

蜡样芽孢杆菌检测方法研究进展

黄晶菁^{1,2}, 罗 静¹, 何宏轩^{1*}

(1. 中国科学院动物研究所, 动物生态与保护生物学重点实验室, 北京 100101;

2. 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100101)

摘要: 蜡样芽孢杆菌是一种可引起食物中毒的常见食源性细菌, 属于革兰氏阳性的条件致病菌, 广泛存在于土壤、空气、水及植物源、动物源加工的食品中。近年发现也能感染包括人在内的多种动物, 是一种人兽共患性细菌, 特别是能够引起人畜肠道疾病, 导致腹泻型或呕吐型食物中毒。快速准确检测蜡样芽孢杆菌是控制其污染和感染后治疗的关键环节。作者对蜡样芽孢杆菌的检测方法进行了全面详细的总结, 主要包括传统检测方法、普通 PCR、多重 PCR(mPCR)、实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)、叠氮溴化丙锭—定量 PCR(PMA-qPCR)、微滴数字 PCR 技术(ddPCR)、环介导等温扩增(LAMP)及酶联免疫吸附测定(ELISA)。从传统方法到新兴技术, 涉及传统检测技术、分子生物学检测和免疫学检测技术, 作者主要总结了各方法的原理、检测范围, 并对各方法的优缺点进行了比较。这些检测方法的灵敏度、精确度、样本要求等有所不同, 可根据检测需要和条件限制进行选择。将分子生物学方法和免疫学等方法有效地结合起来, 多角度多层次地对样品进行检测, 可全面而准确地呈现检测结果。蜡样芽孢杆菌能产生多种毒素, 这些毒素决定了其致病性, 所以除了检测菌体外, 还可以对毒素进行检测, 有助于确定病原及其致病力。总的来说, 蜡样芽孢杆菌对人畜的健康安全均构成了威胁, 快速准确地检测能有效辅助治疗和提前预防, 作者将主要检测方法进行了总结, 希望能有助于全面准确地评估蜡样芽孢杆菌的风险, 为主动监测和预警提供科学依据。

关键词: 蜡样芽孢杆菌; 检测; 食物中毒

中图分类号: S852.61+6

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2018)03-0635-08

Research Progress on Detection Methods for *Bacillus cereus*

HUANG Jingjing^{1,2}, LUO Jing¹, HE Hongxuan^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Ecology and Conservation Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2. College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: *Bacillus cereus* is a common bacterium causing food poisoning, gram-positive opportunistic pathogen, and widely distributing in soil, water and all kinds of food. In recent years, *Bacillus cereus* also has been found in a variety of animals including people as a zoonotic bacterium. It gives rise to gastrointestinal disease, which leading to diarrhoeal or emetic type of food poisoning. Thus, a rapid and accurate detection is critical for controlling the pollution or the treatment. This study conducted a comprehensive and detailed summary for the detection methods of *Bacillus cereus*, including conventional detection, conventional PCR, multiplex PCR, Real-time PCR, propidium monoazide-quantitative PCR, droplet digital PCR, ring-mediated isothermal amplification technology and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). From the traditional method to the emerging technology, involving the traditional detection technology, molecular biology detection and immunological detection technology, the authors described the principle, range and the advan-

收稿日期: 2017-08-09

基金项目: 国家林业局野生动物疫源疫病监测项目; 中国科学院战略生物资源科技支撑体系运行专项野生动物疫源疫病样品组织库(CZBZX-1)

作者简介: 黄晶菁(1996-), 女, 河北石家庄人, 硕士生, 研究方向: 野生动物疫病, E-mail: jingjinghuang2016@163.com

* 通信作者: 何宏轩(1968-), 男, 河南南阳人, 研究员, 研究方向: 野生动物疫病, E-mail: hehx@ioz.ac.cn

tages and disadvantages of each method. Because of the difference in sensitivity, accuracy, sample requirements and so on, the detection methods could be selected according to the requirement and conditions. In the combination of molecular biology methods and immunological methods, the samples are detected from multiple angles and multilevels, and the results can be presented in a comprehensive and convincing manner. Moreover, *Bacillus cereus* can produce a variety of toxins which determine its pathogenicity. Thus, the detection of toxin contributes to determining the pathogen and its pathogenicity. Overall, as a threat to the health of mammals and humans, rapid and accurate detection of *Bacillus cereus* can effectively assist treatment and advance prevention. The detection methods were summarized here to contribute a comprehensive and accurate assessment of the risk of *Bacillus cereus*, and it was respected to provide a scientific evidence to active monitoring and early warning.

