

- 64(9):1-3.
- [20] SHELLEY E B, O'ROURKE D, GRANT K, et al. Infant botulism due to *C. butyricum* type E toxin; a novel environmental association with pet terrapins [J]. *Epidemiol Infect*, 2015, 143(3):461-469.
- [21] HALPIN A L, KHOURI J M, PAYNE J R, et al. Type F infant botulism: investigation of recent clusters and overview of this exceedingly rare disease [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 66(S1):S92-S94.
- [22] DOYLE C J, GLEESON D, JORDAN K, et al. Anaerobic spore formers and their significance with respect to milk and dairy products [J]. *Int J Food Microbiol*, 2015, 197(12):77-87.
- [23] ROZÉ J C, ANCEL P Y, LEPAGE P, et al. Nutritional strategies and gut microbiota composition as risk factors for necrotizing enterocolitis in very-preterm infants [J]. *Am J Clin Nutr*, 2017, 106(3):821-830.
- [24] BARASH J R, HSIA J K, ARNON S S. Presence of soil-dwelling clostridia in commercial powdered infant formulas [J]. *J Pediatr*, 2010, 156(3):402-408.
- [25] GAN X, DONG Y P, YAN S F, et al. Contamination and characterization of multiple pathogens in powdered formula at retail collected between 2014 and 2015 in China [J]. *Food Control*, 2018, 87(12):40-45.
- [26] BRETT M M, MCLAUCHLIN J, HARRIS A, et al. A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder: evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food [J]. *J Med Microbiol*, 2005, 54(8):769-776.
- [27] DONG Y P, WANG W, JIANG T, et al. Molecular and epidemiological characterization of infant botulism in Beijing, China [J]. *Biomed Environ Sci*, 2017, 30(6):460-464.

调查研究

海口市5类食品中蜡样芽胞杆菌药敏和毒力基因检测及分子分型研究

王艳燕¹, 张慧娟², 冯桃¹, 陈聪¹, 庞燕¹

(1.海口市疾病预防控制中心, 海南 海口 570311;

2.中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206)

摘要:目的 了解海口市5类食品中蜡样芽胞杆菌污染状况、毒力基因携带类型、药物敏感特点和分子分型特征。方法 参照 GB 4789.14—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》对海南粉、海南粉配料、奶粉类、快餐类和糕点类5类食品进行分离鉴定蜡样芽胞杆菌,并应用普通聚合酶链式反应(PCR)方法进行菌群特异性基因 *groEL* 和 10种毒力基因检测;采用微量肉汤稀释(MIC)法检测菌株对抗生素的敏感性;应用脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术对菌株进行分子分型。结果 626份不同食品样品中有197份检出蜡样芽胞杆菌,检出率为31.5%,其中海南粉检出率最高,为63.1%(140/222)。所有菌株均至少携带1种毒力基因,*entFM*基因携带率最高,为99.0%(195/197),*ces*基因携带率最低,为2.5%(5/197);同时携带*nheA*、*nheB*和*nheC*基因的菌株占88.8%(175/197),同时携带*hbla*、*hblC*和*hblD*基因的菌株占13.7%(27/197)。所有菌株对庆大霉素和氯霉素的敏感率均为100.0%(197/197),对万古霉素和环丙沙星敏感率分别为99.5%(196/197)和92.9%(183/197),对青霉素和复方新诺明的耐药率分别为100.0%(197/197)和90.9%(179/197)。PFGE分型结果显示,所有菌株可分为30个簇,117种带型。结论 海口市5类食品均存在蜡样芽胞杆菌污染,其中海南粉污染较重,对食品安全构成潜在的威胁;可依据菌株的毒力基因、分子分型和抗生素敏感性特点进行针对性防控和重点监管。

关键词:蜡样芽胞杆菌;毒力基因;药物敏感;脉冲场凝胶电泳;分子分型

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)02-0170-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.02.012

收稿日期:2019-12-28

基金项目:海南自然科学基金面上项目(817397)

作者简介:王艳燕 女 副主任技师 研究方向为微生物病原体检验技术 E-mail:wangyanyan1030@163.com

通信作者:张慧娟 女 副研究员 研究方向为需氧芽胞杆菌属病原学 E-mail:zhanghuijuan@icdc.cn

Study of the drug sensitivity, virulence genes and molecular typing of

Bacillus cereus in five foods in Haikou

WANG Yanyan¹, ZHANG Huijuan², FENG Tao¹, CHEN Cong¹, PANG Yan¹

(1. Haikou Center for Disease Control and Prevention, Hainan Haikou 570311, China;

