

市售婴幼儿米粉中克罗诺杆菌的分子分型和耐药分析

梁安莉, 农珍妮, 温桂珍, 杨显彪, 韩志超, 谢斯
(广西民族大学相思湖学院, 广西南宁 530008)

摘要: 为了解婴幼儿配方米粉中克罗诺杆菌的污染情况、分子分型特征及耐药性情况, 采集广西区内市售 6 个厂家和品牌不同配方的婴幼儿米粉进行克罗诺杆菌分离及 *fusA* 基因的扩增、测序和 MLST 数据库比对分析。并应用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 对菌株进行分型鉴定及微量肉汤稀释法测定分离株对 8 种常见抗生素的最小抑菌浓度 (Minimal Inhibitory Concentrations, MICs)。采集的 268 份婴幼儿米粉共分离到 32 株克罗诺杆菌, 检出率为 11.94%, 菌株鉴定结果显示 32 株分离株包括 22 株 *C.sakazakii*、6 株 *C.malonaticus*、3 株 *C.dublinensis* 和 1 株 *C.muytjensii*。不同添加成分的婴幼儿配方米粉污染情况差异明显, 其中添加淮莲和果蔬的米粉污染率最高为 17.78% 和 15.38%。PFGE 分析显示 32 个菌株共分成 32 种不同的分子型, 相似度为 61.20%~92.30%, 所有分离株对环丙沙星、庆大霉素和头孢噻肟都敏感, 部分菌株 (6.25%~43.75%) 对氯霉素、四环素、甲氧苄啶/磺胺甲基异恶唑、头孢西丁和萘啶酸表现为中等敏感, 有 2 个菌株对氯霉素表现为抗性。结果表明市售婴幼儿配方米粉中存在一定的克罗诺杆菌污染, 尤其是添加营养成分的米粉。婴幼儿配方米粉中克罗诺杆菌污染来源广泛, 部分菌株对一些抗菌药表现为中等敏感甚至是抗性, 提示克罗诺杆菌对抗菌药的敏感性呈现减弱的趋势。

关键词: 克罗诺杆菌; 婴幼儿米粉; 分离鉴定; 脉冲场凝胶电泳 (PFGE); 耐药性

文章编号: 1673-9078(2020)12-36-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0504

Molecular Typing and Drug Resistance of *Cronobacter* spp. in Commercial Formula Rice Flour Products for Infants and Young Children

LIANG An-li, NONG Zhen-ni, WEN Gui-zhen, YANG Xian-biao, HAN Zhi-chao, XIE Si
(Xiangsihu College of Guangxi University for Nationalities, Nanning 530008, China)

Abstract: To understand the contamination, molecular typing and drug resistance of *Cronobacter* spp. in formula rice flour products for infants and young children, the formula products from six different manufacturers and brands with different ingredients were collected in the markets of Guangxi city for isolation of *Cronobacter*, and *fusA* gene amplification, sequencing and MLST database comparative analysis. The molecular typing of the isolates was detected by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), and the minimal inhibitory concentration (Minimal Inhibitory Concentrations, MICs) of the isolates against 8 common antibiotics was analyzed by the broth microdilution method. Two hundred sixty-eight samples of formula rice flour products were collected and 32 strains of *Cronobacter* spp. were isolated, with the detection rate as 11.94%. The strain identification results showed 32 isolated strains, including 22 strains of *C. sakazakii*, 6 strains of *C. malonaticus*, 3 strains of *C. dublinensis* and 1 strain of *C. muytjensii*. The contamination of the formula rice flour products with different ingredients differed significantly, with those ingredients fortified with Huailian or fruits and vegetable having the highest contamination rates (17.78% and 15.38%, respectively). PFGE analysis showed that 32 strains were divided into 32 different molecular types, with the similarity in the range of 61.20%~92.30%. All the isolates were sensitive to ciprofloxacin, gentamycin and cefotaxime, with some (6.25%~43.75%) being moderately sensitive to chloramphenicol,

引文格式:

梁安莉, 农珍妮, 温桂珍, 等. 市售婴幼儿米粉中克罗诺杆菌的分子分型和耐药分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(12): 36-42

LIANG An-li, NONG Zhen-ni, WEN Gui-zhen, et al. Molecular typing and drug resistance of *Cronobacter* spp. in commercial formula rice flour products for infants and young children [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 36-42

收稿日期: 2020-05-30

基金项目: 广西高校中青年骨干教师科研基础能力提升项目 (2019KY1008)

作者简介: 梁安莉 (1983-) 女, 讲师, 研究方向: 食品微生物

tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, cefoxitin and nalidixic acid, and two being resistant to chloramphenicol. The results showed a certain degree of contamination of *Cronobacter* spp. in the formula rice flour products, especially those fortified with nutrients. The source of contaminated *Cronobacter* spp. is broad, with some strains from the formula rice flour products being moderately sensitive or even resistant to some antibiotics, indicating that the sensitivity of *Cronobacter* spp. to antibiotics was on a weakening trend.

