

研究报告

市售婴幼儿食品中克罗诺杆菌分离菌株脉冲场凝胶电泳分型及耐药性研究

贾华云,王岚,陈帅,梁进军,刘晓革,湛志飞

(湖南省疾病预防控制中心 湖南省微生物分子生物学重点实验室,湖南长沙 410005)

摘要:目的 研究婴幼儿食品中克罗诺杆菌分离菌株的分子分型特征和耐药情况。方法 2010—2016年在国内32个企业生产的婴幼儿食品中分离获得50株克罗诺杆菌,使用限制性内切酶 *Xba* I 对基因组DNA进行酶切和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型,利用BioNumerics软件进行聚类分析,采用微量肉汤稀释法进行药敏试验,分析分离菌株的耐药情况。结果 50株克罗诺杆菌分为47个PFGE型,相似度为28.7%~100.0%,具有较高的遗传多态性。不同地区、不同企业的分离株分散在各簇,无地区聚集性和特异性,但有2个企业不同批次产品的分离菌株分别属于同一克隆株。50株克罗诺杆菌对萘啶酸、环丙沙星、头孢吡肟、阿米卡星、头孢噻肟和头孢曲松均敏感,对磺胺嘧啶、氟喹诺酮、氯霉素、复方新诺明、阿莫西林-克拉维酸、卡那霉素和庆大霉素具有不同程度的耐药,7株克罗诺杆菌表现出对抗生素的多重耐药性。结论 部分婴幼儿食品加工企业存在克罗诺杆菌持续污染,且有多重耐药株出现,应加强关注。

关键词: 克罗诺杆菌; 婴幼儿食品; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型; 耐药; 食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)02-0106-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.02.002

Research on molecular pulsed field gel electrophoresis typing and drug resistance of *Cronobacter* isolated from retail infant foods

JIA Huayun, WANG Lan, CHEN Shuai, LIANG Jinjun, LIU Xiaoge, ZHAN Zhifei

(Key Laboratory of Microbial Molecular Biology of Hunan Province, Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hunan Changsha 410005, China)

Abstract: Objective To investigate molecular characteristic and drug resistance patterns of *Cronobacter* isolated from retail infant foods. **Methods** Fifty strains of *Cronobacter* isolated from infant foods between 2010-2016 were typed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) after their chromosomal DNA were digested with restriction endonucleases *Xba* I, and the PFGE patterns were analyzed by BioNumerics software. Antibiotic susceptibility test was carried out by micro-broth dilution method to analyze drug resistance patterns. **Results** Fifty *Cronobacter* strains revealed 47 PFGE patterns with similarity ranged from 28.7% to 100.0%. Isolates from different regions or different enterprises were distributed among clusters with highly polymorphic, and without regional aggregates and specificity. But four strains isolated from different batches of two enterprises belong to the same clone. All strains were sensitive to nalidixic acid, ciprofloxacin, cefepime, amikacin, cefotaxime and ceftriaxone. The strains were resistant to sulfadiazine, ampicillin, chloramphenicol, sulfamethoxazole-trimethoprim, amoxicillin-clavulanic acid, kanamycin and gentamicin at different degrees. And 7 strains were multi-drug resistant. **Conclusion** It should be paid more attention to the contamination of *Cronobacter* in the infant foods, because some enterprises may be contaminated with sustained *Cronobacter* and some multiple antibiotic resistant strains appeared in the study.

Key words: *Cronobacter*; infant foods; pulsed field gel electrophoresis; molecular typing; antibiotic resistance; foodborne pathogenic bacteria

克罗诺杆菌属(*Cronobacter* spp.)是一种肠道革兰阴性无芽胞杆菌,隶属肠杆菌科。最初根据产黄色素的特征被称为“黄色阴沟肠杆菌”(yellow-pigmented *Enterobacter cloacae*)。1980年因DNA杂交和生化试验结果的区别将该菌从阴沟肠杆菌中

