

## 实验技术与方法

## 一起肉毒梭菌中毒事件的实验室诊断

钱璐<sup>1</sup>, 梁胜楠<sup>1</sup>, 董晶<sup>1</sup>, 徐雪芳<sup>2</sup>, 胡彬<sup>3</sup>, 张香媛<sup>1</sup>, 崔方元<sup>1</sup>, 程利红<sup>1</sup>, 窦继波<sup>1</sup>

(1. 聊城市疾病预防控制中心, 山东 聊城 252000; 2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206; 3. 山东省疾病预防控制中心, 山东 济南 250014)

**摘要:**目的 对2023年11月发生的1起疑似肉毒中毒事件的相关样本进行实验室检测,对分离到的一株A型肉毒梭菌(*C. botulinum*)进行全基因组测序(WGS)。方法 对食品、病例粪便和环境样本应用实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)快速检测肉毒毒素基因。参照GB 4789.12—2016对样本进行前处理,经接种疱肉培养基和TPGYT培养基增菌培养5 d,通过动物试验进行毒素检出、确证和定性实验,采用卵黄琼脂平板分离和纯化菌株,并用API 20A和VITEK MS做菌种鉴定。同时对分离得到的菌株开展WGS,分析菌株的遗传特征。结果 病例粪便样本A型肉毒毒素基因阳性,通过动物试验检出A型肉毒毒素,利用卵黄琼脂平板成功分离A型肉毒梭菌RD1和RD2。其他样品均为阴性。WGS分析显示,该菌为肉毒梭菌,共有12个毒素编码相关基因,染色体上有3个噬菌体序列, wg-SNPs分析显示RD1和RD2与BrDura亲缘关系最近。结论 此次实验按照国家标准和本实验室建立的荧光定量PCR方法进行鉴定,检测方案和结果为临床A型肉毒中毒提供参考。

**关键词:**肉毒梭菌; 肉毒毒素; 食物中毒; 实验室诊断; 全基因组测序

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)08-0916-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.08.004

Laboratory diagnosis of poisoning due to *Clostridium botulinum*QIAN Lu<sup>1</sup>, LIANG Shengnan<sup>1</sup>, DONG Jing<sup>1</sup>, XU Xuefang<sup>2</sup>, HU Bin<sup>3</sup>, ZHANG Xiangyuan<sup>1</sup>,  
CUI Fangyuan<sup>1</sup>, CHENG Lihong<sup>1</sup>, DOU Jibo<sup>1</sup>

(1. Liaocheng Center for Disease Control and Prevention, Shandong Liaocheng 252000, China; 2. State Key Laboratory of Communicable Disease Prevention and Control, Institute for Communicable Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 3. Shandong Center for Disease Control and Prevention, Shandong Jinan 250014, China)

**Abstract: Objective** Laboratory analyses were performed for a case of suspected botulinum poisoning incident that occurred in November 2023, and to analyze the whole genome of the strain of *C. botulinum* type A isolated. **Methods** Real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction is applied to rapidly detect botulinum toxin genes in food, case feces and environmental samples. According to GB 4789.12—2016, the samples were subjected to pre-treatment. After being inoculated with blister meat culture medium and TPGYT culture medium for 5 d of enrichment, toxin detection, confirmation, and qualitative experiments were conducted through animal experiments. The strains were isolated and purified using egg yolk agar plates, and identified using API 20A and VITEK MS. Simultaneously, WGS was performed on the isolated strains to analyze their genetic characteristics. **Results** The fecal sample of the case was positive for type A botulinum toxin gene, and type A botulinum toxin was detected through animal experiments. *C. botulinum* type A RD1 and RD2 was successfully isolated using egg yolk agar plates, all other samples were negative. Whole genome sequencing analysis showed that the bacterium is *C. botulinum*, with a total of 12 toxin coding related genes and 3 phage sequences on the chromosome. Wg-SNPs analysis showed that RD1 and RD2 has the closest genetic relationship with BrDura. **Conclusion** This experiment was identified according to national standards and the fluorescence quantitative PCR method established in our laboratory. The detection plan and results provide reference for clinical type A botulism.

