

# 2012~2014年我国婴幼儿食品中克罗诺氏菌 耐药特征分析

甘辛, 白莉, 闫韶飞, 王佳慧, 王伟, 李志刚, 张靖, 李凤琴, 徐进\*

(国家食品安全风险评估中心卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

**摘要:** **目的** 阐述 2012~2014 年中国 27 个省(直辖市, 自治区)分离自市售谷类辅助食品、婴幼儿配方食品、罐装辅助食品和其他乳制品等 4 类食品的 417 株克罗诺氏菌的药敏特征。**方法** 参考美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的微量肉汤稀释法, 选择氨苄西林、阿莫西林、头孢噻肟、头孢他啶、萘啶酸、氨苄西林/舒巴坦、四环素、庆大霉素、环丙沙星、氯霉素、复方新诺明在内的 9 大类 11 种抗生素进行克罗诺氏菌的耐药特征分析。**结果** 417 株克罗诺氏菌中有 8 株耐药, 平均耐药率 1.92%, 其中 7 株耐药克罗诺氏菌来源于谷类辅助食品。耐药株中耐阿莫西林 3 株、氨苄西林 2 株、氯霉素 2 株、头孢噻肟 1 株、萘啶酸 1 株、复方新诺明 1 株、四环素 1 株。有 3 株菌耐受 2 种抗生素。28 株菌抗生素中介, 其中阿莫西林中介 16 株, 氯霉素中介 15 株, 头孢他啶中介 1 株。**结论** 我国 2012~2014 年市售婴幼儿食品来源的克罗诺氏菌总体对抗生素敏感, 耐药菌株主要来源于谷类辅助食品, 阿莫西林和氯霉素显示出一定的耐药趋势, 应持续监测以阐述主要抗生素的耐药变化规律。

**关键词:** 克罗诺氏菌; 婴幼儿食品; 抗生素敏感性

## Drug resistant analysis of *Cronobacter* isolated from infant foods in 2012~2014 in China

GAN Xin, BAI Li, YAN Shao-Fei, WANG Jia-Hui, WANG Wei, LI Zhi-Gang, ZHANG Jing, LI Feng-Qin, XU-Jin\*

(Key Lab of Food Safety Risk Assessment, Ministry of Health, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**ABSTRACT: Objective** To study the antibiotic susceptibility of 417 *Cronobacter* strains isolated from 4 kinds of infant foods from 27 provinces in China during 2012~2014. **Methods** Totally 11 kinds of 9 categories antibiotics, including Ampicillin (AMP), Amoxicillin (AMX), Cefotaxime (CTX), Ceftazidime (CAZ), Nalidixic acid (NAL), Ampicillin/Sulbactam (SAM), Tetracycline (TET), Gentamicin (GEN), Ciprofloxacin (CIP), Chloramphenicol (CHL) and Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT) were chosen to conduct broth microdilution susceptibility tests according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocols. **Results** A total of 8 of 417 *Cronobacter* strains isolates were antibiotic resistance, with the average resistant rate of 1.92%. The antibiotic resistant strains included 3(AMX), 2(AMP), 2(CHL), 1(CTX), 1(NAL), 1(SXT), and 1(TET). Three strains were resistant to 2 kinds of antibiotics. Twenty-eight strains were determined as intermediate, including 16 AMX intermediate, 15 CHL intermediate and 1 CAZ intermediate.

\*通讯作者: 徐进, 研究员, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: xujin@cfsa.net.cn

\*Corresponding author: XU Jin, Researcher, Key Lab of Food Safety Risk Assessment, Ministry of Health, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China. E-mail: xujin@cfsa.net.cn

**Conclusion** All of *Cronobacter* strains were sensitive to most of antibiotics. Drug-resistant strains mainly came from cereal-based complementary food for infants and young children, and Amoxicillin and Chloramphenicol showed antibiotic resistance trend. Antibiotic susceptibility of *Cronobacter* should be continuously monitored in order to expound the main variation tendency of antibiotic resistance.

