

乳制品中肉毒杆菌安全事件警示

李庆鹏, 吕加平, 靳 婧, 崔文慧, 郭 芹, 张书文, 芦 晶, 哈益明*

(中国农业科学院农产品加工研究所/农产品加工重点实验室农业部农产品加工与质量控制重点开放实验室/农产品贮藏保鲜与物流研究室, 北京 100193)

摘 要: 自恒天然乳粉事件发生后, 对我国乳品行业产生了一定的不良影响, 由此引发了一系列的问题。本文重点阐述了国际上一些国家在乳制品或食品标准中对肉毒杆菌及其毒素的限量标准现状及检测方法, 以期为我国乳制品或食品中肉毒杆菌及其毒素标准的制订提供基础参考, 为我国乳品加工行业提供相关技术指导。

关键词: 乳制品; 肉毒杆菌; 检测标准; 限量标准

The warning on *Clostridium botulinum* security incidents in dairy products

LI Qing-Peng, LV Jia-Ping, JIN Jing, CUI Wen-Hui, GUO Qin, ZHANG Shu-Wen,
LU Jing, HA Yi-Ming*

(Research Office of Agro-products Storage and Logistics, Key Laboratory of Agro-products Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: After the Fonterra power incident, it has a certain influence on the dairy industry in our country, which caused a series of problems. The impact of the dairy industry in China was introduced in this paper and the limit standards and detection methods of *botulinum* toxin in dairy or food were mainly reviewed, so as to provide basic references or technical guidance to the dairy products processing industry in China.

KEY WORDS: dairy products; *Clostridium botulinum*; testing standards; limit standards

1 概 述

2013年8月2日, 新西兰最大乳品公司恒天然集团曝出旗下某工厂生产(2012年5月)的浓缩乳清蛋白检出肉毒杆菌, 该批产品可能被用于婴儿奶粉、儿童成长奶粉和运动饮料的生产^[1]。我国是新西兰乳制品最大的出口市场, 80%的进口奶粉来自新西兰^[2,3]。自肉毒杆菌污染事件曝光以来, “肉毒杆菌”就成为了公

众心中婴幼儿奶粉乃至所有食品的“头号公敌”, 对我国乳制品行业特别是奶粉行业造成了巨大冲击, 引起消费者的恐慌^[4]。肉毒杆菌到底有多大危害, 为何会出现在奶粉中, 国家标准是如何规定的, 国际标准又是如何规定和管理的。

1.1 肉毒杆菌及肉毒毒素基本概念

首先, 我们应当科学认识肉毒杆菌、肉毒毒素和芽孢三个概念的区别。肉毒杆菌是一种革兰氏阳性厌

基金项目: 农业部农业财政项目《农产品加工国际标准跟踪与公共平台建设》(2130109)

Fund: Ministry of Agriculture Finance Project "Processing of Agricultural Products to International Standards Tracking and Public Platform" (2130109)

*通讯作者: 哈益明, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为农产品贮藏保鲜与质量安全。E-mail: hayiming@sina.com

*Corresponding author: HA Yi-Ming, Professor, Doctoral Tutor, Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China. E-mail: hayiming@sina.com

氧细菌,在固体培养基上形成非圆形菌落,该菌落为半透明,表面呈颗粒状,边缘不整齐^[5]。其广泛存在于土壤、鱼和家畜的肠内及粪便中,在罐头食品及密封腌制食品中具有极强的生存能力,菌体本身对人体没有危害,并且一般的加热手段就能将其杀死^[6,7]。但是肉毒杆菌在适宜的生长环境条件下会产生肉毒毒素,而肉毒毒素是目前发现的毒性最强的毒物之一,其毒性是氰化钾的10000倍^[8-10]。虽然肉毒毒素的毒性比较大,但它本身对热不稳定,100℃煮沸10 min即可破坏^[11,12]。当肉毒杆菌逆境环境下存在时,为了保护自己就会形成芽孢,芽孢在一般加热条件下很难杀死,遇到适宜的环境条件芽孢就会“苏醒”^[13,14]。

