

· 论 著 ·

广州市首例利齐菲尔德沙门菌食物中毒的病原学分析

张颖*, 张欣强, 邓志爱, 侯水平, 胡肖娟

摘要:目的 对 2011 年 7 月广州市发生的一起细菌性食物中毒进行病原学特征分析。方法 对送检病人粪便、厨工肛拭及食物等样品进行荧光 PCR 检测和分离培养,对分离株进行生化鉴定、血清分型、脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型和药敏分析。结果 从病人粪便、肛拭和厨房抹布共分离到 18 株利齐菲尔德沙门菌,为相同的 PFGE 型别,药敏结果显示菌株对庆大霉素及妥布霉素耐药,对头孢噻肟、亚胺培南、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑等 15 种抗生素均敏感。结论 实验判定这是一起由同一克隆型的利齐菲尔德沙门菌污染厨房环境所引起的食物中毒事件,PFGE 分型法为暴发溯源提供分子流行病学证据和支持。

关键词:食物中毒;利齐菲尔德沙门菌;荧光 PCR;脉冲场凝胶电泳;药敏试验
中图分类号:R378.22 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)6-684-04

Analysis of the pathogenic characteristics of the first food-poisoning outbreak caused by *Salmonella Litchfield* in Guangzhou. ZHANG Ying*, ZHANG Xin-qiang, DENG Zhi-ai, HOU Xiao-juan. (Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440)

Abstract: Objective To study the pathogenic characteristics of *Salmonella enterica* serovar Litchfield isolated from a food-poisoning outbreak. Methods Real-time PCR, Biochemistry identification, serotyping, pulse-field gel electrophoresis (PFGE) and drug sensitivity test were applied to detect the pathogen and to trace the possible strains. Results Eighteen *Salmonella Litchfield* strains were isolated from the patients' fecal stool and a piece of kitchen cloth, which were classified as the same PFGE type. All strains were resistant to Amikacin, Gentamicin and Toramycin, but sensitive to Cefotaxime, Imipenem, Trimethoprim/sulfamethoxazole, et al. Conclusions One *Salmonella Litchfield* clone was responsible to the food poisoning outbreak. PFGE gives molecular epidemiological evidence and support for the source tracing of an outbreak.

Key words: Food poisoning; *Salmonella Litchfield*; Real-time PCR; Pulse-field gel electrophoresis (PFGE); Drug sensitivity test

沙门菌食物中毒在国内外均多见,其中肠炎沙门菌(*Salmonella enteritidis*)最为常见,其他血清型则比较罕见。在 2011 年 7 月广州某职业技术学校陆续有人出现急性胃肠炎症状,主要症状以中低度发热、腹泻、腹痛、胃纳差、乏力为主,大便性状呈水样便、稀便,无明显脓血便,经流行病学调查为一起约 70 人感染的食源性疾病暴发。接报后,本实验室立即对病人的粪便和肛拭、厨工肛拭、食品以及环境样品进行病原学检测,同时做脉冲场凝胶分型溯源和药敏试验,证实这是一起由同一克隆型利齐菲尔德沙门菌所引起食物中毒事件,现将病原学检测情况报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 现场采集样品共 57 份,其中病例粪便和肛拭子 39 份,食堂从业人员肛拭 2 份,食物 11 份,食堂环境棉拭 4 份,水池水 1 份。

