

食物中毒

一起食物中毒病因的实验室分析

盛冬萍¹, 杨元斌², 徐景野²

(1. 宁波市镇海区疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315200; 2. 宁波市疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315010)

摘要:目的 查明引起食物中毒的致病菌, 分析菌株间的亲缘关系, 为明确食物中毒诊断提供依据。方法 采集一起食物中毒蛋糕和病人样品, 用实时荧光 PCR 快速筛检, 按 GB 4789.4—2010《食品微生物学检验 沙门菌检验法》分离、鉴定致病菌, 脉冲电场凝胶电泳 (PFGE) 对病原菌作同源性分析。结果 从 16 份蛋糕样品中检出 8 株肠炎沙门菌, 32 份患者粪便样品中检出 17 株肠炎沙门菌, PCR 核酸阳性与 GB 4789.4—2010 法分离到菌株完全一致; PFGE 条带聚类分析显示患者与蛋糕中检出的肠炎沙门菌属同一基因型, 具有高度同源性。结论 本起食物中毒由肠炎沙门菌污染蛋糕所致; PCR 法与 GB 4789.4—2010 法联合检测, 有助于快速锁定食物中毒致病菌, 从基因水平上证明食物病原的相关性。

关键词:食物中毒; 沙门菌; 实时荧光 PCR; PFGE 同源性分析

中图分类号: R155; R155.3⁺1 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)05-0504-03

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.05.024

The laboratory analysis of a food poisoning pathogeny

SHENG Dong-ping, YANG Yuan-bin, XU Jing-ye

(Zhenhai Centre for Disease Control and Prevention, Zhejiang Ningbo 315200, China)

Abstract: Objective Identify pathogens which causing food poisoning, analysis of genetic relationships among strains and provide the basis for the diagnosis of food poisoning clear. **Methods** Using quantitative PCR rapid screening, GB 4789.4-2010 method to separate and identify the pathogens. **Results** From the 16 cake samples detected 8 *Salmonella* enteritidis, 32 stool samples of patients detected 17 *Salmonella* enteritidis, PCR nucleic acid positive and the GB 4789.4-2010 method were isolated with the same strains. PFGE banding showed that patients had the same pattern of *Salmonella* enteritidis with which were detected in cake, and they had high homology. **Conclusion** This food poisoning from *Salmonella* enteritidis contamination by the cake. PCR method with the GB 4789.4-2010 method helps to quickly lock joint detection of food poisoning bacteria. PFGE detected *Salmonella* enteritidis of the cake and patients were sourced from the same clone. It demonstrate the relevance of food pathogens from genes level.

Key words: Food poisoning; *Salmonella*; real-time fluorescence PCR; PFGE homology analysis

2013年5月29日宁波市镇海区某企业发生一起食物中毒事件, 其发病和调查经过是: 企业向某食品公司订购了966份水果蛋糕分批发放给职工。当晚21点左右出现首例病例, 陆续发生食物中毒病例241例, 罹患率为42.3% (241/570), 经抗生素治疗, 一星期内康复, 无重症、死亡病例。流行病学调查发现病例均为食用过蛋糕的职工及其家属, 并在72h内出现腹痛、腹泻或恶心、呕吐, 可伴发热、头

痛、头晕等中毒症状。患者主要症状为发热、腹痛、腹泻、呕吐等, 腹泻物性状多为水样便, 腹痛多为脐周阵痛; 潜伏期2.5~46.5h, 平均潜伏期15.9h; 部分患者白细胞计数升高、中性粒细胞比率升高。随机选择50名患者和54名无症状的职工进行病例对照研究, 病例组蛋糕进食史100% (50/50), 对照组蛋糕进食史17% (9/54), 经卡方检验, 结果显示差异有统计学意义 ($\chi^2 = 73.45, P < 0.05$), 提示本事件与食用蛋糕有关。经现场调查分析, 排除了食堂就餐、饮用水等其它因素致病的可能性。为快速检出患者和食物中引起中毒的病原菌并进行溯源, 采用双重荧光 PCR 进行中毒病原的快速筛检、GB 4789.4—2010《食品微生物学检验 沙门菌检验法》^[1] 分离鉴定病原菌, 以及脉冲电场凝胶电泳 (PFGE) 分析其同源性, 根据临床症状、流行病学调

收稿日期: 2014-05-30

基金项目: 宁波市 2013 年度科技项目 (2013C51014); 创新团队项目 (2012BB2018)

作者简介: 盛冬萍 女 副主任技师 研究方向为微生物检验

E-mail: sdpone@163.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

查及实验室检查证实,本起食物中毒由肠炎沙门菌污染蛋糕引起,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

采集食物中毒患者粪便样品 32 份、可疑食物芒果果冻慕斯蛋糕 14 份、覆盆子蛋糕 2 份,供检测病原菌用。

1.1.2 主要仪器与试剂

ATB 自动细菌鉴定仪(法国梅里埃)、PCR 荧光分析仪(美国 ABI)、CHEFMAPPER 脉冲场凝胶电泳仪和 VenaDoc 凝胶成像分析系统均购自美国 Bio-Rad。

