

论著

2012—2014年江西省市售婴幼儿配方食品中
蜡样芽胞杆菌调查及呕吐毒素基因分析

游兴勇,卢凌,周厚德,刘洋,刘成伟

(江西省疾病预防控制中心,江西南昌 330029)

摘要:目的 了解2012—2014年江西省市售婴幼儿配方食品中蜡样芽胞杆菌的污染情况并对呕吐毒素基因进行分析。方法 在全省市县中选取13个采样点,包括超市、百货商场、便利店、农贸市场、网店、批发市场,随机抽取婴幼儿配方食品397份,对蜡样芽胞杆菌进行检测和鉴定,同时应用叠氮溴化丙锭内参多重PCR方法检测分离株的呕吐毒素基因。结果 397份食品中蜡样芽胞杆菌阳性率为13.10% (52/397),其中2013年阳性率最高。不同采样点的阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$),不同产地、不同流通环节和不同年龄段的阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$),52份阳性食品中检出呕吐型蜡样芽胞杆菌2份,呕吐毒素阳性率为3.85%。结论 江西省市售婴幼儿配方食品中存在蜡样芽胞杆菌及呕吐型蜡样芽胞杆菌的污染,存在一定的安全隐患,相关监管部门应继续加强监管,预防食源性疾病的发生。

关键词:婴幼儿配方食品;蜡样芽胞杆菌;污染;呕吐毒素;基因;江西

中图分类号:R155.5;S852.61⁺6 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)06-0607-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.06.001

**Investigation of contamination levels and emetic gene analysis of *Bacillus cereus*
in infant formula in Jiangxi Province from 2012 to 2014**

YOU Xing-yong, LU Ling, ZHOU Hou-de, LIU Yang, LIU Cheng-wei

(Jiangxi Province Center for Disease Control and Prevention, Jiangxi Nanchang 330029, China)

Abstract: Objective To investigate the contamination levels and emetic gene analysis of *Bacillus cereus* in infant formula from 2012 to 2014 in Jiangxi Province. **Methods** 397 food samples were collected randomly from supermarkets, department stores, convenience stores, the farmer's markets, online stores, wholesale markets in 13 selected cities and countries of the province. The emetic genes of isolated strains were analyzed by propidium monoazide multiplex PCR and internal amplification control. **Results** The detection rate was 13.10% (52/397), and the contamination was the highest in 2013. Different locations had significant difference ($P < 0.05$), while the different origins of the samples, circulation and infant formula for different ages had no statistical difference ($P > 0.05$). 2 emetic *bacillus cereus* were detected in 52 positive samples and the rate was 3.85%. **Conclusion** The contamination for *Bacillus cereus* and emetic *Bacillus cereus* in infant formula in retail locations was a potential risk for infants. The supervision should be strengthened to prevent the foodborne diseases.

Key words: Infant formula foods; *Bacillus cereus*; contamination; vomitoxin; gene; Jiangxi

婴幼儿食品是婴幼儿的主要能量营养来源,世界上每天有数以百万计的儿童消耗这类食品,婴幼儿配方食品以其蛋白、脂肪、维生素等必须营养成分的高含量而成为婴幼儿食品中的首选产品^[1]。这类食品的主要的疾病影响因素是微生物,由于婴

幼儿的免疫系统不够完善,任何轻微感染都可能引起严重的疾病,因此对这类食品中致病菌的研究调查一直是监控食品安全的重点^[2]。

蜡样芽胞杆菌广泛存在于空气、土壤中,是一种常见的条件致病菌,可以引起腹泻、呕吐等症状^[3]。该细菌导致的腹泻主要由溶血素 BL (hemolysin BL, HBL) 等多种肠毒素引起;同时,能产生高度稳定呕吐毒素 (cereulide) 的呕吐型菌株可引起呕吐,严重时能导致死亡,该菌引起的食物中毒事件时有发生^[4-5]。目前针对肠毒素已经有比较成熟的检测方法,而呕吐毒素的快速检测仍处于研究

收稿日期:2015-10-13

基金项目:江西省卫生厅科研项目(20156016)