收稿日期:2019-01-28

作者简介:贾华云 男 主管技师 研究方向为食品微生物

E-mail:jiahua Yun@126.com

通信作者:湛志飞 男 主任技师 研究方向为病原微生物

E-mail:190776969@qq.com

分离,更名为阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)。2008年根据 Iversen 对 189 株不同生化性状的分离株进行 16S rRNA 序列分析结果,对其进行新的系统学分类,将该菌划分为新的属,即克罗诺杆菌属。目前,克罗诺杆菌属包含 7 个种和 3 个亚种^[1],且均有致病性^[2]。世界卫生组织与粮农组织认为该菌与散发性感染和疾病暴发有关,可引起婴幼儿尤其是低体重或免疫力低下新生儿的脑膜炎、小肠结肠炎和菌血症等严重疾病。在一些婴幼儿感染事件的调查中发现婴幼儿食品,尤其是婴幼儿奶粉是该菌的主要感染渠道^[3-4],因此婴幼儿配方食品中克罗诺杆菌的污染问题一直在国际上受到普遍关注。本研究收集 2010—2016 年国内不同企业生产的婴幼儿配方食品和婴幼儿谷类辅助食品中分离的克罗诺杆菌,对其进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型和耐药性研究,分析分离菌株之间的遗传关系和耐药情况,以期为克罗诺杆菌导致的食源性疾病的分子溯源和防控提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

2010—2016 年从国内 10 个省(市)32 个企业生产的市售婴幼儿食品中分离得到 50 株克罗诺杆菌,其中 15 株分离自婴幼儿配方食品,35 株分离自婴幼儿谷类辅助食品。所有菌株均经生化鉴定确定为克罗诺杆菌。32 个婴幼儿食品生产企业的地区分布见表 1。沙门菌标准菌株(H9812)和大肠埃希菌标准菌株(ATCC 25922)均由国家食品安全风险评估中心提供。

表 1 32 个婴幼儿食品生产企业的地区分布

Table 1 Regional distribution of 32 infant food enterprises

区域	省份	企业数量/个
东北	B	1
华北	G	1
华中	D	4
华东	C, E, F, I	21
华南	A	3
西北	J	1
西南	H	1

1.1.2 主要仪器与试剂

全自动生化鉴定仪 VITEK 2 Compact 系统(法国梅里埃),CHEF MAPPER 脉冲场凝胶电泳仪、GelDoc XR+凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad。

阪崎显色培养基(法国科玛嘉),胰蛋白胍大豆琼脂(TSA,英国 OXOID),药敏试剂盒(上海复兴医药),SeaKem Gold 琼脂糖(美国 LONZA),蛋白酶 K(美国 Sigma),限制性内切酶 *Xba* I [宝生物工程

(大连)有限公司],以上培养基及试剂均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 分子分型试验

PFGE 分型按照国家食源性疾病溯源网络(TraNet)推荐的方法进行。在 TSA 平板上挑取过夜培养的克罗诺杆菌培养物,均匀悬浮于细胞悬浮液中使其达到 4.0~4.5 麦氏浊度。加入 1%SeaKem Gold 琼脂糖,混匀后制成 plug 胶块,54 ℃水浴蛋白酶 K 裂解后,使用 50 U 的 *Xba* I 酶切 3 h。使用 PFGE 仪分型,电泳时间为 18 h,脉冲时间为 2.16~63.8 s。电泳结束使用 GelRed 染色 30 min 后凝胶成像系统成像。

1.2.2 药敏试验

采用微量肉汤稀释法测定克罗诺杆菌的抗生素最小抑菌浓度(MIC)。从过夜培养的 TSA 平板上挑取 3~5 个新鲜菌落,均匀悬浮于无菌水中,使菌悬液达到 0.5 麦氏浊度。吸取 60 μl 菌悬液加至 12 ml 营养肉汤中,混匀后吸取 100 μl 加入药敏测试板,放入 36 ℃培养箱中孵育 18~20 h,记录细菌 MIC。检验抗生素为阿莫西林-克拉维酸(AMC)、阿米卡星(AMK)、氨苄青霉素(AMP)、氯霉素(CHL)、环丙沙星(CIP)、头孢曲松(CRO)、头孢噻肟(CTX)、头孢吡肟(FEP)、庆大霉素(GEN)、卡那霉素(KAN)、萘啶酸(NAL)、磺胺嘧啶(SD)、复方新诺明(SXT)、四环素(TET)。