1.2 肉毒毒素易染食品

引起肉毒毒素中毒的食品通常是因为食品原料被肉毒杆菌污染或食品在加工过程中未进行充分的加热处理、未杀灭芽孢等导致食品可能含有一定量的肉毒毒素^[15]。引起肉毒中毒的食品,常因人们的饮食习惯、膳食组成和食品制作工艺的不同而有差别。我国引起中毒的食品大多是家庭自制的发酵食品和腌制食品,如豆瓣酱、豆酱、豆豉、腐乳等,也有少数是各种不新鲜肉、蛋、鱼类食品;日本以鱼制品引起中毒者较多;美国以家庭自制罐头、肉和乳制品引起中毒者为多;欧洲多见于腊肠、火腿和保藏的肉类^[16]。我国的新疆地区是肉毒中毒高发区,甘肃、陕西、河北等省均有中毒和死亡病例报告。国际上报道的婴儿感染肉毒杆菌事件主要是蜂蜜引起的,提醒家长注意不要给一岁以内的孩子喂食蜂蜜^[5]。

1.3 肉毒毒素中毒症状

肉毒毒素分为A、B、C、D、E、F、G7个型,其中引起人类中毒为A、B、E、F型毒素^[17]。肉毒毒素被人体吸收后,经淋巴和血液循环在人体内扩散,作用于颅脑神经核和外周神经肌肉接头以及植物神经末梢,阻止乙酰胆碱释放,影响神经冲动传导,导致肌肉松弛性麻痹^[18]。潜伏期比较短,中毒后几小时即会有症状表现。经抗生素治疗,一般病人可逐渐恢复,无后遗症^[19,20]。需要注意的是,婴儿与成人发病机制不同,不是因为吃了肉毒毒素污染的奶粉,而是因为婴儿肠道菌群还不完善,肉毒杆菌在肠道内繁殖产生了毒素^[4]。

2 肉毒杆菌及毒素标准现状

2.1 肉毒杆菌及毒素标准

目前,世界各国尚未制订乳粉中肉毒杆菌的限量标准。因为从各国制定标准的原则来看,标准制定时主要是针对食品中的高风险污染因素。对婴儿奶粉来说,肉毒杆菌并不是高风险因素。虽然肉毒毒素的毒性较强,但由于肉毒毒素的产生有严格的条件限制,如厌氧、合适的温度、酸碱度、水分活性、营养条件等,控制肉毒杆菌污染的关键是通过生产工艺的优化和过程控制,避免芽孢的污染和繁殖,而不是单靠最终的产品抽检^[21]。如果每个污染因素都要检验,一是时间长;二是食品的成本将非常高,消费者无法承受;三是会带来过度监管,得不偿失^[5]。

2.2 国外肉毒杆菌及毒素标准现状

自2000年国际食品卫生法典委员会(CCFH)提出要求以来,FAO/WHO食品微生物风险评估专家委员会(JEMRA)先后组织了很多会议,按照一定的原则,对食品中重要的致病菌优先进行风险评估,均未涉及肉毒杆菌。根据JEMRA的评估建议,国际食品法典委员会(CAC)先后于2007年、2008年在相关控制规范中颁布了即食食品中单增李斯特菌和限量标准,以及婴儿配方粉中阪崎肠杆菌(仅限于0~6月的婴儿配方粉)和沙门氏菌的限量标准^[5]。CAC迄今尚未提出对“相关产品中肉毒杆菌”的标准限量规定。并且欧盟、美国、澳大利亚和新西兰等国家均未对食品中的肉毒杆菌及其毒素做出限量规定。一般只对密闭发酵、罐头类食品规定符合商业无菌的要求,而对包括乳粉在内的一般食品均未规定肉毒杆菌的限量要求^[22]。