Key words: *Cronobacter* spp.; rice flour products for infants and young children; isolation and identification; pulsed field gel electrophoresis (PFGE); drug resistance

罗诺杆菌属包括阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌 (*C. turicensis*)、莫金斯克罗诺杆菌 (*C. muytjensii*)、康帝蒙提克罗诺杆菌 (*C. condimenti*)、尤尼沃斯克罗诺杆菌 (*C. universalis*) 和都柏林克罗诺杆菌 (*C. dublinensis*) 七种^[1,2]。克罗诺杆菌被认为是新的机会性食源致病菌, 所有年龄段的人群都可被感染^[3-5]。婴儿感染克罗诺杆菌可引起致命性的坏死性结肠炎 (necrotizing enterocolitis, NEC)、败血症和脑膜炎; 体弱成年人和老年人感染可引起菌血症、尿脓毒症和伤口感染。婴儿感染克罗诺杆菌引起 NEC 的发病率为 2%~5%, 死亡率为 15%~25%。新生儿, 尤其是早产或出生体重轻的婴儿为易感人群, 早产儿出生体重 < 1.5 kg 时发病高达 13%, 被感染后除了引起脑膜炎和坏死性小肠结肠炎外, 还可能造成严重的神经系统后遗症, 死亡率高达 10%~80%^[4,6-10]。

克罗诺杆菌在自然环境中分布广泛, 很多植物如蔬果、药草和香料作物等均可被污染。一些生物也会携带克罗诺杆菌, 如厩螫蝇幼虫被认为是克罗诺杆菌的环境宿主之一, 因此与厩螫蝇有密切联系的老鼠、苍蝇、蟑螂都可能是食品污染来源^[11]。近年来, 克罗诺杆菌的污染逐渐受到人们的关注, 很多类型的加工食品中都检测到克罗诺杆菌的污染, 包括婴幼儿配方奶粉、配方米粉、奶酪、谷类食品、大米、植物性食品添加剂等^[12-17]。婴幼儿是克罗诺杆菌主要的易感人群, 感染后病死率较高, 因此, 婴幼儿食品的克罗诺杆菌污染情况尤其受到关注^[18-21]。当前, 随着细菌抗药性的压力不断增强, 耐药性现象不断增多, 大大增加了临床用药的难度。基于上述情况, 本研究调查广西区内市售的不同厂家、不同批次和不同添加成分的婴幼儿配方米粉中克罗诺杆菌的污染情况, 并对分离株进行鉴定和 PFGE 分子分型及抗菌药耐药特征分析。

1 材料和方法

1.1 样品采集

2017 年 6 月-2019 年 8 月在广西区内超市购买不同品牌的婴幼儿米粉、其中包括 6 个不同的厂家和品

牌 (A~F) 不同批次的婴幼儿米粉共 268 份, 配方米粉的种类包括纯营养米粉 (未添加其他配料原料的), 添加淮山 (淮莲) 米粉, 添加蔬果米粉和添加高蛋白乳粉米粉。

1.2 克罗诺杆菌分离培养

菌株的分离培养参照 Iversen (2007 年) 的方法进行^[22], 无菌条件下称取米粉 100 g 溶于 900 mL 缓冲蛋白胨水 (北京陆桥), 37 °C 中培养 18 h。取 1 mL 的培养液转种至 10 mL 万古霉素改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (北京陆桥), 44 °C 培养 24 h 后, 在阪崎肠杆菌显色培养基 (青岛海博) 上划线转种, 37 °C 培养 24 h 后挑取显色培养基中的蓝绿色疑似菌落进行下一步纯化鉴定。

1.3 克罗诺杆菌属鉴定

纯化后的疑似菌株用 VITEK 2 compact 生化鉴定仪 (bioMérieux, France) 参照说明进行克罗诺杆菌属鉴定, 对照菌株阪崎克罗诺杆菌 ATCC 25944 购自美国标准菌株库。