作者简介:游兴勇 男 主管技师 研究方向为食源性疾病预防

E-mail:jxscdc@163.com

通讯作者:刘成伟 男 主任技师 研究方向为食品安全风险监控

E-mail:liuchengwei718@sina.com

阶段,聚合酶链式反应(PCR)方法以其快速、灵敏度高等优势而成为快速检测方法开发的热点。针对呕吐毒素 *cesB* 和旋转酶 B 亚基基因 *gyrB* 的多重 PCR 方法(multiple PCR, mPCR)结合能特异性结合死亡细胞核苷酸的叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA),同时添加内参(internal amplification control, IAC)消除阴性扩增 PCR 聚合产物,可快速准确区分产和不产呕吐毒素活性蜡样芽胞杆菌,该方法具有特异性好、灵敏度高、重复性好等优点,具有呕吐毒素快速检测的良好应用前景^[6]。蜡样芽胞杆菌产生的芽胞在低温、高温环境都能够生存,因此在婴幼儿配方食品生产的传输、巴士消毒、热处理等环节都有可能受到污染,使得奶粉、混合食品等配方食品成为蜡样芽胞杆菌的重灾区^[7]。一般认为在食品中检出的蜡样芽胞杆菌量在 10^5 以上即能引起中毒症状。

国内外对婴幼儿配方食品中致病菌的食品安全一直都非常重视,早在 2004 年国际食品卫生法典委员会(CCFH)就制定了婴幼儿食品相关病原菌的微生物标准^[8]。我国在安徽阜阳劣质奶粉、三鹿奶粉等事件后,对婴幼儿配方食品的监管得到了较大提升,为掌握江西省婴幼儿配方食品中蜡样芽胞杆菌的污染情况,2012—2014 年本课题组对江西省婴幼儿配方食品中蜡样芽胞杆菌的污染情况进行了调查,同时采用 PMA-mPCR-IAC 方法对分离的蜡样芽胞杆菌开展了呕吐毒素的检测。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 采样地点选择

尽可能覆盖江西省重点消费区域,共选择 13 个调查区,包括南昌市、景德镇市、九江市、萍乡市、宜春市、赣州市兴国县、吉安市吉州区、上饶市铅山县、上饶市上饶县、南昌市青云谱区、九江市德安县、九江市彭泽县、宜春市奉新县。采样点包括超市、百货商场、便利店、农贸市场、网店和批发市场。

1.1.2 样品及菌株来源

共采集 397 份婴幼儿配方食品,以低龄婴幼儿奶粉为主。采样时包装完整、均在保质期内并且避免污染。共分离蜡样芽胞杆菌 52 株,蜡样芽胞杆菌呕吐型标准株(NC7401/2455,武汉轻工大学提供)作为基因测定的阳性对照菌株。

1.1.3 主要仪器与试剂

PCR 仪(美国 Bio-Rad),UV 检测仪(美国 Bio-Rad),生物安全柜,恒温培养箱,OPTIPHOT 荧光显微镜,高速离心机。甘露醇卵黄多粘菌素琼脂

(mannitol-egg-yolk-polymyxin agar base, MYP)、营养琼脂平板均购自青岛海博公司,PBS、 $2 \times Taq$ Mix 均购自日本 Takara,PMA(美国 Biotium),Gel-red,琼脂糖。引物设计引自文献^[6],由上海 Invitrogen 公司合成,见表 1。

表 1 引物序列及扩增产物长度

Table 1 Sequence of primers and the length of amplified products

目的基因	引物序列(5'-3')	扩增产物长度/bp
<i>cesB</i>	F:ACCCATCTTGGCGTCATT	154
	R:CAGCCAAGTGAAGAATACC	
16S rRNA	F:GCGCGCTGCCTAATACATGC	267
	R:CTCAGTCTGGCTACGCATCG	
IAC	F:CCTACGGGAGGCAGCAGT	475
	R:CGTTTACGGCTGTGACTAC	

1.2 方 法

1.2.1 蜡样芽胞杆菌检测

将样品稀释液均匀涂布于 MYP,倒置于培养箱 $30.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,从平板中至少挑取 3 个典型菌落(微粉红色,周围有白色至淡粉红色沉淀环),分别划线接种于营养琼脂平板做纯培养, $30.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,最后进行确证试验^[9]。

