

实验技术与方法

温州地区蜡样芽胞杆菌分型特征研究

李毅,章乐怡,洪程基,胡玉琴

(温州市疾病预防控制中心,浙江温州 325000)

摘要:目的 了解温州地区不同来源蜡样芽胞杆菌毒力基因分布、生化分型和多位点序列分型(MLST)特征。方法 参照 GB 4789.14—2014 对 127 株蜡样芽胞杆菌进行鉴定和生化分型,同时采用 PCR 方法检测 10 种毒力基因,并进行 MLST 基因分型。结果 127 株蜡样芽胞杆菌同时携带 *NheA*、*NheB*、*NheC* 基因的菌株占 94.5% (120/127),而同时携带 *hblA*、*hblC*、*hblD* 基因的占 9.4% (12/127),携带 *ces* 基因的占 7.9% (10/127);127 株菌株除 10 株不能进行生化分型外,其余 117 株分为 2 型(0.8%, 1/127)、5 型(3.9%, 5/127)、8 型(1.6%, 2/127)、9 型(63.8%, 81/127)和 10 型(22.0%, 28/127);通过 MLST 分析,72 株菌株共分为 28 个 ST 序列型,ST26(18.1%, 13/72)、ST144(15.3%, 11/72)、ST92(6.9%, 5/72)和 ST164(6.9%, 5/72)为常见 ST 型别。28 个 ST 型聚类分析显示温州地区蜡样芽胞杆菌分为 4 个序列群和 13 个单态群。结论 温州地区蜡样芽胞杆菌毒力基因携带率较高,遗传关系具有多样性。

关键词:蜡样芽胞杆菌;生化分型;毒力基因;多位点序列分型;食品污染物;食源性疾病

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)02-0172-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.02.012

Virulence genes, biochemical typing and MLST analysis of *Bacillus cereus* from different sources in Wenzhou

LI Yi, ZHANG Le-yi, HONG Cheng-ji, HU Yu-qin

(Wenzhou Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Wenzhou 325000, China)

Abstract: Objective To investigate the virulence genes, biochemical typing and multilocus sequence typing (MLST) distribution of *Bacillus cereus* from different sources in Wenzhou. **Methods** 127 strains of *Bacillus cereus* were identified and biochemical typed according to GB 4789.14-2014. Ten virulence genes were detected with polymerase chain reaction (PCR). Genetic typing was conducted with MLST. **Results** Of 127 isolates, *NheA*, *NheB* and *NheC* genes were accounted for 94.5% (120/127) and *hblA*, *hblC* and *hblD* genes were accounted for 9.4% (12/127). The emetic toxin gene was detected in 10 isolates (7.9%). Except 10 isolates which could not be typed, the rest 117 isolates were classified into type 2 (0.8%), type 5 (3.9%), type 8 (1.6%), type 9 (63.8%) and type 10 (22.0%) by biochemical typing. Seventy-two isolates could be classified into 28 sequence types (STs). ST26 (18.1%), ST144 (15.3%), ST92 (6.9%) and ST164 (6.9%) were the common STs. Cluster analysis on 28 STs generated four MLST groups and 13 singletons. **Conclusion** The positive rate of virulence genes was high in *Bacillus cereus* isolated from different sources in Wenzhou, and the genetic relationship was diverse.

Key words: *Bacillus cereus*; biochemical typing; virulence genes; multilocus sequence typing; food contaminant; foodborne diseases

蜡样芽胞杆菌是一种产芽胞的革兰阳性杆菌,广泛存在于环境和肉制品、汤、蔬菜及奶制品、米饭和面食等多种食品中,可引起腹泻型和呕吐型两种不同临床类型的食源性疾病^[1-2]。腹泻型食源性疾病的食物来源包括肉制品、汤、蔬菜及奶制品等,呕吐型食源性疾病的主要食物是

米饭和面食^[3]。

蜡样芽胞杆菌因其芽胞耐热在食品加工热处理后部分残留,食物保存不当可促使残留的芽胞萌发并大量繁殖产生多种毒素导致食源性疾病。蜡样芽胞杆菌引起食源性疾病的主要致病物质是其产生的两种肠毒素:致呕吐型肠毒素和致腹泻型肠毒素,与呕吐相关的毒力基因为呕吐毒素(*ces*)基因,与腹泻相关的毒力基因主要为溶血致死性肠毒素 BL(*Hbl*)*hblA*、*hblC* 和 *hblD* 以及非溶血性肠毒素

