

研究报告

2018年江西省婴幼儿食品中克罗诺杆菌污染状况及分子分型和耐药特征分析

周厚德,彭思露,刘成伟,游兴勇,刘道峰,刘洋,陈福辉

(江西省疾病预防控制中心 江西省食源性疾病预防与溯源重点实验室,江西 南昌 330029)

摘要:目的 了解2018年江西省婴幼儿食品中克罗诺杆菌的污染情况、分子分型及耐药特征,为市售婴幼儿食品致病菌的溯源积累数据并为临床用药提供参考数据。方法 共采集市售婴幼儿食品337份,按照GB 4789.40—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验》方法进行分离和鉴定,并采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)法对分离株进行验证,采用微量肉汤稀释法和脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术进行药敏试验和分子分型试验。结果 168份婴幼儿配方奶粉中未检出克罗诺杆菌;169份婴幼儿谷类辅食食品中有24份检出克罗诺杆菌(24株),阳性率为14.2%。药敏试验显示,24株分离株共对8种抗生素耐药,头孢唑啉(62.5%,15/24)和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑(29.2%,7/24)耐药率较高,全部菌株均对环丙沙星和亚胺培南敏感,其中1株分离株最高耐7种抗生素。PFGE结果显示分离株共有22种分子型别,相似度为46.6%~100.0%。结论 2018年江西省婴幼儿食品中克罗诺杆菌的污染情况与国内部分地区相似,克罗诺杆菌在婴幼儿谷类辅食中普遍存在,分离菌株对一、二代头孢菌素呈现不敏感趋势,PFGE型别高度多样化。

关键词:婴幼儿食品;克罗诺杆菌;污染;耐药性;分子分型

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)04-0335-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.04.007

**Analysis of the contamination, molecular typing and drug resistance of
Cronobacter in infants and young children foods in Jiangxi Province in 2018**

ZHOU Houde, PENG Silu, LIU Chengwei, YOU Xingyong, LIU Daofeng,
LIU Yang, CHEN Fuhui

(Jiangxi Province Key Laboratory of Diagnosing and Tracing of Foodborne Disease,
Jiangxi Province Center for Disease Control and Prevention, Jiangxi Nanchang 330029, China)

Abstract: Objective To understand the contamination, molecular typing and drug resistance characteristics of *Cronobacter* in infants and young children foods in Jiangxi Province in 2018, and to provide reference data for infants and young children foods safety supervision, and clinical medication. **Methods** 337 commercially available infants and young children foods were collected, *Cronobacter* was isolated and identified according to GB 4789.40-2016 by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The drug resistance test was performed on isolated strains via the broth microdilution method. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was used to confirm the molecular type. **Results** *Cronobacter* was not detected in 168 infants and young children formulas; 24 *Cronobacter* isolates were isolated from 169 infants and young children cereal-based complementary food, with a positive rate of 14.2%. There was no difference in positive rate between rural and urban samples among the four seasons. Among the 13 antibiotics tested, 24 isolates were resistant to 8 kinds of antibiotics. The highest resistance rate was cefazolin (62.5%, 15/24) and trimethoprim/sulfamethoxazole (29.2%, 7/24). All isolates were sensitive to ciprofloxacin and imipenem. Besides, one isolate was resistant up to seven kinds of antibiotics. The result of PFGE showed that there were 22 molecular types in these isolates, and the similarity ranged from 46.6% to 100.0%. **Conclusion** The contamination of *Cronobacter* in infants and young children foods in Jiangxi Province in 2018 was similar to that in some parts of China, *Cronobacter* were prevalent in cereal-based supplements for infants and young children. *Cronobacter* isolates were not sensitive to the first and second generation cephalosporins, and PFGE molecular type of most isolates was highly diverse.

