文章编号: 2095-9982(2017)07-0612-05

中图分类号: R155.5 文献标志码: A

【论著 | 调查研究】

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

乔雪飞,邱香,吴佳瑾,俞佳莉,陆晓红,孙中兴,李欣

摘要:

[目的] 了解上海市松江区婴幼儿食品中阪崎肠杆菌的污染状况、分子分型及耐药性,为婴幼儿食品安全管理和食源性疾病的预警及临床用药提供科学依据。

[方法] 2016年选择松江区3个街道和4个乡镇,共19家食品店或超市,采集婴幼儿配方奶粉(包括乳基、豆基)婴幼儿谷类辅助食品和适用于婴幼儿的固体饮料,共124件。依据GB4789.40—2010《食品安全国家标准食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验》检验程序及荧光定量PCR方法,对所采集样品进行阪崎肠杆菌的分离培养鉴定及血清分型,并进一步进行药物敏感性试验;采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术进行分子分型。

[结果] 124件样品中:婴幼儿谷类辅食51件,检出阪崎肠杆菌11株(9株保存成功),阳性率为21.6%;婴幼儿配方奶粉53件、固体饮料20件,均未检出阪崎肠杆菌;3类食品中阪崎肠杆菌检出率的差异有统计学意义(P<0.01)。采用PCR方法验证阳性菌,符合率为100%。9株阳性菌血清分型显示3株O1群,6株O2群。药敏试验结果显示,在所测定的16种抗生素中,9株阪崎肠杆菌只对头孢唑啉中度耐药或耐药,对其他抗生素均敏感。PFGE分子分型结果显示9株阪崎肠杆菌分为5种PFGE型别,相似度范围在50%~100%;其中A型有4株,B型有2株,相似度均为100%。

[结论] 上海市松江区婴幼儿谷类辅食中阪崎肠杆菌的阳性率高于其他类婴幼儿食品。 阪崎肠杆菌对测定的抗生素(除头孢唑啉外)均敏感,其血清分型主要为O1、O2群, PFGE分型显示不同或相同品牌婴幼儿辅食中阪崎肠杆菌有同源性,可应用于阪崎肠杆菌的溯源。

关键词: 阪崎肠杆菌; 婴幼儿; 食品; 药物敏感性; 血清分型; 脉冲场凝胶电泳

引用: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. **DOI**: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.17144

Enterobacter sakazakii pollution in infant food products in Songjiang District of Shanghai in 2016 QIAO Xue-fei, QIU Xiang, WU Jia-jin, YU Jia-li, LU Xiao-hong, SUN Zhong-xing, LI Xin (Microbiology Laboratory, Shanghai Songjiang District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 201620, China). Address correspondence to LI Xin, E-mail: lixin_0607@163.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To investigate the pollution, molecular types, and drug resistance of *Enterobacter sakazakii* isolated from infant food products in Songjiang District of Shanghai, and to provide a scientific basis for baby food safety management, prevention of foodborne diseases, and clinical medication.

[Methods] All samples of infant formulas (milk-based and soy-based), cereal-based infant food supplement, and powdered infant drinks were collected from 19 supermarkets or grocery stores from 3 subdistrict and 4 villages of Songjiang District in 2016. Isolation, identification, and serotyping of *Enterobacter sakazakii* were performed according to the protocol stipulated in the *National food safety standard Food microbiological examination: Enterobacter sakazakii* (GB 4789.40-2010) and fluorescence quantitative PCR method. Antibiotic susceptibility test and pulsed-field gel electrophoresis were also carried out.

[Results] There were 124 food samples. Eleven strains of *Enterobacter sakazakii* were isolated from 51 cereal-based infant food supplement samples, in which two strains were not preserved, and the positive rate of *Enterobacter sakazakii* was 21.6%; no strains

[·]作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[[]基金项目]上海市松江区公共卫生合作项目-上海市松江地区腹泻病病原监测研究(编号:2014-12)

[[]作者简介] 乔雪飞(1984—), 男, 学士, 主管检验师; 研究方向: 病原微生物; E-mail: 18918791129@163.com

[[]通信作者]李欣, E-mail: lixin_0607@163.com

[[]作者单位]上海市松江区疾病预防控制中心微生物实验室,上海 201620

were isolated from 53 infant formulas samples and 20 powdered drinks samples; and the difference was statistically significant among the three types of baby foods (P < 0.01). The results of PCR method obtained were coincident with the above results. Of the 9 strains with positive *Enterobacter sakazakii*, serotyping results showed three strains of 01 type and six strains of 02 type. All strains were resistant or moderately resistant to cefazolin among 16 selected antibiotics, and were susceptible for other antibiotics. Pulsed-field gel electrophoresis typing results showed five groups with similarity ranged from 50% to 100%, including four strains of type A and two strains of type B whose similarities were both 100%.