1.2.3 结果分析

使用 BioNumerics 软件处理 PFGE 试验后的成像结果,采用非加权组平均(UPGMA)法进行聚类分析,采用基于条带比较的 Dice 系数衡量 PFGE 带型之间的相似度,相似度为 100% 被视为同一 PFGE 型。按照 TENOVER 原则^[5],PFGE 带型仅有 1~3 个条带变化的菌株,被定义为菌株间高度相关。

根据菌株测定的 MIC 值参照美国临床实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)出版的抗生素药物敏感试验指南^[6]判断菌株对 14 种抗生素的敏感(S)、中介(I)和耐药(R)情况。

2 结果

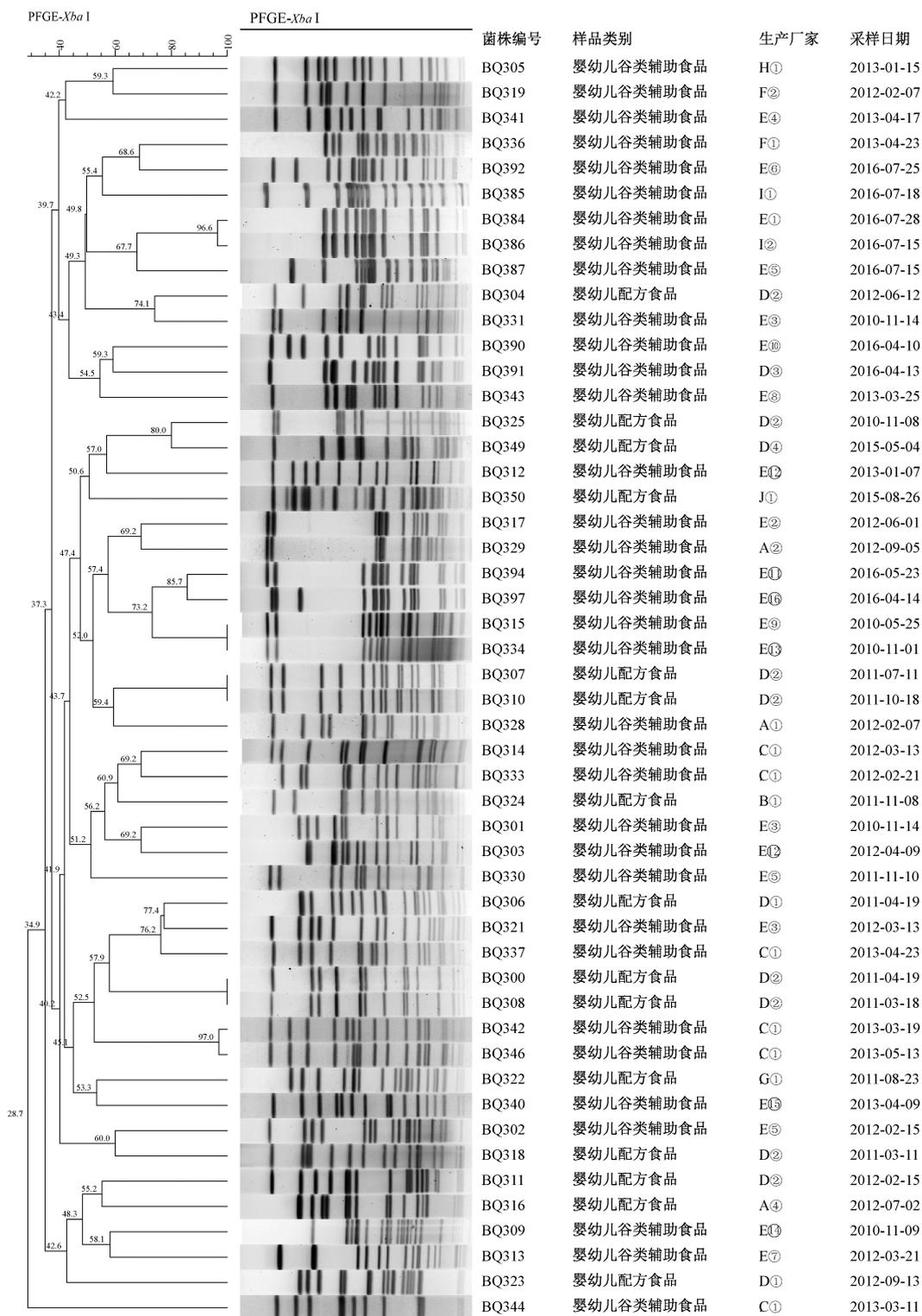
2.1 分子分型

50 株克罗诺杆菌经 *Xba* I 酶切和 PFGE 分离后,产生 10~18 条 DNA 片段,分子量在 20~1 200 kb 之间。所有菌株共分为 47 个 PFGE 型,型别分散,矩阵显示菌株之间相似度为 28.7%~100.0%,具有较高的遗传多态性。

50株克罗诺杆菌 PFGE 后聚类分为 6 个主干簇,簇 1 的菌株来源于华东和西南地区企业生产的婴幼儿谷类辅助食品,簇 2 的菌株来源于华东和华中地区企业,簇 3 的菌株来源于华东、华中、西北和华南地区企业,簇 4 的菌株来源于华东和东北地区企业,簇 5 的菌株来源于华东、华中和东北地区企业,簇 6 的菌株来源于华东、华中和华南地区企业,

菌株无地区聚集性和特异性。

对 32 个企业生产的婴幼儿食品分离的 50 株克罗诺杆菌进行比较,不同企业产品中检出的克罗诺杆菌分散在各簇,少数菌株表现出遗传相关性,见图 1。菌株 BQ315 和 BQ334 分别分离自 E 省的企业 E⑨ 和 E⑬,酶切后具有相同 PFGE 型;菌株 BQ384 和 BQ386 分别分离自企业 E① 和 I②,酶切



