

论著

一蜡样芽胞杆菌食物中毒分离株的表型与基因型

周帼萍¹, Niels Bohse Hendriksen², Kai Bester², 刘勇¹, 杨祖顺³

(1. 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023; 2. 丹麦奥胡斯大学环境科学系, 丹麦 罗斯基勒 DK4000; 3. 云南省疾病预防控制中心, 云南 昆明 650022)

摘要:目的 对2003年发生在云南的一起蜡样芽胞杆菌呕吐型食物中毒案例中的分离株 YN0303 进行表型和基因型分析研究。方法 采用16S rDNA 序列分析和16S/23S rDNA ITS 特征图谱分析结合形态、生理生化和基因型进行菌种鉴定; PCR 检测呕吐毒素和肠毒素合成相关基因, 高效液相和质谱联用(HPLC-MS) 化学定量分析呕吐毒素合成情况, 测试部分生理生化特性和生长温度范围, 进行了 *panC* 分型和多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)。结果 确认了该菌株确为蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus*, 虽然该食物中毒是典型的呕吐型案例, 但是发现该分离株呕吐毒素相关合成基因 *ces* 呈阴性, 呕吐毒素化学定量分析结果为阴性; 其生理生化特性(水杨苷发酵、淀粉水解和溶血特性)与典型呕吐型菌株也不相同。*panC* 分型并非呕吐型蜡样芽胞杆菌所属的Ⅲ型, 而是属于细胞毒性强的Ⅳ型, 而且其肠毒素基因 *hbl*, *nhe* 和 *cytK2* 也均呈阳性; 多位点序列分析显示该菌是一个新型别 ST753, 是区域性相对独立进化菌株。结论 在该呕吐型食物中毒案例中可能有多个蜡样芽胞杆菌参与, 该分离株 YN0303 并非主要致病株—呕吐型菌株, 但可能作为细胞毒性强的菌株参与了共感染。

关键词: 蜡样芽胞杆菌; 呕吐型食物中毒; 多位点序列分析; 食物中毒; 食品安全; 食源性致病菌

中图分类号: R155; O657.7⁺² 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)01-0010-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.01.003

Phenotype and genotype analysis of one *Bacillus cereus* isolate from an emetic food poisoning case

ZHOU Guo-ping, Niels Bohse Hendriksen, Kai Bester, LIU Yong, YANG Zu-shun

(School of Bioengineering and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Hubei Wuhan 430023, China)

Abstract: Objective This study investigated the phenotypic and genotypic characteristics of YN0303, an isolate from a food poisoning case occurred in Yunnan Province in 2003. **Methods** The strain was identified by 16S rDNA and 16S/23S rDNA ITS analysis, together with morphology, biochemical and gene analysis. Toxic gene profiles, *panC* analysis, multilocus sequence typing and high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) analysis were further applied. **Results** YN0303 was confirmed to be *Bacillus cereus*. Although it's an isolate from a typical food poisoning case, it was negative for cereulide-producing related *ces* gene and no cereulide was detected in HPLC-MS quantitative analysis, while it was positive for entero-toxicogenic genes such as *hbl*, *nhe*, and *cytK2*. It's also different from typical emetic *B. cereus* in biochemical tests. It belonged to cytotoxic IV group, while emetic strains should belong to III group. YN0303 forms a new ST in multilocus sequence typing analysis, which was an independent branch in phylogeny tree. **Conclusion** More than one *B. cereus* strain involved in this emetic food poisoning case, and YN0303 was not the main pathogenic strain. But as a cytotoxic strain, it might be involved in co-infection.

Key words: *Bacillus cereus*; emetic food poisoning case; multilocus sequence typing; food poisoning; food safety; foodborne pathogens

蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*, 简称 Bc)在自然界分布很广, 常见于土壤中, 因此谷物粮食类分离率较高, 是常见的食源性致病菌之一。但如果食物中的

污染达到 10^5 cfu/g, 细菌会代谢产生毒素, 人食用含毒素的食物后会产生呕吐、腹泻等不良症状。因此, 由蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒分为呕吐型和腹泻型两种, 前者因摄入热稳定环状毒素 cereulide 而引发恶心和呕吐为主的症状, 潜伏期短; 后者是摄入受污染食品中该菌产生多种肠毒素导致腹痛和腹泻为主的症状, 潜伏期长。呕吐毒素相关基因 *ces* 位于大质粒上也有少数位于染色体上^[1]; 而 HBL, NHE 和 CytK

