

调查研究

佳木斯市食品中致泻性大肠埃希菌的耐药性与同源性研究

付宇¹,吴晓敏¹,赵婧²,孟庆敏¹,王彬¹,包名家¹

(1. 佳木斯市疾病预防控制中心, 黑龙江 佳木斯 154007;

2. 佳木斯大学, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:目的 了解佳木斯市食品中致泻性大肠埃希菌的耐药性与同源性,为有效控制食源性疾病发生与临床治疗提供依据。方法 利用多重聚合酶链式反应(PCR)检测食品中的致泻性大肠埃希菌,并利用 Sensitire 微生物药敏分析系统和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析菌株耐药性及同源性。结果 在1320份食品中分离出致泻性大肠埃希菌51株,检出率为3.86%;其中21株致泻性大肠埃希菌具有耐药性,耐药率为41.18%,包括3株单重耐药和18株菌多重耐药。51株致泻性大肠埃希菌共获得49个不同PFGE指纹图谱,同源性为38.6%~100.00%。结论 佳木斯市食品中致泻性大肠埃希菌存在多重耐药现象,且分布呈多态性。

关键词:食品;致泻性大肠埃希菌;耐药性;同源性

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)03-0303-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.03.011

Research on drug resistance and homology of diarrheagenic***Escherichia coli* from food in Jiamusi**FU Yu¹, WU Xiaomin¹, ZHAO Jing², MENG Qingmin¹, WANG Bin¹, BAO Mingjia¹

(1. Jiamusi Center for Disease Control and Prevention, Heilongjiang Jiamusi 154007, China;

2. Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154007, China)

Abstract: Objective To understand the drug resistance and homology of diarrheagenic *Escherichia coli* (*E. coli*), from food in Jiamusi, and to provide basis for effective control of food borne diseases and clinical treatment. **Methods** Multiple polymerase chain reaction (PCR) was used to detect diarrheagenic *E. coli* in food. Drug resistance of diarrheagenic *E. coli* isolated from food in Jiamusi was analyzed by Sensitire microbial sensitivity analysis system, and the homology of isolates was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** Fifty one strains of diarrheagenic *E. coli* were isolated from 1320 samples with a total positive rate of 3.86%. Twenty one strains of them were resistant to drugs (41.18%), among which 3 were single drug-resistant and other 18 were multi drug-resistant. A total of 49 different PFGE fingerprints were obtained from 51 strains of diarrheagenic *E. coli*, and the homology was 38.6% ~ 100%. **Conclusion** The multi drug-resistant of diarrheagenic *E. coli* from food in Jiamusi is obvious. The homology is polymorphic.

Key words: Food; diarrheagenic *Escherichia coli*; drug resistance; homology

目前,食源性致病菌引起的疾病受到广泛关注,致泻性大肠埃希菌作为其中一种,在世界范围内引起过较重食物中毒暴发事件,如2018年,美国暴发大肠埃希菌O157:H7污染生菜事件,造成96人住院治疗 and 5人死亡^[1];2019年,美国暴发大肠埃希菌O103污染牛肉事件,造成21人住院治疗^[2]。针对引起的疾病的致泻性大肠埃希菌,了解其耐药

性至关重要,为有效治疗疾患,避免抗生素不当使用,防止超级耐药细菌产生提供有力的数据支撑。

食源性疾病暴发时,采取有效检测方法,对控制该疾病持续发生具有至关重要的作用,如2011年,德国爆发肠出血性大肠埃希菌O104污染中毒事件^[3],利用脉冲电场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)技术进行溯源分析,确定了受污染食品中大肠埃希菌O104均来自埃及进口的葫芦巴豆种子^[4-5];美国各州陆续报告食源性疾病暴发,通过使用PFGE技术,确定了受污染食品来自墨西哥的一个农场,实现了从源头上消灭食源性疾病的目的^[6]。PFGE又称脉冲式交变电场电泳技术,可以判定菌株之间同源性,在食源性疾病的溯源中发挥了关键作用,并且以

收稿日期:2020-02-04

基金项目:黑龙江省卫生健康科研计划项目(2017-432)

作者简介:付宇 男 副主任技师 研究方向为微生物 E-mail:

fuyu_yf@163.com

通信作者:包名家 男 主任技师 研究方向为预防医学 E-mail:

cmubmj@163.com

其重复性好,分辨力强而被誉为细菌分子生物学分型技术的“金标准”^[7-8]。本研究采用该技术分析食品中致泻性大肠埃希菌的同源性,为食源性疾病的治疗与控制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

