

研究报告

基于全基因组测序的阪崎克罗诺杆菌婴幼儿食品分离株分子特征研究

张红芝,陈雯杰,刘雪薇,魏滕,鲁珺琰,张曦
(上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

摘要:目的 研究婴幼儿食品中分离的阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)分子生物学特征。方法 对婴幼儿食品中*C. sakazakii*进行分离鉴定、药物敏感性试验和全基因组测序,利用BioNumerics软件对全基因组数据进行拼接组装,对组装基因组开展多位点序列分型(MLST)、核心基因组多位点序列分型(cgMLST)、毒力基因和耐药基因分析,并与PubMLST数据库中ST型进行比较分析。结果 本研究中分离的9株*C. sakazakii*共分为5个ST型,ST1和ST64型为主要型别,同时也是PubMLST数据库中*C. sakazakii*的主要型别。3株*C. sakazakii*携带*mcr-9*耐药基因,但药敏结果显示所有菌株对包括多粘菌素B和多粘菌素E在内的12种抗生素均敏感。除携带共同毒力基因谱外,ST1、ST64和ST458型携带脂多糖基因*gtrB*。cgMLST聚类分析显示,9株*C. sakazakii*呈高度多样性。结论 与临床分离株相关的ST1和ST64型是本研究食品分离株中的主要型别,提示*C. sakazakii*具有潜在的致病性,有必要对婴幼儿食品中*C. sakazakii*开展连续监测,为预防控制由其引起的食源性疾病提供依据。

关键词:阪崎克罗诺杆菌;全基因组测序;多位点序列分型;全基因组多位点序列分型;毒力基因;耐药基因;婴幼儿食品

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)02-0138-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.02.003

Molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* from infant foods using whole genome sequencing

ZHANG Hongzhi, CHEN Wenjie, LIU Xuewei, WEI Teng, LU Junyan, ZHANG Xi
(Shanghai Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: Objective To study the molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* (*C. sakazakii*) from infant foods.

Methods The *C. sakazakii* isolates were characterized using antibiotic susceptibility tests and whole genome sequencing (WGS). BioNumerics software was used to analyze and assemble WGS data. Then, the multilocus sequence typing (MLST), core-genome multi-locus sequence typing (cgMLST), virulence genes profiles were performed using assembled genome sequences. The resistance genes profiles and antimicrobial susceptibility were investigated. Furthermore, STs of *C. sakazakii* in this study were compared with those from PubMLST database. **Results** In this study, nine *C. sakazakii* isolates were detected and subtyped into five STs. ST1 and ST64 were the predominant STs, which were also the predominant STs of *C. sakazakii* in PubMLST database. Three *C. sakazakii* isolates were found to carry the *mcr-9* gene. However, all *C. sakazakii* isolates were sensitive to 12 antibiotics including polymyxin B and E. ST1, ST64 and ST458 carried *gtrB* in addition to the common virulence genes. The nine *C. sakazakii* isolates showed highly genomic diversity according to cgMLST results. **Conclusion** ST1 and ST64 were predominant STs in this study, which were also predominant STs in clinical isolates in PubMLST database. These results suggested the potential pathogenicity of *C. sakazakii*. Our data underscored the importance of continuous surveillance of *C. sakazakii* in infant foods for prevention of foodborne disease caused by *C. sakazakii*.

Key words: *Cronobacter sakazakii*; whole genome sequencing; multilocus sequence typing; core-genome multi-locus sequence typing; toxic gene profiles; resistance gene profiles; infant foods

阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*, *C. sakazakii*)是一种食源性条件致病菌,对婴幼儿非

常危险,尤其对于早产儿、低体质量、免疫力低下的婴儿有严重危害,感染后可引起脑膜炎、败血症和小肠结肠炎等疾病^[1],世界各国近些年相继报道了多起感染事件。除了新生儿感染外,该菌在一定条件下可导致老年人和免疫功能低下的成年人感染,引起菌血症、骨髓炎等疾病^[2]。

