

食源性疾病

一起疑似由蜡样芽胞杆菌引起的食源性疾病事件的分子溯源研究

陈雯杰¹, 陆冬磊¹, 黄峥², 顾其芳¹, 毕磊², 方沁昕¹, 於颖¹, 汪静³, 肖泉¹, 张红芝¹

(1. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336; 2. 上海市长宁区疾病预防控制中心, 上海 200051; 3. 上海市闵行区疾病预防控制中心, 上海 201101)

摘要:目的 对一起食源性疾病事件中食品分离蜡样芽胞杆菌(*B. cereus*)进行溯源分析,为确定污染源、切断传播途径提供技术支撑。方法 本研究建立脉冲场凝胶电泳(PFGE)方法,对12株*B. cereus*进行分子分型,同时对10株*B. cereus*进行全基因组测序(WGS),利用BioNumerics软件对测序数据进行拼接组装、多位点序列分型(MLST)、毒力基因、核苷酸多态性(SNP)分析。结果 本起食源性疾病事件中分离自不同食品的12株*B. cereus*的PFGE分型显示为8种带型,其中3株ST1435型*B. cereus*带型相同,且SNP分析显示这3株*B. cereus*只有3个碱基差异;2株ST24型*B. cereus*的PFGE带型完全相同,且SNP分析显示只有1个碱基差异,提示3株ST1435和2株ST24菌株分别为克隆株。2株ST24型*B. cereus*携带溶血性肠毒素hIbA、hIbC和hIbD,另有4株*B. cereus*携带腹泻毒力基因(*hIbA*、*hIbC*和*hIbD*)。结论 *B. cereus*引起的食源性疾病事件比较复杂,污染源也比较复杂,因此加强原辅料监测、从业人员的卫生监测、环境和设备及环节的清洗消毒,对预防控制由其引起的食源性疾病事件非常重要。

关键词:蜡样芽胞杆菌;食源性疾病;毒力基因;全基因组测序;脉冲场凝胶电泳

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)12-1799-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.12.016

Molecular tracing of a suspected foodborne disease event caused by *Bacillus cereus*CHEN Wenjie¹, LU Donglei¹, HUANG Zheng², GU Qifang¹, BI Lei², FANG Zhixin¹, YU Ying¹,
WANG Jing³, XIAO Quan¹, ZHANG Hongzhi¹

(1. Shanghai Municipal Center for Disease Control & Prevention, Shanghai 200336, China; 2. Changning District Center for Disease Control & Prevention, Shanghai 200051, China; 3. Minhang District Center for Disease Control & Prevention, Shanghai 201101, China)

Abstract: Objective To trace *Bacillus cereus* (*B. cereus*) from foodborne disease outbreaks to identify pathogens and cut off transmission. **Methods** Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed. Furthermore, 12 isolates of *B. cereus* were subjected to PFGE. Subsequently, whole-genome sequencing (WGS) analysis was conducted on ten of these isolates. The WGS data were analyzed and assembled using BioNumerics software. Multilocus sequence typing (MLST), virulence gene profiles, and single nucleotide polymorphisms (SNPs) were analyzed using assembled sequences. **Results** PFGE analysis classified the 12 *B. cereus* strains into nine pulsotypes. The three *B. cereus* isolates with the same PFGE pattern belonged to ST1435, and there were only three SNPs in the three ST1435 strains. The two *B. cereus* isolates with the same PFGE patterns were ST24 with one SNP between them, and the two ST24 isolates harbored *hIbACD*. These results indicate that the *B. cereus* isolates belonged to the same clone. The remaining three *B. cereus* strains also contained *hIbACD*. **Conclusion** Food-borne illness events caused by *B. cereus* are complex and are sources of contamination. Therefore, it will be necessary to strengthen the hygiene surveillance of food sources and workers and to pay more attention to cleaning and disinfecting environments and facilities, which will be important for preventing and controlling foodborne diseases.