2. Institute for Prevention and Control of Infectious Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: Objective To study the distribution, virulence genes, drug sensitivity and molecular characteristic of *Bacillus cereus* in five foods in Haikou area. **Methods** The *Bacillus cereus* strains were isolated from different foods including pastries, milk powder, fast food, Hainan rice noodles and its ingredients, collected from Haikou area, according to the standard GB 4789.14-2014. The specific gene *groEL* and 10 virulence genes were detected by general polymerase chain reaction (PCR) method. The sensitivity to antibiotics of isolates was performed with minimum inhibitory concentration (MIC). The pulsed field gel electrophoresis (PFGE) patterns of strains were analyzed. **Results** 197 strains of *B. cereus* were isolated from 626 food samples and the positive rate of *B. cereus* was 31.5%. In particular, most of *B. cereus* strains were isolated from Hainan rice noodles, accounting for 63.1% (140/222). All isolates carried at least one virulence gene, the rate of *entFM* gene was the highest, up to 99.0% (195/197). On the contrary, *ces* gene was the lowest at 2.5% (5/197) only. There were 175 (88.8%) strains that carried genes of *nheA*, *nheB* and *nheC* simultaneously. There were 27 (13.7%) strains that carried genes of *hblA*, *hblC* and *hblD* simultaneously. The sensitive rate of strains towards gentamicin, chloramphenicol, vancomycin and ciprofloxacin were 100.0% (197/197), 100.0% (197/197), 99.5% (196/197) and 92.9% (183/197), respectively. And the resistance rate of strains towards penicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole were 100.0% (197/197) and 90.9% (179/197), respectively. The PFGE result showed 30 clusters and 117 genotypes. **Conclusion** The positive rate of *Bacillus cereus* in five foods in Haikou area was relatively high, especially in Hainan rice noodles, which should arouse attention and close observation. Targeted prevention and control measures can be carried out according to the characteristics of virulence genes, molecular typing and antibiotic sensitivity of the strains.

Key words: *Bacillus cereus*; virulence gene; drug sensitivity; pulsed field gel electrophoresis; molecular typing

蜡样芽胞杆菌是一种革兰阳性芽胞杆菌,其芽胞具有良好的环境抗性,能在食品的杀菌工艺和脱水干燥过程存活下来,是常见的食品污染菌和食源性致病菌,可导致腹泻型和呕吐型两种食物中毒^[1]。蜡样芽胞杆菌的致病性主要与其携带的毒力基因相关,包括腹泻相关基因如溶血素 BL 基因 (*hblC*、*hblD*、*hblA*、*hblB*)、非溶血性肠毒素基因 (*nheA*、*nheB*、*nheC*)、肠毒素 FM 基因和 T 基因 (*entFM*、*bceT*)、细胞毒素 K 基因 (*cytK*) 以及呕吐毒素相关基因 (*ces*)^[2]。近年来随着有关蜡样芽胞杆菌引起食物中毒的报道越来越多^[3],对蜡样芽胞杆菌潜在危害的研究已成为食品安全领域的热点^[4-10],因此蜡样芽胞杆菌的分离培养、生化鉴定及蜡样芽胞杆菌菌群特异性基因^[2] (*groEL*) 检测,同时对菌株的毒力基因携带类型、药物敏感特点及脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分子分型特征进行相关研究,是食品污染控制和食源性疾病溯源的需要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品及菌株来源

2010—2016 年食源性致病菌监测中,共对

626 份不同食品样品进行蜡样芽胞杆菌检测,包括海南粉 222 份、奶粉类 157 份、海南粉配料 104 份、快餐类 95 份和糕点类 48 份。食品来自海口市四个区域的超市、流动餐车、餐饮服务行业及网购店。试验对照菌株蜡样芽胞杆菌 (ATCC 11778) 购自青岛海博生物科技有限公司,金黄色葡萄球菌 (ATCC 29213) 和粪肠球菌 (ATCC 29212) 均购自广东环凯微生物科技有限公司,沙门菌 (H9812) 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供。

