

- anisakiasis in Humans, South Korea [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(2):342-344.
- [ 3 ] ARIZONO N, YAMADA M, TEGOSHI T, et al. *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii*: biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis [J]. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2012, 9(6):517-521.
- [ 4 ] QIN Y H, ZHAO Y F, REN Y X, et al. Anisakiasis in China: the first clinical case report [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2013, 10(5):472-474.
- [ 5 ] 杜春霞. 黄海鱼类寄生异尖属线虫幼虫及内弯宫脂线虫的分子鉴定[D]. 石家庄:河北师范大学, 2008.
- [ 6 ] FANG W Z, XU S S, ZHANG S L, et al. Multiple primer PCR for the identification of anisakid nematodes from Taiwan Strait [J]. *Exp Parasitol*, 2010, 124(2):197-201.
- [ 7 ] 周晶耀, 林启, 张辉, 等. 舟山渔场海洋鱼类异尖线虫感染调查及分子鉴定[J]. *预防医学*, 2017, 29(7):694-697.
- [ 8 ] PEKMEZCI G Z. Occurrence of *Anisakis simplex sensu stricto* in imported Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) represents a risk for Turkish consumers [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 185(5):64-68.
- [ 9 ] 黄燕琼, 张森, 何淑华, 等. 广州白云机场口岸入境海鱼感染异尖线虫鉴定研究[J]. *广东农业科学*, 2017, 44(4):146-151.

## 研究报告

# 北京市顺义区 87 名健康人中产气荚膜梭菌携带特征研究

李红新<sup>1</sup>, 卢迎瑞<sup>2</sup>, 张爽<sup>3</sup>, 蔡建国<sup>1</sup>, 马红梅<sup>3</sup>, 李印东<sup>3</sup>, 李颖<sup>3</sup>

(1.北京市顺义区旺泉社区卫生服务中心, 北京 101300; 2.吉林大学公共卫生学院, 吉林 长春 130021; 3.北京市顺义区疾病预防控制中心, 北京 101300)

**摘要:**目的 调查北京市顺义区健康人群携带产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, Cp)的生物特征, 研究分离菌株携带产气荚膜梭菌肠毒素(*Clostridium perfringens enterotoxin*, Cpe)、 $\beta 2$  毒力基因情况以及 Cp 在人群中的分布特征, 为 Cp 导致食源性疾病的判定提供健康对照组数据。方法 对采集的 87 份健康体检者粪便开展 Cp 分离培养、平板计数和菌株 *cpe*、 $\beta 2$  毒力基因的聚合酶链式反应(PCR)检测, 对检测结果进行统计分析。结果 87 名健康人粪便中血平板分离培养后 Cp 检出率为 64.37% (56/87); Cp 的月份、性别、年龄分布差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。共有 57 份粪便标本平板计数结果大于最低检出限 (10 CFU/g), 最高定量值为  $4.12 \times 10^6$  CFU/g, 均值为  $1.70 \times 10^5$  CFU/g, 中位数为  $5.30 \times 10^3$  CFU/g, 95% 分位数为  $7.00 \times 10^5$  CFU/g。分离的 56 株 Cp 中, *cpe* 毒力基因检出率为 0.00% (0/56),  $\beta 2$  毒力基因检出率为 73.21% (41/56)。结论 87 名健康人粪便中 Cp 检出率较高, 且  $\beta 2$  毒力基因携带率较高, Cp 引起食源性疾病的原因需要更深度生物标志识别或定量数据分析进行研究。

**关键词:**产气荚膜梭菌; 毒素; 食源性疾病; 人畜共患病原菌; 食源性致病菌

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2019)01-0013-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2019.01.004

## Characteristic of *Clostridium perfringens* isolated from 87 healthy people in Shunyi District, Beijing

LI Hongxin<sup>1</sup>, LU Yingrui<sup>2</sup>, ZHANG Shuang<sup>3</sup>, CAI Jianguo<sup>1</sup>, MA Hongmei<sup>3</sup>, LI Yindong<sup>3</sup>, LI Ying<sup>3</sup>

