

克罗诺杆菌在婴儿配方奶粉及其加工环境中 耐受性和耐药性研究进展

黄燕, 贾媛, 宋丹靓敏, 苏群超, 祁雪鹤, 丁弋芯, 汪玲娥, 杨鑫焱, 满朝新, 姜毓君*

(东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 克罗诺杆菌 (*Cronobacter*) 是一种食源性致病菌, 容易感染新生儿和低体重早产儿并引起坏死性小肠结肠炎、脑膜炎和败血症等疾病, 致死率高达 40%~80%, 治愈后可能存在严重神经系统后遗症。由流行病学可知, 婴幼儿感染克罗诺杆菌与婴儿配方奶粉 (Powdered Infant Formula, PIF) 的关系十分密切。近年来, 克罗诺杆菌污染 PIF 事件频发并且因其耐药性给临床治疗带来巨大挑战, 造成严重后果。究其原因, 是由于该菌对 PIF 及其加工环境的耐受能力强, 不易被完全消杀而造成持续污染。因此, 为详细了解克罗诺杆菌在不利条件下的生长特性, 该研究从克罗诺杆菌耐热性、耐干燥性、耐酸碱性和耐紫外性以及耐药性多个角度综述目前克罗诺杆菌耐受性相关研究进展, 以期为我国克罗诺杆菌的防控消杀以及临床治疗提供参考。

关键词: 克罗诺杆菌; 婴幼儿配方乳粉; 加工环境; 耐受性; 耐药性

文章编号: 1673-9078(2023)07-336-343

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0874

Research Progress on Tolerance and Drug Resistance of *Cronobacter* spp. in Powdered Infant Formulae and Its Processing Environment

HUANG Yan, JIA Ai, SONG Danliangmin, SU Qunchao, QI Xuehe, DING Yixin, WANG Ling'e, YANG Xinyan,
MAN Chaoxin, JIANG Yujun*

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: *Cronobacter* spp. is a foodborne pathogen, which can easily lead to infection in newborns and low-birth-weight premature infants, causing diseases such as necrotizing enterocolitis, meningitis and septicemia, with the mortality rate up to 40%~80%. After cure, patients may suffer from severe psychiatric sequelae. Epidemiological studies have shown that there is a close association between *Cronobacter* spp. infection in infants and powdered infant formula (PIF). In recent years, *Cronobacter* spp. contamination of PIF occurred frequently, and its drug resistance has created great challenges to clinical treatments, resulting in serious consequences. The reason is that the pathogen has strong tolerance to PIF and its processing environment and is not easy to be completely destroyed via sterilization, causing continuous pollution. Therefore, for detailed understanding of the growth characteristics of *Cronobacter* spp. under adverse conditions, this paper reviews the current research progress on the tolerance of *Cronobacter* spp. from the perspectives of its resistance to heat, desiccation, acid, alkali, UV and drug, in order to provide reference for the prevention, controls, elimination and clinical treatment of *Cronobacter* spp. in China.

Key words: *Cronobacter* spp; powdered infant formula; processing environment; tolerance resistance; drug resistance

引文格式:

黄燕, 贾媛, 宋丹靓敏, 等. 克罗诺杆菌在婴儿配方奶粉及其加工环境中耐受性和耐药性研究进展[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 336-343.

HUANG Yan, JIA Ai, SONG Danliangmin, et al. Research progress on tolerance and drug resistance of *Cronobacter* spp. in powdered infant formulae and its processing environment [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 336-343.

克罗诺杆菌 (*Cronobacter*) 是革兰氏阴性非孢子

收稿日期: 2022-07-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31871828)

作者简介: 黄燕 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学,

E-mail: huangyan7115@163.com

通讯作者: 姜毓君 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 乳品科学技术,

E-mail: yujun_jiang@163.com

杆状菌, 该属包括阪崎克罗诺杆菌 (*C. sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌 (*C. turicensis*)、莫金斯克罗诺杆菌 (*C. mytjensii*)、康帝蒙提克罗诺杆菌 (*C. condimenti*)、尤尼沃斯科诺杆菌 (*C. universalis*) 和都柏林克罗诺杆菌 (*C. dublinensis*) 等 7 个种。克罗诺杆菌作为一种重要的食源性致病菌, 可造成早产儿和低体重新生儿的

严重感染, 导致多种疾病如败血症、坏死性小肠结肠炎和脑膜炎等^[1], 致死率为 40%~80%^[2,3], 即使治愈也存在患严重神经系统性后遗症的可能性。克罗诺杆菌引起婴幼儿死亡最早可追溯到 1961 年, 两名婴幼儿感染克罗诺杆菌后导致血性脑膜炎在两天内死亡^[4]。因此, 我国 GB 10765-2021《食品安全国家标准婴儿配方食品》中规定, 0~6 月龄婴儿食品配方食品中克罗诺杆菌不得检出。

