

α -葡萄糖苷酶试验在克罗诺杆菌鉴定中的应用

万志刚¹, 赵琳娜², 刘慧玲¹, 马淑棉¹, 张虹¹, 徐丹艺¹, 蔡向荣³,
孙洁¹, 吕敬章^{1*}

(1. 深圳市检验检疫科学研究院, 深圳 518045; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050;
3. 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司, 青岛 266100)

摘要: **目的** 研究 α -葡萄糖苷酶试验在克罗诺杆菌的快速准确鉴定中的应用。**方法** 对包括克罗诺杆菌在内的 56 株肠杆菌科细菌进行纯培养后, 将单个菌落的生理盐水混悬液, 加到 α -葡萄糖苷酶检测试剂中, 于 37 °C 水浴培养 4 h 后, 在 405 nm 波长处测量其吸光度值, 进行 α -葡萄糖苷酶试验。同时将 56 株菌接种于 TSA 琼脂平板, 于 25 °C 培养 48 h 后, 在自然光下观察菌落的黄色素。**结果** 40 株克罗诺杆菌的 α -葡萄糖苷酶试验均为阳性; 包括阴沟肠杆菌、大肠埃希氏菌、产气肠杆菌在内 16 株肠杆菌, α -葡萄糖苷酶试验均为阴性。在 40 株克罗诺杆菌中, 有 37 株菌产黄色素试验为阳性, 3 株菌产黄色素试验为可疑; 其他 16 株肠杆菌, 产黄色素试验均为阴性。**结论** 与产黄色素试验相比, 用 α -葡萄糖苷酶试验鉴定克罗诺杆菌, 结果更准确, 且检测时间短、客观性强。

关键词: 克罗诺杆菌; 鉴定; α -葡萄糖苷酶试验; 产黄色素试验

Application of α -glucosidase test in the identification of *Cronobacter* spp.

WAN Zhi-Gang¹, ZHAO Lin-Na², LIU Hui-Ling¹, MA Shu-Mian¹, ZHANG Hong¹,
XU Dan-Yi¹, CAI Xiang-Rong³, SUN Jie¹, LV Jing-Zhang^{1*}

(1. Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, Shenzhen 518045, China;
2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;
3. Qingdao Hope Bio-technology Co., Ltd., Qingdao 266100, China)

ABSTRACT: Objective To study the application of α -glucosidase test in rapid and accurate identification of *Cronobacter* Spp. **Methods** After purely culturing 56 strains of *Enterobacter* including *Cronobacter* spp., a single colony of physiological saline suspension was added to the α -glucosidase detection reagent, and cultured in a water bath at 37 °C for 4 hours. The absorbance value was measured at a wavelength of 405 nm for the α -glucosidase test. At the same time, 56 strains were inoculated on TSA agar plates, and after incubation at 25 °C for 48 h, the yellow pigment of the colonies was observed under natural light. **Results** All 40 strains of *Cronobacter* spp. were positive for α -glucosidase test; 16 strains of *Enterobacter*, including *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes* were negative for α -glucosidase test. Among 40 strains of *Cronobacter* spp, 37 strains were positive for the yellow pigment test, 3 strains for the yellow pigment test were suspicious, and 16 strains of the *Enterobacter* were negative for the yellow pigment test. **Conclusion** Compared with the yellow pigment formation, the α -glucosidase test

基金项目: 深圳市科技创新项目(JCYJ20170816143646446)

Fund: Supported by Shenzhen Science and Technology Innovation Plan (JCYJ20170816143646446)

*通讯作者: 吕敬章, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: ficswsw@126.com

*Corresponding author: LV Jing-Zhang, Master, Professor, Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, No.1011 Fuqiang Road, Shenzhen 518045, China. E-mail: ficswsw@126.com

is more likely to obtain accurate results and takes less time to identify *Cronobacter* spp.

