

文章编号:1000-8551(2020)10-2290-09

贵州省售婴儿配方乳粉中克罗诺杆菌的污染情况及特征分析

陈曦 黄道梅* 孟繁博 郑秀艳 李国林

(贵州省农业科学院现代农业发展研究所,贵州 贵阳 550006)

摘要:为揭示贵州省市售婴儿配方乳粉(PIF)中克罗诺杆菌的污染情况及种群特征,本研究以350份PIF样品为研究对象,对PIF中的克罗诺杆菌进行分离鉴定;利用API 20E生化鉴定法、16S rRNA测序法和多位点序列分型(MLST)法对分离株进行生化表型分型和基因分型,最后利用Kirby-Bauer纸片扩散法进行菌株的耐药性分析。结果表明,350份样品中共分离出21株克罗诺杆菌,污染率为6%。21株克罗诺杆菌被分为6个生化表型,3个类群和11个序列型,其中ST193和ST157为分离自贵州省市售PIF的克罗诺杆菌的优势序列型。耐药性分析结果表明,21株克罗诺杆菌对四环素和万古霉素具有高度的耐药性,而对氨苄西林、庆大霉素和氯霉素较为敏感。本研究结果为贵州省市售PIF中克罗诺杆菌的防控提供了理论依据。

关键词:婴儿配方乳粉;克罗诺杆菌;分离鉴定;分型;耐药性

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.10.2290

克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.)是包含了熟知的阪崎克罗诺杆菌的一个新属,是一种极具污染风险的食源性致病菌,可使新生儿感染坏死性小肠结肠炎、菌血症、脑膜炎等多种疾病,且死亡率极高^[1-2]。克罗诺杆菌属分布较为广泛,近些年在五香肉、脱水米粉、调味品、生蔬、即食食品、婴儿食品中均发现克罗诺杆菌的存在,其中婴儿配方乳粉(powdered infant formula, PIF)已经被证实是该致病菌的主要污染源及传播媒介,严重威胁新生儿和婴儿的健康^[3-5]。因此,对市售PIF中克罗诺杆菌的污染情况和特征进行分析十分必要。

对分离自市售PIF的克罗诺杆菌进行生化表型分型和基因分型有助于揭示上述来源的克罗诺杆菌的污染情况和种群特征^[6]。张丽丽^[7]采用生理生化和分子生物学鉴定的方法对市售PIF进行了克罗诺杆菌的分离与鉴定,发现其污染率达到4.55%。Pan等^[8]对我国市场中的PIF和较大婴儿的配方乳粉进行克罗诺杆菌污染情况调查,污染率为10.2%,分离得到的49

株克罗诺杆菌被分为了11个序列型(sequence type, ST)。此外,有研究者对分离自我国东北和中原地区市售PIF中的克罗诺杆菌进行了分型分析,发现分离自上述来源的克罗诺杆菌主要为阪崎克罗诺杆菌,其中优势的序列型为ST1、ST4和ST64^[9]。上述研究在一定程度上揭示了我国克罗诺杆菌的种群特征,但有关贵州省市售PIF中克罗诺杆菌的污染情况及种群特征的研究尚鲜见报道。

抗生素的使用被认为是治疗克罗诺杆菌感染最常见的方法。研究表明,链霉素、庆大霉素、卡那霉素以及环丙沙星对阪崎克罗诺杆菌均有明显的抗应激作用,上述抗生素被认为是治疗克罗诺杆菌感染的首选^[10-11]。但是,长期使用抗生素或使用不当很有可能提高克罗诺杆菌对抗生素的耐受能力,甚至出现多重耐药性菌株^[12-13]。Kim等^[14]从食品中分离得到的克罗诺杆菌对头孢洛林和氨苄西林具有耐药性。Fei等^[9]发现与以往研究相比,分离自中国市售PIF中的

收稿日期:2020-01-03 接受日期:2020-04-15

基金项目:贵州省特色农产品辐照保鲜技术服务企业行动计划(黔科合平台人才[2016]5712),贵州省特色农产品辐照保鲜与加工工程技术研究中心(2016GZ67305)

作者简介:陈曦,女,助理研究员,主要从事农产品加工与贮藏研究。E-mail:13845128564@163.com

* **通讯作者:**黄道梅,女,助理研究员,主要从事农产品加工与贮藏研究。E-mail:huangdaomei915@163.com

克罗诺杆菌对氯霉素和庆大霉素的耐药性有所增加。此外,已有学者从食品样品中分离出了对头孢噻吩、苯唑西林、青霉素、万古霉素具有抗性的克罗诺杆菌,说明目前克罗诺杆菌耐药性有增加的趋势^[15-16]。因此,对食品尤其是婴儿食品中克罗诺杆菌的耐药性进行实时监测非常有必要。

本研究以贵州省市售的 350 份 PIF 样品为研究对象,采用国标法和 16S rRNA 基因测序法对其进行克罗诺杆菌的分离鉴定,并通过分离株的生化表型分型、基因分型和抗生素耐药性分析揭示分离自贵州省市售 PIF 中克罗诺杆菌的特征,旨在为贵州省市售 PIF 中克罗诺杆菌的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