婴幼儿配方奶粉 (Powdered Infant Formula, PIF) 是当新生儿母亲无法提供足够的母乳时的最佳替代品。尽管克罗诺杆菌已从多种食品中分离出来^[5-7], 但大量研究发现配方乳粉及其加工环境是婴幼儿感染的主要途径^[8,9], 世界粮农组织和世界卫生组织将其归为婴幼儿配方乳粉中的 A 类致病菌^[10]。克罗诺杆菌能够在 PIF 的加工环境中长期生长存活, 并且通过形成的生物膜附着在不锈钢、聚氯乙烯、硅胶等多种材料表面^[11], 这些材料在 PIF 生产设备以及婴儿喂养设备中普遍使用, 增加了克罗诺杆菌的防治难度。目前, 众多婴配企业已采用先进的杀菌消毒方法以及合理的生产工艺作为防治克罗诺杆菌的措施, 但近年因克罗诺杆菌污染 PIF 引发的安全事件仍频繁发生, 威胁消费者的生命健康。2018 年荷兰企业生产的婴幼儿配方奶粉遭到阪崎克罗诺杆菌污染后大面积召回^[12]、2019 年加拿大 Costco 奶粉受到克罗诺杆菌污染紧急召回、以及 2022 年美国雅培公司婴配产品遭克罗诺杆菌污染后感染 4 名婴幼儿并致两人死亡^[13], 这些案例说明克罗诺杆菌的防控仍是 PIF 行业亟待解决的重要问题。克罗诺杆菌极强的环境耐受性使它能在 PIF 生产和销售的过程中长期存活, 而其耐药性又增加了临床治疗的难度, 进一步导致婴幼儿感染克罗诺杆菌的死亡率上升。因此, 本文综述了克罗诺杆菌的耐受性以及耐药性的相关研究, 为婴配粉行业的克罗诺杆菌的防治提供借鉴。

1 克罗诺杆菌的环境耐受性

1.1 耐热性

长期以来, 食品企业常采用热处理作为降低食源性病原体污染风险的主要手段^[14], 其中, 63 °C 处理 30 min 或 72 °C 处理 15~20 s 的低温巴氏杀菌法应用最广。Ueda 等^[15]广泛研究了 73 株克罗诺杆菌的耐热性, 50 °C 下处理 30 min 几乎所有菌株均存活, 但使用 55 °C 处理 10~20 min 或 60 °C 处理 2~5 min 时, 活菌数迅速下降直至菌株全部死亡。整体来说克罗诺杆菌不耐高温, 常规的巴氏杀菌法能杀死大部分克罗诺杆菌。

但也有研究表明部分菌株能耐受较高的温度, 这种耐热性的差异可能是由于分离菌株的来源、生长环境以及生长阶段的不同所致^[16]。郑晶等^[17]的研究证实了分离自高温灭菌奶的克罗诺杆菌耐热性强, 能在 72 °C 的热处理下存活 15 min 才全部死亡。克罗诺杆菌在常规热处理过程中可能杀灭不完全, 然而婴配企业基于对营养素保护的考虑, 难以采取过高温度和过长时间的热处理, 使得克罗诺杆菌污染 PIF 的可能性大大增高。

据报道称, 耐热岛基因的存在是部分克罗诺杆菌能耐高温的原因。实验表明含有耐热岛的菌株在 58 °C 下的存活率明显高于缺乏耐热岛基因的克罗诺杆菌突变株, 并且将 3 个不同菌株来源的耐热基因岛组克隆到不耐热岛基因组的菌种中, 耐热基因岛的存在使不耐热岛菌株在 58 °C 热处理下的存活时间增加了 2~8 倍^[18]。这证实了耐热岛基因在克罗诺杆菌耐热性中起到十分重要的作用。此外, Orieskova 等^[18]对克罗诺杆菌进行基因组测序, 发现 67.12% (49/73) 阪崎克罗诺杆菌和 64.29% (9/14) 丙二酸盐克罗诺杆菌中存在耐热岛基因, 这也可能是与克罗诺菌属中其他种相比, 阪崎克罗诺杆菌和丙二酸盐克罗诺杆菌在环境和婴儿配方食品中检出率高的原因^[19,20]。为深入探究克罗诺杆菌的耐热机制, Orieskova 等^[21]比较了不同克罗诺杆菌耐热岛基因之间的差异, 发现耐热岛有两种构型: 包含 *thrB-Q* 基因的完整版本和仅含有 *thrBCDOP* 基因的缩短版本。耐热岛基因的差异也影响菌株的耐热性, 在相同的热处理温度下带有完整版本耐热岛的菌株比带有缩短版本耐热岛的菌株的存活率高 2~10 倍。

此外, 特殊环境造成的亚致死也能增强克罗诺杆菌的耐热性。亚致死是指细菌在面对一些胁迫环境时细胞受到可逆性损伤, 不能在选择性培养基中生长但能在非选择性培养基中修复并增殖的一种状态, 常见的亚致死处理包括热、酸、乙醇、干燥等。亚致死处理会与后续的环境胁迫形成交叉保护增强克罗诺杆菌的耐受性。Arroyo 等^[22]证实了热亚致死处理 (47.5 °C 下处理 1 h) 后的克罗诺杆菌耐热性显著提高。Kim 等^[23]将阪崎克罗诺杆菌进行酸休克 (pH 值 3.06), 结果表明进行酸休克的细胞在 55 °C 热处理时其 D 值 (在一定的处理环境中某细菌菌群中每杀死 90% 原有残存活菌数时所需要的时间) 显著增加。Huang 等^[24]将阪崎克罗诺杆菌进行乙醇亚致死处理, 结果表明亚致死显著增加了阪崎克罗诺杆菌在 51 °C 热处理中的存活率。Arroyo 等^[25]的研究表明随着水分活度的降低, 阪崎克罗诺杆菌在 62 °C 热处理下的 D 值逐渐升高, 表明干燥也能增加克罗诺杆菌对热处理的抗性。这些不利因素与热处理之间形成交叉保护作用, 增强了克罗

