

实验技术与方法

实时荧光PCR鉴定婴幼儿配方食品中克罗诺杆菌的研究

王青龙,张跃川,周燕霞,巩有博,李爽,史锦硕,丁珊珊,冉令磊,王凯毅,汤雨涵,蔡雪凤
(北京市食品检验研究院(北京市食品安全监控和风险评估中心),北京 100094)

摘要:目的 建立一种能够快速准确鉴定克罗诺杆菌的实时荧光聚合酶链式反应(PCR)方法,并对食品样品和人工污染样品进行克罗诺杆菌检验。方法 根据克罗诺杆菌DNA旋转酶B亚基(*gyrB*)基因保守区序列设计引物和探针。通过特异性试验、绝对灵敏度、相对灵敏度试验、抗干扰试验对所建立方法进行方法学验证。采用人工污染样品增菌液进行方法灵敏度试验。结果 本研究建立的方法能够特异性扩增7种克罗诺杆菌,但对与其亲缘关系较近的其他肠杆菌及食品中较为常见的其他致病菌均无扩增,表明本研究建立的方法具有很好的特异性和抗干扰能力。采用阪崎克罗诺杆菌验证绝对灵敏度达1~10 pg,相对灵敏度可以达到 10^3 CFU/mL。在基因组水平和培养物水平均具有很好的抗干扰能力。人工污染样品在36℃增菌24 h后检测灵敏度可以达到 10^0 CFU/mL。结论 本研究所建立的实时荧光PCR方法对婴幼儿配方食品样品中的克罗诺杆菌的检测具有快速、特异、灵敏和稳定的特点,可以为传统婴幼儿配方食品中的克罗诺杆菌的检验提供技术参考。

关键词:实时荧光PCR; 克罗诺杆菌; *gyrB*基因

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)06-0836-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.06.006

Identification of *Cronobacter* in infant formula using real-time polymerase chain reaction

WANG Qinglong, ZHANG Yuechuan, ZHOU Yanxia, GONG Youbo, LI Shuang, SHI Jinshuo,
DING Shanshan, RAN Linglei, WANG Kaiyi, TANG Yuhan, CAI Xuefeng

(Beijing Institute of food inspection (The Center for Supervision and Inspection of Food Quality and Safety of Beijing), Beijing 100094, China)

Abstract: Objective To establish a real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) method for rapid and accurate identification of *Cronobacter* spp. in food samples and artificially contaminated samples. **Methods** Primers and probes were designed based on the conserved region of *gyrB* of *Cronobacter* spp. DNA. The method was verified using a specificity test, absolute sensitivity test, relative sensitivity test, and anti-interference test. Detection sensitivity was determined using artificially contaminated samples. **Results** The method established in this study could specifically amplify seven kinds of *Cronobacter* spp., but not the other Enterobacter species closely related to it and other pathogens common in food, suggesting that this method has good anti-interference ability. The absolute sensitivity was 1-10 pg and the relative sensitivity was 10^3 CFU/mL using *Cronobacter sakazakii*. It had good anti-interference ability at the genome and culture level. The sensitivity of artificially contaminated samples could reach 10^0 CFU/mL after incubation at 36℃ for 24 h. **Conclusion** The real-time PCR method developed in this study is rapid, specific, sensitive, and stable for the detection of *Cronobacter* spp. in infant formula food samples and can provide technical reference for the detection of *Cronobacter* spp. in infant formula food.

Key words: Real-time polymerase chain reaction; *Cronobacter sakazakii*; *gyrB* gene

克罗诺杆菌属(*Cronobacter* spp.)属于肠杆菌科,是寄生在动物和人肠道内的一种有鞭毛、兼性

厌氧、能运动的革兰氏阴性无芽孢杆菌^[1-2]。目前已经分离得到的克罗诺杆菌包括7个种:阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*, *C. sakazakii*)、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌(*C. malonicus*)、穆汀斯克罗诺杆菌(*C. muytjensii*)、都柏林克罗诺杆菌(*C. dublinensis*)、尤尼沃思克罗诺杆菌(*C. universalis*)、康帝蒙提克罗诺杆菌(*C. condimenti*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)^[3-4]和3个亚种:都柏林克罗诺杆菌都柏林

收稿日期:2022-03-11

基金项目:国家市场监督管理总局科技计划项目(2019MK004)