收稿日期:2016-10-20

作者简介:李毅 男 副主任技师 研究方向为微生物检验

E-mail:zjwzlyi@126.com

(*Nhe*) *NheA*、*NheB*、*NheC*、细胞毒素 K (*CytK*)、肠毒素 T (*bceT*) 和肠毒素 FM (*entFM*) 基因。蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒多有报道^[3],控制传染源是控制和降低此类细菌性食物中毒的重要措施。多位点序列分型 (MLST) 技术是基于微生物核苷酸序列比对的一种基因分型方法,其原理是通过比较微生物个体 7 个或更多管家基因的核苷酸序列的多态性,确定其遗传特征^[4]。对该菌进行 MLST 基因分型,是研究该菌的分布特征和进行溯源的重要手段。CARDAZZO 等^[5]对食源性疾病中分离的蜡样芽胞杆菌进行了毒力基因携带率和基因分型的调查研究,表明菌株携带毒力基因与该菌致病性存在一定关联,MLST 分型显示携带毒力基因的优势克隆为 ST142、ST370、ST372、ST376。HOFFMASTER 等^[6]从严重感染患者、胃肠道疾病患者以及相关食物中分离的优势克隆为 ST26、ST78 和 ST94,其中 ST26 与 4 次呕吐为主的食源性疾病暴发事件相关;因此,本试验对温州地区分离的蜡样芽胞杆菌进行毒力基因携带情况以及分型特征的研究,掌握不同来源蜡样芽胞杆菌的分子流行病学特征为预防和控制蜡样芽胞杆菌引起的食源性疾病事件提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

2007—2014 年温州地区不同来源分离的 127 株蜡样芽胞杆菌,其中分离自食源性致病菌监测有 114 株,分别来自米饭、米粉、米线、凉皮、盒饭 14 株,婴幼儿配方食品 89 株和其他食品 11 株,另有来自食物中毒 8 株、血液 1 株和环境 4 株。

1.1.2 主要仪器与试剂

全自动微生物分析系统 VITEK® 2-compact、BCL 芽胞菌鉴定卡均购自法国梅里埃,Mastercycler® ep gradient S 梯度 PCR 仪(德国艾本德),FR-98 生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司)。胰酪胨大豆多粘菌素肉汤、甘露醇卵黄多粘菌素琼脂 (MYP)、硫酸锰营养琼脂等蜡样芽胞杆菌培养基均购自青岛海博生物技术有限公司,*Taq* PCR Master Mix(2×)、琼脂糖等试剂均购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 蜡样芽胞杆菌的鉴定和生化分型

将菌株划线于 MYP 琼脂平板上,30 ℃ 培养 24 h,挑取典型菌落用全自动微生物生化鉴定仪进行系统生化鉴定,补充动力试验、根状生长试验、蛋

白质毒素结晶试验进行确证,同时进行生化分型试验^[7],根据对柠檬酸盐利用、硝酸盐还原、淀粉水解、V-P 试验反应、明胶液化试验,将蜡样芽胞杆菌分成 15 个不同生化型别。

1.2.2 DNA 模板提取

取适量的蜡样芽胞杆菌纯培养菌落于 1 ml 双蒸水中制成菌悬液,100 ℃ 金属浴 20 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为 PCR 反应模板。

1.2.3 毒力基因检测

PCR 法检测蜡样芽胞杆菌 *hbla*、*hbliC*、*hbliD*、*NheA*、*NheB*、*NheC*、*CytK*、*bceT*、*ces*、*entFM* 等 10 种毒力基因^[8],PCR 引物委托上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.4 蜡样芽胞杆菌 MLST 基因扩增、测序和数据特征分析

根据 www.mlst.net 网站^[9]的 MLST 方法扩增蜡样芽胞杆菌的 7 个管家基因 *glpF*、*gmk*、*iluD*、*pta*、*pur*、*pycA* 和 *tpi*,扩增产物测序后,与蜡样芽胞杆菌 MLST 标准数据 (<http://pubmlst.org/bcereus/>)^[10] 进行比对获得该菌株的序列型别 (ST)。运用 BioNumerics 7.5 生物信息学软件对所得蜡样芽胞杆菌 ST 型别进行聚类分析。

