

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240927009

引用格式: 郑洁莹, 吴炜亮, 赵柬云, 等. 食品中 3 种克罗诺杆菌标准检测方法的比对研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(1): 195–201.

ZHENG JY, WU WL, ZHAO JY, *et al.* Comparative study on 3 kinds of standard detection methods of *Cronobacter* in food [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(1): 195–201. (in Chinese with English abstract).

食品中 3 种克罗诺杆菌标准检测方法的比对研究

郑洁莹^{1,2}, 吴炜亮¹, 赵柬云², 甘辛^{2*}, 白莉^{1,2*}

(1. 南方医科大学公共卫生学院, 广州 510515; 2. 国家食品安全风险评估中心,
国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

摘要: 目的 比较 3 种国内外克罗诺杆菌检测方法, 验证 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》、GB 4789.40—2024《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验》和 ISO 22964—2017《食物链微生物学—克罗诺杆菌的水平检测方法》3 种标准方法的实际检测性能。**方法** 采用 3 种标准方法, 对 2020—2022 年采集的包括婴儿配方奶粉、谷基婴幼儿辅食、玉米原料和婴儿配方奶粉原辅料在内的 403 份样品进行克罗诺杆菌的检测, 并对克罗诺杆菌分离株进行药物敏感性检测。**结果** 403 份样品中克罗诺杆菌的总污染率为 17.9% (72/403), 玉米原料、谷基婴幼儿辅食和婴儿配方奶粉的污染率分别为 37.3% (38/102)、23.4% (33/141) 和 1.0% (1/100)。3 种标准方法的总检出率虽然没有显著差异($\chi^2=3.601$, $P=0.170$), 但 41.5 °C 相较于 44 °C 可以有效提升检出率($\chi^2=18.813$, $P=0.000$)。72 株克罗诺杆菌耐药率为 55.6% (40/72), 其中头孢唑林、氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸耐药率分别为 52.8% (38/72)、5.6% (4/72)、1.4% (1/72)。**结论** 本研究表明 GB 4789.40—2024 已达到国际相关方法的水平, 为 GB 4789.40 和 ISO 22964 方法检测结果的互认提供数据支持。克罗诺杆菌对头孢唑林具有较高的耐药性, 在临床治疗选择抗生素时应避免使用该药物。

关键词: 克罗诺杆菌; GB 4789.40; ISO 22964; 方法比对; 耐药性

Comparative study on 3 kinds of standard detection methods of *Cronobacter* in food

ZHENG Jie-Ying^{1,2}, WU Wei-Liang¹, ZHAO Jian-Yun², GAN Xin^{2*}, BAI Li^{1,2*}

(1. School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;
2. National Health Commission Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China
National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

ABSTRACT: Objective To compare three domestic and foreign *Cronobacter* detection methods, for verifying the actual detection performance of three standard methods: GB 4789.40—2016 *National standard for food safety food-Microbiology tests Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii) test*, GB 4789.40—2024 *National standard for food safety food-Microbiology tests Cronobacter test* and ISO 22964—2017 *Food chain microbiology-Horizontal*

收稿日期: 2024-09-27

第一作者: 郑洁莹(1998—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: zjy13676191640@163.com

*通信作者: 甘辛(1984—), 男, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: ganxin@cfssa.net.cn

白莉(1981—), 女, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: baili@cfssa.net.cn

detection methods for Cronobacter spp. **Methods** Three standard methods were used to detect *Cronobacter* in 403 samples collected from 2020 to 2022, including infant formula, cereal-based infant supplements, corn ingredients, and raw and supplemental ingredients of infant formula, and to test *Cronobacter* isolates for drug susceptibility.

Results The total contamination rate of *Cronobacter* in 403 samples was 17.9% (72/403), and the contamination rates of corn raw material, cereal-based infant supplement and infant formula were 37.3% (38/102), 23.4% (33/141) and 1.0% (1/100), respectively. Although there was no significant difference in the total detection rate among the three standard methods ($\chi^2=3.601$, $P=0.170$), 41.5 °C could effectively improve the detection rate compared with 44 °C ($\chi^2=18.813$, $P=0.000$). The resistance rate of 72 strains of *Cronobacter* was 55.6% (40/72), among which the resistance rates of cefazolin, ampicillin, and amoxicillin/clavulanic acid were 52.8% (38/72), 5.6% (4/72), and 1.4% (1/72), respectively. **Conclusion** This study shows that GB 4789.40—2024 has reached the level of the international relevant methods, providing data support for the mutual recognition of the test results of GB 4789.40 and ISO 22964 methods. *Cronobacter* has high resistance to cefazolin, which should be avoided when choosing antibiotics for clinical treatment.