作者简介:王青龙 男 工程师 研究方向为微生物检测与分子生物学检验 E-mail:qinglong1125@126.com

通信作者:蔡雪凤 女 高级工程师 研究方向为食品微生物和分子生物学检测及研究 E-mail:caixuefeng330@126.com

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*)。

克罗诺杆菌具有耐热、耐高渗透压、抗干燥等特点,能够在水活度较低的婴幼儿配方乳粉中存活两年以上。作为一种食源性条件致病菌,克罗诺杆菌能够引起新生儿以及抵抗力不足的幼儿患有败血症、脑膜炎和坏死性小肠结肠炎等能够致命的疾病^[5-7]。被污染的婴幼儿配方乳粉是新生儿或早产儿克罗诺杆菌感染的主要来源,而一旦感染克罗诺杆菌其致死率高达 40%~80%^[8]。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)报告了克罗诺杆菌污染的雅培奶粉导致了 4 名儿童感染,其中 1 名死亡。此外,克罗诺杆菌属中的菌株在自然界中有着较为广泛的分布,可以生存在土壤、污水、蔬菜、谷物制品、婴幼儿配方乳粉、肉制品及动物和人的粪便中^[9-11]。因此,对食源性克罗诺杆菌的鉴定和检测对保证特殊人群身体健康具有非常重要的意义。

克罗诺杆菌的常规鉴定方法较耗时,经常导致不准确的结果(FDA:2002;ISO:2006;GB 4789.40—2016)^[12-15]。随着检测技术的发展,实时荧光聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)方法得到了更广泛的应用,实时荧光 PCR 除了具有快速准确及易操作的特点外,还具有高灵敏性和高特异性,并且能够有效避免交叉污染的可能性。目前,国内外研究机构已开发出了多种实时荧光 PCR 方法来检测克罗诺杆菌。目标序列包括大分子合成操纵子序列^[16]、16S rRNA 基因^[17]、外膜蛋白 A 基因(*ompA*)^[18]、16S~23S rRNA 内部转录间隔区(Internal transcribed spacers, ITS)^[19]等,这些方法均取得了非常好的实验结果,但并不能对克罗诺杆菌属内所有种进行特异性测试,因此在对克罗诺属内某个种进行检测时可以参考。FDA 已将实时荧光 PCR 方法作为婴儿配方奶粉中克罗诺杆菌检测和分离的修订官方方法,并作为一种很有应用前景的筛查和确认工具^[20]。我国也有相关行业标准发布(SN/T 1632.3—2013,第三法)^[21],经过本实验室多次实验验证,该方法不针对穆汀斯克罗诺杆菌(ATCC 51329),存在漏检的情况。因此,建立一种特异性更好,灵敏性更高的实时荧光 PCR 方法非常必要。

本研究基于实时荧光 PCR 技术,通过比对包括克罗诺杆菌 7 个种 3 个亚种、阴沟肠杆菌和大肠杆菌等在内的 39 株菌的 *gyrB* 基因序列发现,该基因存在保守区和突变区。在 *gyrB* 基因的保守区设计

出 1 对特异性好、灵敏性高的引物和探针对克罗诺杆菌属内的 7 种克罗诺杆菌进行特异性鉴定和方法灵敏度验证,建立克罗诺杆菌属水平和种水平实时荧光 PCR 快速鉴定方法,为婴儿配方食品中克罗诺杆菌检测技术提供方法补充。

1 材料与方法

1.1 材料与菌种

1.1.1 实验菌种

克罗诺杆菌属标准菌种 7 种共 9 株,阴沟肠杆菌、大肠杆菌、沙门菌等其他细菌 39 株。以上菌株分别来源于美国典型菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)、中国医学微生物菌种保藏管理中心(National Center for Medical Culture Collection, CMCC)、中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Center of Industrial Culture Collection, CICC)、中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。菌株见表 1。

1.2 主要仪器与试剂

ABI QuantStudio 7 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司),VITEK[®] Compact 微生物分析系统(法国生物梅里埃公司)。

缓冲蛋白胨水培养(美国 Becton, Dickinson and Company 公司),TSA 培养基、血琼脂培养基(北京陆桥技术有限公司),细菌基因组盒提取试剂(Cat: DP302-02)、Taqman master mix(美国 ABI 公司)。

