

华南地区食品中非 O157 致泻大肠杆菌分布特点及分型研究

张淑红, 杨广珠, 赖泽冰, 吴清平, 张菊梅

(广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东广州 510070)

摘要: 为深入了解华南地区食品中非O157致泻大肠杆菌(DEC)的污染分布情况和特点, 本研究随机采集了该地区12个城市的食品样品, 参考GB/T 4789.36-2003方法进行检测, 并利用多重PCR对DEC进行了分子鉴定。另外, 分别采用MLST分型方法和药敏纸片法对DEC菌株的遗传特性和耐药性进行了分析。结果表明, 1000份样品中有164份检出DEC, 总污染率高达16.4%。肉类和水产品污染较严重。在五种DEC中, EPEC检出率最高(8.0%), 其次为ETEC(6.2%), EIEC(3.4%)和STEC(0.4%)。样品中共分离到207株DEC。MLST分型产生了58种ST型, 其中44个为已报道的ST型, 14个为数据库中新的ST型。聚类分析表明这些菌株共有8个克隆复合物(CC), CC10为其中最大的一个。DEC菌株对四环素、复方新诺明、氨苄西林、头孢噻吩和氯霉素等具有高抗性。有关部门应加强非O157致泻大肠杆菌的监控, 减少食源性疾病的发生。

关键词: 食品; 致泻大肠杆菌; 污染分布; 毒力基因; MLST分子分型; 耐药性

文章编号: 1673-9078(2017)3-266-273

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.040

Distribution and Molecular Typing (MLST) of Non-O157 Diarrheagenic

Escherichia coli Isolated from Retail Foods in South China

ZHANG Shu-hong, YANG Guang-zhu, LAI Ze-bing, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei

(Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: To investigate the distribution and characteristics of non-O157 diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) contamination in retail foods in south China, food samples from 12 cities in this region were collected randomly and examined using the GB/T 4789.36-2003 method, and the molecular identification of DEC was conducted using multiplex polymerase chain reaction. In addition, multilocus sequence typing (MLST) and the paper disk method were used to analyze the genetic characteristics and drug resistance of DEC strains. The results showed that DEC was detected in 164 samples from 1000 food samples, with a total contamination rate of 16.4%. Severe contaminations were found in meat and aquatic products. Of the five DEC pathotypes tested, enteropathogenic *E. coli* showed the highest detection rate (8.0%), followed by enterotoxigenic *E. coli* (6.2%), enteroinvasive *E. coli* (3.4%), and Shiga toxin-producing *E. coli* (0.4%). A total of 207 DEC isolates was obtained, and the MLST results showed 58 different sequence types (STs), including 44 reported STs and 14 novel STs. Cluster analysis indicated that eight clonal complexes (CCs) were obtained in these isolates, among which CC10 was the largest. The DEC isolates showed high resistance to tetracycline (72.5%), trimethoprim-sulfamethoxazole (66.2%), cephalothin (50.7%), ampicillin (56.5%), and chloramphenicol (48.3%). The results of this study indicate that related agencies should strengthen the monitoring of non-O157 DEC to reduce the risk of outbreaks of foodborne diseases.

Key words: food; diarrheagenic *Escherichia coli*; contamination distribution; virulence genes; antibiotic resistance; multilocus sequence typing (MLST)

收稿日期: 2016-03-01

基金项目: 国家国际科技合作专项(2013BAD, 16B05); 广东省科技计划项目(2014B050504007)

作者简介: 张淑红(1978-), 女, 副研究员, 研究方向: 食品微生物安全检测技术

通讯作者: 吴清平(1962-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品微生物安全检测与控制技术

大肠杆菌是食品中重要的卫生指示菌,可分为致病性和非致病两类。致病性大肠杆菌,也称“致泻大肠杆菌”(Diarrheagenic *Escherichia coli*, DEC),是引起全球感染性腹泻的重要病原菌。在我国,DEC曾被列为90年代食品中四大致病菌之首^[1]。根据其毒力因子、致病机理及遗传特点,DEC可分为致病性大肠杆菌(EPEC)、产毒性大肠杆菌(ETEC)、侵袭性大肠杆菌(EIEC)、出血性大肠杆菌(EHEC)和聚集性大肠杆菌(EAEC)^[2]五大类。

