

克罗诺杆菌属细菌数值鉴定系统的研制与效果评价

曹璐璐^{1,3}, 万强¹, 金乐萱^{2,3}, 吴毓薇², 赵昕宇², 高宝^{2,3}, 曲晓莹¹, 蒋富凤¹, 叶青华^{*2}, 吴清平^{*1,2}

1 广东环凯生物科技有限公司, 广东 肇庆 526238

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省微生物安全与健康重点实验室
国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 广东 广州 510070

3 合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230009

曹璐璐, 万强, 金乐萱, 吴毓薇, 赵昕宇, 高宝, 曲晓莹, 蒋富凤, 叶青华, 吴清平. 克罗诺杆菌属细菌数值鉴定系统的研制与效果评价[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3165-3178.

CAO Lulu, WAN Qiang, JIN Lexuan, WU Yuwei, ZHAO Xinyu, GAO Bao, QU Xiaoying, JIANG Fufeng, YE Qinghua, WU Qingping. Development and effectiveness evaluation of a numerical identification system for *Cronobacter*[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3165-3178.

摘要: 【背景】克罗诺杆菌属(*Cronobacter*)细菌的分离鉴定是临床医学中精准治疗的理论基础, 然而, 目前的生化鉴定方法仅可将其鉴定至属水平。【目的】开发一种简便、可靠的克罗诺杆菌属生化分种鉴定方法, 建立克罗诺杆菌属细菌数值鉴定系统并对其鉴定性能进行评价。【方法】将鉴定系统所需的生化反应配方浓缩整合到一组注塑件中制得鉴定条, 辅以数值鉴定理论构建克罗诺杆菌属细菌数值鉴定系统, 利用克罗诺杆菌属标准株及分离株对其鉴定准确度进行验证。分离株的鉴定以 *fusA* 基因序列分析方法的鉴定结果作为参考标准, 与数值鉴定法的检测结果进行比较。【结果】创建了用于鉴别克罗诺杆菌属内 9 个种/亚种的生化反应阳性概率数据库, 同时确定了数值法中的计算方法和结果评价标准, 并完成了数值鉴定系统软件的开发。5 株克罗诺杆菌属标准株通过细菌数值鉴定系统均得到了正确鉴定, 结果评价为极好的鉴定结果; 其中, DSM 18707 被准确鉴定为都柏林克罗诺杆菌奶粉亚种(*C. dublinensis* subsp. *lactaridi*)。测试集的 84 株克罗诺杆菌属分离株的数值鉴定法与 *fusA* 基因测序法的总鉴定一致率为 100%; 除 *C. sakazakii* IV 型(1 株)及 *C. dublinensis* III 型(1 株)的数值鉴定为不可接受的鉴定结果外, 其余菌株均得到了明确的鉴定。【结论】本研究开发的克罗诺杆菌属细菌数值鉴定系统操作简便、价格低廉、准确率高, 可为临床诊断及相关食品安全检测提供实验依据, 具有良好的应用推广前景。

关键词: 克罗诺杆菌属; 生化鉴定; 数值鉴定系统; 微生物安全

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFF1101102); 国家自然科学基金(32230084); 广东省科学院项目(2022GDASZH-2022020402-01)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1101102), the National Natural Science Foundation of China (32230084), and the Project of Guangdong Academy of Sciences (2022GDASZH-2022020402-01).

*Corresponding authors. E-mail: YE Qinghua, yeqinghua2002@163.com; WU Qingping, wuqp203@163.com

Received: 2024-03-15; Accepted: 2024-04-05; Published online: 2024-04-30

Development and effectiveness evaluation of a numerical identification system for *Cronobacter*

CAO Lulu^{1,3}, WAN Qiang¹, JIN Lexuan^{2,3}, WU Yuwei², ZHAO Xinyu², GAO Bao^{2,3}, QU Xiaoying¹, JIANG Fufeng¹, YE Qinghua^{*2}, WU Qingping^{*1,2}

1 Guangdong Huankai Biotechnology Company Limited, Zhaoqing 526238, Guangdong, China

2 State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

3 School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, Anhui, China

Abstract: [Background] The isolation and identification of *Cronobacter* forms the theoretical basis for precise treatment in clinical medicine. However, the current biochemical identification methods can only identify them at the genus level. **[Objective]** To develop a simple and reliable method for species identification of *Cronobacter*, we established a numerical identification system and evaluated its identification performance. **[Methods]** The biochemical reaction formulations required for the identification system were concentrated and integrated into a set of plastic containers to prepare identification strips. The numerical identification system of *Cronobacter* was developed based on the numerical identification theory, and the identification accuracy was assessed with the standard strains and isolates of *Cronobacter*. The identification results based on the sequencing of *fusA* were taken as the reference and compared with those obtained with the numerical identification method. **[Results]** We established a biochemical reaction positive probability database for distinguishing the 9 species/subspecies of *Cronobacter*. Simultaneously, we defined the calculation methods and result evaluation criteria for the numerical method and developed a numerical identification system. Five standard strains of *Cronobacter* were correctly identified by the numerical identification system, and the results were evaluated as excellent. Among them, strain DSM 18707 was accurately identified as *C. dublinensis* subsp. *lactaridi*. The total identification agreement between the numerical identification method and the *fusA* sequencing method of the 84 *Cronobacter* isolates in the test set was 100%. The numerical identification method clearly identified other strains except *C. sakazakii* type IV (one strain) and *C. dublinensis* type III (one strain) with unacceptable identification results. **[Conclusion]** The numerical identification system developed in this study for *Cronobacter* has simple operation, low cost, and high accuracy, which can provide an experimental basis for clinical diagnosis and food safety detection and demonstrates a promising prospect of application and popularization.

