



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng

Research
Food Safety and Health—Article

克罗诺杆菌的食品安全风险及危害因子

凌娜^{a,b}, 蒋秀婷^a, Stephen Forsythe^c, 张丹凤^a, 沈益忠^a, 丁郁^b, 王涓^b, 张菊梅^b, 吴清平^b, 叶应旺^{a,b,*}

^a School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China.

^b Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China

^c Foodmicrobe.com, Keyworth NG12 5GY, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2020

Revised 16 February 2021

Accepted 11 March 2021

Available online 24 June 2021

关键词

克罗诺杆菌

食品污染

致病机制

毒力因子

胁迫应答

摘要

克罗诺杆菌(*Cronobacter spp.*)是一种革兰氏阴性条件致病菌,可导致新生儿与婴幼儿患脑膜炎、败血症以及坏死性小肠结肠炎等疾病,严重者留下神经系统后遗症。目前,*Cronobacter spp.*对婴幼儿的高毒力已经引起了全世界的关注。本文分析了*Cronobacter spp.*在重要食品中的流行情况,回顾了该菌在胁迫环境下的应答机制及其致病机制等,并强调了*Cronobacter spp.*对食品安全的重要性,以及相关控制手段/临床治疗方案制定的意义。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

克罗诺杆菌原名阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*),隶属于肠杆菌科,是一种寄生于动物体和人体肠道内的革兰氏阴性无芽孢杆菌[1]。2008年,Iversen等[2]利用生物学手段,对*E. sakazakii*进行多样性分析及DNA杂交分析,建议将*E. sakazakii*定义为*Cronobacter spp.*。目前,*Cronobacter spp.*包括7个种:阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonicus*),二者是引起公共卫生关注的主要致病菌;莫金斯克罗诺杆菌(*C. muytjensi*)、都柏林克罗诺杆菌(*C. dublinensis*)和康帝蒙提克克罗诺杆菌(*C. condimenti*),其临床意义较低;而苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)、尤尼沃斯克罗诺杆

菌(*C. universalis*)很少被研究报道。

新生儿感染*Cronobacter*事件已引起广泛关注。从1961年,英国首次报道住院婴儿中分离到*Cronobacter*。1979年,在佐治亚州梅肯的新生儿中报道了由*Cronobacter*引起的菌血症病例。继而,在荷兰(1983年、1987年)和希腊(1987年)、冰岛(1989年)和美国(1989年和2001年)也出现*Cronobacter*感染的报道。2001年,美国发生一系列*Cronobacter*感染事件,美国疾病预防控制中心对污染的婴幼儿配方奶粉(powered infant formula, PIF)进行了溯源调查[3]。

尽管人们更多地关注于*Cronobacter*感染婴儿的病例,但是*Cronobacter*可以感染所有年龄组。*Cronobacter*感染可导致成人患轻微的胃肠道炎症、腹泻和尿路感染,其

* Corresponding authors.

E-mail addresses: wuqp203@163.com (Q. Wu); yejw04@mails.ucas.ac.cn (Y. Ye).

中，老年和免疫功能低下的成人最易感染 *Cronobacter* [4]。出生两个月内的新生儿，尤其是体重不足的早产儿 [5]，由于其胃酸 pH 值较成年人高、免疫屏障不健全等因素，感染致病菌风险较高，致死率高达 50%~80% [6]。2002 年，国际食品微生物规范委员会[7]将 *Cronobacter* 定义为“严重危害特定人群生命、引起长期慢性实质性后遗症的一种致病菌”。据美国疾病控制与预防中心统计，美国每年有 4~6 名婴儿感染 *Cronobacter*。由于政府卫生部门没有要求各部门上报 *Cronobacter* 感染，因此这个数据被严重低估。

在许多国家，婴儿感染 *Cronobacter* 的原因经常被溯源至其食用了受 *Cronobacter* 污染的 PIF。然而，目前由于我国分子溯源分析较少，我国还没有 *Cronobacter* 感染关联到 PIF 品牌的确切临床报告。这可能归因于中国食源性 *Cronobacter* 临床感染的追踪体系不健全，监测系统仍需不断完善[8]。

该致病菌可通过黏附于宿主细胞表面、侵入肠屏障和血脑屏障引发多种疾病（图 1 [9–11]），轻微症状表现为发热、嗜睡或精神不振[12]，严重者则患有结膜炎、胆汁性败血症、尿脓毒症、脑膜炎等[13]。虽然 *Cronobacter* 感染的患者可以在抗生素治疗后恢复，但他们往往会出现严重的神经系统后遗症和发育障碍。

因此，为了全面了解 *Cronobacter* 对人类健康的潜在风险和致病机制，本文将从该致病菌在食品中的污染分布、其在不同环境中的耐受性以及对食品安全造成威胁的毒力因子及其临床控制新措施的需求等方面进行综述。

2. 食品污染情况

Cronobacter 在自然界中分布极为广泛，可存在于水、土壤、动物及人体排泄物中[14]。目前，研究人员对其生态位、传播途径、流行病学规律和致病机制仍处于探索阶段，因此开展 *Cronobacter* 在不同食品中的污染分布调查，对预防控制由该菌引发的食物中毒事件有很好的预警作用。

2.1. 婴幼儿食品

自英国首次报道由 *Cronobacter* 引起的新生儿脑膜炎后[15]，全球范围内由该致病菌感染引起的婴幼儿食品安全事件频频暴发[16–17]。因此，对 PIF 和其他婴儿食品进行 *Cronobacter* 监测是非常重要的。刘秀梅等[18]首次在 87 份中国安徽阜阳劣质婴幼儿配方奶粉中发现存在 *Cronobacter*，检出率为 12.6%。这些产品均未能满足良好的生产规范和质量要求。2018 年，据欧盟食品和饲料类快速预警系统（Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF）通报，一婴幼儿配方奶粉生产企业因使用了被 *Cronobacter* 污染的奶粉原料，导致多品牌多批次 PIF 有感染致病菌的风险，相关 PIF 也已出口至中国、法国等多个国家。然而，PIF 并不是唯一值得关注的婴儿食品，因为 *Cronobacter* 在米粉、营养饼干和面制品等婴幼儿辅食中的污染率（1.2%~27%）与 PIF（0.9%~23.1%）相似[8]。

多起新生儿 *Cronobacter* 感染事件也表明 PIF 是该致病菌的主要感染载体[16]，2004 年，FAO 和 WHO 将 *Cronobacter* spp. 列为 PIF 中 A 类致病菌[19]。

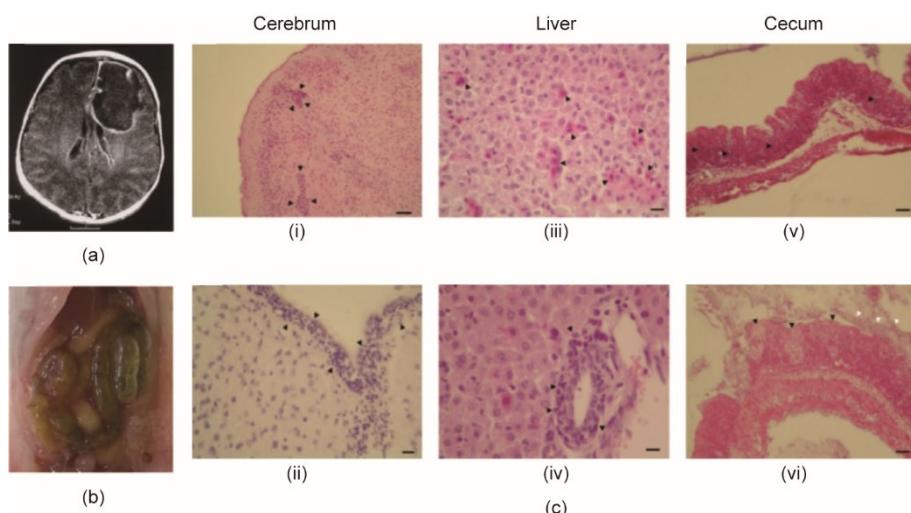


图 1. (a) 感染 *Cronobacter* 的新生儿脑部轴位增强 T1 加权磁共振成像（magnetic resonance image, MRI），左侧额叶有一个大的环形增强积液病变（引用 Burdette 等[9]的研究）。(b) 喂养含有 *Cronobacter* 奶粉的幼鼠发生新生儿坏死性小肠结肠炎（neonatal necrotizing enterocolitis, NEC）（引用 Blackwood 等[10]的研究）。(c) *Cronobacter* 感染小鼠的病理组织的苏木精-伊红染色结果：(i) 胶质增生（黑色箭头），标尺=100 μm；(ii) 脑膜炎（黑色箭头），标尺=50 μm；(iii) 肝细胞变性（黑色箭头），标尺=50 μm；(iv) 肝脏切片炎症（黑色箭头），标尺=50 μm；(v) 炎症（黑色箭头），标尺=100 μm；(vi) 盲肠切片恶化（黑色箭头）和菌落（白色箭头），标尺=100 μm（引用 Lee 等[11]的研究）。