1.1.2 试剂与仪器 荧光定量 PCR 检测试剂盒(沙门菌-志贺菌二联荧光 PCR,副溶血弧菌-霍乱弧

菌二联荧光 PCR,单增李斯特菌-O157 大肠埃希菌二联荧光 PCR,金黄色葡萄球菌-溶血性链球菌二联荧光 PCR)购自深圳生科源生物技术有限公司;SC 增菌液、SS 培养基(北京路桥生物制品公司),沙门显色平板(法国科玛嘉公司),沙门菌诊断血清(宁波天润生物制品有限公司),GN 生化鉴定条、AST-GN31 药敏检测卡(法国梅里埃公司),SeaKem Gold 琼脂糖(Cambrex Bio Science Rockland 公司)、蛋白酶 K、限制性内切酶 Xba (大连宝生物公司)。7500 Real-Time PCR System (美国 Applied Biosystems 公司),CHER Mapper (美国 Bio-Rad 公司),凝胶成像系统为 Bio-Rad Quantity One (美国 Bio-Rad 公司),全自动微生物生化及药敏鉴定系统 VITEK2-ComPACT(法国梅里埃公司)。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光 PCR(real-time PCR) 取病人粪便 2~3g、食品样品 3g,于生理盐水研磨均匀,研磨液经无菌纱布过滤,去除粗杂质,获得滤过液 0.5ml,病人

基金项目 广州市医药卫生科技项目(No.201102A213249)

作者单位 广州市疾病预防控制中心病毒免疫科 广东 广州 510440

作者简介 张颖(1980~),女,汉,硕士,主管技师,主要从事腹泻病原菌研究。

* 通讯作者 E-mail: estelle_zy@yahoo.com.cn

及厨工肛拭、环境拭子样品用 10ml 生理盐水震荡 1 min, 取 0.5ml 液体。上述液体加入 100 μ l DNA 提取液, 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min, 冰浴放置 5min, 12 000 rpm 离心 5min, 取上清液 5 μ l 作为 DNA 模板, 进行沙门菌、志贺氏菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌、单增李斯特菌、O157 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和溶血性链球菌的荧光 PCR 检测, 反应液配置与 PCR 设置按说明书。

1.2.2 分离培养 按照食物中毒诊断标准及技术处理总则 GB14938~1994 和国家《食品微生物检验标准》(GB/T4789~2008)对样品进行食源性致病菌分离检测。同时, 取荧光 PCR 检测沙门菌阳性的样品 25g, 接种 250mlSC 增菌液 37 $^{\circ}$ C 培养 24h, 划线分离于 SS 平板和科玛嘉沙门显色平板, 放置 37 $^{\circ}$ C 培养 24h, 观察平板菌落生长。

1.2.3 生化鉴定及血清凝集试验 挑取平板生长的可疑菌落, 革兰氏染色镜检, 分纯培养后接种 GN 鉴定卡进行全自动生化鉴定。对生化鉴定为致病菌的菌株进行血清凝集试验。

1.2.4 脉冲场凝胶电泳分型 (PFGE) 参考美国 Pulse Net 公布的关于非伤寒沙门菌 PFGE 标准实验室规程进行。挑取新鲜培养的纯菌落, 制备成 OD₆₁₀=1.35 菌悬液, 取 200 μ l 的菌悬液与 10 μ l 蛋白酶 K(25mg/ml) 和 200 μ l 1% Seakem Gold 琼脂糖混合, 加入模具中制成胶块, 然后将胶块放入 5ml 细胞裂解液中(蛋白酶 K 终浓度为 0.1mg/ml), 于 54 $^{\circ}$ C 恒温水浴摇床中震荡 2h 裂解; 倒掉细胞裂解液后加入 10ml 50 $^{\circ}$ C 预热的灭菌水, 50 $^{\circ}$ C 水浴轻摇 15min, 洗 2 次, 再加入 50 $^{\circ}$ C 预热的 TE 缓冲液, 50 $^{\circ}$ C 水浴轻摇 15min, 洗 4 次, 切割出宽度 2mm 的胶块, 用 80U Xba 限制性内切酶 (200 μ l 体系) 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 4h, 0.5 \times TBE 缓冲液平衡 15min, 于 14 $^{\circ}$ C 进行脉冲场凝胶电泳, 电压为 6vol/cm, 脉冲夹角 120 $^{\circ}$, 脉冲参数 2.2~63.8s, 电泳时间 18h, Marker 为沙门菌 Braenderup 血清型 H9812 株。电泳结束后, 凝胶经 EB 染色 30 min 后拍摄图像, 使用 BioNumerics v.4.6 软件, 选择 Dice 相关系数和非加权配对算术平均法(UPGMA)进行处理图谱和聚类分析。