收稿日期: 2014-11-21

基金项目: 中国-丹麦政府间科技合作项目([2010]329); 湖北省教育厅科学研究计划项目中青年项目(Q20111703)

作者简介: 周帼萍 女 副教授 研究方向为微生物与食品安全

E-mail: wjczgp@163.com

这3种桶孔形成类的细胞毒素则是腹泻型食物中毒中的主要致病因子,其相应基因(*hbl*, *nhe*, *cytK1/cytK2*)均位于染色体上^[2-3]。

2003年3月19日,云南某小学发生食用豆豉而导致112名学生集体食物中毒事件,中毒症状为恶心、呕吐和腹痛,云南省疾病预防控制中心通过流行病学调查情况和微生物检测分析,判断为蜡样芽胞杆菌食物中毒^[4],并保留了一株分离株

YN0303。因为Bc在食品中检出率很高,但是其食物中毒却罕见,所以对该菌株进行的表型和基因型分析研究,以了解食物中毒分离株的特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标准菌株来源及特性

标准菌株来源及特性,见表1。

表1 标准株来源及特性

Table 1 Sources and characteristics of type strains

菌株	特性及用途	来源
<i>B. cytotoxicus</i> NVH 391-98	<i>cytK1</i> 和 48 ℃ 及 50 ℃ 生长阳性对照株	丹麦奥胡斯大学
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	ITS 和生理生化试验对照株	丹麦奥胡斯大学
<i>B. cereus</i> F4810/72	<i>ces</i> 和呕吐毒素 HPLC-MS 检测阳性对照	丹麦奥胡斯大学
<i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD1	<i>hbl</i> , <i>nhe</i> 和 <i>cytK2</i> 阳性对照株	丹麦奥胡斯大学
<i>B. weihenstephanensis</i> DSMZ 11821R	嗜冷型,用于低温 6 ~ 15 ℃ 生长对照	丹麦奥胡斯大学
<i>B. anthracis</i> (only DNA extract)	<i>repX</i> 阳性对照株	丹麦奥胡斯大学

1.1.2 主要仪器与试剂

Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国 Dionex)、API 4000(美国 AB Sciex Framingham)、TC-312 PCR 仪(英国 Techne)、SYNGENE 凝胶图像分析系统(英国 Syngene)、荧光显微镜、酶标仪、培养箱。

PCR 扩增试剂(北京 Aidlab 公司),DNA marker DL2000、Goldview 荧光染料均购自日本 TaTaRa,缬氨霉素标准品(2001-95-8 SIGMA-94675,美国 Sigma),16S rDNA 采用通用引物 27F 和 1492R,引物和测序由苏州金唯智公司完成,其他引物见表2。

表2 本研究中所用 PCR 引物

Table 2 Primers used in the study

基因	引物	引物序列(5'-3')	退火温度/°C	产物长度/bp
16S/23S rDNA ITS	ITS-16S-1392-S-15	GNACACACCGCCCGT	55	750 和 500 2 条带 ^[5]
	ITS-23S-206-A-21	NCTTAGATGTTTCAGTTCVCY		
<i>ces</i>	<i>EM1F</i>	GACAAGAGAAATTTCTACGAGCAAGTACAAT	60	636 ^[6]
	<i>EM1R</i>	GCAGCCTTCCAATTACTCCTTCTGCCACAGT		
<i>cesB</i>	<i>CesF1</i>	GGTGACACATTATCATATAAGGTG	58	1 270 ^[7]
	<i>CesR2</i>	GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA		
<i>repX</i>	<i>repX-F4</i>	CACGTGATGCWGAGGCTTTA	49	850 ^[8]
	<i>repX-R2</i>	GATAATTTCTCTTTGTYGTTGTGA		
<i>hblA</i>	<i>HBLA 1</i>	GTGCAGATGTGATGCCGAT	55	320 ^[9]
	<i>HBLA 2</i>	ATGCCACTGCGTGGACATAT		
<i>hblC</i>	<i>L2A</i>	AATGGTCATCGGAACCTAT	55	750 ^[9]
	<i>L2B</i>	CTCGCTGTTCTGCTGTTAAT		
<i>hblD</i>	<i>L1A</i>	AATCAAGAGCTGTCACGAAT	55	430 ^[9]
	<i>L1B</i>	CACCAATTGACCATGCTAAT		
<i>nheA</i>	<i>nheA 344 S</i>	TACGCTAAGGAGGGGCA	55	500 ^[9]
	<i>nheA 843 A</i>	GTTTTTATTGCTTCATCGGCT		
<i>nheB</i>	<i>nheB 1500 S</i>	CTATCAGCACTTATGGCAG	55	770 ^[9]
	<i>nheB 2269 A</i>	ACTCTAGCGGTGTTCC		
<i>nheC</i>	<i>nheC 2820 S</i>	CGGTAGTGATTGCTGGG	55	582 ^[9]
	<i>nheC 3401 A</i>	CAGCATTCTACTTGCCAA		
<i>cytK1</i>	<i>CK 1F</i>	CAATTCACAGGGCAAGTGTC	57	426 ^[10]
	<i>CK 1R</i>	CCTCGTGCATCTGTTTCATGAG		
<i>cytK2</i>	<i>CK 2F</i>	CAATCCCTGGCGCTAGTGCA	57	585 ^[10]
	<i>CK 2R</i>	GTGNAGCCTGGACGAAGTTGG		