Key words: *Bacillus cereus*; foodborne disease; virulence genes; whole-genome sequence; pulsed-field gel electrophoresis

收稿日期:2022-08-19

作者简介:陈雯杰 女 主管医师 研究方向为食源性病原菌检测 E-mail: chenwenjie@scdc.sh.cn

陆冬磊 男 主任医师 研究方向为食源性疾病事件流行病学调查 E-mail: ludonglei@scdc.sh.cn

陈雯杰和陆冬磊为并列第一作者

通信作者:张红芝 女 主任技师 研究方向为食源性致病菌分子溯源 E-mail: zhanghongzhi@scdc.sh.cn

蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)是一种革兰氏阳性、能运动、产芽胞的重要食源性致病菌,是导致细菌性食源性疾病事件的常见致病菌^[1]。国家食源性疾病监测数据显示,2011—2016年期间,由*B. cereus*引起的食源性疾病事件占细菌性疾病事件的第4位^[2]。在一些地区,*B. cereus*引起的食源性疾病事件仅次于副溶血性弧菌^[3-4]。目前对由其引起的食源性疾病事件的诊断参考WS/T 82—1996《蜡样芽胞杆菌食物中毒诊断标准及处理原则》^[5],诊断标准主要是依据流行病学特点,如分析其引起中毒的食品种类及其存放的环境,临床表现是否符合由其引起的食源性疾病的特征,如呕吐型以恶心、呕吐为主,并有头晕、四肢无力等特征,腹泻型以腹痛、腹泻为主;实验室诊断主要是对食品中*B. cereus*进行定量检测,每克食品中一般均 $\geq 10^5$ CFU/mL。但是仅仅依靠这些信息是不够的,尤其是在处理一些复杂的食源性疾病事件,例如若从多个无关联的食品中检测出*B. cereus*,很难判断污染的源头。因此对引起食源性疾病事件的*B. cereus*进行深入的分子生物学特征分析可为溯源提供重要的科学依据。

PFGE在食源性疾病事件的流行病学调查和溯源中的得到广泛应用^[6-7]。但是PFGE在蜡样芽胞杆菌中的分子流行病学调查和溯源中应用相对较少,主要是由于*B. cereus*是革兰氏阳性菌,且能形成芽胞,在PFGE检测时菌体裂解和内切酶酶切DNA上存在一定难度。本研究拟在前期研究的基础上建立*Not I*为内切酶的PFGE方法,用于蜡样芽胞杆菌的分型分析。随着测序技术的发展,全基因组测序(Whole genome sequencing, WGS)技术能够在全基因水平上全面分析病原菌的分子生物学特征,在食源性疾病暴发事件的流行病学调查中发挥了重要作用^[8],尤其为单增李斯特菌监测及由其引起的食源性疾病暴发事件的分子流行病学调查提供重要依据,不但能对致病菌进行菌种鉴定,还能利用分子分型技术(如MLST、SNP)对致病菌进行分型,鉴定其毒力基因^[9-11]。

2021年5月份上海市某区发生一起食源性疾病事件,现场流行病学调查确定有9例病例,均出现呕吐症状,其中5例伴有腹泻症状,7例伴有腹痛症状,实验室检测结果显示共有12件食品样品检出蜡样芽胞杆菌,其中有4件样品中蜡样芽胞杆菌的检出量大于 10^5 CFU/g,病例中无检出,根据《蜡样芽胞杆菌食物中毒诊断标准及处理原则》判断此起食源性疾病事件由蜡样芽胞杆菌引起^[5]。为进一步确定污染源及污染途径,预防控制由蜡样芽胞杆

菌引起的食源性疾病事件的再次发生,对病原菌进行溯源是非常有必要的。本研究拟采用PFGE、WGS对此起食源性疾病事件中食品来源的*B. cereus*进行分子生物学特征分析,为确定、切断传染源,控制*B. cereus*传播提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

从上海市某区一起食源性疾病事件包括火腿红薯、黄油面包、发糕、麻球、空心菜、鸭翅根、烟熏鸡胸、烤麻球、大理石蛋糕、虾仁炒蛋、西兰花、西葫芦在内的可疑食品样品中分离到12株*B. cereus*。*B. cereus*标准菌株:ATCC11778;质谱鉴定用标准菌株ATCC8739由上海市疾病预防控制中心提供。在此次食源性疾病事件中,根据现场流行病学调查结果,采集25件可疑食品、14件环节样本、20名从业人员样本、18件环境样本和5件饮用水样本开展诺如病毒、沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、致泻大肠埃希氏菌和蜡样芽胞杆菌检验,检验方法依据国标GB 4789.42—2016、GB 4789.4—2016、GB 4789.5—2012、GB 4789.6—2016、GB 4789.7—2013、GB 4789.10—2016和GB 4789.14—2014^[12-18]。

