

调查研究

婴幼儿奶粉和米粉中蜡样芽胞杆菌及其毒素、毒力基因的调查研究

章乐怡,张秀尧,李毅,蔡欣欣,王欣

(温州市疾病预防控制中心,浙江温州 325000)

摘要:目的 了解婴幼儿奶粉及米粉中蜡样芽胞杆菌污染状况及其毒素、毒力基因的携带特点。方法 采用稀释培养计数(MPN计数)法分离蜡样芽胞杆菌,采用PCR技术检测10种蜡样芽胞杆菌的腹泻毒素及呕吐毒素基因,在流动相A为0.1%甲酸-乙腈溶液,流动相B为0.1%甲酸-0.2 mmol/L 乙酸铵溶液条件下,用Acquity BEH300 C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm)对样品进行分离,采用超高效液相色谱-串联质谱法检测样品中的呕吐毒素(cereulide)。结果 本研究共监测39份样品,28份检出蜡样芽胞杆菌,检出率为71.79%(28/39);2份检出呕吐毒素,检出率为5.13%(2/39)。检出的蜡样芽胞杆菌菌株大多属于携带复合型毒素的菌株,均携带3种以上的腹泻毒素基因,非溶血性的肠毒素 *nhe* 基因(*nheA*、*nheB* 和 *nheC*)和肠毒素 *FM* 基因(*entFM*)为主要的毒力基因,其中 *nheABC* 基因携带率为100%,*entFM* 基因携带率为35.71%(10/28),*cytK* 基因是检测到的最少的一种毒力基因。结论 应加强婴幼儿奶粉及米粉中的蜡样芽胞杆菌污染监测及其毒力基因致病性研究,以科学评估蜡样芽胞杆菌对婴幼儿食品可能构成的食品安全风险。

关键词:蜡样芽胞杆菌;食源性疾病;呕吐毒素;毒力基因;食源性致病菌;婴幼儿奶粉;米粉

中图分类号:R155;O657.7⁺2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)06-0600-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.06.021

Investigation of *Bacillus cereus* of toxin gene and metic toxin in infant milk powder and rice flour

ZHANG Le-yi, ZHANG Xiu-yao, LI Yi, CAI Xin-xin, WANG Xin

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

Abstract: Objective To understand the *Bacillus cereus* pollution occupation in infant formula and rice flour, and learn the carriage trait of emetic toxin、toxin gene of *Bacillus cereus*. **Methods** The dilution culture count method (MPN counting) was used to isolate *Bacillus cereus*. PCR was to analyze the toxin gene type, including diarrhea toxin genes and enterotoxin genes and ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was to detect the emetic toxin-Cereulide. **Results** 28 *Bacillus cereus* strains were detected in 39 samples, detection rate was 71.79% (28/39), and two samples (5.13%) carried the emetic toxin. All the strains carried at least three toxin genes revealing most of them are strains of multiple toxic genes. Besides that, *nheABC* and *entFM* genes were the common shared toxin genes. The detection rate of *nheABC* genes and *entFM* were 100%, 35.71% respectively. *cytK* gene was the least frequently detected gene in isolated strains. **Conclusion** It should be maintained that the surveillance of contamination occurrence of *Bacillus cereus* in infant milk powder and rice flour and the study of pathogenicity of *Bacillus cereus* to evaluate the possible threat against infant food safety from *Bacillus cereus* scientifically and practically.

