

食品中克罗诺杆菌分离菌株生物被膜形成、 耐药性及毒力基因检测

罗梦幽¹,柯旭泽¹,贺苏皖¹,付成平²,罗玲²,唐俊妮^{1,*}

(1.西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041;

2.四川省农业科学院分析测试中心,四川成都 610066)

摘要:研究食品中克罗诺杆菌分离菌株的生物被膜形成、耐药性以及携带毒力基因情况。在成都市周边农贸市场和路边小摊采集食品样品 129 份,采用 DFI 阪崎肠杆菌显色培养基分离克罗诺杆菌;通过 16S rRNA 序列比对分析鉴定分离菌株;采用试管法和微孔板法分析菌株生物被膜形成能力,同时研究温度对细菌成膜能力影响;采用纸片法检测分离菌株对 18 种抗生素的耐药性;采用 PCR 方法检测分离菌株携带 *cpa*、*hly*、*sip* 和 *ompX* 毒力基因情况。结果发现从 129 份食品样本中共检出克罗诺杆菌 43 株,检出率为 33.3%。43 株克罗诺杆菌食品分离菌株的成膜率为 90.7%,并且温度对细菌成膜影响明显。四种毒力基因中,*ompX* 检出率为 100%;*cpa* 检出率为 13.9%;*hly* 检出率为 11.6%;*sip* 基因未检出。耐药表型检测发现 43 株克罗诺杆菌食品分离菌株对青霉素、克林霉素、万古霉素、苯唑西林和杆菌肽 B 的耐药率为 100%,对利福平的耐药率达 97.7%;对红霉素的耐药率为 7%;对环丙沙星、庆大霉素、四环素、氯霉素、亚胺培南、磺胺甲恶唑、呋喃妥因、头孢西丁、链霉素、阿米卡星、氧氟沙星等 100% 敏感。本研究表明克罗诺杆菌食品分离菌株具有较好的形成生物被膜能力,对常见的抗生素耐药率较高,并且分离菌株携带一定的毒力基因,对食品安全造成潜在威胁。

关键词:克罗诺杆菌,食品分离菌株,生物被膜形成,耐药性,毒力基因

Biofilm Formation, Antimicrobial Susceptibility and Virulence Gene Detection in *Cronobacter* spp. Isolated from Food Sources

LUO Meng-you¹, KE Xu-ze¹, HE Su-wan¹, FU Cheng-ping², LUO Ling², TANG Jun-ni^{1,*}

(1.College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;

2.Analysis and Determination Center, Institute of Quality and Testing Technology for Agro-Products, Chengdu 610066, China)

Abstract: In this study, *Cronobacter* spp. food isolates were identified, and the biofilm formation ability, antimicrobial susceptibility and virulence genes were investigated. All 129 food samples were collected from food markets and food stands from Chengdu city in 2016. *Cronobacter* spp. were isolated and identified by DFI selective medium and 16S rRNA sequencing analysis. The 96-well microplate and tube test were used to detect biofilm formation ability. The influence of temperature on the biofilm formation was also explored. The antimicrobial susceptibility of *Cronobacter* spp. isolates to 18 antibiotics was detected by disk diffusion method. The virulence genes (*cpa*, *hly*, *sip*, and *ompX*) were detected by PCR. The results showed 43 *Cronobacter* spp. strains were identified from 129 food samples. The *Cronobacter* spp. isolation rate was 33.3%. The biofilm formation rate was 90.7% and the temperature had a significant effect on bacterial biofilm formation. The detection rate of *ompX* gene in 43 *Cronobacter* spp. strains was 100%; *cpa* was 13.9%, *hly* was 11.6%, and the *sip* gene was not detected in all isolates. The drug resistance rates to penicillin, clindamycin, vancomycin, oxacillin and bacitracin B for all 43 *Cronobacter* were 100%. The drug resistance rate to rifampicin was 97.7%. For erythromycin, the resistance rate was 7%. All the *Cronobacter* food isolates were sensitive to ciprofloxacin, gentamicin, tetracycline, chloramphenicol, imipenem, sulfamethoxazole, nitrofurantoin, cefoxitin, streptomycin, amikacin, and ofloxacin, completely. The study indicated *Cronobacter* spp. food isolates had better biofilm formation ability and had some resistance to most antibiotics. The food safety were threatened by *Cronobacter* spp. isolates with virulence genes.