KEY WORDS: *Cronobacter* spp.; identification; α -glucosidase test; yellow pigment formation

1 引言

克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.), 以前称为产黄色素阴沟肠杆菌。1980 年, Farmer 根据 DNA-DNA 杂交、生化反应、色素产生和抗生素敏感性的不同, 将其与阴沟肠杆菌区分, 重新命名为阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)^[1]。阪崎肠杆菌在食品和环境广泛存在, 感染早产、出生体重偏低等免疫力低下的新生儿后, 可导致脑膜炎、坏死性小肠结肠炎和菌血症, 并可致神经系统后遗症和死亡。而且许多证据表明, 婴儿配方奶粉是阪崎肠杆菌主要的传染源和传播媒介^[2-4]。2008 年, Iversen 采用 16S rRNA 基因测序、核糖体分型和 DNA-DNA 杂交试验等方法, 对阪崎肠杆菌重新进行系统学分类, 将其定义为肠杆菌科内一个新的属, 即克罗诺杆菌属^[5]。克罗诺杆菌属有 7 个种, 目前发现, 其中只有阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)和苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)与临床感染有关^[6]。但基于食品安全的原则, 联合国粮农组织和世界卫生组织直接将克罗诺杆菌属, 作为严重危害婴儿健康的致病菌, 规定在婴儿配方奶粉中不得检出克罗诺杆菌属, 且无需进一步鉴定至种的水平^[7]。

目前生化试验依然是鉴定克罗诺杆菌的基础^[8,9], 产黄色素是克罗诺杆菌的特征之一, 产黄色素试验成了鉴定克罗诺杆菌的重要生化试验项目, 而且是全自动微生物生化鉴定系统的重要补充试验^[10]。但产黄色素试验也存在实验时间长、客观性不强等缺点。近年涌现了许多新的技术, 用于鉴定克罗诺杆菌^[11,12], 例如采用基于对硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(*paranitrophenyl- α -D-glucopyranoside*)水解的 α -葡萄糖苷酶试验, 进行克罗诺杆菌的鉴定, 具有快速准确的优点^[13], 而且该方法不需要大型仪器设备, 适用于各级实验室, 并取代了产黄色素试验, 在克罗诺杆菌检验方法的国际标准中得到应用^[9]。但对于国内 α -葡萄糖苷酶检测试剂的是使用研究相对较少。

本研究采用国内研制的 α -葡萄糖苷酶检测试剂, 通过 α -葡萄糖苷酶试验和产黄色素试验, 对包括克罗诺杆菌在内的 56 株肠杆菌科细菌鉴定的准确性进行比较, 并为国内制定快速准确鉴定克罗诺杆菌的标准方法提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

KB240 恒温培养箱(德国 BINDER 公司); WNE-22 恒温水浴锅(德国 MEMMERT); UV-2600 紫外可见分光光度计(岛津仪器(苏州)有限公司); VITEK 2 Compact 全自动

微生物生化鉴定系统(法国生物梅里埃公司); BAX Q7 全自动病原微生物检测系统(美国杜邦公司)。

α -葡萄糖苷酶检测试剂(批号 20181126, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司); TSA 琼脂(批号 180702; 北京陆桥技术股份公司); VITEK GN 卡(批号 2410536203, 法国生物梅里埃公司); DuPont BAX *Enterobacter sakazakii* PCR 试剂盒 D11801386(批号 Q8074, 美国杜邦公司)

标准菌株(阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544、穆汀斯克罗诺杆菌 ATCC 51329、大肠埃希氏菌 ATCC 25922、阴沟肠杆菌 ATCC 35030)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心, 其他 52 株分离菌株来自中国食品药品检定研究院以及本实验室。

2.2 实验方法

以下实验, 均以阪崎克罗诺杆菌标准菌株(ATCC 29544)为阳性对照, 以大肠埃希氏菌标准菌株(ATCC 25922)为阴性对照。

2.2.1 菌株准备

分别将 56 株菌划线接种在 TSA 琼脂平板, 于 36 °C 培养 24 h。

2.2.2 分离菌株的鉴定

挑取 TSA 琼脂平板上纯培养的分离菌株单个菌落, 在无菌蒸馏水中混匀后, 按照 DuPont BAX *Enterobacter sakazakii* PCR 试剂盒 D11801386 的说明书, 进行 PCR 检测。同时, 按 VITEK 2 Compact 全自动微生物生化鉴定系统说明书, 采用 VITEK GN 卡进行对各分离菌株进行生化鉴定。PCR 检测结果为阳性, 且经 VITEK 2 Compact 全自动微生物生化鉴定系统确认者, 判定为克罗诺杆菌。