2.3 国内肉毒杆菌及毒素标准现状

我国婴幼儿配方奶粉标准是世界上最严的标准之一。根据《食品卫生法》的规定,参考了《世界食品发展委员会的标准》和《中国城镇居民膳食营养素推荐表》,并结合我国婴幼儿健康和正常生长发育所需的营养要求,我国制定了《婴儿配方乳粉I》(GB 10765)、《婴儿配方乳粉II、III》(GB 10766)和《婴幼儿配方粉及婴幼儿补充谷粉通用技术条件》(GB 10767)等强制性国家标准^[23,24]。在国家标准中规定的卫生指标有铅、砷、黄曲霉毒素、细菌总数、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和阪崎肠杆菌等限量

要求,但对肉毒杆菌尚未做任何规定^[25]。

2013年6月20日,国家食品药品监管总局、工业和信息化部等九部委联合发布《关于进一步加强婴幼儿配方乳粉质量安全工作的意见》,这是我国目前出台的最严格婴幼儿配方奶粉制度,也未对肉毒杆菌做任何规定^[26]。

2013年7月15日,《食品安全国家标准 食品中致病菌限量》审议通过,标准提出了沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠埃希氏菌等几种主要致病菌,在对肉制品、水产制品、即食蛋制品、粮谷类制品、巧克力类及可可制品、即食加工果蔬、饮料及冷冻饮品类、即食调味品、坚果籽实制品共9类食品进行了限量要求,乳制品中肉毒杆菌未在该标准中涉及。GB 29921-2013《食品安全国家标准 食品中致病菌限量》于2014年7月1日实施^[27]。

我国虽未在食品产品标准中对肉毒杆菌及其毒素的限量做出规定,但对于密封罐头等可能存在肉毒杆菌污染风险的食品,其微生物要求均为“应符合商业无菌”。同时,在食品卫生微生物检验方法(GB/T4789.26-2003)商业无菌的检验中明确指出,如发现梭状芽孢杆菌,应用庖肉培养基原培养液按照(GB/T4789.12-2003)进行肉毒杆菌及肉毒毒素的检验^[28,29]。

3 肉毒杆菌及毒素检测方法

肉毒杆菌的致病性主要是由于其产生的外毒素肉毒毒素而引起的,因为肉毒杆菌本身的厌氧特性,在实验室条件下很难培养,所以实验室检测的重点对象是肉毒毒素。目前实验室中主要检测肉毒毒素的方法有动物学实验、免疫学实验、生物传感器技术和基因工程技术等方法^[30,31]。

3.1 小鼠致死实验

小鼠致死实验是检测毒素的金标准。具体方法是将用磷酸盐缓冲溶液稀释可疑样本,然后从腹腔注射到小鼠体内。若含有毒素,经过一定的时间小鼠会表现出典型的肉毒毒素中毒症状^[32,34]。标准实验观察时间为96 h,一般观察时间越久,实验准确性越高^[32]。该方法虽然操作比较简单,但是实验需要大量的小鼠,耗费的成本比较大,时间久不能满足快速检测的要求,而且若是样本本身所含的毒素被分解,容易出现假阴性结果^[33,34]。

3.2 非致死性小鼠实验

非致死性小鼠实验是通过皮下注射毒素来观察小鼠局部肌肉麻痹情况,该方法目前被用来定量治疗用毒素^[35,36]。非致死性小鼠实验和传统的活性实验具有相似的特异性和灵敏度,但不引起应激状态或者不相称的肌肉运动,也不引起小鼠的死亡^[35]。仅用于纯化的毒素毒力测定,但其检测复杂的样品时仍需要进一步的阐明^[36]。

3.3 免疫学实验

免疫学检测方法(immunoassay, IA)是利用抗原抗体反应检测标本中微量物质的方法,是目前肉毒毒素检测领域最为广泛的检测方法^[37,38]。它既可定性又可定量,灵敏度高,特异性强,一次可检测大量样本,能实现自动化^[37]。限制免疫学方法的主要因素是缺乏高质量的抗体,且不同血清型之间的基因改变可能会造成结果的差异^[38]。免疫学检测方法主要包括:酶联免疫吸附法、快速检验试纸条法、免疫荧光法、胶体金免疫层析法等^[37,38]。

