

克罗诺杆菌主要毒力因子及致病机理研究进展

Progress on main virulence factors and pathogenic mechanism of *Cronobacter* spp.

费 鹏¹ 杨同香¹ 陈 曦¹ 向进乐¹ 赵胜娟¹

FEI Peng¹ YANG Tong-xiang¹ CHEN Xi¹ XIANG Jin-le¹ ZHAO Sheng-juan¹

徐云凤¹ 周莲昕¹ 郭 鸽² 康怀彬¹

XU Yun-feng¹ ZHOU Lian-xin¹ GUO Ling² KANG Huai-bin¹

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023;

2. 东北农业大学食品学院乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

(1. College of Food and Biological Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2. Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education Food Science College, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

摘要:综述了克罗诺杆菌肠毒素、外膜蛋白、基因 *Inv*、关键酶 RpfF 等主要的毒力因子在克罗诺杆菌致病过程中的作用, 并从菌毛的黏附作用、克罗诺杆菌对铁的吸收作用、对唾液酸的利用能力、生物膜对克罗诺杆菌的保护作用和黏附能力的影响、外排系统对克罗诺杆菌在宿主胃肠道中存活能力的影响、耐干燥能力等几个方面总结了该病原菌的致病机理。

关键词: 克罗诺杆菌; 致病机理; 毒力因子; 研究进展

Abstract: In this study, the role of major virulence factors in the pathogenic process of *Cronobacter*, including enterotoxin, outer membrane protein, gene *Inv*, and key enzyme RpfF were reviewed. Furthermore, the pathogenic mechanism was summarized from the following aspects, i. e. the adhesion of bacterial hair, the absorption ability of iron by *Cronobacter*, the utilization of sialic acid, the effects of biofilm on the protection, and the adhesion of *Cronobacter*, the effect of efflux system on the viability of *Cronobacter* in host gastrointestinal tract and desiccation resistance.

Keywords: *Cronobacter*; pathogenic mechanism; virulence factors; research progress

克罗诺杆菌属 (*Cronobacter* spp.) 原名阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 属, 是食物中重要的条件致病菌之一^[1]。早期, 阪崎肠杆菌一直被定义为黄色阴沟杆菌 (*Yellow-pigmented Enterobacter cloacae*), 但之后的研究发现在系统发育关系上, 黄色阴沟杆菌与阴沟杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 之间存在一定的距离, 且两种病原菌在生理生化特性和抗生素耐受性上也存在显著差异, 因此 Farmer 等^[2]将黄色阴沟杆菌重新命名为阪崎肠杆菌。Iversen 等^[3]利用分子生物学分析手段对阪崎肠杆菌群体进行了多样性分析及 DNA 杂交分析, 结果发现试验所用的阪崎肠杆菌的相似度只有 50% 以上, 相似度小于分类标准中对“种”的定义, 因此阪崎肠杆菌被定义为一个新的属, 并命名为克罗诺杆菌属^[4], 并被分为了 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*)、穆汀斯克罗诺杆菌 (*C. muytjensii*)、都柏林克罗诺杆菌 (*C. dublinensis*)、尤尼沃斯克罗诺杆菌 (*C. universalis*)、康帝蒙提克克罗诺杆菌 (*C. condimentii*)^[5]。

大量研究表明克罗诺杆菌能够污染多种食物, 包括水^[6]、肉制品^[7]、蔬菜^[8]、水果^[6]、调味品^[9]、食用菌^[10]和婴儿食品^[11-13]等, 严重威胁着人们的健康。在 2010~2011 年各地的疾病预防控制中心的调查报告^[14]中, 江苏宿迁对近 900 份食品样品进行了克罗诺杆菌的分离鉴

基金项目: 河南科技大学博士科研启动基金项目 (编号: 13480066); 河南省科技攻关项目 (编号: 172102110019); 河南省重点攻关项目 (编号: 161100110900); 国家自然科学基金 (编号: 31702218)

