

研究报告

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

黄玉兰, 雷高鹏, 张林, 李莉, 刘丽, 吕红, 黄伟峰, 杨小蓉

(四川省疾病预防控制中心, 四川 成都 610041)

摘要:目的 了解四川省市售婴幼儿奶粉、婴幼儿谷物辅助食品及临床病例中分离的克罗诺杆菌药物敏感性特征。方法 采用微量肉汤稀释法测定 109 株克罗诺杆菌的最低抑菌浓度(MIC), 使用 6 类 8 种抗生素进行药物敏感性试验。结果 109 株克罗诺杆菌对环丙沙星、茶啉酸、头孢噻肟、庆大霉素、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑、氯霉素、四环素等 7 种抗生素均敏感, 53 株对头孢西丁耐药, 耐药率达 48.6% (53/109); 甲氧苄啶/磺胺甲恶唑和氯霉素的 MIC 值呈逐年上升趋势。结论 克罗诺杆菌对二代头孢类药物耐受性较高, 可进一步研究其耐药分子机理, 为促进临床合理用药提供参考, 以控制克罗诺杆菌多重耐药菌株的产生。

关键词: 克罗诺杆菌; 耐药性; 头孢西丁; 食源性致病菌; 婴幼儿食品; 四川

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)03-0299-03

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.03.009

**Drug susceptibility of *Cronobacter* spp. isolated from infant food
and clinical cases in Sichuan Province**

HUANG Yu-lan, LEI Gao-peng, ZHANG Lin, LI Li, LIU Li, LYU Hong,

HUANG Wei-feng, YANG Xiao-rong

(Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the drug susceptibility of *Cronobacter* spp. isolated from formula milk powder, infant rice powder, and clinical cases in Sichuan Province. **Methods** The drug susceptibility test of 109 strains of *Cronobacter* spp. was conducted with minimum broth dilution method. **Results** All the strains were sensitive to ciprofloxacin, nalidixic acid, cefotaxime, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracyclin and chloramphenicol, while 53 strains were resistant to cefoxitin, and the resistance rate was 48.6% (53/109). The minimum inhibitory concentration value of trimethoprim/sulfamethoxazole and chloramphenicol increased year by year. **Conclusion** Strains of *Cronobacter* spp. in this study had higher resistance to the second generation cephalosporins, and further study was needed to understand the mechanism. It was necessary for clinician to refer the drug sensitivity of *Cronobacter* spp. so as to select antibiotics correctly, and also for controlling the rapid evolving of multi-drug resistant strains of *Cronobacter* spp.

Key words: *Cronobacter* spp.; drug resistance; cefoxitin; foodborne pathogens; infant food; Sichuan

克罗诺杆菌, 早期也称阪崎肠杆菌, 是一类周生鞭毛、能运动、无芽胞的革兰阴性杆菌。克罗诺杆菌属于条件致病菌, 对于新生儿, 尤其是早产儿或免疫力较弱婴儿的感染风险最高, 可引起严重脑膜炎、败血症、坏死性结肠炎等疾病, 死亡率可高达 40% ~ 80%^[1]。自 1958 年英国首次报道由克罗诺杆菌引起

的病例后, 世界各国均有该菌引起的严重感染事件暴发。我国由克罗诺杆菌引起的感染事件也多有发生, 例如 2013 年温州市 256 例婴幼儿感染腹泻病例中有 3 例由克罗诺杆菌引起^[2], 2014 年本实验室对 1 例 4 月大婴儿反复腹泻病例进行病原学检测及溯源分析, 最终确定由克罗诺杆菌污染环境导致感染^[3]。目前对于克罗诺杆菌的临床治疗并没有明确用药方案, 而由于抗生素滥用等原因, 导致该菌耐药情况日益严重, 一旦造成院内感染, 将严重威胁婴幼儿的生命健康。2002 年 DENNISON 等^[4]已经发现克罗诺杆菌对氨苄西林、庆大霉素和头孢噻肟具有多重耐药性。为了解四川省克罗诺杆菌耐药情况及变化趋势, 本研究选用 6 类 8 种抗生素药物, 对四川省 2010—2014 年

