



## 阪崎肠杆菌的生物学特性及其检测技术\*

吴清平<sup>1</sup> 叶应旺<sup>1,2,3</sup> 郭伟鹏<sup>1</sup> 杨宁<sup>4</sup>

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)<sup>1</sup>

(中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)<sup>2</sup> (中国科学院研究生院 北京 100049)<sup>3</sup>

(广东环凯微生物科技有限公司 广州 510070)<sup>4</sup>

**摘要:** 阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 是寄生于人和动物肠道的条件性肠道致病菌, 能引起新生儿脑膜炎, 致死性小肠结肠炎以及菌血症等, 具有产生  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和吐温 80 脂酶、不发酵三梨醇以及无磷酸胺酶活性等生理生化特征, 并且对干燥、渗透压和抗生素等有很强的抗性。该菌自然来源非常广泛, 在水、土壤、植物根茎、动物肠道甚至加工食品都可存在, 其中婴儿配方奶粉是婴儿感染阪崎肠杆菌的主要渠道。近年来基于  $\alpha$ -葡萄糖苷酶反应的特异性生化检测和 PCR 扩增的分子检测技术已取得重要进展, 但是目前还缺乏一种稳定检测该菌的分子分型检测技术。

**关键词:** 阪崎肠杆菌, 生物学特性, 检测技术,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶

**中图分类号:** R155.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0099-05

## The Biologic Characteristics of *Enterobacter sakazakii* and its Detection Techniques\*

WU Qing-Ping<sup>1</sup> YE Ying-Wang<sup>1,2,3</sup> GUO Wei-Peng<sup>1</sup> YANG Ning<sup>4</sup>

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbiol Culture Collection and Application,

Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)<sup>1</sup>

(South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301)<sup>2</sup>

(Graduate School of CAS, Beijing 100049)<sup>3</sup>

(Guangdong Huankai Microbiol Sci & Tec Co., Ltd., Guangzhou 510070)<sup>4</sup>

**Abstract:** *Enterobacter sakazakii* is an opportunistic pathogen parasized in human and animal intestines causing meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis and producing  $\alpha$ -glucosidase and tween-80 esterase, but not fermenting D-sorbitol and no phosphoamidase activity. It also shows resistance to antibiotic, osmosis and desiccation. The food-borne pathogen could exist in the soil, water, rootstock of plants, intestine of animals and machining foods. Furthermore, the powdered infant formula milk was the main infection sources. The special biochemical detection based on  $\alpha$ -glucosidase reaction and molecular detection techniques based on PCR amplification have been made much progress in recent years, but in much need of a stable molecular typing technique for detection of *Enterobacter sakazakii*.

**Key words:** *Enterobacter sakazakii*, Biologic characteristics, Detection techniques,  $\alpha$ -glucosidase

阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 是一种周生鞭毛、能运动、无芽孢的革兰氏阴

\* 广东省自然科学基金资助项目 (No. 04000244)

\*\* 通讯作者 Tel: 020-87688132, E-mail: wuqp@gdas.ac.cn

收稿日期: 2005-12-19, 修回日期: 2006-01-17

性细菌,作为肠杆菌的一种,以前一直被认为是黄色阴沟杆菌(*Enterobacter cloacae*)。直到1980年,才更名为阪崎肠杆菌。阪崎肠杆菌感染导致新生儿脑膜炎、致死性小肠结肠炎和菌血症等疾病,尽管使用抗生素治疗可以康复,但伴随着严重的神经系统后遗症、发育障碍等症状<sup>[1]</sup>。2004年安徽阜阳劣质婴儿配方奶粉事件引起我国政府的高度重视,并且首次从87份婴儿配方奶粉中分离到11株该菌,检出率达12.6%<sup>[2]</sup>。尽管专家目前认为是由于奶粉的营养比例问题导致小孩畸形和死亡,但是从生病小孩的临床症状看,小孩头部肿大和反应迟钝与阪崎肠杆菌感染的症状相似,可能该菌在致病中起到重要作用。