Key words: *Bacillus cereus*; foodborne diseases; cereulide; emetic toxin; foodborne pathogen; infant formula; rice flour

蜡样芽胞杆菌是革兰氏阳性、兼性需氧的芽胞杆菌,属于条件致病菌。根据国家食源性疾病监测网对中国食源性疾病暴发的监测资料分析,由蜡样芽胞杆菌引起的疾病占有所有微生物食源性病例的8.6%,排在第四位^[1]。蜡样芽胞杆菌能引起不同类型的食物中毒。一类是腹泻类型综合症,主要由

腹泻毒素引起。腹泻毒素是一种蛋白质,56℃ 5min失活,遇到胰蛋白酶或胃蛋白酶失活,有抗原性^[2]。与腹泻毒素相关的毒力基因主要为溶血素 *BL* 基因(*hblA*、*hblC* 和 *hblD*)、非溶血性的肠毒素 *nhe* 基因(*nheA*、*nheB* 和 *nheC*)、肠毒素 *FM* 基因(*entFM*)、肠毒素 *T* 基因(*bceT*) 和细胞毒素 *K* 基因(*cytK*);另一类是呕吐类型综合症,主要由呕吐毒素引起。呕吐毒素的主要成分十二环肽(cereulide),对酸、碱、热稳定,高温121℃持续30min稳定,一般食品加工不被破坏,活性不受胃蛋白酶的干扰,

收稿日期:2014-09-28

基金项目:温州市2013年科技项目(Y20130209)

作者简介:章乐怡 女 主任技师 研究方向为微生物检验技术

E-mail:zhleyi@126.com

在活菌被消除的情况下仍能引起食物中毒^[3]。与呕吐毒素相关的基因为 *ces* 基因。

本文通过对市场上不同品牌的婴幼儿奶粉、米粉进行蜡样芽胞杆菌的定量监测,采用 PCR 技术检测蜡样芽胞杆菌的腹泻毒素基因及呕吐毒素基因,并用超高效液相色谱-串联质谱法检测样品中的呕吐毒素(*cereulide*),从而掌握婴幼儿奶粉、米粉中蜡样芽胞杆菌及其毒素携带的情况,为食源性疾病的预警提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

2012 年以随机抽样方法采集市场上销售的 34 份 18 个品牌不同阶段的婴幼儿奶粉(包括进口奶粉 12 份,国产奶粉 22 份)和 5 份不同品牌的国产婴幼儿米粉。

1.1.2 主要仪器与试剂

恒温培养箱、PCR 扩增仪(艾本德中国有限公司)、凝胶成像系统(上海复日科技有限公司)、Acquity UPLC-Quattro Premier XE 超高效液相色谱-串联质谱仪(配备 Masslynx 4.1 工作站,美国 Waters)、ASPEC XL4 四通道全自动固相萃取仪(法国 Gilson)。

呕吐毒素 *cereulide* 和其同位素内标¹³C₆-*cereulide* 由本实验室自行制备^[4];甘露醇卵黄多粘菌素培养基(MYP)等蜡样芽胞杆菌生化试剂均购自北京陆桥技术有限责任公司、API50CHB 试剂条

(法国梅里埃)PCR 引物及 PCR 反应体系 *Taq* PCR Mastermix 由上海生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 蜡样芽胞杆菌的分离和鉴定

样品中蜡样芽胞杆菌的测定方法采用稀释培养计数(MPN 计数)法,所有分离的蜡样芽胞杆菌菌株都经过鉴定。分离鉴定的的方法按 GB/T 4789.14—2003《食品卫生微生物数字检验 蜡样芽胞杆菌检验》^[5]及《2012 浙江省食源性致病菌监测工作手册》^[6]进行鉴定。

1.2.2 蜡样芽胞杆菌毒力基因的 PCR 检测法

1.2.2.1 DNA 模板的制备

细菌模版 DNA 的提取参照文献^[7],采用直接提取法。将上述鉴定证实为蜡样芽胞杆菌的菌株接种营养肉汤复苏后再接种营养琼脂平板,置(30±1)℃培养(24±2)h,获得纯培养物。刮取培养基上一定量的菌苔,研磨后加入 1 ml 灭菌蒸馏水,混匀,8 000 r/min 离心 5 min;吸弃上清,沉淀用双蒸水反复洗涤 2~3 次,8 000 r/min 离心 5 min;弃上清,加入 100 μl 双蒸水,100℃煮沸 20 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清即为模板,用于 PCR 扩增。

