

自贡市 2007-2010 年鼠伤寒沙门菌感染的脉冲场凝胶电泳分析

张玲, 刘祥, 陈曦, 肖波, 王斌, 孙松松, 周阳, 王红

自贡市疾病预防控制中心, 四川 自贡 641000

摘要: **目的** 回顾性分析自贡市 2007-2010 年分离到的沙门菌菌株, 评估分子分型技术在食源性传染病暴发识别和处置中的价值。 **方法** 对自贡市 2007-2010 年从食品和腹泻患者中分离的沙门菌进行脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 实验, 用 BioNumerics 软件分析菌株之间的相似度。 **结果** 55 株沙门菌中, 来源于 2007-2008 年的 10 个腹泻患者粪便和 2008 年的 15 个皮蛋中的 25 株鼠伤寒沙门菌菌株 PFGE 带型相似度为 100%, 均为 P9 带型。 **结论** 感染鼠伤寒沙门菌的皮蛋是导致自贡市 2007-2008 年 10 名患者腹泻暴发的污染源, 为快速准确识别食源性疾病暴发并及时溯源、控制, 应在食品安全监测中普及 PFGE 等分子分型技术。

关键词: 脉冲场凝胶电泳; 鼠伤寒沙门菌; 皮蛋; 腹泻; 患者

中图分类号: R446 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2018)01-0082-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.01.023

Analysis of *Salmonella typhimurium* infection by pulsed field gel electrophoresis in Zigong City, 2007-2010

ZHANG Ling*, LIU Xiang, CHEN Xi, XIAO Bo, WANG Bin, SUN Song-song, ZHOU Yang, WANG Hong

* Zigong Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zigong, Sichuan 641000, China

Corresponding author: WANG Hong, E-mail: 460973389@qq.com

Abstract: **Objective** To retrospectively analyze *Salmonella* strains isolated in Zigong City during 2007-2010, and to evaluate the value of molecular typing technique in identification and disposal of outbreaks of foodborne diseases. **Methods** *Salmonella* strains isolated from food and diarrhea patients in Zigong City during 2007-2010 were analyzed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), and BioNumerics software was used to analyze the genetic similarity index of the *Salmonella* strains. **Results** According to the PFGE patterns, 25 of the 55 *Salmonella typhimurium* strains isolated from stool samples of 10 diarrhea patients in 2007-2008 and 15 preserved eggs in 2008 were classified into type P9, and their genetic similarity was 100%. **Conclusions** Eggs contaminated by *Salmonella typhimurium* were the pollution sources that caused the outbreaks of diarrhea in 10 patients in Zigong City during 2007-2008. To quickly and accurately identify foodborne disease outbreaks and timely control and trace the outbreaks, PFGE and other molecular typing techniques should be widely used in food safety monitoring.

Key words: PFGE; *Salmonella typhimurium*; preserved egg; diarrhea; patient

沙门菌属革兰阴性肠道杆菌, 是一种常见的食源性致病菌。沙门菌在国内外造成的食物中毒和食源性疾病案例一直排名前列^[1]。在欧洲, 沙门菌导致的细菌性肠炎占细菌感染性食源性疾病的 31%。伤寒沙门菌的暴发通常与食用污染的蔬菜、水果、未煮熟的肉类及相关产品、蛋类引起的^[2-4]。沙门菌血清型较多,

鼠伤寒沙门菌是最常见的血清型之一。

本实验室在 2007-2010 年从临床腹泻患者、同期在市场上销售的皮蛋以及其他食品样品中共分离到 55 株沙门菌。2007-2008 年均发现病人及食品中鼠伤寒沙门菌检出率有明显上升, 病人与皮蛋中分离的沙门菌中多株表现为相同血清型, 但当时的技术无法证明同源性, 无法判断是否存在暴发从而采取防控行动。本研究利用脉冲场凝胶电泳技术 (PFGE) 对分离的沙门菌进行回顾性分析, 验证 2007-2008 年自贡市

作者简介: 张玲 (1987-), 女, 四川省彭州市人, 硕士, 主管医师, 主要从事分子流行病学工作。

通信作者: 王红, E-mail: 460973389@qq.com。

[17] 张新峰, 郑金华, 蔺胜田, 等. 泰安市婴幼儿食品食源性致病菌检测及耐药性研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26 (17): 2553-2555, 2578.

[18] 刘一倩, 易欣欣. 新鲜蔬果中食源性致病菌研究进展 [J]. 生物技术通报, 2014, 30 (1): 19-24.

