

调查研究

一起肠炎沙门菌引起的食物中毒检测及菌株同源性分析

江金伦¹,陈静¹,竺稽定¹,夏颖萍¹,杨元斌²,徐景野²

(1.浙江省奉化市疾病预防控制中心,浙江 奉化 315500; 2.浙江省宁波市疾病预防控制中心,浙江 宁波 315010)

摘要:目的 检测食物中毒样品中致病菌,分析其同源性,为追踪污染源、明确病因诊断提供帮助,为控制和减少食物中毒提供依据。方法 荧光定量 PCR 快速筛检致病菌,参照 GB 4789.4—2010《食品安全国家标准 食品卫生微生物检验 沙门氏菌检验》分离致病菌,全自动细菌鉴定仪鉴定致病菌,脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析同源性。结果 从21份病人和从业人员粪便样品中检出8株肠炎沙门菌,9份食品样品中检出2份肠炎沙门菌,检出率分别为25.00%和6.25%;食堂用水及井水检测均未检出肠炎沙门菌等致病菌。荧光定量 PCR 法阳性率结果与 GB 4789.4—2010 方法一致。PFGE 分型显示10株肠炎沙门菌的 DNA 条带图谱完全一致,相似性100%,聚类分析为同一型,表明菌株来自同一克隆系。结论 采用荧光定量 PCR 筛检能提示食物中毒样品中病原菌是否存在的信息,通过 GB 4789.4—2010 方法仔细寻找到目标菌,两法联合使用能快速、准确地检测出引起食物中毒的致病菌。运用 PFGE 对致病菌进行溯源,分析其亲缘关系,能追踪到菌株来源,有利于防止食物中毒的发生。

关键词:食物中毒;食源性致病菌;PCR检测;脉冲场凝胶电泳;同源性;分子分型;溯源分析;肠炎沙门菌

中图分类号:R155.5;TS207.4 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)05-0489-03

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.05.023

Determination, tracing and homology analysis of a food poisoning case caused by *Salmonella enteritis*

JIANG Jin-lun, CHEN Jing, ZHU Ji-ding, XIA Ying-ping, YANG Yuan-bin, XU Jing-ye

(Fenghua Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Fenghua 315500, China)

Abstract: Objective To detect the pathogens of food poisoning samples and analyze the homology, help to trace the sources of contamination and clarify etiology diagnosis, and provide the basis for the prevention and control of food poisoning. **Methods**

The pathogens were screened by fluorescence quantitative PCR, isolated according to the GB method, identified by ATB method, and the homology was analyzed by PFGE. **Results** 8 strains of *Salmonella enteritis* were separated from 21 patients or operators, 2 strains were from 9 food samples. The detection rate were 25.00% and 6.25% respectively. *Salmonella* was not detected from water samples from canteen and well. Positive rates were the same for real-time fluorescent quantitative PCR and GB method. PFGE patterns of the 10 *Salmonella enteritis* were the same for cluster analysis. **Conclusion** The food poisoning case was caused by the same clone of *Salmonella enteritis*. Real-time fluorescent quantitative PCR was helpful for rapid examination for pathogenic bacteria. GB method was important for the separation of *Salmonella enteritis*, and the above 2 methods could increase the detection rate and shorten the time spent. PFGE method could analyze the homology of the pathogenic bacteria, trace the source and was helpful to prevent and control food poisoning.

Key words: Food poisoning; food borne pathogens; PCR; pulsed-field gel electrophoresis; homology; molecular typing; tracing; *Salmonella enteritis*

2011年11月30日13时30分,奉化市疾病预防控制中心传染病防制科接到某社区卫生服务中心报告,当地有多名学生出现相类似的不明原因发热并伴有头晕、恶心、腹痛、腹泻等症状,疑似食物中毒,后经

流行病学诊断及实验室检测,确定为由肠炎沙门菌引起的食物中毒。肠炎沙门菌是国内外常见的食物中毒病原菌,我市曾发生过多起,为更好地做好防控工作,我们对其进行系统鉴定和溯源分析,检测项目为沙门菌、志贺菌、致病性大肠埃希菌。

