

风险监测

台州市售婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌污染特征分析

陈喜凯, 盛莹, 沈伟伟, 裘丹红
(台州市疾病预防控制中心, 浙江台州 318000)

摘要:目的 了解台州市售婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌的污染状况、分子分型特征和耐药性。方法 参照 GB 4789.40—2016 对样品进行定性和定量检测, 分离到的菌株进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型和微量肉汤稀释法药敏试验。结果 335 份样品中分离到 41 株克罗诺杆菌, 总检出率为 12.2%; 41 份阳性样品定量结果为 0.36~7.5 MPN/100 g; 食用方式上烹煮类样品检出率最高(46.9%), 购买途径上网购样品检出率最高(24.0%); 41 株菌株 PFGE 聚类分析被分为 34 个带型, 相似度为 45.1%~100.0%, 从同一厂家不同种类样品和不同厂家样品中均有检出同一克隆株; 菌株对头孢唑啉和呋喃妥因的敏感率仅为 48.8% 和 39.0%, 其中 9 株同时对这两种抗生素不敏感。结论 台州市售婴幼儿谷类辅助食品存在克罗诺杆菌的污染, 应关注烹煮类和网购类食品导致婴幼儿感染克罗诺杆菌的风险。

关键词: 谷类辅助食品; 克罗诺杆菌; 药敏性试验; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)07-1075-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.07.016

Analysis of *Cronobacter* contamination characteristics in cereal-based supplementary food for infants in Taizhou

CHEN Xikai, SHENG Ying, SHEN Weiwei, QIU Danhong

(Taizhou Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Taizhou 318000, China)

Abstract: Objective To investigate the contamination, molecular typing characteristics, and drug resistance of *Cronobacter* in cereal-based infant food in Taizhou. **Methods** All samples were detected qualitatively and quantitatively according to GB 4789.40—2016. Isolated strains were typed using pulse field gel electrophoresis (PFGE), and antibiotic susceptibility tests were performed using the micro-broth dilution method. **Results** Forty-one strains were isolated from 335 samples. The total detection rate was 12.2%, and the quantitative results were 0.36-7.5 MPN/100 g. The cooked sample (46.9%) had the highest detection rate among edible samples, and the sample purchased online (24.0%) had the highest detection rate among purchased samples. Forty-one strains were divided into 34 PFGE patterns with similarity rates of 45.1%-100.0%, and some strains from different enterprises or different branches of one enterprise belonged to the same clone. Their insensitivity rates to cefazolin and nitrofurantoin were 48.8% and 39.0%, respectively, and 9 strains were insensitive to both. **Conclusion** Some cereal-based supplementary foods for infants were contaminated with *Cronobacter* in Taizhou. It is necessary to pay attention to the risk of *Cronobacter* infection in infants caused by cooked food and food purchased online.

Key words: Cereal-based supplementary food; *Cronobacter*; antibiotic susceptibility test; pulsed field gel electrophoresis

克罗诺杆菌(*Cronobacter*)原名阪崎肠杆菌,是一种寄生在人或动物肠道内的条件致病菌;它主要感染婴幼儿,特别是早产儿和免疫力下的新生儿;它是婴幼儿食品中威胁健康的主要致病菌,严重可引起脑膜炎、菌血症甚至坏死性小肠结肠炎,致死率高达 40%~80%^[1-2]。近年文献报道婴幼儿谷类辅助食品中普遍存在克罗诺杆菌的污染,部分省

市检出率接近 30%^[3-7]。本文对 2018 年台州市售婴幼儿谷类辅助食品的克罗诺杆菌污染状况进行调查分析,并对菌株的分子分型特征和耐药情况进行回顾性研究,为本地区该类食品中克罗诺杆菌的监测、污染溯源和控制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

2018 年根据国家食品污染和有害因素风险监测工作要求,采用随机抽样的方法通过超市、专卖

收稿日期:2022-08-15

基金项目:台州市科技局社会发展科技项目(20ywb106)

作者简介:陈喜凯 男 主管技师 研究方向为食品微生物学

E-mail:185chenkai888@163.com

店和网购等渠道共采集 335 份婴幼儿谷类辅助食品,涵盖国内外的即食类、冲调类和烹煮类等样品,详见表 1。样品包装均完整且在保质期内。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定分析系统(法国梅里埃);CHEF MAPPER 型 PFGE 仪、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad)。

