

调查研究

2013—2024年温州地区克罗诺杆菌感染的流行病学及菌株
分子特征分析

李毅,章乐怡,胡玉琴,洪程基,谢爱蓉,邵潘驰,李海燕,楼辉煌
(温州市疾病预防控制中心(温州市卫生监督所),浙江温州 325000)

摘要:目的 了解和掌握温州地区腹泻患者克罗诺杆菌感染状况及其菌株分子流行特征,为该地区克罗诺杆菌引发的食源性疾病预防提供科学依据。方法 2013—2024年对温州地区食源性疾病腹泻患者样本,开展克罗诺杆菌检测并对分离的菌株进行菌种鉴定、分子血清分型、全基因组测序,并进行聚类分析,同时分析毒力、耐药相关基因携带情况。结果 在1816份样本中,共检出21株克罗诺杆菌,总分离率达到1.16%。年龄分布上,18~60岁年龄段占比38.10%,<1岁占比33.33%。发病时间上,春季检出占比38.10%,夏季占比33.33%。分离菌株中,阪崎克罗诺杆菌14株,占总菌株数的66.67%。阪崎克罗诺杆菌可分为4个血清型及1个未分型,其中Csak O1为主要血清型;丙二酸盐克罗诺杆菌分为2个血清型,以Cmal O2为主要血清型。21株克罗诺杆菌经鉴定,共分为10个ST型和8个克隆群(CC),其中CC7和CC4为主要克隆群,ST4型和ST201型为主要ST型。21株菌株的基因注释结果显示,均携带17个与运动、黏附和侵袭性等相关的基因。此外,共筛选出15个耐药基因,多数菌株携带11~14个耐药基因。结论 在温州地区由克罗诺杆菌引发的食源性腹泻病例中,需重点关注婴儿群体的克罗诺杆菌感染问题。Csak O1和Cmal O1为主要血清型,CC4、CC7为主要克隆群,ST4型、ST201型为主要ST型。

关键词:腹泻;克罗诺杆菌;流行病学;全基因组测序;分子分型特征

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2025)06-0526-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2025.06.004

Epidemiology and molecular characterization of *Cronobacter* spp. isolated from
2013 to 2024 in Wenzhou

LI Yi, ZHANG Leyi, HU Yuqing, HONG Chengji, XIE Airong, SHAO Panchi,
LI Haiyan, LOU Huihuang

(Wenzhou Center for Disease Control and Prevention (Wenzhou Health Supervision Institute),
Zhejiang Wenzhou 325000, China)

Abstract: **Objective** To understand and master the infection status and molecular epidemiological characteristics of *Cronobacter* spp. in diarrhea patients in Wenzhou, and to provide a scientific basis for the prevention and control of foodborne diseases caused by *Cronobacter* spp. in this region. **Methods** From 2013 to 2024, stool samples were collected from diarrhea patients with foodborne diseases in Wenzhou and tested for *Cronobacter* spp. Isolated *Cronobacter* strains underwent species identification, molecular serotyping, and whole-genome sequencing. Bioinformatics analyses were performed to assess genetic relatedness through cluster analysis, as well as to detect the presence of virulence-associated genes and antimicrobial resistance genes. **Results** A total 21 strains of *Cronobacter* spp. were detected in 1816 samples, with a total isolation rate of 1.16%. In terms age distribution, the proportion of patients aged 18-60 years was 38.10%, and the proportion of patients under 1 year old was 33.33%. In terms of seasonal distribution, the detection rate in spring accounted for 38.10%, and that in summer accounted for 33.33%. Among the isolated strains, there were 14 strains of *Cronobacter sakazakii*, accounting for 66.67% of the total number of strains. *Cronobacter sakazakii* could be divided into 4 serotypes and 1 untyped strain, among which Csak O1 was the main serotype; *Cronobacter malonaticus* was divided into 2 serotypes, with Cmal O2 as the main serotype. After identification, the 21 strains of *Cronobacter* spp. were divided into 10 ST types and 8 clonal complexes (CC), among which CC7 and CC4 were the main clonal complexes, and ST4 and ST201 were the main ST types. The gene annotation results of the 21 strains showed that all of them carried 17 genes related to

motility, adhesion and invasiveness, etc. In addition, a total of 15 drug resistance genes were screened out, and most of the strains carried 11-14 drug resistance genes. **Conclusion** In cases of foodborne diarrhea caused by *Cronobacter* spp. in Wenzhou, attention should be focused on *Cronobacter* spp. infections in infants. Csak O1 and Cmal O1 are the main serotypes, CC4 and CC7 are the main clonal complexes, and ST4 and ST201 are the main ST types.

