

食源性疾病

2018—2022年北京市某区腹泻病例中致泻性大肠埃希菌的感染和分子分型特征分析

张爽¹,王安娜¹,付奎元²,王园园¹,李颖¹,李辉¹,张建涛¹,王会波¹,王丽丽³

(1. 北京市顺义区疾病预防控制中心,北京 101300;2. 包头市昆都仑区疾病预防控制中心,内蒙古包头 014010;3. 北京市疾病预防控制中心,北京 100013)

摘要:目的 了解北京市某区腹泻病例中致泻性大肠埃希菌(DEC)的感染情况和分子分型特征,为进一步防控工作提供依据。方法 2018—2022年从北京市某区3家监测哨点医院采集1600例腹泻病例粪便标本,分离标本中的DEC;采用多重PCR技术检测其毒力基因得到致病型,结合流行病学和临床资料进行分析。同时应用脉冲电场凝胶电泳(PFGE)技术得到分子分型,并将EPEC、EPEC和EAEC型菌株图谱作聚类分析。结果 2018—2022年北京市某区1600份标本中有144份标本分离到DEC,检出率为9.00%(144/1600)。菌株致病型以EPEC为主,其次依次为EPEC、EAEC、EHEC,未检出EIEC。DEC感染病例男女比例为1.48:1,31~45岁年龄组的DEC检出率最高(11.15%,59/529)。DEC阳性检出率最高的年份为2019年,各年夏季检出率均最高。DEC在不同年龄组和年份中的阳性检出率均有显著差异。DEC阳性病例症状以腹泻、脱水、腹痛为主,且多为水样便。144株DEC分为111条带型,同源性13.07%~100.00%。同带型的菌株数目2~7条,分离时间间隔从当天到几年不等。结论 本区DEC致病型以EPEC和EPEC为主,且存在EHEC感染;夏季高发,青壮年中检出较多;PFGE条带呈高度多态性分布。

关键词:致泻性大肠埃希菌;腹泻;感染;分子分型;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)06-0729-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.06.014

Analysis of the infection and molecular characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* in a specific district of Beijing City, 2018—2022

ZHANG Shuang¹, WANG Anna¹, FU Kuiyuan², WANG Yuanyuan¹, LI Ying¹, LI Hui¹,
ZHANG Jiantao¹, WANG Huibo¹, WANG Lili³(1. Shunyi District Center for Disease Prevention and Control, Beijing 101300, China;
2. Kundulun District Center for Disease Prevention and Control, Inner Mongolia Baotou 014010, China;
3. Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective To comprehend the epidemiological and molecular characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) in a specific district of Beijing City from 2018 to 2022, aiming to provide evidence for the prevention and control of related diseases. **Methods** Stool specimens of 1 600 diarrhea cases were collected from 3 surveillance sentinel hospitals in one district of Beijing from 2018 to 2022, and DEC strains were isolated from the specimens. The virulence genes were detected by multiplex PCR, and the pathogenic types were obtained. The epidemiological and clinical data were analyzed. Simultaneously, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used to ascertain the molecular types of the strains. Cluster analysis was performed on the fingerprints of EPEC, EPEC, and EAEC strains. **Results** DEC strains were isolated in 144 of 1 600 specimens from one district of Beijing from 2018 to 2022, with a detection rate of 9.00% (144/1 600). The primary pathogenic type was EPEC, followed by EPEC, EAEC, and EHEC, no EIEC cases were

收稿日期:2023-07-18

基金项目:科技部“食品安全关键技术研发”重点专项(2017YFC1601400)