KEY WORDS: *Cronobacter*; GB 4789.40; ISO 22964; comparison of method; antibiotic susceptibility

0 引言

克罗诺杆菌(*Cronobacter*)是肠杆菌科一种兼性厌氧的条件致病菌,国际食品微生物规范委员会将其列为对限制人群危害严重,能产生慢性后遗症并危及生命的食源性致病菌^[1]。由于该菌的易感人群为 0~6 月龄的早产儿和新生儿,因而受到婴儿食品生产加工行业、监管机构和消费者的高度关注。尽管婴儿食品的加工过程受到严格的监管和控制,相关产品污染导致婴儿感染克罗诺杆菌的散发病例或暴发事件仍时有发生^[2]。目前,克罗诺杆菌包括 7 个种和 3 个亚种,感染后可引发脑膜炎、坏死性小肠结肠炎和菌血症等严重临床症状^[3],由于临床症状和病例所在地区医疗条件的不同,致死率高达 40%~80%^[4]。该菌还可以引起成人,尤其是老年人和免疫功能低下或缺陷的人感染^[5],成人感染的症状包括结膜炎、胆汁性败血症、尿毒症和肺炎等^[6]。克罗诺杆菌广泛分布于自然环境中,能在包括婴儿食品在内的饮料、谷物类食品、植物、新鲜农产品、动物产品等产品中长期存活,在饮用水、污水、土壤以及食品加工环境、医院和家庭环境中也可被检测到^[7-8]。研究表明克罗诺杆菌可在婴儿配方奶粉(powdered infant formula, PIF)中存活长达 2.5 年,即使只有微量的污染,也能导致婴儿食用后发生严重感染^[9-10]。除 PIF 外的其他婴儿食品也可能成为克罗诺杆菌的载体^[11]。因此,迫切需要可靠的克罗诺杆菌检测方法,提升对 PIF 和其他婴儿食品中克罗诺杆菌的检测和监测能力^[12]。

克罗诺杆菌可在 6 至 45 °C 的温度范围内生长,报道显示不同的温度对其生长有显著影响^[13]。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》的检验流程与 ISO

22964—2006《乳和乳制品中克罗诺杆菌检测》基本一致。GB 4789.40—2024《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验》较 2016 版方法进行了大量调整,将选择性增菌培养温度调整为(41.5±1) °C。ISO 22964—2017《食物链微生物学—克罗诺杆菌的水平检测方法》在 2006 版基础上,除将选择性增菌培养温度调整为(41.5±1) °C 外,还将选择性培养基改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤(modified lauryl sulfate tryptose vancomycin medium, mLST/Vm)替换为克罗诺杆菌选择性肉汤(*Cronobacter* screening broth, CSB),显色培养基改为克罗诺杆菌显色分离琼脂(chromogenic *Cronobacter* isolation agar, CCI)。不同的检测方法可能存在性能差异,随着对国际合作和数据共享的要求越来越高,特别是在发生食源性疾病暴发事件时,标准方法之间的一致性对于检测结果的准确性是非常必要的^[14]。本研究旨在比较 GB 4789.40—2016、GB 4789.40—2024 和 ISO 22964—2017 国内外 3 种标准方法的实际检测性能,为未来 GB 4789.40 和 ISO 22964 方法的检测结果的互认提供可靠的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究自 2020—2022 年,采集了来自我国的 4 大类共计 403 份样品,包括来自零售农贸市场、超市和网上商店的 100 份婴儿配方奶粉、141 份谷基婴幼儿辅食和 102 份玉米原料,以及婴儿配方食品生产企业采集的 60 份婴儿配方奶粉原辅料,其中乳清蛋白粉和乳糖粉各 20 份,低聚果糖和半乳糖各 10 份。所有用于分析检测的样品均在保质期内。

胰蛋白胨大豆琼脂(tryptone soya agar, TSA)、缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、mLST/Vm、脑心浸

液琼脂(brain-heart infusion agar, BHA)(北京陆桥科技有限公司); CSB、CCI (A 公司); 阪崎肠杆菌显色培养基(brilliance *Enterobacter sakazakii* agar, DFI)(英国 Oxoid 公司); 0.45%生理盐水(法国生物梅里埃公司)。

1.2 仪器与设备

DensiCHEK-plus 比浊仪、VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析仪、VITEK 革兰阴性鉴定卡、革兰阴性细菌药敏卡 AST-GN16(法国生物梅里埃公司); C1000 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪、Gel Doc 电泳仪、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); PL602-L 电子天平(精度 0.01 g, 瑞士梅特勒-托多利公司); SQ810C 高压灭菌锅(重庆雅马拓科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理与预增菌

每个样品无菌称量 100 g 置于灭菌容器中, 加入预热至 41 °C 的 900 mL BPW, 充分混匀, 37 °C 培养(18±2) h。

1.3.2 克罗诺杆菌的选择性增菌

GB 4789.40—2016 标准: 预增菌液充分混匀后, 取 1 mL 接种于 10 mL mLST/Vm 肉汤中并混匀, 44 °C 培养(24±2) h。将选择性增菌液混匀后, 分别取 1 接种环划线接种于 2 个 DFI 平板上, 37 °C 培养(24±2) h。

GB 4789.40—2024 标准: 预增菌液充分混匀后, 取 1 mL 接种于 10 mL mLST/Vm 肉汤中并混匀, 41.5 °C 培养(24±2) h。将选择性增菌液混匀后, 分别取 1 接种环划线接种于 2 个 DFI 上平板, 37 °C 培养(24±2) h。

