

论著

广西省售婴儿食品中克罗诺菌分离株基因特征及进化分类鉴定

王红,黄彦,周艳,韦程媛,李秀桂,谭冬梅,诸葛石养,孙贵娟

(广西壮族自治区疾病预防控制中心,广西南宁 530028)

摘要:目的 分析广西省售婴儿食品中的克罗诺菌分离株的种类、表型和基因特性。方法 将保存的试验菌株进行复苏,通过 API 20E 生化条和 *ompA* 基因扩增检测进行初步鉴定,扩增 16S rRNA 基因后进行测序,将获得的全 16S rRNA 基因序列在 GeneBank 数据库上比对,构建进化树,确认是否为克罗诺菌。将试验菌接种于显色平板观察其表型和黄色素的产生情况,通过手工生化进行分型,确定其种属。结果 9 株分离菌确定为克罗诺菌,有 5 种生化型,属于 4 个克罗诺种。检出 *Cronobacter sakazakii* 6 株菌,*C. malonaticus*、*C. muytjensii* 和 *C. dublinensis* 各有 1 株; 7 株菌符合 API 20E 鉴定结果,9 株分离菌均可检测到 *ompA* 基因。结论 广西省售婴儿食品中克罗诺菌的污染以 *C. sakazakii* 为主,生化表型、种属及基因型具有多样性;鉴定时仅以单一的生化或其他表型作为判别依据存在很大的局限,需辅以分子生物学手段加以鉴别。

关键词: 克罗诺杆菌; 鉴定; 16S rRNA; 表型; 生化型; 种属; 食源性致病菌

中图分类号: R155; Q9-33 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)01-0006-05

DOI: 10. 13590/j. cjfh. 2016. 01. 002

Identification, classification, phenotypic and genetic characterization of *Cronobacter* spp. isolated from infant food

WANG Hong, HUANG Yan, ZHOU Yan, WEI Cheng-yuan, LI Xiu-gui, TAN Dong-mei,
ZHUGE Shi-yang, SUN Gui-juan

(Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention,
Guangxi Nanning 530028, China)

Abstract: Objective To investigate the subspecies, phenotypic and genetic characterization of *Cronobacter* isolates from infant food in 2010. **Methods** All isolates were reactivated, then suspectable stains were identified preliminarily by two methods, PCR amplifying *ompA* gene and API 20E. To confirm these stains, full 16S rRNA gene sequences were obtained, and made BLASTN on GeneBank database. The identified strains were streaked onto DFI chromogenic agar and TSA to observe phenotype and yellow pigment production. Biochemical tests were conducted and assigned to biogroups to determine their species. **Results** Nine strains were identified as *Cronobacter* spp. These strains were assigned to 5 biogroups, and belonged to 4 species. The majority of strains were *Cronobacter sakazakii*, and three strains was identified as *C. malonaticus*, *C. muytjensii* and *C. dublinensis* respectively. 7 strains were identified as *Cronobacter* by API 20E, yet *ompA* gene amplification of all strains was positive. **Conclusion** *Cronobacter* isolated from infant food were diversified in biochemical phenotype and species. There was a risk of *Cronobacter* in infant food from supermarkets. There was limitation to identify the bacteria only by biochemical phenotype, and supplementary molecular biology methods was necessary.

Key words: *Cronobacter*; identification; 16S rRNA; phenotype; biogroup; species; foodborne pathogenic bacteria

克罗诺菌(*Cronobacter*)是有动力、兼性厌氧的革兰阴性条件致病菌,该菌在各种年龄段的人群中

均有引起感染的报道^[1-2]。早产儿或低体重新生儿尤要注意该菌的感染问题,因为感染该菌可能引起新生儿脑膜炎、坏死性小肠结肠炎和败血症,并可能留下神经系统后遗症;据文献报道,早产儿感染克罗诺菌的死亡率达 25%~80%^[3-5]。为了降低新生儿感染的风险,世界卫生组织已对该菌执行三级风险评估,要求在婴儿配方奶粉中不得检出该菌属。

早期的时候,克罗诺菌曾被认为是一种产黄色素的阴沟肠杆菌。1980年,Famer等^[6]将该菌从阴

收稿日期:2015-09-09

基金项目:广西自然科学基金(2012GXNSFBA053125);广西科学研究与技术开发计划(桂科攻 1298004-3)