Key words: *Cronobacter* spp.; food isolates; biofilm formation; antimicrobial susceptibility; virulence genes

中图分类号: TS201

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)04-0106-06

收稿日期: 2018-06-29

作者简介: 罗梦幽(1994-),女,硕士研究生,研究方向: 食品安全, E-mail: 519415149@qq.com。

* 通讯作者: 唐俊妮(1971-),女,博士,教授,研究方向: 食品安全与食品微生物, E-mail: junneytang@aliyun.com。

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0500500); 西南民族大学研究生创新课题(CX2018SZ15)。

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.04.017

引文格式:罗梦幽,柯旭泽,贺苏皖,等.克罗诺杆菌食品分离菌株生物被膜形成、耐药性及毒力基因检测[J].食品工业科技,2019,40(4):106-111.

克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.)是近年来倍受关注的重要食源性致病菌。克罗诺杆菌是一种周生鞭毛、有运动能力、无芽孢、兼性厌氧的革兰氏阴性杆菌^[1]。感染该菌可引起脓毒血症和菌血症,甚至会引起呼吸道、泌尿道、创伤伤口的感染,以及新生婴幼儿的脑膜炎、菌血症和小肠结肠炎等严重疾病,致死率高达30%~80%^[2]。

不同阪崎克罗诺杆菌的毒力存在差异^[3]。克罗诺杆菌的外膜蛋白X(Outer membrane protein X, OmpX)是克罗诺杆菌毒力决定因子之一^[4],参与宿主细胞的侵袭^[5],抵御宿主细胞防御机制,其编码基因为*ompX*。溶血素(Hemolysin, Hly)是另外一种有溶血活性的蛋白,其编码基因为*hly*^[6]。克罗诺杆菌血浆纤溶酶原激活物(*Cronobacter* plasminogen activator, Cpa)可以保护克罗诺杆菌免受补体依赖性血清的杀伤并对纤溶酶原有活化作用,其编码基因为*cpa*^[7]。免疫相关蛋白(Siderophore-interacting protein, Sip)也与克罗诺杆菌的致病性相关^[6]。另外,当细菌在物体表面附着时,为了适应周围环境和提高生存能力,可以形成与浮游细菌不同的生存方式,称之为生物被膜^[8]。克罗诺杆菌具有广泛的生存温度范围及抗渗透压能力强的特征,其生物被膜形成能力也较强,保护其在食品加工环节广泛生长并进行传播,对食品安全带来隐患^[9]。已经从多种食品中分离出阪崎克罗诺杆菌,包括奶及奶制品、肉类、大米和其他谷物、蔬菜、发酵制品、豆制品、巧克力等^[3]。近年来随着克罗诺杆菌耐药性报道不断增加,有关该菌的耐药性问题也越来越引起重视^[10-13]。

本实验从成都市市场、路边小摊等采集食品样品,分离并鉴定食品中污染的克罗诺杆菌,对其生物被膜成膜情况、携带的毒力基因和耐药性进行检测,为本地区克罗诺杆菌的防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Coster96孔平底细胞培养板 美国康宁公司;胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)、阪崎肠杆菌显色培养基(DFI) 杭州微生物试剂有限公司;Mueller-Hinton琼脂(MHA)、缓冲蛋白胨水(BPW缓冲液)、改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(mLST-Vm) 青岛高科园海博生物技术有限公司;PCR试剂、2×TSINGKE Master Mix 成都擎科梓熙生物技术有限公司;各种抗生素含药纸片 美国Oxoid Limited公司;克罗诺杆菌ATCC 29544 上海复祥生物科技有限公司。

PTC-200 PCR仪、Universal Hood II型凝胶成像仪 Bio-Rad公司;elx808酶标仪 美国biotek公司;UV-6100分光光度计 上海美普达仪器有限公司;WD800B型微波炉 顺德市格兰仕微波炉电器有限公司;5804R型Eppendorf冷冻离心机 Eppendorf

中国有限公司;DYY-6C型电泳仪 北京六一仪器厂;GHP-9080水式恒温培养箱 上海齐欣科学仪器有限公司;HZQ-F160全温振荡培养箱 江苏省太仓市实验设备厂。

