

- 化管理委员会. GB/T 21911—2008 食品中邻苯二甲酸酯的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [10] Brunella C, Barbara M, Giovanni S, et al. Tandem mass spectrometry in food safety assessment: the determination of phthalates in olive oil[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1205(1-2):137-143.
- [11] QIU X L, FENG C, WANG G Q. Determination of phthalates esters in bottled waters by GC-MS/MS[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2013, 4(3):689-698.
- [12] XU X, YANG W H, ZHAO H J, et al. Determination of 17 phthalate esters in different wines and liquors by gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2013, 4(3):877-882
- [13] XU D M, DENG X J, FANG E H, et al. Determination of 23 phthalic acid esters in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1324:49-56.
- [14] János I, Tamáz L, Allan, M U, et al. Compendium of analytical nomenclature[M]. United States: International Union of Pure and Applied Chemistry, 1998.

## 实验技术与方法

### 分子生物学技术在一起食物中毒检测中的应用

宋启发, 王爱红, 杨元斌, 叶硕, 郭延波

(浙江省宁波市疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315010)

**摘要:**目的 应用分子生物学技术对一起食物中毒样品进行检测, 提高实验室应对食物中毒快速检测和溯源分析能力。方法 应用实时荧光 PCR 技术对一起食物中毒 10 份患者粪便和 6 份可疑食品进行快速检测, 并对 39 份粪便和 8 份食品进行病原培养分离鉴定, 应用 PCR 技术对分离菌株进行 *invA* 毒力基因检测, PFGE 及 MLST 基因分型技术对分离菌株进行同源性分析, 并与其他地区菌株进行遗传学差异对比。结果 10 份患者粪便和 6 份可疑食物经实时荧光 PCR 检测均为沙门菌阳性, 从 39 份粪便和 8 份食品中共分离到 31 株肠炎沙门菌。PFGE 及 MLST 分析显示 31 株菌具同源性, 表明食物和患者分离菌株基因型一致, MLST 分型显示本次分离株与其他地区优势克隆有同源性, 31 株肠炎沙门菌均具有 *invA* 毒力基因。结论 实时荧光 PCR 技术应用于食物中毒病原检测, 缩短了病原检测周期, 提高了检测的准确性, PFGE 及 MLST 两种基因分型技术可对病原菌进行溯源分析, 对于掌握病原菌流行规律具有重要意义。

**关键词:** 肠炎沙门菌; 食物中毒; 实时荧光 PCR; 脉冲场凝胶电泳; 多位点测序技术

中图分类号: R155.3; TS201.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)03-0254-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.03.011

### Application of molecular biological technology in a food poisoning incident

SONG Qi-fa, WANG Ai-hong, YANG Yuan-bin, YE Shuo, GUO Yan-bo

(Ningbo Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Ningbo 315010, China)

**Abstract: Objective** To improve the ability of rapid detection and tracing the infectious source of food poisoning outbreak with molecular biological technology. **Methods** Rapid detection of 10 fecal samples and 6 food samples were carried out with real-time fluorescent PCR. A total of 39 fecal samples and 8 food samples were detected by culture, isolation and identification method. Virulence gene of *invA* was detected by PCR. Homologous relationship among strains from local region and other regions was analyzed with PFGE and MLST genotyping technique respectively. **Results** *Salmonella* was detected in 10 fecal samples and 6 food samples with real-time fluorescent PCR. Thirty-one strains of *Salmonella enteritidis* were finally isolated and identified in 39 fecal samples and 8 food samples. Homology among those 31 strains was proved by PFGE, which suggested that the strains from food samples and clinical samples were from the same origin. Homology among the isolates and prevalent strains in other regions was also shown with MLST genotyping results. Virulence gene of *invA* in all isolates was testified by PCR. **Conclusion** Timeliness and accuracy of strain identification during food poisoning incident could be improved by real-time fluorescent PCR. Combination of PFGE and MLST genotyping techniques was of great significance to trace homologous relationship among strains in local region and other

收稿日期: 2014-01-02

基金项目: 宁波市农业社会发展项目资助(2011C50041)

作者简介: 宋启发 男 副主任技师 研究方向为细菌基因组学 E-mail: songqf@nbcde.org.cn

regions, and to understand their epidemiological characteristics.