作者简介: 费鹏, 女, 河南科技大学讲师, 博士。

通信作者: 郭鸽 (1975—), 女, 东北农业大学副教授, 博士。

E-mail: guoling@neau.edu.cn

康怀彬 (1963—), 男, 河南科技大学教授, 硕士。

E-mail: khbin001@163.com

收稿日期: 2019-04-14

定,阳性率为 2.6%;在广西梧州的食物调查中,克罗诺杆菌的检出率为 5.26%,而在湖南长沙食品样本中克罗诺杆菌的检出率则高达 6.3%。克罗诺杆菌可通过污染婴儿配方乳粉(PIF)侵入新生儿的体内,进而产生肠毒素和溶血素,并利用唾液酸通过宿主的血脑屏障,从而造成新生儿的感染^[15]。由于克罗诺杆菌严重的危害性,对该致病菌毒力因子和致病机理的探索一直是研究的热点,随着研究的深入,研究者们从多个角度对克罗诺杆菌的致病机理进行探索。

克罗诺杆菌的致病性为多种因素协同作用的结果,因此其致病机理的揭示是一个复杂的过程。文章结合近年来的相关报道,总结了克罗诺杆菌致病相关的主要毒力因子,并从菌毛的黏附作用、克罗诺杆菌对铁的吸收作用、对唾液酸的利用能力、生物膜的形成、外排系统、耐干燥能力等方面系统地阐述该病原体的致病机理。

1 克罗诺杆菌主要的毒力因子

1.1 肠毒素

食源性致病微生物普遍具有分泌肠毒素的能力,因此早期的研究致力于克罗诺杆菌肠毒素的相关研究,Pagotto 等^[16]在克罗诺杆菌发现了一种类似于肠毒素的物质,能与脂多糖协同作用从而引起宿主产生炎症反应,同时通过腹腔注射和灌胃处理试验发现小鼠死亡时间不等,说明不同克罗诺杆菌之间的毒力存在差异。随后,Raghav 等^[17]发现该肠毒素类似物是分子量为 66 kDa 的蛋白,经巴氏杀菌处理后仍具有活性,说明乳品加工过程中的简单热处理并不能减少该致病菌的污染。综上,克罗诺杆菌肠毒素的研究在一定程度上揭示该物质的特征,但由于该毒素的基因尚未被确定,因此在食品加工过程中很难针对性地通过抑制编码毒素基因的表达来减少该致病微生物的污染。

1.2 外膜蛋白

外膜蛋白(outer membrane protein, Omp)是革兰氏阴性菌特有的毒力因子,其在克罗诺杆菌感染宿主肠道上皮细胞和通过血脑屏障过程中发挥着重要作用。研

究^[18-19]发现阪崎肠杆菌和大肠杆菌 K1 的 OmpA 在蛋白质水平上达到了 88% 的相似度,故推测阪崎克罗诺杆菌与大肠杆菌 K1 的 OmpA 一样,在入侵人类肠道上皮细胞的过程中发挥着重要作用,进而通过对肠上皮细胞 INT407 的侵袭试验证实了上述推测。Mittal 等^[20]利用动物试验探索了 OmpA 与脑膜炎之间的联系,研究发现 OmpA 能与纤连蛋白相结合透过大鼠的血脑屏障损害宿主的中枢神经系统,进而导致脑膜炎的产生。OmpX 为另一种与致病相关的外膜蛋白,参与了克罗诺杆菌的基底外侧侵袭,同时可转移至脾脏、肝脏等重要器官^[21]。此外,研究^[5]发现所有的克罗诺杆菌都能编码和表达 OmpA 和 OmpX,说明这两种外膜蛋白并不是造成克罗诺杆菌毒力差异的原因。