(1. Wangquan Community Health Service Center in Shunyi District, Beijing 101300, China;  
2. Public Health School of Jilin University, Jilin Changchun 130021, China;  
3. Beijing Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101300, China)

**Abstract: Objective** To investigate the characteristics of *Clostridium perfringens* (Cp) from 87 healthy people in Shunyi District of Beijing. To study the prevalence of *cpe* and the  $\beta 2$  toxin gene in the bacterial strain and the distribution characteristics of Cp. It will provide a baseline for the determination of foodborne diseases caused by Cp. **Methods** The stool of 87 health people were collected for Cp isolation culture, plate count and *cpe* and  $\beta 2$  genes test. Statistical analysis

收稿日期: 2018-11-14

作者简介: 李红新 女 副主任医师 研究方向为临床医学 E-mail: war36@163.com

通信作者: 李颖 男 主管检验师 研究方向为病原微生物 E-mail: liying19830805@126.com

was performed on the test result. **Results** The detection rate of Cp in 87 stool samples was 64.37% (56/87). The detection rate showed no significant difference among different sex, age and month ( $P>0.05$ ). The result of 57 fecal specimens were above the detection limit (10 CFU/g), and the maximum quantitative value was  $4.12 \times 10^6$  CFU/g. The mean value was  $1.70 \times 10^5$  CFU/g, the median value was  $5.30 \times 10^3$  CFU/g and the 95% percentile value was  $7.00 \times 10^5$  CFU/g. The detection rate of *cpe* gene was 0.00% (0/56), and that of the  $\beta 2$  gene was 73.21% (41/56). **Conclusion** High Cp detection rate was found in 87 healthy people, the carrying rate of  $\beta 2$  gene was high. The foodborne diseases caused by Cp required more in-depth biological marker identification or quantitative analysis data to conduct research.

**Key words:** *Clostridium perfringens*; toxin; foodborne diseases; zoonotic pathogens; foodborne pathogens

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, Cp) 是一种重要的食源性致病菌,也是一种重要的人畜共患病原菌<sup>[1-4]</sup>。在美国疾病预防控制中心(CDC)食源性疾病负担统计<sup>[5]</sup>中,Cp仅次于诺如病毒和沙门菌排在第三位。近年来,中国已有关于 Cp 引发食物中毒的案例报道<sup>[6-9]</sup>。因为 Cp 是条件致病菌,正常人也可携带,所以正常人 Cp 检出率和检出 Cp 的生物特征需要开展调查研究,以便与食源性疾病病例中分离的 Cp 的生物特征进行对照研究,为 Cp 导致食源性疾病诊断和病原学判定提供依据。本研究对 2018 年 3~5 月期间北京市顺义区 87 名健康人群粪便进行 Cp 分离培养,对粪便中 Cp 检出率、Cp 中 *cpe* 和  $\beta 2$  毒力基因检出率以及 Cp 在 87 名健康人群中的分布特征进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 标本来源

2018 年 3~5 月于北京市顺义区规模最大的健康证办理点旺泉社区卫生服务中心采集健康体检合格,且采集粪便当日未出现腹痛、腹泻等疾病症状的健康人群粪便。每份粪便标本采集 10 g,共 87 份,采集后于 4 °C 保存并在 12 h 内送至北京市顺义区疾病预防控制中心进行 Cp 分离和定量检测。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 2 compact 全自动细菌鉴定/药敏系统和 ANC 卡均购自法国梅里埃,厌氧培养罐,厌氧产气袋。

胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂(TSC)、液体硫乙醇酸盐(FTG)培养基、含铁牛奶培养基和细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购自北京陆桥技术股份有限公司;哥伦比亚血平板[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司]。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 粪便中 Cp 分离与纯化

用 1  $\mu$ l 接种环取粪便 1 环接种血平板,37 °C 厌氧培养 24 h 挑取平板上具有  $\alpha$  溶血环的可疑菌落再次接种血平板进行纯化,获得疑似 Cp 单克隆后,

