

食源性疾病

一起由食用家庭自制辣椒酱引起肉毒中毒的实验室诊断

孟卫卫,李方,袁永和,田甜,林羽佳,苏静,马鑫

(新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心,新疆乌鲁木齐 830002)

摘要:目的 对1例疑似肉毒中毒病例的相关样品进行实验室检测。方法 参照GB 4789.12—2016对病例暴露食品样品(自制辣椒酱、咸菜、芝麻酱、卤猪蹄)和粪便标本进行前处理,应用实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测样品/标本中肉毒毒素基因,通过动物试验进行毒素检测和型别确认,经接种疱肉培养基和TPGYT培养基增菌培养,采用血琼脂平板进行分离、纯化,并做菌种鉴定。结果 5份样品/标本经实时荧光定量PCR法检测,仅在自制辣椒酱样品中检测到A型肉毒毒素基因;通过动物试验进行毒素检测,在自制辣椒酱样品中检测到A型肉毒毒素,其他样品/标本中未检测到肉毒毒素;5份样品/标本中,从自制辣椒酱和卤猪蹄样品中均分离到A型肉毒梭菌。结论 该起中毒事件是由食用肉毒梭菌污染的家庭自制辣椒酱引起。

关键词:肉毒梭菌;肉毒毒素;食物中毒;实验室诊断

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)05-0763-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.05.021

Laboratory diagnosis of food poisoning due to *Clostridium botulinum* contamination of home-made food

MENG Weiwei, LI Fang, YUAN Yonghe, TIAN Tian, LIN Yujia, SU Jing, MA Xin

(Center for Disease Prevention and Control of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Xinjiang Urumqi 830002, China)

Abstract: Objective Laboratory analyses were performed for a case of food poisoning. **Methods** The potential foods involved (homemade chili sauce, pickles, sesame sauce, and marinated pig feet) and fecal samples were prepared according to GB 4789.12—2016. *Clostridium botulinum* neurotoxin gene was detected by real-time polymerase chain reaction (PCR). The detection and confirmation of the toxin were performed by animal experiments. After inoculation on blister meat and TPGYT media, bacteria were cultured, isolated, purified, and identified using blood agar medium. **Results** The chili sauce tested positive for gene producing type A botulinum toxin in five samples by real-time PCR. Type A botulinum toxin was detected only in chili sauce in animal experiments. *Clostridium botulinum* type A was isolated from chili sauce and marinated pig feet. **Conclusion** The food poisoning was attributed to the consumption of home-made chili sauce contaminated with *Clostridium botulinum*.

Key words: *Clostridium botulinum*; botulinum neurotoxin; food poisoning; laboratory testing

肉毒中毒是一种由肉毒毒素(*Botulinum neurotoxin*)引起的潜在危及生命的疾病^[1]。肉毒毒素毒性强,可由肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)产生,或由携带有肉毒毒素基因的巴氏梭菌(*Clostridium baratii*)和丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)产生^[2-3]。肉毒毒素根据抗原性的差别可分为A、B、C、D、E、F和G 7个型,其中A、B、E、F 4个型可引起人类中

毒^[4]。肉毒中毒有食源性肉毒中毒、创伤性肉毒中毒、婴儿肉毒中毒等多种形式,其中以食源性肉毒中毒最为常见^[5]。国外中毒食品多为自制或市售蔬菜、水果、鱼、肉类罐头等,我国主要是家庭自制发酵豆制品和面制品,其次为动物性食品^[6-7],其他类食品引起的中毒事件比较少。肉毒中毒发病急,进展快,及时给予相应型别的抗毒素血清治疗是关键^[8]。由于肉毒中毒早期临床症状多样且不典型,易造成误诊、漏诊,因此快速、准确的实验室诊断对临床治疗肉毒中毒有重要参考价值。2021年8月乌鲁木齐市某医院报告1例疑似肉毒中毒病例,为明确诊断,对该病例暴露食品样品和粪便标本开展

收稿日期:2022-01-11

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2019D01C086)

作者简介:孟卫卫 男 高级实验师 研究方向为食品卫生

E-mail:364387023@qq.com

通信作者:马鑫 女 主任医师 研究方向为食品卫生

E-mail:369819211@qq.com

实验室检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料

2021年8月14日,乌鲁木齐市某医院报告1例疑似肉毒中毒的病例,该病例8月3日发病,8月7日就诊,临床症状表现为胸闷、胸痛、呼吸短促、视力模糊、眼睑下垂等。经医院鉴别诊断,高度怀疑为肉毒毒素中毒。流行病学调查显示,该病例发病前曾食用自制辣椒酱、咸菜、芝麻酱、卤猪蹄等食品。