3.3.1 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(ELISA)是目前使用较为广泛的肉毒毒素检测方法,其中最常用的是双抗夹心ELISA,即预包被抗肉毒毒素的单抗或者多抗,然后加入待检样品和标准品,其次加入针对肉毒毒素的检测抗体,再次加入酶标记的抗检测抗体的二抗,最后加入相应底物,检测与肉毒毒素浓度成比例的信号变化^[35-37]。ELISA可以在一天之内完成检测,且灵敏度较高,方法简便,结果可靠,可用于肉毒毒素的快速检测,但完全确诊仍需进行小鼠活性实验^[35-37]。

3.3.2 快速试纸条法

商品化的检验试纸条方便快捷的进行肉毒毒素的检测,并且不需要其他的试剂盒仪器设备,时间短。但是该方法灵敏度低,因此使用起来有一定的局限性^[37]。可利用该方法快速有目的的筛查出可疑样品,然后再对可疑样品进行后续详尽的实验。需要注意的是样品必须经过很好的处理,以减少其他物质对实验结果的干扰^[35,37,39]。

3.3.3 免疫荧光法

免疫荧光技术是利用荧光素作为标记物质进行免疫分析的方法。原理就是利用荧光素标记已知的抗体或者抗原,然后用标记的抗体(或抗原)作为探针检测标本、组织或细胞内的相应抗原(或抗体),通过相应的仪器测定荧光强度,待测物的浓度与荧光强度

有一定的相关关系。该方法虽灵敏度高于可见光检测技术,但是低于发光方法,其优点在于可以利用各种荧光素不同的荧光特性,实现多种不同形式的标记、检测和定量,具有更广泛的应用领域^[40]。

3.3.4 胶体金免疫层析法

该技术用胶体金作为标记物进行示踪,利用抗原抗体的高度专一结合的特性及胶体金技术的可视定位特性来检测可疑样本。以检测快速,通常 5~10 min 可出结果;检测试纸条先对比较稳定,可长期保存,成本相对较低,易于推广;操作简单,无需对操作者进行特殊培训,节约成本等这些优点著称^[41]。此技术在毒素检测领域有巨大的发展前景。

3.4 分子生物学技术

近年来发展较快的检测肉毒毒素的试验方法之一是聚合酶链式反应(PCR)技术,主要包括普通 PCR、免疫 PCR、多聚 PCR、基因探针杂交 PCR 和荧光定量 PCR 等,不但灵敏度高,且有杂菌存在时也不影响实验结果^[5]。与其他方法相比,PCR 技术准确性高、自动化程度高和操作简便,各种 PCR 方法如表 1 所示。

4 对策与建议

新西兰乳品肉毒杆菌事件的发生,反映出国际农产品加工业中存在着诸多潜在危害风险,农产品食品的安全应警钟长鸣。应对潜在的危害并分析制定紧急预案,防止乳制品中肉毒梭菌污染及危害事件的发生,特提出如下建议:

4.1 加快对婴幼儿配方乳粉生产标准的制订

婴幼儿配方乳粉是食品质量标准的最高端,质量风险零容忍。由于婴幼儿身体的生理功能和结构发育不够完善,婴幼儿期是人类抗御健康风险能力的

最低时期,而婴儿食品又是这一时期几乎唯一的食品来源,其风险暴露率最高,风险最大。因此,对婴幼儿食品的生产、经营、销售及消费等各环节都要严把质量控制关,同时积极开展乳品中肉毒杆菌及其毒素的风险评估工作,为尽快出台该项标准提供理论基础;近期,国家食品药品检验局已经发布了《企业生产婴幼儿配方乳粉许可条件审查细则(2013 版)》征求意见稿,严把奶粉生产环节的各个质量关,提高企业准入门槛,确保产品的质量稳定和安全。

4.2 加严格控制微生物芽孢菌的污染,消除污染源

应该从婴幼儿配方奶粉的原辅料质量关、生产环境和加工工艺关、产品贮藏和流通环节关的监管入手,层层管控,控制原料乳及其他辅料的菌数指标,特别是耐热芽孢菌,控制其菌数指标在经过后期杀菌、浓缩及喷雾干燥后菌数符合国家标准,无检出致病菌(含肉毒梭菌)等要求。在干法生产婴幼儿配方奶粉时,要对每一种干粉状原料的微生物进行严格检查,检查其是否含有肉毒梭菌等致病菌,并保证预混和混合环境为高级别清洁度,避免二次污染。从而将风险排除或降至最低。只有这样才能保证产品质量安全。