PIF 来源:350 份 PIF 样品于 2018 年 1 月至 2019 年 1 月采集于贵州省各地区超市,其中覆盖了 5 种品牌的 PIF,分别标记为 A、B、C、D 和 E,每种品牌采集 70 份样品。

主要试剂:克罗诺杆菌标准菌株 *C. sakazakii* ATCC 29544^T 和 *Escherichia coli* ATCC 25922 中国检科院食品安全微生物菌种保藏管理中心;营养琼脂(nutrient agar)、营养肉汤(nutritious broth)、缓冲蛋白胨水(buffer peptone water)、改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(modified lauryl sulfate tryptone broth-vancomycin)、胰蛋白胨大豆琼脂(tryptone soybean agar)、克罗诺杆菌显色培养基(chromogenic medium of cronobacter),青岛海博生物有限公司;API 20E 生化鉴定试剂盒及辅助试剂,法国生物梅里埃公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、2×Taq Master Mix,美国 Omega 公司;药敏试纸,上海金穗生物科技有限公司;8 种抗生素,西宝生物科技(上海)股份有限公司。

1.2 主要仪器

DNP-250 型大容量恒温培养箱,常州菲普实验仪器厂;SJ-CJ-1FD 超净工作台,苏州艾达康医疗科技有限公司;Sartorius Sigma 2-16KL 高速冷冻离心机,德国赛多利斯 Sartorius 集团;伯乐 T100 梯度 PCR 仪,济南来宝医疗器械有限公司;Tanon 3500 凝胶图像分析系统,德国耶拿仪器股份公司。

1.3 试验方法

1.3.1 克罗诺杆菌的分离鉴定 以《GB 4789.40-2016 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》^[17]的方法为金标准,对 PIF

样品中的克罗诺杆菌进行分离鉴定;随后再对分离的菌株进行基于 16S rRNA 的分子鉴定。

1.3.2 API 20E 表型分型 参照 Nazarowec-white 等^[18]的报道采用 API 20E 的方法对克罗诺杆菌进行生化分型,以 *C. sakazakii* ATCC 29544^T 的表型特征定义为生物表型 1,其余分离菌株与其反应模式比较,删除相同的生化反应,保留具有差异的生化反应项目,把每种区别于生物表型 1 的生化特征定义为另外一种新的生物表型,从而确定克罗诺杆菌的表型分型结果。

1.3.3 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分析 参照 Baldwin 等^[19]的报道,由北京赛百盛基因技术有限公司完成引物(*atpD*、*fusA*、*glnS*、*gltB*、*gyrB*、*infB* 和 *ppsA*)的合成。以克罗诺杆菌 DNA 为模板,PCR 反应体系(50 μL):模板 DNA 2.0 μL、2×buffer 25 μL、上下游引物各 2 μL、ddH₂O 19 μL。扩增条件参照 Baldwin 等^[19]的报道。利用 1%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行验证,并完成基因测序。将测序获得的持家基因序列在克罗诺杆菌 MLST 数据库(<http://pubmlst.org/cronobacter/>)中进行比对,获得克罗诺杆菌的等位基因编码,根据对应的等位基因编码最终确定分离菌株的序列型。

1.3.4 分子分型及系统发育树的构建 从 GenBank 中下载克罗诺菌属及肠杆菌属的相关菌种标准菌株的 16S rRNA 序列作为参考序列,同测序获得的分离菌株的 16S rRNA 序列共同进行系统发育分析。之后,将菌株 7 个持家基因序列串联得到长度为 3 036 bp 的基因序列进行系统发育分析。利用 Mega 6.0 软件,选择最大似然算法进行系统发育分析,同时查找并下载克罗诺杆菌属 7 个种标准菌株所对应的串联序列,将其作为参考菌株序列,构建最小似然系统发育树^[20]。

1.3.5 克罗诺杆菌的耐药性分析 选取八类常见的 8 种抗生素,分别为庆大霉素、磺胺、头孢噻肟、万古霉素、氨苄西林、环丙沙星、四环素、氯霉素,以 *Escherichia coli* ATCC 25922 作为质控菌株,利用 Kirby-Bauer 纸片扩散试验法分析克罗诺杆菌对上述抗生素的耐药性^[21]。将菌悬液稀释为 0.5(以麦克法兰标准计),按照药敏纸片的说明书进行试验,根据抗菌药物敏感性试验执行标准(CLSI-M100-S19)^[22]对结果进行判读。

2 结果与分析

2.1 克罗诺杆菌的污染情况

以国标的检测结果为金标准,利用 16S rRNA 基因

测序进行基因层面的鉴定,结果如表 1 所示。鉴定结果均表明 22 株可疑菌株除 S4 为阴沟肠杆菌,其余菌株均鉴定为克罗诺杆菌,贵州省市售 PIF 中克罗诺杆菌的检出率为 6%。此外,16S rRNA 基因测序结果显示以 99% 为阈值,21 株克罗诺杆菌中有 18 株为阪崎克罗诺杆菌,