目前,许多食品或临床检验实验室仍主要沿用传统的血清型方法对DEC进行鉴定。尽管这种方法在区分某些特定血清型方面具有重要作用,但是单以血清型方法鉴定DEC可能是不可靠的,因为近年来越来越多的文献报道血清型与毒力因子之间没有明确的对应关系^[3]。因此,许多学者建立了以毒力基因为基础的多重PCR方法对不同类型的DEC进行鉴定。这些分子方法具有高效、灵敏等特点,可弥补传统血清型方法的鉴定不足,并且可实现大批量菌株的快速筛选和鉴定^[4-7]。

除了毒力因子鉴定方法,许多分子分型方法被也逐步应用于病原菌污染调查和遗传特性研究中,如脉冲场凝胶电泳(PFGE)、多位点序列分型(MLST)和ERIC-PCR分子分型等^[8-10]。PFGE被广泛认为是细菌分型的“金标准”,但是操作复杂,对操作人员的技术要求较高。MLST是一种以核苷酸序列为基础的分子分型方法,主要根据管家基因序列的多态性进行分型。MLST操作简单,结果能快速得到并且便于不同实验室的比较。因此,MLST已经成为当前细菌分子流行病学研究的一种重要方法。

DEC引起的腹泻大多是自限性的,一般不需要抗生素治疗。但是对一些年幼者或者免疫力较低的人群,抗生素治疗通常是需要的。随着抗生素的广泛应用,抗性大肠杆菌菌株越来越多^[11-12]。监测食品中DEC的抗性变化是十分必要的,这对未来抗生素的选择具有重要指导意义。

在我国,尽管已有部分省市开展了DEC污染调查,但是这些数据多来源于临床样本或细菌性疾病监测点,食品中DEC污染状况及分子特点的数据仍比较缺乏。华南地区地处热带,食品容易受到各种微生物污染。因此,为深入了解食品中的DEC的污染分布情况,本研究对超市和集贸市场的食品进行了调查,采用多重PCR方法对分离株的毒力基因进行了检测,统计了不同类型DEC的污染情况,并运用MLST分子分型对菌株的遗传多样性进行分析,为预防和控制致泻大肠杆菌疾病的暴发提供重要参考数据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2011年7月~2012年12月,随机采集华南地区12个城市(广州、深圳、河源、汕头、湛江、韶关、福州、厦门、北海、南宁、海口和三亚)超市和集贸市场的1000份样品,包括294份生鲜肉,186份水产品,296份熟食和224份蔬菜。按照GB/T 4789.6-2003^[13]中样品处理规则,所有样品保存于4℃冰盒,4h内送实验室检验。

1.2 标准菌株

EPEC O44:K74 (*eaeA*+*bfpA*+), ETEC O25:K7 (*lt*+*st*+), STEC O157:H7 ATCC 35150 (*eaeA*+*stx1*+*stx2*+), EIEC O28:K73 (*ipaH*+), 和 EAEC O42:K? (*pCVD432*+*aggR*+)作为阳性对照,大肠杆菌 ATCC 25922 为阴性对照,以上质控均菌株由本单位广东省微生物分析检测中心提供。

1.3 培养基和试剂

乳糖胆盐发酵培养基、大肠杆菌显色培养基、营养琼脂平板、生理盐水、氧化酶试纸和琼脂糖等购自广东环凯微生物科技有限公司。API 20E生化鉴定试剂盒购自法国生物梅里埃公司,大肠埃希氏菌诊断血清购自宁波天润生物药业有限公司,2×PCR Mix 购自东盛生物科技有限公司,其他PCR试剂和电泳相关试剂购自TaKaRa公司。引物由华大基因合成。Mueller-Hinton琼脂和药敏纸片均购自英国Oxoid公司。

1.4 主要仪器设备

Biometra TProfessional PCR仪(德国Biometra公司);电泳仪(EP301、EP501和EP3501)(瑞典安玛西亚公司);凝胶分析成像系统UVI(英国GE Healthcare公司)。

1.5 方法

参照GB/T 4789.6-2003《食品卫生微生物学检验致泻大肠埃希氏菌检验》^[13]方法,略改动。无菌称取25g样品置入225mL营养肉汤,均质打碎1min。按照9管法对样品处理液进行梯度稀释,各取 10^{-1} ~ 10^{-3} 不同浓度的样品处理液1mL分别接种到3管乳糖胆盐发酵管中,即每个梯度3个重复。36℃±1℃培养18~24h后,将乳糖发酵阳性管中的增菌液划线接种

