

论著

我国食源性蜡样芽孢杆菌毒力基因和药物敏感性研究

庄子慧¹, 何丽², 郭云昌³, 裴晓燕³, 付萍³, 王晓英⁴

(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营养与食品安全所, 北京 100021; 3. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021; 4. 中国动物疫病预防控制中心, 北京 100125)

摘要:目的 了解我国不同地区食源性蜡样芽孢杆菌的毒力基因携带特点及其对抗生素的敏感性, 为食源性食物中毒的防治提供参考依据。方法 采用 PCR 方法对 2011 年我国不同地区收集的 238 株食源性蜡样芽孢杆菌 10 种毒力基因进行检测; 采用微量肉汤稀释法测定其抗生素敏感性。结果 溶血素 BL 基因、肠毒素 T 基因和细胞毒素 K 基因是我国食源性蜡样芽孢杆菌的主要毒力基因, 至少携带一个毒力基因的菌株达到检出菌总数的 87.4%; 蜡样芽孢杆菌对庆大霉素、万古霉素、环丙沙星、复方新诺明的敏感率为 100%, 对红霉素、四环素、氯霉素、克林霉素的敏感率分别为 88.8%、90.2%、99.6%、87.1%, 对氨苄西林和头孢噻肟的敏感率仅为 0.4% 和 5.4%。结论 我国食源性蜡样芽孢杆菌毒力基因携带率较高, 对食品安全和公共健康构成潜在的威胁; 蜡样芽孢杆菌对氨苄西林、头孢噻肟的敏感性差, 不应作为经验用药和预防用药。

关键词: 食源性蜡样芽孢杆菌; 食源性疾病; 食物中毒; 毒力基因; 药物敏感性

中图分类号: R155.5; R378.2; Q939.97 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)03-0198-04

Virulent gene profiles and antibiotic susceptibility of foodborne *Bacillus cereus* in China

Zhuang Zihui, He Li, Guo Yunchang, Pei Xiaoyan, Fu Ping, Wang Xiaoying

(Haikou Centers for Diseases Control and Prevention, Hainan Haikou 570311, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of virulence associate factors and antibiotic susceptibility of foodborne *Bacillus cereus* in China. **Methods** Ten virulence genes were screened by PCR technology, antibiotic susceptibility was determined in Broth Microdilution Susceptibility Testing. **Results** Hemolysin BL, enterotoxin T and cytotoxin K genes were the common genes. 87.4% of the strains carried at least one virulence gene. *Bacillus cereus* was sensitive to gentamicin, vancomycin, ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, erythromycin, tetracycline, chloramphenicol and clindamycin while resistant to ampicillin and cefotaxime. **Conclusion** Foodborne *Bacillus cereus* in China has strong pathogenicity, posing a potential food safety and public health threat. Ampicillin and cefotaxime had lower sensitivity which should not be used for empirical treatment and prevention.

Key words: Foodborne *Bacillus cereus*; foodborne disease; food poisoning; virulent genes; antibiotic susceptibility

蜡样芽孢杆菌是一种常见的可引起食物中毒的致病菌, 根据 2008 年我国突发公共卫生事件报告管理信息系统统计, 我国细菌性食物中毒中由蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒在发生起数和发病人数方面均居前三位^[1]。

蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒临床表现为发病急, 来势猛, 主要症状为恶心、呕吐和腹

泻^[2]。根据蜡样芽孢杆菌产生呕吐毒素和腹泻毒素, 可分为呕吐型综合症和腹泻型综合症两类^[3]。蜡样芽孢杆菌的主要毒力因子包括: 与呕吐毒素相关的非核糖体多肽合成酶系 (NRPS) 基因^[4]; 与腹泻毒素相关的溶血素 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*)。本试验采用 PCR 方法对 2011 年我国不同地区收集的 238 株食源性蜡样芽孢杆菌分离株的 10 种毒力基因进行检测, 同时进行药敏试验, 对掌握蜡样芽孢杆菌的流行病学特征, 为食源性疾病的预警、预防和治疗提供参考。

收稿日期: 2013-02-27

基金项目: 卫生行业科研专项 (201302005)

