

实验技术与方法

聚合酶链式反应和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱
方法鉴定克罗诺杆菌

甘辛,王晓菲,闫韶飞,胡豫杰,董银苹,李凤琴

(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 采用聚合酶链式反应(PCR)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术快速鉴定克罗诺杆菌的方法,实现对该菌显色培养基上生长的可疑菌落高通量、低成本初筛。方法 通过内转录间隔区(*its*)基因设计针对克罗诺杆菌的属特异性引物,以7株参考菌株为对照,对2013年国家食品安全污染物监测网上报、初步鉴定为克罗诺杆菌的214株菌株进行复核鉴定。同时随机挑选其中84株菌,采用MALDI-TOF-MS技术和VITEK革兰阴性细菌鉴定卡鉴定。结果 7株参考菌株的PCR结果与对应大小一致,214株待测菌株PCR结果均为阳性。84株菌MALDI-TOF-MS和VITEK鉴定的结果均为克罗诺杆菌,符合率为100%。结论 PCR和MALDI-TOF-MS技术具有高通量、低成本、耗时短等优势,可以实现大量可疑菌落的初筛,为我国克罗诺杆菌的监测和防控提供技术支持。

关键词:克罗诺杆菌;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;聚合酶链式反应;快速鉴定方法

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)02-0144-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.02.004

Application of polymerase chain reaction and matrix-assisted laser
desorption/ionization time of flight mass spectrometry methods
in *Cronobacter* rapid identification

GAN Xin, WANG Xiaofei, YAN Shaofei, HU Yujie, DONG Yinping, LI Fengqin

(National Health Commission Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National
Centre for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To develop two rapid identification method of *Cronobacter* use polymerase chain reaction (PCR) and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), and to achieve high-throughput and low-cost screening of suspicious colonies of *Cronobacter* on chromogenic medium. **Methods** A pair of genus specific primers for *Cronobacter* were designed by internal transcribed spacer (*its*) gene, and 7 standard strains were set as reference strains to re-identify 214 strains which were preliminarily identified as *Cronobacter* collected in 2013. 84 isolates were selected randomly and identified by MALDI-TOF-MS and VITEK gram-negative bacteria identification card. **Results** The molecular weight of 7 reference strains were the same as expected, and PCR result of 214 isolates were positive. All 84 strains were identified as *Cronobacter* by both MALDI-TOF-MS and VITEK, and the coincidence rate was 100%. **Conclusion** PCR and MALDI-TOF-MS have the advantages of high-throughput, low-cost and short time consuming, which could achieve the preliminary screening of a large number of suspicious colonies, and could provide technical support for *Cronobacter* surveillance and control in China.

Key words: *Cronobacter*; matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; polymerase chain reaction; rapid identification method

克罗诺杆菌(*Cronobacter*)是一种可导致人类肠

道和系统性疾病的革兰阴性条件致病菌,目前包括7个种,分别是阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)、莫金斯克罗诺杆菌(*C. muytjensii*)、康迪蒙提克罗诺杆菌(*C. condimenti*)、尤尼沃斯克罗诺杆菌(*C. universalis*)、都柏林克罗诺杆菌

收稿日期:2021-02-18

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1604303)

作者简介:甘辛 男 副研究员 研究方向为食品微生物 E-mail:
ganxin@cfsa.net.cn

通信作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail:
lifengqin@cfsa.net.cn

