

and metalloids pollutants on the microbiota composition of feces obtained from twelve commercial pig farms across China [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 647:577-586.

[18] WANG L, NAKAMURA H, KAGE-NAKADAI E, et al.

Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 249:44-52.

## 研究报告

# 食品及销售环境中枸橼酸杆菌污染状况及耐药谱分析

秦丽云<sup>1</sup>, 蒋瑞萍<sup>1</sup>, 高伟利<sup>1</sup>, 吕国平<sup>2</sup>, 吕新朝<sup>1</sup>, 宿歆<sup>1</sup>

(1. 石家庄市疾病预防控制中心 河北省疑难细菌研究重点实验室, 河北 石家庄 050011;  
2. 河北省中医学院, 河北 石家庄 050000)

**摘要:**目的 了解石家庄市食品以及销售环境中枸橼酸杆菌的污染状况和菌株耐药情况,为预防由该菌引起的食源性疾病及临床治疗用药提供科学依据。方法 采集石家庄市内4区以及周边4县(区)的超市及农贸市场的生畜肉、生禽肉、动物性水产品、熟食,对4类食品以及销售环境样品进行枸橼酸杆菌分离检测,并对分离株进行耐药检测。菌株鉴定应用飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)系统和全自动细菌鉴定药敏分析系统(VITEK 2 Compact)进行鉴定,药敏试验采用微量肉汤稀释(MIC)法。结果 320份不同来源的样品中,有62份检出枸橼酸杆菌,共分离菌株72株,总检出率为19.4%(62/320),4类食品以及销售环境样品均有检出,其中生畜肉检出率为28.2%(33/117),生禽肉为21.3%(10/47),水产品为18.2%(8/44),熟食为15.7%(8/51),环境样品为4.9%(3/61),食品与环境样品间检出率差异有统计学意义( $\chi^2=10.08, P<0.01$ ),4类食品样品检出率差异无统计学意义( $\chi^2=4.01, P>0.05$ )。菌株的耐药情况比较严重,对所检测的26种抗生素均有不同程度的耐药,对头孢唑林(93.1%,67/72)、头孢西丁(81.9%,59/72)耐药率较高,所有菌株均对美罗培南敏感;分离的枸橼酸杆菌中,产生超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)7株,占9.7%(7/72);耐药谱中66株显示多重耐药(MDR),多重耐药株占比高达91.7%(66/72)。结论 枸橼酸杆菌在食品中污染较为严重,分离株呈高耐药和多重耐药趋势,并有可能成为引起食源性疾病发生的潜在因素,应引起重视。

**关键词:**枸橼酸杆菌;食品;销售环境;污染状况;菌株耐药;食源性疾病

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)02-0131-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.02.002

## Contamination of *Citrobacter* spp. in food and sales environment samples and the antibiotics resistance profile of the isolates

QIN Liyun<sup>1</sup>, JIANG Ruiping<sup>1</sup>, GAO Weili<sup>1</sup>, LYU Guoping<sup>2</sup>, LYU Xinchao<sup>1</sup>, SU Xin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Unidentifical Bacteria Research of Hebei Province, Shijiazhuang Center for Disease Control and Prevention, Hebei Shijiazhuang 050011, China;  
2. Hebei University of Chinese Medicine, Hebei Shijiazhuang 050000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the contamination of *Citrobacter* spp. in food and sales environment samples in Shijiazhuang City discovery the antibiotics resistance profile of the *Citrobacter* spp. isolates, and provide scientific basis for the prevention of foodborne diseases caused by the bacterium and clinical treatment. **Methods** Four kinds of food samples including animal meat, poultry meat, aquatic products and cooked food and sales environment samples were collected from four urban counties and four suburban counties in Shijiazhuang. *Citrobacter* spp. were isolated and then the antibiotics resistance analysis of the isolates were performed. All the strains were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system and VITEK 2 Compact system. Antibiotics susceptibility was performed by broth microdilution method. **Results** Among the 320 samples, 62 samples were *Citrobacter* spp. positive (19.4%, 62/320), and 72 *Citrobacter* spp. strains were isolated. The contamination rate of *Citrobacter*

spp. were 28.2% (33/117) in animal meat, 21.3% (10/47) in poultry meat, 18.2% (8/44) in aquatic products, 15.7% (8/51) in cooked food and 4.9% (3/61) in sales environment samples. There were significant differences in the contamination rate of *Citrobacter* spp. in food samples and sales environment samples ( $\chi^2 = 10.08$ ,  $P < 0.01$ ), but the differences among four kinds of food samples were not significant ( $\chi^2 = 4.01$ ,  $P > 0.05$ ). The antibiotic resistance of the strains were serious. Most of the *Citrobacter* spp. strains were resistant to cefazolin (93.1%, 67/72), and cefoxitin (81.9%, 59/72). All of the *Citrobacter* spp. strains were not sensitive to meropenem. There were seven *Citrobacter* spp. produced extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLs), and most of the *Citrobacter* spp. strains were found to be multiple drug resistance (MDR) (91.7%, 66/72). **Conclusion** The contamination of *Citrobacter* spp. in food samples was quite severe and most of the *Citrobacter* spp. isolates were antibiotic resistant and MDR. *Citrobacter* spp. had a potential food poisoning risk and it should be paid great attention.