ISO 22964—2017 标准: 预增菌液充分混匀后, 取 0.1 mL 接种于 10 mL CSB 肉汤中并混匀, 41.5 °C 培养(24±2) h。将选择性增菌液混匀后, 分别取 1 接种环划线接种于 2 个 CCI 平板, 41.5 °C 培养(24±2) h。

1.3.3 克罗诺杆菌确证实验

从 CCI 或 DFI 平板上挑选蓝绿色的克罗诺杆菌可疑单菌落, 划线接种于 TSA 平板上, 37 °C 培养(24±2) h。从 TSA 平板上挑取纯化后的菌落, 置于 3 mL 0.45%的灭菌生理盐水中制备 0.5 个麦氏单位的菌悬液, 用 VITEK 革兰阴性鉴定卡进行鉴定。

从 TSA 平板上挑取纯化后的菌落, 提取 DNA。克罗诺杆菌属水平鉴定引物针对内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)设计, 上下游引物由上海英骏生物技术有限公司合成, 序列分别为: ITS-F 5'-GGGTTGTGCGAAAGCGAA-3', ITS-R 5'-GTCTTCGTGCTGCGAGTTTG-3'^[15], 目的条带大小为 282 bp。采用 25 μL PCR 反应体系: 2×Master Mix 12.5 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 9.5 μL, 模板 DNA 1 μL。反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。采用 2%的琼脂糖凝胶检测,

120 V 恒压电泳 30 min 后用凝胶成像系统观察结果。

1.3.4 国内外两种方法的检测性能

按照 GB 4789.45—2023《食品安全国家标准 微生物学检验方法验证准则》的要求, 选取 3 大类样品: 成人奶粉(乳与乳制品)、婴儿配方奶粉(特殊膳食)和乳清蛋白粉(原料)。取 100 g 样品添加至 900 mL BPW 中制备预增菌, 每类样品各制备 22 份, 其中 20 份样品分别添加浓度为 10⁻¹ CFU/mL 的菌液各 1 mL, 另设置空白对照 1 份, 阳性对照 1 份(浓度为 10⁻¹ CFU/mL), 37 °C 培养 18 h。其中不同样品中添加不同来源的克罗诺杆菌菌株, 成人奶粉/ATCC 29544(标准菌株), 婴儿配方奶粉/Crono-YL25(环境分离株), 乳清蛋白粉/Crono-Condi(食品分离株)。取 1 mL 前增菌液分别加至 1 管 10 mL mLst-Vm 增菌液中, 41.5 °C 培养 24 h, 另取 100 μL 增菌液加至 CSB 肉汤中, 41.5 °C 培养 24 h。选择性增菌液划线接种 DFI 平板和 CCI 平板。LOD₅₀ [检出限(limit of detection, LOD)]是指期望获得 50%阳性结果的微生物污染浓度^[16], 两种方法的检测性能, 按公式(1)计算:

$$\text{LOD}_{50} = \frac{0.7 \times d}{\ln(n/(n-y))} \quad (1)$$

式中, d 为样品的接收参考值[CFU/g(mL)]; y 为经确证的阳性结果数(份); n 为测试总数(份)。

1.3.5 抗生素敏感性实验

将鉴定为克罗诺杆菌的待测菌株接种于 BHA 平板, 37 °C 培养(24±2) h, 在 3 mL 0.45%的生理盐水中制成 0.5 个麦氏单位的菌悬液, 取 145 μL 加入 3 mL 0.45%的生理盐水, 充分混匀, 使用 AST-GN16 药敏卡进行药物敏感性实验。

1.4 数据处理

使用 SPSS 26.0 软件中的 χ^2 检验对实验数据进行组间差异的比较, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件对不同选择性增菌温度的污染率进行绘图分析, 比较检出情况的差异。

2 结果与分析

2.1 4 类样品中克罗诺杆菌的污染率

婴儿配方奶粉、谷基婴幼儿辅食、玉米原料和婴儿配方奶粉原辅料在内的 4 大类 403 份样品, 具体污染情况见表 1, 其中克罗诺杆菌阳性样品共 72 份, 污染率为 17.9% (72/403)。全部阳性样品中, 玉米原料 38 份(52.8%, 38/72), 谷基婴幼儿辅食 33 份(45.8%, 33/72), 婴儿配方奶粉 1 份(1.4%, 1/72)。玉米原料、谷基婴幼儿辅食和婴儿配方奶粉的污染率分别为 37.3% (38/102)、23.4% (33/141) 和 1.0% (1/100)。60 份婴儿配方奶粉原辅料检测结果均为阴性。

表 1 4 大类 403 份样品中克罗诺杆菌的污染率
Table 1 Contamination rates of *Cronobacter* in 403 samples from 4 categories