注:生产厂家中首字母代表生产厂家所在省(市),比如 A①和 A②分别代表 A 省的 2 个不同生产企业

图 1 50 株克罗诺杆菌 PFGE 聚类结果

Figure 1 Cluster results of 50 strains of Cronobacter

仅一条带有差异,菌株遗传高度相关(96.6%)。对相同企业的分离株进行比较,有2个企业存在不同批号产品的分离株聚类有克隆株的现象,企业D②分离的8株克罗诺杆菌分为6个PFGE型,菌株BQ307和BQ310、BQ300和BQ308分别属于相同的PFGE型;企业C①分离的2株克罗诺杆菌BQ342与BQ346酶切后的带型仅有一条带的差异,菌株间高度相关(97.0%)。

2.2 药敏试验

本研究的50株克罗诺杆菌对NAL、CIP、FEP、AMK、CTX和CRO均敏感,对SD耐药性最强,耐药率为30%(15/50),其次为AMP(20%,10/50)、CHL(14%,7/50)、SXT(8%,4/50)和AMC(6%,3/50),见表2。

表2 50株克罗诺杆菌对14种抗生素的耐药情况

Table 2 Resistance of 50 strains of *Cronobacter* to 14 antibiotics

抗生素	耐药		中介		敏感	
	菌株数	占比/%	菌株数	占比/%	菌株数	占比/%
SXT	4	8	0	0	46	92
TET	0	0	1	2	49	98
KAN	1	2	0	0	49	98
GEN	1	2	0	0	49	98
NAL	0	0	0	0	50	100
CIP	0	0	0	0	50	100
CHL	7	14	6	12	37	74
AMP	10	20	1	2	39	78
FEP	0	0	0	0	50	100
AMK	0	0	0	0	50	100
AMC	3	6	0	0	47	94
CTX	0	0	0	0	50	100
CRO	0	0	0	0	50	100
SD	15	30	0	0	35	70