1.3 其他毒力因子

随着转录组学和蛋白组学的发展,克罗诺杆菌中一些潜在的毒力因子及其作用被充分挖掘,如表 1 所示。研究表明,克罗诺杆菌的毒力因子具有多样性,也说明克罗诺杆菌的致病过程是一个复杂的协同效应,然而此方面的研究还存在一定的局限性,一方面,一些潜在的毒力蛋白虽被发现,但其在克罗诺杆菌致病过程中发挥的作用尚未被揭示;另一方面,目前的研究一般都是以一种毒力基因为靶点,忽视了毒力因子之间的协同作用,因此后续可针对毒力因子的协同作用进行研究。

2 克罗诺杆菌的致病机理

2.1 菌毛的黏附作用

克罗诺杆菌对宿主的侵染作用首先取决于其较强的黏附能力,而研究^[26]发现细菌的菌毛能够帮助菌体吸附于受体细胞表面,从而有助于克罗诺杆菌侵染宿主。研究^[27-28]发现与脓血症和败血症有关的纤维菌毛基因并未在阪崎克罗诺杆菌中发现,却存在于苏黎世克罗诺杆菌基因组中,表明苏黎世克罗诺杆菌能引起宿主的脓血症和败血症与纤维菌毛的存在密切相关。此外,据报道^[29]阪崎克罗诺杆菌 P 菌毛能够促进新生儿脑膜炎的发生,IV 型菌毛则与该致病菌的黏附作用密切相关。上述

表 1 克罗诺杆菌其他的毒力因子

Table 1 Other virulence factors of *Cronobacter* spp.

毒力因子	作用	参考文献
基因 <i>Inv</i>	能够介导该致病菌从基底外侧侵入宿主的内脏器官,并提出了 <i>Inv</i> 和 OmpA 的双重侵入模式,即 <i>Inv</i> 能够增加 OmpA 的致病能力	[22]
DSF 群体感应系统关键酶 RpfR	关键酶 RpfR 能显著提高宿主的死亡率	[23]
毒力因子 Labp	该基因表达的减少能改变外膜蛋白的形态,降低脂多糖的产量,增加膜磷脂的产量,从而降低克罗诺杆菌的致病能力	[24]
潜在的毒力蛋白	通过二维电泳图谱分析发现 15 个可能与克罗诺杆菌毒力相关的蛋白	[25]

研究表明克罗诺杆菌菌毛的黏附作用不仅能够提高其对宿主的侵染能力,而且与克罗诺杆菌的致病类型密切相关,因此可以通过抑制调控菌毛表达的基因,降低该致病菌对宿主的侵染能力。

2.2 克罗诺杆菌对铁的吸收作用

铁作为一种重要的酶辅因子参与了细菌的大量生命活动,因此细菌对铁的吸收能力被认为是病原菌感染宿主的基础^[30]。研究^[31]发现克罗诺杆菌的毒力质粒中含有特异的毒力因子——铁捕获系统,该系统与纤溶酶原激活物以及丝状血凝素一起参与该致病菌对宿主的侵染。pESA3 和 pCTU1 质粒中均含有 *iucABCD/iutA* 和 *eitCBAD* 两个铁吸收系统,并编码了一系列的毒力因子,说明铁吸收系统与克罗诺杆菌的致病性密切相关^[32]。此外,通过全基因组测序^[33]发现在阪崎克罗诺杆菌和苏黎世克罗诺杆菌中发现了编码 pESA3 和 pCTU1 质粒的基因,而在克罗诺杆菌属中的阪崎克罗诺杆菌和苏黎世克罗诺杆菌被证实有侵染机体的能力,说明克罗诺杆菌对铁的吸收作用在其致病过程中发挥着重要作用。