1.2.2.2 PCR 引物

蜡样芽胞杆菌的 10 个毒力基因的特异引物设计参照文献^[8],序列及扩增片段大小见表 1。

1.2.2.3 PCR 反应

PCR 反应体系为 50 μl。包括:*Taq* PCR Mastermix (其中含预混合的 PCR Buffer, *Taq* 酶,

表 1 蜡样芽胞杆菌 10 种毒力基因检测引物和扩增产物大小

Table 1 Primers used in the study and their corresponding amplicons' length

目的基因	引物	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
<i>hblA</i>	<i>hblA</i> -F	GCA AAA TCT ATG AAT GCC TA	884
	<i>hblA</i> -R	GCA TCT GTT CGT AAT GTT TT	
<i>hblC</i>	<i>hblC</i> - F	CCT ATC AAT ACT CTC GCA A	695
	<i>hblC</i> - R	TTT CCT TTG TTA TAC GCT GC	
<i>hblD</i>	<i>hblD</i> - F	GAA ACA GGG TCT CAT ATT CT	1 018
	<i>hblD</i> - R	CTG CAT CTT TAT GAA TAT CA	
<i>nheA</i>	<i>nheA</i> - F	ATT ACA GGG TTA TTG GTT ACA GCA GT	475
	<i>nheA</i> - R	AAT CTT GCT CCA TACT CT CTT GGA TGC T	
<i>nheB</i>	<i>nheB</i> - F	GTG CAG CAG CTG TAG GCG GT	328
	<i>nheB</i> - R	ATG TTT TTC CAG CTA TCT TTC GCA AT	
<i>nheC</i>	<i>nheC</i> - F	GCG GAT ATT GTA AAG AAT CAA AAT GAG GT	557
	<i>nheC</i> - R	TTT CCA GCT ATC TTT CGC TGT ATG TAA AT	
<i>entFM</i>	<i>entFM</i> - F	AAA GAA ATT AAT GGA CAA ACT CAA ACT CA	596
	<i>entFM</i> - R	GTA TGT AGC TGG GCC TGT ACG T	
<i>bceT</i>	<i>bceT</i> - F	GAC TAC ATT CAC GAT TAG GCA GAA	303
	<i>bceT</i> - R	CTA TGC TGA CGA GCT ACA TCC ATA	
<i>cytK</i>	<i>cytK</i> - F	ATC GGK CAA AAT GCA AAA ACA CAT	800
	<i>cytK</i> - R	ACC CAG TTW SCA GTT CCG AAT GT	
<i>ces</i>	<i>ces</i> - F	TTG TTG GAA TTG TCG CAG AG	405
	<i>ces</i> - R	GTA AGC GAA CCT GTC TGT AAC AAC A	

DNTP, Mg²⁺等) 25 μl, 上、下游引物各 2 μl, DNA 模板 2 μl, 用双蒸水调整终体积至 50 μl。PCR 反应程序为: 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 72 °C 5 min 循环 35 次。10 个毒力基因的 PCR 反应条件均一致。结果判断: PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳后在凝胶成像系统中成像。阳性对照为蜡样芽胞杆菌 ATCC 11778、ATCC 14579 及本实验室食物中毒标本蜡样芽胞杆菌呕吐株(因购买不到带呕吐毒素基因的 ATCC 标准菌株), 阴性对照为灭菌纯水。PCR 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 2 次, 确保试验结果真实可靠。

1.2.3 超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)检测样品中的呕吐毒素

1.2.3.1 标准溶液配制

取标准贮备液用 80% 甲醇稀释, 准确配制成浓度分别为 0.010, 0.10, 0.50, 1.0, 5.0 和 30 μg/L cereulide 的标准系列, 再加入适量内标物, 使内标物的浓度为 0.4 μg/L。