1.3 方法

1.3.1 菌株培养及 DNA 提取

-80 °C 保存的克罗诺杆菌标准菌株首先转接于血琼脂培养基中,36 °C 需氧培养(24±2) h,转接两代回复活力,备用。其他细菌根据菌种培养要求进行活化。

DNA 提取方法按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书进行。

1.3.2 引物探针设计

通过比对包括克罗诺杆菌 7 个种 3 个亚种、阴沟肠杆菌和大肠杆菌等在内的 39 株菌的 *gyrB* 基因序列,发现该基因存在高保守区和高突变区。其中保守区在不同属之间差异大于 10%,而突变区在不同种和亚种之间也存在较大差异。因此,对保守区和突变区都进行了序列分析和引物探针的设计,用于建立属水平和种水平鉴定方法。本文根据 *gyrB* 基因保守区序列,使用 Primer Express 软件设计引物和探针,其中探针 Cro-P 5' 端标记 FAM 荧光基团,3' 端标记 TAMRA 淬灭基团。引物和探针由上海生物工程有限公司合成。引物和探针序列见表 2。

表1 标准菌种名称及编号
Table 1 Names and serial numbers of standard strains

| 菌种名称 | 菌株编号 | 菌种名称 | 菌株编号 |
|---|----------------|---|----------------|
| 阪崎肠杆菌 <i>Cronobacter sakazakii</i> | IQCC 10403 | 大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 |
| 阪崎肠杆菌 <i>Cronobacter sakazakii</i> | ATCC 29544 | 大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> | CMCC 44747 |
| 穆汀斯克罗诺杆菌 <i>Cronobacter muytjensii</i> | ATCC 51329 | 大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> | CMCC 44752 |
| 穆汀斯克罗诺杆菌 <i>Cronobacter muytjensii</i> | DSM 21870 | 弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i> | ATCC 43864 |
| 传奇克罗诺杆菌 <i>Cronobacter universalis</i> | DSM 27963 | 产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i> | ATCC 13048 |
| 苏黎世克罗诺杆菌 <i>Cronobacter turicensis</i> | DSM 18703 | 产酸克雷伯 <i>Klebsiella oxytoca</i> | ATCC 700324 |
| 都柏林克罗诺杆菌 <i>Cronobacter dublinensis</i> | DSM 18705 | 弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i> | CICC 10404 |
| 丙二酸盐阳性克罗诺杆菌 <i>Cronobacter malonaticus</i> | DSM 18702 | 痢疾志贺菌 <i>Shigella dysenteriae</i> | CMCC (B) 51105 |
| 调味品克罗诺杆菌 <i>Cronobacter condimenti</i> | DSM 27966 | 福氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i> | CICC 21534 |
| 鼠伤寒沙门菌 <i>Salmonella typhimurium</i> | CMCC 50013 | 粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC 29212 |
| 丙型副伤寒沙门菌 <i>Salmonella Paratyphi C</i> | CMCC 50017 | 铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 |
| 乙型副伤寒沙门菌 <i>Salmonella Paratyphi B</i> | CMCC 50004 | 荧光假单胞菌 <i>Serratia marcescens</i> | CICC 20066 |
| 甲型副伤寒沙门菌 <i>Salmonella paratyphi A</i> | CMCC 50001 | 恶臭假单胞 <i>Pseudomonas putida</i> | CGMCC 1.2309 |
| 亚利桑那沙门菌 <i>Salmonella arizona</i> | CMCC 47001 | 杀鲑气单胞菌 <i>Aeromonas salmonicida</i> | CICC 23564 |
| 甲型副伤寒沙门菌 <i>Salmonella Paratyphi A</i> | ATCC 9150 | 洋葱伯克霍尔德菌 <i>Burkholderia cepacia</i> | CICC 21896 |
| 鸭沙门氏菌 <i>Salmonella enterica</i> | ATCC 9270 | 普通变形菌 <i>Proteus vulgaris</i> | CMCC(B) 49027 |
| 肠沙门氏菌肠亚种 <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> | ATCC 13076 | 单核增生李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i> | ATCC 19115 |
| 布伦登卢普沙门菌 <i>Salmonella Braenderup</i> | ATCCH 9812 | 肠道出血性大肠埃希菌 <i>enterohemorrhagic Escherichia coli</i> | CICC 21530 |
| 肠沙门氏菌肠亚种伤寒血清型 <i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi</i> | CMCC (B) 50071 | 肠道集聚性大肠埃希菌 <i>enteroaggregative Escherichia coli</i> | CICC 24186 |
| 鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i> | ATCC 14028 | 肠道致病性大肠埃希菌 <i>enteropathogenic Escherichia coli</i> | CICC 24189 |
| (Ituri)伊图里沙门菌 <i>Salmonella enterica</i> | ATCC 15611 | 产肠毒素大肠埃希菌 <i>enterotoxigenic Escherichia coli</i> | CICC 10667 |
| 大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i> | AS 1.3373 | 阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i> | CICC 10450 |
| 大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i> | ATCC 8739 | 产志贺毒素大肠埃希菌 <i>enterotoxigenic Escherichia coli</i> | CICC 10670 |
| 大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i> | CICC 10354 | 肠道侵袭性大肠埃希菌 <i>enteroinvasive Escherichia coli</i> | CICC 24188 |