Key words: Infants and young children foods; *Cronobacter*; contamination; antibiotic resistance; molecular typing

收稿日期:2019-04-26

基金项目:江西省科技计划项目(20171BCD40021)

作者简介:周厚德 女 主管技师 研究方向为营养与食品卫生 E-mail:zhouhoude09@126.com

通信作者:陈福辉 男 主管技师 研究方向为卫生检验 E-mail:chenfuhuijx@163.com

克罗诺杆菌(*Cronobacter*,原称为阪崎肠杆菌)是一种有周生鞭毛,能运动,兼性厌氧的革兰阴性无芽胞杆菌。克罗诺杆菌分布广泛,常见于婴幼儿配方粉、奶酪、大米、面包、蔬菜、水果等以及自然环境中^[1]。该菌是条件致病菌,主要危害新生儿、婴幼儿、免疫低下的成人等易感人群,能引起严重的新生儿脑膜炎、小肠结肠炎和菌血症,致病率可达50%以上^[2],并可能造成严重的神经系统后遗症,发病婴儿的死亡率达80%^[3]。

目前,细菌耐药越来越受到广泛的关注,而鲜有关于江西省婴幼儿食品中的克罗诺杆菌污染状况及耐药特征的报道。本研究调查了江西省市售婴幼儿食品中克罗诺杆菌污染状况,分析其分离菌株的脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis,PFGE)分子型别及耐药特征,为致病菌的溯源积累数据并为临床用药提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品及菌株来源

2018年每季度赴零售店、超市和网店采集样品,共采集168份婴幼儿配方奶粉和169份婴幼儿谷类辅助食品。样品产地覆盖我国福建省、广东省、内蒙古自治区、江西省等23个省级行政区和美国、新西兰、德国、荷兰等国家,样品的生产时间在2016年4月—2018年10月之间。本研究采集的婴幼儿配方奶粉种类包括婴儿配方食品、较大婴儿和幼儿配方食品,婴幼儿谷类辅助食品的种类包括婴幼儿谷物辅助食品、婴幼儿高蛋白谷物辅助食品、婴幼儿生制类谷物辅助食品。

克罗诺杆菌标准菌株(ATCC 29544)、大肠埃希菌标准菌株(ATCC 25922)均为本实验室保存。

1.1.2 主要仪器与试剂

基质辅助激光解析飞行时间质谱(MALDI-TOF MS,美国布鲁克)仪,CHEF Mapper XA PFGE仪、Gel Doc XR凝胶成像仪均购自美国Bio-Rad,BioMerieux Vitek Colorimeter比浊仪(法国梅里埃)。

缓冲蛋白胨水、改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素、胰蛋白胨大豆琼脂、阪崎肠杆菌显色培养基均购自青岛海博生物技术有限公司,API生化鉴定试剂条(法国梅里埃),药敏板(上海星佰生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分离培养与鉴定

按照GB 4789.40—2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检

验》^[4]方法进行分离、鉴定,同时用克罗诺杆菌标准菌株(ATCC 29544)作为阳性对照。用MALDI-TOF MS方法验证分离菌株。

1.2.2 PFGE分子分型试验

参照国家食品安全风险评估中心提供的分子分型标准操作方法^[5],阳性菌株基因组经*Xba*I限制性内切酶酶切后,采用PFGE技术对克罗诺杆菌进行分子分型,使用软件BioNumerics 7.6对电泳得到的DNA酶切图谱进行处理及聚类分析,聚类分析算法采用非加权配对平均(UPGMA)法,条带位置差异容许度1.5%,优化1.5%。相似度100.0%认定为同一PFGE带型。

1.2.3 药敏试验

分离菌株的药敏试验采用微量肉汤稀释法,受试抗生素包括9类13种,分别为青霉素类:氨苄西林(AMP), β -内酰胺/ β -内酰胺酶抑制剂复合物:氨苄西林/舒巴坦(AMS),头孢类:头孢噻肟(CTX)、头孢西丁(CFX)、头孢他啶(CAZ)、头孢唑啉(CFZ),碳青霉烯类:亚胺培南(IPM),氨基糖苷类:庆大霉素(GEN),四环素类:四环素(TET),喹诺酮类和氟喹诺酮类:萘啶酸(NAL)、环丙沙星(CIP),苯丙醇类:氯霉素(CHL),磺胺类:甲氧苄啶/磺胺甲噁唑(SXT)。以大肠埃希菌(ATCC 25922)为质控菌株,最小抑菌浓度(MIC)允许范围和MIC解释标准参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)制定的标准^[6]。采用BioNumerics 7.6对药敏数据进行处理分析。

