

论著

3 种方法检测婴幼儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌

庞杏林 莫自耀 张 健 张 颖 胡玉山 张欣强 邓志爱 李孝权 陈守义
(广州市疾病预防控制中心,广东 广州 510080)

摘要:目的 对市售婴幼儿配方奶粉中阪崎肠杆菌检测方法进行研究。方法 分别用常规培养鉴定方法、常规 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法对 32 份奶粉样品进行阪崎肠杆菌分离鉴定。结果 32 份样品中检出 2 株阳性株,阳性率为 6.25%,3 种鉴定方法结果相符。结论 联合使用多种鉴定方法可提高阪崎肠杆菌检测的可靠性。

关键词:乳制品;婴儿配方;阪崎肠杆菌;聚合酶链反应

Study on Isolation and Identification of *Enterobacter Sakazakii* of Milk Powder of Infant Formula

PANG Xing-lin, MO Zi-yao, ZHANG Jian, ZHANG Ying, HU Yu-shan,
ZHANG Xin-qiang, DENG Zhi-ai, LI Xiao-quan, CHEN Shou-yi

(Guangzhou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective To study the methods of isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* (*E. sakazakii*) from commercial available milk powders of infant formula. **Method** *E. sakazakii*, was isolated from infant milk powder samples of 32 portions, and was identified by routine bacterial culture, ordinary PCR and real-time PCR respectively. **Results** Two strains of *E. sakazakii* were isolated and identified from the milk powders of infant formula of 32 portions, and the positive rates were 6.25%. The isolation and identification results of the three identification methods were consistent. **Conclusion** The results indicated that the multiple identification methods could increase the detection credibility of *E. sakazakii*.

Key word: Dairy Products; Infant Formula; *Enterobacter sakazakii*; Polymerase Chain Reaction

阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 属肠杆菌科, 肠杆菌属的革兰阴性无芽孢短小杆菌, 人和动物的肠道寄生菌和条件致病菌。阪崎肠杆菌毒力强, 可以引起严重的新生儿脑膜炎、小肠结肠炎和败血症, 死亡率高达 50% 以上^[1]。Urményi 和 Franklin 率先报道由阪崎肠杆菌引起的 2 例脑膜炎。以后多个研究相继报道了新生儿阪崎肠杆菌感染, 也有报道引起成人骨髓炎和菌血症, 总体死亡率高达 80%^[2], 多起感染证实婴儿配方奶粉为主要感染源^[3]。目前国内外对阪崎肠杆菌的检测多采用常规的分离培养生化鉴定方法。最近, 常规 PCR 方法和实时荧光 PCR 技术也被运用于该菌的检测^[4,5]。Jeffrey M. Farber 博士在第一届 ICMSF - 中国国际食品安全会议上指出, 不同地区阪崎肠杆菌的检出率存在明显的不同 (0.12% ~ 14.2%)^[6]。我国至今还没有检验婴儿配方奶粉阪崎肠杆菌的国家标准, 为了探讨 3 种检测方法同时用于检测的时效性和实用性, 本研究分别采用了常规分离培养鉴定法、PCR 方法和实

时荧光 PCR 方法, 对广州地区采集的 32 份市售婴幼儿配方奶粉进行了阪崎肠杆菌的检测, 以便为国家制定标准提供有效数据。

1 材料与方法

1.1 样品和菌株

1.1.1 2006 年 3 月至 6 月期间, 从广州地区超市采集 32 份婴幼儿配方奶粉, 其中国产奶粉 22 份, 进口奶粉 10 份, 均为 500 g 锡纸袋包装。

1.1.2 阪崎肠杆菌标准菌株 CMCC45401 由中国药品生物制品检定所提供, 阪崎肠杆菌 3 株阳性参考株 S1、S2、S3 由深圳太太基因生物公司提供, 大肠杆菌 ATCC25922 由美国典型培养物保存中心提供, 自编阴沟肠杆菌 WJ005 由本实验室自行分离鉴定。

1.2 培养基、试剂及仪器

1.2.1 肠道杆菌增菌肉汤 (EE)、伊红美兰琼脂 (EMB)、阪崎肠杆菌显色培养基、山梨醇麦康凯琼脂和肠杆菌科微量生化鉴定管购自广东环凯微生物科技公司。结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBG) 和胰蛋白大豆琼脂 (TSA) 购自广州市迪景微生物科技有限公司。API 鉴定系统、API 20E 生化试条及其配套试剂为法国生物梅里埃公司产品。Taq 聚合酶和

基金项目: 广州市科技计划资助项目 (2005J1 - 00191)