所有试验菌株中,对14种抗生素均敏感的克罗诺杆菌为33株,占66%(33/50),其余17株对至少1种抗生素耐药,占34%(17/50),仅对1种抗生素耐药的为7株,占14%(7/50)。共有7株表现出对抗生素的多重耐药性(同时对3类及以上抗生素耐药),多重耐药率为14%(7/50),多重耐药主要表现为对氨基糖苷类(KAN)、 β -内酰胺类(AMP)和磺胺类(SD)耐药以及对氯霉素类(CHL)、 β -内酰胺类(AMP)和磺胺类(SD或SXT)耐药。7株多重耐药菌株中,2株分离自婴幼儿配方奶粉,5株分离自婴幼儿谷类辅助食品,耐药谱分布见表3。

从菌株的分离来源看,同一企业分离的菌株可能具有相同的耐药性,企业C①分离的6株克罗诺杆菌有4株对SD耐药,企业D②分离的8株克罗诺杆菌有6株对14种抗生素均敏感。耐药菌株主要分离自E省、C省、F省和D省的企业,其中E省分离的耐药菌株最多,E省16个企业分离的部分菌

表3 分离菌株的耐药谱分析

Table 3 Analysis of drug resistant spectrum

耐药谱	耐药菌株数
AMP	1
SD	5
GEN	1
CHL-SD	1
SXT-AMP-SD	2
KAN-AMP-SD	1
CHL-AMP-SD	1
SXT-CHL-AMP-SD	2
CHL-AMP-AMC-SD	3

株耐药谱相同,其中耐药谱为CHL-AMP-AMC-SD和SXT-AMP-SD的5株克罗诺杆菌均分离自E省的企业。17株耐药菌株分散在PFGE聚类的各簇,部分遗传相关的菌株具有相同的耐药谱,菌株BQ394和BQ397遗传相似度为85.7%,耐药谱均为SXT-AMP-SD,并且分离自同一省份(E省)的两个企业。

3 讨论

克罗诺杆菌是婴幼儿食品中备受关注的食源性致病菌,了解我国婴幼儿食品中克罗诺杆菌的污染情况,对控制婴幼儿克罗诺杆菌感染具有重要意义。细菌分子分型技术在食品污染、环境污染和疾病溯源中都有较好的应用,常见的分子分型方法有PFGE、多位点序列分型(MLST)和多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)等。PFGE被认为在克罗诺杆菌分型中具有更高的分辨力^[7],而且PFGE试验中Xba I和Spe I两种酶切后的菌株分离效果相同,均可应用于克罗诺杆菌的分子溯源^[8]。本研究对全国10个省(市)32个企业生产的婴幼儿食品分离的50株克罗诺杆菌使用Xba I酶切后进行PFGE分型,分析菌株之间的相关性,结果表明,试验的菌株之间具有较大的遗传多态性,无地区特异性。不同省份的企业分离的克罗诺杆菌相似性较低,仅有2株克罗诺杆菌分离株具有遗传相关,企业E①和I②的分离株仅存在一条带的差异,相似度为96.6%。虽然2株菌株分离自不同省份,但两个企业都位于华东地区,可能有相同的污染源,不排除企业使用相同原料的可能。对同一省份不同企业分离的菌株进行比较,克罗诺杆菌的相似性也较小,E省的16个企业中仅E⑨和E⑬的分离菌株相似度为100.0%。经调查,两家企业位于相同的工业区,在婴幼儿食品生产加工过程中可能有业务或人员联系。但研究认为同一企业不同批次产品中分离的菌株通常具有一定的相关性,企业D②在2010—2012年期间生产的不同批次婴幼儿食品中检出8株克罗诺杆菌,其中BQ300(2009年12月生

