

# 阪崎肠杆菌检测方法的研究进展

文/孔祥瑞

(黑龙江立高仪器设备有限公司)

**摘要:** 阪崎肠杆菌是能够导致新生儿严重疾病甚至死亡的条件致病菌。目前, 该菌已经从多种食品及环境中检出。因此, 建立快速、操作简便、特异性好、灵敏度高的检测方法对食品及加工环境的安全监控具有非常重要的意义。研究了国内外阪崎肠杆菌检测方法的进展情况, 建立快速、简便、灵敏度高的阪崎肠杆菌检测系统是未来发展的需要。

**关键词:** 阪崎肠杆菌; 检测方法; 研究进展

DOI:10.16172/j.cnki.114768.2017.12.014

阪崎肠杆菌是以日本细菌学家 Riichi Sakazakii 的名字命名的, 是肠杆菌科肠杆菌属的一个新种, 属于革兰氏阴性杆菌, 至2006年该菌已经发现了16个生物型。该菌广泛存在于自然界中, 在奶粉、肉制品、谷物、蔬菜、水果等多种食品中分离出了阪崎肠杆菌。此菌是一种条件致病菌, 感染对象多是婴儿, 尤其是早产、低重儿和免疫

力低下的新生儿<sup>[1]</sup>。它可引起新生儿脑膜炎和坏死性小肠结肠炎等重疾, 虽发病率不高, 但死亡率可达50%~80%。根据疾病预防控制中心(CDC)报告, 全球每年约有6例阪崎肠杆菌报告病例, 其中大部分感染病例发生在发达国家。国内外学者针对阪崎肠杆菌的安全监控研发了大量的检测方法。与其它食源性致病菌相比, 阪崎肠杆菌的

常规检测方法不够成熟, 对于该菌的鉴定是以 TSA 平板上产生的黄色素为基础, 只有在 TSA 平板上产生了黄色素, 才能够进行下一步的一系列确认试验<sup>[2]</sup>。然而, 黄色素的产生并不是该菌所特有的, 研究表明, 自然界中存在一些其它菌也可以产生黄色素, 因此该方法特异性差。因此, 研究建立阪崎肠杆菌快速、特异性和灵敏度高, 并且经济

pH值, 适当添加缓冲盐或者稀磷酸, 调节pH值到3.2, 保证CMP充分分离。

本文依据GB 5413.40-2016《食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中核苷酸的测定》方法, 采用高效液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中核苷酸含量, 通过多个厂家多个型号色谱柱的对比, 选用SUPELCO LC-18-T型号色谱柱, 核苷酸5个组分分离效果明显。本方法前处理操作简单, 定量准确,

适合批量测定。■

## 参考文献

- [1] 田燕, 张凤霞, 贾迪, 等. 高效液相色谱法测定乳制品中核苷酸含量[J]. 中国食品添加剂, 2014(4): 138-143.
- [2] 张婷婷, 曾明飞, 金燕, 等. 反高效液相色谱-串联质谱法测定母乳及奶粉中核苷和核苷酸含量[J]. 分析化学, 2014, 42(4): 585-591.
- [3] 俞莎, 陈晓春, 潘洪峰, 等. UPLC-MS/MS法测定婴幼儿配方奶粉中五种核苷酸研究[J]. 营养学报, 2010, 32(2): 187-189.
- [4] 赵贺华, 刘晓红. 核苷酸对婴幼儿免疫系统的影响[J]. 中国临床医生, 2014(8): 12-14.

- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5413.40-2016食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中核苷酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

## 作者简介:

苑向杰(1980-), 女, 助理工程师, 主要从事乳品检测工作。

\*通信作者: 李则均(1983-), 女, 工程师, 主要从事质量分析工作。

(收稿日期: 2017-08-24)

高效的检测方法十分重要。

## 1 传统的检验方法

### 1.1 常规检验方法

传统的食品中阪崎肠杆菌的检测方法是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》，此法与ISO方法相似，包括选择性前增菌、分离、生化鉴定，检测步骤比较复杂，周期较长，需要5~7天才能得到结果，不利于检测该菌对食品的污染情况，且准确性和特异性不高，容易导致结果假阳和假阴性。