收稿日期:2014-06-16

基金项目:宁波市自然科学基金项目(2009A610121);宁波市创新团队项目(2012BB2018)

作者简介:江金伦 男 副主任技师 研究方向为微生物检验与研究

E-mail:fhjjl8899@126.com

通讯作者:徐景野 男 主任技师 研究方向为微生物检验与研究

E-mail:xujy@nbcdc.org.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

采集患者肛拭15份(编号1~15号);采全体食堂工作人员肛拭6份(16~21号);食品样品9份分

别是黑木耳炒青瓜(1号)、红烧鸡壳(2号)、香肠大白菜(3号)、排骨芋艿(4号)、萝卜烤肉(5号)、米饭(6号)、红烧油豆腐(7号)、咸菜炒蛋(8号)、芋艿浆(9号);食堂用水、井水各1份,共32份样品。

1.1.2 主要仪器与试剂

全自动细菌鉴定仪(法国梅里埃)、ABI7500实时荧光PCR仪(美国ABI)、脉冲场凝胶电泳仪、VersaDoc凝胶成像系统(美国Bio-Rad)、聚类分析软件为丹麦Bionumerics v4.6。

肠道增菌液、分离培养基均购自杭州微生物试剂有限公司,显色培养基(郑州博赛生物技术股份有限公司),诊断血清(宁波天润生物药业有限公司),细菌鉴定试剂条(法国梅里埃),实时荧光PCR检测试剂(上海之江生物科技有限公司),脉冲场凝胶电泳检测试剂(大连宝生生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光PCR反应体系

将肛拭、食品、水等样品经肠道增菌液增菌后取1 ml于离心管中,13 000 r/min离心2 min,弃上清,加100 μ l DNA提取液充分混匀,沸水浴10 min,13 000 r/min离心5 min,取上清备用。实时荧光PCR反应体系反应总体积为40 μ l,即36 μ l检测混合液加上4 μ l样品处理液。PCR反应参数为:37 $^{\circ}$ C复性2 min;94 $^{\circ}$ C预变性2 min;93 $^{\circ}$ C变性15 s;60 $^{\circ}$ C退火延伸60 s,循环40次,于60 $^{\circ}$ C检测FAM荧光通道,检测时均设有阴、阳性及空白对照。

1.2.2 脉冲场凝胶电泳

脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)分型方法参照《美国PulseNet PFGE分子分型标准化实验室操作规程》^[1]进行,分子量标记沙门菌(参考菌株H9812)由浙江省疾病预防控制中心微生物室惠赠。挑取菌株新鲜培养物由2 ml CSB(细胞悬浮液),加入蛋白酶K制胶块;用1% Gold Agarose(含1% SDS)等体积混合蛋白消化;再用模具梳子将胶块直接取出,弃液,加5 ml 50 $^{\circ}$ C预热的纯水,轻摇至胶块悬起,50 $^{\circ}$ C水浴轻摇10 min,洗2次,5 ml 50 $^{\circ}$ C预热的TE洗胶块4次,15 min/次,凉至室温,加3 ml TE,置4 $^{\circ}$ C保存。切1~3 mm胶块,浸入150 μ l酶切体系中(其中含Xba I酶50 U),37 $^{\circ}$ C过夜。将酶切后的样品胶置于样品梳上,摆放到模具上。称取1 g Gold Agarose溶于100 ml 0.5 \times TBE液中,加热溶解后冷至60 $^{\circ}$ C,缓缓倒入模具中,冷却20 min后,拔去样品梳,去除挡板,将胶块放入已加入0.5 \times TBE缓冲液的电泳槽中。电压6 V/cm,电泳19 h,脉冲参数2~10 s,13 h,20~25 s,6 h,电泳温度14 $^{\circ}$ C。电泳结束后,

将凝胶取出,用0.5 μ g/ml的Goldview染色30 min,去离子水脱色30 min。用凝胶成像仪读胶分析,PFGE条带用丹麦Bionumerics v4.6版软件进行聚类分析。

1.2.3 检测方法

样品按GB 4789.4—2010《食品卫生微生物检验沙门菌检验》^[2]和WS 271—2007《感染性腹泻诊断标准》^[3]进行病原菌分离、培养、生化及血清学鉴定,依据食物中毒诊断标准及技术处理总则^[4]进行食物中毒的诊断与技术处理。

