

风险监测

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

闫韶飞, 闫旭, 甘辛, 李志刚, 余东敏, 赵熙, 李凤琴

(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)

摘要:目的 了解国内市售婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌污染及毒力基因分布情况。方法 采用MPN法定量检测婴儿配方乳粉中的蜡样芽胞杆菌,在对分离菌株正确鉴定的基础上,开展腹泻型和呕吐型毒素产生相关毒力基因的分布研究。结果 135份婴儿配方乳粉中有57份检出蜡样芽胞杆菌,检出率为42.22%。平均污染水平为7.14 MPN/g。国产产品蜡样芽胞杆菌污染较进口产品重,网售产品较超市销售产品重,差异有统计学意义($P < 0.05$)。共发现24种蜡样芽胞杆菌毒力基因携带模式,其中*nhe*基因携带率最高,达92.98% (53/57),其次为*entFM*基因(71.93%),70.18% (40/57)的菌株同时携带*nhe*和*entFM*基因。亚型分型结果显示*nheA*、*nheB*和*nheC*基因的携带率分别为88.72%、88.72%和49.12%。溶血素*BL*基因携带率分别为*hblA* 24.56%、*hblC* 22.81%和*hblD* 17.54%,*cytK*基因携带率为22.81%。有8株菌既携带*nhe*的3个基因又携带*hbl*的3个基因。结论 我国市售婴儿配方乳粉蜡样芽胞杆菌污染较重,分离到的蜡样芽胞杆菌菌株普遍携带毒力基因,建议加强对婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌污染的监管,并开展膳食暴露该菌对婴儿健康影响的风险评估,为制定婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌的限量标准提供依据。

关键词:蜡样芽胞杆菌; 婴儿配方乳粉; 毒力基因; 定量检测; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号:R155;S852.61+6 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)03-0286-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.03.014

Survey on contamination of *Bacillus cereus* and its virulence gene profiles isolated from retail infant formula in China

YAN Shao-fei, YAN Xu, GAN Xin, LI Zhi-gang, YU Dong-min, ZHAO Xi, LI Feng-qin

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To survey the contamination and virulence gene profiles of *B. cereus* isolated from retail infant formula in China. **Methods** Infant formulas were quantitatively detected for *B. cereus* using MPN method. Virulence genes in relation to emetic and diarrheal toxins production harbored by *B. cereus* were detected by multiplex PCR. **Results**

Fifty-seven out of 135 infant formula samples were positive for *B. cereus* with the contamination rate of 42.22% and the mean contamination level of 7.14 MPN/g. The contamination of *B. cereus* in domestically produced infant formula was more severe than those imported one. *B. cereus* contamination of infant formula sold online was more serious than that collected from supermarket. A total of 24 toxigenic patterns in *B. cereus* were found. Most of *B. cereus* isolates carried *nhe* gene (92.98%) and *entFM* gene (71.93%). There were 40 (70.18%) strains that carried both *nhe* and *entFM* genes simultaneously. Subtyping results demonstrated that the frequency of *nheA*, *nheB*, *nheC* were 88.72%, 88.72%, 49.12%, and *hblA*, *hblC*, *hblD* were 24.56%, 22.81%, 17.54%, respectively. The frequency of *cytK* occurrence was 22.81%. There were 8 strains that carried all three subtypes of both *nhe* and *hbl* genes, which indicated that these strains may be highly toxic. **Conclusion** Retail infant formulas were heavily contaminated by *B. cereus*. Most isolates carried one or more virulence genes. It is recommended to broaden the monitoring for *B. cereus* in infant formulas. It is necessary to make an assessment of infant dietary exposure to *B. cereus* in order to establish the national standard of maximal limit for *B. cereus* in infant formula.

