

# 克罗诺杆菌检测方法的研究进展

陈启明<sup>1,2</sup>, 刘战民<sup>1</sup>, 陆兆新<sup>2\*</sup>

(1. 上海大学生命科学学院, 上海 200444; 2. 南京农业大学食品学院, 南京 210095)

**摘要:** 克罗诺杆菌是一种食源性致病菌, 能够感染婴幼儿并导致坏死性小肠结肠炎、脑膜炎和菌血症, 死亡率最高可达 80%。克罗诺杆菌广泛地存在于食品和自然环境当中, 并且具有极强的抗干燥能力, 因此容易污染乳粉和其原料并在其中长期存在。控制克罗诺杆菌的污染需要增强食品生产质量控制, 也需要开发相应的检测技术。本研究主要从生理生化检测、免疫学检测技术、核酸检测技术等对克罗诺杆菌的检测方法进行综述, 对上述各种检测方法的原理和优劣势进行了分析和总结, 并且对克罗诺杆菌检测方法的未来发展进行展望。

**关键词:** 克罗诺杆菌; 生理生化检测; 免疫学检测技术; 核酸检测技术

## Research progress of detection methods of *Cronobacter* spp

CHEN Qi-Ming<sup>1,2</sup>, LIU Zhan-Min<sup>1</sup>, LU Zhao-Xin<sup>2\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China;  
2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**ABSTRACT:** *Cronobacter* spp. is a kind of foodborne pathogen, which can infect infants and cause necrotizing enterocolitis, sepsis, and meningitis, with fatality rate up to 80%. *Cronobacter* spp. widely exists in the nature environment and it has a great desiccation resistance. Thus, it can contaminate milk powder and raw material for a long time. The control of *Cronobacter* spp. contamination needs improving food quality control as well as developing detection methods. This review mainly focused on the detection method of *Cronobacter* spp., including physiological and biochemical characters detection methods, immunological methods, and nucleic acid test methods, analyzed and summarized the principle of the above detection methods as well as their advantages and disadvantages, and prospected the future development of *Cronobacter* spp. detection methods.

**KEY WORDS:** *Cronobacter* spp.; physiological and biochemical characters detection; immunological methods; nucleic acid test methods

## 1 引言

克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.)(图 1)是一种食源性条件致病细菌, 隶属于肠杆菌科, 革兰氏阴性细菌, 周生鞭毛且不产生芽孢<sup>[1]</sup>。2008 年克罗诺杆菌正式确认为肠杆菌

科的一个新属<sup>[2]</sup>, 共有 7 个种, 分别为阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌(*C. malonicus*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)、尤尼沃斯克罗诺杆菌(*C. universalis*)、穆汀斯克罗诺杆菌(*C. muytjensii*)、康帝蒙提克罗诺杆菌(*C. condimenti*)和都柏林克罗诺杆菌(*C.*

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072182)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation of China (32072182)

\*通讯作者: 陆兆新, 博士, 教授, 主要研究方向为食品微生物学、分子酶工程、食品生物加工。E-mail: fmb@njau.edu.cn

\*Corresponding author: LU Zhao-Xin, Ph.D, Professor, College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China. E-mail: fmb@njau.edu.cn

*dublinensis*)<sup>[3]</sup>。其中, *C. sakazakii* 分离数量最多, 约占所有菌株的三分之二; *C. condiment* 分离数量最少, 且尚未有致病病的报道<sup>[4]</sup>。

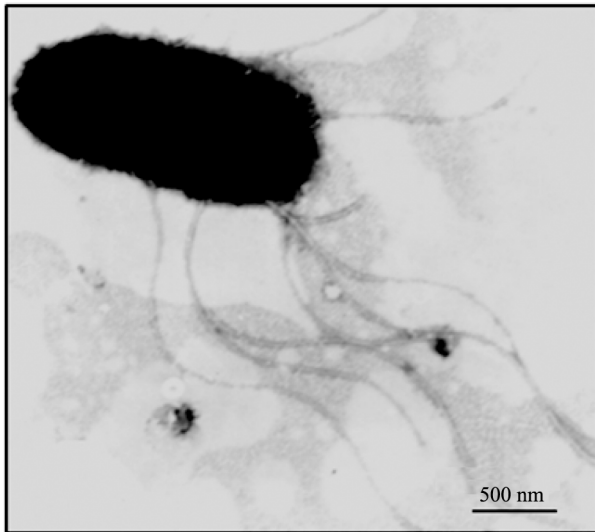


图 1 克罗诺杆菌电镜图<sup>[5]</sup>

Fig.1 The scanning electron microscope pictures of *Cronobacter* spp.<sup>[5]</sup>