1.2 实验方法

1.2.1 样品采集 在成都市附近的农贸市场和路边小摊共采集生鲜食品样品129份,其中菜市场118份,路边摊11份。样品包括:凉拌即食类40份,卤制类27份,米面类23份,发酵类12份,腌制类10份,饮品类3份,生鲜类6份,煮制类2份,烧烤类2份,速食类2份,辣椒面1份,奶片1份。将采集的样品立即送入实验室进行分离培养。采样时间为2016年7月至11月。

1.2.2 克罗诺杆菌的培养纯化与分离 所有样品均在无菌条件下进行处理,按照《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)进行检验。对129份食物中的克罗诺杆菌进行分离。用接种环分别取各增菌培养物1环,划线接种到DFI琼脂平板上,37℃培养18~24 h,从DFI琼脂平板上挑取疑似菌落,再次在DFI琼脂平板上划线纯化,挑取单菌落并进行鉴定。

1.2.3 克罗诺杆菌16S rRNA测序鉴定 将纯化后的菌株接种至TSB肉汤中,37℃培养16~18 h,用Tris-酚法^[14]提取分离菌株的DNA,以克罗诺杆菌16S rRNA引物对其进行PCR扩增,引物序列为:16S-F-5'GCTYTGCTGACGAGTGGCGG 3';16S-R-5'ATCTCTGCAGGATTCTCTGG 3'^[15],扩增理论长度为929 bp。PCR反应体系:上下游引物各0.4 μL,DNA模板1 μL,2×TSINGKE Master Mix 10 μL,由去离子水补齐至20 μL。PCR反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性40 s,58.5℃退火50 s,72℃延伸40 s,35个循环;72℃延伸10 min。

1.2.4 克罗诺杆菌的生物被膜形成能力检测 本研究采用两种方法进行细菌生物被膜形成能力的检测,其中试管法定性检测,微孔板法定量检测。

1.2.4.1 试管法 于5 mL TSB中接入50 μL新鲜菌液过夜培养,37℃150 r/min隔夜培养。培养结束后,倒出菌液并用无菌水冲洗,去除管内杂质和菌体。随后加入1.5 mL的1%结晶紫溶液,染色5 min,染色完毕后清水洗涤2~3 min,直到倾倒流出的水为无色,记录试管壁的成膜情况^[16]。

1.2.4.2 微孔板法 采用96孔板法,检测从食品中分离的克罗诺杆菌生物被膜形成能力。将培养体系增加至200 μL/孔,培养时间延长至48 h。具体操作如下:在微孔板中,每孔加入180 μL已灭菌的TSB培养基,再在每孔加入20 μL 18~24 h培养的新鲜菌液,37℃,培养48 h。待培养结束后,吸出菌液,每孔加入200 μL已灭菌的PBS(pH自然),轻轻敲打清洗,重复3次。加入200 μL甲醇,用于固定生物被膜

表1 克罗诺杆菌的毒力基因引物
Table 1 The primers of virulence genes for *Cronobacter* spp.

引物名称	引物序列(5'-3')	理论长度(bp)	TM 值(℃)	参考文献
<i>ompX</i> -f	CACCATGAAAAAATTGCATGCTCTTTCAG	700	59	[4]
<i>ompX</i> -r	GAAGCGGTAACCCACACCTGC			
<i>cpa</i> -f	CTAGGGCGATGATAGCTGCCTCCG	1015	64	[6]
<i>cpa</i> -r	CTAGGGGGAACAGCCACGAGGAAA			
<i>hly</i> -f	CTAGGGTAACGGACTGTACAGAT	880	59.6	[6]
<i>hly</i> -r	CTAGGAAGAAGCGTAAGCGTCTGA			
<i>sip</i> -f	CTAGGCAAAAGAATCGACAAAGGG	934	57	[6]
<i>sip</i> -r	CTAGGTTGTTGTCTTTATCCGTTC			

