

# 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

庄平<sup>1</sup>, 余以刚<sup>1</sup>, 胡双芳<sup>1</sup>, 李蓉<sup>2</sup>, 肖性龙<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 中山出入境检验检疫局, 广东中山 528403)

**摘要:** 为实现奶粉中常见污染菌穆汀斯克罗诺杆菌的快速检测与控制, 本文根据 *cgcA* 基因序列设计出特异性探针和引物, 建立了运用实时荧光定量 PCR 法检测穆汀斯克罗诺杆菌的反应体系和反应条件, 并对该法的特异性、灵敏度、稳定性进行评价, 并进行人工染菌样品检测实验。特异性结果表明, 对穆汀斯克罗诺杆菌的荧光 PCR 检测结果的特异性为 100%; 灵敏度结果表明, 穆汀斯克罗诺杆菌检出限在 440 cfu/mL; 稳定性结果表明, 穆汀斯克罗诺杆菌组内实验 CV 在 0.48~0.69% 之间波动, 而组间实验 CV 在 0.69~0.73% 之间波动; 人工染菌样品试验表明, 在增菌 6 h 后能检出阳性。本研究所建立的实时荧光定量 PCR 法特异性好、灵敏度高、稳定性强, 有望成为快速检测食品中穆汀斯克罗诺杆菌污染的新方法, 具有很好的研究价值和应用前景。

**关键词:** 穆汀斯克罗诺杆菌; 荧光定量 PCR; 检测

文章编号: 1673-9078(2016)2-296-301

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.043

## Rapid Detection of *Cronobacter mytjensii* by Real-time PCR Based on *cgcA* Gene

ZHUANG Ping<sup>1</sup>, YU Yi-gang<sup>1</sup>, HU Shuang-fang<sup>1</sup>, LI Rong<sup>2</sup>, XIAO Xing-long<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Zhongshan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhongshan 528400, China)

**Abstract:** To achieve the rapid detection of the common contaminating bacteria *C. mytjensii* in milk powder, specific probes and primers were designed based on the *cgcA* gene. The reaction system and reaction conditions for the detection of *C. mytjensii* were developed using quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) assay. Additionally, the specificity, sensitivity, and reproducibility of this method were evaluated, and the method was applied for the detection of artificially contaminated samples. The results showed that the specificity of real-time PCR assay was 100%; the sensitivity results revealed a detection limit of 440 cfu/mL for *C. mytjensii*. The reproducibility test results showed that the intra-assay coefficient of variations (CVs) ranged from 0.48% to 0.69%, while inter-assay CVs ranged from 0.69% to 0.73%. For the artificially contaminated samples, a positive result was obtained after 6 h of enrichment. The established real-time PCR assay exhibited good specificity, high sensitivity, and high reproducibility, and has promising potential to be a novel method for the rapid detection of *C. mytjensii* in food as well as a good value in research and application.

**Key words:** *Cronobacter mytjensii*; quantitative real-time polymerase chain reaction; detection

随着一系列与克罗诺杆菌 (*Cronobacter* spp.) 相关的奶粉召回和重大感染事件的爆发, 婴幼儿奶粉中克罗诺杆菌的污染问题受到全世界的普遍关注。克罗诺杆菌分布广泛, 在婴幼儿奶粉、奶酪、腌肉、水、蔬菜、大米、面包、茶叶、草药、调味料及豆腐等多

收稿日期: 2015-04-15

基金项目: 广东省省部产学研合作重大专项 (2013A090100014); 广东省科技计划项目 (2014A040401011、2013B021100005)