Key words: *Bacillus cereus*; detection; food poisoning

广义的蜡样芽孢杆菌指的是蜡样芽孢杆菌群, 主要包括: 苏云金芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、韦氏芽孢杆菌、假真菌芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌^[1-4]。它们的形态特征、生理生化特征非常相似, 而且有着极高的 DNA 同源性。狭义的蜡样芽孢杆菌是一种革兰氏阳性菌, 能形成芽孢的条件致病菌, 广泛存在于土壤、空气、水及植物源、动物源加工的食品中^[5], 误食后可引起人畜肠道疾病, 出现腹泻型或呕吐型食物中毒。奶牛乳房炎和子宫内膜炎^[6]、仔猪的流行性腹泻^[7]、刺参的腐皮综合征^[8]、犬猫腹泻等都与蜡样芽孢杆菌的感染相关。人感染蜡样芽孢杆菌可能会引发全眼球炎^[9]、心内膜炎、脑膜炎、肺炎、骨髓炎和败血症^[10-11]等疾病, 新生儿上呼吸道感染和脐带炎也与蜡样芽孢杆菌相关。快速、准确地检测蜡样芽孢杆菌是控制其污染和感染后治疗的关键环节, 目前国内外对于蜡样芽孢杆菌的检测主要是通过传统的检测方法、分子学检测方法、免疫学检测方法进行直接检测或通过毒力基因和毒素进行间接检测。近几年对于蜡样芽孢杆菌的检测有了更深的研究, 作者总结了国内外对于蜡样芽孢杆菌的检测方法, 并就它们的优缺点进行了阐述。

1 传统的检测方法

国标法(GB/T 4789.14—2014)是目前中国规定的食品中蜡样芽孢杆菌的标准检测方法, 根据蜡样芽孢杆菌的生长特点和生化特性进行鉴定。主要分为以下几步: 增菌、分离培养、镜检、生化鉴定、生化分型。

生化鉴定即通过生化特性进行鉴定。蜡样芽孢杆菌具有不发酵甘露醇、木糖及阿拉伯糖, 可以液化明胶, 还原硝酸盐、分解酪氨酸、在厌氧环境利用葡萄糖, 含有过氧化氢酶, V-P 反应呈阳性, 发生卵黄

反应等特征。这些特征可以作为生化鉴定的指标。传统的生化鉴定检测程序复杂繁琐、耗时费力。

除传统生化鉴定外, 还可以通过自动细菌鉴定仪鉴定菌种。自动细菌鉴定仪可以同时多种生化反应, 从而鉴定多种纯培养的细菌。目前常用的有两种全自动细菌鉴定仪: PhoenixTM-100 和 VITEK2。PhoenixTM-100 可以对 100 个样本同时进行鉴定和药敏测试, 可进行 51 项生化反应, 而 VITEK2 可进行 30 多项生化反应, 都多于普通生化反应项目, 且可信度较高。但 VITEK2 有 14 种检测卡, 而 PhoenixTM-100 仅有两种即革兰氏阴性检测卡和革兰氏阳性检测卡, 仅需区别革兰氏染色即可选板, 更为简单方便。刘水等^[12]研究了 VITEK2 全自动微生物鉴定系统对蜡样芽孢杆菌检测的可靠性, 分析了 16 株蜡样芽孢杆菌, 结果显示可信度为 97%, 阳性标准菌株可信度为 100%。全自动微生物鉴定仪用于鉴定蜡样芽孢杆菌可信度较高, 简便、准确, 适合大批量的检测, 节省人力, 但仪器和试剂的使用成本比较高, 要求一定比浊度的纯菌液, 存在不能鉴定的细菌, 一些菌不能均匀悬浮于 0.45%~0.5% 的盐水中及菌龄过老等问题。

2 分子生物学技术检测方法

分子生物学技术检测蜡样芽孢杆菌的方法较多, 作者针对普通 PCR、普通多重 PCR、实时荧光定量 PCR、叠氮溴化丙锭一定量 PCR、微滴数字 PCR 技术、环介导等温扩增技术进行总结和评价。