另外 3 株克罗诺杆菌与阪崎克罗诺杆菌和丙二酸盐克罗诺杆菌的相似性均高达 98% 以上。进一步分析不同品牌 PIF 中克罗诺杆菌的污染情况,结果如图 1 所示,5 种不同品牌 PIF 中,C 品牌的污染率最高,为 8.57%,A 品牌的污染率最低,为 4.28%。

表 1 API 20E 及 16S rRNA 鉴定结果
Table 1 API 20E and 16S rRNA appraisal results

菌株 Strain	菌株来源 Strain source	API 20E 鉴定结果 Results of the API 20E identification				16S rRNA 鉴定结果 16S rRNA identification results
		菌株鉴定 Identification of strain	表型特征 Phenotypic characteristic	鉴定相似度 Identificati milarity/%	T 值 T value	
ATCC 29544 ^T		克罗诺杆菌 <i>Cronobacter</i>	3305373	98.4	1.00	阪崎克罗诺杆菌 <i>C. sakazakii</i>
J1	A 品牌	<i>Cronobacter</i>	3305373	98.4	1.00	<i>C. sakazakii</i>
J2		<i>Cronobacter</i>	3304373	97.3	0.84	<i>C. sakazakii</i>
J3		<i>Cronobacter</i>	3304373	97.3	0.84	<i>C. sakazakii</i>
X1	B 品牌	<i>Cronobacter</i>	3304373	97.3	0.84	<i>C. sakazakii</i>
X2		<i>Cronobacter</i>	3305373	98.4	1.00	<i>C. sakazakii</i>
S1		<i>Cronobacter</i>	3304373	97.3	0.84	<i>C. sakazakii</i>
S2		<i>Cronobacter</i>	3305773	40.5	0.82	<i>C. sakazakii</i>
S3	C 品牌	<i>Cronobacter</i>	3305173	51.2	0.92	阪崎克罗诺杆菌或丙二酸盐克罗诺杆菌 <i>C. sakazakii</i> 或 <i>C. malonaticus</i>
W1		<i>Cronobacter</i>	3305373	98.4	1.00	<i>C. sakazakii</i>
W2		<i>Cronobacter</i>	3315373	60.3	0.60	<i>C. sakazakii</i> 或 <i>C. malonaticus</i>
Z1		<i>Cronobacter</i>	3305373	98.4	1.00	<i>C. sakazakii</i>
Z2		<i>Cronobacter</i>	3205373	98.4	0.84	<i>C. sakazakii</i>
S4		<i>E. cloacae</i>	3305573	95.2	1.00	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>
H1		<i>Cronobacter</i>	3305373	98.4	1.00	<i>C. sakazakii</i>
W3	D 品牌	<i>Cronobacter</i>	3305773	40.5	0.82	<i>C. sakazakii</i>
X4		<i>Cronobacter</i>	3305373	98.4	1.00	<i>C. sakazakii</i>
X5		<i>Cronobacter</i>	3205373	98.4	0.84	<i>C. sakazakii</i> 或 <i>C. malonaticus</i>
X6		<i>Cronobacter</i>	3205373	98.4	0.84	<i>C. sakazakii</i>
T1	E 品牌	<i>Cronobacter</i>	3305373	98.4	1.00	<i>C. sakazakii</i>
T2		<i>Cronobacter</i>	3304373	97.3	0.84	<i>C. sakazakii</i>
D1		<i>Cronobacter</i>	3305373	98.4	1.00	<i>C. sakazakii</i>
M1		<i>Cronobacter</i>	3205373	98.4	0.84	<i>C. sakazakii</i>

2.2 克罗诺杆菌的表型分型

利用 API 20E 生化鉴定的菌株共计 22 株(包括 *C. sakazakii* ATCC 29544^T),菌株 S4 鉴定结果为阴沟肠杆菌,故不参与表型分型分析。API 20E 生化试验结果显示(表 2),分离菌株在利用 21 项生化反应进行鉴定时,仅对精氨酸、鸟氨酸、脲酶、肌醇、山梨醇 5 种

反应底物以及 VP 试验的结果呈现差异。按照 Nazarowec-white 的表型分型方法对克罗诺杆菌进行表型分型,结果表明,22 株克罗诺杆菌分为 6 种生物表型,其中生物表型 1 所占权重最高(占 45.4%),是分离菌株的主要表型。

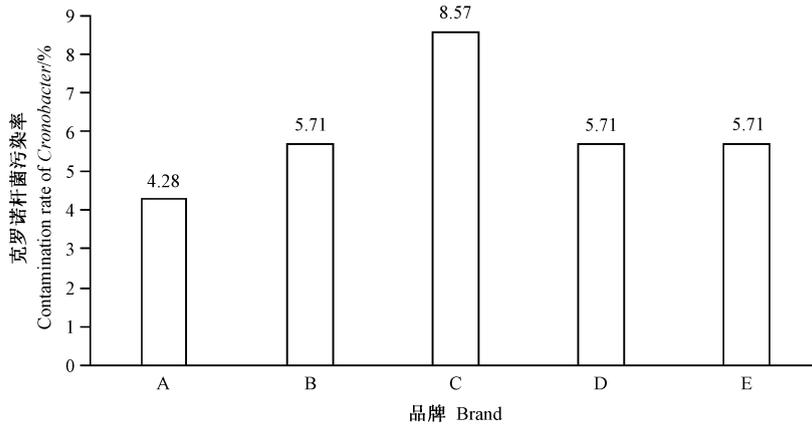


图 1 不同品牌 PIF 中克罗诺杆菌的污染率

Fig.1 Contamination rates of *Cronobacter* spp. in different brands of PIF

表 2 克罗诺杆菌表型分型结果

Table 2 Results of phenotypic typing of *Cronobacter* spp.