1.1.2 主要仪器与试剂

BD phoenixTM-100 细菌鉴定/药敏系统、革兰阳性鉴定卡均购自美国 BD,聚合酶链式反应 (PCR) 仪、电泳仪、CHEF MAPPER PFGE 系统和 GelDoc XR System 自动凝胶成像仪均购自美国 Bio-Rad。

胰酪酪大豆多粘菌素肉汤 (TSB)、甘露醇卵黄多粘菌素 (MYP) 琼脂、硫酸锰营养琼脂、血琼脂平板等均购自青岛海博生物科技有限公司, D2000 Ladder Marker (MD114)、2 × Taq PCR Master Mix (KT201-02)、核酸染料、琼脂糖、溶菌酶等试剂均购自北京天根生化科技有限公司,所用 PCR 引物均由美国 Thermo Fisher 合成,限制性内切酶 *Xba* I 和 *Not* I 均购自美国 NEB,蛋白酶 K (德国默克),金胶 (瑞士

龙沙),革兰阳性需氧菌药敏检测板(上海星佰生物技术有限公司),所用试剂均在有效期内。

1.2 方法

1.2.1 蜡样芽胞杆菌的分离鉴定

参照 GB 4789.14—2014《食品安全国家标准食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》^[11]将样品分离于 MYP 琼脂平板上,30 ℃ 培养 24 h,挑取典型菌落用 BD 全自动微生物生化鉴定仪进行系统生化鉴定,补充溶血试验、动力试验、根状生长试验、蛋白质毒素结晶试验进行确证,并用 PCR 法检测蜡样芽胞杆菌菌群特异性基因 *groEL*。

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 10 min,12 000 r/min 离心 5 min(离心半径为 8 cm),取上清液作为 PCR 反应模板。

1.2.3 蜡样芽胞杆菌菌群特异性基因和毒力基因检测

普通 PCR 法检测蜡样芽胞杆菌菌群特异性基因 *groEL* 和 *hblA*、*hblC*、*hblD*、*nheA*、*nheB*、*nheC*、*cytK*、*bceT*、*ces*、*entFM* 等 10 种毒力基因。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物电泳:产物和 Marker 分别上样 5 μl,120 V 电泳 45 min。同时分别设蜡样芽胞杆菌(ATCC 11778)和沙门菌(H9812)作为阳性和阴性对照菌株。所用引物序列及扩增产物长度^[6]见表 1。

表 1 蜡样芽胞杆菌菌群特异性基因和 10 种毒力基因引物信息

基因	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
<i>groEL</i>	F:AGCTATGATTCGTGAAGGT	236
	R:AAGTAATAACGCCCTCGT	
<i>hblA</i>	F:ATTAATACAGGGATGAGAAACTT	237
	R:TGATCCTAATACTTCTTAGACGCTT	
<i>hblC</i>	F:CCTATCAATACTCTCGAACACCAAT	386
	R:TTTTCTTGATTCGTCATAGCCATTTCT	
<i>hblD</i>	F:AGATGCTACAAGACTTCAAAGGGAAACTAT	436
	R:TGATTAGCAGATCTGCTTCATACTT	
<i>nheA</i>	F:ATTACAGGGTTATTGGTTACAGCAGT	475
	R:AATCTTGCTCCATACTCTCTTGGATGCT	
<i>nheB</i>	F:CTGCAGCAGCTGTAGGCGGT	328
	R:ATGTTTTCCAGCTATCTTTGCAAT	
<i>nheC</i>	F:CCGATATTGTAAGAATCAAATGAGGT	557
	R:TTTCCAGCTATCTTTGCTGTATGTAAT	
<i>entFM</i>	F:CAAAGACTTCGTAACAAAAGGTGGT	290
	R:TGTTACTCCGCCTTTACAAACTT	
<i>bceT</i>	F:GACTACATTCACGATTACGCAGAA	701
	R:CTATGCTGACGAGCTACATCCATA	
<i>cytK</i>	F:CGACGTCACAAGTTGTAACA	565
	R:CGTGTGTAATAACCCAGTT	
<i>ces</i>	F:GCATTCGTTGAAGCAGAGGT	699
	R:CCCTTTATCCCTTCGATGT	

