

## 婴幼儿食品源阪崎克罗诺杆菌的 3 种分型方法

杨秋萍<sup>1</sup>, 阎彦霏<sup>1</sup>, 张艳<sup>2</sup>, 曹晨阳<sup>1</sup>, 盛焕精<sup>1</sup>, 崔生辉<sup>3</sup>, 杨保伟<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>西北农林科技大学食品科学与工程学院 陕西杨凌 712100

<sup>2</sup>富平县检验检测中心(陕西省羊乳产品质量监督检验中心) 陕西富平 711700

<sup>3</sup>中国食品药品检定研究院 北京 100050)

**摘要** 阪崎克罗诺杆菌污染婴幼儿食品可能导致新生儿和婴幼儿脑膜炎、败血症和坏死性小肠结肠炎,对其健康造成严重威胁。采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)、多位点序列分型(MLST)和肠杆菌间保守重复序列 PCR(ERIC-PCR)对分离于婴幼儿配方乳粉、米粉和辅食中的阪崎克罗诺杆菌进行分子分型,计算 3 种分型方法的辛普森多样性指数(DI)值,评价 3 种方法的分型效率,以便精确和快速开展阪崎克罗诺杆菌流行病学研究。PFGE、MLST 和 ERIC-PCR 可分别将 37 株阪崎克罗诺杆菌分为 35 个 PFGE 基因型、28 个 ERIC-PCR 型和 23 个序列(ST)型,分型结果的 DI 值分别为 99.55%、96.40%和 98.05%。3 种方法对阪崎克罗诺杆菌均具有较高的分型能力,其中 PFGE 分型能力最高,分型效率最佳。

**关键词** 阪崎克罗诺杆菌; 脉冲场凝胶电泳; 多位点序列分型; 肠杆菌间保守重复序列 PCR

**文章编号** 1009-7848(2022)05-0358-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.05.038

克罗诺杆菌(*Cronobacter*, 原称阪崎肠杆菌)是一种食源性条件致病菌,可导致各年龄段人群感染,尤其是新生儿、早产儿、老年人和免疫力低下的人群。感染后可引起败血症、神经炎、脑脊髓炎、脑脓肿、脑积水和坏死性小肠结肠炎<sup>[1-2]</sup>。目前,已报道在婴幼儿配方乳粉和谷类辅助食品、奶酪、蔬菜、谷物等食品中检出克罗诺杆菌<sup>[3-4]</sup>。食品污染克罗诺杆菌后会对人体健康构成危害,然而,不是所有克罗诺杆菌都可导致人患病。研究发现,阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter Sakazakii*)、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌(*Cronobacter malonaticus*)和苏黎世克罗诺杆菌(*Cronobacter turicensis*)是引起新生儿和婴儿脑膜炎、败血症和坏死性小肠结肠炎的常见类型<sup>[5-7]</sup>。摄入被阪崎克罗诺杆菌污染的婴幼儿配方乳粉是导致新生儿和婴儿感染的主要原因<sup>[8]</sup>,感染引起的死亡率为 40%~80%<sup>[9-10]</sup>。对婴儿配方乳粉中阪崎克罗诺杆菌进行检测和追溯,对保障新生儿和婴儿食品安全至关重要。

对致病菌分型是追溯其来源的关键。应用于阪崎克罗诺杆菌的分型方法主要有表型和分子分型,其中分子分型技术被认为是追溯微生物来源的最有力工具。目前已有脉冲场凝胶电泳(Pulse

field gel electrophoresis, PFGE)、随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD)、多位点序列分型 (Multilocus sequence typing, MLST)、多位点可变数目串联重复序列分析(Multiple locus variable-number tandem repeat analysis, MLVA)、肠杆菌间保守重复序列 PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR, ERIC-PCR)和全基因组测序(Whole genome sequencing, WGS)等分型方法被用于阪崎克罗诺杆菌分型<sup>[6,11]</sup>,然而,不同方法有着各自的特点和局限。PFGE 分辨率高,是细菌分型的“金标准”,也是流行病爆发调查和食源性病原菌监测中最为常用的方法<sup>[12]</sup>。然而,PFGE 不能对基因组上缺乏 *Xba* I 等限制性内切酶酶切位点的菌株进行分型,也不能用于阪崎克罗诺杆菌鉴定,不能确切反映菌株间的系统发育关系等缺陷<sup>[6]</sup>。MLST 分型重复性好、分辨率高,可根据 *fusA* 等管家基因对克罗诺杆菌进行鉴定,分型结果也可以上传至 MLST 数据库(<http://pubmlst.org/cronobacter/>),进行长期流行病学研究,然而,MLST 分型方法不适用于管家基因序列高度一致的菌株<sup>[6,11]</sup>。ERIC-PCR 具有快速、简便、廉价的特点,可用于管家基因序列相似及不同克罗诺杆菌菌株的流行病学和遗传多样性研究<sup>[13]</sup>。

