

婴幼儿配方粉中克罗诺杆菌属菌株检测方法研究进展

陈万义, 任婧*, 刘振民, 郭本恒

(光明乳业股份有限公司光明乳业研究院, 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436)

摘要: 2008年, 阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 被重新命名并被划分成一个新的属即克罗诺杆菌属 (*Cronobacter* spp.), 是人和动物肠道内寄生的一种革兰氏阴性无芽孢杆菌, 也是一种重要的食源性条件致病菌。2012年, 克罗诺杆菌属被进一步重新分类并包括7个种。该属菌株能引起严重的新生儿脑膜炎、坏死性小肠结肠炎和菌血症, 严重的可引起神经系统后遗症和死亡。目前, 国内外的多篇报道证明婴儿配方粉是其主要的传染源和传播媒介。因此, 准确和快速鉴定克罗诺杆菌属菌株是预防和控制该病原菌的重要举措。本综述简要介绍了截止目前克罗诺杆菌属菌株的主要检测方法, 期望能为我国检测机构提供一定的借鉴和帮助。

关键词: 婴幼儿配方粉; 克罗诺杆菌属; 鉴定; 检测

A Review of Detection Methods for *Cronobacter* spp. in Powder Infant Formula

CHEN Wanyi, REN Jing*, LIU Zhenming, GUO Benheng

(State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Bright Dairy Research Institute, Bright Dairy and Food Co. Ltd., Shanghai 200436, China)

Abstract: *Cronobacter* spp. was originally defined as yellow-pigmented *Enterobacter cloacae* until 1980 when it was designated *Enterobacter sakazakii*, is a Gram-negative opportunistic food-borne pathogen that can cause necrotising enterocolitis, sepsis and meningitis in neonates. Neonates and infants under two months of age are at greater risk of *Cronobacter* infections from consuming *Cronobacter* spp. contaminated powdered infant formula. In 2012, the genus was reclassified to contain seven different species. Rapid and accurate identification of *Cronobacter* strains is important for surveillance, prevention and control of this food-borne pathogen. Moreover, this review summarizes main methods for detection and identification of *Cronobacter* spp., which will be of great benefit to the testing organizations in China.

Key words: powdered infant formula; *Cronobacter* spp.; identification; detection

中图分类号: Q93

文献标志码: A

文章编号: 1671-5187 (2015) 02-0023-06

doi:10.7506/rykxyjs1671-5187-201502006

克罗诺杆菌属 (*Cronobacter* spp.) 即原来的阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*), 是一类革兰氏阴性无芽孢杆菌, 具周身鞭毛和兼性厌氧的细菌^[1]。该类细菌在1980年之前一直被称为阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*), 是一种可导致人畜共患病的条件性致病菌。直到1980年才被正式更名为“阪崎肠杆菌”, 归属于肠杆菌科肠杆菌属, 并包括15个生物型^[2]。2008年, Iversen等^[3-5]根据16S rRNA基因序列、核糖体分型、荧光扩增片段长度多态性 (fluorescent-amplified fragment length polymorphism, f-AFLP) 和DNA-DNA杂交实验对阪崎肠杆菌重新进行系统学分类, 建议将该菌定义为一个新的属, 即克罗诺杆菌属 (*Cronobacter* spp.)。属内包括5个新种 (其中*Cronobacter sakazakii*称为新组合) 和1个克

罗诺杆菌基因种。2012年, Strydom等^[6]根据DNA杂交、表型分型、16S rRNA测序和利用7个看家基因 (*atpD*、*fusA*、*glnS*、*gltB*、*gyrB*、*infB*和*ppsA*; 全长3 036 bp) 的多序列分析方法对克罗诺杆菌属菌株进行了重新分类, 将该属下原来的种进行重新归类并命名了其中两个新种, 包括阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*)、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌 (*Cronobacter malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌 (*Cronobacter turicensis*)、穆汀斯克罗诺杆菌 (*Cronobacter muytjensii*)、康帝蒙提克罗诺杆菌 (*Cronobacter condimenti*)、尤尼沃斯克罗诺杆菌 (*Cronobacter universalis*)、都柏林克罗诺杆菌 (*Cronobacter dublinensis*) 7个种和3个亚种即都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种 (*Cronobacter dublinensis* subsp.