1.2.4 蜡样芽胞杆菌抗生素敏感性检测

采用美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的微量肉汤稀释(MIC)法,根据国家食品污染和有害因素风险监测工作手册^[12]选择抗生素种类(庆大霉素、氯霉素、万古霉素、环丙沙星、四环素、红霉素、青霉素、复方新诺明、克林霉素),对蜡样芽胞杆菌进行抗生素敏感性试验,并根据 2016 年 CLSI 指南(M45-A3, M100-S26)^[13-14]标准判定药敏结果。质控菌株为金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)和粪肠球菌(ATCC 29212)。

1.2.5 蜡样芽胞杆菌 PFGE 试验及分析

按照中国疾病预防控制中心推荐的蜡样芽胞杆菌 PFGE 标准方法^[15]对菌株进行胶块制备、裂解菌体细胞、蛋白消化、胶块洗涤、染色体酶切和电泳及成像,应用 BioNumerics 软件分析聚类。

2 结果

2.1 蜡样芽胞杆菌污染情况

共检测样品 626 份,从其中的 197 份样品中分离鉴定出 197 株蜡样芽胞杆菌菌株,菌群特异性基因 *groEL* 检测均为阳性,总检出率为 31.5%,其中海南粉、糕点类、快餐类、海南粉配料和奶粉类检出率分别为 63.1%(140/222)、18.8%(9/48)、17.9%(17/95)、15.4%(16/104)和 9.6%(15/157)。

2.2 蜡样芽胞杆菌 10 种毒力基因检出情况

197 株蜡样芽胞杆菌至少携带 1 种毒力基因,最多携带 10 种。*entFM* 和 *nheA* 基因存在于大多数蜡样芽胞杆菌中,携带率分别为 99.0%(195/197)和 98.5%(194/197);细胞毒素 *cytK* 基因在菌株中占 52.3%(103/197);而呕吐毒素基因 *ces* 则只在少数蜡样芽胞杆菌菌株中存在,占 2.5%(5/197)。溶血素 BL 基因携带率在 22.3%~42.6%之间,同时携带三种溶血素 BL 基因的菌株占 13.7%(27/197),见表 2。

表 2 197 株蜡样芽胞杆菌 10 种毒力基因携带情况

毒力基因	菌株数	携带率/%
<i>hblA</i>	84	42.6
<i>hblC</i>	44	22.3
<i>hblD</i>	73	37.1
<i>nheA</i>	194	98.5
<i>nheB</i>	190	96.4
<i>nheC</i>	183	92.9
<i>entFM</i>	195	99.0
<i>bceT</i>	106	53.8
<i>cytK</i>	103	52.3
<i>ces</i>	5	2.5
<i>hblA+hblC+hblD</i>	27	13.7
<i>nheA+nheB+nheC</i>	175	88.8
<i>hblA+hblC+hblD+nheA+nheB+nheC</i>	5	2.5
<i>hblA+hblC+hblD+nheA+nheB+nheC+entFM+bceT+cytK+ces</i>	2	1.0

2.3 蜡样芽胞杆菌药物敏感性检测结果

197株蜡样芽胞杆菌均对庆大霉素和氯霉素敏感,对万古霉素、环丙沙星、四环素和红霉素的敏感率分别为99.5% (196/197)、92.9% (183/197)、83.2% (164/197)和73.1% (144/197);对青霉素和复方新诺明的耐药率分别为100.0% (197/197)和90.9% (179/197);对克林霉素敏感率为52.3% (103/197)。

2.4 蜡样芽胞杆菌 PFGE 分子分型结果

197株蜡样芽胞杆菌使用 *Not I* 酶切,PFGE 分型后经 BioNumerics 软件分析聚类,共呈现出 117 种不同的条带。使用 100% 相似度进行比较分析,可分为 30 个簇,其中有 24 个簇的菌株来源于海南粉样品,有 2 个簇的菌株来源于海南粉配料,有 2 个簇的菌株来源于快餐类样品,有 1 个簇的菌株来源于奶粉类样品,有 1 个簇的菌株来源于糕点类和奶粉类样品,见图 1。