[Conclusion] The positive rate of *Enterobacter sakazakii* is significantly higher in cereal-based infant food supplement than in other infant food products. All strains are susceptible to selected antibiotics except cefazolin. O1 and O2 are main serotypes. Pulsed-field gel electrophoresis typing results show *Enterobacter sakazakii* isolated from infant food products are homologous, and the method can be used for molecular typing and source tracing of *Enterobacter sakazakii*.

Keywords: Enterobacter sakazakii; infant; food; antibiotics susceptibility; serotype; pulsed-field gel electrophoresis

Citation: QIAO Xue-fei, QIU Xiang, WU Jia-jin, et al. *Enterobacter sakazakii* pollution in infant food products in Songjiang District of Shanghai in 2016[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(7): 612-616. **DOI**: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.17144

阪崎肠杆菌(Enterobacter sakazakii, ES),又称克罗诺杆菌(Cronobacter species),是一种重要的食源性条件致病菌,可引起任何年龄段的人群发病,但主要危害新生儿、婴幼儿等免疫力低下的人群,能引起严重的新生儿脑膜炎、菌血症和坏死性小肠结肠炎,并可能出现严重的神经系统后遗症,发病婴儿的死亡率达80%^[1]。目前,许多微生物学研究发现婴幼儿配方奶粉及其谷物食品是引起新生儿阪崎肠杆菌感染的主要途径。近年来,随着阪崎肠杆菌耐药性的报道不断增加,有关该菌的耐药性问题也越来越引起临床医生的重视^[2]。

本研究检测上海市松江区婴幼儿食品中阪崎肠杆菌的污染情况,了解其血清型和脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分子分型的分布及耐药情况,这不仅对疾病的预防和控制具有重要意义,而且也对临床用药治疗有指导作用,同时可以对致病菌进行溯源。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2016年每季度采集一批婴幼儿配方食品(包括乳基、豆基)、婴幼儿谷类辅助食品和适用于婴幼儿的固体饮料(清水类/开胃类/补充营养类冲剂,如小儿湿热宝、草莓酸奶溶豆、钙镁锌饮料、无水葡萄糖、菊花晶等)样品。采集样品过程中尽量采集不同品牌样本,尽量分散在各街道或乡镇采样。全年共在3个街道和4个乡镇,共19家食品店或超市采集,总计采集样品124件,其中婴幼儿配方奶粉53件,米粉面条等谷类辅食51件,适用于婴幼儿的固体饮料20件,对所有样品进行阪崎肠杆菌检测。

1.2 主要试剂和仪器

革兰氏阴性细菌鉴定卡、阪崎肠杆菌显色培养基(Biomerieux,法国),缓冲蛋白胨水、改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(上海科玛嘉微生物技术有限公司,中国),阪崎肠杆菌荧光定量PCR检测试剂(江苏硕世生物科技有限公司,中国),阪崎肠杆菌诊断血清(天津生物芯片有限公司,中国),均在有效期内使用。VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定仪(Biomerieux,法国),恒温培养箱(Memmert,德国),药敏板(上海星佰生物技术有限公司,中国),脉冲场凝胶电泳仪和凝胶成像系统(BIO·RAD,美国),恒温水浴箱(上海跃进医疗器械,中国),水浴摇床(GFL,德国),比浊仪(Biomerieux,法国),SG603TXCE生物安全柜(Baker,美国),ABI7500PCR扩增仪(ABI,美国),Techne 100 加热器(Techne,英国)等,均校准合格。

1.3 方法

1.3.2 血清分型 采用玻片凝集法确定每株菌的血清型,同时以生理盐水做对照。

1.3.3 药敏试验方法 依据美国临床与实验室标准化协会(CLSI 2012版)标准操作规定,采用微量肉汤稀释法进行测试,16种抗生素包括氨苄西林、庆大霉

素、四环素、氯霉素、复方新诺明、环丙沙星、萘啶酸、 头孢唑啉、阿莫西林克拉维酸、头孢西丁、头孢噻肟、 头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、氨苄西林舒巴坦、头 孢呋辛。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922, 为本实 验室保存。