Keywords: *Cronobacter*; biochemical identification; numerical identification system; microbial safety

克罗诺杆菌属(*Cronobacter*)隶属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*),为革兰氏阴性无芽孢杆菌,兼性厌氧,是婴幼儿配方奶粉中重要的机会致病菌^[1]。2008年,Iversen等^[2]通过一系列的分子生物学分型手段对阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)群体进行了多样性分析及DNA杂交分析,提出将阪崎肠杆菌重新归类为克罗诺杆菌属;目前,克罗诺杆菌属被分为7个种,分别为阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)、都柏林克罗诺杆菌(*C. dublinensis*)、尤尼沃斯克罗诺杆菌(*C. universalis*)、莫金斯克罗诺杆菌(*C. muytjensii*)和康帝蒙提克罗诺杆菌(*C. condimentii*)。其中,都柏林克罗诺杆菌又被分为3个亚种,包括都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种(*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*)、都柏林克罗诺杆菌奶粉亚种(*C. dublinensis* subsp. *lactaridi*)和都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种(*C. dublinensis* subsp. *lausannensis*)。

克罗诺杆菌广泛存在于奶粉、香料、面食、巧克力、谷物等干燥食品,以及市场上出售的新鲜蔬菜、水果、肉类和即食沙拉等非巴氏杀菌食品中。根据多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)数据库(<https://pubmlst.org/cronobacter/>) 2024年4月8日的报告,在已包含的4180株不同来源的克罗诺杆菌中,*C. sakazakii* (71.2%)和*C. malonaticus* (11.0%)具有最大占比。许多研究报告称,*C. sakazakii*是婴儿克罗诺杆菌感染的罪魁祸首^[3-4]。但除*C. condimentii*外,其他所有克罗诺杆菌属菌种都被认为对人类健康有害^[5]。克罗诺杆菌感染主要发生于免疫力较弱的群体,如早产儿、新生儿、幼儿及老年人^[6]。临床症状包括发热、呕吐、腹泻和精神萎靡,严重感染可导致脑膜炎、

坏死性小肠结肠炎、菌血症和尿毒症^[7]。来自美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的监测表明,1岁以下婴儿的*C. sakazakii*感染率为十万分之一,而感染死亡率高达40%–80%^[8]。此外,克罗诺杆菌属菌种之间由于基因组构成不同,病原体的抗应激能力、毒性能力和抗生素耐药性也各不相同^[9]。因此,实现克罗诺杆菌属“种”水平的准确鉴定,是对克罗诺杆菌进行深入研究的基础。

近年来,序列分析法(包括多位点序列分析、16S rRNA基因序列分析及特异性基因序列分析)、基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)法及PCR法被广泛应用于克罗诺杆菌属的分种鉴定^[10]。然而这些方法大多无法通过一次操作实现对克罗诺杆菌属所有菌种的准确区分。另外,由于需要大型仪器的辅助,难以在欠发达地区得到普及。目前,克罗诺杆菌的检测仍以常规分离鉴定技术为主。生化鉴定是克罗诺杆菌检测的金标准。生化分析方法是指借助细菌对营养物质分解能力的不同及其代谢产物的差异对细菌进行鉴定,包括酶试验、发酵试验、同化试验、蛋白质分解产物试验等。国标GB 4789.40—2024《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验》规定了食品中克罗诺杆菌的检验方法,待测样品经过增菌、分离纯化等步骤通过生化方法进行最终的鉴定^[11]。然而,通过该项国家标准仅可将待测菌株鉴定至克罗诺杆菌的属水平,无法实现对克罗诺杆菌的种和亚种水平的有效区分。

细菌数值鉴定法是在生化鉴定的基础上,结合数值鉴定理论产生的一种细菌概率鉴定方法。其集细菌鉴定学、计算机、自动化技术和数值鉴定理论于一体,从而实现细菌鉴定过程

的系统化、标准化和商业化^[12]。市面上现有的商品化细菌数值鉴定系统主要有 API 鉴定系统、Enterotube II (Roche) 鉴定系统、Micro-ID (REMEL) 鉴定系统和 BBL Minitek System 鉴定系统等。其中 API 是国际公认的标准鉴定系统, 包括 15 种鉴定条, 约 1 000 种生化反应, 可鉴定细菌约 600 种, 是目前世界上鉴定范围最广的一种产品, 但其现有的相关产品对克罗诺杆菌也仅可鉴定至属水平。迄今为止, 国内外均尚无基于生化反应区分克罗诺杆菌属内不同菌种的细菌数值鉴定方法的相关报道。基于此, 研制出我国自主知识产权的克罗诺杆菌属内菌种的数值鉴定系统, 不仅能填补相应商品化产品的空缺, 还能为国内用户提供质优价廉的检测产品, 对临床诊断及食品安全监测具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 样 品

本研究使用的 5 株克罗诺杆菌属标准株及 452 株克罗诺杆菌属分离株由广东省微生物研究所提供。其中, 标准株包括 *C. sakazakii* (ATCC 29544)、*C. mytjensii* (ATCC 51329)、*C. dublinensis* subsp. *lactaridi* (DSM 18707)、*C. universalis* (NCTC 9529) 及 *C. condimenti* (LMG 26250)。分离株为本实验室前期在全国范围内从蔬菜、速冻食品、奶粉、肉制品、水产品及熟食共六大类食品中分离获得^[13], 所有菌株的冻存管均保存在 -80 °C 冰箱。将 452 株克罗诺杆菌属分离株随机分为训练集与测试集, 训练集菌株(368 株)用于建立克罗诺杆菌数值鉴定的阳性概率数据库, 测试集菌株(84 株)用于验证克罗诺杆菌数值快速鉴定方法的准确度。

1.2 主要试剂和仪器

色氨酸、肌醇和 L-鸟氨酸盐酸盐, 上海康

捷生物科技发展有限公司; 甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷、乳糖、N-乙酰神经氨酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 卫矛醇, 上海源叶生物科技有限公司; 丙二酸钠, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白胨水干粉、无菌液体石蜡和靛基质试剂, 广东环凯微生物科技有限公司。

电子分析天平和酸度计, 赛多利斯公司; 真空干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 二级生物安全柜, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; 电热恒温培养箱, 广东环凯微生物科技有限公司。