克罗诺杆菌在自然环境中广泛存在, 主要感染对象为婴幼儿。研究者经过流行病学分析后发现, 克罗诺杆菌感染婴幼儿主要源头为被污染的婴幼儿配方乳粉。克罗诺杆菌能够污染乳粉的一个重要原因是克罗诺杆菌具有很强的抗干燥能力, 室温下在被污染乳粉中存在的克罗诺杆菌在超过两年半后依然保持着活性, 比其他常见食源性致病菌的抗干燥能力更强<sup>[6]</sup>。克罗诺杆菌的抗干燥能力还增强了它对于其他不利因素的抗性, 如处于低水分活度状态下的克罗诺杆菌对于热处理的抗性比高水分活度状态下抗性强很多<sup>[7]</sup>。乳粉及其原料通过加热进行喷雾干燥的过程也不足以灭活克罗诺杆菌<sup>[8]</sup>。婴幼儿配方乳粉中的克罗诺杆菌可能来源于工厂工人和设备上面粘附的菌体<sup>[9]</sup>, 也可能是由于家庭环境中不当储存时外界混入的<sup>[10]</sup>。婴幼儿食用了含有克罗诺杆菌的婴幼儿配方奶粉后, 克罗诺杆菌能够入侵婴幼儿小肠上皮细胞并且在巨噬细胞中生存, 随后随血液循环到全身各处, 越过血脑屏障, 导致坏死性结肠炎、菌血症和脑膜炎<sup>[11]</sup>, 克罗诺杆菌的感染率较低, 但是感染后的致死率极高, 部分研究报告中致死率可达 80%, 侥幸生存者也会患有神经系统的后遗症。根据美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的数据, 克罗诺杆菌感染后相比其他食源性致病菌所需治疗和善后的费用是最多的<sup>[12]</sup>。

考虑到对于婴幼儿的危害, 克罗诺杆菌是我国婴幼

儿配方乳粉中检测要求最为严格的病原菌<sup>[13]</sup>。除了对于产品生产过程中的质量控制外, 对于原料和最终乳粉产品的检测也是避免克罗诺杆菌感染婴幼儿的一个重要措施。基于上述理由, 本文拟对克罗诺杆菌现有检测方法和最新进展进行综述, 为食品工业和相关研究机构选择克罗诺杆菌检测方法提供依据。

## 2 克罗诺杆菌检测方法与技术研究进展

### 2.1 生理生化检测方法

利用克罗诺杆菌的各种生理特性, 通过各种培养方式使得测食品样品中的克罗诺杆菌优势生长并筛选出疑似菌株, 最后通过生理生化特征来鉴定即为克罗诺杆菌的生理生化检测。这也是开发最早的克罗诺杆菌检测方法<sup>[14]</sup>。克罗诺杆菌具有多种特征, 如革兰氏阴性、具有  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性和能够产黄色素。利用这些特征的组合, 研究者建立了经典的克罗诺杆菌检测过程: 1) 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(modified lauryl sulfate tryptose vancomycin medium, mLST-VM): 利用了月桂基硫酸盐和万古霉素抑制样品中阳性细菌的生长, 使克罗诺杆菌等革兰氏阴性细菌优势增长<sup>[15]</sup>; 2) 显色培养基: 利用克罗诺杆菌在肠杆菌科内独有的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性水解显色培养基中的底物发生颜色变化(图 2)(如 5-溴-4-氯-3-吡啶- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖甙<sup>[16]</sup>, 对硝基苯- $\alpha$ -D-葡萄糖吡喃苷<sup>[17]</sup>和 4-甲基伞形酮酰- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷<sup>[18]</sup>)将克罗诺杆菌与其他肠杆菌科细菌区分开来(不同的显色底物对于检测影响不大<sup>[19]</sup>); 3) 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(tryptic soy agar, TSA): 在该培养基上克罗诺杆菌能够产生黄色素, 可以进一步挑去杂菌。在此基础上通过发酵特性、氧化酶活性、柠檬酸水解活性等生化特性进一步确定是否属于克罗诺杆菌属。利用种之间的生理生化特征差异还可以将克罗诺杆菌鉴定到种<sup>[3]</sup>。生理生化鉴定已经广泛地应用于各种国际、国家、行业标准的制定如 ISO 22964:2017<sup>[20]</sup>、GB 4789.40-2016<sup>[21]</sup>。生理生化鉴定的检测限通常提及较少, 但 De-Benito 等<sup>[22]</sup>曾估算 ISO 22964:2017 的 LoD<sub>50</sub>(limit of detection, LoD<sub>50</sub> 指期望获得 50% 阳性结果的微生物污染浓度)为每份样品 0.8~1.1 CFU。

传统的生理生化鉴定耗时长、步骤烦琐, 极大地影响了检测效率, 可以通过开发富集培养基<sup>[23]</sup>或者优化富集培养基<sup>[24]</sup>、增加具有吸附菌体阳离子磁珠<sup>[25]</sup>或者氨基离子磁珠<sup>[26]</sup>吸附步骤、使用商品化生化鉴定试剂盒或者全自动微生物生化鉴定仪等方式提高检测速度和增加检测通量。然而, 受限于需要培养微生物和利用其代谢过程的原理, 生理生化检测效率和耗时间相比其他检测方法仍然不够理想。