对佳木斯市销售食品(生鲜肉、熟肉制品、生牛奶、鱼、生食蔬菜、凉拌菜等17类)进行无菌采集,共1320份。大肠埃希菌 ATCC 25922 由黑龙江省疾病预防控制中心提供。

1.2 主要仪器与试剂

EYELA LTI-700 恒温培养箱(上海爱朗仪器有限公司),BSL-1500 II A2 型生物安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司),VITEK 2 compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统(法国 BioMerieux),ABI 7500 型 PCR 仪(美国应用生物系统公司),Sensitre 微生物药敏分析系统(Thermo Fisher Scientific),CHEF Mapper 脉冲场凝胶电泳仪和凝胶成像系统(美国 Bio-Rad)、HZS-HA 水浴摇床(哈尔滨市东联电子技术开发公司),BioNumerics 7.6.3 分析软件(Applied Maths),凝胶成像系统(美国 Bio-Rad)。

五种致泻性大肠埃希菌核酸多重实时荧光 PCR 检测试剂盒(A版本)和细菌核酸提取试剂盒(北京卓诚惠生生物科技股份有限公司),EC 增菌肉汤、伊红美蓝培养基(北京陆桥技术股份有限公司),革兰阴性需氧菌药敏检测板(上海星佰生物技术有限公司和 Thermo Fisher Scientific),蛋白酶 K(Merck)、SeakemGold 琼脂糖(Lonza)、限制性内切酶 *Xba* I(New England BioLabs)。

1.3 方法

1.3.1 多重实时荧光 PCR 检测

根据 GB 4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》对采集样品经过分离培养后^[9],挑取可疑大肠埃希菌菌落分离纯化培养,按照细菌核酸提取试剂盒说明书进行核酸提取。按照5种致泻性大肠埃希菌核酸多重实时荧光 PCR 检测试剂盒说明书,配置反应体系和设置 PCR 循环条件。

1.3.2 耐药性分析

利用 Sensitre 微生物药敏分析系统进行分析,具体操作步骤为:目标菌纯培养过夜,制备 0.5 麦氏单位菌悬液。将定量试管头装到试管上,用于接种。倒置试管,安装到 AIM 自动接种仪上,并锁住。通过 AIM 触摸屏,选择加样模式。从 AIM 中取出检测板,将检测板密封,36℃±1℃培养 18~24 h。培

养完毕,使用全自动仪器进行判读,打印结果报告。

1.3.3 PFGE 检测

参照《PulseNet China 技术手册之脉冲场凝胶电泳(PFGE)操作规范》中非 O157 大肠埃希菌 PFGE 标准操作方案,对致泻性大肠埃希菌进行同源性分析。

将纯培养的致泻性大肠埃希菌和标准菌株 H9812 分别混于 CSB 中,制备 400 μL 菌悬液(4.0~4.5 麦氏单位),然后用预热 56℃ 400 μL 的 1% Seakem Gold 制作小胶块。将制好的胶块从模具上铲到 5 mL 蛋白酶 K/CLB 混合液中,54℃ 水浴摇床中孵育 2 h,转速为 130 r/min,进行裂解。裂解后的胶块,用预热 50℃ 无菌超纯水清洗 2 次,再用 TE 缓冲液清洗 4 次。然后,将胶块放入到 200 μL 酶(*Xba* I)中酶切,确保胶块在液面下,于 37℃ 水浴中孵育至少 2.5 h。将完成酶切之后的胶块粘于梳子齿上,用 1% Seakem Gold 胶制成电泳的胶。设置电泳条件为:分子质量为 50~400 kb,初始和终末转换时间分别为 6.76 s 和 35.38 s,电泳时间 18 h。电泳完成后,将胶放置于 400 mL Gelred 稀释液中染色 30 min,再用清水脱色 1 h,每 30 min 换 1 次水。用凝胶成像系统拍摄图像和 BioNumerics version 7.6.3 软件分析电泳图像。

2 结果与分析

2.1 佳木斯市食品中致泻性大肠埃希菌污染情况

利用多重实时荧光 PCR 对 1320 份食品进行检测,51 份样品中检出致泻性大肠埃希菌,检出率为 3.86%(51/1320),其中 14 株来自生鲜肉,占 27.45%(14/51),14 株来自生牛奶,占 27.45%(14/51),10 株来自鱼,占 19.61%(10/51),7 株来自凉拌菜,占 13.73%(7/51),4 株来自熟肉制品,占 7.84%(4/51),2 株来自生食蔬菜,占 3.92%(2/51),可见致泻性大肠埃希菌主要来自生鲜肉、生牛奶和鱼。

