

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.12.003

· 论 著 ·

食源性产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌的分布及其同源性研究

宾羽琳¹, 王 萌¹, 陈 艳¹, 邱灿林², 招 莉², 钟启丽²

(1 韶关学院医学院, 广东 韶关 512026; 2 韶关市疾病预防控制中心, 广东 韶关 512026)

[摘要] **目的** 了解不同食源性传播介质中产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌的分布情况及同源性。**方法** 从 2014—2015 年韶关市不同来源的食源性样本中分离产 ESBLs 大肠埃希菌, 采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术和 BioNumerics 软件对菌株进行分型。**结果** 347 份不同来源的食源性样本中检出 11 株致腹泻大肠埃希菌和 29 株产 ESBLs 大肠埃希菌。PFGE 图谱分析, 29 株菌可以分为 21 个聚类群, 其中聚类 A 包含 7 株菌(J2、J3、J4、J7、J9、B4、S3), 为优势的 PFGE 带型, 聚类 B 有 2 株菌(J6、J8), 其余菌株带型为分散克隆。3 株健康从业人员分离菌(J2、J7、J9)相似系数为 100%, 生活饮用水分离菌(S3)与腹泻患者分离菌(B4)的相似系数为 97.1%, S3 菌与 4 株健康从业人员分离菌(J2、J3、J7、J9)相似系数均 $>90.0\%$ 。**结论** 韶关市食源性产 ESBLs 大肠埃希菌在食品、水、动物和人群中广泛分布, 并可能通过食物链相互传播, 应加强监测, 防止进一步扩散。

[关键词] 食源性; 超广谱 β -内酰胺酶; ESBLs; 大肠埃希菌; 脉冲场凝胶电泳; PFGE; 聚集性

[中图分类号] R183.4 R378.2⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2016)12-0907-06

Distribution and homology of foodborne-associated extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli*

BIN Yu-lin¹, WANG Meng¹, CHEN Yan¹, QIU Can-lin², ZHAO Li², ZHONG Qi-li² (1 Medical College of Shaoguan University, Shaoguan 512026, China; 2 Shaoguan Center for Disease Control and Prevention, Shaoguan 512026, China)

[Abstract] **Objective** To study the distribution and homology of foodborne-associated extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing *Escherichia coli* (*E. coli*). **Methods** ESBLs-producing *E. coli* were isolated from different food specimens in Shaoguan from 2014 to 2015, strains were typed with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and BioNumerics software. **Results** 11 strains of diarrhea-causing *E. coli* and 29 strains of ESBLs-producing *E. coli* were isolated from 347 different sources of food specimens. PFGE analysis showed that 29 strains could be divided into 21 cluster groups, group A was predominant pattern, which included 7 strains (J2, J3, J4, J7, J9, B4, S3), group B included 2 strains (J6, J8), the other strains were sporadic clones. Similarity coefficient (SC) of 3 strains (J2, J7, J9) from health practitioners was 100%, SC of strains from drinking water and patients with diarrhea (B4) was 97.1%, SC of S3 strain and 4 strains (J2, J3, J7, J9) from health practitioners were all $>90.0\%$. **Conclusion** Foodborne-associated ESBLs-producing *E. coli* are widely distributed in food, water, animal, and populations, and can be transmitted through food chain, surveillance should be enhanced to avoid further spread.

[Key words] foodborne; extended-spectrum β -lactamase; ESBLs; *Escherichia coli*; pulsed-field gel electrophoresis; PFGE; clustering

[Chin J Infect Control, 2016, 15(12): 907-912]

食源性疾病是全球高度关注的、日益严重的公共卫生问题之一, 而病原微生物是主要的病因^[1]。随着

食品加工、销售的产业化与全球化, 食源性疾病已突破传统的点源暴发, 呈现多地同源暴发或散发趋势。

[收稿日期] 2016-03-01

[基金项目] 韶关市科技局科技研究资金(2014CX-K280)