**Key words:** *Salmonella* enteritidis; food poisoning; real-time fluorescent PCR; pulsed field gel electrophoresis; multilocus sequence typing

食物中毒是指摄入了含有生物性、化学性有毒有害物质的食品或者把有毒有害物质当作食品摄入后出现的急性、亚急性疾病,属于食源性疾病范畴<sup>[1]</sup>。食物中毒事件往往具有突发性和不可预见性,对人体健康造成严重损害。快速查找病因是食物中毒事件重要的处置内容之一,在食源性疾病预防和食品安全监测中,采用普通 PCR 和实时荧光 PCR 等分子生物学方法检测单核细胞增多性李斯特菌、金黄色葡萄球菌、沙门菌等食源性病原菌,可以提高鉴定速度和准确度<sup>[2-5]</sup>。脉冲场凝胶电泳(PFGE)和多位点测序技术(MLST)<sup>[6-7]</sup>等对细菌进行基因分型,分辨力高,可以避免因抗原位点发生突变血清学方法无法分型的情况。PFGE 采用限制性内切酶对整个细菌基因组进行酶切,酶切片段在特定的电泳系统中通过电场方向不断交替变换及合适的脉冲时间等条件下而分离,这种片段分布的多态性可以作为细菌遗传学的识别标识,适合同批次样品的基因比较分析,不同实验室间结果的比较需要对试验过程进行严格标准化管理<sup>[7]</sup>。MLST 分型方法以数字形式表示序列型(ST),适合在不同区域的实验室间进行比对分析<sup>[8]</sup>。综合应用病原培养分离和分子生物学技术对食物中毒样品进行检测分析,可以快速准确地确定病原。

2013年5月30日,某医院陆续接诊多例以腹痛、腹泻、发热症状为主的病例,均为某公司职工或职工家属,截至5月31日上午11时45分,医院共收治病例87例,其中男56例,女31例,平均年龄32.67岁。流行病学抽样调查的21例患者中,症状主要包括腹泻20例(95.24%)、发热18例(85.71%)、腹痛15例(71.43%)、恶心15例(71.43%)、头痛14例(66.67%)和呕吐8例(38.10%)。所有调查对象均反映,在进食了某品牌蛋糕不同时间后出现不适。进食至出现上述不适最短时间1h,最长36h,中位潜伏期12h。通过对流行病学资料、临床症状、患者血常规分析,初步判断为细菌性食物中毒,确定沙门菌、副溶血性弧菌为主要可疑病原菌,本实验室应用分离培养、实时荧光PCR、PFGE和MLST基因分型技术对该起事件进行了病原学检测和溯源分析,现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 标本种类

共采集39份疑似食物中毒患者粪便样品和

8份可疑蛋糕样品,其中10份患者粪便和6份可疑食物进行快速检测,所有样品均进行分离培养。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

ABI 7500 荧光 PCR 扩增仪, Chef Mapper 脉冲场凝胶电泳仪(美国 Bio-Rad)、GelDoc 2000 凝胶成像分析系统、梯度 PCR 仪(德国 eppendorf AG)、VITEK-2 全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司)。

沙门菌诊断血清(兰州生物制品研究所),沙门菌、副溶血性弧菌荧光 PCR 试剂均购自上海之江生物科技有限公司,内切酶为 *Xba* I(日本 TaKaRa),引物(上海 Invitrogen),PCR 试剂(大连 TaKaRa),MH 琼脂、药敏纸片均购自英国 Oxoid,质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922(上海嘉和公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PCR 模板制备

取适量粪便、食品或菌落制备悬液(浊度约1麦氏单位),12 000 r/min 离心 5 min,沉淀物加入 400  $\mu$ l 裂解液(40 mmol/L Tris-醋酸、20 mmol/L 乙酸钠、1 mmol/L EDTA 和 1% SDS, pH = 8.0)混匀,37  $^{\circ}$ C 水浴 1 h。12 000 r/min 离心 10 min,取上清液加等体积苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V)和氯仿各抽提 1 次后,液相加 2.5 倍体积无水乙醇沉淀 DNA,70% 乙醇洗涤沉淀 1 次,干燥后溶于 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 中。