1.2.3.2 样品处理

取 1.00 g 奶制品(奶粉和米粉等), 溶于 2 ml 45 °C 的温水中, 加入 40 μl 10 μg/L 内标液, 混匀,

加入甲醇至 10 ml, 旋涡 1 min, 超声提取 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取 5 ml 上清液, 60 °C 氮气吹至 1 ml, 各用 5 ml 正己烷萃取 2 次, 合并萃取液, 氮吹至干, 加入 1 ml 正己烷溶解残渣。上硅胶和 Carb 固相萃取柱净化。对每份样品进行平行测定, 每 10 份样品做一个质控加标样。

1.2.3.3 仪器条件

色谱条件: 色谱柱采用 Waters Acquity BEH300C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 配在线过滤器; 流动相 A 为 0.1% 甲酸-乙腈溶液; 流动相 B 为 0.1% 甲酸-0.2 mmol/L 乙酸铵溶液, 梯度洗脱程序: 0 ~ 3.5 min, 88% ~ 95% A; 3.5 ~ 5.0 min, 95% A; 5.0 ~ 5.1 min, 95% ~ 88% A; 5.1 ~ 7.0 min, 88% A。流速 0.30 ml/min; 柱温 40 °C; 进样体积 10 μl。乙腈-丙酮(1:1, V/V) 作为强洗针液, 洗针体积 1.0 ml; 50% 甲醇为弱洗针液, 洗针体积 0.5 ml。

质谱条件: 电喷雾离子源正离子多反应监测(MRM)模式。ESI⁺ 毛细管电压 3.5 kV; 离子源温度 120 °C; 锥孔反吹气流量 50 L/h, 脱溶剂温度 350 °C; 脱溶剂气流量 400 L/h; 碰撞室氦气压力 0.352 Pa。其他质谱参数见表 2。

表 2 质谱的 MRM 参数

Table 2 MS parameters for multiple reaction monitoring

化合物	保留时间/min	监测离子对/(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能/eV
蜡样芽胞杆菌呕吐毒素	3.2	1 170.9/1 125.9	67	40
		1 170.9/357.0		65
¹³ C-蜡样芽胞杆菌呕吐毒素	3.2	1 177.0/1 131.8	67	40
缬氨霉素	2.99	1 129.1/1 084.1	60	37

2 结果

2.1 39 份婴幼儿奶粉、米粉的蜡样芽胞杆菌的定量监测结果

在受检的 39 份婴幼儿奶粉、米粉中, 28 份检出蜡样芽胞杆菌, 检出率达 71.79% (28/39), 其中定量值 ≥ 110 MPN/g 的样品有 6 份, 以国产婴幼儿奶粉的蜡样芽胞杆菌检出率最高, 为 86.36% (19/22)。具体结果见表 3。

2.2 对照菌株的毒力基因的测定结果

本试验中对蜡样芽胞杆菌 ATCC 14579、ATCC 11778 的 10 种毒力基因的检测结果, 除未检出 *ces* 基因外, 其余 9 种毒力基因均检出。对本实验室呕

表 3 39 份婴幼儿奶粉、米粉的蜡样芽胞杆菌的定量监测结果
Table 3 *Bacillus cereus* detection results from 39 samples by MPN

类别	样品数/份	MPN 值/(MPN/g)				检出率/%
		<0.3	0.3 ~ 10	11 ~ 100	>100	
进口婴幼儿奶粉	12	5	7	0	0	58.33(7/12)
国产婴幼儿奶粉	22	3	10	4	5	86.36(19/22)
国产婴幼儿米粉	5	3	1	0	1	40.00(2/5)
合计	39	11	18	4	6	71.79(28/39)

吐株毒力基因的检测结果见表 4。

2.3 28 株婴幼儿奶粉、米粉中蜡样芽胞杆菌的毒力基因携带情况

28 株蜡样芽胞杆菌的非溶血性的肠毒素 *nhe* 基因携带率为 100%, 肠毒素 *FM* 基因携带率为 35.71% (10/28)。蜡样芽胞杆菌不同毒力基因模