1.2 方法

1.2.1 YN0303 生理生化特性检测

水杨苷水解、淀粉水解和溶血活力检测方法参见文献[11]。生长温度范围检测:与2株对照株同

时接种 T3 平板^[12],6、48 和 50 ℃ 培养箱中培养,分别于 3 ~ 5 d 和 21 d 记录生长情况。

1.2.2 多位点序列分型(MLST)和 *panC* 分型

panC 基因的扩增、测序、分型和危害性评价见

文献[13]和 Affiliation to phylogenetic groups (I to VII) into the *Bacillus cereus* group^[14]。

MLST 分型依据 *Bacillus cereus* MLST Databases 数据库^[15]要求完成,苏州金唯智公司测序,结果提交 MLST 数据库,以 goeBURST 1.2.1 版软件进行聚类分析。

1.2.3 样品处理

YN0303 和标准株 *B. cereus* F4810/72 接种心脑血管浸液琼脂培养平板,30 ℃ 培养 3 d,半皿菌苔(0.3 ~ 0.5 mg)收集 2 ml EP 管中,用 96% 的无水乙醇提取呕吐型毒素,12 000 r/min 离心 15 min,取上清进行高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)分析。

1.2.4 仪器条件

色谱条件:色谱柱:协同极性反相柱(150 mm × 2 mm,4 μm)。流动相:水、甲醇和乙腈的三元梯度分离液,流速 0.25 ml,进样量 1 μl,Ultimate 3000 双梯度低压混合 HPLC 系统,水、甲醇和乙腈的三元梯度分离液在协同极性反相柱上进行分离,API 4000 质谱仪检测。

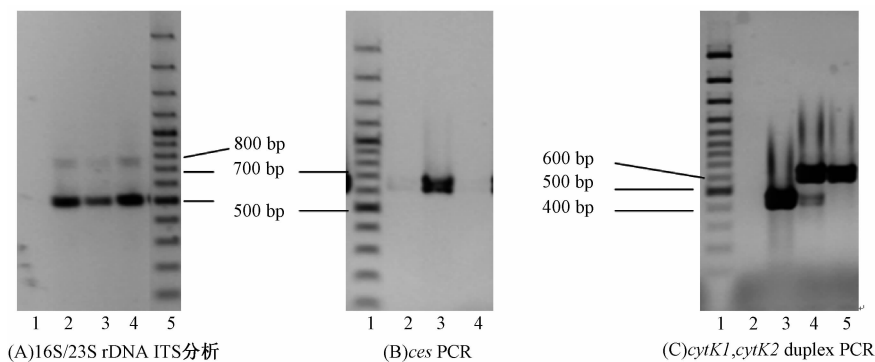
质谱条件:质谱采用正离子模式的电离子喷

雾,从 500 ~ 1 300 amu 全扫描记录。离子丰度 1 170 (1 169.5 ~ 1 170.5) amu,滞留时间 8.50 min 的波峰为呕吐毒素,离子丰度 1 112 (1 111.5 ~ 1 112.5) amu,滞留时间 8.40 min 的波峰记为缬氨霉素。呕吐毒素无标准品,故以缬氨霉素为内标校准,*B. cereus* F4810/72 提取液为参照,通过校准使数据获得部分补偿纠偏^[16]。