该致病菌主要通过未彻底灭菌的生产原料、巴氏杀菌后配方粉或添加剂干粉带入、冲泡过程来污染PIF。PIF的生产方法通常包括干混和湿混喷雾干燥。干混过程通常不需要进行大量的高温处理，因此易于导致部分数量较少的致病菌附着在食品容器和包装袋上，这往往容易在随机抽样检查中被忽视。另外，在湿混喷雾干燥过程中，进出风口的气溶胶和操作人员均可能将外源 *Cronobacter* 带入喷雾干燥塔[20]。此外，在分析PIF生产链中 *Cronobacter* 的污染情况时发现，喷雾干燥器车间、流化床车间落地粉和空气过滤车间地板等生产区域 *Cronobacter* 污染率很高[21]。因此，巴氏杀菌只能在PIF生产的早期阶段灭活 *Cronobacter*，但无法使隐藏在配料、过滤器、喷雾干燥塔和其他加工设备中的 *Cronobacter* 失活[22–23]。一旦生产环境被污染，就可能导致新生儿食用含该致病菌的PIF而患病[24]。

2.2. 即食生鲜食品

除婴幼儿食品外，日本料理[25]、熟肉制品、奶酪、牛肉末、香肠末[26]中均检测出 *Cronobacter* 阳性株。据报道，植物可能是 *Cronobacter* 的自然来源[27]，30.27% 的即食蔬菜食品中含有 *Cronobacter* [28]，且凉拌菜中 *Cronobacter* 阳性率为 8.2% [29]。通过分析 *Cronobacter* 在即食生鲜食品中的流行情况发现，由于凉拌菜、鲜榨果汁或生鲜水果售卖季节通常为春、夏等温度较高的季节，可能为致病菌繁殖提供了有利条件。

在食品制备过程中需要良好的卫生规范，如果没有遵循适当的清洗程序，用于存放熟食的砧板、刀具和器皿及原材料中的 *Cronobacter* 可能会导致即食食品中的交叉污染。

2.3. 即食干制食品

与其他肠杆菌科菌株相比，*Cronobacter* 具有显著的抗干燥特性，*Cronobacter* 感染与奶粉污染的流行病学相关性研究也证明了这种优势特性。在中国 14 家工厂收集的 1012 份脱水米粉中发现 7.5% 的样本呈 *Cronobacter* 阳性，其中一家工厂的 *Cronobacter* 检出率更是高达 28.8% [30]。一项与荷兰生产或销售的食品中 *Cronobacter* 污染有关的五年调查报告也表明，干谷物和香辛料中的 *Cronobacter* 检出率分别约为 4% 和 3% [31]，而中国香辛料 *Cronobacter* 总检出率高达 57% [32]，调味料中 *Cronobacter* 的检出率为 6.3% [33]。因此，添加香辛料的干制食品不经烹调直接与食品共食，容易将外源性 *Cronobacter* 转移到菜肴中，对消费者带来潜在危害。

鉴于 *Cronobacter* 的广泛分布，食品工业，特别是婴儿食品制造商，需要控制这种病原体，必须对原料和加工环境进行有效的分离和定期清洗。

3. 环境胁迫

食源性致病菌在经历食品生产—餐桌—人体感染的过程中，往往会经历不同的不利环境（图 2）。*Cronobacter* 具有极强的逆境耐受力，在干燥、热休克、酸冲击等特殊条件下可代谢生成特殊物质，如海藻糖、脯氨酸、甘氨酸、甜菜碱、葡萄糖、N-酰基高丝氨酸内酯、色素以及特定蛋白来缓解外界压力[34]。同时，该致病菌抵御逆境和抗生素的能力使得病原体难以被根除。由于该菌顽强的生存能力及对婴幼儿极高的致死率，其在婴幼儿食品领域得到广泛关注。

3.1. 干燥抗性

Cronobacter 比大肠杆菌、沙门氏菌、李斯特菌和其他肠杆菌科菌株的耐干燥能力更强[35]。 $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 *Cronobacter* 在脱水 PIF 中室温条件下放置 5 个月活菌数降低 2.4 个对数周期，而随后的 19 个月存活菌量仅下降了 1 个对数周期，且该菌可在 PIF 中存活长达两年之久[36]。

Breeuwer 等[37]认为，*Cronobacter* 能通过 K^+ 等金属离子积累以及海藻糖、脯氨酸和甜菜碱等相溶性物质的分泌增加细胞间的渗透压，维持大分子周围的水膜以减少细胞间的脱水作用。在 *C. sakazakii* SP291 干燥过程中，*opuCABCD* 操纵子和 *proP* 基因编码的运输脯氨酸、甘氨酸、甜菜碱的 OpuC 系统和 ProP 系统，以及 *proVWX* 操纵子编码的膜结合蛋白 ProU 系统高度上调，可以运输渗透保护剂进入胞内抵御干燥胁迫[38]。研究发现，*Cronobacter* 在正常培养条件下静止期时细胞内海藻糖的含量为 $0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ ；而干燥后，海藻糖浓度则上升至 $0.23 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ ，其含量增加了 5 倍以上。然而，其他肠杆菌科菌株在干燥胁迫条件下，均未检测到海藻糖的聚积。随后，通过 iTRAQ 分析了 *C. sakazakii* ATCC 29544 潜在干燥抗性因子，发现 *Cronobacter* 海藻糖合成相关基因 *ostAB*、海藻糖转运基因 *treABCF* [38] 等上调表达，其产物在干燥条件下能保护磷脂膜和蛋白质[39]。

高渗条件和干燥环境引起的生理变化往往是相似的，这常常导致渗透胁迫和干燥胁迫的研究相混淆。Riedel 等[40]利用双向凝胶电泳法（two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE）观察 *Cronobacter* 处于物理干燥和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 高渗透压生长条件的不同应激反应，研究表明，在

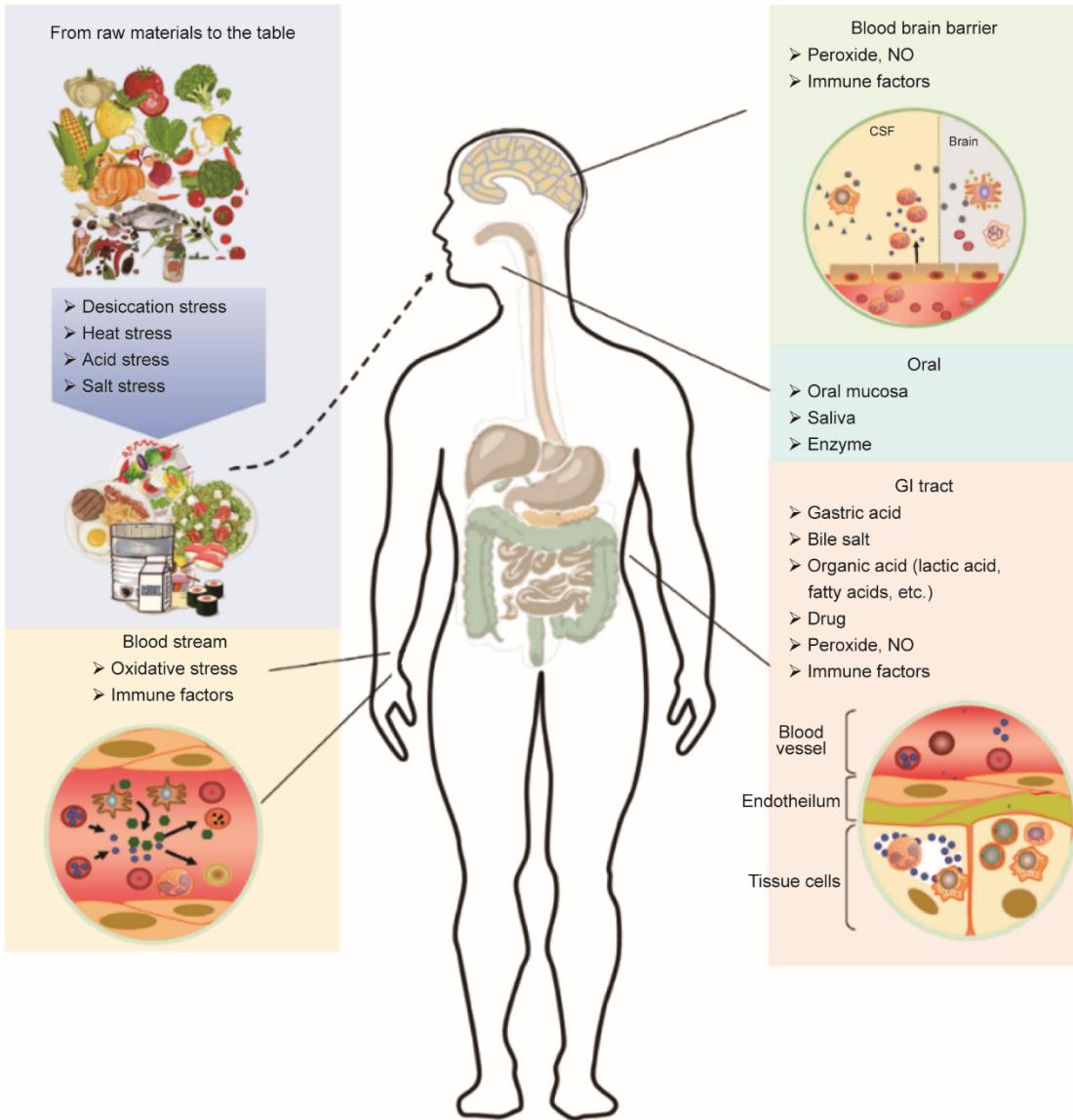


图2.微生物面临来自食物和人类宿主的不同胁迫环境。酸：常见的食物防腐剂和胃的天然抑菌剂；盐：常见的食物防腐剂，也是宿主形成渗透胁迫的天然防御系统；谷物副产品或粉状食品的低水分活度和食品加热过程不利于食源性病原体的生长；口腔黏膜是细菌通过进食方式接触到的第一道机体保护屏障，口腔和胃产生的酶也可以抑制细菌的生长；胃肠道中的有机酸、药物、氧化物和免疫因子是细菌面临的不可避免的胁迫环境；氧化物和一氧化氮：免疫细胞释放的物质；免疫因子：由免疫细胞引起的宿主防御反应；CSF：脑脊液。