表 4 蜡样芽胞杆菌对照菌株的毒力基因的 PCR 测定结果

Table 4 PCR analysis of virulence gene of *Bacillus cereus* reference strains

对照菌株	<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>
ATCC14579	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ATCC11778	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
本实验室呕吐株	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+

式中以携带肠毒素 *nhe* 基因和 *FM* 基因的菌株最多,占 28.57% (8/28),有 5 株菌株仅携带 *Nhe* 基因,占 17.86%。1 株细菌携带所有的腹泻型毒素基因,但不带呕吐毒素基因;带呕吐毒素基因的菌株均携带 *Nhe* 基因。详见表 5、6。

2.4 婴幼儿奶粉及米粉中蜡样芽胞杆菌的呕吐毒素(cereulide)定量分析

对 39 份婴幼儿奶粉、米粉进行呕吐毒素检测,两份检出呕吐毒素,检出率为 5.13% (2/39)。分别在 1 份奶粉和 1 份米粉中检测到呕吐毒素,含量分

表 5 婴幼儿奶粉、米粉中蜡样芽胞杆菌各毒力基因携带情况

Table 5 Distribution of virulence gene of isolated *Bacillus cereus*

毒力基因	检出数/株	携带率/%
<i>hblA</i>	6	21.43 (6/28)
<i>hblD</i>	7	25.00 (7/28)
<i>hblC</i>	6	21.43 (6/28)
<i>nheABC</i>	28	100.00 (28/28)
<i>bceT</i>	6	21.43 (6/28)
<i>cytK</i>	1	3.57 (1/28)
<i>entFM</i>	10	35.71 (10/28)
<i>ces</i>	5	17.86 (5/28)

表 6 本研究中蜡样芽胞杆菌不同毒力基因模式

Table 6 Different toxigenic patterns in the study

基因模式	<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>	目的基因携带率/%
I	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	28.57 (8/28)
II	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	14.29 (4/28)
III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	3.58 (1/28)
IV	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	3.58 (1/28)
V	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	7.14 (2/28)
VI	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	3.58 (1/28)
VII	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	7.14 (2/28)
VIII	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	17.86 (5/28)
IX	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	10.71 (3/28)
X	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	3.57 (1/28)

别为 0.01、0.03 μg/kg。2 份阳性样品平行样相对偏差分别为 9.8%、12.0%。米粉样品中呕吐毒素的 MRM 色谱图见图 1。

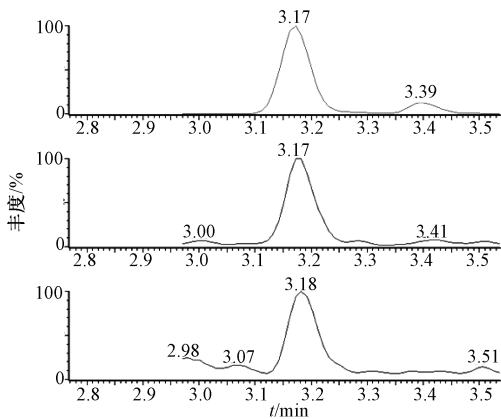


图 1 米粉样品中的 MRM 色谱图

Figure 1 UPLC-MS/MS chromatogram of rice flour sample

3 讨论

我国相关食品的标准中没有明确蜡样芽胞杆菌的残留限量规定值,对该菌的要求大多是按照进食污染菌量 > 10⁵ cfu/g 的食物时就可能发生食物中毒^[9]的标准进行检验控制。GB 10765—2010《食品安全国家标准 婴儿配方食品》^[10]中规定,微生物的限量指标为菌落总数、大肠菌群、金黄色葡萄球菌、阪崎肠杆菌、沙门菌,对蜡样芽胞杆菌无