同化底物 Assimilation substrate	表型 1 Phenotype 1	表型 2 Phenotype 2	表型 3 Phenotype 3	表型 4 Phenotype 4	表型 5 Phenotype 5	表型 6 Phenotype 6
精氨酸 Arginine	+	+	+	+	+	+
鸟氨酸 Ornithin	+	+	+	+	+	-
脲酶 Urease	-	-	-	+	-	-
肌醇 Inositol	+	+	-	+	+	+
VP 试验 Voges-prokauer test	+	+	+	+	-	+
山梨醇 Sorbitol	-	+	-	-	-	-
数量 Number	10	3	1	1	3	4
比例 Ratio/%	45.4	13.6	4.5	4.5	13.6	18.1

注：“+”表示反应为阳性；“-”表示反应为阴性。

Note: ‘+’ means positive. ‘-’ means negative.

2.3 克罗诺杆菌的分子分型

2.3.1 16S rRNA 分型 利用 MEGA 6.0 软件对菌株的 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析,结果如图 2 所示,所有菌株分成两个类群,21 株分离菌株与克罗诺杆菌标准菌株位于同一类群 Group I,亲缘关系较近,而与菌株 S4 所在的阴沟肠杆菌 Group II 的亲缘关系较远,这与 16S rRNA 测定鉴定的结果一致。其中 21 株分离菌株进一步分为 3 个类群,所在同一类群的菌株系统发育关系较近。

2.3.2 MLST 分析 利用 MLST 技术确定菌株的序列型,结果如表 3 所示,21 株克罗诺杆菌分为 11 个序列型,分别为 ST193(7 株)、ST157(3 株)、ST189(2 株)、

ST208(2 株)、ST37(1 株)、ST212(1 株)、ST336(1 株)、丙二酸盐克罗诺杆菌)、ST4(1 株)、ST142(1 株)、ST17(1 株)和 ST23(1 株),表明分离自贵州省市售 PIF 的克罗诺杆菌具有较高的遗传多样性。其中,ST193 和 ST157 的克罗诺杆菌菌株数量分别占总菌株数的 33.3%和 14.3%,为该地区市售 PIF 中克罗诺杆菌的优势序列型。

在此基础上对上述菌株进行系统发育分析,结果如图 3 所示,所有菌株分为两大类群,除菌株 S3 外,20 株分离菌株与阪崎克罗诺杆菌标准菌株同位于 Group I,同时 Group I 进一步划分为 3 个簇,归属同一簇中的菌株遗传信息相似,亲缘关系较近。Group II 包括 2