Key words: Diarrhea; *Cronobacter*; epidemiology; whole-genome sequencing; molecular typing characteristics

克罗诺杆菌(*Cronobacter*)属肠杆菌科,革兰氏阴性杆菌,最初被命名为“产黄色素阴沟肠杆菌(*Yellow Pigmented Enterobacter cloacae*)”,1980年更名为阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)。1961年,URMENYI和FRANKLIN率先报道了两例新生儿由阪崎肠杆菌引发的脑膜炎死亡病例^[1]。目前根据DNA杂交、16SrRNA测序、表型分型等研究,将该属分成7个种和3个亚种,分别为阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌、苏黎世克罗诺杆菌、莫金斯克罗诺杆菌、康帝蒙提克罗诺杆菌、尤尼沃斯克罗诺杆菌和都柏林克罗诺杆菌及3个亚种。此后,全球范围内陆续有研究报道阪崎肠杆菌(现归类于克罗诺杆菌属)引发的菌血症、脑膜炎及坏死性小肠结肠炎等感染病例。尽管病例主要集中于婴儿群体,但该菌对成年人同样具有感染风险,尤其是老年人及免疫功能低下人群^[1]。作为条件致病菌,克罗诺杆菌对新生儿(尤其是早产儿或免疫缺陷婴儿)的威胁尤为显著,其感染致死率高达40%~80%^[2-4]。鉴于该菌在食源性疾病中的潜在危害,其预防与监控研究已在国内外受到广泛关注,成为致病菌监测领域的研究热点。本文旨在调查食源性疾病标本中克罗诺杆菌的感染状况,并对其开展流行病学及病原学分子分型特征分析,以期进一步明确该菌在食源性疾病患者中的感染情况,为克罗诺杆菌的防控预警、暴发流行监测及溯源追踪提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株和标准菌株

2013—2024年从温州市食源性疾病监测点临床诊断为感染性腹泻患者的1816份粪便或肛拭样本中分离出21株克罗诺杆菌。克罗诺杆菌标准菌株*C. sakazakii* CICC 21560和*C. muytjensii* ATCC 51329由中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)提供。

1.2 仪器与试剂

全自动微生物质谱鉴定系统MALDI Biotyper Smart为布鲁克(北京)科技有限公司产品;全自动微生物分析系统VITEK 2 Compact、浊度仪和GN鉴定卡均为法国生物梅里埃公司产品;Cary-Blair运送培养基、克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌)显色培养基为青岛海博生物技术有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 克罗诺杆菌的分离鉴定

按照GB 4789.40—2010、2016和2024国家标准^[5-7]检验方法要求将腹泻患者新鲜粪便或肛拭子直接划线克罗诺杆菌显色培养基平板,36℃进行选择分离培养24h,然后挑取蓝绿色菌落接种于胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptone soy agar, TSA)平板,最后接种GN鉴定卡进行系统生化鉴定和微生物质谱鉴定确认。

1.3.2 全基因组测序及数据分析

全基因组测序委托杭州微数生物科技有限公司。

1.3.2.1 基因组提取、文库构建及全基因组测序

将菌株从菌种保存管划线接种至TSA平板复苏活化,36℃恒温培养箱过夜培养,用无菌接种环刮取新鲜菌落,随后按照天隆细菌基因组DNA提取试剂盒提取菌株的全基因组DNA,外送进行测序和文库构建,简要流程如下:电泳检测DNA纯度和完整性后,利用酶切方法将细菌基因组DNA碎片化为200~300b碱基短片段,使用Enzymic Universal DNaseq Library Prep Kit(杭州开泰生物技术有限公司,AT4107规格试剂盒)文库制备试剂盒制备文库,使用Qubit 4.0荧光计和NanoDrop 2000超微量分光光度计进行定量和插入片段大小检测,使用qPCR进行文库浓度定量后在Illumina(因美纳)HiSeq X Ten平台开展全基因组测序。

1.3.2.2 测序数据处理

测序得到的原始数据(raw data)进行质控(去接头、过滤质量较低的数据),得到clean data,然后通过国家致病菌识别网高性能生物计算数据处理终端中基因分析软件将原始序列进行de novo组装,序列组装拼接以后,通过在相应数据库比对获得分子血清型、MLST、cgMLST、毒力基因、耐药基因的数据分析结果。最终获得的单菌高质量测序数据为所测细菌种属基因组长度的150X以上,基因组覆盖度大于90%。

1.3.2.2.1 MLST和cgMLST特征分析

将全基因组序列结果上传网站数据库(<http://pubmlst.org/organisms/cronobacter/>)进行线上数据分析,获取每株菌7个管家基因(*atpD*、*fusA*、*glnS*、*gltB*、*gyrB*、*infB*和*pps*)的等位基因序列号,与克罗诺杆菌

MLST 标准数据(<http://pubmlst.org/cronobacter/>)进行比对获得该菌株的序列型别(Sequence type, SE)^[8],而同时获取 cgMLST 的 1 865 个核心基因的等位基因序列号,然后利用 BioNumerics 7.6 软件对其进行 MLST 和 cgMLST 聚类分析。

1.3.2.2.2 毒力基因和耐药基因分析

利用软件拼接后的序列,通过细菌基因组分析平台 fDBAC(<http://fbac.dmicrobe.cn/>)提交序列数据获得毒力基因谱和耐药基因谱,同时分别参考病原菌毒力因子数据库 VFDB(<http://www.mgc.ac.cn>)和抗性基因数据库 CARD(<https://card.mcmaster.ca/>)。