**KEY WORDS:** *Cronobacter*; infant foods; antibiotic susceptibility

## 1 引言

克罗诺氏菌(*Cronobacter*, 又称阪崎肠杆菌)是一种兼性厌氧的革兰氏阴性杆菌, 周生鞭毛、能运动、无芽孢, 隶属于肠杆菌科, 广泛分布于婴幼儿配方粉、奶粉、奶酪、水果、蔬菜、肉制品以及自然环境中<sup>[1]</sup>。该菌是一种条件致病菌, 在免疫力低下的人群特别是新生儿、早产儿和老人中能引起严重的脑膜炎、坏死性小肠结肠炎和菌血症, 死亡率高达 40%~80%<sup>[2]</sup>, 并可造成包括迟发型神经发育、脑积水和永久性神经损伤等并发症<sup>[3]</sup>。2002 年国际食品微生物标准委员会(International Commission of Microbiological Specializations on Food, ICMSF)将阪崎肠杆菌列为“可严重危害特定人群生命、引起慢性实质性后遗症的一种致病菌”。2004 年 FAO/WHO 经过风险性评估, 将克罗诺杆菌和沙门氏菌共同列为婴幼儿配方粉的 A 类致病菌, 因此该菌已成为威胁消费者、特别是婴儿健康和生命安全的重要食源性致病菌<sup>[1]</sup>。目前克罗诺氏菌属包括 7 个种, 分别是阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)、莫金斯克罗诺杆菌(*C. muytjensii*)、都柏林克罗诺杆菌(*C. dublinensis*)、调味品克罗诺杆菌(*C. condimentii*)和传奇克罗诺杆菌(*C. universalis*)。

目前, 细菌耐药已成为全球关注的焦点, 耐药细菌的传播直接导致临床抗生素治疗效果降低或无效, 病人病程延长, 并可引发并发症。国内对食源性克罗诺氏菌耐药性的报道较少, 本研究通过对 2012~2014 年国家食品污染和有害因素风险监测网中婴幼儿食品分离的克罗诺氏菌株抗生素敏感性分析, 阐述我国目前克罗诺氏菌的耐药特征。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 菌株来源

菌株来源为 2012~2014 年国家食品污染和有害

因素风险监测网 27 个省(直辖市、自治区)分离自四类食品的 417 株克罗诺氏菌, 其中谷类辅助食品来源的 358 株, 婴幼儿配方食品来源的 57 株, 罐装辅助食品来源的 1 株, 其他乳制品来源的 1 株。药敏质控菌为大肠埃希氏菌(ATCC25922)和大肠埃希氏菌(ATCC 35218), 为本室保存。

#### 2.1.2 主要仪器与试剂

DensiCHEK 比浊仪(法国梅里埃公司)、恒温生物培养箱(美国 3M 公司)、VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析仪(法国梅里埃公司)、PL602-L 电子天平(梅特勒-托多利公司)、SQ810C 高压灭菌锅(重庆雅马拓科技有限公司)。

脑心浸液肉汤(BHI)、脑心浸液琼脂(BHA)、阪崎肠杆菌显色培养基(DFI)、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)均购自北京陆桥技术股份有限公司。MH 肉汤(MHB, 美国 Oxid 公司)、抗生素(美国 Sigma 公司)、氯化钠(北京化工厂)。

## 2.2 方法

### 2.2.1 菌株复核鉴定

菌株的活化与鉴定: 将-80 °C 保存的 417 株待测菌株接种于 5 mL BHI 肉汤管中, 37 °C 培养过夜, 将培养物划线接种于 BHA 平板, 37 °C 培养 24 h。挑取单菌落, 划线接种于 DFI 平板, 37 °C 培养 24 h。挑取绿色单菌落, 划线接种于 TSA 平板, 25 °C 培养 48 h。挑取 2~3 个 TSA 平板上的新鲜黄色菌落, 于 3 mL 无菌 0.85% 生理盐水比浊管中, 用微量紫外分光光度计调整菌悬液至 0.5 麦氏单位, 用 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析仪进行鉴定。

### 2.2.2 抗生素敏感试验

抗生素选择: 根据 CLSI 推荐的肠杆菌科耐药试验抗生素与临床用药相结合, 选择 9 类抗生素(括号内为抗生素的英文全称和缩写, 中括号内为抗生素耐药值), 分别为四环素类-四环素(Tetracycline, TET, [ 16])、喹诺酮类-萘啶酸(Nalidixic acid, NAL, [ 32])、氟喹诺酮类-环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP, [

4)、酰胺醇类-氯霉素(Chloramphenicol, CHL, [32])、叶酸途径抑制剂-复方新诺明(Sulfamethoxazole-Trimethoprim, SXT, [4])、青霉素类-阿莫西林(Amoxicillin, AMX, [32])及氨苄西林(Ampicillin, AMP, [32])、 $\beta$ -内酰胺/ $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复合物--氨苄西林/舒巴坦(Ampicillin-Sulbactam, SAM, [32])、氨基糖苷类-庆大霉素(Gentamicin, GEN, [16])、头孢类-头孢噻肟(Cefotaxime, CTX, [4])及头孢他啶(Ceftazidime, CAZ, [16])。采用 CLSI 推荐的微量肉汤稀释法(broth microdilution susceptibility testing)进行药敏试验。

