

## 实验技术与方法

## 奶粉中阪崎肠杆菌的分离与鉴定

王芳 王金玲 贾琳 张波

(沈阳出入境检验检疫局,辽宁 沈阳 110016)

**摘要:**目的 了解某地区婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的污染情况,为我国制定婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的限量标准及为政府加强对婴儿配方奶粉的管理提供科学依据。方法 常规生理生化鉴定法和实时荧光 PCR 法。结果 检出 2 株阪崎肠杆菌。结论 我国市售的婴儿配方奶粉中存在少量的阪崎肠杆菌污染。

**关键词:**乳制品;婴儿食品;阪崎肠杆菌;微生物学技术

Separation and Identification of *E. sakazakii* in Milk Powder

WANG Fang, WANG Jin-ling, JIA Lin, ZHANG Bo

(Shenyang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the P. R. C, Liaoning Shenyang 110016, China)

**Abstract: Objective** To inspect the condition of pollution of infant formula milk powder by *E. sakazakii* in a city market, and make contribution to the setting of the limit standard of *E. sakazakii* in formula milk powder for Chinese infants and to better management of the government. **Methods** Routine physiological and biochemical methods and real time PCR were used. **Results** Two strains of *E. sakazakii* were detected from the milk powder samples. **Conclusion** Though the situation of pollution of *E. sakazakii* in infant formula milk powder in a city market is not serious, it is better to feed infants with sterilized liquid milk.

**Key word:** Dairy Products; Infant Food; Enterobacter sakazakii; Microbiological Techniques

阪崎肠杆菌属肠杆菌科是一种条件致病菌,可引起婴幼儿发生脑膜炎等疾病,死亡率高达 40%~80%。2004 年,惠氏公司美国费蒙特(Vermont)工厂发现于 2002 年 7 月 12 日至 9 月 25 日期间生产的惠氏爱儿乐妈妈(S-26mama)孕产妇配方奶粉 48 330 罐,爱儿素(Nursoy)婴儿豆基配方粉 30 240 罐,涉及的批号为 L28N、L29N、L30N,可能含有阪崎肠杆菌。并召回其在美国市场销售的相关批号的婴儿奶粉。我国迅速作出反应,国家质检总局要求各地质检机构对本地市场销售的相关批号的婴儿奶粉全部查封。之后,在上海、深圳两地质检局监督下,将可能污染的奶粉全部销毁。

为了解某城市市场销售的进口和国产婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的污染情况,从某城市各大超市购得进口和国产奶粉 50 份,进行阪崎肠杆菌的检测。为我国制定婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的限量标准及为政府加强对婴儿配方奶粉的管理提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料 培养基购自北京陆桥技术有限责公

司,按说明书配制。DNA 提取试剂盒、SYBR<sup>R</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Perfect Real Time) 购于宝生物工程(大连)有限公司。引物根据 Genbank 中阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii* strain ATCC 51329)的序列,取 *gybB* 基因位点设计,在宝生物工程(大连)有限公司合成。

生化培养箱(广东医疗器械厂)、天平(上海分析仪器厂)、Light Cycler 基因扩增仪(德国罗氏诊断产品有限公司(Roche Diagnostics GmbH)、漩涡混合器 MVS-1(北京金北德工贸有限公司)、高速微型离心机 VSMC-13(美国 SHELTON SCIENTIFIC MFG 公司)、精密移液器(法国吉尔森公司 pipetman<sup>R</sup> 系列及德国 BRAND 公司 Transfepette<sup>R</sup> 系列)、LX-100 手掌型离心机(江苏海门麒麟医用仪器厂)。

标准菌株 阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*) 菌号 ATCC 29544;阪崎肠杆菌菌号 ATCC 29004。

样品来源 市售进口和国产奶粉 50 份,以婴儿配方奶粉为主。

1.2 方法 分别取试样 300 g 加入 45 ml 的无菌水 2 700 ml 中,(37 ± 1) °C 过夜培养。取 10 ml 转种于 90 ml EE 肉汤、EC 肉汤,(37 ± 1) °C 下培养 22 ~ 24 h。分别划线结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBGA)、胰化大豆蛋白琼脂(TSA)、显色培养基(产色素琼脂含

作者简介:王芳 女 高级工程师

有基质 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-,D-glucopyranoside 被  $\beta$ -葡萄糖苷酶分解,被阪崎肠杆菌表达,很容易形成可辩认的蓝绿色菌落),37 培养 24 h。观察菌落形态,挑取典型菌落作进一步生化反应。将生化反应确定为阪崎肠杆菌阳性的菌落,用无菌刮板刮取菌苔,按照 DNA 提取试剂盒说明操作提取菌体 DNA,-20 保存备用,-70 长期保存。