类别	阴性样品	检出情况			总计
		GB 4789.40—2016	GB 4789.40—2024	ISO 22964—2017	
玉米原料	64 (62.7%)	25 (24.5%)	38 (37.3%)	36 (35.3%)	102
谷基婴幼儿辅食	108 (76.6%)	27 (19.1%)	32 (22.7%)	32 (22.7%)	141
婴儿配方奶粉	99 (99.0%)	1 (1.0%)	1 (1.0%)	1 (1.0%)	100
婴儿配方奶粉原辅料	60 (100.0%)	0	0	0	60

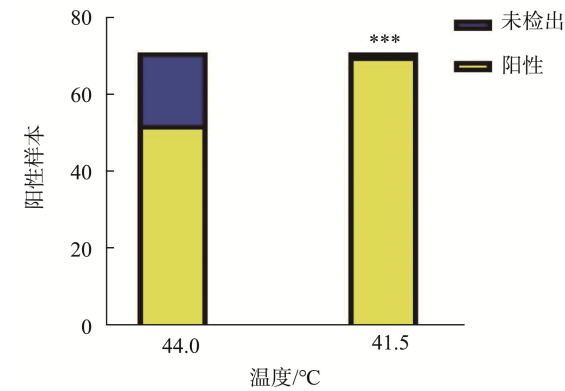
2.2 3 种标准方法的检出率

全部 403 份样品, GB 4789.40—2016 方法的总检出率为 13.2% (53/403), ISO 22964—2017 方法的总检出率为 17.1% (69/403), GB 4789.40—2024 方法的总检出率为 17.6% (71/403), 具体结果详见表 1。3 种方法的总检出率没有显著差异($\chi^2=3.601$, $P=0.170$), 但玉米原料采用 GB 4789.40—2024 方法的克罗诺杆菌检出率高于 GB 4789.40—2016 ($\chi^2=3.881$, $P=0.049$)。此外, 在全部 72 份阳性样品中, 采用 41.5 °C 选择性增菌培养温度共检出 71 株克罗诺杆菌(98.6%), 显著高于 44.0 °C 时检出的 53 株菌(73.6%) ($\chi^2=18.813$, $P=0.000$)(图 1)。全部 72 株菌株经 VITEK 革兰阴性鉴定卡鉴定和 PCR 鉴定后均为克罗诺杆菌。

2.3 LOD₅₀ 结果

20 份乳清蛋白粉样品前增菌液中分别添加 1 mL 浓度为 0.515 CFU/mL 的 Crono-Condi 康迪蒙提克罗诺杆菌(*Cronobacter. condimenti*)食品分离株稀释液, mLst-Vm 与 CSB 肉汤经 41.5 °C 培养后划线接种显色平板, 结果显示 20 份样品中经 mLst-Vm 选择性增菌后共 6 份显色培养基培养结果为阳性, LOD₅₀=1.013 CFU/100 g, 经 CSB 肉汤选择性增菌后仅 5 份显色培养基培养结果为阳性, LOD₅₀=1.253 CFU/100 g。阳性对照克罗诺杆菌检测为阳性, 空白对照结果为阴性。20 份婴儿配方奶粉样品前增菌液中分别添加 1 mL 浓度为 0.545 CFU/mL 的环境来源的 Crono-YL25 阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*) 分离株稀释液, mLst-Vm 与 CSB 肉汤经 41.5 °C 培养后结果一致, 20 份样品中共 9 份显色培养基培养结果为阳性, LOD₅₀=0.638 CFU/100 g。阳性对照克罗诺杆菌检测为阳

性, 空白对照结果为阴性。20 份成人奶粉样品前增菌液中分别添加 1 mL 浓度为 0.595 CFU/mL 的 ATCC 29544 阪崎克罗诺杆菌标准菌株稀释液, mLst-Vm 与 CSB 肉汤经 41.5 °C 培养后结果一致, 20 份样品中共 4 份显色培养基培养结果为阳性, LOD₅₀=1.867 CFU/100 g (表 2)。阳性对照克罗诺杆菌检测为阳性, 空白对照结果为阴性。



注: ***表示具有显著性差异($P<0.05$)。
图 1 72 个阳性样品在不同选择性增菌温度的污染率
Fig.1 Contamination rates of 72 positive samples under different selective enrichment temperature

2.4 药物敏感性结果

上述全部 72 株来自玉米原料、谷基婴幼儿辅食和婴儿配方奶粉的克罗诺杆菌分离株抗生素敏感性检测结果显示, 共有耐药株 40 株, 总耐药率为 55.6% (40/72)。其中头孢唑林、氨苄西林和阿莫西林/克拉维酸的耐药率分别为 52.8% (38/72)、5.6% (4/72)和 1.4% (1/72), 详见表 3。另有呋喃妥因中介 21 株, 阿莫西林/克拉维酸中介 1 株, 头孢西丁中介 1 株, 甲氧苄啶/磺胺甲噁唑中介 1 株。对哌拉西林钠/

表 2 实验室内 3 种基质中克罗诺杆菌 LOD₅₀ 检出结果
Table 2 Intra-laboratory results of detection of *Cronobacter* LOD₅₀ in 3 kinds of substrates

