

食物中毒

同一肇事地不同餐次食物中毒现场流行病学调查及肠毒素基因鉴定

孙延斌¹,程金国²,刘辉¹,王希提³,刘铁诚¹,刘守钦¹,张济¹

(1. 济南市疾病预防控制中心,山东 济南 250021; 2. 济南市市中区疾病预防控制中心,山东 济南 250002; 3. 济南市槐荫区疾病预防控制中心,山东 济南 250022)

摘要:目的 查明本次食物中毒发生的原因,确认致病危害因素及其来源,控制暴发的扩散和蔓延。方法 采用现场流行病学调查方法,开展病例搜索和个案调查,并采集相关样本进行实验室检测及肠毒素基因鉴定。运用流行病学曲线推算潜伏期范围,确定中毒餐次和中毒食品。结果 共搜索确诊中毒病例 27 例,主要临床特征为恶心、呕吐、腹泻,部分病例伴腹痛、头痛、头晕等。中毒餐次为 2014 年 12 月 10 日的午餐和晚餐,中毒食品为烤肉拌饭,致病因子为金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素。烤肉中分离的金黄色葡萄球菌菌株间 PFGE 图谱相似度 100%,具有同源性;RT-PCR 鉴定毒素基因为 A 型肠毒素。结论 发生在同一肇事地不同餐次由金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素引起的食物中毒,交叉污染是金黄色葡萄球菌污染来源最重要的传播方式,应加强餐饮行业监管和关键环节控制,防止类似事件的再次发生。

关键词:现场流行病学调查;流行病学曲线;金黄色葡萄球菌;A 型肠毒素;脉冲场凝胶电泳;实时荧光 PCR;烤肉;交叉污染;食物中毒;鉴定

中图分类号:R155.5;R181.2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)01-0119-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.01.027

Field epidemiological investigation and enterotoxin gene identification of food poisoning caused by different meal times from the same accident unit

SUN Yan-bin, CHENG Jin-guo, LIU Hui, WANG Xi-ti, LIU Tie-cheng, LIU Shou-qin, ZHANG Ji (Jinan Center for Disease Control and Prevention, Shandong Jinan 250021, China)

Abstract: Objective To find out the cause of a food poisoning event, identify the source of infection and risk factors and to control the spread of outbreak. **Methods** Case research and investigation were carried out adopting the method of field epidemiological investigation. Samples were collected for laboratory test and enterotoxin gene identification. Incubation period was calculated by epidemiological curves to identify the poisoning meal time and food. **Results** Nausea, vomiting and diarrhea occurred predominantly in 27 confirmed poisoning cases, accompanied by abdominal pain, headache and dizziness in some cases. The poisoning meal time was lunch and supper in December 10th, and the poisoning food was barbecue rice. The cause of the disease was *Staphylococcus aureus* enterotoxin A. The similarity of PFGE pattern between strains of *Staphylococcus aureus* was 100%, sharing high homology. Toxin genes were confirmed as enterotoxin A by RT-PCR. **Conclusion** The food poisoning occurring in the same place at different meal times was caused by *Staphylococcus aureus* enterotoxin A. Cross contamination was the most important factor of transmission of *Staphylococcus aureus*. Supervision should be strengthened in critical control point for restaurants to avoid recurrence of similar incidents.

Key words: Field epidemiology investigation; epidemiological curves; *Staphylococcus aureus*; enterotoxin A; pulse-field gel electrophoresis; real-time fluorescence PCR; roasted meat; cross-contamination; food poisoning; authenticate

2014 年 12 月 10 日晚,济南 A 大学部分学生出现恶心、呕吐、腹泻等疑似食物中毒症状,为查明事故发生原因,确定影响范围及危害因素,判定事故对暴露人群的健康危害等,在接到卫生行政部门开

展事故调查的指令后,济南市疾病预防控制中心协同市中区、槐荫区疾病预防控制中心立即成立事故应急处置组,对肇事地和两家就诊医院开展了暴露人群流行病学调查、危害因素调查和实验室检测等。

