

- [4] HARVEY S M, STURGEON J, DASSEY D E. Botulism due to *Clostridium baratii* type F toxin[J]. J Clin Microbiol, 2002,40(6):2260-2262.
- [5] CASSIR N, BENAMAR S, LA SCOLA B. *Clostridium butyricum*: from beneficial to a new emerging pathogen[J]. Clin Microbiol Infect, 2016,22(1):37-45.
- [6] WIJESINGHE R U, OSTER R J, HAACK S K, et al. Spatial, temporal, and matrix variability of *Clostridium botulinum* type E toxin gene distribution at great lakes beaches[J]. Appl Environ Microbiol, 2015,81(13):4306-4315.
- [7] AURELI P, FENICIA L, PASOLINI B, et al. Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy[J]. J Infect Dis, 1986,154(2):207-211.
- [8] ABE Y, NEGASAWA T, MONMA C, et al. Infantile botulism caused by *Clostridium butyricum* type E toxin [J]. Pediatr Neurol, 2008,38(1):55-57.
- [9] HATHEWAY C L, MCCROSKEY L M. Examination of feces and serum for diagnosis of infant botulism in 336 patients[J]. J Clin Microbiol, 1987,25(12):2334-2338.
- [10] FENICIA L, ANNIBALLI F, AURELI P. Intestinal toxemia botulism in Italy, 1984-2005 [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007, 26(6):385-394.
- [11] DYKES J K, LÚQUEZ C, RAPHAEL B H, et al. Laboratory investigation of the first case of botulism caused by *Clostridium butyricum* type E toxin in the United States[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(10):3363-3365.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验:GB 4789.12—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [13] MENG X, KARASAWA T, ZOU K, et al. Characterization of a neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism [J]. J Clin Microbiol, 1997,35(8):2160-2162.
- [14] MENG X, YAMAKAWA K, ZOU K, et al. Isolation and characterisation of neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* from soil in China[J]. J Med Microbiol,1999,48(2):133-137.

研究报告

克罗诺杆菌属食品分离株种水平鉴定方法比较研究

张红芝,刘雪薇,魏腾,鲁珺琰,张曦

(上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

摘要:目的 研究食品中分离克罗诺杆菌属种的鉴定方法,旨在建立稳定、可靠的种的鉴定方法。方法 本研究选择三种鉴定方法,包括生化鉴定(VITEK 2 Compact)法、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)、全基因组测序,通过比较分析三种方法对19株克罗诺杆菌属的鉴定结果,阐述三种鉴定方法的优缺点及其适用性。结果 本研究中19株克罗诺杆菌属的鉴定结果显示,VITEK 2 Compact对阪崎克罗诺杆菌和丙二酸盐克罗诺杆菌的鉴定准确率只有67%和66%,而MALDI-TOF MS和全基因组测序的鉴定结果一致,因此可以判定MALDI-TOF MS能够快速、准确、高通量对克罗诺杆菌属进行种的鉴定。但是MALDI-TOF MS受限于数据库,不能鉴定到亚种的水平。结论 本研究结果提示VITEK 2 Compact法不适用于克罗诺杆菌属种的鉴定;全基因组测序鉴定结果准确可靠;MALDI-TOF MS可以实现快速、高通量、准确的鉴定,仍需要进一步研究克罗诺杆菌属3个亚种的蛋白指纹图谱特点,丰富蛋白指纹图谱数据库,使其能够准确鉴定克罗诺杆菌属的7个种和3个亚种。

关键词:克罗诺杆菌属;生化鉴定;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;全基因组测序

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)05-0503-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.05.006

Study on species identification of *Cronobacter* spp. in foods

ZHANG Hongzhi, LIU Xuewei, WEI Teng, LU Junyan, ZHANG Xi

(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: Objective To compare the species identification method of *Cronobacter* spp. in food, in order to establish rapid, high throughout identification method. **Methods** A total of 19 *Cronobacter* spp. in foods were identified with three

收稿日期:2020-06-01

基金项目:上海市第四轮公共卫生三年行动计划高端海外研修团队(GWTD2015S01)

作者简介:张红芝 女 副主任技师 研究方向为食源性病原菌检测与食品安全 E-mail: zhanghongzhi@scdc.sh.cn

通信作者:张曦 女 主任医师 研究方向为病原微生物 E-mail: zhangxi@scdc.sh.cn

method including biochemical method using VITEK 2.0 Compact, matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and whole-genome sequencing (WGS). The advantages and disadvantages of the three identification method were analyzed. **Results** The result indicated that the accuracy of VITEK identification for *C. sakazakii* and *C. malonaticus* was 67% and 66% respectively. However, WGS and MALDI-TOF MS obtained the same result for 19 *Cronobacter* spp.. Three subspecies could not be identified by MALDI-TOF MS due to the limited database.

