



研究报告

食品中克罗诺杆菌属双重 PCR 检测试剂盒的评价

周杨¹ 万强¹ 蔡芷荷³ 卢勉飞¹ 吴清平^{*2} 李健顺³

1 广东环凯微生物科技有限公司 广东 广州 510663

2 广东省微生物研究所 广东 广州 510070

3 广东环凯生物科技有限公司 广东 肇庆 526238

摘要:【背景】在食品安全领域, 克罗诺杆菌属于需要重点监测的致病菌, 当前随着分子检测相关技术的不断发展, 研制有关食品中克罗诺杆菌简便、高效的检测产品至关重要。【目的】研制克罗诺杆菌检测的双重 PCR 检测试剂盒并评价其用于食品中克罗诺杆菌检测的实效性。【方法】优化双重 PCR 反应体系, 反应试剂采用冻干工艺, 确立了试剂盒组成, 并评价其特异性、灵敏度、重复性、保质期等性能指标。【结果】克罗诺杆菌标准菌株和分离菌株均在目标位置出现两条明显条带, 非克罗诺杆菌标准菌株和分离菌株均检测为阴性, 纯基因组 DNA 检测灵敏度为 2.3×10^{-1} ng/ μ L, 纯培养菌检验限为 3.2×10^4 CFU/mL; 对 65 份食品样品进行克罗诺杆菌检测, 该试剂盒检测结果与标准方法检测结果一致性较高; 批内、批间检测重复率均为 100%, 可在 42 °C 环境放置 120 h 且其检测效力不受影响, 4 °C 保质期可长达 12 个月。【结论】该试剂盒性能好, 检测结果稳定、可靠, 适用于食品中克罗诺杆菌的快速检测。

关键词: 克罗诺杆菌, 双重 PCR 检测试剂盒, 性能评价

Evaluation of duplex PCR detection kit for detection of *Cronobacter* in food samplesZHOU Yang¹ WAN Qiang¹ CAI Zhi-He³ LU Mian-Fei¹ WU Qing-Ping^{*2}
LI Jian-Shun³

1 Guangdong Huankai Microbial Science and Technology Co. Ltd., Guangzhou, Guangdong 510663, China

2 Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China

3 Guangdong Huankai Biological Science and Technology Co. Ltd., Zhaoqing, Guangdong 526238, China

Abstract: [Background] *Cronobacter* spp. are major foodborne pathogens that need to be intensively monitored for food safety. At present, with continuous development of the molecular detection technology, it is very important to develop simple and efficient detection methods for *Cronobacter* detection in food. [Objective] Develop duplex PCR detection kit for detecting *Cronobacter* and evaluate its detecting

Foundation items: Key Science and Technology Special Project of Guangdong Province (2015B020230006); Guangzhou Science and Technology Planning Project (201604016068); National Key Research and Development Program of China (2018YFC1604201)

*Corresponding author: Tel: 86-20-87688132; E-mail: wuqp203@163.com

Received: 15-01-2019; Accepted: 01-03-2019; Published online: 23-04-2019

基金项目: 广东省重大科技专项项目(2015B020230006); 广州市科技计划项目(201604016068); 国家重点研发计划(2018YFC1604201)

*通信作者: Tel: 020-87688132; E-mail: wuqp203@163.com

收稿日期: 2019-01-15; 接受日期: 2019-03-01; 网络首发日期: 2019-04-23

efficacy in food samples. **[Methods]** Duplex PCR reaction system was optimized and the components of the kit were confirmed. The main reaction reagents were made into powder pattern by freeze drying. Then the specificity, sensitivity, repeatability, shelf life and other performance indexes of the kit were evaluated. **[Results]** All *Cronobacter* standard strains and isolated strains were detected positive with two distinct bands in the target size, while all non-*Cronobacter* standard strains and isolated strains were detected negative without target band observed. The detection sensitivity of *Cronobacter* purified genomic DNA and pure cultures was respectively 2.3×10^{-1} ng/ μ L and 3.2×10^4 CFU/mL. *Cronobacter* in 65 food samples was detected. The detection result obtained by the kit was highly consistent with that obtained by conventional microbial detection method. The intra-batch and inter-batch testing repetition rates were all 100%. The kit had no efficacy loss after 120 h storage at 42 °C and 12 months at 4 °C. **[Conclusion]** The kit is stable, reliable, and applicable for rapid detection of *Cronobacter* in food.

