

研究报告

一起纽波特沙门菌引起的食物中毒检测及菌株同源性分析

金建潮¹, 曹春远¹, 何春荣¹, 林英华¹, 廖琳虹¹, 张景平^{1,2}, 陈前进^{1,2}

(1. 龙岩市疾病预防控制中心, 福建 龙岩 364000; 2. 福建医科大学龙岩市疾病预防控制中心教学点, 福建 龙岩 364000)

摘要:目的 运用脉冲场凝胶电泳(PFGE)对一起食物中毒事件中分离的菌株进行同源性分析,为查明事件原因提供依据。方法 采集患者、食品加工人员和剩余食物样本进行病原分离及鉴定,对分离到的菌株进行PFGE及耐药性分析。结果 从采集的13份样本中检出4株纽波特沙门菌,其中1株来自病人样本,1株来自食品加工人员(厨师)样本,剩余牛肉、鸭肉各1株。4株菌株经PFGE分析,同源性为100%。4株分离菌株耐药谱相同。结论 此次食物中毒由纽波特沙门菌引起,PFGE分型揭示菌株之间的流行病学联系,为事件的分析和溯源提供分子流行病学证据。

关键词:食物中毒; 纽波特沙门菌; 耐药性; 脉冲场凝胶电泳; 分型; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)02-0172-03

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.02.007

Determination, traceability and homology analysis of a food poisoning case caused by *Salmonella* Newport

JIN Jian-chao, CAO Chun-yuan, HE Chun-rong, LIN Ying-hua,

LIAO Lin-hong, ZHANG Jing-ping, CHEN Qian-jin

(Longyan Center for Disease Control and prevention, Fujian Longyan 364000, China)

Abstract: Objective Using pulsed field gel electrophoresis for the separation of food poisoning strain for homology analysis, and providing a basis to find out the cause and traceability. **Methods** Samples from patients, food processing and leftovers were collected, isolated, identified and PFGE and antibiotic resistance analysis was performed. **Results** Four *Salmonella* Newport strains were detected in 13 samples, which were from the patient, the cooker, the remaining beef, and remaining duck. The PFGE patterns of the 4 strains were identical with the homology of 100%. 4 isolates had to the same resistance spectrum. **Conclusion** The food poisoning was caused by *Salmonella* Newport. PFGE typing techniques revealed epidemiological link between the strains, providing evidence for molecular epidemiological analysis and traceability of events.

Key words: Food poisoning; *Salmonella* Newport; antibiotic resistance; pulsed field gel electrophoresis; somatotype; foodborne pathogenic bacteria; food safety

沙门菌是危害人类与畜禽等动物的一类病原菌,在自然界分布广泛,有2 500多种血清型。沙门菌感染是全球范围内最常见的食源性疾病之一。全球每年有约1 600万例沙门菌感染病例,其中有60万例死亡病例^[1]。美国每年至少有140万例食源性疾病是由沙门菌污染食物引起^[2],并且在与细菌相关的食源

性疾病中,沙门菌感染病例数占总病例数的50%以上^[3]。近年来,美国发生了多起沙门菌感染事件^[4-5],我国沙门菌感染的情况也很严重,沙门菌食物中毒多年来一直居细菌性食物中毒发生数的首位^[6-7]。2014年9月15日,福建省龙岩市L县发生一起由纽波特沙门菌所致食源性疾病暴发疫情,本研究采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型方法对事件中检出菌株进行分子分型和流行病学特征分析。

收稿日期: 2015-12-07

基金项目: 福建省卫生厅青年科研课题项目(2014-1-96); 2014年龙岩市第二批科技项目(2014LY29)

作者简介: 金建潮 男 主管技师 研究方向为微生物检验

E-mail: jinjianchao8565@sina.com

通信作者: 陈前进 男 主任技师 研究方向为传染性疾病预防控制

E-mail: chenqj222@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本

共采集13份样本,其中包括:患者肛拭子6份、

厨师肛拭子 1 份,剩余的牛肉、鸡肉、鸭肉、鱼板、油炸肉球、螃蟹食物样本各 1 份。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 浊度仪、VITEK-II Compact 全自动微生物分析系统均购自法国 bioMérieux, CHEF-DR III 脉冲场凝胶电泳仪、凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad, 水浴摇床。

缓冲蛋白胨水、亚硫酸铋琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂、四硫磺酸钠煌绿增菌液、亚硒酸盐胱氨酸增菌液均购自英国 Oxoid, 沙门菌选择性分离培养琼脂 (HE, 北京陆桥技术有限责任公司), VITEK GN 鉴定卡 (法国 BioMérieux), 沙门菌诊断血清 (泰国 S&A), Seakem Gold Agarose 低熔点琼脂糖 (美国 Cambrex), 蛋白酶 K (德国 Merck), *Xba* I 限制性内切酶 [宝生物工程 (大连) 有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 背景资料调查