流行病学研究证实*C. sakazakii*引起的婴幼儿

收稿日期:2020-11-22

作者简介:张红芝 女 副主任技师 研究方向为食源性病原菌检测与食品安全 E-mail: zhanghongzhi@scdc.sh.cn

通信作者:张曦 女 主任医师 研究方向为病原微生物 E-mail: zhangxi@scdc.sh.cn

感染与食用婴幼儿配方乳粉有关^[3-4]。婴幼儿配方乳粉被 *C. sakazakii* 污染是导致婴幼儿败血症、脑膜炎以及坏死性结肠炎的重要途径^[5], 严重者可导致婴幼儿神经系统方面的后遗症, 死亡率高达 40%~80%^[6]。

C. sakazakii 在自然环境分布广泛, 水、土壤、污水中均有检出, 多种食品中也检出 *C. sakazakii*, 如奶酪制品、肉类、大米和其他谷物、蔬菜、发酵面包、家禽肉、牛奶、意大利面、谷类食品等^[7-8]。*C. sakazakii* 在食品中的分布是不同的, 谷物类食品中 *C. sakazakii* 的检出率较高^[9-10]。

目前对 *C. sakazakii* 的致病机制了解较少, 不同菌株之间毒力差异明显, 有的菌株能引起严重的新生儿脑膜炎, 致死率较高, 而有的却不致病。虽然目前没有很好的分类方法区分高致病菌株和非致病菌株, 但是很多研究证实一些型别与致病性存在一定的相关性。有研究证实 ST4、ST1 和 ST64 型多与致病性相关^[11-12]。全基因组测序技术能够在基因水平上全面分析其分子生物学特征, 在食源性疾病暴发病原菌的流行病学调查中发挥了重要作用^[13-14], 不但能分析菌株之间的亲缘关系, 如全基因组多位点序列分型 (core-genome multi-locus sequence typing, cgMLST), 还能提供全基因组测序数据用于分子分型, 如多位点序列分型 (multi-locus sequence typing, MLST)、毒力基因、耐药基因的分析等^[15-16]。因此, 本研究对食品中分离的 *C. sakazakii* 进行全基因组测序, 进一步进行 MLST 和 cgMLST 分型, 以及毒力基因和耐药基因分析, 为了解 *C. sakazakii* 的致病性、进一步开展分子流行病学监测、防控由其引起的食源性疾病提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品和菌株来源

根据《2019 年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册》^[17], 对上海市市售婴幼儿配方乳粉、婴幼儿谷类辅助食品及谷物冲调制品共计 326 份样品进行 *C. sakazakii* 检测, 检测方法依据 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》^[18]。*C. sakazakii* 标准菌株(ATCC 51329)和质谱鉴定用参考菌株(ATCC 8739)均由本实验室保存。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 2 Compact 生化鉴定仪、基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 均购自法国生物梅里埃, HisexTen PE150 测序仪 (美国

Illumina)。

阪崎克罗诺杆菌显色平板、哥伦比亚血平板均购自上海申启生物科技有限公司, VITEK MS-CHCA 基质液 (法国梅里埃), 细菌全基因组提取试剂盒 (日本 Takara), 药敏板 (珠海美华医疗科技有限公司), 甲酸, 乙腈, 无水乙醇 (色谱纯), α -氰基-4 羟基肉桂酸 (α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, CHCA)。

1.2 方法

1.2.1 MALDI-TOF MS 鉴定

挑取适量 (约 5~10 mg) 菌落样品于 1.5 mL 离心管中, 加入 900 μ L 无水乙醇, 混匀; 12 000 r/min 离心 2 min (离心半径 7.7 cm), 弃去上清液; 加入 40 μ L 70% 甲酸, 混匀, 再加入 40 μ L 乙腈, 混匀, 12 000 r/min 离心 2 min (离心半径 7.7 cm), 吸取 1 μ L 上清液点在靶板上, 自然晾干后再点 1 μ L CHCA 基质覆盖, 晾干后进行质谱分析, 观察、记录结果^[19]。

1.2.2 全基因组测序

取适量新鲜菌液, 用细菌全基因组提取试剂盒提取细菌全基因组 DNA。全基因组测序由生工生物工程公司完成, 采用 HisexTen PE150 测序仪进行全基因组分析。测序策略: 先将样本 DNA 随机打断, 构建 350 bp 小片段文库, 分别进行平行测序, 最终获数据量 Clean data 100 X。数据处理: 测序获得原始数据, 进行质控, 将合格的数据 Clean data 导入 BioNumerics 7.0 软件进行序列拼接。