1.3 培 养 基

悬浮培养基和胰酪大豆胨琼脂(TSA)培养基, 广东环凯微生物科技有限公司。

1.4 生化反应组合及配方的确认

生化反应组合由唾液酸(sialic acid, SA)、吲哚(indole, Ind)、卫矛醇(dulcitol, Dul)、乳糖(lactose, Lac)、丙二酸盐(malonate, Malo)、肌醇(inositol, Ino)、甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷(methyl- α -D-glucopyranoside, MDG)及鸟氨酸(ornithine, Orn)构成。结合显色效果、质量研究、稳定性考察及反应速度等多方面因素, 确定各生化的最佳反应配方。

1.5 鉴定条的制备

按 1.4 确认的生化反应配方配制各反应孔工作液, 调至所需 pH 后, 用 0.45 μ m 微孔滤膜进行抽滤除菌。取一定数量注塑件, 无菌拆去保护膜并臭氧消毒。将上述反应工作液分别用 5 mL 移液器取出后, 依次加入到无菌分液槽的第 1-8 渠, 通过多通道移液器转移至注塑件中(每个孔的添加量为 30 μ L)。将已注液的注塑件整齐摆放于托盘上, 置于真空干燥箱中干燥 3 h。干燥完毕, 取出后立即贴膜, 将鉴定条成品与干燥剂一并装入双层包装袋中密封, 于 4 °C 冷库中保存待用。

1.6 生化鉴定

细菌培养：在无菌条件下，将保存在冻存管中的克罗诺杆菌属待测菌株接种于 TSA 平板上，(36±1) °C 中培养(24±2) h。

鉴定条操作步骤：取鉴定条及悬浮培养基，使用前平衡至室温。从 TSA 平板上挑取新鲜培养的待测菌株单菌落，使用无菌悬浮培养基稀释至 0.5 McFarland (约 10⁸ CFU/mL)，制成均一菌悬液。用微量移液器向无菌鉴定条的干燥孔(1-8 号孔)中分别注入 150 μL 的菌悬液后，在唾液酸、甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷及鸟氨酸反应孔中分别滴加 3-4 滴无菌液体石蜡覆盖液面，然后无菌贴膜密封，置于(36±1) °C 恒温培养箱中避光培养 18-24 h。培养完毕后，向吡啶反应孔中滴加 1-2 滴靛基质试剂，参照比色卡记录实验结果。生化试验重复 3 次，以确保结果准确、可靠。

1.7 *fusA* 基因测序法鉴定

本实验室获得的 452 株分离株通过 *fusA* 基因测序法进行分种鉴定，以作为鉴定条菌种鉴定的参考标准。

模板 DNA 的制备：在 0.5 mL 微量离心管中加入 100 μL 无菌水，用一次性无菌定量接种环(1 μL)挑取新鲜培养的分离株单菌落溶于无菌水中，振荡混匀后，于 99 °C 金属浴热裂解 10 min 后，12 000 r/min 离心 10 min，上清液用于后续实验。

PCR 扩增：根据多位点序列分型数据库 (<https://pubmlst.org/cronobacter/>)提供的 *Cronobacter* 测序方案中的引物及条件对所有分离株进行 *fusA* 基因的扩增^[13]。扩增正向引物：5'-GA AACCGTATGGCGTCAG-3'；扩增反向引物：5'-AGAACCGAAGTGCAGACG-3'。PCR 反应体系(50 μL)：模板 DNA (20 ng/μL) 2 μL，上、

下游引物(10 μmol/L)各 2.0 μL，*Taq* 酶(5 U/μL) 0.5 μL，dNTPs (2.5 mmol/L) 4.0 μL，MgCl₂ (25 mmol/L) 3.0 μL，10×PCR 缓冲液 5.0 μL，ddH₂O 31.5 μL。PCR 反应条件：96 °C 1 min；96 °C 1 min，58 °C 1 min，72 °C 2 min，30 个循环；72 °C 5 min。

测序与分析：扩增后的反应产物送至华大基因科技有限公司(深圳)进行序列测定。测序结果上传 PubMLST 数据库(<http://pubmlst.org/cronobacter/>)进行比对，确定菌种类型。

1.8 统计分析

所有数据均通过 Excel 2019 软件进行分析。采用 Visual C++2019 进行克罗诺杆菌属细菌数值鉴定系统软件的编写。

2 结果与分析

2.1 数值鉴定系统的理论建模

2.1.1 建立阳性概率数据库

基于本实验室在全国 43 个城市不同食品样本中分离到的 368 株训练集克罗诺杆菌属分离株，通过鉴定条对其进行生化鉴定。统计不同菌种的各生化反应阳性率，结合伯杰氏分类手册、相关文献等资料，建立包括 *C. sakazakii*、*C. malonaticus*、*C. muytjensii*、*C. turicensis*、*C. universalis*、*C. condimenti*、*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*、*C. dublinensis* subsp. *lactaridi* 和 *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* 的克罗诺杆菌属菌种阳性概率数据库(表 1)。

2.1.2 数值法中计算方法的确定

获得待测菌株的 8 种生化试验结果后，首先将记录的阴性或阳性反应转换成概率值：即实验结果为阳性则对应生化试验的阳性概率值，若为阴性则 100%减去生化试验的阳性概率值；上述阳性概率值若为 0%或 100%，则用近似值

表 1 克罗诺杆菌属菌种数值鉴定数据库

Table 1 Database for numerical identification of *Cronobacter*

Strains	SA	Ind	Dul	Lac	Malo	Ino	MDG	Orn
<i>C. sakazakii</i>	98	0	1	96	8	83	99	95
<i>C. malonaticus</i>	0	0	0	99	99	54	99	100
<i>C. muytjensii</i>	0	100	100	100	100	100	0	100
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	0	100	0	100	100	100	100	100
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	0	100	4	100	0	63	100	99
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	0	50	5	5	5	5	100	100
<i>C. turicensis</i>	77	0	100	100	100	100	100	92
<i>C. universalis</i>	0	0	100	100	100	100	100	0
<i>C. condimenti</i>	0	100	0	100	100	100	0	100

SA: 唾液酸; Ind: 吲哚; Dul: 卫矛醇; Lac: 乳糖; Malo: 丙二酸盐; Ino: 肌醇; MDG: 甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷; Orn: 鸟氨酸. 表中数据为生化反应阳性率(%)

SA: Sialic acid; Ind: Indole; Dul: Dulcitol; Lac: Lactose; Malo: Malonate; Ino: Inositol; MDG: Methyl- α -D-glucopyranoside; Orn: Ornithine. The data in the table are the rate of positivity for each biochemical reaction (%).

