

研究报告

河南省市售婴幼儿配方食品中克罗诺杆菌的分子分型及系统发育研究

吴玲玲,戚浩彧,任高翔,邱正勇,炊慧霞,李辉,廖兴广
(河南省疾病预防控制中心,河南 郑州 450016)

摘要:目的 了解河南省市售婴幼儿配方食品中克罗诺杆菌污染情况、分子分型特征及耐药情况,分析不同菌株间的系统发育进化关系。方法 采集婴幼儿配方食品 227 份,按照 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》方法进行克罗诺杆菌的分离鉴定,并用微量肉汤稀释法和脉冲场凝胶电泳(PFGE)对分离株进行药敏实验和溯源分析,采用 16S rRNA 和多位点序列分型(MLST)方法进行种属鉴定和系统发育进化分析。结果 227 份婴幼儿配方食品中检出 13 株克罗诺杆菌,分别属于阪崎克罗诺杆菌、苏黎世克罗诺杆菌和都柏林克罗诺杆菌。13 株克罗诺杆菌药敏结果显示头孢唑啉耐药率达到 84.6%(11/13),PFGE 分型得到 7 个带型,MLST 共分为 6 个 ST 型,其中 ST1 为优势型别,相同 PFGE 型的菌株也有相同的 MLST 型。结论 河南省市售婴幼儿配方食品中克罗诺杆菌污染以阪崎克罗诺杆菌为主,种属和基因型具有多样性,系统进化树分析结果显示 MLST 能够更好地说明种水平之间的亲缘关系。

关键词: 克罗诺杆菌;婴幼儿配方食品;分子分型

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)01-0023-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.01.005

Molecular typing identification and phylogenetic analysis of *Cronobacter* spp. in infants formula food in He'nan Province

WU Lingling, QI Haoyu, REN Gaoxiang, QIU Zhengyong, CHUI Huixia, LI Hui, LIAO Xingguang
(He'nan Provincial Center for Disease Control and Prevention, He'nan Zhengzhou 450016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the contamination, molecular typing characteristics and antibiotic resistance of *Cronobacter* in infants formula food in He'nan. **Methods** A total of 227 commercially available infants formula food were collected, and *Cronobacter* was isolated and identified according to GB 4789.40—2016. Pulse field gel electrophoresis (PFGE) and the broth microdilution method were used to confirm the molecular type and antibiotic resistance. 16S rRNA and multilocus sequence typing (MLST) were used to identify the species and analyze the phylogenetic evolution of *Cronobacter*. **Results** 13 *Cronobacter* strains isolated from 227 infants formula food were identified as *C. sakazakii*, *C. turicensis* and *C. dublinensis*. The antibiotic susceptibility result of 13 *Cronobacter* strains showed that the resistance rate of cefazolin reached 84.6% (11/13). 13 strains of *Cronobacter* were divided into 7 clusters and 6 ST types. Majority of the strains with the same PFGE type also had the same MLST type of which ST1 was the dominant type. **Conclusion** The main contamination of *Cronobacter* in infants formula food was caused by *C. sakazakii* with diverse biochemical phenotypes and genotypes. The molecular phylogenetic tree of MLST well interpreted the genetic relationship between different kind of species.

Key words: *Cronobacter*; infant formula food; molecular typing

克罗诺杆菌原称阪崎肠杆菌,是一类周生鞭毛、能运动、无芽孢的革兰氏阴性杆菌,属于肠杆菌科。克罗诺杆菌是一种条件致病菌,可引起脑膜炎、菌血症和坏死性小肠结肠炎,婴儿为易感人群。

28 d 以内的新生儿一旦感染克罗诺杆菌会有生命危险,较大婴儿感染克罗诺杆菌的致死率达到 40%~80%,免疫力低下的成年人感染后也有死亡风险。流行病学调查研究发现,婴儿感染克罗诺杆菌常与摄入被污染的婴幼儿配方食品相关。克罗诺杆菌可以在干燥的婴幼儿配方食品中存活几个月甚至更长时间,具有耐酸耐热耐干燥及渗透压的生物特征^[1],可适应于各种不利环境。克罗诺杆菌可产生荚膜或生物膜,以保护自身免受干