2 结果与分析

2.1 YN0303 的表型特征与菌种鉴定

16S rDNA 序列(GenBank 编号:KF055372.1)分析显示与 *B. thuringiensis* WS2623 (Y18473.1) 的 max identity 达到 100%,与其他 *B. cereus* 群细菌多个菌株的 max identity 达 99%。16S/23S rDNA ITS 分析 *B. cereus* 群细菌会产生 2 个扩增产物位于 750 和 500 bp,是识别 *B. cereus* 群细菌的常见方法^[5],YN0303 具有与标准株一致的典型图谱,可以确定为蜡样芽胞杆菌群细菌(*B. cereus* group),见图 1。



注:图 1(A)从左至右泳道依次为:1. 空白对照,2. 阳性对照 *B. cereus* ATCC 14579,3. *B. cereus* F4810/72,4. YN0303,5. Marker;图 1(B)从左至右泳道依次为:1. Marker,2. 空白对照,3. 阳性对照 *B. cereus* F4810/72,4. YN0303;图 1(C)从左至右泳道依次为:1. Marker,2. 空白对照,3. *cytK1* 基因的阳性对照 *B. cytotoxicus* NVH 391-98,4. *cytK2* 基因的阳性对照 *B. thuringiensis kurstaki* HD1,5. YN0303

图 1 PCR 测定结果

Figure 1 Results analysis of PCR

该群细菌包括至少 7 个种,因为基因组的高度近似性,只能用特定的表型和基因来区分。显微观察不含伴胞晶体,排除苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*,见图 2。没有蕈状生长特性,排除蕈状芽胞杆菌 *B. mycoides* 和假蕈状芽胞杆菌 *B. pseudomycoides*;低于 10 ℃ 不生长。排除韦氏芽胞杆菌 *B. weihenstephanensis*;能运动且 β-溶血,排除炭疽芽胞杆菌 *B. anthracis*;50 ℃ 不生长且 *cytK1* 基因为阴性,排除细胞毒性芽胞杆菌 *B. cytotoxicus*,根据此可初步判定该菌株确为蜡样芽胞杆菌 *B. cereus*。

绝大多数呕吐型菌株有独特的生理生化特性:不水解淀粉、不发酵水杨苷、不溶血或微弱溶血,多为中温菌(≤6 ℃ 和 50 ℃ 不生长)。YN0303 是中

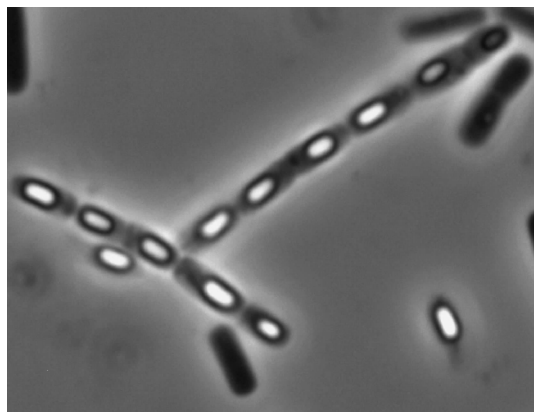


图 2 YN0303 显微形态

Figure 2 Microscopic morphology of YN0303

温菌但淀粉和水杨苷发酵试验均为阳性, β 溶血不同于典型的呕吐型菌株^[7],具体试验结果为水杨苷: +;淀粉: +;溶血: β ;50℃: -;48℃: ±;15℃: + +;10℃: ±;8℃: -;6℃: -。

2.2 HPLC-MS 和 PCR 结果

PCR 检测结果表明,YN0303 呕吐型毒素合成基因 *ces* 为阴性,呕吐毒素合成基因所在大质粒的特征性 *rep* 基因也为阴性。基因型检测结果和化学定量分析结果一致,该菌株既未携带呕吐毒素 *cereulide* 合成相关基因[见图 1(B)],同时 HPLC-MS 也未检出呕吐毒素,说明该菌株并非呕吐型致病菌株。但是 YN0303 的 3 种主要肠毒素基因:*hbl* (编码 3 个亚基的 *hblA*、*hblC* 和 *hblD*)、*nhe* (编码 3 个亚基的 *nheA*、*nheB* 和 *nheC*)、*cytK2* 均为阳性,具备感染型腹泻型致病株的基因特征。细胞毒性芽胞杆菌 *B. cytotoxicus* 所特有的细胞毒素 *cytK1* 为阴性,具体结果为:*ces*: -; *cesB*: -; *repX*: -; *cytK1*: -; *cytK2*: +; *hblA*: +; *hblC*: +; *hblD*: +; *nheA*: +; *nheB*: +; *nheC*: +。