1%或 99%代替。然后按照细菌概率鉴定理论确定每一分类单元的模式频率、总出现频率、多项总发生频率、鉴定百分数、模式似然比值 T 值的计算方法, 具体计算方法如下:

(1) 每一分类单元的模式频率=该分类单元下生化试验组合的最大总出现概率的乘积;

(2) 每一分类单元的总出现频率=该分类单元下生化试验组合的实际出现概率的乘积;

(3) 多项总发生频率=所有分类单元的总出现频率的总和;

(4) 鉴定百分数(%)=(每一分类单元的总出现频率/多项总发生频率) \times 100, 全体鉴定百分数之和应等于 100%;

(5) 模式似然比值 T 值(%)=(每一分类单元的总出现频率/该分类单元的模式频率) \times 100。

为了更好地对计算方法进行阐述, 下面以已知菌 1、已知菌 2、已知菌 3 及其生化试验 A、生化试验 B、生化试验 C、生化试验 D 来进行举例说明。如表 2 所示。

已知菌 1、已知菌 2、已知菌 3 属于克罗诺杆菌属 9 个种/亚种的任意 3 种, 生化试验 A、

B、C、D 为 8 个生化试验中的任意 4 个反应。

已知菌 1 的模式频率: $0.98 \times 0.99 \times 0.92 \times 0.95 = 0.848 0$; 已知菌 2 的模式频率: $0.99 \times 0.99 \times 0.99 \times 0.99 = 0.960 6$; 已知菌 3 的模式频率: $0.77 \times 0.99 \times 0.99 \times 0.92 = 0.694 3$ 。

已知菌 1 的总出现频率: $0.02 \times 0.99 \times 0.08 \times 0.95 = 0.001 5$; 已知菌 2 的总出现频率: $0.99 \times 0.99 \times 0.99 \times 0.99 = 0.960 6$; 已知菌 3 的总出现频率: $0.23 \times 0.01 \times 0.99 \times 0.92 = 0.002 1$ 。

多项总发生频率: $0.001 5 + 0.960 6 + 0.002 1 = 0.964 2$ 。

表 2 待测菌生化试验结果与已知菌反应阳性率
Table 2 Biochemical test results of the tested bacteria and the positive reaction rate of known bacteria (%)

Strains	Test A	Test B	Test C	Test D
Bacteria 1	98	1	8	95
Bacteria 2	0	0	99	100
Bacteria 3	77	100	100	92
Strain to be tested	-	-	+	+

-: Negative; +: Positive.

已知菌 1 的鉴定百分数(%): $0.001\ 5/0.964\ 2\times 100\%=0.16\%$; 已知菌 2 的鉴定百分数(%): $0.960\ 6/0.964\ 2\times 100\%=99.63\%$; 已知菌 3 的鉴定百分数(%): $0.002\ 1/0.964\ 2\times 100\%=0.22\%$ 。

已知菌 1 的 T 值(%): $0.001\ 5/0.848\ 0\times 100\%=0.18\%$; 已知菌 2 的 T 值(%): $0.960\ 6/0.960\ 6\times 100\%=100\%$; 已知菌 3 的 T 值(%): $0.002\ 1/0.694\ 3\times 100\%=0.30\%$ 。

通过上述计算结果可知, 待测菌株为已知菌 2, 鉴定百分数为 99.63%, T 值为 100%。

2.1.3 确定结果评价标准

一般而言, 将鉴定百分数最高的分类单元视为待测菌。在此基础上, 可以通过建立概率值的模式似然比值 T 值来加强鉴定结果的可信度^[12]。模式似然比值 T 值越接近 100%, 说明待测菌在该分类单元下的实际出现概率与该分类单元下的最大总出现概率越接近, 鉴定结果越可靠。根据鉴定百分数与 T 值的大小, 按照表 3 中的评价标准对鉴定结果的可信度进行判定。

鉴定结果评价可分为两大类: 一类为明确

的鉴定结果, 包括极好的鉴定结果、很好的鉴定结果、好的鉴定结果和可接受的鉴定结果; 而另一类为不明确的鉴定结果, 包括可疑的鉴定结果及不可接受的鉴定结果。

2.1.4 数值鉴定系统软件的编制

鉴于本方法涉及 9 个分类单元的 8 个生化反应, 每个待测菌株的鉴定需要计算 9 个分类单元的鉴定百分数和模式似然比值 T 值。由于人工计算工作量大, 因此在相应的配套软件中进行计算是必要的。开发鉴定系统相应软件, 实质上是将 2.1.2 中的数值理论用专业编程语言转换成计算机软件的过程。我们采用 Visual C++ 2019 编写了克罗诺杆菌属细菌数值鉴定系统软件。该软件在输入生化试验的判定结果后, 能够给出每个细菌条目下的鉴定百分数和模式似然比值 T 值。同时, 软件会将待测菌株与鉴定结果中各分类单元不一致的生化试验单独列出。在结果显示中, 对分类单元提供了中文和拉丁文的对照。以 ATCC 29544 为例, 图 1 展示了系统鉴定结果的页面显示。

表 3 鉴定结果评价

Table 3 Evaluation of appraisal results

Identification percentage (%)	T -value (%)	Result evaluation
≥ 90	≥ 90	Excellent identification results
≥ 90	≥ 50	Very good identification results
≥ 80	≥ 60	Very good identification results
≥ 90	≥ 20	Good identification results
≥ 80	≥ 30	Good identification results
≥ 70	≥ 40	Good identification results
≥ 60	≥ 50	Good identification results
≥ 90	≥ 0	Acceptable identification results
$90 \geq \text{Identification percentage} \geq 80$	≥ 1	Acceptable identification results
$80 \geq \text{Identification percentage} \geq 60$	≥ 10	Acceptable identification results
$90 \geq \text{Identification percentage} \geq 60$	≥ 0.01	Suspicious identification results
< 60	≥ 10	Suspicious identification results
< 60	< 10	Unacceptable identification results
< 90	< 0.01	Unacceptable identification results