Conclusion Biochemical method could not be used for species identification of *Cronobacter* spp. MALDI-TOF MS was rapid, high throughout and accurate, but still need to expand the fingerprint database for more *Cronobacter* spp. isolates.

Key words: *Cronobacter* spp.; biochemical method; matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; whole-genome sequencing

克罗诺杆菌属(*Cronobacter* spp.),原阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*),属于肠杆菌科,由7个种和3个亚种组成,7个种分别为阪崎克罗诺杆菌(*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. muytjensii*)、都柏林克罗诺杆菌(*C. dublinensis*)、康迪蒙提克罗诺杆菌(*C. condimenti*)、尤尼沃斯科罗诺杆菌(*C. universalis*),3个亚种包括都柏林克罗诺杆菌奶粉亚种(*C. dublinensis* subsp. *lactaridi*)、都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种(*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*)和都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种(*C. dublinensis* subsp. *lausannensis*)^[1-4]。流行病学和实验室研究结果显示克罗诺杆菌属的7个种均有致病性,对免疫力低下的人群特别是新生儿、早产儿和老人能引起严重的脑膜炎、坏死性小肠结肠炎和菌血症,死亡率高达40%~80%^[5-6]。但是不同种之间毒力表型差异较大,与新生儿感染有关的主要有阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌和苏黎世克罗诺杆菌^[7]。大量的研究表明,克罗诺杆菌属是一种广泛存在的微生物,存在于土壤、水、尘土等自然环境以及家庭环境、零售食品中,奶酪、猪肉、蔬菜、谷类、草药、香辛料和牛奶等食品均有被克罗诺杆菌污染的报道。

目前对克罗诺杆菌属进行种的鉴定在常规的监测中仍旧存在一定的困难,生化反应是常用的鉴定方法,但是其操作繁琐且存在一定假阳性^[3]。分子生物学技术已被广泛应用于微生物的鉴定,如16S rRNA分析^[8]、聚合酶链式反应(PCR)法^[9]、荧光定量PCR法^[10],可以弥补传统生化方法操作繁琐、稳定性低的缺陷,但是其也存在局限性,如16S rRNA无法将阪崎克罗诺杆菌和丙二酸盐克罗诺杆菌严格区分,不能一次性将克罗诺杆菌属的所有种区分,仍需要进一步优化,目前未能广泛应用^[11]。近年来基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术和全基因组测序技术广泛应用于细菌的鉴定工作,可以弥补传统生化方法操作繁琐、区分度差、稳定性差等缺陷。因此本研究对

生化鉴定(VITEK 2 Compact)法、MALDI-TOF MS和全基因组测序三种鉴定方法进行了比较分析,旨在建立针对克罗诺杆菌属稳定、可靠的种的鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

标准菌株(ATCC 51329)购自美国典型菌株保藏中心;质谱鉴定用参考菌株(ATCC 8739)购自法国梅里埃。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 2 Compact生化鉴定仪、MALDI-TOF MS仪均购自法国生物梅里埃,Illumina Hiseaxten PE150测序仪(美国Illumina)。

VITEK MS-CHCA基质液(法国梅里埃),阪崎肠杆菌显色平板、哥伦比亚血平板均购自上海申启,细菌全基因组提取试剂盒(日本Takara)。甲酸、乙腈均为色谱纯,无水乙醇。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离

根据2019年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册^[12],对上海市市售谷物冲调产品及婴儿配方奶粉进行克罗诺杆菌属的检测,检测方法依据GB 4789.40—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验》^[13]。

1.2.2 生化鉴定

用无菌棉签挑取细菌,在无菌0.9%氯化钠溶液中研磨混匀,制成的菌悬液浓度为0.5~0.63麦氏单位,采用GN鉴定卡,参考VITEK 2 Compact操作规程:将GN卡片按顺序放在卡架上,输样管浸入调好的菌悬液中,然后将卡架放入仪器的填充仓,填充完毕,扫描条码,开始检测。8h后观察结果。