**菌株的活化与制备:** 将复核为克罗诺氏菌和质控菌株接种于 5 mL BHI 肉汤管中, 37 °C 培养过夜, 将培养物划线接种于 BHA 平板, 37 °C 培养 24 h。挑取单菌落, 再次接种 BHA 平板, 37 °C 培养 24 h。挑取 2~3 个第二次 BHA 上传代的新鲜菌落, 于 3 mL 无菌 0.85% 生理盐水比浊管中, 用微量紫外分光光度计调整菌悬液至 0.5 麦氏单位, 备用。

**96 孔药敏板制备:** 将 100  $\mu$ L 用 MHB 稀释的 2 $\times$  抗生素工作液加入 96 孔板第一列, 共 11 孔, 剩余孔中各加入 50  $\mu$ L MHB; 从第一列吸出 50  $\mu$ L, 加入第 2 列孔中, 吹打混匀, 并依此操作直到第 8 列, 将第 8 列孔的 50  $\mu$ L 吸出后丢弃。最后一排不加抗生素, 其中 4 个为阴性对照, 4 个为生长对照。

**接种培养及结果观察:** 取配置好的菌悬液 80  $\mu$ L 加至 8 mL MHB 中, 混匀。向配制好的药敏板中加入

菌悬液, 每孔 50  $\mu$ L。37 °C 培养过夜, 保持培养箱湿度。完全抑制细菌生长的最低抗生素浓度记录为最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

### 3 结果与分析

经鉴定, 27 个省上报的分离自 4 类食品的 417 株克罗诺氏菌中, 有 8 株耐药, 耐药率 1.92%, 其中 2012 年的 221 株菌株中有 3 株耐药, 耐药率为 1.36%, 2013 年的 196 株菌株中有 5 株耐药, 耐药率为 2.55%。耐药菌株中, 耐阿莫西林 3 株, 耐氨苄西林 2 株, 耐氯霉素 2 株, 耐头孢噻肟 1 株, 耐萘啶酸 1 株, 耐复方新诺明 1 株, 耐四环素 1 株。另外对阿莫西林中介 16 株, 氯霉素中介 15 株, 头孢他啶中介 1 株。全部 11 种抗生素的敏感率为 95.44%~100%, 具体见表 1。8 株耐药菌中, 单耐药菌 5 株, 分别为耐四环素、耐阿莫西林、耐复方新诺明、耐萘啶酸和耐氯霉素; 双耐药菌 3 株, 分别为耐氨苄西林和头孢噻肟、耐氨苄西林和阿莫西林以及耐阿莫西林和氯霉素, 详见表 2。417 株克罗诺氏菌中, 358 株来自谷类辅助食品, 其中耐药菌株 7 株, 耐药率为 1.96%, 而 57 株来自婴幼儿配方粉, 耐药菌株 1 株, 耐药率为 1.75%, 另有 1 株来自灌装辅助食品, 1 株来自其他乳制品, 详见表 3。28 株抗生素中介的菌株中有 26 株分离自谷类辅助食品, 2 株来自婴幼儿配方粉。417 株菌株的最小抑菌浓度分布情况详见表 4。

表 1 417 株克罗诺氏菌对 11 种抗生素的敏感性结果  
Table 1 Antibiotic susceptibility of 417 *Cronobacter* strains against 11 antibiotics

抗生素	耐药		中介		敏感	
	菌株数	耐药率/%	菌株数	中介率/%	菌株数	敏感率/%
阿莫西林	3	0.72	16	3.84	398	95.44
氨苄西林	2	0.48	0	0.00	415	99.52
氯霉素	2	0.48	15	3.60	400	95.92
头孢噻肟	1	0.24	0	0.00	416	99.76
萘啶酸	1	0.24	0	0.00	416	99.76
复方新诺明	1	0.24	0	0.00	416	99.76
四环素	1	0.24	0	0.00	416	99.76
头孢他啶	0	0.00	1	0.24	416	99.76
环丙沙星	0	0.00	0	0.00	417	100
庆大霉素	0	0.00	0	0.00	417	100
氨苄西林/舒巴坦	0	0.00	0	0.00	417	100

