

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.01.005

89 株蜡样芽孢杆菌食品分离株携带毒力基因情况及 PFGE 分型研究^{*}卢晓芸¹, 施怡茹¹, 吴丽珠¹, 高红梅¹, 郁 晞¹, 庄 源², 张红芝², 徐秋芳^{1△}

1. 上海市青浦区疾病预防控制中心, 上海 201799; 2. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336

摘要:目的 了解上海市青浦区食品中蜡样芽孢杆菌污染情况、蜡样芽孢杆菌毒力基因的携带情况及脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型。方法 参照 GB4789.14—2014 对 729 份食品样品(包含熟制米面制品、熟肉制品、学生午餐、酱料、蔬菜)进行蜡样芽孢杆菌的分离鉴定、生化分型;应用 PCR 对检出的蜡样芽孢杆菌进行 9 种腹泻毒素毒力基因和 1 种呕吐毒素毒力基因检测;使用 PFGE 分型方法及 BioNumerics 5.10 软件进行聚类分析。结果 该研究 729 份食品样品中检出 89 株蜡样芽孢杆菌,检出率为 12.21%,其中熟制米面制品中蜡样芽孢杆菌检出数最多、检出率最高(35 株,16.83%),生化分型以 2 型为主。9 株菌株携带所有腹泻毒素毒力基因,14 株携带呕吐毒素基因 *ces*。PFGE 结果显示,89 株菌株可分为 85 个带型,Not I 酶切可得 5~12 条 DNA 片段,存在带型完全一致菌株。结论 上海市青浦区熟制米面制品、熟肉制品、学生午餐等食品中均能检出蜡样芽孢杆菌且毒力基因携带率较高,存在同地点采样不同样品受相同菌株污染的情况,需加强食品的常规监测,预防食品受污染后引起的食源性疾病,保障公众食品安全,排除潜在食源性风险。

关键词:蜡样芽孢杆菌; 毒力基因谱; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型

中图法分类号:R155.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)01-0018-04

Study on virulence genes carrying status and PFGE typing of 89 strains of
Bacillus cereus isolated from foods^{*}

LU Xiaoyun¹, SHI Yiru¹, WU Lizhu¹, GAO Hongmei¹, YU Xi¹,
ZHUANG Yuan², ZHANG Hongzhi², XU Qiufang^{1△}

1. Qingpu District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 201799, China;

2. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China

Abstract: **Objective** To understand the contamination, virulence genes carrying and typing of pulsed field gel electrophoresis (PFGE) in *Bacillus cereus* (*B. cereus*) isolated from foods in Qingpu District of Shanghai City. **Methods** Referring to GB4789.14—2014, 729 food samples (including cooked rice and noodle products, cooked meat products, school lunches, sauces, vegetables) conducted the isolation, identification and biochemical typing of *B. cereus*. A total of 9 kinds of diarrhea toxin virulence genes and 1 vomiting toxin virulence gene in detected *B. cereus* were detected by PCR; the clustering analysis was performed by using the PFGE typing method and BioNumerics 5.10 software. **Results** Among 729 food samples in this study, 89 strains of *B. cereus* were detected with a detection rate of 12.21%, in which the number of *B. cereus* detected in cooked rice and noodle products, and the detection rate were the highest (35 strains, 16.83%), and the biochemical type was dominated by the type II. A total of 9 strains carried all diarrhea related virulence genes, and 14 strains carried the vomiting virulence gene (*ces*). The PFGE results showed that 85 strains could be classified into 85 band patterns, Not I digestion could obtain 5—12 DNA fragments, and the strains with completely identical band patterns existed. **Conclusion** *B. cereus* could be detected in the foods of cooked rice and noodle products, cooked meat products, school lunches in Qingpu District, moreover the virulent gene carrying rate is higher, the condition of same strain of bacterium contaminating different samples taken from the same location exists. It is needed to strengthen the routine monitoring of foods, prevent the food-borne diseases caused by food contamination to safeguard the public food safety and eliminate the potential food-borne risks.