大肠杆菌显色培养基, 37 °C培养 18~24 h。

1.5.1 菌株生化鉴定

从每个显色平板上挑取 1~2 个蓝色可疑菌落, 在营养琼脂平板纯化后, 用 API-20E、MID-64 和 MID-65 生化鉴定条对菌株进行鉴定。

1.5.2 菌株多重 PCR 鉴定

采用煮沸法提取菌株的基因组 DNA, 并参考文献中的方法对 DEC 进行分子鉴定^[3-5,7]。PCR 引物序列、反应体系扩增条件及产物大小见表 1。反应体系为 25 μ L, 其中包括 2 \times PCR Mix 12.5 μ L, 引物 200~400 nmol/L, ddH₂O 6.5 μ L, DNA 模板 200 ng。扩增反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 58 °C 退火 1 min; 72 °C 延伸 1 min, 共进行 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 扩增后产物于 4 °C 保存。以不同致

病类型 DEC 为阳性对照, *E.coli* ATCC 25922 为阴性对照, PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 用凝胶成像分析系统观察结果。

1.5.3 多位点序列分型(MLST)

采用细菌基因组提取试剂盒提取菌株 DNA, 按照 *E. coli* MLST 数据库(<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) 提供的大肠杆菌 MLST 分型方案, 选择 7 个管家基因 *adhA*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA* 和 *recA* 进行 PCR 扩增。PCR 引物序列、反应体系扩增条件及产物大小见表 1。将 PCR 产物纯化后, 送华大基因进行双向测序。采用 SeqMan II 软件对等位基因序列进行拼接和校正, 将校正后的序列在 *E. coli* MLST 数据库中进行比对, 根据 7 个管家基因的组合获得相应的 ST 型, 并利用 eBURST V3 软件构建遗传进化图谱。

表 1 毒力基因的 PCR 引物序列

Table 1 PCR primers for detecting virulence genes

致病型	毒力基因	引物序列(5'-3')	扩增片段大小/bp	参考文献
EPEC	<i>eaeA</i>	F: CTGAACGGCGATTACGCGAA	917	Mahmoud, 2012
		R: CCAGACGATACGATCCAG		
	<i>bfpA</i>	F: AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326	
		R: GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		
ETEC	<i>lt</i>	F: GGCGACAGATTATACCGTGC	450	
		R: CGGTCTCTATATCCCTGTT		
	<i>st</i>	F: ATTTTCTTCTGIAATTRICTT	190	
		R: CACCCGGTACARGCAGGATT		
EIEC	<i>ipaH</i>	F: GTTCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC	600	
STEC	<i>stx1</i>	F: ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180	Paton, Paton. 1998
		R: AGAACGCCACTGAGATCATC		
	<i>stx2</i>	F: GGCACTGICTGAAACTGCTCC	255	
		R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
EAEC	<i>pCVD432</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	630	Schmidt et al., 1995
		CAATGTATAGAAATCCGCTGTT		
	<i>aggR</i>	F: ACGCAGAGTTGCCTGATAAAG	254	Toma et al., 2003
		R: AATACAGAATCGTCAGCATCAGC		

1.5.4 抗生素抗性测定

药敏实验采用纸片琼脂扩散法 (K-B 法), 参照美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 2011 年版的标准进行结果判定^[14]。选择 15 种临床和农牧业生产中常用的抗生素, 进行药敏实验。药敏纸片包括氨苄西林 (ampicillin, 10 μ g), 阿莫西林-克拉维酸 (amoxicillin-clavulanic acid, 30 μ g), 头孢他啶 (ceftazidime, 30 μ g), 头孢噻肟 (cefotaxime, 30 μ g), 头孢西丁 (cefoxitin, 30 μ g), 头孢噻吩 (cephalothin, 30 μ g), 卡那霉素 (kanamycin 30 μ g), 庆大霉素 (gentamicin, 10 μ g),

链霉素 (streptomycin, 10 μ g), 诺氟沙星 (norfloxacin, 10 μ g), 环丙沙星 (ciprofloxacin, 5 μ g), 奈定酮酸 (nalidixic acid, 30 μ g), 氯霉素 (chloramphenicol, 30 μ g), 复方新诺明 (trimethoprim-sulfamethoxazole, 25 μ g) 和四环素 (tetracycline, 30 μ g)。以大肠杆菌 ATCC 25922 和金黄色葡萄球菌 ATCC25923 作为质控菌株, 根据抑菌圈大小判定菌株敏感 (sensitivity, S), 中介 (intermediate, I) 或耐药 (resistance, R)