#### 1.2.2 实时荧光 PCR

PCR 反应条件:每份检测样本中加 30  $\mu$ l 混合反应液、0.6  $\mu$ l *Taq* 和 2  $\mu$ l 模板,95  $^{\circ}$ C 变性 15 s,60  $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 40 次循环。

#### 1.2.3 病原分离与鉴定

粪便标本按肠道致病菌检验方法进行分离培养和鉴定,先接种亚硝酸盐增菌液 37  $^{\circ}$ C 培养 18 ~ 24 h,转种沙门菌显色平板,37  $^{\circ}$ C 培养 18 ~ 24 h。食品样品检测按照文献<sup>[9]</sup>进行。以上两类样本可疑菌落接种克氏三糖铁琼脂斜面,37  $^{\circ}$ C 培养 18 ~ 24 h,革兰氏染色,镜检,用沙门菌诊断血清作初步凝集试验,阳性者采用 VITEK-2 全自动微生物分析仪进行系统生化鉴定。

#### 1.2.4 PFGE 分型

试验过程根据 PulseNet 网络实验室推荐的标准方法《大肠埃希菌 O157:H7、非伤寒沙门菌和宋内志贺菌的标准化 PFGE 分子分型实验室方法》进行,分子标准采用沙门菌布伦敦卢普血清型 H9812。电泳结束后用溴化乙锭染色,Gel Doc 2000 凝胶图像

分析系统记录结果。

### 1.2.5 MLST 基因分型

按 1.2.1 所述方法提取细菌基因组。根据文献 [10] 合成沙门菌 MLST 分型引物, 50 μl 反应体系: 2 × PCR Premix 25 μl, 引物各 40 pmol, 模板 4 μl, ddH<sub>2</sub>O 21 μl。反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 30 个循环, 分别扩增 *aroC*、*dnaN*、*hemD*、*hisD*、*purE*、*sucA* 和 *thrA* 7 种基因并测序 (上海 Invitrogen), 测序结果与分型数据库比对获得各基因等位基因号, 7 种基因组组合为 ST 序列号。

### 1.2.6 药物敏感实验

采用 K-B 纸片扩散法检测 31 份菌株抗药性。

### 1.2.7 沙门菌 *invA* 基因检测

按 1.2.1 所述方法提取细菌基因组后, 进行沙门菌 *invA* 基因检测, 引物 *invA*-1: ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT; *invA*-2: AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT, 产物长度 244 bp<sup>[11]</sup>。引物合成、PCR 试剂和 50 μl 反应体系同 1.2.5。反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 30 个循环, 产物 1% 琼脂糖电泳分离, 溴乙锭染色判断结果。

## 2 结果

### 2.1 快速检测和培养鉴定

实时荧光 PCR 检测 6 份食品 and 10 份粪便, 沙门菌检测均阳性, 副溶血性弧菌检测均阴性。本次事件中, 从 39 份大便样品中检出肠炎沙门菌 23 株, 8 份食品样品均检出肠炎沙门菌, 沙门菌实时荧光 PCR 扩增反应曲线见图 1。

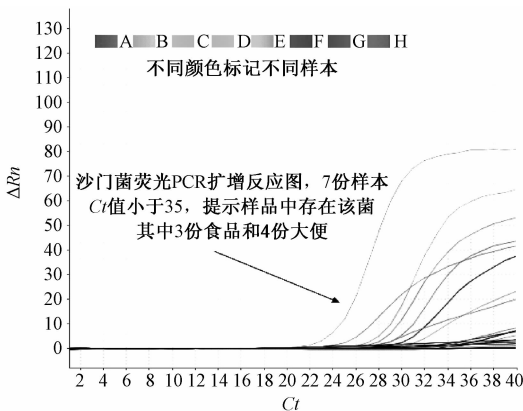
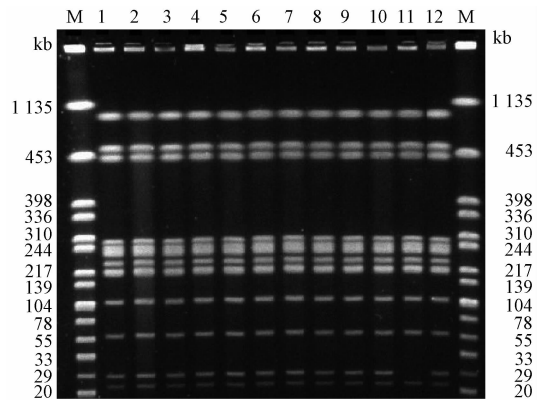