收稿日期: 2017-03-21

基金项目: 四川省医学会科研课题计划 (S15070)

作者简介: 黄玉兰 女 主管技师 研究方向为微生物检测

E-mail: 33599886@qq.com

通信作者: 杨小蓉 女 副主任技师 研究方向为微生物检测

E-mail: 740793458@qq.com

及2016年婴幼儿奶粉、婴幼儿谷物辅助食品等及临床病例中分离的109株克罗诺杆菌开展药物敏感性检验,为临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

2010—2014年及2016年四川省市售婴幼儿配方奶粉、婴幼儿谷物辅助食品、临床4月龄腹泻幼儿患者粪便标本及其生活环境涂抹样品分离的109株克罗诺杆菌,见表1。所有菌株均经过VITEK 2 Compact全自动微生物生化鉴定仪鉴定。大肠埃希菌(ATCC 25922)由本实验室保存,其最小抑菌浓度(MIC)值均在美国临床实验室标准委员会(CLSI)2016年版标准^[5]范围内。2015年未开展婴幼儿食品中克罗诺杆菌监测,因此无该年分离菌株。

表1 试验菌株来源信息

Table 1 Information of experimental strains

类别	菌株数					
	2010年	2011年	2012年	2013年	2014年	2016年
婴幼儿谷物辅助食品	10	20	39	14	3	7
婴幼儿奶粉	1	7	4	1	0	0
患者粪便	0	0	0	0	2	0
环境涂抹样品	0	0	0	0	1	0
合计	11	27	43	15	6	7

1.1.2 主要仪器与试剂

Nephelometer比浊仪、加样器、96孔药敏板、CAMHBT肉汤均购自美国赛默飞。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液制备及药敏板培养

将低温保存的试验菌株用营养肉汤复苏后,划线接种至血琼脂平皿,放于37℃恒温培养箱培养24h。从新鲜培养的血琼脂平皿中挑取3~5个菌落,在去离子水中乳化,并使用比浊仪调节到0.5麦氏浊度。取配制好的菌悬液50μl加入到11ml CAMHBT肉汤中,得到试验用菌悬液。用加样仪分别在96孔药敏板中每孔加入100μl菌悬液,用粘性封膜密封所有孔,放置37℃恒温培养箱过夜培养后读取试验结果。

1.2.2 结果判读

记录每一种抗生素抑制细菌生长的MIC值。参照CLSI 2016年版标准^[5]进行判读,结果为敏感、中介、耐药,见表2。

2 结果

109株克罗诺杆菌对环丙沙星、萘啶酸、头孢噻肟、庆大霉素、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑、氯霉素等7种

表2 抗生素浓度信息及判读依据

Table 2 Antibiotics information and evidence for test result interpretation

抗生素种类	抗生素名称	浓度范围 (μg/ml)	MIC判读标准 (μg/ml)		
			敏感	中介	耐药
头孢类	头孢西丁	0.25~256	≤8	16	≥32
	头孢噻肟	0.015~16	≤1	2	≥4
氨基糖苷类	庆大霉素	0.06~64	≤4	8	≥16
四环素类	四环素	0.06~64	≤4	8	≥16
喹诺酮类	环丙沙星	0.008~8	≤1	2	≥1
	萘啶酸	0.12~128	≤16	—	≥32
叶酸途径抑制剂	甲氧苄啶/ 磺胺甲恶唑	0.03/0.59 ~32/608	≤2/38	—	≥4/76
苯丙醇类	氯霉素	0.25~256	≤8	16	≥32