收稿日期: 2014-12-19

基金项目: 上海市经委引进技术的吸收与创新年度计划项目 (14XI-1-15); 科技部农业科技成果转化资金 (2012GB2CO00141)

作者简介: 陈万义 (1975—), 男, 高级工程师, 博士后, 研究方向为食品安全。E-mail: wychen923@126.com

*通信作者: 任婧 (1980—), 女, 高级工程师, 博士, 研究方向为乳品安全。E-mail: renjing@brightdairy.com

dublinensis)、都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种 (*Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis*) 和都柏林克罗诺杆菌乳粉亚种 (*Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi*)。

近十几年来的研究发现, 阪崎克罗诺杆菌是克罗诺杆菌属临床感染病例中最常见的条件致病菌^[7]。出生两个月之内的新生儿或早产儿以及免疫力低下的婴儿都存在通过食用污染有阪崎克罗诺杆菌的婴儿配方粉或通过其他器具而感染阪崎克罗诺杆菌的风险^[8]。感染该菌可引起新生儿脑膜炎, 致死性小肠结肠炎和败血症等严重疾病, 致死率高达40%~80%^[9]。2004年, 中国安徽阜阳劣质婴幼儿配方粉事件引起了我国政府的高度重视。这是国内首次从婴儿配方粉中分离到克罗诺杆菌属菌株(原阪崎肠杆菌菌株)的报道^[10]。尽管在许多临床感染病例中尚不能确定克罗诺杆菌属感染菌株真正的宿主, 同时, 克罗诺杆菌属菌株也曾其他食品中检出。此外, 冲调环境和器皿的污染也是重要的污染源之一。越来越多的国内外报道证明婴儿配方粉是主要的传染源和传播媒介, 而且只有婴儿配方奶粉与疾病的暴发密切相关^[11]。

美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 检验方法是国际检测克罗诺杆菌属菌株的标准生理生化方法^[12], 但该方法存在一定的缺陷。虽然近年来生理生化检测技术在美国FDA方法的基础上取得了很大改善和进步, 但是仍然存在一些不足之处, 所以进一步寻找该菌的生理生化特征为特异性的生化检测提供参考显得很有必要。尽管很多分子方法已应用于克罗诺杆菌属菌株的检测之中, 但我国目前并没有建立一种相对完善和稳定检测实际样品的分子生物学检测技术。因此, 建立快速检测克罗诺杆菌属菌株的分子平台, 为食品检验、临床诊断和流行病学调查提供可靠依据显得很有必要。同时, 对于分子流行病学的研究也是至关重要的。

1 克罗诺杆菌属的检测方法

1.1 生理生化检测方法

目前较常用的检测方法主要有3种, FDA法、DFI (druggan-forsythe-iversen) 法和国标方法 (GB4789.40—2010《微生物学检验阪崎肠杆菌检验》)。2002年, 美国FDA发行了克罗诺杆菌属菌株(当时称阪崎肠杆菌)的检测方法^[13], 该方法包括: 第1步将25 g食品样品加到225 mL碱性蛋白胨水 (BPW, pH 8.0) 中进行预增菌16~24 h。第2步取上述1 mL增菌液加到9 mL肠杆菌营养肉汤 (EE) 中进行增菌16~24 h。两步增菌后, 用接种环取第2次增菌液划线或稀释涂布在结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBG) 平板上进行选择性增菌培养