Keywords: *Cronobacter*, Duplex PCR detection kit, Performance evaluation

克罗诺杆菌(*Cronobacter*)是常见的食源性致病菌,属于肠杆菌科(*Enterobacter*),曾先后被命名为黄色阴沟肠杆菌(Yellow-pigmented *E. cloacae*)^[1]和阪崎肠杆菌(*E. sakazakii*)^[2],目前将该类菌统称为克罗诺杆菌属^[3],主要包括阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)、都柏林克罗诺杆菌(*C. dublinensis*)、莫金斯克罗诺杆菌(*C. muytjensii*)、康帝蒙提克罗诺杆菌(*C. condimentii*)和尤尼沃斯克罗诺杆菌(*C. universalis*) 7种^[4-5],其中尤以 *C. sakazakii* 常见。大量研究数据以及机构组织均证实克罗诺杆菌作为一种条件致病菌,在人、动物肠道以及水、土壤等自然环境中均有分布^[6],可致使不同年龄段的人群发病,尤其是婴幼儿,严重时可引发脑膜炎、菌血症、坏死性小肠结肠炎以及神经系统损伤等病症,表现出极高的致死率^[7-8],而近年来国内外有关克罗诺杆菌感染的事件时有发生,且在各种奶制品中克罗诺杆菌污染的风险也很高^[9],加之对克罗诺杆菌的具体分布及致病机制尚不了解,因此对食品中克罗诺杆菌的监测至关重要。

当前已有多种有关克罗诺杆菌的检测方法,如 GB 4789.40-2016 法^[10]、酶联免疫法^[11]、实时荧光定量 PCR 法^[12]等,但这些方法多表现为检测周期长、操作复杂、仪器昂贵、检测成本高等局限性,因而在实际检测中迫切需要简便、快速、准确以及成本较低的方法。PCR 技术发展至今已十分成熟,

并且普通的 PCR 扩增仪应用也十分普遍,直接为不同致病微生物的检测提供基础。本研究中基于 PCR 技术,通过筛选获取克罗诺杆菌的特异性靶基因 *16S rDNA*^[13]和 *ompA*^[14]的高度保守区序列,开发了食品中克罗诺杆菌属双重 PCR 检测试剂盒,并根据相关行业标准和技术文件测试本试剂盒的效用,包括其检测体系优化、特异性、灵敏度、重复性以及保质期等指标。

1 材料与方法

1.1 菌株

选用标准菌株: *C. sakazakii* ATCC29544、*C. sakazakii* ATCC51329、*C. sakazakii* A108、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*) CMCC(B) 52204、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC9027、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*) CMCC(B)51105、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*) CMCC(B)50071、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) ATCC43864、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC6633、大肠埃希氏菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7) NTCT12900、大肠埃希氏菌 (*E. coli*) ATCC25922、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) CMCC(B)26069、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) CMCC(B)63303、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CMCC(B)26003、肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*) CMCC(B)50335、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogene*)

ATCC19115、乙型溶血性链球菌(*Beta-hemolytic streptococcus*) ATCC21059、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) Vbo、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) ATCC63501、军团菌(*Legionella pneumophila*) ATCC33152、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*) ATCC33291、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) ATCC13048、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*) CMCC(B)31001、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*) CMCC(B)49005、大肠埃希氏菌(*E. coli*) CMCC(B)44102、粪肠球菌(*Enterococcus faecali*) ATCC29212、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) ATCC33787、乙型副伤寒沙门氏菌(*S. paratyphi*) CMCC(B)50094、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC17802、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*) ATCC27562、福氏志贺氏菌(*S. flexneri*) CMCC(B)51572、白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC10231; 选用分离菌株: 克罗诺杆菌 117 株、*B. cereus* 26 株、*E. coli* 30 株、*S. aureus* 21 株、*L. monocytogene* 28 株、类志贺邻单胞菌(*Plesimonas shigelloides*) 11 株、土生乌拉尔氏菌(*Raoultella terrigena*) 15 株、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*) 13 株、*S. typhi* 21 株、*B. subtilis* 12 株、*C. jejuni* 17 株、*V. parahaemolyticus* 22 株以及 *E. faecali* 19 株。以上菌株均由广东环凯微生物科技有限公司提供。

1.2 主要试剂与仪器

克罗诺杆菌属双重 PCR 检测试剂盒共 6 批次(20161109、20161208、20170111、20170207、20170308、20170410)、缓冲蛋白胨水(BPW)、改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(mLST-Vm)、阪崎肠杆菌显色培养基、胰蛋白胨大豆琼脂

(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)、MID 生化鉴定试剂盒、氧化酶试剂, 广东环凯微生物科技有限公司; $MgCl_2$, 广州化学试剂厂; 引物合成, 生工生物工程(上海)股份有限公司; *Taq* DNA Polymerase、 $10\times$ PCR buffer、dNTPs 以及细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 广州东盛生物科技有限公司; 供试食品样品来自于广州地区 10 个不同市场, 包括婴幼儿奶粉、婴幼儿米粉、成人奶粉、巴氏奶、脱脂牛奶、酸奶共 6 类 60 份代表性食品, 另有人工污染样品 5 份。

高速振荡样品处理器、恒温培养箱、水浴恒温箱, 广东环凯微生物科技有限公司; PCR 仪, ABI 公司; 台式高速离心机, Sigma 公司; 稳压稳流电泳仪, 北京市六一仪器厂; 螺旋接种仪, Interscience 公司; NanoDrop 2000 超微量分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 方法

1.3.1 双重 PCR 检测体系建立

从 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 数据库中搜索获取克罗诺杆菌属特异性靶基因 *16S rDNA*^[13] 和 *ompA*^[14] 序列文件, 并经多重序列比对, 选择其高度保守区序列并设计相应的 PCR 引物, 具体序列见表 1。利用单因素控制法, 并根据相关报道以及前期预实验设计不同因素(包括 $MgCl_2$ 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA Polymerase 浓度、两对引物浓度配比、退火温度以及反应循环数)的梯度(如退火温度设置为 42、43、44、45、46、47、48、49、50、51 °C), 以 ATCC29544 DNA 为模板, 逐个条件进行反应测试, 最终获取最佳反应体系和条件。