1.3.4 脉冲场凝胶电泳实验 参照美国 PulseNet 的沙 门氏菌PFGE分子分型标准方法[4],建立本研究的 分型方法。 制备胶块。将待检菌株接种到营养琼 脂平板上,37 培养16~18h。从培养皿上刮取适量 细菌,悬浮于细胞悬浮液中,使其浓度为4.0个麦氏 单位(1.2×10°CFU/mL)。在1.5 mL Eppendorf管上标 记好样品编号,取细菌悬浊液400 μL于相应的1.5 mL Eppendorf 管中,加入20 mg/mL蛋白酶 K 10 μL混匀, 加入配制好的1%(体积分数,下同)Seakem Gold液 (含1%十二烷基硫酸钠)400 µL,混合均匀,将混合 物注入模具,室温15 min 后待凝固备用。将制备好的 胶块转移至含有20 mg/mL蛋白酶 K 25 μL的5 mL细 胞裂解液中,54 水浴摇床(170 r/min)孵育2h。弃 去裂解液,加入50 纯水10 mL,置于54 水浴摇床 (170 r/min)10 min,洗胶2次。之后加入50 TE缓冲 液 15 mL, 置于 54 的水浴摇床(170 r/min)中 15 min, 清洗4次,备用。 胶块内 DNA 酶切。用刀片将洗好 的胶块切成宽为2mm胶条,放入Xba 酶切缓冲液 中,37 水浴5 min,弃去缓冲液,加入Xba 酶切体 系,37 水浴2h。作为标记的沙门菌H9812的内切 酶与待检菌株相同。 电泳。将胶条放在胶梳上,与 1% SeaKem Gold 制成凝胶 ,进行脉冲场泳。电泳初始 脉冲时间2.16s,最终脉冲时间63.8s,电压6V/cm,角 度120°, 电泳时间17.5h, 冷凝温度14。电泳结束后 GelRed染色30min,超纯水脱色30min,成像仪内获得 图像处理和聚类分析。将实验获取的电 泳图谱用BioNumerics 6.6数据库软件进行处理,识别 图形条带;电泳图谱以Xba I 酶切的 H9812 作为统一的 标准进行校准,确定条带位置,必要时进行手工校正。

1.4 统计学分析

应用 Excel 办公软件建立数据库,采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,不同样品阪崎肠杆菌检出率采用双侧卡方检验,检验水准 α =0.05。

2 结果

2.1 不同类别婴幼儿食品阪崎肠杆菌检出情况 共采集婴幼儿食品124份,进行阪崎肠杆菌检测。 结果 53 份配方奶粉中检出 0 份,20 份固体饮料中检出 0 份,51 份米面等谷类辅食中检出 11 份,阳性率为 21.6%。经统计学检验:米面等谷类辅食与配方奶粉比较, χ^2 =17.03,P=0.00;而与固体饮料比较,计算的确切概率为 P=0.03,因此不同类型的婴幼儿食品阪崎肠杆菌阳性率差异有统计学意义。详见表 1。11 件阪崎肠杆菌阳性的婴幼儿食品详情见表 2。

表 1 2016年上海市松江区不同婴幼儿食品中阪崎肠杆菌 检出差异

	1==	1/1		
类别	采样件数	阳性件数	阳性率(%)	
配方奶粉	53	0	0.0*	
谷类辅食	51	11	21.6	
固体饮料	20	0	0.0#	

[注]*:与谷类辅食相比, χ^2 =17.03,P=0.00;#:与谷类辅食相比,确切概率法P=0.03。

表 2 2016年上海市松江区婴幼儿食品中阪崎肠杆菌检出情况

	2010 2/4/10/14/2/2000/14/1/2000 1/4/10/14/2000		
序号	名称	MPN值/100g(mL)*	采样地点
1	甲品牌营养奶米粉	2.3	A镇某超市
2	乙品牌有机营养米粉	2.3	A镇某母婴店
3	丙品牌滋养 BABY 营养水果面	2.3	D城某购物中心
4	丁品牌营养奶米粉	2.3	B镇某母婴店
5	丁品牌小米胚芽 DHA 胡萝卜蔬菜营养配方米粉	2.3	B镇某母婴店
6	戊品牌金装粒粒面 - 鳕鱼胡萝卜面	2.3	B镇某超市
7	己品牌益生菌水果米粉	2.3	B镇某购物中心
8	庚品牌钙铁锌营养奶米粉	0.9	C镇某购物中心
9	辛品牌水果速溶米粉	2.3	C镇某母婴店
10	壬品牌乐护乳清蛋白营养米粉	24.0	D城某超市
11	壬品牌钙铁锌营养米粉	24.0	D城某超市