收稿日期:2015-05-27

作者简介:孙延斌 男 主任医师 研究方向为营养与食品安全
E-mail:shipinsyb@163.com

通信作者:张济 男 主任医师 研究方向为突发事件应急管理
E-mail:zhangji1967@163.com

1 对象与方法

1.1 对象

2014 年 12 月 10 日,在济南 A 大学西校区东海厅 8 号窗口食用过中餐或晚餐的所有暴露学生为搜

索调查对象,包括医院就诊病例和未就诊者。

1.2 方法

1.2.1 病例定义

2014 年 12 月 10 日中餐或晚餐,凡在该校西校区东海厅 8 号窗口食用过烤肉拌饭,且出现恶心、呕吐、腹痛和腹泻(≥ 3 次/24 h 且大便性状改变)等症状者,判定为疑似病例。烤肉或呕吐物中培养分离出金黄色葡萄球菌并检出肠毒素,且患者符合疑似病例定义要求者,判定为确诊病例。

1.2.2 暴露人群流行病学调查方法

病例搜索与个案调查相结合并同时开展。就诊病例采用询问两家医院接诊医生,查阅 3 日内门诊日志、检验报告等方法,搜索符合病例定义者。对未就诊者通过设立调查电话,由校医、辅导员或餐厅管理人员向在校学生发布有关信息,搜索疑似病例。

根据暴露人群的不同特点,个案调查选择面访调查、自填式问卷调查和电话补充调查相结合的 3 种方式开展。现场流行病学调查使用统一的个案调查表,并采用一览表记录病例发病时间、临床表现和饮食史等信息。

1.2.3 危害因素调查方法

采用访谈相关人员、查阅相关记录和现场勘察等方式进行。访谈对象包括餐厅负责人、现场加工制作人员和学校管理人员等。查阅可疑食品进货记录、销售记录等资料;查看设备维修、清洁消毒记录,食品加工人员的健康证件和出勤记录等。重点勘查现场操作环境、加工过程以及食品原材料、成品和剩余食品的存放,了解烘烤关键环节的时间、温度等。在访谈和查阅资料基础上,绘制加工工艺流程图,找出可能存在危害的关键环节和危害因素。

1.2.4 可疑餐次和可疑食品推断

根据调查病例的临床表现、饮食史和描述性流行病学分布特征,进行流行病学结果统计分析,并绘制流行病学曲线图。采用世界卫生组织(WHO)推荐的方法估计可能暴露时间,推算潜伏期范围,对可能引起事故的致病因子范围、可疑餐次和可疑食品做出判断^[1-2]。

1.2.5 样本采集和实验室检测

采集的样本包括病例呕吐物、病例剩余食物、餐厅留用样品和加工用具等。依据国家卫生检验标准^[3]对采集的样本进行沙门菌(GB 4789.4—2010)、蜡样芽胞杆菌(GB/T 4789.14—2003)、空肠弯曲菌(GB/T 4789.9—2008)、金黄色葡萄球菌(GB 4789.10—2010)、致泻性大肠埃希菌(GB/T 4789.36—2003)分离培养。采用脉冲场凝胶电泳

(PFGE)和实时荧光聚合酶链式反应(RT-PCR)等分子分型技术对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及其肠毒素(*Staphylococcus enterotoxins*,SEs)进行菌株同源性比对和基因型鉴定。

2 结果

2.1 病例搜索和描述性分析

共搜索到在该校东海厅 8 号窗口食用中餐和晚餐的暴露学生 280 例,确诊病例 27 例,罹患率为 9.6% (27/280)。其中食用中餐中毒病例 9 例,晚餐 18 例。27 例病例全部来自济南 A 大学在校学生,发病急且病程短,病例年龄在 18~23 岁之间,男女比例为 2.86:1 (20/7),分散分布于不同专业、年级和班级,居住地无明显的聚集性。临床表现基本相同,主要为恶心、呕吐、腹泻,部分病例伴腹痛、头痛头晕等,见表 1。其中剧烈地反复呕吐症状最为突出,多达 20 次/24 h,5 次及以上患者达 17 例;腹泻多呈稀便,最长达 8 次/24 h,5 次及以上患者 8 例;腹痛主要集中在中、上腹部,呈痉挛性疼痛;1 例发热病例(体温 38.3 ℃)与偶合感染有关。所有就诊病例均给予保护胃粘膜、抗炎、对症和补液治疗,如兰索拉唑、左氧氟沙星、奥硝唑以及补充维生素 C、维生素 B 等。病情恢复较快,当日基本痊愈,无住院病例,也未出现重症、死亡和续发病例。

表 1 27 例病例临床表现分布

Table 1 Distribution of clinical features of 27 cases		
症状/体征	病例数/例	比例/%
呕吐	26	96.3
恶心	24	88.9
腹泻	24	88.9
腹痛	10	37.0
头痛头晕	3	11.1
发热	1	3.7

