

# 阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)分子检测方法研究进展

王翔<sup>1</sup>, 祝长青<sup>1,2</sup>, 徐幸莲<sup>1,\*</sup>, 周光宏<sup>1</sup>

(1.南京农业大学 教育部肉品加工与质量控制重点实验室, 江苏 南京 210095;

2.江苏出入境检验检疫局, 江苏 南京 210001)

**摘要:** 阪崎肠杆菌(现克罗诺杆菌属)是一种重要的食源性条件致病菌, 因其能通过污染婴幼儿配方食品导致严重的新生儿脑膜炎、菌血症和小肠结肠炎等疾病, 而受到广泛的关注。其分子生物学检测方法克服了传统检测方法实验操作繁琐、耗时长等问题。目前常用的分子生物学方法主要有普通PCR、实时荧光定量PCR、环介导恒温扩增、探针方法等。

**关键词:** 阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属); 分子检测方法; 环介导恒温扩增; 分子探针

## Recent Advances in Studies on Molecular Detection Methods for *Enterobacter sakazakii*

WANG Xiang<sup>1</sup>, ZHU Chang-qing<sup>1,2</sup>, XU Xing-lian<sup>1,\*</sup>, ZHOU Guang-hong<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Jiangsu Entry Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

**Abstract:** *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) is an emerging food-borne conditional pathogen associated with meningitis, bacteremia and necrotizing enterocolitis; especially neonatal meningitis is of high potential danger in neonates. Many bio-molecular assays like regular PCR, real-Time PCR, loop-mediated isothermal amplification, and molecular probes are highly sensitive for detecting specific food-borne pathogens, and they have overcome the disadvantages of being time-consuming, tedious operation and ambiguous results, which are usually associated with conventional detection methods.

**Key words:** *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.); molecular detection methods; loop-mediated isothermal amplification; molecular probe

中图分类号: TS207.4; R155.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0350-05

阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)是一种革兰氏阴性、周生鞭毛、能运动、无芽孢的兼性厌氧细菌<sup>[1]</sup>, 以前一直被认为是黄色阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*), 直到1980年才更名为“阪崎肠杆菌”。2008年研究表明阪崎肠杆菌实际上至少包括6个基因种<sup>[2]</sup>, 现已将阪崎肠杆菌定义为肠杆菌科的一个新属——克罗诺杆菌属(*Cronobacter* spp.)。阪崎肠杆菌是一种条件致病菌, 之前一直未被临床引起重视。从1961年开始, 世界范围内由该菌引起的新生儿脑膜炎、菌血症和坏死性小肠结肠炎的病例相继被报道, 阪崎肠杆菌才被作为一种重要的食源性病原菌受到关注。国际食品微生物标准

委员会(ICMSF)在2002年将阪崎肠杆菌列为“严重危害特定人群生命、引起长期慢性实质性后遗症的一种致病菌”<sup>[3]</sup>。FAO和WHO认为阪崎肠杆菌的所有种都是致病的<sup>[4]</sup>。近年来对食品、饮料、加工原料、环境等阪崎肠杆菌污染率的研究发现, 阪崎肠杆菌在自然界中分布广泛<sup>[5-8]</sup>。

传统的阪崎肠杆菌分离检测方法, 依赖于生化和形态学特点, 国际上通常以美国FDA颁布的“婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的分离计数”作为经典方法<sup>[9]</sup>。2008年我国也制定了阪崎肠杆菌检验国家标准, 并于2010年进行了修订<sup>[10]</sup>, 规范了阪崎肠杆菌检测。但传统的检

收稿日期: 2010-11-08

基金项目: 科技部国际科技合作项目(2009DFA31770); 农业部转基因生物新品种培育重大专项课题(2008ZX08011-004)

作者简介: 王翔(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全及检测。E-mail: wangxiangnjau@126.com

\*通信作者: 徐幸莲(1962—), 女, 教授, 博士, 研究方向为畜产品加工与质量控制。E-mail: xlxu@njau.edu.cn

测方法存在操作繁琐、耗时长、不易分辨结果等缺点。分子生物学检测技术的不断完善和发展,克服了传统检测方法存在的问题,也使得针对阪崎肠杆菌开展的快速检测方法迅速发展。