作者简介:王红 女 副主任技师 研究方向为微生物检验及分子生物学 E-mail:gxcdew@126.com

通信作者:黄彦 男 副主任技师 研究方向为微生物检验及分子生物学 E-mail:huangyangx@163.com

沟肠杆菌分离出来,归为肠杆菌属下的一个种,即阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*),根据11种生化表现划分为15个生化型。近5年来,阪崎肠杆菌的系统分类做了重新划分,将原来的阪崎肠杆菌定义为一个新的属,即克罗诺菌属(*Cronobacter* spp.),在此菌属下包括有6个种,分别为:*C. sakazakii*、*C. malonaticus*、*C. turicensis*、*C. muytjensii*、*C. dublinensis*和*C. genomospecies 1*,并确定了各种属所对应的生化型^[7-9]。2012年,有研究者通过MLST构建进化树发现一个新的种(*C. condimentii*),同时建议将*C. genomospecies 1*更名为*C. universali*^[10-11],至此,克罗诺菌属包括了7个种^[12]。

2010年,本课题组对从市售的婴儿食品中(包括婴儿配方奶粉)收集到的9株可疑克罗诺菌通过API 20E和扩增*ompA*基因进行属的鉴定,基于*fusA*基因的测定进行种的鉴定^[13],同时辅以16S rRNA基因测序,构建进化树,并进行手工生化试验,了解来源于婴儿食品的克罗诺菌主要的表型、基因特征、种属的分布和系统进化关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

试验菌株共11株菌,标准株*C. muytjensii*(ATCC 51329)为中国疾病预防控制中心馈赠,其余10株菌均为超市所购买的婴儿米粉或婴儿配方奶粉分离所得,包括9株可疑克罗诺菌和1株非脱梭勒克菌(*Leclercia adecarboxylata*)。

1.1.2 主要试剂与仪器

用PCR方法检测试验菌*ompA*基因的引物为ESS-F:5'-GGATTTAACCGTGAACCTTTTCC-3'和ESS-R:5'-CGCCAGCGATGTTAGAAGA-3'^[15]。DNA模板提取按天根提取试剂盒的说明进行;PCR反应体系(50 μl):4.0 μl模板(4~10 ng/μl)、1.0 μl引物ESS-F(10 μmol/L)、1.0 μl引物ESS-R(10 μmol/L)、5.0 μl 10×PCR缓冲液(含15 mmol/L MgCl₂)、1.0 μl dNTP Mix溶液(每种10 mmol/L)、0.3 μl DNA聚合酶(5 U)和37.7 μl去离子水。反应条件为:94℃预变性2 min;94℃变性15 s,60℃退火15 s,72℃延伸30 s,循环30次;最后72℃延伸5 min。PCR片段大小为469 bp,产物用1.5%琼脂糖进行电泳,电泳条件为1×TAE电泳缓冲液,电压40 V/cm,电泳时间2 h,凝胶成像系统观察结果。

1.2 方法

1.2.1 表型和生化鉴定

所有试验用菌株经BHI复苏后接种于DFI、TSA

和营养琼脂平板。DFI平板在36℃培养24 h后观察是否生成蓝绿色菌落;TSA平板在25℃培养72 h后观察是否产生黄色色素^[14]。从营养琼脂平板上挑取菌落按API 20E商品说明书进行生化鉴定。补充生化试验按照文献[6,9]进行,检测的生化反应有:乙酰甲基甲醇试验,甲基红、硝酸盐还原、动力、吲哚、肌醇产酸,卫矛醇产酸,丙二酸盐利用,葡萄糖产气,鸟氨酸脱羧和甲基-α-D-葡萄糖苷产酸。

1.2.2 PCR鉴定

用PCR方法检测试验菌*ompA*基因的引物为ESS-F:5'-GGATTTAACCGTGAACCTTTTCC-3'和ESS-R:5'-CGCCAGCGATGTTAGAAGA-3'^[15]。DNA模板提取按天根提取试剂盒的说明进行;PCR反应体系(50 μl):4.0 μl模板(4~10 ng/μl)、10 μmol/L上下游引物各1.0 μl、5.0 μl 10×PCR缓冲液(含15 mmol/L MgCl₂)、1.0 μl dNTP Mix溶液(每种10 mmol/L)、0.3 μl DNA聚合酶(5 U)和37.7 μl去离子水。反应条件为:94℃预变性2 min;94℃变性15 s,60℃退火15 s,72℃延伸30 s条件下循环30次;最后72℃延伸5 min。PCR片段大小为469 bp,产物用1.5%琼脂糖进行电泳,电泳条件为1×TAE电泳缓冲液,电压40 V/cm,电泳2 h,凝胶成像系统观察结果。