2 结果与分析

2.1 食品中 DEC 污染分布情况

通过 API20E 和 MID 生化鉴定,从样品中分离到大肠杆菌 893 株,其中 207 株经多重 PCR 鉴定为致泻大肠杆菌 DEC,包括 88 株 EPEC,77 株 ETEC,38 株 EIEC 和 4 株 STEC。从样品检测结果看,1000 份

食品样品中,有 164 份检出 DEC,总污染率为 16.4% (如表 2)。EPEC、ETEC、EIEC 和 STEC 检出率分别为 8.0%、6.2%、3.4%和 0.4%。14 阳性样品中检出了 2 种致泻大肠杆菌,1 份阳性样品中检出了 3 种致泻大肠杆菌。从食品类型来看,水产品的阳性率最高 (21.5%),其次为肉类食品,阳性率 20.4%。

表 2 不同类型食品中致泻大肠杆菌污染分布情况

Table 2 Distribution of diarrheagenic *E. coli* contamination in different food samples

样品种类	数量	阳性样品数量(阳性率/%)	不同类型 DEC 阳性样品(阳性率/%)			
			EPEC	ETEC	EIEC	STEC
肉与肉制品	294	60 (20.4)	31(10.5)	22(7.5)	11(3.7)	4(1.4)
水产品	186	40 (21.5)	22(11.8)	13(7.0)	9(4.8)	0
熟食类	296	34 (11.5)	13(4.4)	16(5.4)	8(2.7)	0
蔬菜	224	30 (13.4)	14(6.3)	11(4.9)	6(2.7)	0
总计	1000	164(16.4)	80(8.0)	62(6.2)	34(3.4)	4(0.4)

2.2 毒力因子分布情况

菌株携带毒力基因情况如表 3 所示。88 株 EPEC 菌株中,81 株 (92.0%) 携带 *eaeA* 基因,7 株 (8.0%) 同时携带 *eaeA* 和 *bfpA* 基因。在 77 株 ETEC 分离株中,

47 株 (61.0%) 携带 *st* 基因,7 株 (9.1%) 携带 *lt* 基因,23 株 (29.9%) 同时携带 *lt* 和 *st* 基因。所有的 38 株 EIEC 都携带 *ipaH* 基因,另外,4 株 STEC 中,3 株均携带 *eaeA* 和 *stx1* 基因,1 株同时携带 *eaeA*、*stx2* 和 *stx1* 基因。

表 3 致泻大肠杆菌毒力基因分布和 MLST 基因分型情况

Table 3 Distribution of virulence genes and MLST genotypes among diarrheagenic *E. coli* isolates

致病型/菌株数量	毒力基因/菌株数量	MLST 基因型/菌株数量
EPEC (88)	<i>eaeA</i> (81), <i>eaeA+bfpA</i> (7)	ST10 (14), ST5076* (1), ST117 (6), ST5047* (1), ST196 (5), ST101 (6), ST746 (3), ST1147 (1), ST191 (3), ST155 (5), ST48 (3), ST398 (3), ST 789 (3), ST5058* (1), ST5059* (1), ST2473 (2), ST218 (4), ST716 (3), ST223 (5), ST711 (4), ST5065* (1), ST1684 (2), ST5078* (1), ST1079 (1), ST216 (3), ST641 (1), ST602 (4), ST5066* (1)
ETEC (77)	<i>lt</i> (7), <i>st</i> (47), <i>lt+st</i> (23)	ST10 (26), ST101 (9), ST48 (7), ST1246 (4), ST5073* (1), ST58 (2), ST278 (3), ST5075* (1), ST5072* (1), ST898 (1), ST155 (3), ST2309 (5), ST1972 (1), ST2251 (2), ST409 (3), ST5085* (1), ST602 (2), ST448 (3), ST2705 (1), ST5043* (1)
EIEC (38)	<i>ipaH</i> (38)	ST10 (6), ST215 (2), ST224 (1), ST155 (4), ST101 (3), ST641 (1), ST196 (2), ST4417 (1), ST1426 (1), ST616 (2), ST345 (1), ST2914(1), ST5083*(1), ST2179(1), ST5082*(1), ST1308(2), ST197 (1), ST117 (1), ST226 (3), ST1246 (1), ST5073 (1), ST409 (1)
STEC (4)	<i>eaeA+stx1</i> (3), <i>eaeA+stx2+stx1</i> (1)	ST10 (1), ST297 (2), ST93 (1)