Key words: *Bacillus cereus*; virulence gene profile; pulsed field gel electrophoresis; molecular typing蜡样芽孢杆菌为兼性厌氧的革兰阳性芽孢杆菌, 是重要的食源性条件致病菌^[1-3], 能引起腹泻、呕吐、^{*} 基金项目: 上海市青浦区卫生健康委员会科研课题(W2019-34); 上海市青浦区卫生健康系统第四轮人才培养基金项目(WD2019-18)。

作者简介: 卢晓芸, 女, 主管技师, 主要从事食品微生物和 PCR 研究。 △ 通信作者, E-mail: 39850233@qq.com。

眼部疾病、败血症等疾病,甚至导致患者死亡^[4-5]。其常污染米面制品、肉制品、蔬菜等,尤其是富含蛋白质、碳水化合物的食物。国家食源性疾病监测数据显示,该菌引起的相关食源性疾病仍存在未被报告或被误诊的情况(蜡样芽孢杆菌呕吐型和腹泻型的症状类似于金黄色葡萄球菌或产气荚膜梭菌引起的食物中毒)^[6],导致其相关食源性疾病事件统计数低于实际事件数。毒力基因和脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术能在食源性疾病暴发调查中对致病菌进行分子分型和毒力基因鉴定。

本研究建立上海市青浦区蜡样芽孢杆菌毒力基因检测方法和 PFGE 分型检测方法,并对 2016—2020 年 729 份样品进行检测,了解青浦区蜡样芽孢杆菌毒力基因和 PFGE 分型,结合污染情况对蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒风险进行评估,减少因蜡样芽孢杆菌引起的食品安全问题。

1 材料与方法

1.1 菌株和样品来源 对 2016—2020 年 729 份样品(包含熟制米面制品 208 份、学生午餐 260 份、熟肉制品 84 份、酱料 78 份、蔬菜 99 份)进行蜡样芽孢杆菌检测,分离得到 89 株蜡样芽孢杆菌。样品采样分别涉及餐饮服务环节(70 份)、学生餐配送公司环节(260 份)、流通环节(399 份)3 个环节。本研究使用蜡样芽孢杆菌标准菌株 CICC23828 作为阳性对照菌株和 PFGE 实验条件优化的质控菌株。

1.2 仪器与试剂 主要仪器包括 PCR 扩增仪(ABI,美国),以及普通电泳仪、PFGE 仪、凝胶成像系统等(Bio-Rad,美国)。主要试剂包括甘露醇卵黄多黏菌素(MYP)琼脂、血平板等(上海科玛嘉生物科技有限公司,中国)。PCR 反应体系 2×Taq PCR Master mix(BBI,美国)、PCR 引物及 DNA 相对分子质量标准(50~1 200 kb,上海生工生物,中国)。限制性内切酶 Xba I 和 Not I、蛋白酶 K(Takara,日本)、Seakem Gold 琼脂糖(Lonza,瑞士)。

1.3 方法

1.3.1 检定 按照国家食品安全标准(GB4789.14-2014 现行有效标准),使用 MYP 琼脂分离样品中的可疑菌落,使用血平板划线分离单个纯菌落,进行常规生化试验和确证试验,同时使用全自动微生物生化系统进行鉴定。对菌株进行生化分型试验[过氧化氢酶试验、动力试验、硝酸盐还原试验、酪蛋白分解试验、溶菌酶耐性试验、V-P 试验、葡萄糖利用(厌氧)试验、根状生长试验、溶血试验、蛋白质毒素结晶试验]。

1.3.2 毒力基因检测 普通 PCR 电泳法检测蜡样芽孢杆菌腹泻毒素毒力基因片段、呕吐毒素毒力基因片段(溶血性基因 hblA、hblC、hblD,非溶血性基因 nheA、nheB、nheC,肠毒素基因 entFM、bceT,细胞毒素基因 cytK,呕吐毒素基因 ces)^[3]。PCR 条件:预变性 94℃ 4 min,变性 94℃ 30 s,退火 54℃ 30 s,延伸