1.2.2 PMA-mPCR-IAC 方法检测呕吐型蜡样芽胞杆菌

挑取 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养的蜡样芽胞杆菌分离株用 PBS 溶解制备菌悬液,使终浓度为 0.5 个麦氏单位,添加 1 mg/ml 二甲亚砜 PMA 储备液按照 1:200 的比例室温暗处孵育 5 min 后用 500 W 灯光照射冰浴 5 min,光照后用灭菌纯水冲洗两遍,把残余的 PMA 洗掉,之后沸水浴 10 min,随后迅速冷却至室温, $12\ 000 \times g$ 离心 5 min,上清转移至 1.5 ml 离心管即提取的总 DNA。构建 20 μl PCR 体系为:10 μl $2 \times Taq$ mix,3 μl 模板,*cesB* 上下游引物各 0.4 μl ,16S rRNA 上下游引物各 0.1 μl ,IAC 上下游引物各 0.25 μl ,5.5 μl 去离子水。PCR 条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,采用含 Gel-red 的 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。基因测定的阳性对照为呕吐型蜡样芽胞杆菌(NC7401/2455),阴性对照为灭菌纯水。毒力基因测定每个反应重复试验 3 次,对于结果不一致的反应,均再重复 3 次,确保试验结果真实可靠。

1.3 统计学分析

采用 Excel 和 SPSS 软件进行统计和分析,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同年份婴幼儿配方食品中蜡样芽胞杆菌检出情况

2012—2014年共检测食品397份,其中52份食品检出蜡样芽胞杆菌,阳性率为13.10%。其中2012、2013、2014年阳性率分别为9.17%(11/120),23.64%(39/165),1.79%(2/112)。

2.2 不同调查区婴幼儿配方食品中蜡样芽胞杆菌

表2 2012—2014年不同调查区婴幼儿配方食品蜡样芽胞杆菌检出情况

Table 2 Results of *Bacillus cereus* in infant formula food in different locations from 2012 to 2014

年份	南昌市		景德镇市		九江市		九江市德安县		九江市彭泽县		赣州市兴国县		吉安市吉州区	
	检出数/份	阳性率/%	检出数/份	阳性率/%	检出数/份	阳性率/%	检出数/份	阳性率/%	检出数/份	阳性率/%	检出数/份	阳性率/%	检出数/份	阳性率/%
2012	5	29.41(5/17)	0	0.00(0/10)	—	—	0	0.00(0/7)	0	0.00(0/3)	0	0.00(0/6)	4	20.00(4/20)
2013	12	63.16(12/19)	1	9.09(1/11)	0	0.00(0/4)	4	28.57(4/14)	5	26.32(5/19)	0	0.00(0/7)	0	0.00(0/12)
2014	0	0.00(0/15)	0	0.00(0/15)	0	0.00(0/10)	—	—	—	—	—	—	0	0.00(0/12)
年份	南昌市青云谱区		萍乡市		上饶市铅山县		上饶市上饶县		宜春市奉新县		宜春市			
	检出数/份	阳性率/%	检出数/份	阳性率/%	检出数/份	阳性率/%	检出数/份	阳性率/%	检出数/份	阳性率/%	检出数/份	阳性率/%	检出数/份	阳性率/%
2012	1	6.25(1/16)	—	—	0	0.00(0/4)	0	0.00(0/7)	1	7.69(1/13)	0	0.00(0/17)		
2013	2	22.22(2/9)	12	54.55(12/22)	1	8.33(1/12)	1	6.25(1/16)	1	14.29(1/7)	0	0.00(0/13)		
2014	1	6.67(1/15)	0	0.00(0/10)	1	6.67(1/15)	—	—	—	—	0	0.00(0/20)		

注:—表示本年度没有开展该项检测

2.3 不同流通环节婴幼儿配方食品蜡样芽胞杆菌检出情况

对不同流通环节的婴幼儿配方食品进行了调查,其中便利店的蜡样芽胞杆菌阳性率为20.16%(26/129),远高于超市、商场等其他流通环节,各流通环节蜡样芽胞杆菌的阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表3。