4.3 严格遵守企业生产规程,消除生产安全隐患

农产品加工行业尤其是乳制品加工业,在生产过程中一方面严格执行日常 CIP(cleaning in place, CIP 清洗系统一般包有清水、热水、酸或碱、热水、清水等步骤)进行清洗和消毒,特别要定期对生产设备拆卸后全方位的清洗消毒,做到彻底清洗设备、管道可能存在的死角;另一方面,对清洗设备的酸碱液进行有效的过滤净化,使其达到理想的清洗效果,且不会造成二次污染。

表 1 各种 PCR 检测肉毒杆菌的结果比较
Table 1 Comparing the results of all kinds of PCR detection of *Clostridium botulinum*

检测方法	可检测物	灵敏度	特异性
PCR	菌株的 DNA 模板	10 pg DNA	100%
基因探针杂交 PCR	同上	0.1 pg DNA	95.6%
多聚 PCR	同上	450 pg DNA	100%
荧光定量 PCR	同上	22 个拷贝数	100%
免疫 PCR	修饰后的 DNA 模板	4.99 pg DNA	100%

参考文献

- [1] 本刊综合. 再见, 洋奶粉“神话”时代[J]. 发明与创新, 2013, 12(9): 6-9.
- Ben KJH. Goodbye, foreign milk power “myth” era [J]. *Inventi Innovati*, 2013, 12(9): 6-9.
- [2] 张杰. “恒天然事件”终结“洋奶粉”神话[N]. 中国畜牧兽医报, 2013-08-18(13).
- Zhang J. “Fonterra event” ends “foreign milk power” myth [N]. *China Ani Husban Veterina News*, 2013-08-18(13).
- [3] 张旭. 恒天然肉毒杆菌风波“善后”难: 多美滋等面临大规模召回[N]. 21 世纪经济报, 2013-08-06(19).
- Zhang X. Fonterra botox storm “mess” difficult: dumex facing massive recall [N]. *21st Centu Econo Repo*, 2013-08-06(19).
- [4] 王乐. 恒天然奶粉事件持续发酵, 专家指出——应科学认识肉毒杆菌[N]. 中国医药报: 食品安全, 2013-08-14(3).
- Wang L. Fonterra milk powder event continuous fermentation, the expert points out-should be scientific understanding botox [N]. *China medi news: food safety*, 2013-08-14(3).
- [5] 刘继超, 姜铁民, 陈历俊. 肉毒毒素检测与控制技术研究进展[J]. 中国奶牛: 肉毒专栏, 2013, 14: 7-10.
- Liu JCh, Jiang TM, Chen LJ. The research progress of Botulinum toxin detection and control technology [J]. *Chin Dair Cows: Botulinum Column*, 2013, 14: 7-10.
- [6] 何国庆, 贾英民, 丁立孝, 等. 食品微生物学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2009.
- He GQ, Jia YM, Ding LX, *et al*. *Food Microbiology* [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2009.
- [7] 董明盛, 贾英民. 食品微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006.
- Dong MSh, Jia YM. *Food Microbiology* [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2006.
- [8] Johnson WA, Bradshaw M. Clostridium botulinum and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective[J]. *Toxicon*, 2001, 39: 1703-1722.
- [9] Gill MD. Bacterial toxins: a table of lethal amounts[J]. *Microbiol Rev*, 1982, 46: 86-94.
- [10] Franz DR, Jahrling PB, Friedlander AM, *et al*. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents[J]. *JAMA*, 1997, 278: 399-411.
- [11] 买买提依明, 马卫英, 热西旦, 等. 肉毒杆菌中毒的临床特点[J]. 临床神经病学杂志, 2013, 26(3): 225-227.
