

论著

基于全基因组测序的蜡样芽孢杆菌食品分离株分子特征及耐药性研究

张红芝,刘雪薇,顾其芳,常兆玉,朱彦祺,张曦

(上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

摘要:目的 研究上海市食品中分离的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的基因组特征及其耐药性。方法 本研究对上海市食品中分离的蜡样芽孢杆菌进行鉴定、药物敏感性实验和全基因组测序,利用 BioNumerics 软件对测序数据进行拼接组装,利用拼接数据进行多位点序列分型(MLST)、毒力基因和耐药基因分析,并与 PubMLST 数据库中的 ST 型进行比较;对耐药基因和耐药表型进行比较分析。结果 本研究中 37 株蜡样芽孢杆菌均可分型,其中 7 株为 ST 新型。37 株蜡样芽孢杆菌分为 34 个 ST 型,其中 3 株菌为 ST26 型,其余 ST 型各占 1 株,呈高度多样性。37 株蜡样芽孢杆菌均携带 *nheA*、*nheB*、*nheC* 基因,*hblACD* 基因簇的携带率为 37.8%,而完整 *ces* 呕吐基因簇的携带率只有 16.2%,其中 2 株为分离自即食食品的 ST26 型。药敏实验显示 37 株蜡样芽孢杆菌对氨苄西林、青霉素和苯唑西林耐药性较高,与其携带耐药基因种类并不完全一致。结论 上海市食品中分离的蜡样芽孢杆菌菌株分子分型呈现高度多样性,应加强食品中蜡样芽孢杆菌分子生物学监测,为预防控制由其引起的食源性疾病提供科学依据。

关键词:蜡样芽孢杆菌;全基因组测序;多位点序列分型;毒力基因谱;耐药性

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)05-0529-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.05.002

Molecular characteristics and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* from foods using whole genome sequencing

ZHANG Hongzhi, LIU Xuewei, GU Qifang, CHANG Zhaoyu, ZHU Yanqi, ZHANG Xi
(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: Objective To study the molecular characteristics and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* (*B. cereus*) from foods in Shanghai. **Methods** The *B. cereus* isolates were characterized using antibiotic susceptibility tests and whole genome sequencing (WGS). BioNumerics software was used to analyze and assemble WGS data. Then, multilocus sequence typing (MLST), virulence genes profiles and antibiotic resistant genes were analyzed using assembled genome sequences. The antimicrobial susceptibility was investigated. Furthermore, STs of *B. cereus* in this study were compared with those from PubMLST database. **Results** In this study, all 37 isolates were confirmed as *B. cereus* isolates. The 37 *B. cereus* were typed into 34 STs with 7 new STs. The result of STs showed high diversity. All 37 *B. cereus* isolates had *nheA*, *nheB* and *nheC* genes. The positive rate of *hblACD* genes was 37.8%. However, only 16.2% of *B. cereus* had *ces* genes. Furthermore, two ST26 *B. cereus* isolates with *ces* genes from ready-to-eat food were identified. The antibiotic resistance rate to Ampicillin, Penicillin and Oxacillin was high, which was not consistent with antibiotic resistant genes. **Conclusion** The STs of 37 *B. cereus* from food in Shanghai showed high genetic diversity, which suggested the molecular surveillance should be enhanced. Fundamental data can be obtained using whole genome sequencing for tracing *B. cereus* isolates and analyzing pathogenicity.

Key words: *Bacillus cereus*; whole genome sequencing; multilocus sequence typing; virulence genes profiles; resistance

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是一种革兰阳性、能运动、产芽孢的食源性致病菌。蜡样芽孢杆

菌在适宜的温度下,能迅速繁殖并分泌大量的毒素和酶,从而引起食源性疾病,临床症状分为呕吐型和腹泻型,或两者兼有。婴幼儿和低免疫力人群感染后还可诱发心内膜炎、脑膜炎和菌血症等并发症,危及生命^[1-2]。国家食源性疾病监测数据显示,2011—2016年,由蜡样芽孢杆菌引起的食源性疾病事件在细菌性疾病事件中排第四位^[3]。在一些地区,蜡样芽孢杆菌引起的食源性疾病事件数仅次于