1.2.3 MALDI-TOF MS鉴定^[10,14]

直接涂布法:用无菌接种环直接挑取单菌落,涂布于样品靶板上。每个靶板有48个点位,包括3个用于涂校准的标准菌株,每次最多可以放3个靶板,即一次性可以鉴定135份样品。涂布完成后,

靶板于室温条件下晾干,再覆盖 1.0 μL 基质溶液,晾干后进行质谱分析。30 min 后观察结果。

甲酸-乙腈处理法:挑取适量(约 5~10 mg)菌落样品于 1.5 mL 离心管中,加入 900 μL 无水乙醇,混匀;12 000 r/min 离心 2 min(离心半径为 6.7 cm),弃去上清液;加入 40 μL 70% 甲酸,混匀,再加入 40 μL 乙腈,混匀,12 000 r/min 离心 2 min(离心半径为 6.7 cm),吸取 1 μL 上清液点在靶板上,自然晾干后再点 1 μL CHCA 基质覆盖,晾干后进行质谱分析。30 min 后观察结果。

MALDI-TOF MS 数据采集:采集 m/z 在 2~10 kD 之间数据,结果用 Biotype 软件进行分析,获得鉴定可信度,60%~99.9% 仅 1 个鉴定结果选项视作好的鉴定。如果可信度 >60%,但是有 2~4 个鉴定选项,需要重复试验或者补充试验进行重新鉴定。若可信度 <60%,无鉴定选项,或者低分辨,即有 4 个以上的鉴定选项,则判定为不能鉴定,即与数据库中的任何质谱不能匹配。

1.2.4 全基因组测序鉴定细菌

取适量新鲜菌液,用细菌全基因组提取试剂盒提取细菌全基因组 DNA。全基因组测序由生工生物工程公司完成,采用 Illumina Hiseaxten PE150 测序仪进行全基因组分析。测序策略:先将样品 DNA 随机打断,构建 DNA 文库,再分别进行平行测序。数据处理:测序获得原始数据,进行质控,将合格的数据 Clean data 导入 BioNumerics 7.0 软件进行序列拼接。最后将完成拼接的基因组序列,上传到网站 https://pubmlst.org/bigsgdb?db=pubmlst_rmlst_seqdef_kiosk,进行菌种鉴定。

2 结果

2.1 检测结果

如表 1 所示,共检测到 19 株克罗诺杆菌属菌株,其中 1 株分离自婴儿配方奶粉,其他均分离自谷物及其制品。阪崎肠杆菌显色平板上的菌落均显示蓝绿色,在胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)平板上为黄色菌落,氧化酶试验阴性。

表 1 19 株克罗诺杆菌属鉴定结果
Table 1 Identification of 19 *Cronobacter* spp.

菌株编码	样品来源	生化鉴定	MALDI-TOF MS		全基因组测序
			直接点样	甲酸-乙腈二次处理	
cg1	黑芝麻糊	阪崎克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌/丙二酸盐克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌
cg3	黑芝麻糊	都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种	丙二酸盐克罗诺杆菌	—	丙二酸盐克罗诺杆菌
cg4	营养麦片	阪崎克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌	—	阪崎克罗诺杆菌
cg8	营养面条	阪崎克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌/丙二酸盐克罗诺杆菌/都柏林克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌
cg9	燕麦片	都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种	丙二酸盐克罗诺杆菌	—	丙二酸盐克罗诺杆菌
cg10	黑芝麻糊	丙二酸盐克罗诺杆菌	丙二酸盐克罗诺杆菌	—	丙二酸盐克罗诺杆菌
cg11	黑豆粉	丙二酸盐克罗诺杆菌	丙二酸盐克罗诺杆菌	—	丙二酸盐克罗诺杆菌
cg12	黑芝麻糊	都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种	阪崎克罗诺杆菌	—	阪崎克罗诺杆菌
cg13	燕麦片	丙二酸盐克罗诺杆菌	丙二酸盐克罗诺杆菌	—	丙二酸盐克罗诺杆菌
cg14	黑芝麻糊	丙二酸盐克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌	—	阪崎克罗诺杆菌
cg15	婴儿配方奶粉	阪崎克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌	—	阪崎克罗诺杆菌
cg16	黑芝麻糊	阪崎克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌	—	阪崎克罗诺杆菌
cg17	黑芝麻糊营养米糊	莫金斯科罗诺杆菌	莫金斯科罗诺杆菌	—	莫金斯科罗诺杆菌
cg18	藕粉	阪崎克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌	—	阪崎克罗诺杆菌
cg19	黑芝麻糊	阪崎克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌/丙二酸盐克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌
cg20	营养麦片	都柏林克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌	—	阪崎克罗诺杆菌
cg21	营养面条	都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种	都柏林克罗诺杆菌	—	都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种
cg22	婴儿碎细面	都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种	阪崎克罗诺杆菌	—	阪崎克罗诺杆菌
cg23	婴儿胡萝卜粒面	阪崎克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌/丙二酸盐克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌	阪崎克罗诺杆菌