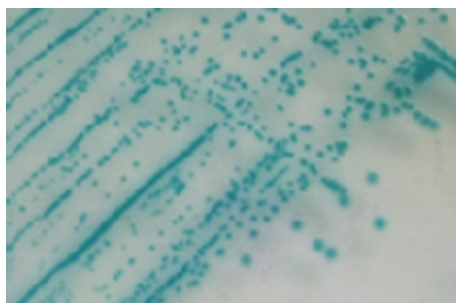


图 2 显色培养基上的克罗诺杆菌菌落  
Fig.2 Colonies of *Cronobacter* spp. on chromogenic medium

## 2.2 克罗诺杆菌免疫学检测技术

免疫学检测技术是基于抗原-抗体之间的相互作用关系, 对抗体和抗原进行鉴定。抗体按照开发方式可以分为单克隆抗体、多克隆抗体和基因工程抗体。针对克罗诺杆菌, 目前已经制备了兔多克隆抗体<sup>[27]</sup>、鼠单克隆抗体<sup>[28]</sup>、单链抗体<sup>[29,30]</sup>。抗克罗诺杆菌抗体在检测方面具有多种应用方式。

### 2.2.1 酶联免疫吸附实验

酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是在固相表面固定抗体或者抗原并利用抗原-抗体结合反应和酶标抗体, 是最为常用的克罗诺杆菌免疫学检测方法。在此基础上, Fang 等<sup>[31]</sup>对 ELISA 方法进行改进, 利用抗 *C. muytjensii* 单克隆抗体, 作为捕获用抗体和检测用抗体, 开发了一种免疫荧光检测方法, 其检测限为  $1.2 \times 10^2$  CFU/mL, 相比传统的比色法 ELISA 检测限降低了 230 倍。

### 2.2.2 免疫磁珠

基于抗体能够和细菌结合进而捕获菌体, 抗克罗诺杆菌抗体可以与磁珠相结合制备成免疫磁珠, 能够有效地

提升生理生化检测或者核酸检测的灵敏度<sup>[32]</sup>, 相比上文中提到的阳离子磁珠的无选择性吸附具有更高优势。考虑到克罗诺杆菌通常在乳粉中存在的量较少, 并且检测要求严格 (如我国国标规定克罗诺杆菌在婴幼儿配方食品中的检测要求为 100 g 奶粉中不得检出克罗诺杆菌), 免疫磁珠可以富集样品中的菌体, 减少预培养时间, 能够较好地提升检测效率<sup>[33,34]</sup> (图 3)。

### 2.2.3 胶体金试纸条

利用层析效应、抗原-抗体结合反应和胶体金显色效应, 可以将抗克罗诺杆菌抗体制成胶体金试纸条<sup>[35]</sup>, 制作和使用都较为方便, 检测时间短。

### 2.2.4 免疫传感器

ELISA 的显色底物一般为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB), 而被氧化的 TMB 具有电化学活性, 因此也可以将免疫学方法与电化学方法相结合开发出免疫传感器<sup>[36]</sup>, 使用丝网印刷碳电极对被氧化的 TMB 进行定量分析, 结果更为精确<sup>[37]</sup>。

多克隆抗体、单克隆抗体、基因工程抗体最初的来源均是淋巴 B 细胞, 其制备过程较为复杂和耗费时间, 尽管目前已经有了噬菌体表面展示技术或者无细胞表面展示技术, 利用事先设立的筛选库, 能够较快地降低筛选过程, 但这些技术的操作复杂性和费用仍不可小觑。核酸适配体能够像蛋白抗体一样, 形成一定的空间结构, 并且与抗原结合, 发挥出类似抗体效果。因此目前也有研究者将适配体应用于克罗诺杆菌抗体的制备<sup>[38]</sup>。相比于传统的蛋白抗体, 核酸适配体的核酸更易合成、成本更低、修饰也较为简单, 也更容易构建筛选库, 具有较好的发展潜力, 目前已有报道将抗克罗诺杆菌适配体与金纳米探针相结合, 检测限可达  $10^3$  CFU/mL<sup>[39]</sup>。但适配体的亲和力相对传统抗体还存在较大差距, 需要进行更为深入的研究。



