

## 研究报告

中国和新西兰来源生孢梭菌的动物毒性比较及  
脉冲场凝胶电泳分子分型研究

董银苹, 李志刚, 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 分别采用中国和新西兰两国两种不同的试验方法, 对我国从相关企业送检的新西兰召回批次浓缩乳清蛋白粉、用问题浓缩乳清蛋白粉生产的婴幼儿配方粉和北京市市售婴幼儿配方粉样品中分离的生孢梭菌, 以及新西兰初级产业部从问题批次浓缩乳清蛋白粉分离的 11 株生孢梭菌对实验动物的毒性作用差异及菌株同源性进行研究。方法 将菌株培养物离心过滤除菌后, 分别腹腔注射和经口灌胃 ICR 小鼠, 观察小鼠的中毒反应及死亡情况, 同时对菌株进行脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分子分型。结果 所有菌株培养物腹腔注射小鼠后, 小鼠均出现呼吸急促继而猝死的中毒表现, 死亡时间多在染毒后 10 min 内, 而经口灌胃小鼠无中毒和死亡; PFGE 结果显示, 虽然来源不同, 但从问题批次浓缩乳清蛋白粉及其相关产品中分离的 10 株生孢梭菌均为同一 PFGE 型, 而分离自北京市市售婴幼儿配方粉的 1 株生孢梭菌为另一 PFGE 型。结论 10 株分离自问题批次浓缩乳清蛋白粉及其为原料生产的婴幼儿配方奶粉的生孢梭菌致动物中毒和死亡表现无差别, 且 10 株生孢梭菌均为同一 PFGE 型, 说明菌株来自同一污染源。

**关键词:**生孢梭菌; 小鼠; 毒性; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型; 中国; 新西兰; 同源性

中图分类号: R155; Q9-33 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)01-0040-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.01.009

### Comparison of mouse assay and pulsed field gel electrophoresis of *Clostridium sporogenes* isolated from China and New Zealand

DONG Yin-ping, LI Zhi-gang, LI Feng-qin

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

**Abstract: Objective** To compare the toxic effect and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of 11 *Clostridium sporogenes* isolates recovered from whey protein concentrate (WPC) suspected to be contaminated with *Clostridium botulinum*, powdered infant formula (PIF) made from WPC and PIF not related to WPC collected in New Zealand and China. **Methods** Broth cultures of all *C. sporogenes* isolates were centrifuged and filtered. The supernatants were orally administered and intraperitoneally injected to ICR mice, respectively. The clinical manifestations of mice were recorded. All isolates were subjected to PFGE analysis and the PFGE patterns were interpreted. **Results** Mice receiving intraperitoneal injection of the culture supernatant of all 11 *C. sporogenes* isolates were dead. The most important poisoning symptoms included irritable, hair arched, shortness of breath followed by sudden death within 10 min. No poisoning and deaths occurred in mice with oral administration of the cultures. PFGE analysis revealed that 7 isolates from China and 3 isolates from New Zealand isolated from WPC and its products share the same PFGE profiles. Different PFGE profile was found in 1 isolate from PIF not related to WPC. **Conclusion** No difference in toxic effect of the culture supernatant produced by 10 *C. sporogenes* isolated from WPC and its products which collected in China and New Zealand was observed. The results suggested that WPC contaminated with *C. sporogenes* detected in both China and New Zealand may be from the same sources, owing to the same PFGE profiles in *C. sporogenes* from both countries were found.

**Key words:** *Clostridium sporogenes*; mouse; toxicity; pulsed field gel electrophoresis; molecular subtyping; China; New Zealand; homology

收稿日期: 2015-10-14

作者简介: 董银苹 女 助理研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail: dongyinping@cfssa.net.cn

通信作者: 李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail: lifengqin@cfssa.net.cn

2013 年新西兰“毒奶粉”事件, 引发了国内外研究者对生孢梭菌的广泛关注, 国家食品安全风险评估中心 (CFSA) 在此次事件中依据我国肉毒梭菌及肉毒毒素检测相关国家标准, 对相关企业送检的新西兰召

