

# 克罗诺杆菌检测方法研究进展

董晓晖<sup>1,2,3</sup> 吴清平<sup>2</sup> 莫树平<sup>2</sup> 张菊梅<sup>2</sup> 杨小鹏<sup>2</sup>

1. 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301;

2. 广东省微生物研究所/广东省华南应用微生物重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地/  
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, 广州 510070;

3. 中国科学院大学, 北京 100049

**摘要** 克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.) 是一类重要的食源性致病菌, 其引起的奶粉安全事件和新生儿致病问题受到了社会的高度重视。随着对该菌研究的深入和现代分类技术的不断发展, 克罗诺杆菌的分类经历了从种到属的变化。但是截至目前, 克罗诺杆菌的污染源和致病机制仍不清楚, 为了防止易感人群的大规模疾病暴发, 对于该菌的检测和预防尤为重要。本文对克罗诺杆菌的生化检测和分子检测的发展历程及存在问题进行综述, 以期为该菌的研究提供参考。

**关键词** 克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌); 分类; 生化检测; 分子检测

**中图分类号** TS 201.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)01-0130-07

克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.) 是由 Iversen 等<sup>[1]</sup>于 2008 年建议创立的隶属于肠杆菌科的一个新属, 囊括了所有的阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*), 该属是寄生在人和动物肠道内的一种有周生鞭毛、能运动、兼性厌氧的革兰阴性无芽孢杆菌。其感染的大多数病例都是婴幼儿, 主要引起菌血症、脑膜炎、坏死性小肠结肠炎等, 致死率高达 40%~80%<sup>[2]</sup>。

克罗诺杆菌分布广泛, 在婴幼儿奶粉、奶酪、腌肉、水、蔬菜、大米、面包、茶叶、草药、调味料及豆腐等多种食品中被检测到<sup>[3-4]</sup>。在对一些新生儿克罗诺杆菌感染事件的调查中发现婴幼儿奶粉是主要感染渠道<sup>[5]</sup>。随着一系列与该菌相关的奶粉召回和重大感染事件的暴发, 婴幼儿配方奶粉中克罗诺杆菌的污染问题受到全世界的普遍关注。目前国际上对克罗诺杆菌的研究主要集中在分类、分型、检测、生化特性、致病性和污染源等方面。虽然与其他食源性致病菌相比, 克罗诺杆菌对大多数人都是非致病的, 但对于特殊人群却有着较高的致死率, 况且该菌的污染源及致病机制尚不十分清楚, 因此对其进行预防和检测显得尤为重要。本文从分类和检测两方

面来阐述克罗诺杆菌的研究进展, 以期为该菌的相关研究提供参考。

## 1 克罗诺杆菌分类情况

随着研究的深入和现代分类技术的不断发展, 克罗诺杆菌的分类经历了 4 个时期。起初该菌因其产黄色素, 而被认为是肠杆菌属中阴沟肠杆菌的生物变形种——黄色阴沟肠杆菌(yellow-pigmented *Enterobacter cloacae*)。1980 年, Farmer 通过 DNA 杂交、生化反应、黄色素产生以及抗生素敏感性等实验, 发现这些“黄色阴沟肠杆菌”的 D-山梨醇反应为阴性, 胞外 DNA 酶反应阳性, 并且产生黄色素, 对氨苄青霉素和头孢菌素非常敏感, 这些都与阴沟肠杆菌不同, 为此将“黄色阴沟肠杆菌”更名为“阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)”, 隶属于肠杆菌属。2007 年, Iversen 利用 16S rRNA 基因序列分析、荧光标记-扩增片段长度多态性指纹图谱(fluorescent-labelled amplified fragment length polymorphism (f-AFLP) fingerprints)、核糖体分型(ribotyping)以及 DNA 杂交等多相分类技术进行了分析。依据分类原则: 通常 2 个菌株的 16S rRNA 基

收稿日期: 2012-07-05

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2011B090300077)和广东省科技计划项目(2010B020316003)