1.2 主要仪器与试剂

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS,法国生物梅里埃公司);CHEF MAPPER脉冲场电泳仪和凝胶成像系统(美国BIO-RED公司)。

甲酸(Formic acid, FA)、乙腈(Acetonitrile, ACN)、无水乙醇(色谱纯);美国Sigma公司。VITEK MS-CHCA基质液(法国梅里埃公司)。甘露醇卵黄多黏菌素平板、哥伦比亚血平板(上海申启公司);细菌全基因组提取试剂盒(日本Takara公司)。

1.3 MALDI-TOF MS鉴定

参考文献[19]中的操作。挑取适量菌落样品于EP管中,加入900 μ L无水乙醇,混匀;12 000 r/min离心2 min,弃上清;加入40 μ L 70%甲酸,混匀,再加入40 μ L乙腈,混匀,12 000 r/min离心2 min,吸取1 μ L上清液点在靶板上,自然晾干后再点1 μ L CHCA基质覆盖,晾干后进行质谱分析,观察、记录结果。菌种鉴定参考VITEK MS鉴定菌种表(V 3.0)。

1.4 脉冲场凝胶电泳(PFGE)

实验方法参考张慧娟等^[20],但略作改动,实验步骤简述如下:

1.4.1 胶块制备

将蜡样芽胞杆菌接种于血平板,37 $^{\circ}$ C培养18 h。

从培养皿上刮取适量菌落用 TE (10 mmol/L Tris-HCl; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 重悬, 调整菌悬液浓度使 OD 值为 5.8~6.0 之间。取 300 μ L 菌悬液于 EP 管中, 加入 100 mg/mL 的溶菌酶 6 μ L, 轻轻混匀后放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 15 min。每管加入 20 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL), 轻轻混匀。制备好的 1% SeaKem Gold; 1% SDS 琼脂糖保温于 56 $^{\circ}$ C 水浴箱中。每管加入等量 1% Seakem Gold; 1% SDS 琼脂糖, 用枪头轻轻吸吹几次混匀, 避免气泡产生, 加入模具, 4 $^{\circ}$ C 冰箱凝固 10 min 后制成胶块。

1.4.2 菌体裂解和蛋白消化

在 50 mL 聚丙烯螺帽管中加入 5 mL 细胞裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl; 1 mmol/L EDTA, pH8.0) 和 25 μ L 溶菌酶 (100 mg/mL), 把胶块移入相应螺帽管, 37 $^{\circ}$ C 水浴摇床孵育 4 h, 转速 150~170 r/min。另取 50 mL 螺帽管加入 5 mL 细胞裂解液和 25 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL), 将胶块转移至其中, 置 54 $^{\circ}$ C 水浴摇床孵育 2 h, 转速 150~170 r/min。

1.4.3 其他条件

用纯水洗 2 次, 每次 15 min, 再用 TE 洗 2 次, 每次 15 min; 在每个 EP 管中加入 200 μ L 酶切缓冲液, 用刀片切下 2 mm 宽的胶块, 放入含酶切缓冲液的 EP 管中, 室温放置 10 min, 用枪头吸出酶切缓冲液, 加入 200 μ L 酶切液。蜡样芽胞杆菌用 *Not* I 酶切, Marker 用 *Xba* I 酶切, 40 U, 在 37 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 3 h。电泳条件设置为电压 6.0 V/cm, 120 $^{\circ}$ C 脉冲夹角, 起始脉冲 5 s, 终止脉冲 80 s, 电泳时间 19 h。胶块用 GelRed 染色 30 min, 纯水脱色 30 min, 利用凝胶成像仪成像。

1.5 全基因组测序

取适量新鲜菌液, 用细菌全基因组提取试剂盒提取 DNA。全基因组测序由生工生物工程公司完成, 采用 Illumina HiSeq 2500 PE150 测序仪进行全基因组分析。先将样本 DNA 随机打断, 构建 350 bp 小

片段文库, 然后分别进行平行测序, 最终获数据量 Clean data 100 X。对测序获得的原始数据进行质控, 将合格的数据 Clean data 导入 BioNumerics 7.6 软件进行序列拼接。

1.6 菌种鉴定

完成拼接的基因组序列, 上传到网站 https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_rmlst_seqdef_kiosk, 进行菌种鉴定。