诺杆菌对热处理的抗性,也增强了热处理杀灭克罗诺杆菌的难度。

1.2 耐干燥性

克罗诺杆菌的突出特点是耐干燥性强,能够在低水分活度(Water Activity, *aw*)的食物基质中长时间存活,据报道其耐干燥性优于大肠杆菌、沙门氏菌和其他肠杆菌科菌株^[26]。Gurtler等^[27]发现克罗诺杆菌在*aw*为0.30~0.69的条件下能存活12个月,同时在较高*aw*(0.82~0.83)的条件下生存能力下降。这表明克罗诺杆菌适宜在低水分活度下存活,而不耐受高水分活度。此外,微环境也影响克罗诺杆菌在干燥条件下存活率。在相同干燥处理下,PIF中生长的克罗诺杆菌比在胰蛋白胨大豆肉汤、LB肉汤培养基以及无菌水等环境中生长的克罗诺杆菌存活率更高。这可能是由于PIF中的蛋白质、脂肪以及乳糖等可以包裹在克罗诺杆菌的表面,从而在干燥胁迫下起到对菌株的保护作用^[28]。以上研究表明PIF为克罗诺杆菌在干燥条件下存活提供了保护性物质从而增强其对于干燥环境的耐受能力,是克罗诺杆菌能在PIF中长期存活的重要原因。

在干燥处理下的克罗诺杆菌通过增加细胞内部渗透压来维持细胞的基础生理活性,从而在干燥环境下长期生存。克罗诺杆菌可以通过自身合成或外部摄取海藻糖、甘氨酸、甜菜碱以及谷氨酰胺等中性渗透保护剂维持细胞内渗透压的稳定,抵抗外部高渗环境,增加干燥耐受性^[29,30]。通过近年的研究报道,已经确定了部分耐干燥和耐渗透压的相关基因,如编码甘氨酸、甜菜碱和海藻糖的基因已在克罗诺杆菌中被发现。Srikumar等^[31]提供了一个全面的基于RNA-seq的转录概述,并且通过敲除海藻糖合成的相关基因证实了海藻糖作为中性渗透保护剂在阪崎克罗诺杆菌耐受干燥过程中的重要生理功能。

多项研究结果证实克罗诺杆菌的耐干燥性与其生物膜密切相关。Du等^[32]对42株阪崎克罗诺杆菌的耐干燥特性进行分析,结果表明生物膜的形成能力与耐干燥性呈正相关。通过采用拉曼光谱技术对耐干燥性不同的克罗诺杆菌菌株形成的生物膜的结构进行研究,结果表明多糖、蛋白质和黄色色素可能在克罗诺杆菌耐干燥过程中发挥重要作用。Johler等^[33]研究表明阪崎克罗诺杆菌ES5无色突变体对干燥的耐受性低于野生型,进一步验证了黄色色素对克罗诺杆菌干燥耐受性的增强作用。此外,研究报道发现另外一些与生物膜合成相关的基因,其基因产物包括纤维素生物合成操纵子、结肠酸胞外多糖、荚膜生物合成操纵子、环境持久性荚膜和卷曲蛋白GR55等,它们的协调表

达从基因层面提供了克罗诺杆菌耐干燥的可能性^[34]。Hu等^[35]对阪崎克罗诺杆菌进行蛋白质组学分析,在蛋白质水平确定其耐干燥因子,结果发现阪崎克罗诺杆菌通过减少非必要生存功能相关基因的表达(如毒性、粘附、入侵和鞭毛组装等),同时增加与抗渗透胁迫相关基因的表达(如海藻糖和甜菜碱摄取相关基因),从而提高其对干燥的抗性。克罗诺杆菌含有多种渗透调节机制系统,其中RpoS基因最有可能作为阪崎克罗诺杆菌渗透反应的整体调控因子,该基因与生物膜的形成密切相关,通过控制生物膜的生成影响克罗诺杆菌的耐干燥能力,RpoS基因功能缺失的菌株生物膜形成量显著减少,耐高渗环境的能力也显著减弱^[36,37]。