高渗培养条件下，观察到周质蛋白 OsmY 的上调，而 γ -谷氨酰转肽酶等相关的氨基酸生物合成酶和转运蛋白显著下调，表明致病菌在该条件下生长缓慢，代谢下降。为了应对干燥环境压力，致病菌热休克蛋白、DNA 结合蛋白 Hns、伴侣蛋白 GroES、OmpA 等相关蛋白持续上调，有助于在干燥条件下保护细胞不受损伤。此外，含有荚膜的 *Cronobacter* 菌株可在干燥环境中存活 2.5 年以上[36]。荚膜多糖作为 *Cronobacter* 生物膜的主要成分，有助于其在不锈钢和玻璃管上附着和形成由三维细胞群组成的 *Cronobacter* 生物膜，从而促使该病原体对外界环境压力的抗性更强[41–42]。本团队发现一株 *Cronobacter* 糖基水解酶缺

陷突变株，由于无法及时裂解生物膜形成堆积，在一定程度上提高了菌株在干燥条件下的适应性[43]。

3.2. 耐热性

高温冲泡 PIF 并冷却至 70 °C 是避免奶粉食用过程中引入的 *Cronobacter* 进入人体的一项重要保障[44]。*Cronobacter* 的生长温度范围为 5.5 ~ 47 °C，在 54 ~ 64 °C 的范围内具有耐热性[45]。Breeuwer 等[37]测定了 *Cronobacter* 在 58 °C 条件下时 *D* 值为 0.39 ~ 0.60 min，且来源于婴幼儿食品中的 *Cronobacter* 在 65 °C 下依旧有少数菌株存活[46]。因此，应该用大于 70 °C 的水而不是温水冲泡奶粉。

Riedel 等[40]和 Asakura 等[47]分别提议将 Mfla-1165

和翻译起始因子 *infB* 作为耐热菌株的分子标记物，与热敏感菌株相比，其在耐热菌株表达量特异性上调。此外，具有完整的 *thrB-Q* 基因组岛能增强 *Cronobacter* 在 58 °C 中的存活力[48]，而编码应激反应 σ 因子 *rpoS* 基因表达水平不同也可能是造成 *Cronobacter* 耐热性差异的原因之一。同时发现沙门氏菌在暴露于低水分亚致死条件下，通过生理遗传调节产生交叉保护，提高了其对高热杀菌的抵抗力[49]，而 *Cronobacter* 的干燥抗性也可以提高该致病菌对高热条件的耐受力[50–51]。尽管用热水冲泡 PIF 后 *Cronobacter* 的持续污染具有重要意义，但 *Cronobacter* 干燥性和耐热性之间的交互关系仍需深入研究。

3.3. 耐酸性

通常成年人胃液 pH 约低于 2，而以 PIF 喂养为主的婴幼儿胃液 pH 约为 3.6。而 *C. sakazakii* 在 pH 3.0 条件下处理后，菌体仍可存活 90 min [52]。因此，一旦婴幼儿食用了被 *Cronobacter* 污染的 PIF 或其他辅助食品，*Cronobacter* 可以突破胃酸屏障，引起坏死性小肠结肠炎等肠道炎症。

此外，在酸处理过程中细胞内阴离子的积累导致 DNA 和蛋白质的损伤，*Cronobacter* 出现生长滞后现象，该致病菌可能通过细胞形态由初始变形到适应酸环境后恢复正常生长来缓解酸胁迫[53]。同时，*Cronobacter* 在酸性条件下也会产生一系列的分子策略来应对环境压力，*cpxR*、*ompR* [54]、*rpoS*、分子伴侣基因 *hfq* [55]、*grxB* [53] 和 *phoP/phoQ* [56] 参与 *C. sakazakii* 的耐酸过程。这些蛋白质通过参与细菌感知逆境并应答、修复受损的蛋白质和核酸、调节氧化应激等过程抵御酸胁迫。

细菌对于不同胁迫条件具有共有应激机制，而对多种环境胁迫的耐受性之间也易存在交叉效应，致使其抗逆调控途径复杂且多样。因此，未来对 *Cronobacter* 的胁迫应答研究除了关注该菌在特定环境下相关蛋白质、基因的调控途径和代谢途径，更应对胁迫中枢调控系统及交叉保护机制进行深入研究。

3.4. 耐药性

近年来对多株食品来源的 *Cronobacter* 进行药敏检测，认为该致病菌的耐药能力并未达到大肠杆菌、沙门氏菌等肠杆菌科细菌所呈现的显著性，但该菌对青霉素、克林霉素、万古霉素、头孢菌素、四环素等医院常用抗生素耐受性较高[57]。同时，由于诱导型 AmpC β -内酰胺酶的产生和耐药基因水平传播，发现多重耐药菌数量日益增加。

Caubilla-Barron 等[58]从新生儿重症监护室分离到 3 株 β -内酰胺酶阳性的 *Cronobacter*，发现强力霉素对所有

菌株均无效，其中 3 株分离自死者气管分泌物和血液的致病菌株还对氨苄西林、头孢呋辛钠、头孢噻肟和阿莫西林/克拉维酸耐药。此外，一例 *Cronobacter* 感染新生儿脑膜炎的调查报告显示，pGW1 质粒中编码 AmpC β -内酰胺酶的耐药基因 *blaDHA-1* 与头孢菌素耐药性有关，且发现了 5 个新的耐药基因，分别为 *mph(A)*、*sulI*、*aadA2*、*dfrA12* 和 *aac-IId* [59]。

近年来，中国等一些国家已用黏菌素作为牲畜饲料中的生长促进剂。近期在 *Cronobacter* 中也检测到质粒携带的黏菌素耐药基因 *mcr-1* 和 *mcr-10* [60–61]。这些耐药质粒的传播和耐药性的加重可能是抗菌药物使用和滥用的后遗症[62–64]。因此，耐药性是一个日益严重的全球公共卫生威胁，为了克服在广谱抗生素治疗过程中正常肠道菌群的扰乱并减少 *Cronobacter* 耐药性的传播，研究重点已经慢慢集中在新治疗方法的建立及联合治疗方法等。研究发现，双歧杆菌已被证实能减缓 *C. sakazakii* 引起的小鼠的肠道炎症现象[65]，而鼠李糖乳杆菌可通过改变细胞膜通透性来逐渐抑制 *C. sakazakii* 生长[66]。此外，亚抑制浓度的柠檬醛[67]能够增加 *C. sakazakii* 对氨苄西林和头孢西丁的敏感性，硫辛酸[68]也可以在体外抑制该菌的感染能力。益生菌制剂及提取物的研发，将为 *Cronobacter* 的有效治疗提供新策略。

Cronobacter 在体内脱水过程中特异地从细胞外基质中获得 K⁺、海藻糖、脯氨酸和甘氨酸，并同时增强海藻糖、脯氨酸和甘氨酸的合成。此外，热休克蛋白 HSPs、DNA 结合蛋白 Hns、伴蛋白 GroES 和外膜蛋白 OmpA 也有利于抗干燥；Mfla-1165、翻译起始因子 *infB*、 σ 因子 *rpoS* 和 *thrB-Q* 基因组岛参与了热耐受性；*Cronobacter* 通过增加应激反应调节因子、伴侣分子、氧化应激相关基因的表达来抵抗酸胁迫；*Cronobacter* β -内酰胺酶的分泌和 pGW1 质粒介导的耐药基因水平转移有助于其在药物处理下存活；海藻糖是生物膜中胞外多糖的重要组成部分，对 *Cronobacter* 在各种逆境下的生存至关重要。

4. 危害机制

通常，细菌进入机体并引发疾病，需穿越宿主机械物理屏障、化学屏障、微生物屏障、免疫屏障。目前，研究发现 *Cronobacter* 能够编码多个与致病过程密切相关的毒力因子，对黏附入侵以及破坏肠屏障、血脑屏障具有重要作用（图 4）。研究者认为，新生儿尤其是早产儿 *Cronobacter* 的高感染率是由于其未成熟的肠道屏障导致肠道黏膜易受 *Cronobacter* 损伤，致使细菌发生易位进入机体组