产)和 BQ308(2010年10月生产)为同一型别, BQ307(2010年9月生产)和 BQ310(2010年12月生产)为同一型别,但两组菌株之间的遗传相关性较远。在不同批次产品中分离到相同型别的菌株,表明该企业的生产环境或原料存在克罗诺杆菌的持续污染,因此企业应加强监测和消毒。

目前,虽然克罗诺杆菌对头孢类(CRO、CTX、FEP)和喹诺酮类(CIP)等大多数临床用抗生素较为敏感,但部分抗生素耐药率仍较高,如AMP耐药率达到20%。而且本研究发现有7株克罗诺杆菌为多重耐药菌株,提示需密切关注其耐药性发展。本研究的菌株对SD耐药性最强(30%),对SXT的耐药率为8%,对CHL的耐药率则达到14%。黄玉兰等^[9]研究发现,克罗诺杆菌对SXT和CHL的MIC值呈逐年上升趋势。张翼等^[10]研究认为一些对AMP或GEN耐药的克罗诺杆菌菌株的出现,是因为它们获得了某些转座子,可能使其产生 β -内酰胺酶的能力或重组形成多重耐药基因簇,因此后期有待对本研究中的耐药菌株进行深入分析,进一步挖掘其耐药机制。

分析菌株PFGE分型结果与耐药谱之间的关系发现,通常同一企业分离的遗传相关菌株具有相同的耐药性,比如企业D②分离的两组相同PFGE型的菌株BQ300和BQ308、BQ307和BQ310均对所测试的14种抗生素敏感。而不同企业分离的遗传相关菌株通常具有不同的耐药性,菌株BQ317和BQ329具有较高的遗传相似性却有不同耐药性,其中BQ317对AMP、CHL和SD耐药,BQ329对测试的14种抗生素均敏感。但不同企业分离的菌株也可能具有相同耐药性,比如BQ394和BQ397的PFGE分型有2条带的区别,而它们具有相同耐药谱SXT-AMP-SD,因此,克罗诺杆菌的耐药性与PFGE分型的相似性并不完全相关,耐药菌株之间的联系非常复杂,必须根据实际情况,结合耐药基因检测和全基因组测序等方法科学、客观地分析。

本研究对婴幼儿食品中克罗诺杆菌分离菌株进行PFGE分型,初步了解不同地区和企业分离菌株的PFGE分型特征,扩充了该菌的PFGE数据库,

为婴幼儿食品生产过程中克罗诺杆菌污染分析和克罗诺杆菌引起的食源性疾病溯源提供技术和资源储备。同时,对菌株进行了耐药性研究,初步掌握该菌的耐药状况,对临床合理使用抗生素以及有效预防和控制克罗诺杆菌感染具有重要意义。

参考文献

- [1] 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 malonatiscus* 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.
- [2] STRYDOM A, CAWTHORN D M, CAMERON M, et al. Species of *Cronobacter*-a review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk [J]. *Inter Dairy J*, 2012, 27 (1/2): 3-12.
- [3] HIMELRIGHT I. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2001 [J]. *Morbidity & Mortality Weekly Report*, 2002, 51(14): 297-300.
- [4] 龙奇志,何志敏,陈友群,等.一例由阪崎肠杆菌感染引起的婴儿腹泻调查[J]. *实用预防医学*, 2017, 24(8): 954-956.
- [5] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement: M100-S24 [S]. Wayne: CLSI, 2014.
- [7] 李秀娟,赵冬,田会方,等.食品及环境阪崎肠杆菌分离株的MLST和PFGE分型方法比较[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(3): 548-552.
- [8] 裴晓燕,郭云昌,刘秀梅.阪崎肠杆菌脉冲场凝胶电泳分型的研究[J]. *卫生研究*, 2008, 37(2): 179-182.
- [9] 黄玉兰,雷高鹏,张林,等.2010—2014年及2016年四川省婴幼儿食品及临床分离克罗诺杆菌耐药分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(3): 299-301.
- [10] 张翼,陈雅衡,周帼萍,等.克罗诺杆菌的生物膜检测和药敏性分析[J]. *食品科学*, 2015, 36(21): 129-134.