化及血清学鉴定(见表 1),其中沙门菌 *Braenderup* 血清型全球参考菌株 H9812 由浙江省疾病预防控制中心微生物所赠送。质控菌株 ATCC 25922 大肠埃希菌、ATCC 17853 绿脓假单胞菌均购自中国生物制品检定所。

Table 1 Basic information of 22 <i>Salmonella</i> strains			
菌株编号	血清型	来源	分离年份
S1	<i>S. Derby</i>	生猪肉	2005
S2	<i>S. Braenderup</i>	豆制品	2005
S3	<i>S. Derby</i>	生牛肉	2006
S4	<i>S. Uganda</i>	生猪肉	2006
S5	<i>S. London</i>	生菜	2006
S6	<i>S. Anatum</i>	生猪肉	2006
S7	<i>S. Newlands</i>	生猪肉	2006
S8	<i>S. London</i>	生猪肉	2006
S9	<i>S. Typhi</i>	生鸡肉	2006
S10	<i>S. Derby</i>	生羊肉	2006
S11	<i>S. Agona</i>	生猪肉	2007
S12	<i>S. Agona</i>	生猪肉	2007
S13	<i>S. London</i>	冷冻鸡	2007
S14	<i>S. London</i>	冷冻鸡	2007
S15	<i>S. London</i>	生猪肉	2007
S16	<i>S. London</i>	生猪肉	2007
S17	<i>S. Enteritidis</i>	生鸡翅	2008
S18	<i>S. Senftenberg</i>	生牛肉	2008
S19	<i>S. Derby</i>	生牛肉	2009
S20	<i>S. Agona</i>	生猪肉	2010
S21	<i>S. Derby</i>	生猪肉	2010
S22	<i>S. Typhimurium</i>	生猪肉	2010

1.1.2 主要仪器和试剂

PTC-200 梯度 PCR 仪、PowerPac Basic 电泳仪、CHEF Mapper XA 脉冲场电泳仪、GD2000 凝胶成像分析系统(均为美国 Bio-Rad),ATB Expression 细菌鉴定系统(法国 Bio-Mérieux)。

沙门菌诊断血清(日本生研),MH 琼脂、药敏纸片(均为杭州天和微生物试剂公司),*Premix Ex Taq™*、*Xba* I 酶(均为大连 TaKaRa),SeaKem Gold 低熔点琼脂糖(美国 Sigema),蛋白酶 K(美国 Merck)。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验

采用 K-B 法进行药敏测试,12 种药敏纸片包括氨苄西林 (AMP)、阿莫西林/克拉维酸 (棒酸) (AMC)、头孢曲松 (CRO)、头孢噻肟 (CTX)、头孢吡肟 (FEG)、链霉素 (S)、卡那霉素 (K)、四环素 (TE)、复方新诺明 (SMZ)、环丙沙星 (CIP)、萘啶酸 (NA)、氯霉素 (C)。以 ATCC 25922 大肠埃希菌、ATCC 17853 绿脓假单胞菌作为质控菌株,根据美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 方法手册对药敏结果做

出判定。

1.2.2 毒力因子检测

参照 Stephan Huehn 等^[3] 的文献合成 10 对引物,检测沙门菌的 10 个潜在毒力因子 (见表 2)。采用煮沸法提取菌株核酸,反应体系 25 μl,反应条件为 95 ℃ 1 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 4 min (*bcfC* 退火温度为 53 ℃)。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,在凝胶成像系统下拍照记录结果。

表 2 10 种毒力因子 PCR 检测引物序列信息
Table 2 Primer Sequence of ten virulent factors by PCR

基因	基因组位置	引物序列 (5'-3')	片段大小/bp
<i>avrA</i>	SPI1	F CCTGTATTGTTGAGCGTCTGG	425
		R AGAAGAGCTTCGTTGAATGTCC	
<i>ssaQ</i>	SPI2	F GAATAGCGAATGAAGAGCGTCC	644
		R CATCGTGTTATCCTCTGTCAGC	
<i>mgtC</i>	SPI3	F TGACTATCAATGCTCCAGTGAAT	655
		R ATTTACTGGCCGCTATGCTGTTG	
<i>siiD</i>	SPI4	F GAATAGAAGACAAAGCGATCATC	1 233
		R GCTTTGTCCACGCCTTTCATC	
<i>sopB</i>	SPI5	F TCAGAAGRCGTCTAACCACCTC	518
		R TACCGTCCTCATGCACACTC	
<i>gipA</i>	Gifsy-1 噬菌体	F ACGACTGAGCAGGCTGAG	422
		R TTG GAAATGGTGACGGTAGAC	
<i>sodCI</i>	Gifsy-2 噬菌体	F CCACTGGAGCAGGTTTATCG	460
		R GGTGCGCTCATCAGTTGTTC	
<i>sopE1</i>	Cryptic 噬菌体	F CGGGCAGTGTTGACAAATAAAG	455
		R TGTTGGAATTGCTGTGAGATC	
<i>spvC</i>	pSLT 质粒	F ACTCCTTGCACAACCAAAATGCGGA	544
		R TGTCTTCTGCATTTGCCACCC	
<i>bcfC</i>	菌毛	F ACCAGAGACATTGCCTTCC	467
		R TTCTGATCGCCGCTATTCCG	