2 结果

2.1 实时荧光PCR筛检

32份中毒样品中,8份患者肛拭样品(1、2、3、7、8、9、10、11号)和2份食品样品(萝卜烤肉、咸菜炒蛋)荧光PCR沙门菌检测呈阳性,其余样品均为阴性,检出率分别为25.00%(8/32)和6.25%(2/32)。荧光PCR检测沙门菌图谱见图1。

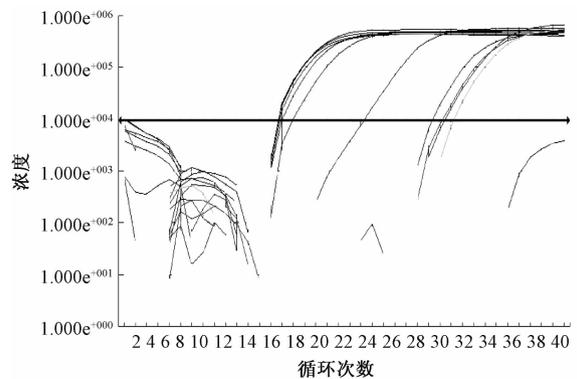


图1 32份样品荧光PCR沙门菌检测图谱

Figure 1 32 samples fluorescence PCR *Salmonella* detection map

2.2 病原菌检出情况

用GB 4789.4—2010法对21份肛拭样品和9份食品样品进行沙门菌、志贺菌、致病性大肠埃希菌检测,结果从8份肛拭样品(1、2、3、7、8、9、10、11)和2份食品样品(萝卜烤肉、咸菜炒蛋)中检测肠炎沙门菌,检测结果与荧光PCR一致,其余食品样品、6份食堂人员肛拭、食堂用水、井水和患者肛拭未检出肠炎沙门菌。

10株沙门菌的生化反应为G⁻短小杆菌、氧化酶试验-、触酶试验+、双糖铁斜面+/-、H₂S+。全自动细菌鉴定仪微生物全自动细菌鉴定结果为:GLU+、LIP+、LARL-、MAN+、MNT-、DARL-、ASPA-、ADH-、TRE+、 β GLU-、 α MAL-、MAL+、 β NAG-、SAC-、RHA+、ODC+、5KG+、LDC+、LARA+、IND-、GAT-、CEL-、ADO-、INO-、 β GAL-、 α GLU-、URE-、SOR+、RP+、PLE-

α GAL + β GUR - ,鉴定结果为沙门菌属, ID 为 99.6%。血清学试验为 AF 多价: +++, O₂: -O₄: -O₉: +++, H₁ 多价: -, H₂ 多价: +++, Hd: -Vi: -Hg: +++, Hm: +++, Hq: -Ht: -H1,2,3,5: ++, H2: -H5: -H6: -H7: ++, 结果为肠炎沙门菌(O₉: gm: 1,7), “-”表示阴性、“+”表示阳性。

2.3 PFGE 分型

对 8 株从患者和 2 株从食品中分离到的肠炎沙门菌作 PFGE 分型,根据 Tenover 的同源性判定标准^[5]各菌株图谱间 DNA 条带数量和位置完全相同为同一型别,若有 1 条或 1 条以上的条带差别,即判为不同的型别,以阿拉伯数字表示,如 1~3 条带差异说明菌株间有相近关系,只有单基因的改变;如有 4~6 条带差异表明菌株间可能亲缘关系相对较远。从图 2 可知,10 株菌株 PFGE 图谱完全一致,DNA 条带 100% 相似。

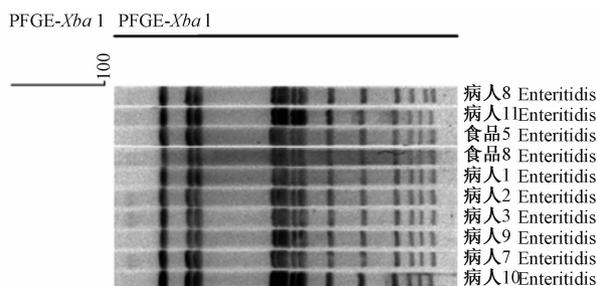


图 2 食物中毒肠炎沙门菌 PFGE 聚类分析图

Figure 2 Inflammatory bowel disease *Salmonella* food poisoning PFGE clustering analysis diagram