**Key words:** *Citrobacter* spp.; food; sales environment; contamination; antibiotics resistance; foodborne disease

枸橼酸杆菌属(*Citrobacter* spp.)是革兰阴性杆菌,属于肠杆菌科,在自然界中广泛分布,水、土壤、食物、人和动物的肠道组织里均能分离到枸橼酸杆菌<sup>[1-2]</sup>,与埃希菌属一样,枸橼酸杆菌可通过食品、饮水和被粪便污染的人的手指进行传播,引起腹泻和食物中毒<sup>[3]</sup>。临床上属于重要的条件致病菌,常引起尿道炎、腹膜炎、脑膜炎、医院获得败血症等院内感染<sup>[2]</sup>。2008年 Mohnarin 数据报告,枸橼酸杆菌在临床分离的肠杆菌科细菌中占第5位<sup>[4]</sup>,容易获得耐药基因而成为院内感染的常见耐药菌之一<sup>[5]</sup>。国外有报道,从人和牛分离的弗劳地枸橼酸杆菌中检测到 STX2 样的毒力因子<sup>[6]</sup>。近年来,在一些腹泻患者的标本中往往不能分离到常见的致病菌,而是分离到枸橼酸杆菌。为了研究石家庄市食品以及销售环境中枸橼酸杆菌的污染状况和菌株耐药情况,掌握该菌的生化型别分布以及耐药谱,本课题组于2018年8月选择了石家庄市销售量较大、风险较高的食品及其销售环境,专项开展了枸橼酸杆菌污染及其耐药性研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品采集

2018年8—11月,在石家庄市内4区及周边4县(区)设置监测采样点,从监测点各选择大型超市、农贸市场等场所采集消费量及风险较高食品及销售环境样品,共采集样品320份,其中生畜肉(猪肉、牛肉、羊肉)117份、生禽肉(鸡肉、鸭肉)47份、水产品(鱼、虾等)44份、熟食51份、容器及销售环境样品61份。环境样品的采集采用有柄海绵涂抹棒,涂抹棒含有10 mL 缓冲蛋白胨水(BPW),无菌操作,从采样袋中取出海绵,对待检区域进行涂抹采样。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

BPW、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)、HE琼脂、伊红美蓝琼脂(EMB)、麦康凯琼脂(MAC)、MH琼脂

均购自北京陆桥技术公司,VITEK 2 Compact、GN 鉴定卡均购自法国梅里埃,HCCA Portioned(质谱仪基质)、微生物飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)系统均购自德国 Bruker,海绵涂抹棒、革兰阴性需氧菌药敏检测板、营养肉汤培养液均购自上海星佰生物技术有限公司,革兰阴性需氧菌药敏检测板带有26种抗生素,分别为氨苄西林(AMP)、氨苄西林/舒巴坦(AMS)、四环素(TET)、氯霉素(Chl)、复方新诺明(SXT)、头孢唑林(CFZ)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢西丁(CFX)、庆大霉素(GEN)、亚胺培南(IMI)、萘啶酸(NAL)、磺胺异噁唑(Sul)、环丙沙星(CIP)、阿莫西林/克拉维酸(AMC)、多粘菌素E(CT)、多粘菌素B(PB)、米诺环素(MIN)、阿米卡星(AMI)、氨基糖苷类(AZM)、头孢吡肟(FEP)、美罗培南(MEM)、左氧氟沙星(LEV)、多西环素(DOX)、卡那霉素(KAN)和链霉素(STR)。

#### 1.1.3 质控菌株

弗氏枸橼酸杆菌(ATCC 43864)、大肠埃希菌(ATCC 25922)均购自中国药品生物制品检定所。

## 1.2 方法

### 1.2.1 枸橼酸杆菌的分离鉴定

食品样品:取样品25 g置于225 mL BPW中,36℃培养过夜,接种至HE和MAC选择性培养基上,置于36℃培养箱中培养18~24 h。环境样品:将采样液36℃培养过夜,接种至HE和MAC选择性培养基上,置于36℃培养箱中培养18~24 h。

### 1.2.2 可疑菌株鉴定及药敏试验

挑取选择平板上的可疑菌落应用MALDI-TOF MS进行快速鉴定,对鉴定不明确的可疑菌株,用VITEK 2 Compact进一步补充鉴定,得到鉴定结果和生化型别。采用微量肉汤稀释(MIC)法并依据测试盒提供的操作步骤进行药敏试验。头孢噻肟/克拉维酸、头孢他啶/克拉维酸MIC值低于相对应头孢噻肟、头孢他啶3个或3个以上浓度梯度,测试菌株为产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBL)株。

### 1.3 统计学分析

利用 Excel 建立数据库,应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,率的比较采用 $\chi^2$  检验,以 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