表 1 所需引物及其序列

Table 1 Sequences of the primers for PCR

Primers name	Sequences (5'→3')	Primer length (bp)	Amplified fragment length (bp)
<i>ompA</i> -F	CGTTGGTGTTTCCTACCGT	19	142
<i>ompA</i> -R	TCAGGGTCGCTTTGTTGA	18	
<i>16S rDNA</i> -F	GAACCTTACCTGGTCTTGACA	21	285
<i>16S rDNA</i> -R	TCGCTTCTCTTTGTATGCG	19	

1.3.2 试剂盒制备

(1) 干粉试剂制备: 在无菌环境下混合需要冻干处理的相关组分混合液(包括 DNA 聚合酶、dNTPs、引物和冻干保护剂), 分装于容器中, 置于液氮中进行快速冷冻, 并按照常规冷冻干燥程序进行干燥得到; (2) 阳性对照干粉制备: 向精提取的阪崎克罗诺杆菌基因组 DNA 溶液中加入相应的冻干保护剂, 分装于容器中, 并经以上冻干程序制备得到; (3) 阴性对照干粉制备: 向精提取的非阪崎克罗诺杆菌基因组 DNA 溶液中加入相应的冻干保护剂, 分装于容器中, 并经以上冻干程序制备得到; (4) 复溶液制备: 由相应浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 、Tris-HCl、KCl 以 Triton X-100 混合得到, 分装于容器中; (5) 裂解液制备: 由相应含量的 Tris-HCl (pH 8.5)、EDTA 以及 SDS 混合得到, 分装于容器中; (6) 6×Loading buffer 制备: 由相应含量的 EDTA、甘油、二甲苯腈蓝 FF 以及溴酚蓝混合得到, 分装于容器中。将上述 6 种容器组装成试剂盒, 规格为 24 Test/盒。

1.3.3 各种 DNA 样品制备

(1) 挑取各个标准菌株和分离株的新鲜培养菌落半环于 30 μL 裂解液, 充分悬浮后经 99 $^\circ\text{C}$ 水浴 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清, 即为粗提 DNA 样品, -40 $^\circ\text{C}$ 保存备用。(2) 实际样品中克罗诺杆菌 DNA 制备: 根据 GB4789.40-2016^[13], 每份实际样品取 100 g 或 100 mL 置于 900 mL 44 $^\circ\text{C}$ 预热的 BPW, 36 \pm 1 $^\circ\text{C}$ 培养 18 \pm 2 h, 取 1 mL 该增菌液转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤, 44 \pm 0.5 $^\circ\text{C}$ 培养 4 h, 取 1 mL 培养菌液到 1.5 mL 无菌离心管中, 6 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 30 μL 裂解液, 充分悬浮后经 99 $^\circ\text{C}$ 水浴 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清, 即为相应的 DNA 样品。(3) 人工污染样品制备: 取婴幼儿奶粉、巴氏奶、脱脂牛奶和酸奶共 4 种共 5 份, 经标准微生物检验方法鉴定为克罗诺杆菌阴性, 后取 100 g 或 100 mL 置于 900 mL 44 $^\circ\text{C}$ 预热的 BPW, 36 \pm 1 $^\circ\text{C}$ 培养 18 \pm 2 h, 取 1 mL 该增菌液转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤, 44 \pm 0.5 $^\circ\text{C}$

培养 4 h, 即对应得到 5 份 mLST-Vm 肉汤, 分别向其中加入 1 mL 阳性菌稀释液, 充分混匀后, 根据上述步骤, 各取 1.0 mL 制备相应的 DNA 样品。其中, 该阳性菌稀释液制备具体为: 根据本研究中有关纯培养菌灵敏度测试结果, 取标准菌株 ATCC29544 新鲜培养物, 经无菌生理盐水悬浮、稀释、计数, 获取浓度约为 3.2×10^5 CFU/mL 的稀释液。

1.3.4 特异性试验

取克罗诺杆菌标准菌株、分离株和非克罗诺杆菌标准菌株、分离株, 分别制备其 DNA 样品, 参照试剂盒说明书进行测试, 每份 DNA 样品采用 3 个平行测试, 观察是否出现目标条带。检测符合率=本检测阳性结果菌株数/被检测菌株数 \times 100%。