回批次问题浓缩乳清蛋白粉、用问题浓缩乳清蛋白粉生产的乳制品(包括婴幼儿配方粉及含乳饮料)、以及北京市售正常婴幼儿配方粉样品进行了检测,共分离出生胞梭菌 8 株。新西兰初级产业部在本次事件中也对召回批次问题浓缩乳清蛋白粉进行了检测,共分离出生胞梭菌 3 株。鉴于生胞梭菌与人类健康的关系缺乏研究数据,且前期试验显示将生胞梭菌污染的食品样品增菌培养后腹腔注射小鼠,动物出现中毒症状及死亡。本研究为了解我国及新西兰两国分离的生胞梭菌菌株间的致病差异,探究两国分离菌株的同源性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 株

生胞梭菌 (*Clostridium sporogenes*) 试验株共 11 株,其中 7 株为国家食品安全风险评估中心(CFSA)从新西兰问题批次浓缩乳清蛋白粉及用问题批次浓缩乳清蛋白粉为原料生产的婴幼儿配方粉样品中分离获得,1 株分离自北京市市售正常婴幼儿配方粉样品;另外 3 株由新西兰初级产业部(MPI)分离自问题批次浓缩乳清蛋白粉样品。

生胞梭菌标准株(CICC 10385)购自中国工业微生物菌种保藏中心。

#### 1.1.2 实验动物

单一性别(雌性)ICR 小鼠,体重分别为 12 ~

15 g(我国国标规定使用的动物体重范围)及 20 ~ 24 g(新西兰规定使用的动物体重范围),小鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[生产许可证号:SCXK(京)2012-0001]。动物饲养于室温 20 ~ 23 ℃、相对湿度为 40% ~ 60%、昼夜交替时间为 10/14 h 的环境中,小鼠按体重随机分组,3 只/笼,自由进食饮水,实验室 SPF 许可号:SYXK(京)2012-0021。

#### 1.1.3 主要仪器与试剂

厌氧培养装置(法国梅里埃),恒温培养箱,生物安全柜,冷冻离心机,凝胶电泳及成像系统(美国伯乐),庖肉培养基基础(CMM)、庖肉牛肉粒均购自北京陆桥技术责任有限公司,CMGS 培养基(美国 Thermo),哥伦比亚血琼脂平板(法国梅里埃),溶菌酶、变溶菌素、十二烷基肌氨酸钠、pefabloc SC 试剂均购自美国 Sigma,蛋白酶 K(法国 Merk),Brij58 试剂、脱氧胆酸钠均购自美国 amresco,Xho I、Sma I 内切酶均购自日本 TaKaRa。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 不同来源生胞梭菌对动物毒性试验比较

根据中国和新西兰两国试验方法的规定,本研究在分离菌株所用培养基及培养条件、培养物处理方式、实验动物体重等不同试验条件下,进行生胞梭菌对小鼠的致病性比较,观察小鼠染毒后 96 h 内的反应情况。具体试验方案设计见表 1。

表 1 不同试验条件下小鼠致病性对比试验设计

Table 1 Design of mouse bioassay using the methods recommended by CFSA and MPI

指标	CFSA 方法 <sup>[1]</sup>	MPI 方法 <sup>a</sup>
菌株活化	菌株划线接种于哥伦比亚血琼脂平板,35 ℃ 厌氧培养 48 h	菌株划线接种于哥伦比亚血琼脂平板,35 ℃ 厌氧培养 5 d
培养物制备	接种于 CMM 培养基,35 ℃ 厌氧培养 5 d	接种于 CMGS 培养基,37 ℃ 厌氧培养 7 d
培养物处理	培养物(8 ml)4 ℃ 4 000 × g 离心 15 min,上清液经 0.45 μm 滤器过滤后备用	培养物(8 ml)4 ℃ 27 000 × g 离心 20 min,上清液经 0.45 μm 滤器过滤后备用
实验动物	体重分别为 12 ~ 15 和 20 ~ 24 g 的两组雌性 ICR 小鼠,每组 3 只	同 CFSA 方法
动物分组	经口灌胃组和腹腔注射组,每组两个体重范围的小鼠各 3 只	同 CFSA 方法
试验对照	CMM 和 CMGS 培养基为空白对照,生胞梭菌标准菌株培养物为阳性对照	同 CFSA 方法
染毒剂量	腹腔注射 0.5 ml/只,经口灌胃 0.4 ml/只	同 CFSA 方法