2.3 克罗诺杆菌对唾液酸的利用能力

唾液酸是神经节苷脂的重要组成部分,能够确保新生儿大脑的正常发育,尤其是对体重较轻的新生儿,可以通过提高体内唾液酸的含量促进其脑结构和功能的健康发展^[34]。PIF 是婴幼儿获得唾液酸的主要途径,唾液酸的摄取能够提高新生儿肠道内 *N*-乙酰葡萄糖胺残基的含量,从而达到促进肠道中有益微生物增殖并抑制有害微生物生长的目的^[35]。然而阪崎克罗诺杆菌却具有利用唾液酸的能力,是阪崎克罗诺杆菌可以顺利定植于新生儿肠道中,并能够穿透血脑屏障诱发新生儿脑膜炎的重要原因之一^[36]。目前,在克罗诺杆菌的 7 个种中,只有阪崎克罗诺杆菌的全基因组中含有编码利用唾液酸的基因簇 *nanAKT*,阐明了为何阪崎克罗诺杆菌是分离自 PIF 及新生儿脑膜炎临床样本的优势菌群^[37-38]。克罗诺杆菌对唾液酸的利用能力增加了新生儿感染脑膜炎的风险,科学地对 PIF 进行冲调有利于减少被污染的 PIF 进入体内。克罗诺杆菌对热较为敏感,因此可采用 70℃ 左右的热水对 PIF 进行冲调,即便 PIF 已经被该致病菌污染也能达到防止新生儿被感染的目的。

2.4 生物膜的形成

克罗诺杆菌的生物膜能够提高该致病菌的吸附能力,并在一定程度上起到自我保护的作用,从而提高了其在不良环境中的生存能力^[39]。在克罗诺杆菌中黏附素蛋白 ESA_00281 和 ESA_00282 已被证实参与了生物膜的形成,并与该致病菌的黏附能力密切相关^[40]。荚膜异多糖是克罗诺杆菌生物膜的主要成分,能够使克罗诺杆菌更好地吸附在硅胶、不锈钢、塑料、玻璃及木质案板上,从而促进该病原体抵抗外界不良的环境^[41]。在 PIF 的生产

过程中,包装被认为是克罗诺杆菌最易污染的环节,与克罗诺杆菌具有形成生物膜的能力密切相关。生物膜的形成可促进克罗诺杆菌紧密地吸附在包装材料上,并能够提高该致病菌对消毒剂的抵抗能力,最终提高克罗诺杆菌感染婴幼儿的几率。

2.5 外排系统

主动外排系统是一种公认的致病性机制,有助于致病微生物在宿主胃肠道中存活^[42]。克罗诺杆菌中存在编码铜银阳离子外排系统的基因 *ibeB* (与 *cusC* 同源),该基因可介导克罗诺杆菌侵袭大脑微血管内皮细胞^[43]。同时研究^[44]发现可引起新生儿感染的克罗诺杆菌菌株中存在完整的阳离子外排操纵子及调节因子,而非感染性菌株中缺失或不存在上述毒力因子。可见,克罗诺杆菌的外排系统与其致病能力有着密切的联系,因此可以编码阳离子外排操纵子或者调节因子的基因为靶点,结合转录组学和蛋白质组学挖掘克罗诺杆菌潜在的毒力因子,从而深入地揭示克罗诺杆菌的致病机理。

2.6 耐干燥能力

克罗诺杆菌对食品尤其是对 PIF 的污染已备受重视,该病原体是肠杆菌科中耐干燥和耐渗透压能力最强的属,也是由于这一特性使得克罗诺杆菌能够在水分活度极低的 PIF 中长期存活^[45]。大多数克罗诺杆菌可以在水分活度 (*A_w*) 0.2~0.5 的条件下存活 1 年以上,而一些具有胶囊结构的克罗诺杆菌菌株则可在干燥的环境中存活 2.5 年以上,大大增加了该致病菌侵染婴幼儿的几率^[46]。研究^[47]发现克罗诺杆菌强的耐干燥能力是由于其细胞液中含有大量的海藻糖,提高了克罗诺杆菌细胞的渗透压,从而增强了该致病菌的抗干燥能力。此外,在牛奶琼脂培养基中具有胶囊结构荚膜的克罗诺杆菌能够产生高黏度的液体,与克罗诺杆菌的毒素特征和抗干燥能力密切相关^[48]。上述研究表明,强的耐干燥能力使得克罗诺杆菌能够在干燥的环境下长期存在,与其他肠杆菌科微生物相比,克罗诺杆菌能够稳定地存在于 PIF 中。