(*C. dublinensis*)^[1-3],以及3个亚种包括都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种(*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*)、都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种(*C. dublinensis* subsp. *lausannensis*)、都柏林克罗诺杆菌乳粉亚种(*C. dublinensis* subsp. *lactaridi*)。其中阪崎克罗诺杆菌和丙二酸盐克罗诺杆菌为主要报道的临床分离株,苏黎世克罗诺杆菌和尤尼沃斯克罗诺杆菌仅有少量临床报道,而其他3种克罗诺杆菌主要为环境共生菌^[4]。克罗诺杆菌广泛分布于多种零售食品和新鲜果蔬中,如麦片、小麦、大豆、大米、蛋糕配料、草药、香料、蔬菜和即食沙拉等,以及婴儿配方食品和婴儿辅助食品^[4]。自1961年,URMENYI和FRANKLIN首次报道2例新生儿克罗诺杆菌临床感染的死亡病例以来,大量受污染的婴儿配方食品或较大婴儿食品在流行病学上与多起新生儿和婴儿败血症/脑膜炎暴发有关,使克罗诺杆菌成为全球关注的食源性和公共卫生问题^[5]。婴儿感染克罗诺杆菌可导致菌血症和脑膜炎,并导致神经功能障碍和死亡,死亡率高达40%~80%^[6]。PATRICK等^[7]根据美国2003—2009年克罗诺杆菌感染监测结果预测每年约有0.49例/10万名婴儿感染克罗诺杆菌。由于大多数国家并未强制要求报告克罗诺杆菌感染,因此目前尚无克罗诺杆菌感染婴儿的确切发病率。

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)已广泛用于细菌鉴定,该方法具有分辨率高、时效性高、可重复性高等优点,我国食源性致病菌检测方法也逐步将PCR技术纳入标准,目前GB 4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》已采用PCR方法用于鉴定5种致泻大肠埃希菌,同时SN/T 1632.2—2013《出口奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)检验方法第2部分:PCR方法》和SN/T 1632.3—2013《出口奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)检验方法第3部分:荧光PCR方法》也在进出口检验检疫机构广泛应用。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)是一种快速、可靠、具有较高可重复性和稳定性的细菌鉴定方法,近年来在致病菌快速鉴定领域得到普遍认可。目前我国GB/T 33682—2017《基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴别微生物方法通则》已将该技术作为微生物鉴定方法纳入,同时规范了该方法在实验室进行微生物快速鉴定和研究中的应用。美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)也发布了MALDI-TOF-MS

技术鉴定微生物的规范化标准。本研究通过对2013年国家食品安全污染物风险监测中,从食品中分离获得的214株克罗诺杆菌为对象,开展复核鉴定,以验证内转录间隔区(*its*)基因PCR、MALDI-TOF-MS在克罗诺杆菌鉴定中的准确性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

本研究采用本实验室保存的阪崎克罗诺杆菌(ATCC 29544)、丙二酸盐克罗诺杆菌(DSM 18702)、苏黎世克罗诺杆菌(DSM 18703)、都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种(DSM 18705)、尤尼沃斯克罗诺杆菌(NCTC 9529)和莫金斯克罗诺杆菌(ATCC 51329)6株克罗诺杆菌标准菌株,以及1株爱尔兰都柏林大学惠赠的康迪蒙提克罗诺杆菌分离菌株共7株作为参考菌株。15株用于验证PCR特异性的菌株,包括大肠埃希菌(ATCC 25922)、肠致病性大肠埃希菌(EPEC, E2348/69)、肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC, 44825)、致泻性大肠埃希菌(EAEC, 042)、肠毒性大肠埃希菌(ETEC, H10407)、非典型性EPEC(ATEC 3431-4/86)、沙门菌(CMCC 14028, H9812, CMCC 50333, ATCC 700720, ATCC 13076)均为本实验室保藏的标准菌株,另有3株肺炎克雷伯菌和1株阴沟肠杆菌也为本实验室鉴定并保藏。

1.1.2 主要仪器与试剂

DensiCHEK-plus比浊仪、VITEK 2 COMPACT全自动微生物分析仪、VITEK革兰阴性细菌鉴定卡均购自法国生物梅里埃,C1000 PCR仪、Gel Doc电泳仪和凝胶成像系统均购自美国Bio-Rad, MALDI Biotyper(德国Bruker)。

脑心浸液肉汤(BHI)、脑心浸液琼脂(BHA)、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)均购自北京陆桥技术股份有限公司,阪崎肠杆菌显色培养基(DFI,英国OXOID),2×Master Mix(北京天根生化科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化