收稿日期:2021-06-25

基金项目:上海市公共卫生体系建设三年行动计划(GWV-2)

作者简介:张红芝 女 主任技师 研究方向为食源性病原菌检测与食品安全 E-mail:zhanghongzhi@scdc.sh.cn

通信作者:张曦 女 主任医师 研究方向为病原微生物 E-mail:zhangxi@scdc.sh.cn

副溶血性弧菌^[4-5]。

蜡样芽孢杆菌能产高黏附能力的孢子^[6],因此无法避免地会污染到食品,米面制品、奶制品、肉类和蔬菜等是其主要污染对象^[7-8]。我国不同地区的奶粉、婴幼儿配方奶粉等乳制品均存在不同程度的蜡样芽孢杆菌污染^[9]。目前对于蜡样芽孢杆菌在各种食品中的污染状况有很多报道,尤其是乳制品及婴幼儿配方奶粉中蜡样芽孢杆菌的污染情况有系统性的研究。

目前对蜡样芽孢杆菌致病机制的研究多集中在其携带毒素类型,以及蜡样芽孢杆菌引起的食源性疾病主要与腹泻毒素或呕吐毒素相关^[10]。腹泻毒素的分子量为38~46 kD,与腹泻毒素相关的毒力基因主要是溶血性肠毒素基因(*hblA*、*hblB*、*hblC*、*hblD*)、非溶血性肠毒素基因(*nheA*、*nheB*、*nheC*)和细胞毒素基因(*cytK*)。与呕吐毒素有关的毒力基因主要是*ces*基因簇^[11]。呕吐毒素可耐受酸、碱、热、酶,特别是对胰蛋白酶与胃蛋白酶不敏感,因此在食物中产生后可稳定存在,经过加工和热处理后仍具有活性,难以被完全破坏,被人体摄入后在胃中与特定的受体结合,导致呕吐^[12]。一些研究证实ST26型蜡样芽孢杆菌多与呕吐型食源性疾病事件相关^[13]。但是,目前缺少蜡样芽孢杆菌的不同型别与致病性之间的系统性研究。

全基因组测序技术(Whole genome sequencing, WGS)能够在基因水平上全面分析病原菌的分子生物学特征,在食源性疾病暴发事件的流行病学调查中发挥了重要作用^[14],尤其为单核细胞增生李斯特菌监测及由其引起的食源性疾病暴发事件的分子流行病学调查提供了重要依据,不但能对致病菌进行菌种鉴定,还能利用分子分型技术[如多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)]对致病菌进行分型,鉴定其毒力基因与耐药基因,进一步分析其致病性^[15-17]。近年来基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)技术和全基因组测序技术广泛应用于细菌的菌种鉴定,可以弥补传统生化方法操作烦琐、区分度差、稳定性差等缺陷。本研究采用不同方法对食品中分离蜡样芽孢杆菌进行鉴定,进一步利用全基因组测序技术对蜡样芽孢杆菌进行分子生物学特征分析,将全基因组测序技术应用于食品安全风险监测中,为预防控制由蜡样芽孢杆菌引起的食源性疾病提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

根据2019年《国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册》^[18],采集上海市售熟制米面制品、腐乳、豆制品和谷物冲调制品,检测蜡样芽孢杆菌。检测方法依据GB 4789.14—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》^[19]。蜡样芽孢杆菌标准菌株(ATCC 11778)和质谱鉴定用参考菌株(ATCC 8739)均由本实验室保存。

1.2 试剂

甲酸(Formic acid, FA)、乙腈(Acetonitrile, ACN)、无水乙醇(色谱纯)(美国Sigma公司)。VITEK MS-CHCA基质液(法国梅里埃)。甘露醇卵黄多黏菌素(Mannitol yolk polymyxin, MYP)平板、哥伦比亚血平板(上海申启生物科技有限公司)。细菌全基因组提取试剂盒(TaKaRa,日本)。药敏板(珠海美华医疗科技有限公司):10种抗生素:四环素(Tetracycline, TET)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、复方新诺明(Trimethoprim and Sulphamethoxazole, SXT)、庆大霉素(Gentamicin, GEN)、氨苄西林(Ampicillin, AMP)、青霉素(Penicillin, P)、苯唑西林(Oxacillin, OXA)、红霉素(Erythromycin, ERY)、氯霉素(Chloramphenicol, C)、克林霉素(Clindamycin, CHL)。