明确的规定。但由于婴幼儿奶粉、米粉的食用方法特殊,50℃左右的水温不能杀灭蜡样芽胞杆菌及其毒素。曾有母乳化奶粉蜡样芽胞杆菌计数为 2 500 个/g 引起的婴儿腹泻案例^[11]及从患儿喂服过的奶粉中检出蜡样芽胞杆菌菌量为 6.0 × 10² 个/g 引起的婴儿腹泻的案例^[12]。因此基于婴幼儿食品特殊性及其安全性的需要很有必要对婴幼儿食品中的蜡样芽胞杆菌进行监测。

本文结果报告了在婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌的潜在威胁。受检的 39 份婴幼儿奶粉、米粉中,28 份检出蜡样芽胞杆菌,检出率达 71.79%,国内品牌的奶粉蜡样芽胞杆菌检出率高于进口奶粉。蜡样芽胞杆菌 MPN 定量值为 0.3 至 ≥110 MPN/g。

本文对检出的蜡样芽胞杆菌进行 *nheABC*、*cytK*、*bceT*、*hblCDA*、*entFM*、*ces* 基因等毒力基因分析,显示这些菌株大多属于携带复合型毒素的菌株,均携带 3 种以上的腹泻毒素基因。以携带非溶血性肠毒素 *nhe* 基因和肠毒素 *FM* 基因模式的菌株最多,占 28.57% (8/28)。其中非溶血性的肠毒素 *nhe* 基因携带率为 100%,这与韩国文献报道^[8]相似,高于国内其他地区食源性调查样品中蜡样芽胞杆菌 *nheABC* 基因的携带率^[13]。文献显示^[14],溶血素 *BL* 基因、非溶血性的肠毒素 *nhe* 基因、细胞毒素 *K* 基因(*cytK*)是引起腹泻的主要毒力基因,而肠毒素 *FM* 基因(*entFM*)、肠毒素 *T* 基因(*bceT*)则

为潜在的腹泻性毒力基因,目前没有数据显示可引起食物中毒。另我们分离出的菌株中, *cytK* 基因携带率最低,仅为 3.57% (1/28)。近年来的研究把 *cytK* 基因分为两种形式,即 *cytK-1* 和 *cytK-2* 基因,其中对人类具有高毒性的主要是 *cytK-1* 基因^[15]。由于对于检测 *cytK-1* 和 *cytK-2* 基因的方法没有深入研究,本文中检测的 *cytK* 并没有区分开这两种基因,有待在今后的工作中更深入的研究。本文菌株呕吐毒素基因 *ces* 的携带率为 17.86%,高于其他文献报道^[8,16-17],这 5 株带呕吐毒素基因的菌株同时携带腹泻毒素基因,也表明了食物中毒中往往腹泻呕吐症状同时存在。

对于呕吐毒素,曾被认为是食品中唯一的热稳定蜡样芽胞杆菌毒素。运用 UPLC-MS/MS 法测呕吐毒素,该方法灵敏、准确,定量限为 10 ng/kg,检出限为 3 ng/kg。39 份样品中有 2 份检出呕吐毒素,这 2 份样品的蜡样芽胞杆菌定量值均 > 110 MPN/g,并携带 *ces* 及 *nheABC* 基因,有 1 份还携带 *hblCD*、*bceT* 基因,虽然检出的呕吐毒素量并不高,但据文献报道^[18],由谷物和营养补充剂组方的婴儿食品不仅适合于呕吐毒素的产生,而且被水稀释后产生的呕吐毒素量更高^[18]。由于国家对呕吐毒素没有限值而无法对该样品进行判断,也无相关文献报道可能导致婴幼儿患病的最低剂量。而我们对呕吐毒素的检测方法的检出限比相关文献报道要灵敏 2 个数量级^[19],故无相关报道显示相似的 cereulide 的检出值。但 2010 年在温州市一起蜡样芽胞杆菌食物中毒中,几份食物中毒标本检出的呕吐毒素的含量最低的仅 0.01 μg/kg,最高的含量达 9.3 μg/kg^[4]。由于婴幼儿抵抗力较弱,且以这种食品为主要食物,这些产呕吐毒素的婴幼儿食品对婴幼儿健康应存在一定的威胁。