注：“*”为新 ST 型。

2.3 MLST 分型结果

MLST 分型结果显示,207 株 DEC 分离株产生了 58 种不同的 ST 型,包括 14 个新的 ST 型。在这 14 个新 ST 型中,11 个 ST 型是由 7 个管家基因的新组合 (ST5043、ST5047、ST5058、ST5059、ST5065、ST5066、ST5073、

ST5072、ST5085、T5083 和 ST5082) 产生的,其余 3 个新 ST 型是由单个等位基因序列变化产生的 (purA 367, *icd* 502 和 *icd* 501) (表 3)。eburst 软件聚类分析结果显示,58 种 ST 型中产生了 8 个克隆复合体 Clone Complexes (CCs) 和 50 个单一体 (Singleton) (图 1)。8 个 CCs 菌株占全部菌株的 52.7%,其中 CC10 为最流行

的克隆复合体。这一克隆复合体中包含了多个ST型，分别为ST10 (47/207; 22.7%)、ST48 (13/207; 6.3%)、ST215 (2/207; 1.0%)、ST218 (4/207; 1.9%) ST789 (3/207; 2.1%) 和ST5072 (1/207; 0.5%)，表明这些ST型在我国华南地区食品中广泛分布和流行的。

2.4 药敏实验结果

抗生素结果表明155 (74.9%) 株菌株抗两种或两种以上抗生素，133 (64.3%) 株抗三种以上抗生素 (Table 4, Table 5)。菌株对四环素 (72.5%)、复方新诺明 (66.2%)、头孢噻吩 (50.7%)、氨苄西林 (56.5%) 和氯霉素 (48.3%) 等具有较高的抗性。大部分菌株对头孢他啶、头孢噻肟、头孢西丁、奈定酮酸、环丙沙星和庆大霉素敏感。另外，从抗性谱来看，抗性谱

种类是多样的。菌株出现了9种常见的抗性谱，其中最常见模式是“AMP-C-TE-SXT”。

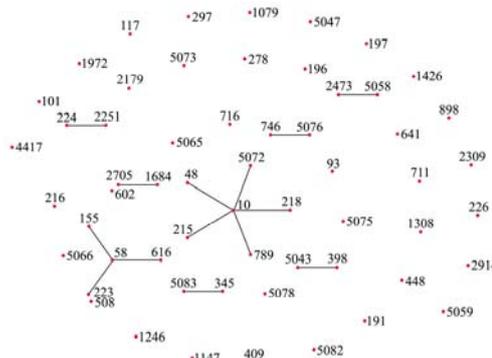


图1 致泻大肠杆菌分离株的MLST遗传聚类图
Fig.1 MLST genetic profile of DEC isolates

表4 致泻大肠杆菌药敏实验结果

Table 4 Antimicrobial resistance of 207 DEC isolates

抗生素种类/浓度	不同类型 DEC 菌株抗生素抗性情况				
	抗性菌株数量 (百分率)	EPEC (88)	ETEC (77)	EIEC (38)	STEC (4)
	DEC (207)				
<i>β</i> -lactams					
AMP (10 μg)	117 (56.5)	55 (62.5)	45 (58.4)	13 (3.42)	4 (100)
AMC (30 μg)	22 (10.6)	9 (10.2)	11 (14.3)	2 (5.3)	0
KF (30 μg)	105 (50.7)	52 (59.1)	34 (44.2)	17 (44.7)	2 (50.0)
CAZ (30 μg)	11 (5.3)	4 (4.5)	5 (6.5)	0	2 (50.0)
CTX (30 μg)	3 (1.4)	1 (1.1)	1 (1.3)	0	1 (25.0)
FOX (30 μg)	3 (1.4)	1 (1.1)	1 (1.3)	1 (2.6)	0
Quinolones and fluoroquinolones					
NA (30 μg)	10 (4.8)	5 (5.7)	4 (5.2)	1 (2.6)	0
CIP (5 μg)	8 (3.9)	5 (5.7)	3 (3.9)	0	0
NOR (10 μg)	23 (11.1)	12 (13.6)	6 (7.8)	5 (13.2)	0
Aminoglycosides					
CN (10 μg)	11 (5.3)	4 (4.5)	5 (6.5)	2 (5.3)	0
K (30 μg)	31 (15.0)	14 (15.9)	12 (15.6)	3 (7.9)	2 (50.0)
S (10 μg)	48 (23.2)	22 (25.0)	16 (20.8)	6 (15.8)	4 (100)
Phenicols					
C (30 μg)	100 (48.3)	41 (46.6)	43 (55.8)	15 (39.5)	1 (25.0)
Sulfonamides and synergistic agents					
SXT (25 μg)	137 (66.2)	55 (62.5)	55 (71.4)	23 (60.5)	4 (100)
Tetracyclines					
TE (30 μg)	150 (72.5)	60 (68.2)	61 (79.10)	25 (65.8)	4 (100)