董晓晖, 博士研究生。研究方向: 微生物学。E-mail: dongxiaohuihebei@126.com

通讯作者: 吴清平, 博士, 教授。研究方向: 微生物学。E-mail: wuqp203@yahoo.com.cn

因全长序列相似性在 98.7%~99.0% 以上,并且 DNA 杂交的相关性超过 70% 时,这 2 个株应为同一种,同种的 2 个菌株的 AFLP 图谱相似性应大于 50%。由于原来作为阪崎肠杆菌这一菌种的很多分离株和标准菌株不能满足以上同为一个种的分类原则,2008 年, Iversen 等<sup>[1]</sup> 建议另外建立一个囊括了原来所有阪崎肠杆菌的新属——克罗诺杆菌属 (*Cronobacter* gen. nov), 隶属于肠杆菌科。这个新属包括 6 个种, 分别为阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌 (*Cronobacter malonicus*)、苏黎世克罗诺杆菌 (*Cronobacter turicensis*)、莫金斯克罗诺杆菌 (*Cronobacter muytjensii*)、都柏林克罗诺杆菌 (*Cronobacter dublinensis*) 和克罗诺杆菌基因种 1 (*Cronobacter genomospecies 1*), 其中阪崎克罗诺杆菌为该属模式菌种。在此分类体系中, 都柏林克罗诺杆菌又分为 3 个亚种, 分别是都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种 (*Cronobacter dublinensis* subsp. *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奶粉亚种 (*Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi*)。2012 年, Joseph 等<sup>[6]</sup> 利用 16S rRNA 基因序列分析和多位点测序 (multilocus sequence typing, MLST) 技术对克罗诺杆菌属进行分类研究, 提出将克罗诺杆菌属分为 7 个种, 隶属于肠杆菌科。这 7 个种是在 Iversen 等分类的基础上增加了康帝蒙提克罗诺杆菌 (*Cronobacter condimentii*) 和尤尼沃斯科罗诺杆菌 (*Cronobacter universalis*), 在 Joseph 等分类中克罗诺杆菌基因种 1 的菌株归于尤尼沃斯科罗诺杆菌, 去掉了克罗诺杆菌基因种 1 的命名, 随后 Joseph 等<sup>[7]</sup> 对克罗诺杆菌多样性的研究支持该属分为 7 个种的提议。

基因组序列的获取和公布对致病微生物的遗传背景、分类、检测和致病性研究都具有重要意义。阪崎克罗诺杆菌 BAA-894 (*Cronobacter sakazakii* BAA-894) 的基因组测序于 2007 年完成, 是克罗诺杆菌属中首株测序的菌株, 2010 年公布于 NCBI 网站 (GenBank 序列号 CP00783)。该菌株分离自婴儿奶粉, 与 2001 年美国田纳西州该菌的医院感染有关, 其基因组由环状染色体 (4.37 Mb) 和 pESAK2 (31 kb)、pESAK3 (131 kb) 2 个质粒组成<sup>[8]</sup>。截至 2012 年, 本属中还有 2 株菌——阪崎克罗诺杆菌 ES15 (*Cronobacter sakazakii* ES15) 和苏黎世克罗诺杆菌 z3032 (*Cronobacter turicensis* z3032) 的全基

因组测序结果被公布, GenBank 序列号分别是 CP003312 (*C. sakazakii* ES15) 和 FN543093 (*C. turicensis* z3032)<sup>[9]</sup>。随着研究的深入, 越来越多克罗诺杆菌基因组信息会被公布, 这为利用基因组数据找到该菌特有的基因从而设计检测靶标奠定了基础。

## 2 克罗诺杆菌检测方法

现有研究表明, 该属的 7 个种都未被证实对婴幼儿健康无害, 因此, 这个新属的细菌都被认为具有致病性, 国际上各种标准的检测方法均是针对该属进行。克罗诺杆菌检测方法有很多种, 依据检测标的物的不同可分为传统生化检测和分子检测两大类。