1.3 仪器

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)(法国梅里埃)。

1.4 MALDI-TOF MS鉴定^[20]

挑取适量(5~10 mg)菌落样品于1.5 mL离心管中,加入900 μ L无水乙醇,混匀;12 000 r/min离心2 min(离心半径7.7 cm),弃去上清液;加入40 μ L 70%甲酸,混匀,再加入40 μ L乙腈,混匀,12 000 r/min离心2 min(离心半径7.7 cm),吸取1 μ L上清液点在靶板上,自然晾干后再点1 μ L VITEK MS-CHCA基质液覆盖,晾干后进行质谱分析,观察、记录结果。菌种鉴定参考VITEK MS鉴定菌种表(V 3.0)。

1.5 药敏实验

采用微量肉汤稀释法进行药敏实验,采用革兰阳性药敏板检测,依据说明书的检测原理及操作步骤完成:每种抗生素都设有一系列倍比稀释的浓度,通过加入待检蜡样芽孢杆菌肉汤培养液稀释的菌悬液,经18~20 h孵育后,用肉眼对药敏板条进行判读,分析其最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)值,并根据2019版美国临床实

实验室标准化委员会的标准获得相应敏感(S)、中介(I)和耐药(R)结果。共检测 10 种抗生素,分别是四环素(2~8 μg/mL)、环丙沙星(0.5~2 μg/mL)、复方新诺明(0.5/9.5~2/38 μg/mL)、庆大霉素(2~8 μg/mL)、氨苄西林(2~4 μg/mL)、青霉素(0.062 5~0.25 μg/mL)、苯唑西林(0.25~2 μg/mL)、红霉素(0.5~4 μg/mL)、氯霉素(4~16 μg/mL)、克林霉素(0.5~4 μg/mL)。

1.6 全基因组测序

取适量新鲜菌液,用细菌全基因组提取试剂盒(TaKaRa,日本)提取 DNA。全基因组测序由生工生物工程(上海)有限公司完成,采用 Illumina Hiseaxten PE150 测序仪(美国 Illumina 公司)进行全基因组分析。测序策略:先将样本 DNA 随机打断,构建 350 bp 小片段文库,然后分别进行平行测序,最终获数据量 Clean data 100×。数据处理:测序获得原始数据,进行质控,将合格的数据 Clean data 导入 BioNumerics 7.6 软件进行序列拼接。

1.7 菌种鉴定

完成拼接的基因组序列,上传到网站 https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_rmlst_seqdef_kiosk,进行菌种鉴定。

1.8 MLST 分析

MLST 分型参考蜡样芽孢杆菌分型的管家基因, *glp*、*gmk*、*ilv*、*pta*、*pur*、*pyc*、*tpi* (<https://pubmlst.org/databases/>)。利用 BioNumerics 7.6 软件,从上述拼接好的序列中提取相应的管家基因,利用 BioNumerics 7.6 软件的功能模块分配 ST 型。

1.9 毒力基因、耐药基因分析

经 BioNumerics 7.6 软件拼接后的序列,通过序列比对分析获得毒力基因和耐药基因谱。参考官网: Virulence Factor Database (VFDB) (MOH Key Laboratory of Systems Biology of Pathogen, Institute of Pathogen Biology, Beijing, China) (<http://www.mgc.ac.cn>) 和 CARD (<https://card.mcmaster.ca/>)。