2.2 可疑餐次和可疑食品推断

首例发病时间为 2014 年 12 月 10 日 14 时,末例发病时间为当日 23 时 30 分,发病时间主要集中在 14:00~17:00 和 20:00~23:30 时间段内,病例发病流行病学曲线呈双峰状,提示该中毒事故存在两个暴露时间,为持续同源多餐次暴露模式。根据每个时间段发病时间的中位数和每个时间段首、末例发病时间间隔,推算的平均潜伏期分别为 3 和 4 h,推断的暴露时间为 2014 年 12 月 10 日的中餐和晚餐(见图 1),表明本次食物中毒与中、晚餐存在关联。

进食情况调查结果显示,发病病例均为网上订餐者,且具有共同进食暴露史,即分别在中餐或晚餐食用过该餐厅销售的烤肉拌饭,但无两个餐次共同进食者。餐厅打卡销售记录表明,外卖用餐者全

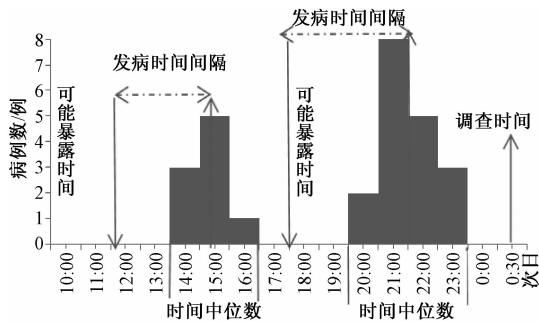


图1 济南A大学食物中毒病例发病时间流行曲线
Figure 1 Epidemic curve of onset time for food poisoning of A university in Jinan

部发病,网上订餐者就餐时间较早者发病,而相对较晚者未发病。也就是说,烤肉拌饭是主要的可疑食物,与本次食物中毒存在明显的关联性,引起中毒风险高。

2.3 危害因素调查结果

该餐厅加工销售场所较小,仅为 15 m² 左右,无就餐场所和原料库等。长期使用市政公共自来水,现场未发现循环用水作业,水污染的可能性较小。操作环境卫生一般,无烘烤关键环节的时间、温度等记录和设备维修、清洁消毒记录。生、熟烤肉混放,制作过程存在严重的交叉污染的可能。主要烤肉原料为脱骨鸡腿,无进货票据,腌制鸡肉的配方液体存在循环使用或清洁消毒不彻底的迹象。现场加工销售人员两人,均有健康证,未发现渗出性、化脓性疾病。另外,该餐厅否认有剩余烤肉的存在,现场勘查也未发现。

该餐厅仅加工销售烤肉拌饭一种食品,以米饭(湿重约 300 g)、烤鸡肉(约 80 g)为主料,再加入适量的黄瓜丝和粉剂调味料等配料即成。采用现场销售和价格相对便宜的网上订餐两种方式经销,中餐销售烤肉拌饭 180 份,其中网上订餐 70 份(含外卖 3 份);晚餐销售 100 份,网上订餐 34 份(含外卖 4 份)。烤肉制作工艺流程为每次将 20 kg 左右的鸡腿清洗,加入配料腌制 10~12 h 后,在旋转式烤肉架上烤制 10~20 min,温度约为 250~300℃。烤熟一层切一层薄肉片,提前约 1~2 h 将熟肉容器放置于烤炉顶端保温待售,温度保持在 30℃ 以上。米饭采用多功能蒸车蒸煮,提前一小时加工完成待售。

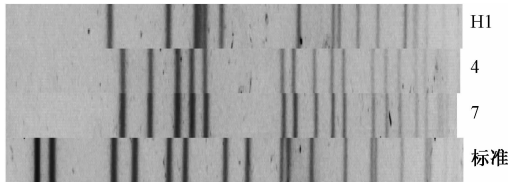
2.4 实验室检测结果

现场共采集样本 10 份。其中病例呕吐物 1 份、病例剩余烤肉 1 份;采集餐厅腌制鸡肉、剩余米饭和调料各 1 份;采集烤肉和米饭等餐厅留样样品各 1 份;采集一次性餐盒、蒸饭盒、烤肉签等加工用具涂抹样各 1 份。从病例呕吐物、病例剩余烤肉和腌制鸡肉 3 种样本中培养分离出金黄色葡萄球菌,并