1.3 统计学分析

采用Excel 2010和SPSS 20.0软件进行统计和分析,检出率的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 婴幼儿食品中克罗诺杆菌的检出情况

2.1.1 不同种类食品中克罗诺杆菌的检出情况

168份婴幼儿配方奶粉中未检出克罗诺杆菌,169份婴幼儿谷类辅助食品中有24份检出克罗诺杆菌,检出率为14.2%,两种食品中克罗诺杆菌检出率差异有统计学意义($\chi^2=25.687,P<0.05$)。

2.1.2 婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌的分布

在农村采集的婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌检出率为13.1%(8/61),而城市为14.8%(16/108),见表1,二者差异无统计学意义($\chi^2=0.092,P>0.05$)。在4个季度所采婴幼儿谷类辅助食品均检出克罗诺杆菌,检出率差异无统计学意义($\chi^2=5.662,P>0.05$)。

表1 不同采样地点和采样时间婴幼儿谷类辅助食品中
克罗诺杆菌的检出情况Table 1 Detection of *Cronobacter* in infant cereal supplements
in different sampling sessions, locations and quarters

类别	样品份数	检出份数	检出率/%	
采样地点	城市	108	16	14.8
	农村	61	8	13.1
采样时间	第一季度	42	5	11.9
	第二季度	48	10	20.8
	第三季度	42	2	4.8
	第四季度	37	7	18.9

2.2 MALDI-TOF MS 验证结果

将克罗诺杆菌分离菌株纯化培养,挑取单个菌落,经MALDI-TOF MS验证,24份样品分离出的24株克罗诺杆菌均为阳性,MALDI-TOF MS验证结果符合率为100.0%。

2.3 药敏试验结果

24株克罗诺杆菌分离菌株中有16株耐药,耐药率为66.7%,只有2株对13种抗生素全部敏感。在所测13种抗生素中,克罗诺杆菌分离菌株对CFZ的耐药率最高(62.5%,15/24),其次为SXT(29.2%,7/24),对CHL、TET和AMP的耐药率均为20.8%(5/24),所有菌株对CIP和IPM全部敏感,见表2。

表2 婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌分离菌株
药敏试验结果(n=24)Table 2 Results of drug susceptibility test of *Cronobacter*
isolates in infant cereal supplements

抗生素	菌株数			耐药率/%
	耐药	中介	敏感	
CFZ	15	6	3	62.5
SXT	7	0	17	29.2
CHL	5	0	19	20.8
TET	5	1	18	20.8
AMP	5	1	18	20.8
NAL	4	0	20	16.7
CTX	1	1	22	4.2
AMS	1	3	20	4.2
CIP	0	0	24	0.0
GEN	0	1	23	0.0
CFX	0	6	18	0.0
CAZ	0	1	23	0.0
IPM	0	0	24	0.0

24株克罗诺杆菌分离菌株中,多重耐药(同时对3类及以上抗生素耐药)菌株占比为20.8%(5/24),其中有1株菌最多能耐7种抗生素,耐药谱为CHL-TET-CTX-AMP-AMS-CFZ-SXT,见表3。

2.4 克罗诺杆菌 PFGE 分子分型结果

对24株克罗诺杆菌进行PFGE分子分型,共得到23条有效指纹图谱。采用BioNumerics 7.6对图

表3 克罗诺杆菌分离菌株耐药谱分布(n=24)

Table 3 Drug resistant spectrum of *Cronobacter* isolates

耐药谱	菌株数	占比/%
CFZ	8	33.3
AMP-SXT	1	4.2
NAL-CFZ	1	4.2
CFZ-SXT	1	4.2
CHL-TET-AMP-CFZ-SXT	1	4.2
CHL-NAL-TET-CFZ-SXT	1	4.2
CHL-NAL-TET-AMP-CFZ-SXT	2	8.3
CHL-TET-CTX-AMP-AMS-CFZ-SXT	1	4.2