2 结果

2.1 蜡样芽孢杆菌鉴定结果

本研究对收集到的蜡样芽孢杆菌采用 3 种方法进行鉴定,37 株蜡样芽孢杆菌分别来自熟制米面制品(24 株)、腐乳(8 株)、豆类制品(4 株)和冲调谷物制品(1 株)。生化、MALDI-TOF MS 以及全基因组测序鉴定结果一致,37 株菌均为蜡样芽孢杆菌,其中 MALDI-TOF MS 鉴定结果的置信度为 99.90%,全基因组测序鉴定结果的置信度为 100%(表 1)。

表 1 37 株蜡样芽孢杆菌鉴定结果
Table 1 Identification of 37 *Bacillus cereus*

菌株数量	生化鉴定		MALDI-TOF MS		全基因组测序	
	菌种	置信度	菌种	置信度	菌种	置信度
37 株	蜡样芽孢杆菌	99.90%	蜡样芽孢杆菌	99.90%	蜡样芽孢杆菌	100.00%

2.2 全基因组测序结果

本研究获得的 37 株蜡样芽孢杆菌全基因组测序的原始数据经过分析,满足以下条件:平均测序读长为 200~300 bp,原始数据量 ≥1.5 G,且 Q20 高质量数据量平均 1.2 G (Clean data ≥1 G);基因组整体覆盖深度 ≥100X;碱基数据质量值 Q20 ≥95%,Q30 ≥85%,SCAFFOLD 数量 <100 个,Contig 数量 <200 个,单碱基错误率低于十万分之一。

2.3 蜡样芽孢杆菌毒力基因鉴定

37 株蜡样芽孢杆菌中毒力基因检测结果如表 2 所示,与腹泻相关的基因 *hblA*、*hblC* 和 *hblD* 的携带率分别为 40.5% (15/37)、51.4% (19/37) 和 51.4% (19/37)。*hblACD* 基因簇的携带率为 37.8% (14/37),其中 85.7% (12/14) 分离自即食食品,如冷面、学生午餐、凉皮。与呕吐相关的 *ces* (*cesD*、*cesC*、*cesB*、*cesA*、*cesT*、*cesP*、*cesH*) 基因簇的携带率为 16.2% (6/37),其中 2 株分离自腐乳,3 株分离自冷面,1 株分离自豆腐。所有菌株中均检

出 *nheA*、*nheB*、*nheC* 和 *inhA* 基因, *cytK* 基因的携带率为 32.4% (12/37), *BAS3109* 的携带率为 86.5% (32/37)。

2.4 蜡样芽孢杆菌 ST 分型

37 株蜡样芽孢杆菌均能分型,其中 7 株菌为新型 ST,分别为 ST2771、ST2772、ST2773、ST2774、ST2775、ST2776 和 ST2777(图 1)。37 株蜡样芽孢杆菌分为 35 个 ST 型,其中只有 ST26 型有 3 株菌,其他 ST 型只有一株菌(图 2)。从 PubMLST 数据库下载具有完整序列型(ST)且具有明确的引起临床症状信息的菌株共 47 株,包括引起食源性疾病的食品分离株 29 株和病人分离株 18 株。MLST 聚类分析结果显示 77 株蜡样芽孢杆菌共分为 57 个型别。ST26 型菌株最多,有 24 株菌,其中 3 株菌为本研究中食品分离株,13 株菌来自 PubMLST 数据库中食源性疾病事件中食品分离株,8 株菌来自病人分离株。ST142 有 3 株菌,均来自 PubMLST 数据库中病人分离株。ST24 有 2 株菌,分别来自本研究中食

表2 37株食品分离蜡样芽孢杆菌毒力基因分布情况

Table 2 Distributions of toxic genes among 37 *Bacillus cereus* strains isolated from food