### 2.1 克罗诺杆菌传统生化检测方法

传统检测方法是以细菌的富集培养或选择性培养为基础, 经菌落纯化得到分离株, 并以分离株的生化反应为判断依据进行检测和鉴定的。1988 年, Muytjens 等<sup>[10]</sup> 在对母乳中肠杆菌属细菌的定量研究中, 提出了首例克罗诺杆菌的定量检测方法, 该方法依据 MPN 原理对母乳中的克罗诺杆菌进行定量检测, 在此方法中样品经过缓冲蛋白胨水 (buffered peptone water, BPW) 预增菌、肠道增菌 (enterobacteriaceae enrichment, EE) 肉汤选择性增菌后, 在紫红胆盐葡萄糖琼脂 (violet red bile glucose agar, VRBGA) 上挑取可疑菌落, 再把可疑菌落接种于伊红美蓝琼脂 (eosin-methylene blue agar, EMB agar)、羊血琼脂 (sheep blood agar) 和 API 20E 进行鉴定。

由于上述方法中 VRBGA 上的可疑菌落需要接种伊红美蓝琼脂和羊血琼脂, 步骤繁琐、费时, 费用也高, 而且对克罗诺杆菌检测的针对性不强。1989 年, Simmon 等<sup>[11]</sup> 发表了改进方法, 提出在 Muytjens 等<sup>[10]</sup> 建立的方法中省去接种伊红美蓝琼脂和羊血琼脂的步骤, 将可疑菌落划线于胰酪大豆琼脂 (tryptic soy agar, TSA) 培养 48~72 h, 并依据在 TSA 上黄色素生成情况进行初步判断的方案。在此基础上, 美国 FDA 建立了现今国际通用的奶粉中克罗诺杆菌定量检测方法, 即“婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的分离计数”。在这个经典方法中, 每个奶粉样品分别称取 3 份 100 g、3 份 10 g 和 3 份 1 g 以 1:10 稀释于无菌水中过夜培养 (未在 BPW 中预增菌), 分别取 10 mL 过夜培养物接种至 90 mL

EE 肉汤中,然后划线或涂布 VBRGA 平板,从 VBRGA 平板挑取可疑菌落至 TSA 初步判断结果,对产黄色素的菌落进行生化确证。以上这些基于 VBRGA 平板筛选和 EE 肉汤选择性培养的方法均存在选择性不佳的问题,如克罗诺杆菌在 VBRGA 平板上的菌落特征不明显,其他肠杆菌在 EE 肉汤的生长优于克罗诺杆菌<sup>[12]</sup>等。

针对培养基选择性不佳的问题,2005 年,Guillaume-Gentil 等<sup>[13]</sup>提出了加有胆盐的 TSA 平板和 1 种克罗诺杆菌选择性培养基——加有万古霉素的改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤(modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin, mLST-Vm),即在月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤(lauryl sulfate tryptose broth, LSTB)中另外添加氯化钠和万古霉素。在该方法中,样品直接在 mLST-Vm 中进行增菌,然后划线加有胆盐的 TSA 平板,经过光照诱导黄色素生成。该方法缩短了检测时间,提高了培养基的选择性,但其弊端是加有胆盐的 TSA 平板筛选效果不好,并且有的克罗诺杆菌由于受损或是缺乏营养,不能在 mLST-Vm 中生长<sup>[14]</sup>。针对这种情况,2006 年国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)和国际乳品联合会(International Dairy Federation, IDF)在此基础上制定了现今较通用的 ISO/TS 22964—2006 检测方法。该方法重新提出样品在选择性增菌的步骤前,添加预增菌的步骤,以使受损或缺乏营养的细菌恢复生长,使用新型筛选培养基——克罗诺杆菌显色培养基。具体过程为:样品先在 BPW 中预增菌,然后于 mLST-Vm 中选择性增菌,将增菌液划线于克罗诺杆菌显色培养基。将显色培养基上显蓝绿色的可疑菌落接种于 TSA 上培养 44 h,判断黄色素生成,然后进行生化确证。此方法避免了 mLST-Vm 选择性过强的问题,并且应用了克罗诺杆菌显色培养基进行筛选,从而使检测更加特异、有效。我国现行的克罗诺杆菌检验国家标准 GB 4789.40—2010<sup>[15]</sup>就是参照此方法制定而成。虽然 ISO/TS 22964—2006 检测方法相较于其他传统检测方法更加可行,但任何一种方法都会有不足,该方法也不例外。这些不足主要包含:得到确定结果所需时间较长(5~7 d),不是所有克罗诺杆菌都产黄色素,不是所有克罗诺杆菌都会在显色培养基上显色等;而且在显色培养基上显色的可疑菌落,不能确定为克罗诺杆菌,这些分离到的菌株还需做生化试验,才能进

