

# 建立一种快速检测坂歧肠杆菌的方法

韩 伟, 顾 鸣, 杨捷琳  
(上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

**摘 要:** 目的: 建立快速检测婴儿配方奶制品(IFM)中坂歧肠杆菌的方法。方法: 选择 ATCC 坂歧肠杆菌标准株, 对不同的增菌性培养基、选择性培养基和显色培养基进行研究; 结合 VITEK 仪和 API20E 细菌鉴定系统, 构建快速检测配方奶制品中坂歧肠杆菌的方法。结果: 建立的快速检测配方奶制品中坂歧肠杆菌的方法, 所需检验流程为 72h, 方法灵敏度为 2CFU/g, 能有效区别于阴沟杆菌、产气杆菌等肠杆菌科细菌; 方法应用稳定; 操作简单、方法可靠, 适宜规模化检测。结论: 本研究认为, 所建立的快速检测配方奶制品中坂歧肠杆菌的方法适宜检验检疫的工作要求, 能有效地发现配方奶制品中坂歧肠杆菌的污染情况。

**关键词:** 婴儿配方奶粉; 坂歧肠杆菌; 显色培养基

## Rapid Method Detection of Residual *E. sakazakii* in Milk-based Powder Infant Formulae

HAN Wei, GU Ming, YANG Jie-lin  
(Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

**Abstract:** Through using two step enrichment followed with isolation on chromogenic *Enterobacter sakazakii* agarose, a rapid method detection of *Enterobacter sakazakii* in milk-based powder infant formulae has been established in this research. Biochemical

收稿日期: 2005-04-22

作者简介: 韩伟(1974), 女, 工程师, 研究方向为食品微生物检测。

苯并吡喃阳离子结构, 故实验中在溶剂里都添加一定量的盐酸。在经过石油醚萃取和 Amberlite 树脂纯化后, 黑米皮提取物中的杂质显著减少, 在样品的色谱图中, 几乎没有杂质峰的出现。黑米皮提取物中花色苷的含量已接近 30%, 说明这是一种有效和值得推广的提取纯化黑米中花色苷的工艺。从色谱图中我们可以看出, 黑米皮提取物中的花色苷除了主要的矢车菊定-3-葡萄糖苷外, 还有少量的芍药定-3-葡萄糖苷。

### 3.2 流动相的选择

在实验过程中, 尝试过用不同比例的流动相。结果发现当乙腈比例为 20% 时, 出峰时间过早, 与溶剂峰太近难以区分, 分离效果不好; 而当乙腈所占的比例为 13% 时, 虽然分离效果明显, 但出峰时间过长。经多次实验后, 得到前面所述的比较合适的磷酸乙腈的比例, 能有效的起到分离的效果。

### 3.3 如何评价物质中花色苷的含量

由于花色苷的种类繁多, 而且一般都是几种花色苷并存, 所以我们通常用总花色苷含量来评价某物质中花

色苷的多少。由于目前某些花色苷对照品并不易获得, 而且有时我们并不清楚某物质中花色苷的具体成分, 这时我们可以用最常见的矢车菊定-3-葡萄糖苷为对照品得到回归方程, 再根据各峰的总面积求出总花色苷的含量。这为今后科学评价花色苷的含量提供了一种切实可行的方法。

### 参考文献:

- [1] 孙玲, 张名位, 池建伟, 等. 黑米的抗氧化性及其与黄酮和种皮色素的关系[J]. 营养学报, 2000, 22(3): 246-249.
- [2] 肖湘, 卢刚, 张捷, 等. 黑色食品色素清除活性氧功效及抗氧化活性[J]. 药物生物技术, 2000, 7(2): 112-115.
- [3] 唐传核, 彭志英. 天然花色苷类色素的生理功能及应用前景[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2000, (1): 26-28.
- [4] 夏敏, 凌文华, 马静, 等. 黑米皮抗载脂蛋白E基因缺陷小鼠动脉粥样硬化形成及机制[J]. 中国动脉粥样硬化, 2002, 10(5): 414-417.
- [5] 吴三桥, 闵锁田, 李新生, 等. 黑米花青色素测定方法的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(4): 44-46.
- [6] 张晴. 黑米色素提取精制工艺的研究[J]. 青岛大学学报, 2000, 15(2): 24-26.

test systems such as API reagent or VITEK method were used to identify the suspicious colonies on the plates. The whole detection process takes 72 hours and the sensitivity is about 2CFU/g, by which *Enterobacter sakazakii* can be effectively selected from other *Enterobacter*. This rapid method has good stability and easy operation, and is fit for the demands of inspection and quarantine.