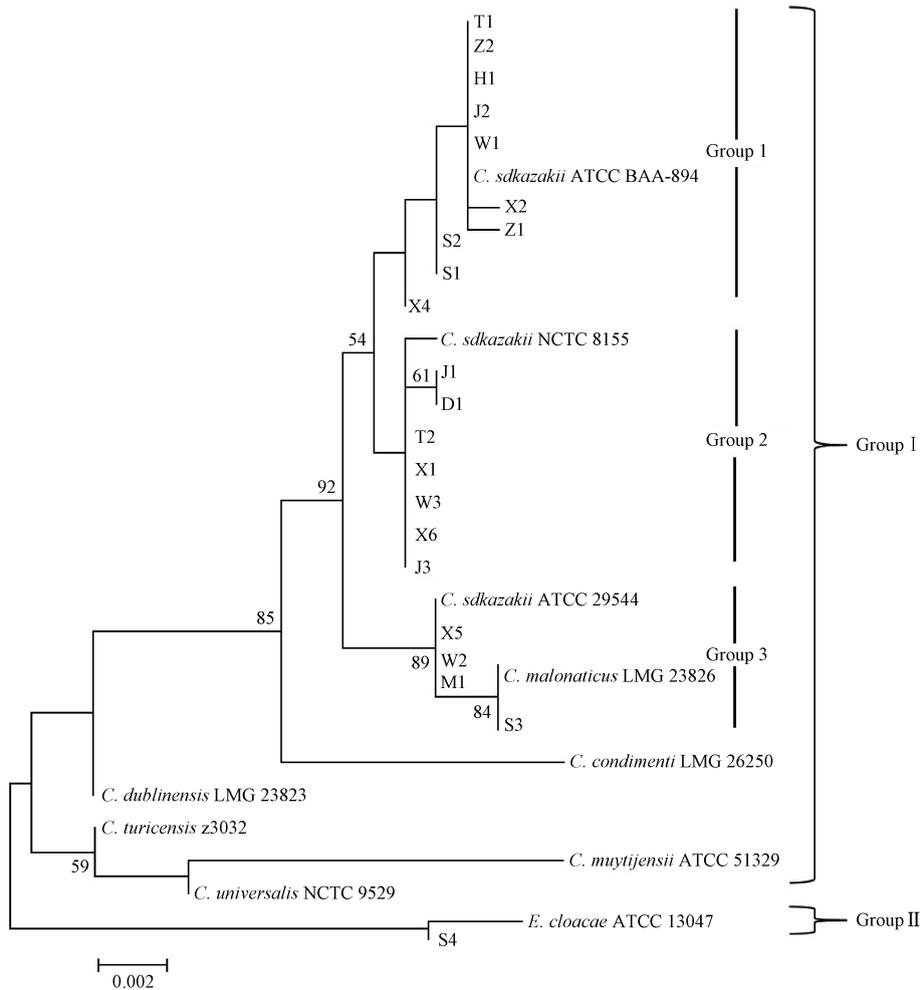


图2 基于16S rRNA序列的最小似然系统发育树

Fig.2 Minimum likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences

个簇,其中菌株S3与*C. malonaticus* LMG 23826同位于Group II 1,从而进一步将菌株S3归属于丙二酸盐阳性克罗诺杆菌物种。此外,根据系统发育结果可知,分离株的亲缘关系与其来源(不同品牌)无明显内在联系。

2.4 克罗诺杆菌的耐药性分析

由表4可知,21株克罗诺杆菌对四环素和万古霉素耐药性较高,分别为80.1%和90.5%;而对氨苄西林、庆大霉素和氯霉素最为敏感,敏感率均达到95.2%,其次为环丙沙星(76.2%)、头孢噻肟(71.4%)和磺胺(66.7%)。

3 讨论

克罗诺杆菌是PIF中的A类致病菌,严重危害着新生儿的健康,因此,对该致病菌的检测一直是研究重点。O'Brien等^[23]调查了欧洲的PIF和婴儿饮

品克罗诺杆菌的污染情况,发现PIF中该致病菌的污染率为0,主要的污染存在于以谷物为主的婴儿饮品中。Santos等^[24]从42个来自巴西的PIF样品中分离出12株克罗诺杆菌,污染率高达29%。Fatimah等^[25]则发现埃及境内PIF中克罗诺杆菌的污染率为5.2%。Fei等^[9, 26]于2015年和2018年对我国市售PIF进行了克罗诺杆菌检测,污染率分别为3.5%和2.8%。本研究中,贵州省市售PIF中克罗诺杆菌的总污染率为6%,对婴幼儿的健康存在潜在的危害,应给予一定的重视。此外,在5种品牌中,C品牌的污染率最高,为8.57%,A品牌的污染率最低,为4.28%。此外,ST193是A、C和D品牌中克罗诺杆菌的优势序列型,在B品牌中未被发现,而ST189是B品牌中克罗诺杆菌的优势序列型。

对PIF中克罗诺杆菌进行生化表型分型和遗传多样性分析有助于了解该种群,以便制定针对性的防控措施^[24]。API 20E生化鉴定是基于20种生化反

表 3 克罗诺杆菌 MLST 分析结果

Table 3 Results of MLST analysis of *Cronobacter* spp.

菌株编号 Strain number	等位基因 Allele							序列型 Sequence type
	<i>atpD</i>	<i>fusA</i>	<i>glnS</i>	<i>gltB</i>	<i>gyrB</i>	<i>infB</i>	<i>ppsA</i>	
J1	44	15	3	5	5	38	59	37
J2	5	8	13	40	15	15	10	193
J3	5	8	13	40	15	15	10	193
X1	20	8	15	96	90	89	105	157
X2	80	77	90	101	2	20	132	212
S1	3	37	13	1	95	63	122	189
S2	3	37	13	1	95	63	122	189
S3	10	7	6	7	148	147	71	336
W1	5	1	3	3	5	5	4	4
W2	20	8	15	96	90	89	105	157
Z1	5	8	13	40	15	15	10	193
Z2	5	8	13	40	15	15	10	193
H1	3	36	74	97	86	66	107	142
W3	20	8	15	96	90	89	105	157
X4	55	1	89	5	5	36	131	208
X5	5	8	13	40	15	15	10	193
X6	5	8	13	40	15	15	10	193
T1	55	1	89	5	5	36	131	208
T2	5	8	13	40	15	15	10	193
D1	3	12	16	5	16	20	14	17
M1	20	18	16	10	3	20	27	23

应对克罗诺杆菌进行鉴定和生化分型,这种方法存在一定的假阳性^[27]。16S rRNA 基因测序可以从基因层面对克罗诺杆菌进行鉴定,并对菌株进行基因分型,但这种方法的辨识度不高,无法将遗传相似性较高的 *C. sakazakii* 与 *C. malonaticus* 区分开^[9]。MLST 分析由于其较高的辨识度和可共享性,已被普遍应用于细菌的分子分型。利用上述 3 种方法对克罗诺杆菌进行分型可以起到互补作用,一种菌株可以同时具有 3 种型别,组合在一起可进一步区分菌种的多态性。因此,本研究选取上述 3 种方法对分离株进行生化表型和基因分型,可以得到更全面的数据,从而提高对贵州省市售 PIF 中克罗诺杆菌的认识。