2.2.3 α -葡萄糖苷酶试验

挑取 TSA 琼脂平板上纯培养的单个菌落, 在 3 mL 0.85% 的生理盐水中混匀, 调节菌悬液浊度至 0.5 麦氏单位。取 2 mL 菌悬液加入到 2 mL α -葡萄糖苷酶检测试剂中, 混匀后置水浴锅中于 37 °C 水浴培养 4 h 后, 在 405 nm 波长处测量其吸光度值。吸光度值 > 0.3 者, 判定为 α -葡萄糖苷酶试验阳性; 吸光度值 $\leq$ 0.3, 则判定为阴性^[13]。

2.2.4 产黄色素试验

挑取 TSA 琼脂平板上纯培养的单个菌落, 再次划线接种于 TSA 琼脂平板, 25 °C 培养 48 h 后, 在自然光下观察菌落的颜色^[14]。

3 结果与分析

3.1 分离菌株的鉴定

经 PCR 检测以及 VITEK 2 Compact 全自动微生物生

化鉴定系统鉴定, 52 株分离菌株中, 38 株为克罗诺杆菌属; 其余 14 株细菌中, 6 株为阴沟肠杆菌, 4 株为大肠埃希氏菌, 4 株为产气肠杆菌(见表 1)。

表 1 分离菌株的鉴定结果
Table 1 Identification of wild-type strains

分离菌株编号	PCR 检测结果	生化鉴定结果
1~38	阳性	克罗诺杆菌属
39~44	阴性	阴沟肠杆菌
45~48	阴性	大肠埃希氏菌
49~52	阴性	产气肠杆菌

3.2 α -葡萄糖苷酶试验和产黄色素试验

结果见表 2, 包括 2 个标准菌株在内的 40 株克罗诺杆菌在 α -葡萄糖苷酶检测试剂中培养后, 其吸光度值均 >0.3 , α -葡萄糖苷酶试验为阳性。16 株非克罗诺杆菌的肠杆菌在 α -葡萄糖苷酶检测试剂中培养后, 其吸光度值均 ≤ 0.3 , α -葡萄糖苷酶试验为阴性。 α -葡萄糖苷酶试验的阴阳性试验结果见图 1。

在包括 2 个标准菌株在内的 40 株克罗诺杆菌中, 有 37 株产黄色素试验为阳性, 3 株产黄色素试验为可疑。16 株非克罗诺杆菌的肠杆菌, 产黄色素试验均为阴性。产黄色素试验阳性、阴性及可疑结果见图 2。

表 2 56 株菌产黄色素试验和 α -葡萄糖苷酶试验结果
Table 2 Results of yellow pigment production test and α -glucosidase test in 56 strains

菌株名称	数量	产黄色素试验 ^a	α -葡萄糖苷酶试验 ^b
阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544	1	+	+
穆汀斯克罗诺杆菌 ATCC 51329	1	+	+
大肠埃希氏菌 ATCC 25922	1	-	-
阴沟肠杆菌 ATCC 35030	1	-	-
克罗诺杆菌属	35	+	+
克罗诺杆菌属	3	±	+
阴沟肠杆菌	6	-	-
大肠埃希氏菌	4	-	-
产气肠杆菌	4	-	-

注: a: “+”表示产黄色素, “-”表示不产黄色素, “±”表示结果可疑。
b: “+”表示吸光度值 >0.3 , “-”表示吸光度值 ≤ 0.3 。

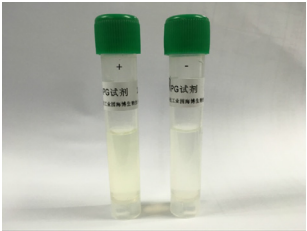
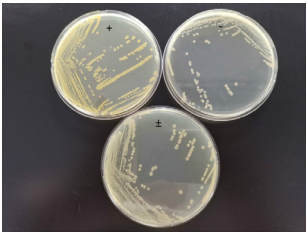