注: AMP: ampicillin; AMC: amoxicillin-clavulanic acid; CAZ: ceftazidime; CTX: cefotaxime; FOX: cefoxitin; KF: cephalothin; K: kanamycin; CN: gentamicin; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacin; NA: nalidixic acid; C: chloramphenicol; SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole; S: streptomycin; TE: tetracycline.

表5 致泻大肠杆菌的耐药谱

Table 5 Antibiotic resistance patterns of 207 diarrheagenic *E. coli* isolates from retail foods

抗生素数量	菌株数量 (百分率)	最常见抗性谱 (菌株数)
0	27 (13.0)	-
1	25 (12.1)	KF (19)
2	22 (10.6)	TE-SXT (8)
3	22 (10.6)	C-TE-SXT (6)
4	30 (14.5)	AMP- C-TE-SXT (15)
5	30 (14.5)	AMP- KF-C-TE-SXT (13)
6	18 (8.7)	AMP- KF-C-TE-SXT-S (6)
7	12 (5.8)	AMP- KF-C-TE-SXT-NOR-S (2)
8	13 (6.3)	AMP-AMC-KF-C-TE-SXT-CIP-S (2)
9	5 (2.4)	No common patterns
10	1 (0.5)	AMP-AMC-KF-C-K- CN-TE-SXT-NA-NOR
11	2 (1.0)	No common patterns

3 结论

3.1 致泻大肠杆菌是一类重要的食源性致病菌,可引起食物中毒、水源性腹泻暴发和医源性感染等。监测食品中的 DEC 对于预防和控制食源性疾病爆发是非常重要的。在我国,食品检测机构通常将大肠杆菌作为食品中粪便污染的指示菌进行检测,而对致泻大肠杆菌特别是非 O157 致泻大肠杆菌及菌株分子特点很少开展深入研究,其在食品中潜在的风险尚不清楚。另外,以往的研究报道多采用传统血清学方法进行致泻大肠杆菌的鉴定,尽管此方法在鉴定某些常见血清型方面具有重要辅助作用,但是由于大肠杆菌血清型较多,不同致病类型的大肠杆菌血清型有时存在交叉凝集现象,因此,单以血清型为基础的鉴定方法可能是不准确的。考虑到以上问题,本研究采用了多重 PCR 对 DEC 菌株进行分子鉴定,首次系统调查了华南地区超市和集贸市场食品中 DEC 的污染情况。结果发现 16.4% 的市售食品样品污染了 DEC,表明食品的卫生状况较差。本次调查中 DEC 的污染率远高于广东省的调查数据以及韩国和墨西哥报道的数据^[11,15,16]。这些数据应当引起食品安全监控部门的重视。

3.2 在五类 DEC 中,EPEC 是最为流行的 DEC 类型,检出率达到 8.0%。EPEC 分为典型 EPEC (tEPEC) 和非典型 EPEC (aEPEC)^[17]。tEPEC 菌株同时携带 *eaeA* 和 *bfp* 两种基因,而 aEPEC 菌株只携带 *eaeA* 基因。本研究中,tEPEC 和 aEPEC 菌株分别为 8.0% 和 92.0%,非典型 EPEC 在食品中比 tEPEC 更普遍,这一结果与以往文献报道的基本一致^[11]。国内外近年来的研究表明,tEPEC 引起的感染有所下降,而 aEPEC 引起的感染在逐渐增加^[18]。无论在发达国家还是发展中国家,