使用 VITEK 2 compact 全自动细菌鉴定/药敏系统进行鉴定并保存菌株。

#### 1.2.2 粪便中 Cp 定量计数

参考 GB 4789.13—2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验》<sup>[10]</sup>进行。称取 1 g 粪便溶解于 10 ml 生理盐水中,充分混匀后 10 倍梯度稀释,分别制备  $10^{-2} \sim 10^{-6}$  倍粪便稀释悬液;将每个稀释度悬液分别吸取 1 ml 加入平板中,倾注冷却至 46 °C 的 TSC 培养基 15 ml,琼脂凝固后 37 °C 厌氧培养 24 h;选取计数为 20~200 CFU 黑色菌落的平板,记录可疑菌落数(T),挑取 5 个黑色可疑菌落接种至 FTG 培养基,37 °C 培养 24 h,进行革兰染色镜检、硝酸盐还原、明胶液化和牛奶暴烈发酵试验,记录鉴定为 Cp 的菌落数(A)。TSC 平板计数结果为  $T \times (A/5) \times$  稀释倍数。

#### 1.2.3 Cp 菌株 *cpe*、 $\beta 2$ 毒力基因 PCR 检测

使用试剂盒提取 Cp 菌株的基因组 DNA,对 *cpe* 和  $\beta 2$  毒力基因进行 PCR 扩增<sup>[6,11]</sup>。扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,循环 35 次;72 °C 延伸 10 min。扩增引物及目的基因见表 1。

表 1 *cpe*、 $\beta 2$  毒力基因扩增引物序列

Table 1 Oignonucleotide primers of <i>cpe</i> and $\beta 2$ toxin genes		
毒力基因	引物(5'-3')	产物大小/bp
<i>cpe</i>	F:GGAGATGGTGGATATTAGG	233
	R:GGACCAGCAGTTGTAGATA	
$\beta 2$	F:AGATTTTAAATATGATCCTAACC	567
	R:CAATACCCTTCACCAAATACTTC	

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,资料的比较应用趋势卡方检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Cp 分离情况和携带毒力基因的人群流行分布

87 份健康人群粪便标本中共有 56 份标本检出 Cp(56 株),检出率为 64.37%(56/87)。不同性别、年龄、采样时间的健康人群粪便标本中,Cp 检出率差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。对分离到的 56 株

Cp 进行 *cpe*、 $\beta 2$  毒力基因 PCR 检测,其中 *cpe* 基因检出率为 0.00% (0/56),  $\beta 2$  基因检出率为 73.21% (41/56)。分离自不同性别和不同采样时间标本的

Cp 菌株,  $\beta 2$  检出率差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 不同年龄组标本分离出的 Cp 菌株,其  $\beta 2$  检出率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 2 87 份粪便标本 Cp 及  $\beta 2$  毒力基因检出情况

Table 2 Positive detection rates of Cp strain and  $\beta 2$  toxin genes in 87 stool samples

类别	Cp			$\beta 2$ 毒力基因			
	检出率/%	$\chi^2$	<i>P</i>	检出率/%	$\chi^2$	<i>P</i>	
性别	男	69.05(29/42)	0.775	0.379	62.07(18/29)	3.810	0.048
	女	60.00(27/45)			85.19(23/27)		
年龄/岁	≤30	67.86(19/28)	0.396	0.820	63.16(12/19)	1.705	0.426
	31~50	60.98(25/41)			76.00(19/25)		
	>50	66.67(12/18)			83.33(10/12)		
采样时间	3月	55.56(25/45)	3.794	0.150	84.00(21/25)	6.232	0.044
	4月	80.00(16/20)			50.00(8/16)		
	5月	68.18(15/22)			80.00(12/15)		

## 2.2 Cp 平板计数结果和各定量区间血平板 Cp 分离率分布

57 份标本的 Cp 含菌量大于最低检出限 (10 CFU/g), 含菌量最高为  $4.12 \times 10^6$  CFU/g, 均值为  $1.70 \times 10^5$  CFU/g, 中位数为  $5.30 \times 10^3$  CFU/g, 95%分位数值为  $7.00 \times 10^5$  CFU/g。将 Cp 含菌量按不同数量级分组, 对比各组粪便标本的血平板 Cp 分离率, 结果显示粪便 Cp 含菌量数量级越高, 血平板 Cp 分离率越高。趋势卡方检验显示, 粪便中 Cp 含菌量为不同数量级的标本中, Cp 分离率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 不同含菌量粪便标本的血平板 Cp 分离情况

Table 3 Distribution of Cp isolation rates used blood plates in stool samples with different Cp counting interval

Cp 含菌量/(CFU/g)	Cp 分离率/%	$\chi^2$	<i>P</i>
<10	36.67(11/30)	24.338	0.000
10~10 <sup>2</sup> (含 10)	33.33(1/3)		
10 <sup>2</sup> ~10 <sup>3</sup> (含 10 <sup>2</sup> )	50.00(2/4)		
10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup> (含 10 <sup>3</sup> )	50.00(6/12)		
10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup> (含 10 <sup>4</sup> )	91.67(22/24)		
10 <sup>5</sup> ~10 <sup>6</sup> (含 10 <sup>5</sup> )	100.00(10/10)		
≥10 <sup>6</sup>	100.00(4/4)		
合计	64.37(56/87)	—	—

注:—表示该项不合计

## 3 讨论

本次研究说明, 87 份健康人群粪便中携带 Cp 的情况较为普遍, 且 Cp 含菌量较高。TSC 平板计数 95%分位定量值为  $7.00 \times 10^5$  CFU/g。文献报道<sup>[12]</sup> 粪便中 Cp 平板计数  $>10^6$  CFU/g 通常与 Cp 导致腹泻具有一定相关性, 这与本研究结果相符, 即健康人群粪便中 Cp 的平板计数定量值绝大部分都低于  $10^6$  CFU/g。

Cp 血平板分离培养和 TSC 平板计数两种方法对比, 发现 Cp 平板计数定量值越高, 血平板分离率

越高。TSC 平板计数为  $10^4 \sim 10^5$  CFU/g 时, 血平板分离率可达到 91.67%, 但 TSC 平板计数小于最低检出限 10 CFU/g 时, 血平板分离率为 36.67%, 所以两种方法对 Cp 检测的敏感性有各自的特点, 应综合使用两种方法对 Cp 进行分离, 确保检测的准确性。从整体检测流程看, 血平板分离培养方法具有培养时间短、工作强度小、菌落识别度高、干扰因素小等优点, 但同时会出现非优势菌容易漏检、无法定量两个缺点; TSC 平板计数法具有可定量的优点, 但同时具有识别度低、工作量大的缺点; 所以在面对不同工作时, 应综合考虑使用两种方法的利弊。

*cpe* 和  $\beta 2$  基因是两种重要的 Cp 毒力基因和致病因子<sup>[13-15]</sup>。本研究 87 份健康人群粪便标本中分离的 Cp 均不携带 *cpe* 基因, 验证了 *cpe* 基因是 Cp 是否致病的一个重要的生物标志; 而  $\beta 2$  基因检出率高达 73.21%, 说明  $\beta 2$  基因与 Cp 导致疾病的关系更为复杂, 应对该毒力基因进行深度生物标志识别或毒素定量分析, 判断其与食源性疾病的相关性。

Cp 在欧美等发达地区是最重要的食源性病原菌, 但我国 Cp 病原学研究尚处于起步阶段, 其病原识别方法研究、生物特征研究均有待加强。健康人群携带 Cp 的生物特征是 Cp 作为食源性病原菌特征研究的重要对照组资料, 所以健康人群携带 Cp 相关研究工作应同样引起重视。

## 参考文献

- [1] HARRISON B, RAJU D, GARMORY H S, et al. Molecular characterization of *Clostridium perfringens* isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-toxin-encoding gene [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8362-8370.
- [2] BEAN N H, GOULDING J S, LAO C, et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 1988-1992 [J].

MMWR CDC Surveillance Summaries, 1996, 45(5):1-66.

[ 3 ] SPARKS S G, CARMAN R J, SARKER M R, et al. Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(3): 883-888.

[ 4 ] ENGLISH M W, LOWIS S P, PENG B, et al. Pharmacokinetically guided dosing of carboplatin and etoposide during peritoneal dialysis and haemodialysis [ J ]. British Journal of Cancer, 1996, 73(6):776-780.

[ 5 ] DELAUNE E, STRAIF-BOURGEAIS S, RATARD R C, et al. Fatal foodborne *Clostridium perfringens* illness at a state psychiatric hospital-Louisiana, 2010 [ J ]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2012, 61(32):605-608.

[ 6 ] 李颖, 李长青, 王彦波, 等. 一起由 C 型产气荚膜梭菌引起的食源性疾病致病因子检测 [ J ]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(23):3379-3381.

[ 7 ] 张彬彬, 陈晓蔚. 一起耐热型 A 型产气荚膜梭菌食物中毒的病原菌分离 [ J ]. 江苏预防医学, 1997(2):68-69.

[ 8 ] 李爱军. 一起产气荚膜梭菌引起的食物中毒报告 [ J ]. 河南预防医学杂志, 2010, 21(4):324-325.

[ 9 ] 刘秀峰, 陈东宛, 吕金昌, 等. 一起由快餐盒饭引发的产气荚膜梭菌食物中毒 [ J ]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(11): 1582-1584.

[ 10 ] 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 产气荚膜梭菌检验:GB 4789.13—2012 [ S ]. 北京:中国标准出版社, 2012.

[ 11 ] 邓志爱, 李孝权, 李钊华, 等. 食品中产气荚膜梭菌的分离鉴定与基因分型 [ J ]. 热带医学杂志, 2006, 6(6):682-684.

[ 12 ] MASLANKA S E, KERR J G, WILLIAMS G, et al. Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigations. [ J ]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(7):2209-2214.

[ 13 ] 霍萍萍, 张聪敏, 胡明丽, 等. 产气荚膜梭菌  $\beta$  毒素研究进展 [ J ]. 动物医学进展, 2013, 34(9):90-94.

[ 14 ] 秦雯, 文明. C 型产气荚膜梭菌 *cpe* 基因克隆与分析 [ J ]. 科技与生活, 2012(14):172-173.

[ 15 ] 姜艳芬, 王清爱. 零售肉品中产气荚膜梭菌的检测与定型:以陕西关中地区为例 [ J ]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(11):55-60, 69.

· 资讯 ·

## 欧盟拟修订螺虫乙酯在蓝莓等果蔬中的最大残留限量

据欧盟食品安全局 (EFSA) 消息, 2019 年 1 月 18 日, 欧盟食品安全局 (EFSA) 就修订螺虫乙酯 (spirotetramat) 的最大残留限量发布意见。

据了解, 依据欧盟委员会法规 (EC) No 396/2005 第 6 章的规定, 比利时国家主管部门提出申请, 要求修改甜茴香和大黄中活性物质螺虫乙酯的最大残留限量; 奥地利收到拜耳作物公司申请, 要求修订螺虫乙酯在其他小果实和浆果和猕猴桃等中的最大残留限量。

欧盟食品安全局在两国评估报告的基础上进行了风险评估, 最终得出如下拟定限量:

商品	现行限量 (以螺虫乙酯及其四种代谢物计, 单位 mg/kg)	拟定限量 (以螺虫乙酯和螺虫乙酯与螺虫乙酯-烯醇的总和计, 单位 mg/kg)	
		螺虫乙酯	螺虫乙酯与螺虫乙酯-烯醇的总和
蓝莓、葡萄干(黑、红、白)、醋栗(绿、红、黄)、玫瑰果、桑葚(黑、白)、地中海欧楂、接骨木果、其他小水果和浆果	0.1*	0.7	0.5
蔓越莓	0.2	0.7	0.5
猕猴桃	0.3	4	3
大蒜	0.1*	0.4	0.3
甜茴香、大黄	0.1*	4	4

注: MRL: 最大残留水平; LOQ: 量化限制; \* 表示 MRL 是在量化极限下提出的

(来源食品伙伴网, 相关链接: <http://news.foodmate.net/2019/01/503268.html>)