表2 克罗诺氏菌的耐药谱  
Table 2 Antibiotic resistance distribution of *Cronobacter*

抗生素耐受数量	耐药谱	菌株数
0	敏感与中介株	409
1	四环素	1
1	阿莫西林	1
1	复方新诺明	1
1	萘啶酸	1
1	氯霉素	1
2	氨苄西林-头孢噻肟	1
2	氨苄西林-阿莫西林	1
2	阿莫西林-氯霉素	1

表3 食品种类与耐药结果  
Table 3 Antibiotics susceptibility of *Cronobacter* isolates from different types of food

食品种类	分离数	耐药数	耐药率/%
谷类辅助食品	358	7	1.96
婴幼儿配方食品	57	1	1.75
罐装辅助食品	1	0	0.00
其他乳制品	1	0	0.00
合计	417	8	1.92

表4 克罗诺氏菌抗生素敏感性分布  
Table 4 Antibiotic susceptibility of *Cronobacter*

抗生素	检测浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	克罗诺杆菌 MIC 值分布( $\mu\text{g/mL}$ )												
		0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
氨苄西林	0.5~64				16	164	203	29	3		2			
头孢噻肟	0.125~16		320	80	14	2		1						
头孢他啶	0.25~32			279	116	19	2		1					
萘啶酸	0.5~64					44	279	87	5	1		1		
环丙沙星	0.0625~8	404	10	3										
四环素	0.5~64				139	219	55	3				1		
庆大霉素	0.5~64				375	37	5							
氨苄西林/舒巴坦	0.5~64				16	179	191	29	2					
复方新诺明	0.125~16		394	14	6	2				1				
阿莫西林	0.5~64				7	106	218	44	23	16	2	1		
氯霉素	2~256						56	273	71	15	2			

## 4 讨论

从2012~2014年国家食品污染和有害因素风险监测网分离的417株克罗诺氏菌食品分类分析,谷类辅助食品所占比例为85.85%,婴幼儿配方粉占13.67%。9类11种抗生素敏感性试验表明,共有8株克罗诺氏菌耐药,其中2012年3株,2013年5株,7株来源于谷类辅助食品,主要耐受阿莫西林和氨苄西林,表明食品中克罗诺氏菌普遍对抗生素敏感,这与国内的报道的结果相似<sup>[12-14]</sup>。耐药结果显著低于国外报道或从进口食品分离的克罗诺氏菌耐药结果<sup>[11,15]</sup>。北京出入境检验检疫局2007~2010年对进口乳制品中分离的99株克罗诺氏菌耐药的耐药分析表明,对头孢噻吩、氨苄西林、头孢唑林和四环素的耐药率分别为25.0%、23.0%、6.0%、2.0%和1.0%<sup>[15]</sup>。本研究有57株克罗诺氏菌来源于婴幼儿配方食品,仅1株显示耐药,显示国内的分离株与进口食品分离株耐药特征区别较大。

此外,本研究中有16株克罗诺氏菌为阿莫西林中介,占中介率的57%(16/28),显示出了一定的耐药趋势。结合2014年美国80岁以上老人克罗诺氏菌感染率高于其他年龄组,甚至是婴儿的2倍以上<sup>[2]</sup>的报道,故克罗诺氏菌危害的人群已不局限于新生儿。因阿莫西林为临床一线抗生素用药,因此有必要定期监测耐药特征,阐述其耐药变化规律,评估耐药可能对婴幼儿和老年人带来的潜在健康风险。

## 参考文献

- [1] Ziad WJ, Waseem AM, Ahmed E, *et al.* Cronobacter spp.-opportunistic foodborne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits [J]. J Med Microbiol, 2014, 63: 1023-1037.
- [2] Mary EP, Barbara EM, Sharon AG, *et al.* Incidence of Cronobacter spp. Infectiones, United States, 2003-2009 [J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20: 1520-1523.
- [3] 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.  
Pei XY, Liu XM. Biological characteristics and health hazard of *Enterobacter sakazakii*: a review [J]. Chin J Food Hyg, 2004, 16(6): 550-555.
- [4] 张雪梅, 孙鑫贵, 卢阳, 等. 阪崎肠杆菌的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(3): 42-46.  
Zhang XM, Lu XG, Lu Y, *et al.* Advances in *Enterobacter sakazakii* research [J]. China Dairy Ind, 2008, 36(3): 42-46.
- [5] 袁飞, 徐宝梁, 任发政, 等. 奶粉中阪崎肠杆菌的风险评估[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 261-265.  
Yuan F, Xu BL, Ren FZ, *et al.* Risk assessment of *Enterobacter sakazakii* in milk powder [J]. Food Sci, 2005, 26(11): 261-265.
- [6] 陈伟伟, 洪锦春, 李闽真, 等. 奶粉中阪崎肠杆菌的污染及快速检测方法的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(4): 182-184.  
Chen WW, Hong JC, Li MZ, *et al.* Study on *Enterobacter sakazakii* Contamination in infant formula milk powder and its rapid detection method [J]. Food Sci, 2009, 30(4): 182-184.
- [7] 董晓晖, 李程思, 吴清平, 等. 食品污染克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌)的分离及鉴定[J]. 微生物学报, 2013, 53(5): 429-436.  
Dong XH, Li CS, Wu QP, *et al.* Isolation and identification of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* strains from food [J]. Acta Microbiol Sin, 2013, 53(5): 429-436.
- [8] 陈雅衡, 周帽萍. 食品工业中克罗诺杆菌(原阪崎肠杆菌)的污染与控制[J]. 中国酿造, 2013, 32(7): 16-19.  
Chen YH, Zhou GP. Pollution and control of *Cronobacter (formerly Enterobacter sakazakii)* in food industry [J]. China Brew, 2013, 32(7): 16-19.
- [9] Carol I, Angelika L, Niall M, *et al.* Identification of "Cronobacter" spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(11): 3814-3816.
- [10] 胡光春, 杨月莲, 刘辉, 等. 阪崎肠杆菌致病性及致病机理研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(8): 626-628.  
Hu GC, Yang YL, Liu H, *et al.* Advances in the study of the mechanisms of *Cronobacter* pathogenicity and pathogenesis [J]. J Pathog Biol, 2011, 6(8): 626-628.
- [11] Kilonzo-Nthenge A, Rotich E, Godwin S, *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from domestic kitchens in middle tennessee, United States [J]. J Food Protect, 2012, 75(8): 1512-1517.
- [12] 顾鸣, 韩伟, 杨捷琳. 进口乳制品中阪崎杆菌的耐药性分析[J]. 检验检疫科学, 2008, 1(18): 14-16.  
Gu M, Han W, Yang JL. Study on antibiotic resistance of *Enterobacter sakazakii* isolated from imported dairy product [J]. Inspect Quarant Sci, 2008, 1(18): 14-16.
- [13] 陈卓, 任立松, 马龙. 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.  
Chen Z, Ren LS, Ma L. Analysis on the antimicrobial susceptibility testing of *Enterobacter sakazakii* isolated for Xinjiang [J]. Mod Pre Med, 2011, 38(17): 3539-3541.
- [14] 裴晓燕, 郭云昌, 徐进. 婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌分离株的

药敏分析[J]. 卫生研究, 2007, 36(1):63-65.

Pei XY, Guo YC, Xu J. Antibiotic susceptibility of *Enterobacter sakazakii* isolated from powdered formula for infant and young children [J]. J Hyg Res, 2007, 36(1): 63-65.

- [15] 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.

Zhang XM, Zeng J, Wei HY, *et al.* Study on antibiotic resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from imported dairy product [J]. Chin J Food Hyg, 2013, 25(4): 320-323.

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



甘 辛, 助理研究员, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: ganxin@cfsa.net.cn



徐 进, 研究员, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: xujin@cfsa.net.cn

## “农副产物综合利用”专题征稿函

农副产物包括大宗农产品在采后加工利用过程中产生的副产物, 也包括有一定商品开发价值或营养价值的小宗农产品。我国农副产物资源丰富, 每年农产品的加工利用产生种类众多的食品和相关制品, 但同时也产生大量副产物, 致使资源得不到充分利用以及造成环境污染。提高农副产物资源的综合利用水平, 实现农产品加工的全利用和零排放, 同时使农副产物增值, 实现农产品加工的可持续发展, 已经成为当今世界各国农产品精深加工与利用和产业升级所面临的重要课题。

基于此, 本刊特别策划“农副产物综合利用”专题, 由四川大学的何强教授担任专题主编。专题将围绕果蔬副产物(皮、渣、籽、壳、叶、茎、根、花等)、粮油副产物(麸皮、胚芽、米糠、饼粕、玉米芯、皮壳、皂脚等)、畜、禽、水产副产物(毛、皮、骨、内脏、腺体、血液等)以及有一定商业价值的小宗农产品(芳香植物、南瓜等)等各类农副产物资源的综合利用技术展开。计划在 2015 年 12 月正式出版。

本刊主编吴永宁研究员 以及专题主编何 强教授 特别邀请您为本专题撰稿, 展示与交流您在相关领域的研究成果与学术发现, 以期农副产物增值与综合利用技术研究提供指导方向。请您请在 2015 年 11 月 30 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoods@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部