Key words: *Bacillus cereus*; infant formula; virulence gene; quantitative detection; foodborne pathogenic bacteria; food safety

收稿日期:2015-03-27

作者简介:闫韶飞 男 助理研究员 研究方向为食品微生物 E-mail:yanshaofei@cfsa.net.cn

通讯作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail:lifengqin@cfsa.net.cn

蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)是一种革兰阳性产芽胞的杆菌,广泛分布于土壤、水、空气以及动物肠道等,生长温度范围较宽(8~55℃),最适生长温度为28~35℃,因此室温条件下极易在食品生产、运输和销售等环节繁殖而污染食品^[1-2]。该菌是条件致病菌,主要通过产生腹泻毒素和呕吐毒素导致人类中毒,其致病性取决于以下两个因素是否同时存在:一是该菌携带并可表达的毒力基因,二是被污染的食品中蜡样芽胞杆菌水平达到 10^5 cfu/g以上^[3]。最常见的中毒食品包括乳制品、肉制品、米饭、豆制品、海鲜、焙烤食品、蔬菜调料等。

蜡样芽胞杆菌能够产生呕吐毒素(ETE)和3种肠毒素,包括溶血性肠毒素(HBL)、非溶血性肠毒素(NHE)和肠毒素K(EntK),其中HBL和NHE是引起以腹泻为主食物中毒的重要肠毒素,与这些肠毒素产生相关的毒力基因有5个:溶血素BL基因(*hbl*)、非溶血性肠毒素基因(*nhe*)、肠毒素FM基因(*entFM*)、肠毒素T基因(*becT*)和细胞毒素K基因(*cytK*)。其中*hbl*与*nhe*各有3个不同的基因亚型,分别为*hblA*、*hblC*、*hblD*与*nheA*、*nheB*、*nheC*。HBL需要*hblA*、*hblC*、*hblD*3个基因均为阳性时才具有毒性;而当*nheA*、*nheB*、*nheC*3个基因均为阳性时NHE的毒性最强^[4-5]。表达呕吐毒素的毒力基因为*ces*基因,该基因编码的呕吐毒素为不易裂解的耐热性毒素^[6]。

除产生毒素引起食物中毒外,近年来蜡样芽胞杆菌引起老人、婴儿免疫力低下以及危重症病人肺炎、脑膜炎、胃炎和皮肤炎症等肠外感染的报道越来越多^[7]。婴儿作为免疫力低下的特殊敏感群体,摄入被蜡样芽胞杆菌污染的食品后更易导致中毒。为了解我国婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌的污染状况,本研究对我国市售婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌的定量污染水平进行检测,并对分离的蜡样芽胞杆菌毒力基因分布进行研究,所获数据可为制订婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌限量标准提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品及标准菌株

从超市、网上商城以及网上母婴专卖店购买66个品牌共计135份婴儿配方乳粉,其中进口样品22份、国产样品113份(产自17个省);羊配方乳粉31份,牛配方乳粉104份。产品均在有效期内。

蜡样芽胞杆菌标准菌株(ATCC 11778)与沙门菌(H9812)均为本实验室保藏。

1.1.2 主要仪器与试剂

UNIVERSAL Hood II型凝胶电泳成像系统、PCR仪、电泳仪均购自美国Bio-Rad, Vitek2全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃), CLASS II B2型生物安全柜(美国LABCONCO), 电子天平(感量:0.01g), 高压蒸汽灭菌器, 恒温培养箱, 离心机, 纯水仪, 涡旋混合器。

缓冲蛋白胨水(BPW)、胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB)、多粘菌素B、脑心琼脂培养基(BHA)、甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基(MYP)均购自北京陆桥生物技术有限公司, Vitek2 BCL TEST KIT 鉴定卡(法国生物梅里埃), 100 bp DNA Ladder(MD109)、 $2 \times Taq$ PCR MaterMix(KT201-02)均购自北京天根生化有限公司, 所用PCR引物均由英潍捷基公司合成。