注:a 表示该方法由 MPI 提供

#### 1.2.2 PFGE 分子分型

##### 1.2.2.1 plug 胶块制备<sup>[2]</sup>

将待测 11 株菌划线接种于哥伦比亚血琼脂平板,37 ℃ 厌氧培养 48 h 后,挑取单菌落接种于 10 ml CMM 培养基中,37 ℃ 厌氧培养 16 ~ 18 h;取 10 ml CMM 培养物于 15 ml 离心管内,4 ℃ 5 000 × g 离心 15 min,弃上清,加入 1 ml 悬浮(PIV)缓冲液[10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)和 1 mol/L

NaCl,pH = 7.5]悬浮菌体,加入 120 μl 甲醛(37% ~ 40%),混匀后于冰中放置 30 min,4 ℃ 5 000 × g 离心 15 min 后弃上清,加入 PIV 缓冲液清洗两次,每次 1 ml;加入 300 μl 裂解缓冲液 I [6 mmol/L Tris、1 mol/L NaCl、100 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、0.5% Brij58、0.2% 脱氧胆酸钠、0.5% 十二烷基肌氨酸钠、1 mg/ml 溶菌酶和 20 U/ml 变溶菌素,pH = 7.6]悬浮底层菌体,37 ℃ 孵育 20 min;加入 300 μl

1.2% SeaKem Gold 琼脂[内含 0.5% 十二烷基磺酸钠(SDS)],混匀后注入 plug 模具内,室温静置 15 min;将制备好的 plug 放入 5 ml 裂解缓冲液 I 内,37 °C 摇床水浴中振摇 1 h,弃去管内液体;加入 5 ml 裂解缓冲液 II (0.5 mol/L EDTA 和 10% 十二烷基肌氨酸, pH = 8),50 °C 水浴中振摇 1 h;弃去管内缓冲液,加入 5 ml pefablock SC(1 mmol/L),37 °C 水浴中振摇 1 h;50 °C 条件下,用无菌蒸馏水清洗 plug 两次,每次 10 ml;用 TE (10 mmol/L Tris、1 mmol/L EDTA, pH = 7.6) 清洗 plug 3 次,每次 10 ml,清洗的时间间隔为 10 min;清洗后的 plug 置于 5 ml TE 内 4 °C 保存。

### 1.2.2.2 酶切及电泳

每个 plug 用 *Sma* I(30 U) 酶切 2 h 后电泳。电泳条件为:电泳凝胶 1% SeaKem Gold 琼脂、2.2 L 0.5 × TBE 电泳液,电泳温度 14 °C,电场强度 6 V/cm,电场角度 120°,脉冲时间 4 ~ 30 s、电泳条带 30 ~ 500 kb、电泳时间 20 h;电泳结束后,取出凝胶放入 EB 中染色 30 min,清水冲洗脱色 2 次,通过凝胶成像系统拍照并保存图像。

## 2 结果

### 2.1 不同来源生胞梭菌对动物毒性试验结果比较

小鼠经口灌胃分离的 11 株生胞梭菌培养物和生胞梭菌标准菌株阳性对照培养物后,均无中毒和死亡;培养基空白对照组无论是经口灌胃还是腹腔注射,也均无小鼠中毒和死亡。小鼠腹腔注射生胞梭菌标准菌株培养物阳性对照组小鼠均出现中毒继而死亡,主要表现为:小鼠初期出现行动迟缓或烦躁不安、呼吸急促、被毛耸起、皮肤暗紫,继而猝死,多在染毒后 10 min 内死亡。尸解可见器官颜色暗紫,显微镜下可见红细胞失去原有的圆润形态,变形并可见细胞破损碎片。按照中国和新西兰两国提供的两种不同试验方法和条件制备生胞梭菌培养物后,用培养物进行腹腔注射小鼠,结果显示,所有试验菌株均导致小鼠死亡,且死亡表现与生胞梭菌标准菌株一致,死亡时间也多集中在染毒后 10 min 以内。