## 1 普通 PCR

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术为食源性病原微生物的检测提供了一种快速、灵敏、特异的方法,可作为一种可靠的检测方法<sup>[11-12]</sup>。PCR 技术给阪崎肠杆菌检测提供了广阔的舞台,各国学者针对阪崎肠杆菌的多个靶基因从多角度进行了研究(表 1)。

表 1 普通 PCR 方法检测阪崎肠杆菌  
Table 1 Common PCR assays for *E. sakazakii*

靶基因	引物序列(5'-3')	片段大小/bp	参考文献
16S rRNA	1: GCTYTGCTGACGAGTGGCGG 2: ATCTCTGCAGGATTCTCTGG	929	[13]
	1: GCTCGTGTNGTGANATGTTGCCA 2: GCGATTTCYGAATGGGGRAACGG	282	[14]
ITS 序列	1: GGGTTGTCTGCGAAAGCGAA 2: GTCTTCGTGCTGCGAGTTTG	282	[15]
	1: CAGGAGTTGAAGAGGTTTAACT 2: GTGCTGCGAGTTTGAGAGACTC	251	[15]
Omp A	1: GGATTTAACCGTGAACCTTTTCC 2: CGCCAGCGATGTTAGAAGA	469	[16]
	1: TGAAAGCAATCGACAAGAAG 2: ACTCATTACCCTCTCTGATG	1680	[17]
$\alpha$ -葡萄糖苷酶	1: AAAGCAATCGACAAGAAGTGGTG 2: ACGTAATGGCGTTGCCGAAGAAA	1521	[18]
	1: GGCGGAGCCGAATAACTG 2: CGTGCCCTGCATGAGAAAA	673	[19]

注: N.A/T/C/G; Y.C/T; R.G/A。

### 1.1 单重 PCR

#### 1.1.1 rRNA 基因

rRNA 基因存在于所有的细胞生物中,其结构和功能都很保守,变异不受环境的影响,是度量生物进化关系一种很好的分子钟。在保守的 rRNA 基因中找到特异性的序列,借助 PCR 等分子生物学方法进行特异性检测。用于阪崎肠杆菌 PCR 检测的 rRNA 基因主要是 16S rRNA 和 16S~23S rRNA 间区(ITS)序列。

2003 年 Keyser 等<sup>[20]</sup>首次报道了阪崎肠杆菌的 PCR 检测方法。该方法根据一株阪崎肠杆菌(GenBank: AB004746)的 16S rRNA 基因序列设计引物,进行 PCR 扩增检测。2004 年 Lehner 等<sup>[13]</sup>对 15 株阪崎肠杆菌进行了系统发育学研究,结果发现各菌株基因序列之间存在较大的差异。他们对 Keyser 等<sup>[20]</sup>建立的检测方法进行了评估,结果发现该方法在特异性上存在较大的问题:不能

检测阪崎肠杆菌 ATCC 51329 这一分支,并且 *E. cloacae* 检测为阳性。Lehner 等<sup>[13]</sup>根据多株阪崎肠杆菌 16S rRNA 测序结果,选择特异序列,建立了检测方法。由于是在分析多株菌株基因序列的基础上建立的检测方法,该检测方法有很好的特异性:47 株不同来源的阪崎肠杆菌和 28 株其他肠杆菌检测结果准确度为 100%。同时检测灵敏度可达 10pg。

针对阪崎肠杆菌 16S~23S rRNA 基因间区序列,高旗利等<sup>[14]</sup>设计和筛选出一对特异性引物,建立了 PCR 检测方法。奶粉样品中检测低限为 2.2~5.4CFU/100g,并且该方法与美国 FDA BAM 方法检测结果完全符合。杨春华等<sup>[21]</sup>参考高旗利等<sup>[14]</sup>设计的特异引物,PCR 扩增产物经变性高效液相色谱进行快速检测。该方法检测结果低限为 25CFU/mL,准确度为 100%。此外, Liu 等<sup>[15]</sup>也根据 ITS 序列设计了两对引物,建立了婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌特异性 PCR 检测方法,检测限可达到 1.3CFU/100g。

