

论著

市售配方粉中阪崎肠杆菌检测方法的比较

裴晓燕 郭云昌 余东敏 刘秀梅

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:目的 比较和分析两种不同的阪崎肠杆菌定性检测方法的区别。方法 修改采用美国 FDA 和 ISO 阪崎肠杆菌检测方法,同时对 194 份市售配方粉进行定性检测。结果 经过选择性增菌和分离,第二法中待鉴定的阪崎肠杆菌疑似菌落只有 8 个,明显少于第一法,而且其特征性菌落易于辨认。运用两种方法分别检测到 4 个和 5 个阳性样品,其中第二法检出的 1 个阳性样品在第一法中未检出。结论 第二法中的选择性增菌液肉汤 mlST-Vm 和阪崎肠杆菌显色培养基的选择性明显优于第一法中相应的培养基,可以大大减少工作量,简单省时。

关键词:肠杆菌; 婴儿配方; 食品; 微生物技术

Comparison on Detection Methods for *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula Powder from Retail Markets

PEI Xiao-yan, GUO Yun-chang, YU Dong-min, LIU Xiur-mei

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To compare and analyze two different detection methods for *Enterobacter sakazakii* in infant formula powder. **Method** According to the detection methods of FDA and ISO for *Enterobacter sakazakii*, the pathogens from 194 formula powder sampled from the markets were isolated and identified. **Results** After selective enrichment and isolation, there

[7] DE MELO ABREU S, ALVES A, OLIVEIRA B, et al. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC - FLD with GC - MS methods [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 382(2) : 498-503.

[8] MIRZOIAN A, MABUD A. Comparison of methods for extraction of ethyl carbamate from alcoholic beverages in gas chromatography/mass spectrometry analysis [J]. J AOAC Int, 2006, 89(4) : 1048-1051.

[9] FAO, WHO JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME CODEX COMMITTEE ON CONTAMINANTS IN FOODS First Session [EB/OL]. [2007 - 04 - 20]. ftp://ftp.fao.org/codex/cccf1/cf01_06e.pdf.

[10] KIM Y K, KOH E, CHUNG H J, et al. Determination of ethyl carbamate in some fermented Korean foods and beverages [J]. Food Addit Contam, 2000, 17(6) : 469-475.

[11] U. S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition Emerging International Contaminant Issues: Development of Codex Alimentarius standards to address the issues. [EB/OL]. [2000 - 03 - 01]. <http://www.cfsan.fda.gov/~cjm/codexfa2.html>.

[12] 马冠生,孔灵芝. 中国居民营养与健康状况调查报告之九 2002 行为和生活方式[M] 人民卫生出版社, 2002:103-126.

[13] 周萍萍,赵云峰,张琪,等. 稳定性同位素稀释技术结合气相色谱 - 离子阱质谱法检测葡萄酒中的氨基甲酸乙酯[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(6) :492-495.

[14] BEN J C, FRA L J, COR B, et al. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce by gas chromatography with mass selective detection: collaborative study [J]. Food Composition And Additives, 1994, 77(6) :1530-1536.

[15] DENNIS M J, HOWARTH N, KEY P E, et al. Investigation of ethyl carbamate levels in some fermented foods and alcoholic beverages [J]. Food Addit Contam, 1989, 6(3) :383-389.

[16] World Health Organization Data and Statistics Global Information System on Alcohol and Health [EB/OL]. [2008 - 02 - 17]. <http://www.who.int/globalatlas/dataQuery/default.asp>.

[17] JECFA Sixty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives EVALUATION OF CERTAIN FOOD CONTAMINANTS [EB/OL]. [2005 - 02 - 17]. ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64_call.pdf.

[18] 夏艳秋,朱强,汪志君. 谨防黄酒中氨基甲酸乙酯的危害[J]. 酿酒, 2004, 31(3) :51-53.