收稿日期:2021-04-28

基金项目:河南省医学科技攻关项目(LHGJ20190690)

作者简介:吴玲玲 女 主管技师 研究方向为微生物检验

E-mail:695490715@qq.com

通信作者:廖兴广 男 主任技师 研究方向为微生物检验

E-mail:13592610139@139.com

干燥条件的影 响,提高在婴幼儿配方食品中的存活能力^[2]。此外,克罗诺杆菌还可以耐受某些抗生素,引发临床治疗中抗生素种类的使用问题^[3-4]。有报道称已在克罗诺杆菌中发现多黏菌素耐药基因 *mcr-1*,因此,对克罗诺杆菌耐药基因以及耐受生产加工过程极端环境相关基因的研究成为公共卫生的重中之重。

管家基因的多位点序列分型 (Multilocus sequence typing, MLST) 可用来分析不同来源克罗诺杆菌属的多样性。等位基因序列与数据库进行比对后克罗诺杆菌分为不同的 ST^[5]。不同 ST 型菌株的感染类型不同,比如 ST4 型主要与新生儿脑膜炎有关,而 ST1、ST4、ST8 和 ST12 型主要与人类疾病相关^[6-9]。脉冲场凝胶电泳 (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 是对暴发菌株进行分子分型的金标准^[10-11],可用来追溯不同来源菌株之间的相关性及其亲缘关系。本研究采集河南省 7 个地市共计 227 份婴幼儿配方食品,检出 13 株克罗诺杆菌,通过抗菌药物敏感实验和 PFGE 实验进行初步分析,再通过 16S rRNA 克隆测序和 *atpD*、*fusA*、*glnS*、*gltB*、*gyrB*、*infB* 和 *pps* 七个管家基因分型确定克罗诺杆菌种属和 ST 型,16S rRNA 序列片段和串联后的管家基因序列片段分别做系统进化发育分析,研究河南省克罗诺杆菌污染婴幼儿配方食品的主要种属特征和流行型别,分析不同来源菌株多态性和菌株间亲缘关系,并对不同克罗诺杆菌分种方法的优缺点进行比较。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

试验菌株共 13 株菌,阪崎克罗诺杆菌标准株 *Cronobacter sakazakii* (ATCC 29544) 和大肠埃希菌标准株 *Escherichia coli* (ATCC 25922) 为实验室保存菌种,其余 13 株菌均分离自婴幼儿配方食品。

1.1.2 主要仪器与试剂

全自动生化鉴定系统 VITEK 2 Compact (法国梅里埃),CHEF MAPPER XA PFGE 脉冲场凝胶电泳仪、Gel Doc XR 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad)。阪崎显色培养基 (法国科玛嘉),胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA,美国 BD),药敏板 (上海星佰生物技术有限公司),SeaKem Gold 琼脂糖 (美国 LONZA),蛋白酶 K (美国 Sigma),限制性内切酶 *Xba* I、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker DL2000 均购自宝生物工程 (大连)有限公司。管家基因引物序列合成及以上培养基和试剂均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定

参考按照 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》^[12] 方法进行目标菌的分离鉴定,同时选用阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 作为阳性对照,分离到的菌株用 VITEK Compact 鉴定到克罗诺杆菌属。

1.2.2 16S rRNA 克隆测序

根据 NCBI 数据库提供的克罗诺杆菌 16S rRNA 序列设计引物^[13],正向引物 FD1:5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'和反向引物 RP2:5'-ACGGCTACTTGTTACGACTT-3',扩增片段长度约为 1 500 bp,PCR 反应体系为 50 μ L,其中 2 \times Pfu PCR Master Mix 25 μ L,10 μ mol/L 正反向引物各 1 μ L,DNA 模板 2 μ L,ddH₂O 22 μ L,PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s;55 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 8 min。1%琼脂糖电泳检测 PCR 扩增结果,将 16S rRNA 的 PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序,测序结果通过 NCBI 数据库比对分析,从中选取同源性较高的序列,利用 MEGA 7.0 软件,采用邻接法构建系统发育进化树。