从病例剩余烤肉和腌制鸡肉检出 A 型肠毒素 (SEA),其余样品或样本均未检出致病菌。

2.4.1 PFGE 菌株同源性鉴定

对培养分离出的 3 株金黄色葡萄球菌进行 PFGE 同源性比对分析。4 号(病例剩余烤肉)和 7 号(腌制鸡肉)菌株图谱间的 DNA 条带数量和位置完全一致,相似度 100%,表明两菌株属于同一型别,具有同源性。而 H1 号(病例呕吐物)菌株图谱的 DNA 条带数量和位置与 4 号、7 号菌株图谱均不相同,不属同一型别亦无同源性。换言之,从食品和病例呕吐物中分离出的金黄色葡萄球菌分属不同来源,见图 2。



注: H1 表示病例呕吐物;4 表示病例剩余烤肉;7 表示腌制鸡肉

图2 金黄色葡萄球菌 PFGE 图谱

Figure 2 PFGE map of *Staphylococcus aureus*

2.4.2 实时荧光 PCR 肠毒素基因分型

对 3 株金黄色葡萄球菌进行 SEA、D 型肠毒素 (SED)基因型检测。4 号和 7 号菌株肠毒素基因型均为 SEA, H1 号菌株未检测出 SEA、SED 肠毒素基因型,见图 3。

3 讨论

金黄色葡萄球菌在自然环境中分布广泛,人和动物的鼻腔、咽喉、消化道带菌率较高,健康的人带菌率约为 20%~30%,上呼吸道感染患者鼻腔带菌率高达 83%。各类食物尤其熟肉制品、乳及乳制品、蛋及蛋制品等是金黄色葡萄球菌生长繁殖的最佳介质和传播载体,受到污染的概率高,由 SEs 引起的暴发中毒事故也较多。如 1986 年、1992 年美国因土耳其烤禽肉和鸡肉沙拉污染分别暴发了 67 人和 16 所小学 1 364 人的中毒事件^[4-5],1998 年巴西因食用 SEA 污染的烤肉暴发了 4 000 人的中毒事件^[6],2009 年在法国的不同地区发生了 6 起由 E 型肠毒素 (SEE)引起的中毒事件^[7],2000 年日本因乳制品污染暴发了万人以上大规模中毒事件^[8],我国每年发生此类中毒事件的通报也较多^[9]。因此,无论在发达国家还是在发展中国家金黄色葡萄球菌仍是引起细菌性食物中毒的重要病原菌之一。结合本次现场流行病学调查结果、病例特有的临床表现和实验室检验结果,按照 GB 14938—1994《食物中毒诊断标准及技术处理总则》和 WS/T 80—1996

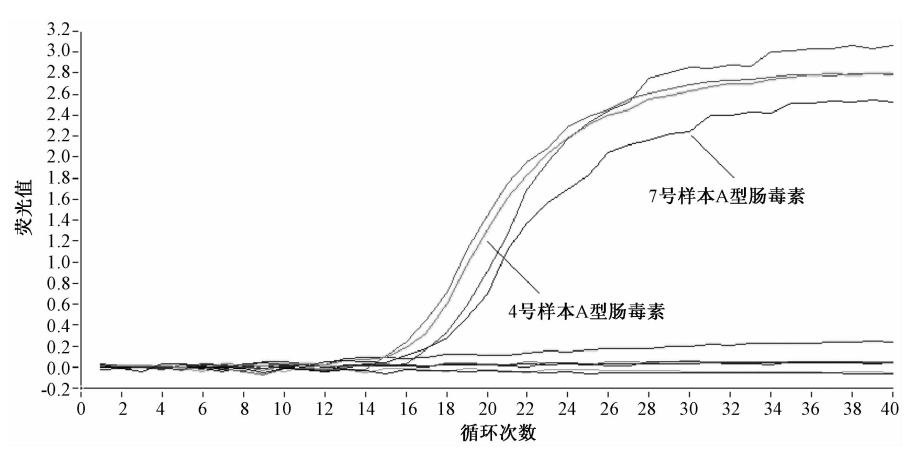


图3 金黄色葡萄球菌肠毒素实时荧光 PCR 测定图谱
Figure 3 Real-time PCR detection map of *Staphylococcus enterotoxins*