2014 年 9 月 15 日中午, 龙岩市 L 县 Q 村某家庭举办婚宴, 约 80 人参加。2014 年 9 月 17 日中午 L 县疾病预防控制中心 (简称为疾控中心) 接到 Q 村卫生院报告, 有多名村民于 2014 年 9 月 15 日中午参加同一起婚宴后, 出现腹痛、腹泄、呕吐等症状。L 县疾控中心流行病学调查人员前往 L 村对参加婚宴人员进行现场调查, 以了解发病者的危险因素, 同时调查可疑食品和加工环境卫生状况, 追踪可疑食品。

1.2.2 菌株分离鉴定

细菌分离鉴定根据 GB 4789.4—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门菌检验》^[8] 进行。对所有样本进行增菌, 接种选择性平板; 在选择性平板上挑可疑菌落, 革兰染色显微镜镜检为 G^- 、氧化酶 (-)、三糖铁琼脂 (K/A) 的菌落, 用 VITEK-II Compact 全自动微生物分析系统进行系统生化鉴定, 确定沙门菌属。沙门菌研究用标准菌株 (ATCC 13076) 由北京陆桥生物技术有限公司提供。

1.2.3 血清学分型及药敏试验

用沙门菌属多价血清进行玻片凝集试验, 呈阳性反应者与该血清所包含的单价血清做凝集, 单价血清呈强凝集者, 根据 Kauffman-White 血清分型标准, 用生理盐水做对照, 确定菌株的血清型别。

根据美国临床实验标准委员会 NCCLS (2012 年版) 推荐的肠杆菌科抗生素, 采用 VITEK II Compact AST-GN08 药敏卡检测, 按照说明书进行操作。

1.2.4 PFGE 分型

参照国际食源性致病菌病原细菌分子分型监

测网络 (PulseNet) 中沙门菌 PFGE 分型的标准操作方法进行, 使用 *Xba* I 限制性内切酶 (50 U), 37 °C 酶切 3 h; 电泳参数 2.2 ~ 63.8 s, 电泳 19 h; 电泳后胶块使用 GelRed 染色, 脱色后读取电泳图谱; 沙门菌标准株 (H9812) 作为分子量标准。PFGE 图像录入 BioNumerics 软件, 非加权配对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类分析, 相似系数用 *Dice* 表示。

2 结果

2.1 流行病学调查结果

2014 年 9 月 15 日中午 12 时, 婚宴就餐人数约 80 人。通过查阅卫生院就诊记录和 Q 村卫生院医生描述, 并按照婚宴主办方提供的名单进行搜索病例, 共搜索到 25 例病人, 分散于 8 桌就餐。首发病例: 女, 44 岁, 2014 年 9 月 15 日下午 3:00, 开始出现脐周腹痛、腹泻; 所有病例症状主要以腹泻 (100%, 25/25)、腹痛 (100%, 25/25)、头痛或头昏 (100%, 25/25) 为主, 部分患者有恶心、呕吐、畏寒等症状; 最短潜伏期为 2 h, 最长潜伏期为 24 h, 平均潜伏期为 16.42 h; 年龄最小的 44 岁, 最大的 66 岁, 男性 10 人, 女性 15 人。25 例患者散落全村, 经 Q 村卫生院或卫生院治疗后, 病例痊愈, 病程 1 ~ 3 d。

婚宴主办地的厨房四周不存在污染源。婚宴所使用的食品原料大部分为 Q 村自产, 少量食品购自县城批发市场。厨师及帮工均为 Q 村村民, 无健康证, 经询问当日厨师近期无腹痛、腹泻症状。

2.2 实验室检测结果

2.2.1 病原菌检出情况

从 6 份患者的肛拭样本、1 名厨师的肛拭子样本、6 份剩余可疑食品中共检出 4 株沙门菌。4 株分离菌经系统生化鉴定, 均为沙门菌属。4 株分离菌均与沙门菌属多价血清发生凝集, 与单价 O6、8 发生凝集反应, 与 H 抗原第 1 相血清 He、h, H 抗原第 2 相血清 H2 发生凝集反应, 生理盐水对照均无自凝现象。根据 Kauffman-White 血清分型标准, 判定 4 株沙门菌血清型均为 6,8:e,h:2, 且均为纽波特沙门菌 (*Salmonella* Newport)。

2.2.2 药敏试验

本起食物中毒 4 株纽波特沙门菌分离株具有相同的耐药谱, 其中对头孢替坦、头孢唑啉、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素均耐药, 对氨苄西林、头孢他啶、头孢吡肟、头孢曲松、亚胺培南、厄他培南、氨曲南、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、环丙沙星、左氧氟沙星、复方新诺明、呋喃妥因均敏感。