(37 °C, 16~24 h), 随后挑取5个可疑的典型菌落进一步接种到大豆酪蛋白琼脂培养基 (TSA) 平板上进行进一步纯化及鉴定。将TSA平板在25 °C条件下培养48~72 h后, 挑选黄色或浅黄色菌落用梅里埃公司生产的API 20E试剂条进行鉴定。这个方法的缺陷在于目标菌株在选择性增菌液EE培养基中生长缓慢; 其次在选择性培养基VRBG上目标菌株与某些肠杆菌菌株颜色和菌落形态无明显差异, 因而对挑取可疑菌株增加了难度, 从某种程度上讲有造成误检或漏检的可能性。另外, 在TSA平板上进行25 °C的培养, 48~72 h培养后有些克罗诺杆菌属目标菌落并不一定产生黄色色素或者产生的黄色色素深浅不一, 因而对挑取鉴定的可疑菌落容易遗漏。最后, 由于快速检测试剂条API 20E的生化反应数量较少 (20个), 因此分辨率较低, 鉴定结果容易造成误判^[4]。Guillaume-Genti等^[14]随后对该方法进行了修订并发布了一个可替代FDA方法的新方法, 主要创新点在于更换了二次选择性增菌液, 将EE更换为添加了0.5 mol/L NaCl和10 mg/L万古霉素的改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (mLST)。随后在该方法基础上被进一步修订, 将选择性培养基VRBG更换为另一种显色培养基, 即DFI琼脂, 也就是在TSA培养基中加入5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-葡萄糖苷 (XaGLC) 作为发色集团, 组成显色培养基, 成为DFI琼脂。该方法后来成为国际标准微生物委员会检测婴幼儿配方粉的技术规范。即ISO/TS 22964—2006《乳和乳制品 阪崎肠杆菌的检测》。该方法的检测过程相对更加完善。

由于选择性显色培养基对于目标菌株的分离是至关重要的步骤, 因此各种显色和以荧光显色底物为基质的培养基在最近几年已经广泛应用在克罗诺杆菌属的检测中^[15-17]。这些方法的依据主要是 α -葡萄糖苷酶, 该酶在克罗诺杆菌属菌株中是组成型表达。然而, 由于另外一些细菌菌落在该显色培养基上产生相似的颜色, 主要是指最新报道的几种细菌, 分别为瑞典肠杆菌 (*Enterobacter helveticus*)、苏黎世肠杆菌 (*Enterobacter turicensis*) 和粉尘肠杆菌 (*Enterobacter pulveris*)^[18-19]。这3种肠杆菌不但生存的环境(干燥)与克罗诺杆菌属菌株类似, 且基因组上差别不大, 因此对利用传统培养法和分子生物学方法分离和鉴定克罗诺杆菌属菌株提出了一定的挑战。同时, 有些研究者发现克罗诺杆菌属中的一些种在mLST增菌液中生长十分缓慢^[20], 这对分离该属菌株极为不利。因此, Iversen等^[21]开发了一种新的增菌液, 即CSB (cronobacter screening broth) 增菌液。该增菌液可弥补2次选择增菌液mLST的缺陷, 提高克罗诺杆菌属菌株2次增菌的富集效果, 从而提高食品中克罗诺杆菌属菌株检测的灵敏度和选择性。此外, 如何改良BPW增菌液的配方组成来达到抑

制革兰氏阳性背景干扰菌的生长,从而可能提高样品中革兰氏阴性菌,如克罗诺杆菌属菌株,对将来分离食品中克罗诺杆菌属菌株提出了更高的要求。提高第1步增菌液富集目标革兰氏阴性菌,如沙门氏菌和克罗诺杆菌属,对将来提高检测目标菌的效率具有很高的实用价值。因此,目前利用生理生化方法来分离和鉴定克罗诺杆菌属菌株还不够完美,还需要科研工作者不断努力寻找更好的增菌液和选择性显色培养基。

1.2 分子检测方法

婴幼儿配方乳粉中克罗诺杆菌属菌株的传统分离鉴定方法检测周期长,操作步骤繁琐,检测结果往往也不够十分准确。再加上婴幼儿食品对安全性要求极高,传统的生理生化检测方法已不能满足当今社会的需要,因此提高检测效率已经刻不容缓。因此,以基因为靶标的分子检测方法正逐渐成为克罗诺杆菌属菌株检测研究的热点和趋势所在。近十年来,分子生物学方法正在逐步建立并得到广泛应用,主要有普通聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测方法,荧光定量PCR检测方法和环介导恒温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)方法等,起到了很好的辅助和弥补生理生化缺陷的目的。

