

研究报告

脉冲场电泳在两起同期异地肠炎沙门菌食物中毒分子流行病学调查中的应用研究

黄彦,孙贵娟,唐振柱,李秀桂,王红

(广西壮族自治区疾病预防控制中心,广西 南宁 530028)

摘要:目的 探讨两起相距210多公里乡镇同期发生的肠炎沙门菌食物中毒分离株之间的分子流行病学关系。方法 将两起食物中毒事件患者和剩余食物分离到的8株肠炎沙门菌进一步鉴定培养,挑取单个菌落增菌,用限制性内切酶Xba I消化酶切后进行脉冲场凝胶电泳,获得的分子分型指纹图谱,运用Bionumerics 5.1进行聚类分析。结果 指纹图谱聚类显示8株肠炎沙门菌分为两个分子型,D乡食物中毒分离到的5株肠炎沙门菌有相同的指纹图谱;P镇的3株分离株图谱也一致;两起食物中毒分离株图谱之间有4个条带的差异。结论 两起食物中毒的暴发虽然都是肠炎沙门菌引起的,但具有不同的分子型别,食物中毒不是由同一种污染的食物源引起;脉冲场凝胶电泳可有效应用于食物中毒溯源分析及肠炎沙门菌分子流行病学研究。

关键词:肠炎沙门菌;脉冲场电泳;食物中毒;分子流行病学;分子分型

中图分类号:R378.22 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)05-0407-04

Molecular epidemiological survey with pulsed-field gel electrophoresis on two simultaneous but allopatric food-poisoning accidents caused by *Salmonella enteritidis*

Huang Yan, Sun Guijuan, Tang Zhenzhu, Li Xiugui, Wang Hong

(Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Guangxi Nanning 530028, China)

Abstract: Objective To study the molecular epidemiology of two *Salmonella enteritidis* strains in two food-poisoning accidents occurred at the same time but separated in a distance of 210 kilometers away from each other. **Methods** Eight *S. enteritidis* stains isolated from patients and food residues in two food-poisoning accidents were identified, and single colonies were picked out to multiply on agar plates. The total DNA of isolates was digested with restriction enzyme Xba I, and run pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The DNA fingerprints of different stains were compared by using Bionumerics 5.1. **Results** The DNA fingerprints of 8 *S. enteritidis* belonged to two PFGE patterns. The fingerprints of 5 stains isolated from D town were consistent and also that of 3 stains from P town, but the PFGE patterns from different towns were varied in four bands. **Conclusion** This two food-poisoning accidents were caused by *S. enteritidis* with different PFGE patterns, so they were not infected by the same contaminated food source. The PFGE technology can be effectively applied in tracing suspected sources of food contamination and in investigating food-poisoning with molecular epidemiology.

Key words: *Salmonella enteritidis*; pulsed-field gel electrophoresis; food-poisoning; molecular epidemiology; molecular subtypes

肠炎沙门菌(*Salmonella enteritidis*, SE)是沙门菌常见的血清型之一,具有广泛寄主谱,对人和禽的分离率较高,主要引起人类肠炎和食物中毒。英国的一项调查表明,SE和鼠伤寒沙门菌(*S. typhimurium*)感染占人类沙门菌感染病例的75%以上^[1]。据统计,在我国由SE引起微生物食物中毒占有很大比例^[2]。目前,食物中毒的流行病

学调查基本上依赖详细评价阳性案例和一批适当的对照,确定调查与特殊疾病的关联因素,而可靠的感染病菌分型是流行病学调查成功的关键^[3]。但在针对同一血清型的不同菌株的鉴定时,传统的实验室方法无能为力^[4]。近年来,以脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)技术为基础的分子生物学分型方法广受重视,在国外被广泛应用于菌种的分子流行病学研究。

2009年初,在广西两个不同行政县的D乡和P镇同一天内均发生群体性腹泻事件,事件发生的两地相距210多公里,经两地卫生机构各自调查及实

收稿日期:2010-10-18

基金项目:广西科学研究与技术开发计划(桂科攻0592007-4)

作者简介:黄彦 男 主管技师 研究方向为微生物检验及分子生物学 E-mail:huangyanx@163.com

实验室检测结果表明,两事件均是由宴会食物被肠炎沙门菌污染所致,并且两地的疾病预防控制中心从患者肛拭和剩余食物样品中共检测分离到8株肠炎沙门菌。为了探讨两起事件被污染食品可能存在的关系,本研究运用 PFGE 对所分离到的8株肠炎沙门菌进行分子分型,比较其遗传差异,通过分析分离株的分子流行病学关系,甄别此两起食物中毒事件之间及可疑食物之间的关联。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