分型方法分型能力的高、低对病原菌溯源和

收稿日期: 2021-05-22

作者简介: 杨秋萍(1996—),女,硕士生

通信作者: 杨保伟 E-mail: ybw090925@163.com

流行病学调查有着重要意义。本研究分别采用 PFGE、MLST 和 ERIC-PCR 分型方法对分离于不同地区,不同品牌婴幼儿配方乳粉、米粉和辅食中的阪崎克罗诺杆菌进行分型,比较3种分型方法的分型能力,以确定更适于阪崎克罗诺杆菌的分型方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

供试阪崎克罗诺杆菌共37株,分离于2010年7月至2012年7月间采集自陕西省宝鸡市、蔡家坡、杨凌、西安市、眉县、岐山县、周至县、扶风县、武功县、兴平市和乾县部分超市、母婴专卖店的婴幼儿配方乳粉、米粉和辅食(表1)。

### 1.2 试剂与仪器

1.2.1 培养基和试剂 Luria-Bertani(LB)营养琼脂、Luria-Bertani(LB)肉汤、胰蛋白大豆琼脂(Tryptic Soy Agar, TSA)购自北京陆桥技术股份有限公司。

Taq DNA 聚合酶、ExTaq DNA 聚合酶、dNTPmix、10×PCR 缓冲液、DL2000 DNA Ladder、蛋白酶 K(含缓冲液)和限制性内切酶 *Xba* I 均购于宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa);DNA 提取试剂盒购于北京康为试剂科技有限公司;十二烷基磺酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris-HCl)、乙二胺四乙酸(EDTA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)等均购自 Sigma 公司;PFGE 专用低熔点琼脂糖(SeaKem Gold Agarose)购自美国 Cambrex Bio Science 公司。

1.2.2 主要仪器与设备 GelDocXR 凝胶成像系统、170-3672 脉冲场凝胶电泳系统、MyCyclerPCR 仪、Bio-Rad 公司;超 NU-425-400E 净工作台,苏州净化设备有限公司;GNP-9080 隔水式恒温培养箱,北京科伟实验仪器有限公司;MDF-U5411 高压灭菌锅,上海申安高压仪器设备有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 PFGE 分型 PFGE 分型方法主要按照美国疾病预防控制中心(the Centers for Disease Control and Prevention, CDC)颁布的应用于食源性疾病预防网 PulseNet 中的 PFGE 标准方法。400  $\mu$ L 菌悬液中加入 20  $\mu$ L 蛋白酶 K 后与 400  $\mu$ L 含

SDS 的 Seakem Gold 琼脂糖快速混匀、冷却凝固。加入 5 mL 细胞裂解缓冲液(Cell lysis buffer, CLB)和 25  $\mu$ L 蛋白酶 K 裂解细菌,于 54  $^{\circ}$ C、150~175 r/min 恒温水浴摇床中裂解 1.5~2 h。用无菌超纯水和 TE 缓冲液洗涤裂解细胞后,用 200  $\mu$ L 含有限制性内切酶 *Xba* I 及其缓冲液的混合液于 37  $^{\circ}$ C 恒温水浴中孵育 1.5~2 h。吸出酶切混合液,加入 200  $\mu$ L 0.5×TBE 缓冲液,终止反应。PFGE 电泳结束后,溴化乙锭染色 30 min;去离子水洗剂 2 次,TE 缓冲液洗剂 3 次,每次 15 min。脱色的琼脂糖凝胶用凝胶成像系统拍照。利用 BioNumerics 3.0 软件对 PFGE 结果进行聚类分析。

1.3.2 MLST 分型 用基因组 DNA 提取试剂盒抽提阪崎克罗诺杆菌基因组 DNA 作为模板,参考克罗诺杆菌 MLST 分型官方数据库(<http://pubmlst.org/cronobacter/>)公布的阪崎克罗诺杆菌 MLST 分型管家基因 *atpD*、*fusA*、*glnS*、*gltB*、*gyrB*、*infB* 和 *pps* 种类、扩增和测序引物序列进行 PCR 扩增和测序。PCR 扩增反应总体系为 50  $\mu$ L,包括 5  $\mu$ L 10×Pfu 缓冲液,5  $\mu$ L dNTP Mix(2 mmol/L),1  $\mu$ L Pfu DNA 聚合酶,引物各 0.5  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L),36  $\mu$ L 超纯水,2  $\mu$ L 模板 DNA;反应条件为 94  $^{\circ}$ C 10 min;94  $^{\circ}$ C 1 min,60  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。除 *gltB* 扩增的退火温度为 63  $^{\circ}$ C 外,其余 6 个基因均为 60  $^{\circ}$ C。PCR 产物由上海桑尼生物技术有限责任公司纯化后测序,测序结果与克罗诺杆菌 PubMLST 数据库(<http://pubmlst.org/cronobacter/>)比对获得 Sequence Type(ST)型。