**Key words** milk-based powdered infant formulae; *Enterobacter sakazakii*; chromogenic *Enterobacter sakazakii* agarose  
中国分类号: TS207.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2006)02-0208-05

*Enterobacter sakazakii*属于肠杆菌属中一种革兰氏阴性、棒状细菌。之前这种细菌被称为“黄色阴沟肠杆菌”，直到1980年被重新命名为坂崎肠杆菌。该细菌已经在奶酪、肉品、蔬菜、调味料等众多食品中分离发现，其中尤以新生儿配方奶粉中发现此菌更令人关注。1961年Urmenyi和Franklin第一次报道了两起由坂崎肠杆菌引起的婴幼儿脑膜炎病例，此后，坂崎肠杆菌开始引起人们的关注，所造成人类疾病，例：脑膜炎、败血病、小肠结肠炎坏死在全球范围内陆续有报道。虽然其中大部分病例为婴幼儿，引发的婴幼儿脑膜炎死亡率高达80%，但也有成年人被感染的报道。更重要的是，一项调查表明新生儿代乳品粉或配方奶粉中，低含量坂崎肠杆菌是导致感染性危害因子。美国FDA2003年预警通报了新生儿代乳品粉或配方奶粉中，低含量坂崎肠杆菌的危害和检验方法。新生儿代乳品粉或配方奶粉感染坂崎肠杆菌的问题又一次受到人们的关注，近来有来自不同国家的一些新生儿配方奶粉的检测报道，在141份样品中有20份含有坂崎肠杆菌，约占14%。未成熟的婴幼儿和病患者极易感染此菌。全世界新生儿特护部门已经爆发过多次坂崎肠杆菌感染。

由于婴儿代乳品粉末不是作为无菌产品生产和销售的，它们在生产过程中虽然有加热处理，但与同类液体状产品不同，不能在高温中停留足够的时间，以使最终的包装产品达到无菌状态。另外，坂崎肠杆菌耐干燥的特性，使在干燥的环境中能存活一定时间，报道在奶粉生产厂中可发现坂崎肠杆菌，这增加了巴斯德杀菌后最终产品污染的危险性。

有关新生儿代乳品粉或配方奶粉中，低含量坂崎肠杆菌的检验方法有不少报道。本文采用独特的坂崎肠杆菌显色培养基法，并结合VITEK仪、API20E生化法鉴定和PCR分子生物学辅助法，对配方奶粉中坂崎肠杆菌检测、鉴定技术条件等进行摸索，以求建立最佳的检测和鉴定方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用菌株

坂崎肠杆菌(ATCC 29544、50205、51329)；大肠杆菌(ATCC 51813、44338)；大肠杆菌0157: H7(ATCC

43889)；产气肠杆菌(ATCC 13048)；阴沟肠杆菌(ATCC 51816)；弗氏枸橼酸杆菌(ATCC 8090)；肺炎克雷伯氏菌(ATCC 13883)；肠炎沙门氏菌(ATCC 49214)；鼠伤寒沙门氏菌(实验室留存)；痢疾志贺氏菌(上海CDC 51336)；福氏志贺氏菌(上海CDC 51311)；奇异变形杆菌(实验室留存)；小肠结肠炎耶尔森氏菌(实验室留存)；绿脓杆菌(上海CDC 10101(S.4))；溶血性链球菌(上海CDC32116(S.1))；金黄色葡萄球菌(ATCC 12600)；单增李斯特菌(ATCC 7644)。

### 1.2 主要培养基和试剂

1.2.1 0.1%灭菌的蛋白胨生理盐水 蛋白胨 1g、氯化钠 8.5g、蒸馏水1000ml。制备时将这些成分溶解在1000ml蒸馏水中，调pH7.0，然后在高压锅内经(121±1)℃消毒15min。

1.2.2 肠道菌增菌肉汤培养基(EE肉汤) 蛋白胨 10g、葡萄糖 5g、牛胆盐 20g、磷酸氢二钠 8g、磷酸二氢钾 2g、煌绿 0.015g、蒸馏水1000ml。制备时将这些成分加热溶解后，调pH7.0，分装90ml，经115℃高压灭菌15min。