72℃ 1 min,40 个循环;最后延伸 72℃ 10 min^[7]。PCR 扩增产物电泳:产物 5 μL,120 V 电泳 30 min。同时设蜡样芽孢杆菌标准菌株 CICC23828 作为阳性对照菌株。所用引物序列及 PCR 产物大小^[1,8-9]见表 1。

表 1 蜡样芽孢杆菌毒力基因引物序列和产物大小		
基因	引物序列(5'—3')	产物大小 (bp)
hblA	F:ATTAAATACAGGGGATGGAGAACTT	237
	R:TGATCCTAATACTTCTTCTAGACGCTT	
hblC	F:CCTATCAATACTCTCGCAACACCAAT	386
	R:TTTCTCTGATTCTGTCATAGCCATTCT	
hblD	F:AGATGCTACAAGACTTCAAAGGGAACTAT	436
	R:TGATTAGCACGATCTGCTTTTCACTT	
nheA	F:ATTACAGGGTTATTGGTTACAGCAGT	475
	R:AATCTTGCTCCATACTCTCTTGGATGCT	
nheB	F:CTGCAGCAGCTGTAGGCGGT	328
	R:ATGTTTTTCCAGCTATCTTTTCGCAAT	
nheC	F:GCGGATATTGTAAAGAATCAAAATGAGGT	557
	R:TTTCCAGCTATCTTTCGCTGTAIGTAAAT	
entFM	F:CAAAGACTTCGTAACAAAAGGTGGT	290
	R:TGTTTACTCCGCCTTTTACAACTT	
bceT	F:GACTACATTCACGATTACGCAGAA	701
	R:CTATGCTGACGAGCTATATCCATA	
cytK	F:CGACGTCACAAGTTGTAACA	565
	R:CGTGTGTAAATATCCAGTT	
ces	F:GCATTTCTGTGAAGCAGAGGT	699
	R:CCCTTTATCCCTTCGATGT	

注:F 为正向引物,R 为反向引物。

1.3.3 PFGE 分型试验 参考黄铭珊^[1]及张慧娟等^[10]的研究,PFGE 方案如下:(1)小胶块。取新鲜菌落用 TE 制备 5.0 麦氏浊度的菌悬液。取 400 μL 菌悬液加入 8 μL 溶菌酶(100 μg/μL,下文水平相同),37℃ 水浴 20 min。加入 20 μL 蛋白酶 K(20 μg/μL)和 400 μL 1% Seakem Gold 琼脂糖(TE 和 SeaKem Gold agarose 制备,54℃ 水浴 30 min 以上)轻柔混匀后,加入模具,4℃ 凝固 5 min。(2)裂解细胞。使用 TE 和溶菌酶处理小胶块(每管 5 mL TE 和 25 μL 溶菌酶,37℃ 水浴,170 r/min 振荡摇晃 4~6 h)。(3)消化蛋白。取出充分裂解的小胶块,使用细胞裂解液 CLB 和蛋白酶 K 处理小胶块(每管 5 mL CLB 和 25 μL 蛋白酶 K,54℃ 水浴,170 r/min 振荡摇晃 18 h)。(4)洗胶块。使用纯水和 TE 分别 54℃ 水浴后 170 r/min 振荡摇晃洗涤 15 min(先纯水洗 2 次,后 TE 洗 4 次)。(5)酶切。选择 Not I 酶切实验菌株小胶条,20 U Not I 在 37℃ 酶切 4 h。沙门菌 H9812 小胶块用 50 U Xba I 在 37℃ 酶切 2 h。(6)电泳。0.5×

TBE 电泳液 2 000 mL,初始转换时间 5 s,最终转换时间 80 s,电压为 6.0 V/cm,脉冲夹角为 120°,电泳时间为 18 h。(7)图像获取。电泳完成后将凝胶用 GelRed 溶液染色 30 min,纯水脱色 20 min,使用 Bio-Rad 成像系统成像。图谱使用 BioNumerics5.10 软件处理。聚类图结果根据非加权配对算术平均法(UPGMA)构建,条带的位置差异容许度设置为 1.0%,电泳条带相似性系数以 Dice 系数表示。