培养基与诊断血清缓冲蛋白胨水(BP)、三糖铁琼脂均购自杭州微生物试剂有限公司,SC 增菌液、SS 琼脂均购自杭州天和微生物试剂有限公司,沙门菌显色平板(郑州博赛生物技术股份有限公司),沙门菌多价诊断血清(兰州生物制品研究所有限责任公司),沙门单价诊断血清(丹麦 DenMark),生化鉴定条(法国 bioMerieux),金黄色葡萄球菌、变形杆菌、致泻大肠埃希菌 PCR 检测试剂盒和沙门菌、志贺菌检测试剂盒均购自深圳市生科源技术有限公司,低熔点琼脂糖、PFGE 级琼脂糖均购自美国 BIO-Bio-Rad,蛋白酶 K(德国 MERCK),以上试剂均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 检测项目

根据患者的食物中毒临床症状,进行沙门菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌和致泻性大肠埃希菌检测。

1.2.2 细菌分离鉴定

食品标本的沙门菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌和致泻性大肠埃希菌按 GB 4789.4—2010 方法检测;粪便标本沙门菌、志贺菌和致泻性大肠埃希菌按 WS 271—2007《感染性腹泻诊断标准》^[2]方法检测,金黄色葡萄球菌按 WS/T 80—1996《葡萄球菌食物中毒诊断标准及处理原则》^[3]方法检测,食品和粪便样品的变形杆菌按 WS/T 9—1996《变形杆菌食物中毒诊断标准及处理原则》^[4]方法检测。病原菌分离采用将直接分离和选择性增菌后分离方法,沙门菌划显色平板和 SS 平板;志贺菌划显色培养基和麦康凯平板(MAC);致泻性大肠埃希菌和变形杆菌划 MAC 和伊红美兰平板(EMB);金黄色葡萄球菌划帕克(Baird-Parker)平板,分别挑取可疑菌落作革兰氏染色镜检、生化试验及血清凝集试验。

1.2.3 实时荧光 PCR 快速检测

粪便和蛋糕样品经 SC 增菌 6 h,12 000 r/min 离心 10 min,沉淀物加 DNA 提取液,将沉淀悬浮后沸水浴处理 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,上清为细菌 DNA 核酸提取液。取 DNA 提取液进行沙门-志贺菌双色实时荧光 PCR 检测,反应体系按说明书操作。荧光 PCR 检测采用 FAM 通道荧光信号。

1.2.4 脉冲场凝胶电泳分型

参照美国 CDC PulseNet USA 方法^[5-6]。分子量标记沙门菌(参考菌株为 H9812)由浙江省疾病预防控制中心微生物室提供。25 株肠炎沙门菌经制胶、*Xba* I 酶切、脉冲场电泳、染色与读胶,用丹麦 Bionumerics v4.6 软件进行聚类分析。

2 结果

2.1 实时荧光 PCR 筛检

32 份中毒病人粪便样品先用实时荧光 PCR 筛检,其中 17 份中毒病人粪便样品检出沙门菌特异性 DNA 核酸,阳性率为 53.13%;均未检出志贺菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌、致泻大肠埃希菌特异性 DNA 核酸。

2.2 沙门菌分离鉴定

32 份中毒病人粪便样品和 16 份蛋糕样品经分离培养,有 25 份样品发现可疑菌落,其中病人粪便样品 17 份,芒果果冻慕斯蛋糕 7 份,覆盆子蛋糕 1 份,检出率分别为 53.13%(17/32)和 50.00%(8/16)。可疑菌落在沙门菌显色平板上为紫红色、中等大小菌落,SS 平板上为中等大小、无色半透明、产 H₂S 菌落;革兰染色镜检为 G⁻杆菌,氧化酶试验阴性。25 株细菌经 ATB 自动细菌鉴定仪鉴定,在 ID 32 GN 生化反应条上生化试验结果完全相同,鉴定编码为 T=0.72, ID% 值为 99.6,属沙门菌的某些种,血清分型抗原式均为 9,12:g,m:-,定为肠炎血清型沙门菌。