[注]*:每100g(mL)检样中阪崎肠杆菌最大可能数。

2.2 PCR 验证结果

常规方法分离培养后,挑取疑似菌落纯分培养后,配制成0.5麦氏单位(1.5×10°CFU/mL)的菌悬液,经VITEK2Compact全自动微生物鉴定系统鉴定,11份样品中检出阪崎肠杆菌,可信度均为99.9%。提取阳性菌落DNA,进行PCR检测,结果显示也均为阳性。PCR验证结果符合率为100%。

2.3 阪崎肠杆菌血清分型结果

在11份样品中检出阪崎肠杆菌,分别保菌,依次命名为ES1~ES11,其中ES1和ES2未保存成功,最终对保存的9株阪崎肠杆菌(ES3~ES11)进行试验。根据O抗原,阪崎肠杆菌可分为7个血清型,本试验血清分型结果显示主要为O1和O2群,其中ES3、ES4、

ES7 菌 株 为 O1 群 , ES5、ES6、ES8、ES9、ES10、ES11 号菌株为 O2 群。

2.4 药敏结果

依据说明书判定结果,在所测定的16种抗生素中,9株阪崎肠杆菌对头孢唑啉不敏感,有6株菌耐药(66.7%),3株中度耐药(33.3%);对其余15种抗生素均敏感。

2.5 PFGE 分子分型结果

从婴幼儿谷类辅食中分离出9株阪崎肠杆菌,进行Xba I酶切的PFGE分子分型结果显示,菌株DNA条带为11~16条,酶切条带片段大小范围为20.5~1135kb,运用BioNumerics 6.6分析软件对图谱进行聚类分析,相似度范围在50%~100%,小于90%的定为不同的型别,大于90%而小于100%的为不同的亚型,等于100%的不同菌株为同一亚型。9株阪崎肠杆菌可分为5种PFGE型别:A型有4株,相似度为100%,属于同一PFGE型别;B型有2株,相似度为100%,属于另一PFGE型别;其他菌株为C、D、E不同PFGE型别。PFGE分子型和血清分型结果显示,相同PFGE分子型别的菌株,血清型也相同,见图1。

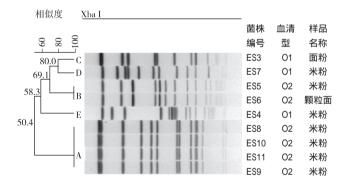


图1 9株阪崎肠杆菌 PFGE 分子分型聚类分析树状图

3 讨论

阪崎肠杆菌存在于人和动物肠道内的正常菌群中,在一定条件下可引起人和动物致病,1980年由黄色阴沟杆菌更名为阪崎肠杆菌^[5],2008年第31届国际食品卫生法典委员会又将其更名为克罗诺杆菌,2012年Joseph等^[6]证实克罗诺杆菌属包括阪崎克罗诺杆菌等7个种。2002年美国食源性疾病主动监测网络估计,小于1岁的婴儿克罗诺杆菌病的年发病率为1/10万,低出生体重儿的年发病率为8.7/10万,虽然其发病率低,但症状严重且病死率高,因此国际上对克罗诺杆菌病也越来越重视^[7]。2004年联合国粮农组

织/世界卫生组织在制定婴幼儿配方奶粉标准时,经过风险性评估,将阪崎肠杆菌与沙门氏菌列为婴幼儿配方奶粉的A类致病菌。

本研究主要在婴幼儿米面等谷类辅食中检出阪 崎肠杆菌,阳性率达21.6%,而配方奶粉和固体饮料 中未检出,与相关报道一致^[8],统计分析显示,不同 类型的婴幼儿食品阪崎肠杆菌阳性率差异有统计学 意义。但另有文献报道国内北京、天津、广东、河南、 泰安等地在配方奶粉中检出阪崎肠杆菌^[9-11],这可能 由于不同地区采样的品牌、采样量不同,以及配方奶 粉中阪崎肠杆菌阳性率比较低等因素所致。