### 2.2 PFGE 分子分型分析结果

11 株生胞梭菌试验菌株产生了 2 种不同的 PFGE 谱型,见图 1。其中新西兰从问题批次浓缩乳清蛋白粉中分离的 3 株生胞梭菌与中国从问题批次浓缩乳清蛋白粉、用问题批次浓缩乳清蛋白粉为原料生产的婴幼儿配方粉样品中分离的 7 株生胞梭菌具有相同的 PFGE 型,被归为一类,提示这 10 株菌可能为相同的克隆菌株,或来自同一污染源;而 1 株

从北京市市售正常婴儿配方粉样品中分离的生胞梭菌株的 PFGE 型有别于其他 10 株菌,被单独归为一类。

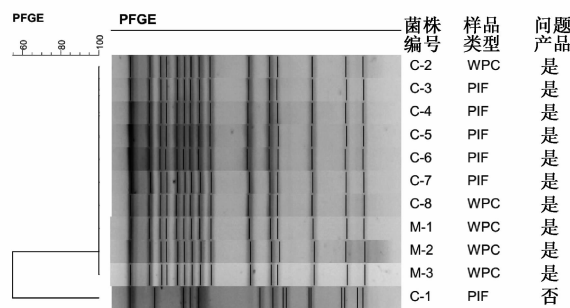


图 1 11 株生胞梭菌 PFGE 聚类图

Figure 1 PFGE typing of 11 *C. sporogenes* strains

## 3 讨论

生胞梭菌属于亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌(SRC),SRC 为一群厌氧、过氧化氢酶阴性、能将亚硫酸盐还原为硫化物的革兰阳性梭状芽胞杆菌,其孢子广泛分布于自然界,通常存在于人和动物的粪便、废水和土壤中,代表性菌种除了生胞梭菌外,还包括致黑梭状芽胞杆菌、产气荚膜梭菌、艰难梭菌等。因此目前将 SRC 用于指示食品被粪便污染、加工环境卫生状况控制、食品生产过程控制的指标菌,调查产芽胞厌氧菌的潜在污染、生长和存活力<sup>[3]</sup>。2013 年新西兰浓缩乳清蛋白粉梭状芽胞杆菌污染事件,最终确定所污染的微生物为生胞梭菌。目前研究结果显示,该菌在食品中检出主要集中于乳制品,如牛奶、羊奶、奶酪及婴幼儿配方粉等<sup>[4-8]</sup>。通常认为该菌不具有致病性,因此目前国内外对生胞梭菌的研究主要集中于表型鉴定等方面,而对于其致病性的研究甚少,文献报道其为“罕见的临床致病菌”<sup>[9]</sup>。Quattocchi<sup>[10]</sup>曾报道生胞梭菌继发感染引起的肝脓肿,另有两例关于生胞梭菌引起脓肿感染的报道以及膝关节前部韧带置换后生胞梭菌引起的继发性化脓性关节炎病例<sup>[11-12]</sup>。有报道从患出血性腹泻的兔子中分离到一株可产生溶血素的生胞梭菌<sup>[13-14]</sup>。本实验室经过大量动物实验,证实分离自新西兰浓缩乳清蛋白粉样品的生胞梭菌可产生致 ICR 小鼠短时间内猝死的有毒代谢产物<sup>[15]</sup>,这一结果与新西兰初级产业部从相同批次问题浓缩乳清蛋白粉中分离到生胞梭菌的动物毒性试验结果一致。为进一步确定两国所用试验方法对动物毒性的结果差别,本研究运用两种不同检测方法将两国实验室分离的 11 株菌进行交叉试验,结果证实,无论采用何种检测条件,生胞梭菌

对动物毒性的结果是相同的。有关该菌致动物死亡有毒代谢产物成分及机理尚需进一步研究。

PFGE 分子溯源分析结果显示,来自中国和新西兰两国不同实验室从问题批次浓缩乳清蛋白粉及其制品中所分离的菌株具有相同的 PFGE 型别,说明我国从新西兰进口的问题浓缩乳清蛋白粉与新西兰方面检测的浓缩乳清蛋白粉为同一厂家生产的同一批次产品,该菌的污染说明浓缩乳清蛋白粉生产过程未遵循良好生产规范,生产条件有利于厌氧微生物的繁殖或有外源性污染,应对可能存在的污染原因进行调查并采取必要的控制措施。