### 1.2 常规方法的改进

为了避免出现假阳和假阴性的结果，同时提高检测结果的准确性，研究人员改进了分离培养基。Leuschner等<sup>[3]</sup>在培养基中加入4-甲基伞形酮- $\alpha$ -D-葡萄糖苷作为荧光底物，阪崎肠杆菌在生长繁殖时会产生荧光产物，从而提高特异性。Muytjens等<sup>[4]</sup>鉴定了129株阪崎肠杆菌分离株的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性，100%为阳性株。在培养基中加入5-溴-4-氯-3-吡啶- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷作为 $\alpha$ -葡萄糖苷酶指示剂，开发了新的分离培养基。Leuschner和Bew<sup>[5]</sup>对ISO检测方法稍作修改，对阪崎肠杆菌进行筛检，在欧洲8个国家的16个实验室间进行验证。阪崎肠杆菌在NA+ $\alpha$ -MUG平板上生长，在日光下菌落呈现鲜黄色，在紫外光下呈现蓝/紫色荧光。可疑菌落用API20E进行生化鉴定。

## 2 分子生物学方法

### 2.1 PCR 检测技术

PCR技术已经在生命科学的许多领域有应用，包括多重PCR、多重PCR、实时PCR技术。Lehner等<sup>[6]</sup>用PCR技术对15株阪崎肠杆菌进行检测。Keyser等<sup>[7]</sup>2003年评估厌氧污泥床技术处理葡萄酒厂废水能力时，首次报道了阪崎肠杆菌快速PCR检测法。高旗利等<sup>[8]</sup>对菌体16S和23S rDNA保守序列通用引物的利用，对6株阪崎肠杆菌16~23S rRNA序列进行扩增、测序，建立奶粉中该菌PCR检测法。PCR技术灵敏度高、快速<sup>[9]</sup>，但需要的仪器设备昂贵、电泳繁琐，对检测人员的技术要求较高。

### 2.2 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术是Notomi等<sup>[10]</sup>在2000年开发的一种新型恒温核酸扩增方法，此法灵敏度高、耗时短、方法简便<sup>[11~12]</sup>。胡连霞等<sup>[13]</sup>采用改良的环介导等温扩增方法，快速检测出婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌。Hu等<sup>[14]</sup>对阪崎肠杆菌的16S~23S rRNA基因区间设计引物，用环介导等温扩增技术对阪崎肠杆菌人工污染的奶粉进行检测，结果表明此法灵敏度、特异性都高于PCR技术。

### 2.3 核酸探针技术

德国Vermicon AG公司利用核酸探针技术，设计了细菌rRNA特殊区域荧光标记，建立了商品化检

验及鉴定系统。Lehner等<sup>[15]</sup>根据德国Vermicon AG公司建立的系统，使用落射荧光显微镜可观察到阪崎肠杆菌发出的特异性红光，使该菌非常容易被鉴定。Liu等<sup>[16]</sup>设计了10对寡核苷酸探针和2对特异性PCR引物。试验结果表明，PCR方法和探针法用于阪崎肠杆菌检测时均为阳性。

## 3 免疫学检测方法

### 3.1 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

酶联免疫吸附是把免疫学和现代测试技术相结合而建立的一种超微量测定方法。石曼<sup>[17]</sup>初步研究了阪崎肠杆菌的免疫分析方法，制备了高效价、高特异性的阪崎肠杆菌多克隆抗体。通过优化免疫分析条件，建立一种快捷、方便且实用的间接酶联免疫检测阪崎肠杆菌的方法。汪琳等<sup>[18]</sup>制备了抗阪崎肠杆菌单克隆抗体，并初步建立了ELISA检测方法。

### 3.2 免疫磁性微球珠富集技术

金燕飞等<sup>[19]</sup>利用阳离子磁珠捕捉奶粉中的阪崎肠杆菌，将特异的阪崎肠杆菌多克隆抗体结合到磁珠微球上，磁珠捕获同时富集细菌，此法大大缩短阪崎肠杆菌检测周期，提高效率，与传统法相比，操作简单、灵敏度高、检测周期短，但是成本有所增加。