注:—表示 CLSI 2016 年版标准中无中介判读标准

抗生素均敏感。其中53株克罗诺杆菌对头孢西丁的MIC值均大于32μg/ml,表现出较高耐药率(48.6%),见表3。

表3 克罗诺杆菌对头孢西丁的敏感性分布

Table 3 Sensitivity distribution of *Cronobacter* spp. to cefoxitin

年份	耐药		中介		敏感	
	菌株数	耐药率/%	菌株数	中介率/%	菌株数	敏感率/%
2010	4	36.4	2	18.2	5	45.5
2011	16	59.3	4	14.8	7	25.9
2012	19	44.2	6	14.0	18	41.9
2013	11	73.3	2	13.3	2	13.3
2014	2	33.3	2	33.3	2	33.3
2016	1	14.3	2	28.6	4	57.1
合计	53	48.6	18	16.5	38	34.9

试验菌株对甲氧苄啶/磺胺甲恶唑及氯霉素的MIC值呈逐年上升趋势。2010年甲氧苄啶/磺胺甲恶唑MIC值最高为0.12/2.38μg/ml,2013年甲氧苄啶/磺胺甲恶唑MIC值最高已达到0.5/9.5μg/ml,见图1。2010年氯霉素MIC值范围为2~8μg/ml,2014年其MIC值范围已增长至4~16μg/ml,见图2。试验菌株对环丙沙星、萘啶酸、头孢噻肟、庆大霉素、四环素的MIC值处于较低水平,波动范围不大,无明显上升趋势。

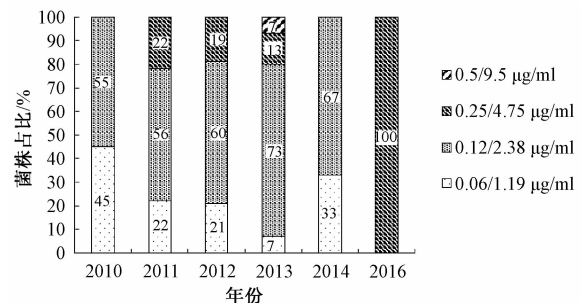


图1 克罗诺杆菌对甲氧苄啶/磺胺甲恶唑药物的敏感性变化趋势

Figure 1 Sensitivity trend of *Cronobacter* spp. to trimethoprim/sulfamethoxazole

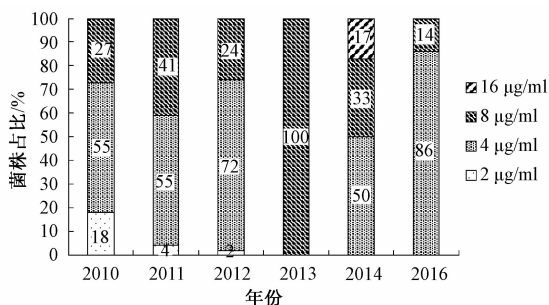


图2 克罗诺杆菌对氯霉素药物的敏感性变化趋势

Figure 2 Sensitivity trend of *Cronobacter* spp. to chloramphenicol sensitive

不同来源食品样品分离菌株对头孢西丁均表现出耐受性,无明显差异。同一患者粪便标本分离菌株与其家中环境分离菌株中有 2 株对头孢西丁耐药。不同来源菌株对头孢西丁的敏感性见表 4。

表 4 不同来源菌株对头孢西丁的敏感性(株)

Table 4 Cefoxitin sensitivity of strains from different sources

来源	耐药菌株数	中介菌株数	敏感菌株数	合计
婴幼儿谷物辅助食品(米粉)	37	15	22	74
婴幼儿谷物辅助食品(面条)	9	3	6	18
婴幼儿奶粉	5	0	9	14
患者粪便	1	0	1	2
环境涂抹样品	1	0	0	1