革兰阴性菌鉴定卡和药敏板(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 mLST-Vm 和阪崎肠杆菌显色培养基(广州环凯);阪崎肠杆菌 ATCC 29544、沙门菌 H9812、大肠杆菌 ATCC 25922(浙江省疾病预防控制中心提供)。

1.2 方法

1.2.1 常规检测与鉴定

参照 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》中的第一法定性和第二法计数方法(Most probable number, MPN 法)。分离到的菌株用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定分析系统进行鉴定。阪崎肠杆菌 ATCC 29544 作为阳性对照菌株。

1.2.2 药物敏感试验

参照 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定分析系统操作说明,使用药敏板 AST-GN13 检测菌株的药物敏感性,判定依据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)发布的药物敏感试验标准。药物包括氨苄西林、氨苄西林-舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢唑啉、头孢吡肟、头孢他啶、头孢曲松、头孢替坦、氨曲南、厄他培南、亚氨培南、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、呋喃妥因、复方新诺明等共 9 类 18 种。大肠杆菌 ATCC 25922 作为质控菌株。

1.2.3 脉冲场凝胶电泳

脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)参照国家致病菌识别网技术规范中克罗诺杆菌属的操作规程进行,挑取血平板的纯菌调成 4.0~4.5 麦氏浊度菌液,加入等体积 1% SDS Seakem Gold Agarose 混匀加入到模具制成胶块,与沙门菌 H9812 胶块同时使用限制性内切酶 *Xba* I 在 37 °C 水浴酶切 3 h,将胶块加入胶槽后进行电泳(脉冲时间为 2.16~63.8 s,电泳 18 h),然后用 GelRed 染色 30 min,凝胶成像系统进行拍照。PFGE 图谱使用 BioNumerics 软件进行分析,非加权配对算数平均法构建聚类图,DIC 系数衡量相似度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 对数据进行统计分析,检出率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 克罗诺杆菌检出和分布情况

335 份样品中检出克罗诺杆菌 41 份,总检出率为 12.2%。根据食用方式分为即食类、冲调类和烹煮类,烹煮类的检出率为 46.9%(23/49),检出率高于其他两类,差异有统计学意义($\chi^2=65.3$, $P < 0.05$);根据采样途径分为超市、专卖店和网店,网店样品检出率为 24.0%(18/75),显著高于其他两种途径($\chi^2=12.8$, $P < 0.05$);根据产地分为国内和国外,检出率分别为 12.7% 和 8.3%,差异无统计学意义($\chi^2=0.57$, $P > 0.05$),详见表 1。41 份阳性样品 MPN 法定量检测结果为 0.36~7.5 MPN/100 g(均值 1.95 MPN/100 g),其中 27 份(65.9%)结果超过于 1 MPN/100 g。

表 1 不同类别婴幼儿谷类辅助食品的检出情况

Table 1 Detection of different types of infant cereal-based supplements food

类别	样品数	检出数	检出率/%	χ^2	<i>P</i>
食用方式					
即食类	49	1	2.0	65.3	0.000
冲调类	237	17	7.2		
烹煮类	49	23	46.9		
采样途径					
超市	108	8	7.4	12.8	0.002
专卖店	152	15	9.9		
网店	75	18	24.0		
产地					
国内	299	38	12.7	0.57	0.449
国外	36	3	8.3		

2.2 药敏结果

根据 CLSI 及说明书判定结果,41 株克罗诺杆菌对头孢唑啉和呋喃妥因存在不同程度的耐药性,对其余 16 种抗生素均敏感。其中 21 株菌株对头孢唑啉不敏感,包括 14 株耐药和 7 株处于中介,敏感率仅为 48.8%;其中 25 株对呋喃妥因不敏感,包括 3 株耐药和 22 株处于中介,敏感率仅为 39.0%;共有 9 株同时对头孢唑啉和呋喃妥因不敏感,耐药分布见表 2。