[19] 王娟, 郑增忍, 王玉东, 等. 市售禽肉产品中沙门菌污染状况调查 [J]. 中国动物检疫, 2010, 27 (1): 50-52.

[20] 韩丽娟, 遇婷, 廖文, 等. 鞍山市 2013 年食品中食源性致病菌监测结果分析 [J]. 实用预防医学, 2016, 23 (12): 1503-1505.

是否存在鼠伤寒沙门菌暴发事件,对分子分型技术在基层食源性传染病防控中的运用前景进行评估。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 本次研究中,腹泻患者的菌株来源于市内参加食源性致病菌临床监测项目中的两家三甲医院以及一家二甲综合医院,食品菌株来源于四川省食源性疾病监测网络专项中分离的菌株。上述沙门菌株均经过四川省疾病预防控制中心微生物实验室生化和血清学鉴定。PFGE 相对分子量标准沙门菌 H9812,由中国疾控中心传染病所提供。

1.2 培养基及试剂 科马嘉沙门显色培养基购自上海中欣生物公司;营养琼脂购自青岛海博生物公司;沙门菌诊断血清购自成都生物研究所;限制性内切酶 XbaI 以及蛋白酶 K 购自美国 NEB 公司;SeaKem Gold 琼脂糖购自 Lonza 公司。

1.3 主要仪器 恒温恒湿培养箱购自上海一恒公司;CHEF Mapper 脉冲场凝胶电泳仪、Gel Doc XR+凝胶成像系统购自美国 BIO-RAD 公司;比浊仪购自法国梅里埃公司;恒温振荡水浴摇床、恒温水浴箱均购自德国优莱宝;超纯水仪购自德国赛多利斯。

1.4 血清型分型 利用沙门菌诊断血清对菌株纯培养物进行玻片凝集,部分菌株 H2 相需要通过诱导鉴定。

1.5 PFGE 分子分型方法 根据 PulseNet 网络实验室推荐的标准方法(美国 CDC)^[5]。沙门菌用琼脂糖固定、裂解、洗涤后,用 XbaI 酶切,CHEF Mapper 进行脉冲场凝胶电泳分型,凝胶使用 GelRed 染色后成像。

1.6 数据分析 将实验获取的电泳图谱用 BioNumerics 数据库软件包进行处理,识别图形条带。电泳图谱以 XbaI 酶切的 H9812 作为统一的分子量标准。用非加权配对算数平均法(UPGMA)构建,用 Dice 系数来衡量 PFGE 带型之间的相似性。

2 结果

2.1 菌株分析 2007-2010 年从腹泻患者中分离到 55 株沙门菌,26 株来自食源性致病菌临床监测项目的腹泻患者样品,其中 15 株鼠伤寒沙门菌,见表 1。29 株来自四川省食源性疾病监测网络的食物样品,其中 16 株鼠伤寒沙门菌(见表 2),菌株的血清型及相关信息见图 1。

2.2 沙门菌 PFGE 图谱分析 55 株沙门菌用 XbaI 酶切并进行脉冲场电泳后,DNA 片段可得到较好地分离,清晰可见大小不一的电泳条带,分子量大小在 18~1 162 kb;菌株条带数目 12~20 之间。样品条带清晰

可见,具有较好的分型能力。

表 1 2007-2010 年自贡市腹泻患者粪便中鼠伤寒沙门菌检出情况

采样年份	沙门菌株	鼠伤寒沙门菌株	鼠伤寒沙门菌株/沙门菌株(%)	P9 型条带的鼠伤寒沙门菌株	P9 型鼠伤寒沙门菌株/鼠伤寒沙门菌株(%)
2007	12	6	50.0	4	67.7
2008	8	6	75.0	6	100.0
2009	2	1	50.0	0	0.0
2010	4	2	50.0	0	0.0
合计	26	15	57.7	10	67.7

表 2 2007-2010 年自贡市食品中鼠伤寒沙门菌检出情况

采样年份	沙门菌株	鼠伤寒沙门菌株	鼠伤寒沙门菌株/沙门菌株(%)	P9 型条带的鼠伤寒沙门菌株	P9 型鼠伤寒沙门菌株/鼠伤寒沙门菌株(%)
2007	5	1	20.0	0	0.0
2008	15	15	100.0	15	100.0
2009	4	0	0.0	0	0.0
2010	5	0	0.0	0	0.0
合计	29	16	55.2	15	93.8