1.1.2 待检样品

病例暴露食品:自制辣椒酱、咸菜、芝麻酱、卤猪蹄,各1份,病例粪便1份。

1.1.3 主要仪器与试剂

BD MAX全自动核酸提取及荧光PCR分析系统(美国BD),罗氏480实时荧光PCR仪(瑞士罗氏),厌氧培养盒,恒温培养箱,低温生化培养箱,高速冷冻离心机,生物安全柜,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometer, MALDI-TOF-MS,法国Biomerieux)。

庖肉基础培养基、TPGYT基础培养基、庖肉牛肉粒、革兰染液均购自北京陆桥技术股份有限公司,血琼脂平板(郑州安图生物工程有限公司),胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司),肉毒毒素诊断血清(兰州生物制品研究所),明胶磷酸盐缓冲液(海博生物),BD MAX™ ExK™ TNA-3核酸提取试剂盒(美国BD),SuperReal PreMix(Probe)(北京天根生化科技有限公司),厌氧产气袋(日本三菱),液体石蜡(天津鑫铂特化工有限公司),肉毒毒素基因(A、B、E、F型)检测用引物和探针试剂由国家食品安全风险评估中心支持,所有试剂与耗材均在有效期内。

1.1.4 实验动物

无特定病原体(SPF)级健康雄性昆明小鼠,15~20g,购自新疆医科大学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(新)2018-002。动物试验通过新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心实验动物福利和伦理委员会审查。

1.2 方法

1.2.1 样品/标本制备

参照GB 4789.12—2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》^[9]方法对样品/标本进行处理及肉毒毒素检测、增菌培养、菌株分离和鉴定。自制辣椒酱、咸菜、芝麻酱、

卤猪蹄和粪便5份样品/标本分别与明胶磷酸盐缓冲液按1:1(m:m)进行稀释,充分混匀后备用。

1.2.2 肉毒毒素基因检测

吸取1.2.1中样品/标本匀液750 μL,经BD MAX全自动核酸提取及荧光PCR分析系统,同时进行A、B、E、F型肉毒毒素基因检测。

扩增反应体系:2×Super Real PreMix(Probe) 12.5 μL,引物各0.6 μL,探针0.4 μL,ddH₂O 5.9 μL, DNA模板5 μL,总体积25 μL。反应条件:95℃预变性15 min;95℃变性20 s,60℃退火1 min,72℃延伸30 s,循环40次;Ct值≤35的扩增结果判定为阳性。

1.2.3 肉毒毒素检出试验

将1.2.1中样品/标本匀液经3 000 r/min离心10 min(离心半径13.5 cm),收集上清。上清液分为两组:A组取上清液直接用于毒素检测;B组加入10%胰酶37℃孵育60 min。每组腹腔注射小鼠3只,每只0.5 mL,观察和记录48 h内的中毒表现。同时设置肉毒毒素阳性对照组和明胶磷酸盐缓冲液阴性对照组。

1.2.4 肉毒毒素确证和定型试验

取经1.2.3中肉毒毒素检出试验检测为阳性的样品上清液,分为7组:1组加入等量明胶磷酸盐缓冲液混匀,煮沸10 min;2组加入等量明胶磷酸盐缓冲液混匀;3~7组分别与A、B、E、F各单型肉毒毒素诊断血清及混合型肉毒毒素诊断血清等量混匀,37℃孵育45 min。每组分别腹腔注射小鼠两只各0.5 mL,观察96 h内小鼠中毒表现和死亡情况。同时设置肉毒毒素阳性对照组和明胶磷酸盐缓冲液阴性对照组。

1.2.5 增菌培养

取1.2.1中样品/标本匀液2 mL分别接种于10 mL经煮沸后的庖肉培养基和TPGYT培养基中,每种培养基分别接种两支。接种后的庖肉培养基和TPGYT培养基分别在35℃和28℃厌氧培养5~10 d。