另外,这些致泻性大肠埃希菌时毒力基因主要为 6 种组合形式,根据其组合方式,可确定致泻性大肠埃希菌的类型主要是 EPEC 和 EAEC,具体如表 1 所示。

表 1 致泻性大肠埃希菌的毒力基因与类型

Table 1 Virulence genes and taxonomy of diarrheagenic

<i>Escherichia coli</i>				
序号	毒力基因	类型	菌株数/株	构成比/%
1	<i>escV</i>	EPEC	23	45.10
2	<i>astA</i>	EAEC	15	29.41
3	<i>pic</i>	EAEC	3	5.88
4	<i>aggR;astA</i>	EAEC	4	7.84
5	<i>Pic;aggR</i>	EAEC	4	7.84
6	<i>aggR;astA;pic</i>	EAEC	2	3.92
合计			51	100

2.2 致泻性大肠埃希菌的耐药

药敏结果显示,51株致泻性大肠埃希菌中有21株(占41.18%,21/51)对11种抗生素存在耐

药性,耐药率最高的四环素达到了35.29%,最低的氨苄西林/舒巴坦和头孢西丁均是3.92%,详见表2。

表2 致泻性大肠埃希菌药敏结果

Table 2 Drug sensitivity of diarrheagenic *Escherichia coli*

序号	抗生素名称	缩写	耐药		中介		敏感	
			菌株数	耐药率/%	菌株数	中介率/%	菌株数	敏感率/%
1	氨苄西林	AMP	9	17.65	5	9.80	37	72.55
2	头孢他啶	CAZ	0	0	4	7.84	47	92.16
3	氨苄西林/舒巴坦	AMS	2	3.92	15	29.41	34	66.67
4	亚胺培南	IMP	0	0	0	0	51	100
5	四环素	TET	18	35.29	0	0	33	64.71
6	萘啶酸	NAL	—	—	—	—	—	—
7	红霉素	ERY	—	—	—	—	—	—
8	头孢西丁	CFX	2	3.92	0	0	49	96.08
9	氯霉素	CHL	10	19.61	5	9.80	36	70.59
10	头孢噻肟	CTX	3	5.88	0	0	48	94.12
11	头孢唑林	CFZ	6	11.76	9	17.65	36	70.59
12	庆大霉素	GEN	10	19.61	0	0	41	80.39
13	复方磺胺	SXT	8	15.69	0	0	43	84.31
14	阿奇霉素	AZM	—	—	—	—	—	—
15	环丙沙星	CIP	6	11.76	0	0	45	88.24
16	甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑	TMP	7	13.73	2	3.92	42	82.35

具有耐药性的21株致泻性大肠埃希菌,包括3株单重耐药(占5.88%,3/51)和18株多重耐药(占35.29%,18/51),共产生14种耐药谱,最高的达到9重耐药,4重耐药的菌株数最多,为6株,占11.76%(6/51),详见表3。

表3 致泻性大肠埃希菌的耐药谱

Table 3 Drug resistant spectrum of diarrheagenic *Escherichia coli*

耐药种类数	耐药谱	菌株数/株	耐药率/%
1	TET	1	1.96(1/51)
	CFX	1	1.96(1/51)
	CFZ	1	1.96(1/51)
2	AMP-TET	1	1.96(1/51)
	AMP-TET-SXT	2	3.92(2/51)
3	CTX-TET-TMP	1	1.96(1/51)
	TET-CHL-CIP	2	3.92(2/51)
4	TET-GEN-CHL-TMP	5	9.80(5/51)
	AMP-TET-CHL-SXT	1	1.96(1/51)
5	TET-GEN-CHL-CIP-TMP	1	1.96(1/51)
	AMP-TET-CFZ-GEN-SXT	2	3.92(2/51)
6	AMP-TET-CFZ-GEN-SXT-CIP	1	1.96(1/51)
7	AMP-AMS-TET-CFX-CTX-CFZ-SXT	1	1.96(1/51)
9	AMP-AMS-TET-CHL-CTX-CFZ-GEN-SXT-CIP	1	1.96(1/51)