## 参考文献

- [ 1 ] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 12—2003 食品卫生微生物检验方法 肉毒梭菌及肉毒毒素检验[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [ 2 ] Garde S, Gaya P, Arias R, et al. Enhanced PFGE protocol to study the genomic diversity of *Clostridium* spp. isolated from Manchego cheese with late blowing defect[J]. Food Control, 2012; 28(2): 392-329.
- [ 3 ] 熊海元, 崔强. 生孢梭菌孢子作为生物指示剂的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(7): 354-356.
- [ 4 ] Cremonesi P, Vanoni L, Silveti T, et al. Identification of *Clostridium beijerinckii*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay[J]. J Dairy Res, 2012, 79(3): 318-323.
- [ 5 ] Reindl A, Dzieciol M, Hein I, et al. Enumeration of clostridia in goat milk using an optimized membrane filtration technique[J]. J Dairy Sci, 2014, 97(10): 6036-6045.
- [ 6 ] Borch E, Lycken L. Influence of long-chain polyphosphate and heat treatment on *Clostridium cochlearium* and *Clostridium sporogenes* isolated from processed cheese spread[J]. J Food Prot, 2007, 70(3): 744-747.
- [ 7 ] Lycken L, Borch E. Characterization of *Clostridium* spp. isolated from spoiled processed cheese products[J]. J Food Prot, 2006, 69(8): 1887-1891.
- [ 8 ] 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.
- [ 9 ] Inkster T, Cordina C, Siegmeth A. Septic arthritis following anterior cruciate ligament reconstruction secondary to *Clostridium sporogenes*: a rare clinical pathogen[J]. J Clin Pathol, 2011, 64(9): 820-821.
- [ 10 ] Quattrocchi G. Rare case of pyogaseous abscess of the liver caused by *Clostridium sporogenes*-*Bacterium pyocyaneum* [J]. Riforma Med, 1963, 77: 288-291.
- [ 11 ] Corbett C E, Wall B M, Cohen M. Case report: empyema with hydropneumothorax and bacteremia caused by *Clostridium sporogenes*[J]. Am J Med Sci, 1996, 312(5): 242-245.
- [ 12 ] SHEN D X, Babady N E, CHEN R, et al. Septicaemia caused by *Clostridium sporogenes*: two case reports and a literature review [J]. Rev Med Microbiol, 2013, 24(3): 81-83.
- [ 13 ] Hara-Kudo Y, Yamakawa Y, Kumagai S. Purification and some properties of *Clostridium sporogenes* hemorrhagic toxin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 227(2): 413-418.
- [ 14 ] Hara-Kudo Y, Ogura A, Noguchi Y, et al. Effect of hemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* on rabbit ligated intestinal loop[J]. Microb Pathog, 1997, 22(1): 31-38.
- [ 15 ] 董银苹, 韩春卉, 江涛, 等. 生孢梭菌代谢产物对 ICR 小鼠的毒性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(5): 414-417.

· 请示批复 ·

## 食品药品监管总局办公厅关于食品添加剂 羟丙基甲基纤维素有关问题的复函

食药监办食监一函[2016]7号

新疆维吾尔自治区食品药品监督管理局:

你局《关于食品添加剂羟丙基甲基纤维素有关问题的请示》(新食药监办[2015]91号)收悉。经研究,现函复如下:

根据原卫生部办公厅《关于食品添加剂使用原料级别问题的复函》(卫办监督函[2011]321号),凡食品添加剂产品标准中对原料级别作出规定的,食品添加剂生产企业必须使用相应级别或质量更高的原料;对原料级别未作具体规定的,食品添加剂生产企业可自行选择原料级别,食品添加剂生产工艺和产品应当符合食品安全国家标准。

(相关链接:<http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1605/141240.html>)

食品药品监管总局办公厅

二〇一六年一月五日