1.2.3 MLST 和 cgMLST 分析

MLST 分型参考克罗诺杆菌属分型的管家基因 *atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB*, *infB*, *pps* (<https://pubmlst.org/databases/>)。利用 BioNumerics 7.0 软件从上述拼接好的序列中提取相应的管家基因, 然后利用 BN 软件的功能模块分配 ST 型。

cgMLST 分析, 根据 BioNumerics Calculation Engine 上的 *Cronobacter* 数据库, 从上述拼接好的序列中选取 1 865 个核心基因, 利用 BioNumerics 7.0 软件对其进行聚类分析。

1.2.4 毒力基因和耐药基因分析

利用 BioNumerics 软件拼接后的序列, 通过序列比对分析获得毒力基因谱和耐药基因谱。分别参考病原菌毒力因子数据库 (virulence factor database, VFDB, <http://www.mgc.ac.cn>) 和抗性基因数据库 (comprehensive antibiotic research database, CARD, <https://card.mcmaster.ca/>)。

1.2.5 药敏试验

采用微量肉汤稀释法进行药敏试验^[20], 采用革

兰阴性需氧药敏检测板检测,依据说明书的检测原理及操作步骤完成;每种抗生素设有一系列倍比稀释的浓度,通过加入待检 *C. sakazakii* 肉汤培养液稀释的菌悬液,经 18~20 h 孵育后,用肉眼对药敏板条进行判读,分析其最低抑菌浓度(MIC 值),并根据 2019 版美国临床实验室标准化委员会的标准^[21]获得相应敏感(S)、中介(I)和耐药(R)结果。共检测 12 种抗生素,分别为四环素(TET, 2~8 μg/mL)、环丙沙星(CIP, 0.5~2 μg/mL)、复方新诺明(SXT, 0.5/9.5~2/38 μg/mL)、阿米卡星(AMK, 8~32 μg/mL)、庆大霉素(GEN, 2~8 μg/mL)、多粘菌素 E (polymyxin E, 0.5~2 μg/mL)、多粘菌素 B (polymyxin B, 0.5~2 μg/mL)、萘啶酸(NAL, 16~32 μg/mL)、亚胺培南(IPM, 1~8 μg/mL)、左氧氟沙星(LEV, 1~8 μg/mL)、头孢曲松(CRO, 1~4 μg/mL)、氨苄西林/舒巴坦(AMS, 4/2~16/8 μg/mL)。

2 结果

2.1 *C. sakazakii* 检测结果

326 份样品中共有 9 份样品分离出 *C. sakazakii* (9 株),分离率为 2.76% (9/326)。其中 1 份来自婴幼儿配方乳粉,4 份来自婴幼儿谷类辅助食品,4 份来自谷物冲调制品。*C. sakazakii* 显色平板上的菌落均显示蓝绿色,在 TSA 平板上为黄色菌落, VITEK 2 Compact 生化鉴定结果和 MALDI-TOF MS 鉴定结果均为 *C. sakazakii*。

表 1 本研究中 *C. sakazakii* ST 型与其他国家比较分析

Table 1 Comparison of STs of *C. sakazakii* in the study with those of STs from other countries

ST 型	本研究分离来源	其他国家分离来源	
		来源	国家
ST1	婴幼儿配方乳粉(n=1), 营养面条(n=1)	婴幼儿配方乳粉(n=78), 环境(n=111), 食品(n=56), 临床患者(n=31), 奶粉(n=14), 婴儿米粉(n=7), 未知(n=5)	欧洲:荷兰、法国、瑞士、丹麦、比利时、爱尔兰、德国、捷克共和国、斯洛文尼亚、英国、意大利; 亚洲:中国、俄罗斯、韩国、马来西亚、沙特阿拉伯、土耳其、约旦; 北美洲:加拿大、美国、墨西哥; 南美洲:巴西; 大洋洲:新西兰、澳大利亚
ST64	黑芝麻糊(n=1), 营养麦片(n=1), 婴儿碎细面(n=1)	婴幼儿乳粉(n=32), 临床患者(n=2), 环境(n=20), 食品(n=19)	欧洲:捷克共和国、德国、法国、荷兰、瑞士; 南美洲:巴西; 北美洲:美国; 亚洲:中国
ST458	黑芝麻糊(n=1)	婴幼儿乳粉(n=1), 食品(n=2)	亚洲:中国、以色列; 欧洲:斯洛文尼亚
ST405	黑芝麻糊(n=2)	食品(n=1)	欧洲:捷克共和国
ST222	藕粉(n=1)	婴儿面条(n=1)	亚洲:中国