一步确证。

在现有的生化自动化检测系统中,法国梅里埃公司的 API 20E、ID 32E、VITEK 2 系列的 GN 和美国的 Biolog Microlog3 4.20 都可以用来鉴定克罗诺杆菌。虽然这 2 种鉴定系统的市场化程度很高,应用广泛,但是由于系统的数据库限制,检测结果往往也不够准确。比如 Iversen 等<sup>[14]</sup>报道,由 ID 32E 鉴定为克罗诺杆菌的 10 株细菌,用 API 20E 进行鉴定时,其生化特征与泛菌属某些种一致,而由 API 20E 鉴定为克罗诺杆菌的 3 株细菌,用 ID 32E 鉴定时被证实为阴沟肠杆菌、河生肠杆菌和日沟维肠杆菌。此外,利用传统培养法检测还会碰到细菌处于活的不可培养状态,或是由于相应选择性培养基的抑制问题,而导致目的菌检测呈现假阴性结果。

总之,传统检测方法存在操作繁琐、所需试剂多、耗时长、结果不准确等缺点。因此,需要发展的方法来弥补传统检测方法的不足。本世纪初,以基因为靶标的分子检测方法成为克罗诺杆菌检测研究的热点。

## 2.2 克罗诺杆菌分子检测方法

1) 普通 PCR 检测。2003 年,Keyser 等<sup>[16]</sup>首次报道了克罗诺杆菌的快速 PCR 检测方法,该方法针对克罗诺杆菌 ATCC 29544(GenBank: AB004746)的 16S rRNA 基因设计引物进行扩增检测。2004 年,Lehner 等<sup>[17]</sup>对 Keyser 的方法进行了评价,发现该方法特异性不高,检测莫金斯克罗诺杆菌出现假阴性而检测阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)出现假阳性,因此 Lehner 等<sup>[17]</sup>通过测定 16S rRNA 序列并构建进化树,重新针对 16S rRNA 基因建立了特异性的克罗诺杆菌 PCR 检测系统,具有良好的特异性和可靠性,检测灵敏度达 10 pg。2006 年,Liu 等<sup>[18]</sup>针对 16S-23S rDNA 间区转录序列(internal transcribed spacer, ITS)建立了克罗诺杆菌特异性的 PCR 检测方法,检测限可达 1.3 cfu/100 g。

2006 年,Lehner 等<sup>[19]</sup>发表了基于  $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因的 PCR 方法,但是因有的克罗诺杆菌不含  $\alpha$ -葡萄糖苷酶而使得该方法检测结果不准确<sup>[20]</sup>;同年,Mohan 等<sup>[21]</sup>发表了基于克罗诺杆菌外膜蛋白 A(outer membrane protein A, *ompA*)基因的 PCR 方法,由于该基因的特异性好,很多双重 PCR 都用到了该基因。如叶应旺等<sup>[22]</sup>以克罗诺杆菌基因组中  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷酶基因和 *ompA* 基因为目标,设计引物建立起特异性强、灵敏度较高的双重 PCR 检测