1.3 耐酸碱性

婴儿摄入被克罗诺杆菌污染的食物后患病,说明该菌能够通过人体胃酸的保护屏障进一步致病,侧面表明克罗诺杆菌具有较强的耐酸性^[38]。袁飞等^[39]对22株阪崎克罗诺杆菌进行酸或碱处理,碱处理后(pH值12.55)立即检测,结果显示所有菌株均已死亡,用酸处理30s后(pH值1.18)检测结果显示除1株死亡外其他菌株均存活,处理2min后尚有两株菌存活。同时,有研究表明阪崎克罗诺杆菌菌株可在pH值4.5的条件下存活并在24h内可以生长到约 10^9 CFU/mL^[33]。综上所述,克罗诺杆菌不耐碱性环境,在酸性环境中具有良好的生存能力,属于耐酸菌。成人胃液pH值是0.9~1.5,以母乳喂养为主的婴幼儿胃酸pH值约为2.7,以奶粉喂养为主的pH值则为3.6,婴幼儿胃中的pH值高于成年人,这也可能是婴儿对克罗诺杆菌易感性增加的原因^[40]。

克罗诺杆菌对酸胁迫的反应可能具有多层机制^[41]:首先,为了减少细胞内过多的质子,克罗诺杆菌通过跨膜蛋白将其泵出,或者通过代谢反应将其消耗。其次,在酸性条件下,细胞内大量活性氧和羟基自由基积累,导致氧化损伤。克罗诺杆菌通过上调抗氧化应激基因(如*soxS*和*madB*)来保护细胞。第三,克罗诺杆菌选择高效能的代谢途径。例如用于产碳化合物的磷酸转移酶系统的相关基因上调以及参与嘧啶代谢、赖氨酸降解和腐胺代谢等耗能途径的基因下调,以减少能量消耗,维持必要的代谢过程。而克罗诺杆菌对碱性环境耐受性差可能是因为其是革兰氏阴性杆菌,细胞壁脂类物质含量较高,容易与碱性溶液发生反应,从而导致细胞膜破裂,引起细胞死亡。因此,碱性消毒剂可应用于乳粉工厂进行杀菌,对克罗诺杆菌有较好防控效果。

此外,热亚致死手段能提高克罗诺杆菌在酸处理

下的存活率。Niu 等^[42]将阪崎克罗诺杆菌进行热亚致死处理(53 °C 处理 15 min), 结果表明热亚致死显著增加了阪崎克罗诺杆菌在模拟胃液(pH 值 3.0)中的存活率。并且热亚致死过程改变了细胞膜的流动性, 降低了膜不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比率, 使膜更加坚固以抵抗后续不利处理。同时在基因层面证实了热亚致死细胞中与耐受性相关的基因均上调(26.52~334.94 倍), 进一步说明了热亚致死能提高克罗诺杆菌对后续不利环境的抗性。

1.4 耐紫外性

紫外辐照作为一种典型的非热处理技术, 通过破坏细菌细胞的 DNA 分子结构造成细胞死亡^[43]。紫外辐照的穿透性差, 杀菌效果受液体样品的浑浊程度和固体样品的厚度限制, 但其相较于巴氏杀菌能最大程度的减少对丁酸乙酯、2-己烯醛、己醛以及乙酸乙酯等风味成分和维生素、酶以及叶绿素等生物活性成分的影响^[44]。同时, 克罗诺杆菌作为革兰氏阴性菌, 其细胞壁肽聚糖薄更易被紫外光穿透内部, 因此, 紫外辐照对某些克罗诺杆菌的灭活效果优于超声、静电电场以及高静水压等其他非热处理手段^[45]。Papademas 等^[46]研究表明紫外辐照能在 30 min 内将驴奶中克罗诺杆菌杀灭至检测限以下。Santo 等^[47]研究表明紫外辐照能将 $10^{8.5}$ CFU/g 阪崎克罗诺杆菌在短时间内降低至 $10^{2.4}$ ~ $10^{2.6}$ CFU/g。因此, 紫外辐照已成为 PIF 等食品企业中常用的杀菌手段^[48,49]。

克罗诺杆菌的常规处理手段之间可能会由于亚致死情况形成交叉保护, 增强其环境耐受性和存活率。相反地, 紫外辐照与其他不利因素之间不存在交叉保护情况, 能与其他处理协同增强克罗诺杆菌的灭活效果。Liu 等^[50]研究发现与 60 °C 的单一热处理相比, 对克罗诺杆菌进行热和紫外联合处理, 克罗诺杆菌在 PIF 中的存活率显著降低。Wu 等^[51]研究也表明相同温度条件, 在紫外的协同处理下阪崎克罗诺杆菌更易被灭活, 并且灭活速率随温度的升高而增加。使用近红外加热^[52]和射频加热^[53]与紫外协同处理也有此结论, 已被证实是由于近红外加热和射频加热破坏细菌细胞膜, 增强紫外杀菌效果。同时, 次氯酸钠^[54]、乙醇^[55]等化学试剂与紫外的联合处理对阪崎克罗诺杆菌等食源性致病菌也有更加显著的灭活效果。其中次氯酸钠通过破坏细菌细胞壁使细菌失活, 乙醇则通过吸收细菌蛋白的水分使其脱水变性。总体来说, 其他处理与紫外辐射灭活机理的差异导致了这些方法结合使用时的协同效应。综上, 紫外辐照是对 PIF 中生物活性成分影响较小的非热处理技术, 可作为 PIF 企业的有效