菌株编码	来源	<i>BAS3109</i>	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>inhA</i>	<i>cytK</i>	<i>ces</i> 基因簇
LY1901	韭菜猪肉水饺	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
LY1903	凉皮	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
LY1904	凉皮	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
LY1941	凉皮	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
LY1902	藕粉	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
LY1924	肥肠冷面	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
LY1934	凉拌牛肉	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
LY1930	腐乳	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
LY1905	学生午餐	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
LY1910	红方腐乳	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
LY1911	白腐乳	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
LY1932	豆皮	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
LY1906	学生午餐	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LY1908	粢饭团	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LY1921	凉皮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LY1923	凉皮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LY1925	牛肉冷面	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LY1926	冷面	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LY1931	豆皮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LY1936	凉皮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LY1937	凉皮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LY1940	凉皮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LY1907	三丝冷面	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
LY1920	凉皮	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LY1909	腐乳	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LY1912	玫瑰腐乳	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
LY1913	糟方腐乳	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LY1916	豆腐	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
LY1918	孜香牛肉盖饭	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LY1914	香辣腐乳	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LY1915	鲜美小白干	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LY1919	凉皮	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LY1927	冷面	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
LY1928	凉面	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LY1929	腐乳	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LY1933	肉酯豆腐	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LY1950	冷面	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+

品分离株和 PubMLST 中病人分离株;ST144 有 2 株菌,分别来自本研究中食品分离株和 PubMLST 中病人分离株。

2.5 药敏性实验结果与耐药基因

本研究对 10 种抗生素做了药敏实验,结果如图 2 所示。本研究中蜡样芽孢杆菌对青霉素、氨苄西林和苯唑西林的耐药率较高,分别为 100.0%、97.0% 和 94.5%。其次是复方新诺明,耐药率为 44.8%。对氯霉素和庆大霉素均敏感。对红霉素、克林霉素和四环素敏感,分别为 89.5%、97.4% 和 92.0%,耐药中介率分别为 10.5%、2.6% 和 8.0%。耐药基因检测结果显示只有 4 株携带耐药基因(表 3),其中 2 株菌携带 *blaZ*,2 株菌携带 *tet(45)*;这 4 株菌中有 2 株分离自凉皮,1 株分离自豆皮,1 株分离自韭菜猪肉水饺。这 4 株菌对氨苄西林、青霉素

和苯唑西林均耐药,1 株分离自凉皮的菌株对四环素耐药性未中介,对其他抗生素均敏感。

3 讨论

本研究采用 3 种方法对 2019 年分离的 37 株蜡样芽孢杆菌进行鉴定分析。结果显示生化方法与 MALDI-TOF MS 和全基因组测序鉴定结果均一致。目前我国针对蜡样芽孢杆菌的鉴定主要采用国标 GB 4789.14—2014 中的生化鉴定方法^[19],但其中部分实验方法烦琐,肉眼判断的结果容易出现误差,人为影响因素比较大。全基因组测序鉴定细菌是基于细菌染色体中的 52 个核糖体进行比对,对细菌菌种的鉴定准确可靠,因此全基因组测序的鉴定结果能够进一步确证 MALDI-TOF MS 鉴定的准确性^[21]。但是由于全基因组测序烦琐,应用于常规