注:数据来源于 PubMLST *Cronobacter* database, 信息获得时间为 2020 年 5 月 17 日

cgMLST 聚类分析显示 9 株菌之间等位差异基因数量在 100~1 750 个之间,3 株 ST64 型菌株之间等位差异基因在 100~130 个之间,2 株 ST1 型菌株之间的等位差异基因数量为 140 个,2 株 ST405 型菌株有 170 个等位差异基因,不同 ST 型菌株之间的等位差异基因数量均超过 1 700 个,见图 1。

2.4 *C. sakazakii* 毒力基因谱分析

通过与 VFDB 比对分析,9 株 *C. sakazakii* 菌株

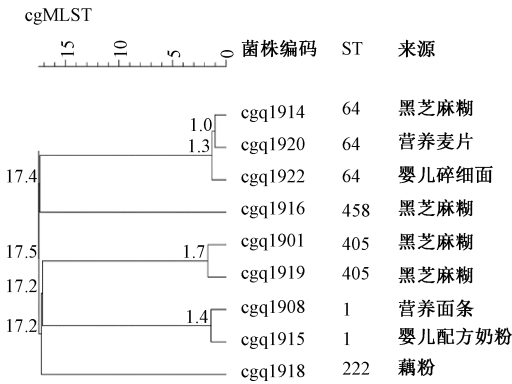
2.2 全基因组测序结果

本研究获得的 9 株 *C. sakazakii* 全基因组测序的原始数据经过分析,满足以下条件:平均测序读长为 200~300 bp,原始数据量≥1.5 G,且 Q20 高质量数据量平均为 1.2 G (Clean data≥1 G);基因组整体覆盖深度≥100 X;碱基数据质量值 Q20≥95%, Q30≥85%, SCAFFOLD 数量<100 个,Contig 数量<200 个,单碱基错误率低于十万分之一。

2.3 *C. sakazakii* 分子分型比较

MLST 分型结果显示,本研究中 9 株 *C. sakazakii* 可分为 5 个 ST 型,其中 2 株为 ST1 型,来自婴幼儿配方乳粉和营养面条,3 株为 ST64 型,分别来自黑芝麻糊、营养麦片和婴儿碎细面;2 株为 ST405 型,均来自黑芝麻糊;1 株 ST458 型分离自黑芝麻糊,1 株 ST222 型分离自藕粉,见表 1。目前 PubMLST 数据库中共有 3 009 条菌株信息,包括本研究获得的 5 个 ST 型,其中 ST1 型报道最多,有 302 条(占 10.0%),属于主要的型别,5 个洲 24 个国家均有 ST1 型菌株检出,且这些菌株来源广泛,包括婴幼儿配方乳粉、临床患者、婴儿米粉、环境、食品等。ST64 型也比较常见,4 个洲 8 个国家均有检出,来源也比较广泛,包括婴幼儿乳粉、临床患者、环境和食品。ST458 型只有 3 株菌,分别来自亚洲和欧洲的 3 个国家,来源为婴幼儿乳粉和食品;ST405 和 ST222 型分别来自欧洲和亚洲,分别分离自食品和婴儿面条。

携带毒力基因谱不同。如表 2 所示,不同 ST 型携带的毒力相关基因谱不同,其中 ST405 型携带 19 个毒力相关基因,ST64、ST1 和 ST22 型各携带 20 个,ST458 型携带 21 个。所有 ST 型菌株共有 18 个基因,其功能与运动、铁离子吸收、VI 型分泌系统、侵袭性有关。除了携带共有的毒力基因谱,ST1、ST64 和 ST458 型携带 *gtrB* 基因,此基因与编码脂多糖有关。