#### 1.1.2 外膜蛋白 A 基因(*ompA*)

Mohan Nair 等<sup>[16]</sup>通过克隆和鉴定阪崎肠杆菌的外膜蛋白 A 基因(*ompA*),针对该基因建立了 PCR 检测方法。经检测 17 株阪崎肠杆菌全为阳性,51 株非阪崎肠杆菌全为阴性,具有很高的特异性。他们还同时检验了不同水平伤寒沙门氏菌( $10^1 \sim 10^8$ CFU/mL)存在的情况下该 PCR 方法的特异性,结果证明该菌的加入并不影响阪崎肠杆菌的特异性检出。该方法检测限可达到  $10^3$ CFU/mL,经过 8h 增菌后,检测限可以达到  $10^1$ CFU/mL。在 Mohan Nair 等<sup>[16]</sup>的研究基础上,周吉海等<sup>[22]</sup>优化了实验条件,优化后的条件选择为:  $Mg^{2+}$  浓度为 2.0mmol/L,退火温度为 60℃,优化后的方法对阪崎肠杆菌的检测限为  $10^3$ CFU/mL。

#### 1.1.3 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因

阪崎肠杆菌的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性是区别于肠杆菌科其他细菌的一个重要特征, $\alpha$ -葡萄糖苷酶能分解 4-甲基伞形酮- $\alpha$ -D-葡萄糖苷(4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glucoside,  $\alpha$ -MUG),平板上生长的阪崎肠杆菌在紫外线照射下表现为黄色荧光菌落<sup>[23]</sup>,这也是采用传统生化培养法检测阪崎肠杆菌的原理之一。

2006 年, Lehner 等<sup>[24]</sup>克隆了阪崎肠杆菌葡萄糖苷酶基因簇,并成功在大肠杆菌中表达。在分析该基因簇分子序列的基础上,建立了针对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性基因的特异性 PCR 鉴定系统<sup>[17]</sup>。虽然还有其他几种细菌具有  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性,但其建立的方法能将它们区分。

叶应旺等<sup>[18]</sup>对寡-1,6-葡萄糖苷酶基因进行分析,设计筛选出特异性和灵敏度均较好的 1 对引物。在对反应条件及扩增程序优化后,建立的方法对纯菌的检测灵敏度为  $10^2$ CFU/mL,70 株阴性对照株均没有扩增出特征性

条带。该PCR方法与传统的生化鉴定方法有很好的一致性。他们还针对阪崎肠杆菌 $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷酶基因,设计引物建立了检测方法<sup>[19]</sup>,纯菌检测灵敏度为10<sup>2</sup>CFU/mL。

众多的单重PCR检测方法在特异性和灵敏性上均存在一定的差别,为了确定最适合阪崎肠杆菌检测的PCR方法,Cawthorn等<sup>[25]</sup>对分别针对16S rRNA基因、ITS序列和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因不同片段的6种检测方法进行了比较和评价。结果发现针对16S rRNA基因扩增长度为929bp的方法最适合阪崎肠杆菌的检测和鉴定。而Ye等<sup>[19]</sup>分别比较了针对ompA基因、ITS序列和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因的3种检测方法,检测243份婴幼儿配方奶粉样品。结果前两者分别出现了33.3%和8.33%的假阳性,针对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因扩增673bp的检测方法有最高的特异性和较高的灵敏性。

1.2 多重PCR

多重PCR检测就是将两对或者两对以上的引物在同一个反应管里进行扩增,达到同时检测多个目的DNA片段的目的。多重PCR的检测应用包括单一病原菌的检测和多种病原菌的同时检测。

针对16S rRNA基因保守序列检测结果种特异性不强,以及单重PCR易于产生假阳性的问题,叶应旺等<sup>[26]</sup>以阪崎肠杆菌基因组中种特异性 $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷酶基因和ompA基因为目标,设计引物建立起特异性强、灵敏度较高的双重PCR检测方法。该方法能够减少以保守序列来设计引物导致假阳性结果的出现。结合固定技术,Zhou等<sup>[27]</sup>建立了针对ompA基因和ITS序列的双重PCR检测方法。经过固定、增菌之后双重PCR的检测限可达到3CFU/mL。相比较单重PCR的检测方法,双重PCR检测单一病原菌灵敏度也有所降低,但具有更高