本研究先用微生物培养方法检出11株阪崎肠杆 菌,再用PCR方法从基因水平进行验证,结果全部符 合,说明平板分离生化实验与PCR方法都是一致的, 在时间紧迫的情况下,可以用PCR代替生化实验。另 外, 阪崎肠杆菌根据O抗原分为7个血清型, 本研究 9株阪崎肠杆菌O抗原血清分型结果为3株O1型和6 株 O2 型 ,另有文献报道检出 O4、O6、O7 血清型[10-12], 提示松江区可能只有 O1 和 O2 血清型分布。另外,本 研究所测定的16种抗生素中,9株阪崎肠杆菌对其 中15种抗生素均敏感,只对头孢唑啉不敏感,其中有 6株菌耐药(66.7%),3株中度耐药(33.3%),敏感率 为 0.0% , 而张西萌等[13]研究显示阪崎肠杆菌对头孢 唑啉耐药率仅3%,中度耐药率为25%,敏感率高达 74%,提示阪崎肠杆菌对头孢唑啉的敏感度明显降低, 趋于耐药。此外,有文献报道,阪崎肠杆菌对苯唑西 林、头孢噻吩、青霉素、万古霉素等耐药,显示阪崎 肠杆菌的耐药性有逐渐扩大的趋势[13-14]。

通过PFGE进行分子分型,9株阪崎肠杆菌可分为5种型别,A型有4株,相似度为100%,B型有2株,相似度为100%,分别属于同一PFGE型别,提示上海市松江区相同及不同品牌和产品类型的婴幼儿谷物食品中阪崎肠杆菌PFGE型别呈现高度同源性。刘桂华等[15]在婴幼儿食品中检出41株阪崎肠杆菌,PFGE分为19个型别,100%相似度的有4个型别,其中一个型别有9株菌同源。Fei等[12]的研究中67株阪崎肠杆菌分为38个PFGE型,1型同源占14%,2型同源占14%,3型同源占10%,而且PFGE型别相同,序列也完全相同。这些也说明婴幼儿食品中检出阪崎肠杆菌型别高度一致,而相似度高达100%的菌株,说明分子型别完全一致,可以认为是同一流行株。本研究显示PFGE分子分型相同的菌株,如ESS、ES6和ES8、

ES9、ES10、ES11,其血清型也完全相同,且都聚集在 O2 群血清型,提示分子分型相同的菌株其血清型也可能相同。

另外本研究还显示PFGE分子分型相同的菌株,其耐药性也相同,但也有文献报道在研究PFGE分型结果与耐药谱之间的关系发现,聚为一类的相似度极高的菌株有相同的耐药谱,也有极高的相似度但分别有不同的耐药谱^[9],说明阪崎肠杆菌耐药性与PFGE分型高度相关,但仍必须依赖于耐药基因等其他检测方法才能客观科学地分析阪崎肠杆菌的耐药性。

阪崎肠杆菌是近年来被广泛关注的细菌,掌握其在婴幼儿食品中的污染情况及其耐药情况,可以加强对婴幼儿食品安全的管理,也可以为临床用药提供科学依据,同时PFGE分子分型可应用于阪崎肠杆菌污染的溯源,具有重要的公共卫生学意义。

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 Appl Microbiol , 2012 , 113 (1): 1-15.
- [2] 裴晓燕,刘秀梅. 阪崎肠杆菌的生物学性状与健康危害[J]. 中国食品卫生杂志,2004,16(6):550-555.
- [3]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.
- [4]Centers for Disease Control and Prevention. Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed field gel electrophoresis(PFGE)[EB/OL]. (2009-06-17)[2017-02-01]. https://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf.
- [5]Farmer JJ III , Asbury MA , Hickman FW , et al. *Enterobacter* sakazakii: a new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens [J]. Int J Syst Bacteriol , 1980 , 30

(3):569-584.

- [6] Joseph S , Sonbol H , Hariri S , et al. Diversity of the cronobacter genus as revealed by multilocus sequence typing [J]. J Clin Microbiol ,2012 ,50(9): 3031-3039.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cronobacter species isolation in two infants-New Mexico, 2008 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep , 2009 , 58 (42): 1179-1183.
- [9]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.
- [10]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.
- [11]Xu X ,Wu Q ,Zhang J ,et al. Occurrence and characterization of *Cronobacter* spp. in powdered formula from Chinese retail markets[J]. Foodborne Pathog Dis ,2014 ,11(4): 307-312.
- [12] Fei P , Man C , Lou 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]. Appl Environ Microbiol ,2015 ,81(16): 5430-5439.
- [13]张西萌,曾静,魏海燕,等.进口乳制品中克罗诺阪崎肠杆菌分离株耐药性研究[J].中国食品卫生杂志,2013,25(4):320-323.
- [14]李秀娟,李丽婕,田会方,等.食品及环境分离的阪崎肠杆菌药敏分析[J].预防医学情报杂志,2010,26(8): 678-680.
- [15]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.

(收稿日期: 2017-02-09; 录用日期: 2017-06-07) (英文编辑: 汪源; 编辑: 陈姣; 校对: 丁瑾瑜)