杀菌手段以减少克罗诺杆菌的污染。

2 克罗诺杆菌的耐药性

目前, 抗生素被认为是治疗人类感染克罗诺杆菌后的常见和首选方法, 但长期使用可能会导致克罗诺杆菌产生并增强耐药性, 因此评价克罗诺杆菌耐药性的研究也已逐步开展。阪崎克罗诺杆菌感染的传统治疗方法是用氨苄青霉素-庆大霉素或氨苄青霉素-氯霉素协同治疗^[56]。这种使用 β -内酰胺类抗生素与其他类抗生素联合治疗的方法随着 β -内酰胺酶基因的发现已逐渐失去效果^[57]。Caubilla-Barron 等^[58]报道, 从致新生儿死亡的婴儿配方奶粉中分离出的阪崎克罗诺杆菌菌株表达了 β -内酰胺酶活性。克罗诺杆菌对 β -内酰胺类的主要耐药机制是通过酶降解、外排泵和外膜孔蛋白缺失等方式^[59]。 β -内酰胺酶能靶向水解 β -内酰胺类抗生素使其失去抑制效果。目前发现的 β -内酰胺酶水解效力逐渐增强, 从仅能水解青霉素类抗生素的青霉素酶到几乎能够水解全部 β -内酰胺类抗生素的碳青霉烯酶。外排泵能够将抗生素从其活性部位移除, 并有助于降低药物敏感性^[59]。Chen 等^[60]将阪崎克罗诺杆菌暴露于氨苄青霉素中, 发现阪崎克罗诺杆菌外排泵的基因显著上调并且对多种抗生素的耐药性也有所增强, 是一种非靶向的基因层面的调节手段。外膜孔蛋白则是抗生素进入细菌体内的高效通道, 其缺失或低表达会导致抗生素无法进入细菌体内或进入减少, 可显著改变机体对药物的敏感性^[61,62], 外膜孔蛋白缺失的突变型菌株表现出多重耐药性。

克罗诺杆菌对多种抗生素表现出耐药性, 并且已发现了多种新型多重耐药菌株。周厚德等^[63]发现从婴幼儿配方食品中分离的克罗诺杆菌对头孢唑啉(62.5%, 15/24)和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑(29.2%, 7/24)耐药率较高, 全部菌株均对环丙沙星和亚胺培南敏感, 但也有其他研究人员从 PIF 中分离出对环丙沙星耐药的菌株^[64]。吴玲玲等^[65]对河南婴儿配方食品中分离出的 13 株克罗诺杆菌药敏研究结果显示, 头孢唑啉耐药率达到 84.6% (11/13)。甚至从婴儿食品中分离出的克罗诺杆菌菌株对头孢唑啉耐药率高达(94.4%)^[6], 这表明了如今克罗诺杆菌对头孢唑啉几乎有天然耐药性。最近的研究发现克罗诺杆菌对头孢噻肟、头孢他啶、头孢泊肟等三代头孢菌素也呈现出耐药性^[66-68], 分离菌株对一、二、三代头孢菌素呈现出耐药趋势。贾云华等^[69]从市售的婴幼儿食品中分离出 50 株克罗诺杆菌, 其中 7 株表现出多重耐药性。有研究人员在婴儿食品中分离出对 7 种抗生素耐药的菌种^[63], 并且在临床病例中也分离出多株不同的多重耐

药克罗诺杆菌菌株^[70-72]。同时,有研究表明克罗诺杆菌在耐受抗生素的胁迫下会增强对其他抗生素的耐受性^[60],这使得对多重耐药菌株的治疗难度进一步加大。

有关报道或实验研究均表明,克罗诺杆菌的耐药性在逐年增加。黄玉兰等^[73]研究说明克罗诺杆菌的耐药性发生了变化,试验菌株对氯霉素和甲氧苄啶/磺胺甲恶唑的最低抑菌浓度逐年增加。裴晓燕等^[74]在2004年的对克罗诺的耐药性研究中建议将碳青霉烯类药物作为治疗克罗诺杆菌的首选方式,陈卓等^[75]在10年前的报道中也表明了克罗诺杆菌的耐药性并不强,对至少二十种常规的抗生素敏感,其中包括一二代头孢菌素、氯霉素和庆大霉素等^[75]。但目前的研究表明克罗诺杆菌对碳青霉烯类抗生素、三代头孢菌素以及其他多种抗生素的耐药性已经出现。这说明克罗诺杆菌对这些抗生素并非有天然耐药性,其耐药性增加主要归因于外源性耐药基因的获取。根本原因仍是由于抗生素的使用导致环境或人体中耐药基因在克罗诺杆菌之间转移^[76]。针对目前克罗诺杆菌的耐药现状,研究重点应集中在新药物和新治疗方法的开发上,并减少抗生素的使用,以控制细菌耐药性的增加。整体来说,克罗诺杆菌的耐药性逐渐增强,抗生素对于克罗诺杆菌的治疗效果正在削弱,新生儿感染克罗诺杆菌的治疗难度也逐渐增大。