- Mai MTYM, Ma WY, Re XD, *et al*. The clinical characteristics of botulism [J]. *J Clini Neurolo*, 2013, 26(3): 225-227.
- [12] 本刊. 科学看待肉毒杆菌[J]. 质量与标准化, 2013, 12(10): 27-28.
- Ben K. Scientific view of botox [J]. *Quali Standardiza*, 2013, 12(10): 27-28.
- [13] Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, *et al*. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management[J]. *JAMA*, 2001, 285: 1059-1081.
- [14] Scott AB, Suzuki D. Systemic toxicity of botulinum toxin by intramuscular injection in the monkey[J]. *Mov Disord*, 1988, 3: 333-335.
- [15] 刘国祥, 张红丽, 申介健, 等. 乳酸钠在延迟袋装鸡肉食品中肉毒杆菌产生肉毒素的作用[J]. 肉类工业, 2011, 366(10): 27-30.
- Liu GX, Zhang HL, Shen JJ, *et al*. Effect of sodium lactate on delay botulinus producing cretoxin in bagged chicken food [J]. *Meat Ind*, 2011, 366(10): 27-30.
- [16] 左庭婷, 端青. 肉毒毒素的中毒和检测方法[J]. 微生物免疫学进展, 2003, 31(2): 87-90.
- Zuo TT, Duan Q. Botulinum toxin poisoning and detection method [J]. *Progress Immunolo*, 2003, 31(2): 87-90.
- [17] 赵思俊, 李雪莲, 曹旭敏, 等. 肉毒杆菌及肉毒毒素研究进展[J]. 中国动物检疫, 2013, 30(8): 36-40.
- Zhao SJ, Li XL, Cao XM, *et al*. Progress in research on bacillus botulinus and botulinum toxins [J]. *Chin Ani Quarant*, 2013, 30(8): 36-40.
- [18] Dembek ZF, Smith LA, Rusnak JM. Botuliam: cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities[J]. *Disaster Med Public Health Prep*, 2007, 1: 22.
- [19] Christine K, Fox MD, Corinne A, *et al*. Recent advances in infant botulism[J]. *Pediatr Neurol*, 2005, 32(3): 149-154.
- [20] Pradeep KM, June P, Clare F, *et al*. Detection limit of Clostridium botulinum spores in dried mushroom samples sourced from China[J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 166(1): 72-76.
- [21] 刘国信. “肉毒杆菌”与奶粉污染[J]. 湖南包装, 2013, 4: 41-42.
- Liu GX. “Botox” and powder pollution [J]. *Hunan packaging*, 2013, 4: 41-42.
- [22] 梁怀玉. 浅谈奶粉质量安全问题[J]. 甘肃科技纵横, 2013, 42(9): 111-113.
- Liang HY. Mainly talks about the milk powder quality and safety [J]. *Gansu Sci Technol Aspect*, 2013, 42(9): 111-113.
- [23] 宋昆冈. 中国婴幼儿配方奶粉标准世界最严[N]. 深圳晚报, 2013-05-31.
- Song KG. Chinese infant formula standard is the world's most tight [N]. *Shenzhen Evening News*, 2013-05-31.
- [24] 新浪财经. 中国婴幼儿配方奶粉标准语欧盟标准比 [EB/OL]. (2013-08-15)[2014-04-04]. <http://finance.sina.com.cn/consume/littletips/20130815/152316459737.shtml>.