Numide系统 退出

假单胞菌 **克罗诺杆菌属** 弧菌科 李斯特菌属 肠杆菌 葡萄球菌

日期: 2024-03-28 样本编号: 请输入样本编号 来源: 请输入来源 备注: 请输入备注

1 2 4 1 2 4 1 2

Ind Dul Lac Malo Ino SA MDG Orn

4 6 3

确认 新实验

分析结果

打印

	<i>Cronobacter sakazakii</i> 阪崎克罗诺杆菌	<i>Cronobacter turicensis</i> 苏黎世克罗诺杆菌	<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>Lactaridi</i> 都柏林克罗诺杆菌奶粉亚种	<i>Cronobacter malonaticus</i> 丙二酸盐克罗诺杆菌	<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>Lausannensis</i> 都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种
鉴定百分数	99.99	0.01	0.01	0.01	<0.01
T值	99.99	0.01	0.01	0.01	<0.01

不一致实验

吡啶			100		
卫矛醇		100			
乳糖					5
丙二酸盐		100		99	
肌醇					5
唾液酸			0	0	0

实验结论

极好的鉴定结果: 阪崎克罗诺杆菌 *Cronobacter sakazakii*

图 1 阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 鉴定结果截屏

Figure 1 Figure displaying the identification results of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544.

2.2 克罗诺杆菌数值快速鉴定方法准确度的验证

2.2.1 标准菌株的鉴定

对克罗诺杆菌标准株 *C. sakazakii* (ATCC 29544)、*C. muytjensii* (ATCC 51329)、*C. dublinensis* subsp. *lactaridi* (DSM 18707)、*C. universalis* (NCTC 9529)及 *C. condimenti* (LMG 26250)通过克罗诺杆菌属鉴定条进行了生化试验,结果如表 4 所示。

将生化试验结果输入克罗诺杆菌属细菌数值鉴定系统软件以获得菌种分析结果,结果见表 5。

五株标准菌株均得到了正确鉴定,结果评价为极好的鉴定结果。其中,DSM 18707 被准确鉴定至亚种水平,鉴定结果为都柏林克罗诺杆菌奶粉亚种(*C. dublinensis* subsp. *lactaridi*),鉴定百分数为 98.16%,*T* 值为 100%,这表明本研究建立的克罗诺杆菌属细菌数值鉴定系统可以实现都柏林克罗诺杆菌亚种的有效区分。

2.2.2 分离株的鉴定

由于 *fusA* 基因测序法是克罗诺杆菌属 7 个

菌种之间区分的最有效、可靠的方法^[14]。因此,分离株的鉴定以 *fusA* 基因测序法的结果作为参考标准,与数值鉴定法的检测结果进行比较,以获知所研制的克罗诺杆菌属细菌数值鉴定系统在实际样品中的检测效果。

在全国范围内从蔬菜、速冻食品、奶粉、肉制品、水产品及熟食共六大类食品中获得的测试集菌株通过 *fusA* 基因序列分析方法确定了菌种类型。结果显示,在 84 株 *Cronobacter* 分离株中包含 37 株 *C. sakazakii* (44.05%)、27 株 *C. malonaticus* (32.14%)、16 株 *C. dublinensis* (19.05%)、3 株 *C. turicensis* (3.57%)及 1 株 *C. muytjensii* (1.19%),未发现 *C. universalis* 及 *C. condimenti*。

利用克罗诺杆菌属鉴定条对所有测试集分离株进行了生化鉴定,从表 6 可以看出,84 株分离株共呈现出 16 种生化谱类型。依据本研究建立的克罗诺杆菌属菌种的细菌数值鉴定方法进行计算,确定各生化谱类型对应的分类单元,结果如表 7 所示。克罗诺杆菌属分离株的数值

表 4 克罗诺杆菌标准株的生化鉴定结果

Table 4 Biochemical identification results of standard strains of *Cronobacter*

Strain	SA	Ind	Dul	Lac	Malo	Ino	MDG	Orn
ATCC 29544	+	-	-	+	-	+	+	+
ATCC 51329	-	+	+	+	+	+	-	+
DSM 18707	-	+	-	+	-	+	+	+
NCTC 9529	-	-	+	+	+	+	+	-
LMG 26250	-	+	-	+	+	+	-	+

-: Negative; +: Positive.

表 5 克罗诺杆菌标准株的数值鉴定法结果

Table 5 Numerical identification results of standard strains of *Cronobacter*

Strain	Identification result	Identification percentage (%)	<i>T</i> -value (%)	Result evaluation
ATCC 29544	<i>C. sakazakii</i>	99.99	100	Excellent
ATCC 51329	<i>C. muytjensii</i>	98.99	100	Excellent
DSM 18707	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	98.16	100	Excellent
NCTC 9529	<i>C. universalis</i>	98.15	100	Excellent
LMG 26250	<i>C. condimenti</i>	98.01	100	Excellent

表 6 克罗诺杆菌属分离株的生化反应谱

Table 6 Biochemical reaction profile of *Cronobacter* isolates

Results of <i>fusA</i> gene sequencing method	Biochemical type	SA	Ind	Dul	Lac	Malo	Ino	MDG	Orn	Number of strains
<i>C. sakazakii</i>	I	+	-	-	+	-	-	+	+	8
<i>C. sakazakii</i>	II	+	-	-	+	-	+	+	+	21
<i>C. sakazakii</i>	III	+	-	-	+	+	+	+	+	1
<i>C. sakazakii</i>	IV	+	-	-	-	-	-	+	+	1
<i>C. sakazakii</i>	V	+	-	-	+	-	+	-	+	6
<i>C. malonaticus</i>	I	-	-	-	+	+	-	+	+	24
<i>C. malonaticus</i>	II	-	-	-	+	+	+	+	+	3
<i>C. dublinensis</i>	I	-	+	-	+	-	+	+	+	2
<i>C. dublinensis</i>	II	-	+	-	+	-	-	+	+	9
<i>C. dublinensis</i>	III	-	+	-	+	+	-	+	+	1
<i>C. dublinensis</i>	IV	-	+	-	+	-	-	+	-	1
<i>C. dublinensis</i>	V	-	+	-	+	-	-	-	+	2
<i>C. dublinensis</i>	VI	-	+	-	+	+	+	+	+	1
<i>C. turicensis</i>	I	+	-	+	+	+	+	+	+	2
<i>C. turicensis</i>	II	-	-	+	+	+	+	+	+	1
<i>C. muytjensii</i>	I	-	+	+	+	+	+	-	+	1

-: Negative; +: Positive.