作者简介: 庄子慧 女 硕士生 研究方向为食品微生物

E-mail: 154814381@qq.com

通信作者: 郭云昌 男 研究员 研究方向为食品微生物

E-mail: yunchanguo2006@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

2011年通过食源性致病菌监测网收集的我国不同地区蜡样芽孢杆菌238株,菌株分离自米饭、米粉、米线、凉皮等食品,食品样品采自餐饮服务行业(包括餐饮店或集体食堂)。蜡样芽孢杆菌(ATCC 11778)和金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)分别作为基因测定的阳性对照菌株和药敏试验的质控菌株,均为本实验室保存。

1.1.2 主要仪器与试剂

恒温培养箱,生物安全柜,高速离心机,奥林巴斯显微镜成像系统,PCR扩增仪、电泳仪、Del-Doc凝胶成像系统(均为美国Bio-Rad公司)。

甘露醇卵黄多粘菌素培养基(MYP)等蜡样芽孢杆菌生化试剂(北京陆桥技术有限责任公司)、PCR反应体系2×Taq PCR Mastermix[天根生化科技(北京)有限公司]、PCR引物(上海生工生物工程技术有限公司合成)、DNA分子量标准[购于宝生物工程(大连)有限公司]、MH肉汤(Oxoid公司)、氨苄西林、头孢噻肟、庆大霉素、万古霉素、红霉素、四环素、环丙沙星、甲氧苄定、磺胺甲恶唑、氯霉素、克林霉素。

1.2 方法

1.2.1 蜡样芽孢杆菌分离株鉴定

将本试验所用菌株接种营养肉汤复苏后接种至血平板和甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基(MYP),置于(30±1)℃培养(24±2)h,挑选在MYP琼脂平板上微粉红色(表示不发酵甘露醇)、周围有白色至淡粉红色沉淀环(表示产卵磷脂酶)的菌落作革兰染色镜检并同时接种营养琼脂平板,置(30±1)℃培养(24±2)h,获得纯培养物。参照GB/T 4789.14—2003^[5]进行生化鉴定。

1.2.2 DNA模板的制备

刮取适量的纯培养菌落于500 μl双蒸水中制成菌悬液,100℃水浴10 min,立即冰浴20 min,12 000 r/min离心10 min,取上清液作为PCR反应的模板,-20℃冻存备用。

1.2.3 PCR引物

蜡样芽孢杆菌的种基因(*gyrB*)和10个毒力基因的特异引物序列及扩增片段大小见表1。

1.2.4 PCR反应

PCR反应体系(25 μl)包括:2×Taq PCR Mastermix(其中含预混合的PCR Buffer, Taq酶, DNTP, Mg²⁺等)12.5 μl,上、下游引物各2 μl, DNA模板2 μl,用双蒸水调整终体积至25 μl。基因测

表1 试验所用PCR引物

Table 1 PCR primers used in this study

目的基因	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)	
<i>gyrB</i> ^[6]	<i>gyrB</i> -F <i>gyrB</i> -R	ATTGGTGACACCGATCAAACA TCATACGTATGGATGTTATTC	365
	NRPS-F NRPS-R	GACAAGAGAAATTTCTACGAGC AAGTACAAT GCAGCCTTCCAATTACTIONCTTCT GCCACAGT	
<i>hblA</i> ^[8]		<i>hblA</i> -F <i>hblA</i> -R	GCTAATGTAGTTTCACCTGTAGCAAC AATCATGCCACTGCGTGGACATATAA
	<i>hblC</i> ^[6]	<i>hblC</i> -F <i>hblC</i> -R	CCTATCAATACTCTCGCAA TTCTCTTGTATACGCTGC
<i>hblD</i> ^[6]		<i>hblD</i> -F <i>hblD</i> -R	GAAACAGGGTCTCATATTTT CTGCATCTTTATGAATATCA
	<i>nheA</i> ^[6]	<i>nheA</i> -F <i>nheA</i> -R	TAAGGAGGGGCAAACAGAAG TGAATGCCAAGAGCTGCTTC
<i>nheB</i> ^[6]		<i>nheB</i> -F <i>nheB</i> -R	CAAGCTCCAGTTCATGCGG GATCCCATTTGTGTACCATTG
	<i>nheC</i> ^[6]	<i>nheC</i> -F <i>nheC</i> -R	ACATACCTTTTGCAGCAGAAC CCACCAGCAATGACCATATC
<i>entFM</i> ^[8]		<i>entFM</i> -F <i>entFM</i> -R	ATGAAAAAAGTAATTTGCAGG TTAGTATGCTTTTGTGTAACC
	<i>bceT</i> ^[9]	<i>bceT</i> -F <i>bceT</i> -R	TTACATTACCAGACGTGCTT TGTTFTGTATTGTAATTCAGG
<i>cytK</i> ^[6]		<i>cytK</i> -F <i>cytK</i> -R	CGACGTCAAAAGTTGTAACA CGTGTGTAAATACCCAGTT