1.3.2.2.3 O 型分子血清型鉴定分析

在 O 型分子血清型区域中,管家基因 *gnd* 与 *galF* 基因位点所构成的基因簇具有特异性^[8]。将全基因组序列提交至克罗诺杆菌数据库,运用 BIGSdb 工具即可对血清型进行鉴定。

2 结果

2.1 克罗诺杆菌感染腹泻患者年龄、性别及发病时间分布特征

2013—2024 年,温州地区针对食源性疾病腹泻患者开展了相关检测工作,总共检测了 1 816 份粪便或肛拭标本,成功分离出 21 株克罗诺杆菌,总体分离率达到 1.16%。年龄分布特征显示,有年龄记录的克罗诺杆菌感染腹泻患者的年龄跨度显著,最小患者不足 1 岁,最大患者达 75 岁。其中,18~60 岁年龄段患者 8 人,占比 38.10%;小于 1 岁的患者 7 人,占比 33.33%。性别差异方面,男性患者数量明显多于女性。其中男性患者 16 人,占比 76.19%;女性患者 5 人,占比 23.81%,男女比例为 3.2:1。发病时间上,除 2 月和 12 月外,其余月份均有克罗诺杆菌检出。6 月检出占比最高,为 19.05%(4/21);3 月和 4 月次之,检出占比均为 14.29%(3/21)。季节分布上,春、夏、秋、冬四季均有感染病例。春季检出占比 38.10%,夏季占比 33.33%,秋季占比 19.05%,冬季占比 9.52%。具体内容见表 1。

2.2 克罗诺杆菌菌种鉴定及分子血清分型情况

根据克罗诺杆菌 MLST 7 个管家基因和全基因组序列分析鉴定,21 株临床分离的克罗诺杆菌中阪崎克罗诺杆菌 14 株,占总菌株数的 66.67%(14/21);丙二酸盐克罗诺杆菌 7 株,占总菌株数的 33.33%(7/21)。依据 *galF* 和 *gnd* 等位基因序列号分析,阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)可分为 4 个血清型及 1 个未分型。其中,Csak O1 为主要血清型,占比 35.71%(5/14),其次为 Csak O3、Csak O2、Csak O4。Csak O1 的 *galF* 和 *gnd* 等位基因序列号组合有 3 种,Csak

O2 和 Csak O3 各有 2 种。丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)分为 2 个血清型,以 Cmal O2 为主要血清型,占比 85.71%(6/7),其次为 Cmal O1。具体内容见表 1。

2.3 克罗诺杆菌 MLST 分型和 cgMLST 聚类分析结果

21 株克罗诺杆菌菌株,经鉴定共分为 10 个 ST 型及 8 个克隆群(CC)。其中克隆群以 CC7 和 CC4 为主,而阪崎克罗诺杆菌涵盖 7 个 ST 型,分别为 ST1、ST4、ST8、ST13、ST21、ST148 和 ST321;丙二酸盐克罗诺杆菌包含 3 个 ST 型,即 ST7、ST60 和 ST201。在所有菌株中,ST4 型有 5 株,占比达 23.8%(5/21);ST201 型有 4 株,占比 19.0%(4/21);此外,ST1、ST7、ST13 和 ST21 型各有 2 株。从克罗诺杆菌数据库下载 24 株具有相关 ST 型的临床分离克罗诺杆菌全基因组测序数据。通过对本地区 21 株菌株的 cgMLST 核心基因进行分析,并与数据库中的 24 株菌株构建最小生成树。cgMLST 聚类分析显示,45 株菌之间的等位差异基因数量为 1~1 171 个。具体而言:3 株本地 ST4 型菌株与 1 株上海 ST4 型菌株的等位差异基因数为 1~18 个;本地 4 株 ST201 型菌株间的等位差异基因数仅 2 个;本地 2 株 ST7 型菌株与 1 株美国 ST7 型菌株、1 株欧洲 ST7 型菌株的等位差异基因数为 8~31 个;本地 1 株 ST60 型菌株与 2 株国内 ST60 型菌株及 2 株欧洲 ST60 型菌株的等位差异基因数为 30~34 个。上述数据表明,这几组菌株具有高度同源性。相比之下,其他相同 ST 型菌株间的等位差异基因数均超过 50 个,具体内容见表 1 和图 1。

2.4 克罗诺杆菌毒力基因谱分析

通过毒力基因数据库对菌株基因组信息进行比对,取 coverage≥90 和 Identity≥90。结果显示,21 株克罗诺杆菌菌株预测获得的基因注释结果均携带 17 个基因,其功能与运动、黏附和侵袭性等有关。在共有毒力基因谱的基础上,主要存在 4 个基因的差异性,20 株菌株携带 *clpB*、*fur* 基因,这类基因参与蛋白质去聚集过程及铁离子吸收;19 株菌株携带 *flgC* 基因,该基因与细菌运动(鞭毛合成)密切相关;而 8 岁男孩感染的 ST201 菌株未携带 *clpB*、*flgC* 基因,小于 1 岁婴幼儿感染的 ST4 菌株未携带 *fur* 基因。此外,只有 1 株 ST13 型菌株携带 *rfbD* 基因,此基因与甘露糖脱水酶相关。具体内容见表 1 和表 2。