谱进行聚类分析显示,相似度范围在46.6%~100.0%。23株分离株共有22种分子型别(图1),其中菌株JX2018FX0070和JX2018FX0074的两条指纹图谱相似度达100.0%,为同一型别,可认为是同一流行株,两者来自不同厂家的不同产品。菌株JX2018FX0023、JX2018FX0027和JX2018FX002的三条指纹图谱相似度达90%以上,且条带差异小于3条,说明三者间有密切关系^[6],其中菌株JX2018FX0023与JX2018FX002来自同一厂家的同类产品,JX2018FX0027为不同厂家的不同产品。JX2018FY0027与JX2018FY0025、JX2018FX0015与JX2018FX0067分别为同一厂家的同类产品,但分子型别无流行病学相关性^[7]。

3 讨论

本研究采集的169份婴幼儿谷类辅助食品中,共有24份样品检出克罗诺杆菌,检出率为14.2%,而在168份婴幼儿配方奶粉中未检出克罗诺杆菌,与相关报道^[8-10]一致。国内有些地区在婴幼儿配方奶粉中检出克罗诺杆菌^[11-13],但检出率均较低,这种现象可能与采样量和采样地点的差异有关。本研究发现婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌的检出率远高于婴幼儿配方奶粉,可能原因与我国国家标准中对婴幼儿配方食品中克罗诺杆菌的限量要求严格有关^[14];还可能由于本研究中婴幼儿配方奶粉的生产厂商基本是较大型企业,相对于小型企业其原料、生产、保藏及运输过程管控较严,产品卫生情况较好。我国国家标准对婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌没有限量要求,加之近年来婴幼儿谷类辅助食品市场异军突起,不少研究者也指出,婴幼儿米粉市场较为混乱,存在较为严重的质量及安全隐患,如微生物超标等现象较为普遍^[15]。

本研究中对克罗诺杆菌鉴定的结果与MALDI-TOF MS法验证的结果一致,表明在一般情况下,为节省时间可以采用MALDI-TOF MS法辅助菌落的鉴定。此外,24株克罗诺杆菌中只有2株菌对13种抗生素全部敏感,有16株菌对1种及以上抗生素