## 1 阪崎肠杆菌生物学特性

**1.1 命名及菌落培养特征** 阪崎肠杆菌属肠杆菌科肠杆菌属,靠鞭毛自由运动的革兰氏阴性无芽孢杆菌。Brenner等通过产色素与不产色素的菌株进行杂交和D-山梨醇产酸和延迟产生脱氧核糖核酸酶与否对该菌的分类产生质疑。1980年Farmer等通过不同菌株之间的DNA杂交实验,发现阪崎肠杆菌菌株之间的DNA一致性高达83%~89%,而与阴沟杆菌菌株一致性只有31%~49%,并结合生化特性、血清型、抗生素敏感性等分析重新命名。研究发现刚分离的阪崎肠杆菌在结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(VR-BGA)上生长形成两种不同的菌落:一种菌落呈干燥或黏液状,边缘不规则,用接种环挑动,菌落具有明显的附着感并且有弹性;另一种菌落则很光滑,很容易用接种环挑取,并发现该菌在肉汤培养基中生长呈现团块或沉淀状,但目前还不清楚菌落特征差别是否与毒性有关<sup>[1,3]</sup>。

**1.2 生理生化特征** 为了分离和鉴定,科学家们对阪崎肠杆菌的生理生化特性进行了大量研究。Muytjens等对229株肠杆菌进行酶学研究,结果发现阪崎肠杆菌与其他的实验肠杆菌之间存在两个明显的不同:阪崎肠杆菌总是表现 $\alpha$ -葡萄糖苷酶阳性,而其他试验菌株均是阴性;所有实验菌株中只有阪崎肠杆菌表现为磷酸酯酶阴性<sup>[4]</sup>。Farmer等研究发现阪崎肠杆菌与其他的实验肠杆菌之间最大的区别是前者不能发酵D-山梨醇,但延迟产生一种分泌到胞外的脱氧核糖核酸酶。1985年又检测了57株阪崎肠杆菌,发现有53株表现为 $\alpha$ -葡萄糖苷酶阳性,因而 $\alpha$ -葡萄糖苷酶阳性被认为是快速检测阪崎肠杆菌的可靠方法<sup>[3]</sup>。Aldova等对分离的73株阪崎肠杆菌进行吐温80酯酶活性检测,结果表明97.3%的阪崎肠杆菌具有产生该酶的能力<sup>[5]</sup>。阪崎肠杆菌具有的主要生理生化特征还有:氧化酶阴性、过氧化氢酶阳性,并且生成黄色菌落。

### 1.3 阪崎肠杆菌的抗性

**1.3.1 热抗性:** Nazarowec-White和Farber等首次描述了奶粉中阪崎肠杆菌的热失活和热抗性,用加热培养基(脂肪含量达3.8g/100mL)对来自食品和临床各5株阪崎肠杆菌进行测定,结果表明 $10^{6-7}$  cfu/mL浓度的菌液需要在60℃加热15.0~17.5 min才能完全致死<sup>[1]</sup>。Nazarowec-White等用高温巴斯德消毒分别对密封试管内、未加工、未培养的牛奶内阪崎肠杆菌进行灭菌,研究高温巴斯德消毒热失活预期模型,发现在给定温度(58℃~68℃)下,不同时间(3~60s)内5支试管中细菌热失活效果不成线性关系,并显示在66℃时,16s就能够使细菌数量下降3个数量级。以上结果表明阪崎肠杆菌经过高温巴斯德消毒(72℃,15s)并不能很好存活。阪崎肠杆菌污染来源可能来自奶粉的加工环境以及干燥和罐装阶段,甚至消毒过的纸装盒和搅拌工具等。进一步

的研究结果表明配方奶粉内的脂肪、蛋白质以及糖类有助于阪崎肠杆菌抵抗热失活<sup>[6]</sup>。实验结果还表明微波对细菌致死不仅与热有关,而且与电磁辐射有关。Kindle等检验了微波对3株细菌的影响(包括1株阪崎肠杆菌),发现当温度达到82℃~93℃时,85~100s就可使该菌浓度从 $10^5$  cfu/mL降到20 cfu/mL<sup>[7]</sup>。