图 3 免疫磁珠富集菌体过程  
Fig.3 Enrichment of *Cronobacter* spp. by immunomagnetic beads

## 2.3 克罗诺杆菌核酸检测技术

核酸检测技术是指利用目标核酸序列与已知序列的差异性来进行检测的技术。DNA 杂交和部分依赖于 DNA 图谱分型技术利用目标核酸序列的差异性来进行检测不需要知道具体序列,在快速测序技术尚未出现或者测序成本极高的时代,发挥着重要的作用。克罗诺杆菌与阴沟肠杆菌区分开正是通过 DNA 杂交来实现的<sup>[40]</sup>。随着测序技术的发展,对于克罗诺杆菌的基因组和特异性基因序列的分析和筛选变得更为方便,依赖于特异性靶点的核酸快速检测技术得到了更快发展。目前最早提交测序序列的为 *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894(Genbank 登录号: CP000783),而目前收录克罗诺杆菌数量最多的 *Cronobacter* MLST 数据库<sup>[4]</sup>,已经有了 935 条基因组序列,这些序列为克罗诺杆菌特异性靶点的筛选提供了极大的帮助。

### 2.3.1 基因分型技术

脉冲场凝胶电泳分型(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)是指在脉冲电场的作用下分离经过酶切处理的 DNA 条带图谱,通过比较不同菌株之间图谱的差异性,分析它们之间的亲缘关系,是目前细菌分子分型技术的“金标准”<sup>[41]</sup>。脉冲场凝胶电泳操作和读图相对较为复杂,且不同实验室的重复性相对较差,处于正在被更新的技术逐步替换的过程。

随着测序技术的进步,目前克罗诺杆菌比较常用的基因分型技术为多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST),可以精准地对细菌进行分型。多位点序列分型以核苷酸序列为分析基础,在不同实验室之间的重复性较好。目前已有专业分析工具和相应的数据库用作比对分析,如 *Cronobacter* MLST。多位点序列分析的可靠性依赖于看家基因的选择。目前 *Cronobacter* MLST 数据库推荐使用 ATP synthase beta chain (*atpD*), Elongation factor G (*fusA*), Glutamyl-tRNA synthetase (*glnS*), Glutamate synthase large subunit (*gltB*), DNA gyrase subunit B (*gyrB*), Translation initiation factor IF-2 (*infB*), Phosphoenolpyruvate synthase (*pps*) 7 个看家基因对克罗诺杆菌分离株进行分型,相关引物和反应条件以及比对工具也在网站提供。值得注意的是,脉冲电场凝胶电泳分型与多位点序列分型的结果可能存在着差异,甘辛等<sup>[42]</sup>采用这 2 种方法对全国 19 个省、自治区和直辖市从婴幼儿配方奶粉中筛选分离的 49 株克罗诺杆菌进行分型研究,结果发现相同 PFGE 型的菌株具有相同的 MLST 型,而相同 MLST 型却不一定具有较高的亲缘关系。这可能是由于多位点序列分型基于核苷酸序列,比脉冲电场凝胶电泳分型更为精确。

除了上述研究外,基于成簇的规律间隔的短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 序列<sup>[43]</sup>和单核苷酸多态性(single nucleotide

polymorphism, SNP) 序列<sup>[44]</sup>的分型技术也得到了应用。CRISPR 序列是原核生物基因组内的一段成簇的、规律间隔的重复序列,是细菌应对噬菌体等的重要武器,具有很高的多态性。SNP 序列分析则是利用单核苷酸多态性位点对细菌菌株进行分析。2 种方法均比 MLST 具有更强的分辨力,是未来基于核酸序列分型技术发展的方向之一,能够更好更为精确地对细菌进行分型。

分型技术可以用于食源性致病细菌的检测,对于流行病学分析具有着重要意义。但在实际样品检测中,由于分型操作相对复杂,耗费时间长,核酸的快速检测技术更为适合。

### 2.3.2 依赖于核酸扩增的快速检测技术

(1) 聚合酶链式反应和实时荧光定量聚合酶链式反应检测方法

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real time-PCR, RT-PCR)是最为常见的克罗诺杆菌核酸检测方法。研究者筛选出了 *dnaG*<sup>[45]</sup>、*gluB*<sup>[46]</sup>、*rpoB*<sup>[47]</sup>、*palE*<sup>[48]</sup>、*ompA*<sup>[49]</sup>、*zpx*<sup>[50]</sup>、*papC*<sup>[51]</sup>等多个检测用靶点,并开发了相应的 PCR 和荧光定量 PCR 检测方法。为了避免假阴性的出现,也可以在反应体系中增加扩增内标<sup>[52]</sup>。PCR 和荧光定量 PCR 需要电泳检测或者荧光染料,Yuan 等<sup>[53]</sup>还设计了一种将鸟嘌呤四链体与 PCR 相结合,设计了一种原位扩增的可视化检测方法,利用肉眼就可以区分阴性和阳性样本,使用更为方便,也可以实现定量分析。也有研究者将 PCR 与 ELISA 方法相结合建立了 PCR-ELISA 检测方法,同样可以实现定量分析<sup>[54]</sup>。