1.4 *fusA* 基因扩增、测序和分析

细菌基因组用试剂盒进行提取。*fusA* 基因扩增参照 Baldwin 等人方法进行^[23], 引物 *fusA-F*: 5'-GAAACCGTATGGCGTCAG-3' 和 *fusA-R*: 5'-AGAACCGAAGTGCAGACG-3', 应用 Premix Taq 试剂盒 (Takara, 大连) 进行 PCR 扩增, 反应体系为 50 μL: 25 μL PCR mix、4 μL 模板 (5~10 ng/μL)、2 μL 的 *fusA-F* 引物 (10 μmol/L)、2 μL 的 *fusA-R* 引物 (10 μmol/L) 和 17 μL 去离子水。扩增条件: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 循环 30 次; 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳。阳性带在紫外光下切胶后用胶回收试剂盒 (Takara, 大连) 进行 DNA 回收, 纯化 DNA 送生工生物 (上海) 有限公司双向测序。获得的 *fusA* 基因序列在多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 数据库中 [Http://Pubmlst.Org/Cronobacter/Info/Protocol.Shtml](http://Pubmlst.Org/Cronobacter/Info/Protocol.Shtml) 进行种类鉴定和等位

基因序列的查找,并用 Mega 7 最大似然算法构建进化树。

1.5 脉冲场凝胶电泳

克罗诺杆菌的 PFGE 按照 Brengi 等人的方法稍作修改^[24]。挑取在 TSA 平板上培养过夜的克罗诺杆菌培养物,均匀悬浮于细胞悬浮液中。加入 1% SeaKemGold 琼脂糖,混匀后制成 plug 胶块,54 °C 水浴蛋白酶 K 裂解后,使用 50 U 的 Xba I 酶切 3 h 分离株,原位酶切后的 DNA 用脉冲场凝胶电泳仪 (CHEF Mapper, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, US) 进行电泳,金胶琼脂糖 (Seakem Gold, Rockland, Maine, US) 浓度为 1% (W/V),电泳液用 0.5×TBE buffer。电泳参数:电压 6 V/cm,脉冲时间 1.8 s~25 s,电泳时间 20 h,电泳角度 120°。电泳结束后凝胶用 GelRed (Biotium, CA, US) 进行染色,用 Geldoc XR+ 系统 (Bio-Rad laboratories, Hercules, California, US) 进行成像。图谱用 Bionumeric 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) 进行分析,聚类用 DICE 系数和非加权成对法 (UPGMA) 进行,条带位置容忍度和优化选择 1.5%。沙门菌 H9812 作为标准对照。

1.6 抗菌药物敏感性试验

采用微量肉汤稀释法测定克罗诺杆菌的抗生素最小抑菌浓度 (MICs),参照临床和实验室标准 (CLSI, M100, 28th, 2018) ^[25] 进行,从 TSA 平板上挑取 3~5

个过夜培养的菌落悬浮于无菌水中,当菌悬液约为 0.5 麦氏浊度时吸取 60 μL 菌悬液加至 12 mL 营养肉汤中,混匀后吸取 100 μL 加入药敏测试板 (Thermo, UK),在 37 °C 培养箱中培 18~20 h, MICs 折点解释根据 CLSI 标准进行^[26]。检验 8 种抗菌药物,分别为,酰胺醇类:氯霉素 (CHL),磺胺类:甲氧苄啶/磺胺甲噁唑 (SXT),头孢类:头孢噻肟 (CTX) 和头孢西丁 (CFX),氨基糖苷类:庆大霉素 (GEN),四环素类:四环素 (TET),喹诺酮类和氟喹诺酮类 (人工合成抗菌药物):萘啶酸 (NAL)、环丙沙星 (CIP)。大肠杆菌 ATCC 25922 作为参考菌株。

2 结果与讨论

2.1 污染情况调查

268 份来自 6 个不同的厂家米粉样品经增菌培养、显色培养基分离、克罗诺杆菌属鉴定发现 32 株克罗诺杆菌,总污染率为 11.94%,略低于我们 2015~2016 年 16.00% (20/125) 调查时的污染率,但是 2015~2016 年调查的生产厂家和米粉数量均比较少^[18]。本次调查我们扩大了调查的数量、品牌和批次,污染率仍高达 11.94%,说明广西市售的婴幼儿米粉中存在克罗诺杆菌污染。在我国其他一些地方也开展了婴幼儿米粉克罗诺杆菌污染情况调查^[19,20],有的地方污染率高达 23.97%,进一步说明婴幼儿米粉中克罗诺杆菌污染具有普遍性。