1.2.6 菌株分离与鉴定

用接种环直接挑取1.2.1中样品/标本匀液1环在血琼脂平板上划线接种,每个样品平行培养两个平板,35℃厌氧培养24 h;另将1.2.5中厌氧培养后的庖肉培养基和TPGYT培养基用接种环分别取1环在血琼脂平板上划线接种,35℃厌氧培养24 h。观察血平板上菌落形态,挑取可疑菌落传代培养后进行革兰染色镜检、MALDI-TOF-MS鉴定。

1.2.7 增菌培养液和分离株的肉毒毒素基因检测

1.2.5中的样品增菌培养液参照1.2.2方法,

经 BD MAX 同时进行 A、B、E、F 型肉毒毒素基因检测。1.2.6 分离到的可疑菌落传代培养后,通过热裂解法提取 DNA,采用实时荧光定量 PCR 进行 A、B、E、F 型肉毒毒素基因检测。

1.2.8 分离株产毒试验

将 1.2.7 中肉毒毒素基因检测为阳性的分离菌株分别接种于 10 mL 经煮沸后的庖肉培养基和 TPGYT 培养基中,按 1.2.5 方法厌氧培养 5 d。培养物按 1.2.3 和 1.2.4 方法进行肉毒毒素检出、确证和定型试验。

2 结果

2.1 肉毒毒素基因检测结果

自制辣椒酱、咸菜、芝麻酱、卤猪蹄和患者粪便 5 份样品/标本经明胶磷酸盐缓冲液对比稀释,通过 BD MAX 全自动核酸提取及荧光 PCR 分析系统同时进行 A、B、E、F 型 4 种肉毒毒素基因检测,发现 5 份样品/标本中仅自制辣椒酱样品中 A 型肉毒毒素基因有典型 S 型扩增曲线,且 Ct 值为 24.9。可判定在自制辣椒酱样品中检测到肉毒毒素基因,型别为 A 型,其他 4 份样品/标本中均未检测到肉毒毒素基因。

2.2 肉毒毒素检测结果

自制辣椒酱样品经明胶磷酸盐缓冲液稀释,取

上清液直接腹腔注射小鼠,小鼠 1 h 后出现竖毛、四肢瘫软,呼吸困难并呈现蜂腰、风箱式呼吸等肉毒毒素中毒症状,24 h 内小鼠全部死亡;上述样品上清液经胰酶处理后腹腔注射小鼠,小鼠同样出现肉毒中毒症状并死亡。其他 4 份样品/标本上清液经腹腔注射小鼠后,小鼠未出现肉毒毒素中毒症状。自制辣椒酱样品再经毒素确证和定型试验,确认从该样品中检出肉毒毒素,且型别为 A 型。

2.3 菌株分离和鉴定结果

5 份样品/标本中,自制辣椒酱样品在增菌培养前后均分离到疑似菌落,卤猪蹄样品在增菌培养后分离到疑似菌落。分离到的疑似菌落在血琼脂平板上呈扁平半透明状,由内到外迁延生长,外围常呈现有一圈圈的纹路;经革兰氏染色镜检,有芽孢,位于菌体次极端,整体呈梭状;经 MALDI-TOF-MS 检测,结果为生孢/肉毒梭菌(既可能是生孢梭菌,也可能是肉毒梭菌);应用实时荧光定量 PCR 进行 A、B、E、F 型肉毒毒素基因检测,A 型肉毒毒素基因检测结果为阳性;经产毒试验确认,分离株可产 A 型肉毒毒素。综上所述,判定分离到的菌株为 A 型肉毒梭菌。其余样品/标本在增菌前后均未分离到疑似菌落,增菌液经肉毒毒素基因检测也均为阴性。样品/标本中菌株分离和鉴定结果见表 1。

表 1 样品中菌株分离和鉴定结果

Table 1 Isolation and identification of strains from samples

样品/标本	疑似菌落		分离株鉴定				综合鉴定结果
	增菌前	增菌后	革兰染色镜检	MALDI-TOF-MS	肉毒毒素基因	产毒试验	
自制辣椒酱	+	+	梭状芽胞杆菌	生孢/肉毒梭菌	A 型	A 型肉毒毒素	A 型肉毒梭菌
卤猪蹄	-	+	梭状芽胞杆菌	生孢/肉毒梭菌	A 型	A 型肉毒毒素	A 型肉毒梭菌
芝麻酱	-	-	—	—	—	—	—
咸菜	-	-	—	—	—	—	—
粪便	-	-	—	—	—	—	—