aEPEC 都属于新现的致病类型^[19,20],某些菌株还具有与 STEC 类似的致病特点。我国已有 aEPEC 引起的食源性疾病爆发的报道^[21]。因此,这一类型菌株在未来应重点监测。此外,本次调查中有 4 份肉类样品检出 STEC。血清学结果表明,4 株 STEC 均为非 O157 型(2 株 O111 和 2 株 O26),这两种血清型已在全球范围内受到广泛关注。欧洲和美国的报道显示,非 O157 STEC 引起的食源性疾病感染比 O157 更普遍^[22,23]。在我国,相关部门对 STEC 监测主要以 O157 为主,而对其他 STEC 血清型较少开展系统调查^[24]。从本研究结果看,肉类仍是重点追踪的样品类型,评估食品中 STEC 的污染风险需要进一步加强。

3.3 随着测序技术成本的降低以及分析软件的发展,MLST 逐渐成为细菌的常规分型方法。本研究采用 MLST 技术首次对华南地区分离的 DEC 菌株进行了分子分型。从数据库中的数据看,我国提供的食品中致泻大肠杆菌 MLST 信息仍是非常少的。本研究发现华南地区食品 DEC 菌株存在较高的遗传多样性。调查中共获得了 58 个不同 ST 型,其中 44 个 ST 型是国际上已报道的,其中一些重要的血清型(ST10、ST155、ST101、ST117、ST48、ST297、ST602 和 ST93),已经在欧洲、北美、非洲、澳大利亚和中国等多个国家爆发流行,是大多数国家普遍流行的类型。通过聚类分析,我们发现四种不同致病类型的致泻大肠杆菌其 ST 型基本上是不同的。但最常见的遗传关系是 CC10、CC155 和 ST101 等克隆复合体,这几种 ST 复合体与人类感染密切相关 (<http://mlst.ucc.ie>)。因此,食品中存在这些菌株对消费者构成了潜在威胁。

3.4 细菌的多重耐药一直是全球关注的重点问题。本研究发现超过 60% 的 DEC 具有多重耐药性(抗三种

以上抗生素)。菌株对四环素、复方新诺明、氨苄西林和头孢噻吩等具有高度抗性,这与以往国外报道的情况基本一致^[10,25,26]。氨苄西林、头孢噻吩和复方新诺明被广泛用于处理肠杆菌科细菌感染,或作为畜牧养殖中的促生长素。DEC 的对这些抗生素的高抗性可能与这些抗生素在临床和畜牧业中的大量使用有关。氯霉素是一种被许多国家禁止在畜牧业中使用的抗生素。以往的研究表明,DEC 或大肠杆菌对氯霉素比较敏感^[11,27],然而本研究中 DEC 对氯霉素具有高抗性 48.3%,表明氯霉素在中国没有规范使用。另外,尽管多数菌株对三代头孢、糖苷类和喹诺酮类抗生素敏感,我们也分离到少数抗 β -内酰胺酶类抗生素的菌株,甚至发现了一些抗 7~9 种抗生素的菌株,这种情况是非常令人担忧的。由于抗菌菌株可能通过食物链进入人体,造成产生危害,因此,持续监测食品菌株的抗性和抗性谱是十分必要的。有关部门也应严格监管抗生素的使用,防止耐药株的传播。

3.5 综上所述,华南地区食品中存在高的 DEC 污染率,分离株大部分均具有多重耐药性,某些 ST 型菌株具有引起人类感染的潜在风险。因此,加强食品中非 O157 致病大肠杆菌的监测十分必要,特别是即食类食品(熟食和部分水产品)。此次调查数据可以为相关部门制定食品安全政策提供有力的数据支撑,同时可为消费者了解食品安全状况提供重要信息。