收稿日期:2024-01-25

基金项目:山东省医药卫生科技项目(202412060988)

作者简介:钱璐 女 主管技师 研究方向为微生物检验检测 E-mail:lccdcql@126.com

通信作者:窦继波 男 副主任医师 研究方向为微生物检验检测与诊断 E-mail:lccdcjib@126.com

**Key words:** *Clostridium botulinum*; Botulinum toxin; food poisoning; laboratory diagnosis; whole genome sequencing

肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)是革兰氏阳性、厌氧、形成孢子的杆状细菌,缺氧环境下可以产生肉毒梭菌神经毒素(Botulinum neurotoxins, BoNTs)<sup>[1]</sup>,是一种危害性极强的食源性致病菌。BoNTs是已知最强大的天然毒素,能够抑制突触前膜分泌乙酰胆碱,只要30~100 ng就有可能致命,能引起影响人类、动物和鸟类的严重神经麻痹性疾病<sup>[2]</sup>。肉毒梭菌可分为7种血清型(A~G),其中A、B、E、F与人类肉毒梭菌中毒有关,并且是最常研究的<sup>[3]</sup>,近年来又提出了第8种血清型(H)<sup>[4]</sup>。在我国,由肉毒梭菌引起的食物中毒事件时有发生<sup>[5-7]</sup>,食品多为发酵豆制品、家庭自制性食品和面制品等<sup>[7]</sup>。肉毒中毒的死亡率较高,一般为20%~40%,且临床表现不同于其他的食物中毒,胃肠道症状比较少见<sup>[8]</sup>,易造成误诊甚至漏诊,因此精准、快速的实验室诊断对临床确诊和治疗肉毒中毒具有重要指导意义。2023年11月23日16时许,某市疾病预防控制中心接本市人民医院报告,2例患者(吴某某、匡某某)食用熏鱼后出现身体不适,临床诊断疑似为肉毒中毒。为明确中毒原因并为临床治疗提供相关支持,本研究对采集的食品、病例粪便和环境标本进行实验室检测,同时对分离得到的菌株开展全基因组测序,从基因层面进行更加准确的鉴定和分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病例资料

病例1吴某某,女,71岁,憋喘3 d,伴头晕、口唇发绀、精神差,给予无创机械通气治疗,效果欠佳。病例2匡某某,男,67岁,视物模糊及视物重影3 d,言语不清1 d,伴饮水呛咳。经市人民医院临床诊断,高度怀疑为肉毒毒素中毒。现场流行病学调查显示,病例1与病例2为夫妻关系,2例病例自述发病前均曾食用熏鱼。

#### 1.1.2 样本

疑似导致食物肉毒中毒的熏鱼样本包装方式为纸箱外包装,内含分别单独塑封袋真空包装熏鱼2条。2位患者疑似食用其中一条熏鱼导致食物中毒,因该熏鱼已被食用且无剩余,故采集同外包装内另一条单独真空包装的熏鱼样本A。同时在超市采集同厂家、同品牌、同批次熏鱼样本B 1份。采集2例病例(吴某某和匡某某)粪便各1份。另采集室内环境样本C、室外土壤环境样本D各1份。共6份待检样本。

#### 1.1.3 主要仪器与试剂

定量PCR仪QS7(美国赛默飞世尔科技公司)、全自动微生物质谱分析仪(法国生物梅里埃公司)、Invitrogen Qubit 4 荧光计(美国赛默飞世尔科技公司)、全基因组测序仪(中国深圳华大智造科技股份有限公司)、电热恒温培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

细菌DNA提取试剂盒购自北京卓诚惠生生物科技股份有限公司,肉毒梭菌产毒基因检测试剂盒购自天津一知科技有限公司,庖肉基础培养基、庖肉牛肉粒、液体石蜡购自广州环凯生物科技有限公司,革兰氏染色液、TPGYT基础培养基、明胶磷酸盐缓冲液、哥伦比亚血平板、卵黄琼脂基础购自北京陆桥技术股份有限公司,胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司,厌氧产气袋购自法国生物梅里埃公司,QIAamp DNA Mini Kit试剂盒购自德国Qiagen,建库试剂盒、测序试剂盒购自深圳华大基因科技有限公司。所有试剂与耗材均在有效期内。

#### 1.1.4 实验动物

3周、体质量为15~18 g无特定病原体(SPF)级昆明小鼠,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2022-0052。动物实验已通过中国疾病预防控制中心的实验动物福利和伦理委员会审查,并严格按照实验动物伦理审查规定的实验方案进行。