1.2.1 菌属的PCR检测方法

大量的分子方法已经被开发并应用于克罗诺杆菌属菌株的特异性鉴定当中。普通PCR和荧光定量PCR方法以其灵敏、特异和快速而最为广泛用于克罗诺杆菌属菌株的检测之中。普通PCR的分子检测靶点包括16S rRNA基因、*ompA*基因、1,6- α -葡萄糖苷酶基因、包涵锌指结构的金属蛋白酶基因(*zpx*)、以DNA促旋酶B亚基基因(*gyrB*)^[21-25]。截止目前,荧光定量PCR使用的分子靶点为16S rRNA基因,16S rRNA-23S rRNA间隔区域(ITS)基因序列,以及在*tRBA-glu*基因与23S rRNA基因之间的间隔序列,另外还有*dnaG*基因^[12,26-29]。在上述研究基础上,美国FDA已经开发了一种修订的克罗诺杆菌属菌株检测方法,该方法包括一步增菌,随后离心并在两种显色固体培养基上进行选择性培养,最后利用普通PCR实验进行确认,确认的目标靶基因是*dnaG*基因^[30]。

1.2.2 免疫学检测方法

为了避免选择性肉汤等其他选择性增菌液的不良效果,英国Matrix Micro-Science公司利用一种新的阳离子免疫磁珠被用来吸附目标菌体从而可以将样品中的目标菌进行浓缩,接着再将目标菌体从免疫磁珠上洗脱下来,直接涂布选择性培养基上进行培养,从而可显著提高检测效率。此外,克罗诺杆菌属的两步酶联免疫法也被一些公司所开发,美国BioControl公司和澳大利亚国标法检测克罗诺杆菌属菌株都利用的是酶联免疫法。该方法特异性高、操作简单,但抗体的筛选和制作难度较

高,前期工作量较大。Mullane等^[31]在2006年成功建立了阳离子免疫磁珠法快速检测克罗诺杆菌属菌株的检测方法,该方法检测灵敏度为1~5 CFU/500 g,整个实验流程检测时间低于24 h。

1.2.3 LAMP法

LAMP是2000年出现的一种新型的核酸靶基因扩增方法,其特点是针对靶基因的6个保守区域设计4种特异引物,利用在链置换DNA聚合酶的作用下,在60~65℃恒温条件下扩增,15~60 min左右即可实现 $10^9\sim 10^{10}$ 倍核酸扩增,具有操作简单、特异性强和产物易检测等优点。在DNA合成时,从脱氧核糖核酸三磷酸底物(dNTPs)中析出的焦磷酸离子与反应溶液中的镁离子反应,产生大量焦磷酸镁沉淀,呈现白色。因此,可以把浑浊度作为反应的指标,只用肉眼观察白色浑浊沉淀,就能鉴定结果是阴性还是阳性,从而不需要繁琐的电泳和紫外线观察。但有时由于气溶胶的影响,反应结果易造成假阳性的结果。但是由于该方法不需要PCR仪和昂贵的试剂,有着十分广泛的应用前景。

胡连霞等^[32]在国内首先报道了利用改良LAMP技术检测克罗诺杆菌属菌株,根据阪崎克罗诺杆菌标准菌株ATCC29544的16S~23S rRNA间区序列作为靶序列,并在靶序列的高度保守区域进行引物在线设计,从设计的1 000对引物中筛选得到特异引物,得到这套带有2条环引物的特异引物,检测灵敏度为0.101 CFU/mL,人工污染阪崎克罗诺杆菌的婴儿配方乳粉的检出限为1.1 CFU/g。如果首先对样品中污染的克罗诺杆菌属菌株采用试剂盒提取基因组DNA,那么从样品处理到报告结果只需3 h左右,它是一种具有灵敏度高、耗时短、操作简便且非常适合高通量的快速检测方法。

1.2.4 核酸杂交

荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)是将细胞原位杂交技术和荧光技术有机结合而形成的技术。Almeida等^[33]报道了一种快速检测婴幼儿配方粉中克罗诺杆菌属菌株的FISH方法,根据NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库中克罗诺杆菌属菌株的16S rRNA基因序列,利用软件设计了一条长度只有15 bp的肽核酸探针,杂交反应体系被优化后建立了针对克罗诺杆菌属菌株的荧光原位杂交检测方法。利用48株克罗诺杆菌属菌株和34株非克罗诺杆菌属菌株(肠杆菌科其他菌株)证实该方法具有较高的特异性,如果婴幼儿配方乳粉中污染有克罗诺杆菌属菌株,该样品经过8 h增菌后即可检测到,检测灵敏度高达1 CFU/10 g。