2.1 普通 PCR 检测

可通过通用基因、管家基因、毒力基因对蜡样芽孢杆菌进行核酸检测。目前利用 PCR 检测蜡样芽孢杆菌特异性靶基因的研究相对较多, 主要有 16S rRNA、gyrB、groEL、rpoB、cereolysin AB、cytK

和 *hblA* 等。

16S rRNA 在细菌中普遍存在且具有种间多态区,所以通常使用 16S rRNA 分析其序列可确定各种细菌的进化距离和相互关系^[13],从而鉴定细菌。16S rRNA 基因在基因序列分析中应用最多,是一种常规的检测手段^[14]。但蜡样芽孢杆菌群中的 16S rRNA 具有高度同源性,一般只有几个碱基有差异,不能很好区分蜡样芽孢杆菌群。通常需要结合其他方法进一步鉴定。

可通过蜡样芽孢杆菌的管家基因,如 *rpoB*、*gyrB* 和 *tuf* 基因鉴定蜡样芽孢杆菌。*gyrB* 基因编码 DNA 旋转酶的 β 亚基,具有高度的特异性。*rpoB* 基因编码 RNA 聚合酶的 β 亚基,*rpoB* 基因序列虽绝大部分相同,但在各种之间存在一定的差别,可以利用这些不同位点将群内的各种细菌区分开。Carroll 等^[15] 使用 *rpoB* 基因为目标基因设计引物,快速分类蜡样芽孢杆菌群。Tang 等^[16] 使用 16S rRNA、*rpoB* 和 *tuf* 基因鉴定包括蜡样芽孢杆菌在内的多种皮肤共生菌。Caamano-Antelo 等^[14] 分析了 *rpoB*、*gyrB*、*tuf* 管家基因鉴别芽孢杆菌的效果,认为 *tuf* 基因是鉴别芽孢杆菌很好的靶标,特别是从相近物种中鉴别枯草芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌。与其他单重 PCR 相比,使用管家基因检测特异

性强、操作简单,能够成功实现与其他芽孢杆菌的区分和鉴定。

对于致病性蜡样芽孢杆菌,也可以通过检测蜡样芽孢杆菌的毒力基因进行检测。如对腹泻型蜡样芽孢杆菌的溶血性毒素 *hbl* 基因、非溶血性毒素 *nhe* 基因、细胞毒素 K 的基因 *cytK*、肠毒素 T 的基因 *bceT* 和肠毒素 FM 的基因 *entFM*^[17] 及呕吐型蜡样芽孢杆菌的 *ces* 基因^[18] 等进行检测。Reis 等^[19] 对分离得到的蜡样芽孢杆菌 *hbl* 基因和 HBL 毒素进行了检测评估。蜡样芽孢杆菌的多种毒力基因受多效性调控子(PlcR 区)的调控^[20],且 PlcR 区和启动子序列距离很近。因此,Oltuszkwalczak 等^[21] 针对 PlcR 区和 *cytK* 设计了两个正向引物和一个反向引物用于检测蜡样芽孢杆菌,同时证明了其含有生成细胞毒素 K 的潜力。但是使用毒力基因为目的基因的单重 PCR 检测方法存在很多问题,如苏云金芽孢杆菌也产生 HBL 毒素、NHE 毒素^[22] 等,因此,鉴定时并不能准确区分种属。而且有的菌株中可能不含有某种毒素,检测不到该基因,存在漏检的现象。

作者将检测蜡样芽孢杆菌的引物汇总并进行了比较,见表 1。总体来说,单重 PCR 技术操作较为简单,耗时短,但是检测结果的准确性较低,存在漏检和误检,因此,需要多角度进行检测验证。

表 1 检测蜡样芽孢杆菌的引物及比较

Table 1 Common primers for detection of *Bacillus cereus* and comparison

基因类型 Types of gene	目的基因 Target genes	鉴定范围 Scope	参考文献 ^[19,21,23-25] References ^[19,21,23-25]
核糖体 RNA rRNA	16S rRNA、23S rDNA	蜡样芽孢杆菌群	Nasrabadi et al. (2017)
管家基因 Housekeeping genes	<i>gyrB</i> 、 <i>tuf</i> 、 <i>rpoB</i>	蜡样芽孢杆菌	Lee et al. (2014)
毒力基因 Virulence genes	<i>hblA</i> 、 <i>hblC</i> 、 <i>hblD</i> 、 <i>nheA</i> 、 <i>nheB</i> 、 <i>nheC</i> 、 <i>bceT</i> 、 <i>entFM</i> 、 <i>cytK</i> 、 <i>ces</i>	毒力基因	Reis et al. (2013); Oltuszk-Walczak et al. (2013); Lee et al. (2014); Arslan et al. (2014)