## 1.2 方法

### 1.2.1 样品制备

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》方法进行样品制备、肉毒毒素检测、肉毒梭菌分离鉴定等,并使用荧光定量PCR的方法对毒素基因进行检测。无菌操作称取样品25 g,加入50 mL明胶磷酸盐缓冲液中,浸泡30 min,用拍击式均质器拍打2 min后获得样本匀液。

### 1.2.2 肉毒毒素基因PCR检测

吸取1.2.1中的样本匀液,用细菌DNA提取试剂盒和肉毒梭菌产毒基因检测试剂盒进行核酸提取和扩增,进行A、B、E、F型肉毒毒素基因检测,实验过程参照试剂盒及仪器使用说明书。

### 1.2.3 样本增菌培养

吸取1.2.1中的样品匀液2 mL,接种至隔水煮沸的庖肉培养基和TPGYT培养基,每种增菌液各接种两支,庖肉培养基和TPGYT肉汤管分别于35℃和28℃厌氧培养5 d。记录增菌培养物的浊

度、产气、肉渣颗粒消化情况,并注意气味。

#### 1.2.4 样本增菌液肉毒毒素检出试验

吸取 1.2.3 中有微生物增长的增菌液 3 mL, 1:5 倍稀释, 3 000 r/min 离心 10 min, 上清用于毒素检测。上清分为 2 份, 1 份直接用于毒素检测, 1 份加入 10% 胰酶水溶液, 37 °C 孵育 60 min 后用于毒素检测。2 份上清液分别腹腔注射小鼠 3 只, 每只 0.5 mL, 观察和记录小鼠 48 h 内的中毒表现, 同时设置明胶磷酸盐缓冲液阴性对照组和肉毒毒素阴性对照组。

#### 1.2.5 样本增菌液肉毒毒素确证和定性实验

取 1.2.4 中增菌液肉毒毒素检出试验为阳性的样品上清液, 分为 3 组: 第 1 组加入等量明胶磷酸盐缓冲液混匀, 煮沸 10 min; 第 2 组加入等量明胶磷酸盐缓冲液, 混匀; 第 3 组与 A 型肉毒毒素诊断血清混匀, 37 °C 孵育 30 min。每组分别腹腔注射小鼠 2 只, 每只 0.5 mL, 观察和记录小鼠发病与死亡情况至 96 h, 同时设置明胶磷酸盐缓冲液阴性对照组和肉毒毒素阳性对照组。

#### 1.2.6 菌株分离、鉴定与分型

取肉毒毒素基因 PCR 筛查阳性的样品增菌液 1 环, 接种至卵黄琼脂平板, 35 °C 厌氧培养 1 d, 选取可疑菌落转接于卵黄琼脂平板 35 °C 厌氧培养 1 d。纯化后的可疑菌落进行革兰氏染色和镜检、API 20A 生化鉴定和 VITEK MS 全自动微生物质谱鉴定仪鉴定。采用荧光定量 PCR 的方法, 对分离菌株进行 A、B、E、F 型肉毒毒素基因检测。将肉毒毒素基因检测为阳性的分离菌株按 1.2.4 和 1.2.5 的方法进行肉毒毒素检出、确证和定型试验。

#### 1.2.7 全基因组测序

鉴定为肉毒梭菌的菌落, 按照 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒操作手册进行基因组 DNA 提取, 使用超微量紫外-可见分光光度计测定基因组 DNA 纯度, 使用 Invitrogen Qubit 4 测定基因组 DNA 浓度。使用仪器 MGISP-100 和 MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂套装进行 DNA 文库自动化构建; 使用 MGISEQ-200RS 基因测序仪完成全基因组 PE100 测序。利用微生物基因组分析系统(MGAP 软件)对下机数据进行质控, 使用 De Bruijn graph 算法对质控合格的测序数据进行基因组组装, 并且利用测序数据对组装长度进行延伸, 获得基因组组装报告表。

#### 1.2.8 数据分析

对组装后的序列(Fasta file)使用典型菌种基因组服务器 TYGS server(<https://tygs.dsmz.de/>)进行鉴定<sup>[9]</sup>。使用 PubMLST(<https://pubmlst.org/>), 得到菌株的 ST 分型; 使用 PHASTE (PHAge Search