作者简介: 庄平 (1991-), 男, 硕士, 研究方向: 食品安全与检测

通讯作者: 肖性龙 (1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品安全与检测

种食品中被检测到<sup>[1-2]</sup>。克罗诺杆菌下属 10 个种, 除了最新归类的三种 *C. zurichensis*, *C. helveticus* 和 *C. pulveris* 等还未见引起人体疾病的报道, 包括穆汀斯克罗诺杆菌 (*C. mytjensii*) 在内的 7 种克罗诺杆菌均被证实对人体具有致病性, 对特殊人群的致死率高达 40~80%<sup>[3-4]</sup>。克罗诺杆菌对温度和化学物质的敏感性存在较大的差异, 而且各种菌的致病因子在特定情况下的表达也各不相同, 从而导致的致病力也不尽相同。穆汀斯克罗诺杆菌具有非常强的抵抗干燥和耐渗透压的能力, 这有利于其在婴幼儿配方奶粉干燥环境下存活<sup>[4-5]</sup>。因此穆汀斯克罗诺杆菌的快速准确检测对于由

该菌引起的食源性疾病的预防和控制具有十分重要的意义。

穆汀斯克罗诺杆菌的检测难点在于该菌同其它克罗诺杆菌以及肠杆菌科的其他细菌特别是阴沟肠杆菌在形态特征、生理生化特征方面都具有高度相似性,并有极高的 DNA 同源性<sup>[5-6]</sup>。无论是 FDA 推荐的传统生化培养法还是各类基于核苷酸片段的检测方法都不是针对穆汀斯克罗诺杆菌设计的,不能对穆汀斯克罗诺杆菌进行快速准确的鉴定。二鸟苷酸环化酶广泛存在于各种食源性致病菌中,相关的某些基因片段在许多细菌中都具有高度的保守性,如霍乱弧菌、沙门氏菌和大肠杆菌<sup>[7]</sup>。克罗诺杆菌属中参与编码二鸟苷酸环化酶的 *cgcA* 基因能与肠杆菌科其他细菌进行很好的区分,同时具有属内的保守性和种间等位基因的特异性差异<sup>[8-9]</sup>。Carter 等<sup>[10]</sup>研究表明基于 *cgcA* 基因设计出的引物可对克罗诺杆菌属进行分型研究。因此本文拟参考 *cgcA* 基因的保守序列设计用于荧光定量 PCR 的特异性检测穆汀斯克罗诺杆菌的引物与探针。

本研究在分析已报道穆汀斯克罗诺杆菌及其它克罗诺杆菌基因序列的基础上,基于 *cgcA* 基因分别设计引物及荧光探针,建立实时荧光定量 PCR 方法,对其进行了特异性、灵敏性、稳定性的检验,并进行人工染菌样品的初步检测,以期建立快速准确检测穆汀斯克罗诺杆菌的方法提供新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与样品

奶粉中最常见的致病菌为克罗诺杆菌和肠杆菌科细菌,其次为单增李斯特菌、沙门氏菌、大肠杆菌以及志贺氏菌<sup>[11]</sup>。本文使用的 34 株菌株详见表 1。表 1 中的所有细菌都是婴幼儿配方奶粉的潜在污染源,并用分子或传统检测方法得以分型确定。

#### 1.1.2 主要试剂

Premix Ex Taq(Probe qPCR) (宝生物工程(大连)有限公司), 细菌 DNA 提取试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司), 引物、探针(上海辉瑞生物科技有限公司合成), 缓冲蛋白胨水(BPW)、LB 培养基(广东环凯微生物科技有限公司), 金装婴幼儿配方奶粉(内蒙古伊利实业集团股份有限公司), DEPC 水。