2.2 普通多重 PCR 检测

多重 PCR 是在同一个反应体系中加入多对引物,同时扩增出相对应的多个核酸片段的一种聚合酶链式反应,其反应原理和操作过程与单重 PCR 基本一致。

蜡样芽孢杆菌群中的 DNA 同源性很高,使用某一种引物不能准确判断。多重 PCR 可以同时检测同源性较高的蜡样芽孢杆菌群中的菌种。Kumar 等^[26] 通过目标基因 *hblA*、*nheA*、*cytK*、*cryIA* 和

pag 设计引物,可以同时检测鉴定蜡样芽孢杆菌群中蜡状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌。并且设计了扩增内标(internal amplification control, IAC), IAC 的引物 5' 由 *nheA* 为目的基因构建,3' 由 pUC18 质粒为目的基因构建,避免假阴性发生,同时增强了 mPCR 系统的灵敏度。

通过多重 PCR 不仅可以鉴别蜡样芽孢杆菌群,还可以同时检测多种常见的细菌。Kim 等^[27] 通过目标基因 *actA*、*fliC*、*hbl*、*invA*、*ileS* 同时检测低脂

乳品中的单核细胞增多性李斯特菌、大肠杆菌 O157:H7、蜡状芽孢杆菌、沙门氏菌属和金黄色葡萄球菌。此方法可以同时检测多种细菌,比普通 PCR 更快速。

与普通 PCR 相比,mPCR 更加快速、准确和灵敏,可同时检测多种细菌,对于病原菌的检测更为实用且便捷。但多重 PCR 引物设计较为复杂,容易出现非特异性的扩增,需要多重验证。

2.3 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测

实时荧光定量 PCR 技术是 20 世纪 90 年代发展起来的一种准确、快速的核酸定量分析技术。根据所使用的荧光化学制剂分为荧光探针法和荧光染料法,主要有 TaqManTM 探针法和 SYBR Green I 染料法。Cremonesi 等^[28] 使用 TaqManTM 探针法针对蜡样芽孢杆菌的 *ces* 基因及其他细菌的基因设计探针,实现同时对 23 种常见食物中毒的细菌进行鉴定。定量的线性范围是 $10^4 \sim 10^8$ CFU/g。Forghani 等^[29] 使用 SYBR Green I 染料法和高分辨率溶解曲线分析法针对 *gyrB*、*hly*、*nuc* 基因同时检测食物中的蜡状芽孢杆菌、单核细胞增多性李斯特氏菌和金黄色葡萄球菌,不进行扩菌处理的检出限为 3.7×10^3 CFU/g。

近些年,将叠氮溴化丙锭染料(PMA)和实时荧光定量 PCR 技术结合,能有效区分死菌和活菌。PMA 可以穿过受损的细胞膜,在可见光作用下其分解产物与 DNA 发生交联,从而抑制 DNA 的 PCR 扩增。Cattani 等^[30] 使用 PMA-qPCR 检测定量蜡样芽孢杆菌的活细胞,检出限为 7.5×10^2 CFU/mL。

SYBR Green I 染料能与所有 DNA 双链结合,无法较好地区分 PCR 产物和非特异性条带,因此无法进行精确的定量,相比较而言,TaqManTM 探针法特异性好,能精确定量。与常规 PCR 相比,实时荧光定量 PCR 特异性更强、灵敏度更高,既可以定性也可以定量且特异性好、假阳性低、灵敏度高、通过

荧光信号的检测可以直接对产物进行定量,不需要开盖,不易污染,扩增和检测一步完成,而且检测周期短,能更有效解决 PCR 污染问题。使用 PMA-qPCR 对活细胞进行定量检测,能消除假阳性结果。

2.4 微滴数字 PCR 技术(ddPCR)检测

ddPCR 技术是将样本通过微滴发生器进行微滴化处理,制成微滴后进行 PCR 反应,PCR 反应结束后,使用微滴检测器对每个微滴逐个检测,最终经分析软件计算出 DNA 分子的浓度。Porcellato 等^[31] 首次使用 ddPCR 检测牛奶中的蜡样芽孢杆菌。实时荧光定量 PCR 和 ddPCR 比较,ddPCR 有更低的检出限,检测期间不需要标准曲线,能够减小误差,对于目标细菌少的样品来说有很大的优势,即使在低浓度样本检测中也有更高的灵敏度和稳定性。但其成本和花费时间比标准实时荧光定量 PCR 高一倍,定量的范围小,不适合高丰富度的检测。