《葡萄球菌食物中毒与诊断标准及处理原则》相关诊断标准^[10],判定本起事故是由 SEA 引起发生在同一肇事地不同餐次的食物中毒。

危害因素调查证据显示,现场加工销售人员在处理剩余烤肉过程中,穿插处理腌制鸡肉,且刀具、案板等加工用具交替使用,加上清洗消毒又不彻底,以及腌制鸡肉的配方液体循环使用,生、熟烤肉混放等,意味着各加工处理环节存在严重的交叉污染,综合导致了剩余烤肉污染机会的增多。金黄色葡萄球菌在温度 30~37℃、pH=7~7.5 的适宜条件下,经 3~5 h 以上的繁殖,易产生大量的肠毒素^[11]。被污染的剩余烤肉至下一餐的食用时间恰好为 4~5 h 以上,与金黄色葡萄球菌繁殖、产毒强而多的时间点基本吻合。由此可以推定,交叉污染是金黄色葡萄球菌最主要的污染传播方式。

调查过程中还发现,所有病例均为网上订餐的学生,部分网上订餐者的外卖送餐时间早于正常销售时间,且外卖用餐者全部发病;另一部分病例来源于自取时间较早的网上订餐者,而相对较晚者未发病,提示早期售卖的烤肉拌饭为污染来源,而后期新加工的烤肉拌饭并未引起食用者发病。据此进一步推断,该餐厅存有其否认的前一餐次剩余的烤肉,并且将剩余烤肉单独留用,未彻底加热专门销售给了价格相对便宜的部分网上订餐者食用。也就是说,导致本次食物中毒可能性最大的风险食品是前一餐次的剩余烤肉。

金黄色葡萄球菌致病力的强弱主要取决于其产生肠毒素的量和型别,而肠毒素则是确诊食物中毒致病因子的重要依据。相关文献研究表明^[11-12],金黄色葡萄球菌产毒量与食物受其污染的程度呈正相关,通常正常人摄入约 0.1 μg 浓度的肠毒素就会引起中毒,其潜伏期长短取决于肠毒素型别和摄入量^[13-14]。目前为止,发现并证实能引起食源性疾

病的肠毒素血清型已超过 20 型^[13-14],包括 SEA、SEB、SEC(C1、C2、C3)、SED 和 SEE 等,以 SEA 毒力最强,SEA 和 SED 引起的食物中毒最为常见。据欧洲食品安全管理局(EFSA)统计^[14],2007—2008 年欧盟(EU)共报告了由细菌毒素引起的食物中毒 983 起,其中 549 起致病因子确诊为 SEs 基因型;在美国,SEs 引起的食物中毒占整个细菌性食物中毒的 33%,其中 SEA 占 77.8%,SED 占 37.5%,SEB 占 10.0%^[15],而我国肠毒素分型的相关报道则相对较少。本次 PFGE 和 RT-PCR 分型测定结果表明,病例呕吐物分离出的金黄色葡萄球菌不含 SEA、SED 肠毒素,可能是一种非致病性的自身携带菌,而暴露于食品中的 SEA 是导致本次食物中毒发生的毒素型别。从对食物中毒做出诊断结论的角度看,虽然病例呕吐物中未检出而食品中检出 SEA,且菌株不具有同源性,理论上确证暴露与中毒的因果关系尚不充分,但不影响食物中毒的诊断结论。按 WS/T 80—1996 诊断标准规定的患者吐泻物或中毒食品中,其中一项符合即可判定为葡萄球菌中毒的原则要求,故本次事故做出食物中毒的诊断结论是毋庸置疑的。这一点充分反映了检测 SEs 对做出食物中毒病因结论的重要性,另一方面也进一步证实了 PFGE 和 RT-PCR 检测技术方法具有溯源性,可以用来跟踪相关致病菌的污染来源。

研究证实^[14],SEs 具有高耐热和耐冷冻、干燥等环境条件的特性,可耐受 100℃煮沸 30 min 而不被破坏,并能抵抗胃肠道中蛋白酶的水解作用;加热 100℃持续 2 h 食物中存在的肠毒素方可破坏。被产肠毒素金黄色葡萄球菌污染的食品,经 -18℃低温冷藏 9 个月,其含量呈一定程度的减少,但食品中仍含有相当数量的存活菌,并且不影响其产毒能力^[16],表明 SEs 稳定性极强,控制肠毒素繁殖、破坏肠毒素结构极为困难。但是,本次调查烤肉的烤制

温度为 250 ~ 300 ℃ ,时间为 10 ~ 20 min ,且食用当餐次现制烤肉者皆未发病 ,是否说明该温度和时间可破坏肠毒素的基因结构 ,尚需进一步验证。

