

## 调查研究

## 某企业婴儿肉毒中毒乳粉相关样品中肉毒梭菌的分离与分型

骆海朋<sup>1</sup>,瞿洪仁<sup>1</sup>,丁波<sup>2</sup>,任秀<sup>1</sup>,赵琳娜<sup>1</sup>,白继超<sup>1</sup>,王亚萍<sup>1</sup>,林兰<sup>1</sup>,崔生辉<sup>1</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院,北京 100050;2. 烟台市食品药品检验检测中心,山东烟台 264003)

**摘要:**目的 对从某企业获取的30批次婴儿配方乳粉样品进行肉毒毒素和肉毒梭菌检测,对分离到的1株B型肉毒梭菌进行全基因组测序分析。方法 参照GB 4789.12—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》对样品进行肉毒梭菌分离及肉毒毒素分型实验;对分离到的菌株进行全基因组测序,并分析菌株的遗传特征。结果 30批次样品中均未检出肉毒毒素;将增菌液进行小鼠腹腔注射后,4批次乳粉样品出现了典型小鼠肉毒中毒症状,但仅从1批次乳粉样品中分离到肉毒梭菌。基因组测序分析显示,该菌为I群B型肉毒梭菌,毒素基因簇为Ha型,毒素基因为B2亚型。结论 针对背景微生物复杂的婴儿配方乳粉中肉毒梭菌检测,不应以菌种分离作为金标准,而应以增菌液小鼠毒性实验结合肉毒抗血清保护实验作为确认方法。全基因组测序可对分离菌种进行精准鉴定和相关遗传特征分析,为中毒事件处理提供可靠的技术支撑。

**关键词:**肉毒梭菌;基因组;肉毒毒素分型

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)10-1475-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.10.011

**Isolation and typing of *Clostridium botulinum* from milk powder of an enterprise associated with a case of infant botulism**LUO Haipeng<sup>1</sup>, QU Hongren<sup>1</sup>, DING Bo<sup>2</sup>, REN Xiu<sup>1</sup>, ZHAO Linna<sup>1</sup>, BAI Jichao<sup>1</sup>, WANG Yaping<sup>1</sup>, LIN Lan<sup>1</sup>, CUI Shenghui<sup>1</sup>

(1. China National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

2. Yantai Food and Drug Inspection and Testing Center, Shandong Yantai 264003, China)

**Abstract: Objective** The aim of this study was to detect botulinum toxin and *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) in 30 batches of infant formula milk powder obtained from an enterprise and to analyze the whole genome of the strain of *C. botulinum* type B isolated from the samples. **Methods** The samples were subjected to *C. botulinum* isolation and botulinum toxin typing experiments according to the “National standard for food safety microbiological examination of *C. botulinum* and botulinum toxin” (GB 4789.12—2016). The whole genomes of the isolated strains were sequenced and their genetic characteristics were analyzed. **Results** Botulinum toxin was not detected in any of the 30 batches of samples. After intraperitoneal injection of the enrichment solution into mice, four batches of milk powder samples induced symptoms of botulism, but *C. botulinum* was isolated from only one batch of milk powder samples. Genome sequencing revealed that the bacterium was *C. botulinum* group I, type B, the toxin gene cluster was type Ha, and the toxin gene was subtype B2. **Conclusion** The detection of *C. botulinum* in infant formula milk powder with a complex background of microorganisms should not be based on the isolation of bacteria as the gold standard but should be confirmed by a mouse toxicity test of the enrichment solution combined with a botulinum toxin antiserum protection test. Whole genome sequencing can accurately identify strains and analyze relevant genetic characteristics, providing reliable technical support for handling poisoning events.

**Key words:** *Clostridium botulinum*; genome; botulinum toxin typing

收稿日期:2022-12-21

基金项目:多重耐药食源性病原菌溯源及其耐药基因传播预警(2022YFC2303900)

作者简介:骆海朋 男 副主任检验技师 研究方向为食品微生物学 E-mail:luohaipeng@nifdc.org.cn

瞿洪仁 女 助理研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail:hrqu0909@126.com

骆海朋和瞿洪仁为并列第一作者

通信作者:崔生辉 男 研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail:cuishenghui@aliyun.com