作者简介:张爽 女 副主任技师 研究方向为病原微生物实验室检验和实验室质量管理 E-mail:43761191@qq.com

王安娜 女 副主任医师 研究方向为感染性疾病应急处置 E-mail:412911294@qq.com

张爽和王安娜为并列第一作者

通信作者:王丽丽 女 副主任技师 研究方向为食品微生物和食源性疾病预防和溯源 E-mail:wangll4585@163.com

detected. The male-to-female ratio of DEC infection cases was 1.48:1, with the highest detection rate occurring in the 31~45 age group (11.15%, 59/529). The year 2019 exhibited the highest positive detection rate of DEC, with the highest rates consistently observed during the summer months. Significant differences in the positive detection rate of DEC were observed among different age groups and years. Most of the DEC-positive patients suffered diarrhea, dehydration, abdominal pain and watery stool. The 144 DEC strains yielded 111 bands, with homology ranging from 13.07% to 100.00%. Isolates of the same type ranged from 2 to 7 strains, and their separation intervals varied from the same day to several years. **Conclusion** ETEC and EPEC were the predominant pathogenic types of DEC in this area, while EHEC infections persisted. DEC exhibited a high incidence during the summer and was more frequently detected in young adults. The PFGE bands exhibited a highly polymorphic distribution.

Key words: Diarrheagenic *Escherichia coli*; diarrhea; infection; molecular typing; foodborne pathogens

致泻性大肠埃希菌(diarrheagenic *Escherichia coli*, DEC)^[1]可以导致人类腹泻,甚至可引发致死性溶血性尿毒症综合征(Hemolytic uremic syndrome, HUS)^[2]。根据毒力因子、致病性、临床表型和流行病学等特征,DEC主要可分为5类主要的致病型,分别是:肠致病性大肠埃希菌(Enteropathogenic *E. coli*, EPEC)、肠侵袭性大肠埃希菌(Enteroinvasive *E. coli*, EIEC)、肠聚集性大肠埃希菌(Enteroadgregative *E. coli*, EAEC)、肠产毒性大肠埃希菌(Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)和肠出血性大肠埃希菌(Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)。DEC在世界范围内均可引起腹泻和食源性疾病暴发,2011年DEC大型疫情暴发曾给德国造成了13亿美元的损失^[3];在南非和南亚,DEC是导致儿童重度腹泻的重要病原^[4];DEC也是我国感染性腹泻主要的病原菌之一,在我国曾发生因感染DEC导致177人死亡的大型疫情^[5]。为进一步了解本区DEC的感染情况和分子分型特征,我们采用了暴发溯源中细菌分型的“金标准”:脉冲电场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)^[6]以完善DEC指纹图谱数据库,为本地区的腹泻防控提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 样本来源

2018—2022年收集北京市某区3家哨点医院腹泻病例1600例的粪便标本,其中男性889例、女性711例(参考《WS 271—2007 感染性腹泻诊断标准》,病例定义为腹泻 ≥ 3 次/d的急性腹泻患者),同时收集病例流行病学和临床信息。标本置于Cary-Blair培养基立即冷藏送至属地疾控中心实验室进行细菌分离。

1.2 主要试剂及仪器

北京卓诚惠生生物科技股份有限公司:5种DEC核酸多重实时荧光PCR检测试剂盒(A版本)(A2418);青岛海博生物技术有限公司:Cary-Blair氏运送培养基(HB0120)、麦康凯琼脂(HB6238)和

营养琼脂(HBKD0109);美国索莱宝公司:Tris-HCl、EDTA、SDS、TBE和蛋白酶K;瑞士LONZA公司:SeaKem Gold Agarose;美国NEB公司:限制性内切酶Xba I;美国Biotium公司:Gelred染液;非伤寒沙门菌Braenderup血清型H9812为北京市疾病预防控制中心提供。所有试剂均在有效期内使用。美国ABI公司:ViiA7型实时荧光定量PCR仪;美国伯乐公司:脉冲电场凝胶电泳CHEF Mapper和凝胶成像仪。

1.3 检测方法

1.3.1 菌株分离鉴定及致病型判定

粪便标本接种麦康凯(MAC)培养基37℃过夜培养,挑选多个乳糖发酵(粉色)或不发酵(白色)的可疑菌落进行荧光定量PCR检测,根据试剂说明书确定其毒力基因,判定致病型,收集菌株并保存。