#### 1.1.3 主要仪器

ABI 7500 Real Time PCR System、Thermo 微量超

Biophotometer 分光光度计(Eppendorf)、Thermo 微量移液器。

表 1 菌种列表和 PCR 检测结果

Table 1 Bacterial strains used in this study and PCR results

菌株	编号/来源	荧光 PCR 检测结果
<i>Cronobacter muytjensii</i>	ATCC 51329	+
<i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC 12868	-
<i>Cronobacter sakazakii</i>	CMCC 45401	-
<i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC 29544	-
<i>Cronobacter sakazakii</i>	奶粉分离株 1	-
<i>Cronobacter sakazakii</i>	奶粉分离株 2	-
<i>Cronobacter turicensis</i>	ZSCIQ	-
<i>Cronobacter malonaticus</i>	ZSCIQ	-
<i>Cronobacter universails</i>	ZSCIQ	-
<i>Cronobacter dublinensis</i> sp. dublinensis	ZSCIQ	-
<i>Cronobacter dublinensis</i> sp. lausannensis	ZSCIQ	-
<i>Cronobacter dublinensis</i> sp. lactatidi	ZSCIQ	-
<i>Cronobacter condiment</i>	ZSCIQ	-
<i>Enterobacter cloace</i>	ATCC 13047	-
<i>Enterbacter cloacae</i>	CICC 21539	-
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12900	-
<i>E. coli</i> O157:H7	CICC 21530	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 9637	-
<i>Enterbacter aerogenes</i>	CICC 10293	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13408	-
<i>Bacillus cereus</i>	CMCC 70331	-
<i>Bacillus cereus</i>	CCTCCAB92023	-
<i>Shigella sonnei</i>	CMCC 51592	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	CCTCC 94018	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	CMCC 50337	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	CMCC 50732	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	CMCC 54002	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19117	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCTCC 97021	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CICC 6149	-
<i>Bacillus subtilis</i>	CICC 20533	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	CICC 23706	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CICC 6119	-
<i>Lactobacillus pentosus</i> DMDL 9010	CGMCC 5172	-

注: ATCC 为美国典型菌种保藏中心, CMCC 为中国医学细菌保藏管理中心, CICC 为中国工业微生物菌种保藏管理中心, CGMCC 为中国普通微生物菌种保藏管理中心, NCTC 为

英国典型菌种保藏中心, ZSCIQ 为中山出入境检验检疫局; “+”代表阳性, “-”代表阴性。

## 1.2 方法

### 1.2.1 引物探针设计

引物探针设计: 经过 Blast 分析可知, *cgcA* 基因具有克罗诺杆菌属内保守性。本研究根据克罗诺杆菌属 *cgcA* 基因序列与其他菌种的差异, 运用 ABI 的 Primer Express 及 DNASTar 中的 PrimerSelect 软件, 设计出引物和探针, 见表 2。

表 2 引物和探针序列

Table 2 Sequences of primers and probes

穆汀斯克罗诺杆菌	序列(5'-3')	长度	T <sub>m</sub> /°C	扩增片段长度/bp
上游引物 CMuPF14	GGATACGCAGGAGGTGGCA	19	60.6	
下游引物 CMuPR13	GATGCTGCCTGCCAGCAGG	19	60.2	120
探针 CMuPB64	FAM-5'CATTTTAGCGCTTGATACTCCCTGGGC-BHQ1	28	70.0	

### 1.2.2 DNA 模板的提取

所有细菌用液体 LB 培养基在 37 °C 下培养 12 h 后, 测 OD 值, 估计细菌浓度。然后分别取 1 mL 菌液依照 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA, 提取的 DNA 作为反应模板贮存于 -20 °C 备用。

### 1.2.3 Real-time PCR 检测穆汀斯克罗诺杆菌方法的建立

根据 takara Premix Ex Taq 试剂盒说明书要求, 每 20 μL 的 PCR 反应体系包含 10 μL 2×Premix Ex Taq (Probe qPCR), 0.2 μL ROX Reference Dye II, 1.0 μL 上游引物 (10 μM), 1.0 μL 下游引物 (10 μM), 0.5 μL 探针 (10 μM), 2 μL Template (反应组使用备用 DNA 模板, 对照组使用 DEPC 水), 于 ABI 7500 Real Time PCR System 进行实时荧光 PCR 扩增。反应程序: 95 °C 变性 1 min; 以 95 °C 5 s, 60 °C 40 s 扩增 40 个循环 (收集荧光)。

### 1.2.4 Real-time PCR 的特异性

根据步骤 1.2.2 提取的 DNA 模板和步骤 1.2.3 建立的反应条件与反应体系进行荧光 PCR 特异性实验。判断研究方法的特异性, 避免设计上出现假阳性或假阴性。