Tool Enhanced Release, <https://phaster.ca/>)服务器进行噬菌体分析; 用 RAST(<https://rast.nmpdr.org/>)软件对其进行基因注释; 使用 VFDB(<http://www.mgc.ac.cn>)数据库分析毒力基因。

根据全基因组测序结果, 进行基因组学比较研究。利用网站 IPGA 和软件 MEGA11 对分离株的全基因组与 NCBI 上获得的不同年份、地区和来源的 15 株具有代表性菌株基因组(表 4)构建全基因组单核苷酸多态性(Whole genome-based single-nucleotide polymorphisms, wg-SNP)进化树<sup>[10]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 肉毒毒素基因检测结果

6 份待检样本匀液用肉毒梭菌产毒基因检测试剂盒进行 A、B、E、F 型肉毒毒素基因检测, 结果显示仅 2 例病例粪便样本 A 型肉毒毒素基因有典型 S 型扩增曲线, 病例 1 和 2 Ct 值分别为 25.4 和 26.5。说明 2 例病例粪便样本中检测到肉毒毒素基因, 型别为 A 型, 其他样本均为阴性, 即未检测到肉毒毒素基因。

### 2.2 样本增菌液肉毒毒素检测结果

6 份待检样本增菌培养后, 所有接种样品的庖肉培养基和 TPGYT 增菌液均出现浑浊、可见微生物生长。2 例病例粪便样本增菌液上清直接腹腔注射小鼠, 小鼠 1 h 后出现竖毛、四肢瘫软, 呼吸困难等肉毒中毒症状, 4 h 内小鼠全部死亡; 上述样品上清液经胰酶处理后腹腔注射小鼠, 小鼠同样出现肉毒中毒症状并于 24 h 内全部死亡。其他 4 份样本小鼠未出现肉毒毒素中毒症状。2 例病例粪便样本再经毒素确证和定型试验, 确认从该样品中检出肉毒毒素, 且型别为 A 型。

### 2.3 菌株分离和鉴定结果

2 例病例粪便样本增菌液中分离得到疑似菌落 RD1 和 RD2, 涂片、革兰染色和镜检结果显示, 分离的疑似菌落为阳性粗大杆菌、芽胞卵圆形、位于次端, 菌体呈网球拍状。经 VITEK MS 全自动微生物质谱鉴定仪检测, 结果均为生孢梭菌; 经 API 20A 生化鉴定, 结果均为肉毒梭菌。用肉毒梭菌产毒基因检测试剂盒进行 A、B、E、F 型肉毒毒素基因检测, 结果显示 A 型肉毒毒素基因检测结果为阳性, 病例 1 和 2 Ct 值分别为 27.1 和 26.8。经产毒试验确认, 分离株可产 A 型肉毒毒素。样本中菌株分离和鉴定结果见表 1。

### 2.4 肉毒梭菌全基因组测序结果与分析

菌株 RD1 的基因组大小为 3 813 060 bp, Scaffold 个数为 30, Scaffold N50 为 522 828 bp, Contig 个数为 30, Contig N50 为 522 828 bp, 鸟嘌呤和胞嘧啶之比(CG

表1 6份样本中菌株分离和鉴定结果详情表

Table 1 Details of strain isolation and identification results in 6 samples

样本	样本匀液肉毒毒素基因		可疑菌落分离		综合鉴定结果			综合鉴定结果
	毒素基因	可疑菌落分离	VITEK MS	API20A	全基因组测序	肉毒毒素基因	产毒试验	
吴某某粪便	A型CT值25.4	RD1	生孢梭菌	肉毒梭菌	肉毒梭菌	A型CT值27.1	A型	A型肉毒梭菌
匡某某粪便	A型CT值26.5	RD2	生孢梭菌	肉毒梭菌	肉毒梭菌	A型CT值26.8	A型	A型肉毒梭菌
室内环境标本	-	-	—	—	—	—	—	—
室外土壤环境标本	-	-	—	—	—	—	—	—
熏鱼样本A	-	-	—	—	—	—	—	—
熏鱼样本B	-	-	—	—	—	—	—	—

注:—表示未做鉴定;-表示未检出可疑菌落

含量)为27.98%,ST分型为16型;菌株RD2的基因组大小为3 812 165 bp,Scaffold个数为24,Scaffold N50为476 747 bp,Contig个数为27,Contig N50为476 747 bp,