**1.3.2 干燥和渗透压抗性:** Nazarowec-White和Farber等认为阪崎肠杆菌在婴儿奶粉中存活与该菌的高度耐热性有关,但Breeuwer等发现阪崎肠杆菌并不具耐热性,而是具有一定的耐渗透压和干燥的能力。Breeuwer等认为该菌通过金属离子积累以及可溶性物质如海藻糖、脯氨酸、糖胶以及甜菜碱来增加细胞间的渗透压,维持大分子周围一层水膜来防止细胞间脱水作用。在水活度0.934的脑心肉汤(加山梨醇)中检测阪崎肠杆菌的抗渗透性,结果表明在25℃时阪崎肠杆菌具有比大肠杆菌、沙门氏菌等更高的抗渗透性。并且显示细菌的抗性与细胞的生长时期有关,处在对数生长期细菌对环境更加敏感<sup>[8]</sup>。阪崎肠杆菌抗性的分子机制研究很少,Breeuwer等在水活度0.23的干燥条件下研究表明,为了应对干燥环境压力,细菌启动许多不同簇功能基因的大量表达,包括热休克蛋白调节子、环AMP受体蛋白调节子等的诱导表达<sup>[1]</sup>。

**1.3.3 抗生素抗性:**大量实验证明长期使用广谱抗生素是导致抗多种抗生素微生物数量增加的原因之一。随着新生儿阪崎肠杆菌感染的发生,有效的治疗显得很必要。Farmer等检验阪崎肠杆菌对氯霉素和氨苄青霉素的最小抑制剂量分别为4~8μg/mL和2~4μg/mL。随着研究的深入,治疗阪崎肠杆菌的有效方法是氨苄青霉素联合庆大霉素或者氯霉素,这种方法被Willis和Robinson称为治疗阪期肠杆菌感染的金标准<sup>[1]</sup>。

## 2 阪崎肠杆菌污染来源

**2.1 医院临床** Farmer等1980年就报道从感染阪崎肠杆菌病人的脑髓液、血液、喉咙分泌物等分离到阪崎肠杆菌,7个月后又从同一医院29例病人呼吸道中发现该菌<sup>[3]</sup>。尽管有报道称新生儿阪崎肠杆菌感染可能来自于母亲的产道,但质粒DNA图谱分析表明,从同医院分离的5株阪崎肠杆菌中有3株是同一菌株。对3例感染阪崎肠杆菌的新生儿进行检查时发现,两例出生时没有感染阪崎肠杆菌,且在他们母亲的排泄物、阴道、子宫中都没有发现该菌<sup>[1]</sup>。这些表明感染来自母亲产道污染的假说依据不足,可能是其他原因导致感染。

**2.2 婴儿配方奶粉** 近年来许多报道表明婴儿配方奶粉是其主要感染途径。1980年Farmer等从未开封的脱脂干奶粉中分离到阪崎肠杆菌<sup>[3]</sup>。Muytjens等对35个国家141种配方奶粉检测结果显示,20种样品中分离到阪崎肠杆菌,检出率达14.2%<sup>[9]</sup>。Iversen等调查82份婴儿配方奶粉和402份其他食品,并对阪崎肠杆菌以及其他肠杆菌进行检测。结果发现在配方食品、干婴儿食品、干酪产品和奶粉中的阪崎肠杆菌检出率分别为2.4%、10.2%、3.3%、4.1%,而没有发现沙门氏菌和其他肠杆菌,可见食品加工和生产阶段用来防止沙门氏菌和其他肠杆菌的措施不足以控制阪崎肠杆菌的生长繁殖,说明阪崎肠杆菌比其他肠杆菌有更强抗干燥能力,且该菌在食品中分布很广泛<sup>[10]</sup>。

**2.3 自然环境** 早在1974年Sakazakii等报道从土壤、水、下水道、动物和人类排泄物中分离到阪崎肠杆菌,并且在对内生微生物调查中发现,农作物的根、茎和果实中存在阪崎肠杆菌。科学家们还从面粉加工厂、蝇的肠道和家庭环境中分离到该菌。因而要防止阪崎肠杆菌的感染不仅要在加工过程中进行有效消毒,而且还要加强对环境中致病菌载体的消杀工作。Iversen等认为阪崎肠杆菌产生的胶囊状结构提高了它附着物