2.5 环介导等温扩增技术(LAMP)检测

LAMP 是一种恒温核酸扩增技术,不需要进行变性、退火、延伸的循环,针对 6 个区域设计 4 个引物^[32],以一种链置换 DNA 聚合酶在恒温条件下完成扩增,耗时短,灵敏度比普通 PCR 高很多,不需要特殊仪器,适合现场、战时野外进行病原微生物的快速检测。周巍等^[33] 以 *hblA* 基因为目的基因设计引物,建立的 LAMP 检测方法能特异性地扩增蜡样芽孢杆菌。LAMP 方法灵敏度高、反应时间短、操作简单,但是容易形成气溶胶污染,假阳性问题严重。

总体而言,分子生物学检测技术与传统方法相比,特异性强且快速,但是不同的检测方法又有不同的优势和缺陷。现场、战时野外进行病原微生物的快速检测可选择 LAMP 方法检测,但是其假阳性问题严重,在有条件的情况下一般不适用。在样品量少的情况下可以选择 ddPCR 技术,但其时间和成本是 qPCR 的两倍。以上分子生物学检测蜡样芽孢杆菌方法的优缺点汇总于表 2。

表 2 分子生物学检测方法的优缺点

Table 2 Advantages and disadvantages of molecular biology detection methods

检测方法 Methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
普通 PCR Standard PCR	简单,耗时短	检测结果的准确性较低
多重 PCR Multiplex PCR	灵敏度高,可同时鉴定多种细菌	容易出现非特异性的扩增
实时荧光定量 PCR Real-time PCR	特异性好、假阳性低、灵敏度高、不易污染	成本高、无法检测扩增子大小
微滴式 PCR 技术 ddPCR	适合低浓度样本检测,比实时荧光定量 PCR 检出限低	成本和时间是实时荧光定量 PCR 的两倍
环介导等温扩增技术 LAMP	时间短,成本低	假阳性问题严重

3 免疫学方法检测

3.1 酶联免疫吸附测定试验(ELISA)检测

ELISA 测定基于抗原抗体之间的反应,将待测物与酶连接,然后通过酶与底物之间的颜色反应,用于定量测定大分子质量的蛋白、多糖和细菌的方法。可以通过 ELISA 直接检测蜡样芽孢杆菌细胞,也可检测毒素。Zhu 等^[34]通过制备的兔的多克隆抗体和鼠的单克隆抗体,可以识别某些蜡样芽孢杆菌表面的成分,从而开发了使用双抗体夹心法快速检测食品中的蜡样芽孢杆菌。该方法的线性检测范围约为 $1 \times 10^4 \sim 2.8 \times 10^6$ 个细胞/mL,检测限为 0.9×10^3 个细胞/mL。使用双抗体夹心 ELISA 可实现对蜡样芽孢杆菌细胞的直接和特异性检测。已经有商业的 ELISA 试剂盒用于检测毒素,如用 BDE VIA™ 试剂盒^[35]可检测蜡样芽孢杆菌的 Nhe-A。

ELISA 检测具有特异性,精确度及灵敏度较高且成本低,不需要昂贵设备。

3.2 商业化毒素检测试剂盒检测

现在市面存在很多检验蜡样芽孢杆菌的肠毒素的试剂盒,包括通过反向被动乳胶凝集检测 HBL-L2 组分的 BCET-RPLA 试剂盒^[19,35-36]、胶体金检测 Nhe-B 和 Hbl-L2 的 Duopath® 试剂盒^[1,2,35-36]及上

文提到的 ELISA 检测 Nhe-A 的 BDE VIA™ 试剂盒^[35]等。通过试剂盒可以快速检测蜡样芽孢杆菌的毒素。但这些试剂盒也不是可以检测所有蜡样芽孢杆菌的肠毒素,如蜡样芽孢杆菌 NVH 391/98 株的 Nhe-B 的组分就不能被 Duopath® 试剂盒检测到^[37]。值得注意的是,不同细菌可产生同种毒素,如蜡样芽孢杆菌群中的苏云金芽孢杆菌等、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌。因此,检测到某种肠毒素,不能确定为某种菌产生时需要进一步的鉴定。而且由于检测的是毒素的某一组分,因此也不能判断其是否具有生物学活性。