2 结 果

2.1 蜡样芽孢杆菌的来源分析 89 株蜡样芽孢杆菌检出情况:熟制米面制品中检出 35 株,学生午餐中检出 29 株,熟肉制品中检出 13 株,酱料中检出 5 株,蔬

菜中检出 7 株,检出率分别为 16.83%(35/208)、11.15%(29/260)、15.48%(13/84)、6.41%(5/78)、7.07%(7/99)。各类型食品检出率差异有统计学意义($\chi^2=10.13,P=0.038$)。样品采样涉及餐饮服务环节、学生餐配送公司环节、流通环节,各环节检出率分别为 35.71%(25/70)、11.15%(29/260)、8.77%(35/399),差异有统计学意义($\chi^2=40.75,P<0.01$)。

2.2 蜡样芽孢杆菌的鉴定结果 89 株菌株确证试验均符合蜡样芽孢杆菌生化特征,定量结果均小于 10⁵ CFU/g,后续进行生化分型试验(以 2 型为主),结果见表 2。确证试验和生化分型试验全部完成所需时长为 6 d。

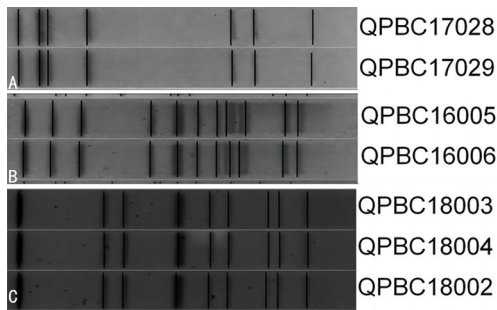
表 2 89 株蜡样芽孢杆菌的生化分型结果(n)

样品来源	1 型	2 型	4 型	5 型	8 型	9 型	10 型	11 型	12 型	13 型	14 型
熟制米面制品*	3	14	0	1	4	5	2	2	1	0	1
学生午餐	1	19	1	0	6	1	1	0	0	0	0
熟肉制品*	0	3	1	0	3	3	0	0	0	2	0
酱料	0	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0
蔬菜	0	3	0	0	2	2	0	0	0	0	0
合计	4	42	2	2	16	11	3	2	1	2	1

注:*指 2 份熟制米面制品和 1 份熟肉制品不能依据 GB4789.14—2014 分型。

2.3 蜡样芽孢杆菌的毒力基因检测结果 89 株蜡样芽孢杆菌中,hblA、hblC、hblD 基因都携带的蜡样芽孢杆菌有 38 株(42.70%),均不携带 27 株(30.34%),剩余 24 株菌株(26.96%)均携带 hblA、hblC、hblD 中的 1~2 种,携带 hblC 基因的菌株最多(60.67%)。nheA、nheB、nheC 基因都携带的菌株有 50 株(56.18%),39 株均携带 nheA、nheB、nheC 基因中至少一种(43.82%),携带 nheB 基因的菌株最多(88.76%)。entFM、bceT、cytK、ces 这 4 种基因携带情况分别为 71.91%、38.20%、41.57%、15.73%。各类型毒力基因(hblA、hblC、hblD、nheA、nheB、nheC、entFM、bceT、cytK、ces)携带情况不同。有 9 株菌株为腹泻强毒株(仅不携带 ces 基因),15 株同时携带肠毒素基因 entFM、bceT 和细胞毒素基因 cytK,有 14 株携带呕吐毒素基因 ces,该 38 株菌株均来自熟制米面制品、学生午餐、熟肉制品。