### 3.3 免疫荧光技术

支援等<sup>[20]</sup>采用荧光生物标记物标记免疫磁珠富集的阪崎肠杆

菌，其中荧光生物标记物为量子点。结果显示整个检测过程只需要2小时，检出限较低，约为100 CFU/mL，且时间短、灵敏度高、特异性好。

## 4 计算机网络系统模拟智能计算系统

Iversen等<sup>[21]</sup>利用计算机网络系统模拟生物神经网络的智能计算系统和多层感知器ANN技术，对阪崎肠杆菌分离株的生化特征和16S rDNA序列进行分析。以计算机为基础的分析方法可降低数据的复杂性和维数，提高菌种鉴定系统速度及可靠性。

## 5 小结

快速、操作简便、灵敏度高、特异性高的检测技术是食品中病原性微生物检测的主要发展方向。国内外大量的阪崎肠杆菌研究数据表明，PCR技术是未来阪崎肠杆菌快速检测方法的研究基础和方向。C

### 参考文献

- [1] 刘艳艳, 柳增善, 卢士英, 等. 灭菌乳中活阪崎肠杆菌PMA-PCR检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41 (2): 65-69.
- [2] Iversen C, Forsythe S J. Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (1): 48-52.
- [3] Leuschner R G K, Baird F, Donald B, et al. A medium for presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula[J]. *Food Microbiology*, 2004, 21 (96): 133-139.
- [4] Muyltjens H L, van der Ros-van de Repe J, van Druuten H A. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha-glucosidase reaction and reproducibility of the test system[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1984, 20 (4): 684-686.
- [5] Leuschner R G, Bew J. A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula: interlaboratory study[J]. *Journal of AOAC International*, 2004, 87 (3): 604-613.
- [6] Lehner A, Tasara T, Stephan R. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification[J]. *BMC Microbiology*, 2004, 4 (1): 1-7.
- [7] Keyser M, Witthuhn R C, Ronquest L C, et al. Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB) - granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii*[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25 (22): 1893-1898.
- [8] 高旗利, 张霞, 罗茂凤, 等. 奶粉中阪崎肠杆菌 PCR检测方法研究[J]. 检验检疫科学, 2005, 15 (4): 4-8.
- [9] Orlandi P A, Lampel K A. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (6): 2271-2277.
- [10] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28 (12): e63.
- [11] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2004, 59 (2): 145-157.
- [12] Suzuki R, Yoshikawa T, Ihira M, et al. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA[J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 132 (1-2): 216-221.
- [13] 胡连霞, 张伟, 张先舟, 等. 改良环介导等温扩增技术快速检测婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌[J]. 微生物学报, 2009, 49 (3): 378-382.
- [14] Hu L, Zhang W, Zhang X, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49 (3): 378-382.
- [15] Lehner A, Nitzsche S, Breeuwer P, et al. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular-based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection[J]. *BMC Microbiology*, 2006, 23 (6): 15.
- [16] Liu Y, Gao Q, Zhang X, et al. PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula[J]. *Molecular & Cellular Probes*, 2006, 20 (1): 11-17.
- [17] 石曼. 食品中阪崎肠杆菌酶联免疫检测方法研究: 硕士论文[D]. 天津: 天津科技大学, 2011.
- [18] 汪琳, 李劲伟, 邢佑尚, 等. 阪崎肠杆菌单克隆抗体制备及ELISA检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40 (12): 52-55.
- [19] 金燕飞, 郑培, 王海明, 等. 应用阳离子磁珠捕集法快速检测奶粉中阪崎肠杆菌[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9 (19): 3741-3743.
- [20] 支援, 孟瑾, 郑小平, 等. 一种快速检测阪崎肠杆菌的新方法免疫磁性分离荧光标记[J]. 乳业科学与技术, 2010, 33 (5): 231-233.
- [21] Iversen C, Lancashire L, Waddington M, et al. Identification of *Enterobacter sakazakii* from closely related species: The use of Artificial Neural Networks in the analysis of biochemical and 16S rDNA data[J]. *BMC Microbiology*, 2006, 13 (6): 28.

### 作者简介:

孔祥瑞 (1982-), 女, 本科, 研究方向为乳制品检测化验。

(收稿日期: 2017-06-20)