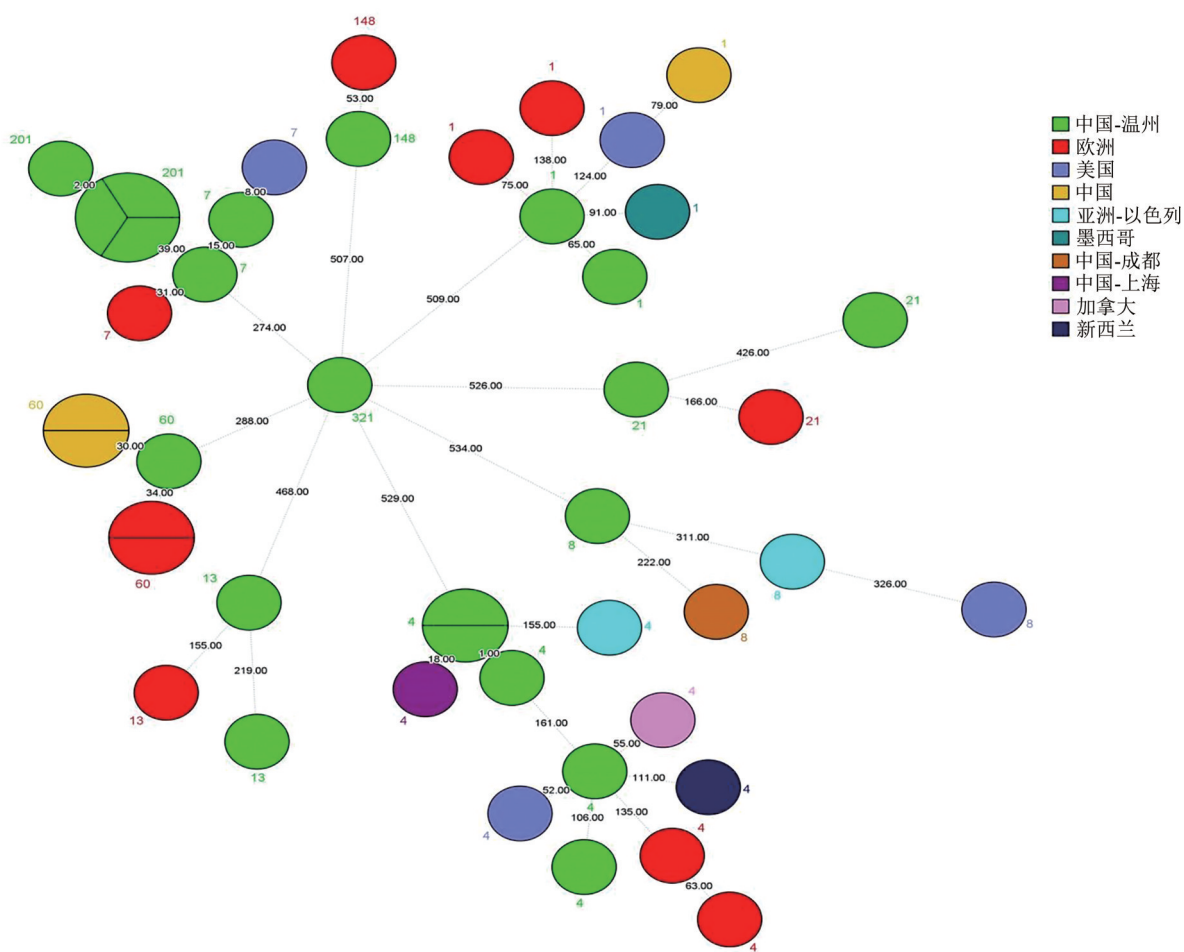
2.5 克罗诺杆菌耐药基因谱分析

将全基因组测序数据提交到细菌基因组分析平台与 CARD 数据库进行比对后,取 coverage≥90 和 Identity≥90 的结果,发现 21 株克罗诺杆菌共筛选出

表1 克罗诺杆菌分离菌株来源、菌种鉴定、血清分型、基因分型等情况
Table 1 Sources of isolates, species identification, serotyping, and genotyping of the strains of *Cronobacter* spp.