1.7 MLST 分析

MLST 分型参考蜡样芽胞杆菌分型的管家基因, *glp*, *gmk*, *ilv*, *pta*, *pur*, *pyc* 和 *tpi* (<https://pubmlst.org/databases/>)。利用 BioNumerics 7.6 软件, 从上述拼接好的序列中提取相应的管家基因, 然后利用 BN 软件的功能模块分配 ST 型。

1.8 毒力基因分析

将 BioNumerics 软件拼接后的序列在 VFDB 数据库 (<http://www.mgc.ac.cn>) 进行序列比对分析获得毒力基因谱。

1.9 SNP 分析

利用 *B. cereus* 的全基因组测序的拼接数据绘制 SNP 进化树。

2 结果

2.1 鉴定结果

检验结果显示除 *B. cereus* 外, 无其他微生物检出。检出的 12 株 *B. cereus* 分别来自火腿红薯、黄油面包、发糕、麻球、空心菜、鸭翅根、烟熏鸡胸、烤麻球、大理石蛋糕、虾仁炒蛋、西兰花、西葫芦。其中 10 株 *B. cereus* 生化、MALDI-TOF MS 以及全基因组测序鉴定结果一致, 均为 *B. cereus*, MALDI-TOF MS 鉴定结果的可信度为 99.9%, 全基因组测序鉴定结果的可信度为 100% (表 1)。

2.2 PFGE 聚类结果

图 1 显示了 12 株 *B. cereus* 经 *Not* I 酶切后的

表 1 12 株蜡样芽胞杆菌的鉴定结果

Table 1 Identification Result of 12 *B. cereus*

菌株信息	来源	生化鉴定置信度 99.9%	MALDI-TOF MS 可信度 99.9%	全基因组测序可信度 100%
LY2120	火腿红薯	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌
LY2121	黄油面包	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌
LY2122	发糕	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌
LY2123	麻球	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌
LY2124	空心菜	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌
LY2125	鸭翅根	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌
LY2126	烟熏鸡胸烤	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌
LY2127	麻球	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌
LY2128	大理石蛋糕	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌
LY2129	虾仁炒蛋	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌
LY2130	西兰花	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌
LY2131	西葫芦	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌

PFGE 图谱,除了 LY2125(酶切失败),11 株 *B. cereus* 产生了 10-13 条分布均匀的条带,可满足实验分析要求。11 株菌分成 8 个 PFGE 带型,其中 LY2123、LY2126 和 LY2128 的 PFGE 带型完全一致,这 3 株菌分别来自麻球、烟熏鸡胸烤和大理石蛋糕。LY2122 和 LY2130 的 PFGE 带型完全一致,这两株菌分别来自发糕和西兰花。

2.3 全基因组测序结果

本研究获得的 10 株 *B. cereus* 全基因组测序的原始数据经过分析,满足以下条件:平均测序读长为 200~300 bp,原始数据量≥1.5 G,且 Q20 高质量数据量平均 1.2 G(Clean data ≥1G);基因组整体覆

盖深度 ≥100X;碱基数据质量值 Q20≥95%,Q30≥85%,SCAFFOLD 数量<100 个,Contig 数量<200 个,单碱基错误率低于十万分之一。

2.4 10 株 *B. cereus* 的分子生物学特征及 SNP 分析

10 株 *B. cereus* 均能分型,共分为 7 个 ST 型,其中 1 株菌为新 ST 型,为 ST2749 型,3 株属于 ST1453,2 株属于 ST24,其他 ST 型只有一个菌株,分别为 ST1431、ST1210、ST378、ST770。本研究中 10 株 *B. cereus* 中毒力基因检测结果如图 2 所示,与腹泻相关的溶血性肠毒素基因 *hblA*、*hblC* 和 *hblD* 的携带率均为 60%(6/10);本研究中的 10 株 *B. cereus* 中均检出非溶血性肠毒素基因 *nheC*、*nheB* 和 *nheA*。