1.2.5 基因芯片

基因芯片是生物芯片的一种,又称DNA芯片、DNA微阵列或寡核苷酸阵列,是随着人类基因组计划研究的开展和大规模测序的需要应运而生的。它的基本原理是杂

交和测序, 通过应用平面微细加工技术和分子自组装技术, 在固相载体(如硅片、玻片或尼龙膜等)上固定大量的分子识别探针, 样品基因组DNA进行体外扩增并掺入标记(主要是荧光标记)分子后按碱基配对原理与探针进行杂交, 通过激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描, 根据检测杂交信号强度, 并用计算机软件对扫描结果进行数据的比较和综合分析后, 从而获得样品中大量的基因序列特征或基因表达信息^[34]。

与多重PCR方法相比, 该方法不但更为特异、灵敏和准确, 并且还可以避免PCR假阳性的结果。此外, 高通量是基因芯片最主要的优势之一, 只需在一次反应中就可同时检测多个病原菌。

Wang Min等^[35]基于ITS序列和O抗原基因设计并优化反应体建立了一种婴幼儿配方粉常见主要致病菌的基因芯片检测方法, 主要检测阪崎克罗诺杆菌属菌株、沙门氏菌和李斯特氏菌等10种病原菌。两对引物和27条探针能够特异的检测10种致病菌, 检测灵敏度达到0.100 ng DNA/反应或 10^4 CFU/mL。

2 克罗诺杆菌属内种水平的鉴定

2.1 属内种水平PCR检测方法

为了分子流行病学研究的需要, 必须将克罗诺杆菌属内的7个菌种区别开来。尽管属内的每一个种都有一定的致病性, 但是致病性差异较大, 其中阪崎克罗诺杆菌是临床感染病例中最为常见的导致婴幼儿脑膜炎的菌种。利用传统的生理生化方法很难将克罗诺杆菌属内的7个种区分开来, 因此分子方法为区别并鉴定该属内7个菌种提供了可能性。2009年, Stoop等^[36]利用普通PCR方法进行了克罗诺杆菌属内6个种的区别和鉴定, 该方法选用*rpoB*基因作为目标检测基因, 利用该基因设计特异性引物能够将以前鉴定为克罗诺杆菌属的菌株鉴定到种的水平。然而由于阪崎克罗诺杆菌和丙二酸盐阳性克罗诺杆菌的*rpoB*基因具有高同源性, 因此还需要再设计一对引物才能将两者区别开来。Huang等^[37]利用DNA促旋酶B亚基基因设计引物, 建立了一种只能用于区别阪崎克罗诺杆菌和都柏林克罗诺杆菌的普通PCR检测方法。

Cai Xianquan等^[38]利用外膜蛋白基因*ompA*基因建立了针对克罗诺杆菌属菌株的荧光定量PCR方法, 该方法不但可以快速检测克罗诺杆菌属菌株, 还能够进行基因分型, 也就是说荧光定量PCR反应结束后对PCR产物进行高分辨率溶解曲线的生成, 根据溶解曲线的差异从而将克罗诺杆菌属内不同种的菌株区别开来。该方法不但可减少PCR假阳性的发生, 还能提高检测的灵敏度, 同时还能进行基因分型, 并且该方法还和传统的ISO/TS 22964—2006检测方法进行了对照, 检测结果一