2009年D乡和P镇发生的食物中毒患者肛拭和宴会中的剩余食物分离到的肠炎沙门菌菌株,见表1。

表1 8株肠炎沙门菌来源

Table 1 The source of 8 *Salmonella enteritidis* strains isolated from food-poisoning accidents

分离地点	菌号	分离物
D乡	gx200901	患者1肛拭
	gx200902	患者2肛拭
	gx200903	剩余小炒
P镇	gx200904	剩余煎蛋
	gx200905	剩余竹笋
	gx200906	患者3肛拭
	gx200907	患者4肛拭
	gx200908	剩余食品

1.2 主要试剂

沙门菌显色平板为 CHROMagar 生产。细菌鉴定用生物梅里埃公司的 API 20E。沙门菌诊断血清购自宁波天润。限制性内切酶 Xba I 购自 Takara 公司。脉冲场电泳用琼脂糖 SeaKem Gold (SKG) 为 CMBREX 公司生产。蛋白酶 K 为 MERCK 公司产品。十二烷基肌氨酸钠、Tris base、EDTA、硼酸等均为 Sigma 公司产品。以上培养基和试剂均在有效期内使用。

1.3 仪器

脉冲场凝胶电泳仪为 BIO-RID 公司的 CHEF MAPPER 脉冲场凝胶电泳仪,凝胶成像系统为 BIO-RID 公司产品,比浊仪 bioMerieux Vitek colorimeter 为法国梅里埃产品。

1.4 方法

1.4.1 试验用菌株的鉴定

8株肠炎沙门菌按 GB 4789.4—2008^[5]进行鉴定,用 API 20E 生化鉴定卡进行生化鉴定,并用沙门菌诊断血清进行血清分型。

1.4.2 DNA 指纹图谱分型方法

参照美国 CDC 提供的 O157、非伤寒沙门菌和志贺菌 PFGE 分子分型标准操作方法^[6]进行。

1.4.2.1 胶块的制备

将肠炎沙门菌菌体和分子量标准株包埋后使细胞在胶块中原位裂解,洗涤胶块后用 XbaI 限制性内切酶进行酶切。处理好的胶块待进行脉冲场电泳。

1.4.2.2 脉冲场电泳

将酶切后的样品胶置于样品梳上,确保所有胶块在一条线上,从胶槽下部中央缓慢倒入 100 ml 融化 1% SKG。冷却 20 min 后,拔去样品梳,去除挡板,将胶块放入电泳槽中。加入 2.2 L 0.5 × TBE,关上盖子,设置电泳参数。电泳条件: Auto Algorithm 程序,30 kb 低分子量,700 kb 高分子量,时间为 20 h,电泳温度 14 °C。

1.4.2.3 染色读胶

电泳结束后,将凝胶取出,0.1 μg/ml 的 EB 染色 20 min,于纯水中脱色 30 min,读胶仪成像保存。

1.4.3 指纹图谱的聚类分析

将8株肠炎沙门菌进行脉冲场电泳产生的图谱用 Bionumerics 5.1 软件导入指纹图谱库,运用该软件的 clustering 功能,根据条带的差异,用 UPGMA 算法进行聚类分析。

2 结果

2.1 菌株鉴定结果

8株分离株在 CHROMagar 沙门菌显色平板上为紫红色典型菌落,API 20E 生化试验结果符合沙门菌的生化特征,经诊断血清学鉴定均为肠炎沙门菌。

2.2 脉冲场电泳结果

8株肠炎沙门菌菌株经 Xba I 原位酶切,经 20 h 的脉冲电泳后,在 20 ~ 1100 kb 范围产生了 14 和 15 条片段条带,部分菌株的脉冲场电泳结果见图 1。将 8 株肠炎沙门菌脉冲场电泳指纹图谱导入 Bionumerics,并进行聚类分析,8 株肠炎沙门菌可分为 A、B 两个分子型;D 乡分离的 5 株 SE 无论是患者或是剩余食品来源菌株或是两者之间的指纹图谱完全相同,聚类分析相似度为 100%,这 5 株肠炎沙门菌在 PFGE 分子分型的层面上没有遗传差异,为同一来源的菌株,归为同一分子型 A;P 镇的 3 株图谱也一致,聚类分析相似度也为 100%,归为另一个分子型 B;A 型和 B 型菌株 DNA 指纹图谱之间存在 4 个条带的差异,该两起食物中毒肠炎沙门菌分离株在 PFGE 分型的层面上是存在遗传差异的,聚类显示两型之间的相似度为 87.5%。聚类分析结果见图 2。

