

一起疑似产气荚膜梭菌食物中毒事件的病原学分析

张晓媛¹, 刘玉竹¹, 张鹏航¹, 吴阳博¹, 张 诣¹, 曹 伟², 陈 倩^{1*}

(1. 北京市疾病预防控制中心营养与食品卫生所, 北京市预防医学研究中心, 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013; 2. 北京市西城区疾病预防控制中心, 北京 100053)

摘 要: **目的** 分析一起疑似产气荚膜梭菌食物中毒事件的病原学。**方法** 利用荧光定量 PCR 方法对一起食物中毒患者的粪便进行产气荚膜梭菌基因的初筛, 根据荧光定量 PCR 初筛的结果进行细菌的分离培养, 对分离到的菌株进行质谱和生化鉴定、毒力基因检测和 PFGE 分析。**结果** 从 5 份食物中毒患者粪便中分离到 5 株携带肠毒素基因 *cpe* 的 A 型产气荚膜梭菌, 并且这 5 株菌的 PFGE 带型完全一致。**结论** 此次食物中毒致病因子为携带肠毒素基因 *cpe* 的 A 型产气荚膜梭菌, PFGE 结果提示 5 株菌可能有同一来源。

关键词: 产气荚膜梭菌; 食物中毒; 毒力基因; 脉冲场凝胶电泳

Etiological analysis of a suspected food poisoning incidents of *Clostridium perfringens*

ZHANG Xiao-Ai¹, LIU Yu-Zhu¹, ZHANG Peng-Hang¹, WU Yang-Bo¹, ZHANG Yi¹, CAO Wei², CHEN Qian^{1*}

(1. Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing Center for Disease Preventive Medical Research, Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China; 2. Xicheng Center of Disease Control and Prevention, Beijing 100053, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the etiology of a suspected food poisoning case of *Clostridium perfringens*. **Methods** The feces of patients with food poisoning were screened for *Clostridium perfringens* genes by fluorescence quantitative PCR method. The bacteria were isolated and cultured according to the results of the initial screening by fluorescence quantitative PCR, and the isolated strains were identified by mass spectrometry, biochemical identification, virulence gene detection and PFGE analysis. **Results** Totally 5 strains of *Clostridium perfringens* carrying enterotoxin gene *cpe* were isolated from the feces of 5 food poisoning patients, and the PFGE bands of the 5 strains were identical. **Conclusion** The pathogenic factor of this food poisoning was *Clostridium perfringens* type A, which carried the enterotoxin gene *cpe*. PFGE results suggested that 5 strains might have the same source.

KEY WORDS: *Clostridium perfringens*; food poisoning; virulence genes; pulsed-field gel electrophoresis

基金项目: 科技部“食品安全关键技术研发”重点专项项目(2017FYC1601400)、北京市疾病预防控制中心科研专项(2016-BJYJ-06)

Fund: Supported by the Special Program for Key Technology in Food Safety of the Ministry of Science and Technology of China (2017FYC1601400) and the Cultivation Fund of Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing Research Center for Preventive Medicine (2016-BJYJ-06)

*通讯作者: 陈倩, 主任技师, 主要研究方向为食物中毒诊断溯源技术。E-mail: cchenqian@263.net

*Corresponding author: CHEN Qian, Chief Technician, Beijing Center for Disease Prevention and Control, No.16, Heping Li Middle Street, Dongcheng District, Beijing 100013, China. E-mail: cchenqian@263.net

1 引言

产气荚膜梭菌是一种革兰氏阳性产芽孢专性厌氧杆菌, 广泛存在于自然界的土壤、水源及人和动物肠道中, 能够引起食物中毒。在美国, 2011 年的监测数据显示 10% 的食源性疾病病例是由产气荚膜梭菌引起的, 占第 3 位^[1]。在英国, 2001~2011 十年间共报道了 81 起产气荚膜梭菌的食物中毒暴发事件, 波及到约 3000 人^[2]。在我国, 随着检测技术的提高, 近年来也不断出现产气荚膜梭菌食物中毒的报道^[3-5]。

产气荚膜梭菌可产生很多毒素, 至少有 15 种, 主要研究的有 6 种, 即: α 、 β 、 ϵ 、 ι 毒素和 CPE、 β 2 肠毒素。根据 α 、 β 、 ϵ 、 ι 4 种毒素的有无, 可以将产气荚膜梭菌分为 A、B、C、D、E 5 种类型^[6]。其中产肠毒素 CPE 的 A 型产气荚膜梭菌是全世界范围内引起食物中毒最多的一种产气荚膜梭菌^[7]。

脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 被认为是食源性病原细菌分型的金标准, PFGE 具有重复性好、分辨率高的优点, 被广泛用于多种致病菌的分型和食物中毒的溯源调查中。本研究通过荧光定量 PCR 初筛发现一起食物中毒事件的病人粪便中存在产气荚膜梭菌的特异基因, 通过细菌的分离、培养和鉴定获得 5 株产气荚膜梭菌, 对这 5 株菌进行了毒力基因检测和 PFGE 分析, 为食物中毒的判定提供了病原学基础。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

CFX96 荧光定量 PCR 仪、CHEF-DRIII system 脉冲场凝胶电泳仪及配套设备、Gel Doc 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); 609824 显微镜(日本 Olympus 公司); VITEK2-compact 全自动细菌生化鉴定系统、DensiChek 浊度仪(法国 BioMérieux 公司); Microflex LT 基质辅助激光解析飞行时间质谱仪(德国 Bruker 公司); Veriti 96 well Thermal cycler 普通 PCR 仪(美国 Life 公司); Cabinet 10 实验用去离子水系统(美国 Millipore 公司); SW22 水浴摇床(德国 Julabo 公司); 5417R 型台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司); MIR-254 恒温培养箱($36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 日本 SANYO 公司)。

产气荚膜梭菌核酸检测试剂盒(深圳生科原生物股份有限公司); 哥伦比亚血平板(英国 Oxoid 公司); ANC 鉴定卡(法国 BioMérieux 公司); Premix Taq™ 试剂、限制性内切酶 *Xba*I 和 *Sma*I、分子量标准 DL2000(北京宝生物生物技术有限公司); Seakem Gold 琼脂糖(美国 Cambrex Bio Science Rockland 公司); 蛋白酶 K(德国 Merck 公司); 所有试剂均在有效期内使用。

2.2 实验方法

2.2.1 病例基本信息

2017 年 9 月 24~25 日, 某建筑工地 16 人出现不同程度的上腹阵痛、恶心、腹泻的症状, 腹泻次数 3~10 次不等, 均为稀便。16 个病例均未出现发烧, 用药后症状缓解, 无住院病例。发病前 3 d 内, 这 16 人同在工地食堂就餐。

2.2.2 标本采集

采集到 5 例就诊病例的粪便标本, 编号为 XC01~XC05。因现场调查时无剩余食品和储存食品, 所以没有获得可疑食品样品。

2.2.3 主要方法流程图

主要方法流程图见图 1, 具体方法如下。

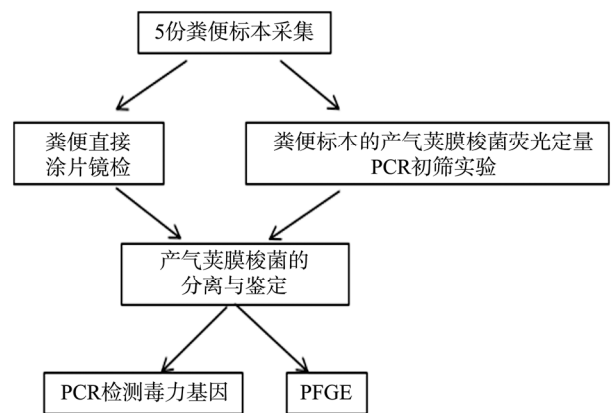


图 1 主要方法流程图

Fig.1 Flow chart of the main methods

(1) 粪便标本的产气荚膜梭菌荧光定量 PCR 初筛实验

直接用粪便标本进行荧光定量 PCR 检测产气荚膜梭菌特异基因。参照产气荚膜梭菌荧光定量 PCR 的说明书进行操作, 具体如下; 挑取一接种环粪便在 1 mL 灭菌生理盐水中悬浮, 取上清离心后保留沉淀, 在沉淀中加入 DNA 提取液 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 离心后取上清用作扩增模板。配置 PCR 反应液和混合酶液, 加入模板、阳性对照和阴性对照进行扩增。PCR 反应参数为: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 s; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min。40 个循环检测荧光值, FAM 通道检测。阳性对照, 阴性对照为试剂盒提供。Ct 值 ≤ 36 , 有明显指数增长被认为扩增阳性, Ct 值在 36~39 之间需要对样品进行重复检测, Ct 值 > 39 或无 Ct 值被认为扩增阴性。