[收稿日期:2008 - 03 - 31]

中图分类号:R15; TS262.6; O623.736 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2008)03 - 0208 - 03

基金项目:“十五”国家重大项目资助(2001BA804A36)

作者简介:裴晓燕 女 博士生

通讯作者:刘秀梅 女 研究员 博士生导师



were only eight presumptive isolates of *Enterobacter sakazakii* in the second method, which were significantly lower than the first method, and the characteristic colony on the DFI agar was much easier to identify. Four and five positive samples were detected by the first method and the second method, respectively. One sample was identified as positive by the second method but negative by the first method. **Conclusion** The selectivity of the mlST - Vm and *Enterobacter sakazakii* chromogenic media used in the second method was much better than those in the first method, and the second method was more simple, less laborious and time-consuming.

Key word: *Enterobacter sakazakii*; Infant Formula; Food; Microbiological Techniques

阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 是肠杆菌科肠杆菌属的一种,革兰染色阴性、周生鞭毛、无芽孢。阪崎肠杆菌曾经一直被称为产黄色素阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*),直到 1980 年才更名为阪崎肠杆菌。该菌广泛分布于食品和环境,是一种条件致病菌。1961 年 Urmenyi 和 Franklin 首次报道了两例阪崎肠杆菌导致的新生儿脑膜炎病例^[1]。自 1961 年起,在世界各地报道了一系列新生儿阪崎肠杆菌感染的散发和暴发事件。虽然尚不能确定阪崎肠杆菌的宿主,但大量的研究发现配方粉是婴幼儿感染的主要途径。婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌的食品安全问题成为近几年 FAO/WHO 关注的新焦点^[1,2]。

传统的阪崎肠杆菌检测方法都是针对阪崎肠杆菌特有的生化特征,尤其是黄色素的产生和 - 葡萄糖苷酶活性等生物学性状进行鉴定,包括前增菌、选择性增菌、选择性分离培养、生化鉴定 4 个步骤。研究初期,阪崎肠杆菌的检测方法都是在国际标准化组织 (International Organization for Standardization, ISO) 肠杆菌科细菌标准检测方法的基础上建立起来的,在这方面具有代表性的是美国 FDA 于 2002 年颁布的“婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌的分离和计数”^[3,4]。然而,该方法的选择性只是针对肠杆菌科细菌,而不是阪崎肠杆菌,这就使方法本身的灵敏度、特异性和适用性得到质疑。随着近几年来对阪崎肠杆菌研究的不断发展,针对该菌的生长和生化特征建立了阪崎肠杆菌特异性检测方法,如 2006 年 ISO 颁布的“乳和乳制品中阪崎肠杆菌的检测”^[5]。在研究中,我们分别以 FDA 方法和 ISO 方法为基础,通过大量的实验研究建立了配方粉中阪崎肠杆菌的 FDA 定性检测方法(第一法)和 ISO 定性检测方法(第二法)。为了进一步对上述两种定性方法进行比较和分析,2005 年我们同时采用两种方法对收集到的 194 份样品进行了检测。

1 材料和方法

1.1 样品来源 2005 年从 10 个省(市)的零售或批发市场采集的 194 份配方粉。

1.2 培养基和试剂 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (lauryl sulfate tryptose broth, LST broth)、肠道杆菌增菌

肉汤 (*Enterobacteriaceae* enrichment broth, EE broth)、结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (Violet Red Bile Glucose Agar, VRBGA)、胰蛋白酶大豆琼脂 (Trypticase Soy Agar, TSA)、氧化酶试纸条和万古霉素 (vancomycin, Vm) 均购自北京陆桥技术有限公司。