1.2.5 药敏检测 根据美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 抗微生物药物敏感性试验的之行标准(2008 版)推荐的肠杆菌科抗生素, 使用 AST-GN31 药敏检测卡对分离株进行药敏检测, 抗菌药物包括阿米卡星、氨基糖苷、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松、环丙沙星、厄他培南、庆大霉素、亚胺培南、左氧氟沙星、美罗培南、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林/克拉维酸、替卡环素、妥布霉素、甲氧苄啶/

磺胺甲恶唑。质控菌株为阴沟肠杆菌 ATCC 700323 和嗜麦芽寡养单胞菌 ATCC 17666。

2 结果

2.1 荧光 PCR 检测 荧光定量 PCR 检测显示 22 份样本为沙门菌阳性, 其中 21 份为病人粪便, 1 份为厨房抹布, Ct 值分布在 11~17 之间, 厨房从业人员肛拭子、食品及 3 份厨房环境涂抹拭子均为阴性, Ct 值 >35, 见图 1。

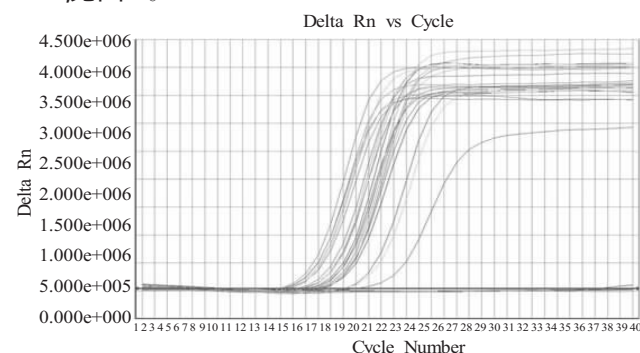


图 1 病人和环境样本荧光 PCR 扩增曲线 (22 份样品阳性, 1 个阳性对照和 1 个阴性对照)

Fig 1 Real-time PCR amplification curve of patients' and environment samples (22 positive, 1 positive control and 1 negative control)

2.2 分离培养结果 17 份病人粪便样本和 1 份厨房抹布棉拭子在 SS 平板及科玛嘉沙门显色平板上均生长出典型的沙门菌菌落。SS 平板菌落形态为 1~2mm 大小, 产硫化氢的圆形透明光滑菌落, 科玛嘉沙门显色平板菌落形态为 2~3mm 大小的紫红色菌落, 挑取可疑菌落进行革兰氏染色, 油镜下见中等大小无芽孢 G⁻ 杆菌。

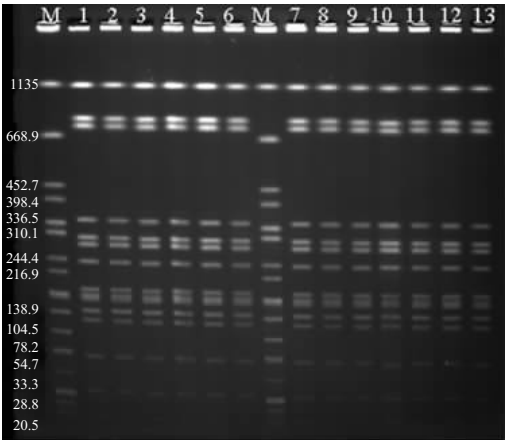
2.3 生化鉴定及血清分型 22 份 PCR 阳性标本分离出 18 株可疑菌株, 菌落制成菌悬液, 接种 GN⁺ 鉴定卡, 经全自动微生物生化及药敏鉴定系统 VITEK2-ComPACT 鉴定为沙门菌, 概率为 99%, 见表 1。18 株沙门菌分离株的诊断血清凝集试验结果显示: A-F 和“O”多价凝集, 与 O8 因子 H₁ 及 H₂ 因子血清呈强凝集, 其他因子血清均不凝集, 生理盐水对照不凝集, 确定为利奇菲尔德沙门菌, 抗原结构式为 6,8,1₂:1,2。