的特异性,减少了假阳性<sup>[27]</sup>。

梁会营等<sup>[28]</sup>根据阪崎肠杆菌ompA基因和金黄色葡萄球菌耐热核酸酶(nuc)基因特异序列,设计两对特异性引物,分别扩出282bp和482bp的目的条带。建立的方法可同时检测两种致病菌。针对阪崎肠杆菌ompA基因、沙门菌属侵袭性抗原保守基因(invA),侯殿东等<sup>[29]</sup>建立了双重PCR检测方法。检测结果表明两种菌均能出现相应条带,并且引物间无交叉反应。

2 荧光定量PCR

定量PCR不仅实现了PCR从定性到定量的飞跃,而且与常规PCR相比,它具有特异性更强、自动化程度高等优点,已在食源性病原菌的检测中广泛应用<sup>[30]</sup>,许多研究者针对阪崎肠杆菌多个靶基因进行了荧光定量PCR检测研究(表2)。

Malorny等<sup>[12]</sup>针对阪崎肠杆菌16S rRNA基因的特异序列设计了引物和探针,建立了Taq Man探针的检测方法。在150拷贝内部扩增参照(IAC)存在的条件下,一个反应中5CFU的检出可能性为100%。Kang等<sup>[31]</sup>也根据16S rRNA基因中的特异序列设计了引物和探针。检测限为100fg基因组DNA。

Liu等<sup>[30]</sup>针对阪崎肠杆菌的ITS序列,建立了荧光定量PCR的检测方法。对包含于ITS序列中的G基因(tRNA<sup>Glu</sup>基因)设计了引物和Taq Man探针;而在SYBR Green染料检测模式下设计的一对引物可同时扩增出G基因中285bp的片段和IA基因(tDNA<sup>Ile</sup>+tDNA<sup>Ala</sup>基因)中222bp的片段。35株阪崎肠杆菌和88株非阪崎肠杆菌两种方法检测结果准确率都为100%。经25h增菌后,最

表2 荧光定量PCR方法检测阪崎肠杆菌  
Table 2 Real-time PCR assays for *E. sakazakii*

荧光PCR	靶基因	引物、探针序列(5'-3')	片段大小/bp	参考文献
SYBR-Green	ITS 序列	1:TATAGGTTGCTGCGAAAGCG: 2:GTCTTCGTGCTGCGAGTTTG	285 和 222	[30]
		1:CAAGTCGAACGGTAACAGGG 2:GTCCCCCACTTTGGTCCG		
	16S rRNA	P:FAM-TGCTGCTCTGCTGACGAGTGGC-DarkQuencher	149	[12]
		1:TAACAGGGAGCAGCTTGCTGCTCTG 2:CGGGTAACGTCAATTGCTGCGGT		
Taq Man	ITS 序列	P:FAM-CCGCATAACGTCTACGGACCAAA-TAMRA	462	[31]
		1:CCGGAACAAGCTGAAAATTGA 2:TCTTCGTGCTGCGAGTTTG		
	MMS	P:FAM-ACTCTGACACACCGCGCATTCCTG-TAMRA	98	[30]
		1:GGGATATTGTCCCCTGAAACAG 2:CGAGAATAAGCCGCGCATT		
	OmpA	P:FAMAGAGTAGTAGTTGTAGAGGCCGTGCTTCCGAAAAG-TAMRA	78	[11]
		1:GGTGAAGGATTTAACCGTGAACCT 2:GCGCCTCGTTATCATCCAAA		
		P:FAM-CCCGGAAAAGCGCATGGCC-BHQ	70	[8]

低检测限可达 1.1CFU/100g 婴儿配方粉。2005 年通过审定的《SN/T 1632.3—2005 奶粉中阪崎肠杆菌检测方法》行业标准中荧光定量 PCR 的检测方法也是针对阪崎肠杆菌的 ITS 序列<sup>[32]</sup>。