### (2) 恒温扩增方法

PCR 方法需要昂贵的扩增仪器。为了实现更方便和更低成本的检测,研究者还开发了各种各样的克罗诺杆菌恒温扩增检测方法,如环介导恒温核酸扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)<sup>[55]</sup>、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)<sup>[56]</sup>、依赖解旋酶恒温扩增(helicase-dependent isothermal deoxyribonucleic acid, HAD)<sup>[57]</sup>、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)<sup>[58]</sup>。这些恒温扩增方法对于设备的依赖度较低,并且通常具有更高的灵敏度,更为广泛的应用前景。利用恒温扩增方法的高灵敏度和简易型,将恒温扩增与其他方法相结合,进一步提升检测效率。考虑到恒温扩增系统依然需要加温设备,也可以利用自发热装置如氧化钙和水反应放热为反应提供条件<sup>[55]</sup>。

### (3) 其他核酸快速检测方法

除了上述方法,有不少研究者还在尝试进一步提升检测效率。如 Xu 等<sup>[59]</sup>将核酸探针与磁珠相结合,制备了一种可以用于捕获特异性核酸片段的磁珠富集方法。这种方法类似于上文提到的免疫磁珠,同样能够起到减少富集

时间, 提升检测效率的作用。Choi 等<sup>[60]</sup>基于基因扩增制备了一种微流控芯片, 能够快速检测克罗诺杆菌。经过 12 h 的培养能够检测初始接种量为 1 CFU/300 g 婴幼儿配方奶粉, 该系统可以用于现场检测, 对于企业和质检部门具有很好的应用价值。Fu 等<sup>[61]</sup>将 LAMP 与侧向层析相结合, 开发了检测限在  $10^1$  级别的试纸条检测方法, 整个检测过程在 40 min 以内(图 4)。

## 2.4 克罗诺杆菌其他诊断技术

克罗诺杆菌其他检测方法还包括飞行时间质谱法<sup>[62]</sup>和气相色谱法<sup>[63]</sup>, 这些方法利用特征性物质的指纹图谱识别克罗诺杆菌, 类似基因分型, 其分辨力可以达到种水平, 样品制备要求较低, 但是设备要求较高。

## 3 克罗诺杆菌检测技术的发展趋势与前景

尽管克罗诺杆菌感染率较低, 但是其危害对象为婴

幼儿且感染后果严重, 因此能够快速准确地检测出食品中污染的克罗诺杆菌就极为重要。克罗诺杆菌在食品中特别是婴幼儿配方奶粉中污染有如下几个特点: 1) 污染量低; 2) 检测要求高; 3) 食品基质成分复杂。针对上述特点, 目前已经有大量的关于克罗诺杆菌的检测方法, 能够满足不同应用场景的检测要求。也正是如此, 本文从生理生化检测、免疫学检测方法和依赖于核酸的检测方法 3 个方面对克罗诺杆菌检测方法进行了综述。3 种类型的方法各有各的优缺点, 均有着广泛应用前景。需要指出的是, 目前大量的检测方法, 大多更为强调方法的灵敏度和检测限。提升灵敏度能够更快更好地检出克罗诺杆菌, 但是克罗诺杆菌在食品污染量低且食品基质可能会对检测造成一定的干扰, 这导致培养增菌这一步骤必不可少, 且是整个检测过程耗时最长的一步。目前也有通过磁珠富集的方式来减少这一步骤的时间, 但是仍然耗时较长。因此, 在未来研究过程中, 还需要对这一点进行更为深入的研究。