1.2 方法

1.2.1 蜡样芽胞杆菌的分离

参照美国细菌学分析手册(BAM)中蜡样芽胞杆菌的最大可能数(MPN)检测方法^[8]对乳粉样品进行检测。即无菌称取50g乳粉于盛有450ml BPW均质袋中,快速拍打1~2min至乳粉完全溶解后,用BPW进行10倍系列稀释,取 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 3个稀释度的样品匀液各1ml,分别接种于10ml的胰酪胨大豆多粘菌素肉汤中,每一稀释度接种3管,共计9管。(30±1)℃培养48h后,自浑浊生长的培养管中取一环培养液划线接种于MYP平板,(30±1)℃培养24h后进行基因和生化确认鉴定。

1.2.2 蜡样芽胞杆菌的鉴定

从每个MYP平板上分别挑取5个蜡样芽胞杆菌疑似菌落,转种到BHA平板,(30±1)℃条件下培养24h后,挑取菌落于双蒸水中,煮沸10min后,进行细菌基因组DNA模板提取,用PCR方法对蜡样芽胞杆菌菌群特异性基因*groEL*进行鉴定。PCR反应条件为:95℃预变性3min,95℃变性30s,56℃退火30s,72℃延伸30s,30个循环后,72℃10min。*groEL*上下游引物序列分别为:AGCTATGATTCGTGAAGGT和AAGTAATAACGCCGTCGT,扩增片段大小为236bp^[9],蜡样芽胞杆菌(ATCC 11778)与沙门菌(H9812)分别做为PCR试验的阳性和阴性对照菌株。

对所有*groEL*基因阳性的菌株用Vitek 2全自动细菌鉴定仪进行生化鉴定。将生化鉴定为蜡样/蕈状/苏云金芽胞杆菌组的菌株再进一步做根状生长试验和蛋白质毒素结晶试验,将根状生长试验和蛋白质毒素结晶试验均为阴性者判定为蜡样芽胞杆菌。

1.2.3 蜡样芽胞杆菌毒力基因测定

对鉴定确认为蜡样芽胞杆菌的菌株采用多重

PCR 方法进行 10 个毒力基因的检测。根据扩增片段大小将 10 个毒力基因分为 5 组:包括 *hblA/hblC/hblD*、*nheA/nheB/nheC/entFM/bceT/cytK* 以及 *ces*, 引物序列及扩增片段大小具体见表 1^[4,9]。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,30 个循环后,72 °C 10 min。同时设蜡样芽胞杆菌(ATCC 11778)做为阳性对照、沙门菌(H9812)为阴性对照。

表 1 蜡样芽胞杆菌毒力基因检测用引物序列及扩增产物长度
Table 1 Primers and amplicons of virulence genes of *B. cereus*

引物	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
<i>hblA</i> -F	ATTAATACAGGGGATGGAGAACTT	237
<i>hblA</i> -R	TGATCCTAATACTTCTTCTAGACGCTT	
<i>hblC</i> -F	CCTATCAATACTCTCGCAACACCAAT	386
<i>hblC</i> -R	TTTTCTTGATTGCTCATAGCCATTCTT	
<i>hblD</i> -F	AGATGCTACAAGACTTCAAAGGAACTAT	436
<i>hblD</i> -R	TGATTAGCACGATCTGCTTTCATACTT	
<i>nheA</i> -F	ATTACAGGGTTATTGGTTACAGCAGT	475
<i>nheA</i> -R	AATCTTGCTCCATACTCTCTTGGATGCT	
<i>nheB</i> -F	GTGCAGCAGCTGTAGCGCGT	328
<i>nheB</i> -R	ATGTTTTCCAGCTATCTTTCCGAAT	
<i>nheC</i> -F	GCGGATATTGTAAAGAATCAAATGAGGT	557
<i>nheC</i> -R	TTTCCAGCTATCTTTCCGCTGTATGTAAT	
<i>entFM</i> -F	CAAAGACTTCGTAACAAAAGGTGGT	290
<i>entFM</i> -R	TGTTTACTCCGCCCTTTTACAACTT	
<i>bceT</i> -F	AGCTTGGAGCGGAGCAGACTATGT	701
<i>bceT</i> -R	GTATTTCTTTCCCGCTTGCCCTTTT	
<i>cytK</i> -F	CGACGTCACAAGTTGTAACA	565
<i>cytK</i> -R	CGTGTGTAATAACCCAGTT	
<i>ces</i> -F	GCATTTCTGTAAGCAGAGGT	699
<i>ces</i> -R	CCCTTTATCCCCTTCGATGT	