图 1 部分粪便和食品样品沙门菌实时荧光 PCR 扩增曲线  
Figure 1 Amplification curve of real-time fluorescent PCR of *Salmonella enteritidis*

### 2.2 PFGE 分型

PFGE 结果显示, 31 株分离株图形高度一致, 按

照酶切图谱间有同样的条带数, 且相应条带大小相同, 判断患者和食品中肠炎沙门菌高度同源<sup>[12]</sup>, 结果见图 2。

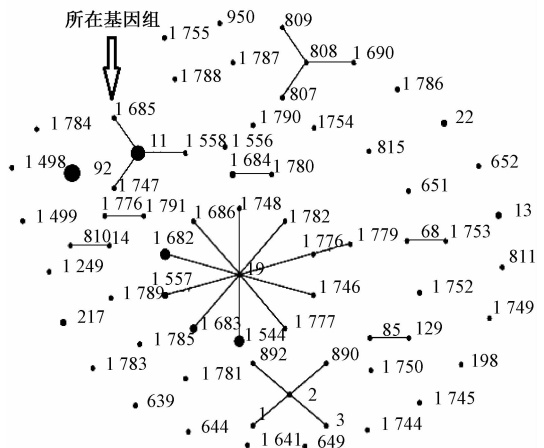


注: M: H9812 DNA 分子标准; 1~8 号: 临床分离株; 9~12 号: 食品分离株

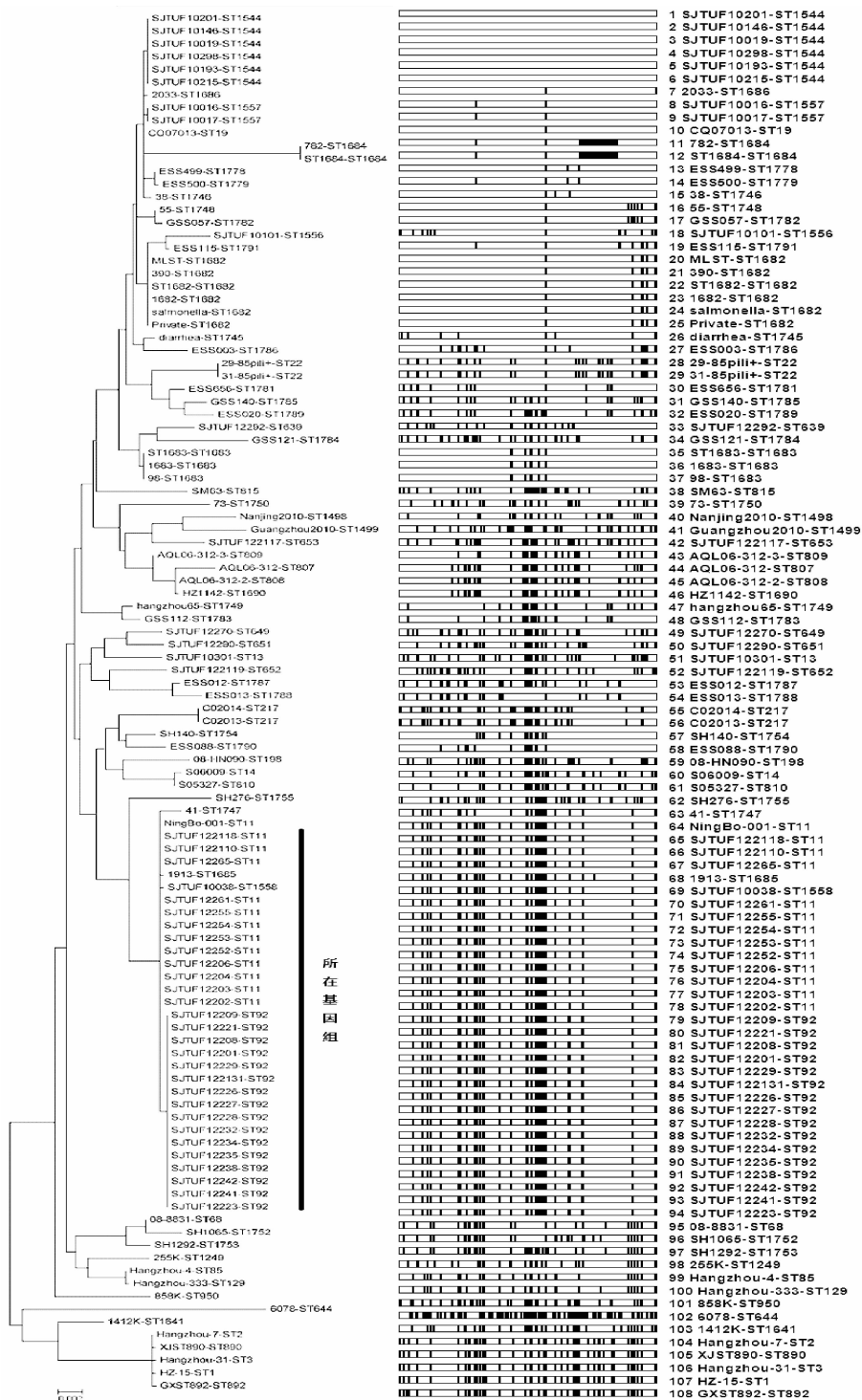
图 2 部分肠炎沙门菌菌株 PFGE 图  
Figure 2 PFGE diagram of *salmonella enteritidis*