方法。又如结合固定技术, Zhou等<sup>[23]</sup>建立了针对 *ompA* 基因和 ITS 序列的双重 PCR 检测方法, 经过固定、增菌之后双重 PCR 的检测限可达到 3 cfu/mL。

2007年, Kothary等<sup>[24]</sup>针对克罗诺杆菌的含锌蛋白酶(zinc-containing metalloprotease, *zpx*)基因设计了2对引物, 其PCR产物分别为94和350 bp, 在经过135株克罗诺杆菌和25株其他菌的特异性验证后, 发现2对引物都具特异性。而Jaradat等<sup>[25]</sup>在实际样品检测中比较了克罗诺杆菌的多对引物, 包括Mohan等<sup>[21]</sup>设计的 *ompA* 引物、Kothary等<sup>[24]</sup>设计的 *zpx* 2对引物、Liu等<sup>[18]</sup>设计的ITS引物和Lehner等<sup>[19]</sup>设计的葡萄糖苷酶引物, 指出Mohan设计的 *ompA* 引物特异性最好, 但该引物也未能将所有的克罗诺杆菌分离株进行准确鉴定。

2011年, Blazkova等<sup>[26]</sup>针对克罗诺杆菌的16S rRNA基因设计了1对特异性引物——标记了生物素和地高辛的引物, 利用该引物扩增后经免疫印迹原理检测克罗诺杆菌, 可在16 h检测到少于10个细菌的样品。

2) real-time PCR检测。在普通PCR的基础上发展起来的real-time PCR检测方法更加快捷, 自动化程度高, 可以定量并且杜绝了扩增后可能会污染的问题, 在检测方面得到了快速发展和应用。

Seo等<sup>[27]</sup>报道了针对克罗诺杆菌局部大分子合成操纵子(macromolecular synthesis, MMS), 即 *rpsU* 基因3'末端和 *dnaG* 基因5'末端, 设计引物和 *TaqMan* 探针的real-time PCR, 该方法对克罗诺杆菌纯培养物的检测可达到100 cfu/mL, 增菌后检测限可达0.6 cfu/g。2006年, Liu等<sup>[28]</sup>针对克罗诺杆菌ITS序列设计引物, 建立了 *TaqMan* 探针和SYBR Green染料模式下检测婴儿配方奶粉中克罗诺杆菌的实时定量检测方法, 该检测模式下克罗诺杆菌纯培养物检测限为18 cfu/mL。Kang等<sup>[29]</sup>针对16S rRNA序列设计了 *TaqMan* 探针来检测克罗诺杆菌, 检测限达到2.3 cfu/mL。Hyeon等<sup>[30]</sup>在Seo的基础上, 建立了同时检测克罗诺杆菌属和沙门氏菌属的多重real-time PCR方法, 实现了两类菌的同时检测。

Fricke-Feer等<sup>[31]</sup>比较了3种基于荧光技术的商品化的克罗诺杆菌检测方法, 包括杜邦公司的Dupont Qualicon BAX检测系统、Biocontrol公司的

克罗诺杆菌实时荧光检测试剂盒和Bioteccon Diagnostics公司的食品中克罗诺杆菌荧光实时检测试剂盒, 对8株克罗诺杆菌和13株非克罗诺杆菌特异性检测的结果表明, Biocontrol公司和Bioteccon Diagnostics公司的试剂盒特异性为100%, BAX系统由于其将1株阴沟肠杆菌误判为克罗诺杆菌, 使检测结果呈现假阳性。Minami等<sup>[32]</sup>在Kang等<sup>[29]</sup>建立的real-time PCR方法的基础上, 添加叠氮溴化乙锭染料, 可以检测有活性的克罗诺杆菌, 检测限达1 cfu/300 g。

3) 环介导恒温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。LAMP是Notomi等<sup>[33]</sup>于2000年发明的一种新的核酸扩增方法。其原理是针对目的基因的6个区域设计4条特异引物, 利用一种链置换DNA聚合酶(*Bst* DNA polymerase)在65 °C恒温保温几十分钟, 即可完成核酸的高效扩增。许多研究者利用LAMP技术, 针对不同靶基因, 进行了克罗诺杆菌的检测研究。