3 总结与展望

克罗诺杆菌作为一种食源性致病菌,可通过婴幼儿配方奶粉传播,造成新生儿的严重感染。克罗诺杆菌对于多种不利环境均具有较强的耐受性,使其能够在PIF及其加工环境中长期存活。克罗诺杆菌菌株耐热性的差异导致常规巴氏杀菌不能其完全灭活,同时因其耐干燥性能在低水分活度的食品特别是婴儿配方奶粉中长期存活,又因其耐酸性能在婴幼儿胃部等酸性条件下正常生长从而感染婴幼儿。同时,克罗诺杆菌在亚致死条件下的交叉保护机制也提高了防治难度。但紫外辐照通过与热、有机试剂以及酸处理其他方式协同增强灭菌效果,有效灭活克罗诺杆菌且对于PIF中生物活性成分的破坏程度较低。此外,由于抗生素的滥用,导致克罗诺杆菌的耐药性逐渐加强,已经分离得出多种多重耐药的菌株,表明传统抗生素治疗方法的效果正在逐渐减弱,临床治疗的难度逐渐提升。

目前,通过多项研究,对克罗诺杆菌的耐受性表现已有了解,但其具体的内在机理的研究并不充分,不能完全解读克罗诺杆菌在不利环境中的耐受机制,也不能通过抑制克罗诺杆菌单一耐受基因的表达从而完全抑制其耐受性。明确克罗诺杆菌多重耐受机制的

协同作用,将有助于进一步了解克罗诺杆菌的生物学特征,对其在婴配加工环境中的防控防治以及所引发的食源性疾病的预防提供理论依据,最终为婴儿配方食品安全提供保障。同时,研究克罗诺杆菌的抗生素耐受水平以及开发新型的治疗方法,降低其耐药性的产生对克罗诺杆菌临床治疗同样有十分重大的意义。因此,后续研究工作应继续针对克罗诺杆菌多重耐受机制进行更深入的研究,以开发出更加有效的防控手段和更靶向的治疗方法。

参考文献

- [1] Chauhan R, Bansal S, Azmi W, et al. Increased thermal tolerance in *Cronobacter sakazakii* strains in reconstituted milk powder due to cross protection by physiological stresses [J]. *Journal of Food Safety*, 2020, 40(4): 12810.
- [2] Forsythe S J. Updates on the cronobacter genus [J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2018, 9(1): 23-44.
- [3] Stryzko 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.
- [4] Urmenyi A M, Franklin A W. Neonatal death from pigmented coliform infection [J]. *Lancet (London, England)*, 1961, 1(7172): 313-315.
- [5] Wang Q, Forsythe S J, Zhao X J, et al. Species identification and molecular characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food imported over nine years into Beijing, China [J]. *Food Microbiology*, 2019, 82: 11-19.
- [6] Carvalho G G, Calarga A P, Teodoro J R, et al. Isolation, comparison of identification methods and antibiotic resistance of *Cronobacter* spp. in infant foods [J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109643.
- [7] Li Y, Zhang Y, Zhang L, et al. Prevalence and genetic characteristics of *Cronobacter* spp. from food and human clinical stool samples in Wenzhou, China 2008-2018 [J]. *Food Microbiology*, 2020, 89: 103432.
- [8] Hayman M M, Edelson-Mammel S G, Carter P J, et al. Prevalence of *Cronobacter* spp. and *Salmonella* in milk powder manufacturing facilities in the United States [J]. *Journal of Food Protection*, 2020, 83(10): 1685-1692.
- [9] Pei X, Li Y, Zhang H, et al. Surveillance and characterisation of *Cronobacter* in powdered infant formula processing factories [J]. *Food Control*, 2019, 96: 318-323.
- [10] 陈翠玲,钮冰,杨捷琳,等. 克罗诺杆菌在特殊环境中耐受性与耐药性的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(5): 328-331, 339.