注:—为未进行甲酸-乙腈二次处理

2.2 菌株的生化鉴定结果

如表 1 所示,本研究中 19 株克罗诺杆菌属菌株最终鉴定结果为:8 株阪崎克罗诺杆菌、1 株都柏林克罗诺杆菌、5 株都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种、4 株丙二酸盐克罗诺杆菌和 1 株莫金斯科罗诺杆菌。

2.3 MALDI-TOF MS 鉴定结果

图 1 所示,4 张蛋白指纹图谱分别代表阪崎克

罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌、莫金斯科罗诺杆菌和都柏林克罗诺杆菌的蛋白指纹图谱,可信度均为 99.9%。这 4 张蛋白指纹图谱既有共性又有差异,不同菌株的蛋白指纹图谱有相同的质荷比(m/z)及相应的离子峰,如 m/z 9 000~10 000 处均有相似离子峰, m/z 分别为 9 477、9 476、9 477 和 9 478;在 m/z 5 000 处有相似的离子峰, m/z 分别为

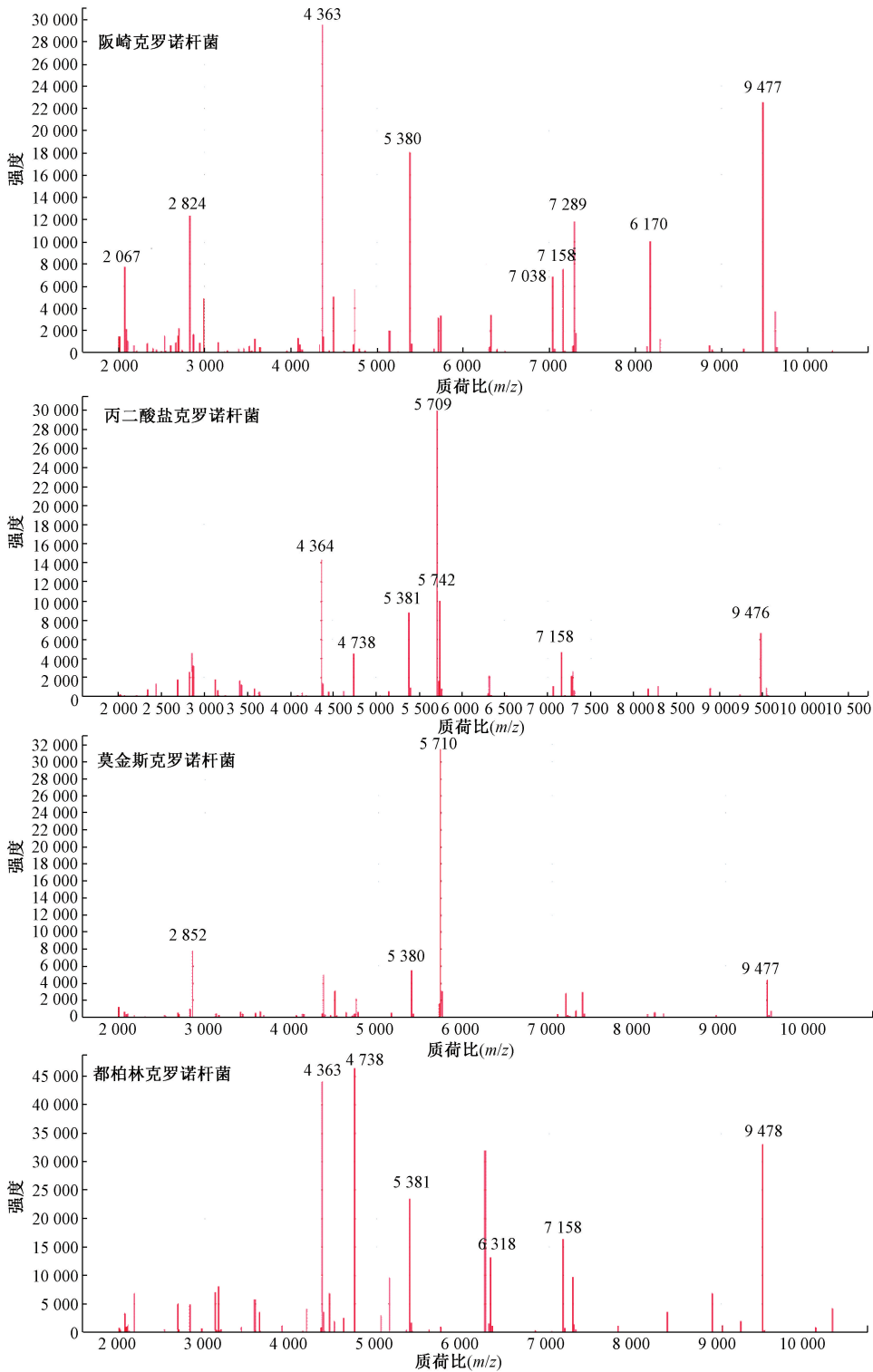


图1 MALDI-TOF MS 鉴定克罗诺杆菌属蛋白指纹图谱

Figure 1 Protein mass spectrometric profiles of *Cronobacter* spp. by MALDI-TOF MS

5 380、5 381、5 380 和 5 381。除了相同的蛋白指纹,每张图均有其特异的蛋白指纹,如图 A 在 m/z 8 000 处有离子峰 6 170,图 B 在 m/z 5 700 处有离子峰 5 742,图 C 在 m/z 3 000 处有离子峰 2 852,图 D 在 m/z 6 000 处有离子峰 6 318,最终这些相同的和不同的蛋白指纹组成了种特异性指纹图谱,是判定克罗诺杆菌属不同种的依据。本研究