表2 实时荧光 PCR 引物和探针序列

Table 2 The primers and probe sequences of real-time PCR

| 目标基因 | 引物探针序列 | Ganbank 编码 |
|-------------|--|---------------------|
| <i>gyrB</i> | CroF: 5'-ACTCCGAACTCTACCTGGTG-3' | GenBank: CP012264.1 |
| | CroR: 5'-CCTGATTCTTCCGGTTACGG-3' | |
| | CroP: 5'-FAM-AGAACCGCCCGGAGTCCC-TAMRA-3' | |

1.3.3 实时荧光 PCR 反应体系和参数

实时荧光 PCR 反应体系为 25 μ L: 2 \times master mix12.5 μ L、引物对(10 μ mol/L)各 1 μ L、探针(10 μ mol/L)0.5 μ L、模板 DNA 1 μ L、ddH₂O 9 μ L。

实时荧光 PCR 反应参数:50 °C, 2 min, 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 40 s; 同时收集 FAM 荧光, 进行 40 个循环, 4 °C 保存反应产物。

对照组设置:阪崎肠杆菌 ATCC 29544 DNA 设置为阳性对照;大肠杆菌 ATCC 25922 DNA 设置为阴性对照;以 ddH₂O 设置为空白对照。

实时荧光 PCR 扩增曲线呈指数扩增, Ct < 35 可直接判定为阳性, Ct 值为 35~40 判定为可疑, 需要进行重复实验, 重复检测结果 Ct 值仍然在 35~40 之间, 判定为阳性, Ct > 40 判定为阴性。

1.3.4 特异性、灵敏度实验

特异性实验选取表 1 中菌株, 按照 1.3.3 中的反应体系和参数验证引物和探针的特异性, 进行实时荧光 PCR 扩增。每次实验设置 5 个平行, 重复实验 4 次, 共计重复实验 20 次, 记录阳性扩增次数。

选取阪崎肠杆菌 ATCC 29544 用于绝对灵敏度和相对灵敏度实验验证。

绝对灵敏度实验将 DNA 溶液梯度稀释至 10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001 ng/μL。所有稀释液在同一条件下进行实时荧光 PCR 扩增。相对灵敏度实验是将阪崎肠杆菌 ATCC 29544 添加到用 BPW 1:10 溶解的婴幼儿配方奶粉中, 添加菌落数为 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² CFU/mL, 使用细菌提取试剂盒提取 DNA 备用。

1.3.5 实时荧光 PCR 反应抗干扰实验

为验证该方法的稳定性, 使用阪崎肠杆菌 ATCC 29544 在基因组水平和培养物水平进行抗干扰实验验证。

1.3.5.1 基因组水平的抗干扰实验

将提取得到的阪崎肠杆菌 DNA 梯度稀释至 100、10、1、0.1 ng/μL、0.01 ng/μL, 分别按 1:1 (V/V) 的比例添加 100 ng/μL 的大肠杆菌 ATCC 25922

DNA 提取液和 TE 溶液, 混合后的 DNA 作为模板用于实时荧光 PCR 扩增。记录干扰 DNA 对实验结果的影响。

1.3.5.2 培养物水平的抗干扰实验

将阪崎肠杆菌 ATCC 29544 培养物梯度稀释至 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴ CFU/mL, 分别按照 1:1 (V/V) 添加 10⁸ CFU/mL 的大肠杆菌 ATCC 25922 和无菌水, 充分混匀后取 1 mL 混合液按照细菌 DNA 提取试剂盒的说明书提取 DNA, 并用于实时荧光 PCR 扩增, 提取的 DNA 作为模板采用 1.3.3 的方法进行扩增, 记录非特异性菌对实验结果的影响。