2.3 PFGE 聚类分析

41 株克罗诺杆菌经限制性内切酶 *Xba* I 酶切

表 2 41 株克罗诺杆菌抗生素耐药性结果

Table 2 The antibiotic resistance results of 41

<i>Cronobacter</i> strains			
抗生素	耐药率/%	中介率/%	敏感率/%
头孢唑啉	34.1(14/41)	17.1(7/41)	48.8(20/41)
呋喃妥因	7.3(3/41)	53.7(22/41)	39.0(16/41)
其他 16 种抗生素	0.0(0/41)	0.0(0/41)	100(41/41)

得到的图谱,利用 BioNumerics 软件聚类分析可分为 34 个带型,相似度为 45.1%~100.0%,其中 P14 和 P18 各包含 3 个菌株,P7、P9 和 P27 分别包含两个菌株,未发现明显的优势带型和聚集现象(图 1)。相同 PFGE 带型的菌株结合耐药结果分析,P14、P18 带型的耐药结果一致,对应样品品牌和生产厂家一致;P7、P9 和 P27 带型的菌株则来自不同厂家样品(表 3)。

3 讨论

食品污染是婴幼儿感染克罗诺杆菌的主要途径,由于其病死率高,故引起国际的广泛重视^[1-3]。

表 3 相同带型菌株分析结果

Table 3 Analysis results of strains with the same band type

PFGE 带型	菌株号	药敏结果	品牌	生产厂家
P14	ES24、ES25、ES26	相同	相同	相同
P18	ES14、ES15、ES16	相同	相同	相同
P7	ES29、ES38	不同	不同	不同
P9	ES08、ES09	不同	不同	不同
P27	ES30、ES31	不同	不同	不同

联合国粮食和农业组织和联合国世界卫生组织对婴幼儿配方乳粉污染克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌)进行风险评估,将该菌列为不可检出的致病菌^[1]。我国 GB 29921—2021《食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量》也将克罗诺杆菌列为婴幼儿配方食品(0~6 月龄)不得检出的致病菌。但我国迄今未