中 19 株克罗诺杆菌属的菌株最终鉴定结果为: 8 株阪崎克罗诺杆菌、5 株丙二酸盐克罗诺杆菌、1 株莫金斯克罗诺杆菌、1 株都柏林克罗诺杆菌、不能确定者有 4 株。对 4 株未能鉴定的菌株,利用甲酸-乙腈二次处理,对新鲜的菌体重新处理,上机鉴定,最终全部鉴定成功,均为阪崎克罗诺杆菌(可信度 99.9%)。

2.4 全基因组测序鉴定结果

本研究获得的 19 株克罗诺杆菌属全基因组测序的原始数据经过分析,满足以下条件:平均测序读长为 200~300 bp,原始数据量 ≥ 1.5 G,且 Q20 高质量数据量平均 1.2 G(有效数据 ≥ 1 G);基因组整体覆盖深度 ≥ 100 X;碱基数据质量值 Q20 $\geq 95\%$, Q30 $\geq 85\%$,读长数量 < 100 个,重叠群数量 < 200 个,单碱基错误率低于十万分之一。

通过比对分析,鉴定结果为:12 株阪崎克罗诺杆菌、5 株丙二酸盐克罗诺杆菌、1 株莫金斯科罗诺杆菌、1 株都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种,这些菌株的鉴定可信度均为 100%。

2.5 三种方法鉴定克罗诺杆菌属结果比较

表 1 为三种方法的鉴定结果,全基因组测序和 MALDI-TOF MS 的鉴定结果一致,12 株阪崎克罗诺杆菌、5 株丙二酸盐克罗诺杆菌、1 株莫金斯科罗诺杆菌和 1 株都柏林克罗诺杆菌。而生化鉴定结果与