对于呕吐毒素与呕吐毒素基因检测结果的比较,5 份检出呕吐毒素基因的标本有 2 份检出呕吐毒素,有 3 份未检出呕吐毒素,这种结果表明菌株携带毒力基因可能未被表达,另两种方法的前处理方法不同可能造成上述两种结果的不一致,由于检测呕吐毒素取样量少(1 g),而呕吐毒素基因测得是样品中分离到的蜡样芽胞杆菌的毒素基因,样品取样部位和量与前者不同。

本调查研究结果表明,目前我国婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌污染状况不容忽视,建议国家标准有必要对婴幼儿食品增加蜡样芽胞杆菌及毒素的检测项目,以保证婴幼儿食品的安全。

参考文献

- [1] 刘秀梅,陈艳,樊永祥,等. 2003 年中国食源性疾病暴发的监测资料分析[J]. 卫生研究,2006,35(2):201-204.
- [2] 张伟伟,鲁维,张金兰,等. 食品中蜡样芽胞杆菌的研究进展[J]. 中国酿造,2010(5):1-4.
- [3] Taylor J M, Sutherland A D, Aidoo K E, et al. Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*[J]. FEMS Microbiol Lett,2005,242(2):313-317.
- [4] 张秀尧,蔡欣欣,李毅. 超高效液相色谱串联质谱法检测食品中蜡样芽胞杆菌呕吐毒素 Cereulide[J]. 分析化学,2012,40(8):1267-1273.
- [5] 中华人民共和国卫生部,GB/T 4789. 14—2003 食品卫生微生物学检验 蜡样芽胞杆菌[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [6] 浙江省卫生厅. 2012 年浙江食源性致病菌监测手册[Z]. 2012.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1869—2007 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [8] Seong S J, Lim J S, Lee K G, et al. Toxin gene profiling of *Bacillus cereus* food isolates by PCR[J]. J Korean Soc Appl Biol Chem,2008,51(4):263-268.
- [9] 蔡纪明. 常见传染病与急性中毒预防和控制手册[M]. 北京:北京大学医学出版社,2004.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB 10765—2010 食品安全国家 婴儿配方食品[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [11] 易锦庄,姚小玲,丁登禄. 一起婴儿奶粉污染事故的调查[J]. 上海预防医学杂志,1997,9(11):503-504.
- [12] 吴雅儿. 因喂服染有蜡样芽胞杆菌奶粉引起婴儿腹泻 1 例[J]. 海峡预防医学杂志,2003,9(5):4.
- [13] 庄子慧,何丽,郭云昌,等. 我国食源性蜡样芽胞杆菌毒力基因和药物敏感性研究[J]. 中国食品卫生杂志,2013,25(3):198-201.
- [14] Reis A L, Montanhini M T, Bittencourt J V, et al. Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil[J]. Braz J Microbiol, 2013, 44(4): 1195-1198.
- [15] Guinebretiere M H, Fagerlund A, Granum P E, et al. Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system [J]. FEMS Microbiol, 2006,259(1):74-80.
- [16] Chon J W, Kim J H, Lee S J, et al. Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in *Sunsik* [J]. Food Microbiol, 2012, 32: 217-222.
- [17] Kim J B, Kim J M, Cho S H, et al. Toxin genes profiles and toxin production ability of *Bacillus cereus* isolated from clinical and food samples [J]. J Food Sci, 2011, 76(1):25-29.
- [18] 李敏,李东光,王美茵,等. 食物中呕吐毒素 Cereulide 特性及检测研究进展[J], 中国公共卫生,2007,23(9):1116-1117.
- [19] Bauer T, Stark T, Hofmann T, et al. Development of a stable isotope dilution analysis for the quantification of the *Bacillus cereus* toxin cereulide in foods[J] J Agric Food Chem,2010,58(3):1420-1428.