1.3.2 PFGE分子分型

参考国家致病菌识别网推荐的DEC PFGE标准化分型方法。制备吸光度4.2左右的菌悬液,37℃水浴条件下使用Xba I对DEC的DNA片段酶切4h。电泳参数为:6.0 V/cm,电泳时间18h,切换时间6.8~35.4s。电泳后凝胶Gelred染色30min,过夜脱色后用凝胶成像仪读胶并拍摄图像,上传至致病菌识别网进行PFGE聚类分析。

1.4 统计学分析

采用SPSS 25.0软件进行统计分析和数据处理,用频数(构成比)[$n(\%)$]进行统计描述,组间比较采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEC检出情况

2018—2022年北京市某区3家监测哨点医院共采集的1600例腹泻患者粪便样本中有144份标本分离到DEC,检出率为9.00%(144/1600)。共检出除EIEC以外的4种DEC:其中ETEC检出最多,检出率为3.88%(62/1600);EPEC次之,检出率为2.94%(47/1600);EAEC检出率为2.06%(33/1600);EHEC检出率为0.13%(2/1600)。

2.2 不同性别DEC的分布情况

1 600份粪便标本中,男性889例、女性711例。男女阳性检出率分别为9.67%(86/889)和8.16%(58/711),阳性病例男女比例1.48:1,经 χ^2 检验,性别检出率差异无统计学意义($\chi^2=1.109, P=0.292$)。在检出的4种DEC中,男、女性均为ETEC检出率最高,分别为4.50%(40/889)和3.09%(22/711),其次是EPEC(男性3.15%,28/889;女性2.67%,19/711)和EAEC(男性2.02%,18/889;女性2.11%,

15/711),2例EHEC阳性的病例均为女性。

2.3 不同年龄组DEC的分布

腹泻患者的年龄分布在1月龄至96岁,DEC阳性病例为14~81岁。将每15岁分为1个年龄组,75岁以上为1组,将病例分为6组。阳性检出率最高为<31~45岁年龄组(11.15%,59/529),DEC阳性检出率的年龄分布具体见表1。经 χ^2 检验,不同年龄组的DEC阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=15.077, P=0.010$)。

表1 2018—2022年北京市某区3家监测哨点医院腹泻患者粪便DEC检出率年龄分布

Table 1 Age distribution of DEC detection rate of stool specimens from diarrhea patients in 3 sentinel hospitals in one district of Beijing from 2018 to 2022

年龄/岁	DEC阳性病例数	腹泻病例总数	DEC阳性检出率/%	ETEC病例数	EPEC病例数	EAEC病例数	EHEC病例数
≤15	1	69	1.45	0	0	1	0
<15~30	48	439	10.93	27	11	9	1
<31~45	59	529	11.15	25	26	7	1
<46~60	17	253	6.72	4	6	7	0
<61~75	16	235	6.81	4	4	8	0
>75	3	75	4.00	2	0	1	0
总计	144	1 600	9.00	62	47	33	2

2.4 DEC检出率的时间分布

2018—2022年每年的DEC阳性检出率分别为9.60%(36/375)、13.37%(48/359)、2.17%(7/323)、10.31%(37/359)和8.70%(16/184),检出率最高的年份为2019年,各年份DEC阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=27.719, P<0.001$)。

DEC检出率的月份分布如图1所示:在2~11月间均有DEC检出,在7月达到最高峰。其中,ETEC在5~10月间有检出,7月达高峰;EPEC在2~11月间有检出,高峰在5月和8月;EAEC在6~10月间有检出,高峰为6月和10月;EHEC仅有2例检出,在2021年的4月、5月。

2.5 临床症状分布

144例DEC阳性病例最常见的全身症状是脱水(19.44%,28/144),其次是发热(16.67%,24/

144)、乏力(16.67%,24/144)、口渴(9.72%,14/144)和头痛(1.39%,2/144);消化系统症状除腹泻外,最主要为腹痛(58.33%,84/144),其次是恶心(54.17%,78/144)、呕吐(22.92%,33/144)和里急后重(4.17%,6/144);粪便性状占比最高,为水样便(68.75%,99/144),其次为稀便(29.86%,43/144)、血便(0.69%,1/144)和黏液便(0.69%,1/144)。