1.3.5 灵敏度试验

(1) 纯 DNA 测试: 取标准菌株 ATCC29544 新鲜培养物接种到 100 mL TSB 中, 36 \pm 1 $^\circ\text{C}$ 培养 24 \pm 2 h, 经细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取得到纯基因组 DNA, 并测定其浓度为 2.3×10^2 ng/ μL 。以上纯 DNA 经梯度稀释至 2.3×10^{-6} ng/ μL , 后分别取 2 μL 经本试剂盒检测, 均采用 3 个平行测试。(2) 纯培养菌测试: 取标准菌株 ATCC29544 新鲜培养物, 挑取一环菌落置于 30 mL 生理盐水中, 充分悬浮其中, 并经生理盐水梯度稀释(分别为 10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 和 10^9 倍), 分别取稀释液 100 μL 进行螺旋平板法计数。同时取稀释液 100 μL 制备 DNA 样品, 具体方法为: 取稀释液 100 μL 置于 200 μL 预灭菌 PCR 管中, 6 000 r/min 离心 5 min; 弃上清, 后续操作参照 1.3.3 获取对应的 DNA 样品, 分别取 2 μL 经本试剂盒检测, 均采用 3 个平行测试。试剂盒检测结果与螺旋平板法计数结果进行对比, 计算最低检验限。菌落总数计算方法参照 GB4789.2-2016^[15], 该试剂盒最低检验限(CFU)=(本试剂盒检测能检测到的最高稀释倍数的 100 μL 菌液对应的含菌量)/15。

1.3.6 与标准检测方法对比验证

制备实际样品和人工污染样品 DNA 共计 130 份, 分别经本试剂盒检测, 均采用 3 个平行

测试,同时通过标准方法检测以上样品,主要包括增菌、分离以及生化鉴定,具体过程参照GB4789.40-2016^[13],对比以上两种方法检测结果并进行统计分析。其中,检出准确度=(本检测法和标准检测法均为阳性结果例数+本检测法和标准检测法均为阴性结果例数)/所有样品例数×100%。

1.3.7 重复性验证

随机取试剂盒10盒,经其中阳性对照和阴性对照测试,期间有不同的操作地点、时间、人员以及仪器(在单一操作条件下,其他操作条件均一致),每份检测做10个平行,判读其检测结果,以测定其批内重复性;选取1.2中6个批次的试剂盒,在同一操作条件下,经试剂盒中阳性对照和阴性对照测试,每份检测做10个平行实验,判读其检测结果,以测定其批间重复性。批间或批内检测重复率=批间或批内检测符合数/检测总数×100%。

1.3.8 保质期验证

根据1.3.3中制备的浓度约为 3.2×10^4 CFU/mL

的阳性菌稀释液,并取1 mL该稀释液制备其DNA样品,作为测试样品。随机选取本试剂盒5盒置于4 °C环境保存,并在保存1、3、6、9和12个月时间点取出经DNA样品测试试剂盒效力;随机选取本试剂盒5盒置于42 °C环境中储存120 h,并分别在每24 h后,经DNA样品测试其高温运输稳定性。以上每份检测做10个平行实验,判读检测结果。检测效率=阳性结果例数/总检测例数×100%。

2 结果与分析

2.1 双重PCR检测体系的建立

通过条件优化,确立检测中20 μL的双重PCR反应体系(包括10×PCR buffer, *Taq* DNA Polymerase, dNTPs以及两对引物混合物等组分)。PCR反应条件为:95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s, 30个循环; 72 °C 10 min。其中,反应体系中两对引物配比优化见图1。

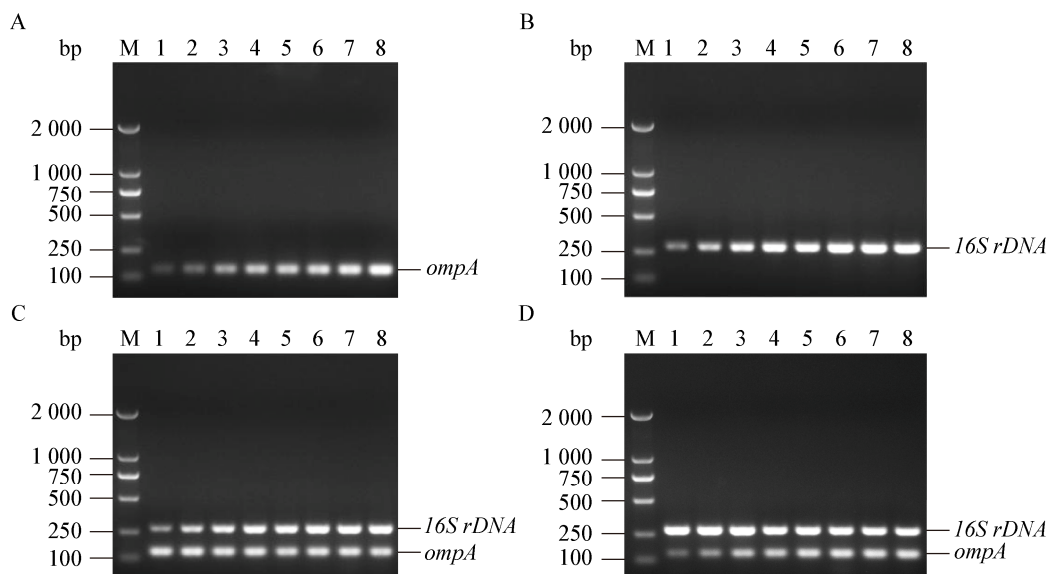


图1 PCR反应体系中引物配比优化

Figure 1 Optimization of primer concentration test for the duplex PCR reaction system