CG含量为27.98%,ST分型为16型,详见表2。将全基因组测序结果上传至基因组服务器(TYGS server),结果显示菌株RD1、RD2鉴定为肉毒梭菌种。

表2 肉毒梭菌RD1和RD2基本信息和基因组结构特征

Table 2 Basic information and genomic structural characteristics of *Clostridium botulinum* RD1 and RD2

菌株编号	分离来源	分离时间	Scaffold个数	Scaffold N50/bp	Contig个数	Contig N50/bp	GC含量/%	基因组大小/bp	ST分型
RD1	病人吴某某	2023-11-23	30	522 828	30	522 828	27.98	3 813 060	16
RD2	病人匡某某	2023-11-23	24	476 747	27	476 747	27.98	3 812 165	16

使用VFDB数据库对肉毒梭菌RD1测序结果进行分析,共计识别出12个毒素编码相关基因,起止位点和基因功能详见表3。用RAST软件对其进行基因注释,结果显示肉毒毒素基因簇位于染色体上。PHASTER分析显示,染色体上有3个噬菌体序列,其中1个区域完整,2个区域不完整,均不在毒素基因附近。

表3 肉毒梭菌RD1基因组上的毒素编码相关基因

Table 3 Toxin coding related genes on the RD1 genome of

*Clostridium botulinum*

基因名称	起止位点	基因功能
<i>cup66</i>	7414-9483	依从性;非菌毛黏附素
<i>fbpA/fbp68</i>	348054-349784	依从性;非菌毛黏附素
<i>GroEL</i>	187151-188776	依从性;非菌毛黏附素
<i>cloSI</i>	339430-341004	编码半胱氨酸蛋白酶
<i>atx</i>	408195-412094	编码肉毒毒素
<i>colA</i>	203914-207180	编码胶原酶
<i>orf01152</i>	244504-245829	编码溶血素
<i>orf01831</i>	239964-240614	编码溶血素
<i>orf02430</i>	374146-374982	编码溶血素
<i>orf01965</i>	373987-374625	编码溶血素

本研究用从NCBI中选择不同国家不同来源的、完全测序的15株肉毒梭菌基因组(表4)构建了wg-SNPs系统进化树,见图1。结果显示,16株菌可分为2个主进化分支,RD1和RD2与肉毒梭菌BrDura亲缘关系最近。

### 3 讨论

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》和WS/T 83—1996《肉毒梭菌食物中毒诊断标准及处理原则》,肉毒中毒的实验室诊断主要依据检出肉毒毒

表4 15株来自NCBI的肉毒梭菌菌株信息

Table 4 Information on 15 *Clostridium botulinum* strains from

## NCBI

菌株编号	分离国家	分离年份	来源	accession号
ST7B	芬兰	2022	病例(婴儿)	GCA_022833145
FE9504ACG	加拿大	1995	食品	GCA_024584665
Hall	美国	1947	病例	GCA_000017045
ATCC 3502	英国	2007	病例	GCA_000063585
Su1036	美国	2019	环境	GCA_007833415
V73	芬兰	2010	病例(婴儿)	GCA_029962365
CFSAN034202	美国	2018	食品	GCA_003345315
BrDura	阿根廷	2018	食品	GCA_002866045
A634	阿根廷	2018	食品	GCA_002865825
CJ0611A1	加拿大	2006	食品	GCA_014068615
Osaka2020	日本	2020	病例	GCA_027943665
X58540	德国	2005	病例	GCA_016798345
NCTC 8266	比利时	1944	食品	GCA_000827935
food_20	中国	2015	食品	GCA_003014955
ZJK-3	中国	2019	食品	GCA_026224615

素和分离肉毒梭菌,但耗时较长且实验过程烦琐,往往会耽误病情的治疗。本次疑似肉毒毒素中毒事件中,实验室收到样本后立即开展肉毒毒素基因检测,并在3 h内及时将结果反馈给医院,根据临床症状、流行病学调查和实验室检测结果,初步判定此次中毒事件为A型肉毒梭菌引起的肉毒中毒,临床医生立即给予相应的肉毒抗毒素治疗,病情明显好转。根据WS/T 83—1996《肉毒梭菌食物中毒诊断标准及处理原则》中实验室诊断需从中毒食品(或患者粪便、血液)检出肉毒毒素,并确定其型别,实验室继续开展肉毒毒素检出、确证和定型试验以及肉毒梭菌的分离、培养和鉴定,最终在两例病例粪便标本中检出A型肉毒毒素并成功分离出肉毒梭菌。但因疑似引起肉毒中毒的熏鱼已被全部食用无剩余,故在食物中未检出。