2 结果

2.1 市售婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌污染状况分布

本研究共检测分析了 66 个品牌共计 135 份婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌的污染情况,所采样品基本覆盖了国内销售的高、中、低端品牌婴儿配方乳粉,结果有 57 份检出蜡样芽胞杆菌,检出率为 42.22%,污染水平范围 3 ~ 1 100 MPN/g,污染水平平均值为 7.14 MPN/g。57 份被蜡样芽胞杆菌污染的样品中 78 份污染水平 < 3 MPN/g,45 份污染水平在 3 ~ 10 MPN/g 范围内,11 份介于 11 ~ 100 MPN/g(7 份介于 11 ~ 50 MPN/g,4 份介于 51 ~ 100 MPN/g),其中有 1 份的污染水平达 1 000 MPN/g,需要引起关注。在被调查的 31 份婴儿配方羊乳粉中,有 20 份被蜡样芽胞杆菌污染,污染率为 64.52% (20/31)。而 104 份婴儿配方牛乳粉的污染率为 35.58% (37/104),低于羊乳粉的污染率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。羊乳粉中污染水平高于 10 MPN/g 的有 8 份,牛乳粉有 4 份,见表 2。

对国产和进口乳粉样品的检验结果统计分析显示,国产婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌污染率(48.67%)远高于进口产品中该菌的污染率(9.09%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,对不同经销商出售的样品检验结果统计分析显示,网上孕婴专卖店出售的婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌污染率及污染水平最高,分别为 47.73% 和 8.01 MPN/g,其次为网上商城出售的样品(38.89%,5.31 MPN/g),

表 2 市售婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌污染状况

Table 2 Prevalence and contamination level of *B. cereus* in retail infant formulas in China

分组	乳粉特点	检出率/%	蜡样芽胞杆菌污染水平分布/(MPN/g)					污染水平平均值 /(MPN/g)	污染水平范围 /(MPN/g)
			<3	3~10	11~50	51~100	>1 000		
原料类别	牛奶	35.58(37/104)	67	33	2	1	1	5.96	3~1 100
	羊奶	64.52(20/31)	11	12	5	3	0	9.99	3~93
样品产地	进口	9.09(2/22)	20	2	0	0	0	3.60	3.60
	国产	48.67(55/113)	58	43	7	4	1	7.32	3~1 100
采样地点	超市	9.09(1/11)	10	1	0	0	0	3.60	3.60
	网上商城	38.89(14/36)	22	13	0	1	0	5.31	3~75
适用年龄段	网上孕婴专卖店	47.73(42/88)	46	31	7	3	1	8.01	3~1 100
	0~100 天	0 (0/1)	1	0	0	0	0	0	0
	0~6 个月	44.86(48/107)	59	38	5	4	1	7.57	3~1 100
	0~12 个月	21.43(3/14)	11	3	0	0	0	3.39	3~3.60
产地省份*	6~12 个月	46.15(6/13)	7	4	2	0	0	6.50	3.60~15
	陕西	66.67(22/33)	11	13	5	3	1	12.59	3~1 100
	黑龙江	51.85(14/27)	13	11	2	1	0	7.07	3.60~75
	山东	41.67(5/12)	7	5	0	0	0	3.35	3~3.60
	浙江	40.00(2/5)	3	2	0	0	0	5.16	3.60~7.40
	广东	37.50(3/8)	5	3	0	0	0	6.73	3.20~9.60

注: * 为产地省份中仅显示采样量 > 5 份的省份,国内其他 12 个省份阳性样品的污染水平均低于 3.60 MPN/g,因此表中产地省份项检出数少于 57 份,样品总数少于 135 份