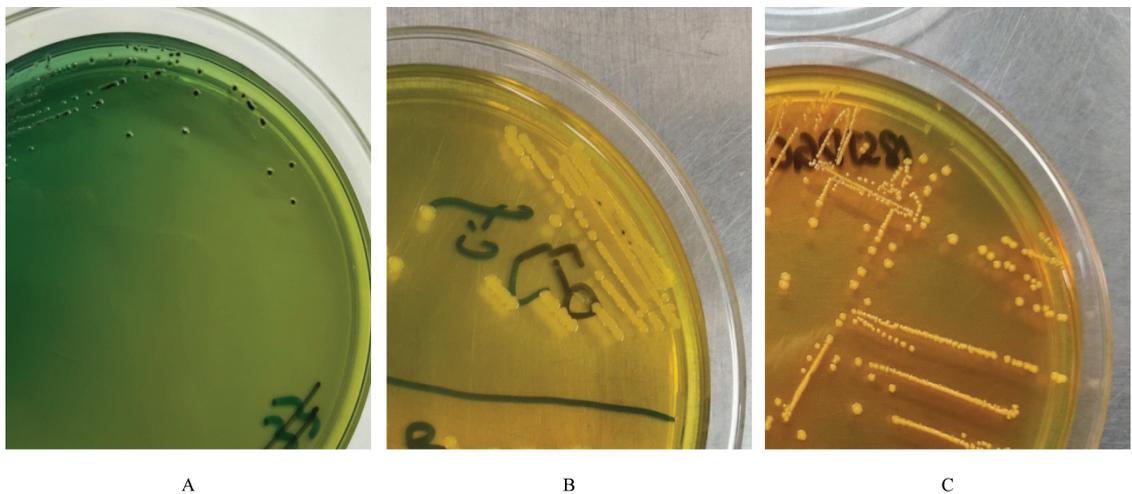
## 2 结果

### 2.1 枸橼酸杆菌分离情况

#### 2.1.1 枸橼酸杆菌在选择平板上的菌落特征

枸橼酸杆菌的生化特征:多数硫化氢阳性

(80%),乳糖阳性或阴性,36 ℃ 培养 24 h 后,枸橼酸杆菌在 HE 平板上大致可有 3 种形态特征(见图 1),从图 1A 可以看到,菌落周围是蓝绿色中间带黑心(表示菌株不发酵乳糖,硫化氢阳性);从图 1B 可以看到,菌落是黄色中间带黑心(表示菌株发酵乳糖,硫化氢阳性);从图 1C 可以看到,菌落是黄色中间不带黑心(表示菌株发酵乳糖,硫化氢阴性)。



注:A:在 HE 琼脂平板 36 ℃ 培养 24 h 后蓝绿色带黑心的枸橼酸杆菌;B:在 HE 琼脂平板 36 ℃ 培养 24 h 后黄色带黑心的枸橼酸杆菌;C: 在 HE 琼脂平板 36 ℃ 培养 24 h 后黄色的枸橼酸杆菌

图 1 枸橼酸杆菌在 HE 琼脂平板上的 3 种菌落特征

Figure 1 Morphological characters of *Citrobacter* spp. on HE agar plate

#### 2.1.2 不同样品中枸橼酸杆菌检出情况

320 份不同来源的样品中,有 62 份检出枸橼酸杆菌,检出率为 19.4% (62/320),4 类食品样品和环境样品均有检出,其中食品样品检出率为 22.8% (59/259),环境样品检出率为 4.9% (3/61),食品与环境样品间检出率差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.08, P < 0.01$ )。食品样品中,生畜肉检出率最高,为 28.2% (33/117),33 份阳性样品

中检出 36 株枸橼酸杆菌;生禽肉检出率为 21.3% (10/47),10 份阳性样品中检出 13 株枸橼酸杆菌;水产品检出率为 18.2% (8/44),检出 9 株枸橼酸杆菌;熟食检出率为 15.7% (8/51),检出 10 株枸橼酸杆菌。4 类食品检出率差异无统计学意义( $\chi^2 = 4.01, P > 0.05$ )。3 份环境阳性样品中检出 4 株枸橼酸杆菌。各类样品枸橼酸杆菌检出率及菌株分离情况见图 2。

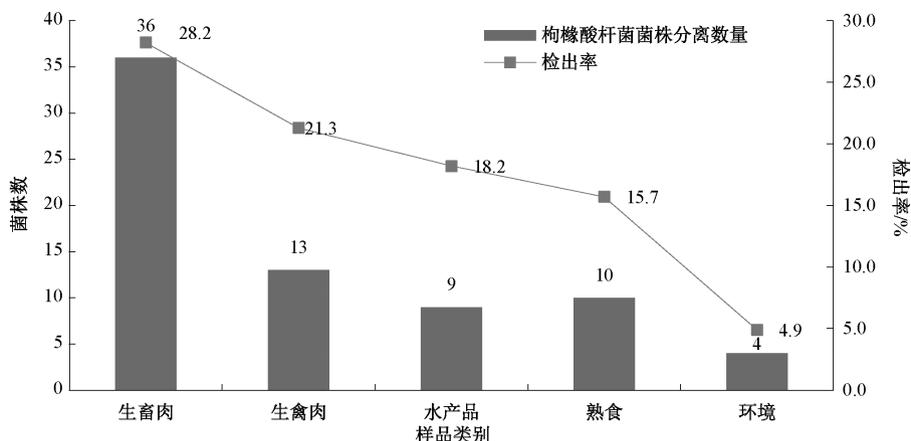


图 2 各类样品中枸橼酸杆菌分离数量及检出率

Figure 2 Quantity and contamination rate of *Citrobacter* spp. in four kinds of food and environment samples

