

## 中国安徽阜阳劣质婴儿配方粉中阪崎肠杆菌的污染

刘秀梅 裴晓燕 郭云昌

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100050)

**摘要:** 2004年中国安徽阜阳劣质婴儿配方粉事件引起了我国政府的高度重视。为了调查婴儿配方粉中阪崎肠杆菌的污染状况,根据美国FDA和加拿大实验室的方法,建立了婴儿配方粉中阪崎肠杆菌的分离鉴定技术。从87份阜阳劣质奶粉样品中检测到11份阪崎肠杆菌阳性样品,污染阳性率为12.6%。用API 20E和Qualicon BAX<sup>R</sup>系统鉴定了11株阪崎肠杆菌。这是国内首次从婴儿配方粉中分离到阪崎肠杆菌菌株。

**关键词:** 肠杆菌,阪崎;婴儿食品;奶粉;婴儿配方;食品污染

### Isolation of *Enterobacter sakazakii* from infant formula powder samples collected from Fuyang, Anhui Province, China

LIU Xiu-mei, PEI Xiao-yan, GUO Yun-chang

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

**Abstract:** To establish a sensitive and specific method for the examination and identification of *Enterobacter sakazakii* and to survey the microbiological contaminants of *E. sakazakii* in the Infant Formula Powder in Fuyang, Anhui Province, P. R. China. The isolation methods were established according to US-FDA and Canada laboratory recommendations. The isolates were identified by API 20E and Qualicon BAX<sup>R</sup> system. Eleven strains of *E. sakazakii* were isolated and identified from 11 out of 87 samples of the infant formula powder in Fuyang. The positive ratio is 12.6%. This is the first report about the isolation of *E. sakazakii* from the infant formula powder samples in China.

**Key word:** *Enterobacter sakazakii*; Infant Food; Milk Infant formula; Food Contamination

阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 是人和动物肠道内寄生的一种革兰阴性无芽孢杆菌,属肠杆菌科的一种<sup>[1]</sup>。该菌在一定条件下可引起人和动物致病,因而被称为条件致病菌。1961年,英国首次报道2例由阪崎肠杆菌引起的脑膜炎病例,以后相继在美国、希腊、荷兰、冰岛、加拿大、比利时等国家报道了新生儿阪崎肠杆菌感染事件。据不完全资料报道,阪崎肠杆菌能引起严重的新生儿脑膜炎、小肠结肠炎和菌血症,并且可能引起神经系统后遗症和死亡,死亡率高达50%以上。2001年4月美国田纳西州发生阪崎肠杆菌感染事件后,医务人员与疾病控制中心协同对感染源进行了调查,结果从10例婴儿体内分离到的阪崎肠杆菌,与从婴儿所食用的已开罐和未开罐的婴儿配方奶粉中分离到的指纹图谱一致。由此导致国际间第一次因阪崎肠杆菌污染而致商业婴儿配方粉的广泛召回。目前,虽然还不能确

定阪崎肠杆菌的宿主和传播途径,但多起新生儿阪崎肠杆菌感染事件基本证实了婴儿配方奶粉是主要感染源<sup>[2,3]</sup>。

2004年4月,我国安徽省阜阳地区连续发生了与“劣质奶粉”有关的婴儿营养状况不良甚至导致死亡事件的报道,引起了国务院及相关部门的极大关注。在国务院派出联合调查组进行现场调查,以及对婴儿配方粉营养质量监测的基础上,我们特别关注了婴儿配方奶粉中的微生物安全性问题。对从阜阳市场采集的87份婴儿配方奶粉进行了阪崎肠杆菌的分离鉴定。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 样品

2004年4月,从阜阳市场及喂养婴儿家庭采集婴儿配方粉87份。依据产品包装标识的信息,为来自于全国11个省、60个食品企业的62个品牌的产

作者简介:刘秀梅 女 研究员 首席科学家

品。

### 1.1.2 培养基及试剂

肠道杆菌增菌肉汤 (*Enterobacteriaceae* enrichment broth, EE broth)、结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (Violet red bile glucose agar, VRBG)、胰蛋白酶大豆琼脂 (Trypticase Soy Agar, TSA)、脑心浸液肉汤 (breast heart infusion broth, BHI broth) 购自北京路桥公司。

APE 20E 生化鉴定板 (API 20E)、氧化酶试剂 购自法国生物梅里埃公司。

DuPont Qualicon 试剂盒 # 17720657, 购自美国杜邦公司。

### 1.1.3 标准菌株

ATCC 51329 *Enterobacter sakazakii* ;

ATCC 25922 *E. coli*。

### 1.1.4 仪器

Qualicon BAX<sup>R</sup> 系统, 美国杜邦公司。

## 1.2 方法

参照美国 FDA 和加拿大卫生部健康产品和食品部的推荐方法<sup>[4-7]</sup>, 进行样品处理和阪崎肠杆菌的分离。生化鉴定按 APE 20E 试剂条产品说明书进行, PCR 检测按 Dupont Qualicon BAX(r) 检测程序进行。