表 7 克罗诺杆菌属分离株的数值鉴定法结果

Table 7 Results of numerical identification method of *Cronobacter* isolates

Results of <i>fusA</i> gene sequencing method	Biochemical type	Identification result of strip	Identification percentage (%)	T-value (%)	Result evaluation	Number of strains	Consistency rate (%)
<i>C. sakazakii</i>	I	<i>C. sakazakii</i>	99.79	20.48	Good	8	100
<i>C. sakazakii</i>	II	<i>C. sakazakii</i>	99.97	100.00	Excellent	21	100
<i>C. sakazakii</i>	III	<i>C. sakazakii</i>	82.85	8.70	Acceptable	1	100
<i>C. sakazakii</i>	IV	<i>C. sakazakii</i>	58.60	0.85	Unacceptable	1	100
<i>C. sakazakii</i>	V	<i>C. sakazakii</i>	99.96	1.01	Acceptable	6	100
<i>C. malonaticus</i>	I	<i>C. malonaticus</i>	99.65	85.19	Very good	24	100
<i>C. malonaticus</i>	II	<i>C. malonaticus</i>	97.52	100.00	Excellent	3	100
<i>C. dublinensis</i>	I	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	98.16	100.00	Excellent	2	100
<i>C. dublinensis</i>	II	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	94.10	58.73	Very good	9	100
<i>C. dublinensis</i>	III	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	51.15	1.01	Unacceptable	1	100
<i>C. dublinensis</i>	IV	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	94.07	0.59	Acceptable	1	100
<i>C. dublinensis</i>	V	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	91.67	0.59	Acceptable	2	100
<i>C. dublinensis</i>	VI	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	97.84	100.00	Excellent	1	100
<i>C. turicensis</i>	I	<i>C. turicensis</i>	99.89	100.00	Excellent	2	100
<i>C. turicensis</i>	II	<i>C. turicensis</i>	93.17	29.87	Good	1	100
<i>C. muytjensii</i>	I	<i>C. muytjensii</i>	98.99	100.00	Excellent	1	100
Total						84	100

一致率(%)=数值鉴定法与 *fusA* 基因测序法结果一致的菌株数/用 *fusA* 基因测序法鉴定的菌株数×100

Consistency rate (%)=Number of strains with consistent results between the numerical identification method and the *fusA* gene sequencing method/number of strains identified by the *fusA* gene sequencing method×100.

鉴定法与 *fusA* 基因测序法的总鉴定一致率为 100%。进一步地,按照表 3 中的评价标准对数值鉴定法鉴定结果的可信度进行了判定,82 株分离株得到了明确的鉴定结果(包括极好的鉴定结果、很好的鉴定结果、好的鉴定结果和可接受的鉴定结果),2 株的鉴定结果不明确(不可接受的鉴定结果)。2 株鉴定结果不明确的分离株包括 1 株 *C. sakazakii* IV 型及 1 株 *C. dublinensis* III 型。*C. sakazakii* IV 型分离株由于乳糖和肌醇反应为阴性,导致其生化谱与 *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* 的典型生化谱相似,*C. sakazakii* 的鉴定百分数仅达到 58.60%,*T* 值为 0.85%。此外,*C. dublinensis* subsp. *dublinensis* 的肌醇反应阳性率为 100%,而 *C. dublinensis* III 型分离株的肌醇反应呈阴性,导致了较大的结果偏差;*C. dublinensis* subsp. *dublinensis* 的鉴定百分数为 51.15%,*T* 值为 1.01%。虽然上述两株菌的鉴定结果仍与 *fusA* 基因测序法结果一致,但结果评价均为不可接受的鉴定结果。

3 讨论与结论

克罗诺杆菌属包含的 7 个种在环境和食品中的分布、生态习性及对人类健康的潜在风险差异显著。除 *C. condimenti* 与人类疾病无关外,其余 6 个物种均具有医学意义。*C. sakazakii* 由于与婴幼儿奶粉相关的感染案例和较高致死率而备受关注,其在干燥环境下的持久生存能力是食品安全研究的重要关注点^[15]。*C. malonaticus* 与 *C. turicensis* 能够通过受污染的食品传播,导致食源性疾病。尽管与 *C. sakazakii* 相比,关于这两种细菌导致的食源性疾病的案例报告较为少见,但它们仍然具有显著的临床重要性^[16]。*C. dublinensis*、*C. universalis* 和 *C. muytjensii* 在自然界中较为罕见,对人类健康构成的威胁也最低,但对它们的研究对深入理解其生态分布

和潜在健康风险具有重要价值^[9]。此外,由于鉴定水平的限制,其余菌种被识别和报告的频率远低于 *C. sakazakii*,这也是导致相关疾病案例的信息较少的原因之一。