ETEC、EPEC和EAEC与总DEC的临床症状情况相似,均以腹痛、恶心为主要症状,以水样便为主要粪便性状。其中血便病例为EAEC阳性,黏液便病例为EPEC阳性。

2.6 PFGE聚类分析

144株DEC共分为111条带型,其中,62株ETEC分为41个带型;47株EPEC分为43个带型;33株EAEC分为25个带型;2株EHEC分为2个带型。将ETEC、EPEC和EAEC分别使用国家致病菌识别网进行PFGE在线图谱聚类。详见图2。

ETEC条带同源性分布在38.10%~100%。9个同源性100%的分支中(图2中标为红色),每个分支的菌株数为2~7株。分支7的2株菌株分离时间为同一天,分支2、3的分离时间为同一月份,分支8的分离时间在2个月内;分支1、5分离在同一年,间隔3~4个月;分支4、6、9分离自不同年份。

EPEC条带同源性分布在13.07%~100%。4个同源性100%的分支中(标为绿色),每个分支的菌株数均为2株。分支1的分离时间仅间隔1d;其

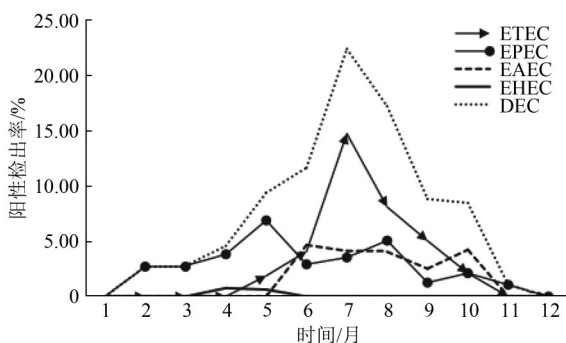


图1 2018—2022年北京市某区3家监测哨点医院腹泻患者粪便DEC检出率月份分布

Figure 1 Monthly distribution of DEC detection rate of stool specimens from diarrhea patients in 3 sentinel hospitals in one district of Beijing from 2018 to 2022