采用现场流行病学调查分析方法来确定中毒人数 ,推断可疑餐次及可疑食物是行之有效的 ,是目前国内外通常采用的调查方法^[1-2,17] ,但由于受到人为因素的干扰和客观因素的限制 ,本调查存在一定的局限性和不确定性。一是现场未能及时采集到患者吐泻物、肛拭子样本 ,与食品样本中检出的菌株进行同源性验证 ,其证据缺乏充分性 ;二是由于现场调查、采样等与餐饮食品加工之间存在一定的滞后时间差 ,多数情况下当餐次使用的刀具、案板等已被清洗 ,难以采集到加工用具的涂抹样品 ,确定交叉污染途径来源极为困难 ;三是暴露因素调查主要依靠暴露人群的回顾记忆 ,易产生回忆性偏倚。

特别需要强调的是 ,近年来在国内外病原微生物领域 ,PFGE 和 PCR 等分子生物学方法应用广泛 ,主要运用 DNA 指纹技术原理 ,从分子水平上进行定性定量测定分析 ,判定各菌株间的亲缘关系和关联强度 ,是当前追踪致病微生物来源最有效的技术手段^[18-19]。基于目前我国由病原微生物引起食物中毒实验室病因确诊率较低的现状 ,应加大分子流行病学方法在病因诊断方面的应用和推广 ,从根本上弥补溯源证据不足的缺陷 ,提高食物中毒病因诊断的鉴定能力和准确可靠性。

参考文献

[1] 赵同刚,马会来. 食品安全事故流行病学调查手册[M]. 北京:法律出版社,2013.

[2] 周祖木,仝振东,魏承毓,等. 食源性疾病暴发:调查和控制指南(WHO)[M]. 北京:人民卫生出版社,2009.

[3] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验标准汇编[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

[4] U. S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Staphylococcal food poisoning from turkey at a country club buffet-New Mexico[J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 1986,35(46):715-722.

[5] U. S. Food and Drug Administration. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook *Staphylococcus aureus*[EB/OL]. (2010-12-29) [2015-03-01]. [http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/Causes Of Illness](http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/Causes%20Of%20Illness)

Bad Bug Book/ucm070015. html.

[6] Do Carmo L S,Cummings C,Linardi V R,et al. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident[J]. Foodborne Pathogens and Disease,2004,1(4):241-246.

[7] Ostyn A,De Buyser M L,Guillier F,et al. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009[EB/OL]. (2010-04-01) [2015-03-01]. [http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V15N13/art19528. pdf](http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V15N13/art19528.pdf).

[8] Asao T,Kumeda Y,Kawai T,et al. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk[J]. Epidemiology and Infection, 2003, 130 (1): 33-40.

[9] 罗海波,何来英,叶伟杰,等,2004—2013 年中国大陆食物中毒情况分析[J]. 中国食品卫生杂志,2015,27(1):45-49.

[10] 卫生部卫生监督中心. 食品卫生标准及相关法规汇编(上) [S]. 北京:中国标准出版社,2005.

[11] Le Loir Y,Baron F,Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning[J]. Genetics and Molecular Research, 2003, 2 (1): 63-76.

[12] Everson M L,Hinds W M,Bernstein R S,et al. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk[J]. International Journal of Food Microbiology,1988,7(4):311-316.

[13] Argudin M A,Mendoza M C,Rodicio M R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins[J]. Toxins, 2010, 2 (7): 1751-1773.

[14] Hennekinne J A,De Buyser M L,Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36 (4): 815-836.

[15] Balaban N,Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins[J]. International Journal of Food Microbiology,2000,61(1):1-10.

[16] 吴仲梁,江蕙琪. 产毒金黄色葡萄球菌在低温贮藏食品中的存活及其产毒情况[J]. 上海畜牧兽医通讯,1996(1):20-21.

[17] 中华人民共和国卫生部. 卫生部办公厅关于印发《食品安全事故流行病学调查技术指南(2012 年版) 》的通知(卫办监督发[2012] 74 号) [Z]. 2012-06-07.

[18] 张红芝,朱召芹,陈海丽,等. 金黄色葡萄球菌食品分离株肠毒素基因分布及分型研究[J]. 中国食品卫生杂志,2012,24(5):417-420.

[19] Letertre C,Perelle S,Dilasser F,et al. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej* [J]. Molecular and Cellular Probes,2003,17(4):139-147.