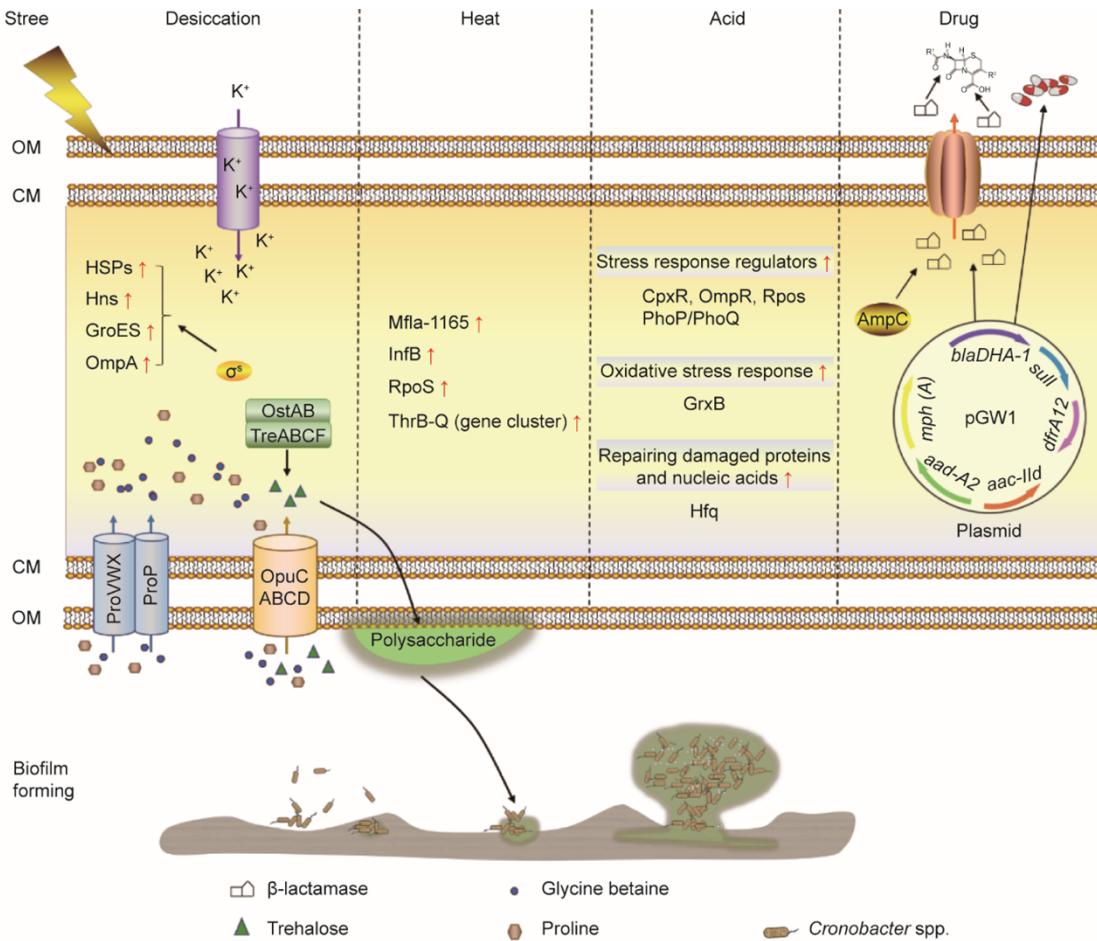


图3. *Cronobacter*的胁迫应答。OM和CM分别代表外膜和细胞质膜；HSP：热休克蛋白；Hns：热稳定的核结构蛋白。

织[69]，引起肠道免疫功能紊乱，同时激活一系列细胞因子，引起炎症级联反应，导致肠道的进一步损伤及最终的肠坏死。此外，*Cronobacter*也可侵入血液形成菌血症，继而细菌黏附、侵入人脑微血管内皮细胞（human brain microvascular endothelial cell, HBMEC），并穿过血脑屏障（blood-brain barrier, BBB）之后存活，引发脑膜炎[69]。

4.1. 黏附

*Cronobacter*对宿主细胞的黏附作用是多数感染性疾病的起因，可使病原体粘连于肠道上皮细胞表面，避免被宿主清除[70]。*Cronobacter*依靠菌毛吸附于受体细胞表面，并定向侵入及作用于宿主细胞[71]。其中，编码菌毛的基因簇 sfp 与其黏附作用密切相关[72]，P菌毛则能够提高新生儿感染脑膜炎的发生率[73]。此外，研究发现*C. sakazakii* ES5 菌株中假定蛋白ESA_00281、ESA_00282与该菌黏附过程有关，鞭毛蛋白FlhA、FliG 和 FliC 参与介导*C. sakazakii* 的自凝集[74]。致病菌穿越肠道屏障后侵入宿主循环系统，引发宿主严重的系统性感染，进而穿透血脑屏障[75]。然而，亚抑制浓度的硫辛酸可以在*C. sakaza-*

kii 感染初期抑制该菌的泳动及群集，从而降低致病菌对宿主细胞的侵袭能力[68]。

4.2. 入侵

细菌入侵会扰乱宿主的免疫平衡，宿主往往通过免疫细胞的吞噬、清除及免疫因子、细胞黏液蛋白分泌等方式抑制宿主细胞异常凋亡、提高细胞间紧密连接蛋白表达来维持屏障的完整性[76]。*Cronobacter* 菌株可以侵入肠道上皮细胞，进入血液，进而转移到肝脏、脾脏等器官，并穿越血脑屏障进入大脑[77]。

*Cronobacter*产生的外膜蛋白、脂多糖、肠毒素、入侵和纤溶酶原激活物是入侵宿主的主要毒力因子。*Cronobacter*通过铁获取系统、阳离子外排系统、群体感应系统以及唾液酸的催化和利用等途径在宿主体内生存和繁殖，以加重其感染。