作者简介: 庞杏林 女 主管技师

通讯作者: 莫自耀 男 主任医师

PCR 缓冲液购自北京赛百盛基因公司。深圳太太基因工程有限公司提供阪崎肠杆菌荧光 PCR 检测试剂盒。PTC-220 型梯度扩增仪和 Gel Doc XR 凝胶成像系统为伯乐公司生产。ABI 7500 荧光 PCR 仪为美国生物应用公司产品。

1.2.2 常规 PCR 引物,2 种特异性引物引用参考文献[4],由北京赛百盛基因公司合成,引物序列如下:SG-F:GGTGTGCTCGCAAAGCGAA,SG-R:GCTTCGTGCTCGAGTTTG;SI-F:CAGGAGTTGAGAGGGTTAACT,SI-R:GTGCTCGAGTTTGAGAGACTC。

1.2.3 实时荧光 PCR 引物序列 5'-CCGTTCGACGTAGCACTGC-3',5'-CATAGAATTCACGACGACGAAGTTC-3',探针:FAM-5'-TTCAAACGTTC TCCGAGAAAGCGG-3'-TAMRA。

1.3 方法

参考美国 FDA 和加拿大卫生部健康产品和食品部的推荐方法^[7-10],进行样品处理与菌株分离鉴定。生化鉴定按 API 20E 试剂条说明书进行,同时用常规 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法鉴定、比较。

1.3.1 常规分离培养鉴定 无菌操作称取试样 50 g,加入 450 ml 预热 45℃ 灭菌生理盐水溶解,置 37℃ 前增菌 18~24 h。吸取 10 ml 前述培养物接种于 90 ml 肠道增菌肉汤,置 37℃ 增菌培养 18~24 h。用标准菌株、阳性参考株、大肠杆菌和阴沟肠杆菌作对照试验。分别取培养液(定量为 10 μl)划线接种于阪崎肠杆菌显色平板、EMB 平板、山梨醇麦康凯平板和 VRBG 平板,各种平板分别接种 2 个,37℃、18~24 h 进行分离培养。根据标准株在肠道选择性平板上形成的菌落特征,从上述平板上挑选可疑菌落各 5 个,分别接种 TSA 平板和血平板,置 37℃、48~72 h 纯化培养。挑取纯培养物涂片,革兰染色镜检。如为 G⁻ 短小杆菌则做氧化酶试验,氧化酶试验阴性者用 API 20E 生化试条和肠杆菌科微量生化鉴定管进行生化鉴定。

1.3.2 常规 PCR 分别从每瓶 EE 肉汤取 1.2 ml 加到 1.5 ml 无菌离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,取灭菌双蒸水 100 μl 研磨管底沉淀,制备成菌悬液,100℃、10 min 加热裂解菌体,13 000 r/min、4℃ 低温离心 5 min,取上清液作为模板。20 μl PCR 反应体系,预变性 94℃ 5 min,变性 94℃ 60 s,退火 52℃ 60 s,延伸 72℃ 60 s,40 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。取扩增产物 10 μl,标准分子量 Marker 10 μl,0.8% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统拍照。

1.3.3 实时荧光 PCR

1.3.3.1 模板 DNA 准备 分别从每瓶 EE 肉汤取 1

ml 加到 1.5 ml 无菌离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入 50 μl DNA 提取液,混匀后沸水浴 5 min,12 000 r/min、4℃ 低温离心 5 min,取上清液以待检测。

1.3.3.2 荧光 PCR 检测 反应体系总体积为 25 μl,其中含:10×PCR 缓冲液 2.5 μl、引物对(10 μmol/L)各 1 μl、dNTP(10 mmol/L)1 μl、Taq DNA 聚合酶(5 U/μl)0.5 μl、水 17 μl、模板 DNA 2 μl。反应步骤一:37℃ 5 min,95℃ 预变性 3 min。反应步骤二:95℃ 变性 5 s,60℃ 退火延伸 40 s,同步收集 FAM 荧光,共进行 40 个循环。以含有扩增片段的质粒为阳性对照,以灭菌水作为空白对照,大肠杆菌和阴沟肠杆菌作为阴性对照。

1.3.3.3 结果及判断 检测样本 Ct 值小于或等于 35.0 时,报告阪崎肠杆菌筛选阳性;否则报告阪崎肠杆菌未检出;样本检测不到 Ct 值时,报告阪崎肠杆菌未检出。

2 结果

通过 3 种方法的检测,32 份奶粉样品中检出 2 株阪崎肠杆菌,均为国产奶粉样本,总阳性率为 6.25%,国产奶粉检出率为 9.09%,进口奶粉未检出本菌。所有的标准株和阳性参考株均为阳性结果,2 株阴性株结果阴性。本次研究同时采用 3 种方法检测阪崎肠杆菌,进行了平行比较试验,以评价符合程度,几种方法的检验结果完全相符。