(15 min)。弃去甲醇后,每孔加入 200 μ L 的 1% 结晶紫溶液,染色 5 min。染色结束后,清水冲洗微孔板至流水无色,彻底干燥后,每孔加入 200 μ L 33% 的冰乙酸,并测定在 630 nm 处的 OD 值。每株样品重复 3 次,200 μ L TSB 为空白对照组^[16]。结果判定参考文献[17]:把空白对照的平均值记为 A 值,设定空白对照 A 值加上其 3 倍标准差为临界 A 值,即记为 AC。根据样品 A 值与 AC 之间的关系,对生物被膜形成能力的强弱等级进行以下 4 个分级: $A \leq AC$ 属于不附着(0), $AC < A \leq 2AC$ 属于弱附着(+), $2AC < A \leq 4AC$ 属于中等强度附着(++), $A > 4AC$ 属于强附着(+++)

1.2.5 不同温度对生物被膜形成能力影响测定 从中选取 A/AC 值最大的 2 株菌株,进一步探究不同温度对其生物被膜形成能力影响^[18]。具体操作如下:将 A/AC 值最大的两株菌株接至 96 孔板,分别设置 4、10 和 37 $^{\circ}$ C 温度条件下培养 48 h,进行生物被膜量判定并记录数据。

1.2.6 克罗诺杆菌毒力基因的检测 检测 *ompX*、*cpa*、*hly* 和 *sip4* 种毒力基因,DNA 模板、PCR 反应体系同 1.2.3,克罗诺杆菌毒力基因引物序列及退火温度和片段扩增长度见表 1。扩增产物采用琼脂糖电泳和凝胶成像系统检测。

1.2.7 克罗诺杆菌药敏检测 采用 18 种抗生素对分离菌株进行药敏检测,阳性对照菌株为克罗诺杆菌 ATCC 29544,根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and laboratory standards institute,CLSI)推荐的 K-B 纸片扩散法进行操作,试验结果按照 CLSI 的标准进行操作和判定。

1.3 数据分析

药敏实验每株菌和每个药片平行重复 3 次,结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,数据采用 SPSS 19.0 统计软件处理。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离结果

通过细菌的形态学特征初步得到 43 株克罗诺杆菌,进一步对疑似菌株进行 16S rRNA 序列比对,比对结果证实 43 株分离菌株均为克罗诺杆菌属。129 份食品样品中克罗诺杆菌的检出率为 33.3%。其中,路边摊采样 11 份,检出 6 份,检出率为 54.5%;菜市场采样 118 份,检出 35 份,检出率为 29.7%。样品中,卤制品 27 份,检出 12 份,检出率 44.4%;米面

类、发酵类与凉拌类食品检出率则分别为 34.7%、33.3%、27.5%。克罗诺杆菌的样品分离来源详见表 2。

2.2 克罗诺杆菌生物被膜形成能力检测结果

如表 2,试管法定性检测 43 株克罗诺杆菌生物被膜形成情况,发现 43 株分离菌株中有 35 株具有成膜能力,8 株未成膜。微孔法定量检测 43 株克罗诺杆菌生物被膜形成能力,根据样品 A 值与临界值 AC 之间的关系,43 株分离菌株中,有 4 株被判定为无附着关系,即不具有生物被膜形成能力,而剩下 39 株则被判定为有附着关系。其中,有 21 株分离菌株为弱附着菌株,16 株分离菌株为中等附着菌株,2 株为强附着菌株,分离的克罗诺杆菌成膜率达到 90.7%。

2.3 不同温度对克罗诺杆菌分离菌株生物被膜形成能力影响

选取被膜强附着菌株 Cro-16-13 和 Cro-16-32,分别在 4、10 和 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 48 h。如图 1 所示,4 $^{\circ}$ C 时,两株克罗诺杆菌分离菌株几乎无被膜形成;10 $^{\circ}$ C 时,两株克罗诺杆菌被膜形成稍微增加,但不明显;但随着温度升高到 37 $^{\circ}$ C 条件下,两株克罗诺菌株的被膜形成能力显著高于 AC 临界值。说明培养温度对于细菌被膜形成有明显影响。

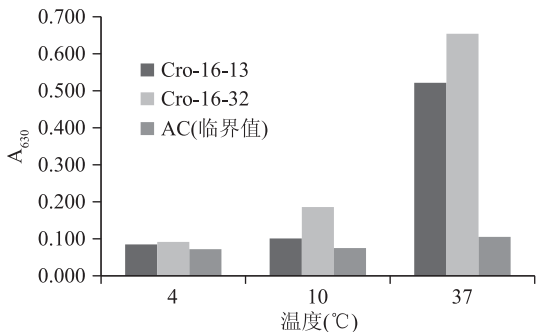


图1 不同温度条件对克罗诺杆菌生物被膜形成能力影响
Fig.1 Effects of temperature on *Cronobacter* spp. biofilm formation