林兰 女 研究员 研究方为食品与药品检验检测 E-mail:linlan@nifdc.org.cn

崔生辉和林兰为共同通信作者

肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)为革兰氏阳性、专性厌氧梭状芽孢杆菌,该菌产生的肉毒毒素(Botulinum neurotoxins, BoNTs)是已知天然毒素中毒力最强的一种神经毒素,共分为7个型(A~G)<sup>[1]</sup>。2013年新西兰乳清粉肉毒梭菌污染事件虽然最终证明是检测实验室生孢梭菌污染的错误报告,但鉴于生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)与肉毒梭菌的高度相似性,生孢梭菌的存在指示着肉毒梭菌存在的可能。有报道显示<sup>[2-3]</sup>,婴儿配方食品可能是导致婴儿型肉毒中毒的原因之一。由于婴儿肠道缺乏正常菌群的保护及抑制梭菌繁殖的胆汁酸,婴儿摄入的肉毒梭菌芽孢可在肠道中定植、繁殖,产生肉毒毒素,从而导致婴儿肉毒中毒,在中毒婴儿的食品中可分离到肉毒梭菌芽孢,但通常没有肉毒毒素检出<sup>[4]</sup>。英国曾报道了一起与食用婴幼儿奶粉相关的婴儿肉毒中毒,对中毒婴儿食用的奶粉进行分析后发现,肉毒梭菌芽孢的浓度仅为0.38 MPN/100 g<sup>[2]</sup>。国内由肉毒梭菌引起的食物中毒时有发生<sup>[5-7]</sup>。2017年,我国也报道了一起由B型肉毒梭菌污染婴儿配方乳粉引起的肉毒中毒事件<sup>[3]</sup>。

多数婴儿配方食品并非无菌产品,GB 10765—2021《食品安全国家标准 婴儿配方食品》中规定,婴儿配方食品中的菌落总数不得超过 $10^4$  CFU/g( $n=5, c=2, m=10^3$  CFU/g,  $M=10^4$  CFU/g)。由原奶采集、运输、加工等环节污染的芽孢菌时常会出现在婴儿配方奶粉中<sup>[8]</sup>,据文献报道<sup>[2,9]</sup>,婴儿配方奶粉中常见的梭状芽孢菌有10多个种,芽孢浓度为1.1~23 CFU/100 g,其中以生孢梭菌最为常见,这些结果均提示婴儿配方奶粉存在肉毒梭菌污染的可能。

2019年,国内发生了一起婴儿肉毒中毒事件,疑似与一家无资质企业生产的婴儿配方乳粉相关。本研究对从该企业获取的30批次样品进行了肉毒毒素和肉毒梭菌检测。根据GB 4789.12—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》<sup>[10]</sup>对分离菌株的鉴定仅包括了革兰氏染色、菌株产毒实验、肉毒梭菌毒素基因的聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)实验等。但梭菌属多样性复杂,难以对肉毒梭菌进行准确鉴定。而随着全基因组测序技术的普及,对分离菌株进行全基因组测序成为可能,可以对菌株进行更准确的鉴定和分析<sup>[11-15]</sup>。本次研究通过三代测序技术获得了分离菌种的完整基因组,通过使用开放的网络生信分析工具分析。基因组测序分析显示,该菌为I群B型肉毒梭菌,毒素基因簇为Ha型,毒素基因为B2亚型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

从某起婴儿肉毒中毒事件相关企业抽取共计17批次乳粉样品和13批次原料样品。见表1和表2。

表1 乳粉样品名称及编号

Table 1 Name and number of milk powder samples

编号	样品名称	编号	样品名称
G-1	无乳糖营养配方粉	G-10	无乳糖营养配方粉
G-2	氨基酸营养配方粉	G-11	无乳糖营养配方粉
G-3	氨基酸优选营养配方粉	G-12	无乳糖营养配方粉
G-4	氨基酸优选营养配方粉	G-13	无乳糖营养配方粉
G-5	无乳糖营养配方粉	G-14	乳蛋白营养强化复合粉 固体饮料
G-6	深度水解乳清蛋白配方粉	G-15	无乳糖营养配方粉
G-7	无乳糖营养配方粉	G-16	小肽营养配方粉
G-8	深度水解乳清蛋白配方粉	G-17	深度水解乳清蛋白配方粉
G-9	胆黄素黄疸期营养配方粉		

表2 原料样品名称及编号

Table 2 Name and number of raw material samples

编号	名称	编号	名称
Y-1	含乳食品基料粉双蛋 白无乳糖配方粉	Y-8	乳清蛋白粉
Y-2	植物脂肪粉(基料粉)	Y-9	有机全脂乳粉
Y-3	食用葡萄糖	Y-10	全脂羊奶粉
Y-4	精氨酸	Y-11	脱脂奶粉
Y-5	蛋清肽(白蛋白肽)	Y-12	含乳食品基料粉(无乳糖粉)
Y-6	水解乳清蛋白	Y-13	复配固体饮料营养强化剂 (维生素)
Y-7	浓缩乳清蛋白80%		

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

LT-IBX450F 恒温培养箱(中国立德泰勃科学仪器有限公司), THERMO 1384 生物安全柜(美国 THERMO 公司), CR22G III 高速冷冻离心机(日本日立公司), C1000 48SYS PCR 仪(美国 Bio-rad 公司), Autoflex speed 基质辅助激光解吸飞行时间质谱(德国 Bruker), PL2002 天平(瑞士梅特勒公司)。