致性高达100%, 为区别和鉴定克罗诺杆菌属内不同种的差异提供了数据支撑。

2.2 MALDI-TOF质谱鉴定方法

使用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术对细菌的快速鉴定已经成为一种非常方便的鉴定工具。该方法的基本原理是分析细菌内所有蛋白质的质谱曲线, 通过对获得模式菌株的蛋白质质量图谱进行对比分析, 找出该菌株特征性离子峰, 将其作为鉴定该菌的生物标识物; 对全细菌蛋白质质量图谱进行聚类分析, 将该菌进一步划分为不同类型从而形成该种菌的特异性MS曲线, 从而根据特征性曲线对细菌进行鉴定。Stephan等^[39]利用该方法将克罗诺杆菌属菌株鉴定到种的水平。在国内, 赵贵明等^[40]首次利用该技术对34株克罗诺杆菌属菌株进行了MALDI-TOF不一样质谱鉴定, 结果表明4株克罗诺杆菌参考菌株质量图谱约在5 740 *m/z*离子质荷比处出现1个相近离子峰, 28株克罗诺杆菌属分离菌株中27株(占96.4%)表现出相同的MS特征; 32株克罗诺杆菌被分为6种类型(以50%距离水平为分类界限)。MALDI-TOF-MS作为一种新研发的技术, 不仅能够用于克罗诺杆菌的鉴定, 而且根据获得的细菌蛋白质质量图谱可将克罗诺杆菌属内7个种区别开来, 旨在以新的技术手段完成对克罗诺杆菌属内种的水平实现快速鉴定和分型, 将我国食品中分离到的克罗诺杆菌属分离菌株建立质谱质量指纹图谱数据库, 为我国克罗诺杆菌属菌株的分子流行病学研究提供参考。

2.3 表型鉴定

为了确保婴幼儿配方粉的安全并且减少商家不必要的召回, 尽最大努力做到克罗诺杆菌属菌株的准确鉴定尤为重要。近几年开发的依靠氟和其他显色培养基来筛选克罗诺杆菌属菌株起到了非重要的作用。然而, 由于瑞典肠杆菌(*Enterobacter helveticus*)、苏黎世肠杆菌(*Enterobacter turicensis*)、粉尘肠杆菌(*Enterobacter pulveris*)和阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)这4种肠杆菌与克罗诺杆菌属菌株亲缘关系较近, 菌落形态和许多生化反应类似, 因此它们是克罗诺杆菌属分离鉴定中最为重要的背景干扰菌, 因此分离菌株的最后确认也是相当必要的。利用当前的商品化的试剂和仪器对克罗诺杆菌属菌株进行表型鉴定是比较困难的, 因此必须借助分子生物学方法进行鉴定, 有研究者发现通过商品化的生化试剂盒鉴定为阴沟肠杆菌的菌株, 进一步通过分子生物学方法(例如荧光定量PCR)被鉴定为克罗诺杆菌属菌株。因此, 克罗诺杆菌属菌株的表型鉴定至少到目前还是相当困难的, 需要研究者开发更好的方法才能将它们准确鉴定到菌种或者菌株的水平。

3 结 语

克罗诺杆菌属传统的检测方法包括增菌培养、选择性培养基分离纯化、镜检、生化鉴定以及最后的血清鉴定与确认,整个过程通常需要5~7 d的时间。近几年发展并运用PCR法已广泛用于该病原菌的检测,不仅可提高检测的特异性和灵敏度,还可减少检出所需的时间,一般只需24 h即可完成^[30]。目前,常用于PCR检测克罗诺杆菌属的靶基因有*ompA*、*IGS*、16S rDNA和*zpx*等基因^[21-25]。近年来的实践应用表明,克罗诺杆菌常规PCR检测方法存在一些不足之处主要在于:以往发掘的靶点限于细菌所测序的全基因序列有限,而使其检测靶基因特异性不强,从而极易造成假阳性或假阴性结果的出现,并且每个靶点都或多或少存在一定的假阳性或者假阴性结果^[12]。鉴于一种方法难以准确快速鉴定克罗诺杆菌属菌株,因此两种或两种以上方法联合起来使用进行婴幼儿食品中的克罗诺杆菌属菌株的分离与鉴定尤为必要。