2.3 致泻性大肠埃希菌的同源性

对 *Xba* I 酶切后的51株致泻性大肠埃希菌进行 PFGE 分子分型,共获得49个不同指纹图谱,聚类相识度为38.6%~100%。其中,指纹图谱相似度较高的簇,聚类相识度为64.3%~100%,包含的菌株 HLJMS-E09 与 HLJMS-E10 同源性为100%,均来自生牛奶;HLJMS-E35 与 HLJMS-E37 的同源性为96.6%,均来自鱼;HLJMS-E11 与 HLJMS-E09 和

HLJMS-E10 的同源性为96.3%,均来自生牛奶。其他簇中聚类相似度较高的菌株,HLJMS-E14 与 HLJMS-E15 的同源性为100%,均来自生牛奶;HLJMS-E65 与 HLJMS-E66 的同源性为97%,均来自生鲜肉,如图1所示。

3 讨论

本研究利用多重实时荧光定量 PCR 方法在佳木斯市食品中检出51株致泻性大肠埃希菌,相比较 GB 4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》使用的普通 PCR 检测方法,更加快速简便。51株致泻性大肠埃希菌,有21株具有耐药性,分别来自生牛奶(9株)、鱼(8株)、生鲜肉(3株)和生食蔬菜(1株),可见佳木斯市食品中耐药性致泻性大肠埃希菌主要来自生牛奶、鱼和生鲜肉,这与黑龙江省作为生牛奶生产大省,在佳木斯市有较高的流通量密切相关,同时处在高寒和松花江所在地的地域特点,使人们形成了喜爱吃肉和产自松花江的鱼的饮食习惯,因此这些食品较高的流通量,增大了来自致泻性大肠埃希菌污染的机会,与其他地区有一定差异,如广东省食品中致泻性大肠埃希菌主要来自生鲜肉,检出率在10%以上^[10],江油市的生鲜肉和蔬菜中致泻性大肠埃希菌检出率最高^[11],因此,针对我市食品存在的危害风险,应加强监测和宣传教育,让人们形成健康的饮食习惯,避免风险食品对消费者健康造成伤害。