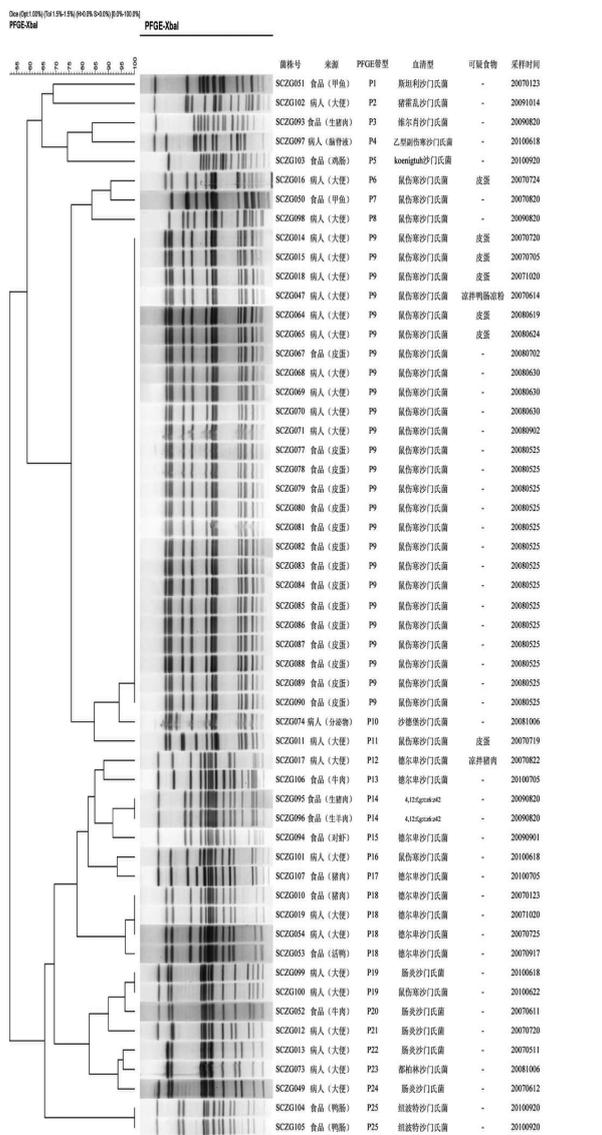


图 1 2007-2010 年自贡市腹泻患者粪便及食品中分离的 55 株沙门菌 PFGE 带型 UPGMA 聚类分析

2.3 BioNumerics 数据分析 根据电泳产生条带的位置和数量的不同,共分为 25 个 PFGE 带型,相似度 50%~100%。其中优势带型为 P9 型,所占比例约为 45.46%(25/55),其余 30 株菌株的条带分布在其他的 24 个带型中,见图 1。

2.4 P9 带型鼠伤寒沙门菌的来源分析 在 PFGE 带型相似度为 100% 的 P9 带型的 25 株鼠伤寒沙门菌中,10 株菌株来自 2007-2008 年的腹泻患者,15 株来自 2008 年食品样品中的皮蛋。

根据初步流行病学调查,10 名腹泻患者中有 5 名明确发病前食用过皮蛋的病史,4 名不详,1 名无食用皮蛋的病史。食品菌株中,2008 年四川省食源性疾病预防网络专项项目中,在农贸市场和超市采集的 60 份皮蛋,其中 15 份农贸市场的皮蛋样本中检出该带型的鼠伤寒沙门菌。该市场均是散户,摊位不固定,该农贸市场在 2008 年是市区规模最大、最集中的农贸市场,其位置靠近参与临床主动监测食源性致病菌项目送菌株的两家三甲综合医院。2008 年以后,从腹泻患者中及市售皮蛋监测中没有再分离到该带型的鼠伤寒沙门菌。

3 讨论

突破传统方法限制,不拘于通过表型来分离和鉴定不同样品来源的致病菌,准确快速寻找从食品中和病患身上分离的致病菌之间的关系,一直是食源性致病菌监测项目最核心的问题^[6]。沙门菌是一种引起腹泻的食源性致病菌,只通过表型分析无法判定具有相同生化特征及相同血清的沙门菌,是否遗传物质相同,是否来自同一污染源。PFGE 分型方法因其高分辨率被国际上广泛采用,是细菌基因分型的“金标准”,广泛用于识别和追踪各种细菌、真菌等引起的感染暴发及流行,尤其在沙门菌食源性疾病暴发调查及监测中发挥重要作用^[7]。