[作者简介] 宾羽琳(1975-), 女(汉族), 广东省韶关市人, 副主任技师, 主要从事微生物学检验研究。

[通信作者] 宾羽琳 E-mail: 1368655059@qq.com

2004 年我国建立食源性致病菌的监测网和病原菌分子分型监测网络,对主要食源性致病菌开展主动监测及溯源,应对日益严峻的食源性疾病,但该监测体系还不完善,纳入监测的致病菌比较局限,赵怀龙等^[2]认为应扩大食源性病原菌检测的种类,提高实验室检测能力,健全我国食源性疾病监测网络和报告体系,使监测数据真实反映我国食源性疾病的现状。大肠埃希菌(*Escherichia coli*)是人和动物肠道中的正常菌群,是重要的肠道指示菌和条件致病菌,其中产超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamases, ESBLs)大肠埃希菌越来越受到关注。本文以食源性产 ESBLs 大肠埃希菌为切入点,研究其在不同食源性传播介质中的分布,并应用脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)技术对分离株进行分子分型及同源性分析,初步建立韶关市食源性产 ESBLs 大肠埃希菌的 PFGE 分子分型数据库,有利于韶关市开展食源性传染病的溯源及其聚集性识别。

1 材料与方法

1.1 标本来源 食品:韶关市疾病预防控制中心依据 2014 年和 2015 年《韶关市食品安全风险因素评价专项监测工作方案》,采集生肉类、熟食类、水(海)产类、蔬菜类等标本共 100 份。生活饮用水:2014—2015 年自来水厂入厂水、井水、山泉水、水库水等生活饮用水源水共 60 份,其中 45 份标本由韶关市疾病预防控制中心采集送检。食源性动物:采集 2014—2015 年韶关市区家禽家畜批发市场和近郊 3 个养殖场的鸡、鸭、猪等粪便或肛拭子共 57 份标本。健康从业人员:采集 2015 年韶关市食品和公共场所从业人员常规体检肛拭子标本 50 份,由市区某医院体检科采样送检。腹泻患者:2014—2015 年临床肠道感染性疾病患者粪便或肛拭子 80 份,由韶关市各医院、市疾病预防控制中心提供。对照标本:12 株来自珠海某医院临床腹泻患者的产 ESBLs 大肠埃希菌。

1.2 主要试剂与仪器 麦康凯琼脂培养基、MH 琼脂培养基、乳糖蛋白胨水均购自杭州天和微生物试剂有限公司,大肠埃希菌诊断血清购自宁波天润生物药业有限公司,ESBLs 确证试验抗生素纸片为英国 OXOID 公司产品,限制性内切酶 Xba I 为美国 Promega 公司产品,蛋白酶为美国 MERCK 公司产品。自动细菌鉴定及药敏测定系统购自法国生物梅里埃公司,脉冲场凝胶电泳仪及凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 大肠埃希菌的分离鉴定 依据《感染性腹泻的诊断标准及处理原则》、《食品卫生微生物学检验》、《生活饮用水卫生标准检验方法》及《广东省疾控系统 2013 年食源性致病菌监测检验方法》对各类标本进行分离、培养和鉴定。

1.3.2 产 ESBLs 大肠埃希菌的检测 经自动细菌鉴定及药敏分析仪初筛产 ESBLs 的菌株,参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的方法进行产 ESBLs 菌株的确证试验:采用头孢他啶(30 μ g)及头孢他啶/克拉维酸(30 μ g/10 μ g)组合,头孢噻肟(30 μ g)及头孢噻肟/克拉维酸(30 μ g/10 μ g)组合,当任何一种复合物纸片抑菌圈直径大于或等于其单独药敏纸片抑菌圈直径 5 mm,可确证产 ESBLs。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922。

1.3.3 PFGE 将检出的产 ESBLs 大肠埃希菌及珠海市提供的对照菌株送至广东省疾病预防控制中心进行 PFGE 分子分型,操作参照美国疾病控制与预防中心 PulseNet 试验方法,采用 Bionumerics 软件对图谱进行分析。采用 Tenover 等^[3]提出的判定标准:当菌株 PFGE 条带型别完全相同时,可判定为相同型别;当条带型别相差 2~3 个条带时,判定为密切相关;当条带型别相差 4~6 个条带时,判定为可能相似;当条带型别相差 7 个条带及以上时,则可判定为不同菌株。系统根据指纹图谱将每个条带转换为二进制数据,按公式计算出相似性系数($S_{sm} = 2 \times W / (a + b)$), W :两菌株共有条带数; a :A 菌条带数; b :B 菌条带数,相似性系数越大菌株间亲缘关系越近,公式换算后可将相似系数 >90% 的菌株判定为密切相关。