1.3.3 ERIC-PCR 分型 用 1.3.2 节中抽提的基因组 DNA 作为模板,上游引物:5'-ATG-TAAGCTCCTGGGGATTAC-3',下游引物:5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3',PCR 扩增总体系为 25  $\mu$ L,包括 13.15  $\mu$ L 超纯水,1.5  $\mu$ L Mg-Cl<sub>2</sub>(25 mmol/L),2  $\mu$ L dNTP(2.5 mmol/L),2.5  $\mu$ L 10×PCR 缓冲液,引物各 0.3  $\mu$ L(50 pmol/L),0.25  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶,5  $\mu$ L 模板。PCR 扩增条件为 95  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 45 s,52  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 5 min,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增后取 5  $\mu$ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,使用凝胶成像系统照相。采用“1”“0”记带法,同一位点有扩增带的记为“1”,无扩增带记为“0”。使用 R 软件包

(版本 3.4.4)和 Pheatmap 软件包(版本 3.0.1)进行聚类分析。

### 1.4 辛普森多样性指数(DI 值)

根据辛普森多样性指数方程计算 3 种分子分型方法的 DI 值, 根据 DI 值判断分型方法分辨率高低。DI 值越大, 分型能力越强<sup>[14]</sup>。

$$DI(\%)=1-\frac{1}{N(N-1)}\sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

式中,  $N$ ——菌株总数;  $S$ ——被描述的类型总数;  $n_j$ —— $j$  型的菌株总数。

## 2 结果与分析

### 2.1 阪崎克罗诺杆菌 PFGE 分型

PFGE 分型结果如图 1 所示。37 株阪崎克罗诺杆菌可被分为 35 个 PFGE 带型, 分别命名为 PT01~PT35, 其中 PT28 包含 3 株菌, 其余 34 个 PT 型各含 1 株菌。菌株 PFGE 带谱相似度范围为 92%~100%, 分型后没有明显的优势带谱。菌株 14-4(2)和 14-4(1)分离于陕西省兴平市同一品

牌的婴幼儿配方乳粉, 菌株 12-12(2)分离于陕西省西安市的婴儿辅食奶糕粉, 3 株菌带谱相同, 为 PT28 型。菌株 15-17(2)、15-8(2)和菌株 14-20(2)PFGE 带谱相似性为 99%, 其中 15-17(2)和 15-8(2)来源于同一地区采集的米粉, 而 14-20(2)来自其它地区的婴幼儿配方奶粉。PFGE 分型方法分型能力较高, 可对不同来源的菌株进行相似性和溯源分析。

### 2.2 阪崎克罗诺杆菌 MLST 分型

MLST 分型结果表明, 37 株菌株可被分为 23 种 ST 型, 其中 ST1、ST4、ST93 型菌株各有 4 株, ST444 型 3 株菌, ST12、ST451 和 ST449 各 2 株, 其余 16 种 ST 型各 1 株。23 种 ST 型中, 有 13 个 ST 型(ST441、ST442、ST443、ST444、ST445、ST446、ST447、ST448、ST449、ST450、ST451、ST452 和 ST453)为克罗诺杆菌 MLST 数据库没有记录的 ST 型。2-9(1)、35-15-1、36-8-1、6-16(1)为与新生儿脑膜炎相关的 ST4 型。其中, 36-8-1 或 6-16(1)分别来源于同一地区的米粉和婴幼儿配方奶粉, 2-9

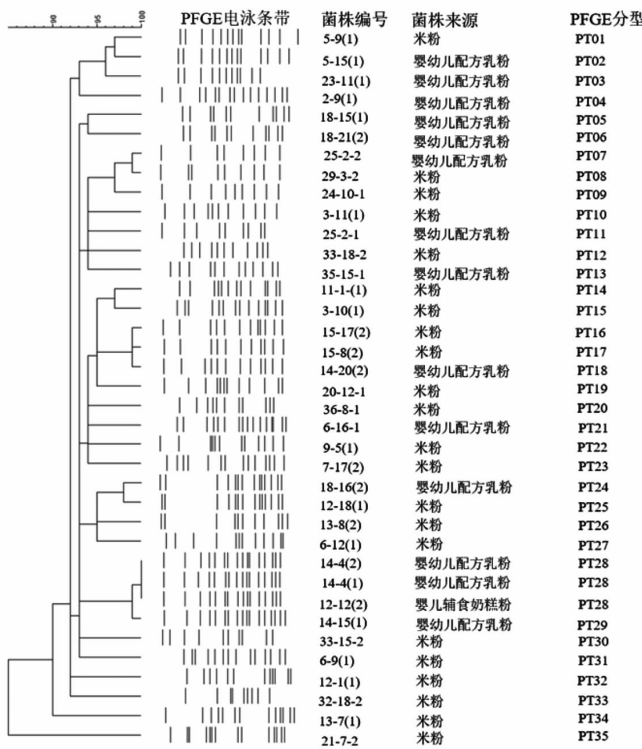
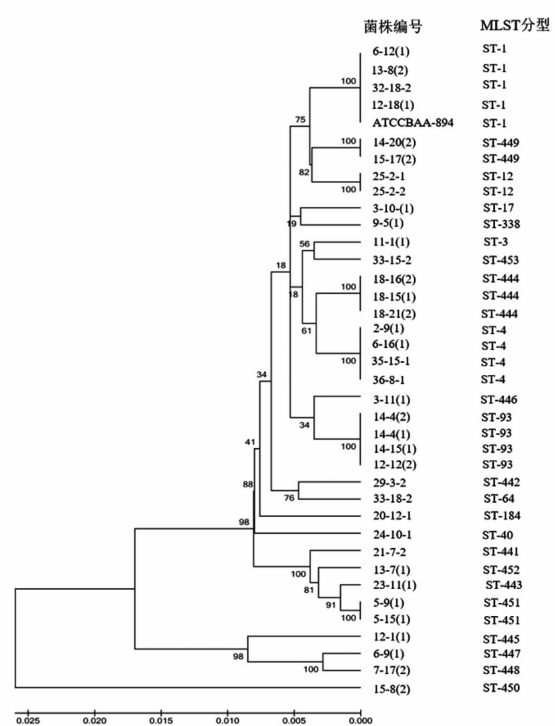