庖肉培养基基础、庖肉牛肉粒、卵黄琼脂基础、50% 卵黄液、胰蛋白胍葡萄糖酵母膏肉汤和 TPGYT 培养基均购自北京陆桥技术股份有限公司,无水乙醇、磷酸氢二钾、明胶和液体石蜡购自国药集团(中国),胰酶(Gibco)购自赛默飞世尔科技(中国)公司,细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)购自天根生化(北京)科技有限公司,EX Taq 酶购自宝生物工程(大连)有限公司,厌氧产气袋购自赛默飞世尔科技(中国)公司,API 20A 生化鉴定试剂购自法国生物梅里埃公司,A型、B型、E型、F型肉毒梭菌毒素基因 PCR 检测的引物合成于北京天一辉远生物科技有限公司,单价抗肉毒毒素诊断血清购自兰州生物制品研究所,标准菌株生孢梭菌 CMCC(B)64941

为本实验室保存。

### 1.1.3 实验动物

无特定病原体(SPF)级昆明小鼠,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,雌雄各半,体质量为15~20 g,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。动物饲养于温度为20℃~23℃、相对湿度为40%~60%的环境中,动物房许可证号:SCXK(京)2019-0017,按体质量随机分组,3只/笼。

## 1.2 方法

### 1.2.1 肉毒毒素和肉毒梭菌检验

参照GB 4789.12—2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》<sup>[10]</sup>对样品进行肉毒毒素和肉毒梭菌检验。样品的取样与处理、肉毒毒素检测、增菌均依据国家标准进行,使用庖肉培养基和TPGYT培养基增菌,生孢梭菌CMCC(B)64941在检验过程中作为培养的阳性质控。

### 1.2.2 增菌液肉毒毒素筛查

每份样品取有微生物生长的庖肉培养基2管和TPGYT培养基1管,每管分别取上清液3 mL,于3 000 g离心10 min,取上清液用于肉毒毒素筛查。其中1份庖肉培养基上清液取1.8 mL,加入10%的胰酶0.2 mL,于37℃水浴60 min。取上述上清液0.5 mL/只注射小鼠腹腔,每管增菌液注射3只小鼠,观察小鼠48 h内的中毒表现。小鼠如出现竖毛、四肢瘫软,呈现风箱式呼吸、腰腹部凹陷、宛如蜂腰等呼吸困难症状或因呼吸衰竭而死亡,判定该增菌液为肉毒毒素筛查阳性。

### 1.2.3 增菌液肉毒毒素基因筛查

取肉毒毒素筛查阳性的样品增菌液,用天根细菌基因组提取试剂盒,按照说明书提取DNA,参照GB 4789.12—2016中肉毒毒素基因PCR检测方法进行A、B、E、F型肉毒毒素基因的筛查。

### 1.2.4 分离培养、鉴定与分型

取肉毒毒素基因筛查阳性的样品增菌液,划线接种卵黄琼脂平板,(35±1)℃厌氧培养3 d。观察卵黄琼脂分离平板的生长情况,将菌落周围形成乳色沉淀晕圈,表面呈现珍珠样虹彩的可疑菌落转种卵黄琼脂进行分纯,每个样品挑取5个菌落,(35±1)℃厌氧44~48 h。

对分纯后的可疑肉毒梭菌株进行革兰氏染色、API 20A生化鉴定、基质辅助激光解吸飞行时间质谱(以下简称质谱)鉴定。

挑取纯化后的可疑菌落接种TPGYT培养基,(35±1)℃厌氧培养22~24 h后,用Tiangen试剂盒提取DNA,参照GB 4789.12—2016中PCR方法检

验分离菌株中A、B、E、F型肉毒毒素基因。根据PCR检测结果,使用肉毒毒素诊断血清结合动物实验进行确认。

取分离菌种对应的肉毒素抗体血清,用无菌生理盐水进行1:1 000稀释。取待确认菌种庖肉培养基增菌后肉汤的10<sup>-3</sup>稀释液0.6 mL,加入0.6 mL肉毒毒素诊断血清稀释液,37℃水浴30 min。另取待确认菌种庖肉培养基增菌后肉汤的10<sup>-3</sup>稀释液0.6 mL,加入0.6 mL明胶磷酸盐缓冲液,99℃水浴10 min。将经上述处理后的稀释液以0.5 mL/只腹腔注射小鼠,每份稀释液注射2只,观察96 h内小鼠的中毒及死亡情况。

### 1.2.5 菌种毒力测定

参照参考文献[10]将鉴定与分型明确的肉毒梭菌接种庖肉培养基,(35±1)℃厌氧培养5 d后,用明胶磷酸盐缓冲液将培养液进行10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup>的10倍系列稀释,取稀释液对小鼠进行腹腔注射,每只0.5 mL,每个稀释度注射两只,观察96 h内小鼠中毒症状与死亡情况,计算最低致死剂量(Minimum lethal dose,MLD/mL)。