2.4 PFGE 分型结果 从 Xba I 酶切的 PFGE 图谱分析, 可见各菌株 DNA 条带为 14 条, 酶切条带分子量范围为 20kb~1100kb。用 BioNumerics 软件对各菌株间进行聚类分析, 将相似性系数小于 99% 作为分型标准, 18 株利奇菲尔德沙门菌分离株的聚类相关系数为 100%, 显示菌株来源为同一克隆型的利奇菲尔德沙门菌, 见图 2~3。

表 1 18 株沙门菌 VITEK2-ComPACT 生化鉴定结果

Table 1 Biochemistry identification of 18 *Salmonella* strains by VITECK 2- ComPACT

生化项目	结果	生化项目	结果	生化项目	结果	生化项目	结果	生化项目	结果	生化项目	结果
Items	Results	Items	Results	Items	Results	Items	Results	Items	Results	Items	Results
DP3	-	OFG	-	GC	+	ACE	-	ESC	-	PL I	-
URE	-	CIT	-	MAL	-	TDA	-	PXB	-	LAC	-
MLT	-	MAN	+	XYL	-	RAF	-	SOR	+	SUC	-
INO	-	ADO	-	COU	-	H ₂ S	+	ONP	-	RHA	+
ARA	+	GLU	+	ARG	-	LYS	+	ORN	+	OXI	-



注 M 沙门菌 H9812 分子量标准 ;1~6 病人肛拭分离株 ;7~13 病人粪便分离株

Note M *Salmonella* serotype Braenderup H9812 standard 1~6: Isolates of patients' stools 7~13: Isolates of patients' fecal

图 2 部分病人利奇菲尔德沙门菌分离株的 PFGE 电泳图
Fig 2 PFGE of *Salmonella Litchfield* strains isolated from some patients

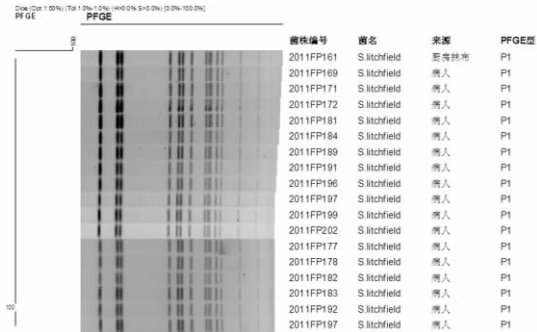


图 3 18 株利奇菲尔德沙门菌的 PFGE 图谱聚类分析图
Fig3 PFGE-based dendrogram of 18 *Salmonella Litchfield* isolates

2.5 药敏试验结果 18 株利奇菲尔德沙门菌的药敏试验检测结果一致 ,其中对阿米卡星 ,庆大霉素和妥布霉素耐药 ,对替卡西林 / 克拉维酸、哌拉西林、哌拉西林 / 他唑巴坦、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松、氨曲南、厄他培南、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星、左氧氟沙星、甲氧苄啶 / 磺胺甲恶唑、替卡环素敏感。

3 讨论

结合流行病学和实验室检测结果 ,确认本次的食物中毒事件是由利奇菲尔德沙门菌污染所引起的 ,且属于同一污染源。调查所知 ,所有病例均在 6 月 30 日

和 7 月 1 日至少有一顿晚餐在学校食堂就餐 ,第二天开始出现不适 ;实验室在 17 名病人和厨房抹布中检出同一血清型沙门菌 ,通过药敏谱和 PFGE 图谱比对分析证实其为同源株 ,推测污染源很可能来自这块厨房抹布。本实验室在 2 件食物、3 个厨工肛拭子和 7 个病人粪便中都分离出条件致病菌变形杆菌 ,但是通过 PFGE 聚类分析和根据 Tenover 等提出的菌株同源性判别标准判断^[1] ,12 株变形杆菌 PFGE 图谱相差较大 ,不属于相同或相近克隆株 ,说明本次食物中毒的主要致病菌是利奇菲尔德沙门菌。该学校的厨房具有独立的洗消间、加工间、备餐间和仓库 ,但无更衣洗手消毒设施 ;厨工在制作食物过程中未戴口罩和手套 ;现场检查发现了蟑螂、苍蝇等 ,说明该厨房卫生环境恶劣 ,故能同时存在变形杆菌污染。本研究中仍有部分样品未能检出致病菌 ,原因可能是错过了最佳采样机会 ,病人已经服食了抗生素而导致菌量的减少。