1.2.3 16S rRNA基因的测序

核糖体16S rRNA基因用引物P0和P6进行扩增^[16]。P0:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',P6:5'-GTACGGCTACCTTGTTACGA-3'。反应条件为:95℃预变性3 min,95℃变性30 s,54℃退火30 s,72℃延伸2 min,循环30次;最后72℃延伸5 min。扩增反应体系(50 μl):10 μl Q solution、4.0 μl模板(5~10 ng/μl)、2.0 μl P0引物(10 μmol/L)、2.0 μl P6引物(10 μmol/L)、5.0 μl 10×PCR buffer(含15 mmol/L MgCl₂)、1.0 μl dNTP Mix溶液(每种10 mmol/L)、0.25 μl *Taq*聚合酶(5 U)和25.75 μl去离子水。PCR产物用1%琼脂糖电泳(电泳条件同1.2.2),在紫外光下切胶回收,送Invitrogen(上海)贸易有限公司双向测序,拼接。

1.2.4 16S rRNA基因序列的投递和进化树构建

所有克罗诺菌株序列均提交GeneBank数据库。通过应用美国国立生物技术信息中心网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)的同源分析功能,将所有菌株全16S rRNA基因序列在核酸数据库进行比对,确定为克罗诺菌属。9株试验菌株的进化树构建是通过把试验菌株的16S rRNA基因序列与从GeneBank数据库下载的7株标准菌[*C. sakazakii* (ATCC 29544)、*C. malonaticus* (CDC1058-77)、*C. turicensis* (NCTC 9529)、

C. uricensis (z3032)、*C. muytjensii* (ATCC 51329)、*C. dublinensis* (LMG 23825) 和 *C. dublinensis* (LMG 23823)]16S rRNA 基因序列运用 Bionumeric 软件 6.0 版通过比邻连接法构建。

2 结果

经天根提取试剂盒提取后,获得 11 株菌的基因组 DNA,PCR 扩增 *ompA* 基因后,凝胶成像系统观察结果,9 株可疑克罗诺菌分离株和标准株 (ATCC 53129) 为阳性,WJC10 为阴性。以抽提的 DNA 为模板扩增 16S rRNA 基因,结果均出现特异性条带。扩增产物经胶回收后进行测序,获得的序列投递于 GeneBank 数据库, GeneBank 注册号: WJC01 (KC818138), WJC02 (KC818139), WJC03 (KC818140), WJC04 (KC818141), WJC05 (KC818142), WJC06 (KC818143), WJC07 (KC818144), WJC08 (KC818145) 和 WJC09 (KC818146)。将 9 株可疑克罗诺菌的 16S rRNA 基因序列与标准株比对,确定为克罗诺菌。

9 株确定的克罗诺菌和两株对照菌分别接种 DFI 和 TSA 琼脂平板。培养后,DFI 琼脂平板上,除菌株 WJC06 菌落呈不典型浅蓝色外,其余 10 株菌(包括非克罗诺菌 WJC10)均呈现典型的蓝绿色菌落。在 TSA 琼脂平板上,同样也是菌株 WJC06 不符合典型的菌落特征呈现奶白色外,其余 10 株试验菌均产生黄色

色素。在用 API 20E 生化鉴定条对 9 株可疑菌鉴定时,有 7 株菌获得理想鉴定结果,但 WJC06、WJC07 这 2 株菌鉴定率仅为 51.30%,结果见表 1。

表 1 分离株鉴定结果

Table 1 Isolation strains identification results

菌株编号	DFI 菌落显色	TSA 平板结果	API 20E 鉴定条 <i>E. sakazakii</i> 鉴定率/%	<i>ompA</i> PCR 鉴定	16S rDNA 鉴定
WJC01	蓝绿	+	99.90	+	克罗诺菌
WJC02	蓝绿	+	98.40	+	克罗诺菌
WJC03	蓝绿	+	99.90	+	克罗诺菌
WJC04	蓝绿	+	98.40	+	克罗诺菌
WJC05	蓝绿	+	98.50	+	克罗诺菌
WJC06	浅蓝	-	51.30	+	克罗诺菌
WJC07	蓝绿	+	51.30	+	克罗诺菌
WJC08	蓝绿	+	99.90	+	克罗诺菌
WJC09	蓝绿	+	98.40	+	克罗诺菌
WJC10	蓝绿	+	非脱梭勒克菌	-	非脱梭勒克菌