4.2.1. 外膜蛋白

研究表明，*Cronobacter*的侵袭过程与其外膜蛋白（outer membrane protein, OMP）密切相关，OMP是仅存

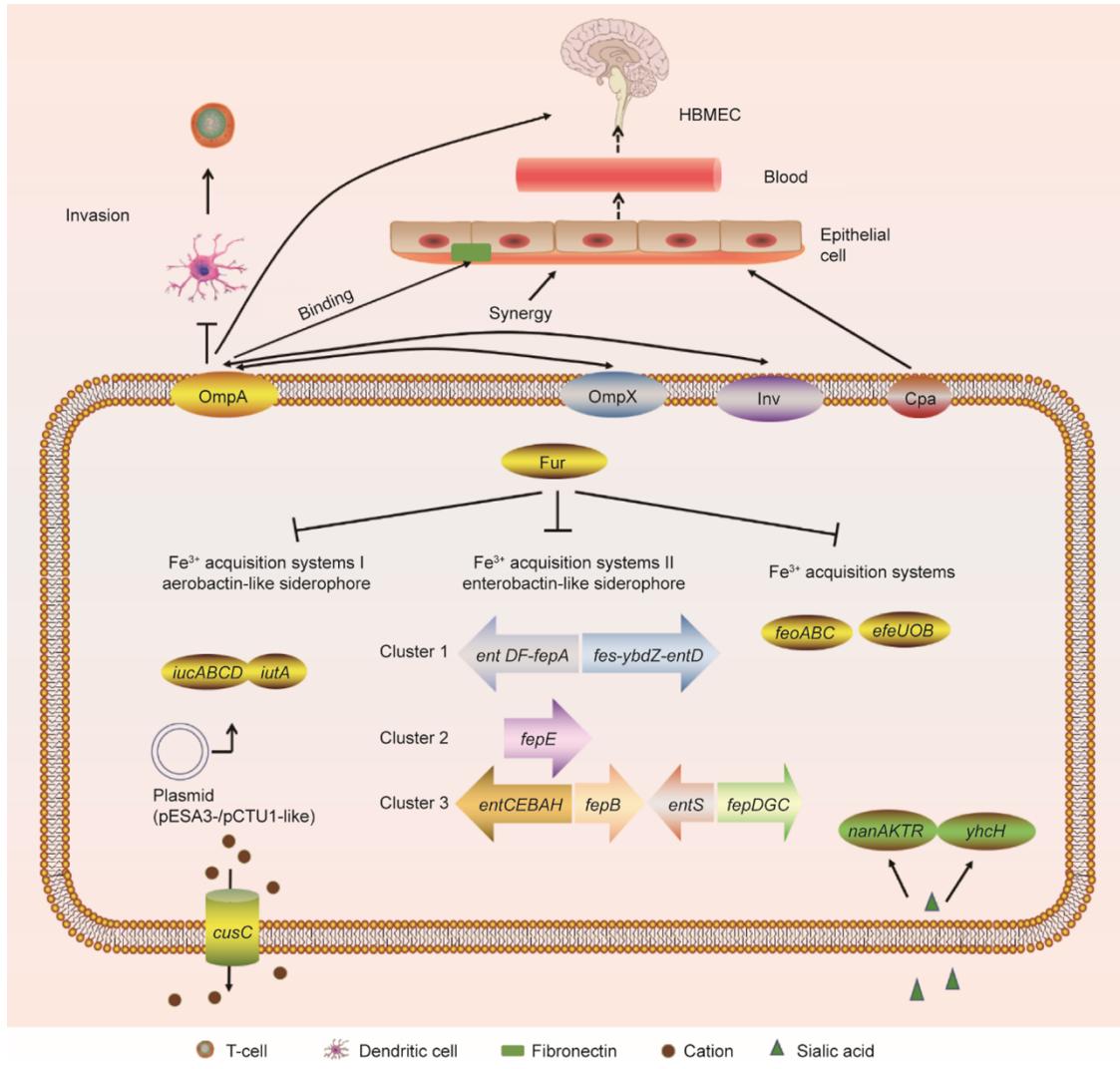


图4. *Cronobacter* 入侵宿主细胞的毒力因子。HBMEC: 人脑微血管内皮细胞。

在革兰氏阴性菌中的一组镶嵌在细菌外层磷脂双分子层中，能够维持细菌外膜结构完整以及形态正常的蛋白质。*Cronobacter* 的外膜蛋白 A (OmpA) 是噬菌体的结合位点，也是 F 菌毛介导的接合反应的中间体。Mittal 等[78]发现 *Cronobacter* 感染新生小鼠后，在所有死亡小鼠中均检测到 OmpA，并且伴有嗜中粒细胞渗漏、出血和神经胶质增生现象，表明携带 OmpA 的 *Cronobacter* 菌株可以成功穿越新生小鼠小肠屏障在血液中增殖，该蛋白可以结合纤连蛋白侵入 HBMEC，随后穿过血脑屏障诱导细胞凋亡，而侵入血脑屏障是细菌性脑膜炎的关键致病机制[79]。此外，Inv 和 OmpA 在体内外具有协同效应，Inv 能够介导 *C. sakazakii* 从基底外侧侵入宿主的内脏器官，增加 OmpA 的致病能力[80]。

外膜蛋白 X (OmpX) 是一种小分子的毒力蛋白，可以和 OmpA 协同参与 *C. sakazakii* 肠道组织的侵袭过程，*ompX* 缺失后菌株对 Caco-2 和 INT-407 细胞的侵袭黏附能

力明显降低[81]。近期，微阵列分析表明，*Cronobacter* 分泌的外膜囊泡 (outer membrane vesicle, OMV) 中包裹的具有毒性的 OMP 可能参与被肠道细胞吸收、增加细胞增殖并刺激宿主的先天促炎反应[82]。

4.2.2. 脂多糖

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 也被称为 O-抗原或内毒素，是嵌入革兰氏阴性细胞壁的外膜，当死亡或遭到物理化学攻击时才会释放的一种多糖物质。有研究表明，当体内含有适量的 LPS 时，可以激发机体的免疫反应提高免疫力，而高浓度或长期接触低浓度 LPS 则会破坏机体平衡，诱发糖尿病、脂肪肝等一系列炎症反应。摄入 LPS 可增加婴儿肠壁的通透性，导致细菌入侵继而全身感染。LPS 是 *Cronobacter* 一种非常重要的毒力因子，被细胞受体识别后会引起一系列级联反应及相关促炎性因子的表达，如 Toll 样受体 TLR2 或 TLR4，并往往伴随着细胞完

整性的破坏[69]。本课题组将提取的 *C. sakazakii* LPS 腹腔注射小鼠，发现 *C. sakazakii* LPS 会引发肠道菌群紊乱，且影响了肠道紧密连接蛋白（Claudin-4, Occludin）、TLR4 以及一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase, iNOS）的含量表达，使肠道组织受到不同程度的损伤（数据未发表）。值得注意的是，在 PIF 的加工过程中，具有一定耐热性的 LPS 难以被完全消除[69]。然而，目前并没有针对 PIF 中 *Cronobacter* LPS 量级检测及限量的相关安全标准。新生婴幼儿在先天免疫系统未成熟时，如果摄入含高水平 LPS 的奶粉，则会增加患菌血症或内毒素血症的风险。

4.2.3. 肠毒素

Pagotto 等[83]首次发现在测定的 18 株 *Cronobacter* 中，有 4 株菌产生类似肠毒素样化合物，其能与 LPS 协同作用引起炎症反应，同时可导致肠上皮细胞内 cAMP 水平升高，肠细胞内的水、钠离子、氯离子和碳酸氢钾连续分泌到管腔，导致腹泻。Raghav 等[84]用硫酸铵盐析处理后测得该肠毒素类似物的分子质量为 66 kDa，并且其在 90 °C 条件下处理 30 min 仍具有活性，该肠毒素类似物的强稳定性可能会加重 *Cronobacter* 污染 PIF 的致病风险。有研究证明，将 $10^4 \sim 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *Cronobacter* 注射到小鼠体内时，72 h 后小鼠存活率仅为 33%，而当致病菌含量达到 $10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，所有小鼠均死亡[85]。然而，编码该毒素的基因尚未确定，*Cronobacter* 肠毒素的性质和形成机制有待进一步研究。

4.2.4. 铁捕获系统

铁作为 *Cronobacter* 中一种重要的辅酶因子，参与了电子转移、细胞呼吸等一系列基本的新陈代谢活动。在缺铁环境中，*Cronobacter* 可产生具有高亲和力的铁载体来吸收环境中的 Fe^{3+} ，一旦通过特殊的铁捕获系统进入细胞质， Fe^{3+} 铁载体复合物会被还原成 Fe^{2+} 以供致病菌的生长，因此铁捕获机制在 *Cronobacter* 入侵感染宿主细胞过程中至关重要。Grim 等[86]对 231 株不同来源的 *Cronobacter* 菌株的铁捕获系统进行鉴定，发现为了获取 Fe^{3+} ，所有 *Cronobacter* spp. 基因组都具有编码气杆菌素样铁载体和肠杆菌素样铁载体的同源基因。其中气杆菌素样铁载体基因簇定位在类似 pESA3 和 pCTU1 质粒上，其基因簇由合成基因 *iucABCD* 和受体基因 *iutA* 同源的基因组成；而编码肠杆菌素样铁载体基因则定位在染色体上的三个不同位点上，分别为 *entD*、*sepA*、*fes*、*ybdZ*、*entF*、*entCEBAH*、*sepB*、*entS*、*sepDGC* 和 *sepE*，用于肠杆菌素铁载体的合成、转运以及在细胞内裂解释放主链中的铁。此外，为了

从环境中获取 Fe^{2+} ，*Cronobacter* spp. 基因组含有 *feoABC* 编码的 Feo 和 *efeUOB* 编码的 Efe 亚铁转运系统。然而，通常当铁摄取充足时，铁摄取调节蛋白（ferric uptake regulator, Fur）则结合至大多数铁转运系统的启动子区抑制铁转运系统的表达。Fur 是细菌参与调节金属离子摄取和细胞金属稳态的蛋白家族并负责控制细胞内铁的浓度。尽管铁是必需的，由于高浓度的铁会形成活性氧产生细胞毒性，因此在正常环境条件下铁的浓度范围必须加以控制。

4.2.5. 其他毒力因子

随着蛋白质组学和转录组学的进步发展，*Cronobacter* 的测序基因组揭示了一系列潜在的毒力因子，如表 1 所示。其中研究发现，只有 *C. sakazakii* 和部分 *C. turicensis* 含有可催化、利用唾液酸的基因 *nanAKTR* 和 *yhcH* [87]，可将存在于母乳、PIF、脑神经节苷脂等中的外源唾液酸转运到细胞质中并进行代谢，该过程会加重坏死性小肠结肠炎病症和新生儿脑膜炎期间的严重脑损伤。研究表明，在 *E. coli* K1 中可利用唾液酸在细胞表面形成荚膜来抵抗宿主免疫反应，而在 *C. sakazakii* 暂未发现该机制[88]。此外，*Cronobacter* 可产生大量由可拉酸（colonic acid, CA）和 K 抗原组成的胞外多糖，其中，K2:CA2 型荚膜可能是导致新生儿感染 *C. sakazakii* CC4 (clonal complex 4) 引发脑膜炎的重要因素之一[88]。然而，没有实验数据支持 *Cronobacter* 荚膜成分与脑膜炎之间的关系，K2:CA2 型荚膜是否参与该菌穿越血脑屏障尚不明确。因此，进一步了解 *Cronobacter* 的发病机制对预防和控制 *Cronobacter* 的感染至关重要。

Cronobacter 能产生抗血清杀菌活性的纤溶酶原激活因子[89]。Rpff 介导的 DSF 群体感应系统则通过调节细胞内环二鸟苷酸（c-di-GMP）水平来影响生物膜的形成、菌落形态及群集运动，在该菌黏附入侵过程中发挥重要作用[90]。

4.3. 诱导凋亡

Hunter 等[91]首次发现 *Cronobacter* 可能通过调节小鼠肠上皮细胞胞内信号通路来诱导细胞凋亡。在 *Cronobacter* 感染宿主过程中，一氧化氮（nitric oxide, NO）合成系统被激活，诱导肠上皮细胞 IEC-6 释放大量的 NO，引起细胞凋亡（图 5）。*Cronobacter* 引起的异常凋亡则会损害肠道屏障功能，增加肠屏障的通透性，进而导致细菌移位。而用保加利亚乳杆菌预处理 *Cronobacter* 感染的小鼠模型可以减少其 NO 的合成，降低肠上皮细胞 IEC-6 的凋亡。同样的，在 *Cronobacter* 侵袭 Caco-2 细胞之前增加