3 结论

克罗诺杆菌是 PIF 中的 A 类致病菌,新生儿和婴幼儿一旦摄入被该致病菌污染的 PIF 即会造成严重的感染,甚至危及生命^[49]。目前,对于克罗诺杆菌引起的新生儿感染并未得到应有的重视,比如在阜阳毒奶粉事件中,起初新生儿脑膜炎被认为是由于奶粉中蛋白质含量过低造成的,但随后的研究^[50]发现毒奶粉中克罗诺杆菌的污染率高达 12.6%,表明克罗诺杆菌污染很可能是造成“大头娃娃”事件最重要的原因,因此开展克罗诺杆菌毒力因子和致病机理的研究是非常必要的。

近年来,对于克罗诺杆菌致病性的研究逐渐深入,并取得了一定的进展,同时也存在以下问题:① 目前的研究

大多集中在某单一的毒力因子,而克罗诺杆菌的致病能力是多种毒力因子共同作用的结果,因此现有研究并不能清晰地揭示克罗诺杆菌的致病机理,但随着组学技术的发展,越来越多的毒力因子终将被发现;② 在致病机理的研究过程中,目前的研究通常以某一基因(蛋白)为靶点,并未形成一个完整的调控网络,为克罗诺杆菌致病机理的研究造成了障碍;③ 细菌并不是以个体存在的,会通过分泌信号因子影响群体的行为,已有研究^[51]表明这种群体感应与细菌生物膜的形成和毒素的表达密切相关,因此克罗诺杆菌的群体感应系统与其致病性的关系还需深入研究。

参考文献

- [1] YAN Q Q, CONDELL O, POWER K, et al. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: A review of our current understanding of the biology of this bacterium[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(1): 1-15.
- [2] FARMER J, ASBURY M, HICKMAN F, et al. *Enterobacter sakazakii*: A new species of “Enterobacteriaceae” isolated from clinical specimens[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1980, 30(3): 569-584.
- [3] IVERSEN C, LEHNER A, MULLANE N, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: Proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions 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 dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1 [J]. Bmc Evolutionary Biology, 2007, 7(1): 64.
- [4] 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 dublinensis* sp. nov. *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(6): 1 442-1 447.
- [5] 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.
- [6] FEI Peng, JIANG Yi-chao, GONG Shao-ying, et al. Occurrence, genotyping, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in drinking water and food samples from Northeast China[J]. Journal of Food Protection, 2018, 81(3): 456-460.
- [7] MOHAMMED M A, SALLAM K I, TAMURA T. Prevalence, identification and molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* isolated from retail meat products[J]. Food Control, 2015, 53: 206-211.
- [8] CHEN Wan-yi, YANG Jie-lin, YOU Chun-ping, et al. Diversity of *Cronobacter* spp. isolates from the vegetables in the middle-east coastline of China[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(6): 90.
- [9] GARBOWSKA M, BERTHOLD-PLUTA A, STASIAK-RÓANSKA, L. Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp.[J]. Food Microbiology, 2015, 49: 1-5.
- [10] YE Ying-wang, LI Hui, WU Qing-ping, et al. Isolation and phenotypic characterization of *Cronobacter* from dried edible macrofungi samples[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(7): 1 382-1 386.
- [11] FEI Peng, MAN Chao-xin, LOU Bin-bin, et al. Genotyping and source tracking of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* isolates from powdered infant formula and an infant formula production factory in China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(16): 5 430-5 439.
- [12] HEPERKAN D, DALKILIC-KAYA G, JUNEJA V K. *Cronobacter sakazakii*, in baby foods and baby food ingredients of dairy origin and microbiological profile of positive samples[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 75: 402-407.
- [13] FEI Peng, JIANG Yi-chao, JIANG Yan, et al. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula collected from Chinese retail markets[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2 026.
- [14] 陈雅衡, 周帼萍. 食品工业中克罗诺杆菌(原阪崎肠杆菌)的污染与控制[J]. 中国酿造, 2013, 32(7): 16-19.
- [15] CAUBILLABARRON 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): 3 979-3 985.
- [16] PAGOTTO F J, NAZAROWEC-WHITE M, BIDAWID S, et al. *Enterobacter sakazakii*: Infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo[J]. J Food Prot, 2003, 66(3): 370-375.
- [17] RAGHAV M, AGGARWAL P K. Purification and characterization of *Enterobacter sakazakii* enterotoxin [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2007, 53(6): 750-755.
- [18] MOHAN NAIR M K, VENKITANARAYANAN K. Role of bacterial *OmpA* and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*[J]. Pediatric Research, 2007, 62(6): 664-669.