注:等位基因差异的个数为图中显示数字的100倍

图1 9株 *C. sakazakii* cgMLST 分型聚类图

Figure 1 Phylogenetic trees constructed based on cgMLST

表2 不同ST型菌株携带毒力基因谱分析

Table 2 Virulence gene profiles of different STs *C. sakazakii* isolates

ST 型	毒力基因个数	特有毒力相关基因及功能	共有毒力相关基因及功能
ST405	19	<i>flgH</i> :与运动有关	<i>cheW, cheY, flgB, fliA, fliG, fliI, fliM, fliN, flip</i> :与运动有关(鞭毛合成)
ST64	20	<i>flgG</i> :与运动有关; <i>gtrB</i> :编码脂多糖	<i>entA, entB, fepA, fepB, fepC, fepG</i> :与铁离子吸收有关; <i>hsiB1/vipA, hsiC1/vipB</i> :VI型分泌系统相关基因; <i>ompA</i> :与侵袭性有关
ST1	20	<i>flgG, flgH</i> :与运动有关; <i>gtrB</i> :编码脂多糖	
ST222	20	<i>epC, flgG, flgH</i> :与运动有关	
ST458	21	<i>flgH</i> :与运动有关; <i>gtrB</i> :编码脂多糖	

研究中,ST1型菌株来自婴幼儿配方乳粉和营养面条,这两种食品对婴幼儿存在潜在的危险,与之前的研究报道类似,FEI等^[22]对中国市场上2000多份婴幼儿配方乳粉检测发现,*C. sakazakii*的污染率为2.8%,其中ST4、ST1和ST64型为主要型别。WANG等^[23]报道2006—2015年间输入北京的奶粉中分离*C. sakazakii*主要的型别为ST1和ST4型。SONBOL等^[24]报道ST1型是婴幼儿配方乳粉中*C. sakazakii*的主要型别。本研究中ST64型菌株分离自婴幼儿辅助食品和谷物冲调制品,虽然在食用前有加热处理,可以灭活*C. sakazakii*,但是操作过程的交叉污染也使得*C. sakazakii*有潜在的感染风险。ST64型是肉中分离*C. sakazakii*的主要型别^[25-26],一些研究也证实ST1和ST64型与临床患者有关^[26]。这些结果提示需重视*C. sakazakii*对食品的污染,采取措施预防控制由其引起的食源性疾病。ST405和ST222型别在亚洲均有报道,ST458型目前只有欧洲的数据,这3个型别目前均没有临床菌株,但并不能说明这3个型别与临床患者无关,仍要引起注意。

cgMLST聚类分析提示本研究中分离的*C. sakazakii*基因呈现高度多样性,等位基因差异数量最少为100个,最多高达1700个,提示这些菌株之间没有同源性。

有研究^[27]表明不同*C. sakazakii*的毒力存在差异,本研究分析了不同型别菌株携带毒力基因谱的差异,5个ST型菌株携带的毒力基因数量虽不同,

2.5 *C. sakazakii* 耐药基因谱及药敏性试验结果

与CARD数据库中耐药基因序列比对结果显示,3株*C. sakazakii*携带多粘菌素耐药基因*mcr-9*。同时对12种抗生素进行药敏试验,结果显示所有菌株对12种抗生素均敏感。

3 讨论

本研究结果显示ST1和ST64是主要型别,占55.6%(5/9),PubMLST数据显示这两个型别的菌株来源广泛,且是食品、环境及临床患者分离*C. sakazakii*的重要型别,这些结果证明ST1和ST64型*C. sakazakii*的广泛分布以及较强的适应性。在本

但其共同携带的毒力基因与以下三个致病性有关:首先是编码鞭毛的基因(*cheW, cheY, flgB, fliA, fliG, fliI, fliM, fliN, flip*),鞭毛的存在对*C. sakazakii*的黏附起着重要的作用^[28]。其次是编码外膜蛋白的基因(*ompA*),很多研究表明外膜蛋白A与*C. sakazakii*的毒力密切相关^[29],MOHAN等^[30]通过*C. sakazakii*侵染人的肠上皮细胞试验得出,*ompA*基因突变株的侵袭力远远低于*ompA*基因回复株。再次是与铁获得相关的基因(*entA, entB, fepA, fepB, fepC, fepG*),铁是细菌最基本的微量元素之一,是细菌致病机制的重要因素之一^[31]。铁获得能力是致病菌进入宿主肌体产生感染作用的先决条件^[32],FRANCO等^[33]研究显示*C. sakazakii*携带的质粒pESA3和含铁细胞的活动有关;pESA3含有T6SS基因,本研究分离菌株中均携带T6SS基因(*hsiB1/vipA, hsiC1/vipB*),具有多种不同功能,如增强致病菌毒力和致病菌间竞争能力。值得注意的是,ST1、ST64和ST458型携带*gtrB*基因,*gtrB*基因编码脂多糖,研究报道脂多糖是一种热稳定性内毒素,持续存在于婴儿配方乳粉的加工过程中,一经摄入,可增加新生儿肠上皮的通透性,进而引起肠道中细菌的易位^[34]。有研究证实当新生儿食用婴儿配方乳粉后,其中所含的脂多糖也随之摄入体内,从而增加了新生儿患严重疾病的风险^[35]。这可能是ST1和ST458型为主要致病菌株的原因,因此ST458型别虽然不是主要的型别,仍需要警惕其潜在的致病性。