超市出售的婴儿配方乳粉中该菌的污染率和污染水平最低,分别为 9.09% 和 3.6 MPN/g。两种网店

出售的婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌污染率(47.73% 和 38.89%) 远高于超市(9.09%),差异有

统计学意义($P < 0.05$),见表2。

根据采集样品中标签标示的适应年龄段,将本研究所采婴儿配方乳粉样品的适宜人群分为4个不同年龄段,分别为0~100天、0~6个月、6~12个月和0~12个月。其中以供0~6个月婴儿食用的配方乳粉中蜡样芽胞杆菌污染率和污染水平最高,分别为44.86%和7.57 MPN/g,其次为供6~12个月婴儿食用的配方乳粉(46.15%,6.5 MPN/g),因此供适宜消费人群的年龄段越低,蜡样芽胞杆菌的污染率和污染水平越重,应引起生产厂家和政府监管部门的关注,见表2。

不同产地婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌检出率各异,在采样量为5份以上的省份中,陕西产婴儿配方乳粉中该菌的污染率和污染水平最高,分别为66.67%和12.59 MPN/g,其次为黑龙江(51.85%,7.07 MPN/g),此外污染率较高的省份还有山东(41.67%,3.35 MPN/g)、浙江(40%,5.16 MPN/g)和广东(37.5%,6.37 MPN/g)产婴儿配方乳粉。其他省份产样品该菌检出率较低,且阳性样品的污染水平均低于3.6 MPN/g,结果见表2。

2.2 蜡样芽胞杆菌婴儿配方乳粉分离株毒力基因携带情况

经鉴定,从135份婴儿配方乳粉样品中共分离出57株蜡样芽胞杆菌,在检测的5种腹泻型毒力基因中,以*nheA*和*nheB*的携带率最高,均为88.72%,其次为*entFM*和*nheC*,携带率分别为71.93%和49.12%。3个溶血素BL基因携带率分别为*hblA* 24.56%、*hblC* 22.81%和*hblD* 17.54%,*cytK*的携带

率为22.81%。腹泻类毒素基因中携带率最低的为*bceT*(7.02%)。仅有2株(3.51%)蜡样芽胞杆菌携带表达呕吐毒素的毒力基因*ces*,具体见表3。

表3 婴儿配方奶粉中蜡样芽胞杆菌分离株毒力基因的检出及携带情况

Table 3 Virulence genes harbored by *B. cereus* isolated from infant formulas

毒力基因	检出数/株	携带率/%
<i>hblA</i>	14	24.56
<i>hblC</i>	13	22.81
<i>hblD</i>	10	17.54
<i>nheA</i>	50	87.72
<i>nheB</i>	50	87.72
<i>nheC</i>	28	49.12
<i>entFM</i>	41	71.93
<i>bceT</i>	4	7.02
<i>cytK</i>	13	22.81
<i>ces</i>	2	3.51
<i>hblA + hblC + hblD</i>	10	17.54
<i>nheA + nheB + nheC</i>	29	50.88
<i>hblA/C/D + nheA/B/C</i>	8	14.04

本研究共发现24种蜡样芽胞杆菌毒力基因携带模式。其中92.98%(53/57)的蜡样芽胞杆菌携带*nhe*基因,70.18%(40/57)的蜡样芽胞杆菌同时携带*nhe*和*entFM*基因;50.88%(29/57)的蜡样芽胞杆菌同时携带*nheA*、*nheB*和*nheC*;17.54%(10/57)的蜡样芽胞杆菌同时携带*hblA*、*hblC*和*hblD*。既携带*nhe*3个基因同时又携带*hbl*3个基因的有8株,占14.04%(8/57)。除*ces*基因外,1株蜡样芽胞杆菌携带所有类型的毒力基因,属强毒株。3株(5.26%)蜡样芽胞杆菌不携带任何毒力基因,具体见表4。