2 结果

2.1 培养鉴定结果 各类标本共检出大肠埃希菌 147 株,经血清分型鉴定出致腹泻大肠埃希菌 11 株,其中生活饮用水中检出 4 株,分别为 2 株肠毒素型大肠埃希菌(ETEC) O78K80 和 2 株 ETEC O25K19;腹泻患者中检出 6 株,分别为肠致病性大肠埃希菌(EPEC) O142K86 和 EPEC O125K70、肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC) O136K78 和 EIEC O124K72、ETEC O8K40(A) K47(A) 和 ETEC O25K19(L);食源性动物(鸭)中检出 1 株 EPEC O86K61K62,其余均为非致腹泻大肠埃希菌。经 ESBLs 确证试验 147 株大肠埃希菌,产 ESBLs 菌株

29 株,腹泻患者标本中检出的 1 株 EPEC 和 1 株 ETEC 同时产 ESBLs。见表 1~2。

表 1 不同来源标本检出大肠埃希菌情况

Table 1 Detection results of *E. coli* from different sources of specimens

标本来源	标本数(份)	大肠埃希菌株数	检出率(%)	致腹泻大肠埃希菌株数(%)	产 ESBLs 大肠埃希菌株数(%)
食品	100	14	14.00	0(0.00)	0(0.00)
生活饮用水源水	60	20	33.33	4(20.00)	3(15.00)
食源性动物	57	35	61.40	1(2.86)	8(22.86)
健康从业人员	50	32	64.00	0(0.00)	9*(28.13)
腹泻患者	80	46	57.50	6(13.04)	9(19.57)
合计	347	147	42.36	11(7.48)	29(19.73)