注:—表示为未分离到疑似菌落,未做鉴定;+表示检出-表示未检出;生孢/肉毒梭菌表示既可能是生孢梭菌,也可能是肉毒梭菌

3 讨论

在本次疑似肉毒毒素中毒的实验室检测中,首先对暴露食品、病例粪便等 5 份样品/标本直接进行肉毒毒素基因检测,在收到样品/标本后 3 h 内得到检测结果,结果显示自制辣椒酱中 A 型肉毒毒素基因检测结果为阳性,鉴于肉毒毒素基因和肉毒毒素的高度一致性^[10],初步判定这是一起由 A 型肉毒毒素引起的食物中毒事件。继续开展肉毒毒素检出、确证和定型试验以及肉毒梭菌的分离鉴定试验进行确认。5 份样品/标本中,从自制辣椒酱和卤猪蹄中均分离到肉毒梭菌,经鉴定为 A 型。肉毒毒素检出试验结果则显示仅在自制辣椒酱中检出肉毒

毒素,卤猪蹄中并未检出,卤猪蹄中的肉毒梭菌可能是在食用过程中被自制辣椒酱中肉毒梭菌污染所致,其中的肉毒梭菌因无厌氧等环境条件,并未产生肉毒毒素。根据 WS/T 83—1996《肉毒梭菌食物中毒诊断标准及处理原则》中实验室诊断需从中毒食品中检出肉毒毒素,并确定其型别(如中毒食品未能采到,可采取患者粪便或血液进行检测)这一原则^[11],结合临床表现和流行病学调查,判定此次中毒事件为一起肉毒梭菌污染家庭自制辣椒酱引起的肉毒中毒。

肉毒中毒的实验室诊断中,主要依据肉毒毒素的检出和肉毒梭菌的分离鉴定,在诊断过程中,通

常需要结合多种鉴定方法进行综合判断,才可获得准确可靠的鉴定结果。其鉴定过程繁琐、耗时长,往往不能及时得到鉴定结果。本研究在对样品进行肉毒毒素检测和增菌培养之前,对样品直接开展肉毒毒素基因检测,可在3 h内得到试验结果,为此次肉毒中毒事件的快速判定提供了首要参考依据。在肉毒梭菌的分离鉴定过程中,经常会分离到相似的其他种类的梭菌如生孢梭菌、索氏梭菌、丁酸梭菌等,其中肉毒梭菌与生孢梭菌在生化特征和遗传学特性方面非常相似^[12],常用的细菌学鉴定方法如革兰氏染色法、VITEK2、MALDI-TOF-MS、16S rRNA测序等都很难将二者区分^[13],因此需要结合肉毒毒素基因检测、产毒试验、菌落形态等多种鉴定方法进行综合判断。MALDI-TOF-MS常用于细菌种水平的鉴定,尽管该鉴定方法目前无法区分肉毒梭菌和生孢梭菌,但可将二者与其他梭菌如索氏梭菌、丁酸梭菌等相区分,该方法操作简单、快速,结果可靠,因此可用于分离平板上疑似菌落的快速鉴定。肉毒毒素的检测目前主要还是要通过小鼠试验,实验条件要求高,耗时长,且样品中所含成分复杂,可能会出现非特异性的反应等,但该方法敏感、特异性强,其检测结果依然是肉毒中毒实验室诊断的判定标准。在本研究中,从自制辣椒酱和卤猪蹄中均分离到A型肉毒梭菌,此结果无法确定此次中毒事件是由何种食品引起,但毒素检出试验结果显示仅在自制辣椒酱中检测到肉毒毒素,从而明确了自制辣椒酱是此次肉毒中毒事件中的中毒食品,可见肉毒毒素检出试验在中毒事件判定及溯源方面依然具有决定性的参考价值。

本次肉毒中毒事件的中毒食品为家庭自制辣椒酱,与我国肉毒中毒食品则多为家庭自制发酵豆制品和面制品有所不同,罗建忠与徐文英^[14]曾报道有豇豆蔬菜罐头、自制西瓜水、自制啤酒等食品引起的肉毒中毒。国外肉毒中毒食品中自制或市售罐装蔬菜、水果等比较常见,AUSTIN等^[15]的研究结果表明,多种型别的肉毒梭菌在适宜条件下的多种蔬菜中可以生长繁殖并产生毒素。因此,除发酵豆制品、面制品之外,还应对自制罐装蔬菜等食品可能发生肉毒中毒予以重视。