表 1 不同配方和厂家不同配方婴幼儿配方米粉克罗诺杆菌污染情况

Table 1 The *Cronobacter* spp. infection in different additive ingredient of dehydrated rice powder

配方米粉种类/厂家	检测样品数	阳性输出数 (检出率/%)
营养米粉 (厂家 A)	26	2 (7.69)
营养米粉 (厂家 B)	17	2 (11.76)
营养米粉 (厂家 D)	24	0 (0.00)
营养米粉 (厂家 F)	12	1 (8.33)
淮山 (淮莲) 营养配方米粉 (厂家 A)	28	5 (17.86)
淮山 (淮莲) 营养配方米粉 (厂家 B)	21	3 (14.29)
淮山 (淮莲) 营养配方米粉 (厂家 C)	23	4 (17.39)
淮山 (淮莲) 营养配方米粉 (厂家 F)	18	4 (22.22)
蔬果类配方米粉 (厂家 A)	29	4 (13.79)
蔬果类配方米粉 (厂家 E)	23	4 (17.39)
高蛋白配方米粉 (添加乳粉) (厂家 A)	21	1 (4.76)
高蛋白配方米粉 (添加乳粉) (厂家 D)	26	2 (7.70)
总计	268	32 (11.94)

我们调查的 4 种不同配方米粉中,添加高蛋白配方米粉和未添加其他的营养米粉的污染率比较低,为 6.33% 和 6.38%,添加淮山 (淮莲) 和果蔬的配方米粉

污染率则比较高,为 17.78% 和 15.38% (表 1),是前面两者的 2~3 倍,统计差异及其显著 ($p < 0.01$)。污染率的差异可能是由于厂家添加的淮莲粉、蔬菜和水果

等营养物质本身有较高的污染率，厂家为了更好的保持它们的营养成分往往没有进行高温杀菌，由于克罗诺杆菌具有耐干燥、耐高温，形成生物膜后粘附能力强的特点，如果加工灭菌工艺不彻底就会增加污染的风险^[27]。因此，厂家应该重视克罗诺杆菌的污染，完善婴幼儿米粉的生产工艺，既要保持添加原料中的营养成分，也要防止克罗诺杆菌的污染和繁殖。

6个厂家中除了厂家D在营养米粉样品中未检测出污染情况外，其他的均检测、分离出克罗诺杆菌(表1)。不同婴幼儿米粉生产厂家之间污染差异明显，污染率最低的为厂家D，仅为4.0%，最高的为厂家F，为16.67%。不同厂家克罗诺杆菌污染差异可能与生产企业的卫生状况和生产工艺有关，但是由于不同厂家调查数量差异较大，有待进一步的分析。

2.2 菌株鉴定和进化分析

获得32条 *fusA* 基因序列经过 MLST 数据库比对分析，鉴定到4种不同的克罗诺杆菌，其中 *C. sakazakii* 22株、*C. malonaticus* 6株、*C. dublinensis* 3株、*C. muytjensii* 1株。进化分析显示这四种不同的克罗诺杆菌分别成独立的群(图1)。目前，国内外众多克罗诺杆菌污染研究表明，食品和植物性原材料中污染最广泛，致病能力较强的克罗诺杆菌属为 *C. sakazakii*^[14,16,17,28,29]，这与我们的研究结果相一致。在我国报道的食品源克罗诺杆菌中，除了 *C. sakazakii*、*C. malonaticus*、*C. dublinensis* 和 *C. muytjensii* 外，还报道了其他种的克罗诺杆菌如 *C. universalis* 和 *C. turicensis* 的污染^[30-32]，提

示克罗诺杆菌污染种类的多样性。

22株 *C. sakazakii* (绿色) 单独成群，自展值为47，*fusA* 有1、8、17、36和67型。6株 *C. malonaticus* (红色) 独立成群，自展值为94，*fusA* 均为7型；3株 *C. dublinensis* (亮蓝) 独立成群，自展值为88，*fusA* 有43和20型；1株 *C. muytjensii* 单独成群(蓝色)，*fusA* 为24型。