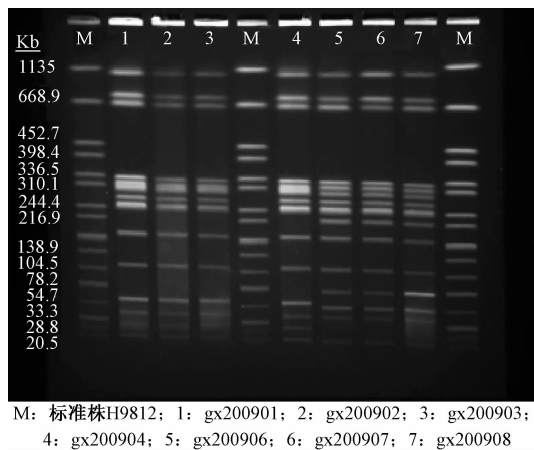


图1 部分肠炎沙门菌分离株 PFGE 分析图

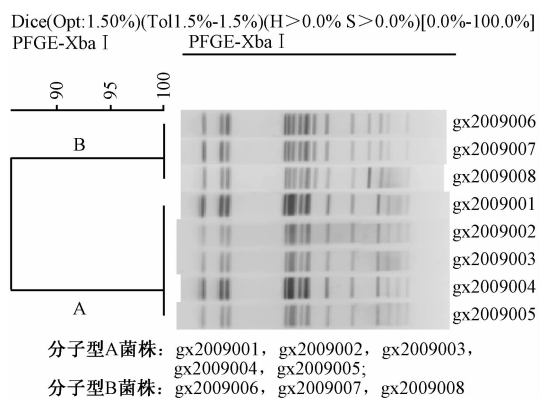
Figure 1 PFGE pattern of partial *S. enteritidis* isolated from food-poisoning accidents

图2 2起食物中毒肠炎沙门菌分子分型聚类图

Figure 2 Molecular subtypes of *S. enteritidis* isolated from food-poisoning accidents

3 讨论

沙门菌的分型方法很多,传统方法主要是根据细菌的一些表型特征(如血清学)分型,但对于同一血清型的沙门菌之间的关联还需要依附其他技术进一步分型;也有使用噬菌体进行分型的,但是由于噬菌体分离困难,不同血清型沙门菌需要对应使用不同的噬菌体进行分型,应用极为受限,难以推广。DNA是生物体最稳定的遗传物质,细菌的二分体繁殖使得子代和母代有着相同DNA,基于DNA结构研究的PFGE方法,被运用于分子流行病学中,为确定菌株之间的亲缘关系,提供了可靠的技术手段^[7]。与其他分型比较,PFGE能够对整个染色体进行分析,具有结果稳定、区分能力强、重复性好、易于标准化等优点,能够实现不同实验室之间的同源性比对,因此美国疾病预防控制中心及其他发达国家都建立以PFGE为基础的PulseNet国家分子分型网络体系。本实验室因为只有10个样孔的梳子,因此菌株gx200905和其余的7株肠炎沙门菌不是在同一时间同一块胶上跑的电泳,但由于采用相同

的标准操作规程,获得的PFGE电泳图谱重现性好,导入Bionumerics 5.1软件图谱库后可比性强,充分体现了PFGE分子分型的优势。近年,中国由中国疾病预防控制中心牵头,也建立了以PFGE为基础的PulseNet-China分型网络,用于传染病的网络监测,为细菌的流行病学监测带来生机。但现阶段PulseNet-China网络的建设、信息的及时性和共享仍有待完善,而PulseNet-China网络在食物中毒和食源性致病菌的溯源分析、预测预警的应用更是有待推广与发展。