免疫检测可针对营养细胞、芽孢和毒素的蛋白进行检测,包括鞭毛抗原、细胞表面抗原、芽孢外壁的碳水化合物及 Nhe-A、Nhe-B、HBL-L2 等蛋白。作者将上述几种蜡样芽孢杆菌的免疫学检测方法(ELISA 测定^[34-35]、反向被动乳胶凝集^[35-36]及胶体金检测^[35-36])进行汇总,见表 3。值得注意的是,现在还没有直接检测蜡样芽孢杆菌细胞的商业化试剂盒,在蛋白水平直接检测菌体需要制备抗体,操作较为复杂且耗时长。而使用针对毒素的商业化试剂盒也存在漏检、误检等情况,因此蛋白水平菌体的检测亟需进一步得到发展。如同时进行菌体和毒素的检测,可以更全面对蜡样芽孢杆菌进行风险评估分析。

表 3 免疫学检测方法的比较

Table 3 Comparison of immunological methods

方法 Methods	酶联免疫吸附测定试验 ELISA	反向被动乳胶凝集 RPLA	胶体金方法 Colloidal gold method
试剂盒或技术 Kit or technology	双抗体夹心 ELISA, BDE VIA™ 试剂盒	BCET-RPLA 试剂盒	Duopath® 试剂盒
检测的靶标 Target	蜡样芽孢杆菌细胞, 毒素 Nhe-A	毒素 Hbl-L2	毒素 Hbl-L2, Nhe-B
检出限 Detection limit	0.9×10^3 个细胞/mL, 1 ng/mL	2 ng/mL	20 ng/mL, 6 ng/mL
检测时间 Test time	不确定, 5 h	20 h	0.5 h

4 小结

蜡样芽孢杆菌引起的中毒与其他一些细菌毒素导致的中毒症状很相似,如金黄色葡萄球菌肠毒素^[38],两者都导致急性的恶心与呕吐症状,因此,蜡样芽孢杆菌所导致的食物中毒事件常常被低估。虽

然腹泻型毒素并不会引起死亡,但呕吐型毒素会导致肝细胞中线粒体肿大、肝功能衰竭^[39],进而致死。不同菌株的致病性有很大的差异,有些菌株是益生菌,可添加到动物的饲料中。在中国,对蜡样芽孢杆菌作为益生菌使用的安全性虽然有一定的评估和监管程序,但这些规定中有很多已经过时,没有考虑到

最新的毒力因子^[40]。因此,蜡样芽孢杆菌应该作为常规的一项检测项目并引起重视,作为益生菌使用前也应进行全面的检查,以确定菌株的安全性。

近几年有关蜡样芽孢杆菌的检测方法层出不穷,作者仅总结了一些应用性比较强的技术,涉及传统检测方法、分子学检测方法、免疫学检测方法。各个检测方法有不同的优势,可根据检测需要和条件限制进行选择,充分发挥各自优势。如仅需要对病原菌进行常规检测,可直接使用多重 PCR 或普通单重 PCR 检测;需要定量时可采用实时荧光定量 PCR,能直接对产物进行定量;在样品量少的情况下可以选择 ddPCR 技术,对于低浓度样本也有较高的灵敏度和稳定性;在检测条件较差的情况下,可采用 LAMP 检测方法,不需要特殊的仪器和设备。值得注意的是,对于致病菌的检测不应只停留在对菌体的检测上,还需要对其产生的毒素进行检测,可将分子生物学方法和免疫学等方法有效地结合起来,多角度多层次地对样品进行检测,从而全面有力地呈现检测结果。

目前蜡状芽孢杆菌仍是细菌性的食源性疾病的重要病原,且食品中蜡样芽孢杆菌的含量比较低,很多检测方法在检测前要经过增菌培养过程,会延长检测周期。因此,迫切需要有快速、准确的检测方法进行诊断,从而防止食物污染和食源性疫情。

参考文献 (References):