注:在 TSA 平板鉴定结果中,+表示产黄色色素,-表示不产黄色色素;*ompA* PCR 鉴定结果中,+表示 PCR 阳性,-表示 PCR 阴性

9 株克罗诺菌分属于生化型 1,2,5,10 和 15a。生化型 2 为主要型别,包括 4 株菌;生化型 1 包括 2 株菌;其他 3 个生化型分别包括 1 株菌。由克罗诺菌系统分类学上种属所对应的生化型进行划分^[8],9 株克罗诺菌分属于 4 个种 (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii* 和 *C. dublinensis*)。婴儿食品中分离到的克罗诺菌大多数为 *C. sakazakii*,占 66.7% (6/9),其他 3 个种各包括 1 株,见表 2、3。

表 2 生化分型

Table 2 Strains to the biogroups originally defined

菌株编号	生化型	VP	MR	NIT	ORN	MOT	INO	DUL	IND	MALO	GAS	AMG
ATCC 51329	15	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
WJC01	15a*	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
WJC02	1	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
WJC03	10	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
WJC04	1	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
WJC05	2	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
WJC06	2	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
WJC07	2	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
WJC08	5	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
WJC09	2	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+

注:*为新发现生化亚型;VP为Voges-Proskauer;MR为甲基红;NIT为硝酸盐还原;ORN为鸟氨酸利用;MOT为37℃下的运动;INO为肌醇产酸;DUL为卫矛醇产酸;IND为吡啉生成;MALO为丙二酸盐利用;GAS为葡萄糖产气;AMG为甲基-α-D-葡萄糖苷产酸

表 3 分离株生化型与种属关系

Table 3 Biogroups and species classification of isolates

种属	生化型	菌株
<i>C. sakazakii</i>	1,2	WJC02、WJC04、WJC05、WJC06、WJC07、WJC09
<i>C. malonaticus</i>	5	WJC08
<i>C. dublinensis</i>	10	WJC03
<i>C. muytjensii</i>	15a*	WJC01

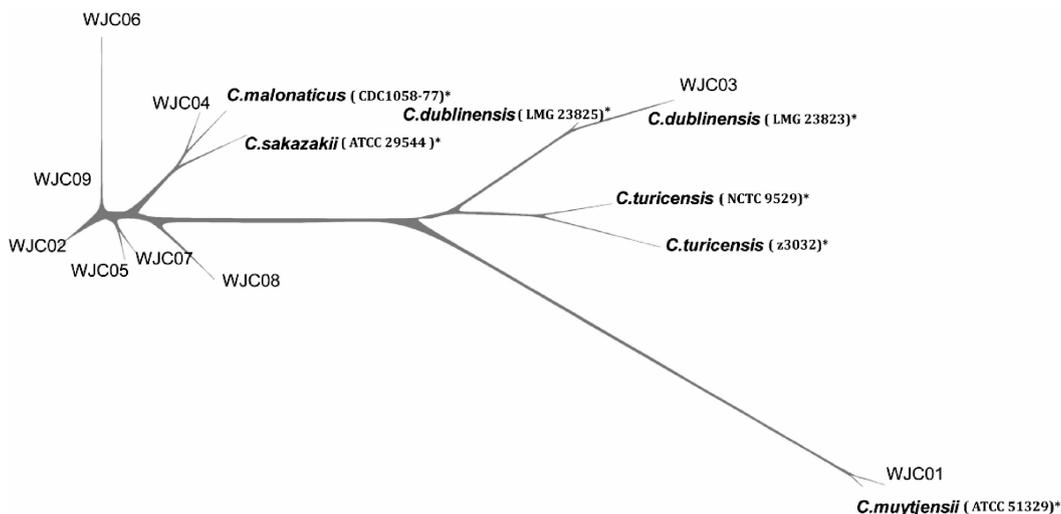
注:*为新发现生化亚型

9 株分离株和 7 株标准菌株分成 4 个大的分支,标准株 *C. sakazakii*、*C. malonaticu* 和 WJC02,

WJC04、WJC05、WJC06、WJC07、WJC09、WJC08 聚在 1 个大的分支里;标准株 *C. muytjensii* 和 WJC01 构成另一分支;*C. dublinensis* 和分离株 WJC03 聚为 1 支;两株 *C. turicensis* 标准株单独构成 1 大分支,见图 1。