耐药基因比对分析显示有3株菌携带 *mcr-9* 耐药基因, *mcr-9* 基因属于多粘菌素耐药基因家族的一员, 最早报道是2015年从肠炎沙门菌中分离到^[36], 随后在中国、瑞士和法国也鉴定到 *mcr-9* 基因^[37-38]。NCBI 官网显示目前有284株细菌中检出 *mcr-9* 基因, 包括沙门菌、弗氏柠檬酸杆菌、肠杆菌科、克吕沃菌属、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、志贺菌、产酸克雷伯菌、克罗诺杆菌[[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/gene_family:\(mcr-9\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/gene_family:(mcr-9))]。研究发现 *mcr-9* 基因的携带与细菌的耐药性并不一致, YUAN 等^[37] 报道携带 *mcr-9* 基因的肠杆菌均显示对多粘菌素的耐药性, 而 CARROLL 等^[36] 在鼠伤寒沙门菌中鉴定出 *mcr-9* 基因, 药敏试验显示此菌对多粘菌素敏感。研究人员把 *mcr-9* 基因通过质粒转入对多粘菌素敏感的大肠埃希菌后, 后者表现出对多粘菌素的耐药性。进一步的分析提示 *mcr-9* 基因的表达需要启动子、诱导因子等, 一些细菌虽然携 *mcr-9* 基因, 但是缺少 *mcr-9* 表达所需要的相关因子, 因此不能表现对多粘菌素的耐药性, 这与本研究的结果相似。在本研究中, 药敏试验结果显示携带 *mcr-9* 基因的3株菌对多粘菌素 B 和多粘菌素 E 均表现敏感。本研究中的菌株对其他10种抗生素均表现敏感, 这与之前一些报道一致, 食品分离 *C. sakazakii* 对抗生素敏感^[11,36]。

参考文献

[1] INERSEN C, FORSYTHE S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula [J]. Trends in Food Science & Technology, 2003, 14(11):443-454.

[2] KUCEROVA E, CLIFTON S W, XIA X Q, et al. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species [J]. PLoS One, 2010, 5(3):e9556.

[3] HUNTER C J, BEAN J F. *Cronobacter*: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis [J]. Journal of Perinatology, 2013, 33(8): 581-585.

[4] 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.

[5] BLOCK C, PELEG O, MINSTER N, et al. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii* [J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2002, 21(8): 613-616.

[6] IVERSEN C, FORSYTHE S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products [J]. Food Microbiology, 2004, 21(6):

771-777.

[7] KANDHAI M C, REIJ M W, GORRIS L G, et al. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households [J]. The Lancet, 2004, 363(9402): 39-40.

[8] FRIEDEMANN M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder) [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(1): 1-10.

[9] BRANDO M L L, UMEDA N S, JACKSON E, et al. Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retail foods [J]. Food Microbiology, 2017, 63: 129-138.

[10] SILVA J N, VASCONCELLOS L, FORSYTHE S J, et al. Molecular and phenotypical characterization of *Cronobacter* species isolated with high occurrence from oats and linseeds [J]. FEMS Microbiology Letters, 2019. DOI: 10.1093/femsle/fny289.

[11] FEI P, JIANG Y C, JIANG Y, et al. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula collected from Chinese retail markets [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2026.

[12] BALDWIN A, LOUGHLIN M, CAUBILLA-BARRON J, et al. Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes [J]. BMC Microbiology, 2009, 9(1): 223.

[13] SCHARFF R L, BESSER J, SHARP D J, et al. An economic evaluation of PulseNet: a network for foodborne diseases surveillance [J]. American Journal of Preventive Medicine, 2016, 50(5):S66-S73.