目前,以荧光定量PCR为理论依据建立了专门用于检测克罗诺杆菌属的快速定量检测试剂盒。当前市场上流通有克罗诺杆菌属菌株的快速检测试剂,最常见的3种检测试剂盒为:美国BioControl公司的GDS检测试剂盒,美国杜邦公司的BAX系统检测试剂盒,以及德国Boitecon公司的Foodproof检测试剂盒^[41]。这些试剂盒的操作相对较为简便,通常只需要取1 mL的过夜增菌培养液或者可疑单菌落的富集培养液,然后按照操作说明书就可以进行操作,并能在几小时内得到实验结果。这些试剂盒通常是经过几个实验室大量的验证和评价,直至几个实验室获得的检测结果完全一致后才成功推广到市场上进行应用。这些试剂盒通常的检测特异性高达100%,而且不但可以用于纯培养物的检测,还能够用于婴幼儿配方粉的检测。但是这些检测试剂盒不但价格较为昂贵,而且有些试剂盒还必须借助配套的检测设备才能使用,因此对于一般中等规模的工厂和实验室而言,显然成本较高而难以承受。但是,目前至少存在两个方面需要注意的问题,其一,这些试剂盒检测方法还不是我国法定的检测方法,因而不能用于有法律效应的检测环节;其二,这些试剂盒绝大多数没有我国自己的知识产权,因此检测成本昂贵,长期使用起来难以承受。所以,迫切需要研发一些具有我国自主知识产权且操作简便和准确快速的食品安全检测技术及其产品。

近十几年来,生物信息学的发展和细菌全基因组的不断测序,为挖掘克罗诺杆菌属菌株新的分子检测靶点提供了可能。由Yu Shuijing等^[42]开发的生物信息学软件已经成功用于食源性病原菌的检测。今后,随着克罗诺杆菌越来越多菌株的基因组数据相继被公布,利用该软件挖掘克罗诺杆菌属更加特异的分子检测靶点将很快实

现。综上所述,建立特异性好、灵敏度高、低成本和准确的克罗诺杆菌属检测方法是对科研工作者提出的最终目标。如何将传统检测方法与分子检测方法结合起来联合使用,也将是今后研究的主要任务之一。因此,随着生物信息学和其他科技技术的不断进步和创新,传统的检测方法也要不断更新和完善,才能够满足当今快速准确检测的要求。

参考文献:

- [1] HEALY B, COONEY S, O'BRIE N S, et al. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2010, 7(4): 339-350.
- [2] NAZAROWEC-WHITE M, FARBER J M. *Enterobacter sakazakii*: a review[J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 34: 103-113.
- [3] IVERSEN C, LEHNER A, MULLANE N, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1[J]. BMC Evolutionary Biology, 2007, 7: 64-74.
- [4] IVERSEN C, LEHNER A, MULLANE N, et al. Identification of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45: 3814-3816.
- [5] IVERSEN C, MULLANE N, MCCARDELL B, et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. Nov[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58: 1442-1447.
- [6] STRYDOM A, CAWTHORN D M, CAMERON M, et al. Species of *Cronobacter*: a review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk[J]. International Dairy Journal, 2012, 27(1/2): 3-12.
- [7] JOSEPH S, SONBOL H, HARIRI S, et al. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(9): 3031-3039.
- [8] HUNTER C J, PETROSYAN M, FORD H R, et al. *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in infants and neonates[J]. Surgery Infection, 2008, 9: 533-539.
- [9] LAMPEL K A, CHEN Y. Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 136: 179-184.
- [10] 刘秀梅, 裴晓燕, 郭云昌. 中国安徽阜阳劣质婴儿配方粉中阪崎肠杆菌的污染[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(1): 10-12.
- [12] DERZELLE S, DILASSEF R. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formulae[J]. BMC Microbiology, 2006, 6: 100. doi: 10.1186/1471-2180-6-100.
- [13] CAWTHORN D M, BOTHA S, WITTHUHN R C. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 127: 129-138.