1.2.3 显色*Enterobacter sakazakii*琼脂 胰蛋白胨15.0g、大豆蛋白胨 5.0g、氯化钠 5.0g、柠檬酸铁铵 1.0g、硫代硫酸钠 1.0g、脱氧胆酸盐 1.0g、发色基团 0.1g、琼脂 15.0g、调pH7.3±0.2，25℃，溶于1000ml蒸馏水中，混匀煮沸使之完全溶解。高压灭菌121℃，15min。培养基冷却到50℃，混匀倒入无菌玻璃平皿。

1.2.4 胰蛋白胨大豆琼脂(TSA) 胰蛋白胨 17.0g、植物蛋白胨 3.0g、氯化钠 5.0g、磷酸氢二钾 2.5g、葡萄糖 2.5g、琼脂 15.0g，调pH7.3±0.2，25℃，溶于1000ml蒸馏水中，混匀煮沸使之完全溶解。高压灭菌121℃，15min。培养基冷却到50℃，混匀倒入无菌玻璃平皿。

1.2.5 主要试剂 API20E肠杆菌科检测试剂条及相关试剂；VITEK GNI革兰氏阴性菌检测卡(法国生物梅里埃公司产品)。

### 1.3 常用微生物检验设备

干热灭菌设备或湿热灭菌设备、培养箱 35±1℃或 37±1℃；水浴锅 35±0.2℃、铂/铬制成接种环，直

径大约 3 mm、玻璃 L 型涂布棒、玻璃器皿(试管或烧瓶、量筒、刻度吸管、培养皿(直径 90 mm)、玻璃珠(直径为 3 mm)、显微镜、VITEK 仪、PHS-3 酸度计、IEC Centra MP4 离心机;均质器 MRK、天平(感量为 0.01 g)。

#### 1.4 实验方法

1.4.1 无菌打开样品,分别称取 25 g 共四份,放入无菌容器中,以 1:10 比例分别加入灭菌的蛋白胨大豆肉汤,放置 25℃ 培养 4~6 h。

1.4.2 分别取 10 ml 移入 3 个 90 ml 肠道菌增菌肉汤中,置 35~37℃ 培养 18~20 h。

1.4.3 分别取 0.1 ml 增菌液涂布显色 *Enterobacter sakazakii* 琼脂培养基,35~37℃,观察蓝绿色菌落。

1.4.4 挑取 8~10 个可疑的蓝绿色 *E. sakazakii* 菌菌落,接种在营养琼脂平板上,35~37℃,16~18 h,观察黄色色素产生情况和 G 染色镜检观察。

1.4.5 做氧化酶试验,用 VITEK 仪或 API20E 等生化系统,确认可疑的 *E. sakazakii* 菌蓝绿色菌落。

## 2 结果与分析

### 2.1 特异性试验

表1 不同菌株在显色 *Enterobacter sakazakii* 琼脂培养基的形态

Table 1 Characteristic of different bacteria colony on Chromogenic *Enterobacter sakazakii* agar

菌株	生长状况	菌落颜色
坂崎肠杆菌(29544、50205、51329)	良好	蓝绿色
大肠杆菌(51813、44338); 大肠杆菌 0157:H7; 产气肠杆菌; 阴沟肠杆菌; 弗氏枸橼酸杆菌; 肺炎克雷伯氏菌; 痢疾志贺氏菌; 福氏志贺氏菌; 奇异变形杆菌; 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 绿脓杆菌	良好	浅黄色
肠炎沙门氏菌; 鼠伤寒沙门氏菌; 溶血性链球菌; 金黄色葡萄球菌; 单增李斯特菌	良好 不生长	浅黄色, 中心黑色 -

将显色 *Enterobacter sakazakii* 琼脂培养基上经 37℃ 24 h 培养的蓝绿色纯菌落直接用 API20E 肠杆菌试条和 VITEK GNI 板条进行快速生化鉴定。

表2 坂崎肠杆菌的 API 及 VITEK 鉴定结果

Table 2 Identification of *Enterobacter sakazakii* by API and VITEK method

菌株	API 20E 鉴定结果		VITEK 鉴定结果
	生化编码	符合率 (%)	符合率 (%)
坂崎肠杆菌 29554	3305373	98.4	99
坂崎肠杆菌 50205	3105373	97.1	98
坂崎肠杆菌 51329	3305373	98.4	99