注: A: *ompA* 单重PCR引物浓度测试; B: *16S rDNA* 单重PCR引物浓度测试; C: *ompA* 引物浓度为0.1 μmol/L, *16S rDNA* 引物浓度呈梯度变化测试; D: *16S rDNA* 引物浓度为0.1 μmol/L, *ompA* 引物浓度呈梯度变化测试。M: Marker DL2000; 1-8: 各组测试中选取的引物浓度分别为0.01、0.02、0.05、0.07、0.10、0.12、0.15、0.20 μmol/L。

Note: A: *ompA* primer concentration test for single PCR; B: *16S rDNA* primer concentration test for single PCR; C: The concentration of *ompA* primer is 0.1 μmol/L, gradient concentration change test of *16S rDNA* primer; D: The concentration of *16S rDNA* primer is 0.1 μmol/L, gradient concentration change test of *ompA* primer. M: Marker DL2000; 1-8: The gradient concentrations of primer change in each group are respectively 0.01, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10, 0.12, 0.15, 0.20 μmol/L.

2.2 特异性试验

3 株克罗诺杆菌标准菌株样品均在目标位置出现两条明显条带, 而 29 株非克罗诺杆菌标准菌株样品检测未出现目标条带, 见图 2。117 株克罗诺杆菌分离菌株样品均在目标位置出现两条明显条带, 而其他 235 株非克罗诺杆菌分离菌株样品检测未出现目标条带, 见表 2。

2.3 灵敏度试验

纯 DNA 浓度在 2.3×10^{-1} – 2.3×10^2 ng/ μ L 时, 均可出现明显的目标条带(另外, 浓度为 2.3×10^{-2} ng/ μ L 时, 仍可出现两条目标条带), 见图 3; 纯培养菌浓度在 3.2×10^4 – 3.2×10^7 CFU/mL 时, 均可出现明显的目标

条带(另外, 浓度为 3.2×10^2 – 3.2×10^3 CFU/mL 时, 仍可出现两条目标条带), 见图 4, 确定本产品检验限为 3.2×10^4 CFU/mL。

2.4 与标准检测方法的对比验证

经两种方法对 65 份样品同时进行检测, 结果显示在婴幼儿奶粉、婴幼儿米粉、成人奶粉、巴氏奶、脱脂牛奶和酸奶中, 本方法的检出准确度分别为 100.0%、100.0%、90.0%、100.0%、100.0%、100.0%和 100.0%, 合计为 98.3%, 对人工污染样品的检出准确度为 100.0%。总体上其检测结果与标准方法检测结果一致性较高, 见表 3。

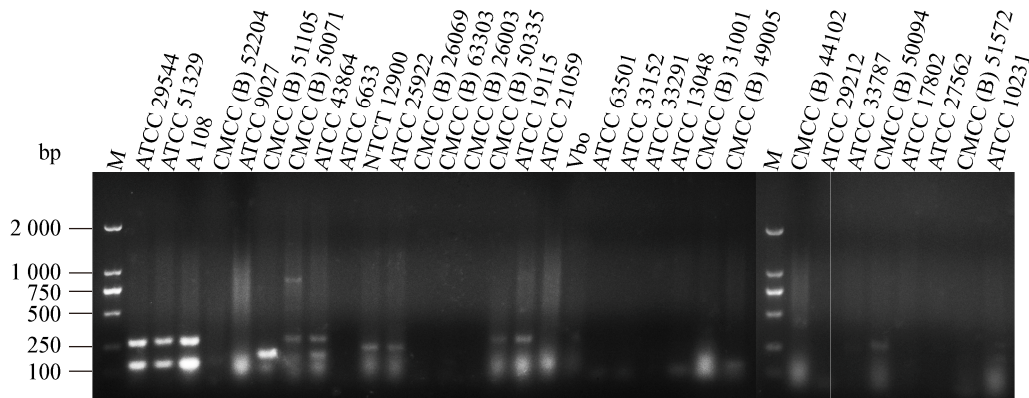


图 2 标准菌株特异性检测电泳结果

Figure 2 Electrophoretic results of PCR product for sensitivity

Note: M: Marker DL2000.

表 2 特异性检测结果

Table 2 Results of specificity

菌株类别 Strain category	本检测阳性结果菌株数/被检测菌株数(份/份) Positive strain samples/Total strain samples (n/n)	检测符合率 Accordance rate (%)
<i>Cronobacter</i> standard strains	3/3	100
Non- <i>Cronobacter</i> standard strains	0/29	100
<i>Cronobacter</i> isolated strains	117/117	100
Non- <i>Cronobacter</i> isolated strains	0/235	100
<i>B. cereus</i>	0/26	100
<i>E. coli</i>	0/30	100
<i>S. aureus</i>	0/21	100
<i>L. monocytogene</i>	0/28	100
<i>P. shigelloides</i>	0/11	100
<i>R. terrigena</i>	0/15	100
<i>Y. enterocolitica</i>	0/13	100
<i>S. typhi</i>	0/21	100
<i>B. subtilis</i>	0/12	100
<i>C. jejuni</i>	0/17	100
<i>V. parahaemolyticus</i>	0/22	100
<i>E. faecali</i>	0/19	100