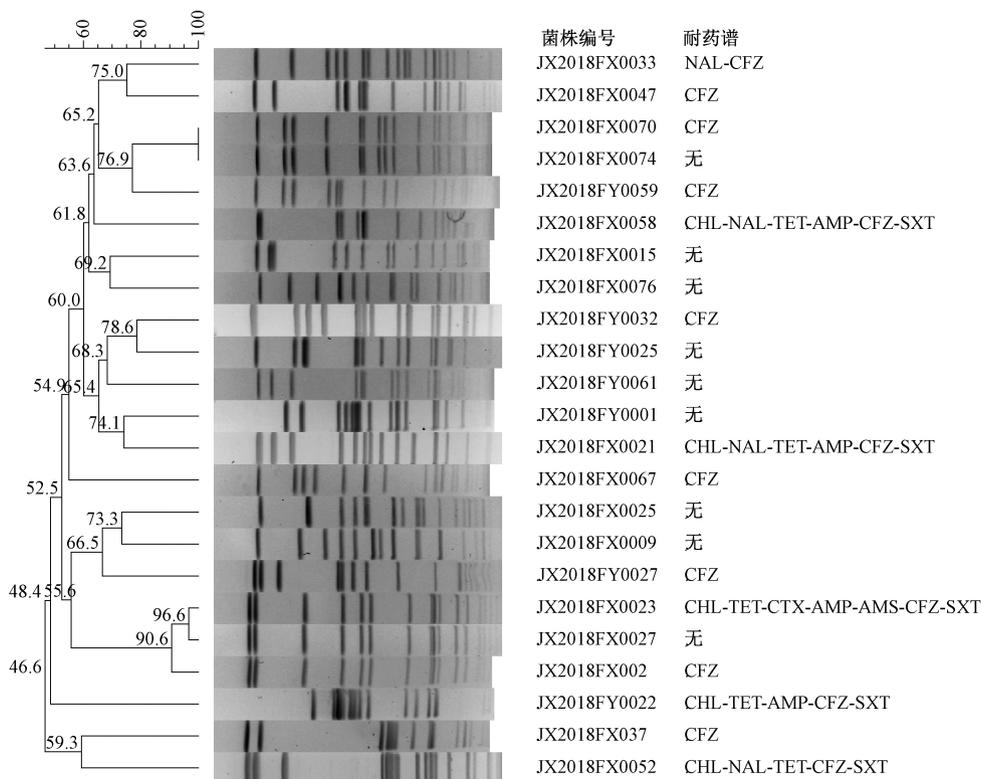


图1 2018年婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌分离株 PFGE 图谱聚类分析

Figure 1 Cluster analysis of PFGE patterns of *Cronobacter* isolates in infant cereal supplements in 2018

产生耐药,主要耐受 CFZ、SXT、CHL、TET、AMP 和 NAL,只对 CIP 和 IPM 全部敏感。有文献指出婴幼儿食品中克罗诺杆菌分离菌株主要耐受 CFZ、AMP、头孢噻吩、阿莫西林、头孢吡辛^[16-17]等,对 IPM、CAZ、CTX、CIP、GEN、CHL、NAL 和 SXT 高度敏感^[10,16]。与早期的报道^[11,16-18]比较,本研究中克罗诺杆菌的耐药性加剧,且多重耐药现象不容乐观。由此可见,婴幼儿食品中克罗诺杆菌分离菌株对一、二代头孢菌素不敏感,提示一、二代头孢菌素不宜作为治疗克罗诺杆菌感染的临床用药,建议临床治疗应尽量针对药敏试验结果,选用适合有效的窄谱抗生素,有效地控制克罗诺杆菌的耐药程度。

PFGE 分子分型结果显示共有 22 个型别,其中相似度为 100.0% 的两个分离菌株来自不同厂家的不同产品,可能这两种产品在原料、运输过程中存在相同污染源。在相同厂家生产的同类产品中,分离菌株(如 JX2018FY0027 与 JX2018FY0025、JX2018FX0015 与 JX2018FX0067)未表现出流行病学相关性,可能该厂家在原料、加工、运输等过程中存在不同的污染。来自同一厂家同种产品中的分离菌株的分子型别呈现高度的相似性(如 JX2018FX0023 与 JX2018FX002),该厂家可能在生产过程中存在同一污染源。其他分离菌株 PFGE 型别的高度多样化在一定程度上反映克罗诺杆菌在婴幼儿谷类辅助食品中普遍存在。这些结果也表

明,PFGE 技术可以从基因组方面快速分析菌株间的关系,实现准确溯源,在流行病学调查以及疾病控制方面发挥较大的作用。

此外,本研究中未发现分离菌株的 PFGE 型别与其耐药谱之间的关联性。但有文献^[19-20]报道 PFGE 分子型别相似度极高的菌株有相同的耐药谱,同时也有极高相似度的 PFGE 分子型别的菌株存在不同的耐药谱,所以,PFGE 分子型别与其耐药谱之间的关系还有待在全基因组序列层面,甚至是蛋白质表达方面做深入研究。

参考文献

- [1] ZIAD W J, WASEEM A M, AHMED E, et al. *Cronobacter* spp.-opportunistic foodborne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits [J]. J Med Microbiol, 2014, 63 (8): 1023-1037.
- [2] 章迎春,陆永梅.绍兴市售婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌污染状况分析[J].中国卫生检验杂志,2015,25(15):2608-2609,2612.
- [3] YAN Q Q, CONDELL O, POWER K, et al. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium[J]. J Appl Microbiol, 2012, 113(1): 1-15.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验:GB 4789.40—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [5] 国家食品安全风险评估中心.2018年食源性疾病预防工作手