本研究中,21 株克罗诺杆菌中,20 株为阪崎克罗诺杆菌,1 株为丙二酸盐克罗诺杆菌,说明分离自贵州省市售 PIF 的克罗诺杆菌的优势种为阪崎克罗诺杆菌,这与 Fei 等^[9]和 Joseph 等^[20]的报道一致。此外,将 21 株克罗诺杆菌分为 11 个序列型,其中 ST193 和 ST157 是主要的序列型。不同的是,在欧洲和新西兰等地,ST1、ST40、ST9 和 ST3 是分离自 PIF 及其加工环境中克罗诺杆菌的优势序列型^[28]。Muller 等^[29]发现 ST83 是瑞士 PIF 及生产环境中克罗诺杆菌的优势序

表 4 21 株克罗诺杆菌耐药性分析

Table 4 Antibiotic susceptibility of 21 *Cronobacter* strains

抗生素类型 Antibiotic regimen	药物名称 Drug name	敏感 Sensitive		中介 Intermediate		耐药 Resistant	
		菌株数量 Number of strains	敏感率 Antibiotic sensitive rate/%	菌株数量 Number of strains	中介率 Antibiotic intermediate rate/%	菌株数量 Number of strains	耐药率 Antibiotic resistant rate/%
氨基糖苷类 Aminoglycosides	庆大霉素 Gentamicin	20	95.2	0	0.0	1	4.8
磺胺类 Sulfonamides	磺胺 Sulfanilamide	14	66.7	2	9.5	5	23.8
头孢素类 Cephalosporins	头孢噻肟 Cefotaxime	15	71.4	3	14.3	3	14.3
糖肽类 Glycopeptides	万古霉素 Vancomycin	1	4.8	1	4.8	19	90.5
青霉素 Penicillins	氨苄西林 Ampicillin	20	95.2	1	4.8	0	0.0
氟喹诺酮类 Fluoroquinolones	环丙沙星 Ciprofloxacin	16	76.2	4	19.0	1	4.8
四环素类 Tetracyclines	四环素 Tetracycline	4	19.0	0	0.0	17	81.0
酰胺醇类 Amide alcohols	氯霉素 Chloramphenicol	20	95.2	1	4.8	1	4.8