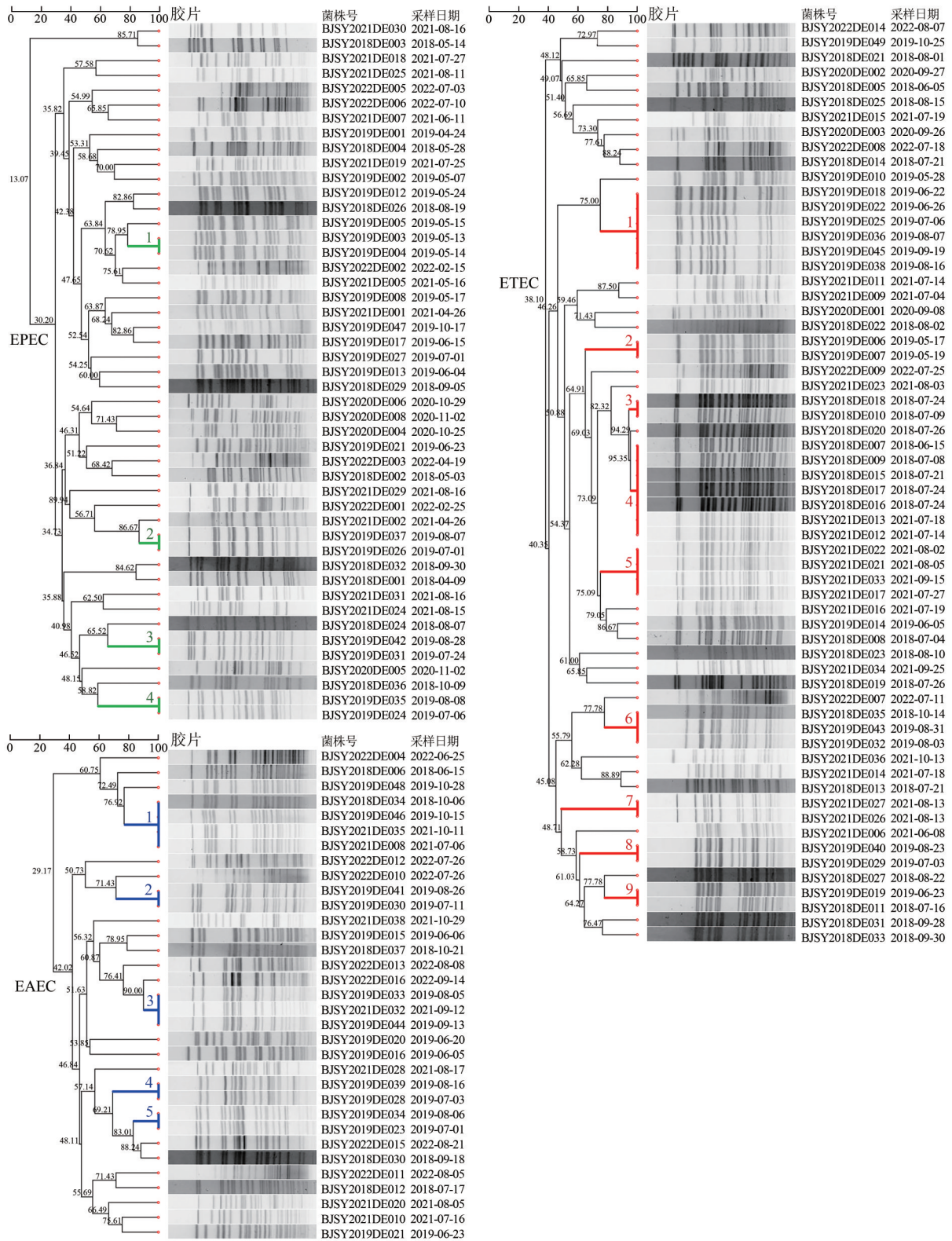


图2 2018—2022年北京市某区3家监测哨点医院腹泻患者粪便分离的DEC系统进化树

Figure 2 Phylogenetic trees of DEC strains isolated from stool specimens of diarrhea patients from 3 surveillance sentinel hospitals in one district of Beijing from 2018 to 2022

余分支的分离时间均间隔2个月以内。

EAEC条带同源性分布在29.17%~100%。5个同源性100%的分支中(标为蓝色),每个分支的菌株数为2~4株。分支2、4、5的分离时间间隔在2个月以内;分支1、3分离自不同年份。

3 讨论

DEC是引起人类腹泻流行和食源性暴发最重要的致病菌之一,曾在国内引起涉及人数上百的大规模暴发,并导致了177人死亡。在加拿大,仅从2008年到2018年就发生了11起与绿叶蔬菜有关

的 O157:H7 DEC 感染疫情^[7]。由其感染引起的腹泻发病率高、流行广泛,并有一定的传染性,患病严重者甚至可引发 HUS^[2]。DEC 对各年龄人群的健康和公共卫生均造成了巨大的威胁。本区多年的腹泻病原学监测显示 DEC 仍为腹泻病例主要的细菌病原,检出率多年来一直居高不下。本研究结果显示 DEC 2018—2022 年总检出率为 9.00%,与 2013—2018 年的 8.80%^[8]相近。

EPEC 常引起儿童腹泻^[9]和旅行者腹泻^[10],其在本地区的 DEC 中检出率最高,EPEC 次之,该结果与本区^[8]、北京市丰台区^[11]及安徽省马鞍山市^[12]之前的研究结果一致。此外,有研究显示在 2009—2018 年全国急性腹泻患者主动哨点监测中 DEC 的检出率为 6.68%,EAEC 为优势菌群,女性检出较多^[13],推测可能是不同地区生态环境、经济水平、饮食结构、生活习惯的差异造成了 DEC 的检出率、优势菌群和流行特征不同。自 2013 年北京地区开展腹泻监测以来,从未检出过 EHEC^[14]。本次在 2021 年春季短时间内监测到 2 例 EHEC 感染病例,提示应加强 EHEC 的进一步监测。EHEC 并未出现典型的血便症状,可能由于其中 1 例混合轮状病毒感染且血便并非 EHEC 感染后必然出现的症状导致,其余 DEC 阳性病例症状则仍以腹泻导致的消化道症状为主。