### 1.2.6 菌种全基因组测序与分析

将鉴定与分型明确的肉毒梭菌接种于TPGYT培养基,(35±1)℃厌氧培养22~24 h后,离心收集菌体,使用天根磁珠法通用型基因组DNA提取试剂盒进行DNA提取,并使用Qubit dsBR Assay kit测定DNA浓度。三代测序使用PacBio Sequel平台进行测序。构建10K SMRT Bell文库,将经电泳检测合格的DNA样品打断成构建文库所需大小的目的片段,经DNA损伤修复及末端修复并纯化,对特定大小的片段及浓度进行筛选,随后修复DNA损伤,再次对文库纯化,将构建好的文库经Qubit浓度定量,最后用PacBio平台进行测序。对测得的原始数据进行过滤处理,得到有效数据。质控后的有效数据,使用SMRT Link v5.0.1软件(<https://www.pacb.com/support/software-downloads/>)对reads进行基因组组装,得到能反映样品基因组基本情况的初步的组装结果。把Reads比对到组装好的基因组序列上,统计Mapping到最长序列的测序深度的分布情况。通过把原始数据比对到初步的组装序列,利用Arrow软件进行组装结果的优化,把存在组装错误的区域进行校正。将优化后的组装结果进行比对分析,并采用二代数据进行校正,筛分染色体与质粒序列,并将染色体序列组装成为一个环状基因组。对组装后的序列使用典型菌种基因组服务器(<https://tygs.dsmz.de/>)进行鉴定,使用RAST服务器对基因组进行注释,使用VFDB(Virulence

Factors of Pathogenic Bacteria) 数据库分析毒力基因, 使用 PHASTER (PHAge Search Tool Enhanced Release, <https://phaster.ca/>) 服务器进行噬菌体分析。将肉毒梭菌菌株的基因组序列文件 (Fasta file) 上传到 TYGS server ([https://tygs.dsmz.de/user\\_requests/new](https://tygs.dsmz.de/user_requests/new)) 及 Patric 网站中的 Similar Genome Finder (<https://www.bv-brc.org/app/GenomeDistance>), 对该肉毒梭菌进行分析鉴定。该肉毒梭菌菌株的基因组的序列已经上传到北京基因组所 (国家生物信息中心) 的国家基因组科学数据中心基因组序列库 (<https://ngdc.cnbc.ac.cn/gwh/documents>)<sup>[16]</sup>, 编号为 GWHBQDU00000000。

### 1.2.7 肉毒毒素的分型

根据 RAST 服务器对基因组注释结果, 分析该菌毒素基因簇的构成, 判断基因簇类型。根据文献<sup>[17]</sup>, 从美国国家生物技术信息中心 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 网站下载已知 B 型肉毒毒素 8 个亚型的典型序列。使用 Mega-X 将本研究分离的肉毒毒素基因序列与已知的 B 型肉毒梭菌亚型进行亲缘关系的比较, 计算与 B 型肉毒毒素各亚型之间的遗传距离, 判断分离株菌肉毒毒素的亚型。

## 2 结果

### 2.1 样品肉毒毒素小鼠毒性实验

13 批次原料样品中, Y-4 (精氨酸) 和 Y-13 (复配固体饮料营养强化剂) 样品处理液腹腔注射小鼠后均出现急性死亡, 将两样品的处理液 1:10 和 1:100 稀释后再分别注射小鼠, 均未见异常, 表明该样品引起的小鼠急性死亡是样品基质浓度过高所致。17 批次乳粉样品的处理液腹腔注射小鼠后, 均未见异常。综上, 30 批次样品中均未检出肉毒毒素。

### 2.2 样品增菌液小鼠毒性实验

增菌培养后, 所有接种样品的庖肉培养基和 TPGYT 增菌液均可见微生物生长。经小鼠毒性实验检测, 11 批次可导致不同程度小鼠中毒症状, 其中 Y2、Y9、G3、G6、G9、G11 和 G17 样品增菌液 1:10 和 1:100 稀释后再分别注射小鼠, 均未见异常, 表明小鼠的中毒症状并非肉毒毒素引起; 腹腔注射 G4、G5、G8 和 G16 样品增菌液的部分小鼠出现了竖毛、四肢瘫软, 呼吸困难, 呼吸呈风箱式, 腰部凹陷, 宛若蜂腰, 9 h 后部分小鼠死于呼吸麻痹等疑似肉毒中毒症状 (表 3), 其中 3 个样品增菌液为庖肉培养基, 1 个样品增菌液为 TPGYT 培养基。B 型肉毒毒素抗血清对小鼠可形成有效保护, 加热后的培养物对小鼠未见毒性。

表 3 乳粉样品增菌液腹腔注射小鼠的中毒症状

Table 3 Toxic symptoms of mice injected intraperitoneally with milk powder sample enrichment solution