在广州地区的食物中毒事件中 ,沙门菌污染居第三位 ,除了一起为姆班达卡沙门菌(*Salmonella enterica* serovar Mbandaka)外 ,其余均为肠炎沙门菌 ,集中在每年的 4~11 月份出现 ,主要污染糕点和公用具^[2]。在国内外由利奇菲尔德沙门菌引起食物中毒非常少 ,曾报道在 1992 年南京发生一起 39 人的食物中毒和 2010 年湖南嘉禾县发生一起 12 人的食物中毒^[3,4]。至目前为止 ,这是广州市首次报道的由该菌引起的食物中毒事件。因此 ,笔者对本次获得的利奇菲尔德沙门菌株进行了药敏实验 ,发现其对阿米卡星 ,庆大霉素和妥布霉素表现耐药 ,这与 2010 年湖南的食物中毒菌株结果不同(仅对氯霉素耐药)^[4]。因此 ,引起食物中毒的沙门菌血清型的变迁和菌株耐药性的出现应当引起卫生部门的注意。

本次检测在 57 份样本中分离出 18 株利奇菲尔德沙门菌 ,而荧光 PCR 检出 22 个样本沙门菌阳性 ,显示荧光 PCR 检测方法比传统方法更加敏感 ,对及时诊断起到了重要作用。在本实验中所使用到的沙门菌 - 志贺菌二联荧光 PCR 试剂盒的探针是针对沙门菌侵袭性基因 *invA* 和沙门菌毒力岛 基因 *ssaR* ,其中 *invA* 基因在部分山夫登堡沙门菌(*Salmonella*

enterica serovar *Senftenberg*) 和利齐菲尔德沙门菌不存在或者缺失,而 *ssaR* 是属特异性基因,因此双重探针的设计保证了所有沙门菌的检出^[5]。随着分子生物学技术的发展,针对病原菌的快速检测方法和分型技术日益完善。PFGE 分型方法不但能够从基因水平进行属种和亚种的鉴定,而且具有鉴定基因型间差异的能力,不但能快速鉴定病原菌,还可以进一步追踪细菌遗传上的亲缘关系。除了在疾病爆发的调查中提供分子流行病学证据和支持,还能为病原菌数据库的建立提供更详细的资料,特别是在食品污染的监测中发现重要菌株和及时预警。

参考文献:

- [1] Timothy J. Barrett, Peter Gerner-Smidt, et al. Interpretation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns in Foodborne Disease Investigations and Surveillance [J]. Foodborne pathogens and Disease, 2006, 3.
- [2] Li XQ, Li CH, Deng ZA, et al. Study on the pathogenic characteristics of bacterial food-poisoning from 2000 to 2006 in Guangzhou [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2011, 21(3): 622-624. (In Chinese)
(李孝权, 李钊华, 邓志爱, 等. 广州地区七年细菌性食物中毒的病原特征研究[J]. 中国卫生检验, 2011, 21(3): 622-624.)
- [3] Liu YY. A food-poisoning outbreak caused by *Salmonella* Litchfield [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 1994, 17(2): 101. (In Chinese)
(刘月茵. 一起利齐菲尔德沙门菌引起食物中毒[J]. 中华医学检验杂志, 1994, 17(2): 101.)
- [4] Duan CH, Li SF, Li GW. Laboratory detection of a food-poisoning outbreak caused by *Salmonella* Litchfield [J]. China Modern Medicine, 2010, 17(27): 129-130. (In Chinese)
(段朝标, 李淑芳, 李刚文. 利齐菲尔德沙门菌引起食物中毒的实验室检测[J]. 中国当代医学, 2010, 17(27): 129-130.)
- [5] Shi XL, Hu QH, Zhang JF, et al. Rapid simultaneous detection of *Salmonella* and *Shigella* using modified molecular beacons and real-time PCR [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2006, 27(12): 1053-1056. (In Chinese)
(石晓璐, 扈庆华, 张佳峰, 等. 多重实时 PCR 快速同时检测沙门菌和志贺菌[J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(12): 1053-1056.)