鼠伤寒沙门菌导致的人类和动物感染很常见^[8]。赵萍等^[9]研究发现鼠伤寒沙门菌能在皮蛋中长期存活,并且其毒力不会因 pH 值的变化而降低。国内因生食皮蛋导致的食物中毒也有报道^[1,10]。

本研究中食品和腹泻患者粪便中分离的鼠伤寒沙门菌具有相同血清型,同时 PFGE 带型相似度达到 100%,这说明食品和腹泻患者中的菌株是同一污染源,结合流行病学资料,皮蛋是导致患者腹泻的污染源,患者可能因食用被鼠伤寒沙门菌污染的皮蛋而发病。2008 年以后腹泻患者和食品中未分离到该带型的鼠伤寒沙门菌,可能是被污染的皮蛋已销售完毕,感染

结束。由于条件限制,在菌株分离后,实验室未及时完成 PFGE 实验,导致流行病学资料无法追溯,不能确认皮蛋的来源,以及在生产、运输、销售的哪一个环节导致鼠伤寒沙门菌的污染。如果在 2007 年本中心已经建立分子分型方法,就可能完成本起事件溯源追踪,召回被污染的皮蛋,从而减少后续病例的出现。

市一级食品安全风险监测、卫生监督等相关单位应该建立分子分型技术,作为食源性疾病预防的重要组成部分,以便发现暴发后,迅速、准确溯源^[11-12],及时指导相关行政部门对污染源采取有效的控制措施,避免感染态势继续恶化,保证社会公共卫生安全。尽快查明原因,迅速控制污染源,停止食用并召回,避免污染食品的进一步危害。

参考文献

- [1] 张建梅,翁琴云,陈泽辉,等.一起沙门菌食物中毒事件的病原检测和溯源分析[J].现代预防医学,2013,40(20):3815-3818.
- [2] Moffatt CR, Appuhamy R, Kaye A, et al. An outbreak of *Salmonella typhimurium* phage type 135a gastroenteritis linked to eggs served at an Australian Capital Territory cafe[J]. Commun Dis Intell Q Rep, 2012, 36(3):E281-285.
- [3] Ziehlm D, Dreesman J, Rabsch, et al. Subtype specific risk factor analyses for sporadic human salmonellosis; a case-case comparison in Lower Saxony, Germany[J]. Int J Hyg Environ Health, 2013, 216(4):428-434.
- [4] Kozak GK, MacDonald D, Landry L, et al. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce:2001 through 2009[J]. J Food Prot, 2013, 76(1):173-183.
- [5] 杨柳青,欧新华,贾华云,等.长沙市沙门菌表型特征及 PFGE 分子分型[J].实用预防医学,2016,23(1):39-42.
- [6] Sellappan S, Venketaraman P, Thippichettyalayam RG, et al. Molecular epidemiology of nontyphoidal *Salmonella* in poultry and poultry products in india: implications for human health[J]. Indian J Microbiol, 2015, 55(3):319-326.
- [7] Carol H, Paula J, Deepanker T, et al. A comparison of non-typhoidal *Salmonella* from humans and food animals using pulsed-field gel electrophoresis and antimicrobial susceptibility patterns[J]. PLoS One, 2013, 8(1):1-10.
- [8] Gornatti Churria CD, Vigo GB, Origlia J, et al. Diagnosis of an outbreak of *Salmonella typhimurium* in chinchillas(*Chinchilla lanigera*) by pulsed-field gel electrophoresis [J]. Rev Argent Microbiol, 2014, 46(3):205-209.
- [9] 赵萍,辛又川.鼠伤寒沙门菌在皮蛋中 300 日的存活观察[J].现代预防学,2000,27(4):478-479.
- [10] 周江,向晓霞,张学健.一起由食用皮蛋引起的食物中毒的病原学分析[J].中国卫生检验杂志,2010,20(2):422.
- [11] Bixia K, Jiufeng S, Dongmei H, et al. Serovar distribution, antimicrobial resistance profiles, and PFGE typing of *Salmonella enterica* strains isolated from 2007-2012 in Guangdong, China [J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(1):338-347.
- [12] Taru L, Aino K, Jani H, et al. Characterization of *Salmonella typhimurium* isolates from domestically acquired infections in Finland by phage typing, antimicrobial susceptibility testing, PFGE and MLVA [J]. BMC Microbiol, 2015, 15(1):131-231.