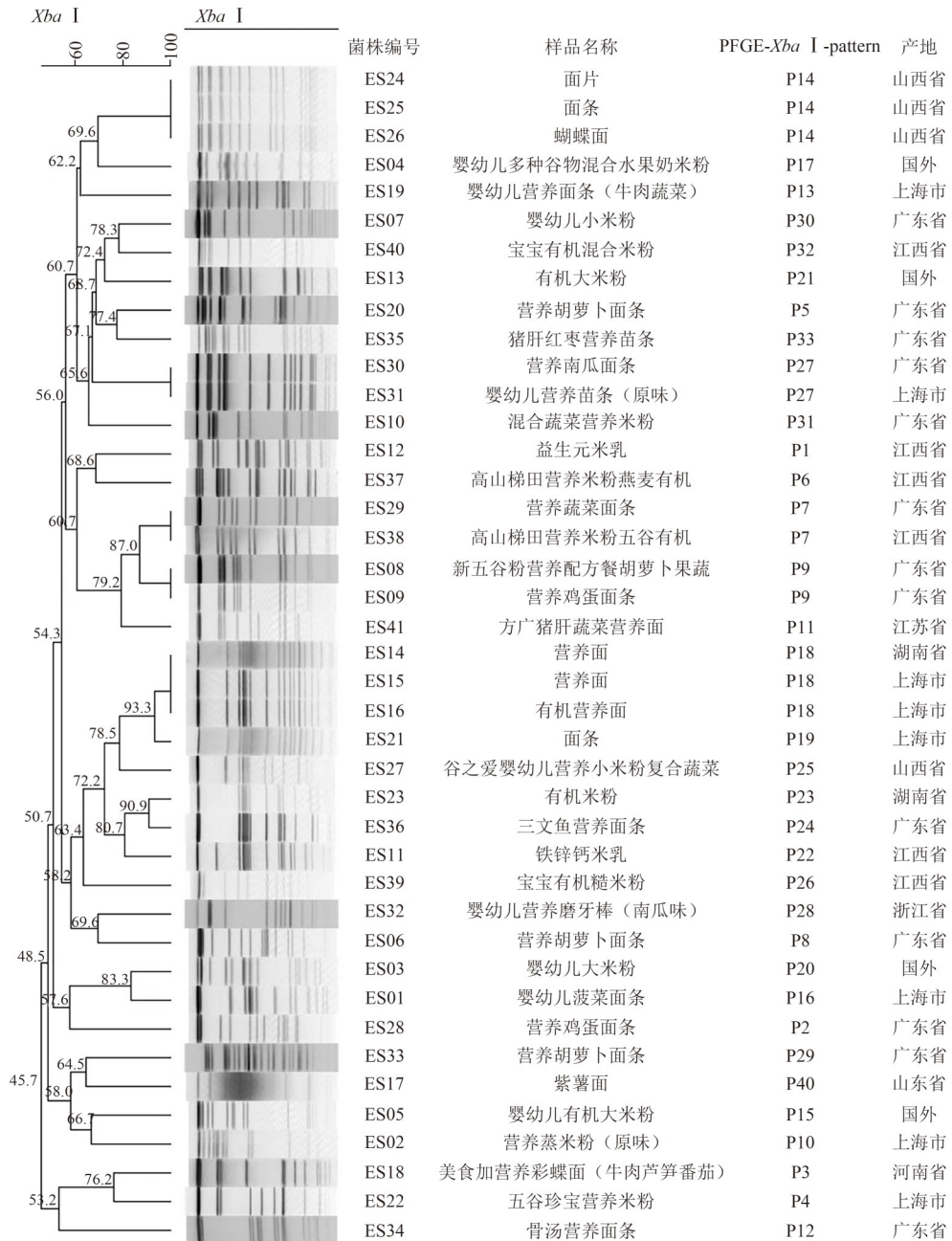


图 1 41 株克罗诺杆菌 PFGE 分型聚类分析结果

Figure 1 Results of PFGE molecular typing of 41 *Cronobacter* strains

制订婴幼儿谷类辅助食品的克罗诺杆菌限量标准。国外对原料成分研究表明,谷物比其他原料有更高的克罗诺杆菌污染率^[7],因此婴幼儿谷类辅助食品更容易受克罗诺杆菌污染,而且实际喂养中存在给0~6月龄婴儿提前使用谷类辅助食品的现象,因此有必要控制婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌污染,避免喂养中增加婴幼儿感染克罗诺杆菌的风险。

本次调查采集的台州市售国内外品牌婴幼儿谷类辅助食品均存在克罗诺杆菌的污染,总检出率为12.2%,与晋城市(17.2%)^[5]和绍兴市(13.9%)^[8]婴幼儿谷物类辅助食品或婴幼儿配方乳粉中阪崎肠杆菌的检出率接近,但低于部分文献报道约30%的检出率,这可能与本次调查采集的样品中检出率较高的烹煮类食品占比较低有关。近年来,国内各地对婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌污染情况有较多报道^[3,5-17],但包括定量数据的文章不多。本研究着重对样品进行定量检测,结果为0.36~7.5 MPN/100 g(均值1.95 MPN/100 g),65.9%的样品超过1 MPN/100 g,对应国标里的9管法至少有3管阳性,这与章迎春和陆永梅^[8]对绍兴地区的调查结果基本一致,这些数据可以为婴幼儿辅助谷类食品克罗诺杆菌污染的风险评估和限量标准制定提供一定的参考。

婴幼儿谷类辅助食品根据食用方式不同可分为即食类、冲调类和烹煮类,调查发现烹煮类样品的检出率较其他类型高,检出率高达46.9%,这和其他地区的报道基本一致^[5-7]。分析原因可能是此类食品往往添加更多种类的原料,但加工往往没有原料熟制过程,因此可以推测婴幼儿谷类辅助食品最主要的污染来源可能是谷物及添加物等原料。由于克罗诺杆菌对干燥、高温有较强的耐受性,同时可以产生稳定的生物膜^[1,10,18],可在生产环境中(包括空气和机器表面)长期存在,因此分析其他两类食品受环境污染的概率更大。对于谷类辅助食品克罗诺杆菌的污染控制,应重点把关原料质量,同时重视对生产环境的消毒灭菌。另外对原料和环境进行定期监测有助于污染源头追溯和风险控制。本次调查还发现网购的样品检出率达到24%,高于其他途径,提示网购此类食品感染克罗诺杆菌的风险更大,应引起相关部门重视。