- [19] MOHAN NAIR M K, VENKITANARAYANAN K S. Cloning and sequencing of the OmpA gene of enterobacter sakazakii and development of an OmpA-Targeted PCR for rapid detection of *enterobacter sakazakii* in infant formula[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(4): 2 539-2 546.
- [20] MITTAL R, WANG Y, HUNTER C J, et al. Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: A role for outer membrane protein A[J]. Laboratory Investigation, 2009, 89(3): 263-277.
- [21] KIM K, KIM K P, CHOI J, et al. Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(15): 5 188-5 198.
- [22] CHANDRAPALA D, KIM K, CHOI Y, et al. Putative inv is essential for basolateral invasion of Caco-2 Cells and acts synergistically with OmpA to affect in vitro and in vivo virulence of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(5): 1 755-1 765.
- [23] SUPPIGER A, ESHWAR A K, STEPHAN R, et al. The DSF type quorum sensing signalling system RpfF/R regulates diverse phenotypes in the opportunistic pathogen *Cronobacter* [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 18 753.
- [24] KIM S, YOON H, RYU S. New virulence factor CSK29544_02616 as LpxA binding partner in *Cronobacter sakazakii* [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 835.
- [25] 韩冉. 阪崎克罗诺杆菌菌毒力比较与致病因子研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2014: 42.
- [26] MANGE J P, STEPHAN R, BOREL N, et al. Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells[J]. Bmc Microbiology, 2006, 6(1): 58.
- [27] STEPHAN R, LEHNER A, TISCHLER P, et al. Complete genome sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a food-borne pathogen causing deaths in neonates[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(1): 309-310.
- [28] JOSEPH S, FORSYTHE S J. Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections[J]. Emerging Infectious Diseases, 2011, 17(9): 1 713-1 715.
- [29] 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(1): 366.
- [30] NEGRE V L, BONACORSI S. The siderophore receptor IroN, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(2): 1 216-1 220.
- [31] FRANCO A A, HU L, GRIM C J, et al. Characterization of putative virulence genes on the related repFIB plasmids harbored by *Cronobacter* spp. [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(10): 3 255-3 267.
- [32] FRANCO A A, KOTHARY M H, GOPINATH G, et al. Cpa, the outer membrane protease of *Cronobacter sakazakii*, activates plasminogen and mediates resistance to serum bactericidal activity [J]. Infection and Immunity, 2011, 79(4): 1 578.
- [33] 刘咪, 杨保伟, 夏效东, 等. 阪崎克罗诺肠杆菌致病性机理研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 329-333.
- [34] 齐晓彦. 唾液酸在婴幼儿配方奶粉中的应用进展[J]. 食品工业, 2017, 38(8): 221-225.
- [35] 王艳菲, 张兰威. 人乳低聚糖的特点及其对婴儿肠道菌群与免疫功能的影响[C]//中国食品科学技术学会第十五届年会. 青岛: 中国食品科学技术学会, 2018: 113-114.
- [36] SALVADOR A M, FIDELMA B E. Insights into the evolution of sialic acid catabolism among bacteria[J]. BMC Evolutionary Biology, 2009, 9(1): 45-50.
- [37] JOSEPH S, HARIRI S, NAQASH MASOOD, et al. Sialic acid utilization by *Cronobacter sakazakii* [J]. Microbial Informatics and Experimentation, 2013, 3(1): 3.
- [38] JOSEPH S, SONBOL H, HARIRI S, et al. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(9): 3 031-3 039.
- [39] BEUCHAT L R, KIM H, GURTLE J B, et al. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 136(2): 204-213.
- [40] HARTMANN I, CARRANZA P, LEHNER A, et al. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(7): 2 251-2 261.
- [41] SCHEEPE-LEBERKÜHNE M, WAGNER F. Optimization and preliminary characterization of an exopolysaccharide synthesized by *Enterobacter sakazakii* [J]. Biotechnology Letters, 1986, 8(10): 695-700.
- [42] TOUZE, THIERRY, ESWARAN, et al. Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system[J]. Molecular Microbiology, 2010, 53(2): 697-706.
- [43] FRANKE S, GRASS G, RENSING C, et al. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli* [J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(13): 3 804-3 812.
- [44] KUCEROVA E, CLIFTON S W, XIA Xiao-qin, et al. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species[J]. Plos One, 2010, 5(3): e9556.