3 讨论

沙门菌是各国公认的食物源性疾病主要病原菌,其引起的食物中毒全球报道最多,其中又以肠炎沙门菌血清型最为常见。根据流行病学调查、临床表现和实验室检测结果,证实本起食物中毒为肠炎沙门菌所致。

随着检测技术的进步,对病原菌进行分子分型,了解菌株间的相关性,发现流行优势株,为追踪污染源和疾病的防控提供重要的依据,是疾病诊断的重要手段。本起食物中毒从患者和食品中检出相同血清型肠炎沙门菌,难以说明其内在的关联性,因此,我们选用被认为是细菌分子流行病学研究“金标准”^[6]的 PFGE 分型方法进行溯源。PFGE 是一种对细菌全染色体 DNA 进行分析,检测细菌的染色体结构特征,从分子水平上显示出菌株间微小差异,因此,分析更准确、更稳定,不受表型性状的易变性带来的干扰,具有特异性高、重复性好、结果容易判读等优点^[7],结果显示,分离于食品和患者中的肠炎沙门菌其 PFGE 基因型 100% 相似,表明菌株

的 DNA 结构高度一致,可认为本次食物中毒由同一克隆病原菌所致,主要原因是食用了受肠炎沙门菌污染的咸菜炒蛋和萝卜烤肉,表明其在加工过程中受肠炎沙门菌交叉污染,应进一步追溯食品原料,寻找污染源。由此提示,监管部门应加强对餐饮业管理上的监督检查力度,提高从业人员的卫生意识,养成良好的卫生习惯,只有在软、硬件管理都到位,才能更有效地防止食物中毒的发生。

食物中毒各级、各部门都非常重视,对实验室的要求不但要检测快速,而且还要正确。现行的国标和常规等检测方法,存在检测周期长、操作步骤多、方法欠敏感、易误检和漏检等缺陷,随着分子生物学技术的普及,实时荧光 PCR 检测食物中毒病原菌已被广泛应用,利用其快速、灵敏度高等特点,及时地检出标本中的食物中毒病原菌,为 GB 4789.4—2010 法等常规法明确提示检测方向和重点,加快捕获食物中毒病原菌,提高检出率,使诊断食物中毒时间明显缩短^[8]。本研究运用实时荧光 PCR 与 GB 4789.4—2010 法相结合的细菌培养检测方法,能快速、准确地检出食物中毒的病原菌,同时运用 PFGE 分型技术对病原菌进行溯源,了解菌株间的相关性,达到快速发现食物中毒病原菌的种类,追踪病原菌间的相关性^[9],做好食物中毒的防控工作之目的。该方法的应用,对今后食物中毒检测具有指导意义。

参考文献

- [1] Parsons M B, Cooper K L F, Kubota K A, et al. PulseNet USA standard ized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Borne Pathogens Dis, 2007,4(3):285-292.
- [2] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.4—2010 食品安全国家标准 食品卫生微生物检验 沙门氏菌检验[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [3] 中华人民共和国卫生部. WS 271—2007 感染性腹泻诊断标准[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB 14938—1994 食物中毒诊断标准及技术处理总则[S]. 北京:中国标准出版社,1994.
- [5] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gelelectrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol, 1995,33(9):2233-2239.
- [6] Oliv D M, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms[J]. J Clin Microbiol, 1999,37(6):1661-1669.
- [7] 徐景野,许国章,金春光,等. 伤寒与甲型副伤寒沙门菌基因分型志耐药性研究[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(12):3145-3151.
- [8] 陈化,谭翰清,谭海芳,等. 一起肠炎沙门菌食物中毒检测分析[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(8):1650-1651.
- [9] 丁水军,陈棋桐,孙永祥,等. 食物中毒肠炎沙门菌生物学特性及分子型研究[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(6):1326-1328.