表1 *Cronobacter* spp. 已知毒力因子及作用

Virulence factor	Related genes	Functions
OMPs	<i>ompA, ompX</i>	Promoting adherence and invasion to host cells
Fimbriae	<i>sfp</i>	Promoting adherence to host cells
Flagellum	<i>fliA, fliG, fliC</i>	Participating in the automatic aggregation of pathogenic bacteria and chemotaxis
Sialic acid utilization	<i>nanAKRT, yhcH</i>	Contributing to colonization of intestinal tract by pathogenic bacteria and digestion of gangliosides
Efflux system	<i>cusC</i>	Encoding cation efflux operon, mediating invasion of brain microvascular endothelial cells
Iron acquisition systems	<i>Fur, iucABCD/ iutA, entD, fepA, fes, ybdZ, entF, entCEBAH, fepB, entS, fep-DGC, fepE, feoABC, efeUOB, eitCBAD</i>	Encoding iron acquisition systems and participating in pathogenic process together with plasminogen activator, <i>iucABCD/iutA</i> and <i>eitCBAD</i> are on a RepFIB plasmid
Plasminogen activator	<i>cpa</i>	Related to the resistance of serum and the spread and invasion of pathogenic bacteria
Diffusible signal factor (DSF) quorum-sensing	<i>rpfF</i>	Regulating c-di-GMP in cells and increasing the lethal rate

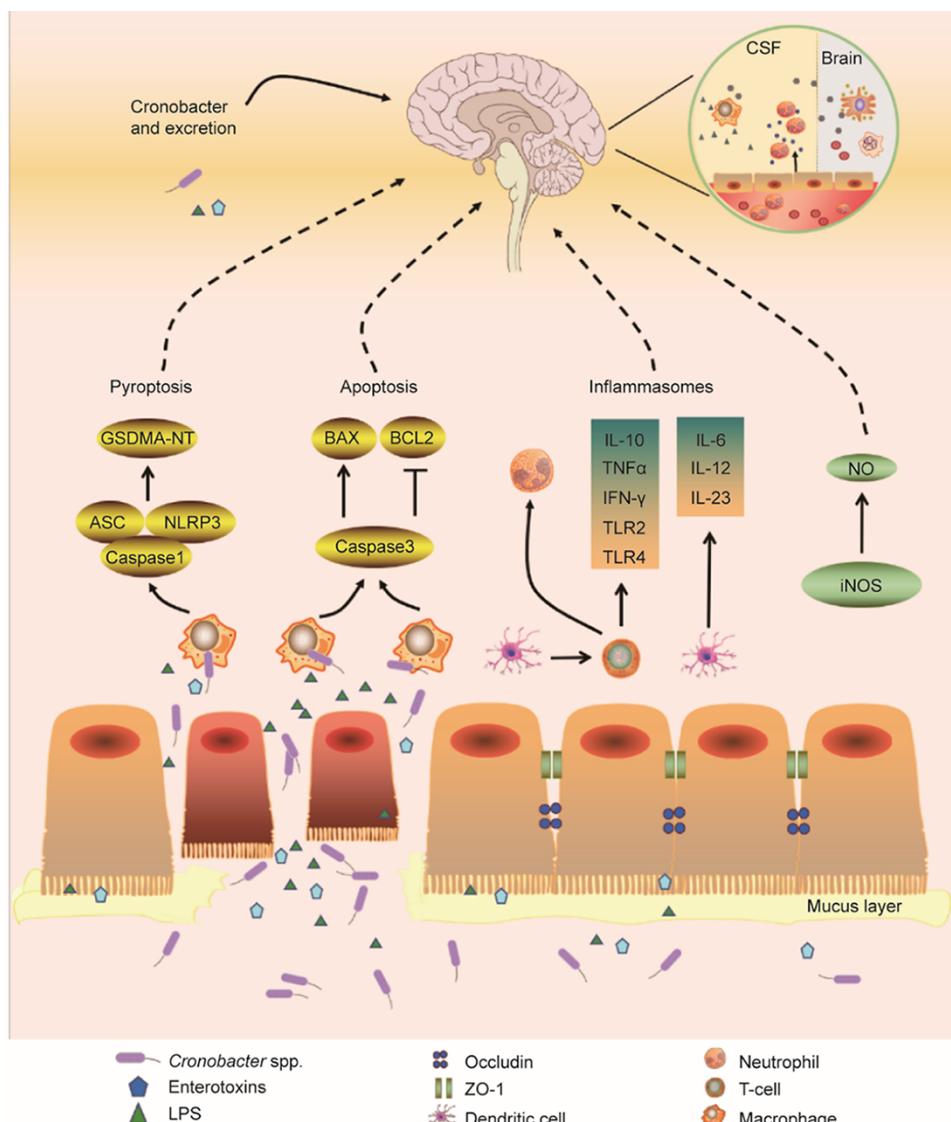


图5. *Cronobacter* spp. 引发的宿主细胞屏障与免疫反应。GSDMA: gasdermin A; NT: N端; ASC: 淀亡相关斑点样蛋白, 含有C端 caspase招募结构域; NLRP3: 含 pyrin 结构域 NOD 样受体家族 3; BCL: B 细胞淋巴瘤; BAX: BCL2 同源 X 蛋白; IL: 白介素; ZO: 紧密连接蛋白; TNF: 肿瘤坏死因子; IFN: 干扰素。

柠檬醛预处理，可显著降低细胞iNOS的表达及Caspase-3的酶活力，从而减少NO的产生和细胞凋亡，提高肠上皮细胞抵抗*C. sakazakii*引起炎症反应的能力[67]。

4.4. 免疫逃逸

*C. sakazakii*在人巨噬细胞U937中可存活96 h，在一段时期内甚至可以复制增殖[10]，引发宿主全身感染[77]。Townsend等[92]将*Cronobacter*注入新生小鼠脑内，发现浸润性巨噬细胞和嗜中性粒细胞形成炎症性聚集并吞噬致病菌，但大多数*Cronobacter*菌株仍可在小鼠巨噬细胞中生存48 h。*C. sakazakii*中*sod*基因可编码超氧化物歧化酶SOD，其活性会影响巨噬细胞的pH值，并与巨噬细胞中的活性氧发生中和反应降低宿主活性氧胁迫力，抵抗宿主免疫反应，从而提高*Cronobacter*的存活[93]。同时有研究表明，含有OmpA的*Cronobacter*可以干扰树突细胞的成熟，经其处理的树突细胞会诱导少量甚至无T细胞增殖来逃避强大的宿主免疫防御机制[94]。

*Cronobacter*感染主要通过5个关键过程引发病害：①降低紧密连接蛋白（occludin和ZO-1）表达；②通过NLRP3/caspase1/ASC信号通路诱导细胞凋亡；③通过caspase3信号通路诱导细胞凋亡；④激活炎症小体；⑤释放大量NO损伤细胞。

5. 展望

*Cronobacter*对所有年龄段人群都具有致病性，且危害大、致死率高。*Cronobacter*作为婴幼儿配方奶粉的“A”类致病菌，近年来因引发多起食品安全事件而备受世界卫生组织、国家政府以及消费人群的高度关注。因此，为了减少*Cronobacter*的传播与暴发，应进一步分析该致病菌的外源传播特征，发掘并靶向控制污染源以及提高食品安全检测标准。

目前，*Cronobacter*致病机制仍需深入阐明。首先，环境胁迫应答途径需要进一步研究，特别是食品加工处理可能诱发其响应机制。其次，携带K2:CA2型荚膜多糖的*Cronobacter*菌株被认为更易引起新生儿脑膜炎感染，然而，该现象是否存在因果关系尚不清楚。关于*Cronobacter*在特殊环境下相关蛋白质、基因的调控途径和代谢途径需要进一步阐明；其次，与*Cronobacter*致病性有关的毒力因子未完全发掘，且研究大多集中于单一的毒力因子的影响，而较少研究多种毒力因子的协同致病效应。此外，芳香性精油、多酚类化合物等抑菌物质和益生菌的应用，也可能是未来控制*Cronobacter*多重耐药菌株和耐药

传播出现的一项新策略。

致谢

我们非常感谢国家重点研发计划(2017YFC1601202和2017YFC1601200)、国家自然科学基金项目(31671951和31972175)、广东省“珠江人才计划”本土创新科研团队项目(2017BT01S174)、中央高校基本科研基金(JZ2020HGQA0151)提供的资金支持。