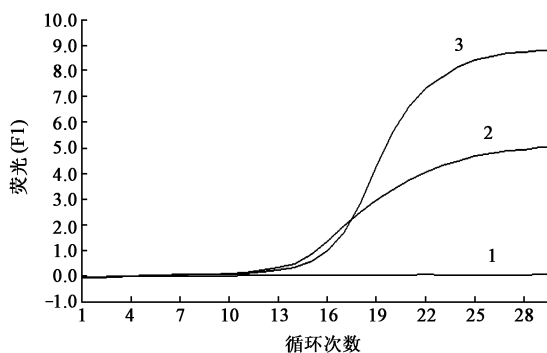
SYBR Premix Ex Taq<sup>T</sup> 10  $\mu$ l,10  $\mu$ mol/L 上游和下游引物各 0.5  $\mu$ l,模板 DNA 2  $\mu$ l,加灭菌双蒸水使总体积为 20  $\mu$ l。95 ,10 s,1 个循环;95 ,20 s,60 ,20 s,30 个循环。荧光信号收集结合溶解曲线 Ct 值的数值报告样品的结果。

## 2 结果

2.1 阪崎肠杆菌的菌落形态 VRBGA:紫色菌落周围有一圈紫色的胆汁酸沉淀环;X- - GcA:蓝绿色菌落;TSA:黄色菌落。

2.2 鉴定结果 首先进行革兰染色、氧化酶和触酶试验,如果革兰(-),氧化酶试验(-),触酶试验(+),再依据阪崎肠杆菌的典型生化反应鉴定。阪崎肠杆菌的生化反应有赖氨酸脱羧酶(-)、鸟氨酸脱羧酶(+)、精氨酸双水解(+)、KCN(+),实验,糖发酵试验有蔗糖(+),卫矛醇(-),戊五醇(-),棉子糖(+),D-山梨醇(-),D-阿拉伯糖(-),X-甲基-D-葡萄糖苷(+)。50 份样品中 2 份样品为阪崎肠杆菌阳性。

2.3 荧光 PCR 鉴定结果 荧光 PCR 鉴定结果与生化鉴定结果一致,见图 1、图 2。

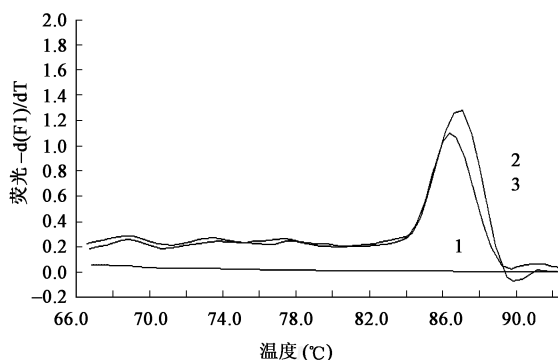


1. 水空白对照; 2,3 生化鉴定为阳性的样品

图 1 SYBR<sup>R</sup> Green I 实时 PCR 扩增阪崎肠杆菌的扩增曲线

## 3 结论

美国 2001 年 4 月,发现某医院新生儿重症监护



1. 水空白对照; 2,3 生化鉴定为阳性的样品

图 2 SYBR<sup>R</sup> Green I 实时 PCR 扩增阪崎肠杆菌的熔解曲线

室一早产儿发烧、心动过速、脑脊液培养发现阪崎肠杆菌,诊断为脑膜炎,用抗生素治疗无效,9 d 后死亡。扩大检查该院 49 名婴儿的粪便和尿液,发现 10 人为阪崎肠杆菌阳性,其原因是使用了某批 Portagen 的婴儿配方奶粉,而且在该批奶粉中也检查出了阪崎肠杆菌,结果导致 Portagen 婴儿配方奶粉于 2002 年 4 月被召回。1998 年在比利时 12 个婴儿因喂食同一牌号的婴儿配方粉,发生小肠结肠坏死,在这些婴儿和该批产品中同时分离出阪崎肠杆菌。从大多数病例看,孤崎肠杆菌的主要危害对象是身体状况较差的婴儿,感染引发脑膜炎、脓血症和小肠结肠坏死,虽然有抗生素的治疗,但总体死亡率在有些病例中高达 80%。目前科学家还不十分清楚阪崎肠杆菌的污染来源,但多数报告表明婴儿配方奶粉是目前发现的主要感染渠道。由于婴儿配方奶粉不是商业无菌的,尽管在加工过程中有加热处理,但未彻底灭菌,成品中仍含有一部分细菌。例如,专家从 35 个国家收集 141 种婴儿配方奶粉进行细菌检验,结果分离出 20 个阪崎肠杆菌,阳性占 14%,此外还有阴沟肠杆菌、聚团肠杆菌和肺炎克雷伯菌等。

本次检测结果表明,在我国市售的婴儿配方奶粉中存在少量的阪崎肠杆菌污染,阳性率在 4%,远低于其他国家,但仍然不可忽视其危害作用。因此专家建议最好能采用商业无菌的液态奶。

## 参考文献

- [1] Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from Dehydrated Powdered Infant Formula [Z]. U. S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2002.

[收稿日期:2006-10-20]