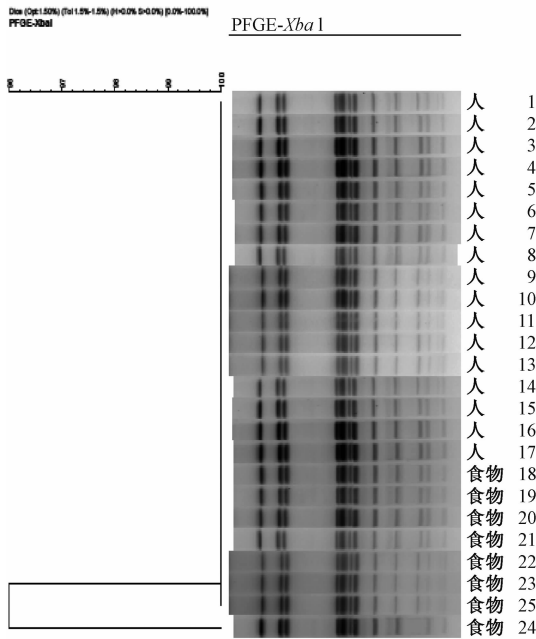
2.3 其它细菌分离鉴定

志贺菌显色培养基中未见可疑菌落生长,粪便样品直接分离的 MAC 平板上发现有中等大小无色半透明的可疑菌落,与志贺菌四种多价血清不凝集,与沙门氏菌 A-F 多价血清凝集,可疑菌落分纯后经 ATB 自动细菌鉴定仪鉴定结果为沙门菌属。Baird-Parker 平板上无金黄色葡萄球菌可疑菌落生长。EMB 平板上未见迁移生长的可疑变形杆菌菌落。致泻大肠埃希菌,挑取 MAC 平板上桃红色不透明菌落;EMB 平板上黑紫色或红紫色、圆形、边缘整齐、表面光滑湿润、具金属光泽,或紫黑色不带或略带金属光泽,或粉红色中心较深的菌落;可疑菌落

接种双糖后,作大肠杆菌多价血清凝集试验,所有可疑菌落均未出现凝集。

2.4 脉冲电场凝胶电泳分型

25株肠炎沙门菌经制胶、酶切、电泳菌株的DNA片段得到良好分离,PFGE条带100%相似,根据Tenover的同源性判定标准^[7]属同一基因型。结果见图1。



注:M:Marker;1~17:病人菌株;18~25:食品菌株

图1 Bionumerics 4.6版软件聚类分析图

Figure 1 Bionumerics 4.6 version software clustering analysis diagram

3 讨论

PFGE分型由Schwartz和Cernter建立,采用定时改变电场方向的交变电源,可对100 Mb范围内的DNA分子进行分析。由于PFGE是对细菌全染色体DNA进行分析,检测细菌的染色体结构特征,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,且能显示出菌株间微小差异,被认为是细菌分子流行病学研究的“金标准”^[8],是国内外同源性分析和传染源追踪的通用方法。为进一步证实可疑食物与本次食物中毒的相关性,我们对病原菌进行PFGE同源性分析,聚类分析显示两类菌株条带100%相似,表明患者和蛋糕菌株的遗传亲缘关系较近,进一步证实本起食物中毒是由肠炎沙门菌污染蛋糕引起。因此,PFGE用于食物中毒病因追踪有重要的意义,能为食物中毒查明原因,对事件处置提供有力依据。

食品安全备受政府和社会关注,因此,快速查明食物中毒病因,体现了疾病预防控制中心检测能力。对细

菌性食物中毒的病原菌检测都依据GB 4789.4—2010法进行,采用病原菌分离培养、生化试验和血清学试验等步骤,耗时较长(至少需72 h以上),用实时荧光PCR筛检时间缩短到10 h左右,发挥了该方法的特异性好、灵敏度高、操作简单、速度快、高通量等优点,应用后将初步报告取得了较好的效果^[9],为食品安全事件处置提供及时准确的科学依据,值得在细菌性食物中毒检测中推广使用。

本起食物中毒潜伏期短,发病急,中毒症状重,病例对照研究结果显示发病与进食可疑蛋糕显著相关($\chi^2 = 73.45, P < 0.05$),实验室从食品和患者标本中检出肠炎沙门菌,且两者菌株的PFGE型具高度同源性,证实本次食物中毒是食用受肠炎沙门菌污染的蛋糕所致。沙门菌引起的食物中毒是全球报道最多的^[10],本地食品中也有较高的携带率^[11]。本次事件警示沙门菌污染食品仍是诱发本地区食物中毒的因素之一,应引起相关部门的注意,加强禽蛋以及含生蛋产品的沙门菌等致病菌监测,加强对蛋糕等食品生产企业的监管力度,以防此类事件再次发生。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB 4789.4—2010 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [2] 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.
- [3] 中华人民共和国卫生部. WS/T 80—1996 葡萄球菌食物中毒诊断标准及处理原则[S]. 北京:中国标准出版社,1996.
- [4] 中华人民共和国卫生部. WS/T 9—1996 变形杆菌食物中毒诊断标准及处理原则[S]. 北京:中国标准出版社,1996.
- [5] Parsons M B, Cooper K L F, Kubota K A, et al. PulseNet USA standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Foodborne Pathog Dis, 2007,4(3):285-292.
- [6] 陈忠妙,徐景野,郑官增,等. 甲型副伤寒沙门菌株的脉冲电场凝胶电泳分型研究[J]. 国外医学流行病学传染病学分册, 2005,32(3):140-142.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 郭敏,郎中凯,向晓霞. 实时荧光PCR在一起沙门菌食物中毒检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(2):372-374.
- [10] 黄文宇,柳陈坚. 食源性沙门氏菌检测方法的研究进展[J]. 生物技术,2009,19(3):95-97.
- [11] 盛冬萍,谢益君,陈米娜,等. 宁波地区食品中致病菌污染物检测与调查[J]. 中国食品卫生,2013,25(4):369-374.