图 1 α -葡萄糖苷酶试验阳性及阴性结果

Fig.1 Positive and negative results of α -glucosidase test



注: “+”表示产黄色素, “-”表示不产黄色素, “±”表示结果可疑。
图 2 产黄色素试验阳性、阴性及可疑结果

Fig.2 Positive, negative and doubtful results of yellow pigment production test

4 结 论

产黄色素是克罗诺杆菌的特征之一, 因此我国现行克罗诺杆菌属检验的食品安全国家标准^[14], 只对产黄色素的菌落进行生化鉴定。但是, 产黄色素试验的培养时间长达 48 h。此外, 其结果判断会受主观因素的影响, 本研究也表明产黄色素试验容易出现可疑结果。国外的研究还发现, 近 8%的克罗诺杆菌属不产黄色素^[8]。因此, 用产黄色素试验来鉴定克罗诺杆菌, 不仅耗时费力, 而且还存在假阴性结果。

近来发现, 应用 α -葡萄糖苷酶试验鉴定克罗诺杆菌速度较快, 此外, 通过测定吸光度值来判定结果, 又排除了主观因素的干扰。而且该试验的特异性更高, 因为目前发现几乎所有克罗诺杆菌的 α -葡萄糖苷酶均为阳性^[8]。

现行克罗诺杆菌属检验的食品安全国家标准, 主要参照国际标准化组织的技术规范^[15], 该规范在技术上并不成熟。在新发布的克罗诺杆菌检验国际标准 ISO 22964: 2017 中, 已不再采用产黄色素试验鉴定克罗诺杆菌, 而改用 α -葡萄糖苷酶试验进行克罗诺杆菌的鉴定^[9]。因此, 现行克罗诺杆菌属检验的国家标准, 应适时进行修订, 以采用更为快速准确方法对克罗诺杆菌进行鉴定。

参考文献

[1] Farmer JJ, Asbury MA, Hickman FW, et al. *Enterobacter sakazakii*: A new species of “Enterobacteriaceae” isolated from clinical specimens [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 1980, 30(3): 569–584.
[2] Muytjens HL, Zanen HC, Sonderkamp HJ, et al. Analysis of eight cases of

- neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii* [J]. J Clin Microbiol, 1983, 18: 115–120.
- [3] vanAcker J, deSmet F, Muyltermans G, *et al.* Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1): 293–297.
- [4] Iversen C, Stephen F. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula [J]. Trends Food Sci Technol, 2003, 14: 443–454.
- [5] Iversen C, Mullane NB, Tall BD, *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 malonicus* sp. nov. *Cronobacter turicensis* sp. nov. *Cronobacter muytjensii* sp. nov. [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(6): 1442–1447.
- [6] Joseph S, Sonbol H, Hariri S, *et al.* Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(9): 3031–3039.
- [7] FAO/WHO, 2008. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. *Enterobacter Sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Meeting report, Washington, D.C. [EB/OL]. [2019-3-13]. <http://www.fao.org/3/a-i0453e.pdf>
- [8] Iversen C, Lehner A, Mullane N, *et al.* Identification of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(11): 3814–3816.
- [9] ISO 22964: 2017 Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. [S].
- [10] Jackson EE, Forsythe SJ. Comparative study of *Cronobacter* identification according to phenotyping methods [J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1): 146–245.
- [11] Wang Q, Zhao XJ, Wang ZW, *et al.* Identification of *Cronobacter* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with an optimized analysis method [J]. J Microbiol Meth, 2017, 139: 172–180.
- [12] David T, Mingzhen F, Sha Z, *et al.* Use of biochemical miniaturized galleries, rRNA based lateral flow assay and real time PCR for *Cronobacter* spp. confirmation [J]. Food Microbiol, 2018, 76: 189–195.
- [13] Kandhai MC, Reij MW, Van PK, *et al.* A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples [J]. J Food Prot, 2004, 67(6): 1267–1270
- [14] GB 4789.40-2016 食品安全国家标准 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验 [S].
GB 4789.40-2016 National food safety of standard-Detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) [S].
- [15] ISO/TS 22964: 2006 Milk and milk products-Detection of *Enterobacter sakazakii* [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



万志刚, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向为食品微生物检测。
E-mail: 81786350@qq.com



吕敬章, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: ficswsw@126.com