

研究报告

我国婴儿配方粉来源的克罗诺杆菌脉冲场凝胶电泳分子分型和多位点序列分型研究

甘辛,王伟,胡豫杰,彭子欣,闫韶飞,徐进

(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

摘要:目的 探讨我国婴儿配方粉污染克罗诺杆菌的主要分子分型特征,分析不同地区间菌株亲缘相关性,为我国克罗诺杆菌引起的疾病溯源提供技术支持。方法 采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)和多位点序列分型(MLST)两种方法,对全国19个省/自治区/直辖市婴儿配方粉来源的49株克罗诺杆菌进行分型研究。结果 49株克罗诺杆菌PFGE分型得到38个带型,未发现明显的优势分型和聚集现象。MLST共获得15个已知序列型(ST型)和2个新ST型,ST4、ST1和ST64为优势型别,分别占菌株总数的20.4%(10/49)、18.4%(9/49)、10.2%(5/49)。PFGE型和MLST型结果分析表明,具有相同PFGE型的菌株也有相同的MLST型,而相同MLST型却不一定具有较高的亲缘关系。结论 我国婴儿配方粉来源的克罗诺杆菌菌谱具有高多态性和离散性,据此预测我国婴儿配方粉污染克罗诺杆菌导致婴儿患病以散发为主,出现多人患病的暴发事件几率较低。

关键词: 克罗诺杆菌; 脉冲场凝胶电泳; 多位点序列分型; 婴儿配方粉; 食源性致病菌

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2018)03-0235-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2018.03.003

Study on pulsed field gel electrophoresis and multilocus sequence typing of *Cronobacter* isolated from powdered infant formula

GAN Xin, WANG Wei, HU Yu-jie, PENG Zi-xin, YAN Shao-fei, XU Jin

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To investigate the majority molecular typing characteristics of *Cronobacter* contamination in powdered infant formula (PIF), analyze the genetic correlation of strains from different provinces, and provide technical support to track diseases of *Cronobacter* infection in China. **Methods** Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) were used to analysis 49 strains isolated from PIF from 19 provinces in China. **Results** Totally 49 strains of *Cronobacter* were divided into 38 clusters, no obvious dominant cluster and aggregation were found. There were 15 ST types and 2 new ST types in 49 strains, ST4, ST1 and ST64 were the dominant types, accounted for 20.4% (10/49), 18.4% (9/49), 10.2% (5/49), respectively. The result of PFGE and MLST showed that strains with the same PFGE type also had the same MLST type, however, the same MLST type was not necessarily related. **Conclusion** *Cronobacter* isolated from PIF in China showed highly polymorphism and discreteness, it could predict that the infant infected by *Cronobacter* contamination in PIF in China was mainly sporadic, the incidence of outbreak of multiple people was low.

Key words: *Cronobacter*; pulsed field gel electrophoresis; multilocus sequence typing; powdered infant formula; foodborne pathogenic bacteria

克罗诺杆菌(*Cronobacter*)属于肠杆菌科,是一种兼性厌氧、有动力、无芽孢的革兰阴性条件致病

菌。该菌广泛分布于包括婴儿配方粉、奶制品、鸡蛋、水果等食品及土壤、水、尘土等自然环境中^[1-2],以婴儿配方粉、婴儿谷物食品等最常见,新生儿克罗诺杆菌感染的主要途径为食用因加工、储藏或者冲调不当导致污染的婴儿配方粉,该菌对免疫力低下新生儿和早产儿可引起脑膜炎、败血症和坏死性小肠结肠炎,死亡率高达40%~80%^[3-4]。近年来报道^[5-6]显示,相较于婴儿感染者,免疫力缺陷的成人(主要是老年人)被克罗诺杆菌感染的情况更

收稿日期:2018-04-19

基金项目:国家重点研发计划“跨境食品潜在、新发病原微生物筛查监控技术及溯源平台建设”(2016YFD0401102)

作者简介:甘辛 男 助理研究员 研究方向为食品微生物

E-mail: ganxin@cfsa.net.cn

通信作者:徐进 男 研究员 研究方向为食品微生物

E-mail: xujin@cfsa.net.cn

为常见,与新生儿感染不同,成人克罗诺杆菌感染主要症状为菌血症、骨髓炎、脾脓肿、肺炎、结膜炎、伤口感染和尿路感染。目前研究^[7-8]发现,菌株序列型(sequence types, STs)与克罗诺杆菌感染存在一定关联,导致新生儿脑膜炎的克罗诺杆菌均为ST4型,而ST7型多与成人感染相关,ST8型虽然与临床病例相关,但并不一定导致新生儿感染。

脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoreses, PFGE)是分子生物学分型的“金标准”,广泛应用于病原菌基因组特征分析和不同来源菌株间的遗传相关性研究。克罗诺杆菌的多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)方法主要通过 *atpD*、*fusA*、*glnS*、*gltB*、*gyrB*、*infB* 和 *pps* 七个管家基因的序列差异,通过与网络数据库比对获得菌株 ST 型。本研究对全国 19 个省/自治区/直辖市婴儿配方粉来源的 49 株克罗诺杆菌进行 PFGE 和 MLST 分型,探讨我国目前婴儿配方粉污染克罗诺杆菌的主要分子分型特征及流行株,分析不同地区菌株亲缘相关性,为我国克罗诺杆菌引起的疾病溯源提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

49 株克罗诺杆菌分离自 2012—2014 年全国 19 个省/自治区/直辖市的婴儿配方粉样品,包括北京、福建、甘肃、广东、贵州、河北、河南、湖北、湖南、吉林、江西、内蒙古、宁夏、山东、山西、陕西、四川、新疆和云南。标准菌株为沙门菌(H9812),由本实验室保藏。

1.1.2 主要仪器与试剂

PCR 扩增仪(C1000)、凝胶成像系统(Gel Doc)、脉冲场凝胶电泳仪(CHEF-mapper)均购自美国 Bio-Rad,比浊仪(法国生物梅里埃),超纯水仪,生化培养箱,电子天平。

Tris base、Tris-HCl、2 × GoTaq Green Master Mix 均购自美国 Promega,细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司),脑心浸液琼脂(BHA,北京陆桥技术有限公司),蛋白酶 K(德国 Merck),限制性内切酶 *Xba* I、*Spe* I 均购自美国 New England BioLabs,十二烷基磺酸钠、SeaKem Gold(SK)琼脂糖均购自美国 BD。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化

将于 -70 °C 冰箱中冻存的 49 株克罗诺杆菌和参考菌株(H9812)划线接种于 BHA 上,37 °C 培养 24 h,挑取单克隆再次接种 BHA 培养基,37 °C 培养

18 h。

1.2.2 MLST

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA,7 对管家基因序列扩增引物来自 PubMLST 网站,引物序列如表 1 所示。PCR 反应体系(50 μl): 2 × buffer 25 μl,上下游引物(10 μmol/L)各 2 μl,样品 DNA 2 μl,ddH₂O 19 μl。PCR 反应条件:96 °C 预变性 1 min,96 °C 变性 1 min,58 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,共 30 个循环,72 °C 延伸 5 min。PCR 产物由上海英骏生物技术有限公司测序,测序结果提交 PubMLST 获得菌株 ST 型。

表 1 克罗诺杆菌 MLST 引物序列
Table 1 MLST primers of *Cronobacter*

基因	序列(5'-3')
<i>atpD</i>	F:CGACATGAAAGGCGACAT
	R:TTAAAGCCACGGATGGTG
<i>fusA</i>	F:GAAACCGTATGGCGCTCAG
	R:AGAACCGAAGTGCAGACC
<i>glnS</i>	F:GCATCTACCCGATGTACC
	R:TTGGCAGCCTGAACAGAC
<i>gltB</i>	F:CATCTCGACCATCGCTTC
	R:CAGCACTTCCACCAGCTC
<i>gyrB</i>	F:TGCACCACATGGTATTCCG
	R:CACCGGTCACAAACTCGT
<i>infB</i>	F:GAAGAAGCCGTAATGAGC
	R:CGATACCACATCCATGCG
<i>pps</i>	F:GTCCAACAATGGCTCGTC
	R:CAGACTCAGCCAGGTTTG