按无菌操作程序进行取样前的样品袋表面处理。每份样品取 40 g, 放入已预热到 45 ℃ 装有 360 ml 无菌水的三角烧瓶中, 轻轻摇动使其充分溶解, 36 ℃ 孵育过夜。移取上述混合液 10 ml 转种到 90 ml 无菌肠道杆菌增菌肉汤中, 36 ℃ 孵育过夜。充分混合增菌培养液, 分别在结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂平板上进行直接涂布或划线分离, 36 ℃ 培养过夜。过夜培养后, 观察平板上的菌落特征, 挑取紫色及粉色疑似菌落分别划线接种到胰蛋白酶大豆琼脂

平板, 25 ℃ 培养 48 ~ 72 h。挑取 TSA 琼脂平板上所有菌落, 根据 APE 20E 试验指南进行生化鉴定, 同时做氧化酶试验。

PCR 检测 将 API 20E 确证后的阳性分离菌株, 按 Dupont Qualicon BAX<sup>R</sup> 系统的操作程序, 进行阪崎肠杆菌的 PCR 扩增, 与 API 20E 的结果进行符合对比。

## 2 结果

### 2.1 阪崎肠杆菌的生化特征

在安徽阜阳采集的 87 份婴儿配方粉样品中, 从 11 份样品中分离出 11 株阪崎肠杆菌, 分别编号为 ESIF 001 ~ ESIF 011。婴儿配方粉样品中阪崎肠杆菌的污染阳性率为 12.6%。11 株阪崎肠杆菌分离株的主要生化鉴定结果分为 3 类 (见表 1、表 2), 分别为 3305 373 (Good identification), 3305 173 (Excellent identification) 和 3305 363 (Very good identification)。经杜邦 BAX<sup>R</sup> 系统的进一步鉴定, 所有阳性分离株均符合阪崎肠杆菌阳性菌株特征。

表 1 阪崎肠杆菌分离株的生化反应编码及评价

| 菌株编号       | API 20E 反应编码 | API 20E 结果评价             |
|------------|--------------|--------------------------|
| ESIF 001   | 3305 373     | Good identification      |
| ESIF 002   | 3305 173     | Excellent identification |
| ESIF 003   | 3305 363     | Very good identification |
| ESIF 004   | 3305 173     | Excellent identification |
| ESIF 005   | 3305 173     | Excellent identification |
| ESIF 006   | 3305 373     | Good identification      |
| ESIF 007   | 3305 373     | Good identification      |
| ESIF 008   | 3305 373     | Good identification      |
| ESIF 009   | 3305 373     | Good identification      |
| ESIF 010   | 3305 373     | Good identification      |
| ESIF 011   | 3305 373     | Good identification      |
| ATCC 51329 | 3345 373     | Excellent identification |

表 2 PCR 检测结果

| 菌株号 | ATCC  | 阜阳样品分离株 (ESIF) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | ATCC  |
|-----|-------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
|     | 51329 | 001            | 002 | 003 | 004 | 005 | 006 | 007 | 008 | 009 | 010 | 011 | 25922 |
| 结果  | +     | +              | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -     |

### 2.2 阪崎肠杆菌的菌落形态

阪崎肠杆菌菌株在 TSA 平板上为淡黄色菌落。在 VRBG 平板划线分离培养 24 h 后, 多数分离菌株呈流蜡样, 并散发出特殊气味; 有的为表面干燥、顶部发白的紫色菌落。ESIF 008 株在结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂平板上呈现特殊的菌落形态: 菌落干燥、边缘有褶皱, 极富弹性。传代后, 菌落皱褶减少。延长培养时间, 可见皱褶逐渐增加。菌株的生化特征和菌落形态之间没有相关性。

### 2.3 PCR 检测结果

在 Dupont Qualicon BAX<sup>R</sup> 系统计算机工作站观察结果。阳性标准菌株和 11 株阜阳分离株均出现阪崎肠杆菌的特征性阳性曲线, 在 87 出现特异峰, 峰值范围为 85.5 ~ 88 。而阴性菌株的曲线, 除较大的对照峰之外, 无其它可见峰。符合 Dupont Qualicon BAX<sup>R</sup> 阪崎肠杆菌的阳性特征 (见表 3)。

结果表明, 本研究获得的 11 株分离菌, 其 API 20E 的生化鉴定结果与 Dupont Qualicon BAX(r) 的 PCR 鉴定结果完全吻合, 可全部确认为阪崎肠杆菌。