参考文献

- [1] LÚQUEZ C, EDWARDS L, GRIFFIN C, et al. Foodborne botulism outbreaks in the United States, 2001-2017 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 713101.
- [2] 董银苹,李颖,徐进,等. B型婴儿肉毒中毒的实验室诊断[J]. *中国食品卫生杂志*, 2016, 28(5): 576-580.
DONG Y P, LI Y, XU J, et al. Laboratory-based confirmation of type B infant botulism [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2016, 28(5): 576-580.
- [3] 董银苹,江涛,赵帅,等. 我国首例由丁酸梭菌引起婴儿E型肉毒中毒实验室诊断研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2020, 32(5): 499-503.
DONG Y P, JIANG T, ZHAO S, et al. Laboratory investigation of the first infant botulism case caused by type E botulinum neurotoxin producing *Clostridium butyricum* in China [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2020, 32(5): 499-503.
- [4] 杨英超,张华捷,马霄. 肉毒梭菌及其毒素分型方法概述[J]. *疾病监测*, 2022, 37(1): 23-31.
YANG Y C, ZHANG H J, MA X. Review on *Clostridium botulinum* and its toxin typing methods [J]. *Disease Surveillance*, 2022, 37(1): 23-31.
- [5] 古丽娜·吐尔地,高鹏亚,孙晖,等. 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市一起肉毒中毒事件调查分析[J]. *疾病监测*, 2022, 37(1): 45-49.
GULINA T E D, GAO P Y, SUN H, et al. An investigation of a botulism poisoning event in Urumqi, Xinjiang [J]. *Disease Surveillance*, 2022, 37(1): 45-49.
- [6] 高庆仪,刘宏道,黄愿峰,等. 中国的肉毒梭菌食物中毒[J]. *中国食品卫生杂志*, 1989, 1(3): 45-50.
GAO Q Y, LIU H D, HUANG Y F, et al. Foodborne botulism in China [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 1989, 1(3): 45-50.
- [7] SOBEL J, TUCKER N, SULKA A, et al. Foodborne botulism in the United States, 1990—2000 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, 10(9): 1606-1611.
- [8] 张鹏,董建光,白丽丽,等. 53例肉毒杆菌食物中毒临床病例分析[J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(5): 459-464.
ZHANG P, DONG J G, BAI L L, et al. Clinical analysis of 53 patients with *Clostridium botulinum* food poisoning [J]. *Chinese Critical Care Medicine*, 2017, 29(5): 459-464.
- [9] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验: GB 4789.12—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. Microbiological examination of food hygiene-Examination of *Clostridium botulinum* and botulinus toxin: GB 4789.12—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [10] 雷高鹏,杨小蓉,黄玉兰,等. 四川省肉毒梭菌PCR基因分型方法比较研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(4): 445-449.
LEI G P, YANG X R, HUANG Y L, et al. Comparative study on PCR genotyping methods of *Clostridium botulinum* [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2017, 29(4): 445-449.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 肉毒梭菌食物中毒诊断标准及处理原则: WS/T 83—1996[S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Diagnostic criteria and principles of management for food poisoning of *Clostridium botulinum*: WS/T 83—1996 [S]. Beijing: Standards Press of China, 1996.
- [12] 董银苹,韩春卉,江涛,等. 生孢梭菌代谢产物对ICR小鼠的

- 毒性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(5): 414-417.
- DONG Y P, HAN C H, JIANG T, et al. To study the toxic effect of the culture supernatant produced by *Clostridium sporogenes* in ICR mice [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2014, 26(5): 414-417.
- [13] 董银苹, 徐进, 王伟, 等. 浓缩乳清蛋白粉及其制品中梭状芽胞杆菌的分离及鉴定[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(5): 494-498.
- DONG Y P, XU J, WANG W, et al. Isolation and identification of *Clostridium* from whey protein concentrate and its products [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2015, 27(5): 494-498.
- [14] 罗建忠, 徐文英. 新疆肉毒中毒流行状况及预防对策[J]. 现代预防医学, 2002, 29(1): 97-98.
- LUO J Z, XU W Y. Epidemic status and preventive measures of botulism in Xinjiang[J]. Modern Preventive Medicine, 2002, 29(1): 97-98.
- [15] AUSTIN J W, DODDS K L, BLANCHFIELD B, et al. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* on inoculated fresh-cut packaged vegetables [J]. Journal of Food Protection, 1998, 61(3): 324-328.