### 1.2.5 Real-time PCR 的灵敏度

取穆汀斯克罗诺杆菌于 LB 培养基, 37 °C 培养 12 h, 然后按 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 梯度稀释, 取 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 分别进行涂板计数, 涂板的菌液量为 100 μL/平板, 同时取各梯度菌液 1 mL 用细菌提取试剂盒提取基因组 DNA, 具体步骤参照该试剂盒说明书, 用优化后的反应条件与反应体系进行荧光 PCR 实验, 每个梯度重复 3 次。

### 1.2.6 Real-time PCR 的稳定性

取穆汀斯克罗诺杆菌于 LB 培养基, 37 °C 培养 12 h, 然后按如下梯度稀释 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>, 取 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 用细菌提取试剂

盒提取 DNA。在 20 μL 荧光 PCR 反应体系中, 分别加入 2 μL 以上提取的各个梯度穆汀斯克罗诺杆菌基因组 DNA, 按前述 PCR 反应条件进行荧光 PCR 检测, 进行组内和组间稳定性测试。组内试验一次做 4 个重复, 同时上机, 计算 Ct 值的标准差与 CV 值。组间试验不设重复, 在不同的时间内分别做 4 次, 计算 Ct 值的标准差与 CV 值。

### 1.2.7 检测方法的初步应用

取婴幼儿配方奶粉, 根据 GB 4789.40-2010<sup>[12]</sup> 检测证明无克罗诺杆菌污染。分别吸取 1 mL 浓度为 8.3×10<sup>3</sup>、8.3×10<sup>2</sup>、83、8.3 cfu/mL 的菌悬液, 均匀混在 25 g 婴幼儿配方奶粉中, 静置 10 min, 加入 225 mL 缓冲蛋白胍水增菌液, 混合均匀后, 37 °C 培养, 分别在 4 h、6 h、8 h、18 h、24 h 后各取 1 mL 增菌液, 12000 r/min 离心 10 min, 小心挑去上层脂肪, 12000 r/min 离心 5 min, 按细菌提取试剂盒要求提取 DNA。根据前述所建立 PCR 反应条件进行荧光 PCR 检测, 并用 DEPC 水作为阴性对照。同时根据国标法 GB 4789.40-2010 对各梯度增菌液进行菌落计数。所有实验重复三次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PCR 的特异性

用荧光定量 PCR 检测收集到的穆汀斯克罗诺杆菌和其他代表性菌株, 特异性实验结果如表 1 所示, 仅穆汀斯克罗诺杆菌出现阳性“S”型扩增曲线, 其他菌株均无扩增为阴性, 在选定的菌株范围内, 荧光定量 PCR 检测结果的特异性为 100%。如图 1 展示了引物和探针针对穆汀斯克罗诺杆菌与其亲缘关系接近的阴沟肠杆菌和克罗诺杆菌属其他种良好的选择特异性, 其中阴沟肠杆菌与阪崎克罗诺杆菌均未出现扩增为阴性。

## 2.2 PCR 的灵敏度

荧光定量 PCR 检测和平板计数结果见表 3 和图 2。荧光 PCR 结果表明,随着稀释梯度的不断增加,即菌悬液中菌浓度的不断减少,其 Ct 值相应的增大,直至稀释梯度为  $10^{-6}$  时达到检出限,其平均 Ct 值达 37.43, 标准差为 0.14。平板计数结果显示,前四个稀释梯度  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  由于菌液浓度太高无法计数,后三个稀释梯度  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  平板计数平均值分别为 318、44、5,涂板的菌液量为  $100 \mu\text{L}/\text{平板}$ ,计算得到稀释梯度为  $10^{-6}$  的菌浓度为  $440 \text{ cfu}/\text{mL}$ ,即荧光 PCR 检出限在  $440 \text{ cfu}/\text{mL}$ 。结果表明上述引物和