* :其中 1 株为鸡场工作人员伤口分泌物检出菌

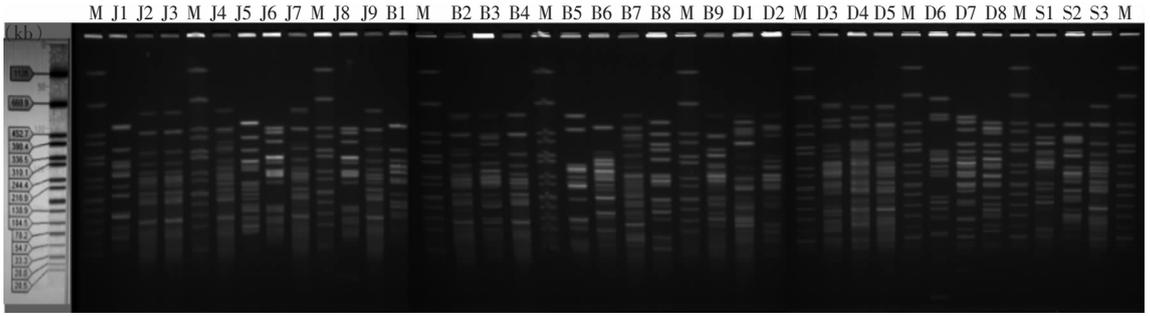
表 2 29 株产 ESBLs 大肠埃希菌的标本信息

Table 2 Information of specimens of 29 ESBLs-producing *E. coli* strains

标本编号	标本类型	标本来源	采样时间	血清分型
S1	井水	某家禽养殖场	2015-04-25	非致腹泻大肠埃希菌
S2	井水	三鸟批发市场	2014-01-08	非致腹泻大肠埃希菌
S3	山泉水	芙蓉山	2015-05-21	非致腹泻大肠埃希菌
D1	肛拭子	鸡	2015-05-08	非致腹泻大肠埃希菌
D2	肛拭子	鸡	2015-05-13	非致腹泻大肠埃希菌
D3	肛拭子	鸡	2015-05-13	非致腹泻大肠埃希菌
D4	肛拭子	鸡	2015-06-03	非致腹泻大肠埃希菌
D5	肛拭子	鸡	2015-06-03	非致腹泻大肠埃希菌
D6	肛拭子	鸡	2015-07-21	非致腹泻大肠埃希菌
D7	肛拭子	鸡	2015-07-21	非致腹泻大肠埃希菌
D8	粪便	猪	2015-07-21	非致腹泻大肠埃希菌
J1	伤口分泌物	家禽养殖人员	2015-05-08	非致腹泻大肠埃希菌
J2	粪便	健康从业人员	2015-07-23	非致腹泻大肠埃希菌
J3	粪便	健康从业人员	2015-07-23	非致腹泻大肠埃希菌
J4	粪便	健康从业人员	2015-07-23	非致腹泻大肠埃希菌
J5	粪便	健康从业人员	2015-07-23	非致腹泻大肠埃希菌
J6	粪便	健康从业人员	2015-07-23	非致腹泻大肠埃希菌
J7	粪便	健康从业人员	2015-07-23	非致腹泻大肠埃希菌
J8	粪便	健康从业人员	2015-07-23	非致腹泻大肠埃希菌
J9	粪便	健康从业人员	2015-07-23	非致腹泻大肠埃希菌
B1	粪便	腹泻患者	2014-06-15	非致腹泻大肠埃希菌
B2	粪便	腹泻患者	2014-06-15	非致腹泻大肠埃希菌
B3	粪便	腹泻患者	2014-06-24	EPEC O142K86
B4	粪便	腹泻患者	2015-06-23	非致腹泻大肠埃希菌
B5	粪便	腹泻患者	2015-06-27	非致腹泻大肠埃希菌
B6	粪便	腹泻患者	2015-07-21	非致腹泻大肠埃希菌
B7	粪便	腹泻患者	2015-07-22	非致腹泻大肠埃希菌
B8	粪便	腹泻患者	2015-07-22	ETEC O8K40(A)K47(A)
B9	肛拭子	腹泻患者	2015-04-25	非致腹泻大肠埃希菌

2.2 产 ESBLs 大肠埃希菌 PFGE 分型 对 PFGE 图谱进行聚类分析,29 株菌可以分为 21 个聚类群,其中聚类 A 包含 7 株菌(J2、J3、J4、J7、J9、B4、S3),为优势的 PFGE 带型,聚类 B 有 2 株菌(J6、J8),其余菌株带型为分散克隆。见图 1~2。3 株健康从业人员分离菌(J2、J7、J9)间的相似系数为 100%,生活饮用水分离菌(S3)与腹泻患者分离菌(B4)的相似系数高

达 97.1%,生活饮用水分离菌(S3)与 4 株健康从业人员分离菌(J2、J3、J7、J9)、腹泻患者分离菌(B4)与健康从业人员分离菌(J2、J7、J9)相似系数均>90.0%。韶关市与珠海市腹泻患者标本共分离产 ESBLs 大肠埃希菌株 21 株,分为 19 种不同的 PFGE 带型,珠海市患者标本两组分离菌(ZH1 与 ZH10,ZH7 与 ZH8)的带型相同,其余菌株的相似系数均<90%。见图 3。



M: 参考菌株 H9812; J1~J9: 健康从业人员检出菌株; B1~B9: 腹泻患者检出菌株; D1~D8: 食用动物检出菌株; S1~S3: 水源水检出菌株

图 1 韶关市食源性产 ESBLs 大肠埃希菌 PFGE 分型图

Figure 1 PFGE patterns of foodborne-associated ESBLs-producing *E. coli* in Shaoguan