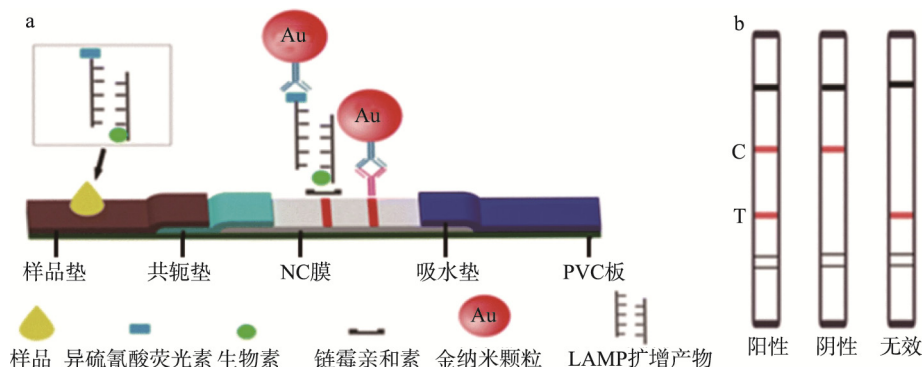


图 4 LAMP 与侧向层析相结合<sup>[61]</sup>

Fig.4 Combination of LAMP and lateral flow

## 参考文献

- [1] Kim TJ, Silva JL, Weng WL, et al. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by water-soluble muscadine seed extracts [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 129(3): 295–299.
- [2] Iversen C, Mullane N, Mccardel 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 mytjensii* 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]. Int J Syst Evol Micr, 2008, 58: 1442–1447.
- [3] Joseph S, Cetinkaya E, Drahovska 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]. Int J Syst Evol Micr, 2012, 62: 1277–1283.
- [4] Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. *Cronobacter* spp. [DB/OL]. [2020-08-28]. <https://pubmlst.org/cronobacter/>
- [5] Veronica EK, Sara AO, Everardo CQ, et al. Proteomics profiles of *Cronobacter sakazakii* and a *fliF* mutant: Adherence and invasion in mouse neuroblastoma cells [J]. Microbial Pathogen, 2020, 104595. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104595>
- [6] Barron JC, Forsythe SJ. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula [J]. J Food Protect, 2007, 70(9): 2111–2117.
- [7] Arroyo C, Condon S, Pagan R. Thermobacteriological characterization of *Enterobacter sakazakii* [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 136(1): 110–118.
- [8] Pei XY, Li Y, Zhang HN, et al. Surveillance and characterisation of *Cronobacter* in powdered infant formula processing factories [J]. Food Control, 2019, 96: 318–323.
- [9] Lu Y, Liu P, Li CG, et al. Prevalence and genetic diversity of *Cronobacter* species isolated from four infant formula production factories in China [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 8.
- [10] Simmons BP, Gelfand MS, Haas M, et al. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula [J]. Infect Cont Hosp Ep, 1989, 10(9): 398–401.

- [11] Townsend SM, Hurrell E, Gonzalez-Gomez I, *et al.* *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat [J]. *Microbiol-Sgm*, 2007, 153: 3538–3547.
- [12] Minor T, Lasher A, Klontz K, *et al.* The per case and total annual costs of foodborne illness in the United States [J]. *Risk Anal*, 2015, 35(6): 1125–1139.
- [13] GB 10765-2010 食品安全国家标准 婴儿配方食品[S].  
GB 10765-2010 National food safety standard- Infant formula [S].
- [14] Lampel KA, Chen Y. Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula [J]. *Int J Food Microbiol*, 2009, 136(2): 179–184.
- [15] Guillaume-Gentil O, Sonnard V, Kandhai MC, *et al.* A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples [J]. *J Food Protect*, 2005, 68(1): 64–69.
- [16] Iversen C, Druggan P, Forsythe S. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study [J]. *Int J Food Microbiol*, 2004, 96(2): 133–139.
- [17] Kandhai MC, Reij MW, Van-Puyvelde K, *et al.* A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples [J]. *J Food Protect*, 2004, 67(6): 1267–1270.
- [18] Oh SW, Kang DH. Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Enterobacter sakazakii* [J]. *Appl Environ Microb*, 2004, 70(9): 5692–5694.
- [19] Teramura H, Fukuda N, Okada Y, *et al.* Comparison of chromogenic selective media for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. *Biocontrol Sci*, 2018, 23(1): 27–33.
- [20] ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. [S].
- [21] GB 4789.40-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验[S].  
GB 4789.40-2016 National food safety standard-Food microbiology detection-*Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) detection [S].
- [22] De-Benito A, Besse NG, Desforges I, *et al.* Validation of standard method EN ISO 22964:2017-Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp [J]. *Int J Food Microbiol*, 2019, 288: 47–52.
- [23] Al-Holy MA, Shin JH, Osaili TM, *et al.* Evaluation of a new enrichment broth for detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula [J]. *J Food Protect*, 2011, 74(3): 387–393.
- [24] Weber C, Stephan R, Druggan P, *et al.* Improving the enrichment procedure for Enterobacteriaceae detection [J]. *Food Microbiol*, 2009, 26(6): 565–572.