2.3 *panC* 分析结果

panC 分析能将 *Bc* 群细菌分为 7 个系统发育组,能反映细胞毒性和致病力。呕吐型 *Bc* 菌株属于其中 III 型,YN0303 属于 IV 型,IV 型菌株绝大多数都携带有 *hbl*、*nhe* 和 *cytK2* 三种肠毒素基因,有细胞毒性,部分菌株有很高的细胞毒性。YN0303 的生长温度范围和毒素基因携带情况与 *panC* 分析的 IV 型菌株的特征完全吻合,而不同于 III 型^[12,17]。

2.4 MLST 与 eBURST 聚类分析

结果提交 MLST 数据库 ID1382,并确认属于一个新型别 ST753。MLST *Bacillus cereus* 数据库目前含有全球提交的 1 451 分离株的有效信息,共分为 815 个不同的型别(STs)。设定群所需最小相同等位基因数为 6,取样自展值设置为 1 000,运行 goeBURST V1.2.1 版软件 MLST 数据库中数据进行聚类分析:SLV 水平(单位点差异/最小相同等位基因数为 6),ST753 独自构成了一个序列群 Group 426;DLV 水平(双位点差异/最小相同等位基因数 5)独自构成 Group 214;只有 TLV 水平(三位点差异/最小相同等位基因数为 4)属于 Group 0 (含 204STs,409 个菌株,)。Group 0 中与 ST753 在系统进化上最为接近的是 ST466(中国台湾食品分离株);ST473(中国台湾大米分离株);ST159(日本健康食品操作人员粪便分离株);ST157(日本河流中分离);ST238(美国)。这些 STs 都是仅含单一菌株的 ST,而且除 ST238 外都是亚洲分离株。显示 ST753 可能是具有地区性相对独立进化的菌株。

而呕吐型 *Bc* 菌株在进化上比较保守,目前发现的 4 个型别:ST26,ST164,ST165 和 ST144^[11],SLV 水平均属于 Group 9,DLV 水平属于 Group 12,TLV 水平属于 Group 3,都与 YN0303 构成的 ST753 相距甚远,见图 3。

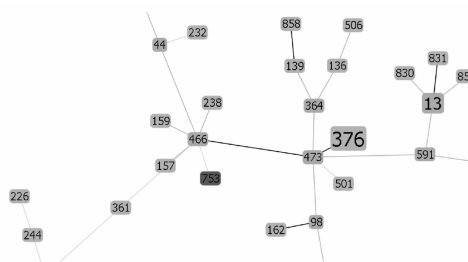


图3 采用 goeBURST 算法分析 MLST 数据库,选取三位点差异/最小相同等位基因数为 4,新型别 ST753 所属 Group 0 的局部示意图

Figure 3 Partial snapshot of the *Bacillus cereus* MLST database Group 0 generated using the goeBURST algorithm, indicating new ST753

3 讨论

目前标准主要依据形态和生理生化法对病原菌进行鉴定和分类^[18],这些传统方法具有很高的实用性和可行性,尤其在基层和初步分析工作中必不可少,但是先进的分子生物学技术因其快速、灵敏、可以更全面的展现微生物的生物学特性而日益突显出其优越性。常见污染菌如 *Bc*,在同一个样品中存在多种菌株,其中毒或感染可能有表型非常接近的多种基因型菌株参与。比如 2003 年比利时 *Bc* 呕吐型食物中毒死亡案例,共分离 22 个菌株,通过后续分析,发现至少有 5 种不同基因型的 *Bc* 菌株,6 株为非呕吐型,16 株为呕吐型(PFGE 有 2 种不同类型),充分显示了 *Bc* 食物中毒的复杂性:多种菌株参与,菌株之间存在复杂的协同或竞争关系^[19]。今后的食物中毒分析需尽可能多收集来源、菌落和显微形态不同的菌株,结合分子生物学技术才能保证分析的可靠性和完整性。