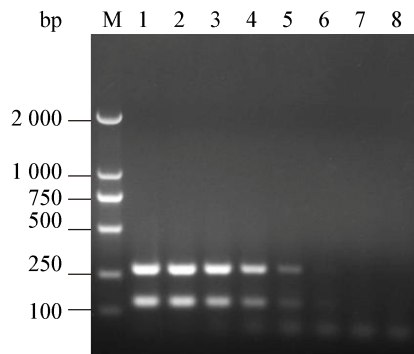


图3 纯DNA灵敏度测试电泳图

Figure 3 Electrophoretic results of purified genomic DNA PCR product for sensitivity

注: M: Marker DL2000; 1-8: 纯DNA浓度分别为 2.3×10^2 、 2.3×10^1 、 2.3×10^0 、 2.3×10^{-1} 、 2.3×10^{-2} 、 2.3×10^{-3} 、 2.3×10^{-4} 、 2.3×10^{-5} ng/μL.

Note: M: Marker DL2000; 1-8: The concentrations of purified genomic DNA are 2.3×10^2 , 2.3×10^1 , 2.3×10^0 , 2.3×10^{-1} , 2.3×10^{-2} , 2.3×10^{-3} , 2.3×10^{-4} , 2.3×10^{-5} ng/μL, respectively.

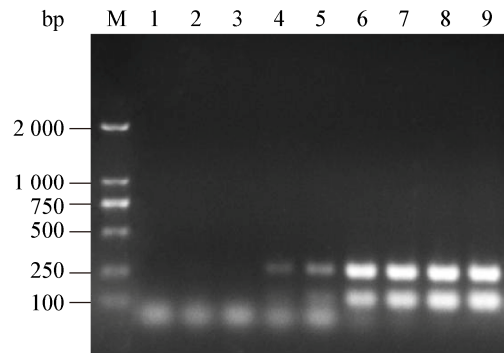


图4 纯培养菌灵敏度测试电泳图

Figure 4 Electrophoretic results of pure cultures PCR product for sensitivity

注: M: Marker DL2000; 1-9: 纯培养菌浓度分别为 3.2×10^{-1} 、 3.2×10^0 、 3.2×10^1 、 3.2×10^2 、 3.2×10^3 、 3.2×10^4 、 3.2×10^5 、 3.2×10^6 、 3.2×10^7 CFU/mL.

Note: M: Marker DL2000; 1-9: The concentrations of pure cultures are 3.2×10^{-1} , 3.2×10^0 , 3.2×10^1 , 3.2×10^2 , 3.2×10^3 , 3.2×10^4 , 3.2×10^5 , 3.2×10^6 , 3.2×10^7 CFU/mL, respectively.

表3 食品样品中PCR检测结果

Table 3 The detection results of practical samples by the PCR method

样品名称 Sample name	检出数/被检测样品数(份/份) Positive cases/Total cases of sample (n/n)		检出准确度 Accuracy rate (%)
	PCR 检测 PCR method	标准方法检测 Conventional method	
	实际样品 Practical samples	4/60	
Infant milk powder	1/10	1/10	100.0
Infant rice flour	0/10	0/10	100.0
Adult milk powder	2/10	1/10	90.0
Pasteurised milk	0/10	0/10	100.0
Skim milk	1/10	1/10	100.0
Acidophilus milk	0/10	0/10	100.0
人工污染样品 Artificially contaminated samples	5/5	5/5	100.0

2.5 重复性验证

批内检测中,不同的操作地点、时间、人员和仪器的检测重复率均为100%,见表4;批间检测中,不同批次的试剂盒其检测重复率均为100%,见表5。

2.6 保质期验证

在42℃环境中分别储存24、48、72、96和120h后,其检测效率均可达到100%;在4℃环境中分别保存1、3、6、9和12个月后的检测效率均为100%。见表6。

3 讨论与结论

克罗诺杆菌分布广泛,尤其是 *C. sakazakii*,而婴幼儿是易感染人群,其致死率极高,因此婴幼儿奶制品等食品是重点检测的对象,本研究在实际食品样品中主要选取各种奶制品,与实际生产生活中对克罗诺杆菌的防控相符。当前关于克罗诺杆菌的检测防控多依据美国FDA细菌学分析手册(Food and Drug Administration-Bacteriological Analytical Manual, FDA-BAM)和GB4789.40-2016^[10]中提供的方法,主要包括前增菌、增菌、

表 4 批内重复性实验结果[阳性结果例数:阴性结果例数(n:n)]

Table 4 Results of intra-batch repeatability (positive cases:negative cases (n:n))

操作条件 Operating conditions	阴性对照样品 Negative control samples	阳性对照样品 Positive control samples	检测重复率 Accordance rate (%)
Site 1	0:10	10:0	100
Site 2	0:10	10:0	
Site 3	0:10	10:0	
Time 1	0:10	10:0	100
Time 2	0:10	10:0	
Time 3	0:10	10:0	
Personnel 1	0:10	10:0	100
Personnel 2	0:10	10:0	
Personnel 3	0:10	10:0	
Instrument 1	0:10	10:0	100
Instrument 2	0:10	10:0	
Instrument 3	0:10	10:0	