表3 不同流通环节婴幼儿配方食品蜡样芽胞杆菌的检出情况

Table 3 Results of *Bacillus cereus* in infant formula food in different circulation

地点	食品数/份	检测数/份	阳性率/%
百货商场	37	3	8.11
便利店	129	26	20.16
超市	186	19	10.22
农贸市场	10	0	0.00
网店	2	0	0.00
批发市场	33	4	12.12
合计	397	52	13.10

2.4 不同产地婴幼儿配方食品蜡样芽胞杆菌检出情况

397份食品中包括江西省内自产和省外多个产地的产品,其中江西省内产品53份,外省份产品337份,国外产品7份,不同产地的蜡样芽胞杆菌阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表4。

检出情况

2012年南昌市、吉安市吉州区的蜡样芽胞杆菌污染较为严重,阳性率分别为29.41%和20.00%;2013年南昌市、萍乡市的蜡样芽胞杆菌污染较为严重,阳性率分别为63.16%和54.55%;2014年南昌市青云谱区、上饶铅山县的蜡样芽胞杆菌也有检出,阳性率均为6.67%。不同调查区蜡样芽胞杆菌阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

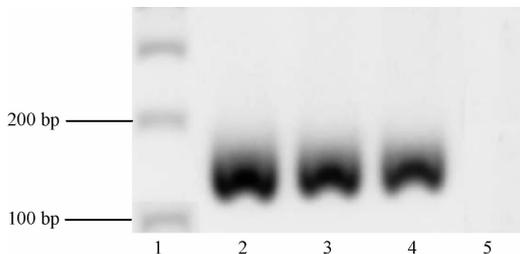
表4 不同产地婴幼儿配方食品蜡样芽胞杆菌检出情况

Table 4 Results of *Bacillus cereus* in infant formula food in different origins

产地	食品数/份	检测数/份	阳性率/%
江西省内	53	3	5.66
国内其他省份	337	49	14.54
国外	7	0	0.00

2.5 含呕吐基因蜡样芽胞杆菌的检出情况

52株蜡样芽胞杆菌PCR结果均含有267 bp的16S rRNA蜡样特异性扩增片段。2株蜡样芽胞杆菌JDZ102Y和PZ0063L含154 bp呕吐基因特异性扩增片段,具有与标准株一致的典型图谱,可以确定为呕吐型蜡样芽胞杆菌(见图1),阳性率为3.85%,详见表5。



注:从左至右泳道依次为:1. Marker; 2. 阳性对照 NC7401/2455; 3. JDZ102Y; 4. PZ0063L; 5. 空白对照

图1 PMA-mPCR-IAC方法测定结果

Figure 1 Results analysis of PMA-mPCR-IAC

表5 呕吐型蜡样芽胞杆菌鉴定

Table 5 Distinguish of emetic *Bacillus cereus*

试验菌株	数目 /株	PCR产物	
		<i>cesB</i>	16S rRNA
产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌	2	+	+
不产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌	50	-	+

3 讨论

婴幼儿因其免疫系统尚未构建完全,少量细菌的引入可能引发大的感染甚至爆发性食物中毒。蜡样芽胞杆菌能产生肠毒素、呕吐毒素,同时其产生的大量生命力强的孢子能够污染婴幼儿配方食品生产的多个环节^[3],因此调查研究婴幼儿配方食品中蜡样芽胞杆菌的污染情况具有重要意义。

2012—2014年江西省婴幼儿配方食品的蜡样芽胞杆菌阳性率为13.10%,具有一定的安全隐患。3年的检测结果中,2013年的阳性率偏高,2014年有所降低。统计学分析显示,不同地点采集的食品中蜡样芽胞杆菌阳性率差异有统计学意义,其中南昌地区3年间检测的婴幼儿配方食品中具有较高的蜡样芽胞杆菌检出,这可能与该地区市场流通量较大有关,提示相关监管部门应将该类食品作为重点监控对象。不同食品产地的阳性率差异无统计学意义,可能与江西省内自助生产和国外生产的产品采样量较少有关,今后可以适度增加相关产品的检测以得到更加明确的结果。