1.2.3 药敏试验

采用微量肉汤稀释法测定分离菌株的抗生素耐受试验,选用的抗生素包括 9 类 13 种,分别为青霉素类:氨苄西林 (Ampicillin, AMP); β -内酰胺/ β -内酰胺酶抑制剂复合物:氨苄西林/舒巴坦 (Ampicillin-sulbactam, AMS);头孢类:头孢噻肟 (Cefotaxime, CTX)、头孢西丁 (Cefoxitin, CFX)、头孢他啶 (Ceftazidime, CAZ)、头孢唑啉 (Cefazolin, CFZ);碳青霉烯类:亚胺培南 (Imipenem, IPM);氨基糖苷类:庆大霉素 (Gentamicin, GEN);四环素类:四环素 (Tetracycline, TET);喹诺酮类和氟喹诺酮类:萘啶酸 (Nalidixic acid, NAL)、环丙沙星 (Ciprofloxacin, CIP);苯丙醇类:氯霉素 (Chloramphenicol, CHL);磺胺类:甲氧苄啉/磺胺甲噁唑 (Sulfamethoxazole, SXT)。最小抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 允许范围和 MIC 解释标准参照美国临床和实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)^[14] 制定的标准,以大肠埃希菌 (ATCC 25922) 为质控菌株,采用 BioNumerics 7.6 对药敏数据进行处理分析。

1.2.4 PFGE 试验

按照国家食品安全风险评估中心克罗诺杆菌 PFGE 标准操作手册^[15],用无菌棉签刮取血平板纯菌落,均匀悬浊于细胞悬浊液中,用比浊仪测其浓

度至 4.0 ~ 4.5 麦氏浊度。加入等体积 1% SDS Seakem Gold Agarose 混匀,加入模具孔制成 plug 胶块,将制作完成的胶块置于 TE 缓冲液中 4 °C 保存。选用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Spe* I 切胶块,37 °C 水浴条件下酶切 3 h 后进行脉冲场凝胶电泳。脉冲时间为 2.16~63.8 s,电泳时间 18 h。电泳结束后选用 GelRed 染色 30 min,然后纯水脱色,凝胶成像系统拍照成像,使用 BioNumerics 7.6 生物信息学软件对电泳图谱进行处理及聚类分析。

1.2.5 MLST 试验

根据 Pub MLST 数据库提供的 7 对管家基因序列合成引物^[16],PCR 反应体系为 50 μL,其中 2×Pfu PCR MasterMix 25 μL,10 μmol/L 正反向引物各 4 μL,DNA 模板 4 μL,ddH₂O 13 μL,PCR 扩增条件为 96 °C 1 min,96 °C 1 min;58 °C 1 min;72 °C 2 min,30 个循环,最后延伸 72 °C 5 min。送至上海生工测序,将测序结果提交 Pub MLST 数据库获得菌株 ST 型,采用 MEGA 7.0 软件对 7 个管家基因串联序列进行分子进化分析,利用邻接法 (Neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树。

表 1 7 对管家基因引物序列

基因	引物序列 (5'-3')	扩增片段
<i>atpD</i>	F-CGAAATGACCGACTCCAA R-GGATGGCGATGATGTCTT	390
<i>fusA</i>	F-GCTGGATCGCGTAATTGA R-CCCATAACCAGCGATGATG	438
<i>glnS</i>	F-GGCTGCTGGATAACATCA R-CTTGTGGCTTCTTCACG	363
<i>gltB</i>	F-GCGAATACCACGCCTACA R-GCCTATTTACGGAGGAG	507
<i>gyrB</i>	F-CTCGCGGTCCTACTGTA R-ACGCCGATACCGTCTTTT	402
<i>infB</i>	F-TGACCACGGTAAAACCTC R-GGACCAGACCTTTATCC	441
<i>pps</i>	F-ACCCTGACGAATTCTACG R-CAGATCCGGCATGGTATC	495