1.2.3 脉冲电场凝胶电泳 (PFGE) 分型

菌株参照 PulseNet 网络中沙门菌 PFGE 分型标准化方案^[4] 进行操作。用限制性内切酶 *Xba* I 进行酶切,电泳条件:电压 6 V/cm、脉冲参数 2.16 ~ 63.80 s、电泳时间 18 h。获得的 PFGE 电泳图像用 BioNumerics 5.0 软件包进行数据分析,使用非加权配对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类,构建聚类树,分析不同菌株间的相似性。

2 结果

2.1 药敏试验结果

22 株沙门菌中对 12 种药物至少一种耐药的共 13 株,占 59.1%;对 3 种以上药物耐药的菌株有 8 株,占 36.3%;有 9 株对检测的药物均敏感,占 40.9%。12 种药物中耐药率居前 5 位的分别是复方新诺明 (36%)、四环素 (27%)、萘啶酸 (27%)、氨苄西林 (18%)、卡那霉素 (18%),见表 3。

表 3 22 株沙门菌的敏感试验结果

Table 3 Antimicrobial sensitivity results of 22 <i>Salmonella</i> strains						
抗生素	耐药		中介		敏感	
	菌株数	百分比	菌株数	百分比	菌株数	百分比
		/%		/%		/%
青霉素类						
氨苄西林(10 μg)	4	18	0	0	18	82
阿莫西林/棒酸(20 μg)	2	9	0	0	20	91
三代头孢						
头孢曲松(30 μg)	1	5	0	0	21	95
头孢噻肟(30 μg)	0	0	2	9	20	91
四代头孢						
头孢吡肟(30 μg)	1	5	0	0	21	95
氨基糖苷类						
链霉素(10 μg)	2	9	0	0	20	91
卡那霉素(30 μg)	4	18	0	0	18	82
四环素类						
四环素(30 μg)	6	27	0	0	16	73
磺胺类						
复方新诺明(23.7 μg)	8	36	4	18	10	45
喹诺酮类						
环丙沙星(5 μg)	2	9	0	0	20	91
萘啶酸(30 μg)	6	27	1	5	15	68
氯霉素类						
氯霉素(5 μg)	3	14	0	0	19	86

2.2 毒力基因检测结果

22 株沙门菌共检出 9 种毒力基因 (*avrA*、*ssaQ*、*mgtC*、*siiD*、*sopB*、*sodC1*、*sopE1*、*spvC*、*bcfC*)，未检出 *gipA* 基因。*avrA*、*ssaQ*、*mgtC*、*sopB* 基因的携带率均为 100%，*siiD* 基因携带率为 95%，毒力基因的检出情况见表 4。

2.3 PFGE 指纹图谱分型结果

对 22 株沙门菌 DNA 经 *Xba* I 酶切电泳后得到 21 个条带，有 1 株菌降解而无条带。所有菌株共可分为 5 个基因型别，包括 18 种指纹图谱，各基因型别间同源性小于 70%，同一种 PFGE 基因指纹图谱条带数量与大小均相同，血清型相同的菌株（如 S11、S12 和 S20）可分属不同基因型别，不同的血清

表 4 22 株沙门菌毒力基因检测结果

Table 4 Detection of virulent factors of 22 <i>Salmonella</i> strains		
基因	阳性菌株数	携带率/%
<i>avrA</i>	22	100
<i>ssaQ</i>	22	100
<i>mgtC</i>	22	100
<i>siiD</i>	21	95
<i>sopB</i>	22	100
<i>gipA</i>	0	0
<i>sodC1</i>	4	18
<i>sopE1</i>	7	32
<i>spvC</i>	1	5
<i>bcfC</i>	20	91