2.4 蜡样芽孢杆菌的 PFGE 分型结果 对 89 株蜡样芽孢杆菌进行 PFGE 和聚类分析,可分为 85 个带型,见图 1。NotI 酶切可得 5~12 条 DNA 片段。编号为 QPBC16005 和 QPBC16006 的菌株、QPBC17028 和 QPBC17029 的菌株,图谱相似度为 100%,QPBC18002、QPBC18003 和 QPBC18004 3 株菌株图谱相似度为 100%,为 3 种带型,且均分别源自同时时间同一采样地点的不同样本,其余 82 株带型之间均存在不同程度差异。



注:A 为 QPBC17028 和 QPBC17029 的 PFGE 图谱;B 为 QPBC16005 和 QPBC16006 的 PFGE 图谱;C 为 QPBC18002、QPBC18003 和 QPBC18004 的 PFGE 图谱。

图 1 89 株蜡样芽孢杆菌中用 Not I 酶切的相似度为 100% 的菌株 PFGE 图谱

3 讨 论

本研究对上海市青浦区 2016—2020 年 5 类 729 份食品进行检测,共检出蜡样芽孢杆菌 89 株,检出率为 12.21%,且菌含量低于国家致病菌限量(10⁵ CFU/g),低于我国 39 个城市的蜡样芽孢杆菌的总检出率(35.00%^[11]),以及吉林市的 32.90%^[12]、宝鸡市的 17.65%^[13],提示本地区蜡样芽孢杆菌污染具有地区 and 食品种类特色。受污染样品来源以餐饮服务环节为主,提示应加强餐饮服务环节的菌株污染监测。本地区食品检出蜡样芽孢杆菌以熟制米面制品、学生午餐、熟肉制品为主,与王伟等^[14]、HUSSEIN 等^[15]研究蜡样芽孢杆菌主要污染对象的结论一致,这些食品类别作为即食性食品引起食源性疾病风险较高,提示

青浦区需要关注即食性食品在餐饮服务环节被污染。

本研究确证试验和生化分型试验结果证明,青浦区流行生化株为蜡样芽孢杆菌 2 型,提示应对该流行生化分型多加关注。本研究发现生化分型数据有助于菌株来源分析,但操作复杂、试剂繁多、所需时间长,且存在不能分型的菌株,后续通过毒力基因 PCR(小于 24 h)和 PFGE(小于 60 h)对此加以补充,探讨快速确定菌株型别、加快事件分析速度的试验选择,提升检测效率。

本地区毒力基因携带情况呈多样化:89 株蜡样芽孢杆菌中 *nheA*、*nheB*、*nheC* 任意一种基因携带率高达 100.00%,与 KONG 等^[16]、YU 等^[17] 研究中 *nhe* 基因的携带情况高度一致;腹泻相关基因 *hblA*、*hblC*、*hblD* 3 种基因均携带率和 *nheA*、*nheB*、*nheC* 3 种基因均携带率分别为 42.70%、56.18%,其产生的溶血素和非溶血素会导致强烈腹泻;张红芝等^[4] 的研究提示携带 *ces* 呕吐毒素基因簇的菌株是引起呕吐型食源性疾病的潜在因子,而本研究中蜡样芽孢杆菌携带呕吐毒素基因 *ces* 高达 14 株且均污染即食性食品(熟制米面制品、学生午餐、熟肉制品),增加了发生食源性疾病的风险。以上提示本区域应加强食品风险监测和食品安全管理,并应对区域内腹泻和呕吐事件多加关注。

PFGE 结果显示,青浦区蜡样芽孢杆菌分子分型呈现多态性。同时,蜡样芽孢杆菌菌株编号为 QP-BC16005 和 QPBC16006 两株、QPBC17028 和 QP-BC17029 两株、QPBC18002、QPBC18003 和 QP-BC18004 3 株的 PFGE 图谱相似度为 100%,分别为 3 种带型,均分别源自同时间同一采样地点不同样本,均污染即食性食品,是食品操作环节不当导致的交叉污染(受到相同菌株污染),提示 PFGE 分型可以实现食品污染的有效溯源,且本区域需提高食品操作环节卫生要求。剩余 82 株蜡样芽孢杆菌的条带类型分布表明菌株之间无明显聚集性,说明青浦区蜡样芽孢杆菌在遗传特征上目前仍呈高度多样性。