阪崎肠杆菌显色培养基 (Druggan Forsythe-Iversen agar, DFI 琼脂) 购自英国 Oxoid 公司。

改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 - 万古霉素 (Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium, mlST - Vm) 的制备 (1) mlST 的制备: 每 1 000 ml 的蒸馏水中加入 35.6 g/L ST 和 29 g 氯化钠,加热搅拌至溶解,调节 pH 为 6.8 ± 0.2。每管分装 10 ml, 121 高压灭菌 15 min。(2) 万古霉素溶液的配制: 10.0 mg 万古霉素溶解于 10.0 ml 蒸馏水,滤过除菌。(3) 完全培养基 mlST - Vm 的制备: 每 10 毫升 mlST 加入万古霉素溶液 0.1 ml, 混合液中万古霉素的终浓度为 10 μg/ml。

API 20E 生化鉴定试剂盒和 VITEK GNI + 快速革兰阴性鉴定卡,均购自法国生物梅里埃公司 (bioMérieux)。

1.3 主要仪器 VITEK 32 微生物自动鉴定仪 (bioMérieux, 法国)。

1.4 样品检测 根据美国 FDA 阪崎肠杆菌检测方法,参考 1988 年 Muytjens 等肠杆菌检测方法建立市售配方粉中阪崎肠杆菌的定性检测方法^[3,6,7],即第一法。每份试样无菌取出 40 g,放入已预热至 45 的装有 360 ml 无菌水的三角烧瓶中 (1:10 稀释),用手轻轻摇动使其充分溶解,36 孵育过夜,进行前增菌。分别移取以上混合液 10 ml 转种到装有 90 ml 无菌 EE 肉汤的三角烧瓶中,36 孵育过夜。充分混合每个瓶中的增菌培养液,用直径 3 mm 的接种环蘸取 EE 增菌液划线接种 2 个 VRBGA 平板,每个平板分 3 区,36 培养 24 ± 2 h。过夜培养后,挑取 VRBGA 平板上的粉紫色疑似菌落,分别划线接种 TSA 平板,25 培养 48 ~ 72 h,挑取黄色菌落同时进行 API 20E 和 VITEK GNI + 生化鉴定。

根据 2004 年 ISO 颁布的“乳和乳制品中阪崎肠杆菌的检测”方法,参考 Iversen 和 Manafi 等的研究方法建立配方粉中阪崎肠杆菌定性检测方法^[5,8,9],

即第二法。从同一过夜培养的前增菌液中,移取1 ml转种于10 ml mlST - Vm肉汤,45 ±0.5 培养24 h ±2 h。轻轻混匀过夜培养的mlST - Vm肉汤,用直径3 mm的接种环蘸取增菌肉汤,分别划线接种于2个DFI平板,36 培养24h ±2 h。挑取蓝绿色可疑菌落,划线接种于TSA平板。25 培养48 ~ 72 h,挑取黄色菌落同时进行API 20E和VITEK GNI +生化鉴定。

2 结果和讨论

共采集194份样品,第一法检出4个阳性样本,第二法检出5个,其中4个在第一法的检测中均为阳性,另一阳性检出样品在第一法中的检测结果为阴性。两种方法同时检出的4个阳性样品的阪崎肠杆菌分离株API 20E和VITEK GNI +生化特征相同。5株阪崎肠杆菌分离株分别编号为ES 1 ~ ES 5。

ES 3为第一法未分离到的一株阪崎肠杆菌。同时使用两种方法对该样品进行检测时,从VRBGA和DFI平板上分别分离到2种不同的菌落。VRBGA平板上的2种菌落较为相似,分别挑取典型菌落接种TSA平板,培养48 ~ 72 h后,均呈现白色菌落,经生化鉴定均为肺炎克雷伯菌肺炎亚种(*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*)。DFI平板上的2种菌落分别呈白色和蓝绿色,经TSA培养后分别为白色和黄色菌落,生化鉴定结果分别为肺炎克雷伯菌肺炎亚种和阪崎肠杆菌。