3 讨论

克罗诺菌曾被认为是产黄色色素的阴沟肠杆菌,因此,产黄色色素一直作为判定克罗诺菌的最重要指标,国内一度认为不产色素就不能认定为克



注:9株试验菌株与标准菌株基于16S rRNA基因序列进化树;运用Bionumeric软件6.0版比邻连接法;*表示GeneBank数据库下载标准株序列

图1 16S rRNA基因序列进化树

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene

罗诺菌。本试验中菌株WJC06在TSA平板上不产黄色色素而呈乳白色菌落,该菌株用API 20E方法鉴定为阪崎的鉴定率仅为51.30%,但经ompA基因扩增确定,补充生化反应,16S rRNA基因序列比对及fusA位点检测均表明该菌为克罗诺菌。而WJC10在DFI平板呈克罗诺菌的典型蓝绿色菌落,而且在TSA平板也产黄色色素,但最终确定为非脱梭梭克菌。因此,在分离鉴定克罗诺菌时,产黄色色素的指标不能作为判定菌株是否为克罗诺菌的前提标准,否则会出现漏检的情况。Ivesen等^[14]的研究也说明这点,他们观察了210株克罗诺菌产黄色色素的情况,结果就有17株(8%)克罗诺菌不产黄色色素。

本研究组采用API 20E生化鉴定条来鉴定克罗诺菌,结果WJC06和WJC07鉴定为阪崎肠杆菌的鉴定率仅51.30%,导致这两株菌被判定为非克罗诺菌,也就是说API 20E生化鉴定条鉴定克罗诺菌的符合率仅77.8%,这数据和Ivesen等^[14]研究相似,结果显示,只有70%的克罗诺菌能够被API 20E准确鉴定,同时还发现API 20E鉴定出现了假阳性,有些非克罗诺菌的肠杆菌科菌株被鉴定为阪崎肠杆菌。Jaradat等^[13]用API 20E作为初筛的方法分离到了44株可疑克罗诺菌,在最终的鉴定中,13株不是克罗诺菌,假阳性率高达29.5%。鉴于这种情况,API 20E生化鉴定条最好只作为初筛克罗诺菌的依据^[15-17]。除用API 20E鉴定外,本研究还用PCR方法检测了所有试验菌的ompA基因,该基因被报道存在于克罗诺菌中,编码外膜蛋白A,被认为是保守的基因,而在其他肠道菌中检测不出来^[15]。本研究结果显示,所有菌株ompA基因检测均为阳性,符合率为100%。Jaradat等^[13]在比较了不同文献报道的8对检测克罗诺菌的

引物后发现,检测ompA基因的引物是可靠的方法之一。但是PCR方法并不能保证100%符合率,也有假阴性出现。

在分类学研究方面,Iversen等^[14]根据16S rRNA基因序列、核糖体分型、扩增片段长度多态性(f-AFLP)和DNA-DNA杂交试验对阪崎肠杆菌重新进行系统学分类,建议从肠杆菌属分出来,单独成为一个新的属,把原来的15个生化型扩展为16个型,并根据丙二酸盐还原或动力等生化表现的差别,进一步分出了14个亚型。研究还将克罗诺菌属的5个种与生化型建立对应关系,C. sakazakii包括的生化型有:1、2-4、7、8、11和13,C. malonaticus包括的生化型有:5、9和14,C. turicensis包括的生化型为16,C. muytjensii包括的生化型为15,C. dublinensis包括的生化型有:6、10和12^[7-9]。本研究中,超市零售婴儿食品样品中分离到的克罗诺菌主要生化型为1型和2型,主要是C. Sakazakii,与国外分离情况相似。而就这9株克罗诺菌,就包含4个种,可以推测污染婴儿食品的克罗诺菌存在多样性,提示要加强婴儿食品中克罗诺菌检测力度。16S rRNA基因序列的分析曾经在克罗诺菌新属的认定和命名发挥了巨大的作用,但是,最近的研究发现,用16S rRNA基因序列进行种属鉴定和分类有局限性,其无法区分C. sakazakii和C. malonaticus,在鉴定过程中容易与其他杆菌科发生误判^[18]。本文也存在这问题,WJC08和其他的C. sakazakii在进化树有更近的距离,但经生化分类,WJC08为C. malonaticus。最近的多位点序列分型(MLST)研究提示,可以通过基于fusA管家基因的进化树很好的将C. sakazakii和C. malonaticus区分^[10],但是该方法的运行也有