编号	TPGYT	庖肉培养基处理方式			
		加热	加热+胰酶	未加热	未加热+胰酶
Y-2	—*	0.5 h 死亡 (3/3)	0.5 h 死亡 (3/3)	—	—
Y-9	—	0.5 h 死亡 (3/3)	0.5 h 死亡 (3/3)	—	—
G-3	—	0.5 h 死亡 (3/3)	*	—	—
G-6	—	—	0.5 h 死亡 (3/3)	—	—
G-9	0.5 h 死亡 (3/3)	0.5 h 死亡 (3/3)	0.5 h 死亡 (3/3)	0.5 h 死亡 (3/3)	0.5 h 死亡 (3/3)
G-11	—	0.5 h 死亡 (3/3)	0.5 h 死亡 (3/3)	—	未见异常
G-17	—	0.5 h 死亡 (3/3)	0.5 h 死亡 (3/3)	—	未见异常
G-4	有类似肉毒梭菌中毒症状** (1/3)	—	—	—	—
G-5	—	有类似肉毒梭菌中毒症状, 9 h 后死亡 (3/3)	有类似肉毒梭菌中毒症状, 9 h 后死亡 (3/3)	有类似肉毒梭菌中毒症状 (3/3), 9 h 后死亡 (1/3)	—
G-8	—	0.5 h 死亡 (3/3)	0.5 h 死亡 (3/3)	有类似肉毒梭菌中毒症状 (3/3), 9 h 后死亡 (1/3)	—
G-16	—	—	—	—	有类似肉毒梭菌中毒症状 (3/3), 48 h 后死亡 (1/3)

注: \* 未发现异常; \*\* 观察到竖毛、四肢瘫软, 呼吸困难, 呈现风箱式呼吸、腰腹部凹陷、宛如蜂腰等肉毒毒素中毒症状

### 2.3 乳粉样品增菌液 PCR 检测及菌种分离结果

参照 GB 4789.12—2016 中的 PCR 方法对导致小鼠疑似肉毒中毒症状的 G4、G5、G8 和 G16 样品增菌液进行检测, 结果显示 G-5 和 G-8 样品庖肉培养基为 B 型肉毒毒素基因扩增阳性, G4 和 G16 样品增菌液各种亚型基因扩增均阴性。致小鼠疑似肉毒中毒症状的 G4、G5、G8 和 G16 样品增菌液在卵

黄琼脂分离平板上均出现如下形态的肉毒梭菌疑似菌落: 形态扁平、稍粗糙, 蔓延生长, 边缘不规则, 菌落周围可见乳色沉淀晕圈, 菌落表面呈现珍珠样虹彩。显微镜下呈革兰氏阳性棒状杆菌, 芽孢位于菌体一端, 类似网球拍状, 该菌在血平板上可见溶血环, 经 API 20A 生化鉴定、质谱鉴定和 16S rRNA 序列测定, 与生孢梭菌 (*C. sporogenes*) 不能区分。

## 2.4 可疑菌落 PCR 分型与确认

参照 GB 4789.12—2016 中的 PCR 方法对分离纯化的肉毒梭菌疑似菌落检测显示,G4、G8 和 G16 样品来源菌落均未检出肉毒毒素基因,G-5 样品来源菌落 G-5p2 B 型肉毒毒素基因扩增阳性。G-5 样品来源肉毒梭菌可疑菌落 G-5p2 庖肉培养物经 1:10~1:10 000 稀释后,均可致小鼠死亡(2 只/组),小鼠肉毒中毒症状为:注射培养物后 1.5~2 h 出现竖毛、四肢瘫软,呼吸困难,呼吸呈风箱式,腰部凹陷,宛若蜂腰,4~48 h 死于呼吸麻痹。1:100 000 稀释后,两只小鼠均出现中毒症状,最终 1 只恢复,1 只死亡;1:1 000 000 稀释后,两只小鼠均未见中毒症状。由此计算分离菌株庖肉培养物对小鼠的最低致死剂量为 20 000 MLD/mL。B 型肉毒毒素抗血清对小鼠可形成有效保护,加热后的培养物对小鼠未见毒性。

## 2.5 肉毒梭菌 G-5p2 基因组测序与分析

对肉毒梭菌 G-5p2 基因组测序结果分析显示,分离菌种染色体大小为 3 902 164 bp,携带一个 21 598 bp 质粒,质粒上未见毒力相关基因(表 4)。在 Type (Strain) Genome Server 网站及 Patric 网站中的 Similar Genome Finder 分析后,分离菌株 G-5p2 鉴定为 I 群肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)。

使用 VFDB 数据库对测序结果分析,共计识别

表 4 肉毒梭菌 G-5p5 基因组测序统计信息表

Table 4 Statistical Information on Genome Sequencing of *Clostridium botulinum* G-5p5

种类	基因组 大小/bp	基因 数量	编码基因 长度/bp	GC 含量/%	基因平均 长度/bp
染色体	3 902 164	3 657	3 217 590	28.25	879.84
质粒	21 598	33	13 990	25.47	424.09