1.3.6 人工污染样品增菌后检测

实时荧光 PCR 对增菌后样品的检测灵敏度, 采用从当地市场购买的无克罗诺杆菌污染婴幼儿配方乳粉。取 100 g 奶粉样品到 900 mL BPW 中均质 2 min, 每个样品中取出 9 mL 接种 1 mL 10 倍连续稀释的克罗诺杆菌培养物, 以获得终浓度为 1×10⁹~1×10⁴ CFU/mL 克罗诺杆菌的人工污染样品。样品在 36 °C 孵育 24 h。取 1 mL 增菌液按照细菌 DNA 提取试剂盒的说明书提取 DNA。采用国标 GB 4789.2—2016^[14] 所描述的方法测定奶粉自然背景菌群的活细胞计数。

2 结果

2.1 特异性验证结果

特异性实验验证了表 1 中 48 株(包括 9 株克罗诺杆菌)食品中常见细菌, 其中 7 种 9 株克罗诺杆菌 DNA 为模板的反应具有明显的扩增曲线, 与克罗诺杆菌亲缘关系较近的其他肠杆菌及食品中常见的细菌 DNA 为模板的反应均无荧光扩增信号。即本研究建立的实时荧光 PCR 方法对克罗诺杆菌属内的 7 个种均可以进行特异性扩增, 而对食品中常见的其他细菌无扩增反应。见图 1。

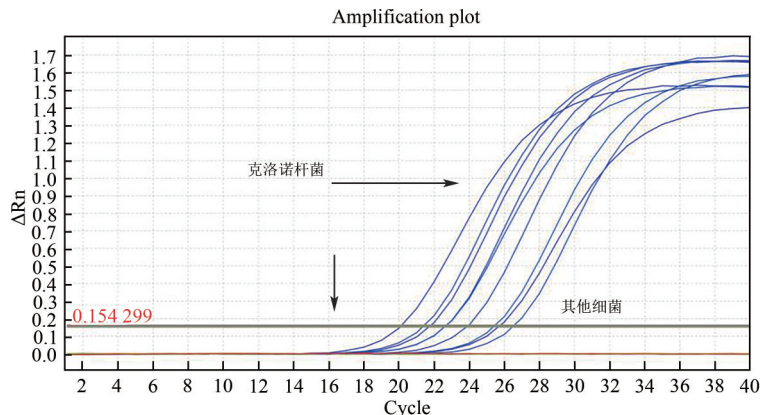


图 1 实时荧光 PCR 特异性实验测试结果

Figure 1 The specificity test results of real-time PCR

2.2 灵敏性验证结果

2.2.1 绝对灵敏度验证

实时荧光 PCR 实验的绝对灵敏度实验的扩增结果见表 3。根据表 3 所示结果可以看出,该方法对阪崎肠杆菌 ATCC 29544 可稳定检出的质量浓度为 0.001 ng/ μ L,表示检测下限可以达到 1 pg/ μ L。结果表明该方法在基因水平具有非常高的灵敏度,极微量克罗诺杆菌 DNA 也能够被稳定检出。

2.2.2 相对灵敏度验证

实时荧光 PCR 实验的相对灵敏度实验结果见

表 4 实时荧光 PCR 实验的相对灵敏度实验结果

Table 4 Relative sensitivity test results of the real-time PCR

| 基质 | 菌名 | 菌浓度(CFU/mL) | | | | | | |
|---------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 10 ⁸ | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 10 ⁵ | 10 ⁴ | 10 ³ | 10 ² |
| BPW 1:10 溶解的婴幼儿配方奶粉 | 阪崎肠杆菌 ATCC 29544 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 18/20(a) | 14/20 |

注:表中数据表示“检出次数/检测次数”,a表示有两次结果因为客观原因没有实验结果

2.3 抗干扰能力验证结果

为验证方法的稳定性,本文设计了基因组水平的抗干扰实验和培养物水平的抗干扰实验。通过增菌干扰菌的 DNA 浓度验证其在基因组水平的稳定性,通过增菌干扰菌的浓度来验证其在培养物水平的稳定性。

2.3.1 基因组水平的抗干扰实验结果

实时荧光 PCR 方法在基因组水平抗干扰实验结果见表 5。在干扰基因组浓度是目标基因组浓度 10 000 倍的情况下,克罗诺杆菌的扩增 Ct 值无显著影响($P>0.05$),该结果说明高浓度背景基因组的存在并不会对实验结果有影响,即该方法具有非常好的稳定性。这个结果说明该方法在用于食品样品检测时,检测结果并不会受背景基因组的影响,在基因组水平具有很好的抗干扰能力。