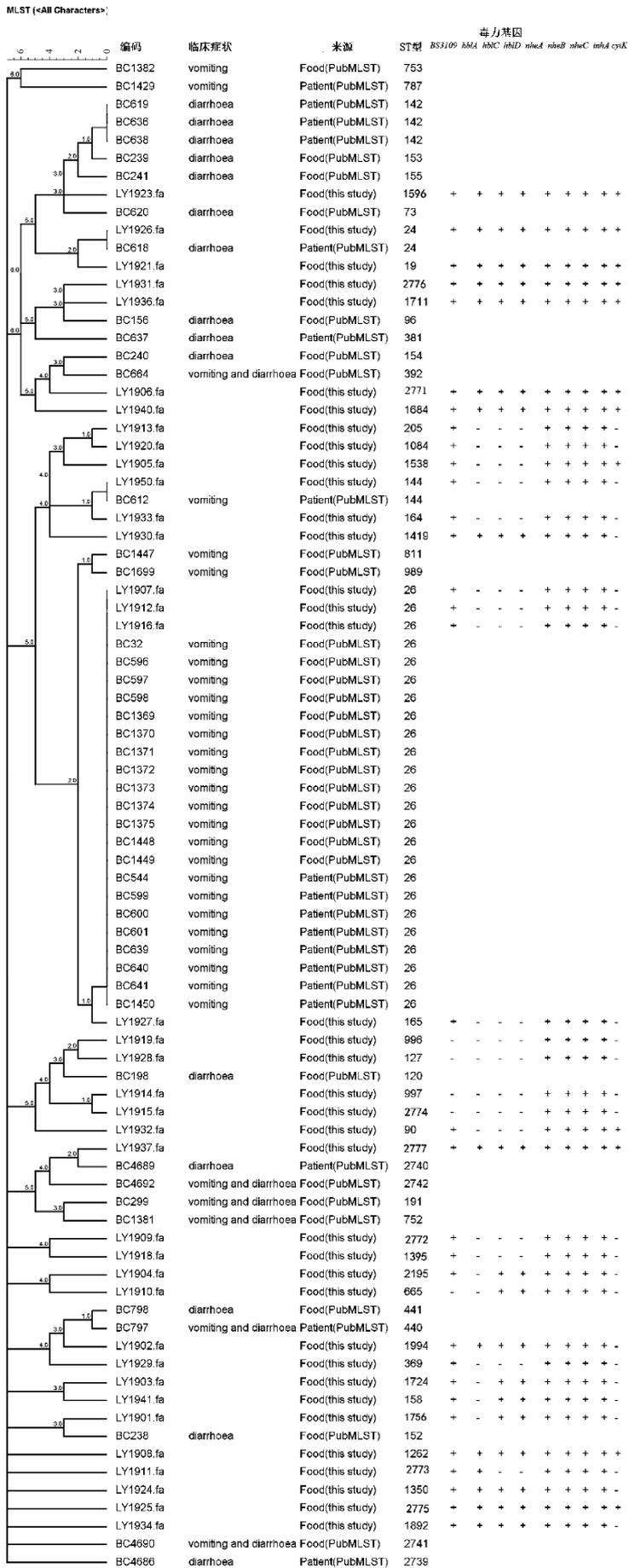


图 1 蜡样芽孢杆菌分子生物学特征

Figure 1 Molecular characteristics of *Bacillus cereus* isolates

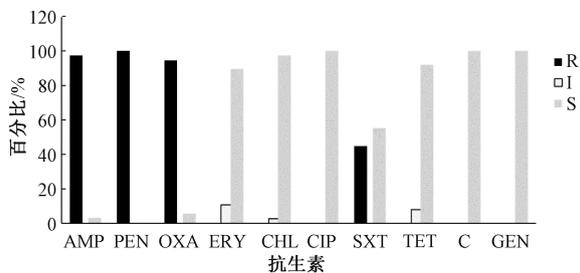


图2 37株蜡样芽孢杆菌对抗生素药敏实验性

Figure 2 Results of antibiotic resistance of 37 *Bacillus cereus* isolates

表3 蜡样芽孢杆菌携带耐药基因类型及其来源和耐药性

Table 3 Resistant genes, source and resistance of 37 *Bacillus cereus* isolates

菌株编码	来源	耐药基因	耐药性
LY19001	韭菜猪肉水饺	<i>blaZ</i>	对 AMP、PEN、OXA 耐药,对 ERY、CLI、T/SUL、TET、CHL、GEN、FOX、IPM 敏感
LY19032	豆皮	<i>tet(45)</i>	对 AMP、PEN、OXA 耐药,对 ERY、CLI、T/SUL、TET、CHL、GEN、FOX、IPM 敏感
LY19036	凉皮	<i>tet(45)</i>	对 AMP、PEN、OXA 耐药,ERY、CLI、T/SUL、CHL、GEN、FOX、IPM 敏感、对 TET 中介
LY19040	凉皮	<i>blaZ</i>	对 AMP、PEN、OXA 耐药,对 ERY、CLI、T/SUL、TET、CHL、GEN、FOX、IPM 敏感