出 7 个毒素编码相关基因(表 5),RAST 软件对其进行基因注释显示,B 型肉毒毒素基因簇位于染色体上,毒素编码基因周边未发现转座子相关基因。PHASTER 分析显示,染色体上有四个噬菌体序列,但均不在毒素基因附近。B 型肉毒毒素基因簇由 5 个基因组成,属于 ha+ 基因簇类型,该基因簇两端的基因为未知功能蛋白(hp)和核酸外切酶(exo SbcC)(图 1)。

表 5 肉毒梭菌 G-5p2 基因组上的毒素编码相关基因

Table 5 Toxin genes related to the G-5p2 genome of *Clostridium botulinum*

基因名称	起止位点	基因功能
atx	944 915~948 790	编码肉毒毒素
colA	1 795 213~1 798 842	编码胶原酶
cloSI	2 095 136~2 096 710	编码半胱氨酸蛋白酶
orf01496	1 626 909~1 627 547	编码溶血素
orf01628	1 761 625~1 762 275	编码溶血素
orf01844	2 017 502~2 018 338	编码溶血素
orf02857	3 076 642~3 077 781	编码溶血素



注:ha-17:血凝集素相关基因;mtx: Mosquitocidal toxin 编码基因;botR:毒素表达调控基因;ntnh:非毒素非血凝素基因 NTNH 蛋白; bont:肉毒毒素编码基因

图 1 肉毒梭菌 5P2 毒素基因簇基因注释图

Figure 1 Gene annotation of *Clostridium botulinum* 5P2 toxin gene cluster

将 G-5P2 基因组中肉毒毒素基因序列与已知 B 型肉毒毒素梭菌 8 个亚型的毒素基因参考序列使用 Mega-X 构建系统发育图并计算氨基酸序列的差异。如图 2 所示,根据发育树所示 G-5P2 与 B2 型肉毒梭菌 BAC22064.1 亲缘关系最近。

## 3 讨论

肉毒梭菌按生化、生理和基因特征可分为 4 个群(I~IV 群),这些群呈现出非常多样化的表型和基因型特征<sup>[14,18]</sup>。因为梭菌属内多样性,导致对于该属细菌的分类仍存在争议,这给肉毒梭菌的检测、分离和鉴定带来很多问题,如不产肉毒毒素的生孢梭菌和肉毒梭菌通过生化分析、16S rRNA 测序等都很困难区分,这在本次研究中得到进一步验证。但肉毒梭菌区别于其他梭菌的一个共同特征是均可产生肉毒神经毒素。目前,引起食物肉毒中毒的

肉毒梭菌多属于 I 和 II 群<sup>[11]</sup>,而本研究分离的菌种为 I 群 B 型肉毒梭菌,该菌种庖肉培养物的毒力为 20 000 MLD/mL,这些数据提示该菌种一旦被婴儿摄入,极可能会引发肉毒中毒。

由于婴儿肠道菌群不健全及抑制梭菌繁殖的胆汁酸较低,从外界摄入的肉毒梭菌芽孢可在肠中定植、繁殖,产生肉毒毒素。报道显示,婴儿配方奶粉可能是导致婴儿型肉毒中毒的原因之一<sup>[3]</sup>。鉴于婴儿配方奶粉生产过程中通常有严格的环境控制,其中可能污染的肉毒梭菌芽孢浓度很低,如英国报道的一起与食用婴幼儿奶粉相关的婴儿肉毒中毒,对中毒婴儿食用的奶粉进行分析显示,肉毒梭菌芽孢的浓度仅为 0.38 MPN/100 g<sup>[2]</sup>。如此低浓度的肉毒芽孢混杂在诸多背景微生物中,对检测用培养基的种类和质量提出了较高的要求。本研究中,共计 4 批次乳粉样品增菌液腹腔注射后,小鼠出现了

