

昆明市首起由疑似肉毒梭菌引起食物中毒的 实验室快速检测

李桂满, 张 艳, 王慧雯, 颜 军, 侯 敏*

(昆明市疾病预防控制中心, 昆明 650228)

摘 要: **目的** 快速查明昆明市一起疑似由肉毒梭菌引起食物中毒事件的病原菌的具体类别。**方法** 根据 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》, 样品在庖肉培养基中 35 °C 厌氧增菌 5 d 后镜检, 用 2 个不同生产厂家的肉毒梭菌实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测试剂进行检测并进行肉毒毒素分型。**结果** 镜检符合典型的肉毒梭菌的特征, 2 个不同生产厂家的肉毒梭菌 Real-time PCR 检测结果均为阳性, 且均检测出 E 型肉毒毒素。Real-time PCR 检测只需在增菌后 4 ~ 6 h 的检测时间, 即可得到结果, 且无需进行菌体的纯化培养, 鉴定时间节约至少 96 h。**结论** 此次事件为食用被 E 型肉毒梭菌及其毒素污染食品而引起的细菌性食物中毒事件, 用 Real-time PCR 检测方法可对肉毒梭菌食物中毒事件作出快速判定。

关键词: E 型肉毒梭菌; 食物中毒; 实时荧光定量 PCR

First rapid laboratory test for food poisoning caused by suspected *Clostridium botulinum* in Kunming

LI Gui-Man, ZHANG Yan, WANG Hui-Wen, YAN Jun, HOU Min*

(Kunming Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650228, China)

ABSTRACT: Objective To quickly identify the specific types of pathogen suspected to be caused by *Clostridium botulinum* in a food poisoning incident in Kunming city. **Methods** According to GB4789.12-2016 *National food safety standard food microbiology examination of Clostridium botulinum and botulinum toxin*, the samples were microscopically examined after anaerobic enrichment at 35 °C for 5 days in cooked meat medium base, Real-time PCR detection reagents of *Clostridium botulinum* from two different manufacturers were used for detection and botulinum toxin typing. **Results** Microscopic examination was consistent with the characteristics of typical *Clostridium botulinum*. The real-time PCR results of *Clostridium botulinum* from two different manufacturers were all positive, and all of the *Clostridium botulinum* E-type toxin were detected. Real-time PCR detection only needed 4 to 6 hours after enrichment to get the results, and did not need to carry out purification culture of bacteria, so the identification time was saved at least 96 hours. **Conclusion** This food poisoning event was caused by eating food contaminated by *Clostridium botulinum* type E and its toxins. Real-time PCR can be used to identify food poisoning

基金项目: 昆明市卫生科技人才培养项目暨“十百千”工程[2019-sw(省)-24]

Fund: Supported by Kunming Health Science and Technology Talents Training Project and “One Hundred Thousands” Project [2019-sw(province)-24]

*通讯作者: 侯敏, 主任技师, 主要研究方向为微生物检验与研究。E-mail: houmin7250@163.com

*Corresponding author: HOU Min, Chief Technician, Kunming Center for Disease Control and Prevention, Microbiology Laboratory, Kunming 650228, China. E-mail: houmin7250@163.com

events of *Clostridium botulinum* quickly.

KEY WORDS: *Clostridium botulinum* type E; food poisoning; real-time PCR

1 引言

肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*, *C. botulinum*)食物中毒的病原体为肉毒梭状芽孢杆菌,简称肉毒梭菌,为革兰氏阳性厌氧菌。广泛存在于土壤、尘土和动物的粪便中^[1]。引起人类食物中毒的肉毒梭菌主要携带 A 型、B 型、E 型或 F 型等毒素基因^[2,3]。我国报道的肉毒梭菌中毒主要发生在新疆、青海、西藏地区^[4,5],多为 A 型,其次为 B、E 型,新疆察布查尔地区为多发地区^[6]。

肉毒毒素是肉毒梭菌产生的外毒素,是一种强烈的神经毒素,可抑制突触前膜释放神经递质乙酰胆碱,引起眼肌、呼吸肌等主要肌肉麻痹,毒性比氯化钾强 1 万倍,对人致死量约为 0.1 μg ,肉毒梭菌食物中毒发病的潜伏期多为 12~36 h,长者可达 8~10 d,临床症状以运动神经麻痹为主,且潜伏期越短,病死率越高^[6,7]。据文献报道,云贵高原(云南、贵州、广西)的土壤能检出 E 型肉毒梭菌^[8],但云南近些年却很少发生 E 型肉毒梭菌食物中毒事件,本研究对昆明市首起由疑似肉毒梭菌引起食物中毒事件进行实验室快速检测鉴定,在一定程度上对处理肉毒梭菌食物中毒事件以及实验室检测提供参考。