Compliance with ethics guidelines

Na Ling, Xiuting Jiang, Stephen Forsythe, Danfeng Zhang, Yizhong Shen, Yu Ding, Juan Wang, Jumei Zhang, Qingping Wu, and Yingwang Ye declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Forsythe SJ. Updates on the *Cronobacter* genus. *Ann Rev Food Sci Technol* 2018;9:23–44.
- [2] Iversen C, Mullane N, Mccardell B, Tall BD, Lehner A, Fanning S, 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. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58(6):1442–7.
- [3] Strysko J, Cope JR, Martin H, Tarr C, Bowen A. Food safety and invasive *Cronobacter* infections during early infancy, 1961 – 2018. *Emerg Infect Dis* 2020;26(5):857–65.
- [4] Alsonosi A, Hariri S, Kajsif M, Oriešková M, Hanulík V, Röderová M, et al. The speciation and genotyping of *Cronobacter* isolates from hospitalised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34(10):1979–88.
- [5] Chandrasekaran S, Burnham CD, Warner BB, Tarr PI, Wylie TN. Carriage of *Cronobacter sakazakii* in the very preterm infant gut. *Clin Infect Dis* 2018; 67(2):269–74.
- [6] Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. *Medicine* 2001;80(2): 113–22.
- [7] International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). *Microbiological testing in food safety management*. Boston: Springer; 2002.
- [8] Ling N, Jiang Y, Zeng H, Ding Y, Forsythe S. Advances in our understanding and distribution of the *Cronobacter* genus in China. *J Food Sci* 2021;86(2):276–83.
- [9] Burdette JH, Santos C. *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging. *Pediatr Radiol* 2000;30(1):33–4.
- [10] Blackwood BP, Hunter CJ. *Cronobacter* spp. In: Scheld WM, Hughes JM, Whitley RJ, editors. *Emerging infections 10*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2016. p. 255–63.
- [11] Lee HA, Hong S, Park H, Kim H, Kim O. *Cronobacter sakazakii* infection induced fatal clinical sequels including meningitis in neonatal ICR mice. *Lab Anim Res* 2011;27(1):59–62.
- [12] Townsend SM, Hurrell E, Gonzalez-Gomez I, Lowe J, Frye JG, Forsythe S, et al. *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain

- pathology in the neonatal rat. *Microbiology* 2007;153(10):3538–47.
- [13] Townsend SM, Hurrell E, Caubilla-Barron J, Loc-Carrillo C, Forsythe SJ. Characterization of an extended-spectrum beta-lactamase *Enterobacter hormaechei* nosocomial outbreak, and other *Enterobacter hormaechei* misidentified as *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*. *Microbiology* 2008;154 (12):3659–67.
- [14] Iversen C, Forsythe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Technol* 2003; 14(11):443–54.
- [15] Urmey AMC, White FA. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet* 1961;277(7172):313–5.
- [16] The Centers for Disease Control and Prevention. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula—Tennessee, 2001. *JAMA* 2002;287(17):2204–5.
- [17] Masood N, Moore K, Farbos A, Paszkiewicz K, Dickins B, McNally A, et al. Genomic dissection of the 1994 *Cronobacter sakazakii* outbreak in a French neonatal intensive care unit. *BMC Genomics* 2015;16:750.
- [18] Liu X, Pei X, Guo Y. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from infant formula powder samples collected from Fuyang, Anhui Province, China. *Chin J Food Hygiene* 2005;(1):10–2. Chinese.
- [19] Forsythe SJ. Chapter 13-new insights into the emergent bacterial pathogen *Cronobacter*. In: Ricke SC, Donaldson JR, Phillips CA, editors. *Food safety emerging issues, technologies and systems*. Pittsburgh: Academic Press; 2015. p. 265–308.
- [20] Henry M, Fouladkhah A. Outbreak history, biofilm formation, and preventive measures for control of *Cronobacter sakazakii* in infant formula and infant care settings. *Microorganisms* 2019;7(3):77.
- [21] Lu Y, Liu P, Li C, Sha M, Fang J, Gao J, et al. Prevalence and genetic diversity of *Cronobacter* species isolated from four infant formula production factories in China. *Front Microbiol* 2019;10:1938.
- [22] Jacobs C, Braun P, Hammer P. Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. *J Dairy Sci* 2011;94(8):3801–10.
- [23] Fei P, Man C, Lou B, Forsythe SJ, Chai Y, Li R, et al. Genotyping and source tracking of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonicus* isolates from powdered infant formula and an infant formula production factory in China. *Appl Environ Microbiol* 2015;81(16):5430–9.
- [24] Mullane NR, Whyte P, Wall PG, Quinn T, Fanning S. Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterise and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility. *Int J Food Microbiol* 2007;116(1):73–81.
- [25] Vasconcellos L, Carvalho CT, Tavares RO, de Mello MV, de Oliveira RC, Silva JN, et al. Isolation, molecular and phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. in ready-to-eat salads and foods from Japanese cuisine commercialized in Brazil. *Food Res Int* 2018;107:353–9.
- [26] Leclercq A, Wanegue C, Baylauc P. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(4):1631–8.
- [27] Turcovský I, Kuníková K, Drahotovská H, Kaclíková E. Biochemical and molecular characterization of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2011;99(2):257–69.
- [28] Ling N, Li C, Zhang J, Wu Q, Zeng H, He W, et al. Prevalence and molecular and antimicrobial characteristics of *Cronobacter* spp. isolated from raw vegetables in China. *Front Microbiol* 2018;9:1149.
- [29] Moravkova M, Verbikova V, Huvarova V, Babak V, Cahlikova H, Karpiskova R, et al. Occurrence of *Cronobacter* spp. in ready-to-eat vegetable products, frozen vegetables, and sprouts examined using cultivation and real-time PCR Methods. *J Food Sci* 2018;83(12):3054–8.
- [30] Huang Y, Pang Y, Wang H, Tang Z, Zhou Y, Zhang W, et al. Occurrence and characterization of *Cronobacter* spp. in dehydrated rice powder from Chinese supermarket. *PLoS ONE* 2015;10(7):e0131053.
- [31] Kandhai MC, Heuvelink AE, Reij MW, Beumer RR, Dijk R, van Tilburg JJHC, et al. A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in the Netherlands between 2001 and 2005. *Food Control* 2010;21(8):1127–36.
- [32] Liu M, Hu G, Shi Y, Liu H, Li J, Shan X, et al. Contamination of *Cronobacter* spp. Chinese retail spices. *Foodborne Pathog Dis* 2018;15(10):637–44.
- [33] Garbowska M, Berthold-Pluta A, Stasiak-Rózaniecka L. Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol* 2015;49:1–5.
- [34] Johler S, Stephan R, Hartmann I, Kuehner KA, Lehner A. Genes involved in yellow pigmentation of *Cronobacter sakazakii* ES5 and influence of pigmentation on persistence and growth under environmental stress. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(4):1053–61.
- [35] Koseki S, Nakamura N, Shiina T. Comparison of desiccation tolerance among *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *J Food Prot* 2015;78(1): 104–10.
- [36] Barron JC, Forsythe SJ. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula. *J Food Prot* 2007;70(9):2111–7.
- [37] Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J Appl Microbiol* 2003;95(5):967–73.
- [38] Srikumar S, Cao Y, Yan Q, Van Hoorn K, Nguyen S, Cooney S, et al. RNA sequencing-based transcriptional overview of xerotolerance in *Cronobacter sakazakii* SP291. *Appl Environ Microbiol* 2019;85(3):e01993–18.
- [39] Hu S, Yu Y, Wu X, Xia X, Xiao X, Wu H. Comparative proteomic analysis of *Cronobacter sakazakii* by iTRAQ provides insights into response to desiccation. *Food Res Int* 2017;100:631–9.
- [40] Riedel K, Lehner A. Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics. *Proteomics* 2007;7(8):1217–31.
- [41] Iversen C, Lane M, Forsythe SJ. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett Appl Microbiol* 2007;38:378–82.
- [42] Renner LD, Weibel DB. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull* 2011;36(5):347–55.
- [43] Zhang M, Zhang X, Tong L, Wang Y, Ou D, Zhang J, et al. Genes involved in tolerance to osmotic stress by random mutagenesis in *Cronobacter malonicus*. *J Dairy Sci* 2018;101(5):3851–8.
- [44] World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Geneva: World Health Organization; 2004.
- [45] Al-Holy MA, Lin M, Abu-ghoush MM, Al-qadiri HM, Rasco BA. Thermal resistance, survival and inactivation of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered and reconstituted infant formula. *J Food Safety* 2009;29(2): 287–301.
- [46] Cal-Sabater P, Caro I, Castro MJ, Cao MJ, Quinto EJ. Flow cytometry to assess the counts and physiological state of *Cronobacter sakazakii* cells after heat exposure. *Foods* 2019;8(12):688.
- [47] Asakura H, Morita-Ishihara T, Yamamoto S, Igimi S. Genetic characterization of thermal tolerance in *Enterobacter sakazakii*. *Microbiol Immunol* 2007;51(7): 671–7.
- [48] Orieskova M, Kajiski M, Szemes T, Holy O, Forsythe S, Turna J, et al. Contribution of the thermotolerance genomic island to increased thermal tolerance in *Cronobacter* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2016;109(3): 405–14.
- [49] Finn S, Condell O, McClure P, Amézquita A, Fanning S. Mechanisms of survival, responses and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Front Microbiol* 2013;4:331.
- [50] Arroyo C, Condón S, Pagán R. Thermobacteriological characterization of *Enterobacter sakazakii*. *Int J Food Microbiol* 2009;136(1):110–8.
- [51] Chauhan R, Bansal S, Azmi W, Goel G. Increased thermal tolerance in *Cronobacter sakazakii* strains in reconstituted milk powder due to cross protection by physiological stresses. *J Food Saf* 2020;40(4):e12810.
- [52] Maerani M, Dewanti-Hariyadi R, Nurjanah S. Expression of stress regulator and virulence genes of *Cronobacter sakazakii* strain Yrt2a as a response to acid stress. *Food Sci Biotechnol* 2020;29(9):1273–9.
- [53] Ling N, Zhang J, Li C, Zeng H, He W, Ye Y, et al. The glutaredoxin gene, *grxB*, affects acid tolerance, hydrophobicitysurface, auto-aggregation, and biofilm formation in *Cronobacter sakazakii*. *Front Microbiol* 2018;9:133.
- [54] Álvarez-Ordóñez A, Cummings C, Deasy T, Clifford T, Begley M, Hill C. Acid stress management by *Cronobacter sakazakii*. *Int J Food Microbiol* 2014;178: 21–8.
- [55] Alvarez-Ordóñez A, Begley M, Hill C. Selection for loss of *RpoS* in *Cronobacter sakazakii* by growth in the presence of acetate as a carbon source. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(6):2099–102.
- [56] Amalaradjou MAR, Venkitanarayanan K. Effect of trans-cinnamaldehyde on reducing resistance to environmental stresses in *Cronobacter sakazakii*. *Foodborne Pathog Dis* 2011;8(3):403–9.
- [57] Li C, Zeng H, Zhang J, He W, Ling N, Chen M, et al. Prevalence, antibiotic susceptibility, and molecular characterization of *Cronobacter* spp. isolated from edible mushrooms in China. *Front Microbiol* 2019;10:283.
- [58] Caubilla-Barron J, Hurrell E, Townsend S, Cheetham P, Loc-Carrillo C, Fayet O, 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 Clin Microbiol* 2007;45(12):3979–85.