- [19] 李保国. 食品冷冻过程的试验研究与数值模拟[C]//第四届全国食品冷藏链大会暨 2002 全国气调冷库技术研讨会论文集. 西安: 中国制冷学会, 2002: 6.
- [20] ERDOGDU F, FERRUA M, SINGH K S, et al. Air-impingement cooling of boiled eggs: Analysis of flow visualization and heat transfer[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 79(17): 920-928.
- [21] DARIUSZ G, KLUZA F. Heat transfer coefficient in impingement fluidization freezing of vegetables and its prediction[J]. International Journal of Refrigeration, 2012, 35(4): 871-879.
- [22] HUAN Zhong-jie. Performance evaluation indexes for quick-freezers[J]. International Journal of Refrigeration, 2003, 26(7): 817-822.
- [23] 赖威娜. 交通运输工具用液氮速冻机提高液氮利用率的设计研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2017: 31-40.
- [24] 牛新朝. -60℃低温速冻柜内流场及温度场模拟分析与实验研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2015: 22-28.
- [25] 徐斌, 胡振武, 王志远, 等. 板带式速冻机内部通道流场的数值模拟[J]. 制冷学报, 2004(1): 55-59.
- [26] 祁艳会. 速冻隧道流场模拟及隧道的优化设计[D]. 郑州: 郑州大学, 2017: 62-80.
- [27] LACERDA V T, MELO C, BARBOSAIR J, et al. Measurements of the air flow field in the freezer compartment of a top-mount no-frost refrigerator: The effect of temperature[J]. International Journal of Refrigeration, 2005, 28(5): 774-783.
- [28] 张珍, 谢晶. 上下冲击式高效鼓风冻结装置速度场的数值模拟与验证[J]. 低温工程, 2008, 3(6): 45-50.
- [29] 朱必佳, 孙宇. 自堆积式螺旋速冻机流场数值模拟[J]. 包装与食品机械, 2017, 35(5): 37-42.
- [30] 赵文锋, 杨洲. 微型冷库货物降温特性的 CFD 数值模拟[J]. 中国科技, 2015, 10(5): 546-551.
- [31] ODEY M. Meat carton blast chilling/freezing cabinet performance improvements [C]//Proceedings IIR-IRHACE 2006 Conference. Madrid: Atlantis Press, 2006: 118-124.
- [32] 李堃. CO₂冷风机结构参数研究与优化[D]. 天津: 天津商业大学, 2018: 49-53.
- [33] CHENG Qiong-yi, LI Hao, RONG Li, et al. Using CFD to assess the influence of ceiling deflector design on airflow distribution in hen house with tunnel ventilation[J]. Computers and Electronics in Agriculture, 2018, 151(29): 165-174.
- [34] WU Tao, GE Zhi-hua, YANG Li-jun, et al. Flow deflectors to release the negative defect of natural wind on large scale dry cooling tower[J]. International Journal of Heat and Mass Transfer, 2019, 128(26): 248-269.