相比不产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌,呕吐型蜡样芽胞杆菌的危害程度更大,使用快捷高效的检测方法鉴定该类细菌意义重大。PMA-mPCR-IAC方法以多重PCR为基础,特异性设计了针对蜡样芽胞杆菌的呕吐基因、16S rRNA基因、IAC内参基因,具备了PCR方法的特异和高效性,可快速、特异、准确的鉴定活性呕吐型蜡样芽胞杆菌,相比传统方法,该方法可大大提高工作效率^[6]。本文采用PMA-mPCR-IAC方法在52株菌中筛选出2株呕吐型蜡样芽胞杆菌,提示江西省市售婴幼儿配方食品中存在该类菌株的污染,52株阳性菌株均含有16S rRNA基因进一步验证了该方法有望取代传统方法鉴定活性蜡样芽胞杆菌和呕吐型蜡样芽胞杆菌。

江西省市售婴幼儿配方食品中蜡样芽胞杆菌的阳性率低于Kim等^[10]报道的韩国婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌的阳性率(20.9%),但高于李莹等^[11]对中国8省婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌污染的调查(阳性率9.8%),也高于姚雪婷等^[12]对广西省市售婴幼儿食品中报道的蜡样芽胞杆菌的阳性率

(10.37%)。由此可见江西省市售婴幼儿配方食品中蜡样芽胞杆菌的污染状况尽管低于某些国外的检出阳性率,但仍高于国内其他地区,同时有检出危害较大的呕吐型蜡样芽胞杆菌,因此仍然需要重点加强这方面的监督管理。

市售婴幼儿配方奶粉作为婴幼儿的主要营养来源,虽然经过加工处理,但是在江西地区仍然存在较高的蜡样芽胞杆菌污染风险,同时有检出呕吐型蜡样芽胞杆菌,这表明婴幼儿配方食品的食品安全问题不容忽视。尽管2014年各调查区的情况有所好转,但是仍应从原料、生产环节、环境等多个方面严格把关,多部门共同携手努力,进一步提高监管水平,为提高产品质量,提升消费者健康提供强有力的保障。

参考文献

- [1] Ebrahim R, Fahimeh A, Hassan M, et al. *Bacillus cereus* in infant foods: prevalence study and distribution of enterotoxigenic virulence factors in Isfahan Province, Iran [J]. The Scientific World Journal, 2013(1):2925-2931.
- [2] WHO. Food safety & food-borne illness [M]. Geneva: Switzerland, 2007.
- [3] 周帼萍,袁志明. 蜡样芽胞杆菌污染及其对食品安全的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(3):357-360.
- [4] Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay [J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 232(2):189-195.
- [5] Hansen B M, Høiby P E, Jensen G B, et al. The *Bacillus cereus* beeT enterotoxin sequence reappraised [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 223(1):21-24.
- [6] ZHANG Z H, WANG L J, XU H Y, et al. Detection of non-emetic and emetic *Bacillus cereus* by propidium monoazide multiplex PCR (PMA-mPCR) with internal amplification control [J]. Food Control, 2014, 35(1):401-406.
- [7] 杨文龙,陈雅衡,王继金,等. 婴幼儿辅食中细菌总数及蜡样芽胞杆菌污染情况分析[J]. 中国酿造, 2013, 32(10):26-30.
- [8] Salmon L. Food security for infants and young children: an opportunity for breastfeeding policy [J]. Int Breastfeed J, 2015, 10:7.
- [9] 杨大进,李宁. 2014年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册[M]. 北京:中国质检出版社,中国标准出版社, 2014:626-644.
- [10] Kim S A, Oh S W, Lee Y M, et al. Microbial contamination of food products consumed by infants and babies in Korea [J]. Lett Appl Microbiol, 2011, 53(5):532-538.
- [11] 李莹,裴晓燕,杨大进,等. 中国八省婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌污染状况研究[J]. 卫生研究, 2014, 43(3):435-438.
- [12] 姚雪婷,唐振柱,刘展华,等. 2012年广西省市售婴幼儿食品食源性致病菌监测与分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(1):85-88.