表4 婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌分离株不同基因模式在毒力基因中的分布

Table 4 Patterns of virulence genes of *B. cereus* isolated from infant formulas

基因模式	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>entFM</i>	<i>bceT</i>	<i>cytK</i>	<i>ces</i>	基因模式携带率/%
I	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	19.30(11/57)
II	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	17.54(10/57)
III	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	7.02(4/57)
IV	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	5.26(3/57)
V	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	5.26(3/57)
VI	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	5.26(3/57)
VII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.26(3/57)
VIII	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	3.51(2/57)
IX	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3.51(2/57)
X	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	3.51(2/57)
XI	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	1.75(1/57)
XII	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	1.75(1/57)
XIII	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1.75(1/57)
XIV	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	1.75(1/57)
XV	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	1.75(1/57)
XVI	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	1.75(1/57)
XVII	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	1.75(1/57)
XVIII	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	1.75(1/57)
XIX	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	1.75(1/57)
XX	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	1.75(1/57)
XXI	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	1.75(1/57)
XXII	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1.75(1/57)
XXIII	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	1.75(1/57)
XXIV	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	1.75(1/57)

3 讨论

婴儿由于其免疫系统尚未发育成熟,即使摄入少量的蜡样芽胞杆菌也能够对其健康造成危害。文献报道^[10-11],婴儿在分别进食污染 2 500 cfu/g 和 160 cfu/g 蜡样芽胞杆菌的婴儿配方乳粉后可引起腹泻。为此,澳大利亚和新西兰 [$n = 5, c = 0, m = 100 \text{ cfu/g (ml)}$]、加拿大 [$n = 10, c = 1, m = 100 \text{ cfu/g (ml)}$], $M = 10\ 000 \text{ cfu/g (ml)}$] 分别制定了婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌的限量标准。而我国目前尚无控制婴儿配方食品中蜡样芽胞杆菌污染的相关标准。虽然蜡样芽胞杆菌致病性相对较弱,且污染水平达到 10^5 cfu/g 才会引起相应临床症状,但鉴于本次调查中市售国产婴儿配方乳粉中该菌的整体污染率较高(48.67%),且婴儿免疫力较低、婴儿配方乳粉又是婴儿的主要食品,因此为降低该菌对婴儿可能造成的健康危害,有必要制订婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌的限量标准。

本研究在对疑似蜡样芽胞杆菌阳性菌株的确认过程中先用 PCR 方法对蜡样芽胞杆菌菌群特异性基因 *groEL* 进行初筛,若 *groEL* 基因阳性,即可确认待检菌属于蜡样菌群,可以提高鉴定效率。继而通过生化试验进一步确认,并通过补充试验(根状菌落观察、伴胞晶体染色)将蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌、蕈状芽胞杆菌鉴别开来,最终对蜡样芽胞杆菌进行准确鉴定。而目前我国国标方法中并没有 *groEL* 基因鉴定这一步,为了提高鉴定效率,建议在以后国标方法修订中增加对 *groEL* 基因的检测。

本研究结果显示,婴儿配方牛乳粉与羊乳粉蜡样芽胞杆菌的污染情况各异,羊乳粉的污染率比牛乳粉高两倍;且蜡样芽胞杆菌污染水平高于 10 MPN/g 的样品数量后者也高于前者。本次采集婴儿配方羊乳粉的生产厂家多位于陕西地区,生产者规模参差不齐,建议当地食品安全监管部门应加强对婴儿配方羊乳粉生产过程的监管。此外,国产婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌污染较进口产品重、网售产品较超市产品重。鉴于网购已成为目前消费者购物的主要渠道,应加强对网售产品的溯源监测,避免假冒伪劣食品网上销售。