针对阪崎肠杆菌大分子合成(MMS)操纵子基因, Seo 等<sup>[11]</sup>建立了实时荧光定量 PCR 方法。用该方法对 58 株阪崎肠杆菌和 65 株非阪崎肠杆菌(其中 10 株肠杆菌)进行检测, 准确性为 100%, 灵敏性为 100CFU/mL PBS, 增菌后检测限可达到 0.6CFU/g 婴儿配方奶粉。最近, 该方法被 FDA 官方作为筛选和确认婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的一个方法<sup>[33]</sup>。

Kandhai 等<sup>[18]</sup>建立了根据 *ompA* 基因设计的 *TaqMan* 探针检测方法, 用该方法对 2001—2005 年荷兰市场上食品和环境阪崎肠杆菌的污染情况进行了调查。该方法能够很好地将阪崎肠杆菌与肠杆菌科其他属、种区分: 35 株阪崎肠杆菌均为阳性, 44 株其他菌都是阴性。

### 3 环介导恒温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)

LAMP 法是 2000 年新出现的核酸扩增方法。LAMP 法针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异的引物, 利用一种链置换 DNA 聚合酶在恒温条件保温几十分钟, 即可完成扩增反应, 具有高特异性和等温快速扩增的特点。

贺楠等<sup>[34]</sup>针对阪崎肠杆菌 16S rRNA 基因设计 LAMP 引物, 建立检测方法, 特异性和灵敏度均较高。用 LAMP 方法分别扩增阪崎肠杆菌标准株, 3 株参考株及 13 种近源菌株, 结果显示很好的特异性。最低检测限可达到 0.3pg 基因组 DNA, 灵敏度是对照的普通 PCR 方法<sup>[32]</sup>的 1000 倍。

胡连霞等<sup>[35]</sup>建立的 LAMP 检测方法以阪崎肠杆菌的 ITS 序列作为靶序列, 从设计的 1000 对引物中筛选得到特异引物, 纯菌检测灵敏度为 0.101CFU/mL, 人工污染阪崎肠杆菌的婴儿配方奶粉的检出限为 1.1CFU/g。张宏伟等<sup>[36]</sup>也利用阪崎肠杆菌 ITS 序列, 在比较阪崎肠杆菌与其近源株 ITS 序列的基础上, 设计了 4 条 LAMP 特异性引物, 建立了奶粉中阪崎肠杆菌 LAMP 检测方法。15 株阪崎肠杆菌和 61 株近源菌验证实验表明, 所建立的 LAMP 方法准确且灵敏度高。

### 4 探针方法

#### 4.1 荧光原位杂交(FISH)技术

FISH 是将细胞原位杂交技术和荧光技术有机结合而形成的技术。Almeida 等<sup>[37]</sup>报道了一种快速检测婴幼儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的 FISH 方法, 针对阪崎肠杆菌的 16S rRNA 设计了一条肽核酸(PNA)探针, 并建立了检测体系。检测结果具有很好的特异性和很高的灵敏性,

婴幼儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌经过 8h 的增菌后, 灵敏度为 1CFU/10g。

德国 Vermicon AG 公司也针对阪崎肠杆菌 16S rRNA 设计了荧光探针, 并建立了商品化的检测、鉴定系统。Lehner 等<sup>[17]</sup>根据操作指南进行检测, 并与普通 PCR 的检测方法进行对比。结果发现两者都具有很好的特异性。但相比较 PCR 方法荧光原位杂交不需要 DNA 提取的步骤, 方法更为快捷, 而且该方法原则上只能检测到活的菌体。

#### 4.2 基因芯片

基因芯片又称为 DNA 芯片、DNA 微矩阵, 该检测技术具有高通量、操作简便快速、特异性强, 敏感性高等优点。

Liu 等<sup>[15]</sup>利用基因芯片技术, 选择 ITS 序列作为目的片断进行扩增, 根据 6 株阪崎肠杆菌的 ITS 测序序列及 GenBank 序列信息, 设计两对引物和 10 条探针。选用 23 株阪崎肠杆菌和 65 株其他菌进行特异性检测, 没出现假阴性和假阳性。经过选择性富集, 检测的灵敏度为 1.3CFU/100g。