序号	菌株编号	年龄/岁	性别	分离时间	菌种	<i>gulf</i>	<i>gnd</i>	血清型	ST型	克隆群(CC)	<i>clpB</i>	<i>fur</i>	<i>flgC</i>	<i>rfbD</i>	<i>aadA27</i>	<i>mcr-6</i>	<i>mcr-9</i>	<i>lnuA</i>
1	1315002	<1	男	2013年6月	阪崎克罗诺杆菌	21	23	Csak 01	148	16	+	+	+	-	-	-	+	-
2	1315003	<1	女	2013年10月	阪崎克罗诺杆菌	4	45	Csak 03	4	4	+	-	+	-	+	-	-	-
3	1315004	<1	男	2013年10月	阪崎克罗诺杆菌	4	45	Csak 03	4	4	+	+	+	-	+	-	-	-
4	1615003	8	男	2016年3月	丙二酸盐克罗诺杆菌	5	4	Cmal 02	201	7	-	+	-	-	-	-	+	-
5	1615024	<1	男	2016年6月	阪崎克罗诺杆菌	70	67	Csak 03	8	8	+	+	+	-	+	-	+	+
6	1615034	<1	男	2016年8月	丙二酸盐克罗诺杆菌	24	27	Cmal 01	60	60	+	+	+	-	-	-	-	-
7	B1715001	<1	男	2017年11月	阪崎克罗诺杆菌	13	14	Csak 04	13	13	+	+	-	+	+	-	-	-
8	B1715002	9	男	2017年6月	阪崎克罗诺杆菌	2	1	Csak 01	1	1	+	+	+	-	+	-	+	-
9	B1815001	15	男	2018年1月	阪崎克罗诺杆菌	25	28	Csak 02	13	13	+	+	+	-	+	+	-	-
10	B2115001	<1	男	2021年4月	阪崎克罗诺杆菌	2	1	Csak 01	1	1	+	+	+	-	+	-	+	-
11	1615001	57	男	2016年3月	阪崎克罗诺杆菌	19	21	Csak 01	21	21	+	+	+	-	-	-	+	-
12	1615002	73	女	2016年4月	丙二酸盐克罗诺杆菌	5	4	Cmal 02	201	7	+	+	+	-	-	-	+	-
13	1615035	26	男	2016年9月	丙二酸盐克罗诺杆菌	5	4	Cmal 02	201	7	+	+	+	-	-	-	-	-
14	B1915001	66	男	2019年1月	阪崎克罗诺杆菌	3	2	Csak 02	4	4	+	+	+	-	+	+	-	-
15	B2020001	75	女	2020年6月	丙二酸盐克罗诺杆菌	5	4	Cmal 02	7	7	+	+	+	-	-	-	-	-
16	B2415001	27	男	2024年3月	阪崎克罗诺杆菌	109	140	unknown	321	unknown	+	+	+	-	-	-	-	-
17	B2415002	37	男	2024年5月	阪崎克罗诺杆菌	4	45	Csak 03	4	4	+	+	+	-	+	+	-	-
18	B2415003	31	女	2024年5月	丙二酸盐克罗诺杆菌	5	4	Cmal 02	7	7	+	+	+	-	-	+	-	-
19	B2415004	25	男	2024年8月	丙二酸盐克罗诺杆菌	5	4	Cmal 02	201	7	+	+	+	-	-	+	-	-
20	C2415001	18	女	2024年4月	阪崎克罗诺杆菌	3	2	Csak 02	4	4	+	+	+	-	+	-	-	-
21	C2415004	22	男	2024年7月	阪崎克罗诺杆菌	19	21	Csak 01	21	21	+	+	+	-	-	+	-	-

注:春季:3~5月,夏季:6~8月,秋季:9~11月,冬季:12、1月



注:绿色圆圈代表本地分离菌株,其余不同颜色圆圈代表来自全球范围的临床分离菌株。每个圆圈对应一种ST型,圆圈大小直观反映该ST型所含菌株数量,圆圈旁标注的数字为对应的ST型,分类线上的数字表示等位基因差异性

图1 克罗诺杆菌cgMLST聚类分析结果

Figure 1 Result of cgMLST cluster analysis of *Cronobacter* spp.

表2 克罗诺杆菌菌株毒力基因携带情况

Table 2 The carriage of virulence genes in *Cronobacter* spp.

特有 virulence 相关基因及功能	共有 virulence 相关基因及功能/%
<i>clpB</i> (95.24%): 蛋白质去聚集伴侣蛋白基因; <i>fur</i> (95.24%): 铁吸收调节子基因; <i>flgC</i> (90.48%): 与运动有关(鞭毛合成); <i>rfbD</i> (4.76%): 甘露糖脱水酶	<i>cheB</i> (100%), <i>cheY</i> (100%), <i>cheW</i> (100%), <i>flgC</i> (100%), <i>fliA</i> , (100%), <i>fliG</i> (100%), <i>fliH</i> (100%), <i>fliM</i> (100%), <i>fliQ</i> (100%), <i>flhA</i> (100%), <i>flhC</i> (100%), <i>motA</i> (100%); 与鞭毛有关(鞭毛合成); <i>ompA</i> (100%), <i>NlpI</i> (100%); 与黏附和侵袭性有关; <i>rpoS</i> (100%); RNA 聚合酶相关基因; <i>gndA</i> (100%); NADP 依赖性 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因; <i>RcsAB</i> (100%); 调节胶囊合成基因

15 个耐药基因,多数菌株携带 11~14 个耐药基因,其中所有菌株均带有 *emrB*、*GlpT*、*acrB*、*CRP*、*marR*、*acrD*、*emrR*、*marA*、*msbA*、*ampH*、*rsmA* 11 种基因。在共有耐药基因谱的基础上,主要存在 4 个基因的差异性,10 株(ST1、ST4、ST8 和 ST13)阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)携带氨基糖苷类抗生素耐药基因 *aadA27*; 5 株阪崎克罗诺杆菌(ST1、ST8、ST21 和 ST148)及 2 株 ST201 型丙二酸盐克罗诺杆菌带有多黏菌素耐药基因 *mcr-9*; 4 株阪崎克罗诺杆菌(ST4、ST13 和 ST21)和 2 株(ST7 和 ST201)丙二酸盐克罗诺杆菌携带多黏菌素耐药基因 *mcr-6*; 另外,1 株 ST8 型阪崎克罗诺杆菌携带林可酰胺类抗生素耐药基因 *lnuA*。具