	样品(添加菌株)		
	乳清蛋白粉(Crono-Condi)	婴儿配方奶粉(Crono-YL25)	成人奶粉(ATCC 29544)
菌液浓度/(CFU/mL)	0.515	0.545	0.595
mLst-Vm 结果阳性	6	9	4
mLst-Vm 结果阴性	14	11	16
mLst-Vm-LOD ₅₀ /(CFU/mL)	1.013	0.638	1.867
CSB 结果阳性	5	9	4
CSB 结果阴性	15	11	16
CSB-LOD ₅₀ /(CFU/mL)	1.253	0.638	1.867

他唑巴坦钠、头孢曲松、头孢吡肟、氨曲南、厄他培南、亚胺培南、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、替加环素的敏感率为 100.0%。全部耐药菌株中, 耐头孢唑林 38 株(95.0%, 38/40), 耐氨苄西林 4 株(10.0%, 4/40), 耐阿莫西林/克拉维酸 1 株(2.5%, 1/40), 其中单耐药菌 37 株, 分别为耐氨苄西林 2 株、耐头孢唑林

35 株; 双耐药菌 3 株, 其中耐氨苄西林和耐头孢唑林 2 株, 耐阿莫西林/克拉维酸和耐头孢唑林 1 株, 详见表 4。72 株克罗诺杆菌中, 38 株来自玉米原料, 其中耐药菌株 22 株, 耐药率为 57.9% (22/38), 33 株来自谷基婴幼儿辅食, 耐药菌株 17 株, 耐药率为 51.5% (17/33), 另有 1 株是来自婴儿配方奶粉的耐药菌株, 见表 5。

表 3 72 株克罗诺杆菌对 18 种抗生素的敏感性结果
Table 3 Antibiotic susceptibility results of 72 *Cronobacter* strains against 18 kinds of antibiotics

抗生素	耐药		中介		敏感	
	菌株数	耐药率/%	菌株数	中介率/%	菌株数	敏感率/%
头孢唑林	38	52.8	0	0	34	47.2
氨苄西林	4	5.6	0	0	68	94.4
阿莫西林/克拉维酸	1	1.4	1	1.4	70	97.2
呋喃妥因	0	0	21	29.2	51	70.8
头孢西丁	0	0	1	1.4	71	98.6
甲氧苄啶/磺胺甲噁唑	0	0	1	1.4	71	98.6
哌拉西林钠/他唑巴坦钠	0	0	0	0	72	100.0
头孢曲松	0	0	0	0	72	100.0
头孢吡肟	0	0	0	0	72	100.0
氨曲南	0	0	0	0	72	100.0
厄他培南	0	0	0	0	72	100.0
亚胺培南	0	0	0	0	72	100.0
阿米卡星	0	0	0	0	72	100.0
庆大霉素	0	0	0	0	72	100.0
妥布霉素	0	0	0	0	72	100.0
环丙沙星	0	0	0	0	72	100.0
左氧氟沙星	0	0	0	0	72	100.0
替加环素	0	0	0	0	72	100.0

表 4 克罗诺杆菌的耐药谱
Table 4 Resistance spectrum of *Cronobacter*

抗生素耐受数量	耐药谱	菌株数
0	敏感与中介株	32
1	头孢唑林	35
1	氨苄西林	2
2	氨苄西林-头孢唑林	2
2	阿莫西林/克拉维酸-头孢唑林	1

表 5 食物种类与耐药结果
Table 5 Food kinds and resistance outcomes

食品种类	分离数	耐药数	耐药率/%
婴儿配方奶粉	1	1	100.0
玉米原料	38	22	57.9
谷基婴幼儿辅食	33	17	51.5
合计	72	40	55.6

3 讨论与结论

克罗诺杆菌作为一种重要的食源性致病菌, 具有较强的环境胁迫抗性, 可以承受高温、强酸、低水分活度等压力, 并能形成生物膜。此外, 在巴氏灭菌、营养缺乏、低温或干燥条件下, 克罗诺杆菌可进入活的非可培养(viable but

non-culturable, VBNC)状态来抵御不良环境^[17-18]。克罗诺杆菌进入 VBNC 状态后仍具有致病能力^[19], 使得该菌在加工和保藏条件较为严苛的食品产品中长期存活, 进而对消费者的健康产生严重威胁。报道显示, 婴儿感染侵袭性克罗诺杆菌引起的脑膜炎能引发脑梗塞、脑室炎等一系列并发症, 更为严重的是即便存活也可能存在神经系统后遗症, 对生长和发育产生长期影响^[20]。我国每年对婴幼儿相关食品及原辅料有着巨大的市场需求, 因此构建更可靠的分离和检测方法对于保障消费者健康, 防止克罗诺杆菌感染以及减少婴幼儿食品和原辅料中克罗诺杆菌的污染至关重要。