### 2.2 灵敏度试验

取 2 份细菌总数分别为 80 和 100 CFU/g 的配方奶粉样品 S1 和 S2,经 FDA BAM 方法检验无坂崎肠杆菌,备用。

取麦氏浓度 1 的坂崎肠杆菌标准菌株(ATCC29544),10 倍递增稀释至  $10^{-6}$ ,各稀释度取 1 ml,分别添加到 100 g S1 和 S2 中,充分均质后进行检验;同时对各稀释度的标准菌液进行计数。

表3 添加试验结果

Table 3 Result of recovery test

稀释倍数	菌落计数(CFU/g)	检出情况	
		S1	S2
$10^{-2}$	2100	检出	检出
$10^{-3}$	450	检出	检出
$10^{-4}$	17	检出	检出
$10^{-5}$	2	检出	检出
$10^{-6}$	0	未检出	未检出

### 2.3 对自然样品的检测试验

对 20 份含植物蛋白的固体样品(大豆分离蛋白、固体麦精粉、粉末酱油、植物饮料粉、大豆卵磷脂胶囊及调料粉等)进行检验,增菌培养后,仅有 3 个样品在显色 *Enterobacter sakazakii* 琼脂培养基上出现非典型菌落(浅黄色菌落),此些菌落后经生化鉴定非坂崎肠杆菌。该 20 份样品均未检出坂崎肠杆菌。

对 106 份进口乳制品样品(牛奶、全脂奶粉、脱脂奶粉、婴儿配方奶粉、乳清粉及乳酪等)进行检验,增菌培养后,有 5 个样品在显色 *Enterobacter sakazakii* 琼脂培养基上出现典型菌落(蓝绿色菌落),经 VITEK 仪鉴定均为阪崎肠杆菌。

## 3 讨论

自 1961 年英国 Urmenyi 和 Franklin 首次报道了 *E. sakazakii* 菌可以感染婴幼儿造成脑膜炎以来,已经有许多报道从高风险产品中发现坂崎肠杆菌,例如:IFM 奶粉、脱水性婴儿食品、婴儿奶粉、不同的植物性食品原料等,说明该细菌具有在干燥环境中生存很长时间的特性,与泛菌属细菌、肠杆菌属细菌具有共同的生物生态性。由于在 IFM 奶粉等产品中的潜在危害性,该菌污染危害引起了国际上的关注,2002 年国际微生物规格委员会(ICMSF)已经将坂崎肠杆菌归列在“对特殊人群具有严重危害、甚至危及生命的致病菌”名单中,同时,随着大家对此菌的重视和逐步认识,和对完整的风险评估体系的需要,尤其是涉及到新生儿、婴幼儿消费,2003 年 FAO/WHO 要求进行回顾性调查和发表了二项风险分析报告;2004 年 CAC 委员会第 36 次会议上

又提出“婴幼儿配方食品标准”的起草工作,这项工作将有43个国家和21个国际组织参与,其中一项工作是制定“婴幼儿配方食品”中坂崎肠杆菌等微生物的卫生标准。国际上1988年有过一次对IFM产品中坂崎肠杆菌和肠杆菌的调查,来自36个国家141份IFM产品中,分离到20份坂崎肠杆菌,细菌浓度为0.36个/100g;1997年Farbe调查了5家工厂,每家厂24份样品,发现每家厂样品中0~12%有坂崎肠杆菌。以上二次调查中,检测方法均采纳BPW预增菌、EE肉汤增菌、VRBGA分离,挑取5个菌落在TSA,25℃培养48~72h,观察黄色素,最后API20E鉴定。2002年美国FDA在此方法的基础上,将BPW预增菌改为无菌蒸馏水预增菌,同时增加了接种量,即:将溶解的代乳品孵育过夜,然后在EE肉汤中,次培养再孵育过夜;下一步在VRBGA上再培养,孵育过夜;挑取带有紫色晕轮沉淀物的菌落,在TSA上次培养,孵育48~72h,25℃,观察有黄色素淀积的典型坂崎肠杆菌菌落;可疑菌落用生化法进行确认。但是方法中并没有注意到坂崎肠杆菌弱竞争生长的特性,方法的中预增菌、增菌过程中坂崎肠杆菌往往被其他肠杆菌科细菌所生长掩盖,造成阳性分离率低的情况。