(2) 粪便直接涂片镜检

在玻片上滴一滴生理盐水, 挑取少量粪便到其中混匀, 酒精灯加热固定后进行革兰染色镜检, 检查粪便中细菌的颜色、形态, 是否有芽孢的杆菌或者游离芽孢。

(3) 产气荚膜梭菌的分离与鉴定

将 5 份粪便样品直接在哥伦比亚血琼脂平板上划线接种, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧过夜培养。挑取典型菌落于血平板传代培养用于菌株的鉴定。

1) 表型鉴定; 进行菌落形态、生长特性及溶血现象观察。

2) 生化鉴定; 使用 Vitek2 全自动生化鉴定系统对菌株进行鉴定, 使用 ANC 卡, 菌液浓度调至 2.7~3.3 OD。

3) 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪鉴定; 挑取菌落置于样品靶上, 加入 1 μ L 基质溶液, 室温晾干后进行检测用 MALDI Biotyper 2.0 软件进行数据处理, 若得分在 2.300~3.000 之间表示对所鉴定的细菌在种水平高度可信, 得分在 2.000~2.299 之间表示在种水平鉴定可信, 得分在 1.700~1.999 之间表示在属水平鉴定可信, 得分<1.7 表示鉴定结果不可信。

(4) PCR 检测毒力基因

PCR 扩增 α 、 β 、 ε 、 ι 、CPE 和 $\beta 2$ 6 种毒素基因(*cpa*、*cpb*、*etx*、*iA*、*cpe* 和 *cpb2*), 引物序列见表 1^[8], 这 6 对特异性引物由上海生工生物工程公司合成。使用细菌 DNA 提取试剂盒提取 5 株产气荚膜梭菌的 DNA 作为模板。PCR 扩增体系(50 μ L); 2 $\times$ PCR Mastermix 25 μ L, 上下游引物各 2 μ L, DNA 模板 10 μ L, 用无菌去离子水补足至 50 μ L。PCR 反应参数为: 预变性 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 退火 55 $^{\circ}$ C, 1 min; 延长 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 35 个循环, 再延长 72 $^{\circ}$ C, 10 min。取扩增产物 5 μ L 在 1.0%琼脂糖凝胶上电泳, DL2000 作为 marker, 用凝胶成像仪成像。

表 1 6 种毒素基因的扩增引物序列
Table 1 Oignonucleotide primers of six toxin genes

毒素基因	扩增引物 5'-3'	片段长度 /bp
<i>cpa</i>	F: GCTAATGTTACTGCCGTGA	324
	R: CCTCTGATACATCGTGTAAG	
<i>cpb</i>	F: GCGAATATGCTGAATCATCTA	196
	R: GCAGGAACATTAGTATATCTTC	
<i>etx</i>	F: GCGGTGATATCCATCTATTC	655
	R: CCACTTACTTGTCTACTAAC	
<i>iA</i>	F: ACTACTCTCAGACAAGACAG	446
	R: CTTTCTTCTATTACTATACG	
<i>cpe</i>	F: GGAGATGGTGGATATTAGG	233
	R: GGACCAGCAGTTGTAGATA	
<i>cpb2</i>	F: AGATTTTAAATATGATCCTAACC	567
	R: CAATACCCTTTCACCAAATACTTC	

(5) PFGE 实验

参照国际食源性致病病菌原细菌分子分型监测网络 PulseNet 中单增李斯特菌 PFGE 分型的标准操作方法^[9], 对相关参数进行调整, 具体如下: 细菌悬液浓度用 bioMérieux 麦氏比浊仪调至 6.5~7.0; 取 240 μ L 菌悬液加入 60 μ L 溶菌酶溶液(20 mg/mL), 用枪头轻轻混匀, 放入

55~60 $^{\circ}$ C 水浴 10~20 min; 取出后每管加入 20 μ L 的蛋白酶 K(20 mg/mL), 再加入 300 μ L 溶化的 1% SKG:1% SDS 琼脂糖制成胶块; 每 1 个胶块在 5 mLCLB/40 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL)缓冲液中裂解 2.5 h; 使用 *Sma*I 限制性内切酶 (60 U), 30 $^{\circ}$ C 酶切 3~4 h; 电泳参数为 0.5~40 S, 19 h; 胶块电泳后使用 GelRed 染色, 纯水脱色, 读取电泳图谱; 沙门菌标准株 H9812 作为分子量标准。