婴儿配方奶粉污染是婴儿感染克罗诺杆菌的主要途径之一, 我国 GB 29921—2021《食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量》中规定该菌在婴儿配方食品(0~6 月龄)中不得检出, 目前各国尚未针对婴儿辅食(>6 月龄)制定克罗诺杆菌限量要求。玉米粉和婴幼儿谷基辅食均属于非灭菌产品, 相比其他食品及原料成分具有更高的克罗诺杆菌污染率^[21], 处理时极易产生粉尘, 存在交叉污染厨房加工环境和其他食品进而造成家庭成员感染的风险。本研究检测出谷物基辅食食品和玉米粉的总污染率为 29.2% (71/243), 高于其他文献报道的污染率(5.3%~12.2%)^[21-23]。

本研究收集的 100 份婴儿配方奶粉和 60 份婴儿配方奶粉原辅料在内的 160 份样品中仅检出 1 份阳性样品, 阳性率为 0.6%。同时本实验室之前的研究显示, 在 119 份婴儿配方奶粉样品中, 克罗诺杆菌的检出率仅为 3.4%^[24]。新版 GB 4789.40 克罗诺杆菌检验食品安全国家标准适用范围增加了婴幼儿辅食, 同时为更好地比较方法检测性能的差异, 本次研究采集了 141 份谷物基婴幼儿食品和 102 份玉米原料作为重要的谷物基原辅料进行验证。这两类样品中克罗诺杆菌的总污染率高达 29.2% (71/243), 其中 GB 4789.40—2024 (28.8%, 70/243) 和 ISO 22964—2017 标准 (28.0%, 68/243) 的阳性样品检出率均高于 GB 4789.40—2016 (21.4%, 52/243)。若使用 GB 4789.40—2016 标准方法会导致约有 26.4% (19/72) 的阳性样品被漏检, 对产品的质量和消费者的身体健康构成了较大的隐患。其中 1 份阳性样品仅被 GB 4789.40—2016 方法检出, 可能与该婴儿米糊培养后变黏稠, 难以充分混匀和取样有关, 有待对该类产品的样品制备开展更深入研究。

温度是影响微生物生长的重要因素之一, 当温度过高时, 细菌中蛋白质、核酸、细胞膜等物质由于热作用发生变性或凝固导致细菌死亡。克罗诺杆菌耐热性较强, 部分克罗诺杆菌甚至能抵抗低温巴氏杀菌法, 常规热处理并不能完全杀灭该菌^[25]。然而, 克罗诺杆菌耐热性存在种间差异, ORIESKOVA 等^[26]对克罗诺杆菌进行基因组测序, 发现 67.1% (49/73) 阪崎克罗诺杆菌和 64.3% (9/14) 丙二酸盐克罗诺杆菌中存在耐热基因岛, 提高其在环境和婴幼儿食品中的存活率。本研究验证结果显示 3 种标准方法中影响检出率的最主要因素为选择性增菌培养温度, 41.5 °C 相较 44 °C 可以显著提高阳性样品的检出率, 与之前文献报道的情况一致^[27]。虽然选择性增菌肉汤 mLST/Vm (17.6%, 71/403) 和 CSB (17.1%, 69/403) 之间没有显著差异, 但 CSB 对其他细菌的抑制能力较 mLST/Vm 弱, 存在其他细菌生长较好而抑制克罗诺杆菌生长的个别情况, 而显色培养基 DFI 和 CCI 琼脂对检出率没有影响。

不同的标准检测方法在称样量、选择性培养基和培养温度等整个样品检测流程的个别步骤存在一定的差异, 可能会导致检测灵敏度等检测指标出现差异。因此, 通过比较研究建立替代方法和标准方法之间的等效性是方法验证的一个重要部分^[14]。本研究结果显示 GB 4789.40—2024 与 ISO 22964—2017 标准方法在检测 3 种基质中的克罗诺杆菌的 LOD₅₀ 没有明显的差异, 这两种标准方法在检测婴儿配方奶粉、成人奶粉、乳清蛋白粉中的克罗诺杆菌时具有等效性。此外, 本研究显示 GB 4789.40—2024 与 ISO 22964—2017 标准方法检测全部 403 份样品的结果基本一致, 较 GB 4789.40—2016 检出率有了较大提升, 可以更好地承担食品中克罗诺杆菌的准确检测工作, 提升产品的质量安全并减少由于方法导致的漏检发生。GB 4789.40—2024 已达到国际相关方法的水平, 因此本研究可为我国与欧盟等广泛使用 ISO 标

准的国家的相关产品进出口检测结果的互认提供数据支持。

目前全球范围内, 食品中的克罗诺杆菌检测的标准方法仍主要为基于培养的分离和鉴定传统方法。培养基和培养温度对克罗诺杆菌的检出率影响较大, 部分耐热性较强的克罗诺杆菌可以在较高温度培养时检出, 而部分耐热性较弱或存在损伤的菌株则存在漏检的风险, 而较低的培养温度和选择性弱的培养基则存在污染严重的问题。因此不断完善、构建更可靠、高效的检测和鉴定方法, 对于保障消费者健康, 防止克罗诺杆菌感染以及减少婴幼儿食品中克罗诺杆菌的污染至关重要, 最终为婴幼儿食品安全提供保障。