细菌的准确鉴定是临床治疗和深入研究的基础。近年来,一系列分子生物学方法被用于克罗诺杆菌属的分种。例如,16S rRNA 基因序列分析^[17]、MALDI-TOF-MS 法^[18]及 PCR 方法^[19-20]等,然而这些方法都未能将克罗诺杆菌种或亚种有效区分,无法满足临床检验及鉴定研究要求。本研究使用的 *fusA* 基因测序法是目前区分克罗诺杆菌属 7 个菌种最有效可靠的方法^[21],但其操作烦琐、成本较高,并且复杂的分析过程及昂贵的仪器设备使其难以普及。生化鉴定应用较早、方法成熟,是早期进行菌种鉴定的常规方法。20 世纪 60 年代,数值分类(numerical taxonomy)和数值鉴定(numerical identification)的概念开始被应用于微生物分类学。这一方法基于细菌生化反应的统计分析,通过计算和比较不同菌株生化特性的相似性,实现细菌的分类和鉴定^[22]。建立在此基础上的 API 系统是一种经典的微生物鉴定工具,因其准确性、可靠性和用户友好性而广泛应用于临床微生物学和工业微生物学实验室。对于不同类型的微生物,法国生物梅里埃公司提供了多种专门的 API 试剂盒,如 API20NE 针对非肠道革兰氏阴性杆菌,API20E 用于肠杆菌和其他革兰氏阴性杆菌的鉴定,API STAPH 用于鉴定葡萄球菌和微球菌等^[23]。然而,API20E 对克罗诺杆菌属细菌仅可鉴定至“属”水平。此外,考虑 API 产品的进口性质导致较高的成本,以及其生化测试模式的固定性和地域性限制可能导致菌种的生化反应阳性率存在差异。我国面临着开发符合国内需求、能够准确鉴定食品中克罗诺杆菌属细菌至“种”水平的细菌鉴定系统的迫切需求。目前,我

国已有一些关于细菌数值鉴定系统的研究,如叶清华研发的肠杆菌科细菌数值鉴定系统^[12]、吴诗开发的李斯特菌数值鉴定系统(Numide-Listeria v1.0)^[24]等,但检测试剂均为基于单管加样的常规生化管,操作烦琐。

本研究创新性地构建了克罗诺杆菌属细菌数值鉴定系统。其中,生化反应组合的筛选综合考虑了显色效果、反应稳定性及微量干燥化的可行性、简便性等多方面因素,确保了鉴定结果的可靠性。鉴定条采用的一体化菌液接种方式简化了操作过程,同时增强了结果的易读性。阳性概率数据库是整个系统的核心,该系统的阳性表是对国内各地大量的分离株进行生化实验后统计获得的,并在验证过程中进行了多次修改,保证了基础数据的准确性与时效性。通过实验验证克罗诺杆菌数值快速鉴定法的准确度,结果显示,5株标准菌株均得到了正确鉴定,84株测试集分离株的总鉴定一致率(数值鉴定法与 *fusA* 基因测序法鉴定结果一致的比率)为100%。表明所建立的克罗诺杆菌属内菌种数值鉴定方法具有较高的鉴定水平,可作为克罗诺杆菌属分种(亚种)鉴定的可行手段。我们团队此前开发了肠杆菌科细菌数值鉴定生化试剂盒,相较于API20E,其操作更为简便、准确性高且价格低廉,但仅能将克罗诺杆菌鉴定至属水平^[25]。本研究的工作解决并完善了该鉴定限制,进一步拓展了系列产品的鉴定范围。

本研究方法尚存在改进的余地:*fusA* 基因序列分析方法仅能将克罗诺杆菌属菌株鉴定至“种”水平,无法进行“亚种”的区分。因此,本研究在进行分离株鉴定时,虽然通过数值鉴定法对 *C. dublinensis* 给出了亚种水平的鉴别,但由于缺乏可靠的参考标准,无法确定结果的准确性。后续可利用全基因组二代测序(高通量测序)法^[26-27]对所有 *C. dublinensis* 进行鉴定,确认

其所属亚种类型,进一步验证所研制的克罗诺杆菌属细菌数值鉴定系统在 *C. dublinensis* 亚种水平上的鉴定准确度。此外,鉴于本研究涉及的菌种数量有限,未来研究应进一步扩大样本范围,以丰富和完善现有的鉴定系统。

综上,本研究首次建立了克罗诺杆菌属内种间鉴定的细菌数值鉴定方法,仅通过8种生化试验即完成克罗诺杆菌属内9个种/亚种——*C. sakazakii*、*C. malonaticus*、*C. muytjensii*、*C. turicensis*、*C. universalis*、*C. condimenti*、*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*、*C. dublinensis* subsp. *lactaridi*、*C. dublinensis* subsp. *lausannensis* 的有效区分,简化操作流程的同时保证了高准确率。因此,该鉴定系统为克罗诺杆菌的临床诊断及相关食品安全检测提供了一种高效便捷的新方法,展现了广阔的应用潜力。另外,鉴于目前的细菌数值鉴定系统主要依赖传统生化反应,缺乏足够的特异性,探索细菌的特异性靶标成为关键。运用基因组学、转录组学、蛋白组学、代谢组学等生物信息学方法挖掘特征性酶,以区分不同菌株,并据此开发新一代鉴定条,将是未来研究的新方向。