2.4 克罗诺杆菌分离菌株毒力基因检测结果

如表 3,根据 PCR 检测结果,*ompX* 在 43 株克罗诺分离菌株中均有检出,检出率为 100%;*cpa* 检出 6 株,检出率为 13.9%;*hly* 检出 5 株,检出率为 11.6%;*sip* 未检出。另外,每株菌至少携带一种毒力基因,其中,Cro-16-2、Cro-16-31、Cro-16-42 和 Cro-16-43 菌株携带 3 个毒力基因,Cro-16-30、Cro-16-35、Cro-16-41 菌株携带 2 个毒力基因。

表2 克罗诺杆菌的样品来源
Table 2 The sampling sources of *Cronobacter* spp.

菌株编号	样品全称	样品来源	生物被膜形成能力	菌株编号	样品全称	样品来源	生物被膜形成能力
Cro-16-1	泡菜	路边摊	++	Cro-16-23	卤鸡爪	菜市场	+
Cro-16-2	卤豆干	路边摊	++	Cro-16-24	泡椒凤爪	菜市场	++
Cro-16-3	凉拌海白菜	路边摊	+	Cro-16-25	卤豆干	菜市场	++
Cro-16-4	凉拌藕片	路边摊	+	Cro-16-26	卤鸡胗	菜市场	+
Cro-16-5	炒饭	路边摊	++	Cro-16-27	臭豆腐	菜市场	+
Cro-16-6	凉面	路边摊	+	Cro-16-28	凉面	菜市场	+
Cro-16-7	卤鸭胗	菜市场	+	Cro-16-29	凉拌笋	菜市场	++
Cro-16-8	凉拌毛豆	菜市场	-	Cro-16-30	卤鸡爪	菜市场	+
Cro-16-9	凉皮	菜市场	+	Cro-16-31	新鲜豆腐	菜市场	+
Cro-16-10	即食海带片	菜市场	++	Cro-16-32	发面馒头	菜市场	+++
Cro-16-11	凉拌藕片	菜市场	+	Cro-16-33	煮芋头	菜市场	+
Cro-16-12	豆瓣酱	菜市场	++	Cro-16-34	卤鸡胗	菜市场	+
Cro-16-13	臭豆腐	菜市场	+++	Cro-16-35	臭豆腐	菜市场	-
Cro-16-14	卤鸡爪	菜市场	++	Cro-16-36	烤鸡皮	菜市场	+
Cro-16-15	卤肥肠	菜市场	+	Cro-16-37	凉面	菜市场	+
Cro-16-16	凉面	菜市场	++	Cro-16-38	凉拌海白菜	菜市场	-
Cro-16-17	泡椒凤爪	菜市场	++	Cro-16-39	卤鸡爪	菜市场	+
Cro-16-18	凉拌豆皮	菜市场	+	Cro-16-40	凉拌豆皮	菜市场	-
Cro-16-19	卤鸡爪	菜市场	+	Cro-16-41	烤鸡肾	菜市场	++
Cro-16-20	即食海带	菜市场	+	Cro-16-42	炒饭	食堂	++
Cro-16-21	凉拌笋	菜市场	++	Cro-16-43	奶茶	便利店	++
Cro-16-22	卤肥肠	菜市场	++				

表3 克罗诺杆菌毒力基因检测结果

Table 3 The results of virulence genes detection for *Cronobacter* spp. isolates

菌株编号	基因名称				合计
	<i>cpa</i>	<i>hly</i>	<i>sip</i>	<i>ompX</i>	
Cro-16-1	-	-	-	+	1
Cro-16-2	+	+	-	+	3
Cro-16-3	-	-	-	+	1
Cro-16-4	-	-	-	+	1
Cro-16-5	-	-	-	+	1
Cro-16-6	-	-	-	+	1
Cro-16-7	-	-	-	+	1
Cro-16-8	-	-	-	+	1
Cro-16-9	-	-	-	+	1
Cro-16-10	-	-	-	+	1
Cro-16-11	-	-	-	+	1
Cro-16-12	-	-	-	+	1
Cro-16-13	-	-	-	+	1
Cro-16-14	-	-	-	+	1
Cro-16-15	-	-	-	+	1
Cro-16-16	-	-	-	+	1
Cro-16-17	-	-	-	+	1
Cro-16-18	-	-	-	+	1
Cro-16-19	-	-	-	+	1
Cro-16-20	-	-	-	+	1
Cro-16-21	-	-	-	+	1
Cro-16-22	-	-	-	+	1