表3 阪崎肠杆菌的 API 20E 生化反应特征

| 编码      | 1        | 2   | 3   | 4   | 5    | 6     | 7   | 8   | 9   | 10   | 11      | 12  | 13  | 14  | 15  | 16  | 17  | 18  | 19   | 20   | 21    |
|---------|----------|-----|-----|-----|------|-------|-----|-----|-----|------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-------|
| 试验      | ONPG     | ADH | LDC | ODC | CIT  | H2S   | URE | TDA | IND | VP   | GEL     | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY  | ARA  | OX    |
| 底物      | 邻硝基苯半乳糖苷 | 精氨酸 | 赖氨酸 | 鸟氨酸 | 柠檬酸钠 | 硫代硫酸钠 | 脲素  | 色氨酸 | 色氨酸 | 丙酮酸盐 | Kohn 明胶 | 葡萄糖 | 甘露醇 | 肌醇  | 山梨醇 | 鼠李糖 | 蔗糖  | 密二糖 | 苦杏仁苷 | 阿拉伯糖 | 氧化酶试验 |
| 3305173 | +        | +   | -   | +   | +    | -     | -   | -   | -   | +    | -       | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +   | +    | +    | -     |
| 3305363 | +        | +   | -   | +   | +    | -     | -   | -   | -   | +    | -       | +   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +    | +    | -     |
| 3305373 | +        | +   | -   | +   | +    | -     | -   | -   | -   | +    | -       | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +    | +    | -     |
| 3345373 | +        | +   | -   | +   | +    | -     | -   | -   | +   | +    | -       | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +    | +    | -     |

### 3 讨论

阪崎肠杆菌是一种革兰阴性杆菌,作为肠杆菌科的一种,一直被称为黄色阴沟肠杆菌,直到1980年才根据该菌与阴沟肠杆菌 DNA-DNA 杂交、色素产生、生化反应、抗生素敏感性的不同更名为阪崎肠杆菌。阪崎肠杆菌可引起各年龄段人群的患病,但从已报道病例的年龄分布来看,婴儿(1岁以下的儿童)是该菌感染的高危人群,特别是新生儿、早产儿、出生体重偏低、免疫力低下等身体状况较差的婴儿。

由阪崎肠杆菌污染婴儿配方粉而引起的婴儿感染已引起全世界的关注。1988年,Muytjens等检测了从35个国家收集的141种婴儿配方粉,其中从13个国家的20种抽检样品中分离到阪崎肠杆菌(14.2%)<sup>[8]</sup>。1997年N-White和Farber从加拿大零售市场上采集的来自5个公司的120份样品中分离到8罐阳性样品(6.7%)<sup>[9-10]</sup>。2004年10月Jeffrey M. Farber博士在第一届ICMSF-中国国际食品安全会议上指出,不同地区阪崎肠杆菌的检出率存在明显的不同(0.12%~14.2%)。

本研究参照美国FDA和加拿大卫生部健康产品和食品部推荐的方法,建立了食品中阪崎肠杆菌的分离鉴定方法,并首次从中国劣质婴儿配方粉中分离到11株阪崎肠杆菌,其污染阳性率(12.6%)与以往国际相关报道水平一致<sup>[8]</sup>。提示我们,我国婴儿食品中病原微生物污染的严重性。虽然本次采集的婴儿配方粉尚不能代表中国大中城市食品市场中阪崎肠杆菌的污染情况,但鉴于劣质婴儿配方粉在农村市场的流通量大,加上婴儿配方粉的大量进口,由阪崎肠杆菌引起的潜在危险性是不容忽视的。

尽快制订更加完善的婴儿配方粉微生物卫生标准和检验方法,加强对婴儿配方粉生产、流通的监管,是控制婴儿配方粉中致病菌污染的有效措施。同时,在全国范围内,特别是广大农村、山区及西部

不发达地区开展预防宣教,是保护高危婴儿人群健康的必要和重要途径。

### 参考文献:

- [1] Farmer J J, M A Asbury, F W Hickman, et al. *Enterobacter sakazakii*: a new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1980, 30:569-584.
- [2] Joint FAO/WHO Workshop on *Enterobacter sakazakii* and Other Microorganisms in Powdered Infant Formula, Geneva [DB/OL]. <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/en/report.pdf>, 2004-02-02-05.
- [3] 刘秀梅. 婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌-食品安全控制的新目标[J]. *中国食品卫生杂志*, 2004, 16(5):385-388.
- [4] U S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula [Z]. 2002.
- [5] Microbial Detection of *Enterobacter sakazakii*: Food and Clinical [DB/OL]. [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3939b1\\_tab4a.doc](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3939b1_tab4a.doc).
- [6] Kandhai M C, M W Reij, K van Puyvelde, et al.. A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples[J]. *J Food Prot*, 2004, 67:1267-1270.
- [7] Government of Canada Laboratory Procedure. MFLP-27. September 2003. The dupont oualicon BAX<sup>R</sup> system method for the detection of *Enterobacter Sakazakii* in selected foods [Z]. Health products and food branch OTTA WA.
- [8] Muytjens HL, H Roelofs-Willemsse, G H J aspar. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*[J]. *J Clin Microbiol*, 1988, 26:743-746.
- [9] Nazarowec-White M, J M Farber. *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int J J. Food Microbiol*, 1997, 34:103-113.
- [10] Nazarowec-White M, J M Farber. Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula [J]. *J. Food Prot*, 1997, 60: 226-230.

[收稿日期:2004-11-24]

中图分类号:R15;Q378.2 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)01-0010-03