PFGE具有更高的分辨率,被认为是克罗诺杆菌分子分型和溯源工作的金标准^[1],有文献报道使用*Xba* I和*Spe* I酶切的分离效果相同^[10,16-17]。本次研究对分离到的41株克罗诺杆菌使用*Xba* I酶切后进行PFGE分型,分析菌株间的相关性,结果显

示41株菌被分成34个带型,大多数带型相似度低于80%,未发现明显的优势带型和聚集现象,表明本地区分离的菌株具有较高的遗传多样性,这和其他文献报道比较一致^[13,18-19]。调查中发现同一厂家不同种类样品分离的菌株PFGE型相同(P14和P18),可以认为污染来源于同一克隆株,提示这些样品存在相同的污染源,比如相同的原料或持续污染的生产环境。结合耐药结果分析发现部分相同PFGE型菌株(P7、P9和P27)的耐药结果存在差异,这种现象与许龙岩等^[19]研究一致,可能的原因是引起耐药的基因突变位点并不在酶切位点上。文献^[9,20-21]报道克罗诺杆菌对大多数临床抗生素敏感,但会对少数耐药。本次调查显示菌株对头孢唑啉和呋喃妥因的敏感率仅为48.8%和39.0%,其中有9株菌同时对头孢唑啉和呋喃妥因不敏感,表现出一定的多重耐药的趋势,提示应关注临床上这两类抗生素治疗克罗诺杆菌的效果,并加强对食品分离株和临床分离株耐药性的持续监测,以应对可能产生的多重耐药。

综上,台州市售婴幼儿谷类辅助食品存在克罗诺杆菌污染,污染主要来源于原料和生产环境。其中烹煮类和网购类样品检出率较高。分离到的克罗诺杆菌具有较高的遗传多样性,表现出一定的耐药趋势,应在临床上加强对该菌的检测。

参考文献

- [1] WHO/FAO. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula: Meeting report [M]. Geneva: World Health Organization, 2008.
- [2] 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]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(1): 1-15.
- [3] 梁安莉, 农珍妮, 温桂珍, 等. 市售婴幼儿米粉中克罗诺杆菌的分子分型和耐药分析[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(12): 36-42, 83.
- [4] 贾华云, 王岚, 陈帅, 等. 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[J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(2): 106-110.
- [5] JIA H Y, WANG L, CHEN S, et al. Research on molecular pulsed field gel electrophoresis typing and drug resistance of *Cronobacter* isolated from retail infant foods [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2019, 31(2): 106-110.
- [6] 宋晓红, 刘晔, 王文军. 2016年山西省晋城市婴幼儿谷类辅助食品阪崎肠杆菌污染情况调查[J]. *中国卫生检验杂志*,