- [35] RAINA A, HARMAIN G A, HAQ M I U. Numerical investigation of flow around a 3D bluff body using deflector plate[J]. International Journal of Mechanical Sciences, 2017, 131/132: 701-711.
- [36] KIM J J, KIM J J, LEE S J. Substantial drag reduction of a tractor-trailer vehicle using gap fairings[J]. Journal of Wind Engineering and Industrial Aerodynamics. 2017, 171(25): 93-100.
- [37] 梁亚星, 陶乐仁, 郑志皋. 新型流态化食品速冻机内风道流场的数值模拟[J]. 食品与机械, 2005, 21(2): 37-40.
- [38] 张翔, 韩佳伟, 杨信廷, 等. 不同构造冷藏车厢体的冷却性能模拟与对比[J]. 制冷学报, 2018, 39(2): 89-98.
- [39] 张亮. 隧道式速冻装置风场均衡性研究[C]//第七届中国冷冻冷藏新技术新设备研讨会论文集. 天津: 中国制冷空调工业协会, 2015: 5.
- [40] 郭振华. 螺旋式快速冻结装置进出口热质交换的研究[D]. 天津: 天津商学院, 2002: 3.
- [41] 尹从绪. 遮流板对螺旋式速冻装置料口热质交换的节能研究[C]//中国制冷学会第十七次团体会员大会暨第五届全国食品冷藏链大会论文集. 长沙: 中国制冷学会, 2004: 5.
- [42] 毛力, 郇中杰. 螺旋式速冻机料口跑冷的可视化实验研究[J]. 制冷与空调: 四川, 2004(1): 24-26.
- [43] 黄建昌, 何绍书. 螺旋式速冻机料口跑冷机理分析[J]. 低温工程, 2003(2): 36-40.
- [44] 吕静, 郇中杰, 何绍书, 等. 单螺旋吹风式速冻装置料口改进的实验研究[J]. 制冷学报, 2004(3): 33-36.
- [45] 毛力, 黄建昌, 何绍书. 螺旋式速冻装置料口气流组织的研究[J]. 低温工程, 2004(2): 30-35.
- [46] 陆蓓蕾, 陈瑞球, 黄建昌. 低温流场气流组织的数值分析[J]. 流体机械, 2006, 3(10): 84-86.

(上接第 154 页)

- [45] 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.
- [46] IVERSEN C, LANE M, FORSYTHE S J. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii*, grown in infant formula milk[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 38(5): 378-382.
- [47] RIEDEL K, LEHNER A. Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics[J]. Proteomics, 2007, 7(8): 1 217-1 231.
- [48] OGRODZKI P, FORSYTHE S. Capsular profiling of the *Cronobacter* genus and the association of specific *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* capsule types with neonatal meningitis and necrotizing enterocolitis[J]. Bmc Genomics, 2015, 16(1): 1-15.
- [49] 陈启明. 克罗诺杆菌免疫学和分子生物学检测方法研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016: 1.
- [50] 刘秀梅, 裴晓燕, 郭云昌. 中国安徽阜阳劣质婴儿配方粉中阪崎肠杆菌的污染[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(1): 10-12.
- [51] RAMSEY M M, KORGAONKAR A K, WHITELEY M. Quorum-sensing in bacteria[J]. Encyclopedia of Microbiology, 2009, 55(2): 357-374.