体表面和形成生物膜的能力,建议盛装奶粉用的瓶子和其它用具要彻底消毒以消除阪崎肠杆菌的感染<sup>[1]</sup>。

### 3 阪崎肠杆菌的检测技术

#### 3.1 生理生化检测技术

**3.1.1 传统生理生化检测技术:**目前阪崎肠杆菌的分离主要是依据FDA标准方法和Muytjens等及Nazarowec-White和Farber的方法进行。具体的操作:称333g样品(如婴儿配方奶粉),分成3份即 $3 \times 1g$ 、 $3 \times 10g$ 、 $3 \times 100g$ ,分别稀释成1:10的溶液(用蒸馏水或者蛋白胨缓冲液稀释),然后取10mL混合液到90mL肠杆菌增殖肉汤中进行增殖培养,直接取0.1mL增殖菌液涂布平板培养或者用0.01mL的划线培养或者取1mL的菌液倒平板培养,采用VRBGA培养基在36℃过夜进行选择培养,再挑取5个可疑菌落到胰蛋白酶大豆琼脂培养基上25℃培养48h~72h,挑取黄色菌落,用API-20E和氧化酶进行鉴定<sup>[5]</sup>。

**3.1.2 特异性生理生化检测技术:**Muytjens等在培养基中加入4-硝基苯酚- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷,只有阪崎肠杆菌产生黄色菌落,并且发现阪崎肠杆菌没有磷酸胺酶活性,而阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、成团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) 在实验中磷酸胺酶阳性率分别为72%,89%,100%。可见 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和磷酸胺酶存在与否是阪崎肠杆菌与其它肠杆菌之间两个主要区别,并进一步指出利用该两种酶反应随机检测重复率分别达89%和81%。但是由于产生的4-硝基苯酚在琼脂上很容易扩散影响实验结果观察,因而存在一定的局限性<sup>[4]</sup>。Druggan, Forsythe和Iversen等在TSA上加入X $\alpha$ Glc(5-溴-4-氯-3-吡啶- $\alpha$ -D-葡萄糖苷酸), $\alpha$ -葡萄糖苷酶的作用于X $\alpha$ Glc只有阪崎肠杆菌产生蓝绿色菌落,这种鉴别方法比传统FDA方法快2d,敏感性达100%,特异性达87.2%,但这种鉴别方法产生假阳性较多,比对FDA方法假阴性,各有优缺点<sup>[11]</sup>。Leuscher等发现在TSA上加入 $\alpha$ -MUG可以鉴别阪崎肠杆菌可疑菌落,可疑菌落在加有 $\alpha$ -MUG(4-甲基伞形花内酮- $\alpha$ -D-葡萄糖苷酸)的营养琼脂上产生黄色菌落,用紫外线照射发出荧光,而其它实验菌株可生成黄色菌落,但在紫外线下不发出荧光<sup>[12]</sup>。2004年Oh和Kang等利用 $\alpha$ -葡萄糖苷酶作用于底物 $\alpha$ -MUG产生黄色菌落的基础上,对培养条件如培养温度、氮源的种类和剂量以及选择性培养基种类进行优化,指出在胰蛋白酶含量达20g/L的胆盐琼脂上,37℃培养24h具有最佳检出率<sup>[13]</sup>。

**3.2 分子检测技术** 目前只有美国DuPont Qualicon开发出一套BAX( $\tau$ )检测阪崎肠杆菌程序系统,并用于和FDA方法进行对照检测<sup>[2]</sup>。RAPD、PFGE、染色体DNA分析、核糖核酸分型以及质粒分型等都已用于对阪崎肠杆菌分型研究。Nazarowec-White和Farber等用EcoRI对18株阪崎肠杆菌进行核糖核酸分型,发现18株有10种分型<sup>[1]</sup>。1999年Nazarowec-White和Farber等用XalI限制性核酸内切酶对18株阪崎肠杆菌基因组进行切割,通过PFGE进行分型分析,结果显示每个菌株都有一个不同的带型<sup>[14]</sup>。高旗利等运用16S和23S rDNA的保守区作为通用引物对16S~23S rDNA间区序列(IRS)进行扩增和测序,通过比较阪崎肠杆菌与近源菌株之间16S~23SrDNA间区序列的基础上,从设计的11对引物中优化出一对检测阪崎肠杆菌的特异性引物,采用该引物对阪崎肠杆菌进行检测,灵敏度达2.2~5.4cfu/100g,并且该方法与FDA方法