图 1 阪崎克罗诺杆菌 PFGE 分型及聚类分析

Fig.1 PFGE typing and cluster analysis of *Cronobacter sakazakii*



注: 6-12-1 为菌株编号, ST-1 表示该菌株的 ST 分型。

图 2 阪崎克罗诺杆菌 MLST 分型结果及聚类分析

Fig.2 MLST subtyping and cluster analysis of *Cronobacter sakazakii*

(1)、35-15-1 和 6-16(1)为来源于不同地区的婴幼儿配方奶粉,且 35-15-1 和 6-16(1)是为同一品牌。MLST 方法也具有较高的分型能力,可用于追溯食品中阪崎克罗诺杆菌污染源(表 1,图 2)。

表 1 阪崎克罗诺杆菌来源及 MLST 分型结果

Table 1 The source and MLST sutyping of *Cronobacter sakazakii*

菌株编号	地点	食品	PFGE	ERIC-PCR	MLST
5-9(1)	杨凌	米粉	PT01	ET15	ST451
5-15(1)	宝鸡市	婴幼儿配方奶粉	PT02	ET09	ST451
23-11(1)	杨凌	婴幼儿配方奶粉	PT03	ET27	ST443
2-9(1)	武功县	婴幼儿配方奶粉	PT04	ET03	ST4
18-15(1)	武功县	婴幼儿配方奶粉	PT05	ET25	ST444
18-21(2)	武功县	婴幼儿配方奶粉	PT06	ET25	ST444
25-2-2	岐山县	婴幼儿配方奶粉	PT07	ET20	ST12
29-3-2	眉县	米粉	PT08	ET28	ST442
24-10-1	宝鸡市	米粉	PT09	ET23	ST40
3-11(1)	杨凌	米粉	PT10	ET06	ST446
25-2-1	岐山县	婴幼儿配方奶粉	PT11	ET22	ST12
33-18-2	周至县	米粉	PT12	ET21	ST64
35-15-1	蔡家坡	婴幼儿配方奶粉	PT13	ET18	ST4
11-1(1)	西安市	米粉	PT14	ET28	ST3
3-10-(1)	杨凌	米粉	PT15	ET28	ST17
15-17(2)	杨凌	米粉	PT16	ET14	ST449
15-8(2)	杨凌	米粉	PT17	ET16	ST450
14-20(2)	兴平市	婴幼儿配方奶粉	PT18	ET14	ST449
20-12-1	西安市	米粉	PT19	ET26	ST184
36-8-1	扶风县	米粉	PT20	ET28	ST4
6-16(1)	扶风县	婴幼儿配方奶粉	PT21	ET24	ST4
9-5(1)	乾县	米粉	PT22	ET10	ST338
7-17(2)	岐山县	米粉	PT23	ET08	ST448
18-16(2)	武功县	婴幼儿配方奶粉	PT24	ET19	ST444
12-18(1)	西安市	米粉	PT25	ET27	ST1
13-8(2)	宝鸡市	米粉	PT26	ET17	ST1
6-12(1)	扶风县	米粉	PT27	ET13	ST1
14-4(2)	兴平市	婴幼儿配方奶粉	PT28	ET02	ST93
14-4(1)	兴平市	婴幼儿配方奶粉	PT28	ET12	ST93
12-12(2)	西安市	奶糕粉	PT28	ET01	ST93
14-15(1)	兴平市	婴幼儿配方奶粉	PT29	ET11	ST93
33-15-2	周至县	米粉	PT30	ET04	ST453
6-9(1)	宝鸡市	米粉	PT31	ET07	ST447
12-1(1)	西安市	米粉	PT32	ET05	ST445
32-18-2	乾县	米粉	PT33	ET04	ST1
13-7(1)	宝鸡市	米粉	PT34	ET10	ST452
21-7-2	杨凌	米粉	PT35	ET27	ST441