(6) 数据分析

将 PFGE 图像录入 BioNumerics 7.0 进行处理, 识别图像条带, 经同一的分子质量标准进行校准, 标定条带位置, 必要时进行手工校正, 在 PFGE 图像中 < 20.5kbp 的条带忽略不计。PFGE 电泳图谱中, 每条泳道代表 1 株菌, 在限制性内切酶的切割下, 不同的菌株会呈现不同的条带数和片段大小。将条带数和位置相同的菌株归为同一 PFGE 型别。用 BioNumerics 软件对电泳图像进行数据分析, 构建聚类树状图。聚类图类型根据非加权配对算术平均法(UPGMA)构建, 条带位置差异容许度设为 1.0%。

3 结果与分析

3.1 荧光定量 PCR 初筛

对采集的 5 份粪便标本进行产气荚膜梭菌荧光定量 PCR 快速初筛检测, 结果 4 件粪便标本中产气荚膜梭菌核酸检测阳性, *Ct* 值分别为; 21.45、25.38、25.59、31.05, 另外 1 件粪便标本的产气荚膜梭菌核酸检测阴性, 线型为直线, 位于基线以下。阳性对照 *Ct* 值是 24.17, 阴性对照无 *Ct* 值, 线型为直线。结果见图 2。

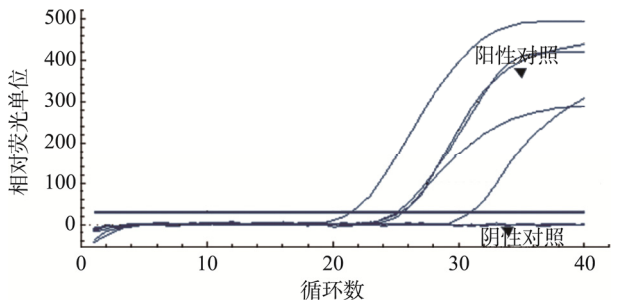


图 2 5 份粪便标本产气荚膜梭菌的荧光定量 PCR 检测结果
Fig.2 Detection of *Clostridium perfringens* in 5 stool specimens by fluorescence quantitative PCR

3.2 镜检结果

5 份粪便标本均在显微镜下可见紫色的革兰染色阳性大杆菌, 菌体两端钝圆, 芽孢位于菌体中央, 视野中可见散在的游离芽孢。

3.3 菌落表型特性和鉴定结果

5 份粪便标本划线接种于哥伦比亚血平板上, 37 $^{\circ}$ C 厌氧过夜培养后均呈现产气荚膜梭菌的典型菌落。血平板上

菌落呈乳白色, 边缘光滑, 较扁平, 菌落周围有一透明宽大溶血环, 外层有一不透明的溶血环, 呈典型的双层溶血环, 见图 3。挑取典型菌落传代培养后, 经全自动生化鉴定系统鉴定均为产气荚膜梭菌(编号为 2017cp xc1~2017cp xc5)。5 株菌经质谱鉴定均为产气荚膜梭菌, 得分在 2.000~2.400 之间。

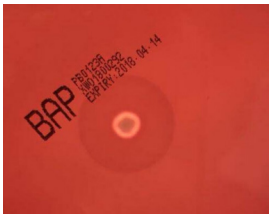
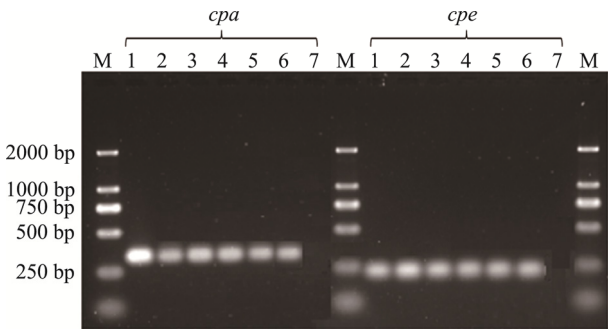


图 3 产气荚膜梭菌在哥伦比亚血平板上的典型菌落形态
Fig.3 Typical colony form of *Clostridium perfringens* on columbia blood plate medium