胡连霞等<sup>[34]</sup>建立的LAMP检测方法以克罗诺杆菌的ITS序列作为靶序列, 纯菌检测灵敏度为0.101 cfu/mL, 人工污染样品的检测限为1.1 cfu/g。Liu等<sup>[35]</sup>也利用阪崎肠杆菌ITS序列, 在比较克罗诺杆菌与其近源株ITS序列的基础上, 建立了LAMP检测方法, 该方法人工污染样品经48 h增菌后的检测限为1.2 cfu/100 g。2012年, Liu等<sup>[36]</sup>也利用阪崎肠杆菌ITS序列, 建立了LAMP检测克罗诺杆菌的方法, 该方法的检测限为9.1 fg/ $\mu$ L, 高于普通PCR(91 pg/ $\mu$ L)和实时荧光PCR(9.1 pg/ $\mu$ L)的灵敏度。

贺楠等<sup>[37]</sup>针对克罗诺杆菌16S rRNA基因, 设计LAMP引物, 最低检测限可达到0.3 pg。鲁曦等<sup>[38]</sup>也针对克罗诺杆菌16S rRNA基因, 建立了LAMP检测方法, 最低检测限可达到0.3 fg, 纯菌检测限可达10 cfu/mL。范宏英等<sup>[39]</sup>根据克罗诺杆菌 *ompA* 基因, 设计LAMP引物, 得到的纯培养物检测灵敏度为10 cfu/mL。

LAMP技术检测致病菌所需设备简单, 只要有恒温设备就可完成, 产物也不需要特殊仪器检测, 肉眼观察即可, 从而缩短了检测时间, 节约了人力和物力, 对于基层检测机构比较适用。但该方法检测灵敏度高、容易污染, 操作时要仔细。

4) 荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)。FISH是荧光标记的特异性探针与

靶标 DNA 杂交,经荧光显微镜显色的技术。Almeida 等<sup>[40]</sup>建立了利用 FISH 技术检测婴幼儿奶粉中克罗诺杆菌的方法,该方法针对克罗诺杆菌的 16S rRNA 设计了 1 条特异的肽核酸(peptide nucleic acid,PNA)探针,结合 8 h 的增菌过程,检测限可达 1 cfu/10 g。

现有的检测试剂盒中,除了以上基于 PCR 的检测试剂盒,还有德国 Vermicon 公司<sup>[20]</sup>利用 FISH 技术开发的克罗诺杆菌检测试剂盒,该试剂盒由于不需要提取 DNA,相较于 PCR 方法更为快捷,可在 3 h 内得到检测结果。

由于缺乏国际通用的评价体系和相应的评价标准,很难对上述各种分子检测方法做出全面评价。这些评价体系和标准的缺乏主要表现在:检测方法的灵敏度或最低检测限所用的单位不同、特异性评价体系采用的菌株不一致、应用的 DNA 聚合酶扩增性能有差异等方面。

### 3 展 望

随着对克罗诺杆菌的深入研究,其分类地位发生了从种到属的变化。现有研究表明,所有克罗诺杆菌都有致病性,因此建立针对该属的检测方法尤为重要。克罗诺杆菌检测主要包括传统生化检测和分子检测两大类,其中传统生化检测与分子检测相比,优势在于可以分离纯化菌株从而得到进一步的研究材料,缺点是耗时、费力;分子检测方法相比传统生化检测更加灵敏、省时,但是在特异性方面也存在缺陷。现今,克罗诺杆菌检测的趋势正在向传统生化检测和分子检测相结合的方向发展。如美国 FDA 于 2012 年推荐的新检测方法中,就是在 CHEN 等<sup>[41-43]</sup>的实验基础上进行的修订,该方法将 Seo 建立的 real-time PCR 检测与传统生化检测相结合。又如 Zhu 等<sup>[44]</sup>用 BacTrac 4300 系统检测克罗诺杆菌,该系统将电阻抗和 rRNA 杂交显色相结合。这些方法缩短了检测时间,可在 2~3 d 内得到结果。但由于克罗诺杆菌的遗传多样性和分类的复杂性,各菌株 DNA 序列之间可能存在较大差异,找到所有菌株共有的保守序列并建立合适的分子检测方法非常不易,这也是针对不同靶基因的同种检测方法检测特异性存在差异的原因。