2 结果

2.1 温州地区不同来源菌株毒力基因检出情况

127 株蜡样芽胞杆菌中携带 *NheA*、*NheB* 和 *NheC* 基因的分别占 98.4%、97.6% 和 94.5%,其他毒力基因的携带率为 7.9% ~ 34.6%,其中 *ces* 基因携带率最低 (7.9%),具体结果见表 1。按照 *NheA*、*NheB*、*NheC*、*hbla*、*hbliC*、*hbliD*、*ces* 及其他毒力基因的分布差异,所有菌株可分为 A ~ F 共 6 群,其中最常见群为 A 群 (47.2%) 和 B 群 (29.9%),F 群有 1 株蜡样芽胞杆菌未携带毒力基因 (表 2)。

2.2 蜡样芽胞杆菌生化分型结果

127 株菌株除 10 株不能分型外,其余分为 5 型,其中 9 型占 63.8%,10 型占 22.0% (表 3)。

2.3 不同来源分离的蜡样芽胞杆菌 MLST 分型结果

根据毒力基因、生化分型结果随机选取 72 株菌株 (食品 59 株、食物中毒 8 株、血液 1 株、环境 4 株) 进行 MLST 基因分型,共分为 28 个 ST 型,最常见的 ST 型为 ST26 (13 株,18.1%),见表 4。

2.4 聚类分析结果

BioNumerics 7.5 软件对不同来源菌的等位基因编码进行聚类分析显示,本地区 28 个 ST 型被分为 4 个序列群和 13 个单态群 (图 1)。其中序列群

表1 不同来源菌株毒力基因检出情况
Table 1 Carrier rates of toxin genes in isolates from different sources

来源(菌株数)	毒力基因检出菌株数(检出率/%)									
	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>NheA</i>	<i>NheB</i>	<i>NheC</i>	<i>bceT</i>	<i>CytK</i>	<i>entFM</i>	<i>ces</i>
米粉米线及盒饭(14)	2(14.3)	2(14.3)	2(14.3)	14(100.0)	14(100.0)	14(100.0)	0(0.0)	2(14.3)	6(42.9)	1(7.1)
婴幼儿配方食品(89)	11(12.4)	13(14.6)	10(11.2)	87(97.8)	86(96.6)	82(92.1)	32(36.0)	26(29.2)	20(22.5)	5(5.6)
食物中毒(8)	2(25.0)	2(25.0)	2(25.0)	8(100.0)	8(100.0)	8(100.0)	2(25.0)	3(37.5)	3(37.5)	1(12.5)
其他食品(11)	10(90.9)	0(0.0)	0(0.0)	11(100.0)	11(100.0)	11(100.0)	10(90.9)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
血(1)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	0(0.0)	1(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
环境(4)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(75.0)	3(75.0)
合计(127)	25(19.7)	17(13.4)	14(11.0)	125(98.4)	124(97.6)	120(94.5)	44(34.6)	32(25.2)	32(25.2)	10(7.9)

表2 携带 *hblA*、*hblC*、*hblD*、*NheA*、*NheB*、*NheC*、*CytK*、*bceT*、*ces*、*entFM* 基因在不同来源菌株的情况 ($n = 127$)

Table 2 Distribution of *hblA*, *hblC*, *hblD*, *NheA*, *NheB*, *NheC*, *CytK*, *bceT*, *ces* and *entFM* toxin genes in isolates from different sources

编号	毒力基因群	菌株数						合计 (%)
		米粉米线及盒饭(14)	婴幼儿配方食品(89)	食物中毒(8)	其他食品(11)	血(1)	环境(4)	
A	同时携带 <i>NheA</i> 、 <i>NheB</i> 、 <i>NheC</i> + <i>CytK</i> + <i>bceT</i> + <i>entFM</i>	4	42	2	10	1	1	60(47.2)
B	同时携带 <i>NheA</i> 、 <i>NheB</i> 、 <i>NheC</i>	7	27	3	1	0	0	38(29.9)
C	同时携带 <i>NheA</i> 、 <i>NheB</i> 、 <i>NheC</i> + <i>ces</i> + <i>CytK</i> + <i>bceT</i> + <i>entFM</i>	1	5	1	0	0	3	10(7.9)
D	同时携带 <i>NheA</i> 、 <i>NheB</i> 、 <i>NheC</i> 、 <i>hblA</i> 、 <i>hblC</i> 、 <i>hblD</i> + <i>CytK</i> + <i>bceT</i> + <i>entFM</i>	2	8	2	0	0	0	12(9.4)
E	同时携带 <i>NheA</i> 、 <i>NheB</i>	0	6	0	0	0	0	6(4.7)
F	未检出毒力基因	0	1	0	0	0	0	1(0.8)