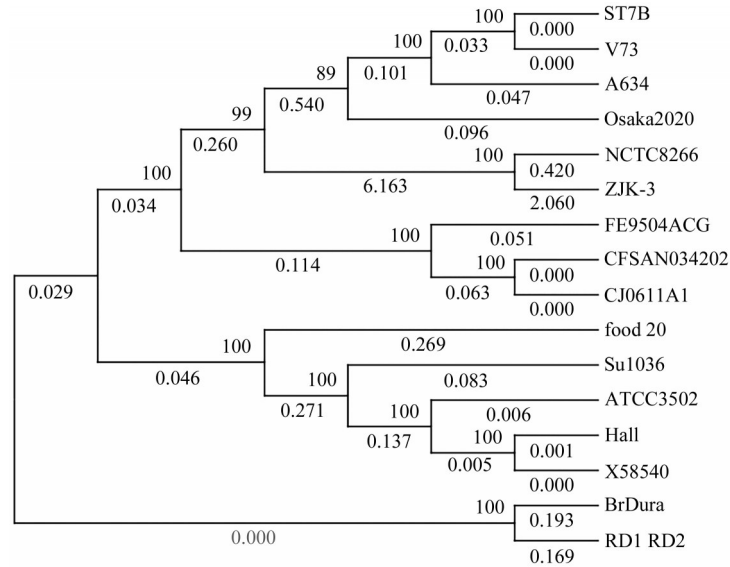


图1 17株肉毒梭菌 wg-SNPs 系统进化树

Figure 1 Wg-SNPs phylogenetic tree of 17 *Clostridium botulinum* isolated strains

在肉毒梭菌的分离、培养和鉴定过程中,生孢梭菌、丁酸梭菌等与肉毒梭菌在生化特征和遗传学特性方面非常相似<sup>[11]</sup>,常见的细菌学鉴定方法如革兰氏染色法、VITEK MS、16S rRNA 测序等很难将二者进行区分<sup>[12]</sup>,因此需要结合生化实验、肉毒毒素基因检测、产毒试验、API20A 和全基因组测序等多种鉴定方法进行综合判断。本研究中,VITEK MS 鉴定结果为生孢梭菌,API20A 和全基因组测序鉴定结果为肉毒梭菌,且肉毒毒素基因检测、产毒试验结果均为 A 型肉毒梭菌,结合革兰染色镜检结果,综合判断,此次从病例粪便标本中分离出来的菌株为肉毒梭菌。

近年来,WGS 在病原细菌的遗传进化、种群迁移和流行分析中被广泛应用<sup>[13-14]</sup>。随着基因组测序成本的降低和生物信息分析技术的进步,细菌 WGS 正在逐步应用到处于疾病预防控制领域前沿阵地的暴发调查、预警和流行病学分析中<sup>[14]</sup>。本次研究通过第三代测序技术成功获得了分离菌种 RD1 和 RD2 的完整基因组序列,并使用网络生信鉴定工具对前期鉴定结果进行了确认。目前,基于 WGS 的病原细菌分子分型方法中被使用比较多的技术是基于 wg SNP, wg SNP 是在全基因组的水平基于序列多态性进行分型,比传统分子分型方法(PFGE、MLST、MLVA 等)具有更高的分辨力<sup>[15]</sup>。本研究 wg SNP 结果显示,RD1 和 RD2 与肉毒梭菌 BrDura 亲缘关系最近,BrDura 是一株从与阿根廷食源性肉毒杆菌中毒病例相关的受污染食品中分离出来的<sup>[16]</sup>。

疑似导致本次食物肉毒中毒的熏鱼样本已被全部食用,但患者自述食用熏鱼数小时后出现肉毒中毒症状,与我国常见的引起肉毒中毒的发酵豆制品、面制品多为家庭自制有所不同<sup>[7]</sup>,因此,除家庭自制品之外,市售塑封熏制水产品等食品也有可能引发肉毒中毒,应予以高度重视,建议有关部门加强对这类食品的针对性监管。同时,提倡在新闻媒体如广播、微信公众号等进行食品安全知识宣传教育,提高群众对肉毒中毒的认识。