2 结果

2.1 菌株鉴定及 MLST 分型结果

227 份样品中共检出 13 株克罗诺杆菌,经 16S rRNA 克隆测序鉴定 9 株为阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*),3 株为苏黎世克罗诺杆菌 (*Cronobacter turicensis*),1 株为都柏林克罗诺杆菌 (*Cronobacter dublinensis*),与 MLST 鉴定结果一致。同时本研究对 13 株克罗诺杆菌和 1 株标准菌株进行 MLST 分型研究,将 7 个管家基因测序所得结果拼接校正后上传 Pub MLST 网站,获得等位基因数值并得到相应的菌株 ST 型。14 株菌株共分为 6 个 ST 型,其中阪崎克罗诺杆菌 4 个 ST 型,苏黎世克罗诺杆菌 1 个 ST 型,都柏林克罗诺杆菌 1 个 ST 型。ST1 型共 6 株,ST691 型共 3 株,其余 ST 型各 1 株。阪崎克罗诺杆菌标准株 (ATCC 29544) 为 ST1 型,图 1 可见,阪崎克罗诺杆菌和都柏林克罗诺杆菌与 ST 型之间有相对集中的趋势,说明它们之间在分种方面具有一定的关联性。有 4 株菌株的测序结果提交至 Pub MLST 网站后命名为新型 ST691 和 ST692 被网站收录,见图 1。

2.2 耐药试验结果

13 株克罗诺杆菌分离株中有 12 株耐药,其中对三代先锋霉素头孢唑啉 (CFZ) 耐药率为 84.6% (11/13);对头孢噻肟 (CTX) 耐药率为 7.7% (1/13),只有一株菌对 13 种抗生素都敏感,未发现多重耐药菌株。

2.3 PFGE 分型结果

使用 BioNumerics V7.6 软件对图谱进行聚类分析,13 株克罗诺杆菌分离株和 1 株标准菌株共分为 7 种 PFGE 型别,相似度在 33.2% ~ 100.0%。10 株阪崎克罗诺杆菌分成 5 种 PFGE 型,3 株都柏林克罗诺杆菌和 1 株苏黎世克罗诺杆菌各分为 1 种 PFGE 型。7 株 ST1 型菌株分成 3 种 PFGE 型,其中

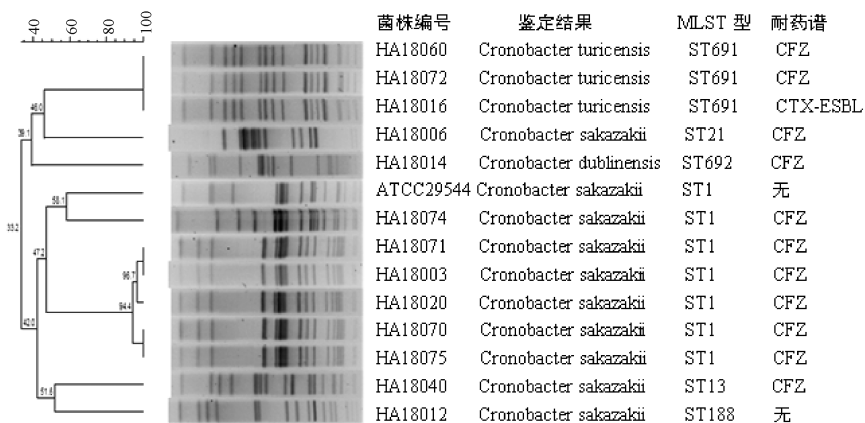


图 1 14 株罗诺杆菌 PFGE 分型、耐药谱及种属鉴定结果

Figure 1 PFGE patterns, drug resistance and identification of 14 *Cronobacter* strains

5株为同一型别,3株ST691型菌株分成1种PFGE型,其余各1株的ST13、ST21、ST188和ST692型菌株各分为1种PFGE型,且所有分离株和标准菌株的酶切图谱各不相同。PFGE谱型分散,菌株之间相似度为33.2%~96.7%,具有一定的遗传多态性,具体见图1。

2.4 基于16S rRNA和MLST的系统发育树分析结果

由图2(a)可知,测序菌株 *Cronobacter turicensis* HA18072和 *Cronobacter sakazakii* HA18003、*Cronobacter sakazakii* HA18071、*Cronobacter sakazakii* HA18075位于同一进化树分支, *Cronobacter dublinensis* HA18014与 *Cronobacter turicensis* HA18016、*Cronobacter turicensis* HA18060也处在同一分支,说明 *Cronobacter sakazakii* 与 *Cronobacter turicensis* 系统进化关系密切,同时也说明 *Cronobacter dublinensis* 与 *Cronobacter turicensis* 具有较高的遗传相似性,反映出以16S rRNA作为靶基因将克罗诺杆菌属准确鉴定到种的