注：*hblA*、*hblC* 和 *hblD* 代表溶血致死性肠毒素 BL(Hbl)；*NheA*、*NheB* 和 *NheC* 代表非溶血性肠毒素(Nhe)；*CytK* 代表细胞毒素 K；*bceT* 代表肠毒素 T；*ces* 代表呕吐毒素；*entFM* 代表肠毒素 FM。

表3 127株蜡样芽胞杆菌生化分型结果

Table 3 Biochemical typing of 127 *Bacillus cereus* isolates

型别	生化试验					菌株数	占比/%
	柠檬酸盐利用	硝酸盐还原	淀粉水解	V-P反应	明胶液化		
10	-	+	+	-	+	28	22.0
9	-	+	-	-	+	81	63.8
8	-	+	-	+	+	2	1.6
5	-	-	-	+	+	5	3.9
2	-	+	+	+	+	1	0.8
未能分型	-	-	-	-	-	10	7.9

注：-为不做生化试验。

1 包含 3 种 ST 型 (ST26、ST144、ST164) 占 40.3% (29/72), 分离自食品、食物中毒和环境, 包括 A、B、C 毒力基因群; 序列群 2 包含 4 种 ST 型 (ST4、ST24、ST142、ST184) 占 6.9% (5/72), 全部分离自食品, 包括 A、E 毒力基因群; 序列群 3 包含 3 种 ST 型 (ST205、ST368、ST1 017) 占 8.3% (6/72), 分离自食品和血液, 包括 A、B、D 毒力基因群; 序列群 4 包含 5 种 ST 型 (ST5、ST32、ST92、ST120、ST127) 占 18.1% (13/72), 全部分离自食品, 包括 A、B、E 毒力基因群; 13 个单态群中最常见的为 ST138 和 ST156, 均占 4.2% (3/72), 来自食物中毒的 3 株菌株构成两个单态群 ST145 和 ST177。在序列群中, ST4 和 ST142、ST92 和 ST127、ST144 和 ST164 之间仅有 1 个等位基因差别, ST26 和 ST164、ST184 和 ST142、ST205 和 ST1 017 之间则有 2 个等位基因差异 (图 1)。

3 讨论

蜡样芽胞杆菌产生的肠毒素和活菌数量是引

起食源性疾病的重要因素。活菌量越高产生肠毒素越多, 致病性越强。目前国内报道的蜡样芽胞杆菌研究包括细菌计数和鉴定^[7,11-12]以及该菌的致病物质和分子分型特征^[13-14], 如 CARDAZZO 等^[5]对蜡样芽胞杆菌进行了毒力基因和基因分子分型的研究报道以及 KIM 等^[15]对产生呕吐毒素的蜡样芽胞杆菌进行了基因多样性研究。本试验结果显示 99.2% (126/127) 的蜡样芽胞杆菌存在毒力基因, 同时携带 *NheA*、*NheB*、*NheC* 基因的菌株占 94.5% (120/127), 高于秦丽云等^[14]报道的 29.0% 携带率和 BATCHOUN 等^[16]报道的 51.9% 携带率, 接近 LEE 等^[17]100% 的携带率, 说明温州地区分离株存在引起腹泻型食源性疾病的风险, 而携带 *ces* 基因菌株虽然只占 7.9%, 但由于呕吐型食源性疾病比腹泻型更严重, 呕吐毒素摄入 30 min 后即可出现呕吐症状, 因此更应关注携带呕吐毒素引起的食源性疾病事件。

本试验研究的蜡样芽胞杆菌 85% 以上生化分型结果集中在 9 和 10 型, 但部分菌株生化结果难判断, 有少数菌株按照现有的国家标准无法进行分型^[7], 同时因生化分型操作方法复杂等因素, 造成分型不够精确^[13], 难于满足实际工作需求。