2.1.3 枸橼酸杆菌各生化型别检出情况

在检出枸橼酸杆菌的 62 份样品中,共分离到 72 株菌,有弗氏枸橼酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、布氏枸橼酸杆菌 (*Citrobacter braakii*) 和 杨氏枸橼酸杆菌 (*Citrobacter youngae*) 3 种型别,其中以弗氏枸橼酸杆菌最多,占总检出菌株的

63.9% (46/72), 其次是布氏枸橼酸杆菌占 31.9% (23/72), 杨氏枸橼酸杆菌占 4.2% (3/72), 3 种型别枸橼酸杆菌在各类样品中的分布各异,但均以生畜肉检出最多,见表 1。62 份阳性样品中,每类样品均有同一份样品检出 2 种枸橼酸杆菌的情况。

表 1 72 株枸橼酸杆菌总构成比和各型别在各类样品构成比结果 [株 (%) ]

Table 1 Total constituent ratio and types of 72 *Citrobacter* spp. in samples

检出型别	总检出株数	生畜肉	生禽肉	水产品	熟食	环境
弗氏枸橼酸杆菌	46 (63.9)	22 (47.8)	9 (19.6)	7 (15.2)	5 (10.9)	3 (6.5)
布氏枸橼酸杆菌	23 (31.9)	11 (47.8)	4 (17.4)	2 (8.7)	5 (21.7)	1 (4.3)
杨氏枸橼酸杆菌	3 (4.2)	3 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
合计	72 (100.0)	36 (50.0)	13 (18.1)	9 (12.5)	10 (13.9)	4 (5.6)

2.2 枸橼酸杆菌分离株抗生素耐药情况

2.2.1 枸橼酸杆菌分离株的耐药结果

药敏结果显示,72 株枸橼酸杆菌分离株对所检测的 26 种常用抗菌药物呈现不同程度的耐药现象,耐药率较高的抗生素有头孢唑林 (93.1%, 67/72)、头孢西丁 (81.9%, 59/72)、四环素 (54.2%, 39/72)、萘啶酸 (50.0%, 36/72), 所有菌株均对美罗培南敏感。4 类食品样品枸橼酸杆菌分离株中,熟食分离株对 5 种抗生素的耐药率达

到 50% 以上,生畜肉、生禽肉、水产品分离株分别对 4 种抗生素的耐药率达到 50% 以上,熟食分离株对氨苄西林/舒巴坦耐药率高于生畜肉、生禽肉、水产品分离株,差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 9.35, P < 0.05$ ), 熟食分离株对亚胺培南耐药率高于生畜肉、生禽肉、水产品分离株,差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 11.95, P < 0.01$ ), 对其他抗生素的耐药率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。不同来源枸橼酸杆菌分离株的耐药结果见表 2。

表 2 不同来源枸橼酸杆菌分离株的耐药率 (%)

Table 2 Antibiotics resistance result of the *Citrobacter* spp. isolates

抗生素	生畜肉分离株	生禽肉分离株	水产品分离株	熟食分离株	环境分离株
氨苄西林	44.4 (16/36)	30.8 (4/13)	55.6 (5/9)	50.0 (5/10)	0.0 (0/4)
氨苄西林/舒巴坦	2.8 (1/36)	7.7 (1/13)	0.0 (0/9)	30.0 (3/10)	0.0 (0/4)
四环素	52.8 (19/36)	53.8 (7/13)	44.4 (4/9)	60.0 (6/10)	75.0 (3/4)
氯霉素	16.7 (6/36)	23.1 (3/13)	11.1 (1/9)	20.0 (2/10)	0.0 (0/4)
复方新诺明	22.2 (8/36)	38.5 (5/13)	33.3 (3/9)	30.0 (3/10)	75.0 (3/4)
头孢唑林	91.7 (33/36)	92.3 (12/13)	88.9 (8/9)	100.0 (10/10)	100.0 (4/4)
头孢噻肟	8.3 (3/36)	7.7 (1/13)	11.1 (1/9)	20.0 (2/10)	0.0 (0/4)
头孢他啶	0.0 (0/36)	7.7 (1/13)	11.1 (1/9)	10.0 (1/10)	0.0 (0/4)
头孢西丁	86.1 (31/36)	69.2 (9/13)	77.8 (7/9)	80.0 (8/10)	100.0 (4/4)
庆大霉素	11.1 (4/36)	0.0 (0/13)	0.0 (0/9)	0.0 (0/10)	0.0 (0/4)
亚胺培南	0.0 (0/36)	0.0 (0/13)	0.0 (0/9)	20.0 (2/10)	0.0 (0/4)
萘啶酸	50.0 (18/36)	30.8 (4/13)	44.4 (4/9)	70.0 (7/10)	75.0 (3/4)
磺胺异噁唑	19.4 (7/36)	15.4 (2/13)	22.2 (2/9)	30.0 (3/10)	75.0 (3/4)
环丙沙星	11.1 (4/36)	15.4 (2/13)	11.1 (1/9)	20.0 (2/10)	25.0 (1/4)
阿莫西林/克拉维酸	61.1 (22/36)	76.9 (10/13)	66.7 (6/9)	70.0 (7/10)	0.0 (0/4)
多粘菌素 E	0.0 (0/36)	15.4 (2/13)	11.1 (1/9)	20.0 (2/10)	0.0 (0/4)
多粘菌素 B	0.0 (0/36)	7.7 (1/13)	11.1 (1/9)	20.0 (2/10)	0.0 (0/4)
米诺环素	0.0 (0/36)	7.7 (1/13)	0.0 (0/9)	10.0 (1/10)	0.0 (0/4)
阿米卡星	0.0 (0/36)	7.7 (1/13)	11.1 (1/9)	0.0 (0/10)	0.0 (0/4)
氨基南	0.0 (0/36)	7.7 (1/13)	11.1 (1/9)	10.0 (1/10)	0.0 (0/4)
头孢吡肟	2.8 (1/36)	7.7 (1/13)	11.1 (1/9)	0.0 (0/10)	0.0 (0/4)
美罗培南	0.0 (0/36)	0.0 (0/13)	0.0 (0/9)	0.0 (0/10)	0.0 (0/4)
左氧氟沙星	8.3 (3/36)	15.4 (2/13)	33.3 (3/9)	0.0 (0/10)	25.0 (1/4)
多西环素	19.4 (7/36)	15.4 (2/13)	22.2 (2/9)	20.0 (2/10)	25.0 (1/4)
卡那霉素	2.8 (1/36)	7.7 (1/13)	11.1 (1/9)	0.0 (0/10)	25.0 (1/4)
链霉素	22.2 (8/36)	15.4 (2/13)	44.4 (4/9)	20.0 (2/10)	0.0 (0/4)