将保存有菌株的培养物取1接种环于5 mL BHI肉汤管中,37℃培养24 h,增菌液充分混匀后,划线接种DFI平板,37℃培养24 h。挑取平板上生长的蓝绿色单菌落,划线接种于TSA平板,25℃培养48 h,同时划线接种BHA平板,37℃培养24 h。

1.2.2 生化鉴定

从BHA平板上挑取菌落,置于3 mL 0.45%的灭菌生理盐水中混匀,使用比浊仪将菌悬液调整至0.5个麦氏单位,用VITEK 2 COMPACT全自动微生

物分析仪进行鉴定。

1.2.3 细菌组 DNA 提取

用接种环从 BHA 平板上刮取菌落,在 300 μL 灭菌超纯水中振荡混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热 10 min,10 625 $\times g$ 离心 5 min,将上清液转移至另一灭菌离心管中,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.4 PCR 扩增

克罗诺杆菌属水平鉴定引物针对 *its* 基因设计,由上海英骏生物技术有限公司合成,扩增片段长度为 282 bp。该序列上下游引物信息为:F-5'-GGGTTGTCTGCCAAAGCGAA-3', R-5'-GTCTTCGTGCTGCGAGTTT-3'^[8]。配制 25 μL 反应体系:2 \times Master Mix 12.5 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,模板 DNA 1 μL ,ddH₂O 9.5 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。取 10 μL 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶中上样,120 V 恒压电泳 30 min,用凝胶成像系统观察结果。

1.2.5 质谱鉴定

取 BHA 平板上的菌落,在 300 μL 灭菌超纯水中涡旋混匀 1 min。加入 900 μL 无水乙醇,涡旋混匀 1 min,12 470 $\times g$ 离心 2 min 去上清,重复一次至完全除去乙醇溶液。加入 50 μL 70% 的甲酸水溶液至离心管,涡旋至沉淀完全悬浮混匀,加入 50 μL 乙腈,吹打混匀,12 470 $\times g$ 离心 2 min,取 1 μL 上清液至靶板上,晾干,加 1 μL 质谱样品处理基质(IVD HCCA)溶液仔细涂敷,均匀覆盖干燥后的样品表面,晾干后上机检测。

2 结果

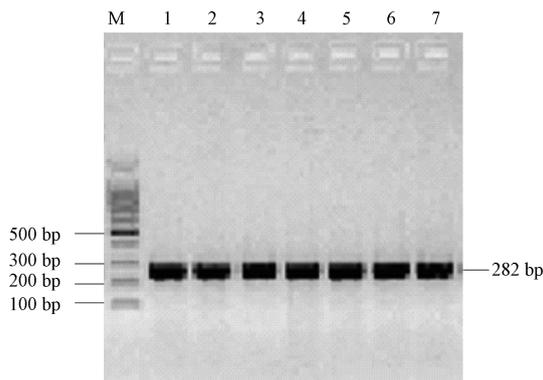
2.1 *its* 基因 PCR 鉴定结果

2013 年国家食品安全污染物风险监测网上报的 214 株菌株接种 DFI 平板后,菌落均为蓝绿色,菌落形态存在一定差异可能与克罗诺杆菌属包括 7 个种和 3 个亚种有关。DFI 平板上未见杂菌生长,214 株菌株接种 TSA 平板,25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后均产生黄色素。利用 PCR 法对本实验室保藏的 7 株克罗诺杆菌参考菌株和 15 株包括沙门菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌等在内的非克罗诺杆菌菌株的 *its* 基因进行检测以验证该方法,7 株克罗诺杆菌参考菌株的 PCR 产物条带大小与目的片段大小一致,且无任何非特异性扩增,而其他 15 株非克罗诺杆菌菌株未见目的条带出现,如图 1 和图 2 所示。确认所用退火温度、PCR 试剂和水煮法制备的 DNA 模板等条件对 PCR 结果不产生干扰后,对 214 株受试菌株 DNA 进行检测,PCR 结果均为阳