### 2.3 阪崎克罗诺杆菌 ERIC-PCR 分型

ERIC-PCR 分型后,各菌株扩增得到的 DNA 条带数目为 2~6 条,扩增片段长度均在 100~2 000 bp 之间。37 株菌株可被分为 28 个亚型,分

别命名为 ET01~ET28。其中,ET28 型有 4 株菌,ET27 型有 3 株菌,ET4、ET10、ET14 和 ET25 各有 2 株菌,其余 ET 型均有 1 株菌。同属 ET28 型的 4 株菌分离于不同地区采集的米粉。23-11(1)、12-



18 (1) 和 21-7-2 的 ERIC-PCR 分型结果为 ET27 型, 菌株 23-11(1) 和 21-7-2 分离于陕西杨凌采集婴幼儿配方奶粉和米粉, 12-18(1) 分离于西安

采集米粉。ERIC-PCR 分型结果聚类分析表明, 分离于不同地区不同食品的阪崎克罗诺杆菌可能具有相同基因型, 可用于阪崎克罗诺杆菌溯源分析。

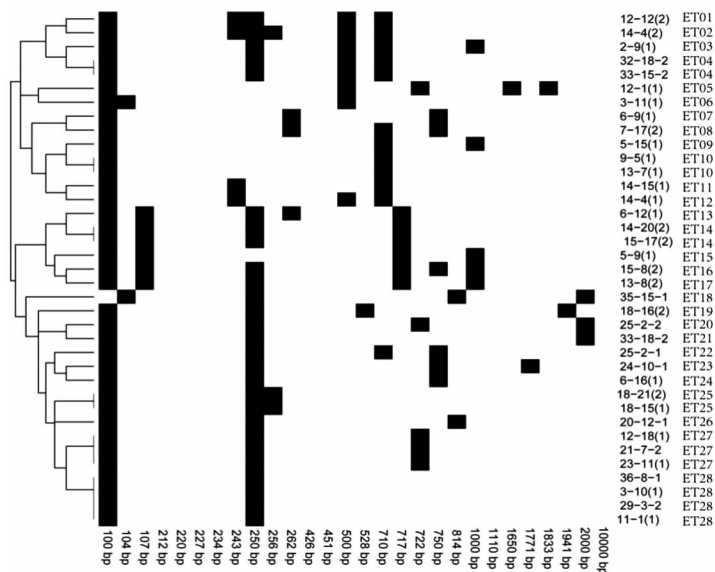


图3 ERIC-PCR 结果聚类分析

Fig.3 Cluster analysis of ERIC-PCR results

#### 2.4 PFGE、MLST 和 ERIC-PCR 分型比较

对 37 株菌的 PFGE 和 MLST 分型结果进行比较, 以相似度 100% 为临界值, PFGE 和 MLST 的 DI 值分别为 99.55% 和 96.40%。DI 值越高, 对菌株的鉴别能力越强, 因此 PFGE 的分型能力高于 MLST 分型。总体而言, PFGE 与 MLST 分型结果相似, 具有相同 ST 型菌株的 PFGE 分型相似度不低于 94%。菌株 14-4(2)、14-4(1) 和 12-12(2) MLST 分型为 ST93, PFGE 带型为 PT28。然而, 也有菌株具有相同 ST 型而 PFGE 分型略有差异的情况, 如菌株 14-20(2) 和 15-17(2) MLST 型为 ST449, PFGE 图谱相似度为 98%; 菌株 2-9(1)、35-15-1、36-8-1 和 6-16(1) 为 ST4 型, PFGE 条带也存在差异。

以相似性 100% 为临界值, PFGE 和 ERIC-PCR 分型的 DI 值分别为 99.55% 和 98.05%, PFGE 对阪崎克罗诺杆菌分辨率略高于 ERIC-PCR。ERIC-PCR 分型中菌株 32-18-2 和 33-15-2 同为 ET04 型, 而 PFGE 分型相似性为 92%; 菌株 15-17(2) 与 14-20(2) 同为 ET14 型, PFGE 分型相似性为 99%。菌株 14-4(2)、14-4(1) 和 12-12(2) PFGE

分型为 PT28, ERIC-PCR 电泳图谱存在一定差异, 这表明 PFGE 和 ERIC-PCR 对阪崎克罗诺杆菌均有较高分型能力, 2 种方法分型结果略有差异。

MLST 和 ERIC-PCR 分别将 37 株菌分为 23 个 ST 型和 28 个不同的类群, 且 ERIC-PCR 的 DI 值大于 MLST 分型, 表明 ERIC-PCR 对阪崎克罗诺菌的分型能力强于 MLST 分型。ERIC-PCR 与 MLST 分型结果间存在一定的相似性, 如菌株 18-21(2) 和 18-15(1) 均为 ST444, ERIC-PCR 指纹图谱也相同。然而两种分型结果也存在差异, 如菌株 36-8-1、3-10(1)、29-3-2 和 11-1(1) 的 ERIC-PCR 分型相似性为 100%, 而 ST 型各不相同。