水平具有一定的不确定性,很难区分发育相近的种。

利用MEGA 7.0软件对14株克罗诺杆菌7个管家基因串联的3 036 bp的片段进行分子系统发育进化树的构建和分析,结果见图2(b)。测序菌株 *Cronobacter sakazakii* HA18070、HA18003、HA18020、HA18071、HA18074和HA18075与参考菌株 *Cronobacter sakazakii* ATCC 29 544具有相同ST型且聚类于同一进化树分支。其余不同ST型的 *C. sakazakii* 菌株未与参考菌株 *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544聚类于同一分支,但相互之间分支距离较近,bootstrap自举值分别达到84%和58%。测序菌株 *Cronobacter turicensis* HA18072、HA18016和HA18060具有相同的ST型聚在同一进化分支上,不同ST型的菌株各自聚类于不同的分支。同时也说明基于MLST序列构建的系统发育树可将遗传相似性较高的三个物种 *Cronobacter sakazakii*、*Cronobacter turicensis* 和 *Cronobacter dublinensis* 很好地区分开。

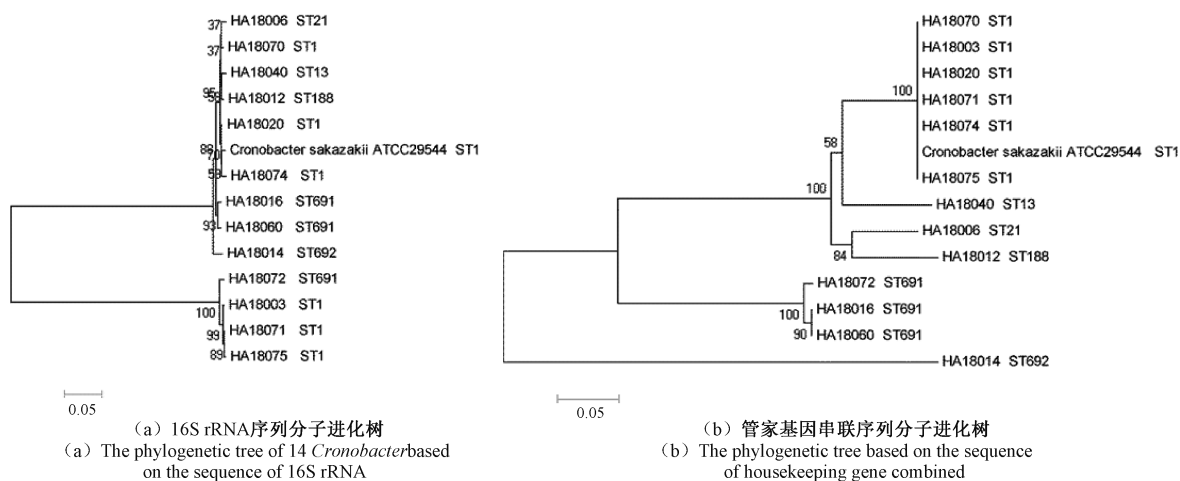


图2 14株克罗诺杆菌系统发育树

Figure 2 The phylogenetic tree of 14 *Cronobacter* strains

3 讨论

本研究从227份婴幼儿配方食品中检出13株克罗诺杆菌,其中6株均分离自0~6月婴幼儿配方奶粉,包括4株阪崎克罗诺杆菌和2株苏黎世克罗诺杆菌。7株分离自婴幼儿谷类辅助食品,包括5株阪崎克罗诺杆菌、1株苏黎世克罗诺杆菌和1株都柏林克罗诺杆菌。食品安全国家标准规定0~6月龄婴儿和特殊医学用途婴儿配方食品中不得检出克罗诺杆菌,较大月龄的婴幼儿配方奶粉对克罗诺杆菌的限量要求严格有关^[17],而对于婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌没有限量要求。这就给婴幼儿配方食品生产加工过程的规范和质量控制带来风险,婴幼儿谷类辅助食品与婴幼儿配方奶粉