- [14] GUILLAUME-GENTIL O, SONNARD V, KANDHAI M C, et al. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68: 64-69.
- [15] IVERSEN C, DRUGGAN P, FORSYTHE S J. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 96: 133-139.
- [16] OH SW, KANG DH. Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Enterobacter sakazakii*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 70: 5692-5694.
- [17] RESTAINO L, FRAMPTON E W, LIONBERG W C, et al. A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients and environmental sources[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69: 315-322.
- [18] STEPHAN R, van TRAPPEN S, CLEENWERCK I, et al. *Enterobacter turicensis* sp. nov. and *Enterobacter helveticus* sp. nov. isolated from fruit powder[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57: 820-826.
- [19] STEPHAN R, van TRAPPEN S, CLEENWERCK I, et al. *Enterobacter pulveris* sp. nov. isolated from fruit powder, infant formula and infant formula production environment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58: 237-241.
- [20] IVERSEN C, FORSYTHE S. Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73: 48-52.
- [21] IVERSEN C, DRUGGAN P, SCHUMACHER S, et al. Development of a novel screening method for the isolation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 74: 2550-2552.
- [22] 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: 43. doi:10.1186/1471-2180-4-43.
- [23] LEHNER A, RIEDEL K, RATTEI T, et al. Molecular characterization of the alpha glucosidase activity in *Enterobacter sakazakii* reveals the presence of a putative gene cluster for palatinose metabolism[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29: 609-625.
- [24] MOHAN NAIR K M, VENTKITANARAYANAN K S. Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA* targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72: 2539-2546.
- [25] CHEN Wanyi, AI Lianzhong, YANG Jieli, et al. Development of a PCR assay for rapid detection of *Cronobacter* spp. from food[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2013, 59(10): 656-661.
- [26] KOTHARY M M, MCCARDELL B A, FRAZAR C D, et al. Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73: 4142-4151.
- [27] KANG S E, NAM Y S, HONG K W. Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* using *TaqMan* real-time PCR assay[J]. Microbial Biotechnology, 2007, 17: 516-519.
- [28] LIU Y, CAI C, ZHANG X, et al. Real time PCR using *TaqMan* and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 65: 21-31.
- [29] SEO K H, BRACKETT R E. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real time PCR assay[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68: 59-63.
- [30] CHEN Y, HAMMACK T S, SONG K Y, et al. Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration method for the detection and isolation of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula: precollaborative study[J]. Journal of AOAC international, 2009, 92: 862-872.
- [31] MULLANE N R, MURRAY J, DRUDY D, et al. Detection of *Enterobacter sakazakii* in dried infant milk formula by cationic-magnetic-bead capture[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(9): 6325-6330.
- [32] 胡连霞, 张伟, 张先舟, 等. 改良环介导等温扩增技术快速检测婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 378-382.
- [33] ALMEIDA C, AZEVEDO N F, IVERSEN C, et al. Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Cronobacter* genomospecies (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(9): 2925-2930.
- [34] MLAKAR V, GLAVAC D. DNA microarrays and their use in dermatology[J]. Acta Dermato-Venerologica, 2007, 16(1): 7-12.
- [35] WANG Min, CAO Boyang, GAO Qili, et al. Detection of *Enterobacter sakazakii* and other pathogens associated with infant formula powder by use of a DNA microarray[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(10): 3178-3184.
- [36] STOOP B, LEHNER A, OVERSEN C, et al. Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 136(2): 165-168.
- [37] HUANG C H, CHANG M T, HUANG L. Use of novel species-specific PCR primers targeted to DNA gyrase subunit B (*gyrB*) gene for species identification of the *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter dublinensis*[J]. Molecular and Cellular Probes, 2013, 27(1): 15-18.
- [38] CAI Xianquan, YU Haiqiong, RUAN Zhouxi, et al. 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.
- [39] STEPHAN R, ZIEGLER D, PFLÜGER V, et al. Rapid genus and species specific identification of *Cronobacter* spp. by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48: 2846-2851.
- [40] 赵贵明, 杨海荣, 赵勇胜, 等. MALDI-TOF 质谱技术对克罗诺杆菌的鉴定与分型[J]. 微生物学通报, 2010, 37(8): 1169-1175.
- [41] FRICKER-FEER C, CERNELA N, BOLZAN S, et al. Evaluation of three commercially available real-time PCR based systems for detection of *Cronobacter* species[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(2): 200-202.
- [42] YU Shuijing, LIU Weibing, SHI Chunlei, et al. SMM-system: a mining tool to identify specific markers in *Salmonella enterica*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84(3): 423-429.