续表

菌株编号	基因名称				合计
	<i>cpa</i>	<i>hly</i>	<i>sip</i>	<i>ompX</i>	
Cro-16-23	-	-	-	+	1
Cro-16-24	-	-	-	+	1
Cro-16-25	-	-	-	+	1
Cro-16-26	-	-	-	+	1
Cro-16-27	-	-	-	+	1
Cro-16-28	-	-	-	+	1
Cro-16-29	-	-	-	+	1
Cro-16-30	+	-	-	+	2
Cro-16-31	+	+	-	+	3
Cro-16-32	-	-	-	+	1
Cro-16-33	-	-	-	+	1
Cro-16-34	-	-	-	+	1
Cro-16-35	+	-	-	+	2
Cro-16-36	-	-	-	+	1
Cro-16-37	-	-	-	+	1
Cro-16-38	-	-	-	+	1
Cro-16-39	-	-	-	+	1
Cro-16-40	-	-	-	+	1
Cro-16-41	-	+	-	+	2
Cro-16-42	+	+	-	+	3
Cro-16-43	+	+	-	+	3
合计	6	5	0	43	

注;“+”代表已检出;“-”代表未检出。

表4 克罗诺杆菌分离菌株对18种药物的敏感性检测结果
Table 4 The results of antimicrobial susceptibility test for *Cornobacter* spp. isolates

抗菌药物类型	药物名称	抗菌药物代码	纸片药含量 (μg)	敏感(S)		中介(I)		耐药(R)	
				菌株数 (株)	敏感率 (%)	菌株数 (株)	中介率 (%)	菌株数 (株)	耐药率 (%)
氨基糖苷类	庆大霉素	GEN	10	43	100	0	0	0	0
	阿米卡星	AK	30	43	100	0	0	0	0
	链霉素	SM	10	43	100	0	0	0	0
氟喹诺酮类	氧氟沙星	CIP	5	43	100	0	0	0	0
	环丙沙星	OFLX	5	43	100	0	0	0	0
头孢类	头孢西丁	FOX	30	43	100	0	0	0	0
四环素类	四环素	TCY	30	43	100	0	0	0	0
碳青霉烯类	亚胺培南	IPM	10	43	100	0	0	0	0
叶酸途径抑制剂	磺胺甲恶唑	SMZ	25	43	100	0	0	0	0
苯丙醇类	氯霉素	CHL	30	43	100	0	0	0	0
硝基呋喃类	呋喃妥因	F	300	43	100	0	0	0	0
β-内酰胺类	苯唑西林	OXA	1	0	0	0	0	43	100
	青霉素	PEN	10	0	0	0	0	43	100
林可胺类	克林霉素	CLI	2	0	0	0	0	43	100
糖肽类	万古霉素	VAN	30	0	0	0	0	43	100
多肽类	杆菌肽 B	B	10	0	0	0	0	43	100
大环内酯类	红霉素	ERY	15	8	18.6	32	74.4	3	7
安沙霉素类	利福平	RFP	5	0	0	1	2.3	42	97.7

注:耐药:指菌株不能被常规剂量抗菌药物达到的浓度所抑制;中介:指细菌对抗菌药物 MICs 接近血液和组织中通常可达到的浓度疗效低于敏感株;敏感:指菌株被通常可达到的抗菌药物浓度水平所抑制。

2.5 克罗诺杆菌耐药表型检测结果

耐药表型检测结果表明(表4),43株克罗诺杆菌对苯唑西林、青霉素、克林霉素、杆菌肽B、万古霉素5种抗生素耐药率为100%;对利福平的耐药率为97.7%;对红霉素的耐药率为7%,中介率为74.4%,敏感率为18.6%;对头孢西丁、庆大霉素、阿米卡星、链霉素、四环素、亚胺培南、环丙沙星、氧氟沙星、磺胺甲恶唑、氯霉素、呋喃妥因11种抗生素100%敏感。