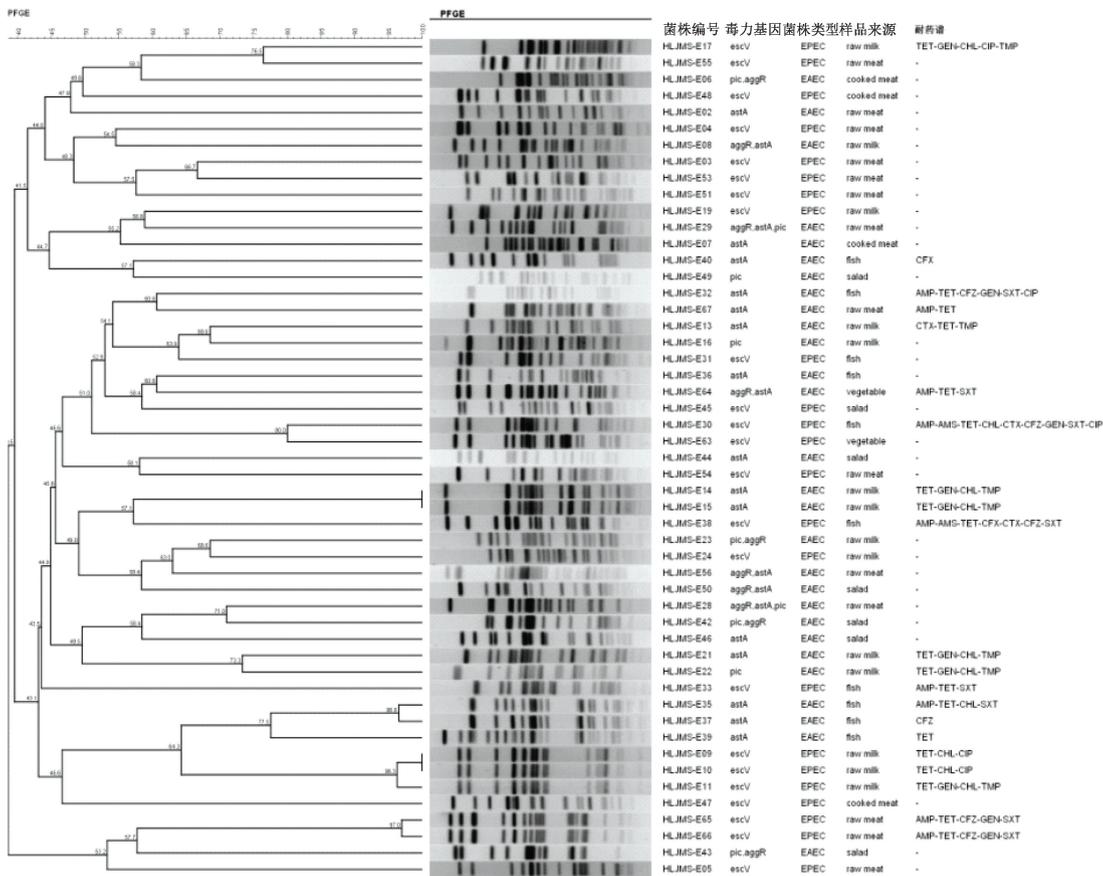


图1 致泻性大肠埃希菌的同源性

Figure 1 Homology of diarrheagenic *Escherichia coli*

本地区致泻性大肠埃希菌对抗生素有一定抗菌性,其中四环素耐药率最高,达到了35.29%,这与不同地区的畜牧业和医疗机构预防和治疗疾病时,对抗生素的选择标准和使用量不同相关,使菌株的耐药性存在一定差异,如北京地区致泻性大肠埃希菌对氨苄西林、哌拉西林、复方磺胺甲噁唑、环丙沙星和诺氟沙星耐药率较高,均在45%以上^[12];宁夏回族自治区致泻性大肠埃希菌菌株对氨苄西林、阿莫西林和复方磺胺甲噁唑耐药性最为严重,达到100%^[13];广东省不同地区生肉中致泻性大肠埃希菌的耐药率不同,粤西地区四环素耐药率为90.9%、粤东地区左旋氧氟沙星耐药率为76%、粤北地区四环素耐药率为73.3%、珠三角地区氨苄西林耐药率为70.8%^[14]。在使用抗生素进行治疗和防控时,应根据当地致病菌株的耐药性情况,选择有效抗生素至关重要,如贵州省致泻性大肠埃希菌对环丙沙星和阿莫西林/克拉维酸的敏感率均较高^[15];宁夏回族自治区致泻性大肠埃希菌对庆大霉素、氯霉素和头孢噻肟较为敏感^[16],我市食品中分离的致泻性大肠埃希菌菌株,对亚胺培南、头孢西丁和头孢他啶的敏感率为100%、96.08%和92.16%。因此,根据本地区菌株耐药情况,为临床

患者有针对性的使用抗生素,能够达到更好的治疗效果。

佳木斯市分离的致泻性大肠埃希菌从单重耐药到9重耐药都有分布,其中多数集中在3重至5重耐药,与我国一些地区情况相似,如白银市致泻性大肠埃希菌3重耐药最多,其次是5重和4重耐药^[17];长春市致泻性大肠埃希菌4重耐药最多^[18],说明致泻性大肠埃希菌的多重耐药现象较明显,为相关疾病的救治增加了难度和成本。因此,为减少多重耐药菌株和防止超级耐药菌株的产生,应合理使用抗生素进行疾病的治疗,避免滥用抗生素,同时对致泻性大肠埃希菌的耐药基因与机制进行深入研究,探索更有效的防控方式和临床治疗方法,为改变菌株耐药现状提供理论和技术依据。

对致泻性大肠埃希菌的同源性与耐药性进一步分析,发现亲缘关系非常密切的两株菌(如HLJMS-E65与HLJMS-E66,指纹图谱相似度为97%)耐药谱相同,与杜悦等^[19]的研究相似,而指纹图谱相识度为38.6%~96.6%的其他菌株,多数耐药谱不同,少数耐药谱相同的菌株,指纹图谱相识度只有43.1%~73.3%。可见,菌株之间亲缘关系对耐药性的影响尚不明确,了解致泻性大肠埃希菌

的耐药谱与 PFGE 指纹图谱之间的关系,还需要进一步深入研究。

利用 PFGE 技术分析食品中分离的 51 株致泻性大肠埃希菌,发现不同产地的生牛奶中,菌株 HLJMS-E09 与 HLJMS-E10、HLJMS-E14 与 HLJMS-E15 的指纹图谱相同,并且结合流行病学调查相关信息和相同的毒力基因与耐药谱,可以判定它们来源于同一菌株,进而推断两地生牛奶对同一污染源有过接触经历,造成了指纹图谱相同的致泻性大肠埃希菌出现在两个不同产地的生牛奶中。其他 47 株致泻性大肠埃希菌获得 47 个 PFGE 指纹图谱,差异性较明显,呈多态性分布,与一些地区情况相似^[20-23]。随着 PFGE 技术的广泛应用,致病菌数据库中菌株之间同源性数据信息不断积累,可以构建不同菌种的基因进化树,为食品中致病菌的溯源和了解相关进化信息,提供有力的技术依据。