3 讨论

抗生素生产过程中废弃物不经处理直接排放到环境中,以及抗生素在农业养殖及医疗卫生等多个领域的不合理使用,导致细菌耐药情况日益严重。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)菌株及耐碳青霉烯菌等各类超级耐药菌严重威胁着人类生命健康。世界卫生组织提出,到 2050 年全球因抗生素耐药引起的死亡人数或将达 1 000 万^[6],因此加强耐药监测,了解细菌耐药变化趋势具有必要性和紧迫性。克罗诺杆菌作为一种条件致病菌,其感染对象主要为新生儿,特别是早产儿等免疫能力低下的婴儿,可导致其感染脑膜炎等重症,严重威胁婴儿生命健康,应引起高度重视,并对其进行疾病监测和耐药监测。国内研究^[7-9]发现克罗诺杆菌对苯唑西林和一代头孢类药物头孢噻吩 100% 高度耐药,崔晶花等^[10]对分离自国内 11 个省(直辖市)婴幼儿奶粉及米粉中的 60 株克罗诺杆菌进行药敏分析后,发现 4 株对 14 种抗生素均耐药的多重耐药菌株。而本研究仅在四川省采集样品,且品牌相对集中,因此未发现多重耐药菌株。本试验分离的 109 株克罗诺杆菌对环丙沙星、萘啶酸、头孢噻肟、庆大霉素、甲氧苄啶/

磺胺甲恶唑、氯霉素、四环素等 7 种抗生素均敏感,而 53 株细菌对头孢西丁耐药,耐药率高达 48.6%。头孢西丁为头孢类抗生素,类似于第二代头孢菌素,对革兰阴性菌有较强的抗菌作用,具有高度抗 β -内酰胺酶性质,其通过与青霉素结合蛋白(PBPs)结合,抑制细胞壁合成,从而起到抗菌作用。进一步研究需要确定,克罗诺杆菌对头孢西丁的高度耐药是否由改变青霉素的结合蛋白位点而引起。克罗诺杆菌广泛分布于自然界环境和食品中,有研究^[11]表明其感染婴儿的主要途径为食用被细菌污染的奶粉和米粉。本试验分离自患者粪便标本和环境涂抹样品中的 3 株克罗诺杆菌,其中 2 株对头孢西丁耐药,与食品中分离菌株的耐药性较一致,提示食源性菌株的耐药检测结果对临床用药具有一定指导作用。

目前,克罗诺杆菌对多数临床药物较敏感,多重耐药菌株检出较少,但本研究发现试验菌株对甲氧苄啶/磺胺甲恶唑和氯霉素的耐受性呈逐年上升趋势,提示应加强菌株耐药监测,在临床治疗中合理用药,减少多重耐药菌株的产生。

参考文献

- [1] 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 App Microbiol*, 2012, 113(1): 1-15.
- [2] 洪程基, 李毅, 上官智慧. 温州市婴幼儿感染性腹泻疾病中阪崎肠杆菌的检测研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(2): 193-195.
- [3] 杨小蓉, 黄伟峰, 谢晓丽, 等. 一例由阪崎肠杆菌感染引起腹泄患儿的溯源分析[J]. *疾病监测*, 2014, 29(10): 794-796.
- [4] DENNISON S K, MORRIS J. Multiresistant *Enterobacter sakazakii* wound infection in an adult[J]. *Infec Med*, 2002, 19(11): 533-535.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement; M100-S24 [S]. Wayne: CLSI, 2016.
- [6] WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014[J]. *Australasian Medical Journal*, 2014, 7(4): 237.
- [7] 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*, 2007, 36(1): 63-65.
- [8] 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.
- [9] 王硕, 朱超, 杜欣军, 等. 食源性阪崎肠杆菌耐药性分析及超广谱 β -内酰胺酶检测[J]. *食品科技*, 2011, 36(9): 330-334.
- [10] 崔晶花, 杨小蓉, 杜小莉, 等. 60 株克罗诺杆菌的药敏分析[J]. *疾病监测*, 2012, 27(5): 409-411.
- [11] WHO. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report [J]. *Microbiol Risk Assessment*, 2004, 45(4): 858.