- [25] Mullane NR, Murray J, Drudy D, *et al.* Detection of *Enterobacter sakazakii* in dried infant milk formula by cationic-magnetic-bead capture [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(9): 6325–6330.
- [26] 王蕊, 杨鑫淼, 陈思涵, 等. 一种快速检测婴幼儿配方奶粉中阪崎克罗诺杆菌的方法[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(10): 212–218.  
Wang R, Yang XY, Chen SH, *et al.* A method for rapid detection of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula [J]. *Food Ferment Ind*, 2018, 44(10): 212–218.
- [27] 徐晓可, 吴清平, 张淑红, 等. 阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的原核表达及其多克隆抗体制备 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(2): 198–201.  
Xu XK, Wu QP, Zhang SH, *et al.* Prokaryotic expression of *Enterobacter sakazakii*  $\alpha$ -Glucosidase and preparation of its polyclonal antibody [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2013, 34(2): 198–201.
- [28] 翟绪昭, 曾海娟, 王广彬, 等. 阪崎克罗诺杆菌单克隆抗体的制备及其间接竞争-ELISA 检测方法[J]. *食品科学*, 2017, 38(20): 268–272.  
Dong XZ, Zeng HZ, Wang GB, *et al.* Preparation of monoclonal antibodies against *Cronobacter sakazakii* and development of an indirect competitive ELISA for detection of this bacterium [J]. *Food Sci*, 2017, 38(20): 268–272.
- [29] Chen Q, Tao T, Bie X, *et al.* Characterization of a single-chain variable fragment specific to *Cronobacter* spp. from hybridoma based on outer membrane protein A [J]. *J J Microbiol Meth*, 2016, 129: 136–143.
- [30] 张秀媛, 黄智鸿, 王丽霞, 等. 基于 ELISA 克罗诺杆菌单链抗体制备与鉴定[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(5): 169–174.  
Zhang XY, Huang ZH, Wang LX, *et al.* Preparation and identification of *Cronobacter* single-chain variable fragment antibody using ELISA [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2015, 31(5): 169–174.
- [31] Fang H, Li XM, Leng YK, *et al.* Amphiphilic ligand modified gold nanocarriers to amplify lanthanide loading for ultrasensitive DELFIA detection of *Cronobacter* [J]. *Analyst*, 2020, 145(1): 249–256.
- [32] Chen QM, Li YH, Tao TT, *et al.* Development and application of a sensitive, rapid, and reliable immunomagnetic separation-PCR detection method for *Cronobacter* spp [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(2): 961–969.
- [33] 周文琦, 王蕊, 王喆, 等. 乳中阪崎克罗诺杆菌的快速捕获方法的建立 [J]. *中国乳品工业*, 2016, 44(12): 19–21.  
Zhou WQ, Wang R, Wang Z, *et al.* Development on rapid capturing *Cronobacter sakazakii* in dairy products [J]. *China Dairy Ind*, 2016, 44(12): 19–21.
- [34] 叶玲娟, 黄浩然, 柳露, 等. IgG-Biotin-Avidin-HRP 信号转导探针结合免疫比色法快速检测克罗诺阪崎肠杆菌[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(7): 237–243.  
Ye LX, Huang HR, Liu L, *et al.* Rapid detection of *Cronobacter sakazakii* by IgG-Biotin-Avidin-HRP combined with colorimetric immunoassay [J]. *J Chin I Food Sci Technol*, 2020, 20(7): 237–243.
- [35] Pan RL, Jiang YJ, Sun LH, *et al.* Gold nanoparticle-based enhanced lateral flow immunoassay for detection of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula [J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101(5): 3835–3843.
- [36] 黄留洋, 窦文超, 胡雪, 等. 快速检测奶粉中阪崎肠杆菌新型酶免疫传感器[J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(8): 1272–1277.  
Huang LY, Dou WC, Hu X, *et al.* A new enzyme immunosensor for rapid detection of *E.sakazakii* in milk powder [J]. *Chin J Veter Sci*, 2014, 34(8): 1272–1277.
- [37] Hu SF, Yu YG, Wu XW, *et al.* Simultaneous detection and identification of pathogenic *Cronobacter* species by high-resolution melting analysis in powdered infant formulas [J]. *Int J Dairy Technol*, 2018, 71(1): 253–263.
- [38] 张云怡, 梅玲玲, 占利, 等. 阪崎克罗诺菌特异性适配子筛选研究 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2020, 36(1): 12–19, 24.  
Zhang YY, Mei LL, Zhan L, *et al.* Screening of adaptor specific for *Cronobacter sakazakii* [J]. *Chin J Zoonoses*, 2020, 36(1): 12–19, 24.
- [39] Kim HS, Kim YJ, Chon JW, *et al.* Two-stage label-free aptasensing platform for rapid detection of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula [J]. *Sens Actuator B-Chem*, 2017, 239: 94–99.
- [40] Farmer JJ, Asbury MA, Hickman F, *et al.* *Enterobacter sakazakii*: A new