### 2.3 MLST 基因分型

引起本次中毒事件的 MLST 序列型为 ST11。分析 MLST 数据库所报道来源中国的 108 株肠道沙门菌显示, ST 排列前 3 的分别为 ST92 (16 株, 14.81%)、ST11 (13 株, 12.04%) 和 ST1682 (6 株, 5.56%), 本事件中所分离 ST11 与其他 3 种 ST 型组成一个克隆群, 除起源为 ST11 和 ST19 的两种克隆群外, 其他 ST 型较分散, 见图 3。采用 Mega 5.0 软件 Maximum Likelihood 分析方法对 7 种基因进行多基因同源性分析, 结果显示引起本次食物中毒事件的肠炎沙门菌存在于 ST11 和 ST92 序列型所构成的基因组中, 提示该菌与其他引起食源性相关疾病的优势克隆具有高度同源性, 见图 4。



注: 数字表示 ST 序列型, 箭头所指为引起本次食物中毒事件的肠炎沙门菌 ST11 序列所在位置, 原点面积代表病例数  
图 3 MLST 数据库中来源为中国的沙门菌 ST 序列型分布  
Figure 3 ST distribution of strains in China in MLST database



注:图中菌株名 NingBo-001-ST11 为本次事件中所分离克隆,与多份克隆存在高度同源性,右侧条图黑线实体表示与1号菌比较,基因突变的位置。

图4 中国108株沙门菌进行MLST分型中的7种基因进化树分析。

Figure 4 Phylogenetic tree of 7 MLST genes in 108 *Salmonella* strains isolated in China

### 2.4 药物敏感试验及沙门菌 *invA* 基因检测

31株沙门菌抗药试验结果为:四环素(敏感)、磺胺(中敏)、环丙沙星(敏感)、阿米卡星(敏感)、氨苄(敏感)、氨苄-舒巴坦(敏感)、头孢噻啉(敏感)、头孢他啶(敏感)、氨基曲南(敏感)。31株沙门菌 *invA* 基因检测均为阳性。

### 3 讨论

在处置细菌性食物中毒事件中,及时准确地确定病原并进行溯源分析具有重要意义。培养法特异性高,但检测周期长,阳性率低,特别是一些生长缓慢或是新的病原菌难以用传统培养方法进行检测。PCR等现代分子生物学技术应用于食源性病原菌检测,具有灵敏度高、检测周期短等优点,但