上面两种方法的鉴定结果差异较大,其中 8 株阪崎克罗诺杆菌的鉴定结果与全基因组测序和 MALDI-TOF MS 的鉴定结果一致,但其他 4 株阪崎克罗诺杆菌经生化鉴定为 2 株都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种、1 株丙二酸盐克罗诺杆菌和 1 株都柏林克罗诺杆菌,结果显示生化鉴定阪崎克罗诺杆菌的准确率较低,只有 67%。全基因组测序鉴定结果显示有 5 株丙二酸盐克罗诺杆菌,与 MALDI-TOF MS 的鉴定结果一致,而生化鉴定结果显示只有 3 株丙二酸盐克罗诺杆菌的鉴定结果与上面两种方法一致,其余 2 株丙二酸盐克罗诺杆菌均被鉴定为都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种,准确率为 60%。三种方法对 1 株都柏林克罗诺杆菌和 1 株莫金斯科罗诺杆菌的鉴定结果是一致的,但是全基因组测序和生化鉴定均将都柏林克罗诺杆菌鉴定到亚种水平,即为都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种。三种方法优缺点比较结果见表 2。

表 2 三种方法鉴定克罗诺杆菌属菌种优缺点比较

Table 2 Advantages and disadvantages of species identification for *Cronobacter* spp. using three methods

鉴定方法	优点	缺点
VITEK 生化鉴定方法	应用较早,方法成熟	操作繁琐,耗时长,准确率低
MALDI-TOF MS 鉴定方法	快速、高通量,可实现克罗诺杆菌属菌种的鉴定	数据库需进一步完善,不能鉴定到亚种
全基因组测序鉴定方法	可准确鉴定克罗诺杆菌属菌种、亚种	操作繁琐、耗时长,对人员、设备要求高

3 讨论

本研究从婴儿配方奶粉、谷物及其制品中分离到 19 株克罗诺杆菌属, MALDI-TOF MS 和全基因组测序鉴定结果一致,其中 12 株阪崎克罗诺杆菌、5 株丙二酸盐克罗诺杆菌、1 株莫金斯科罗诺杆菌和 1 株都柏林克罗诺杆菌。研究^[7,15]报道克罗诺杆菌属的 7 个种的毒性之间有差异,并不是所有的种都与感染有关,只有阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌和苏黎世克罗诺杆菌与新生儿感染相关。本研究从上海市市售谷物冲调产品及婴儿配方奶粉中分离到两种与新生儿感染相关的种,分别是阪崎克罗诺杆菌和丙二酸盐克罗诺杆菌,尤其是在婴儿配方奶粉中分离到阪崎克罗诺杆菌,提示其引起婴儿感染的潜在风险,因此,对克罗诺杆菌属鉴定到种的水平,可以了解食品中该属种的分布情况,从而确定其毒性、致病性,掌握该菌的污染规律,为控制由其引起的食源性疾病提供基础数据,提升食品安全水平。

为了建立适用于克罗诺杆菌属菌种的鉴定方法,将其应用于监测工作中,本研究阐述了两种常用鉴定方法(VITEK 和 MALDI-TOF MS)对克罗诺杆菌属种的鉴定结果,以及全基因组测序技术的鉴

定结果,并深入比较分析其优缺点。研究结果显示生化鉴定法对克罗诺杆菌属进行种的鉴定结果可靠性很低,对阪崎克罗诺杆菌和丙二酸盐克罗诺杆菌的鉴定准确率只有 67%和 66%,虽然准确鉴定都柏林克罗诺杆菌和莫金斯科罗诺杆菌,但是由于这两种菌数量太少,分别只有 1 株,不能确定生化鉴定法对其鉴定的准确性。总之,不建议采用生化鉴定法鉴定克罗诺杆菌属菌种。

本研究显示 MALDI-TOF MS 能在 30 min 内完成 135 份样品的鉴定,具有快速、高通量的优势,此技术目前已经广泛应用于细菌的鉴定中。研究报告基质、培养条件、菌体处理被认为是影响 MALDI-TOF MS 分析微生物的 3 个主要因素,但是赵贵明等^[16]的研究显示克罗诺杆菌对生长条件的要求较为宽泛,因此本研究选择哥伦比亚血平板作为克罗诺杆菌的培养平板。菌体处理对鉴定结果影响较大,本研究中 4 株菌通过直接涂布法无法鉴定,利用甲酸-乙腈二次处理之后得到鉴定结果,可信度均为 99.9%。这可能是由于直接涂布法易受菌体其他代谢物的干扰,甲酸-乙腈提取法可以将细菌内部和表面蛋白质提取出来,能够包含更多的蛋白标志物。本研究显示 MALDI-TOF MS 能够准确鉴定 4 种克罗诺杆菌,分别为阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺

杆菌、都柏林克罗诺杆菌和莫金斯科罗诺杆菌。STEPHEN 等^[14]利用这种方法鉴定出 7 种克罗诺杆菌。但本研究结果显示 MALDI-TOF MS 对都柏林克罗诺杆菌的鉴定不能达到亚种水平,这是由于微生物蛋白指纹图谱数据库不够完善,亚种的图谱尚未被数据库收录,从而导致鉴定困难。因此进一步分析亚种的蛋白指纹图谱,完善克罗诺杆菌 MALDI-TOF MS 数据库,可以实现对克罗诺杆菌属进行快速、准确、高通量种的鉴定。

全基因组测序鉴定细菌是基于细菌染色体中的 52 个核糖体(*rpsA-U*, *rplA-U*, *rpmA-U*)进行比对,对细菌菌种的鉴定准确可靠,因此全基因组测序的鉴定结果能够进一步确证 MALDI-TOF MS 鉴定的准确性。虽然全基因组测序在细菌鉴定方面具有其他方法不能比的优势,但是由于全基因组测序繁琐,应用于常规监测有一定局限性。而 MALDI-TOF MS 可以实现快速、高通量鉴定,能更好的应用于监测工作中。但由于本研究菌株数量有限,克罗诺杆菌属菌种有限,有待积累更多的菌株对 MALDI-TOF MS 的鉴定方法进行验证,并进一步完善数据,建立快速、便捷、高通量的 MALDI-TOF MS 鉴定方法。

参考文献

- [1] FARMER J J. My 40-year history with *Cronobacter/Enterobacter sakazakii*-lessons learned, myths debunked, and recommendations [J]. *Front Pediatr*, 2015, 3:84.
- [2] IVERSEN C, LESNER A, MULLANE N, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii* proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and decisions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dudlinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1 [J]. *BMC Evol Bio*, 2007, 7: 64.
- [3] IVERSEN C, MULLANE N, MCCARDELL B, et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dudlinensis* sp., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dudlinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dudlinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dudlinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov [J]. *Int J Syst Evol Micr*, 2008, 58(6):1442-1447.
- [4] JOSEPH S, CETINKYA E, DRAHOVSKA H, et al. *Cronobacter* condiment sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universais* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients [J]. *Int J Syst Evol Micr*, 2012, 62(6):1277-1283.
- [5] JARADAT Z W, MOUSA A W, ELBETIEHA A, et al. *Cronobacter* spp. -opportunistic foodborne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits [J]. *J Med Microbiol*, 2014, 63(8):1023-1037.
- [6] HPLY O, FORSYTHE S J. *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection [J]. *J Hosp Infect*, 2014, 86(3):169-177.
- [7] HUANG Y, PANG Y H, WANG H, et al. Occurrence and characterization of *Cronobacter* spp. in dehydrated rice powder from Chinese supermarket [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):e0131053.
- [8] 杜小莉,李伟,阚帆.我国部分地区克罗诺杆菌分离株分种及其方法的比较研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2016, 37(2):259-262.
- [9] HUANG C H, CHANG M T, HUANG L N. Use of novel species-specific PCR primers targeted to DNA grease subunit B (*gyrB*) gene for species identification of the *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter dudlinensis* [J] *Mol Cell Probes*, 2013, 27(1):15-18.
- [10] CAI X Q, YU H Q, RUAN Z X, et al. Rapid detection and simultaneous genotyping of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula using real-time PCR and high resolution melting (HRM) analysis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e67082.
- [11] 李小芳,崔晶花. 克罗诺杆菌分种方法研究进展[J]. *疾病监测*, 2018, 33(5):413-416.
- [12] 国家食品安全风险评估中心. 国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册[Z]. 2019.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验:GB 4789.40—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [14] STEPHEN R, ZIEGLERR D, PFLUGER V, et al. Rapid genus-and species-specific identification of *Cronobacter* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(8):2846-2851.
- [15] 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(30):e9556.
- [16] 赵贵明,刘洋,陈颖,等. 克罗诺杆菌 MALDI-TOF-MS 数据库的建立及应用[J]. *食品科学*, 2014, 35(8):105-110.