蜡样芽胞杆菌的致病性与其携带的毒力基因直接相关,溶血素 BL、非溶血性肠毒素和细胞毒素 K 在腹泻型蜡样芽胞杆菌中毒中发挥重要作用。溶血素 BL 需要 *hblA*、*hblC*、*hblD* 3 个基因均携带并表达时才具有毒性;而非溶血性肠毒素需要 *nheA*、*nheB*、*nheC* 3 个基因均携带并表达时毒性最大。本次研究中分离到的蜡样芽胞杆菌除了 3 株不携带任何毒力基因外,其他均带有一种或多种毒力基因,其中以 *nhe* 基

因携带率最高,达到 92.98% (53/57),这与文献报道的几乎所有蜡样芽胞杆菌均携带 *nhe* 的结果一致^[12]。53 株携带 *nhe* 基因的菌株中有 29 株同时携带 *nheA*、*nheB* 和 *nheC* 这 3 个基因,表明分离到的所有蜡样芽胞杆菌中有 50.88% (29/57) 的菌株能够发挥非溶血性肠毒素的强致腹泻功能。既携带 *nhe* 3 个基因同时又携带 *hbl* 3 个基因的有 8 株,提示如果进食这 8 株蜡样芽胞杆菌污染的产品导致的中毒症状可能较重。57 株蜡样芽胞杆菌中仅有 2 株(3.51%)携带 *ces* 基因,这与荷兰(8.2%)、比利时(0%)的结果基本一致^[13-14]。鉴于本研究中婴儿配方乳粉受蜡样芽胞杆菌的污染率较高,而被污染的食品又是敏感群体的主食,建议我国扩大对婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌的监测范围,以此为基础开展婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌污染对人群健康影响的暴露评估,为制订我国婴儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌的限量标准提供依据。

参考文献

- [1] Ramarao N, Sanchis V. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review [J]. *Toxins*, 2013, 5(6): 1119-1139.
- [2] 秦丽云, 吕国平, 郭玉梅, 等. 石家庄市市售婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌的监测及溶血素基因的分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(4): 388-390.
- [3] 中华人民共和国卫生部. WS/T 82—1996 蜡样芽胞杆菌食物中毒诊断标准及处理原则[S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- [4] YANG I C, Shih D Y, HUANG T P, et al. Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group [J]. *J Food Prot*, 2005, 68(10): 2123-2130.
- [5] 章乐怡, 张秀尧, 李毅, 等. 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[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(6): 600-604.
- [6] Ueda S, Yamaguchi M, Iwase M, et al. Detection of emetic *Bacillus cereus* by real-time PCR in foods [J]. *Biocontrol Sci*, 2013, 18(4): 227-232.
- [7] Bottone E J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(2): 382-398.
- [8] Tallent S M, Rhodehamel E J, Harmon S M, et al. Chapter 14: *Bacillus cereus*, bacterial analytical manual [Z]. U. S. Food and Drug Administration, 2012.
- [9] Kim G H, Forghani F, Oh D H. Rapid detection of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains using triple-primer polymerase chain reaction (PCR) assay [J]. *Afr J Microbiol Res*, 2013, 7(8): 620-625.
- [10] 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.
- [11] 吴雅儿. 因喂服染有蜡样芽胞杆菌乳粉引起婴儿腹泻 1 例 [J]. *海峡预防医学杂志*, 2003, 9(5): 4.
- [12] Moravek M, Dietrich R, Buerk C, et al. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses [J]. *Fems Microbiol Lett*, 2006, 257(2): 293-298.
- [13] Samapundo S, Heyndrickx M, Xhaferi R, et al. Incidence,

diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 150(1):34-41.

[14] Wijnands L M, Dufrenne J B, Rombouts F M, et al. Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in the Netherlands [J]. J Food Prot, 2006, 69(11):2587-2594.