性,且无任何非特异性条带出现。

2.2 MALDI-TOF-MS 鉴定结果

随机挑选其中 84 株 PCR 结果阳性的菌株使用 VITEK 革兰阴性细菌鉴定卡进行检测,结果全部显示为克罗诺杆菌属,且准确性均>95%,84 株菌株全部鉴定为克罗诺杆菌。同时对这 84 株菌株进行质谱鉴定,结果显示为阪崎克罗诺杆菌且结果得分全部>2.0,由于仪器自带的数据库仅使用多个阪崎克罗诺杆菌标准菌株用于建库,没有使用克罗诺杆菌属其他种的菌株构建针对种水平鉴定的数据库,因此只能鉴定到克罗诺杆菌属。



注:M 为 100 bp DNA ladder;1~7 为 7 株克罗诺杆菌参考菌株

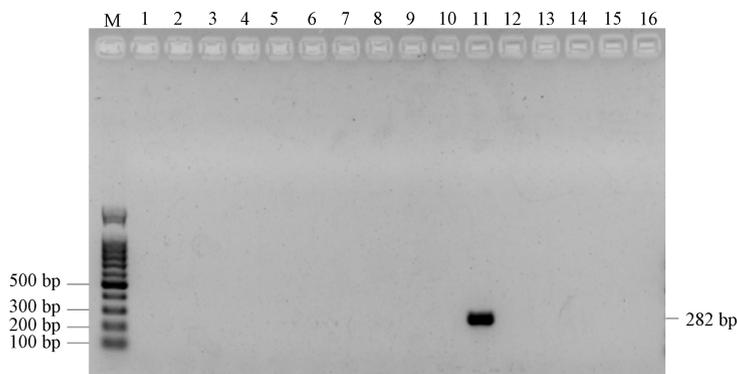
图 1 7 株克罗诺杆菌参考菌株的 PCR 产物条带

Figure 1 PCR products of seven strains of *Cronobacter*

3 讨论

婴儿配方食品是除母乳外 0~6 月龄婴儿摄取营养成分的主要来源。该产品污染克罗诺杆菌导致的感染暴发事件引发了消费者、媒体和政府的广泛关注,已成为近年来全世界范围内安全监管的焦点产品。报道显示大多数婴儿感染克罗诺杆菌均与食用该菌污染的婴儿配方食品有关,开封后的婴儿配方食品是重要的传播载体^[9]。与其他肠杆菌科细菌比较,克罗诺杆菌有极强的耐热、耐干燥和抗渗透压抗性,能抵御配方粉喷粉过程的高温,在水分活度只有 0.2 的婴儿配方粉中也可存活 2 年以上^[10]。作为非完全灭菌食品,近年来婴儿配方粉受克罗诺杆菌污染情况逐年好转。2015—2016 年本实验室对我国市售和网购的 63 个品牌 119 份婴儿配方粉和乳粉的检测发现,克罗诺杆菌污染率为 3.4%^[11]。尽管如此,由于易感人群非常特殊且感染后果十分严重,因此建立高效、准确的克罗诺杆菌快速鉴定方法有助于政府机构和企业提高监管和自查能力,进一步提高产品质量,切实保护消费者健康。

目前 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)



注: M: 100 bp DNA ladder; 1: EPEC (E2348/69); 2: EIEC (44825); 3: 非典型性 EPEC (ATEC 3431-4/86); 4: 沙门菌 (CMCC 14028); 5: 沙门菌 (H9812); 6: 沙门菌 (CMCC 50333); 7: 肺炎克雷伯菌-1; 8: 肺炎克雷伯菌-2; 9: 肺炎克雷伯菌-3; 10: 阴沟肠杆菌; 11: 阪崎克罗诺杆菌 (ATCC 29544); 12: 沙门菌 (ATCC 13076); 13: 大肠埃希菌 (ATCC 25922); 14: 沙门菌 (ATCC 700720); 15: EAEC (042); 16: ETEC (H10407)