体内容见表 1 和表 3。

3 讨论

克罗诺杆菌作为一种食源性条件致病菌,能引起菌血症、脓毒血症,以及泌尿道、呼吸道、创伤面或局部感染等严重疾病,但高风险人群主要是 0~6 个月婴儿,特别是早产儿、低出生体质量儿和免疫力低下的婴儿,病死率为 40%~80%,幸存者多遗留严重的神经、发育后遗症,因而在国内外备受关注。不过,国内关于克罗诺杆菌感染导致腹泻的报道相对较少,因此本研究聚焦调查温州地区 2013—2024 年食源性疾病腹泻患者克罗诺杆菌的感染情况,结果

表3 21株克罗诺杆菌耐药基因携带情况
Table 3 Drug resistance gene carrying of 21 strains of *Cronobacter* spp.

耐药基因类型	携带率/%	介导耐受抗生素	耐药机制类型
<i>aadA27</i>	47.62	氨基糖苷类	外排泵
<i>acrB</i>	100	利福霉素类、甘氨酸环素类、头孢菌素类、四环素类、氟喹诺酮类、苯尼考类、三氯生类、青霉烷酸类	外排泵
<i>acrD</i>	100	氨基糖苷类	外排泵
<i>ampH</i>	100	头孢菌素类、青霉素类	抗生素灭活
<i>CRP</i>	100	氟喹诺酮类、青霉烷酸类、大环内酯类抗生素	外排泵
<i>emrB</i>	100	氟喹诺酮类	外排泵
<i>emrR</i>	100	氟喹诺酮类	外排泵
<i>GlpT</i>	100	磷霉素类	抗生素靶点改变
<i>lnuA</i>	4.76	林可酰胺类抗生素	抗生素灭活
<i>marA</i>	100	利福霉素类、头孢菌素类、氟喹诺酮类、苯尼考类、青霉烷酸类、四环素类、碳青霉烯类、甘氨酸环素类、单胺菌素类、头孢霉素、三氯生类、青霉烯类	外排泵
<i>marR</i>	100	利福霉素类、甘氨酸环素类、头孢菌素类、四环素类、氟喹诺酮类、苯尼考类、三氯生类、青霉烷酸类	外排泵
<i>mcr-6</i>	28.57	多肽抗生素类	抗生素靶点改变
<i>mcr-9</i>	33.33	多肽抗生素类	抗生素靶点改变
<i>msbA</i>	100	硝基咪唑类	外排泵
<i>rsmA</i>	100	氯霉素类、二氨基嘧啶类、氟喹诺酮类	外排泵

显示总分离率为 1.16%。这一数据与其他城市的监测结果相比,接近北京市的 2.63%^[9]和 2.89%^[10],但远低于武汉市针对住院患者的 28.36%^[11],这些差异提示克罗诺杆菌的感染水平存在地域性和检验对象的差异,同时也表明温州市腹泻患者中确实存在克罗诺杆菌感染现象,这一情况值得关注。进一步分析发现,本研究中克罗诺杆菌在春、夏两季的检出率较高,显示出明显的季节特征,尽管食源性克罗诺杆菌病例在全年大部分月份均有发生,但依据不同月份的特征数据可知,温州市的流行高峰期每年的 3~6 月,这意味着防控措施应具有针对性。从性别差异角度分析,男性患者数量多于女性,推测其原因,可能与当前食源性疾病监测的阳性病例数据量不足有关。今后,需进一步加强阳性病例的检出工作,以便更全面地阐释这一现象。

患者的年龄、性别分布特征显示,18~60 岁的占 38.10%,这与武汉市^[9]等地的相关报道一致。此外,小于 1 岁的患者占比达 33.33%,这与武汉市^[11]既往的报道基本相符,与 PATRICK 等^[12]报道在美国克罗诺杆菌感染病例主要集中在 5 岁以下的儿童情况一致,可能原因为婴幼儿免疫系统发育尚不完善,免疫力低下,抵抗力较弱,且尚未养成良好的个人卫生习惯,因而极易受到感染。鉴于此,应当重点加强对婴儿克罗诺杆菌感染问题的关注。

本研究针对 21 株克罗诺杆菌临床分离株,开展了菌种鉴定及分子血清分型工作。结果显示,分离株以阪崎克罗诺杆菌为主,这一结果与余欢等^[13]的报

道一致。在血清型方面,主要为 Csak O1 和 Cmal O1,与武汉市相关研究^[11]中的血清型情况高度相似。鉴于此,今后需要深入研究不同血清型克罗诺杆菌的致病性差异,这将为后续高致病性菌株的精准检测提供关键依据,助力公共卫生安全防控工作。