而 MLST 能够在鉴别病原的同时进行病原间遗传相关性分析, 如果 7 个管家基因的位点有 4 个或者更多相同, 则病原个体之间的遗传距离相近, 属于相同的克隆复合体^[4]。本试验对 72 株菌株进行 MLST 分型鉴定, 结果显示 ST26、ST92、ST144 和 ST164 为温州地区分离株中常见 ST 型, 说明温州地

力基因群,应该同时做好蜡样芽胞杆菌引起临床感染的监测工作;13个单态群中最常见的为ST138和ST156,而来自食物中毒的3株菌株构成两个单态群ST145和ST177,说明这些ST型引起的食源性疾病事件更应该加强关注。

本试验表明温州地区蜡样芽胞杆菌毒力基因携带率较高,同时遗传关系具有多样性,说明应该深入开展对食品和食源性疾病中分离到的蜡样芽胞杆菌毒力基因携带情况以及基因分型特征等的研究。

参考文献

- [1] JAY J M, LOESSNER M J, GOLDEN D A. 现代食品微生物学[M]. 何国庆, 丁立孝, 宫春波, 译. 7版. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 486-488.
- [2] 周幅萍, 袁志明. 蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)污染及其对食品安全的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 357-360.
- [3] 陈慧燕, 马雪莲. 蜡样芽胞杆菌及毒素引起食源性疾病的实验室检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(8): 1964-1965.
- [4] 徐建国, 阚飙, 张建中, 等. 现场细菌学[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 7-12.
- [5] CARDAZZO B, NEGRISOLO E, CARRARO L, et al. Multiple-locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(3): 850-860.
- [6] HOFFMASTER A R, NOVAK R T, MARSTON C K, et al. Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing [J]. BMC Microbiology, 2008, 8(1): 191.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家

标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验: GB 4789.14—2014 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

- [8] 李毅, 章乐怡, 吴可可, 等. 温州地区食源性蜡样芽胞杆菌生化分型、毒素和耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(20): 3010-3012.
- [9] HELGASON E, TOURASSE N J, MEISAL R, et al. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(1): 191-201.
- [10] JOLLEY K A, MAIDEN M C. BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level [J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11(1): 595.
- [11] 王红戟, 陈娅. 豆浆引起学生食源性疾病的实验室分析[J]. 现代预防医学, 2007, 34(18): 3505-3506.
- [12] 李建科, 戎江瑞, 冯祥. 连续两起蜡样芽胞杆菌食源性疾病调查引起的思考[J]. 中国预防医学杂志, 2007, 8(3): 232-233.
- [13] 李春, 撒楠, 胡万富, 等. 食品中蜡样芽胞杆菌的分离鉴定与分型[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(14): 2313-2314.
- [14] 秦丽云, 吕国平, 蔡箴, 等. 石家庄市131株食源性蜡样芽胞杆菌毒力基因的分布[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(4): 358-362.
- [15] KIM J B, PARK J S, KIM M S, et al. Genetic diversity of emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean strains [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 150(1): 66-72.
- [16] BATCHOUN R, AI-SHA'ER A I, KHABOUR O F. Molecular characterization of *Bacillus cereus* toxigenic strains isolated from different food matrices in Jordan [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(11): 1153-1158.
- [17] LEE N, SUN J M, KWON K Y, et al. Genetic diversity, antimicrobial resistance, and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from Sunsik [J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(2): 225-230.

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定禽蛋中2种色素残留

杨梅, 张姮婕, 陈红

(成都市食品药品检验研究院, 四川 成都 610045)

摘要:目的 建立测定禽蛋中斑螫黄和 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯残留的定性和定量方法。方法 采用固相萃取技术处理样品,通过超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)对禽蛋中的斑螫黄和 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯进行分离和检测,通过考察方法的检测限、精密度、回收率等指标对方法学进行验证。结果 斑螫黄和 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的检测限分别为1、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率在72.2%~91.9%之间,RSD在4.6%~7.1%($n=5$)之间。结论 本法准确、快速、灵敏度高,可对禽蛋中斑螫黄和 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯残留进行快速分析。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱法; 色素; 饲料添加剂; 斑螫黄; β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯; 禽蛋; 残留; 检测

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)02-0176-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.02.013