[14] NARDON C, VAN WALLE I, GERNER-SMIDT P, et al. PulseNet international: vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global foodborne disease surveillance [J]. Eurosurveillance, 2017, 22(23): 30544.

[15] KOZYREVA V K, CRANDALL J, SABOL A, et al. Laboratory investigation of *Salmonella enterica* serovar Poona outbreak in California: comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and whole genome sequencing (WGS) results [J]. PLoS Currents, 2016. DOI: 10.1371/currents.outbreaks.1bb3e36e74bd5779bc43ac3a8dae52e6.

[16] FORSYTHE S J, DICKINS B, JOLLEY K A. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of ages, MLST and whole genome sequence analysis [J]. BMC Genomics, 2015, 15(1): 1121.

[17] 国家食品安全风险评估中心. 国家食品污染物和有害因素风险评估工作手册 [Z]. 2019.

[18] 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.

[19] STEPHEN R, ZIEGLER D, PFLUGER V, et al. Rapid genus- and species-specific identification of *Cronobacter* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(8): 2846-2851.

- [20] ZHANG H Z, YE Y L, YANG B W, et al. Characterization of an unusual foodborne illness including an outbreak and sporadic illness caused by three bacterial pathogens via a takeaway service [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2019, 16: 616-621.
- [21] CLSI. Clinical and Laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-29 [S]. Wayne, PA: CLSI, 2019.
- [22] FEI P, MAN C X, LOU B B, et al. Genotyping and source tracking of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* isolates from powdered infant formula and infant formula production factory in China [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81 (16): 5430-5439.
- [23] WANG Q, FORSYTHE S J, ZHAO X J, et al. Species identification and molecular characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food imported over time nine years into Beijing, China [J]. *Food Microbiology*, 2019, 82: 11-19.
- [24] SONBOL H, JOSEPH S, MCAULEY C M, et al. Multilocus sequence typing of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula and milk powder production factories [J]. *International Dairy Journal*, 2013, 30(1): 1-7.
- [25] ZENG H Y, LI C S, LING N, et al. Prevalence, genetic analysis and CRISPR typing of *Cronobacter* spp. isolated from meat and meat products in China [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 321: 108549.
- [26] LEPUSCHITZ S, RUPPITSCH W, PEKARD-AMENITSCH S, et al. Multicenter study of *Cronobacter sakazakii* infections in humans, Europe, 2017 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2019, 25(3): 515-522.
- [27] 韩冉. 阪崎克罗诺杆菌间毒力比较与致病因子研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2014.
- [28] KIM H, RYU J H, BEUCHAT L R. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(4): 1256-1265.
- [29] MITTAL R, WANG Y, HUNTER C J, et al. Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: a role for outer membrane protein A [J]. *Laboratory Investigation*, 2009, 89(3): 263-277.
- [30] MOHAN N M K, VENKITANARAYANAN K. Role of bacterial *OmpA* and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii* [J]. *Pediatric Research*, 2007, 62(6): 664-669.
- [31] NÈGRE V L, BONACORSI S, SCHUBERT S, et al. The siderophore receptor *IroN*, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor *Chua*, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis [J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(2): 1216-1220.
- [32] CROSA J H, WAISH C T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(2): 223-249.
- [33] FRANCO A A, HU L, GRIM C J, et al. Characterization of putative virulence genes on the related RepFIB plasmids harbored by *Cronobacter* spp. [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(10): 3255-3267.
- [34] 李贞. 基于乳鼠的食源性阪崎克罗诺杆菌致病性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [35] TOWNSEND S M, 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]. *Microbiology*, 2007, 153(10): 3538-3547.
- [36] CARROLL L M, GABALLA A, GULDIMANN C, et al. Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate [J]. *mBio*, 2019, 10(3): e00853-19.
- [37] YUAN Y, LI Y, WANG G X, et al. Coproduction of MCR-9 and NDM-1 by colistin-resistant *Enterobacter hormaechei* isolated from bloodstream infection [J]. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 2979-2985.
- [38] BÖRJESSON S, GREKO C, MYRENÄS M, et al. A link between the newly described resistance gene *mcr-9* and clinical *Enterobacteriaceae* isolates carrying blaSHV-12 from horses in Sweden [J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2020, 20: 285-289.