制作相比,成分复杂、配料更多,与婴幼儿配方奶粉的生产线一致,却没有灭菌流程,暴露出潜在的安全风险。通过查阅相关文献发现,李毅等^[18]调查737份婴幼儿相关食品,婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌检出率(23.4%,37/158)明显高于婴幼儿配方奶粉(6.1%,45/737),周厚德等^[19]调查337份婴幼儿相关样品检出了24株克罗诺杆菌,均来自婴幼儿谷类辅助食品(14.2%,24/169)。贾华云等^[20]从全国32个企业生产的市售婴幼儿食品中分离得到50株克罗诺杆菌,35株分离自婴幼儿谷类辅助食品,15株分离自婴幼儿配方食品。由此可见,婴幼儿谷类辅助食品中克罗诺杆菌的检出率高于其他类别的食品,与本实验结果一致。因此应加强婴幼儿食品生产过程控制,同时严格把关生产原材料

的质量,增加生产加工车间环境消毒流程和生产工艺环节灭菌步骤,确保从点及面到线的质量安全控制管理系统,以追溯污染问题源头并进行危害评估分析。

MLST 是基于 7 个管家基因序列分析菌株的变异特征并对细菌进行分型的方法^[16]。与传统生物学分型方法相比,MLST 能将同一菌种的分离株细分为亚型,同时表明不同 ST 型之间的系统发育关系以及不同 ST 型别与疾病发生的潜在联系^[21]。刘铭等^[22]用 PFGE、MLST 和 MALDI-TOF-MS 三种方法对克罗诺杆菌进行分型研究,发现 MALDI-TOF-MS 的分辨率较高,MLST 准确性较高,PFGE 分型辨识度较高。PFGE 试验选用 *Xba* I 和 *Spe* I 两种限制性内切酶对克罗诺杆菌进行酶切,具有较高的分辨率,多应用于菌株的分子溯源分析,显示不同来源菌株之间具有的相关遗传多态性。本实验 13 株克罗诺杆菌分离株和 1 株标准菌株可分成 6 种 MLST 型和 7 种 PFGE 分型,除了 6 株同一种 ST1 型的阪崎克罗诺杆菌被分为两种 PFGE 谱图之外,其余每种 ST 型均对应一种 PFGE 谱图,可能与 PFGE 分型辨识度较高相关。6 株婴幼儿配方奶粉分离株有 4 个 PFGE 型和 4 个 MLST 型,7 株婴幼儿谷类辅助食品分离株有 5 个 PFGE 型和 4 个 MLST 型,9 株阪崎克罗诺杆菌分成 5 种 PFGE 型,3 株苏黎世克罗诺杆菌分成 1 种 ST 型,1 株都柏林克罗诺杆菌分成 1 种 ST 型。除 6 株 ST1 型菌株分为 2 个 PFGE 型,3 株 ST691 菌株分为 1 个 PFGE 型外,其余 ST 型菌株均归为 1 种 PFGE 型,型别较为分散。所有分离株与标准菌株的酶切图谱各不相同,相似度 100% 的菌株均来自不同生产厂家不同种类的食品。

闫瑞等^[23]用 7-loci MLST 方法对 Pub MLST 数据库中已登记的 2 438 株克罗诺杆菌进行 ST 分型,发现优势菌种为阪崎克罗诺杆菌和丙二酸盐阳性克罗诺杆菌,优势 ST 型为 ST1、ST4、ST7 和 ST13 型,而且多数菌株来源于食品及配料中。本实验结果发现阪崎克罗诺杆菌为优势菌株,分别为 ST1、ST13、ST21 和 ST188 型。多位点序列分型(MLST)方法^[5]已成功地临床相关的克罗诺杆菌属菌株聚集到特定的序列型别(Sequence type, ST)或克隆复合体(Clonal complex, CC)中,并形成稳定的进化谱系。Pub MLST 数据库收录了分离自食品、环境和临床上的大量克罗诺菌株^[24],数据库显示中国克罗诺杆菌属分离株主要来源于食品^[25],包括婴幼儿配方奶粉和蔬菜等,其中婴幼儿配方奶粉中分离菌株最多,环境分离菌株较少,但与食品安全特别是婴幼儿食品安全高度相关,说明婴幼儿配方食品原料