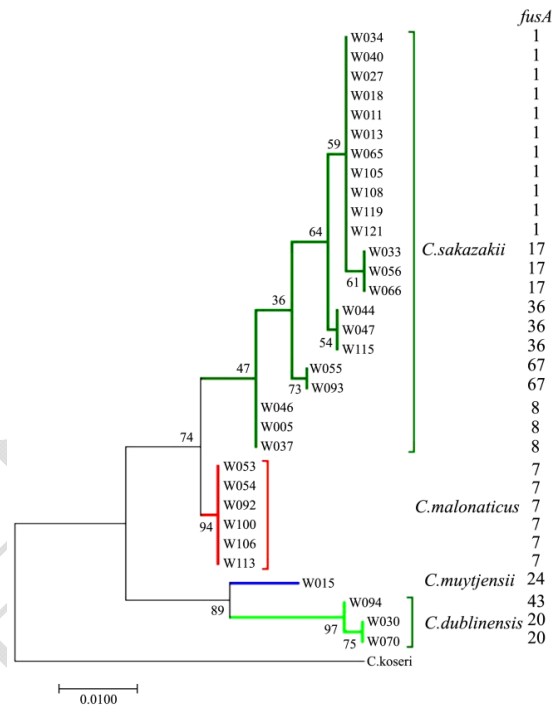


图1 基于 *fusA* 基因构建的进化树

Fig.1 The phylogenetic tree of isolated *Cronobacter* spp. based on *fusA* gene

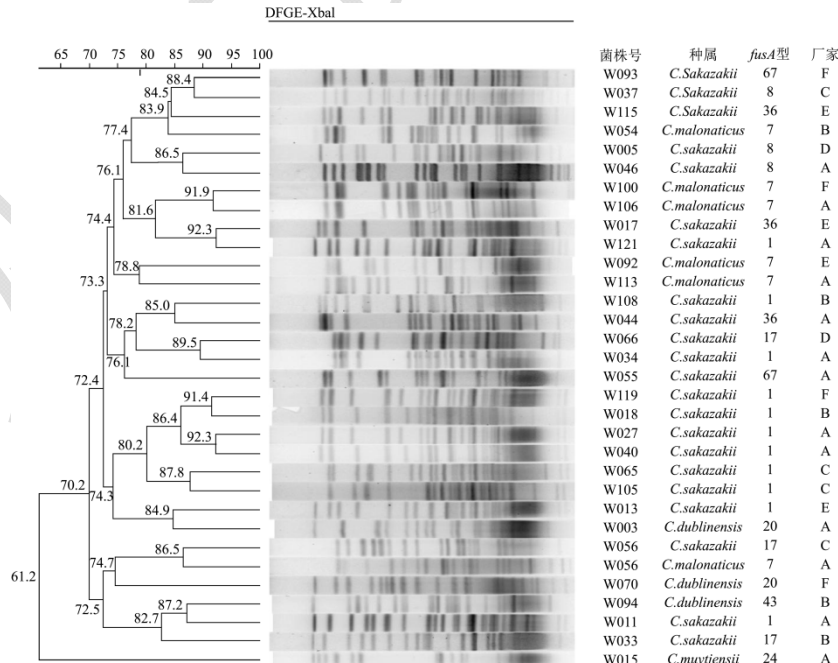


图2 脉冲场凝胶电泳图

Fig.2 The PFGE of the isolated *Cronobacter* spp.

2.3 脉冲场凝胶电泳

限制性内切酶 Xba I 酶切后, 经 BioNumerics 软件分析, 32 株分离株可分为 32 种 PFGE 基因指纹图谱, 菌株间相似度 61.20%~92.30% (图 2)。聚类相似度 >90% 的只有 4 个群落, 每个群落分别有 2 个菌株。分离到的克罗诺杆菌 PFGE 存在较大的差异, 即使是在相同的品牌 PFGE 分子分型也未见明显的相似, 揭示了克罗诺杆菌的高度遗传多样性。在 32 个 PFGE 分型中, *C. sakazakii*, *C. malonicus* 和 *C. dublinensis* 均表现出高度多样性。PFGE 分型被誉为流行病学研究过程中的“金标准”。据国内外文献报道, 婴幼儿食品源的克罗诺杆菌经 PFGE 分型呈现高度多样性^[21,33-35], 如贾华云等^[36]对国内 32 个企业生产婴幼儿食品中分离的 50 株 *Cronobacter* spp. 进行 PFGE 分子分型获得 47 个亚型, 相似度为 28.7%~100%, 具有很高的遗传多态性; 甘辛等^[34]对从全国 19 个省/自治区/直辖市婴儿配方奶粉中分离获得的 49 株克罗诺杆菌进行分子分型得到 38 个亚型, 未发现有明显的优势分型和聚集现象, 这些结果与我们的结果相一致。PFGE 图谱相似度达 100%, 则为同一型, 同一流行株。本次调查中分离的 32 个菌株未发现 PFGE 分型相同的菌株, 即使来自同一厂家同一批次米粉中分离的菌株其分子分型也不同, 说明婴幼儿米粉中克罗诺杆菌的污染来源广泛, 如原料污染、环境污染和生产过程污染。因此, 企业要加强婴幼儿米粉生产各个环节的监控, 完善生产工艺, 加强原料来源监管。