2.2.2 枸橼酸杆菌分离株产 ESBLs 菌株结果

72 株枸橼酸杆菌分离株有 7 株产 ESBLs 株,占

比 9.7%, 熟食分离株最高,为 20.0% (2/10), 其次是生畜肉分离株 (11.1%, 4/36) 和生禽肉 (7.7%,

1/13), 3类样品比较差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.87$ ,  $P > 0.05$ ), 水产品、环境分离株均未检出产 ESBLs 株, 见表 3。

表 3 枸橼酸杆菌分离株产 ESBLs 菌株情况

Table 3 ESBLs product strains rate of the *Citrobacter*

样品类别	spp. isolates		
	菌株数	产 ESBLs 菌株数	占比/%
生畜肉	36	4	11.1
生禽肉	13	1	7.7
水产品	9	0	0.0
熟食	10	2	20.0
环境	4	0	0.0
合计	72	7	9.7

### 2.2.3 枸橼酸杆菌分离株多重耐药情况

枸橼酸杆菌耐药结果显示, 耐药谱中 66 株显示多重耐药 (MDR), 多重耐药株占比高达 91.7% (66/72), 共产生 60 种耐药谱型, 5 种来源样品中枸橼酸杆菌多重耐药菌株的检出率差异无统计学意义( $\chi^2 = 4.74$ ,  $P > 0.05$ ), 耐药谱详见表 4。

## 3 讨论

枸橼酸杆菌属作为肠杆菌科的一员, 广泛存在于水、土壤、食物和人类与动物肠道中, 属于条件致病菌, 当机体抵抗力降低时, 该菌即可引起胃肠炎和肠道外感染等, 极易造成严重后果。引起腹泻和食物中毒的事件国内外均不乏报道: 美国曾有过由弗氏枸橼酸杆菌污染食物引起的暴发性腹泻事件的记载<sup>[7]</sup>; 印度和德国也报道过由弗氏枸橼酸杆菌污染婴儿奶粉后导致婴儿集体腹泻事件<sup>[8-9]</sup>; 国内曾有弗劳地枸橼酸杆菌引起食物中毒和肠道腹泻的报道<sup>[10-12]</sup>; 李士永等研究结果表明弗劳地枸橼酸杆菌有较强的毒力, 能引起患者霍乱样腹泻, 如不及时抢救, 将危及生命<sup>[13-14]</sup>。由枸橼酸杆菌导致的感染病例呈上升趋势而逐渐引起关注, 同时, 随着广谱抗生素的使用, 枸橼酸杆菌属对头孢唑辛、替卡西林、氯霉素等耐药率已居于临床检验肠杆菌科细菌的第一位<sup>[15]</sup>。我国作为世界人口大国, 枸橼酸杆菌引起的危害不容小觑, 本研究对销售量较大、污染风险较高的食品及其销售环境进行了枸橼酸杆菌污染状况调查, 并对分离株进行了耐药分析, 以期得到该菌的污染数据及耐药特性, 为预防和控制由该菌引起的感染以及指导临床合理用药提供数据支持。

本研究显示, 食品及其销售环境样品中枸橼酸杆菌总检出率 (19.4%) 高于汪永禄等<sup>[16]</sup>报道的食品餐具及食物中毒标本枸橼酸杆菌检出率 (6.27%); 食品样品中枸橼酸杆菌的检出率 (22.8%) 高于 TASSEW 等<sup>[17]</sup>报道的对来自食品