3 讨论

蜡样芽胞杆菌广泛存在于土壤、空气、水、尘埃和植物中,也适合在昆虫和哺乳动物等多种动物的肠道中繁殖。污染源主要为泥土和灰尘,通过昆虫、不洁用具和从业人员的手而传播。蜡样芽胞杆菌食物中毒所涉及的食物种类繁多,包括奶类食品、米饭、禽畜肉类制品及各种甜点等。在美国,炒米饭是引起蜡样芽胞杆菌呕吐型食物中毒的主要食品,在欧洲主要由甜点、色拉、奶和肉类制品引起^[16-17]。我国主要与受污染的米饭和淀粉类制品有关^[8-10]。本研究结果显示,采集的 626 份食品样品中共 197 份样品分离出蜡样芽胞杆菌 197 株,蜡样芽胞杆菌的污染比例达到 31.5%,其中海南粉污染较重,其次是糕点类、快餐类、海南粉配料和奶粉类。研究报道^[4-7]食品中蜡样芽胞杆菌的污染率在 10% 以上,在熟制米面制品中达到 20%~30%,而在快餐盒饭及市场摊点中可达 50%,本研究中的海南粉是即食凉拌食品,长时间暴露在空气中和凉拌即食的销售方式可能是造成大量蜡样芽胞杆菌污染海南粉的主要原因;糕点类、快餐类和海南粉配料食品虽然也是暴露空气中的销售方式,但属于食用前加热加工食品,所以污染程度较轻。奶粉类可能是生产原料受污染所致。

蜡样芽胞杆菌致病力的强弱与携带的毒力因子及表达有关。本研究显示 197 株菌株均至少携带 1 种毒力基因,最多携带 10 种。*entFM* 基因和 *nhe* 基因携带率较高,这与一些文献报道^[5-7,8-10] 相同,提示肠毒素 FM 和非溶血性肠毒素是海口市食品中蜡样芽胞杆菌的主要毒力因子。非溶血性肠毒素在

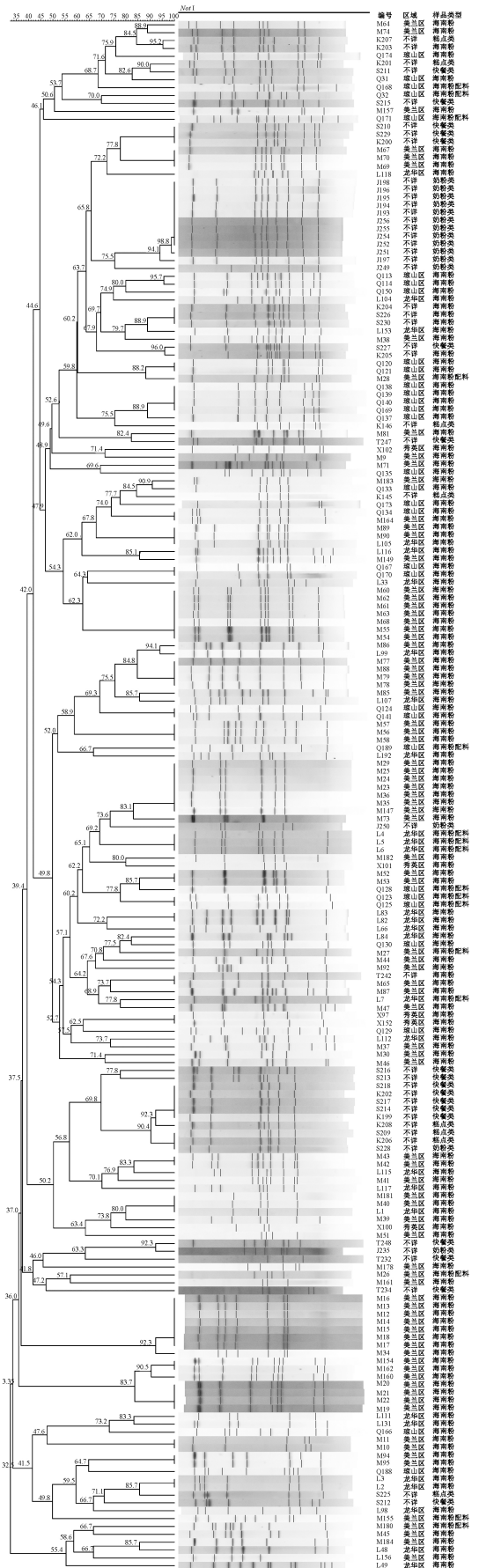


图 1 197 株蜡样芽胞杆菌聚类分析结果

Figure 1 Phylogenetic analysis of PFGE patterns of 197 strains of *B. cereus*

三个亚型基因 (*nheA*、*nheB*、*nheC*) 均呈现阳性时毒性最强;溶血素 BL 需要三个亚型基因 (*hbla*、*hblic*、*hbld*) 均为阳性时才具有毒性;复合型毒素全部组分的共同参与能使该菌毒力达到最大^[6,15]。本研究显示 88.8% 的菌株同时携带三个非溶血性肠毒素基因亚型,13.7% 的菌株同时携带三个溶血素 BL 基因亚型,同时携带溶血素 BL 基因和非溶血性肠毒素基因的菌株占 2.5%,同时携带 10 个毒力基因的强毒株有 2 株,提示海口市 5 类食品中蜡样芽胞杆菌具有毒性的毒株值得关注。