2.3.2 培养物水平的抗干扰实验结果

实时荧光 PCR 方法在培养物水平的抗干扰实验

表 5 实时荧光 PCR 基因组水平的抗干扰实验结果

Table 5 Anti-disturbance ability of the real-time PCR method at the level of the genome

| 质量浓度(ng/ μ L) | Ct 值 | |
|-------------------|------------|----------------|
| | 1:1 添加 TE* | 1:1 添加大肠杆菌 DNA |
| 100 | 18.9±0.07 | 18.6±0.06 |
| 10 | 22.3±0.06 | 22.1±0.10 |
| 1 | 25.2±0.06 | 25.5±0.05 |
| 0.1 | 28.5±0.13 | 28.8±0.15 |
| 0.01 | 32.1±0.16 | 32.4±0.21 |
| 阳性对照 | 17.8±0.05 | 17.8±0.05 |
| 阴性对照 | — | — |
| 空白对照 | — | — |

注:*添加 TE 是为了与添加大肠杆菌 DNA 保持相同比例的稀释,减小误差;两组实验具有相同的阳性对照、阴性对照和空白对照。“—”表示 Ct 值>40

表 3 实时荧光 PCR 实验的绝对灵敏度实验结果

Table 3 Absolute sensitivity test results of the real-time PCR

| 菌名 | 质量浓度/(ng/ μ L) | | | | | |
|------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|---------|
| | 10 | 1 | 0.1 | 0.01 | 0.001 | 0.000 1 |
| 阪崎肠杆菌 ATCC 29544 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 3/20 |

注:表中数据表示“检出次数/检测次数”

表 4。根据表 4 所示结果可以看出,可以稳定检出的最低菌液浓度为 10³ CFU/mL。表示该方法在培养物水平的检测下限是 10³ CFU/mL。该结果表明在婴幼儿配方乳粉中克罗诺杆菌浓度达到 10³ CFU/mL 时可以被稳定检出。

结果见表 6。在干扰菌浓度达到目标菌浓度 10 000 倍的情况下各菌浓度的 Ct 值未受显著影响($P>0.05$)。该结果说明高浓度背景菌不会对实验结果有影响,即该方法具有非常好的稳定性,在用于食品样品检测时,检测结果并不会受背景菌的影响,在培养物水平具有很好的抗干扰能力。

表 6 实时荧光 PCR 培养物水平的抗干扰实验结果

Table 6 Anti-disturbance ability of the real-time PCR method at the cultural level

| 阪崎肠杆菌 (CFU/mL) | Ct 值 | |
|-----------------|--------------|-------------------------------------|
| | 添加 1 mL 无菌水* | 添加 1 mL 10 ⁸ CFU/mL 大肠杆菌 |
| 10 ⁸ | 19.2±0.02 | 19.1±0.03 |
| 10 ⁷ | 22.7±0.05 | 22.8±0.02 |
| 10 ⁶ | 26.4±0.05 | 26.4±0.02 |
| 10 ⁵ | 29.8±0.10 | 29.6±0.05 |
| 10 ⁴ | 33.0±0.15 | 33.2±0.22 |
| 阳性对照 | 17.5±0.05 | 17.5±0.05 |
| 阴性对照 | — | — |
| 空白对照 | — | — |

注:*添加无菌水是为了与添加大肠杆菌保持相同比例稀释,减小误差;两组实验具有相同的阳性对照、阴性对照和空白对照。“—”表示 Ct 值>40

2.4 人工污染样品实验结果

人工污染样品增菌后扩增结果见表 7。样品污染克罗诺杆菌浓度为 10⁰ CFU/mL 时,36 °C 培养 24 h 后,采用实时荧光 PCR 方法能够检测到荧光信号。该结果表明在婴幼儿配方乳粉污染克罗诺杆菌浓度极低的情况下,经过增菌后能够用本文建立的方法稳定检出。这进一步保证了婴幼儿配方食品中克罗诺杆菌的检测下限。可以将检出限降低至 10⁰ CFU/mL。