Wang 等<sup>[38]</sup>基于 ITS 序列和 O 抗原聚合酶基因设计了一种快速的基因芯片检测方法, 检测阪崎肠杆菌、沙门氏菌、李斯特氏菌等 10 种菌。两对引物和 27 条探针能够特异的检测 10 种致病菌, 灵敏度为 0.100ng DNA。

### 5 结 语

与其他食源性致病微生物相比, 阪崎肠杆菌并不能感染大多数人群, 发病率也不高, 但对于特殊人群却有着较高的致死率, 并且该菌的生存环境及致病机制并不是十分清楚。因此对于该菌的预防和检测尤为重要。

分子生物学技术应用于阪崎肠杆菌检测, 具有方法灵敏、特异性高, 检测时间短等优点, 克服了传统方法不利的问题。最近阪崎肠杆菌被定义为至少包括 6 个种的克罗诺杆菌属, 由于这 6 个种均被认为有致病性, 因此建立属特异性的分子检测方法是必要的。但由于该菌遗传的多样性和分类的复杂性, 各菌株 DNA 序列之间可能存在较大的差异, 找到所有菌株共有的保守序列并建立合适的分子检测方法是不易的, 这也是针对不同靶基因的同种检测方法检测特异性存在差异的原因。再加上基于 DNA 的 PCR 扩增的检测技术在检测活细胞 DNA 中面临着挑战, 该技术在实际应用中受到了一定的限制。目前对于该菌还没有公认的分子检测方法。另外食源性病原菌通常要求鉴定到种水平, 而目前尚没有针对克罗诺杆菌属单一种的分子检测方法。在今后的研究中需要筛选出种特异性的 DNA 序列, 为建立种特异性的分子检测方法提供依据。综上所述, 建立高特异性、高灵敏性、高稳定性和低成本的克罗诺杆菌种属分子检测方法有待于进一步的研究。