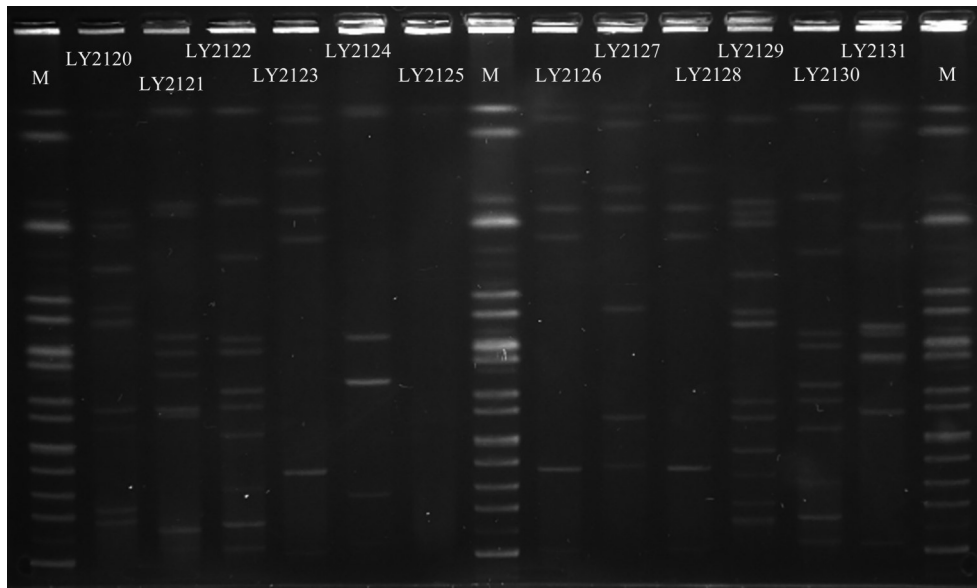


图1 12株蜡样芽胞杆菌的PFGE图谱

Figure 1 PFGE profile of 12 *B. cereus*

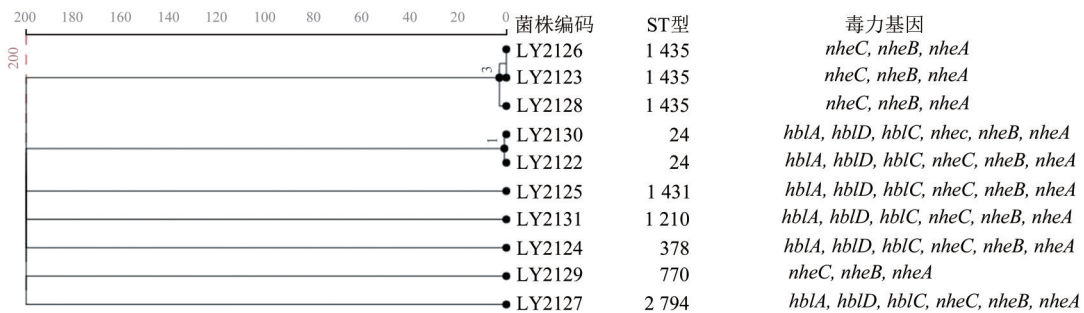


图2 10株蜡样芽胞杆菌ST型、毒力基因及SNP分析

Figure 2 STs, toxic genes and SNP of 10 *B. cereus*

SNP 分析结果显示 3 个 ST1453 型 *B. cereus* (LY2123、LY2126 和 LY2128) 只有 3 个碱基差异,提示这三株菌可能为一个克隆株;LY2122 和 LY2130(均为 ST24)只有 1 个碱基差异,提示这两株菌可能为一个克隆株。其他的 5 株菌(均为不同的 ST 型)的碱基差异大于 200,提示这些菌株的基因组水平差异较大,来自不同的祖先。

3 讨论

分型溯源技术是分析食源性疾病事件暴发源头的重要方法,在食品安全监管处置中发挥着重要的作用。本研究比较了两种不同的分型方法在 *B. cereus* 引起的食源性疾病事件中的应用。PFGE 是目前公认的溯源的有效方法之一,该方法通过在基因组水平上的遗传差异进行分型,已被普遍应用于细菌食源性疾病的分子流行病学调查中。但是

目前国内还没有使用该方法对 *B. cereus* 进行分析,主要是由于 *B. cereus* 形成芽胞,细胞壁裂解相对比较困难。在本研究中,通过对菌液浓度和裂解时间的研究,发现这两个参数对 PFGE 图谱的质量影响非常大。本研究结果显示利用新鲜 *B. cereus* 菌液,浓度调整为 5.8~6.0 McF,在溶菌酶中于 37 °C 裂解 4 h,随后又在含有蛋白 K 的裂解液中裂解 2 h;同时参考国内外的文献报道^[6-7],选择 *Not I* 作为内切酶,最终得到的 PFGE 条带在 10~13 条之间,且分布均匀,能够满足分析的要求。最终 12 株 *B. cereus* 得到 8 种 PFGE 带型。其中三株菌(LY2123、LY2126 和 LY2128)的 PFGE 条带完全一致,提示这三株菌同源性极高,可能来自同一克隆株,来自相同的污染源。两株菌(LY2122 和 LY2130)的 PFGE 条带完全一致,提示这两株菌的同源性极高,可能来自同一克隆株,来自相同的污染源。其他的 *B. cereus* 菌株 PFGE 条带同源性比较低,提示可能来自不同的污染源。