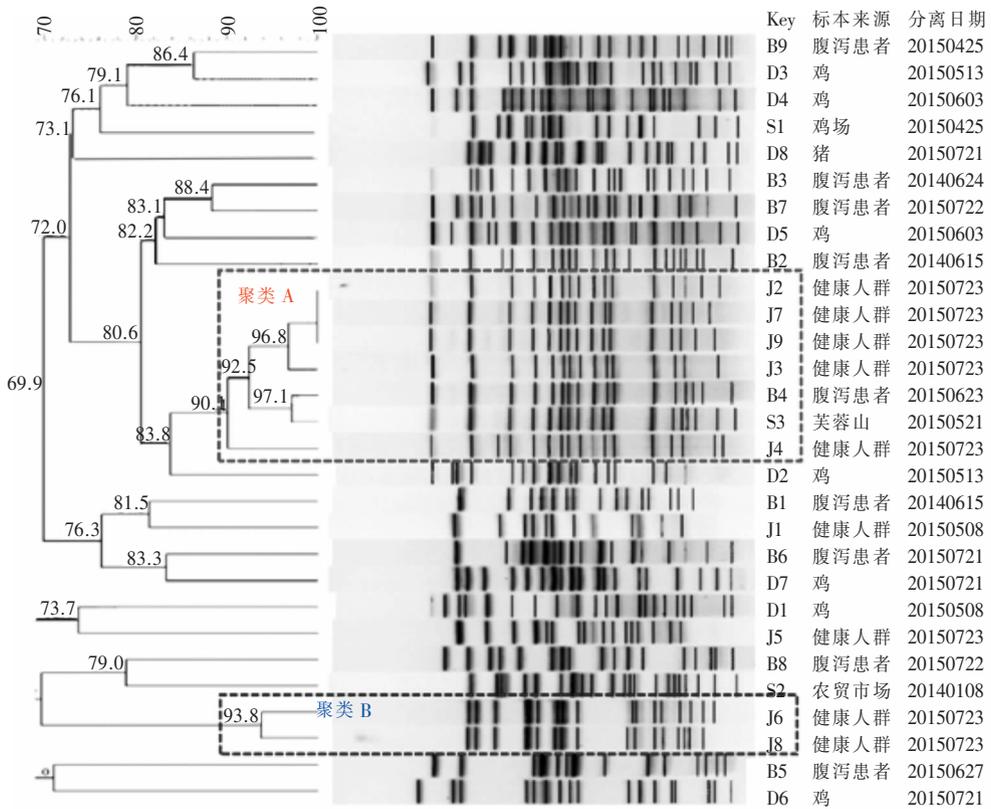
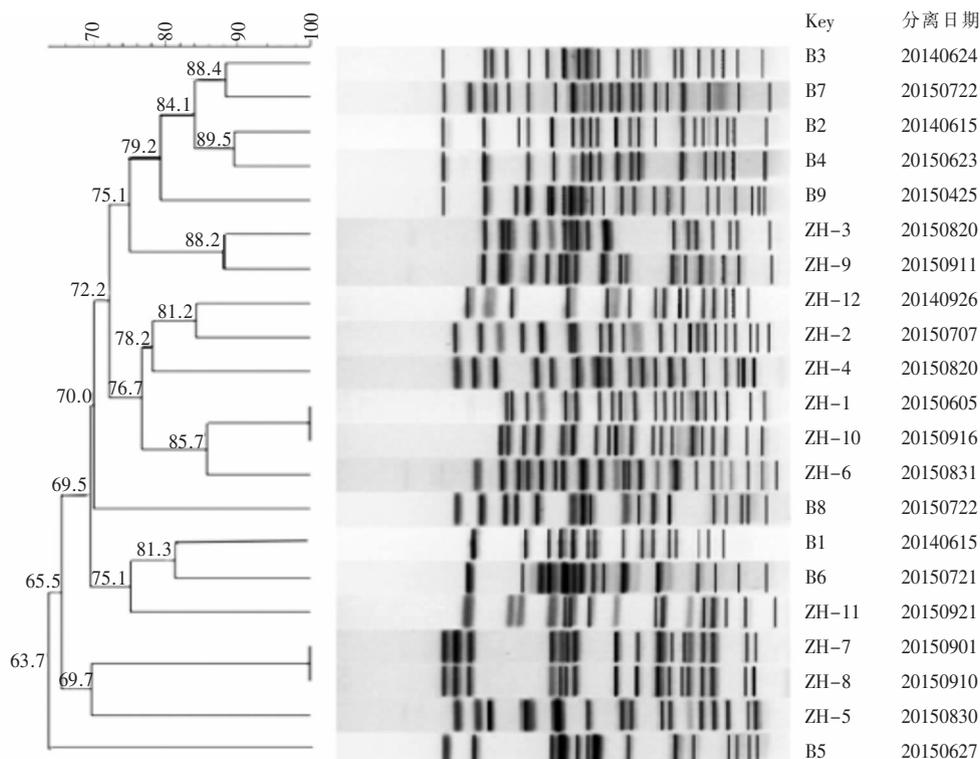