本研究中的 21 株克罗诺杆菌,主要以克隆群 CC4、CC7 为主,与武汉市相关研究^[11]和余欢等^[13]研究报道的中国情况一致,然而,与国外研究发现最常见克隆群为 CC1 和 CC4 有所不同,推测这可能是由区域差异、基因多样性等因素导致^[14]。既往研究表明,克罗诺杆菌的致病性与序列型及克隆复合体密切相关,特别是 CC4 和 CC7 群分离株与人类致病关联紧密,其中在 CC4 群里 ST4 型分离株数量较多,CC7 群里 ST7 型分离株占比也较大^[13]。例如,CC4 群(包括 ST4 型)属于可引发婴幼儿与新生儿脑膜炎的致病变种,在温州分离出的 ST4 菌株来源除婴儿外,还有成人感染情况,这些菌株在毒力基因方面和其他 ST 型差别不大,但都携带 *aadA27* 耐药基因;CC1(ST1)菌株同样能引起婴儿和儿童感染,都携带 *aadA27* 耐药基因。而 CC7(包含 ST7、ST201 等)主要致使儿童与成人感染^[13],而均未携带 *aadA27* 耐药基因,符合温州地区监测情况。此外,ST60 主要导致婴幼儿感染,这也与温州的情况一致。随着克罗诺杆菌全基因组测序的普及,cgMLST 分析方法的应用使得对大量相同序列型菌株进行更全面的全基因组比较分析成为可能。研究结果显示,该方法不仅有助于对克罗诺杆菌属内相同 ST 菌株

进一步细分,同时可以分析不同聚类与菌株来源之间存在一定相关性,进一步表明 cgMLST 方法在克罗诺杆菌的溯源分析中,是极为有效的分型方法之一。

本研究针对不同菌株所携带的毒力基因谱差异开展分析,结果显示,各菌株共同携带的毒力基因与张红芝等^[15]的报道高度相似,主要涉及编码鞭毛的基因,鞭毛在细菌的移动过程中发挥关键作用,其存在对克罗诺杆菌的黏附具有重要意义^[16]。其次是编码外膜蛋白的基因(*ompA*),大量研究表明,外膜蛋白 A 与阪崎克罗诺杆菌的毒力紧密相关^[17],能够促使克罗诺杆菌在脑膜炎发作前更易通过血脑屏障。MOHAN 和 VENKITANA^[18]通过克罗诺杆菌感染人肠上皮细胞实验发现,*ompA* 基因突变株的侵袭能力显著低于 *ompA* 基因回复株。HOLÝ 等^[19]研究报道,临床分离的克罗诺杆菌菌株均携带 *ompA* 和 *fliC* 基因,进一步证实了这两类致病因子的重要性。此外,大部分菌株携带 *clpB* *fur* 基因,有可能参与蛋白质去聚集过程和铁离子吸收相关功能,因为铁作为细菌生长所必需的基本微量元素之一,在细菌致病机制中扮演着重要角色,细菌获取铁的能力是其进入宿主体并引发感染的先决条件。

全基因组测序的耐药基因比对分析显示,共筛选出 15 个耐药基因,主要介导氨基糖苷类、氟喹诺酮类、磷霉素类、头孢菌素类、青霉素类、多肽抗生素类等抗生素耐药基因,而耐药机制类型主要包括外排泵、抗生素灭活和抗生素靶点改变。经分析,所有菌株均携带有 11 个共有耐药基因,但是各菌株主要存在 4 个基因(*aadA27*、*mcr-6*、*mcr-9*、*lnuA*)的差异性,有 10 株阪崎克罗诺杆菌携带了 *aadA27* 氨基糖苷类抗生素耐药基因,说明今后要重点关注这类耐药基因引起的耐药情况。还有 6 株克罗诺杆菌携带多黏菌素耐药基因 *mcr-6*,该基因是目前已知多黏菌素耐药基因家族中传播范围最小的成员,同时还有另外 7 株克罗诺杆菌携带多黏菌素耐药基因 *mcr-9*,此基因属于多黏菌素耐药基因家族,该基因最早于 2015 年从肠炎沙门菌中分离得到^[20],随后在中国、瑞士和法国也相继鉴定出该基因^[21-22]。因此,迫切需要进一步开展监测,以明确 *mcr-6* 和 *mcr-9* 基因的流行与传播情况。

鉴于此,我们必须强化对克罗诺杆菌感染病例的监测,深入探究克罗诺杆菌病的流行病学特征,进一步阐明该菌的致病机制。这些工作将有助于制定和实施克罗诺杆菌感染的应对方案,确保在疾病暴发时,相关研究成果能迅速应用于克罗诺杆菌属菌株的精准溯源分析,进而实现高效监管与防