及其他毒力相关基因 *BAS3109*、*nheA*、*nheB*、*nheC*、*nheD*,未发现携带腹泻型 *hblACD* 基因,这与文献报道一致,呕吐型菌株一般携带 *ces* 呕吐基因簇^[23]。国内有报道 ST26 型蜡样芽孢杆菌引起食源性疾病事件^[24]。这些结果提示本研究中分离的 ST26 型有引起呕吐型食源性疾病的潜在危害,且其中两株分离自米面制品(冷面)和腐乳,属于即食食品,增加了引起食源性疾病的潜在危害性。ST144、ST27 型菌株与 ST26 型菌株相似,均携带 *ces* 基因簇以及相关的毒力基因,来自 PubMLST 数据库的病人分离株 ST144 型(BC612)引起的临床症状为呕吐;ST27 型与 ST26 型相差一个管家基因,同为一个克隆复合体,携带相同的 *ces* 基因簇和相关的毒力基因。本研究中 ST144 和 ST27 型菌株均分离自熟制米面制品(冷面)。这些研究结果提示上海市熟制米面制品具有引起食源性疾病的潜力,应加强监测及食品安全管理。本研究中,分离自腐乳的 ST1419 型菌株携带所有呕吐和腹泻相关基因,此菌株可能会引起呕吐和腹泻复合型疾病,值得引起关注。

随着全基因组测序技术的发展,全基因组测序已经广泛应用于食源性致病菌的鉴定和分型分析中^[25-26],本研究分析也证实全基因组信息能够为病原菌的分子分型、毒力基因和致病机制分析提供重要基础性依据。

蜡样芽孢杆菌携带毒力基因呈现多样化,与腹泻相关的基因携带率较高,*hblACD* 携带率为 37.8%,而与呕吐相关的 *ces* 基因簇携带率仅为 16.2%。但是 PubMLST 数据分析的结果显示在引起食源性疾病事件的菌株和病人分离株中以呕吐型症状为主,占 55.3%,腹泻型占 31.2%,呕吐和腹

监测有其局限性。而 MALDI-TOF-MS 可以实现快速、高通量鉴定,能更好地应用于监测工作中。

本研究分析结果显示,ST26 是全球范围内蜡样芽孢杆菌导致食源性疾病主要的型别, PubMLST 数据库信息显示 ST26 型菌株均引起呕吐型食源性疾病。呕吐型食源性疾病在亚洲特别是中国、日本和韩国等国家较为常见^[22]。在本研究中,有 3 株分离自食品的菌株均携带完整的 *ces* 呕吐基因簇,以

泻复合型占 12.7%。崔一芳^[28]总结了 1972—2015 年发生在国内的由蜡样芽孢杆菌引起的食源性疾病事件,研究显示临床症状以呕吐型为主,占 68.4%,腹泻症状占 28.9%,呕吐和腹泻复合型占 2.63%。这些研究结果提示蜡样芽孢杆菌引起的食源性疾病以呕吐型症状为主。

目前,有关蜡样芽孢杆菌耐药性的报道较多,对青霉素、氨苄西林和苯唑西林的耐药性较高^[29],与本研究结果一致。但是对蜡样芽孢杆菌耐药基因检测的报道较少。本研究中,37 株蜡样芽孢杆菌只检测到两种耐药基因 *blaZ* 和 *tet(45)*,但是药敏结果显示超过 90% 的菌株对氨苄西林、青霉素和苯唑西林耐药。可能该菌株不存在相应的耐药基因。因此,有必要同时对蜡样芽孢杆菌的耐药性和耐药基因进行监测。

本研究结果证实全基因组测序技术能够快速、准确鉴定蜡样芽孢杆菌携带的毒力基因、耐药基因,以及分子分型,对蜡样芽孢杆菌进行分子特征分析,为评估食品中蜡样芽孢杆菌的潜在危害提供重要基础。

参考文献

- [1] NICHOLLS M, PURCELL B, WILLIS C, et al. Investigation of an outbreak of vomiting in nurseries in South East England, May 2012 [J]. *Epidemiology and Infection*, 2016, 144 (3): 582-590.
- [2] OH M H, HAM J S, COX J M. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 152(1-2): 1-8.
- [3] LIU J K, BAI L, LI W W, et al. Trends of foodborne diseases in China: Lessons from laboratory-based surveillance since 2011 [J]. *Frontiers of Medicine*, 2018, 12(1): 48-57.
- [4] 王伟杰, 孙婷婷, 魏彤竹, 等. 2017—2018 年辽宁省食品中