由Druggan、Forsyth等人开发的坂崎肠杆菌显色培养基是一种选择性培养基,可用来鉴别和计数新生儿代乳品粉、配方奶粉和其他食品中的坂崎肠杆菌。由于,坂崎肠杆菌具有的 $\alpha$ -葡萄糖苷醛酶与显色培养基中的生色基团特异性结合,酶分解生色基团(5-溴-4-氯-3-吡啶基- $\alpha$ , D-吡喃型葡萄糖苷)产生典型的蓝绿色菌落。尽管,普通变形菌(*Proteus Vulgris*)具有弱 $\alpha$ -葡萄糖苷醛酶的产生能力,在这个培养基上呈现为灰/黑菌落。这是因为变形菌属(*Proteus spp*)能减少硫代硫酸盐,产生硫化氢,因为在培养基中含有铁离子(来自柠檬酸铁铵),可使菌体变黑,以掩盖菌落中的蓝绿色泽。培养基配方中含有的脱氧胆酸盐(胆汁盐)可以抑制革兰氏阳性菌的生长。

由报道坂崎肠杆菌显色培养基对自临床和食品的坂崎肠杆菌株(95/95)进行了分析,其结果所有的95株坂崎肠杆菌株24h孵育后在显色琼脂上产生明显的蓝绿色菌落。特异性试验选择了148株、代表17个不同属的其他肠杆菌进行试验。这些菌株接种到显色琼脂上,37℃孵育24h,发现只有37℃孵育24h后、明显的蓝绿色菌落是非常可疑的阳性。

最近,法国AES实验室最近开发了一种检测奶粉中坂崎肠杆菌的增菌肉汤和显色培养基,但是未公开这种培养基的具体配方或性能。

利用细菌特异性酶介反应,利用显色培养基试剂来快速检测细菌,具有明显的优势:菌体颜色容易用肉眼

判断和区分、特殊的酶促反应将坂崎肠杆菌与其他肠杆菌很好的区分开来、较少非目标有机体生长、遗漏目标有机体导致生长过度几率小、培养基分离所有的坂崎肠杆菌无假阳性、结果比使用FDA方法快3d;对检验工作的益处:培养基使用简单无特殊培训要求、结果可靠、灵敏度高和87.2%特异性结果、孵育24h后平板可读结果,适合大通关的要求。经科技情报检索,本研究采纳了Druggan、Forsyth等人开发的新型显色培养基,利用坂崎肠杆菌具有 $\alpha$ -葡萄糖苷醛酶功能,以区别于其他肠杆菌科 $\alpha$ -葡萄糖苷醛酶阴性的细菌(见下表),该新型显色培养比以往的方法时间上缩短了2d,而且灵敏度达87%、特异性达100%,能够提高增菌后从其他竞争性肠杆菌科细菌中检测坂崎肠杆菌的几率和与其它的细菌区分鉴别。本方法中以*Enterobacter sakazakii*显色琼脂代替了两个平板培养基,因此,整个步骤相当于减少了3d。

在众多的细菌快速鉴定系统中,基于生化鉴定的API系统和VITEK系统都可做为最终鉴定结果。本文分别采用API20E肠杆菌科鉴定系统和GNI革兰氏阴性菌鉴定系统作针对坂崎肠杆菌的检测,从结果来看,即使部分生化反应项目上有区别(见表4),但两种系统对坂崎肠杆菌的鉴定结果完全一致。

表4 坂崎肠杆菌的生化反应特性  
Table 4 Biochemical test of *Enterobacter sakazakii*

GNI+ 革兰氏阴性菌试板生化项目	API-20E生化项目	坂崎肠杆菌的生化反应
乙酰胺发酵	/	-
侧金盏花醇发酵	/	-
/	苦杏仁苷发酵	
精氨酸水解	精氨酸水解	+
阿拉伯糖发酵	阿拉伯糖发酵	+
柠檬酸利用	柠檬酸利用	+
P-香豆素利用	/	-
DP-300 抑制	/	+/-
七叶苷发酵	/	+
生长抑制试验	/	+
/	明胶液化	-
葡萄糖发酵	葡萄糖发酵	+
硫化氢产生	H <sub>2</sub> S 产生	-
肌醇发酵	肌醇发酵	+
/	吡啶产生	-
乳糖/10%乳糖发酵	/	+
赖氨酸脱羧酶	赖氨酸脱羧酶	-
丙二酸发酵	/	-
甘露醇发酵	甘露醇发酵	+
麦芽糖发酵	/	+
/	密二糖发酵	+
/	鸟氨酸脱羧酶	+
葡萄糖(氧化的)	/	+
$\beta$ -D.半乳糖吡喃糖苷	$\beta$ -半乳糖苷酶	+
碱性对照	/	+