检测结果完全相符<sup>[15]</sup>。2004年 Iversen 等利用 16S rDNA 的测序结果对 126 株经生化鉴定 (API20E 和 ID32E; bioMerieux) 为阪崎肠杆菌菌株进行系统发育调查, 发现菌株都分成 4 个簇, 并且每个簇都和标准菌株存在一定差异, 16S rDNA 调查结果显示与标准菌株的差异分别是 0.1% ~ 1.2%, 1.6% ~ 1.9%, 2.2% ~ 2.5%, 3.5%; 再从不同簇中选出 41 株孤崎肠杆菌, 对其 *hsp60* 的测序结果进行系统发育分析, 结果显示同样形成 4 个簇, 并且与标准菌株的差异分别是 1.6% ~ 2.4%, 9.6% ~ 10.8%, 4.8%, 11.2%。这表明该菌具有遗传多样性, 并且分类的复杂性比目前认为的要大得多。此外还发现这种方法与 DNA-DNA 杂交方法的鉴定结果不成线性关系, 因而寻找一种更为稳定的检测实际样品中阪崎肠杆菌的分子分型检测技术显得很关键<sup>[16]</sup>。

#### 4 讨论

阪崎肠杆菌感染具有发病急, 致死率高等特点, 同时该菌的自然来源非常广泛, 并且目前对其致病机制还不是很清楚, 因而建立准确、灵敏的检测方法对食源性致病细菌感染的控制、疾病的诊断和流行病学调查显得非常关键。目前 FDA 方法是国际检测阪崎肠杆菌的标准生化方法, 但该方法存在假阴性较高。虽然近年来生化检测技术在 FDA 方法的基础上取得了很大的进展, 但是仍然存在一些缺陷, 所以进一步寻找该菌的生理生化特征为特异性的生化检测提供参考显得很有必要。另外, 阪崎肠杆菌在平板培养基生长具有两种截然不同的菌落, 猜测在该菌菌株间可能存在毒性的差别, 所以进一步的血清型、噬菌体分型等将会在生化检测中发挥很大的作用。虽然很多分子方法已应用于阪崎肠杆菌的分型研究, 但是目前还没有建立一种稳定检测实际样品中该菌的分子分型技术。由于阪崎肠杆菌是一种寄生于人和动物肠道的条件致病菌, 在其基因组间存在一种短的串联重复序列 (ERIC), 因此可以试图采用建立 ERIC-PCR 技术扩增该菌的基因组 DNA, 通过扩增的特征条带构建该菌的指纹图谱, 建立快速检测阪崎肠杆菌的分子平台, 为临床诊断和流行病学调查提供可靠依据。

#### 参考文献

- [1] Joshua B G, Jeffrey L K, Larry R B. *Int J Food Microbiol*, 2005, **104** (1): 1~34.
- [2] 李秀梅, 裴晓燕, 郭云昌. *中国食品卫生杂志*, 2005, **17** (1): 10~12.
- [3] Farmer J J, Asbury M A, Hickman F W, *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1980, **30**: 569~584.
- [4] Muytjens H L, van der Ros-van Repe J, van Druten H A M. *J Clin Microbiol*, 1984, **20**: 684~686.
- [5] Iversen C, Forsythe S. *Trends Food Sci Tech*, 2003, **14**: 443~454.
- [6] Nazarowec-White M, Mekellar R C, Piyasena P. *Food Res Int*, 1999, **32**: 375~379.
- [7] Kindle G, Busse A, Kampa D, *et al.* *J Hosp Infect*, 1996, **33**: 273~278.
- [8] Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, *et al.* *J Appl Microbiol*, **95**: 2003, 967~973.
- [9] Muytjens H L, Roelofs W H, Jaspas G H J. *J Clin Microbiol*, 1988, **26**: 743~746.
- [10] Iversen C, Forsythe S. *Food Microbiol*, 2004, **21**: 771~777.
- [11] Iversen C, Druggan P, Forsythe S. *Int J Food Microbiol*, 2004, **96**: 133~139.
- [12] Leuscher R G K, Baird F, Donald B, *et al.* *Food Microbiol*, 2004, **21**: 527~533.
- [13] Oh S W, Kang D H. *Appl and Envi Microbiol*, 2004, **70** (9): 5692~5694.
- [14] Nazarowec-White M, Farber J M. *J Med Microbiol*, 1999, **48**: 559~567.
- [15] 高旗利, 张霞, 罗茂恩, 等. *检验检疫科学*, 2005, **15** (4): 3~8.
- [16] Iversen C, Waddington M, On S L W. *J Clin Microbiol*, 2004, **42** (11): 5368~5370.