### 3 讨论与结论

传统的表型分型方法如血清学分型不利于对菌株进行亲缘性分析和溯源, 基于细菌 DNA 的分子分型技术则在研究菌株间关系、确定感染源等方面表现出明显的优势, 在食品安全检测和病原菌分型研究中起到关键作用。本研究通过比较 PFGE、ERIC-PCR 和 MLST 3 种分子分型方法对分离于婴幼儿食品源的 37 株阪崎克罗诺杆菌的

分型能力,以确定 3 种分型方法在食源性阪崎克罗诺杆菌风险监测和溯源中的优势和局限。

PFGE 分型是针对菌株基因组,通过不同的限制性内切酶将细菌基因组酶切为不同片段,再外加变化的电场,从而产生不同的基因指纹图谱,以分析菌株相似性和亲缘关系<sup>[15]</sup>。周厚德等<sup>[4]</sup>采用 PFGE 将 24 株来源于市售婴幼儿食品的克罗诺杆菌分成 22 个 PFGE 基因指纹图谱 PFGE 型别高度多样性。张彩霞等<sup>[16]</sup>对 68 株食品源阪崎克罗诺杆菌进行 PFGE 分型,可分为 58 个 PFGE 带型,且带型较分散。本研究的 37 株婴幼儿食品源阪崎克罗诺杆菌可分为 35 个 PFGE 带型,且 DI 值为 99.55%,表明 PFGE 对阪崎克罗诺杆菌具有较高的分型能力。PFGE 分辨率高的优势,有利于菌株之间的亲缘性分析和溯源,从而快速分析出感染源,减少致病菌造成的危害。然而,由于 PFGE 具有较低的重现性、无法识别酶切位点外的差异和不具备鉴定菌株的能力<sup>[6]</sup>,因此不利于长期的流行病学监测或研究菌株之间的进化和种系关系。

ERIC-PCR 是以肠杆菌间保守重复序列设计引物,PCR 扩增后产生不同的 DNA 图谱,从而对细菌进行分型和遗传分析。Babak 等<sup>[17]</sup>采用 ERIC-PCR 对从 364 个婴幼儿配方奶粉样品中分离的 25 株阪崎克罗诺杆菌进行分子分型,菌株被分为 8 种不同的类型且具有高度的遗传多样性。Ye 等<sup>[18]</sup>利用 ERIC-PCR 分型方法将 22 株来源于婴幼儿配方奶粉的阪崎肠杆菌分为 16 个 ERIC-PCR 指纹图谱,且 DI 值为 93.3%,表明 ERIC-PCR 具有较高的区分能力,并显示了阪崎肠杆菌的遗传多样性,同时作者认为 ERIC-PCR 分型方法可用于追踪食物链中阪崎肠杆菌的来源。本研究中 37 株阪崎克罗诺杆菌具有 28 种 ERIC-PCR 指纹图谱,DI 值为 98.05%,这也表明 ERIC-PCR 同样具有较强的分型能力。此外,ERIC-PCR 具有快捷、简便等优势可使其迅速分析菌株之间遗传多样性和亲缘性,从而可快速展开流行病学调查,然而 PCR 扩增结果影响因素多,需不断优化试验。

MLST 是通过扩增菌株的管家基因,比较管家基因的核苷酸序列差异从而对菌株进行分型,已广泛用于即食食品、婴幼儿配方奶粉、奶粉等食品

中分离阪崎克罗诺杆菌分型<sup>[19-20]</sup>。同时,已有研究发现阪崎克罗诺杆菌 ST 型与特定感染相关,如 ST4 型与新生儿脑膜炎有关<sup>[21]</sup>。本研究中 37 株阪崎克罗诺杆菌具有 23 个 ST 型,DI 值为 96.04%,表明 MLST 同样具有较高的分辨率,其中有 4 株阪崎克罗诺杆菌为 ST4 型,对婴幼儿健康造成威胁。MLST 分型可用于评估菌株潜在致病性。此外,已建立在线数据库可实现数据的全球共享和比对,有利于长期流行病学调查。