综上所述,建立特异性好、灵敏度高和低成本

的克罗诺杆菌分子检测方法有待于进一步的研究。随着克罗诺杆菌越来越多菌株的基因组数据被公布,

利用基因组信息找到该属共同特有的基因序列,并针对该基因或其产物开发新的检测靶标,将传统方法与分子检测联用互补,将是今后克罗诺杆菌研究发展的主要方向。

### 参 考 文 献

- [1] 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. *lausamensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(6):1442-1447.
- [2] YAN Q Q, CONDELL O, POWER K, et al. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium [J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(1):1-15.
- [3] RYU J H, KO J, PARK H, et al. Microbial examination of nonheated foods served in feeding programs of elementary schools, Iksan City, Jeonbuk Province, Korea [J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(9):1564-1568.
- [4] KIM S A, YU J H, RHEE M S. A rapid and simple screening method of *Cronobacter* spp. in cell suspension and tofu [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 12(6):263-267.
- [5] NORBERG S, STANTON C, ROSS R P, et al. *Cronobacter* spp. in powdered infant formula [J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(3):607-620.
- [6] JOSEPH S, CETINKAYA E, DRAHOVSK H, et al. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62:1277-1283.
- [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] KUCEROVA E, CLIFTON S W, XIA X Q, et al. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species [J]. Plos One, 2010, 5(3):e9556-e9566.
- [9] STEPHAN R, LEHNER A, TISCHLER P, et al. Complete genome sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a food-borne pathogen causing deaths in neonates [J]. Journal of Bac-

- teriology, 2011, 193(1): 309-310.
- [10] MUYTKENS H L, ROELOFS-WILLEMSE H, JASPAR G H. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1988, 26(4): 743-746.
- [11] SIMMONS B P, GELFAND M S, HAAS M, et al. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula [J]. Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America, 1989, 10(9): 398-401.
- [12] IVERSEN C, DRUGGAN P, SCHUMACHER S, et al. Development of a novel screening method for the isolation of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(8): 2550-2553.
- [13] 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(1): 64-69.
- [14] IVERSEN C, FORSYTHE S J. Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(1): 48-52.
- [15] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 40-2010 食品卫生微生物学检验: 阪崎肠杆菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [16] KEYSER M, WITTHUHN R C, RONQUEST L C, et al. Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB)—granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii* [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(22): 1893-1898.
- [17] 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: 43-50.
- [18] LIU Y, GAO Q, ZHANG X, et al. PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula [J]. Molecular and Cellular Probes, 2006, 20(1): 11-17.
- [19] 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(8): 609-625.
- [20] LEHNER A, NITZSCHE S, BREUWER P, et al. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection [J]. BMC Microbiology, 2006, 6: 15-22.
- [21] MOHAN NAIR M K, VENKITANARAYANAN 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 and Environmental Microbiology, 2006, 72(4): 2539-2546.
- [22] 叶应旺, 吴清平, 郭伟鹏, 等. 种特异性 PCR 快速检测奶粉中阪崎肠杆菌研究 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1192-1197.
- [23] ZHOU Y, WU Q, XU X, et al. Development of an immobilization and detection method of *Enterobacter sakazakii* from powdered infant formula [J]. Food Microbiology, 2008, 25(5): 648-652.
- [24] KOTHARY M H, 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 and Environmental Microbiology, 2007, 73(13): 4142-4151.
- [25] JARADAT Z W, ABABNEH Q O, SAADOUN I M, et al. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing [J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 225-235.
- [26] BLAZKOVA M, JAVURKOVA B, FUKAL L, et al. Immunochromatographic strip test for detection of genus *Cronobacter* [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2011, 26(6): 2828-2834.
- [27] 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(1): 59-63.
- [28] LIU Y, CAI X, ZHANG X, et al. Real time PCR using *TaqMan* and SYBR green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula [J]. Journal of Microbiology Methods, 2006, 65(1): 21-31.
- [29] KANG S E, NAM Y S, HONG K W. Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* using *TaqMan* real-time PCR assay [J]. Journal of Microbiology Biotechnology, 2007, 17(3): 516-519.
- [30] HYEON J Y, PARK C, CHOI I S, et al. Development of multiplex real-time PCR with Internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(1): 177-181.
- [31] 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.
- [32] MINAMI J, SOEJIMA T, YAESHIMA T, et al. Direct real-time pcr with ethidium monoazide; a method for the rapid detection of viable *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula [J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(9): 1572-1579.
- [33] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e630- e631.
- [34] 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.
- [35] LIU C, ZHENG W, ZHANG H, et al. Sensitive and rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula by loop-mediated isothermal amplification method [J]. Journal of Food Safety, 2009, 29(1): 83-94.