- 2018, 28(2): 228-230.
- SONG X H, LIU Y, WANG W J. Survey of *Enterobacter sakazakii* pollution in cereal supplementary food for infants in Jincheng, Shanxi in 2016 [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2018, 28(2): 228-230.
- [6] 乔雪飞, 邱香, 吴佳瑾, 等. 2016年上海市松江区婴幼儿食品中阪崎肠杆菌污染状况分析[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(7): 612-616.
- QIAO X F, QIU X, WU J J, et al. *Enterobacter sakazakii* pollution in infant food products in Songjiang district of Shanghai in 2016 [J]. Journal of Environmental & Occupational Medicine, 2017, 34(7): 612-616.
- [7] 周少君, 邓小玲, 朱海明, 等. 2010年-2013年广东省婴幼儿食品中阪崎肠杆菌污染情况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(15): 2248-2251.
- ZHOU S J, DENG X L, ZHU H M, et al. Survey of *Enterobacter sakazakii* pollution in infant food in Guangdong province [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 24(15): 2248-2251.
- [8] 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.
- ZHANG Y C, LU Y M. Analysis of *Enterobacter sakazakii* pollution status in infant formula powder in Shaoxing [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2015, 25(15): 2608-2609, 2612.
- [9] 吴玲玲, 戚浩彧, 任高翔, 等. 河南省市售婴幼儿配方食品中克罗诺杆菌的分子分型及系统发育研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(1): 23-28.
- WU L L, QI H Y, REN G X, et al. Molecular typing identification and phylogenetic analysis of *Cronobacter* spp. in infants formula food in He'nan province [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(1): 23-28.
- [10] 武永春, 高瑞红, 张晓华, 等. 太原市克罗诺杆菌属污染情况调查分析[J]. 中国药物与临床, 2021, 21(10): 1680-1682.
- WU Y C, GAO R H, ZHANG X H, et al. Investigation and analysis of *Cronobacterium* pollution in Taiyuan City [J]. Chinese Remedies & Clinics, 2021, 21(10): 1680-1682.
- [11] 李毅, 章乐怡, 洪程基, 等. 婴幼儿食品和配方奶粉中克罗诺杆菌污染调查及分子分型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(4): 360-365.
- LI Y, ZHANG L Y, HONG C J, et al. Contamination status and molecular typing of *Cronobacter* in infant food and formula powder [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(4): 360-365.
- [12] 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.
- HUANG Y L, LEI G P, ZHANG L, et al. Drug susceptibility of *Cronobacter* spp. isolated from infant food and clinical cases in Sichuan province [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2017, 29(3): 299-301.
- [13] 郑金华, 张新峰, 陆娟娟, 等. 2011年-2014年泰安市婴幼儿食品中阪崎肠杆菌的检测及耐药性和毒力基因研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(5): 670-672.
- ZHENG J H, ZHANG X F, LU J J, et al. Study on the detection, drug resistance and virulence gene of *Enterobacter sakazakii* in infants food of Tai'an from 2011 to 2014 [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2016, 26(5): 670-672.
- [14] 黄玉兰, 杨小蓉, 赵晋, 等. 2010年四川省市售婴幼儿食品中阪崎肠杆菌监测与分析[J]. 预防医学情报杂志, 2013, 29(3): 208-211.
- HUANG Y L, YANG X R, ZHAO J, et al. *Enterobacter sakazakii* in infant food in Sichuan, market [J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2013, 29(3): 208-211.
- [15] 吴环, 聂炎炎, 黄宇锋, 等. 广州市售婴幼儿配方乳粉阪崎肠杆菌污染情况调查[J]. 中国乳业, 2013(3): 48-49.
- WU H, NIE Y Y, HUANG Y F, et al. Contamination of *Enterobacter sakazakii* in infant formula available on the Guangzhou retail market [J]. China Dairy, 2013(3): 48-49.
- [16] 刘桂华, 赵薇, 裴晓燕, 等. 婴幼儿食品中阪崎肠杆菌的PFGE分型研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(6): 1350-1352.
- LIU G H, ZHAO W, PEI X Y, et al. PFGE typing of *Enterobacter sakazakii* in infant food [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2013, 23(6): 1350-1352.
- [17] 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, 186.
- PEI X Y, GUO Y C, LIU X M. Study on the molecular typing of *Enterobacter sakazakii* with pulsed-field gel electrophoreses [J]. Journal of Hygiene Research, 2008, 37(2): 179-182, 186.
- [18] 陈雪峰, 郭玉曦, 曾海燕, 等. 阪崎克罗诺杆菌物理和化学防控方法的研究进展[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 1-10, 421.
- CHEN X F, GUO Y X, ZENG H Y, et al. Advancement in physical and chemical methods for controlling *Cronobacter sakazakii* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 1-10, 421.
- [19] 许龙岩, 袁慕云, 刘静宇, 等. 阪崎肠杆菌脉冲场凝胶电泳分型及耐药研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 205-209.
- XU L Y, YUAN M Y, LIU J Y, et al. Pulsed-field gel electrophoresis types and drug resistance of *Enterobacter sakazakii* [J]. Food Science, 2010, 31(7): 205-209.
- [20] 张彩霞, 陈颖, 胡安妥, 等. 食品中阪崎克罗诺杆菌的药物敏感性及其分子分型研究[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(6): 123-129.
- ZHANG C X, CHEN Y, HU A T, et al. Drug sensitivity analysis and molecular typing of *Cronobacter sakazakii* isolated from food [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(6): 123-129.
- [21] 李毅, 林丹, 谢爱蓉, 等. 食品香辛料和调味品中克罗诺杆菌污染调查及分子分型研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(4): 495-498.
- LI Y, LIN D, XIE A R, et al. Contamination investigation and molecular typing analysis of *Cronobacter* in food spices and condiments [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2022, 32(4): 495-498.