PFGE、MLST 和 ERIC-PCR 3 种分子分型方法均有较高的分型能力,已有文献比较这 3 种分型方法对空肠弯曲菌和大肠杆菌的分型能力,结果也表明 3 种方法均有高度的辨识度,其中 PFGE 分辨率最高,其次是 ERIC-PCR 和 MLST<sup>[22]</sup>。然而,目前未有文献比较这 3 种分型方法对阪崎克罗诺杆菌的分型能力。本研究结果表明 PFGE 对阪崎克罗诺杆菌的分型能力最强,而 MLST 分型的能力相对最弱,这与已报道 PFGE 分型方法对阪崎克罗诺杆菌、阪崎肠杆菌、气单胞菌、大肠埃希菌、空肠弯曲菌、沙门氏菌、李斯特菌和铜绿假单胞菌等菌株的分型能力均略强于 ERIC-PCR 结果一致<sup>[23-28]</sup>。此外,目前虽尚未有研究比较 MLST 和 ERIC-PCR 2 种分型方法对阪崎克罗诺杆菌的分型效果,但 ERIC-PCR 对肺炎克雷伯菌、空肠弯曲菌等致病菌的分型能力高于 MLST<sup>[29-30]</sup>。根据对菌株的分型能力而言,3 种分型方法中 PFGE 分辨率最高。

细菌分型在食品安全监控和流行病学调查中发挥着重要作用,传统的表型方法和基于特定基因序列的分子分型方法已不能满足对菌株的精准溯源分析。基于细菌基因组分型技术可进一步对菌株进行精准分型,且具有重复性好、稳定等优点,同时随着基因组测序技术的发展以及测序费用降低,该技术可在风险监测和溯源中广泛应用。

## 参 考 文 献

- [1] STRYSKO J, COPE J R, MARTIN H, et al. Food safety and invasive cronobacter infections during early infancy, 1961-2018 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(5): 857-865.

- [2] 韩冉. 阪崎克罗诺杆菌间毒力比较与致病因子研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2014.  
HAN R. Virulence comparison and pathogenic factors screening of *Cronobacter sakazakii*[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2014.
- [3] JARADAT Z W, AL MOUSA W, ELBETIEHA A, et al. *Cronobacter* spp. – opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits[J]. Journal of Medical Microbiology, 2014, 63(8): 1023–1037.
- [4] 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.  
ZHOU H D, PENG S L, LIU C W, et al. Analysis of the contamination, molecular typing and drug resistance of *Cronobacter* in infants and young children foods in Jiangxi province in 2018[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(4): 335–339.
- [5] 刘咪, 杨保伟, 夏效东, 等. 阪崎克罗诺杆菌致病性机理研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 329–333.  
LIU M, YANG B W, XIA X D, et al. Progress in understanding the pathogenic mechanism of *Cronobacter sakazakii*[J]. Food Science, 2014, 35(9): 329–333.
- [6] 费鹏, 杨同香, 姜亦超, 等. 克罗诺杆菌分型技术研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(21): 308–312.  
FEI P, YANG T X, JIANG Y C, et al. Progress in typing methods for *Cronobacter* spp.[J]. Food Science, 2017, 38(21): 308–312.
- [7] CHAUHAN R, SINGH N, PAL G K, et al. Trending biocontrol strategies against *Cronobacter sakazakii*: A recent updated review[J]. Food Research International, 2020, 137: 109385.
- [8] YAN Q Q, CONDELL O, POWER K, et al. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: A review of our current understanding of the biology of this bacterium[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(1): 1–15.
- [9] FORSYTHE S J. Updates on the *Cronobacter* genus[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2018, 9(1): 23–44.
- [10] FRIEDEMANN M. Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2009, 28(11): 1297–1304.
- [11] 田雪, 王娉, 陈颖, 等. 克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌)分子分型技术研究进展[J]. 卫生研究, 2014, 43(5): 862–866.  
TIAN X, WANG P, CHEN Y, et al. Progress in molecular typing for *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. Journal of Hygiene Research, 2014, 43(5): 862–866.
- [12] MELLES D C, VAN LEEUWEN W B, SNIJDERS S V, et al. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*[J]. J Microbiol Methods, 2007, 69(2): 371–375.
- [13] AWADALLAH M A I, AHMED H A, MERWAD A M A, et al. Molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* in Egypt, survival and thermoresistance at different temperatures: A potential public health risk[J]. Vector Borne & Zoonotic Diseases, 2018, 18(2): 101–107.
- [14] HUNTER P. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1988, 26(11): 2465–2466.
- [15] 何卓琳, 唐敏嘉, 蒲万霞. 大肠杆菌分子分型方法研究进展[J]. 中国草食动物科学, 2021, 41(5): 57–60.  
HE Z L, TANG M J, PU W X. Advance in molecular typing of *Escherichia coli* [J]. China Herbivore Science, 2021, 41(5): 57–60.
- [16] 张彩霞, 陈颖, 胡安妥, 等. 食品中阪崎克罗诺杆菌的药物敏感性及其分子分型研究[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(6): 123–129.  
ZHANG C X, CHEN Y, HU A T, et al. Drug sensitivity analysis and molecular typing of *Cronobacter sakazakii* isolated from food[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(6): 123–129.
- [17] BABAK P, WOLFRAM M B, SAMANEH A, et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* strains isolated from powdered infant formula milk[J]. Foods, 2020, 11(8): 1093.
- [18] YE Y, WU Q, XU X, et al. The phenotypic and

- genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* strains from infant formula milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93(6): 2315–2320.
- [19] 陈启明, 刘战民, 陆兆新. 克罗诺杆菌检测方法的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(24): 9281–9287.
- CHEN Q M, LIU Z M, LU Z X, et al. Research progress of detection methods of *Cronobacter* spp.[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(24): 9281–9287.
- [20] FEI P, MAN C X, LOU B B, et al. Genotyping and source tracking of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* isolates from powdered infant formula and an infant formula production factory in China[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2015, 81(16): 5430–5439.
- [21] JOSEPH S, FORSYTHE S J. Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(9): 1713–1715.
- [22] WARDAK S, JAGIELSKI M. Evaluation of genotypic and phenotypic methods for the differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* clinical isolates from Poland. II. PFGE, ERIC-PCR, PCR-flaA-RFLP and MLST[J]. *Medycyna Doświadczalna I Mikrobiologia*, 2009, 61(1): 63–77.
- [23] 张博. 源于羊奶粉生产过程各工序的阪崎克罗诺杆菌基因分型研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- ZHANG B. Study on genotyping of *Cronobacter Sakazakii* in production processes of infant formula goat milk powder factories[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017.
- [24] PROUDY I, BOUGLE D, COTON E, et al. Genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* isolates by PFGE, BOX-PCR and sequencing of the *fliC* gene[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 104(1): 26–34.
- [25] 黄玉萍, 邓玉婷, 姜兰, 等. 复合水产养殖环境中气单胞菌耐药性及其同源性分析[J]. *中国水产科学*, 2014(4): 777–785.
- HUANG Y P, DENG Y T, JIANG L, et al. Antimicrobial resistance and homology analysis in *Aeromonas* isolated from integrated fish farms [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014(4): 777–785.
- [26] CASAREZ E A, PILLAI S D, DI GIOVANNI G D. Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR [J]. *Water Research*, 2007, 41(16): 3643–3648.
- [27] LONDERO A, COSTA M, SUCARI A, et al. Comparison of three molecular subtyping techniques for *Listeria monocytogenes*[J]. *Revista Argentina De Microbiologia*, 2019, 51(4): 359–362.
- [28] SILBERT S, PFALLER M A, HOLLIS R J, et al. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli [J]. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 2004, 25(10): 847–851.
- [29] 李丽娟, 陈丹娜, 谢小燕, 等. 广东省东莞市56株高毒力肺炎克雷伯菌感染分布及分子流行病学研究[J]. *中国热带医学*, 2020, 20(10): 967–971, 983.
- LI L J, CHEN D N, XIE X Y, et al. Distribution and molecular epidemiology of 56 strains of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Dongguan, Guangdong[J]. *China Tropical Medicine*, 2020, 20(10): 967–971, 983.
- [30] 王寒. 四川部分地区禽源空肠弯曲菌的分离鉴定、分子分型及毒力相关基因检测[D]. 雅安: 四川农业大学, 2017.
- WANG H. Isolation, identification, molecular typing and virulence related gene detection of *Campylobacter jejuni* isolated poultry in some areas of Sichuan province[D]. Yanan: Sichuan Agricultural University, 2017.

### Subtyping of *Cronobacter sakazakii* Derived from Infant and Baby Food Using Three Molecular Typing Methods

Yang Qiuping<sup>1</sup>, Yan Yanfei<sup>1</sup>, Zhang Yan<sup>2</sup>, Cao Chenyang<sup>1</sup>, Sheng Huanjing<sup>1</sup>, Cui Shenghui<sup>3</sup>, Yang Baowei\*

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi

<sup>2</sup>Fuping Inspection and Testing center (Shaanxi Goat Milk Product Quality Supervision and Inspection Center), Fuping 711700, Shaanxi



<sup>3</sup>National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050)

**Abstract** *Cronobacter sakazakii* in infant and baby food can lead newborns and infants to infect meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis, and composed serious threat to their health. In this study, 3 molecular subtyping methods including pulse field gel electrophoresis(PFGE), multilocus sequence typing (MLST) and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR(ERIC-PCR) were used for *Cronobacter sakazakii* subtyping for its quick and accurate epidemiological investigation and analysis. *Cronobacter sakazakii* was isolated from infant formula milk powder, rice flour and complementary food. The classification and subtyping efficiency of the 3 methods were evaluated by Simpson's diversity index (DI) value. The results indicated that PFGE, MLST and ERIC-PCR classified 37 *Cronobacter sakazakii* isolates into 35 PFGE genotypes, 23 ST types and 28 different ERIC-PCR subtypes, respectively. DI values of PFGE, MLST and ERIC-PCR were 99.55%, 96.40% and 98.05%, respectively. Three molecular methods had high classification ability for *Cronobacter sakazakii* subtyping, among which, PFEG showed the highest subtyping ability and efficiency.

**Keywords** *Cronobacter sakazakii*; pulse field gel electrophoresis (PFGE); multi locus sequence typing (MLST); enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR)