

食物中毒

应用脉冲场凝胶电泳技术对肠炎沙门菌食物中毒的溯源分析

阮韦伟¹,张劭劼²,黄智瑜²,王凤美²,蔡洪庆³,余航²

(1. 福建师范大学福清分校,福建 福清 350300; 2. 莆田市疾病预防控制中心,福建 莆田 351100; 3. 莆田市荔城区疾病预防控制中心,福建 莆田 351100)

摘要:目的 对2016年莆田市某区一起细菌性食物中毒事件进行致病菌分离鉴定和溯源分析。方法 将采集到的样品和标本进行细菌分离培养、生化鉴定及血清学分型,应用脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术进行同源性分析,并对分离菌株进行毒力基因检测和药敏分析。结果 共检出23株肠炎沙门菌,其中8株来源于留样食物,2株来源于厨师肛拭子,13株来源于患者肛拭子;所有菌株经BioNumerics软件聚类分析同源性为100%;所有菌株均携带沙门菌毒力基因*invA*,且具有相同的耐药谱。结论 PFGE技术有利于细菌性食物中毒的溯源分析。该起食物中毒事件是由携带肠炎沙门菌的厨师进行冷盘制作和水果拼盘过程中污染食物所引起。

关键词:食物中毒; 肠炎沙门菌; 脉冲场凝胶电泳; 药敏试验; 溯源

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2018)05-0543-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.05.020

Traceability analysis of *Salmonella enteritidis* caused food poisoning accident using pulsed field gel electrophoresis

RUAN Weiwei¹, ZHANG Mengjie², HUANG Zhiyu², WANG Fengmei²,
CAI Hongqing³, YU Hang²

(1. Fuqing Branch of Fujian Normal University, Fujian Fuqing 350300, China;

2. Putian Center for Disease Control and Prevention, Fujian Putian 351100, China;

3. Licheng District Center for Disease Control and Prevention, Fujian Putian 351100, China)

Abstract: Objective The purpose of this research was to isolate and identify the pathogenic bacterium which might cause the bacterial food poisoning accident in 2016 in Putian. The traceability analysis of the pathogenic bacterium was also emphatically investigated. **Methods** The bacteria in the collected samples were isolated, cultured, biochemical identified and serotyped. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) were used for the homology analysis of the isolated strains. Virulence gene detection and drug susceptibility analysis of the isolated strains were also applied. **Results** A total of 23 strains of *Salmonella enteritidis* were isolated, of which 8 strains were isolated from the retained food samples, 2 strains from the cooks and 13 strains from the patients. The result of cluster analysis using BioNumerics indicated that all of the strains were 100% homological. The virulence gene *invA* were detected in all these strains with the same drug-resistant spectrum. **Conclusion** This food poisoning accident was caused by *Salmonella enteritidis* which carried by the cooks to the food during the preparation of the cold cuts and the fresh fruit platter. PFGE were useful for the traceability analysis of bacterial caused food poisoning.

Key words: Food poisoning; *Salmonella enteritidis*; pulsed field gel electrophoresis; drug susceptibility testing; traceability

自1885年被发现以来,沙门菌一直被视为是引起人类食物中毒的主要病原菌之一。沙门菌属革兰阴性杆菌,广泛存在于自然环境中,其对肉类、蛋类等动物源性食品污染的情况普遍存在,引发食物中毒的事件也屡见不鲜。据统计,全球每年约有15

万例死亡病例由沙门菌引起,其中约有86%是由于食物中毒引起的^[1],因此,加强对沙门菌食源性疾病的预防控制已经成为关注的焦点。脉冲场凝胶电泳(PFGE)作为目前国内外研究细菌分子分型普遍应用的一种电泳技术,以条带图谱的形式反映细菌DNA,为研究细菌同源性和疾病的溯源提供了重要的技术支持^[2]。2016年莆田市某区发生了一起食物中毒事件,经实验室检测确定为由肠炎沙门菌引起的细菌性食物中毒,应用PFGE技术,揭示此次食物中毒分离株的同源性,为食源性沙门菌的溯源

收稿日期:2018-04-19

作者简介:阮韦伟 男 技师 研究方向为病原微生物检测及分子分型 E-mail: rww3020@126.com

通信作者:张劭劼 男 主管技师 研究方向为病原微生物检测及研究 E-mail: 87272593@qq.com

提供判断依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

2016年莆田市某区一起食物中毒事件中分离出23株沙门菌,其中8株来源于留样食物,2株来源于厨师肛拭子,由莆田市疾病预防控制中心提供,13株来源于患者肛拭子,由莆田市荔城区疾病预防控制中心提供。所有菌株均经过莆田市疾病预防控制中心微生物实验室最终生化鉴定和血清学分型。PFGE用参考菌株为沙门菌标准菌株(H9812),由福建省疾病预防控制中心提供。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 2 compact全自动微生物分析系统(法国BioMérieux),CHEF Mapper脉冲场凝胶电泳系统、GEL DOC凝胶成像系统、CFX96荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪均购自美国Bio-Rad,微生物药敏分析仪(美国ThermoFisher)。

营养琼脂、半固体琼脂、三糖铁琼脂斜面(TSI)均购自北京陆桥技术有限责任公司,沙门菌显色培养基(上海科玛嘉微生物技术有限公司),沙门菌诊断血清(宁波天润生物药业有限公司、泰国S&A),蛋白酶K(德国Merck),限制性内切酶*Xba*I(日本TaKaRa),Seakem Gold Agarose(瑞士Lonza),TE缓冲液(美国Solarbio),GelRed(美国Biotium),GN4F革兰阴性药敏检测板(美国ThermoFisher),沙门菌核酸检验试剂盒(上海之江生物科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离培养及生化鉴定

收集留样食物、患者肛拭子和餐饮服务人员肛拭子,根据GB 4789.4—2010《食品安全国家标准食品微生物学检验沙门氏菌检验》^[3]对所有样品和标本进行细菌分离培养。挑取可疑菌株用VITEK 2 compact全自动微生物鉴定系统进行生化鉴定。

1.2.2 血清学分型

将生化鉴定结果为沙门菌属的菌株用沙门菌诊断血清进行血清学分型。

1.2.3 PFGE

采用王炳发等^[4]报道的方法,略作修改。使用限制性内切酶*Xba*I(60 U)于37℃酶切2 h;酶切后上样电泳19 h(电泳参数2.2~63.8 s),使用GelRed染色。应用BioNumerics软件对PFGE结果图像进行聚类分析。

1.2.4 核酸鉴定

采用沙门菌核酸检测试剂盒,检测沙门菌毒力

基因*invA*,按照说明书进行操作。

1.2.5 药敏分析

根据美国临床和实验室标准研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的标准M100-S22 2017版^[5]推荐的肠杆菌科抗生素,采用GN4F药敏卡检测,按照说明书进行操作。质控菌株为大肠埃希菌(ATCC 25922,由福建省疾病预防控制中心提供)。

2 结果

2.1 生化鉴定

挑取沙门菌显色培养基上可疑菌落进行革兰染色镜检,选取镜检结果为革兰阴性杆菌的细菌菌落转接到普通营养琼脂及TSI上,(36±1)℃培养18~24 h。挑取TSI结果为K/A++(斜面产碱、底部产酸、产气产硫化氢)的菌株相对应的营养琼脂培养基上的菌落制备菌悬液,接种到GN鉴定卡,应用VITEK 2 compact全自动微生物鉴定系统进行生化鉴定。最终鉴定结果所有菌株均为沙门菌属。

2.2 血清学分型

选取普通营养琼脂培养基上的菌落进行血清学试验,血清学鉴定结果发现23株菌株均为肠炎沙门菌。具体结果为O多价A~F群血清(+),O9因子血清(+),Hg(+),Hm(+),H因子t(-),H因子1,7(+),盐水对照(-),因此判定引起该起食物中毒事件的致病菌株为肠炎沙门菌。

2.3 PFGE分子分型结果

将23株肠炎沙门菌应用PFGE进行分子分型,研究结果表明23株菌株电泳图谱一致,条带数量大小相同,且经BioNumerics软件聚类分析显示所有菌株同源性高达100%,为同一来源的菌株,见图1。

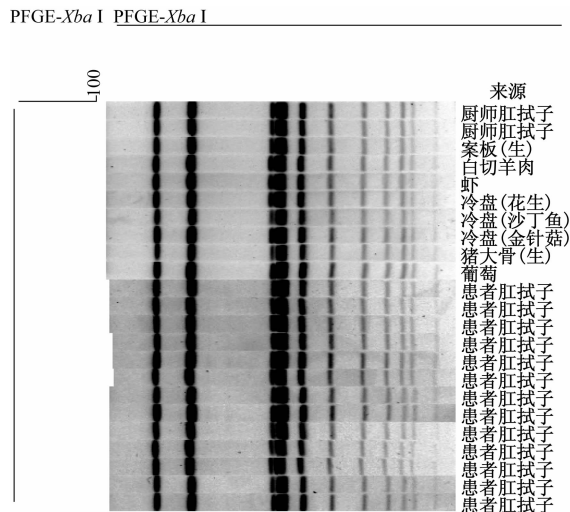
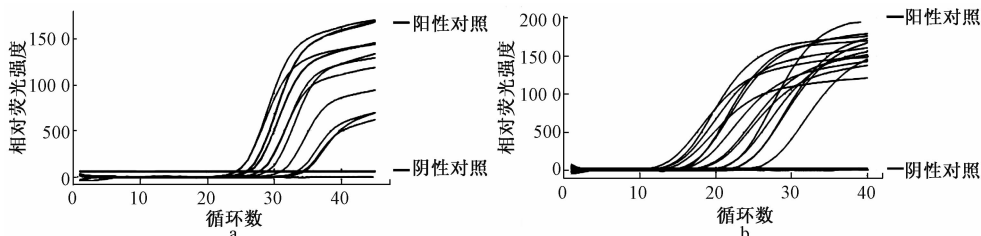


图1 23株肠炎沙门菌PFGE指纹图谱聚类分析

Figure 1 PFGE analysis of 23 strains of *Salmonella enteritidis*

2.4 毒力基因检测结果

10株来源于厨师肛拭子和留样食物的菌株(图2a)以及13株来源于患者肛拭子的菌株(图2b)沙



注:a为厨师肛拭子和留样食物分离菌株(10株);b为患者肛拭子分离菌株(13株)

图2 23株肠炎沙门菌的荧光定量PCR图谱

Figure 2 Real-time PCR spectrums of 23 strains of *Salmonella enteritidis*

2.5 药敏结果分析

此次食物中毒事件分离的所有沙门菌菌株的耐药性相同,除对环丙沙星和左氧氟沙星中度敏感,对其他检验的抗生素均敏感,见表1。

表1 肠炎沙门菌药敏结果

Table 1 Results of drug susceptibility of <i>Salmonella enteritidis</i>	耐药菌株数	中介菌株数	敏感菌株数
左氧氟沙星	0	23	0
多尼培南	0	0	23
厄他培南	0	0	23
甲氧苄啶	0	0	23
头孢他啶	0	0	23
氨苄西林	0	0	23
头孢曲松	0	0	23
环丙沙星	0	23	0

3 讨论

本研究针对2016年莆田市发生的一起由沙门菌引起的食物中毒事件展开。沙门菌是引起细菌性食物中毒最主要的致病菌之一,同时也是我国食品污染物风险监测的重要对象之一,其预防控制及检测已经成为研究的热点^[6-7]。沙门菌食物中毒最常见的血清型是肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌^[8]。由于大部分细菌性食物中毒的症状相似,因此在流行病学调查和临床症状的基础上,结合实验室的检测结果,才能为食物中毒的溯源判定提供可靠依据。

根据现场调查发现,发生食物中毒事件的酒店厨房卫生状况差且无功能分区,刀具砧板均随意放置在桌面上,没有区分生食熟食。厨师的肛拭子检出肠炎沙门菌,说明厨师是肠炎沙门菌的携带者。同时发现厨师接触过的案板、猪大骨以及制作的冷菜和水果拼盘中均检出相同病原菌,且所有食物在整个过程中没有交叉污染。所有患者当天都食用了冷菜及水果拼盘,随后均出现腹泻、呕吐等症状,采取肛拭子均检出肠炎沙门菌。所有菌株均携带有沙门菌 *invA* 毒力基因,且 PFGE 图谱证明此次食

物中毒是由同一来源肠炎沙门菌引起的,因此,推测这起事件可能是携带肠炎沙门菌的厨师在制作冷菜及水果拼盘的过程中污染了食物,引起食用人员食物中毒。此次溯源过程中所采集的样品和标本涵盖致病菌传播途径的各个环节,且每个环节都检出了相同致病菌,形成了一条完整的证据链,为这起食物中毒事件的结果判定提供了可靠的实验室支持。

23株肠炎沙门菌对8种抗生素表现出了相同的耐药性,较为敏感的为多尼培南、厄他培南、甲氧苄啶、头孢他啶、氨苄西林和头孢曲松。药敏试验有助于加强沙门菌耐药菌株的监测,促进抗生素的科学管理,结合实际调查情况合理使用,避免经验用药。