控,有效降低由克罗诺杆菌引起的食源性疾病暴发风险。

参考文献

- [1] 甘辛,李凤琴. 克罗诺杆菌属致病性研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(6): 663-667.
GAN X, LI F Q. Advances in the study of pathogenicity of Cronobacter[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2018, 30(6): 663-667.
- [2] 徐建国. 现场细菌学[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 251-258.
XU J G. Site Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2011: 251-258.
- [3] 柳增善. 食品病原微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 98-108.
LIU Z S. Food pathogenic microbiology[M]. Beijing: Science Press, 2015.
- [4] 蒋原,祝长青,徐幸莲,等. 主译. 美国FDA食品微生物检验指南(第八版)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2020: 383-396.
JIANG Y, ZHU C Q, XU X L, et al. FDA Bacteriological Analytical Manual(8th Edition)[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2020: 383-396.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准食品微生物学检验阪崎肠杆菌检验: GB 4789.40—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
Ministry of Health of the People's Republic of China. National Food Safety Standard for Food Microbiological Inspection-Cronobacter sakazakii Inspection: GB 4789.40—2010[S]. Beijing: Standards Press of China, 2010.
- [6] 中华人民共和国国家卫生与计划生育委员会. 国家食品药品监督管理总局. 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: GB 4789.40—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. National Standard for Food Safety-Food Microbiological Inspection-Enterobacter sakazakii Inspection: GB 4789.40—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [7] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验: GB 4789.40—2024[S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.
National Health Commission of the People's Republic of China. State Administration for Market Regulation. National Standard for Food Safety-Food Microbiological Inspection: Cronobacter spp. Inspection: GB 4789.40—2024[S]. Beijing: Standards Press of China, 2024.
- [8] 闫瑞,钮冰,杨捷琳. 克罗诺杆菌分子分型及毒力机制研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(21): 243-250.
YAN R, NIU B, YANG J L. Research progress in molecular typing and virulence mechanism of Cronobacter sakazaki[J]. Food Science, 2019, 40(21): 243-250.
- [9] 张阳,李东迅,王维钧,等. 2019年北京市昌平区某医院腹泻患者阪崎克罗诺杆菌分子特征分析[J]. 上海预防医学, 2025, 37(1): 29-33.
ZHANG Y, LI D X, WANG W J, et al. Detection and molecular

- characteristics of *Cronobacter* spp. isolated from diarrhea patients at a hospital in Changping District, Beijing in 2019[J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 2025, 37(1): 29-33.
- [10] 王维钧,舒高林,彭华,等.北京市昌平区感染性腹泻标本常见病原菌谱分析[J]. *实用预防医学*, 2019, 26(10): 1274-1277.
- WANG W J, SHU G L, PENG H, et al. Spectrum Analysis of Pathogenic Bacteria in Infectious Diarrhea Specimens in Changping District, Beijing[J]. *Practical Preventive Medicine*, 2019, 26(10): 1274-1277.
- [11] 余欢,毛晓丽,费龙.武汉地区住院患者克罗诺杆菌感染及其临床分离株分子特征与耐药性研究[J]. *皖南医学院学报*, 2024, 43(4): 346-350.
- YU H, MAO X L, FEI L. *Cronobacter* infections and the molecular properties and drug resistance of the clinical isolates in hospitalized patients in Wuhan area[J]. *Journal of Wannan Medical College*, 2024, 43(4): 346-350.
- [12] PATRICK M., MAHON B., GREENE S., et al. Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003—2009[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20: 1520-1523.
- [13] 余欢,姜华,陈凯,等.基于PubMLST数据库的克罗诺杆菌全球分离株多位点序列分型分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 12(11): 1042-1047.
- YU H, JIANG H, CHEN K, et al. Multilocus sequence typing of global *Cronobacter* strains based on the PubMLST database.[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2017, 12(11): 1042-1047.
- [14] JACKSON EE, GNANOU BESSE N, BENNOU, HENNEKINNE R, et al. Lack of correlation between growth rate and sequence type among *Cronobacter sakazakii*[J]. *Food Microbiology*, 2023, 111: 104191.
- [15] 张红芝,陈雯杰,刘雪薇,等.基于全基因组测序的阪崎克罗诺杆菌婴幼儿食品分离株分子特征研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2021, 33(2): 138-143.
- ZHANG H Z, CHEN W J, LIU X W, et al. Molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* from infant foods using Whole genome Sequencing.[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2021, 33(2): 138-143.
- [16] KIM H, YU J H, BEUCHAT L. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(4): 1256-1265.
- [17] MITTAL R, WANG Y, HUNTE C J, et al. Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: a role for outer membrane protein A[J]. *Laboratory Investigation*, 2009, 89(3): 263-277.
- [18] MOHAN N M K, VENKITANA AYANAN K. Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*[J]. *Pediatric Research*, 2007, 62(6): 664-669.
- [19] HOLÝ O, CRUZ-CÓRDOVA A, XICOHTENCATL-CORTES J, et al. Occurrence of virulence factors in *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* originated from clinical samples[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019 Feb; 127(0): 250-256.
- [20] CARROLL L M, GABALLA A, GULDIMANN C, et al. Identification of novel mobilized colistin resistance gene mcr-9 in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2019, 10(3): e00853-19.
- [21] YUAN Y, LI Y, WANG G X, et al. Coproduction of MCR-9 and NDM-1 by colistin-resistant *Enterobacter hormaechei* isolated from bloodstream infection[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 2979-2985.
- [22] BORJESSON S, GREKO C, MYREN S M, et al. A link between the newly described resistance gene mcr-9 and clinical *Enterobacteriaceae* isolates carrying blaSHV-12 from horses in Sweden[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2020, 20: 285-289.