REFERENCES

- [1] WANG Y, LING N, WANG YP, OU DX, LIANG Z, LI GQ, ZHAO HY, YE YW. Effect of ferric ions on *Cronobacter sakazakii* growth, biofilm formation, and swarming motility[J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 408: 110418.
- [2] IVERSEN C, MULLANE N, McCARDELL B, TALL BD, LEHNER A, FANNING S, STEPHAN R, JOOSTEN H. *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(6): 1442-1447.
- [3] ZHANG YS, XU XC, YANG JL, TAN MY, ZHOU WY, GAO L, YANG ZQ. Directional immobilization of phage on the palladium-based nanozyme for colorimetric detection of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 186: 115260.
- [4] YI M, HE P, LI JY, ZHANG JF, LIN L, WANG L, ZHAO LC. A portable toolbox based on time-resolved fluoroimmunoassay and immunomagnetic separation for *Cronobacter sakazakii* on-site detection in dairy[J]. International Dairy Journal, 2022, 133: 105425.
- [5] LIU J, XIE GY, XIONG Q, LIANG TB, XU HY. Sensitive dual readout assays based on rolling circle amplification for fluorescent and colorimetric detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula[J]. Food Control, 2021, 124: 107840.
- [6] YIN MY, WANG ZD, XIE PJ, HAN LR, LI LS, WANG HY, QIAO XQ, DENG QL. Fluorescence sensing platform for *Cronobacter sakazakii* based on the cationic metal-organic frameworks modified upconversion nanoparticles[J]. Food Control, 2023, 145: 109443.
- [7] KIM HR, KIM BC. Development of multi-reactive aptamers for *Cronobacter* spp. using the sequential partitioning method to detect them in powdered infant formula[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1249: 340935.
- [8] GAO B, MA TT, FENG L, HUANG XL, CHEN XL, XIONG YH. Light scattering intensity as signal transducer to enhance the performance of immunoassay for *Cronobacter* detection in powdered infant formula[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 344: 130312.
- [9] HU SF, YU YG, XIAO XL. Stress resistance, detection and disinfection of *Cronobacter* spp. in dairy products: a review[J]. Food Control, 2018, 85: 400-415.
- [10] 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.
- LI XF, CUI JH. Progress in research in species identification methods of *Cronobacter* spp.[J]. Disease Surveillance, 2018, 33(5): 413-416 (in Chinese).
- [11] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验: GB 4789.40—2024[S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.
- National Health Commission of the People's Republic of China and State Administration for Market Regulation. National Food Safety Standard-Food Microbiological Analysis-Examination of *Cronobacter*: GB 4789.40—2024[S]. Beijing: Standards Press of China, 2024 (in Chinese).
- [12] 叶青华. 食源性致病菌肠杆菌科细菌数值鉴定系统和耐药性研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2016.
- YE QH. Study on the numerical identification and antimicrobial resistance of foodborne enterobacteriales[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2016 (in Chinese).
- [13] 凌娜. 中国即食蔬菜食品中克罗诺杆菌的遗传多样性与酸胁迫响应机制研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2019.
- LING N. Study on genetic diversity and acid stress response mechanism of foodborne *Cronobacter* spp. in ready-to-eat vegetables of China[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [14] LI Q, LI CS, YE QH, GU QH, WU S, ZHANG YX, WEI XH, XUE L, CHEN MT, ZENG HY, ZHANG JM, WU QP. Occurrence, molecular characterization and antibiotic resistance of *Cronobacter* spp. isolated from wet rice and flour products in Guangdong, China[J]. Current Research in Food Science, 2023, 7: 100554.
- [15] CHAUHAN R, TALL BD, GOPINATH G, AZMI W, GOEL G. Environmental risk factors associated with the survival, persistence, and thermal tolerance of *Cronobacter sakazakii* during the manufacture of powdered infant formula[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(33): 12224-12239.
- [16] WANG L, WU P, SU YY, WEI Y, GUO X, YANG L, WANG M, LIU B. Detection of genus and three important species of *Cronobacter* using novel genus- and species-specific genes identified by large-scale comparative genomic analysis[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 885543.
- [17] LI HX, FU SQ, SONG D, QIN X, ZHANG W, MAN CX, YANG XY, JIANG YJ. Identification, typing and drug resistance of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula and processing environment[J]. Foods, 2023, 12(5): 1084.
- [18] CARVALHO GG, CALARGA AP, TEODORO JR, QUEIROZ MM, ASTUDILLO-TRUJILLO CA, LEVY CE, BROCCCHI M, KABUKI DY. Isolation, comparison of identification methods and antibiotic resistance of

- Cronobacter* spp. in infant foods[J]. Food Research International, 2020, 137: 109643.
- [19] LEE JI, KIM SS, KANG DH. Development of DNA probes to detect *Cronobacter sakazakii* based on comparative genomics and its application in food samples[J]. Food Control, 2022, 137: 108853.
- [20] SHANG YT, YE QH, WU QP, PANG R, ZHOU BQ, WANG CF, XIANG XR, LI F, WANG J, ZHANG YZ, WANG JS, SUN XL, ZHANG JM. PCR and multiplex PCR assays for the detection of *Cronobacter* species using specific targets obtained by a bioinformatics approach[J]. Food Control, 2021, 125: 107896.
- [21] VASCONCELLOS L, CARVALHO CT, TAVARES RO, de MELLO MEDEIROS V, de OLIVEIRA ROSAS C, SILVA JN, dos REIS LOPES SM, FORSYTHE SJ, BRANDÃO MLL. Isolation, molecular and phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. in ready-to-eat salads and foods from Japanese cuisine commercialized in Brazil[J]. Food Research International, 2018, 107: 353-359.
- [22] 邓宾, 张蕴丽. 细菌数值鉴定法及鉴定系统的发展[J]. 中国医疗设备, 2011, 26(3): 57-59.
DENG B, ZHANG YL. The development and application of bacteria numerical identification method[J]. China Medical Devices, 2011, 26(3): 57-59 (in Chinese).
- [23] PASCU C, HERMAN V, IANCU I, COSTINAR L. Etiology of mastitis and antimicrobial resistance in dairy cattle farms in the western part of Romania[J]. Antibiotics, 2022, 11(1): 57.
- [24] 吴诗. 食源性单增李斯特菌数值鉴定系统及其遗传多样性研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2016.
WU S. The study on numerical identification system and genetic diversity for foodborne *Listeria monocytogenes*[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2016 (in Chinese).
- [25] 金乐萱, 万强, 曹璐璐, 叶青华, 王迅, 张菊梅, 蔡芷荷, 吴清平. 基于数值鉴定法的肠杆菌科生化试剂盒的研制及效果评价[J]. 微生物学报, 2024. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20230701.
JIN LX, WAN Q, CAO LL, YE QH, WANG X, ZHANG JM, CAI ZH, WU QP. Development and performance evaluation of a biochemical kit for identification of *Enterobacteriaceae* based on numerical identification method[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20230701 (in Chinese).
- [26] WANG L, ZHU WX, LU GG, WU P, WEI Y, SU YY, JIA TY, LI LX, GUO X, HUANG M, YANG Q, HUANG D, LIU B. In silico species identification and serotyping for *Cronobacter isolates* by use of whole-genome sequencing data[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 358: 109405.
- [27] 张红芝, 刘雪薇, 魏腾, 鲁珺琰, 张曦. 克罗诺杆菌属食品分离株种水平鉴定方法比较研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(5): 503-508.
ZHANG HZ, LIU XW, WEI T, LU JY, ZHANG X. Study on species identification of *Cronobacter* spp. in foods[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2020, 32(5): 503-508 (in Chinese).