- species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1980, 30: 569–584.
- [41] Bender JB, Hedberg CW, Boxrud DJ, *et al.* Use of molecular subtyping in surveillance for *Salmonella enterica* serotype typhimurium [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(3): 189–195.
- [42] 甘辛, 王伟, 胡豫杰, 等. 我国婴儿配方粉来源的克罗诺杆菌脉冲场凝胶电泳分子分型和多位点序列分型研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2018, 30(3): 235–238.
- Gan X, Wang W, Hu YJ, *et al.* Study on pulsed field gel electrophoresis and multilocus sequence typing of *Cronobacter* isolated from powdered infant formula [J]. *Chin J Food Hyg*, 2018, 30(3): 235–238.
- [43] Zeng HY, Li CS, Ling N, *et al.* Prevalence, genetic analysis and CRISPR typing of *Cronobacter* spp. isolated from meat and meat products in China [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 321: 8.
- [44] 郭清艳, 钮冰, 杨捷琳. 两种分子分型技术在乳制品克罗诺杆菌污染溯源分析上的比较[J]. *中国乳品工业*, 2018, 46(8): 13–17, 20.
- Guo QY, Niu B, Yang JL. Application of whole genome sequencing (WGS) to *Cronobacter sakazakii* in dairy products, comparing two subtyping methods of MLST and SNP [J]. *China Dairy Ind*, 2018, 46(8): 13–17, 20.
- [45] Kaclikova E, Turcovsky I. A method for the detection of *Cronobacter* strains in powdered milk-based foods using enrichment and real-time PCR [J]. *J Food Nutr Res*, 2011, 50(2): 118–124.
- [46] Ye YW, Ling N, Han YJ, *et al.* Detection of *Cronobacter* on *gluB* gene and differentiation of four *Cronobacter* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism typing [J]. *J Food Saf*, 2015, 35(3): 422–427.
- [47] Li Y, Chen Q, Jiang H, *et al.* Novel development of a qPCR assay based on the *rpoB* gene for rapid detection of *Cronobacter* spp [J]. *Curr Microbiol*, 2016, 72(4): 436–443.
- [48] Krascensicova K, Trncikova T, Kaclikova E. Detection and quantification of *Enterobacter sakazakii* by real-time 5'-nuclease polymerase chain reaction targeting the *palE* gene [J]. *Food Anal Method*, 2008, 1(2): 85–94.
- [49] 李静, 段永生, 王建昌, 等. 实时荧光单引物等温扩增检测阪崎克罗诺杆菌方法的建立[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(5): 524–530.
- Li J, Duang YS, Wang JC, *et al.* Establishment of the real-time fluorescence single primer isothermal amplification for the detection of *Cronobacter sakazakii* [J]. *Chin J Food Hyg*, 2015, 27(5): 524–530.
- [50] Kothary MH, Mccardell BA, Frazer CD, *et al.* Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(13): 4142–4151.
- [51] Qiming C, Tingting T, Xiaomei B, *et al.* Mining for sensitive and reliable species-specific primers for PCR for detection of *Cronobacter sakazakii* by a bioinformatics approach [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(8): 5091–5101.
- [52] Wang X, Zhu C, Xu X, *et al.* Real-time PCR with internal amplification control for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in food samples [J]. *Food Control*, 2012, 25(1): 144–149.
- [53] Yuan Y, Wu X, Liu Z, *et al.* A signal cascade amplification strategy based on RT-PCR triggering of a G-quadruplex DNAzyme for a novel electrochemical detection of viable *Cronobacter sakazakii* [J]. *Analyst*, 2020, 145(13): 4477–4483.
- [54] Li YH, Cao L, Zhang C, *et al.* Development and evaluation of a PCR-ELISA assay for the detection and quantification of *Cronobacter* spp [J]. *Int Dairy J*, 2013, 33(1): 27–33.
- [55] 付世骞, 曲艳艳, 冯晓涵, 等. 环介导等温扩增-无电加热法检测乳中阪崎克罗诺杆菌[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(3): 220–225.
- Hu SY, Qu YY, Feng XH, *et al.* Detection of *Cronobacter sakazakii* in milk by Loop-mediated isothermal amplification without electric heating method [J]. *Food Ferment Ind*, 2018, 44(3): 220–225.
- [56] Liu J, Zhan Z, Liang T, *et al.* Dual-signal amplification strategy: universal asymmetric tailing-PCR triggered rolling circle amplification assay for fluorescent detection of *Cronobacter* spp. in milk [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(4): 3055–3065.
- [57] 周巍, 张薇, 刘亮, 等. 婴儿配方乳粉中阪崎克罗诺杆菌解酶恒温基因扩增检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2014, 35(4): 155–158.
- Zhou W, Zhang W, Liu L, *et al.* Detection of *Cronobacter sakazakii* in infant formula powder by helicase-dependent isothermal DNA amplification assay [J]. *Food Sci*, 2014, 35(4): 155–158.
- [58] Liu SY, Geng Y, Liu LB, *et al.* Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid detection of *Cronobacter* spp [J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101(6): 4914–4922.
- [59] Xu F, Li P, Ming X, *et al.* Detection of *Cronobacter* species in powdered infant formula by probe-magnetic separation PCR [J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(10): 6067–6075.
- [60] Cho TJ, Kim HW, Yoo C, *et al.* Labchip-based diagnosis system for on-site application: Sensitive and easy-to-implement detection of single recoverable *Cronobacter* in infant formula without post-enrichment treatment [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 327: 108659.
- [61] Fu SQ, Jiang YJ, Jiang X, *et al.* Probe-free label system for rapid detection of *Cronobacter* genus in powdered infant formula [J]. *AMB Express*, 2018, 8: 10.
- [62] 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.
- [63] Whittaker P. Identification of six species in the new genus *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) from culture using gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters [J]. *JAOAC Int*, 2011, 94(5): 1581–1584.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



陈启明, 讲师, 主要研究方向为食品安全与快速检测方法。

E-mail: cqm2016@shu.edu.cn



陆兆新, 教授, 主要研究方向为食品微生物学、分子酶工程、食品生物加工。

E-mail: fmb@njau.edu.cn