随着全基因组测序技术的发展,全基因组测序已经广泛应用于食源性致病菌的鉴定和分型分析中^[21-23]。在本研究中,10 株菌分为 7 个 ST 型,其中 3 个 ST1435 型 *B. cereus*(LY2123、LY2126 和 LY2128)的 PFGE 带型完全相同,2 个 ST24 型 *B. cereus*(LY2122 和 LY2130)的 PFGE 带型完全相同,而且 SNP 聚类分析显示三株 ST1435 只有 3 个差异碱基,而两株 ST24 只有 1 个差异碱基,这些结果说明 3 株 ST1435、2 株 ST24 分别为克隆株,在加工环节中存在克隆传播。2 株 ST24 携带 *hbla*、*hblD* 和 *hblC* 基因,这 3 个基因编码与腹泻相关的溶血性肠毒素^[24],提示 2 株 ST24 可能导致腹泻症状。目前已有 ST24 引起腹泻疾病的报道^[20],但是没有 ST1435 引起食源性疾病的报道。2 株 ST24 分别来自发糕和西兰花,1 株 ST1210 来自西葫芦,这些食品不是常见的蜡样芽胞杆菌污染的食品。在我国,*B. cereus* 的检出主要与受污染的米饭或淀粉类制品有关。

值得注意的是,本起事件中食品分离的菌株均不携带呕吐毒素基因,其编码的呕吐毒素被人体摄入后在胃中与特定受体结合,是导致呕吐的主要原因^[25]。流行病学调查显示 9 例病例均有呕吐症状,而且病人的发病时间为 5 h 左右,符合呕吐毒素导致的疾病特点^[26]。造成流行病学调查中病人症状与 *B. cereus* 生物学特征不一致的原因可能是:食品中存在携带呕吐毒素基因的 *B. cereus*,但是并未分离到;由于呕吐毒素非常耐热,只有呕吐毒素存在食品中,*B. cereus* 已经失活,但是由于实验条件的限制,并未检测食品中是否存在呕吐毒素。因此,进

一步研究建立针对不同种类食品中的 *B. cereus* 产呕吐毒素的检测方法,对于准确、及时追踪污染源非常重要。

本研究结果显示 *B. cereus* 引起的食源性疾病事件比较复杂,污染源也比较复杂,可能是不同食品之间的交叉污染、可能是环节和食品之间的交叉污染、也可能是原辅料和食品之间的交叉污染所致,因此清洗环境和设备、对环节彻底消毒、加强原辅料监测、加强从业人员的卫生监测,对预防控制由其引起的食源性疾病事件非常重要。

参考文献

- [1] STENFORS ARNESEN L P, FAGERLUND A, GRANUM P E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(4): 579-606.
- [2] LIU J K, BAI L, LI W W, et al. Trends of foodborne diseases in China: Lessons from laboratory-based surveillance since 2011 [J]. *Frontiers of Medicine*, 2018, 12(1): 48-57.
- [3] 王伟杰, 孙婷婷, 魏彤竹, 等. 2017—2018 年辽宁省食品中食源性致病微生物监测结果分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(22): 8566-8571.
WANG W J, SUN T T, WEI T Z, et al. Analysis of monitoring results of foodborne pathogenic microorganisms in food in Liaoning Province from 2017 to 2018[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(22): 8566-8571.
- [4] 李荣华. 2014—2018 年济宁市食源性疾病事件流行病学特征分析[J]. *预防医学论坛*, 2019, 25(11): 872-874.
LI R H. Analysis on epidemiological characteristics of foodborne disease outbreaks, Jining City, 2014—2018 [J]. *Preventive Medicine Tribune*, 2019, 25(11): 872-874.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 蜡样芽胞杆菌食物中毒诊断及处理原则: WS/T 82—1996[S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Diagnostic criteria and principles of management for food poisoning of *Bacillus cereus*: WS/T 82—1996[S]. Beijing: Standard Press of China, 1996.
- [6] SCHOONMAKER D, HEIMBERGER T, BIRKHEAD G. Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, 30(6): 1491-1498.
- [7] HEINZEN R, STIEGLER G L, WHITING L L, et al. Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1990, 590: 504-513.
- [8] KOZYREVA V K, CRANDALL J, SABOL A, et al. Laboratory investigation of *Salmonella enterica* serovar Poona outbreak in California: Comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and whole genome sequencing (WGS) results [J]. *PLoS Currents*, 2016, 8: ecurrents.outbreaks.1bb3e36e74bd5779bc43ac3a8dae52e6.
- [9] FORSYTHE S J, DICKINS B, JOLLEY K A. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis [J]. *BMC Genomics*,