图 2 克罗诺杆菌 *its* 鉴定引物特异性检测

Figure 2 Specific detection of *its* primers for *Cronobacter*

检验》^[12]中依然采用传统的细菌鉴定方法,该方法从样品处理到最终鉴定需要 5~6 d,耗时长、所需生化试剂较多,增加了工作人员的日常工作量。ITS 是染色体上一段位于核糖体大小亚基基因之间的间隔序列,该序列具有不同细菌间 ITS 的 rDNA 操纵子拷贝数不同、不同种间 ITS 序列的长度存在差异性以及同一种内不同 rDNA 操纵子之间片段长度和序列具有差异性等特点^[13]。本试验采用的 *its* 基因 PCR 鉴定法,目前除在科研领域广泛应用外^[8,14-15],也被 SN/T 1632.2—2013 纳入,应用于我国进出口检验检疫机构。本研究对 214 株具有典型蓝绿色、产黄色素菌落进行 PCR 检测,全部结果均为阳性,且片段大小与目的条带一致。由于受试菌株在上报国家食品安全污染物风险监测网前,由各检测机构进行过初步生化鉴定,通过结合 PCR 结果进一步证明该 *its* 基因引物与传统生化鉴定的复合率为 100%,不会出现克罗诺杆菌被漏检的情况。

2016 年, JACKSON 等^[16]报道, VITEK 革兰阴性细菌鉴定卡除了能鉴定克罗诺杆菌属 7 个种的菌株外,瑞士弗朗哥菌 (*Franconibacter helveticus*) 和粉末弗朗哥菌 (*F. pulveris*) 两种细菌也会被该卡判断为克罗诺杆菌。弗朗科杆菌 (*Franconibacter*) 属于肠杆菌科,2013 年 BRADY 等^[17]报道,基于多位点序列分析等数据将瑞士肠杆菌 (*Enterobacter helveticus*)、粉末肠杆菌 (*E. pulveris*) 和苏黎世肠杆菌 (*E. turicensis*) 划入克罗诺杆菌属作为 3 个新的种型,虽然目前国际权威机构尚未将上述 3 种菌纳入克罗诺杆菌属,但是其基因与克罗诺杆菌属亲缘性 >98%,也可能是导致 VITEK 鉴定卡无法区分的主要原因,但对于克罗诺杆菌属的细菌, VITEK 罕有误判为其他细菌的情况出现。本试验 84 株 VITEK 革兰阴性

细菌鉴定卡鉴定为克罗诺杆菌的细菌,同时 PCR 结果也为阳性,生化鉴定的基础上,增加了基因型证据可以有效提高克罗诺杆菌鉴定的准确性和可靠性,目前国际上大量科研期刊也建议细菌鉴定除了传统的生化鉴定外,最好增加基因型鉴定以提高可信度。

MALDI-TOF-MS 技术与传统致病菌鉴定方法比较,具有时效性高、准确性高和可重复性高等特点,目前已作为快检方法应用于我国进出口检验检疫机构,而关于该方法在细菌鉴定中的应用也较多。MALDI-TOF-MS 结果的干扰因素较多,如数据库、培养基成分、培养时间和温度以及菌株前处理的方法等,但近年来随着该方法和设备的推广,目前已建立了完整的检测程序并使用大量菌株进行了相关验证。本研究分析的 84 株菌株经分析均为克罗诺杆菌且得分全部 >2.0,未见假阴性结果出现,证明该方法对于克罗诺杆菌属有较好的鉴别能力。