2.1 阪崎肠杆菌培养鉴定特征

阪崎肠杆菌在显色平板上形成绿色菌落,湿润,挑起有粘性。在山梨醇麦康凯平板上形成直径 4~5 mm、无色、光滑湿润、扁平的菌落,针挑有粘稠感,易于融合生长。因为阪崎肠杆菌不分解山梨醇,故在山梨醇麦康凯平板上为无色菌落,可以与其他肠杆菌区别。在 EMB 平板上菌落较大肠杆菌小,分解乳糖呈淡粉红色,有金属光泽。在 VRBG 平板上形成 2 种菌落形态,一种为光滑湿润、紫红色菌落,外绕一圈深紫色不透明的胆酸沉淀环,针挑有粘稠感,可拉出黏丝状,易融合生长。另一种为粗糙型菌落,边缘呈放射状,接种环触碰可有弹性感觉。标准株 45401 的 API 20E 鉴定率为 99.9%,阳性参考株 S1 的 API 20E 鉴定率为 98.9%,阳性参考株 S2 的 API 20E 鉴定率为 99.8%,阳性参考株 S3 的 API 20E 鉴定率为 99.8%,样本 SW098 的 API 20E 鉴定率为 99.3%,样本 SW 102 的 API 20E 鉴定率为 99.7%。API 20E 生化试条鉴定结果见表 1,肠杆菌科微量生化鉴定结果见表 2。

表 1 阪崎肠杆菌 API 20E 生化试条鉴定结果

试验菌株	半乳糖苷酶	精氨酸酶	赖氨酸酶	鸟氨酸酶	枸橼酸	硫化氢	尿素酶	色氨酸酶	靛基质	伏普	明胶	葡萄糖	甘露醇	肌醇	山梨醇	鼠李糖	蔗糖	蜜二糖	苦杏仁苷	阿拉伯糖	氧化酶
标准株 45401	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
阳性参考株 S1	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
阳性参考株 S2	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
阳性参考株 S3	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
样本 SW098	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
样本 SW102	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

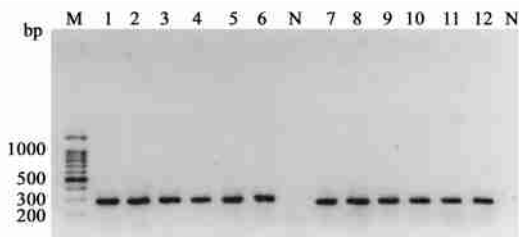
表 2 阪崎肠杆菌微量生化鉴定结果

试验菌株	靛基质	甲基红	伏普	枸橼酸	硫化氢	尿素酶	葡萄糖	乳糖	蔗糖	麦芽糖	棉子糖	鼠李糖	山梨醇	甘露醇	硝酸盐	赖氨酸	鸟氨酸	精氨酸	氧化酶	黄色素	麦康凯生长
标准株 45401	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
阳性参考株 S1	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
阳性参考株 S2	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
阳性参考株 S3	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
样本 SW098	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
样本 SW102	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

2.2 阪崎肠杆菌常规 PCR 结果

为了检验 PCR 反应的特异性,同时用大肠杆菌和阴沟肠杆菌作了对照,结果为阴性。PCR 阳性产物电泳结果见图 1,SG 引物的扩增产物长度为 282 bp,SI 引物的扩增产物长度 251 bp。



N:阴性对照;1~6:SG引物扩增产物 282 bp(1:45401标准株;2:阳性参考株 S1;3:阳性参考株 S2;4:阳性参考株 S3;5:样本 SW098;6:样本 SW102);7~12:SI引物扩增产物 251bp(顺序同 SG)

M:Molecular weight marker(100 bp)