近年来,随着食品加工趋向规模化,发达的物流业使得各国食品得以在全球范围内流通,由微生物引起的食源性疾病可能会在多地同源暴发,或是同一种被污染的食品导致各地表现为不相关的散发。因此推广常见食源性致病菌的PFGE分析技术,建立起区域性网络实验室,及时将从食品或/病人中分离到的病原株进行分型分析,并将分析结果及时传送到国家网络图谱库进行比对,发现食源性疾病的发生与发展趋势,及时查明疾病起因与污染源,才能更有效地从源头控制微生物食源性疾病的发生。本研究正是通过运用PFGE技术,将D乡和P镇暴发的食物中毒肠炎沙门菌分离株进行分子分型,开展分子流行病学调查。通过对相距210多公里的D乡和P镇发生的肠炎沙门菌引起的食物中毒分离株联合调查、PFGE分型比对发现两地食物中毒分离株之间的相似度为87.5%,在PFGE分型层面上存在有遗传差异,属两个不同的分子型,提示引起中毒事件的肠炎沙门菌并非同一来源,从而可以成功地断定这两起同期暴发的食物中毒为孤立的事件。该研究案例说明,通过PFGE分子分型可以很好地为食物中毒提供可靠的流行病学依据,而且更重要的是PFGE分子分型调查可以为一些散发的事件或是同期异地暴发的事件或是不同时期的细菌性感染事件之间的关联性提供准确客观的证据。

遗憾的是,在这两起食物中毒事件的调查与处理过程中,对食品可能存在的原材料污染链重视不足,未能对相关食物链样品进行有效的采样与检测,无法追踪到导致食物被污染的源头,使得潜在的危险仍然存在,因此只能被动地通过隔离、查封可疑食物和可能的途径来消除可能的隐患,没能真正地做到从源头上消除隐患。要很好地控制食源性疾病与食物中毒事件,预防是关键,因此在加大食品安全教育力度,提高民众食品卫生意识的同时,监督和检测部门应充分利用快速检测技术与准确溯源技术,对食物的加工过程——从农场到餐桌

的各个环节,进行严格的监控与监测。利用 PFGE 技术建立起常见食源性病原 DNA 指纹图谱库,及时将监测过程分离到的病原进行分析并应用因特网将结果传送到数据库,以发现散发病例成簇现象,评估流行趋势,及早发出预警,做好预防,消除隐患,有效地防止大面积食源性疾病的发生,保障食品安全。

参考文献

[1] HARDY J. Salmonelle:a contuinuing problem[J]. Postgrad Med J, 2004,80:541-545.

[2] 王世杰,杨杰,谌志强,等. 1994-2003 年我国 766 起细菌性食物中毒分析[J]. 中国预防医学杂志,2006,7(3):180-184.

[3] WELLOR T M A. Methicillin-resistant staphylococcus aurous ty-ping methods:which should be the international standard? [J].

Hosp Infect,2000,44(2):160-172.

[4] 李燕俊,赵熙,杨宝兰,等. 肠炎沙门氏菌脉冲场凝胶电泳分型研究[J]. 卫生研究,2005,34(3):338-340.

[5] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 4—2008 食品卫生微生物学检验沙门氏菌检验[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

[6] One-Day(24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of Escherichia coli O157: H7, Salmonella serotypes, Shigella sonnei, and Shigella flexneri by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) [EB/OL]. [2010-01-15]. http://www.pulsenetinternational.org/SiteCollectionDocuments/pfge/5%201_5%202_5%204_PNetStand_Ecoli_with_Sflexneri.pdf.

[7] LUKINMAA S,TAKKUNEN E,SITONEN A. Molecular epidemiology of Clostridium perfringens related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999 [J]. Appl Environ Microbiol,2002,68(8):3744-3749.

《中国食品卫生杂志》2012 年征稿征订启事

《中国食品卫生杂志》为中华预防医学会系列杂志,为中文核心期刊、国家科技部中国科技核心期刊,被中国知网(CNKI)全文收录。

所设栏目有:专家述评、论著、研究报告、实验技术与方法、监督管理、调查研究、食品安全标准、食物中毒、综述等。通过本刊可以及时掌握食品卫生领域的最新科研动向、食品安全监管、食品安全事故处理以及国内、国际有关食品卫生的政策、法律法规和标准等最新信息。

高质量的论文优先发表。

《中国食品卫生杂志》为双月刊,96 页,逢单月末出版,公开发行。2012 年定价每期 18 元,全年售价 108 元(含邮费)。欢迎大家投稿、订阅,编辑部常年办理过刊邮购。

投稿网址:<http://www.zgspws.com>

联系邮箱:spws462@163.com

邮局订阅:邮发代号 82-450

邮购地址:北京市宣武区南纬路 29 号 462 室 《中国食品卫生杂志》编辑部

邮 编:100050 电话/传真:(010)83132658

银行汇款:工商银行北京潘家园支行 账 号:0200022709008904285

户 名:中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。汇款时请注明“《中国食品卫生杂志》邮购款”或“《中国食品卫生杂志》版面费”。