2.4 抗菌药物敏感性试验

32 株克罗诺杆菌对 8 种抗菌药的抗性结果如表 2 所示。所有分离株对环丙沙星、庆大霉素和头孢噻肟敏感, 有部分菌株 (6.25%~43.75%) 对氯霉素、四环素、甲氧苄啶/磺胺甲基异恶唑、头孢西丁和萘啶酸表现为中等敏感, 有 2 个菌株 (均为 *C. sakazakii*) 对氯霉素表现为抗性。国内外已有较多对克罗诺杆菌耐药性研究: 贾华云等^[33]研究表明, 分离的克罗诺杆菌对萘啶酸、环丙沙星、头孢吡肟、阿米卡星、头孢噻肟和头孢曲松均敏感, 对磺胺嘧啶、氨苄青霉素、氯霉素、复方新诺明、阿莫西林-克拉维酸、卡那霉素和庆大霉素具有不同程度的耐药, 有 7 株克罗诺杆菌表现出对抗生素的多重耐药性。黄玉兰等^[37]对四川省市售婴幼儿奶粉、婴幼儿谷物辅助食品及临床病例中分离的 109 株克罗诺杆菌进行耐药性分析, 发现克罗诺杆菌对环丙沙星、萘啶酸、头孢噻肟、庆大霉素、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑、氯霉素、四环素等 7 种抗生素均敏

感, 53 株对头孢西丁耐药, 耐药率达 48.62% (53/109)。经分析发现, 不同研究中克罗诺杆菌对同种抗菌药的耐药性结果存在差异, 如氯霉素和头孢西丁, 有的研究结果为敏感有的则是抗性。虽然相对于其它肠杆菌科的病原菌, 克罗诺杆菌对抗菌药似乎更敏感, 但目前越来越多的研究发现克罗诺杆菌逐渐形成对部分抗菌药产生耐药性^[35-39], 因此, 我们应加强克罗诺杆菌耐药的监测工作。

表 2 32 株克罗诺杆菌的抗菌药物敏感性实验

Table 2 Results of drug susceptibility test of 32 *Cronobacter* spp.

isolates in infant rice formula			
药物种类	敏感/%	中度敏感/%	抗性/%
环丙沙星(CIP)	32(100)	0(0)	0(0)
氯霉素(CHL)	22(68.75)	8(25.00)	2(6.25)
四环素(TET)	26(81.25)	6(18.75)	0(0)
庆大霉素(GEN)	32(100)	0(0)	0(0)
甲氧苄啶/ 磺胺甲恶唑(SXT)	18(56.25)	14(43.75)	0(0)
头孢噻肟(CTX)	32(100)	0(0)	0(0)
头孢西丁(CFX)	29(90.63)	3(9.38)	0(0)
萘啶酸(NAL)	30(93.75)	2(6.25)	0(0)

3 结论

广西区市售婴幼儿配方米粉中存在克罗诺杆菌污染, 尤其是添加其他营养成分原料的配方米粉。婴幼儿配方米粉中克罗诺杆菌污染来源广泛, 生产厂家应引起重视。部分分离的克罗诺杆菌对一些抗菌药表现为中等敏感甚至是抗性, 提示克罗诺杆菌对抗菌药的敏感性呈现减弱的趋势, 应加强监测。

参考文献

- [1] Joseph S, Sonbol H, Hariri S, et al. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(9): 3031-3039
- [2] Forsythe S J. *Cronobacter* the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis (BIGSdb) [C]// ASM General Meeting. 2014, 15: 1121-1134
- [3] Muytjens H L, Zanen H C, Sonderkamp H J, et al. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii* [J]. J Clin Microbiol, 1983, 18(1): 115-120
- [4] Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults [J]. Medicine, 2001, 80(2): 113-122