表 5 批间重复性验证[阳性结果例数:阴性结果例数(n:n)]

Table 5 Results of inter-batch repeatability (positive cases:negative cases (n:n))

批次 Batches	阴性对照样品 Negative control samples	阳性对照样品 Positive control samples	检测重复率 Accordance rate (%)
20161109	0:10	10:0	100
20161208	0:10	10:0	100
20170111	0:10	10:0	100
20170207	0:10	10:0	100
20170308	0:10	10:0	100
20170410	0:10	10:0	100

表 6 保质期试验结果

Table 6 Results of shelf life stability

参数 Parameters	阳性结果例数:总检测例数(n:n) Positive cases:Total cases (n:n)		检测效率 Detection efficiency (%)
储存时间(小时) Time (h)	24	10:10	100
	48	10:10	100
	72	10:10	100
	96	10:10	100
	120	10:10	100
保存时间(月) Time (month)	1	10:10	100
	3	10:10	100
	6	10:10	100
	9	10:10	100
	12	10:10	100

分离、形态学鉴定、生化鉴定以及计数,期间需要 BPW、mLST-Vm、阪崎肠杆菌显色培养基以及生化鉴定等多种试剂,整个检测时间长达 5-6 d,加之该操作繁琐,需辅以相关仪器并由专门人员进行,因而大大提高了检测成本。而酶联免疫法也有应用于克罗诺杆菌检测研究^[16],另外在研究中用到一些克罗诺杆菌的分子分型方法,如脉冲场凝胶电泳法(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)

从 3 种婴儿配方奶粉中分离得到 *C. sakazakii* 和 *C. malonaticus*^[17]; 利用多位点序列分型技术(Multilocus sequence typing, MLST)对从食品中分离到的多种克罗诺杆菌进行分型^[18]; 通过多位点可变数目串联重复序列分析(Multiple locus variable-number tandem repeat analysis, MLVA)对国内分离得到的 62 株克罗诺杆菌进行了分型研究^[19]等。但以上方法均处在研究阶段,市场上也

没有明确可靠的产品出现,加上检测费用昂贵,需要建立细菌分子分型国家电子网络,因此在基层单位检测中难以推广普及。

PCR 技术发展至今已十分成熟,并且普通的 PCR 扩增仪应用也十分普遍,PCR 技术无论是从所需试剂(包括 *Taq* DNA Polymerase、反应 Buffer、dNTPs 等)、仪器,还是实际应用均十分广泛,加之当前在如 GB4789.6-2016^[20]和 GB4789.12-2016^[21]等标准中均明确指出可经 PCR 进行相关毒力基因验证,直接为基于 PCR 技术的致病微生物检测提供基础。针对克罗诺杆菌的 PCR 检测方法国内外研究很多,如通过 *ompA* 基因 PCR 法建立检测 *C. sakazakii* 的方法^[22];经 *cgca* 基因^[23]和 *MMS* 基因^[12]实时荧光 PCR 法建立克罗诺杆菌检测方法等,但是由于实时荧光定量 PCR 检测需要较大的设备投入以及试剂费用等,制约了在基层单位的应用。在实际物种鉴别中,应用物种特异性 PCR (Species specific PCR, SSPCR)技术^[24],设计高度特异性的引物,并通过简单的琼脂糖凝胶电泳观察目的片段的有无即可完成,期间无需复杂仪器设备,且操作简便快速。本研究根据之前的研究基础,选取已被广泛报道的克罗诺杆菌特异性基因 *16S rDNA*^[13]和 *ompA*^[14],进一步经比对筛选获取其高度特异性的片段,设计引物进行双重 PCR 反应体系优化,通过对多达 384 株常见致病菌的标准菌株和分离菌株的测定,证实该检测体系的高度特异性,这也有效避免了单重 PCR 检测中易出现的假阳性情况。通过对实际样品的对比检测,其结果与标准方法相一致,期间在样品前处理中也参照 GB/T4789.40-2016^[10],如本文 1.3.3 中所述,这也为该检测方法的可行性提供依据。另外,为适应实际应用的需要,本研究研制了双重 PCR 检测试剂盒,并针对该反应体系中需要冷冻储存的成分(如 dNTPs 以及 *Taq* DNA 聚合酶等),经相关工艺设计,进行干粉化处理,相对于常规的液体试剂,具有如下优势:(1) 避免冷链运输、储存以及冷链失败造

成的试剂损耗;(2) 操作简便,可有效避免加样移液中的误差、试剂反复冻融造成的损耗以及气溶胶造成的污染等;(3) 总体上可明显降低检测成本。本研究证实了该试剂盒的灵敏度较高,批内、批间重复性较好,并且其可在 4 °C 条件下储存较长时间(12 个月),也可在 42 °C 的高温环境中存放长达 5 d,方便高温远距离运输,也证实了本试剂盒所采用冻干工艺的重要性。总之,本研究证实了该试剂盒的各项性能需求,其操作简化、检测成本低,便于对食品中克罗诺杆菌进行快速检测。