图 2 韶关市食源性产 ESBLs 大肠埃希菌 PFGE 图谱的聚类分析图

Figure 2 PFGE cluster analysis of foodborne-associated ESBLs-producing *E. coli* in Shaoguan



注: B1~B9 为韶关市腹泻患者检出菌株; ZH-1~ZH-12 为珠海市腹泻患者检出菌株

图 3 珠海市与韶关市患者分离的产 ESBLs 大肠埃希菌 PFGE 图谱聚类分析图

Figure 3 PFGE cluster analysis of ESBLs-producing *E. coli* isolated from patients in Zhuhai and Shaoguan

3 讨论

大肠埃希菌是国际公认的卫生监测指示菌,主要经食物传播,近年该菌引起的食源性疾病在世界范围内呈上升趋势^[4]。韶关市多年监测数据^[5]表明,致腹泻大肠埃希菌是引发当地肠道传染病暴发的主要病原菌,占病原体的 59.79%。食品、生活饮用水、食源性动物、食品加工与公共场所从业人员是食源性疾病的主要传播介质。本研究监测了上述传播介质中大肠埃希菌的携带情况,共检出 147 株大肠埃希菌,从生活饮用水、食源性动物和腹泻患者标本中检出 11 株致腹泻大肠埃希菌,血清型比较分散,无聚集。此外,从生活饮用水、食源性动物、健康从业人员和腹泻患者标本中检出产 ESBLs 大肠埃希菌 29 株,其中腹泻患者分离的 2 株致腹泻大肠埃希菌同时产 ESBLs,本研究显示韶关市食源性疾病传播介质中,致腹泻大肠埃希菌和产 ESBLs 大肠埃希菌呈一定比例分布。大肠埃希菌是耐药基因的重要储存库,在耐药基因的传播中发挥重要作用,食源性产 ESBLs 大肠埃希菌可通过食物链进入人体,一旦在肠道中定植,其耐药基因可在不同菌株之间

传播,临床治疗非常困难,造成的危害不亚于由致病菌引起的暴发性疾病。

PFGE 具有对肠道致病菌的分型能力强,易于分析和标准化等优点,被誉为细菌分子分型技术的“金标准”^[6]。通过对 PFGE 图谱进行分析,能识别不同来源菌株间的亲缘关系。目前已被广泛应用于食源性疾病溯源、传染病的流行监测、病原菌耐药性研究等方面^[7-8]。本研究应用 PFGE 技术对 29 株食源性产 ESBLs 大肠埃希菌进行分子分型,按照 90% 的相似度分为 21 个聚类群,大部分菌株呈散发克隆分布,目前未出现大规模的流行克隆。值得关注的是,聚类 A 群中包含了 7 株分离菌,多于其他聚类群,为韶关市食源性产 ESBLs 大肠埃希菌的主要流行型别,其中 5 株菌分离于食品加工或公共场所健康从业人员,编号 J2、J7、J9 三株分离菌带型相同,提示在本市健康从业人员间存在着相同克隆,一旦带菌者严重聚集或通过食品加工环节传播该菌,可能会引起疾病的暴发。山泉水分离菌(S3)与腹泻患者分离菌(B4)、4 株健康从业人员分离菌(J2、J3、J7、J9) 的相似性系数均 > 90.0%。山泉水于 2015 年 5 月采自本市市中心某山上,该采水点为市民私自开发引流,无任何消毒处理设施,在同年 6 月