目前有文献^[18-19]报道,有部分克罗诺杆菌不产黄色素,而某些肠杆菌科细菌可在 TSA 平板上产生黄色素,因此将产黄色素作为克罗诺杆菌的关键鉴定指标步骤可能会有菌株漏检的情况发生,导致检测的污染率低于实际污染的情况,新发布的 ISO 2296—2017 (microbiology of the food chain -horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.) 标准,已取消产黄色素作为筛选克罗诺杆菌疑似菌株的关键指标步骤,未来修订 GB 4789.40 时,应考虑取消该指标。DFI 平板是利用克罗诺杆菌具有 α -葡萄糖苷酶水解 5-溴-4-氯-吡啶- α -D 吡喃葡萄糖苷 (Xa-GLC) 的能力,通过释放的糖苷配基 5-溴-4-氯-吡啶在氧存在时形成色素溴-氯-吡啶,使菌落呈现蓝绿色,但普通变形杆菌和其他少量细菌也能在 DFI 平

板上形成中心蓝绿色的菌落,因此直接从 DFI 平板挑取可疑菌落进行生化鉴定将会增加后续生化试验的工作量和检测成本。本研究采用的 PCR 方法和 MALDI-TOF-MS 技术都具有高通量、低成本、耗时短等特点,结果未见假阴性出现,不会导致克罗诺杆菌被漏检,可以有效避免阳性率低于实际的情况。同时两种方法一次上机能对近百株可疑菌株进行检测,可以作为实验室菌株初筛的方法,短时间内获取结果指导后续鉴定工作的开展,在扩大检测范围的同时减少实验室人员工作量,为保障产品质量安全提供了坚实的数据基础。

参考文献

- [1] 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 sakazakii* subsp. *Malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1 [J]. BMC Evolutionary Biology, 2007, 7: 64.
- [2] 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* I, 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(6):1442-1447.
- [3] JOSEPH S, CETINKAYA E, DRAHOVSKA H, et al. *Cronobacter condiment* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. *genomospecies* I, recovered from a leg infection, water and food ingredients [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(6): 1277-1283.
- [4] FORSYTHE S J. Updates on the *Cronobacter* genus[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2018, 9:23-44.
- [5] JANG H, GOPINATH G R, ESHWAR A, et al. The secretion of toxins and other exoproteins of *Cronobacter*: Role in virulence, adaptation, and persistence [J]. Microorganisms, 2020, 8(2): 229.
- [6] JARADAT Z W, AL MOUSA W, ELBETIEHA A, et al. *Cronobacter* spp. -opportunistic foodborne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits[J]. Journal of Medical Microbiology, 2014, 63(8):1023-1037.
- [7] PATRICK M E, MAHON B E, GREENE S A, et al. Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003-2009 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(9):1520-1523.
- [8] LIU Y, GAO Q L, 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.
- [9] STRYSKO J, COPE J R, MARTIN H, et al. Food safety and invasive *Cronobacter* infections during early infancy, 1961-2018 [J]. Emerging Infection Diseases, 2020, 26(5): 858-865.
- [10] 甘辛, 李凤琴. 克罗诺杆菌属致病性研究进展 [J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(6):663-667.
- [11] GAN X, DONG Y P, YAN S F, 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.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 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—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [13] 郑雪松, 杨虹, 李道棠, 等. 基因间隔序列(ITS)在细菌分类鉴定和种群分析中的应用 [J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(6): 678-684.
- [14] 董晓晖, 李程思, 吴清平, 等. 食品污染克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌)的分离及鉴定 [J]. 微生物学报, 2013, 53(5): 429-436.
- [15] 李远宏, 张逸飞, 张庆成, 等. 谷类食品中克罗诺杆菌的分离与鉴定 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(15):154-158, 164.
- [16] JACKSON E E, FORSYTHE S J. Comparative study of *Cronobacter* identification according to phenotyping methods [J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1):146.
- [17] BRADY C, CLEENWERCK I, VENTER S, et al. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter* [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2013, 36(5):309-319.
- [18] 万志刚, 赵琳娜, 刘慧玲, 等. α -葡萄糖苷酶试验在克罗诺杆菌鉴定中的应用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(16): 5432-5435.
- [19] IVERSEN C, LEHNER A, MULLANE N, et al. Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(11): 3814-3816.