列型。Fei 等^[9]对分离自我国东北和中原地区市售 PIF 中的克罗诺杆菌进行了分析,发现 ST1、ST4 和

ST64 为优势序列型。上述研究说明,分离自不同地区的克罗诺杆菌的优势序列型不同,这可能与 PIF 产品

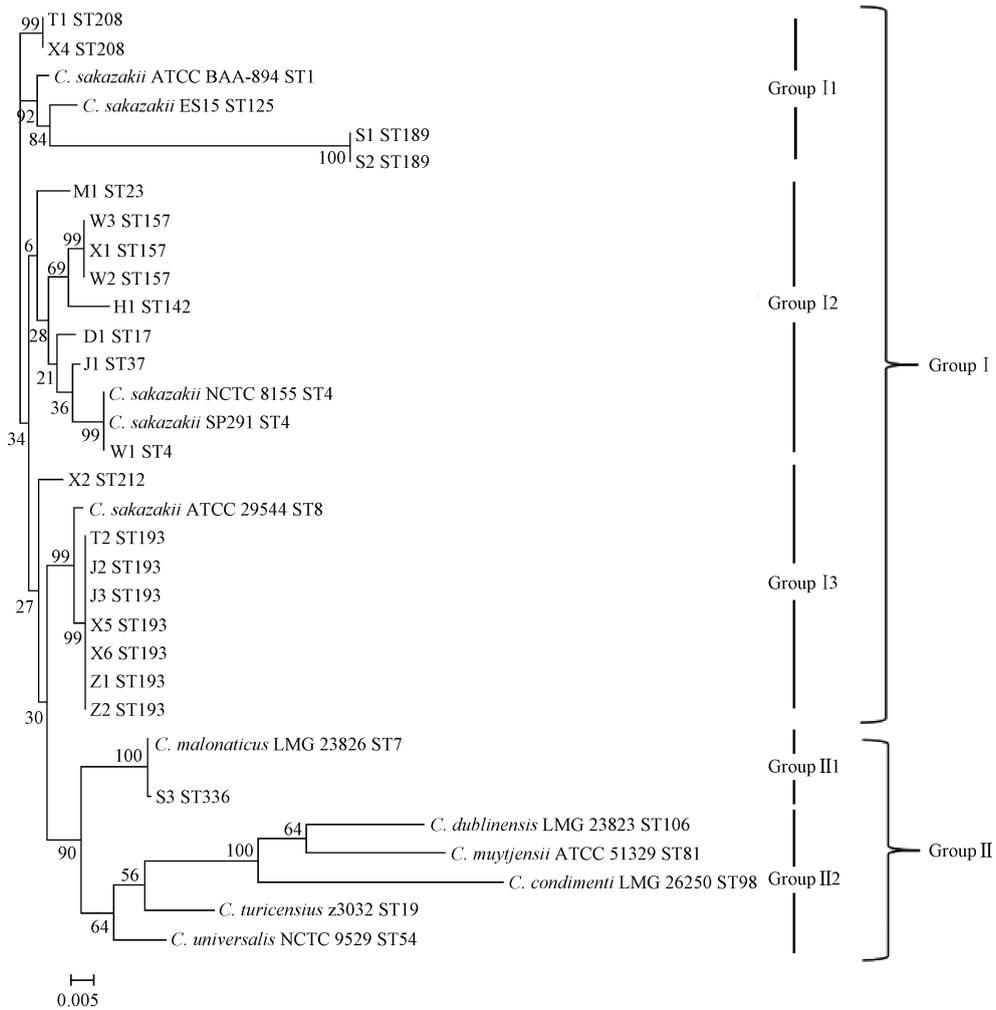


图3 7个持家基因串联序列(3 036 bp)的最小似然系统发育树

Fig.3 Maximum-likelihood tree of the spliced sequences of the 7 house keeping genes (3 036 bp)

产地或销售地的环境有关,因此有必要对特定地区PIF中的克罗诺杆菌进行遗传多样性研究,从而提供有针对性的防控依据。

研究表明,早期分离自食品的克罗诺杆菌很少受到外界抗生素的作用,其对大多数的抗生素都非常敏感,因此,抗生素被认为是最有效的治疗人体克罗诺杆菌感染的方法^[10]。但是随着抗生素的长时间使用,或者不科学的滥用,受试菌株可能会发生突变或者基因水平转移,导致耐药性增加^[27, 30]。已有研究表明,由于临床长期的使用,分离自医院临床环境中的克罗诺杆菌对环丙沙星、氨苄西林、阿卡米星、头孢他啶和亚胺培南呈现不同程度的抗生素耐药性^[31-32]。此外,由于克罗诺杆菌有较强的产生生物膜的能力,使得其能够长时间粘附在PIF生产设备表面,并起到减少抗生素对菌体破坏的作用,因此,生物膜对克罗诺杆菌的保护作用为其产生耐药性创造了条件^[33]。Fei等^[9]研究

发现,分离自我国市售PIF中的克罗诺杆菌对四环素和头孢噻肟的耐药性均为0,而在本研究中,分离自贵州省市售PIF中的克罗诺杆菌对四环素和头孢噻肟的耐药性为81.0%和14.3%,说明本研究中的受试菌株对四环素和头孢噻肟的耐受性有所提高。因此,很有必要对PIF中克罗诺杆菌耐药性进行持续的监控。

4 结论

本研究调查了贵州省市售PIF中克罗诺杆菌的污染情况,发现该地区PIF中克罗诺杆菌的总污染率为6%,对婴幼儿的健康具有潜在的威胁。利用API 20E生化鉴定系统、16S rRNA基因测序和MLST分析揭示了分离株的生化分型和基因多样性,共分离得到21株克罗诺杆菌,其中20株为阪崎克罗诺杆菌,1株为丙二酸盐克罗诺杆菌,分为6个生化表型,3个类群和11

个序列型,其中 ST193 和 ST157 为优势序列型。抗生素耐受性试验表明,分离自贵州省市售 PIF 中的克罗诺杆菌对四环素和头孢噻肟的耐受性有所提高。本研究结果有助于揭示贵州省市售 PIF 中克罗诺杆菌的污染情况和种群特征,并为该致病菌的针对性防控和治疗提供了有力的科学依据。

参考文献:

- [1] Hunter C J, Bean J F. *Cronobacter*: An emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis[J]. *Journal of Perinatology*, 2013, 33(8):581-585
- [2] Cai X Q, Yu H Q, Ruan Z X, Yang L L, Bai J S, Qiu D Y, Jian Z H, Xiao Y Q, Yang J Y, Le T H, Zhu X Q. Rapid detection and simultaneous genotyping of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula using real-time PCR and high resolution melting (HRM) analysis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67082
- [3] Hochel I, Rikov H, Krsn L. Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 112(6): 1257-1265
- [4] Joseph S, Cetinkaya E, Drahovska H. *Cronobacter* condimenti sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov. a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(6): 1277-1283
- [5] Zhang H N, Hou P B, Lv H H, Chen Y Z, Li X P, Ren Y Y, Wang M, Tan H L, Bi Z W. Surveillance and molecular typing of *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula and follow-up formula from 2011 to 2013 in Shandong Province, China[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(7):2141-2146
- [6] Fei P, Man C X, Lou B B, Forsythe S J, Chai Y L, Li R, Niu J T, Jiang Y J. 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
- [7] 张丽丽. 婴儿配方乳粉中克罗诺杆菌的分离鉴定及分型[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(12):166-168
- [8] Pan Z, Cui J A, Lyu G P, Du X L, Qin L Y, Guo Y M, Xu B H, Li W, Cui Z G, Zhao C. Isolation and molecular typing of *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula and follow-up formula[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2014, 11(6): 456-461
- [9] Fei P, Jiang Y, Jiang Y. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *cronobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula collected from Chinese retail markets[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8(2):20-26
- [10] Florence D, Isabelle P, Roland L. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(1):79-114
- [11] AL-nabulsi A A, Osaili T M, Elabedeen N A Z. Impact of environmental stress desiccation, acidity, alkalinity, heat or cold on antibiotic susceptibility of *Cronobacter sakazakii* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 146(2):137-143
- [12] Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development [J]. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 2006, 70(5):1060-1075
- [13] Memahon M A S, Xu J, Moore J E. Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(1):211-217
- [14] Kim K, Jang S S, Kim S K. Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 122(1/2):196-203
- [15] 郑金华, 张新峰, 陆娟娟, 张华宁. 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
- [16] 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
- [17] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.40-2016 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[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016
- [18] Nazarowec-White M, Farber J M. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii* [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 1999, 48(3):559-567
- [19] Baldwin A, Loughlin M, Caubilla B J. Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes [J]. *Bmc Microbiology*, 2009, 9(1):223
- [20] Joseph S, Sonbol H, Hariri S, Desai P, McClelland M, Forsythe S J. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(9):3031-3039
- [21] Fei P, Jiang Y C, Gong S Y, Li R, Jiang Y, Yuan X J, Wang Z Y, Kang H B, Ali M A. Occurrence, genotyping, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in drinking water and food samples from Northeast China [J]. *Journal of Food Protection*, 2018, 81(3):456-460
- [22] 孙长贵, 成军, 杨燕. 2009 年 CLSI M100-S19 文件主要更新内容介绍[J]. *浙江检验医学*, 2009(2):8-10
- [23] O'Brien S, Healy B, Negrodo C, Anderson W, Fanning S, Iversen C. Prevalence of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in follow-on infant formulae and infant drinks[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48(5):536-541
- [24] Santos R F S, Silva N D, Junqueira A Valéria C, Michal K, Stephen F, Luiz P J. Screening for *Cronobacter* species in powdered and reconstituted infant formulas and from equipment used in formula preparation in maternity hospitals [J]. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2013, 63(1/2):62-68
- [25] Fatimah Y, Galil A, Hemmat K, Abdel L, Ahmed M, Ammar F M, Serry E. Studies on prevalence, antimicrobial resistance and survival

- of *Cronobacter sakazakii* [J]. Zagazig Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 23(1):1–15
- [26] Fei P, Man C X, Lou B B, Forsythe S J, Chai Y L, Li R, Niu J T, Jiang Y J. Genotyping and source tracking of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonicus* isolates from powdered infant formula and an infant formula production factory in China [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(16): 5430–5439
- [27] Fei P, Jiang Y J, Jing F, Forsythe S J, Li R, Zhou Y H. Antibiotic and desiccation resistance of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonicus* isolates from powdered infant formula and processing environments[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8:316
- [28] Forsythe S J, Dickins B, Jolley K A. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1):1121–1124
- [29] Müller A, Stephan R, Claudia F F, Lehner A. Genetic diversity of *Cronobacter sakazakii* isolates collected from a Swiss infant formula production facility[J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(5): 883–887
- [30] 李剑峰, 张淑卿, 师尚礼. 微波诱变选育高产生长素及耐药性根瘤菌株研究[J]. 核农学报, 2009, 23(6):83–87
- [31] 王倩宁, 葛武鹏, 袁亚娟, 杨静, 王欢, 马园. 羊奶粉生产环节阪崎肠杆菌分离鉴定及其毒力基因和药敏检测[J]. 中国食品学报, 2015, 15(5): 175–181
- [32] 黄玉兰, 雷高鹏, 张林, 李莉, 刘丽, 吕红, 黄伟峰, 杨小蓉. 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[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(3):299–301
- [33] Lee Y D, Park J H, Chang H I. Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea [J]. Food Control, 2012, 24(1/2):225–230

Contamination and Characteristic Analysis of *Cronobacter* Isolated From Commercially Available Powdered Infant Formula in Guizhou

CHEN Xi HUANG Daomei* MENG Fanbo ZHENG Xiuyan LI Guolin

(Institute of Integrated Agricultural Development Research, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550006)

Abstract: The aim of this study was to indicate the population and characteristics of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula (PIF) collected in Guizhou province. A total of 350 PIF samples were used as research objects to isolate and identify the *Cronobacter* strains. The biochemical phenotypes and genotypes of isolates were performed by API 20E system, 16S rRNA sequencing and multilocus sequence typing (MLST) methods. Finally, the antibiotic susceptibility of isolates was evaluated using Kirby-Bauer diffusion method. The results indicated that 21 *Cronobacter* strains were isolated from 350 PIF samples, with a contamination rate of 6%. These isolates were divided into 6 biochemical phenotypes, 3 groups and 11 sequence types (STs). Among them, ST193 and ST157 were the dominant STs of *Cronobacter* isolated from commercially available PIF in Guizhou. The results of antibiotic susceptibility showed that 21 isolates were highly resistant to tetracycline and vancomycin, while, sensitive to ampicillin, gentamicin, and chloramphenicol. Our findings provided a theoretical basis for the prevention and control of *Cronobacter* in commercially available PIF collected from Guizhou.

Keywords: powdered infant formula, *Cronobacter*, isolation and identification, typing, antibiotic susceptibility