2.2.3 PFGE 分型与聚类结果

通过 PFGE 分子分型溯源分析, 4 株纽波特沙

门菌聚类图谱分析相似性达 100%，可以认定为同一菌株引起的食物中毒，见图 1。



注: FJ-Sal2014-00026 为病人分离菌株,

FJ-Sal2014-0027 为厨师分离菌株

图 1 4 株纽波特沙门菌 PFGE 聚类分析

Figure 1 Analysis of 4 strains of *Salmonella* Newport PFGE cluster

3 讨论

本次食物中毒事件患者发病急、潜伏期短、发病时间比较集中、临床症状典型。根据流行病学调查、患者临床表现及病原学鉴定结果,确定该起事件是由纽波特沙门菌引起的食源性疾病。由于对患者的调查及样本的采集是在婚宴举办 2 d 后,患者已进行了抗菌素治疗,可能是本次食物中毒仅从患者分离到 1 株菌株的原因,也提示对于食源性疾病的采样务必及时、准确、全面,以免影响对事件性质的判断。

本研究采用传统分离培养方法,并对获得病原菌进行 PFGE 分子分型,PFGE 分型特异性强、重复性好、结果稳定、易于标准化,被广泛应用于很多种细菌的分子流行病学研究中,常应用于分析菌株之间的相关性,协助追踪感染来源,在控制传染病疫情方面发挥重要作用。

传统的实验室方法主要依据相同菌种相同血清型作为同源株的判定,但只能从株、血清型、亚型的层面进行分析探讨,并不能确认为真正意义的同源株,也不能对有空间距离的同种(型)分离菌株进行同源性判定。PFGE 分型是通过限制性内切酶对细菌染色体 DNA 的稀有酶切位点进行酶切,经 PFGE 分离,比较染色体限制性内切图谱对整个染色体进行分析,以确定菌株的亲缘关系。PFGE 已作为众多国家公共卫生实验室用以区分暴发菌株和溯源的“金标准”^[9-10],本次食物中毒事件分离的 4 株沙门菌,虽然血清学分型同为纽波特沙门菌,但是仅从生化试验结果分析,不能得出菌株之间的相关性。通过 PFGE 分型,PFGE 图谱一致,电泳条带无差别,根据 Tenover 等^[11]提出的 PFGE 解释标准,表明从患者、厨师和剩余食物中检出的沙门菌株从分子水平具有紧密相关和高度的同源性,来源于同一克隆系,这起食物中毒事件的发生可能是厨师携带纽波特沙门菌进而污染食物,患者进食被污染的食物后被感染而引起食物中毒。由纽波特沙门菌引起的食物中毒鲜见报道,2011 年宁夏回族自治区

永宁县曾报道一起由纽波特沙门菌和金黄色葡萄球菌引起的食物中毒^[11],从 1 份熟牛肉中检出 1 株纽波特沙门菌。近年来龙岩市发生的数起沙门菌食物中毒主要血清型为肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌,引起本次食物中毒的纽波特沙门菌较为鲜见,应引起重视。本次事件是在农村流动宴席中引发的,厨师帮厨均未办理健康证,建议食品监管部门加强农村流动餐桌的监管力度,建立可行的农村家庭宴席卫生管理办法,加强相关人员的健康检查,防止类似事件的发生。

参考文献

- [1] Garaizar J, Lopez-Molina N, Laconcha I, et al. Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR and pulsed field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar enteritidis [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(12): 5273-5281.
- [2] Mead P S, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States [J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(5): 607-625.
- [3] Olsen S J, MacKinnon L C, Goulding J S, et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 1993-1997 [J]. MMWR CDC Surveill Summ, 2000, 49(1): 1-62.
- [4] Hedican E, Miller B, Ziemer B, et al. Salmonellosis outbreak due to chicken contact leading to a foodborne outbreak associated with infected delicatessen workers [J]. Foodborne Pathog Dis, 2010, 7(8): 995-997.
- [5] Schneider J L, White P L, Weiss J. Multistate outbreak of muleidrug-resistant *Salmonella* Newport infections associated with ground beef, October to December 2007 [J]. J Food Prot, 2011, 74(8): 1315-1319.
- [6] 毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅, 等. 我国细菌性食源性疾病负担的初步研究 [J]. 中国食品卫生检验杂志, 2011, 23(2): 132-136.
- [7] 朱超, 许学斌. 沙门菌属血清型诊断 [M]. 上海: 同济大学出版社, 2009.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.4—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门菌检验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [9] Thong K L, Ngeow Y F, Altwegg M, et al. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(5): 1070-1074.
- [10] Landaras E, Gonzalez-Hevia M A, Alzugaray R, et al. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella enteritidis* by ribotyping [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(9): 2294-2296.
- [11] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33: 2233-2239.
- [12] 张桂芳, 高斌, 刘月淑, 等. 一起纽波特沙门菌和金黄色葡萄球菌引起的食物中毒调查报告 [J]. 宁夏医科大学学报, 2013, 35(2): 232-233.