参考文献

- [1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections linked to romaine lettuce [R]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2018.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *E. coli* infections linked to ground beef [R]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2018.
- [3] KAMPMEIER S, BERGER M, MELLMANN A, et al. The 2011 German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104: H4 outbreak—The danger is still out there [J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2018, 416: 117-148.
- [4] European Food Safety Authority. Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104: H4 2011 Outbreaks in Germany and France [J]. *EFSA Supporting Publications*, 2011, 8(7): 176E.
- [5] 黄熙, 邓小玲, 梁骏华, 等. 2011 年德国肠出血性大肠杆菌 O104:H4 感染暴发疫情溯源调查 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, (23) 6: 555-559.
- [6] 李燕俊, 刘秀梅. 脉冲场凝胶电泳技术及其在致病菌研究中的应用 [J]. *国外医学 (卫生学分册)*, 2005, 32(5): 305-309.
- [7] 黄涛, 山珊, 黄艳梅, 等. 大肠埃希氏菌的分型方法及其研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2020, 47(3): 892-902.
- [8] LOPEZ-CANOVAS L, MARTINEZ BENITEZ M B, HERRERA ISIDRON J A, et al. Pulsed field gel electrophoresis: past, present, and future [J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 573: 17-29.
- [9] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 中华人民共和国国家标准 食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验: GB 4789.6—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [10] 王建, 杨冰, 严纪文, 等. 2003—2006 年广东省食品中致泻性大肠埃希菌污染状况调查分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(8): 1387-1389.
- [11] 邓明林, 蒋琳, 刘宗丽, 等. 江油市初级食品中致泻性大肠杆菌污染调查 [J]. *现代预防医学*, 2004, 31(1): 109-110.
- [12] 张菊玲, 崔恩博, 鲍春梅, 等. 致泻性大肠埃希菌的分布及耐药特点研究 [J]. *传染病信息*, 2012, 25(3): 180-182.
- [13] 张燕飞, 田晓伟, 郝琼, 等. 宁夏致泻性大肠埃希菌的流行特征及耐药现状研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2015, 40(11): 865-869.
- [14] 王建, 杨冰, 赖蔚冬, 等. 广东省动物性来源的致泻性大肠埃希氏菌耐药性分析 [J]. *中国卫生检验杂志*. 2014, 24(2): 288-291.
- [15] 韦小瑜, 游旅, 田克诚, 等. 2013—2014 年贵州省致泻性大肠埃希菌药物敏感性分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(17): 3859-3862.
- [16] 郭邦成, 闫立群, 郝琼, 等. 宁夏致泻性大肠杆菌的流行特征及耐药现状研究 [J]. *宁夏医学杂志*, 2013, 35(4): 307-309.
- [17] 李梅基, 张小, 强丽红, 等. 2016—2018 年白银市食源性疾病主动监测病原学及流行病学特征分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2020, 32(1): 72-76.
- [18] 李月婷, 龚云伟, 刘桂华. 食源性沙门菌和致泻性大肠杆菌的耐药性分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(22): 3335-3337.
- [19] 杜悦, 王红, 苏爱荣, 等. 急性腹泻病患者与健康体检人员肠集聚性大肠埃希菌分子特征及耐药性研究 [J]. *疾病监测*, 2017, 32(12): 931-935.
- [20] LAW R J, GUR-ARIE L, ROSENSHINE I, et al. In vitro and in vivo model systems for studying enteropathogenic *Escherichia coli* infections [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2013, 3(3): a009977.
- [21] OCHOA T J, CONTRERAS C A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children [J]. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2011, 24(5): 478-483.
- [22] 李东迅, 彭华, 闻艳红, 等. 2015 年北京市昌平区致泻性大肠埃希菌耐药性及脉冲场凝胶电泳分型研究 [J]. *疾病监测*, 2017, 32(3): 247-251.
- [23] 陈道利, 许彦梅, 王利, 等. 马鞍山市非典型肠致病性大肠杆菌的鉴定及分子分型研究 [J]. *安徽预防医学杂志*, 2016, 22(2): 71-75, 82.