## 参考文献:

- [1] HEALY B, COONEY S, O'BRIEN S, et al. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen[J]. Foodborne Pathog Dis, 2010, 7(4): 339-50.
- [2] 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 malonicus* 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.
- [3] ICMSF. Microbiological testing in food safety management: volume 7 [R]. New York: Academic/Plenum Publishers, 2002.
- [4] FAO/WHO. 2008. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Microbiological risk assessment series No. 15. Rome[C]. FAO and WHO Meeting, Washington DC, USA, 2008 July 15-18.
- [5] 裴晓燕, 刘秀梅. 中国市售配方粉中阪崎肠杆菌和其它肠杆菌的污染状况[J]. 中国食品学报, 2006, 6(5): 6-10.
- [6] FRIEDEMANN M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages(other than infant formula and milk powder)[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(1): 1-10.
- [7] KANDHAI M C, REIJ M W, GORRIS L G, et al. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households [J]. Lancet, 2004, 363: 39-40.
- [8] KANDHAI M C, HEUVELINK A E, REIJ M W, et al. A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in The Netherlands between 2001 and 2005[J]. Food Control, 2010, 21(8): 1127-1136.
- [9] U. S. Food and Drug Administration. Isolation and enumeration of from dehydrated powdered infant formula. 2002[EB/OL]. (2009-06-18)[2010-10-10]. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucml14665.htm>.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.40 — 2010 食品卫生微生物学检验 阪崎肠杆菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [11] SEO K H, BRACKETT R E. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(1): 59-63.
- [12] MALORNY B, WAGENER M. Detection of *Enterobacter sakazakii* strains by real-time PCR[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(8): 1623-1627.
- [13] LEHNER A, TASARA T, STEPHAN R. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification[J]. BMC Microbiol, 2004, 4(1): 43, doi: 10.1186/1471-2180-4-43.
- [14] 高旗利, 张霞, 罗茂凤, 等. 奶粉中阪崎肠杆菌 PCR 检测方法研究[J]. 检验检疫科学, 2005, 15(4): 4-8.
- [15] LIU Yin, GAO Qili, ZHANG Xia, et al. PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula[J]. Molecular and Cellular Probes, 2006, 20(1): 11-17.
- [16] MOHAN NAIR M K, 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.
- [17] LEHNER A, NITZSCHE S, BREEUWER P, et al. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection[J]. BMC Microbiol, 2006, 6(1): 15, doi: 10.1186/1471-2180-6-15.
- [18] 叶应旺, 吴清平, 郭伟鹏, 等. PCR 快速检测奶粉中阪崎肠杆菌研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(3): 422-424; 467.
- [19] YE Yingwang, WU Qingping, LIN Yao, et al. A comparison of polymerase chain reaction and international organization for standardization methods for determination of *Enterobacter sakazakii* contamination of infant formulas from Chinese mainland markets[J]. Foodborne Pathog Dis, 2009, 6(10): 1229-34.
- [20] KEYSER M, WITTHUHN R C. Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket(UASB)-granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii*[J]. Biotechnol Lett, 2003, 25(22): 1893-1898.
- [21] 杨春华, 曹际娟, 桂家祥, 等. 乳及乳制品中阪崎肠杆菌PCR-DHPLC 检测新技术的建立[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1845-1849.
- [22] 周吉海, 侯殿东, 胡英, 等. PCR 法检测阪崎肠杆菌的研究[J]. 中国热带医学, 2008, 8(2): 186-187.
- [23] LEUSCHNER R G K, BAIRD F, DONALD B, et al. RETRACTED: a medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula[J]. Food Microbiology, 2004, 21(5): 527-533.
- [24] LEHNER A, GRIMM M, RATTEI T, et al. Cloning and characterization of *Enterobacter sakazakii* pigment genes and in situ spectroscopic analysis of the pigment[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 265(2): 244-248.
- [25] CAWTHORN D M, BOTHA S, WITTHUHN R C. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 127(1/2): 129-138.
- [26] 叶应旺, 吴清平, 郭伟鹏, 等. 种特异性 PCR 快速检测奶粉中阪崎肠杆菌研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1192-1197.
- [27] ZHOU Yanhong, WU Qingping, XU Xiaoke, et al. Development of an immobilization and detection method of *Enterobacter sakazakii* from powdered infant formula[J]. Food Microbiology, 2008, 25(5): 648-652.
- [28] 梁会营, 侯殿东, 胡英, 等. 婴幼儿奶粉中病原菌多重 PCR 检测研究[J]. 中国热带医学, 2008, 8(10): 1685-1686; 1691.
- [29] 侯殿东, 周吉海, 胡英, 等. 阪崎肠杆菌和沙门菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 卫生研究, 2009, 38(3): 366-367.
- [30] LIU Yin, CAI Xiaoning, ZHANG Xia, et al. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 65(1): 21-31.
- [31] KANG S E, NAM Y S, HONG K W. Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* using TaqMan real-time PCR assay[J]. J Microbiol Biotechnol, 2007, 17(3): 516-9.
- [32] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1632.3 — 2005 奶粉中阪崎肠杆菌检验方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [33] CHEN Yi, SONG K Y, BROWN E W, et al. Development of an improved protocol for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(6): 1016-1022.
- [34] 贺楠, 雷质文, 高宏伟, 等. 阪崎肠杆菌环介导恒温扩增方法检测[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(4): 509-511.
- [35] 胡连霞, 张伟, 张先舟, 等. 改良环介导等温扩增技术快速检测婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 378-382.
- [36] 张宏伟, 于佳, 郑文杰, 等. 利用环介导等温扩增技术对奶粉中阪崎肠杆菌进行检测[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6): 114-117.
- [37] ALMEIDA C, AZEVEDO N F, IVERSEN C, et al. Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Cronobacter* genomospecies (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(9): 2925-2930.
- [38] WANG Min, CAO Boyang, GAO Qili, et al. Detection of *Enterobacter sakazakii* and other pathogens associated with infant formula powder by use of a DNA microarray[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(10): 3178-3184.