- [1] MILLER R A, BENO S M, KENT D J, et al. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(11):4744-4753.
- [2] DIDIER A, JESSBERGER N, KREY V, et al. The mutation Glu151Asp in the B-component of the *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) leads to a diverging reactivity in antibody-based detection systems[J]. *Toxins*, 2015, 7(11):4655-4667.
- [3] CIESLIK P, KNAP J, KOLODZIEJ M, et al. Real-time PCR identification of unique *Bacillus anthracis* sequences[J]. *Folia Biologica (Praha)*, 2015, 61(5): 178-183.
- [4] LIU Y, LAI Q, GOKER M, et al. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:14082.
- [5] CEUPPENS S, BOON N, Uyttendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 84(3):433-450.
- [6] 李 尧, 郑之琬, 何 娟, 等. 重庆荣昌某奶牛场子宫内膜炎蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *中国兽医杂志*, 2012, 48(6):52-54.
LI J, ZHENG Z W, LI J, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Bacillus cereus* from endometritis in a dairy farm in Rongchang [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2012, 48(6):52-54. (in Chinese)
- [7] 赵振宇, 戴荣四, 刘东友, 等. 一株猪源致病性蜡样芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2014, 3:311-315.
ZHAO Z Y, DAI R S, LIU D Y, et al. Isolation and characterization of a pathogenic *Bacillus cereus* from a piglet with diarrhea[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2014, 3: 311-315. (in Chinese)
- [8] 骆艺文, 郝志凯, 王印庚, 等. 一株引起刺参“腐皮综合征”的蜡样芽孢杆菌[J]. *水产科技情报*, 2009, 2: 60-63.
LUO Y W, HAO Z K, WANG Y G, et al. A strain of *Bacillus cereus* that causes apostichopus japonicus "rot skin syndrome" [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2009, 2:60-63. (in Chinese)
- [9] HONG M, WANG Q, TANG Z, et al. Association of genotyping of *Bacillus cereus* with clinical features of post-traumatic endophthalmitis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e147878.
- [10] ABFALTER C M, SCHONAUER E, PONNURAJ K, et al. Cloning, purification and characterization of the collagenase ColA expressed by *Bacillus cereus* ATCC 14579[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9):e162433.
- [11] YEO I C, LEE N K, CHA C J, et al. Interspecies interaction of signal peptide PapR secreted by *Bacillus cereus* and its effect on production of antimicrobial peptide[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(3):700-710.
- [12] 刘 水, 杜志刚. VITEK-2 全自动微生物鉴定系统在蜡样芽孢杆菌检测中应用[J]. *中国误诊学杂志*, 2010, 24:5854-5855.
LIU S, DU Z G. Application of VITEK-2 automatic microbiological identification system in detection of *Bacillus cereus* [J]. *Chinese Journal of Misdiagnosics*, 2010, 24:5854-5855. (in Chinese)
- [13] LI G N, XIA X J, ZHAO H H, et al. Identification and characterization of *Bacillus cereus* SW7-1 in *Bombyx*