PCR方法也存在假阳性和假阴性的缺点。本次食物中毒事件中,采用荧光PCR检测,从接收标本到提示可能病原只需要3 h。虽然PCR结果不能作为最终结果报告,但在多份样品中检出高拷贝目的菌,提示意义明显,而PCR阳性标本培养结果均阳性。因此,在食物中毒检测中综合应用两类方法是保证检测结果及时准确的重要措施。

在溯源分析中,以核酸分析为手段的基因分型技术,受主观影响小,分辨率高于血清学分型方法。PFGE分型方法为图形识别技术,适合同批次发生的多菌株间同源性分析,实验室内结果的比较需要严格的实验室操作标准,未参加PFGE网络的普通实验室难于进行室间比较。MLST采用数字化的基因分型结果,测序可由合格的测序公司完成,结果一致性高,适合不同实验室不同时期的结果进行同源性比较。因此本试验采用PFGE基因分型方法,证明31株沙门菌为同一克隆,患者中克隆来自于可疑食品。MLST方法比较该克隆与其他地区不同时期获得的沙门菌,显示该起食物中毒分离株属流行优势基因型。

沙门菌是常见的食源性病原菌<sup>[13]</sup>,肠炎沙门菌是常见的血清型之一,主要引起畜禽肠炎及人类肠炎和食物中毒。沙门菌在外环境中抵抗力较强,在水、牛乳及肉制品中能生存数月,在禽蛋和禽肉中的污染较为常见,污染食物后无感官性状变化,易引起食物中毒。研究表明,沙门菌侵袭蛋白(invasion protein, *inv*)决定细菌进入宿主上皮细胞的能力,与沙门菌致病性密切相关,由*invA*、*invB*、*invC*、*invD*和*invE*等一组基因编码,其中*invA*为沙门菌主要毒力因子<sup>[14]</sup>。因此,对食源性疾病分离株进行毒力基因分析,以探讨其与致病力的关联性。本起食物中毒所分离的31株沙门菌*invA*基因均阳性,再次证实携带*invA*因子的沙门菌更易引起人群腹泻。

沙门菌血清或基因型别众多,致病性差异大,传播机制复杂,在后续工作中,需要对地区相关病原菌的种群分布、基因变异等进行深入研究,为防控类似食物中毒事件提供技术资料。

## 参考文献

[1] 中华人民共和国国务院. 突发公共卫生事件应急条例[S].

2003-05-09.

- [2] 金大智,谢明杰,曹际娟. 食品中单增李氏菌实时荧光PCR检测鉴定方法的建立[J]. 辽宁师范大学学报:自然科学版, 2003,26(1):73-76.
- [3] 云泓若,李月琴,周天鸿. PCR技术检测金黄色葡萄球菌肠毒素D基因[J]. 暨南大学学报:自然科学版,1999,20(5):84-87.
- [4] 沈孝民,涂书清. 用PCR技术检测动物产品中沙门菌的研究[J]. 追究动物检疫,1997,14(2):8-10.
- [5] Kim M S, Jeong H D. Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments[J]. Aquaculture, 2001,193(1):199-211.
- [6] Lanier W A, Leeper M M, Smith K E, et al. Pulsed-field gel electrophoresis subtypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from ground beef and humans, United States, 2001-2006[J]. Food-borne Pathog Dis, 2009,6(9):1075-1082.
- [7] Melles D C, Van Leeuwen W B, Snijders S V, et al. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007,69(2):371-375.
- [8] Lucia L N, Mamuka K, Justine T, et al. Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates[J]. J Clin Microbiol, 2005,43(4):1776-1781.
- [9] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.4—2010 中华人民共和国国家标准 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,2010.
- [10] Torpdahl M, Skov M N, Sandvang D, et al. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005,63(2):173-184.
- [11] Chiu C H, Ou J T. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay[J]. J Clin Microbiol, 1996,34(10):2619-2622.
- [12] 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 strains typing[J]. J Clin Microbiol, 1995,33(9):2233-2239.
- [13] Scallan E, Hoekstra R M, Angulo F J, et al. Food-borne illness acquired in the United States-major pathogens[J]. Emerg Infect Dis, 2011,17(1):7-15.
- [14] Galán J E, Inocchio C, Costeas P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new-protein family[J]. J Bacteriol, 1992,74(13):4338-4349.