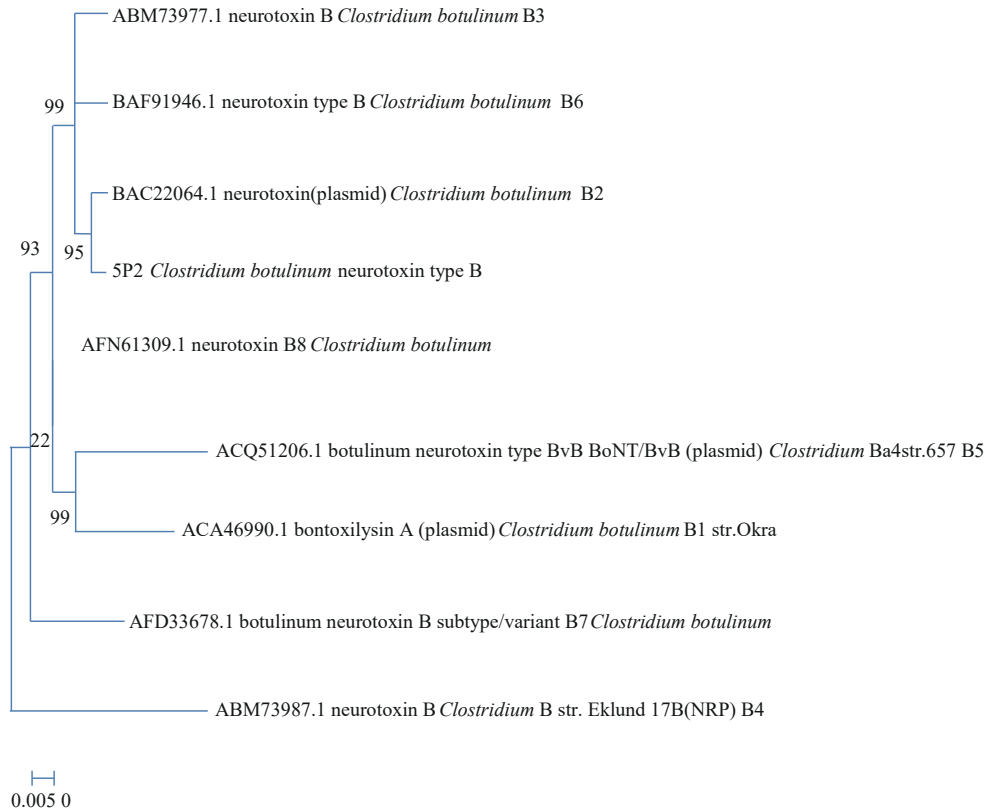


图2 5P2肉毒毒素基因序列与B型肉毒素梭菌8个亚型肉毒毒素基因参考序列Mega-X构建系统发育图

Figure 2 Phylogenetic diagram of 5P2 botulinum toxin gene sequence and Mega-X reference sequence of botulinum toxin gene of 8 subtypes of *Clostridium botulinum* type B

疑似肉毒中毒症状,其中3批次为疱肉培养基,一批次为TPGYT,这一结果提示,国标中使用的两种增菌培养基间具有一定的互补性,进一步证实使用两种增菌培养基的必要性。但对4批次小鼠出现了疑似肉毒中毒症状的增菌液进行PCR检测和平板划线显示,两批次样品为PCR阳性,仅从1批次样品中分离到了肉毒梭菌,从其他3批次样品中分离到的菌种均为生孢梭菌。这一结果提示,PCR方法和平板分离培养方法的灵敏度远低于小鼠毒性实验。肉毒毒素是已知天然毒素中毒力最强的一种神经毒素,A、B、E、F型毒素对小鼠的半数致死剂量仅为0.5~1 ng/kg,不同型别间差异不大<sup>[19]</sup>。目前国标肉毒梭菌的检测方法以PCR筛选和菌落分离为金标准,而检测中使用的增菌和分离培养基选择性不强,针对背景微生物复杂的样品势必会造成漏检。鉴于小鼠肉毒中毒的症状具有很高的特异性,在没有研发出选择性良好的培养基之前,针对背景微生物复杂样品中肉毒梭菌的检测应以小鼠毒性实验结合肉毒抗血清保护实验作为确认实验,以减少漏检。

生孢梭菌与肉毒梭菌无论在菌落形态、显微镜下的特征均难以区分,其生化反应和16S rDNA序列都与肉毒梭菌高度相似<sup>[7]</sup>,这在本次研究中得到

进一步验证。通常认为生孢梭菌为不产神经毒素的肉毒梭菌,常作为肉毒梭菌的替代质控菌使用。据文献报道,生孢梭菌可产生溶血毒素<sup>[20-21]</sup>。该毒素是造成本次实验过程中小鼠急性中毒死亡的原因。鉴于生孢梭菌在部分样品中的浓度远远高于肉毒梭菌,这导致增菌过程中肉毒梭菌不能生长至较高浓度,从而导致PCR阴性;在平板分离过程中,肉毒梭菌菌落也被生孢梭菌掩盖,这些因素导致尽管4批次样品出现了小鼠肉毒中毒症状,但仅从1批次样品中分离到肉毒梭菌。

对不同肉毒梭菌菌株的基因组序列进行分析后发现,编码肉毒毒素的基因位于染色体、质粒或噬菌体上,并可以通过水平转移、基因重组等方式在不同梭菌属菌株之间转移<sup>[11,22]</sup>。本次研究通过三代测序技术获得了分离菌种的完整基因组,通过使用开放的网络生信分析工具分析,进一步对前期鉴定结果进行了确认,同时分析结果显示,本次分离的菌种肉毒毒素编码基因位于染色体上,属于ha+基因簇类型,含有一个非毒素非凝血素(*ntnh*)基因,它的功能是提高BoNT在肠道内的稳定性,提高毒素的效力<sup>[20]</sup>。该基因周边未见如噬菌体、转座子等可移动原件,说明该基因在该菌种中较为稳定,不易发生水平转移。

综上,为避免肉毒梭菌的漏检,针对背景微生物复杂的婴儿配方乳粉中肉毒梭菌检测,建议不以菌种分离作为金标准,而应以增菌液小鼠毒性实验结合肉毒抗血清保护实验作为确认方法。如分离到肉毒梭菌,结合基因组测序手段可对菌种进行精准鉴定和相关生物信息学分析,可为相关中毒事件暴发处理提供可靠的技术支撑。