本区 DEC 男女阳性检出率差异无统计学意义,全年龄段均可感染,16~45 岁的青壮年阳性检出率较高,这与之前的研究^[15]相符。有研究表明,环境温度的升高与 DEC 的发病率升高相关^[16]。在本研究中,DEC 冬季检出较少,夏季检出较多,与之前研究相符^[17]。究其原因,可能与青壮年外出就餐机会较多,烧烤等夏季常见的烹饪方式对食物加热不充分有关,加之夏季进食生食、凉拌和冷饮等食物机会较多,增加了 DEC 通过污染食品感染患者的机会。DEC 的 4 种致病型时间分布各有特点:EPEC 作为检出率最高的型别,其检出高峰与总 DEC 一致,出现在 7 月;EPEC 和 EAEC 全年均出现了 2 个检出高峰,分别在 5 月、8 月和 6 月、10 月。EHEC 检出数量太少,在本地仅在春季有检出。由于新冠疫情反复的原因,2020 年 2~7 月、2021 年 1~3 月和 2022 年的 11 月、12 月未开展相关工作,也可能对本地 DEC 的时间分布结果有一定影响。

PFGE 具有分辨率高、成本低等优点,目前仍是病原细菌分子流行病学研究和暴发疫情溯源常用的方法之一^[18],被誉为暴发溯源中细菌分型的“金标准”。我们应用 PFGE 技术,得到了本区 2018—2022 年的 DEC 指纹图谱数据库,并对 ETEC、EPEC

和 EAEC 这 3 种主要的型别进行了聚类分析。可以看出,本区的 DEC 大部分菌株同源性相距较远,结果与北京市之前的研究结果一致^[19],推测可能为散发食源性致病菌。每种 DEC 中均有部分菌株同源性 100%,且分离时间接近,尤其是 ETEC 有个别 100% 同源分支所指病例数较多,该结果是否提示存在腹泻暴发事件仍需流行病学数据支撑。此外,有些 100% 同源的菌株分离时间相距较远,这种现象可能是由于 PFGE 没有监测到菌株基因组发生的进化,或有部分 DEC 菌株进化缓慢。这同时也提示了我们应用 PFGE 进行分子分型的局限性。今后可应用结果更为精细、准确的全基因组测序技术,结合传统的 PFGE 方法进行致病菌分子分型及溯源分析。

综上,DEC 作为一种常见的腹泻致病菌,在本区仍处于流行高发态势,并可能有食源性疾病暴发风险,应持续对其监测,并加强分子分型研究,科学防控 DEC 在本地发生及流行。

参考文献

- [1] GOMES T A T, ELIAS W P, SCALETSKY I C, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology], 2016, 47(Suppl 1): 3-30.
- [2] CODY E M, DIXON B P. Hemolytic uremic syndrome [J]. Pediatric Clinics of North America, 2019, 66(1): 235-246.
- [3] YANG S C, LIN C H, ALJUFFALI I A, et al. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development [J]. Archives of Microbiology, 2017, 199(6): 811-825.
- [4] CROXEN M A, LAW R J, SCHOLZ R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli* [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2013, 26(4): 822-880.
- [5] XIONG Y W, WANG P, LAN R T, et al. A novel *Escherichia coli* O157:H7 clone causing a major hemolytic uremic syndrome outbreak in China [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e36144.
- [6] LOPEZ-CANOVAS L, MARTINEZ BENITEZ M B, HERRERA ISIDRON J A, et al. Pulsed field gel electrophoresis: Past, present, and future [J]. Analytical Biochemistry, 2019, 573: 17-29.
- [7] COULOMBE G, CATFORD A, MARTINEZ-PEREZ A, et al. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to romaine lettuce in Canada from 2008 to 2018: An analysis of food safety context [J]. Journal of Food Protection, 2020, 83(8): 1444-1462.
- [8] 冯冉,甄国新,李颖,等. 2013—2018 年北京市顺义区哨点医院腹泻病例中致泻性大肠埃希菌流行特征分析 [J]. 首都医科大学学报, 2020, 41(6): 991-996.
FENG R, ZHEN G X, LI Y, et al. Epidemiological characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* among diarrhea outpatients in Shunyi district of Beijing, 2013—2018 [J]. Journal of Capital Medical University, 2020, 41(6): 991-996.