生产及加工环境中该菌存在的遍在性和污染途径的多样性。此外,临床分离株占比最少,如 2016 年南京市某儿童医院^[26]从重症肺炎新生儿的痰标本中获得了阪崎克罗诺杆菌 ST1 型菌株。

13 株克罗诺杆菌分离株有 12 株对头孢类抗生素耐药,其中 11 株对第一代头孢菌素头孢唑啉(CFX)耐药,1 株对第三代头孢菌素头孢噻肟(CTX)耐药,仅有 1 株对所有抗生素敏感,耐药谱如图 1 所示,由此可见选用头孢类抗生素用于临床治疗的存在局限性,但是不同文献报道克罗诺杆菌类抗生素的耐药性结果存在差异,如第一、二代头孢菌素(头孢唑啉)、氯霉素类(氯霉素)和头霉素类抗生素(头孢西丁)等,有的显示敏感,有的显示抗性。因此应加强对食品分离株和临床分离株的药敏监测,掌握其耐药规律,以应对可能出现的多重耐药现象^[27]。

16S rRNA 是一段高度保守的基因片段,因此被用来当作分种研究和系统发育进化分析的标志因子。有研究发现,16S rRNA 不能区分 *Cronobacter sakazaki* 和 *C. malonaticus* 两个物种^[28],与本实验结果类似,系统发育树的聚类结果不够精确,由此可见 16S rRNA 的分辨率和特异性差,不能一次性将克罗诺杆菌的所有的“种”区分,需要结合其他方法才能实现精准鉴定,同时提示了 16S rRNA 更适用于鉴定属水平之间的进化关系而无法准确定义到种水平。MLST 分型是一种基于核酸序列测定的细菌分型方法,多用于细菌分型,JOSEPH 等^[29]用此方法对克罗诺杆菌进行系统发育分析并证实了 7 个种的存在。本实验采用邻接法对 7 个管家基因串联序列构建系统发育树,结果表明,MLST 可将克罗诺杆菌属不同种的菌株很好地区分开,并将本实验分离到的 3 个菌种分化成 3 大分支。综上可知,16S rRNA 序列只能鉴定到属的水平,而 MLST 可用于克罗诺杆菌属种间的区分。

本实验选用 16S rRNA、PFGE 分型以及 MLST 分型等方法对克罗诺杆菌分离株进行研究,获得丰富的基因分型结果,对比发现不同分型方法的优缺点。16S rRNA 操作简单,结果分辨率低,多用于分析属水平菌株间的系统进化关系和遗传关系的远近。PFGE 分型方法可进行精准溯源,但对仪器设备要求较高,正逐渐被全基因组测序方法取代。MLST 基于 Pub MLST 数据库可进行种之间的分型研究,虽然操作烦琐,在研究菌株多态性和菌株间亲缘关系较有优势,但该分型结果往往不能应用于克罗诺杆菌的溯源分析。另外,基于单基因如 *fusA* 的分型可用于克罗诺杆菌种水平的鉴定,其他单基

因分型可用于克罗诺杆菌功能及毒力基因的研究, 如对食品和临床分离株进行基于 *gnd* 和 *galF* 基因及 MLST 分型研究, 可获得关于菌株血清型, ST 型和 CC 型等相关信息, 从而能够进行系统发育关系、菌株致病相关性和流行病学等相关研究。基于以上实验结果, 应扩大克罗诺杆菌的监测范围至生产加工环境和临床病患, 通过药敏试验, 结合分子分型方法对菌株进行系统的流行病学研究, 以了解该菌致病的毒力机制, 对食品中该菌的污染防控提供理论基础。