机构、肉店和屠宰场的 165 份肉制品中枸橼酸杆菌检出率 (9%), 也高于 IBENYASSINE 等<sup>[18]</sup>报道的蔬菜中枸橼酸杆菌检出率 (18.7%)。并且, 每类样品均有同一份样品检出 2 种枸橼酸杆菌的情况, 可见石家庄地区枸橼酸杆菌污染比较普遍, 引起食物中毒的潜在风险很大, 应对其在食品中的污染引起重视。

结果显示生畜肉、生禽肉和水产品枸橼酸杆菌的检出率都较高, 并且在其销售环境中的一些盛放生肉的容器和案板, 也检出了枸橼酸杆菌, 提示生肉制品和动物性水产品在进行加工、贮存、销售过程中易受到枸橼酸杆菌的污染; 特别是在 51 份熟食中有 8 份检出了枸橼酸杆菌, 检出率为 15.7%, 提示在熟食烹饪、储藏和销售环节中存在枸橼酸杆菌的污染, 可能与生熟用具不分、缺乏有效的管理措施有关, 因此, 有关部门应加强熟食制品的原料来源、加工、储藏和销售环节的卫生监管, 防止交叉污染和食源性疾病的发生。

本研究选用 HE 和 MAC 作为分离平板, 均是否是发酵乳糖为检测原理进行显色反应, 而 HE 培养基可以检测细菌是否产硫化氢, 利用这一特点, 可将枸橼酸杆菌属中大部分的产硫化氢细菌鉴别出来; 根据枸橼酸杆菌的生化特征, 总结出了在 HE 平板上可有 3 种形态特征, 这样在挑取可疑菌落时提高了工作效率和准确性, 有利于枸橼酸杆菌的检出, 为传统手段分离枸橼酸杆菌提供了参考。

本次分离以弗氏枸橼酸杆菌最多, 占总检出菌株的 63.9%, 这与石叶夫等<sup>[19]</sup>报道的 97 株枸橼酸杆菌临床分布中弗氏枸橼酸杆菌占 70.1% 较一致。说明, 无论是食品污染株还是临床株弗氏枸橼酸杆菌都是优势菌。已有文献报道, 弗氏枸橼酸杆菌的一些分离株由于获得毒力基因而引起人类的腹泻和其他感染症状<sup>[20]</sup>, 刘丽云等<sup>[21]</sup>报道了弗氏枸橼酸杆菌具有细胞毒性, 通过全基因组测序, 还发现一株弗氏枸橼酸杆菌获得了一个具有完整的六型分泌系统的毒力岛。因此, 枸橼酸杆菌作为一种条件致病菌, 其危害性应引起研究者的重视。

文献报道, 食源性致病菌中耐药株, 甚至多重耐药株不断出现并有上升趋势, 耐受的抗菌药物种类也日趋增多<sup>[22-23]</sup>, 本次药敏结果显示, 72 株枸橼酸杆菌分离株对所检测的 26 种常用抗菌药物呈现出不同程度的耐药现象, 耐药率较高的是头孢类的头孢唑林 (93.1%)、头孢西丁 (81.9%), 其次是四环素类的四环素 (54.2%), 喹诺酮类的萘啶酸 (50.0%), 对美罗培南最敏感, 耐药率为 0.0%, 可

表4 不同来源枸橼酸杆菌分离株的耐药谱

Table 4 Antibiotics resistance profile of the *Citrobacter* spp. isolates from different samples