- 食源性致病微生物监测结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(22): 8566-8571.
- [5] 李荣华. 2014—2018年济宁市食源性疾病事件流行病学特征分析[J]. 预防医学论坛, 2019, 25(11): 872-874.
- [6] MOLS M, ABEE T. *Bacillus cereus* responses to acid stress[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(11): 2835-2843.
- [7] 王君. 全国食品中蜡样芽孢杆菌的污染分布规律及遗传多样性研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2013.
- [8] HUSSEIN M, SADEK O, EI TAHER S. Occurrence of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* organisms in some dairy desserts [J]. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 2015, 61(145): 160-165.
- [9] 赵月明, 任国谱. 乳制品中蜡样芽孢杆菌的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(4): 46-49.
- [10] ZHANG Z H, FENG L X, XU H Y, et al. Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(2): 1047-1055.
- [11] 倪刚, 倪文玲, 沈静华, 等. 红河州食源性蜡样芽孢杆菌毒力基因研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(5): 499-502.
- [12] 闫韶飞, 闫旭, 甘辛, 等. 我国市售婴儿配方乳粉中蜡样芽孢杆菌污染及其毒力基因调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(3): 286-291.
- [13] 刘勇. 对大米中呕吐型蜡样芽孢杆菌的多位点序列分型和毒力评价研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2014.
- [14] KOZYREVA V K, CRANDALL J, SABOL A, et al. Laboratory investigation of *Salmonella enterica* serovar Poona outbreak in California: Comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and whole genome sequencing (WGS) results[J]. *PLoS Currents*, 2016, 8.
- [15] FORSYTHE S J, DICKINS B, JOLLEY K A. Cronobacter, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis[J]. *BMC Genomics*, 2015, 15(1): 1-14.
- [16] ZHANG H Z, CHEN W J, WANG J, et al. 10-year molecular surveillance of *Listeria monocytogenes* using whole-genome sequencing in Shanghai, China, 2009-2019 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 551020.
- [17] PIETZKA A, ALLERBERGER F, MURER A, et al. Whole genome sequencing based surveillance of *L. monocytogenes* for early detection and investigations of listeriosis outbreaks [J]. *Frontiers in Public Health*, 2019, 7: 139.
- [18] 国家食品安全风险评估中心. 国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册[Z]. 2019.
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验: GB 4789.14—2014 [S]. 2014.
- [20] 张红芝, 刘雪薇, 魏腾, 等. 克罗诺杆菌属食品分离株种水平鉴定方法比较研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(5): 503-508.
- [21] 张红芝, 陈雯杰, 刘雪薇, 等. 基于全基因组测序的阪崎克罗诺杆菌婴幼儿食品分离株分子特征研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2021(2): 138-143.
- [22] 张翼. 婴幼儿食品中呕吐型蜡样芽孢杆菌的鉴别与多位点序列分析[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2015.
- [23] DOMMEL M K, LÜCKING G, SCHERER S, et al. Transcriptional kinetic analysis of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(2): 284-290.
- [24] 汪皓秋, 俞骅, 郑伟, 等. 二代测序技术在仪器食源性疾病事件冰原鉴定中的初步应用[J]. 中华预防医学杂志, 2018, 52(6): 647-652.
- [25] TORO M, RETAMAL P, AYERS S, et al. Whole-genome sequencing analysis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates in Chile provides insights into possible transmission between gulls, poultry, and humans [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(20): 6223-6232.
- [26] ALLARD M W, STRAIN E, MELKA D, et al. Practical value of food pathogen traceability through building a whole-genome sequencing network and database [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2016, 54(8): 1975-1983.
- [27] STENFORS A L P, FAGERLUND A, GRANUM P E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(4): 579-606.
- [28] 崔一芳. 蜡样芽孢杆菌毒素特征及耐药基因 *tet(45)* 的可移动性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [29] 豆朋朋, 王利, 方庆, 等. 鱼源蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(9): 2745-2752.