- [9] MIRHOSEINI A, AMANI J, NAZARIAN S. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 117: 162-169.
- [10] OKOH A I, OSODE A N. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC): A recurring decimal in infants' and travelers' diarrhea [J]. Reviews on Environmental Health, 2008, 23(2): 135-148.
- [11] 余红, 石婧, 王兆娥, 等. 2018—2019年北京市丰台区腹泻病例感染致泻大肠埃希菌 PFGE 分子分型[J]. 预防医学情报杂志, 2021, 37(6): 846-850.
YU H, SHI J, WANG Z E, et al. Molecular typing of diarrheagenic *Escherichia coli* by using pulsed field gel electrophoresis from 2018 to 2019 in Fengtai district from Beijing [J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2021, 37(6): 846-850.
- [12] 王利, 洪颖, 陈谨, 等. 安徽省马鞍山市 2014—2018 年腹泻患者中致泻性大肠埃希菌病原学及流行特征分析[J]. 疾病监测, 2019, 34(11): 1010-1016.
WANG L, HONG Y, CHEN J, et al. Etiologic and epidemiologic characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* in diarrhea patients in Maanshan, Anhui, 2014—2018 [J]. Disease Surveillance, 2019, 34(11): 1010-1016.
- [13] ZHOU S X, WANG L P, LIU M Y, et al. Characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* among patients with acute diarrhea in China, 2009—2018 [J]. The Journal of Infection, 2021, 83(4): 424-432.
- [14] 张爽, 王丽丽, 杨茜, 等. 北京市某区产 2k 新亚型志贺毒素大肠埃希菌的检出及其分子特征分析[J]. 疾病监测, 2023, 38(7): 872-877.
ZHANG S, WANG L L, YANG X, et al. Molecular characterization of *Escherichia coli* producing a novel Shiga toxin 2k subtype detected in one district of Beijing [J]. Disease Surveillance, 2023, 38(7): 872-877.
- [15] 吴晓芳, 陈莉萍, 严伟, 等. 2018—2020 年湖州市腹泻人群致泻大肠埃希菌流行特征及病原分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(3): 260-263.
WU X F, CHEN L P, YAN W, et al. Epidemiologic characteristics and pathogen analysis of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Huzhou, 2018—2020 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(3): 260-263.
- [16] PHILIPSBORN R, AHMED S M, BROSI B J, et al. Climatic drivers of diarrheagenic *Escherichia coli* incidence: A systematic review and meta-analysis [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2016, 214(1): 6-15.
- [17] 李迎慧, 邱亚群, 洗慧霞, 等. 深圳市腹泻人群致泻性大肠埃希菌流行及病原特征研究[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(1): 115-118.
LI Y H, QIU Y Q, XIAN H X, et al. Epidemiologic and etiologic characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* infection in population in Shenzhen [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2016, 37(1): 115-118.
- [18] NEOH H M, TAN X E, SAPRI H F, et al. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2019, 74: 103935.
- [19] 王丽丽, 张寻, 陈倩. 2014—2018 年北京市人源性肠致病性大肠埃希菌耐药特征及分子特征研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(4): 371-374.
WANG L L, ZHANG X, CHEN Q. Antimicrobial resistance and molecular characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrheal patients in Beijing from 2014 to 2018 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(4): 371-374.