- [11] Gupta T B, Mowat E, Brightwell G, et al. Biofilm formation and genetic characterization of New Zealand *Cronobacter* isolates [J]. Journal of Food Safety, 2018, 38(2): 12430.
- [12] 李美英,周博雅,林亚青,等.荷兰婴儿配方乳粉阪崎肠杆菌污染事件的警示[J].中国乳品工业,2018,46(7):28-32.
- [13] 余源.雅培遭海关总署点名国产奶粉能翻身吗?[J].中国食品工业,2022,5:99-101.
- [14] Lindsay D, Robertson R, Fraser R, et al. Heat induced inactivation of microorganisms in milk and dairy products [J]. International Dairy Journal, 2021, 121: 105096.
- [15] Ueda S. The effects of temperature on the growth and heat resistance of *Cronobacter* spp [J]. Biocontrol Science, 2017, 22(2): 125-129.
- [16] Walsh D, Molloy C, Iversen C, et al. Survival characteristics of environmental and clinically derived strains of *Cronobacter sakazakii* in infant milk formula (IMF) and ingredients [J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(3): 697-703.
- [17] 郑晶,魏丹琦,黄晓蓉,等.液态奶中分离的阪崎肠杆菌生物学性状研究[J].食品科技[J].2007,12:50-53.
- [18] Orieskova M, Kajsik M, Szemes T, et al. Contribution of the thermotolerance genomic island to increased thermal tolerance in *Cronobacter* strains [J]. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 2016, 109(3): 405-414.
- [19] 王小曼.214份食品中克罗诺杆菌的检测、鉴定、分型及其特性初步分析[D].武汉:武汉轻工大学,2020.
- [20] 姜华,陈苏南,薛婧琳,等.学生宿舍和食堂环境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,2021,33(1):14-18.
- [21] Orieskova M, Turna J, Drahovska H. Variability of the thermotolerance genomic island present in *Cronobacter* spp [J]. Journal of Biotechnology, 2015, 208: S74-S74.
- [22] Arroyo C, Cebrian G, Condon S, et al. Development of resistance in *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 to thermal and nonthermal processes after exposure to stressing environmental conditions [J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(3): 561-570.
- [23] Kim S J, Bae Y M, Lee S Y. Stress Response of Acid-shocked *Cronobacter sakazakii* against subsequent acidic pH, mild heat, and organic acids [J]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21(1): 205-210.
- [24] Huang Y T, Cheng K C, Yu R C, et al. Effect of ethanol shock pretreatment on the tolerance of *Cronobacter sakazakii* BCRC 13988 exposed to subsequent lethal stresses [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2013, 10(2): 165-170.
- [25] Arroyo C, Condon S, Pagan R. Thermobacteriological characterization of *Enterobacter sakazakii* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 136(1): 110-118.
- [26] Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, et al. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(5): 967-973.
- [27] Gurtler J B, Beuchat L R. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature [J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(7): 1579-1586.
- [28] Xu H, Huang W, Hou Q, et al. The effects of probiotics administration on the milk production, milk components and fecal bacteria microbiota of dairy cows [J]. Science Bulletin, 2017, 62(11): 767-774.
- [29] 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: 1023-1037.
- [30] Joseph S, Desai P, Ji Y, et al. Comparative analysis of genome sequences covering the seven *Cronobacter* species [J]. Plos One, 2012, 7(11): e49455.
- [31] Srikumar S, Cao Y, Yan Q, et al. RNA sequencing-based transcriptional overview of xerotolerance in *Cronobacter sakazakii* SP291 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(3): e01993-18.
- [32] Du X J, Wang X Y, Dong X, et al. Characterization of the desiccation tolerance of *Cronobacter sakazakii* strains [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2867.
- [33] Johler S, Stephan R, Hartmann I, et al. Genes involved in yellow pigmentation of *Cronobacter sakazakii* ES5 and influence of pigmentation on persistence and growth under environmental stress [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(4): 1053-1061.
- [34] Grim C J, Kotewicz M L, Power K A, et al. Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 366.
- [35] Hu S, Yu Y, Wu X, et al. Comparative proteomic analysis of *Cronobacter sakazakii* by iTRAQ provides insights into response to desiccation [J]. Food Research International, 2017, 100: 631-639.
- [36] 战捷.调控因子 RpoS 和 SspA 在阪崎克罗诺杆菌抗环境胁迫中的作用[D].无锡:江南大学,2021.
- [37] Fernandez-Gomez P, Lopez M, Prieto M, et al. The role of

- the general stress response regulator RpoS in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation [J]. Food Research International, 2020, 136: 109508.1-109508.8.
- [38] 张茂峰.基于随机突变体构建的克罗诺杆菌逆境相关基因的发掘研究[D].合肥:合肥工业大学,2018.
- [39] 袁飞,徐宝梁,陈颖,等.阪崎肠杆菌生长特性及耐热耐酸碱性的分析[J].中国公共卫生,2008,24(12):1475-1476.
- [40] 柴云雷,满朝新,卢雁,等.阪崎克罗诺杆菌耐热性和耐酸碱性的研究[J].中国食物与营养,2014,20(5):27-29.
- [41] Zhou A, Cao Y, Zhou D, et al. Global transcriptomic analysis of *Cronobacter sakazakii* CICC 21544 by RNA-seq under inorganic acid and organic acid stresses [J]. Food Research International, 2020, 130: 108963.
- [42] Niu H, Mingzheyang, Qi Y, et al. Heat shock in *Cronobacter sakazakii* induces direct protection and cross-protection against simulated gastric fluid stress [J]. Food Microbiology, 2022, 103: 103948.
- [43] Kebbi Y, Muhammad A I, Sant'ana A S, et al. Recent advances on the application of UV-LED technology for microbial inactivation: Progress and mechanism [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(6): 3501-3527.
- [44] Hinds L M, O'donnell C P, Akhter M, et al. Principles and mechanisms of ultraviolet light emitting diode technology for food industry applications [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2019, 56: 102153.
- [45] Santo D, Graca A, Nunes C, et al. Survival and growth of *Cronobacter sakazakii* on fresh-cut fruit and the effect of UV-C illumination and electrolyzed water in the reduction of its population [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 231: 10-15.
- [46] Papademas P, Mousikos P, Aspri M. Optimization of UV-C processing of donkey milk: An alternative to pasteurization? [J]. Animals, 2021, 11(1): 42.
- [47] Santo D, Graca A, Nunes C, et al. *Escherichia coli* and *Cronobacter sakazakii* in 'Tommy Atkins' minimally processed mangos: Survival, growth and effect of UV-C and electrolyzed water [J]. Food Microbiology, 2018, 70: 49-54.
- [48] Ward D M, Patras A, Kilonzo-Nthenge A, et al. UV-C treatment on the safety of skim milk: Effect on microbial inactivation and cytotoxicity evaluation [J]. Journal of Food Process Engineering, 2019, 42(4): e12944.1-e12944.10.
- [49] Chawla A, Lobacz A, Tarapata J, et al. UV light application as a mean for disinfection applied in the dairy industry [J]. Applied Sciences-Basel, 2021, 11(16): 7285.
- [50] Liu Q, Lu X, Swanson B G, et al. Monitoring ultraviolet (UV) radiation inactivation of *Cronobacter sakazakii* in dry infant formula using fourier transform infrared spectroscopy [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(1): M86-M93.
- [51] Wu Y, Zheng Y, Wang D, et al. Evaluation of the inactivation kinetics of *Cronobacter sakazakii* in infant formula treated by radio frequency dielectric heating and UVC light [J]. Philippine Agricultural Scientist, 2021, 104(1): 82-89.
- [52] Ha J W, Kang D H. Synergistic bactericidal effect of simultaneous near-infrared radiant heating and UV radiation against *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(6): 1858-1863.
- [53] Wu Y W, Zheng Y R, Wang D F, et al. Evaluation of the inactivation kinetics of *Cronobacter sakazakii* in infant formula treated by radio frequency dielectric heating and UVC light [J]. Philippine Agricultural Scientist, 2021, 104(1): 82-89.
- [54] Ha J H, Ha S D. Synergistic effects of sodium hypochlorite and ultraviolet radiation in reducing the levels of selected foodborne pathogenic bacteria [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(5): 587-591.
- [55] Ha J H, Ha S D. Synergistic effects of ethanol and UV radiation to reduce levels of selected foodborne pathogenic bacteria [J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(3): 556-561.
- [56] Lai K K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature [J]. Medicine, 2001, 80(2): 113-22.
- [57] Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, et al. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(1): 175-182.
- [58] Caubilla-Barron J, Hurrell E, Townsend S, et al. Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(12): 3979-3985.
- [59] Mo Y, Lorenzo M, Farghaly S, et al. What's new in the treatment of multidrug-resistant gram-negative infections? [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2019, 93(2): 171-181.
- [60] Chen C, Ao J, Wang L, et al. Characterisation of the molecular mechanisms of multiple antibiotic tolerance in