表 7 人工污染样品实时荧光 PCR 结果
Table 7 Real-time PCR results of artificially contaminated samples

| 阪崎肠杆菌/(CFU/mL) | Ct 值 |
|-----------------|-----------|
| 10 ⁰ | 31.2±0.32 |
| 10 ¹ | 30.7±0.15 |
| 10 ² | 27.4±0.25 |
| 10 ³ | 26.8±0.21 |
| 10 ⁴ | 22.4±0.17 |
| 阳性对照 | 17.7±0.02 |
| 阴性对照 | — |
| 空白对照 | — |

注：“—”表示 Ct 值>40

3 讨论

克罗诺杆菌作为一种食源性条件致病菌,是导致新生儿以及免疫低下的幼儿较高致死率的病原菌。因此,加强对婴幼儿配方粉中克罗诺杆菌的监测、检测将有效降低克罗诺杆菌感染的风险。传统的克罗诺杆菌检测方法基于生化和血清学方法,不能满足快速检测的需求。实时荧光 PCR 法检测使用 TaqMan 探针用于检测食品样中的致病菌已被证明是可信的^[14]。实时荧光 PCR 方法不仅快速、简单,而且特异性和灵敏度高,该方法还能够很好地避免交叉污染的可能。

本研究利用克罗诺杆菌的 *gyrB* 基因保守区序列设计出能够特异性扩增克罗诺杆菌的引物和探针,建立一种实时荧光 PCR 方法用于婴幼儿配方乳粉中克罗诺杆菌属的检测。使用 39 株常见致病菌对该方法进行特异性验证,结果显示,本研究建立的实时荧光 PCR 方法对于克罗诺杆菌的鉴定具有良好的特异性。

本研究对克罗诺杆菌检测的绝对灵敏度可达到 1~10 pg,相对灵敏度可以达到 10³ CFU/mL。由于配方食品样品中克罗诺杆菌的浓度非常低,因此增加活细胞的数量或者提高最低的检测浓度有助于提高实时荧光 PCR 方法对克罗诺杆菌的检测率^[18-19, 22]。本研究使用实时荧光 PCR 方法对富集后的人工污染食物样品进行检测,结果显示该方法对克罗诺杆菌的检测灵敏度达到 10⁰ CFU/mL。因此,本方法有助于提高婴幼儿配方食品中克罗诺杆菌检出率。

本文在研究克罗诺杆菌的 *gyrB* 基因序列时发现该基因除了具有保守区序列可以用于属水平的鉴定外,同时具有高突变区,其高突变区序列可以用于克罗诺杆菌种水平的区分,通过该基因建立一种克罗诺杆菌分型的实时荧光 PCR 方法是今后的研究方向。

参考文献

- [1] NAZAROWEC-WHITE M, FARBER J M. *Enterobacter sakazakii*: A review[J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 34(2): 103-113.
- [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] 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.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(6): 1442-1447.
- [4] STRYDOM A, CAWTHORN D M, CAMERON M, et al. Species of *Cronobacter* - A review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk [J]. International Dairy Journal, 2012, 27(1-2): 3-12.
- [5] K. SULOVSKA, E. FISEROVA, M. CHVOSTEKOVA, et al. Appropriateness of gait analysis for biometrics: Initial study using FDA method [J]. Measurement, 2017, 105. 1-10.
- [6] GOSNEY M. *Enterobacter sakazakii* bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: A case report [J]. Age and Ageing, 2008, 37(2): 236-237.
- [7] LAI K K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature[J]. Medicine, 2001, 80(2): 113-122.
- [8] HUNTER C J, PETROSYAN M, FORD H R, et al. *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in infants and neonates [J]. Surgical Infections, 2008, 9(5): 533-539.
- [9] 徐湾, 姜华, 张逸飞, 等. 我国克罗诺杆菌污染现状与预防控制措施研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(9): 848-851.
- XU W, JIANG H, ZHANG Y F, et al. Advances in research on *Cronobacter* spp.: Current contamination status and preventive measures in China [J]. Journal of Pathogen Biology, 2015, 10(9): 848-851.
- [10] MCAULEY C M, MCMILLAN K, MOORE S C, et al. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments [J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(12): 7402-7412.
- [11] BORGNE L, FRANCOISE, GUYOT, et al. Comparative Analysis of Genome Sequences Covering the Seven *Cronobacter* Species [J]. PLoS ONE, 2012.
- [12] U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula [Z/OL]. July 2002; re-vised August 2002 (2022-08-22) [2022-02-01]. <https://corpora.tika.apache.org/base/docs/govdocs1/256/256703.html>.
- [13] ISO. Milk and milk product—Detection of *Enterobacter sakazakii*: ISO/TS 22964—2006 & IDF/IRM 210—2006 [S/OL]. First edition, 2006 (2006-02-01) [2022-02-01]. <https://www.saiglobal.com>.