2.1 选择性增菌肉汤的比较 第一法选择EE肉汤作为选择性增菌肉汤,该肉汤适合所有肠道菌群的生长繁殖,这就可能对阪崎肠杆菌的生长产生竞争性抑制作用,降低检出率。第二法选用Nestle方法^[10]和ISO 2004^[5]方法推荐的“mlST - Vm”作为阪崎肠杆菌选择性增菌肉汤,即在大肠菌群增菌肉汤LST中另加入氯化钠和万古霉素。研究证明与其他肠杆菌科细菌相比,如沙门菌属(*Salmonella* spp.)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)和弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*),阪崎肠杆菌具有较高的耐渗透压能力。加入0.5 mol/L的氯化钠在保证阪崎肠杆菌良好生长的同时,可以有效地抑制上述其他细菌的生长。在LST+0.5 mol/L氯化钠中加入Vm可以有效地抑制革兰阳性菌的生长^[10]。多项研究证明阪崎肠杆菌在46 或47 也能良好地生长,而较高的生长温度可以进一步抑制其他细菌的生长,因此选用45 作为阪崎肠杆菌选择性增菌的培养温度^[10]。

2.2 选择性分离平板的比较 美国FDA方法使用VRBGA,ISO方法使用法国AES实验室生产的阪崎

肠杆菌分离琼脂(*Enterobacter Sakazakii* Isolation Agar, ESIA)作为选择性分离平板。考虑到国内市场培养基的供应情况和文献报道^[1,8,11],在第二法中我们选用英国Oxoid公司生产的商用阪崎肠杆菌显色培养基DFI琼脂。上述两种显色培养基ESIA和DFI对阪崎肠杆菌的选择性分离均具有良好的敏感性和特异性,其基本原理相似,二者都是根据阪崎肠杆菌能产生 - 葡萄糖苷酶,分解底物5 - 溴 - 4 - 氯 - 3 - 吲哚 - - d - 吡喃葡萄糖甙(5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - - d - glucopyranoside, XaGc)产生有色菌落^[9]。

VRBGA平板对阪崎肠杆菌的选择性较差,阪崎肠杆菌、阴沟肠杆菌和泛菌属(*Pantoea* spp.)的某些菌种可以在该平板上生长并产生粉紫色菌落,胆汁酸沉淀形成紫色晕圈,阪崎肠杆菌无特征性菌落,不易与其他微生物相区别^[4]。在本研究中,只有5个检样的分离株在VRBGA平板上表现为“粉紫色、圆形、光滑、凸起、饱满”阪崎肠杆菌典型菌落^[7],其中有3个被证明是阪崎肠杆菌,被第一法证明为阳性的其他2株菌均为非典型菌落。表1中列举了194份检样在VRBGA平板上的菌落特征和样品数量,由于阪崎肠杆菌在VRBGA平板上的非典型菌落极难确定,为了避免降低检出率,一般从VRBGA平板上选择用于接种TSA的疑似菌落就相对较多,在本研究中,17个检样中的可疑分离株能在TSA平板上产生黄色菌落,通过对其进行API 20E生化鉴定,发现除VRBGA分离到的5株典型菌落外,其他12株需进行生化鉴定菌种中只有1株是阪崎肠杆菌,其中7株都为泛菌属细菌,占非特异性鉴定的58.33%(7/12)。

表1 VRBGA平板上分离株的菌落特征和样品数量

菌落特征	样品数量
无任何菌落生长	14
直径 < 1 mm 的菌落	137
两种菌落	6
典型菌落	5
一种非典型菌落	32
合计	194

显色培养基DFI对阪崎肠杆菌的选择性较好,阪崎肠杆菌形成的蓝绿色特征性菌落易于辨认,而且,硫化氢指示剂(硫代硫酸钠和柠檬酸铁铵)可以区分阪崎肠杆菌和产生少量 - 葡萄糖苷酶但硫化氢阳性菌株,如普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)。研究证明所有阪崎肠杆菌都可以在DFI平板上生长并产生蓝绿色菌落,只有伤口埃希菌(*Escherichia*