本案例仅保留了一个分离株,通过深入的表型和基因型分析却发现并非呕吐型致病株,非此案例的主要罪魁祸首,但作为一个细胞毒性菌株可能参与了感染过程。但也显示现行蜡样芽胞杆菌分析鉴定方法的缺陷:不能区分呕吐型和腹泻型 *Bc* 菌株,落后于微生物分类体系的发展,不能将 *Bc* 群中另外 2 个与食品安全有重要关联的新种—韦氏芽胞杆菌、细胞毒性芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌区分开来。这几点对于分析调查我国高致病力食源性致病菌来说是个重大问题,国际上公认呕吐型 *Bc* 在系统进化上同源性

很高,生理生化特性较为保守而独特^[7]。但我国21个呕吐案例分离株有9个生化型,显示出高度的分化特征^[20],这可能是因为国标中生理生化试验的设计没有很好区别呕吐型和其他Bc菌株,也可能是如本案例一样,未区分同种不同菌株的共感染,从侧面证实了呕吐型Bc食物中毒案例中分离株不等于呕吐型Bc菌株,存在误判。

参考文献

- [1] MEI X F, XU K, YANG L L, et al. The genetic diversity of cereulide biosynthesis gene cluster indicates a composite transposon tnces in emetic *Bacillus weihenstephanensis* [J]. BMC Microbiol, 2014, 14: 149-159.
- [2] 周帼萍,袁志明. 蜡状芽胞杆菌及其对食品安全的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 357-361.
- [3] Ceuppens S, Boon N, Uytendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2013, 84(3): 433-450.
- [4] 沈其萍,杨庆文,栗场. 一起蜡样芽胞杆菌引起食物中毒的调查分析[J]. 实用预防医学, 2005(6): 713.
- [5] Willumsen P A, Johansen J E, Karlson U, et al. Isolation and taxonomic affiliation of N-Heterocyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(3): 420-428.
- [6] Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 23(2): 189-195.
- [7] Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretiere M H, et al. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains [J]. Microbiology, 2005, 15(1): 183-197.
- [8] HU X, Swiecicka I, Timmerly S, et al. Sympatric soil communities of *Bacillus cereus* sensu lato: population structure and potential plasmid dynamics of pXO1- and pXO2-like elements [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2009, 70(3): 344-355.
- [9] Hansen B M, Hendriksen N B. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis [J]. Applied Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 185-189.
- [10] 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 Microbiology Letters, 2006, 259(1): 74-80.
- [11] Apetroaie C, Andersson M A, Sproer C, et al. Cereulide-producing strains of *Bacillus cereus* show diversity [J]. Archives in Microbiology, 2005, 184(3): 141-151.
- [12] Travers R S, Martin P A, Reichelderfer C F. Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(6): 1263-1266.
- [13] Guinebretiere M H, Thompson F L, Sorokin A, et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(4): 851-865.
- [14] Guinebretiere M H. Affiliation to phylogenetic groups (I to VII) into the *Bacillus cereus* group [DB/OL]. [2014-09-20]. <https://www.tools.symprevious.org/Bcereus/english.php>
- [15] Jolley K. *Bacillus cereus* MLST Databases [DB/OL]. [2014-11-02]. <http://pubmlst.org/bcereus/>
- [16] Haggblom M M, Apetroaie C, Andersson M A, et al. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2479-2483.
- [17] Guinebretiere M H, Velge P, Couvert O, et al. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (Groups I to VII) rather than species affiliation [J]. Journal Clinical Microbiology, 2010, 48(9): 3388-3391.
- [18] 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 蜡样芽胞杆菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [19] Dierick K, Van Coillie E, Swiecicka I, et al. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning [J]. Journal Clinical Microbiology, 2005, 43(8): 4277-4279.
- [20] 周帼萍,梁天光,丁淑娟. 1986—2007年中国299起蜡样芽胞杆菌食物中毒案例分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(5): 450-453.

· 请示批复 ·

国家卫生计生委食品司关于餐饮环节生肉类食材微生物检测有关问题的复函

国卫食品标便函〔2014〕171号

中国烹饪协会:

你协会《关于餐饮环节生肉类食材微生物检测事项适用标准的函》收悉。经研究,现答复如下:

《食品中致病菌限量》(GB 29921—2013)规定了即食生肉制品和熟肉制品中沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌等致病微生物限量要求,不适用于餐饮环节非即食生肉;《速冻面米制品》(GB 19295—2011)适用于预包装速冻面米制品的管理,不适用于生肉类食品。

专此函复。

(相关链接:<http://www.nhfdc.gov.cn/sps/s3593/201501/d1f14c5095aa43b8a65708e47023c866.shtml>)

国家卫生计生委食品司
二〇一四年八月十九日