综上所述,本研究分析了蜡样芽孢杆菌在青浦区的污染情况、生化分型、呕吐和腹泻相关的毒力基因携带情况、PFGE 分型结果,分析污染食品的潜在风险,探讨快速确定菌株型别检测方法的选择,为评估青浦区食品中蜡样芽孢杆菌污染危害提供重要数据支持。

参考文献

- [1] 黄铭珊.蜡样芽孢杆菌多重 PCR 快速检测及 PFGE 分型[D].福州:福建医科大学,2016.
- [2] 李红秋,郭云昌,宋壮志,等.2019 年中国大陆食源性疾病

- 暴发监测资料分析[J].中国食品卫生杂志,2021,33(6):650-656.
- [3] LIU J K,BAI L,LI W W,et al. Trends of foodborne diseases in China:lessons from laboratory-based surveillance since 2011[J]. Front Med,2018,12(1):48-57.
- [4] 张红芝,刘雪薇,顾其芳,等.基于全基因组测序的蜡样芽孢杆菌食品分离株分子特征及耐药性研究[J].中国食品卫生杂志,2021,33(5):529-535.
- [5] 包海燕,岳喜庆,武俊瑞,等.基于实时荧光 PCR 技术快速检测饲料中的蜡样芽孢杆菌[J].沈阳农业大学学报,2020,51(3):349-354.
- [6] 刘帅.蜡样芽孢杆菌核酸检测方法的研究及其在食品安全评价中的应用[D].青岛:青岛科技大学,2020.
- [7] 王艳燕,张慧娟,冯桃,等.海口市 5 类食品中蜡样芽孢杆菌药敏和毒力基因检测及分子分型研究[J].中国食品卫生杂志,2020,32(2):170-174.
- [8] 闫绍飞,闫旭,甘辛,等.我国市售婴儿配方乳粉中蜡样芽孢杆菌污染及其毒力基因调查[J].中国食品卫生杂志,2015,27(3):286-291.
- [9] EBRAHIM R,FAHIMEH A,HASSAN M. Bacillus cereus in infant foods:prevalence study and distribution of enterotoxigenic virulence factors in Isfahan Province, Iran[J]. Scient World J,2013,73(5):292-295.
- [10] 张慧娟,潘琢,魏建春,等.中国蜡样芽孢杆菌脉冲场凝胶电泳标准化技术的建立与应用[J].疾病监测,2015,30(5):411-414.
- [11] 王琼,马红梅,曾瑾,等.食源性蜡样芽孢杆菌的危害及其检测方法研究进展[J].中国食品卫生杂志,2021,33(5):633-637.
- [12] 赵薇,孙景昱,刘思洁,等.吉林省 2011—2015 年食品中蜡样芽孢杆菌污染监测数据分析[J].食品安全质量检测学报,2018,9(5):1190-1194.
- [13] 张丽萍,高涛,魏雯,等.2018—2020 年宝鸡市食品中蜡样芽孢杆菌污染状况的调查研究[J].医学动物防制,2021,37(12):1128-1131.
- [14] 王炜,江晓,叶艳华,等.2012—2017 年南京市部分餐饮食品中 5 种常见食源性致病菌污染状况监测与分析[J].医学动物防制,2022,38(1):87-90.
- [15] HUSSEIN M,SADEK O,EI TAHER S. Occurrence of Bacillus cereus and Staphylococcus aureus organisms in some dairy desserts[J]. Assiut Veter Med J,2015,61(145):160-166.
- [16] KONG L,YU S B,YUAN X M,et al. An investigation on the occurrence and molecular characterization of Bacillus cereus in meat and meat products in China[J]. Food Pathog Dis,2021,18(5):306-314.
- [17] YU S,YU P,WANG J,et al. A study on prevalence and characterization of Bacillus cereus in ready-to-eat foods in China[J]. Front Microbiol,2020,10:3043.