传统细菌检测方法虽然经典、可靠,但是耗时长、技术内容繁杂且无法体现菌株的相关性,无法满足食物中毒快速检测的需要。丁水军等^[9]提示可利用沙门菌主要毒力因子 *invA* 作为实验室快速诊断沙门菌的特异性基因。相对于其他分子分型技术,PFGE 技术具有结果稳定、分辨率高和重复性好等优点,能够处理庞大的细菌基因组数据,还能反映细菌的变异情况。同时,快速 PFGE 技术的出现也克服了其周期长的缺点^[10],因此 PFGE 技术被广泛应用于各种突发事件如传染病暴发、食物中毒以及院内感染等病原菌的溯源,已经成为细菌分子流行病学研究的“金标准”。而由此为基础建立起来的细菌分子分型国家电子网络(PulseNet),可以通过实验室间不同来源菌株的基因图谱进行比对,完成对细菌性传染病的监测;同时还能监测暴发疫情的流行范围,确定传染源,为及时采取公共卫生干预提供快速准确的实验室依据^[11]。随着我国对食品安全关注的提高,我国的 PulseNet 机构 PulseNet China 也在逐步完善,规范操作规程,建立标准化图谱数据库,与食源性疾病监测和食品污染物风险监测相结合,能够更好地实现对食源性疾病的

的预防控制。

参考文献

- [1] LYNCH M F, TAUXE R V, HEDBERG C W. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities [J]. *Epidemiol Infect*, 2009, 137(3): 307-315.
- [2] 孟庆峰, 潘乐, 王伟利. 脉冲场凝胶电泳技术的研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2012 (7): 26-28.
- [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 沙门氏菌检验: GB 4789.4—2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [4] 王炳发, 曹春远, 陈前进, 等. 两起肠炎沙门菌所致食物中毒的病原学研究及溯源分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 28(1): 32-36.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S22: performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement [S]. USA: CLSI, 2017.
- [6] 韩晗, 韦晓婷, 魏映, 等. 沙门氏菌对食品的污染及其导致的食源性疾病 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(5): 15-20.
- [7] 毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅. 我国细菌性食源性疾病疾病负担的初步研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, 23(2): 132-136.
- [8] LI Y F, XIE X B, XU X B, et al. Nontyphoidal *Salmonella* infection in children with acute gastroenteritis: prevalence, serotypes, and antimicrobial resistance in Shanghai, China [J]. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2014, 11(3): 200-206.
- [9] 丁水军, 陈棋炯, 孙永祥, 等. 食物中毒肠炎沙门菌的生物学特性及分子分型研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(6): 1326-1328.
- [10] ALAIDAN A, BOHOL M F, AL-THAWADI S I, et al. Rapid PFGE method for fingerprinting of *Serratia marcescens* isolates [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 78(2): 238-241.
- [11] 石晓路, 刘小立, 黄薇, 等. 脉冲场凝胶电泳在沙门菌食物中毒溯源中的应用研究 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2007, 11(5): 502-504.

· 资讯 ·

欧盟审查唑菌脒的最大残留限量

据欧盟食品安全局(EFSA)消息,近日,欧盟食品安全局就审查唑菌脒(fenbuconazole)的最大残留限量发布意见。

根据欧盟(EC) No 396/2005 的第 12 章的规定,欧盟食品安全局审查了唑菌脒的最大残留限量。

为了解唑菌脒在植物、加工商品、轮作农作物以及牲畜中的最大残留限量,欧盟食品安全局参考了 91/414/EEC 号指令当中的结论以及成员国的限量规定。

在现有数据基础之上,EFSA 得出最大残留限量提案并开展了消费者风险评估。经过评估,欧盟食品安全局认为,由于部分数据的缺少,消费者可能面临严重风险。消费者风险评估仅被认为是指示性的,所以 EFSA 提出的某些最大残留限量需要进一步的评估。

部分审查结果如下:

商品	现有欧盟 MRL/(mg/kg)	审查结果 MRL/(mg/kg)	评论
杏	1.0	0.6	需要进一步考虑
栗子,椰子,榛子,松子,开心果,杏仁	0.05	0.01	推荐
黄瓜,西葫芦,南瓜,西瓜	0.2	0.3	需要进一步考虑
马肉机内脏,牛奶,羊奶,禽肉及肝脏	0.05	0.05	推荐

(来源食品伙伴网,相关链接:<http://news.foodmate.net/2018/09/483020.html>)

关键词: 欧盟;唑菌脒;最大残留限量