- mori* (Lepidoptera: Bombycidae)[J]. *Journal of Insect Science*, 2015, 15(1):136.
- [14] CAAMANO-ANTELO S, FERNANDEZ-NO I C, BOHME K, et al. Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes[J]. *Food Microbiology*, 2015, 46: 288-298.
- [15] CARROLL L M, KOVAC J, MILLER R A, et al. Rapid, high-throughput identification of anthrax-causing and emetic *Bacillus cereus* group genome assemblies using BTyper, a computational tool for virulence-based classification of *Bacillus cereus* group isolates using nucleotide sequencing data [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(9): e01096-17.
- [16] TANG V H, CHANG B J, SRINIVASAN A, et al. Skin-associated *Bacillus*, staphylococcal and micrococcal species from the house dust mite, dermatophagoides pteronyssinus and bacteriolytic enzymes [J]. *Experimental and Applied Acarology*, 2013, 61(4): 431-447.
- [17] WALKER-YORK-MOORE L, MOORE S C, FOX E M. Characterization of enterotoxigenic *Bacillus cereus* sensu lato and *Staphylococcus aureus* isolates and associated enterotoxin production dynamics in milk or meat-based broth [J]. *Toxins*, 2017, 9(7): 225.
- [18] KIM M J, HAN J K, PARK J S, et al. Various enterotoxin and other virulence factor genes widespread among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(6): 872-879.
- [19] REIS A L, MONTANHINI M T, BITTENCOURT J V, et al. Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013, 44(4): 1195-1198.
- [20] HUILLET E, TEMPELAARS M H, ANDRE-LEROUX G, et al. PlcRa, a new quorum-sensing regulator from *Bacillus cereus*, plays a role in oxidative stress responses and cysteine metabolism in stationary phase [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51047.
- [21] OLTUSZAK-WALCZAK E, WALCZAK P. PCR detection of *cytK* gene in *Bacillus cereus* group strains isolated from food samples [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 95(2): 295-301.
- [22] KAMINSKA P S, YERNAZAROVA A, Murawska E, et al. Comparative analysis of quantitative reverse transcription Real-time PCR and commercial enzyme immunoassays for detection of enterotoxigenic *Bacillus thuringiensis* isolates [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 357(1): 34-39.
- [23] NASRABADI Z, RANJBAR R, POORALI F, et al. Detection of eight foodborne bacterial pathogens by oligonucleotide array hybridization [J]. *Electronic Physician*, 2017, 9(5): 4405-4411.
- [24] LEE N, KWON K Y, OH S K, et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157 : H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2014, 11(7): 574-580.
- [25] ARSLAN S, EYI A, KUCUKSARI R. Toxigenic genes, spoilage potential, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group strains from ice cream [J]. *Anaerobe*, 2014, 25: 42-46.
- [26] KUMAR T D K, MURALI H S, BATRA H V. Multiplex PCR assay for the detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* group strains and its application in food matrices [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2010, 50(2): 165-171.
- [27] KIM J H, RHIM S R, KIM K T, et al. Simultaneous detection of listeria monocytogenes, *Escherichia coli* O157 : H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* in low-fatted milk by multiplex PCR [J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2014, 34(5): 717-723.
- [28] CREMONESI P, PISANI L F, LECCHI C, et al. Development of 23 individual TaqMan® Real-time PCR assays for identifying common foodborne pathogens using a single set of amplification conditions [J]. *Food Microbiology*, 2014, 43: 35-40.
- [29] FORGHANI F, WEI S, OH D H. A rapid multiplex Real-time PCR high-resolution melt curve assay for the simultaneous detection of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in food [J]. *Journal of Food Protection*, 2016, 79(5): 810-815.
- [30] CATTANI F, BARTH V J, NASARIO J S, et al. Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* group species in milk by propidium monoazide quantitative Real-time PCR [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(4): 2617-2624.
- [31] PORCELLATO D, NARVHUS J, SKEIE S B. Detection and quantification of *Bacillus cereus* group in milk by droplet digital PCR [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, 127: 1-6.

- [32] LI F, YAN W, LONG L, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays for rapid visual detection of cry2Ab and cry3A genes in genetically-modified crops[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(9): 15109-15121.
- [33] 周 巍, 张 薇, 刘 亮, 等. 环介导等温扩增技术检测酸乳中蜡样芽孢杆菌[J]. *乳业科学与技术*, 2013, 5: 29-31.
ZHOU W, ZHANG W, LIU L, et al. Detection of *Bacillus cereus* in yogurt by loop-mediated isothermal amplification assay[J]. *Journal of Dairy Science & Technology*, 2013, 5: 29-31. (in Chinese)
- [34] ZHU L, HE J, CAO X, et al. Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of *Bacillus cereus* in food[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 16092.
- [35] CEUPPENS S, RAJKOVIC A, HAMELINK S, et al. Enterotoxin production by *Bacillus cereus* under gastrointestinal conditions and their immunological detection by commercially available kits [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2012, 9(12): 1130-1136.
- [36] TALLENT S M, HAIT J M, BENNETT R W. Analysis of *Bacillus cereus* toxicity using PCR, ELISA and a lateral flow device[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 118(4): 1068-1075.
- [37] KRAUSE N, MORAVEK M, DIETRICH R, et al. Performance characteristics of the Duopath® cereus enterotoxins assay for rapid detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* strains[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 144(2): 322-326.
- [38] STENFORS ARNESEN L P, FAGERLUND A, GRANUM P E. From soil to gut; *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins [J]. *FEMS Microbiol Review*, 2008, 32(4): 579-606.
- [39] SALEH M, AL N M, DOLOY A, et al. *Bacillus cereus*, an unusual cause of fulminant liver failure; Diagnosis may prevent liver transplantation[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2012, 61(Pt 5): 743-745.
- [40] ZHU K, HOLZEL C S, CUI Y, et al. Probiotic *Bacillus cereus* strains, a potential risk for public health in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 718.

(责任编辑 卢庆萍)