获得患者分离菌,同年 7 月获得健康从业人员分离菌,上述标本的采样时间虽不同,但患者和健康从业人员的居住和工作地点与水源为同一片区,菌株间表现出高度的相似性,怀疑这几株菌的分离人群可能饮用受污染的水源或食用被水源污染的食物,提示产 ESBLs 大肠埃希菌可能在环境、水、食品和人中相互传播。因此,通过对环境、水、食品 and 从业人员的主动监测,有利于查找感染性事件发生的传染源和传播途径,指导采取正确的防治措施。

本研究未发现产 ESBLs 大肠埃希菌在不同种群间(即鸡与猪、鸡与鸭、鸡与人、猪与人)存在克隆性的传播,与佟盼盼^[9]的研究结果一致,但带菌动物的粪便有可能通过污染水源、食物或食品加工环节而感染人体,对人体健康存在潜在的威胁,应加强主动监测。另外,韶关市与珠海市两地的孤立病例呈散发分布,与临床研究^[10-11]结果一致,认为外源性感染或社区感染是孤立病例产 ESBLs 大肠埃希菌感染的主要途径,张帅^[12]推测,食品也可能是肠外致腹泻大肠埃希菌致病的传播媒介。

由于食源性标本的种类多,来源范围广,本研究在标本类型和数量的设计上存在一定的局限性,另外,本研究的病例是分散型病例,缺乏完整的流行病学资料,仅以 PFGE 溯源识别菌株的亲缘关系,无法确认病例的感染是否经食物链导致,需在日后进一步的研究中加以改善。

韶关市食源性产 ESBLs 大肠埃希菌在食品、水、动物和人群中广泛分布,PFGE 分型结果提示韶关市食源性产 ESBLs 大肠埃希菌可能通过食物链相互传播,应加强监测,防止进一步扩散。PFGE 可分析病例、可疑食品及污染环节中病原菌间的遗传相关性,起到明确诊断及早期预警作用,建议韶关市疾病防控部门尽早将 PFGE 技术应用于食源性致

病菌的分析研究,建立以 PFGE 技术为核心的食源性疾病监测溯源网络,为本市的食源性疾病和传染病的防控提供技术保障。

[参 考 文 献]

- [1] 魏公铭,王薇. 中国的食品安全应高度关注微生物引起的食源性疾病[N]. 中国食品报,2012-10-24.
- [2] 赵怀龙,付留杰,唐功臣. 我国主要的食源性致病菌[J]. 医学动物防制,2012,28(11):1212-1216.
- [3] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2333-2339.
- [4] 徐进,付萍. 1998-2002 年美国食源性疾病暴发监测[J]. 中国食品卫生杂志,2009,21(5):446-449.
- [5] 邓俊兴,宾羽琳,唐建红,等. 韶关市肠道传染病暴发疫情病原学检测结果分析[J]. 医学检验与临床,2014,25(3):75-76.
- [6] 陆水英,陈维贤. 细菌分子生物学分型技术进展[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(14):1716-1718.
- [7] 张磊,李瑞,宋晓昀,等. 脉冲场凝胶电泳在食源性疾病溯源中的应用[J]. 实用预防医学,2013,20(11):1407-1409.
- [8] 白书媛,刘淑岭,高波,等. 2011-2013 年北京某城区感染性腹泻患者致病菌检测分析[J]. 中国感染控制杂志,2015,14(6):361-365.
- [9] 佟盼盼. 鸡粪便菌耐药基因及其产 ESBLs 大肠杆菌耐药性的研究[D]. 长春:吉林大学,2015.
- [10] 许青霞,潘军,孙明月,等. 肿瘤专科医院临床和环境标本中产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌流行病学调查[J]. 中华传染病杂志,2015,33(8):490-493.
- [11] 李晓军,邓明惠,张波,等. 产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌所致社区获得性血流感染特征分析[J]. 中华医学杂志,2015,95(26):2084-2089.
- [12] 张帅. 食源性与医源性大肠埃希菌相关性分析[D]. 贵阳:贵阳医学院,2015.

(本文编辑:豆清娅)