菌株来源	谱型数目	耐药谱	菌株数	构成比/%
生畜肉	27	AMP-AMS-CFZ-CFX-AMC	1	2.8
		AMP-CFZ-CFX-AMC-STR	2	5.6
		AMP-CFZ-CFX-NAL-AMC	1	2.8
		AMP-CFZ-CTX-CFX-ESBL	2	5.6
		AMP-TET-CFZ-CFX-AMC	1	2.8
		AMP-TET-CFZ-CFX-NAL-AMC	2	5.6
		AMP-TET-CFZ-CFX-NAL-AMC-STR	1	2.8
		AMP-TET-CHL-SXT-CFZ-CFX-GEN-NAL-Sul-CIP-AMC-LEV-DOX	1	2.8
		AMP-TET-CHL-SXT-CFZ-CFX-GEN-NAL-Sul-CIP-LEV-KAN-STR	1	2.8
		AMP-TET-CHL-SXT-CFZ-CFX-Sul-AMC	1	2.8
		AMP-TET-CHL-SXT-CFZ-CTX-CFX-GEN-NAL-Sul-CIP-AMC-ESBL-FEP-DOX	1	2.8
		AMP-TET-SXT-CFZ-CFX-NAL	1	2.8
		AMP-TET-SXT-CFZ-CTX-CFX-AMC-ESBL	1	2.8
		CFZ	2	5.6
		CFZ-CFX	1	2.8
		CFZ-CFX-AMC	1	2.8
		CFZ-CFX-NAL	1	2.8
		CFZ-CFX-NAL-AMC	3	8.3
		CFZ-CFX-NAL-AMC-STR	1	2.8
		TET-CFZ-CFX-AMC-DOX	1	2.8
		TET-CFZ-CFX-DOX	1	2.8
		TET-CFZ-CFX-NAL	2	5.6
		TET-CFZ-CFX-NAL-DOX-STR	1	2.8
		TET-CHL-CFZ-CFX-Sul-AMC-DOX	1	2.8
		TET-CHL-SXT-CFZ-CFX-GEN-NAL-Sul-CIP-AMC-LEV-STR	1	2.8
		TET-NAL-DOX-STR	1	2.8
		TET-SXT-CFZ-CFX-Sul-AMC	1	2.8
生禽肉	11	AMP-AMS-TET-CHL-SXT-CFZ-CFX-Sul-AMC-DOX-STR	1	7.7
		AMP-CFZ-AMC	1	7.7
		AMP-CFZ-CFX-AMC-ESBL	1	7.7
		AMP-TET-CHL-SXT-CFZ-CTX-CAZ-CFX-NAL-Sul-CIP-CT-PB-MIN-AMI-AZM-FEP-LEV-DOX-KAN-STR	1	7.7
		CFZ-CFX-AMC	2	15.4
		CFZ-NAL	1	7.7
		TET-CFZ-CFX-NAL-AMC	1	7.7
		TET-CFZ-CFX-NAL-CIP-AMC-LEV	1	7.7
		TET-CHL-SXT-CFZ-CFX-AMC	1	7.7
		TET-SXT-CFZ-AMC-CT	1	7.7
		TET-SXT-CFZ-CFX-AMC	1	7.7
水产品	9	AMP-CFZ-CFX-AMC	1	11.1
		AMP-CFZ-CFX-NAL-CIP-AMC-LEV	1	11.1
		AMP-TET-CHL-SXT-CFZ-CFX-NAL-Sul-LEV-DOX-STR	1	11.1
		AMP-TET-SXT-CFZ-CFX-NAL-AMC	1	11.1
		AMP-TET-SXT-CFZ-CFX-Sul-AMC-STR	1	11.1
		CFZ-AMC	1	11.1
		CFZ-CFX-AMC	1	11.1
		CFZ-CTX-CAZ-CFX-NAL-Sul-CT-PB-AMI-AZM-FEP-KAN-STR	1	11.1
TET-CHL-SXT-CFZ-CFX-NAL-AMC-LEV-DOX-STR	1	11.1		
熟食	9	AMP-AMS-CFZ-CFX-AMC-CT-PB	1	10.0
		AMP-AMS-TET-CHL-SXT-CFZ-CTX-CAZ-IMI-NAL-Sul-CIP-AMC-ESBL-CT-PB-MIN-AZM-DOX-STR	1	10.0
		AMP-AMS-TET-CHL-SXT-CFZ-CTX-CFX-Sul-AMC-ESBL	1	10.0
		AMP-CFZ-CFX-NAL-AMC	1	10.0
		AMP-CFZ-IMI-NAL-AMC	1	10.0
		CFZ-CFX-AMC	1	10.0
		TET-CFZ-CFX-NAL	2	20.0
		TET-CFZ-CFX-NAL-DOX	1	10.0
		TET-SXT-CFZ-CFX-NAL-Sul-CIP-AMC-STR	1	10.0
环境	4	CFZ-CFX	1	25.0
		TET-SXT-CFZ-CFX-NAL-Sul	1	25.0
		TET-SXT-CFZ-CFX-NAL-Sul-CIP-LEV-KAN	1	25.0
		TET-SXT-CFZ-CFX-NAL-Sul-DOX	1	25.0

作为感染时临床首选药。72株分离株有7株产ESBLs株,占9.7%,生畜肉、生禽肉和熟食3类样品分离株均有,生畜肉分离株最多。ESBLs酶能水解 $\beta$ -内酰胺类抗菌药物的 $\beta$ -内酰胺环并使其灭活,是革兰阴性菌产生耐药的主要原因<sup>[24]</sup>,并且导致菌株呈现多重耐药性,本研究显示多重耐药株占比高达91.7%,共产生54种耐药谱型,耐药谱进一步增宽,值得关注的是,有1株来源于生禽肉的菌株有21重耐药菌株出现,应对此类菌株的耐药机制进行更为深入的研究。

以上研究表明,枸橼酸杆菌在食品和环境中的污染范围较广,分离株呈高耐药和多重耐药趋势,并有可能成为引起食源性疾病发生的潜在因素。因此,一要继续加强对该菌病原学和耐药性监测研究,为更好地防控疾病积累数据;二要结合石家庄地区菌株的耐药特性,对其引起的食源性疾病进行相应的临床用药,以减轻公众的疾病负担;三要提提高居民自我防范意识,养成良好的卫生习惯,增强食源性疾病的安全防范能力。