型菌株（如 S6 和 S17）可属于同一基因型别，见图 1。

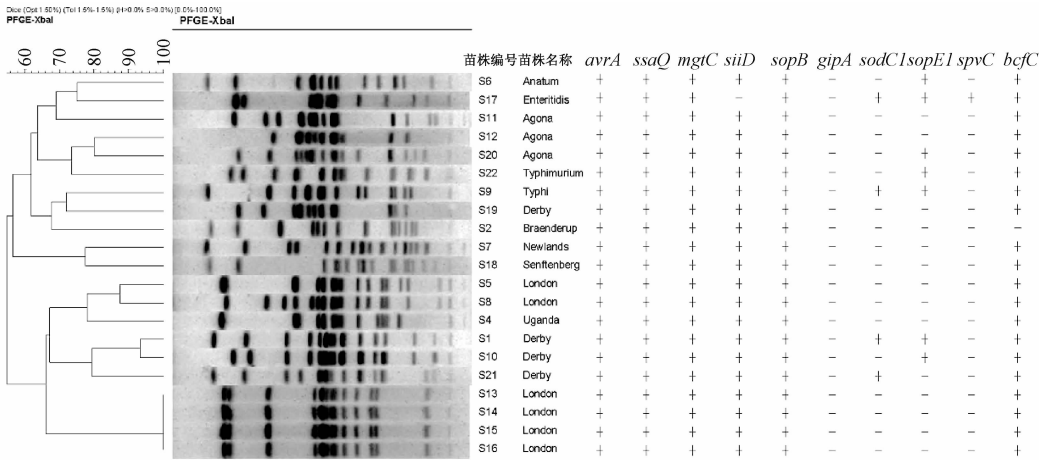


图 1 21 株沙门菌 *Xba* I 酶切 PFGE 指纹图谱

Figure 1 The PFGE patterns with *Xba* I digestion within 21 *Salmonella* strains

3 讨论

沙门菌是引起细菌性食源性疾病的主要病原菌，居我国内陆地区微生物性食物中毒病原首位^[5]。随着抗生素的广泛使用和选择性压力的产生，沙门菌的多重耐药率已从上世纪 90 年代的 20% 增加至本世纪初的 70%^[6]。其致病性主要是由于毒力因子的作用，而不同沙门菌的毒力因子携带情况并不相同。在沙门菌引起的食源性疾病事件中，可以运用区分能力较好、重复性好、结果稳定、易于标准化的 PFGE 技术对传染源进行追踪及探明传播途径^[7]。

本研究通过对 22 株从食品中分离的沙门菌的耐药性的分析，发现近几年台州市的食源性沙门菌的总耐药率为 59.1%，其中最高的是复方新诺明（36%），其次是四环素及萘啶酸（均为 27%），总耐药率低于吴平芳等^[8]报道的深圳地区食源性沙门菌耐药率（四环素 47.83%、萘啶酸 56.52%、复方新诺明 47.83%），但高于张毅等^[9]报道的上海市食源

性沙门菌总耐药率（41.66%），在浙江省内略高于平均水平（48.48%）^[10]，说明台州市的食源性沙门菌存在耐药问题，由于耐药性可通过食物链或环境在人与食品、人与人或人畜之间传递^[11]，从食品安全角度应加强对其进行持续监测的力度。食源性沙门菌的耐药问题具有普遍性，进行耐药性的研究对于公共食品卫生安全具有重要意义，本研究虽然掌握了食源性沙门菌的药敏表型，但对于菌株在基因水平的耐药机制仍缺少相关深入的研究。

沙门菌的毒力因子包括脂多糖、肠毒素、细胞毒素以及毒力基因等，大多数毒力基因由染色体上的毒力岛编码^[12]。本研究对潜在的 10 个毒力因子进行基因检测，发现毒力岛（SPII-5）和菌毛的基因具有较高的稳定性，携带率均在 90% 以上。有 32% 的菌株检出 *sopE1*，该基因可通过溶原性转换将其编码的毒力因子 SopE 转移至沙门菌中，从而增强沙门菌的侵袭力^[13]。结果显示，有 1 株肠炎沙门菌除缺失与 SPI4 和噬菌体 Gifsy-1 相关的 2 个基因外，其余 8 个毒力基因均呈阳性，说明该菌株具有毒力

岛、pSLT 质粒、噬菌体等多种可作为水平转移的毒力基因元件,虽然毒力基因的存在只是菌株致病的前提,基因的表达还受其它基因的调控及感染宿主本身免疫状态等因素的影响^[14],但在特定条件下该肠炎沙门菌可变为强毒株,考虑到该菌株对头孢吡肟、链霉素、卡那霉素、四环素、复方新诺明、环丙沙星、萘啶酸、氯霉素等均耐药,说明在本地区的消费人群存在从食品中感染这种强毒力、多重耐药的沙门菌的潜在风险。