表 3 灵敏度实验结果

Table 3 Sensitivity for detection of *C. mytjensii* by real-time PCR

稀释梯度	Ct 值			平均 Ct (SD)	%CV	平板计数平均值
	1	2	3			
$10^{-1}$	20.16	20.56	20.90	20.54(0.30)	1.46	TNTC
$10^{-2}$	23.82	23.56	24.09	23.82(0.22)	0.92	TNTC
$10^{-3}$	27.69	28.15	27.97	27.94(0.20)	0.72	TNTC
$10^{-4}$	31.38	31.08	31.71	31.39(0.26)	0.83	TNTC
$10^{-5}$	33.79	33.36	33.72	33.62(0.19)	0.57	318
$10^{-6}$	37.57	37.47	37.24	37.43(0.14)	0.37	44
$10^{-7}$	-	-	-	-	-	5

注: 变异系数 (%CV) = 标准差 SD/平均 Ct 值。

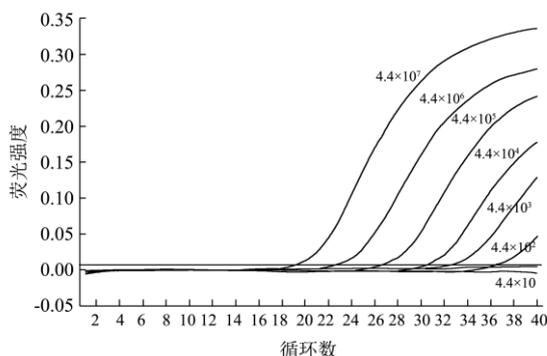


图 2 穆汀斯克罗诺杆菌灵敏度曲线

Fig.2 Curve of detection limit of *C. mytjensii* by real-time PCR

## 2.3 PCR 的稳定性

稳定性结果如表 4 所示。组内实验每个稀释梯度的 4 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本上重合,平均 Ct 值范围在 27.56~37.51 之间,CV 在 0.48~0.69% 之间波动。而组间实验每个稀释梯度的 4 个时间段扩增曲线在阈值线附近也基本上重合,平均 Ct 值范围在 27.54~37.51 之间,在 0.69~0.73% 之间波动。组内实验和组间实验对应的稀释梯度 Ct 值也基本重合,综上可知本方法稳定性良好。

探针具有良好的灵敏度。

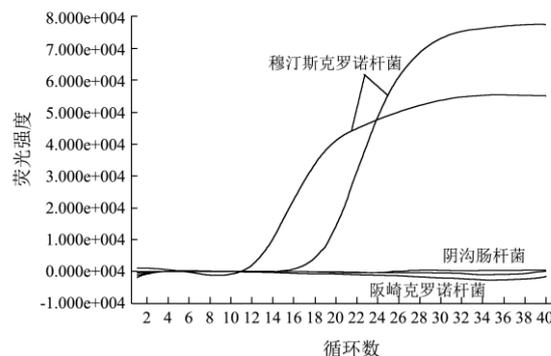


图 1 荧光 PCR 扩增结果

Fig.1 Real-time PCR amplification result

## 2.4 PCR 法对产品样本的检测结果

用荧光定量 PCR 检测人工染菌婴幼儿配方奶粉,实验所示三个梯度浓度菌悬液在增菌 6 h 后检测出阳性,结果如表 5 所示。国标法对人工染菌婴幼儿配方奶粉的检测发现至少需要 5 d 才能看到结果,并与实时荧光定量 PCR 方法一致。通过结果比较,实时荧光定量 PCR 法大大缩短了穆汀斯克罗诺杆菌检出所需的时间。如图 3 所示,当人工污染量为  $830 \text{ cfu}/25\text{g}$  时,增菌 4 h 依然无法检出穆汀斯克罗诺杆菌,但是增菌 6 h 后 Ct 值达到可检出范围,随着增菌时间的增加,菌含量不断增加, Ct 值不断减小。