1.2.3 PFGE

用无菌棉签刮取新鲜菌落,于 3 ml 无菌细胞悬浮液(100 mmol/L Tris-HCl,100 ml 乙二胺四乙酸,pH = 8.0)中制成 4.0 ~ 4.5 麦氏浓度菌悬液;取 400 μl 菌悬液至 1.5 ml EP 管中,37 °C 水浴 5 min,加入 20 μl 浓度为 20 mg/ml 的蛋白酶 K;加入 400 μl 的 1% SKG 琼脂糖,混匀,制作胶块;将制作好的胶块放入 50 ml 离心管中,加入 5 ml 细胞裂解液(50 mmol/L Tris,50 nmol/L 乙二胺四乙酸,1% 十二烷基肌氨酸钠,pH = 8.0)和 25 μl 浓度为 20 mg/ml 的蛋白酶 K,55 °C 恒温水浴 170 r/min 振荡孵育 2 h,弃去管内液体;无菌蒸馏水 50 °C 清洗 2 次,每次 10 ml;预热的 TE 缓冲液 50 °C 清洗 3 次,每次 10 ml;清洗后的胶块置于 5 ml TE 内 4 °C 保存。胶块用 *Xba* I、*Spe* I 两种酶切 37 °C 水浴 2 h 后电泳。电泳条件:电泳凝胶 1% SKG 琼脂糖、2.2 L 0.5 × TBE 电泳液,温度 14 °C,电场强度 6 V/cm,电厂角度 120°,脉冲时间 2.16 ~ 63.8 s,电泳条带 30 ~ 700 kb,电泳时间 18 h。电泳结束后,用 GelRed 染色 30 min,清水脱洗 2 次;图像应用 BioNumerics V7.6 数据库软件进行处理。

2 结果

2.1 MLST 结果

本研究对 49 株克罗诺杆菌进行 MLST 分型鉴定,将 7 个管家基因测序所得结果拼接校正后上传 PubMLST 网站,获得等位基因数值并得到相应的菌株 ST 型。49 株菌株共有 15 个已知 ST 型和 2 个新

ST 型,ST4、ST1 和 ST64 为常见型别,其中 ST4 型共 10 株,占全部菌株的 20.4% (10/49)。ST1 型共 9 株,占全部菌株的 18.4% (9/49)。ST64 型共 5 株,占全部菌株的 10.2% (5/49)。通过将测序结果提交 PubMLST 网站,2 个新发现的 ST 型被网站收录后命名为 ST645 和 ST646,其他 ST 型比较分散,见图 1。

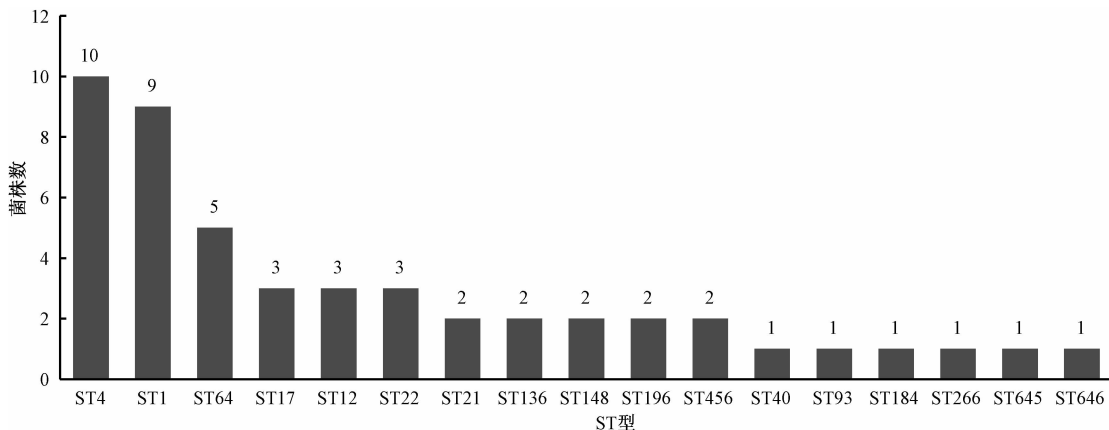


图 1 49 株克罗诺杆菌 ST 型分布情况

Figure 1 Distribution of 49 *Cronobacter* strains of ST

2.2 PFGE 结果

全部 49 株克罗诺杆菌进行 PFGE 分型,将 *Xba* I、*Spe* I 两种酶切的结果用 BioNumerics V7.6 进行合并分析。PFGE 图谱中相似度大于 85.0% 的菌株可

以判断为具有流行病学相关性^[9],通过分析,本研究共有 38 种不同的分型,分别为 1~38 型,详见图 2。其中 8 型(12287、12288、12286)分为 2 个亚型,8A 型包括 2 株菌(12287、12288),菌株相似度为