- com/PDFTemp/Previews/OSH/iso/updates2006/wk7/ISO-TS_22964-2006.PDF.
- [14] 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 菌落总数测定: GB 4789.2—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National food safety standard Food microbiological examination: aerobic plate count: GB 4789.2—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [15] FOX E M, JORDAN K N. Towards a one-step *Enterobacter sakazakii* enrichment [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(4): 1091-1097.
- [16] 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.
- [17] KANG S E, NAM Y S, HONG K W. Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* using TaqMan real-time PCR assay [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(3): 516-519.
- [18] KANDHAI M C, HEUVELINK A E, REIJ M W, et al. A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in the netherlands between 2001 and 2005[J]. Food Control, 2010, 21(8): 1127-1136.
- [19] LIU Y, CAI X N, ZHANG X, et al. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 65(1): 21-31.
- [20] CHEN Y, HAMMACK T S, SONG K Y, et al. Evaluation of a revised US food and drug administration method for the detection and isolation of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula: Precollaborative study[J]. Journal of AOAC International, 2009, 92(3): 862-872.
- [21] 国家质量监督检验检疫总局. 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: SN/T 1632.3—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Test method for *Enterobacter sakazakii* (Cronobacter) in exported milk powder Part 3: Fluorescent PCR method: SN/T 1632.3—2013[S]. Beijing: Standards Press of China, 2013.
- [22] 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.

(上接第835页)

- 刘弘(上海市疾病预防控制中心)
- 刘长青(河北省疾病预防控制中心)
- 刘成伟(江西省疾病预防控制中心)
- 刘兆平(国家食品安全风险评估中心)
- 刘守钦(济南市疾病预防控制中心)
- 刘烈刚(华中科技大学公共卫生学院)
- 刘爱东(国家食品安全风险评估中心)
- 孙长颢(哈尔滨医科大学)
- 李 宁(国家食品安全风险评估中心)
- 李 黎(中华预防医学会)
- 李凤琴(国家食品安全风险评估中心)
- 李业鹏(国家食品安全风险评估中心)
- 李国梁(陕西科技大学食品与生物工程学院)
- 李静娜(武汉市疾病预防控制中心)
- 杨 方(福州海关技术中心)
- 杨 钧(青海省卫生健康委员会卫生监督所)
- 杨大进(国家食品安全风险评估中心)
- 杨小蓉(四川省疾病预防控制中心)
- 杨杏芬(南方医科大学公共卫生学院)
- 肖 荣(首都医科大学公共卫生学院)
- 吴永宁(国家食品安全风险评估中心)
- 何更生(复旦大学公共卫生学院)
- 何来英(国家食品安全风险评估中心)
- 何洁仪(广州市疾病预防控制中心)
- 姜毓君(东北农业大学食品学院)
- 聂俊雄(常德市疾病预防控制中心)
- 贾旭东(国家食品安全风险评估中心)
- 徐 娇(国家卫生健康委员会食品标准与监测评估司)
- 徐海滨(国家食品安全风险评估中心)
- 高志贤(军事科学院军事医学研究院)
- 郭云昌(国家食品安全风险评估中心)
- 郭丽霞(国家食品安全风险评估中心)
- 唐振柱(广西壮族自治区疾病预防控制中心)
- 黄 薇(深圳市疾病预防控制中心)
- 黄锁义(右江民族医学院药学院)
- 常凤启(河北省疾病预防控制中心)
- 崔生辉(中国食品药品检定研究院)
- 章 宇(浙江大学生物工程与食品学院)
- 章荣华(浙江省疾病预防控制中心)
- 梁进军(湖南省疾病预防控制中心)
- 程树军(广州海关技术中心)
- 傅武胜(福建省疾病预防控制中心)
- 谢剑炜(军事科学院军事医学研究院)
- 赖卫华(南昌大学食品学院)
- 裴晓方(四川大学华西公共卫生学院)
- 廖兴广(河南省疾病预防控制中心)
- 熊丽蓓(上海市疾病预防控制中心)
- 樊永祥(国家食品安全风险评估中心)