风险监测

2009—2013 年广州市市售粮油食品黄曲霉毒素 B₁ 调查

张维蔚, 何洁仪, 李迎月, 余超, 林晓华, 梁伯衡
(广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510440)

摘要:目的 了解 2009—2013 年广州市市售食品中黄曲霉毒素 B₁ 污染水平, 为广州市开展居民膳食中黄曲霉毒素 B₁ 风险评估提供基础数据。方法 在广州市 10 个区的农贸市场、超市、批发市场、餐饮单位、加工场以及零售店等随机采集米及米制品(大米及米粉)、面及面制品(小麦粉及面包)、植物油(花生油、玉米油)、花生(熟制及生花生)、玉米粉(渣、碎)、油炸食品以及大豆共 7 类食品, 采用国家标准测定方法(ELISA)进行黄曲霉毒素 B₁ 的含量测定。结果 820 份样品中共 260 份被检出黄曲霉毒素 B₁, 检出率为 31.71%, 检出值范围为 0.012 ~ 39.300 μg/kg, 均值为 2.675 μg/kg, 中位数为 2.5 μg/kg, 食品总体合格率为 98.66%。结论 广州市市售粮油食品黄曲霉毒素 B₁ 总体污染水平不高, 但植物油(花生、玉米)检出率较高。

关键词:黄曲霉毒素 B₁; 污染; 花生; 玉米; 大米; 面; 植物油; 食品污染物; 食品安全

中图分类号: R155; R155.5⁺8; Q949.327.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)03-0291-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.03.015

Analysis on contamination of aflatoxin B₁ in food and oil in Guangzhou from 2009 to 2013

ZHANG Wei-wei, HE Jie-yi, LI Ying-yue, YU Chao, LIN Xiao-hua, LIANG Bo-heng
(Guangzhou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 510440, China)

Abstract: Objective To investigate the contamination of aflatoxin B₁ in food and oil in Guangzhou, and provide the basic data of dietary intakes of aflatoxin B₁ for food safety assessment. **Methods** The samples of seven kinds of food including rice, wheat flour, peanut and corn oil, peanut, corn flour, fried food and soybean from ten regions were collected randomly from farmer's markets, supermarkets, wholesale markets, and catering units. The national standard detection method for aflatoxin B₁ (ELISA) was taken to detect the content of aflatoxin B₁. **Results** 260 samples were detected aflatoxin B₁ and the detection rate was 31.71%, and the farmer's markets had the highest detection rate. The detection range was 0.025 ~ 39.300 μg/kg, with the mean value of 2.675 μg/kg and the median of 2.5 μg/kg. The overall qualified rate was 98.66%. **Conclusion** The overall level of aflatoxin B₁ contamination in market food was low, but some foods such as vegetable oils (peanut, corn) should be more concerned.

Key words: Aflatoxin B₁; contamination; peanut; corn; rice; wheat flour; vegetable oil; food contaminants; food safety

黄曲霉毒素(AFT)主要由黄曲霉和寄生曲霉产生的次生代谢产生。黄曲霉毒素目前已发现 20 余种, 以黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 毒性最强, 污染也最为广泛。1993 年黄曲霉毒素被世界卫生组织的癌症研究机构划定为 I 类致癌物。黄曲霉毒素

的危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用, 严重时可导致肝癌甚至死亡^[1]。黄曲霉毒素广泛存在于坚果(如花生)、大豆、玉米、大米和食用油等多种食品中, 以花生和玉米中黄曲霉毒素污染最为严重^[2-6]。已有 70 多个国家和地区规定了食品中黄曲霉毒素的限量, 我国在 GB 2761—2011《食品安全国家标准 食物中真菌毒素限量标准》^[7]中规定了黄曲霉毒素 B₁ 的限量。广州市地处亚热带地区, 高温潮湿, 适于黄曲霉毒素生长, 为了解广州市市售粮油食品中黄曲霉毒素 B₁ 污染状况, 2009—2013 年对广州市常见易受黄曲霉

收稿日期: 2015-03-17

基金项目: 广州市医药卫生科技项目(20151A011050)

作者简介: 张维蔚 女 主管医师 研究方向为食品安全风险监测

E-mail: 249726849@qq.com

通讯作者: 何洁仪 女 主任医师 研究方向为食品安全风险监测

与评估 E-mail: jiejyaa@21cn.com