定的阳性对照为蜡样芽孢杆菌,阴性对照为灭菌纯水。PCR反应后立即取10 μl产物上样至1.8%的琼脂糖凝胶于120 V电压下电泳60 min,Del-Doc凝胶成像系统观察、拍照记录结果。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。

1.2.5 药物敏感性试验

采用美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的微量肉汤稀释法进行药物敏感性试验。药敏试验质控菌株为金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)。

1.3 统计学方法

采用B×C列联表 χ^2 检验。

2 结果

2.1 毒力基因检出情况

溶血素BL基因、肠毒素T基因和细胞毒素K基因在我国分布广泛,分布差异无统计学意义,是我国食源性蜡样芽孢杆菌的主要毒力基因。87.4%的菌株携带至少一个毒力基因,40.3%的菌株携带复合型溶血素BL基因。可见,我国食源性蜡样芽孢杆菌的毒力基因携带率较高,是潜在病源。呕吐毒素NRPS基因、非溶血性的肠毒素Nhe基因和肠毒素FM基因的地区分布差异有统计学意义。进一步分析发现呕吐毒素NRPS基因的地域差异出现在华北与华东、华北与中南地区之间;非溶血性的肠

毒素 *Nhe* 基因的地域差异出现在华北与华东、华北与中南、华北与西南地区之间;肠毒素 *FM* 基因的

地域差异出现在华北与西南地区之间。检测结果统计如表 2。

表 2 我国食源性蜡样芽孢杆菌毒力基因在不同地区的检出情况

Table 2 Distribution of virulence gene of *Bacillus cereus* strains isolated from different areas in China

毒力基因	毒力基因检出菌株数(地区百分率%)					
	全国	华北	华东	中南	西南	西北
NRPS	17(7.1%)	6(24%)	1(2%)	5(5.1%)	2(4.8%)	3(13.6%)
<i>hbla</i>	116(48.7%)	11(44%)	29(58%)	48(48.5%)	18(42.9%)	10(45.5%)
<i>hblC</i>	120(50.4%)	11(44%)	28(56%)	51(51.5%)	19(45.2%)	11(50.0%)
<i>hblD</i>	99(41.6%)	9(36%)	24(48%)	42(42.4%)	15(35.7%)	9(40.9%)
同时携带 <i>hbla</i> 、 <i>hblC</i> 、 <i>hblD</i>	96(40.3%)	9(36%)	24(48%)	39(39.4%)	15(35.7%)	9(40.9%)
至少携带 <i>hbla</i> 、 <i>hblC</i> 、 <i>hblD</i> 中的一个	124(52.1%)	12(48%)	29(58%)	53(53.5%)	19(45.2%)	11(55.0%)
<i>nheA</i>	32(13.4%)	10(40%)	5(10%)	12(12.1%)	3(7.1%)	2(9.0%)
<i>nheB</i>	59(24.8%)	16(64%)	12(24%)	22(22.2%)	5(11.9%)	4(18.2%)
<i>nheC</i>	152(63.9%)	18(72%)	38(76%)	51(51.5%)	30(71.4%)	15(68.2%)
同时携带 <i>nheA</i> 、 <i>nheB</i> 、 <i>nheC</i>	31(13.0%)	10(40%)	4(8%)	12(12.1%)	1(2.4%)	2(9.1%)
至少携带 <i>nheA</i> 、 <i>nheB</i> 、 <i>nheC</i> 中的一个	154(64.7%)	18(72%)	39(78%)	52(52.5%)	30(71.4%)	15(68.2%)
<i>entFM</i>	55(23.1%)	11(44%)	15(30%)	20(20.2%)	4(9.5%)	5(22.7%)
<i>bceT</i>	96(40.3%)	14(56%)	24(48%)	36(36.4%)	22(52.4%)	10(45.5%)
<i>cytK</i>	120(50.4%)	15(60%)	21(42%)	51(51.5%)	20(47.6%)	13(59.1%)
至少携带所检测十个毒力基因中的一个	208(87.4%)	23(92%)	48(96%)	82(82.8%)	35(83.3%)	20(90.9%)