## 参考文献

- [1] HOROWITZ B Z. Botulinum toxin [J]. *Critical care clinics*, 2005, 21(4): 825-839.
- [2] BRETT M M. A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder: Evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2005, 54(8): 769-776.
- [3] DONG Y P, WANG W, JIANG T, et al. Molecular and epidemiological characterization of infant botulism in Beijing, China [J]. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 2017, 30(6): 460-464.
- [4] 骆海朋,任秀,崔生辉. 婴儿肉毒中毒[J]. *中国药事*, 2015, 29(8): 806-813.  
LUO H P, REN X, CUI S H. Infant botulism [J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2015, 29(8): 806-813.
- [5] 卢开林,王媛媛,张丽,等. 2例经食物肉毒中毒病例分析[J]. *实用休克杂志(中英文)*, 2021, 5(1): 59-60.  
LU K L, WANG Y Y, ZHANG L, et al. Analysis of 2 cases of botulism via food [J]. *Journal of Practical Shock*, 2021, 5(1): 59-60.
- [6] 葛绣山,孙启杰,徐雪芳,等. B型肉毒梭菌致婴儿肉毒中毒三例临床分析及实验室诊断[J]. *中华儿科杂志*, 2020, 58(6): 499-502.  
GE X S, SUN Q J, XU X F, et al. Clinical analysis and laboratory diagnosis of three cases with infantile botulism caused by *Clostridium botulinum* type B [J]. *Chinese Journal of Pediatrics*, 2020, 58(6): 499-502.
- [7] 李桂满,张艳,王慧雯,等. 昆明市首起由疑似肉毒梭菌引起食物中毒的实验室快速检测[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(9): 3009-3013.  
LI G M, ZHANG Y, WANG H W, et al. First rapid laboratory test for food poisoning caused by suspected *Clostridium botulinum* in Kunming [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(9): 3009-3013.
- [8] 安琳,余文,徐颖华,等. 婴幼儿配方乳粉菌落总数检测与细菌污染种属分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(17): 5891-5896.  
AN L, YU W, XU Y H, et al. Determination of total bacterial colony and analysis of bacterial contamination species in infant formula milk powder [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(17): 5891-5896.
- [9] JASON R, BARASH, CLS M, et al. Presence of soil-dwelling clostridia in commercial powdered infant formulas [J]. *The Journal of Pediatrics*, 2010, 156(3): 402-408.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验: GB 4789.12—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National food safety standard—Microbiological examination of food—Examination of *Clostridium botulinum* and botulinus toxin: GB 4789.12—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [11] COLLINS M D, EAST A K. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 84(1): 5-17.
- [12] CONNAN C, DENÈVE C, MAZUET C, et al. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* [J]. *Toxicon*, 2013, 75: 90-100.
- [13] CHEN Y, KORKEALA H, LINDÉN J, et al. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis reveals stable and prolonged neurotoxin cluster gene activity in a *Clostridium botulinum* type E strain at refrigeration temperature [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(19): 6132-6137.
- [14] HILL K K, SMITH T J. Genetic diversity within *Clostridium botulinum* serotypes, botulinum neurotoxin gene clusters and toxin subtypes [J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012: 1-20.
- [15] SMITH T J, LOU J, GEREN I N, et al. Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization [J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(9): 5450-5457.
- [16] CHEN M L, MA Y K, WU S, et al. Genome warehouse: A public repository housing genome-scale data [J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2021, 19(4): 584-589.
- [17] HILL K K, XIE G, FOLEY B T. Genetic diversity within the botulinum neurotoxin-producing bacteria and their neurotoxins [J]. *Toxicon*, 2015, 107: 2-8.
- [18] 董银苹,江涛,赵帅,等. 我国首例由丁酸梭菌引起婴儿E型肉毒中毒实验室诊断研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2020, 32(5): 499-503.  
DONG Y P, JIANG T, ZHAO S, et al. Laboratory investigation of the first infant botulism case caused by type E botulinum neurotoxin producing *Clostridium butyricum* in China [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2020, 32(5): 499-503.
- [19] LUVISETTO S, ROSSETTO O, MONTECUCCO C, et al. Toxicity of botulinum neurotoxins in central nervous system of mice [J]. *Toxicon*, 2003, 41(4): 475-481.
- [20] HARA-KUDO Y, OGURA A, NOGUCHI Y, et al. Characteristics of toxicity and haemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* in various animals and cultured cells [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 1997, 46(4): 270-275.
- [21] HARA-KUDO Y, OGURA A, NOGUCHI Y, et al. Effect of hemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* on rabbit ligated intestinal loop [J]. *Microbial Pathogenesis*, 1997, 22(1): 31-38.
- [22] HILL K K, SMITH T J, HELMA C H, et al. Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(3): 818-832.