基因分型结果显示,本地区食品中分离的包含 11 种血清型的 22 株沙门菌可分成 18 种基因图谱,具有相同血清型的菌株可具有不同的基因指纹图谱,与梅玲玲等^[15]的研究结果较一致,但在本次研究中未发现不同血清型同属于一种 PFGE 指纹图谱的菌株,这可能与此次研究的样本量较少有关。PFGE 分型方法作为沙门菌基因分型的“金标准”,其分辨率高、重复性好^[16],对于相同血清型的菌株可以作进一步区分,在沙门菌引起的食源性疾病流行病学调查中具有重要意义。

本研究从耐药性、毒力因子及基因分型等方面对分离自食品中的沙门菌进行分子生物学特性研究,初步掌握了台州市食源性沙门菌的耐药率、毒力基因携带率及 PFGE 指纹图谱聚类特征,从病原菌分子角度描述了食源性沙门菌的可能危害特征,并建立了食源性沙门菌的分子特征及基因分型本底信息,为食源性疾病的防治及预警提供了技术支撑。

参考文献

[1] WHO. Consolation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne diseases[R]. WHO,2006.

[2] 杨保伟,曲东,申进玲,等. 陕西食源性沙门氏菌耐药及相关基因[J]. 微生物学报,2010,50(6):788-796.

[3] Huehn S, La Ragione R M, Anjum M, et al. Virulotyping and

antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe[J]. Foodborne Pathogens and Disease,2010,7(5):523-535.

[4] Ribot E M, Fair M A, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet [J]. Foodborne Pathogens and Disease,2006,3(1):59-67.

[5] 甘学雄,杨克军. 关注沙门菌确保禽蛋食品安全[J]. 养禽与禽病防治,2008(10):20-21.

[6] SU L H, CHIU C H, CHU C, et al. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* serotypes: a global challenge [J]. Clinical Infectious Disease,2004,39(4):546-551.

[7] 赵薇,桂华,张秀丽. 食品中沙门氏菌血清及 PFGE 分型研究[J]. 中国卫生工程学,2012,11(6):443-446.

[8] 吴平芳,贺连华,石晓路,等. 深圳市食源性疾病监测中沙门菌的耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22(3):581-583.

[9] 张毅,陈欣钦,宋昌彦. 2010 年上海市食源性沙门菌菌型分布和药敏分析以及快速检测方法的建立[J]. 现代生物医学进展,2012,20(11):3938-3941.

[10] 潘雪霞,朱敏,梅玲玲,等. 食品中沙门菌污染状况及耐药性研究[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(9):1103-1104.

[11] 陈玉贞,邵坤,关冰,等. 2003—2010 年山东省食源性沙门菌血清分型及药敏分析[J]. 中国食品卫生杂志,2012,24(1):9-13.

[12] 方艳红,孙裴,魏建忠,等. 沙门菌毒力基因研究进展[J]. 动物医学进展,2010,31(S):190-193.

[13] Hapfelmeier S, Ehrbar K, Stecher B. Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice[J]. Infect Immun,2004,72(2):795-809.

[14] 朱玉贤,李毅,郑晓峰. 现代分子生物学[M]. 4 版. 北京:高等教育出版社,2007.

[15] 梅玲玲,罗芸,叶菊莲,等. 浙江省 209 株沙门菌 PFGE 指纹图谱研究[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(11):2478-2481.

[16] 张代涛,阚飙. 沙门菌属分子分型技术研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2009,25(5):465-468.

· 请示批复 ·

国家卫生计生委关于风味鱼干制熟食适用标准问题的批复

国卫食品函〔2013〕5 号

湖南省卫生厅：

你厅《关于明确风味鱼干制熟食镉限量值标准的请示》（湘卫报〔2013〕23 号）收悉。经研究，现批复如下：

根据食品安全国家标准《食品中污染物限量》（GB 2762—2012）第 3.5 项干制食品中污染物限量折算的规定，风味鱼干制熟食属于干制食品，其镉限量应当以鲜、冻鱼类的镉限量并结合其加工脱水率进行折算。

此复。

国家卫生和计划生育委员会
二〇一三年七月一日

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	草莓乳酪糯米粉	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 *C. sakazakii*

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 1.5×10⁸ 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均明确规定适合 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.