3 讨论与结论

近年来克罗诺杆菌引起危害的报道逐年增加,其不同食品中的检出率也较高,如李远宏等^[19]从食品香辛料和调味样品中分离克罗诺杆菌,检出率为29.7%;陈万义等^[20]从生鲜蔬菜中分离克罗诺杆菌,检出率为13%。黄启红等^[2]从蔬菜、熟食和豆制品中分离发现克罗诺杆菌在这些食品的污染率达35.9%。潘琢等^[21]通采集某营养面条生产企业的生产原料、中间产品、环境、设备、人员和终产品等共101份样品,发现生产过程中克罗诺杆菌检出率为29.7%(30/101),终产品的克罗诺杆菌检出率为50.0%。本研究从市场和路边摊等共采集129份食品样品,检出43株克罗诺杆菌,检出率为33.3%。与上述研究结果具有一致性。从我们的研究结果来看,卤制类、米面类、发酵类及凉拌菜等熟食制品受克罗诺杆菌污染比较严重,说明食品在加工或售卖过程中易污染克罗诺杆菌。

本研究对克罗诺杆菌分离菌株的生物被膜附着

情况进行检测,发现绝大多数分离菌株具有形成生物被膜的能力。温度对菌株的成膜能力影响较明显,温度升高,细菌的成膜量增加。杜玄等^[18]认为克罗诺杆菌食品分离菌株具有较强形成细菌生物被膜的能力,并且不同培养条件对克罗诺杆菌生物被膜的形成影响不同。食品加工过程中常用的设备是由不锈钢、铝面板等表面具有微细沟槽和缝隙,容易滋生细菌并形成生物被膜^[22]。因此,食品生产操作过程应采取措施控制细菌生物被膜的形成。

针对43株克罗诺杆菌分离菌株携带毒力基因的调查结果表明,ompX出现在所有43株分离菌株中,cpa和hly分别检出6株和5株,sip未检出。王倩宁^[23]对陕西羊奶粉生产企业加工过程中分离的67株克罗诺杆菌的毒力基因cpa、hly、sip和ompX进行检测,sip同样未检出,ompX检出率100%,hly和cpa部分检出,本文的研究结果与其他研究者有关结果一致。

本研究发现43株克罗诺杆菌对苯唑西林、青霉素、克林霉素、万古霉素、杆菌肽B5种抗生素耐药率为100%,对利福平的耐药率为97.7%,对头孢西丁、庆大霉素、阿米卡星、链霉素、四环素、亚胺培南、环丙沙星、氧氟沙星、磺胺甲恶唑、氯霉素、呋喃妥因11种抗生素100%敏感。黄玉兰等^[24]针对四川省市售婴幼儿奶粉、婴幼儿谷物辅助食品及临床病例中分离的克罗诺杆菌药物敏感性研究认为109株克罗诺杆菌对环丙沙星、萘啶酸、头孢噻肟、庆大霉素、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑、氯霉素、四环素7种抗生素敏感,53株菌株对头孢西丁耐药。张翼等^[25]从我

国婴幼儿食品中分离克罗诺杆菌,发现分离菌株对万古霉素和四环素耐药性较高,对氨苄西林、庆大霉素、奈替米星敏感。崔晶花等^[26]对60株克罗诺杆菌耐药检测发现60株菌株均对青霉素G、苯唑西林、万古霉素有耐药性,对头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、阿米卡星呈现高敏感性。该研究结果与其他研究者有关结果存在差异,可能是由于采样来源不同。这些结果也表明克罗诺杆菌食品分离菌株对抗生素的耐药情况在一定程度上反映了当地抗生素的使用情况。