vulneris)、泛菌属(*pantoea spp.*)和柯氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter koseri*)肠杆菌属中的少量菌种能够在DFI琼脂上产生类似菌落。而婴儿配方粉中常见的肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、大肠埃希菌、泛菌属的多种菌一般都产生白色菌落,赫氏埃希菌(*Escherichia hermannii*)产生黄色菌落,还有少量菌种可在DFI平板上产生黑褐色、粉色或只有中心蓝绿色的菌落^[8]。本研究在DFI平板上生长蓝绿色典型菌落,其中5个被证明是阳性菌株。表2中列举了194份检样在DFI平板上的菌落特征和样品数量。

表2 DFI平板上分离株的菌落特征和样品数量

菌落特征	样品数量
无任何菌落生长	163
一种蓝绿色菌落	5
一种白色菌落	22
白色菌落和蓝绿色菌落各一种	3
一种白色菌落但略显淡绿	1
合计	194

与第二法相比,第一法所使用的各种培养基更为常见、价格便宜,更易普及。然而由于EE肉汤的竞争性抑制作用,极难确定阪崎肠杆菌在VRBGA平板上的非典型菌落,且多种产生黄色素沉着的肠杆菌科菌株均能在TSA平板上生长,如:泛菌属某些种、赫氏埃希菌,伤口埃希菌。为了避免降低检出率,一般从VRBGA平板上选择用于接种TSA和生化鉴定的疑似菌落就相对较多一点,这样就增加了生化鉴定的消耗和任务量,但即便如此,仍不能避免漏检。第二法中选择性增菌液mIST-Vm和选择性分离培养基DFI的选择性明显好于第一法的选择性,因此可以大大减少工作量,简单省时,准确可靠,

并且明显减少的生化鉴定可以显著减少试剂的损耗和降低实验成本。

参考文献

- [1] 刘秀梅. 婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌 - 食品安全控制的新目标[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(5): 385-388.
- [2] 裴晓燕, 刘秀梅. 阪崎肠杆菌的生物学性状与健康危害[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(6): 550-555.
- [3] US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula [S], July 2002; Revised August 2002.
- [4] 裴晓燕, 刘秀梅. 阪崎肠杆菌检测方法的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2006, 33(6): 380-385.
- [5] ISO. Milk and milk products-detection of *Enterobacter sakazakii* [S]. Technical Specification, ISO/PDTS TS\ RM, 2004 - 07 - 20.
- [6] MUYIJENS H L, ROELOFS-WILLEMSE H, JASPAR G H. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae [J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(4): 743-746.
- [7] 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, 2004, 17(1): 10-12.
- [8] IVERSEN C, DRUGGAN P, FORSYTHE S. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 96: 133-139.
- [9] MANAFI M, LANG K. Comparison of three chromogenic media for detection of *Enterobacter sakazakii*; a preliminary study [DB/OL]. <http://www.univie.ac.at/hygiene-aktuell/asm2005.pdf>.
- [10] GUILLAUME GENTIL O, SONNARD V, KANDHAI M C, et al. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples [J]. J Food Prot, 2005, 68(1): 64-69.
- [11] Netherlands Controlling Authority for Milk and Milk Products. A comparative study of methods for the detection of *Enterobacter sakazakii* [R]. Netherlands, 2004.

[收稿日期: 2007 - 12 - 10]

中图分类号: R15; TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 8456(2008)03 - 0210 - 04

消息(三)

人们长期受到有害菌的影响, 机体组织会发生变化, 其结果就是导致慢性病的发生。年轻时没有治愈的传染病可以在成年时发展成大病, 这时治疗就为时已晚。许多发达国家非常注意临床诊断研究, 科学家们借助于他可以准确地确定许多有害菌。同时, 这些早期诊断能够帮助医生对这些问题做出快速反应, 并预防严重疾病。