参考文献

- [1] 严纪文,朱海明,宋曼丹,等.广州市市售食品中致泻性大肠埃希氏菌污染状况调查分析[J].华南预防医学,2002,28(4):37-39
YAN Ji-wen, ZHU Hai-ming, SONG Man-dan, et al. The contamination of diarrheagenic *Escherichia coli* in retail food in Guangzhou [J]. South China Journal of Preventive Medicine, 2002, 28(4): 37-39
- [2] Kaper J B, Nataro J P, Mobley H L. Pathogenic *Escherichia coli* [J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2: 123-140
- [3] Toma C, Lu Y, Higa N, et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(6): 2669-2671
- [4] Schmidt H, Knop C, Franke S, et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(3): 701-705
- [5] Paton A W, Paton J C. Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(2): 598-602
- [6] Kagambèga A, Martikainen O, Lienemann T, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in raw meat and beef intestines sold at local markets in Ouagadougou, Burkina Faso [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(1-2): 154-158
- [7] Mohammed M A M. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from meat products sold at Mansoura city, Egypt [J]. Food Control, 2012, 25(1): 159-164
- [8] Kjelstrup C K, Amesen L P, Granquist E G, et al. Characterization of *Escherichia coli* O78 from an outbreak of septicemia in lambs in Norway [J]. Veterinary Microbiology, 2013, 166(s1-2): 276-280
- [9] Koo H J, Kwak H S, Yoon S H, et al. Phylogenetic group distribution and prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from food samples in South Korea [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(4): 1813-1816
- [10] 王君,吴清平,吴克刚,等.蜡样芽孢杆菌 ERIC-PCR 分子分型方法的建立[J].现代食品科技,2013,29(7):1696-1701
WANG Jun, WU Qing-ping, WU Ke-gang, et al. Establishment of ERIC-PCR molecular typing method for *Bacillus cereus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1696-1701
- [11] Canizalez-Roman A, Gonzalez-Nuñez E, Vidal J E, et al. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 64(1): 36-45
- [12] Cortés P, Blanc V, Mora A, et al. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(9): 2799-2805
- [13] GB/T 4789.6-2003 食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验[S]
GB/T 4789.6-2003 National food safety standard food microbiological examination detection of diarrheagenic *Escherichia coli* [S]
- [14] Wayne P A. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved standard M45-A [J]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011
- [15] 杨冰,王建,朱海明,等.2004-2009 年广东省食品中致泻性大

- 肠埃希菌污染状况及耐药性分析[J]. 华南预防医学, 2011, 37(5):69-71
- YANG Bing, WANG Jian, ZHU Hai-ming, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of diarrheagenic *Escherichia coli* in food samples in Guangdong province from 2004 to 2009 [J]. South China Journal of Preventive Medicine, 2011, 37(5): 69-71
- [16] Lee G Y, Jang H I, Hwang I G, et al. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef poultry and pork in Korea [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 134(3): 196-200
- [17] Trabulsi L R, Keller R, Tardelli Gomes T A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. Emerging Infectious Diseases, 2002, 8(5): 508-513
- [18] Hernandez R T, Elias W P, Vieira M A, et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. Fems Microbiology Letters, 2009, 297(297): 137-149
- [19] Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, et al. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical *Enteropathogenic E. coli* with acute diarrhea [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(1): 93-8
- [20] Contreras C A, Ochoa T J, Lacher D W, et al. Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children [J]. Journal of Medical Microbiology, 2010, 59(Pt1): 25-31
- [21] 陈应坚, 甘莉萍, 金玉娟, 等. 非典型致病性大肠埃希菌引起食物中毒病原学研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(7): 1596-1598
- CHEN Ying-jian, GAN Li-ping, JIN Yu-juan, et al. A study on the etiology of food poisoning caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2012, 22(7): 1596-1598
- [22] Johnson K E, Thorpe C M, Sears C L. The emerging clinical importance of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. Clinical Infectious Diseases, 2006, 43(12): 1587-1595
- [23] Scallan E, Hoekstra R M, Angulo F J, et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens [J]. Emerging Infectious Diseases, 2011, 17(1): 7-15
- [24] 白向宁, 王红, 赵爱兰, 等. 食源性产志贺毒素大肠杆菌的分离及菌株特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(4): 312-316
- BAI Xiang-ning, WANG Hong, ZHAO Ai-lan, et al. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing isolates in foods [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2014, 26(4): 312-316
- [25] Harakeh S, Yassine H, Gharios M, et al. Isolation, molecular characterization and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from meat-based fast food in Lebanon [J]. Science of the Total Environment, 2005, 341(1-3): 33-44
- [26] Paneto B R, Schocken-Iturrino R P, Macedo C, et al. Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil [J]. Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia, 2007, 59(2): 508-512
- [27] Schroeder C M, White D G, Ge B, et al. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in greater Washington, DC, USA [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 85(s1-2): 197-202