- [5] Nazarowec-White M, Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: a review [J]. Int J Food Microbiol, 1997, 34(2): 103-113
- [6] Caubilla-Barron J, Hurrell E, Townsend SI. Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(12): 3979-3985
- [7] FAO/WHO. 2004. Workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula, Geneva, 2-5 February 2004 [C]// Available: <http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/meetings/feb2004/en/index.html>
- [8] Food F. *Enterobacter sakazakii* and Other Microorganisms in Powdered Infant Formula [M]. World Health Organization, 2004: 1-51
- [9] FAO/WHO. 2006. Expert meeting on *Enterobacter sakazakii* and Salmonella in powdered infant formula, Rome, 16-20 January 2006 [C]// Available: <http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/meetings/jan2006/en/index.html>
- [10] FAO/WHO. 2008. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Microbiological Risk Assessment Series no. 15 [C]// Available: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_followup/en/
- [11] García F, Notario M J, Cabanás J, et al. Incidence of bacteria of public health interest carried by cockroaches in different food-related environments [J]. J Med Entomol, 2012, 49(6): 1481-1484
- [12] Chap J, Jackson P, Siqueira R, et al. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 136 (2): 185-188
- [13] Zeng H, Li C, Ling N, et al. Prevalence, genetic analysis and CRISPR typing of *Cronobacter* spp. isolated from meat and meat products in China [J]. Int J Food Microbiol, 2020, 321(16): 108549
- [14] 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
DONG Xiao-hui, LI Cheng-si, WU Qing-ping, et al. Isolation and identification of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) strains from food [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(5): 429-436
- [15] 姚帮本,焦芮,叶应旺.海产干货中克罗诺杆菌污染分布调查及生物学特性研究[J].食品科学技术学报,2018, 36(4): 24-31
YAO Bang-ben, JIAO Rui, YE Ying-wang. Distribution and biological characterization of *Cronobacter* spp. in dry aquatic food samples [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 36(4): 24-31
- [16] 陈万义,任婧,吴正钧,等.生鲜蔬菜中阪崎克罗诺杆菌的分离与鉴定[J].食品科技,2014,39(1):304-308
CHEN Wan-yi, REN Jing, WU Zheng-jun, et al. Isolation and identification of *Cronobacter sakazakii* from raw vegetables [J]. Food Science and Technology, 2014, 39(1): 304-308
- [17] 陈雅衡,赵炜,王洋,等.部分茶饮料原辅料中优势菌-克罗诺杆菌(原阪崎肠杆菌)的分离和鉴定[J].中国酿造,2013,32(5): 59-61
CHEN Ya-heng, ZHAO Wei, WANG Yang, et al. Isolation and identification of predominant bacteria-*Cronobacter sakazakii* from some tea drink materials [J]. China Brewing, 2013, 32(5): 59-61
- [18] 梁安莉,农珍妮,杨江夏,等.婴幼儿配方米粉克罗诺杆菌污染调查与分析[J].中国食物与营养,2018,24(9):29-32
LIANG An-li, NONG Zhen-ni, YANG Jiang-xia, et al. Investigation and analysis on *Cronobacter* spp. contamination in different infant formula rice flour [J]. Food and Nutrition in China, 2018, 24(9): 29-32
- [19] 郭大城,炊慧霞,戚浩彧,等.2018年河南省市售婴幼儿谷类辅助食品微生物污染状况调查[J].中国食品卫生杂志,2020, 32(2):175-179
GUO Da-cheng, CHU Hui-xia, QI Hao-yu, et al. Investigation on microbial contamination of cereal-based complementary foods for infants and young children in Henan in 2018 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2020, 32(2): 175-179
- [20] 吴林蔚,杨祖顺,丁超,等.2016-2018年市售242件婴幼儿米粉微生物污染情况调查[J].食品安全质量检测学报,2020, 11(5):1679-1686
WU Lin-wei, YANG Zu-shun, DING Chao, et al. Investigation on microbial contamination of 242 infant rice flours sold in Yuxi from 2016 to 2018 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(5): 1679-1686
- [21] 李毅,章乐怡,洪程基,等.婴幼儿食品和配方奶粉中克罗诺杆菌污染调查及分子分型研究[J].中国食品卫生杂志,2019, 31(4):360-365
LI Yi, ZHANG Le-yi, HONG Cheng-ji, et al. Contamination status and molecular typing of *Cronobacter* in infant food and formula powder [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(4): 360-365
- [22] Iversen C, Forsythe S J. Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii* [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73: 48-52