PFGE ANALYSIS

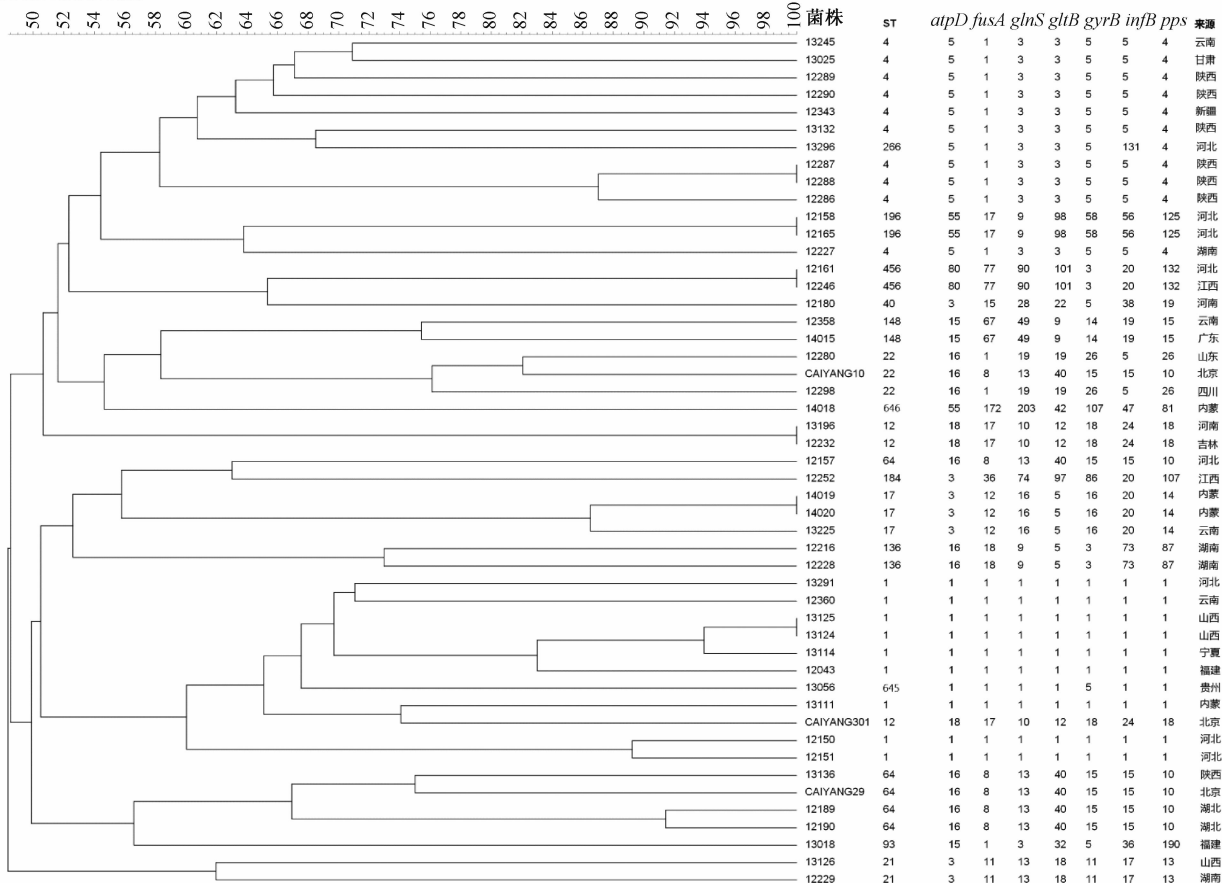


图 2 49 株克罗诺杆菌 PFGE 分型

Figure 2 PFGE typing of 49 *Cronobacter* strains

100.0%,亚型间相似度为87.0%;22型(14019、14020、13225)分为2个亚型,亚型间相似度为86.0%,其中22A型包括2株菌(14019、14020),菌株相似度为100.0%;27型(13125、13124、13114)分为2个亚型,亚型间相似度为93.5%,其中27A型包括2株菌(13125、13124),菌株间相似度为100.0%;32型(12150、12151)分为2个亚型,亚型间相似度为89.0%;35型(12189、12190)也分为2个亚型,亚型间相似度为91.0%。9型(12158、12165)、11型(12161、12246)和19型(13196、12232)各有2株菌,菌株间相似度为100.0%;其余各型仅包括1株菌。