综上,本研究为成都地区的克罗诺杆菌引起食物中毒的风险和防治提供参考。建议有关部门应加强市场上食品的抽检,做好预防控制,保证消费者健康。

参考文献

- [1] 覃小玲,任国谱.乳制品中阪崎肠杆菌的研究进展[J].中国乳品工业,2011(11):45-46,49.
- [2] 黄启红,蔡大川,张志军,等.食品中克罗诺杆菌的分离和鉴定[J].食品研究与开发,2016,37(9):192-194.
- [3] 韩冉.阪崎克罗诺杆菌间毒力比较与致病因子研究[D].天津:天津科技大学,2014.
- [4] Kim K, Kim K P, Choi J, et al. Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(15): 5188.
- [5] De K G, Bolton A, Martin G, et al. Invasion of rabbit ileal tissue by *Enterobacter cloacae* varies with the concentration of OmpX in the outer membrane [J]. Infection & Immunity, 1994, 62(11): 4722-4726.
- [6] Cruz A, Xicohtencatl-Cortes J, González-Pedrajo B, et al. Virulence traits in *Cronobacter* species isolated from different sources [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2011, 57(9): 735.
- [7] Franco A A, Kothary M H, Gopinath G, et al. Cpa, the outer membrane protease of *Cronobacter sakazakii*, activates plasminogen and mediates resistance to serum bactericidal activity [J]. Infection & Immunity, 2011, 79(4): 1578.
- [8] 李燕杰,杜冰,董吉林,等.食品中细菌生物被膜及其形成机制的研究进展[J].现代食品科技,2009,25(4):435-438.
- [9] Gupta T B, Mowat E, Brightwell G, et al. Biofilm formation and genetic characterization of New Zealand *Cronobacter* isolates [J]. Journal of Food Safety, 2017(396): e12430.
- [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] 甘辛,白莉,闫韶飞,等.2012~2014年我国婴幼儿食品中克罗诺氏菌耐药特征分析[J].食品安全质量检测学报,2015,6(9):3491-3496.
- [12] 周显凤,高建新,龙慧,等.婴幼儿配方奶粉中肺炎克雷伯菌与阪崎肠杆菌分离株的药敏分析[J].现代预防医学,2012,39(6):1511-1513.
- [13] 陈卓,任立松,马龙,等.阪崎肠杆菌新疆分离株的药敏分析[J].现代预防医学,2011,38(17):3539-3541.
- [14] 熊明华,朱继荣,王光利,等.一种快速经济提取革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌基因组DNA的方法[J].基因组学与应用生物学,2016,35(2):385-390.
- [15] Lehner A, Tasara T, Stephan R. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification [J]. BMC Microbiology, 2004, 4(1): 1-7.
- [16] 唐俊妮,康名松,陈焕春,等.葡萄球菌核酸酶对金黄色葡萄球菌和其他细菌生物被膜形成的抑制作用[J].中国科学:生命科学,2011,41(7):586-592.
- [17] Rodrigues L B, Dos Santos L R, Tagliari V Z, et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse [J]. Br J Microbiol, 2010, 41(4): 1082-1085.
- [18] 杜玄,贺苏皖,田万帆,等.培养条件对阪崎克罗诺杆菌食品分离菌株生物被膜形成的影响[J].食品安全质量检测学报,2018,9(4):699-705.
- [19] 李远宏,姜华,焦阳,等.食品香辛料和调味品中克罗诺杆菌的分离与鉴定[J].食品工业科技,2017,38(19):125-130.
- [20] 陈万义,任婧,吴正钧,等.生鲜蔬菜中阪崎克罗诺杆菌的分离与鉴定[J].食品科技,2014,39(1):304-308.
- [21] 潘琢,郭玉梅,徐保红,等.营养面条生产过程中克罗诺杆菌污染状况与溯源研究[J].中国食品卫生杂志,2018,30(1):54-58.
- [22] 王琼,唐俊妮,陈娟,等.金黄色葡萄球菌生物被膜检测及控制方法研究进展[J].食品工业科技,2014,35(22):371-375.
- [23] 王倩宁.羊奶粉生产环节克罗诺杆菌污染情况及分离菌株特性研究[D].杨陵:西北农林科技大学,2014.
- [24] 黄玉兰,雷高鹏,张林,等.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.
- [25] 张翼,陈雅箫,周帼萍,等.克罗诺杆菌的生物膜检测和药敏性分析[J].食品科学,2015,36(21):129-134.
- [26] 崔晶花,杨小蓉,杜小莉,等.60株克罗诺杆菌的药敏分析[J].疾病监测,2012,27(5):409-411.

欢迎订阅《食品工业科技》