- 2014, 15(1): 1121.
- [10] ZHANG H Z, CHEN W J, WANG J, et al. 10-year molecular surveillance of *Listeria monocytogenes* using whole-genome sequencing in Shanghai, China, 2009-2019[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 551020.
- [11] PIETZKA A, ALLERBERGER F, MURER A, et al. Whole genome sequencing based surveillance of *L. monocytogenes* for early detection and investigations of listeriosis outbreaks [J]. *Frontiers in Public Health*, 2019, 7: 139.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验: GB 4789.42—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. National Standard for Food Safety, Food microbiological examination: *Norovirus*: GB 4789.42—2016[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验: GB 4789.4—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. National Standard for Food Safety, Food microbiological examination: *Salmonella*: GB 4789.4—2016[S]. Beijing: China Standards Press, 2014.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验: GB 4789.5—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012. Ministry of Health of the People's Republic of China. National Standard for Food Safety Food microbiological examination: *shigella*: GB 4789.5—2012[S]. Beijing: China Standards Press, 2012.
- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验: GB 4789.6—2016. 北京: 中国标准出版社, 2014. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. National Standard for Food Safety. Food microbiological examination: diarrheagenic *Escherichia coli*: GB 4789.6—2016[S]. Beijing: China Standards Press, 2014.
- [16] 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 副溶血性弧菌检验: GB 4789.7—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, National Standard for Food Safety Food microbiological examination: *Vibrio parahaemolyticus*: GB 4789.7—2013[S]. Beijing: China Standards Press, 2013.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验: GB 4789.10—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. National Standard for Food Safety. Food microbiological examination: *Staphylococcus aureus*: GB 4789.10—2016[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.
- [18] 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. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National Standard for Food Safety Food microbiological examination: *Bacillus cereu*: GB 4789.14—2014[S]. Beijing: China Standards Press, 2014.
- [19] 张红芝, 刘雪薇, 魏腾, 等. 克罗诺杆菌属食品分离株种水平鉴定方法比较研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(5): 503-508. ZHANG H Z, LIU X W, WEI T, et al. Study on species identification of *Cronobacter* spp[J]. in foods. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2020, 32(5): 503-508.
- [20] 张慧娟, 潘琢, 魏建春, 等. 中国蜡样芽胞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. ZHANG H J, PAN Z, WEI J C, et al. Establishment and application of standard pulsed-field gel electrophoresis assay to detect *Bacillus cereus*[J]. *Disease Surveillance*, 2015, 30(5): 411-414.
- [21] 张红芝, 刘雪薇, 顾其芳, 等. 基于全基因组测序的蜡样芽胞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. ZHANG H Z, LIU X W, GU Q F, et al. Molecular characteristics and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* from foods using whole genome sequencing [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2021, 33(5): 529-535.
- [22] TORO M, RETAMAL P, AYERS S, et al. Whole-genome sequencing analysis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates in Chile provides insights into possible transmission between gulls, poultry, and humans[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(20): 6223-6232.
- [23] ALLARD M W, STRAIN E, MELKA D, et al. Practical value of food pathogen traceability through building a whole-genome sequencing network and database [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2016, 54(8): 1975-1983.
- [24] 闫韶飞, 闫旭, 甘辛, 等. 我国市售婴儿配方乳粉中蜡样芽胞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. YAN S F, YAN X, GAN X, et al. Survey on contamination of *Bacillus cereus* and its virulence gene profiles isolated from retail infant formula in China [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2015, 27(3): 286-291.
- [25] Zhang Z H, , FENG L, XU H, et al. Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(2): 1047-1055.
- [26] PER E G, TERJE L. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins [J]. *FEMS Microbiology Letters*. 1997, 157(2), 157:223-228.