3.4 毒力基因结果

这 5 个产气荚膜梭菌 DNA 经 PCR 扩增电泳后均出现大小为 324、233 bp 的特异性条带, 与预期扩增出的 *cpa*、*cpe* 基因片段大小一致。未扩增出针对 *cpb*、*etx* 和 *iA* 基因

的特异性条带, 表明这 5 株菌均为携带肠毒素基因 *cpe* 的 A 型产气荚膜梭菌。结果见图 4。



注: 1~5; 2017cp xc1~2017cp xc5; 6; 标准菌株 CHPC 1.002837, 7; 阴性对照

图 4 5 株产气荚膜梭菌的毒力基因检测结果
Fig.4 Virulence genes detection of 5 *Clostridium perfringens* isolates

3.5 PFGE 结果

5 株产气荚膜梭菌基因组 DNA 经 *Sma*I 酶切后, 将 PFGE 图谱进行聚类分析, 结果见图 5。5 株菌的 PFGE 带型完全一致, 提示这 5 株菌来自同一克隆群。

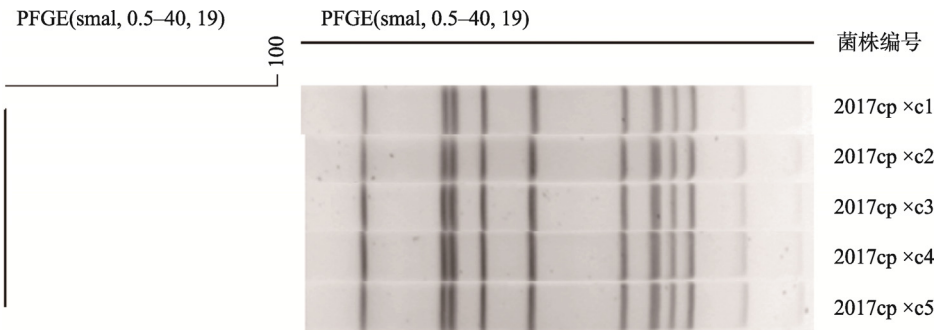


图 5 5 株产气荚膜梭菌的 PFGE 聚类图
Fig.5 Relationship of the 5 *Clostridium perfringens* isolates based on PFGE

4 结论与讨论

本研究对一起食物中毒事件中采集的 5 份粪便样本进行了荧光定量 PCR 快速检测、传统的镜检和细菌的分离培养鉴定, 对分离到的 5 株产气荚膜梭菌进行了毒力基因检测和 PFGE 分析, 为食物中毒的判定提供了可靠证据支持。

荧光定量 PCR 技术已广泛应用于病原微生物检测, 该方法具有快速、特异、敏感、自动化程度高等优点。在食物中毒事件处置中, 可用于初筛, 帮助快速确定检测的方向。本研究用荧光定量 PCR 方法在 4 份患者粪便标本中检测到产气荚膜梭菌的核酸阳性, 而在细菌分离培养中 5 份患者粪便中都分离到了产气荚膜梭菌, 2 种方法检测结果存在一定差异, 可能跟荧光定量 PCR 处理粪便制备

DNA 的方法有关。镜检虽然是传统方法, 但是在产气荚膜梭菌食物中毒中也具有很好的初筛作用。因为产气荚膜梭菌食物中毒的特点是病人带菌已达到一定数量级, 而且此菌镜下特征明显, 其革兰阳性短杆菌、带有芽孢等特点较易在镜下识别, 可快速与肠杆菌科细菌区分^[3]。本研究由于粪便的量太少, 而没能直接进行产气荚膜梭菌的定量检测, 存在一定的缺陷。

本研究中分离到的 5 株菌均为携带肠毒素基因 *cpe* 的 A 型产气荚膜梭菌。只有大约 5% 的 A 型产气荚膜梭菌能够产生肠毒素^[10], 产肠毒素的 A 型产气荚膜梭菌也是世界范围内最常见的引起食物中毒的型别^[7,11]。实验室检出多个患者粪便中的 CPE 毒素也是产气荚膜梭菌食物中毒的判定的一个重要证据^[12,13]。

PFGE 广泛用于多种病原微生物的暴发溯源中, 在本研究中也对分离到的 5 株产气荚膜梭菌进行 PFGE 实验。目前, 产气荚膜梭菌还没有国际公认的 PFGE 标准操作方案, 文献报道的产气荚膜梭菌的 PFGE 方案存在耗时长、图谱质量差等缺点^[14,15], 在本研究中通过优化单增李斯特菌的 PFGE 方案建立了产气荚膜梭菌的 PFGE 方案, 对菌悬液、溶菌酶使用量、蛋白酶 K 使用量、裂解时间进行优化, 得到了理想的 PFGE 图谱。5 株菌的 PFGE 图谱完全一致, 提示 5 株菌可能为同一来源, 为该起食物中毒事件的判定提供了科学依据。