## 参考文献

- [ 1 ] NADA T, BABA H, KAWAMURA K, et al. A small outbreak of third generation cephem-resistant *Citrobacter freundii* infection on a surgical ward [ J ]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2004, 57(4) : 181-182.
- [ 2 ] KIM P W, HARRIS A D, ROGHMANN M C, et al. Epidemiological risk factors for isolation of ceftriaxone-resistant versus-susceptible *Citrobacter freundii* in hospitalized patients [ J ]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(9) : 2882-2887.
- [ 3 ] GIAMMANCO G M, ALEO A, GUIDA I, et al. Molecular epidemiological survey of *Citrobacter freundii* misidentified as *Cronobacter* spp. ( *Enterobacter sakazakii* ) and *Enterobacter hormaechei* isolated from powdered infant milk formula [ J ]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(4) : 517-525.
- [ 4 ] 窆红涛,谢秀丽,张小江,等. Mohnarin 2008 年度报告:肠杆菌科细菌耐药监测 [ J ]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(7) : 556-560, S1-S4.
- [ 5 ] PARK Y J, YU J K, LEE S, et al. Prevalence and diversity of qnr alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea [ J ]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 60(4) : 868-871.
- [ 6 ] SCHMIDT H, MONTAG M, BOCKEMÜHL J, et al. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples [ J ]. Infection and Immunity, 1993, 61(2) : 534-543.
- [ 7 ] (CDC) CFDC. Gastrointestinal illness associated with imported Brie cheese-District of Columbia [ J ]. MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report, 1983, 32(41) : 533.
- [ 8 ] PARDIA S N, VERMA I C, DEB M, et al. An outbreak of diarrheadue to *Citrobacter freundii* in a neonatal special care nursery [ J ]. The Indian Journal of Pediatrics, 1980, 47(1) : 81-84.
- [ 9 ] THURM V, GERICKE B. Identification of infant food as a vehicle in a nosocomial outbreak of *Citrobacter freundii*: Epidemiological subtyping by allozyme, whole-cell protein and antibiotic resistance [ J ]. Journal of Applied Bacteriology, 1994, 76(6) : 553-558.
- [ 10 ] 左翠瑛. 一起由弗劳地枸橼酸杆菌引起的食物中毒 [ J ]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(3) : 375.
- [ 11 ] 贾维华,薛慧丽,张友晶,等. 1起弗劳地枸橼酸杆菌引起的食物中毒 [ J ]. 预防医学论坛, 2005, 11(6) : 封3.
- [ 12 ] 潘继军. 一株弗劳地枸橼酸杆菌引起的肠道腹泻 [ J ]. 实用医技杂志, 2006, 13(4) : 645.
- [ 13 ] 李士永,刘均凤,孙天梅,等. 腹泻病人粪便中弗氏枸橼酸杆菌的分离鉴定 [ J ]. 中国卫生检验杂志, 1996, 6(1) : 49-50.
- [ 14 ] 马芹,张红霞. 霍乱样腹泻病例中分离出弗氏枸橼酸杆菌 [ J ]. 现代中西医结合杂志, 1999, 8(9) : 1403.
- [ 15 ] 张京文,姜惠,邓书杰,等. 老年患者腹泻粪便弗劳地枸橼酸杆菌复合群的鉴定及耐药性 [ J ]. 中华传染病学杂志, 2002, 20(6) : 357-359.
- [ 16 ] 汪永禄,陶勇,王利安. 食品餐具及食物中毒标本枸橼酸杆菌的污染状况分析 [ C ] // 传染病防控基础研究与应用技术论坛. 中国医学会,中国微生物学会, 2011.
- [ 17 ] TASSEW H, ABDISSA A, BEYENE G, et al. Microbial flora and food borne pathogens on minced meat and their susceptibility to antimicrobial agents [ J ]. Ethiopian Journal of Health Sciences, 2010, 20(3) : 137-143.
- [ 18 ] IBENYASSINE K, MHAND R A, KARAMOKO Y, et al. Bacterial pathogens recovered from vegetables irrigated by wastewater in Morocco [ J ]. Journal of Environmental Health, 2007, 69(10) : 47-51.
- [ 19 ] 石叶夫,吕玉明. 97株枸橼酸杆菌的临床分布及耐药性分析 [ J ]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(4) : 958-959, 962.
- [ 20 ] GUERRANT R L, DICKENS M D, WENZEL R P, et al. Toxicogenic bacterial diarrhea: nursery outbreak involving multiple bacterial strains [ J ]. The Journal of Pediatrics, 1976, 89(6) : 885-891.
- [ 21 ] 刘丽云,夏胜利,孙晖. 潜在致病性的弗氏枸橼酸杆菌的筛查 [ J ]. 疾病监测, 2015, 30(2) : 92-96.
- [ 22 ] SAKKEJHA H, BYRNE L, LAWSON A J, et al. An update on the microbiology and epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* England 2010-2012 [ J ]. Journal of Medical Microbiology, 2013, 62(pt 10) : 1531-1534.
- [ 23 ] CROXEN M A, LAW R J, SCHOLZ R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli* [ J ]. Clinical Microbiology Reviews, 2013, 26(4) : 822-880.
- [ 24 ] BROLUND A, HÆGGMAN S, EDQUIST P J, et al. The DiversiLab system versus pulsed-field gel electrophoresis: Characterisation of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* [ J ]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 83(2) : 224-230.