- [36] LIU X, FANG J, ZHANG M, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28: 1013-1020.
- [37] 贺楠, 雷质文, 高宏伟, 等. 阪崎肠杆菌环介导恒温扩增方法检测[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(4): 509-511.
- [38] 鲁曦, 师宝忠, 王彬, 等. LAMP 法检测奶粉中的阪崎肠杆菌[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 540-543.
- [39] 范宏英, 龙敏, 刘欢, 等. 阪崎肠杆菌环介导等温扩增检测方法建立[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(1): 31-33.
- [40] ALMEIDA C, AZEVADO N F, IVERSEN C, et al. Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Cronobacter* genospecies (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(9): 2925-2930.
- [41] CHEN Y, SONG K Y, BROWN E W, et al. Development of an improved protocol for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula [J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(6): 1016-1022.
- [42] CHEN Y, KUMAR N, SIDDIQUE N. Incorporation of an internal control into the PCR assay published in "Development of an improved protocol for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula" [J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(6): 872-873.
- [43] CHEN Y, NOE K E, THOMPSON S, et al. Evaluation of a revised U. S. Food and drug administration method for the detection of *Cronobacter* in powdered infant formula: a collaborative study [J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(6): 1144-1147.
- [44] ZHU S, SCHNELL S, FISCHER M. Rapid detection of *Cronobacter* spp. with a method combining impedance technology and rRNA based lateral flow assay [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 159(1): 54-58.

## Advances in methods of detecting *Cronobacter* spp.

DONG Xiao-hui<sup>1,2,3</sup> WU Qing-ping<sup>2</sup> MO Shu-ping<sup>2</sup> ZHANG Ju-mei<sup>2</sup> YANG Xiao-juan<sup>2</sup>

1. South China Sea Institute of Oceanology, Guangzhou 510301, China;

2. Guangdong Institute of Microbiology/State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base)/South China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application/Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China;

3. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract** *Cronobacter* spp. is an important food-borne pathogen. The problems of *Cronobacter* spp. infections in newborns and the security of powdered infant formula have drawn the attention of researchers all over the world. With the development of modern classification techniques for *Cronobacter* spp., these organisms category experienced a change from species to genus. However, the pathogenic mechanism and primary reservoir of *Cronobacter* spp. are still unknown. To prevent large-scale disease outbreaks for newborns, the detection and prevention of these pathogens are important. In this paper, the available methods of detecting *Cronobacter* spp. ranged from conventional culture methods to molecular technologies were reviewed.

**Key words** *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*); taxonomy; biochemical detection; molecular detection

(责任编辑:张志钰)