局限性,就是必须进行 *fusA* 基因的扩增和测序,然后与数据库的等位基因比对构建进化树,整个过程较为繁琐,可操作性有限。因此,作为一个较新的菌属,克罗诺菌的鉴定和分类仍处于一个发展的阶段,一个相对简单便于操作的方法仍需进一步的研究。

在生化分型中,值得注意的是菌株 WJC01,该菌的生化型与之前所报道的 16 种生化型及 14 种生化亚型均不能完全匹配,其生化型与生化型 15 最为相近,然而以前的文献所报告的生化型 15 的动力为阳性,但 WJC01 却为阴性。本研究组将 WJC01 的 16S rRNA 基因序列与 GeneBank 数据库公布的 6 个克罗诺菌种的标准菌株构建进化树发现(数据未列出),其与 *C. muytjensii* (ATCC 51329) 遗传距离最近,聚为一簇,说明 WJC01 为 *C. muytjensii*,而 *C. muytjensii* 对应的生化型正好为生化型 15,很可能 WJC01 在食品加工过程或是储存过程中发生了动力缺失,这是一个以前鲜见报道的新的生化型,为了与原来的生化型 15 区分,本研究组命名为生化亚型 15a。

综上所述,超市里销售的婴儿食品(包括婴儿配方奶粉)存在克罗诺菌的污染情况,婴儿食品安全值得关注。在这些婴儿食品样品中分离到的克罗诺菌无论是平板显色或是表型特征,还是各种生化指标、基因特征等,均表现为多样性。作为较新的一个种属,对该菌的认识并不全面,鉴定时不能仅靠表型或生化,还要结合分子生物学技术作为补充。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Nazarowec-White M, Farber J M. *Enterobacter sakazakii*: a review [J]. *Int J Food Microbiol*, 1997, 34 (2) : 103-113.
- [3] FAO/WHO. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae [C] // Microbiological risk assessment series No. 15, Geneva: WHO, 2008. http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_followup/en/.
- [4] Corti G, Panunzi I, Losco M, et al. Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man [J]. *J Chemother*, 2007, 19 (1) : 94-96.
- [5] Forsythe S J. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula [J]. *Matern Child Nutr*, 2005, 1 (1) : 44-50.
- [6] Farmer J J, Asbury M A, Hickman F W, et al. *Enterobacter sakazakii*: a new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens [J]. *Soc General Microbiol*, 1980, 30 (3) : 569-584.
- [7] Iversen C, Waddington M, Farmer J J, et al. The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes [J]. *BMC Microbiol*, 2006, 6 (1) : 94.
- [8] 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., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58 (6) : 1442-1447.
- [9] Iversen C, Lehner A, Mullane N, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1 [J]. *BMC Evol Biol*, 2007, 7 (1) : 64.
- [10] Joseph S, Sonbol H, Hariri S, et al. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing [J]. *Am Soc Microbiol*, 2012, 50 (9) : 3031-3039.
- [11] Joseph S, Cetinkaya E, Drahovska H, et al. *Cronobacter condimentii* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. *genomospecies* 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012, 62 (6) : 1277-1283.
- [12] Forsythe S J, Benjamin D, Jolley A K. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15 (1) : 1121.
- [13] Jaradat Z W, Ababneh Q O, Saadoun I M, et al. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing [J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9 (1) : 225.
- [14] Iversen C, Lehner A, Mullane N, et al. Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45 (11) : 3814-3816.
- [15] Nair M M, Venkitanarayanan K S. Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA*-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72 (4) : 2539-2546.
- [16] Kolbert C P, Persing D H. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens [J]. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2 (3) : 299-305.
- [17] Fanjat N, Leclercq A, Joosten H, et al. Comparison of the phenotyping methods ID 32E and VITEK 2 compact GN with 16S rRNA gene sequencing for the identification of *Enterobacter sakazakii* [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45 (6) : 2048-2050.
- [18] Kerova E S, Forsythe S. *Cronobacter*: diversity and ubiquity [J]. *Qual Ass Safety Foods Crops*, 2011, 3 (3) : 104-122.