## 3 结论

3.1 克罗诺杆菌的传统检测方法包括增菌培养、选择性培养基分离纯化、鉴定及血清鉴定与确认,而菌的鉴定通常需要 5~7 d,而且容易出现假阴性或假阳性的缺点。近年来,克罗诺杆菌分子检测方法取得重要进展,叶应旺等<sup>[13]</sup>以克罗诺杆菌基因组中  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷酶基因和 *ompA* 基因为目标,建立起双重 PCR 检测方法应用于克罗诺杆菌属的快速检测,但是传统

PCR 检测方法存在易受污染, 需要使用有毒试剂等缺点。实时荧光定量 PCR 不仅解决了传统 PCR 的缺点, 而且比传统 PCR 具有更强的特异性、更高的灵敏度。Fricker-Feer 等<sup>[14]</sup>比较了 3 种基于实时荧光 PCR 的商品化克罗诺杆菌检测方法, 在对 8 株克罗诺杆菌和 13 株非克罗诺杆菌特异性检测中发现, Biocontrol 公司和 Bioteccon Diagnostics 公司的试剂盒特异性为 100% 而

杜邦公司的 Dupont Qualicon BAX 检测系统将一株阴沟肠杆菌误判为克罗诺杆菌, 使检测结果呈假阳性。目前基于保守序列如 16S rRNA、*rpoB*、*ompA*、*dnaG*、*gyrB* 等的克罗诺杆菌分子检测技术相继建立, 很多方法并没有在食品中得到验证, 穆汀斯克罗诺杆菌作为克罗诺杆菌的重要分支, 针对其的特异性检测技术还未见报道。

表 4 组内与组间实验 CV 值

**Table 4 CV values for intra- and inter-assay groups**

稀释浓度	Ct 值				平均 Ct 值 (SD)	%CV
	1	2	3	4		
组内						
10 <sup>-6</sup>	37.20	37.54	37.41	37.87	37.51(0.24)	0.64
10 <sup>-5</sup>	33.54	33.26	33.25	33.79	33.46(0.22)	0.66
10 <sup>-4</sup>	31.38	31.43	31.74	31.63	31.55(0.15)	0.48
10 <sup>-3</sup>	27.65	27.32	27.45	27.83	27.56(0.19)	0.69
组间						
10 <sup>-6</sup>	37.56	37.91	37.31	37.25	37.51(0.26)	0.69
10 <sup>-5</sup>	33.34	33.71	33.84	33.26	33.54(0.24)	0.72
10 <sup>-4</sup>	31.34	31.17	31.60	31.79	31.48(0.23)	0.73
10 <sup>-3</sup>	27.62	27.29	27.79	27.46	27.54(0.19)	0.69

表 5 婴幼儿配方奶粉人工染菌结果

**Table 5 Detection of *C. muytjensii* in artificially contaminated milk formula for babies**

增菌 时间/h	Ct 值		
	增菌液浓度/(cfu/25g)		
	830	83	8.3
4	-	-	-
6	36.31±0.31	37.60±0.40	37.54±0.33
12	23.74±0.27	29.96±0.29	31.29±0.41
24	18.18±0.35	25.02±0.34	27.83±0.32

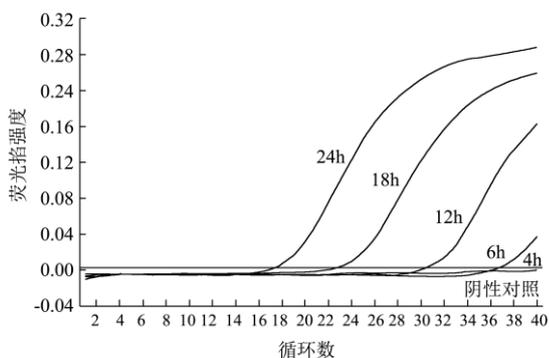


图 3 穆汀斯克罗诺杆菌荧光 PCR 扩增结果

**Fig.3 Results of real-time PCR amplification of *C. muytjensii***

3.2 为实现奶粉中常见污染菌穆汀斯克罗诺杆菌的快速检测与控制, 本文根据其 *cgA* 基因序列设计出特异性探针和引物, 建立了实时荧光定量 PCR 法, 并对