REFERENCES

- [1] Farmer III JJ, Asbury MA, Hickman FW, et al. *Enterobacter sakazakii*: a new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1980, 30(3): 569-584
- [2] Nazarowec-White M, Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: a review[J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 34(2): 103-113
- [3] Healy B, Cooney S, O’Brien S, et al. *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: an opportunistic foodborne pathogen[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2010, 7(7): 339-350
- [4] 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]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58: 1442-1447
- [5] Dong XH, Li CS, Wu QP, et al. Isolation and identification of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* strains from food[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(5): 429-436 (in Chinese)
董晓晖, 李程思, 吴清平, 等. 食品污染克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌)的分离及鉴定[J]. 微生物学报, 2013, 53(5): 429-436
- [6] Jongenburger I, Reij MW, Boer EPJ, et al. Actual distribution of *Cronobacter* spp. in industrial batches of powdered infant formula and consequences for performance of sampling strategies[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 151(1): 62-69
- [7] Broge T, Lee A. A case of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* bacteremia in a breastfed infant[J]. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society, 2013, 2(4): e1-e2
- [8] Emami CN, Mittal R, Wang L, et al. Role of neutrophils and macrophages in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis caused by *Cronobacter sakazakii*[J]. Journal of Surgical Research, 2012, 172(1): 18-28
- [9] Fang RY. Prevalence and control of *Cronobacter* spp. in

- production processes of infant formula goat milk powder factories[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2016 (in Chinese)
- 房若愚. 婴幼儿配方羊乳粉生产环节克罗诺杆菌污染状况及防控研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2016
- [10] National Health and Family Planning Commission of PRC, China Food and Drug Administration. GB 4789.40-2016 National food safety standard Food microbiological examination: Food microbiological examination: *Enterobacter sakazakii*[S]. Beijing: China Standards Press, 2017 (in Chinese)
- 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 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[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [11] Song XJ, Shukla S, Lee G, et al. Detection of *Cronobacter* genus in powdered infant formula by enzyme-linked immunosorbent assay using anti-*Cronobacter* antibody[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1124
- [12] Tan HQ, Cai JS, Tan HF, et al. Establishment of quantitative real-time PCR targeting the *MMS* gene of *Cronobacter* spp. based on TaqMan-MGB probe[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2014, 26(1): 40-44 (in Chinese)
- 谭翰清, 蔡建生, 谭海芳, 等. TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 检测克罗诺杆菌 *MMS* 基因方法的建立[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(1): 40-44
- [13] Pei XY, Liu XM. Analysis of 16S rDNA sequence of *Cronobacter* spp.[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2010, 39(1): 36-39 (in Chinese)
- 裴晓燕, 刘秀梅. 克洛诺菌属分离株 16S rDNA 序列分析[J]. *卫生研究*, 2010, 39(1): 36-39
- [14] Kim K, Kim KP, Choi J, et al. Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(15): 5188-5198
- [15] National Health and Family Planning Commission of PRC, China Food and Drug Administration. GB 4789.2-2016 National food safety standard Food microbiological examination: Aerobic plate count[S]. Beijing: China Standards Press, 2017 (in Chinese)
- 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [16] Xu X. Study on a sandwich enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Cronobacter sakazakii*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2013 (in Chinese)
- 徐欣. 阪崎克罗诺杆菌双抗夹心酶联免疫方法的建立[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2013
- [17] Terragno R, Salve A, Pichel M, et al. Characterization and subtyping of *Cronobacter* spp. from imported powdered infant formulae in argentina[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 136(2): 193-197
- [18] 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
- [19] Cui JH, Du XL, Yang XR, et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of 62 isolates of *Cronobacter* spp.[J]. *Chinese Preventive Medicine*, 2012, 13(6): 410-414 (in Chinese)
- 崔晶花, 杜小莉, 杨小蓉, 等. 62 株克罗诺杆菌多位点可变数目串联重复序列分析分子分型研究[J]. *中国预防医学杂志*, 2012, 13(6): 410-414
- [20] National Health and Family Planning Commission of PRC, China Food and Drug Administration. GB 4789.6-2016 Microbiological examination of food hygiene-Examination of diarrheogenic *Escherichia coli*[S]. Beijing: China Standards Press, 2017 (in Chinese)
- 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.6-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [21] National Health and Family Planning Commission of PRC, China Food and Drug Administration. GB 4789.12-2016 Microbiological examination of food hygiene-Examination of *Clostridium botulinum* and botulinus toxin[S]. Beijing: China Standards Press, 2017 (in Chinese)
- 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.12-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [22] Mohan Nair MK, Venkitanarayanan KS. 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2539-2546
- [23] Zhuang P, Yu YG, Hu SF, et al. Rapid detection of *Cronobacter muytjensii* by real-time PCR based on *cgcA* gene[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(2): 296-301 (in Chinese)
- 庄平, 余以刚, 胡双芳, 等. 基于 *cgcA* 基因实时荧光 PCR 快速检测穆汀斯克罗诺杆菌的研究[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(2): 296-301
- [24] Lee H, Baek H, Lim SB, et al. Development of species-specific PCR primers and polyphasic characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* isolated from Korean sourdough[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 200: 80-86