参考文献

- [1] FAKRUDDIN M, RAHAMAN M, AHMED M M, et al. Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food [J]. *Biological Research*, 2014, 47(1): 1-12.
- [2] HURRELL E, KUCEROVA E, LOUGHLIN M, et al. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other Enterobacteriaceae [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 136(2): 227-231.
- [3] KILONZO-NTHENGE A, ROTICH E, GODWIN S, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from domestic kitchens in middle Tennessee, United States [J]. *Journal of Food Protection*, 2012, 75(8): 1512-1517.
- [4] XU X K, LI C S, WU Q P, et al. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 204: 17-23.
- [5] JOSEPH S, FORSYTHE S J. Insights into the emergent bacterial pathogen *Cronobacter* spp., generated by multilocus sequence typing and analysis [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3:397.
- [6] JOSEPH S, FORSYTHE S J. Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(9): 1713-1715.
- [7] JOSEPH S, SONBOL H, HARIRI S, et al. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(9): 3031-3039.
- [8] MASOOD N, MOORE K, FARBOS A, et al. Genomic dissection of the 1994 *Cronobacter sakazakii* outbreak in a French neonatal intensive care unit [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 1-9.
- [9] OGRODZKI P, FORSYTHE S J. DNA-sequence based typing of the *Cronobacter* genus using MLST, CRISPR-cas array and capsular profiling [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:1875.
- [10] STRANDÉN A, FREI R, WIDMER A F. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis? [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(7): 3181-3186.
- [11] ALSONOSI A, HARIRI S, KAJŠÍK M, et al. The speciation and genotyping of *Cronobacter* isolates from hospitalised patients [J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2015, 34(10): 1979-1988.
- [12] 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.
- [13] KOLBERT C P, PERSING D H. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 299-305.
- [14] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fourth informational supplement: M100-S24[S]. Wayne: CLSI, 2014.
- [15] CDC. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Cronobacter* species [EB/OL]. (2017-07) [2019-04-20]. <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/cronobacter-pfge-protocol-508c.pdf>.
- [16] BALDWIN A, LOUGHLIN M, CAUBILLA-BARRON J, et al. Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonicus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes [J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9(1): 1-9.
- [17] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 婴儿配方食品: GB 10765—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [18] 李毅, 章乐怡, 洪程基, 等. 婴幼儿食品和配方奶粉中克罗诺杆菌污染调查及分子分型研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(4): 360-365.
- [19] 周厚德, 彭思露, 刘成伟, 等. 2018年江西省婴幼儿食品中克罗诺杆菌污染状况及分子分型和耐药特征分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(4): 335-339.
- [20] 贾华云, 王岚, 陈帅, 等. 市售婴幼儿食品中克罗诺杆菌分离菌株脉冲场凝胶电泳分型及耐药性研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(2): 106-110.
- [21] FORSYTHE S J, DICKINS B, JOLLEY K A. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1-14.
- [22] 刘铭, 时玉雯, 刘辉, 等. 应用 PFGE、MLST 和 MALDI-TOF-MS 方法对克罗诺杆菌分型的研究 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(3): 323-329.
- [23] 闫瑞, 杨捷琳, 陈翠玲, 等. 多位点序列分析方法在克罗诺杆菌属菌株溯源分析上的应用 [J]. *中国乳品工业*, 2019, 47(9): 9-14.
- [24] 闫瑞, 钮冰, 杨捷琳, 等. 克罗诺杆菌分子分型及毒力机制研究进展 [J]. *食品科学*, 2019, 40(21): 243-250.
- [25] 王小曼, 赵炜, 李诗瑶, 等. PubMLST 数据库克罗诺杆菌中外分离株的分型比较 [J]. *中国酿造*, 2020, 39(4): 165-170.
- [26] SHI L N, LIANG Q H, ZHAN Z, et al. Co-occurrence of 3 different resistance plasmids in a multi-drug resistant *Cronobacter sakazakii* isolate causing neonatal infections [J]. *Virulence*, 2018, 9(1): 110-120.
- [27] 梁安莉, 农珍妮, 温桂珍, 等. 市售婴幼儿米粉中克罗诺杆菌的分子分型和耐药分析 [J]. *现代食品科技*, 2020, 36(12): 36-42.
- [28] 李小芳, 崔晶花. 克罗诺杆菌分种方法研究进展 [J]. *疾病监测*, 2018, 33(5): 413-416.
- [29] JOSEPH S, SONBOL H, HARIRI S, et al. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(9): 3031-3039.