- Finance Sina. Chinese infant formula standard language of European standard ratio[EB/OL].(2013-08-15)[2014-04-04]. <http://finance.sina.com.cn/consume/littletips/20130815/152316459737.shtml>.
- [25] 钟凯. 肉毒杆菌非乳品中常见污染物 各国无限量标准[N]. 中国食品安全报, 2013-08-06(第 A02 版).
- Zhong K. Botulinum toxin is not a common pollutant in the dairy no limited standards in world [N]. Chin Food Safe News, 2013-08-06(A02).
- [26] 国务院办公厅. 国务院办公厅转发食品药品监管总局等部门关于进一步加强婴幼儿配方乳粉质量安全工作意见的通知[J]. 法规性文件, 2013, 31: 41-46.
- Forwarding food and drug supervision administration departments under the state council on further strengthening the work on the quality and safety of infant formula powder [J]. 2013, 31: 41-46.
- [27] GB 29921-2013 《食品安全国家标准 食品中致病菌限量》[S]. GB 29921-2013 《National food safety standards Pathogenic bacteria limit in food》[S].
- [28] GB/T 4789.26-2003 《食品卫生微生物学检验 罐头食品商业无菌的检验》[S].
- GB/T 4789.26-2003 《Food hygiene microbiological testing Canned food business testing》[S].
- [29] GB/T 4789.12-2003 《食品卫生微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》[S].
- GB/T 4789.12-2003 《Food hygiene microbiological testing Clostridium botulinum and botulinum toxin》[S].
- [30] 张雪平. 肉毒毒素生物学活性剂肉毒中毒病原检测方法的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(7): 728-733.
- Zhang XP. Progress in research on methods for determination of bioactivity of Clostridium botulinum toxin ad pathogenic diagnosis of botulism [J]. Chin J Biologi, 2009, 22(7): 728-733.
- [31] Chao HY, Wang YC, Tang SS, *et al.* A highly sensitive immune polymerase chain reaction assay for Clostridium botulinum neurotoxin type A[J]. Toxicon, 2004, 43(1): 27-34.
- [32] Pearce LB, Borodic GE, First ER, MacCallum RD. Measurement of botulinum toxin activity: evaluation of the lethality assay[J]. Toxicol Application Pharmacol, 1994, 128(1): 69-77.
- [33] Ferrira JL, Eliasberg SJ, Harrison MA, *et al.* Detection of preformed type A botulinum toxin in hash brown potatoes by using the mouse bioassay and modified ELISA test[J]. J Assoc Official Anal Chem Int, 2001, 84(5): 1460-1464.
- [34] Shone C, Wilton-Smith P, Appleton N, *et al.* Monoclonal antibody-based immunoassay for type a Clostridium botulinum toxin is comparable to the mouse bioassay[J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 50(1): 63-67.
- [35] 刘志佳. 肉毒毒素中和抗体的制备以及快速检验诊断方法的建立和应用[D]. 西安: 第四军医大学基础部免疫学教研室, 2012.
- Liu ZJ. Preparation of monoclonal antibodies against botulinum neurotoxins and development of methods for detecting botulinum neurotoxins and their application [D]. Xian: Department of Immunology, Fourth Military Medical University, 2012.
- [36] Lindstrom M., Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(2): 298-314.
- [37] 高艳丽, 王景林. 肉毒毒素及其检测方法研究进展[J]. 现代生物医学研究进展, 2008, 12(8): 2334-2337.
- Gao YL, Wang JL. Botulinum neurotoxin and advancements on its detective method [J]. Progre Modern Blomedi, 2008, 12(8): 2334-2337.
- [38] Smith TJ, Lou J, Geren IN, *et al.* Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization[J]. Infect Immun, 2005, 73: 5450-5457.
- [39] Gessler F, Pagel-Wieder S, Avondet MA, *et al.* Evaluation of lateral flow assays for the detection of botulinum neurotoxin type A and their application in laboratory diagnosis of botulism[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007, 3: 243-249.
- [40] Ozanich RM, Warner MG, Miller K, *et al.* Rapid multiplexed flow cytometric assay for botulinum neurotoxin detection using an automated fluidic microbead-trapping flow cell enhanced sensitivity[J]. Anal Chem, 2009, 81(14): 5783-5793.
- [41] Sharma SK, Eblen BS, Bull RL, *et al.* Evaluation of lateral-flow Clostridium botulinum neurotoxin detection kits for food analysis[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 3935-3941.

(责任编辑: 邓伟)

作者简介



李庆鹏, 助理研究员, 主要研究方向为农产品贮藏保鲜及农产品加工国际标准跟踪。

E-mail: liqingpeng@caas.cn



哈益明, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为农产品贮藏保鲜与质量安全。

E-mail: hayiming@sina.com