本次药敏检测结果提示青霉素和复方新诺明这两种抗生素不适用于蜡样芽胞杆菌引起的食源性疾病,而大部分菌株对其他抗生素敏感,与其他研究^[8]相符,本研究显示蜡样芽胞杆菌对庆大霉素、氯霉素、万古霉素和环丙沙星有较好的敏感性,可作为临床合理用药的重要依据。

PFGE 分型技术是目前公认的分子分型金标准,可从分子水平追溯菌株同源性,判明传播途径,确定污染源。国外已有将蜡样芽胞杆菌 PFGE 方法应用于食物中毒暴发疫情调查的报道^[18],国内也陆续出现应用 PFGE 方法对食源性蜡样芽胞杆菌进行分型研究的报道^[15,19]。本研究中 5 类食品来源的 197 株蜡样芽胞杆菌 PFGE 分析共呈现出 117 种不同的带型,聚类分析显示可分为 30 个基因簇,说明菌株之间没有聚集性,呈现多态性分布,这可能与蜡样芽胞杆菌在遗传特征上的多样性有关。蜡样芽胞杆菌多样性的遗传特点需要更多的调查数据支持,可通过对不同菌株 PFGE 分型比较,对食品污染进行溯源。

参考文献

- [1] 王洋,周帼萍. 蜡样芽胞杆菌食物中毒死亡案例分析[J]. 中国食品卫生杂志,2011,23(2):191-194.
- [2] PARK S H, KIM H J, KIM J H, et al. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR[J]. J Microbiol Biotechnol, 2007, 17(7): 1177-1182.
- [3] 马文革,黄喜明,谭小华,等. 应用病例-对照研究方法调查一起蜡样芽胞杆菌食物中毒暴发事件[J]. 华南预防医学, 2016,42(2):159-162.
- [4] 诸葛石养,苏爱荣,李秀桂. 广西米面制品中蜡样芽胞杆菌污染分布及耐药性研究[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(18): 2661-2663.
- [5] 谢爱蓉,吴可可,李毅,等. 温州市市售奶粉蜡样芽胞杆菌污染情况调查及毒力基因分析[J]. 中国卫生检验杂志,2018, 28(23):2930-2932.
- [6] 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.
- [7] 游兴勇,卢凌,周厚德,等. 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[J]. 中国食品卫生杂志,2015,27(6):607-610.
- [8] 曹飞扬. 北京市腐乳中蜡样芽胞杆菌检测及毒力基因和耐药性研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2017.
- [9] 李文娟,刘东立,马琳,等. 陕西食品中蜡样芽胞杆菌毒力基因的分布及分子分型研究[J]. 中国卫生检验杂志,2018, 28(9):1027-1031.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 杨大进,李宁. 2014 年国家食品污染物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, 2014:447-579.
- [13] CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; CLSI guideline M45-A3[S]. Wayne, PA: CLSI,2016.
- [14] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-sixth informational supplement; CLSI M100-S26 [S]. Wayne, PA: CLSI,2016.
- [15] 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.
- [16] CHAVES J Q, PIRES E S, VIVONI A M. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades[J]. Int J Food Microbiol,2011,147(1):12-16.
- [17] CHOI K B, LIM H S, LEE K, et al. Epidemiological investigation for outbreak of food poisoning caused by *Bacillus cereus* among the workers at a local company in 2010 [J]. Prev Med Public Health,2011,44(2):65-73.
- [18] LIU P Y, KE S C, CHEN S L. Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *B. cereus* in a pediatric unit[J]. J Clin Microbiol,1997,35(6):1533-1535.
- [19] 黄铭珊. 蜡样芽胞杆菌多重 PCR 快速检测及 PFGE 分型[D]. 福州:福建医科大学,2016.