- [23] Baldwin A, Loughlin M, Caubilla-Barron J, et al. Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes [J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 223
- [24] Brengi SP, O'Brien SB, Pichel M. Development and validation of a PulseNet standardized protocol for subtyping isolates of *Cronobacter* species [J]. Food Borne Pathog Dis, 2012, 9(9): 861-867
- [25] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [S]. 28 th ed, Wayne, PA: CLSI 2018 supplement M100
- [26] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically [S]. 11th ed, Wayne, PA: CLSI 2018 Standard M07
- [27] Beuchat LR, Kim H, Gurtler JB, et al. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 136(2): 204-213
- [28] Jaradat ZW, Ababneh QO, Saadoun IM, et al. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*), from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing [J]. BMC Microbiology, 2009, 9(1): 1-1
- [29] Miled-Bennour R, Eils T C, Pagotto F J. Genotypic and phenotypic characterisation of a collection of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) isolates [J]. Int J Food Microbiol, 2010, 139(1-2): 116-125
- [30] 李远宏,姜华,焦阳,等.食品香辛料和调味品中克罗诺杆菌的分离与鉴定[J].食品工业科技,2017,38(19):125-130
LI Yuan-hong, JIANG Hua, JIAO Yang, et al. Isolation and identification of *Cronobacter* spp. from dried spices and condiments [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(19): 125-130
- [31] 甘辛,王伟,胡豫杰,等.2012-2014年中国婴儿配方食品和谷基辅食类食品及临床腹泻病例来源的克罗诺杆菌种水平鉴定研究[J].卫生研究,2017,46(5):695-704
GAN Xin, WANG Wei, HU Yu-jie, et al. Study on species identification of *Cronobacter* isolated from infant formula foods and cereal based foods and clinical diarrhea cases in 2012 to 2014 in China [J]. Journal of Hygiene Research, 2017, 46(5): 695-704
- [32] 李远宏,张逸飞,张庆成,等.谷类食品中克罗诺杆菌的分离与鉴定[J].食品工业科技,2016,37(15):154-158
LI Yuan -hong, ZHANG Yi -fei, ZHANG Qing -cheng, et al. Isolation and identification of *Cronobacter* spp. from cereal foods [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(15): 154-158
- [33] Proudly I, Bougle D, Coton E, et al. Genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* isolates by PFGE, BOX-PCR and sequencing of the *fliC* gene [J]. J Appl Microbiol, 2008, 104: 26-34
- [34] 甘辛,王伟,胡豫杰,等.我国婴儿配方粉来源的克罗诺杆菌脉冲场凝胶电泳分子分型和多位点序列分型研究[J].中国食品卫生杂志,2018,30(3):235-238
GAN Xin, WANG Wei, HU Yu-jie, et al. Study on pulsed field gel electrophoresis and multilocus sequence typing of *Cronobacter* isolated from powdered infant formula [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2018, 30(3): 235-238
- [35] 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,2019,4:335-339
ZHOU Hou-de, PENG Si-lu, LIU Cheng-wei, 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, 4: 335-339
- [36] 贾华云,王岚,陈帅.市售婴幼儿食品中克罗诺杆菌分离菌株脉冲场凝胶电泳分型及耐药性研究[J].中国食品卫生杂志,2019,2:106-110
JIA Hua-yun, WANG Lan, CHEN Shuai, et al. Research on molecular pulsed field gel electrophoresis typing and drug resistance of *Cronobacter* isolated from retail infant foods [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 2: 106-110
- [37] 黄玉兰,雷高鹏,张林.2010-2014年及2016年四川省婴幼儿食品及临床分离克罗诺杆菌耐药分析[J].中国食品卫生杂志,2017,29(3):299-301
HUANG Yu-lan, LEI Gao-peng, ZHANG Lin. Drug susceptibility of *Cronobacter* spp. isolated from infant food and clinical cases in Sichuan Province [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2017, 29(3): 299-301
- [38] 张西萌,曾静,魏海燕,等.进口乳制品中克罗诺阪崎肠杆菌分离株耐药性研究[J].中国食品卫生杂志,2013,4:34-37
ZHANG Xi-meng, ZENG Jing, WEI Hai-yan, et al. Study on antibiotic resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from imported dairy product [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2013, 4: 34-37