- [59] Zeng HY, Lei T, He WJ, Zhang JM, Liang BS, Li CS, et al. Novel multidrugresistant *Cronobacter sakazakii* causing meningitis in neonate, China, 2015. *Emerg Infect Dis* 2018;24(11):2121–4.
- [60] Liu BT, Song FJ, Zou M, Hao ZH, Shan H. Emergence of colistin resistance gene mcr-1 in *Cronobacter sakazakii* producing NDM-9 and in *Escherichia coli* from the same animal. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(2):e01444–16.
- [61] Yang J, Liu L, Feng Y, He D, Wang C, Zong Z. Potential mobilization of mcr-10 by an integrative mobile element via site-specific recombination in *Cronobacter sakazakii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2021;65(2):e01717–20.
- [62] Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 2004;10:S122–9.
- [63] De Jong MG, Wood KB. Tuning spatial profiles of selection pressure to modulate the evolution of drug resistance. *Phys Rev Lett* 2018;120(23):238102.
- [64] Yelin I, Kishony R. Antibiotic resistance. *Cell* 2018;172(5):1136–1136.e1.
- [65] Weng MQ, Ganguli K, Zhu WS, Shi HN, Walker WA. Conditioned medium from *Bifidobacteria infantis* protects against *Cronobacter sakazakii*-induced intestinal inflammation in newborn mice. *Am J Physiol Gastr L* 2014;306(9):779–87.
- [66] Campana R, Federici S, Ciandrini E, Manti A, Baffone W. *Lactobacillus* spp. inhibit the growth of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 by altering its membrane integrity. *J Food Sci Technol* 2019;56(8):3962–7.
- [67] Shi C, Jin T, Guo D, Zhang W, Yang B, Su D, et al. Citral attenuated intestinal inflammation induced by *Cronobacter sakazakii* in newborn mice. *Foodborne Pathog Dis* 2020;17(4):243–52.
- [68] Shi C, Sun Y, Zhang X, Zheng Z, Yang M, Ben H, et al. Antimicrobial effect of lipoic acid against *Cronobacter sakazakii*. *Food Control* 2016;59:352–8.
- [69] Townsend S, Barron CJ, Loc-Carrillo C, Forsythe S. The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat. *Food Microbiol* 2007;24 (1):67–74.
- [70] Eshwar AK, Tasara T, Stephan R, Lehner A. Influence of FkpA variants on survival and replication of *Cronobacter* spp. in human macrophages. *Res Microbiol* 2015;166(3):186–95.
- [71] Mange JP, Stephan R, Borel N, Wild P, Kim KS, Pospischil A, et al. Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. *BMC Microbiol* 2006;6(1):58.
- [72] Cui J, Hu J, Du X, Yan C, Xue G, Li S, et al. Genomic analysis of putative virulence factors affecting cytotoxicity of *Cronobacter*. *Front Microbiol* 2019; 10:3104.
- [73] Grim CJ, Kotewicz ML, Power KA, Gopinath G, Franco AA, Jarvis KG, et al. Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation. *BMC Genomics* 2013;14(1):366.
- [74] Hoeflinger JL, Miller MJ. *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 autoaggregation requires FliC flagellation, not motility. *Front Microbiol* 2017;8:301.
- [75] Giri CP, Shima K, Tall BD, Curtis S, Sathyamoorthy V, Hanisch B, et al. *Cronobacter* spp. (previously *Enterobacter sakazakii*) invade and translocate across both cultured human intestinal epithelial cells and human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* 2012;52(2):140–7.
- [76] Fan H, Chen Z, Lin R, Liu Y, Wu X, Puthiyakunnon S, et al. *Bacteroides fragilis* strain ZY-312 defense against *Cronobacter sakazakii*-induced necrotizing enterocolitis *in vitro* and in a neonatal rat model. *mSystems* 2019;4(4):e00305–19.
- [77] Almajed FS, Forsythe SJ. *Cronobacter sakazakii* clinical isolates overcome host barriers and evade the immune response. *Microb Pathog* 2016;90: 55–63.
- [78] Mittal R, Wang Y, Hunter CJ, Gonzalez-Gomez I, Prasadrao NV. Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: a role for outer membrane protein A. *Lab Invest* 2009;89(3):263–77.
- [79] Mohan Nair K, Venkitanarayanan K, Silburt LK, Kim KS. Outer membrane protein A (OmpA) of *Cronobacter sakazakii* binds fibronectin and contributes to invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Foodborne Pathog Dis* 2009;6(4):495–501.
- [80] Chandrapala D, Kim K, Choi Y, Senevirathne A, Kang DH, Ryu S, 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. *Infect Immun* 2014;82(5):1755–65.
- [81] Kim K, Kim KP, Choi J, Lim JA, Lee J, Hwang S, et al. Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(15):5188–98.
- [82] Alzahrani H, Winter J, Boocock D, De Girolamo L, Forsythe SJ. Characterization of outer membrane vesicles from a neonatal meningitic strain of *Cronobacter sakazakii*. *FEMS Microbiol Lett* 2015;362(12):fnv085.
- [83] Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S, Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production *in vitro* and *in vivo*. *J Food Prot* 2003;66 (3):370–5.
- [84] Raghav M, Aggarwal PK. Purification and characterization of *Enterobacter sakazakii* enterotoxin. *Can J Microbiol* 2007;53(6):750–5.
- [85] Yang J, Wei L, Gu M, Fang X, Yang P. Identification of proteins involved in infectivity and enterotoxin production in *Enterobacter sakazakii*. *J Rapid Meth Aut Mic* 2009;17(2):164–81.
- [86] Grim CJ, Kothary MH, Gopinath G, Jarvis KG, Beaubrun JJ, McClelland M, et al. Identification and characterization of *Cronobacter* iron acquisition systems. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(17):6035–50.
- [87] Joseph S, Hariri S, Masood N, Forsythe S. Sialic acid utilization by *Cronobacter sakazakii*. *Microb Informatics* 2013;3(1):1–11.
- [88] Ogródzki 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. *BMC Genomics* 2015; 16(1):758.
- [89] Franco AA, Kothary MH, Gopinath G, Jarvis KG, Grim CJ, Hu L, et al. Cpa, the outer membrane protease of *Cronobacter sakazakii*, activates plasminogen and mediates resistance to serum bactericidal activity. *Infect Immun* 2011;79(4): 1578–87.
- [90] Suppiger A, Eshwar AK, Stephan R, Kaever V, Eberl L, Lehner A. The DSF type quorum sensing signalling system RpfF/R regulates diverse phenotypes in the opportunistic pathogen *Cronobacter*. *Sci Rep* 2016;6(1):18753.
- [91] Hunter CJ, Williams M, Petrosyan M, Guner Y, Mittal R, Mock D, et al. *Lactobacillus bulgaricus* prevents intestinal epithelial cell injury caused by *Enterobacter sakazakii*-induced nitric oxide both *in vitro* and in the newborn rat model of necrotizing enterocolitis. *Infect Immun* 2009;77(3):1031–43.
- [92] Townsend S, Hurrell E, Forsythe S. Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. *BMC Microbiol* 2008;8(1):64.
- [93] Amalaradjou MAR, Kim KS, Venkitanarayanan K. Sub-inhibitory concentrations of trans-cinnamaldehyde attenuate virulence in *Cronobacter sakazakii* *in vitro*. *Int J Mol Sci* 2014;15(5):8639–55.
- [94] Mittal R, Bulgheresi S, Emami C, Prasadrao NV. *Enterobacter sakazakii* targets DC-SIGN to induce immunosuppressive responses in dendritic cells by modulating MAPKs. *J Immunol* 2009;183(10):6588–99.