- growth-arrested *Cronobacter sakazakii* under ampicillin exposure [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2022, 57(6): 3850-3861.
- [61] Wu L T, Guo M K, Ke S C, et al. Characterization of the genetic background of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* with insertion elements disrupting the ompK36 porin gene [J]. Microbial Drug Resistance, 2020, 26(9): 1050-1057.
- [62] Hao M, Ye M, Shen Z, et al. Porin deficiency in carbapenem-resistant *Enterobacter aerogenes* strains [J]. Microbial Drug Resistance, 2018, 24(9): 1277-1283.
- [63] 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.
- [64] Pakbin B, Bruck W M, Allahyari S, et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* strains isolated from powdered infant formula milk [J]. Foods, 2022, 11(8): 1093.
- [65] 吴玲玲,戚浩彧,任高翔,等.河南省市售婴幼儿配方食品中克罗诺杆菌的分子分型及系统发育研究[J].中国食品卫生杂志,2022,34(1):23-28.
- [66] Li C, Zeng H, Zhang J, et al. *Cronobacter* spp. isolated from aquatic products in China: Incidence, antibiotic resistance, molecular characteristic and CRISPR diversity [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 335(16): 108857.
- [67] Costa P V, Vasconcellos L, Da Silva I C, et al. Multi-locus sequence typing and antimicrobial susceptibility profile of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* isolated from corn-based farinaceous foods commercialized in Brazil [J]. Food Research International, 2020, 129: 108850.
- [68] Arslan S, Erturk H G. Occurrence, virulence and antimicrobial susceptibility profiles of *Cronobacter* spp. from ready-to-eat foods [J]. Current Microbiology, 2021, 78(9): 3403-3416.
- [69] 贾华云,王岚,陈帅,等.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,2019,31(2):106-110.
- [70] Zeng H, Lei T, He W, et al. Novel multidrug-resistant *Cronobacter sakazakii* causing meningitis in neonate, China, 2015 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(11): 2121-2123.
- [71] Cui J H, Yu B, Xiang Y, et al. Two cases of multi-antibiotic resistant *Cronobacter* spp. infections of infants in China [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2017, 30(8): 601-605.
- [72] 张强,罗勤贵,赵南昕,等.陕西省市售婴幼儿食品中阪崎克罗诺杆菌流行状况及相关特性研究[J].西北农业学报,2019, 28(5):843-852.
- [73] 黄玉兰,雷高鹏,张林,等.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.
- [74] 裴晓燕,刘秀梅.阪崎肠杆菌的生物学性状与健康危害[J].中国食品卫生杂志,2004,6:550-555.
- [75] 陈卓,任立松,马龙,等.阪崎肠杆菌新疆分离株的药敏分析[J].现代预防医学,2011,38(17):3539-3541.
- [76] 韩蓓,梁欢,付桂明,等.市售即食食品中非致病菌的耐药性及耐药基因转移的研究[J].中国食品卫生杂志,2012,24(5): 412-416.