3 讨论

本研究利用PFGE从DNA水平对49株克罗诺杆菌菌株进行分子分型,通过比较DNA指纹图谱的相似性获得菌株亲缘关系,共发现38个带型,大多数带型间的相似度低于80.0%,未呈现出较高的相似度,也未发现有明显的优势分型与聚集现象,表明19个地区来源于婴儿配方粉的克罗诺杆菌图谱具有高多态性和离散性,据此可以预测我国婴儿配方粉污染克罗诺杆菌导致婴儿患病以散发为主,出现多人患病的暴发事件几率较低。

本研究的49株克罗诺杆菌中ST4型有10株,占全部菌株的20.4%,是婴儿配方粉分离株中的主要型别,克罗诺杆菌ST4型与新生儿脑膜炎相关,有报道^[7]ST4型相较ST1、ST8、ST12、ST21、ST64和ST201型的菌株有更强的耐干燥能力,这可能与ST4型成为婴儿配方粉中被发现的主要型别密切相关,表明污染ST4型菌株的婴儿配方食品对婴幼儿有潜在的风险。本研究ST1型有9株,占全部菌株的18.4%,也是婴儿配方粉中分离的主要型别之一,这与SONBOL等^[10]的报道相同,同时HIMELRIGHT等^[11]报道过ST1型可能与新生儿脑膜炎相关。ST12型3株,占全部菌株的6.1%,该型可感染新生儿并导致婴儿患坏死性小肠结肠炎。在全部17个型别中,ST266型与ST4型仅*infB*基因存在差异,而其中一个新发现的ST645型与ST1型仅*gyrB*基因存在差异。MLST分型的作用不仅仅局限于鉴定和基因分型,同时也反映了新生儿感染的潜在临床意义,并能精准追踪和溯源。

PFGE和MLST结果结合分析表明,具有相同的PFGE型的菌株也有相同的MLST型,而相同MLST型却不一定具有较高的亲缘关系,这与MLST是针对7个高度保守的管家基因的多态性进行分析,而

PFGE是基于细菌基因组DNA进行比较因此具有更高的多态性和分辨率有关。本研究利用PFGE和MLST分型技术对我国19个地区婴儿配方粉来源的克罗诺杆菌进行研究和分析,初步显示了菌株的基因多态性,基于目前的结果,尚需分析更多的菌株才能得出我国目前婴儿配方粉污染克罗诺杆菌的主要分子分型特征及流行株,预测克罗诺杆菌可能带来的食品安全风险。

参考文献

- [1] UEDA S. The effects of temperature on the growth and heat resistance of *Cronobacter* spp. [J]. *Biocontrol Science*, 2017, 22(2):125-129.
- [2] SHI C, YAN C H, SUI Y, et al. Thymoquinone inhibits virulence related traits of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 and has anti-biofilm formation potential [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:2220.
- [3] JARADAT Z W, AL MOUSA M, ELBETIEHA A, et al. *Cronobacter* spp. -opportunistic foodborne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2014, 63(8):1023-1037.
- [4] MIRANDA N, BANERJEE P, SIMPSON S, et al. Molecular surveillance of *Cronobacter* spp. isolated from a wide variety of foods from 44 different countries by sequence typing of 16S rRNA, *rpoB* and *o*-antigen genes [J]. *Foods*, 2017, 6(5):36.
- [5] HU L. Prevalence of curli genes among *Cronobacter* species and their roles in biofilm formation and cell-cell aggregation [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 265(10):65-73.
- [6] KOTHARY M H, GOPINATH G R, GANGIREDLA J, et al. Analysis and characterization of proteins associated with outer membrane vesicles secreted by *Cronobacter* spp. [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:134.
- [7] FEI P, MAN C X, LOU B B, et al. Genotyping and source tracking of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* isolates from powdered infant formula and an infant formula production factory in China [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(16):5430-5439.
- [8] ALMAJED F S, FORSYTHE S J. *Cronobacter sakazakii* clinical isolates overcome host barriers and evade the immune response [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2015, 90(11):55-63.
- [9] 石晓璐, 扈庆华, 王冰, 等. 深圳市伤寒 PulseNet 数据库的初步建立与应用 [J]. *现代预防医学*, 2007, 34(17):3201-3206.
- [10] SONBOL H, JOSEPH S, MCAULEY C M, et al. Multilocus sequence typing of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula and milk powder production factories [J]. *International Dairy Journal*, 2013, 30(1):1-7.
- [11] HIMELRIGHT I, HARRIS E, LORCH V, et al. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2001 [J]. *J Am Med Assoc*, 2002, 287(17):2204-2205.