2.2 食源性蜡样芽孢杆菌药物敏感性分析

食源性蜡样芽孢杆菌对庆大霉素、万古霉素、环丙沙星、复方新诺明、红霉素、四环素、氯霉素、克林霉素敏感,而对氨苄西林、头孢噻肟的敏感率低,

仅为 0.4%、5.4%。不同地区食源性蜡样芽孢杆菌对抗生素药物的敏感性差异无统计学意义。药敏试验结果见表 3。

表 3 我国食源性蜡样芽孢杆菌在不同地区药物敏感情况

Table 3 Antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from different areas in China

药名称物	敏感菌株数(地区百分率%)					
	全国	华北	华东	中南	西南	西北
氨苄西林	8(0.4%)	1(4.0%)	2(4.4%)	3(3.2%)	2(4.9%)	0(0)
头孢噻肟	12(5.4%)	2(8.0%)	2(4.4%)	4(4.3%)	3(7.3%)	1(5.0%)
庆大霉素	224(100%)	25(100%)	45(100%)	93(100%)	41(100%)	20(100%)
万古霉素	224(100%)	25(100%)	45(100%)	93(100%)	41(100%)	20(100%)
红霉素	199(88.8%)	23(92%)	40(88.9%)	85(91.4%)	37(90.2%)	14(70%)
四环素	202(90.2%)	24(96%)	40(88.9%)	85(91.4%)	36(87.8%)	17(85%)
环丙沙星	224(100%)	25(100%)	45(100%)	93(100%)	41(100%)	20(100%)
复方新诺明	224(100%)	25(100%)	45(100%)	93(100%)	41(100%)	20(100%)
氯霉素	223(99.6%)	25(100%)	45(100%)	92(98.9%)	41(100%)	20(100%)
克林霉素	195(87.1%)	23(92%)	37(82.2%)	79(84.9%)	40(97.6%)	16(80%)

3 讨论

本研究报告了我国食源性蜡样芽孢杆菌潜在的毒性威胁。结果显示,溶血素 BL 基因、肠毒素 T 基因和细胞毒素 K 基因是我国食源性蜡样芽孢杆菌的主要毒力基因。蜡样芽孢杆菌的致病性强弱取决于其毒力因子,复合型毒素全部组分的共同参与能使其毒力达到最大,有研究显示只有含有溶血素 BL 全部基因的菌株才会产生溶血素^[10],而我国食源性蜡样芽孢杆菌 40.3% 携带复合型溶血素 BL 基因,表明我国食源性蜡样芽孢杆菌有可能对进食者产生严重的危险性。国内食源性蜡样芽孢杆菌的各毒力基因的阳性率均低于印度、韩国和巴西^[6,11-12],这可能与菌株的基因型别、食品种类和

地理位置差别有关。食源性蜡样芽孢杆菌溶血素 BL 基因、肠毒素 T 基因和细胞毒素 K 基因在我国分布较为广泛,且地域分布差异无统计学意义;而呕吐毒素 NRPS 基因、非溶血性的肠毒素 *Nhe* 基因和肠毒素 *FM* 基因地域分布差异有统计学意义。本试验所研究的食源性蜡样芽孢杆菌抗生素敏感情况与昆明等地的食源性蜡样芽孢杆菌情况相近^[13],与国外 M. A. Rather 等^[6]的报道亦相近。

总而言之,了解食源性蜡样芽孢杆菌主要毒力基因型,有助于掌握我国食源性蜡样芽孢杆菌的流行病学特征,同时通过对不同地区来源的食源性蜡样芽孢杆菌进行药敏试验,可为合理应用抗生素,选择高敏药物治疗食源性蜡样芽孢杆菌引起的疾