近年来的研究报告证实, 克罗诺杆菌具有较强的耐药性, 且呈逐年增高趋势。青霉素、第一代、第二代头孢菌素等医院常用的抗生素对克罗诺杆菌已失去抑制作用^[28]。为了更新有效的抗生素治疗方案, 监测克罗诺杆菌的抗生素耐药性也是必要的^[29]。本研究对全部 72 株克罗诺杆菌分离株进行了抗生素敏感性测试, 了解婴幼儿食品和玉米原料中克罗诺杆菌分离株的耐药情况, 为临床合理使用抗生素以及有效预防和控制克罗诺杆菌感染提供数据支持。本研究耐药结果显示受试菌株对头孢唑林的耐药性最高, 达到 52.8% (38/72), 其次为氨苄西林, 耐药率为 5.6% (4/72)。与周厚德等^[30]发现从婴幼儿配方食品中分离的克罗诺杆菌对头孢唑林的耐药率 (62.5%, 15/24) 基本一致; 低于裴晓燕等^[31]发现从婴幼儿配方奶粉中分离的克罗诺杆菌的头孢唑林耐药率 (93.8%, 15/16) 和 CARVALHO 等^[32]从婴儿食品中分离出的克罗诺杆菌头孢唑林耐药率 (94.4%, 68/72)。以上数据表明克罗诺杆菌对头孢唑林具有较高的耐药性, 在临床治疗选择抗生素时应避免使用该药物。其中 21 株克罗诺杆菌为呋喃妥因中介, 占中介株的 87.5% (21/24), 提示该菌可能存在一定对呋喃妥因的耐药趋势。目前有研究表明克罗诺杆菌对碳青霉烯类抗生素、三代头孢菌素以及其他多种抗生素的耐药性已出现。这说明克罗诺杆菌的耐药性正逐渐增强, 感染克罗诺杆菌的治疗难度也逐渐增大^[25]。在进行克罗诺杆菌研究时要加强对婴幼儿食品分离株和临床分离株的药敏监测, 及时发现其耐药谱的变化, 能提供早期预警并根据其药敏结果针对性用药。

参考文献

- [1] FINKELSTEIN S, NEGRETE F, JANG H, *et al.* Prevalence, distribution, and phylogeny of type two toxin-antitoxin genes possessed by *Cronobacter* species where *C. sakazakii* homologs follow sequence type lineages [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(11): 554.
- [2] STRYSKO J, COPE JR, MARTIN H, *et al.* Food safety and invasive *Cronobacter* infections during early infancy, 1961–2018 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(5): 857.
- [3] 伊廷存, 程祥龙, 郑世超, 等. 阪崎克罗诺杆菌鉴定分型方法的比较及耐药特征分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(9): 70–77.
YI TC, CHENG XL, ZHENG SC, *et al.* Comparison of identification and typing methods of *Cronobacter sakazakii* and analysis of drug resistance characteristics [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(9): 70–77.
- [4] HOLÝ O, FORSYTHE S. *Cronobacter* spp. as emerging causes of