品、面制品多为家庭自制有所不同<sup>[7]</sup>,因此,除家庭自制品之外,市售塑封熏制水产品等食品也有可能引发肉毒中毒,应予以高度重视,建议有关部门加强对这类食品的针对性监管。同时,提倡在新闻媒体如广播、微信公众号等进行食品安全知识宣传教育,提高群众对肉毒中毒的认识。

## 参考文献

- [1] XIN W W, HUANG Y, et al. Identification and characterization of *Clostridium botulinum* strains associated with an infant botulism case in China[J]. *Anaerobe*, 2019, 55: 1-7.
- [2] PECK M W. Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum* [J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2009, 55: 183-265.
- [3] 杨英超, 张华捷, 马霄. 肉毒梭菌及其毒素分型方法概述 [J]. *疾病监测*, 2022, 37(1): 23-31.  
YANG Y C, ZHANG H J, MA X. Review on *Clostridium botulinum* and its toxin typing methods [J]. *Disease Surveillance*, 2022, 37(1): 23-31.
- [4] SKADI K, MELANIE S K, et al. Isolation and Functional Characterization of the Novel *Clostridium botulinum* Neurotoxin A8 Subtype [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116381.
- [5] 孟卫卫, 李方, 袁永, 等. 一起由食用家庭自制辣椒酱引起肉毒中毒的实验室诊断 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2023, 35(5): 763-767.  
MENG W W, LI F, YUAN Y, et al. Laboratory diagnosis of food poisoning due to *Clostridium botulinum* contamination of home-made food [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2023, 35(5): 763-767.
- [6] 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 case of botulism via food [J]. *Journal of Practical Shock*, 2021, 5(1): 59-60.
- [7] 林羽佳, 李方, 孟卫卫, 等. 脉冲场凝胶电泳分子分型技术在一起肉毒中毒诊断中的应用 [J]. *疾病预防控制通报*,

- 2022, 37(1):89-91.
- LIN Y J, LI F, MENG W W, et al. Application of pulsed field gel electrophoresis molecular typing technique in the diagnosis of a botulism event[J]. *Bulletin of Disease control and Prevention (China)*, 2022, 37(1):89-91.
- [ 8 ] 骆海朋, 瞿洪仁, 丁波, 等. 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[J]. *中国食品卫生杂志*, 2023, 35(10): 1475-1481.
- LUO H P, QU H R, DING B, et al. Isolation and typing of *Clostridium botulinum* from milk powder of an enterprise related of an infant botulism [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2023, 35(10): 1475-1481.
- [ 9 ] MEIER-KOLTHOFF J P, GÓKER M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. [J]. *Nature Communication*, 2019, 10: 2182.
- [10] LIU D M, ZHANG Y F, et al. IPGA: A handy integrated prokaryotes genome and pan-genome analysis web service [J]. *iMeta*, 2022: e55.
- [11] 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.
- DONG Y P, HAN C H, JIANG T, et al. To study the toxic effect of the culture supernatant produced by *Clostridium sporogenes* in ICR mice [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2014, 26(5):414-417.
- [12] 董银苹, 徐进, 王伟, 等. 浓缩乳清蛋白粉及其制品中梭状芽胞杆菌的分离及鉴定[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(5): 494-498.
- DONG Y P, XU J, WANG W, et al. Isolation and identification of *Clostridium* from whey protein concentrate and its products [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2015, 27(5): 494-498.
- [13] DIDELOT X, PANG B, ZHOU Z M, et al. The role of China in the global spread of the current cholera pandemic [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(3): e1005072.
- [14] HOLT K E, WERTHEIM H, ZADOKS R N, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(27): E3574-3581.
- [15] 周海健, 阚颀. 细菌基因组分型方法的应用研究进展[J]. *疾病监测*, 2016, 31(8): 668-675.
- ZHOU H J, KAN B. Progress in application research of bacterium genome-based subtyping [J]. *Disease Surveillance*, 2016, 31(8): 668-675.
- [16] THERESA J S, GARY X, CHARLES H D W, et al. Genomic Characterization of Newly Completed Genomes of *Botulinum Neurotoxin*-Producing Species from Argentina, Australia, and Africa [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2020, 12(3): 229-242.