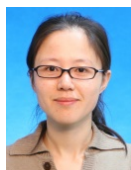
目前我国对于产气荚膜梭菌食物中毒的判断标准只能参照 WST 7-1996《产气荚膜梭菌食物中毒诊断标准及处理原则》^[16], 该标准年代久远, 存在一定的方法局限性, 动物实验对实验室有特殊要求, 操作复杂耗时, 血清学方法不能 100%对产气荚膜梭菌进行分型鉴定。随着新的检测技术的应用, 荧光定量 PCR 的快速筛查、毒力基因的检测、PFGE 图谱的分析为产气荚膜梭菌食物中毒的判定和溯源提供了新的方法和思路。

参考文献

- [1] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, *et al.* Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(1): 7-15.
- [2] Public Health England. Outbreaks reported to the HPA of gastroenteritis due to *Clostridium perfringens* in England and Wales 1992-2011 [R]. Available January, 2013, 2.
- [3] 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.
Li Y, Li CQ, Wang YB, *et al.* Detection of food borne pathogenic factors caused by *Clostridium perfringens* [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2016, 26(23): 3379-3381.
- [4] 麻美芬, 崔艳, 黄抱抱, 等. 一起产气荚膜梭菌食物中毒事件现场流行病学调查[J]. *预防医学*, 2018, 30(6): 624-628.
Ma MF, Cui Y, Huang BB, *et al.* Epidemiological investigation on a food poisoning incident caused by *Clostridium perfringens* [J]. *Prev Med*, 2018, 30(6): 624-628.
- [5] 徐春风, 郑灿杰, 严晓莉, 等. 一起幼儿园食物中毒事件调查[J]. *预防医学*, 2018, 30(6): 618-620.
Xu CF, Zheng CJ, Yan XL, *et al.* Investigation on a food poisoning incident in kindergartens [J]. *Prev Med*, 2018, 30(6): 618-620.
- [6] Carman RJ, Sayeed S, Li J, *et al.* *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the feces of healthy north American [J]. *Anaerobe*, 2008, 14(2): 102-108.
- [7] Brynestad S, Granum PE. *Clostridium perfringens* and foodborne infections [J]. *Int J Food Microbiol*, 2002, 74(3): 195-202.
- [8] 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, 690.
Deng ZA, Li XQ, Li CH, *et al.* Identification and genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from the food samples [J]. *J Trop Med*, 2006, 6(6): 682-684, 690.
- [9] PulseNet Methods [EB/OL]. [2019-03-01]. <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/index.html>
- [10] Lindström M, Heikinheimo A, Lahti P, *et al.* Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning [J]. *Food Microbiol*, 2011, 28(2): 192-198.
- [11] Lukinmaa S, Takkunen E, Siitonen A. Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(8): 3744-3749.
- [12] Heymann D. Control of communicable diseases manual [M]. Washington DC: American Public Health Association, 2008.
- [13] United States Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1998-2002 [J]. *MMWR Surveill Summ*, 2006, 55(10): 38-42.
- [14] Lyhs U, Perko-Mäkelä P, Kallio H, *et al.* Characterization of *Clostridium perfringens* isolates from healthy turkeys and from turkeys with necrotic enteritis [J]. *Poult Sci*, 2013, 92(7): 1750-1757.
- [15] Brzychez-Włoch M, Bulanda M. Analysis of genetic similarities between *Clostridium perfringens* isolates isolated from patients with gas gangrene and from hospital environment conducted with the use of the PFGE method [J]. *Pol Przegl Chir*, 2014, 86(3): 141-146.
- [16] WST 7-1996 产气荚膜梭菌食物中毒诊断标准及处理原则[S].
WST 7-1996 Diagnostic criteria and principles of management of *Clostridium perfringens* food poisoning [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



张晓媛, 博士, 主要研究方向为病原生物学和分子流行病学。

E-mail: zhangxiaoyuan_0922@163.com



陈倩, 主任技师, 主要研究方向为食物中毒诊断溯源技术。

E-mail: cchenqian@263.net