收稿日期 2012-01-21 编辑 符式刚

(上接第 678 页)

27 人的配偶做了 HIV 抗体检测,其中 HIV 抗体确认阳性 14 例^[1]。④生理需求。随着社会经济的不断发展,人们的物质生活水平不断提高,营养状况和身体机能有了很大的提高,50 岁以上的老年人生理上对性的需求也有所提高。从性交易中获得满足以后,更多的是心理上产生对性的需求。⑤心理需求。社会发展带来的家庭结构变化,50 岁以上的老年男性,因子女长大、成家立业,家庭负担减轻了,在家庭的地位发生了变化,生活变得空闲,心生寂寞。面对方便获得的性交易萌生了好奇心理,促进了商业性行为的发生。从性交易中获得满足以后,更多的是心理上产生对性的需求。有研究表明:男人的收入、常年在外出差、职业、婚姻状况等对找不找小姐有一定影响,但这并不是决定性因素。最根本的原因还是自我约束能力差^[2]。

近年来,老年人 HIV 感染在全球和国内正成为艾滋病疫情上升的新的特点^[3]。国内已有相关研究表明,50 岁以上的男性性病感染率为 16.7%,艾滋病的感染率为 2.9%^[4]。从人群特点分析,老年人不同于年轻人,感染上 HIV 后,可能会受到来自家庭和社会更大的歧视。在临床上,也会带来更多的诊断和治疗困难^[5]。加上,部分老年人会出现心理变化,认为“来日无多,及时行乐”,在艾滋病的传授中扮演“桥梁”角色。从社会层面看,随着社会经济发展,人类预期寿命延

长,尤其是我国正逐步进入老年社会,对老年无论心理和生理需求都应该引起重视。

因此,研究老年人的艾滋病相关行为、心理、性生理等因素,开发有效干预模式,保护老年人群健康,将是今后艾滋病防治工作刻不容缓的重要内容之一。

参考文献:

- [1] Li J, Chen X, Qin BY, et al. A study on the behavior and psychological factors among HIV positive elderly in Xiangxi, Hunan [J]. Practical preventive medicine, 2010, 17(2): 227-229. (In Chinese)
(李桀, 陈曦, 覃碧云, 等. 老年感染者感染 HIV 相关危险因素调查[J]. 实用预防医学, 2010, 17(2): 227-229.)
- [2] Can G. The epidemiological study of sub-populations at high risk for HIV/AIDS [D]. University of Graduation Southeast University. (In Chinese)
(曹淦. 江苏省男性艾滋病相关高危人群流行病学研究[D]. 东南大学硕士学位论文.)
- [3] UNAIDS, WHO. AIDS epidemic update November 2009: 7-14. UNAIDS/09.36E/JC1700E
- [4] Chen H, Lu FB, Jiang HY, et al. Prevalence study on HIV infection of 272 men over fifty years old in some county in Jiang Xi Province [J]. Chin J Prev Med. 2010, 44(12): 1152-1153. (In Chinese)
(陈红, 卢飞豹, 姜红英, 等. 江西省某县 272 名 50 岁以上男性 HIV 感染的现况调查 [J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(12): 1152-1153.)
- [5] Paul D, Zelenetz, Marcia E, Epstein. HIV in the elderly [J]. AIDS patient care and STDs. 1988, 12(4): 255-262.

收稿日期 2011-10-17 编辑 符式刚