图 1 阪崎肠杆菌种特异性 PCR 扩增产物电泳图

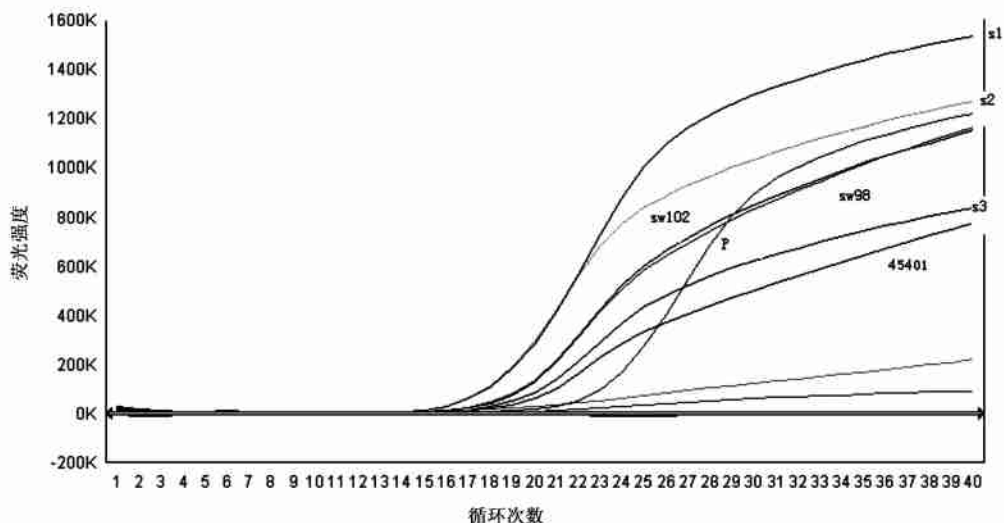
2.3 阪崎肠杆菌实时荧光 PCR 结果

实时荧光 PCR 产生了 7 个阳性结果,结果见表 3 和图 2。所有的阳性株均在 16 个循环突然荧光增强,曲线呈现 S 型,在 20 个循环左右测得 Ct 值。阴性对照和干扰株为阴性结果。

表 3 阪崎肠杆菌实时荧光 PCR Ct 值

菌株编号	定性结果	Ct 值
标准株 45401	+	21.94
阳性参考株 S1	+	19.15
阳性参考株 S2	+	19.23
阳性参考株 S3	+	21.16
样本 SW098	+	20.96
样本 SW102	+	20.88
大肠杆菌 ATCC25922	-	-
阴沟肠杆菌自备 WJ005	-	-
试剂盒阳性对照	+	24.38
试剂盒阴性对照	-	-

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。



阳性曲线从左至右分别为:阳性参考株 S1、阳性参考株 S2、样本 SW102、样本 SW98
阳性参考株 S3、标准株45401、试剂盒阳性对照

图 2 阪崎肠杆菌实时荧光 PCR 循环数曲线图

参考文献

[1] Joint FAO/WHO Workshop on *Enterobacter sakazakii* and other Microorganisms in Powdered infant Formula , Geneva [EB/OL]. <http://www.who.int/food/safety/micro/meetings/en/report.pdf>.

[2] WILLIS J , ROBINSON J E. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates[J]. *Pediatric Infect Disj* ,1988 ,7(2) :196-199.

[3] 刘秀梅. 阪崎肠杆菌- 食品安全控制的新目标[J]. *中国食品卫生杂志* ,2004 ,16(5) :385-388.

[4] YIN LIU , QILI GAO , XIA ZHANG , et al. PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula [J]. *Molecular and Cellular Probes* ,2006 , (20) :11-17.

[5] 张霞 ,高旗利 ,罗茂凰 ,等. 实时荧光 PCR 对奶粉中阪崎肠杆菌的检测[J]. *中国卫生检验杂志* ,2006 ,16(2) :214-216.

[6] 刘秀梅 ,裴晓燕 ,郭云昌. 中国安徽阜阳劣质婴儿配方粉中阪崎肠杆菌的污染[J]. *中国食品卫生杂志* ,2005 ,17(1) :10-12.

[7] US Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula ,2002 [DB]. <http://www.cfsan.fda.gov/comm/mmesakaz.html>.

[8] Microbial Detection of *Enterobacter sakazakii* : Food and Clinical [EB/OL]. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3939b1.tab4a.doc>.

[9] KANDHAI M C , REIJ , KVAN PUYVEL ,et al. A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples [J]. *J Food Prot* ,2004 ,67 :1267-1270.

[10] Government of Canada Laboratory Procedure. The Dupont oualicon BAX system method for the detection of *Enterobacter sakazakii* in selected foods[J]. *Health product and food branch OTTA WA* ,2003 , 9 :27

[收稿日期 :2007 - 06 - 01]

中图分类号 :R15 ;Q939. 122 ;TS216 文献标识码 :A 文章编号 :1004 - 8456(2007)05 - 0399 - 04

中华人民共和国卫生部
卫办监督函[2007]340号

卫生部办公厅关于同意废止《肉品卫生检验试行规程》的复函

农业部办公厅:

你厅《关于商请联合废止 肉品卫生检验试行规程 的函》(农办医函[2007]23号)收悉。经研究,同意你部关于废止《肉品卫生检验试行规程》的意见。

卫生部办公厅
二 七年六月五日