该法的特异性、灵敏度、稳定性及适用性进行试验。在选定的菌株范围内, 荧光检测结果特异性达 100%, 并且具有极高的灵敏度, 检出限在 440 cfu/mL, 同时稳定性结果良好, 其中组内实验 CV 0.48~0.69% 之间波动, 而组间实验在 0.69~0.73% 之间波动。研究建立的实时荧光定量 PCR 检测方法通过人工染菌样品试验得到验证, 阳性检出时间只需 6 h, 相比于国标法 GB 4789.2-2010 检测所需至少 5 d, 大大缩短了穆汀斯克罗诺杆菌检测所需时间, 且具有操作简单的优点。3.3 综上所述, 本研究所构建的实时荧光定量 PCR 探针法具有操作简单、快速、特异性强、灵敏度高、稳定性好等优点, 为食品中穆汀斯克罗诺杆菌污染的检测提供了新的手段, 有望发展为快速检测穆汀斯克罗诺杆菌污染的有效手段。

参考文献

[1] Ryu J H, Ko J, Park H, et al. Microbial examination of nonheated foods served in feeding programs of elementary schools, Iksan City, Jeonbuk Province, Korea [J]. Journal of Food Protection®, 2011, 74(9): 1564-1568

[2] Kim S, Yu J H, Rhee M S. A rapid and simple screening method of *Cronobacter spp.* in cell suspension and tofu [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(6): 1520-1524

- [3] Zimmermann J, Schmidt H, Loessner M J, et al. Development of a rapid detection system for opportunistic pathogenic *Cronobacter spp.* in powdered milk products [J]. Food Microbiology, 2014, 42: 19-25
- [4] Joseph S, Forsythe S J. Insights into the emergent bacterial pathogen *Cronobacter spp.*, generated by multilocus sequence typing and analysis [J]. Frontiers in microbiology, 2012, 3
- [5] Edelson-Mammel S G, Porteous M K, Buchanan R L. Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula [J]. Journal of Food Protection®, 2005, 68(9): 1900-1902
- [6] Jackson E E, Sonbol H, Masood N, et al. Genotypic and phenotypic characteristics of *Cronobacter* species, with particular attention to the newly reclassified species *Cronobacter helveticus*, *Cronobacter pulveris*, and *Cronobacter zurichensis* [J]. Food Microbiology, 2014, 44: 226-235
- [7] Sondermann H, Shikuma N J, Yildiz F H. You've come a long way: c-di-GMP signaling [J]. Current Opinion in Microbiology, 2012, 15(2): 140-146
- [8] Kucerova E, Clifton S W, Xia X Q, et al. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species [J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9556
- [9] Stephan R, Lehner A, Tischler P, et al. Complete genome sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a food-borne pathogen causing deaths in neonates [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(1): 309-310
- [10] Carter L, Lindsey L A, Grim C J, et al. Multiplex PCR assay targeting a diguanylate cyclase-encoding gene, *cgcA*, to differentiate species within the genus *Cronobacter* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(2): 734-737
- [11] Mortari A, Lorenzelli L. Recent sensing technologies for pathogen detection in milk: A review [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 60: 8-21
- [12] 中华人民共和国卫生部, GB 4789.40-2010, 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验》[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010  
GB 4789.40-2010, National food safety standard Food microbiological examination: *Enterobacter sakazakii* [S].
- [13] 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.  
YE Ying-wang, WU Qing-ping, GUO Wei-peng, et al. Rapid detection for *Enterobacter sakazakii* in powdered milks based on species-specific PCR [J]. Bulletin of Microbiology, 2007, 34(6): 1192-1197
- [14] Fricker-Feer C, Cernela N, Bolzan S, et al. Evaluation of three commercially available real-time PCR based systems for detection of *Cronobacter* species [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(2): 200-202