- healthcare-associated infection [J]. Journal of Hospital Infection, 2014, 86(3): 169–177.
- [5] ALSONOSI A, HARIRI S, KAJŠÍK M, *et al.* The speciation and genotyping of *Cronobacter* isolates from hospitalised patients [J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2015, 34: 1979–1988.
- [6] LI CS, ZENG HY, ZHANG JM, *et al.* *Cronobacter* spp. isolated from aquatic products in China: Incidence, antibiotic resistance, molecular characteristic and CRISPR diversity [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 335: 108857.
- [7] UEDA S. The effects of temperature on the growth and heat resistance of *Cronobacter* spp. [J]. Biocontrol Science, 2017, 22(2): 125–129.
- [8] GAN X, LI MH, YAN SF, *et al.* Genomic landscape and phenotypic assessment of *Cronobacter sakazakii* isolated from raw material, environment, and production facilities in powdered infant formula factories in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 686189.
- [9] WANG LH, FORSYTHE SJ, YANG XY, *et al.* Invited review: Stress resistance of *Cronobacter* spp. affecting control of its growth during food production [J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(11): 11348–11367.
- [10] BARRON JC, FORSYTHE SJ. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula [J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(9): 2111–2117.
- [11] HU SF, YU YG, XIAO XL. Stress resistance, detection and disinfection of *Cronobacter* spp. in dairy products: A review [J]. Food Control, 2018, 85: 400–415.
- [12] SONG XJ, TENG H, CHEN L, *et al.* *Cronobacter* species in powdered infant formula and their detection methods [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2018, 38(2): 376.
- [13] MOUSAVI ZE, HUNT K, KOOLMAN L, *et al.* *Cronobacter* species in the built food production environment: A review on persistence, pathogenicity, regulation and detection methods [J]. Microorganisms, 2023, 11(6): 1379.
- [14] 张鑫欣, 陈万义, 陈婧, 等. GB 4789.40—2016 和 ISO 22964:2017 方法检测婴幼儿配方奶粉中克罗诺杆菌属的实验室适用性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(8): 351–358.
- ZHANG XX, CHEN WY, CHEN J, *et al.* An interlaboratory method applicability study of GB 4789.40—2016 and ISO 22964:2017 for the detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(8): 351–358.
- [15] LIU Y, GAO QL, 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.
- [16] 陈启明, 刘战民, 陆兆新. 克罗诺杆菌检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9281–9287.
- CHEN QM, LIU ZM, LU ZX. Research progress of detection methods of *Cronobacter* spp. [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(24): 9281–9287
- [17] 曹怡芳, 周爱莲, 白泓, 等. 牛奶发酵过程中阪崎克罗诺杆菌可形成活的非可培养状态[J]. 现代食品科技, 2022, 38(3): 56–62.
- CAO YF, ZHOU AIL, BAI H, *et al.* Formation of viable but non-culturable state of *Cronobacter sakazakii* during milk fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(3): 56–62.
- [18] 张竞丰, 王丽, 陈洵, 等. 乳及乳制品中常见“活的非可培养态”食源致病菌研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 300–306.
- ZHANG JF, WANG L, CHEN X, *et al.* A review of viable but nonculturable pathogens in milk and dairy products [J]. Food Science, 2019, 40(3): 300–306
- [19] ZHOU AD, WANG L, ZHANG JF, *et al.* Survival of viable but nonculturable *Cronobacter sakazakii* in macro-phages contributes to infections [J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 158: 105064.
- [20] FRIEDEMANN M. Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections [J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2009, 28: 1297–1304.
- [21] 周少君, 邓小玲, 朱海明, 等. 2010年—2013年广东省婴幼儿食品中阪崎肠杆菌污染情况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(15): 2248–2251.
- ZHOU SJ, DENG XL, ZHU HM, *et al.* Survey of *Enterobacter sakazakii* pollution in infant food in Guangdong Province from 2010 to 2013 [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 24(15): 2248–2251.
- [22] 陈喜凯, 盛莹, 沈伟伟, 等. 台州市售婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌污染特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(7): 1075–1079.
- CHEN XK, SHENG Y, SHEN WW, *et al.* Analysis of *Cronobacter* contamination characteristics in cereal-based supplementary food for infants in Taizhou [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(7): 1075–1079.
- [23] 梁安莉, 农珍妮, 温桂珍, 等. 市售婴幼儿米粉中克罗诺杆菌的分子分型和耐药分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(12): 36–42, 83.
- LIANG ANL, NONG ZN, WEN GZ, *et al.* Molecular typing and drug resistance of *Cronobacter* spp. in commercial formula rice flour products for infants and young children [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 36–42, 83.
- [24] GAN X, DONG YP, YAN SF, *et al.* Contamination and characterization of multiple pathogens in powdered formula at retail collected between 2014 and 2015 in China [J]. Food Control, 2018, 87: 40–45.
- [25] 黄燕, 贾媛, 宋丹靓, 等. 克罗诺杆菌在婴儿配方奶粉及其加工环境中耐受性和耐药性研究进展[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 336–343.
- HUANG Y, JIA A, SONG DLM, *et al.* Research progress on tolerance and drug resistance of *Cronobacter* spp. in powdered infant formulae and its processing environment [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 336–343.
- [26] ORIESKOVA M, KAJŠÍK M, SZEMES T, *et al.* Contribution of the thermotolerance genomic island to increased thermal tolerance in *Cronobacter* strains [J]. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiol, 2016, 109(3): 405–414.
- [27] O'BRIEN S, HEALY B, NEGREDO C, *et al.* Evaluation of a new one-step enrichment in conjunction with a chromogenic medium for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula [J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(7): 1472–1475.
- [28] LI HX, FU SQ, SONG DL, *et al.* Identification, typing and drug resistance of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula and processing environment [J]. Foods, 2023, 12(5): 1084.
- [29] FEI P, JING H, MA Y, *et al.* *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula collected from Nine Provinces in China: Prevalence, genotype, biofilm formation, and antibiotic susceptibility [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 900690.
- [30] 周厚德, 彭思露, 刘成伟, 等. 2018年江西省婴幼儿食品中克罗诺杆菌污染状况及分子分型和耐药特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(4): 335–339.
- ZHOU HD, PENG SL, LIU CW, *et al.* Analysis of the contamination, molecular typing and drug resistance of *Cronobacter* in infants and young children foods in Jiangxi Province in 2018 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(4): 335–339.
- [31] 裴晓燕, 郭云昌, 徐进, 等. 婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌分离株的药敏分析[J]. 卫生研究, 2007(1): 63–65.
- PEI XY, GUO YC, XU J, *et al.* Antibiotic susceptibility of *Enterobacter sakazakii* isolated from powdered formula for infant and young children [J]. Journal of Hygiene Research, 2007(1): 63–65.
- [32] CARVALHO GG, CALARGA AP, TEODORO JR, *et al.* Isolation, comparison of identification methods and antibiotic resistance of *Cronobacter* spp. in infant foods [J]. Food Research International, 2020, 137: 109643.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)