2 材料和方法

2.1 标本来源

2019 年某日,昆明市东川区 3 人在食用同一批储存于冰箱一周左右自行加工的卤猪肝后,24 h 内相继出现头昏,无力,口舌发麻,口齿不清,眼花出现重影,呕吐等症状,后在医院就诊时均出现相似的咽部肌肉麻痹、呼吸肌麻痹的临床症状,治疗时均使用呼吸机维持呼吸,其中一人情况较为严重,治疗无效后死亡。昆明市疾病预防控制中心在调查时对采集到的 3 份标本进行微生物检测,分别为剩余的自制卤猪肝 1 份,患者家庭垃圾 1 份(混合有患者呕吐物),患者医院呕吐物 1 份,其中后 2 份样品均来自制作卤猪肝的同一患者。

2.2 仪器与试剂

QuantStudio 7 Flex 实时荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)。

庖肉培养基(北京陆桥技术有限责任公司);肉毒梭菌核酸检测试剂盒、肉毒梭菌 A 型核酸检测试剂盒、肉毒梭菌 B 型核酸检测试剂盒、肉毒梭菌 E 型核酸检测试剂盒、肉毒梭菌 F 型核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法,分别购自深圳生科原股份有限公司和江苏硕世生物科技

股份有限公司)。

2.3 检测方法

根据流行病学调查及临床表现,检测肉毒梭菌。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]方法进行增菌后进行镜检和 Real-time PCR 检测。

2.3.1 增菌

以无菌操作分别称取 3 份采集的样品各 25 g 于无菌均质袋,加入 225 mL 生理盐水,并用拍击式均质器拍打 2 min。分别吸取样品匀液 2 mL 接种至 10 mL 庖肉培养基中,35 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 5 d。

2.3.2 染色镜检

分别吸取适量 2.3.1 增菌液样本进行涂片、革兰氏染色和镜检。

2.3.3 实时荧光定量 PCR 检测

(1)模板 DNA 的制备:

分别吸取 2.3.1 增菌液样本 1 mL,12000 r/min 离心 5 min 后弃上清,保留沉淀,加入 50 μL DNA 提取液悬浮沉淀,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热处理 5 min,12000 r/min 离心 2 min,取上清液,上清液即为核酸模板。

(2)肉毒梭菌 Real-time PCR 检测及肉毒毒素分型检测

吸取上清液 5 μL 作为 DNA 模板,分别用深圳生科原股份有限公司和江苏硕世科技股份有限公司的肉毒梭菌核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)进行检测,依据检测结果进行 A 型、B 型、E 型和 F 型肉毒毒素检测。荧光 PCR 反应体系均为 20 μL ,待测标本 DNA 5 μL ,深圳生科原股份有限公司的试剂反应条件为:2 min UNG 处理,50 $^{\circ}\text{C}$;3 min 预变性,95 $^{\circ}\text{C}$;5 sec 变性,95 $^{\circ}\text{C}$;55 $^{\circ}\text{C}$,60 sec 退火、延伸及检测荧光,共 40 个循环。江苏硕世科技股份有限公司的试剂反应条件为:5 min 预变性,95 $^{\circ}\text{C}$;10 sec 变性,95 $^{\circ}\text{C}$;55 $^{\circ}\text{C}$,40 sec 退火、延伸及检测荧光,共 40 个循环。

3 结果与分析

3.1 增菌结果

培养后 3 份样品的庖肉培养基中肉渣和肉汤均变黑、产气,并有明显异臭味,表明有可疑菌落生长。

3.2 镜检结果

3 份样品中的庖肉培养基增菌肉汤均含有革兰氏阳性粗大杆菌,且有卵圆状芽胞,大于菌体、位于次端,菌体呈网球拍状(见图 1),符合典型的肉毒梭菌的镜检特征。

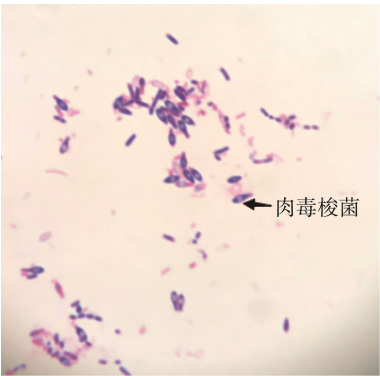


图 1 镜检结果
Fig.1 Microscopy results

3.3 肉毒梭菌 Real-time PCR 检测及肉毒毒素分型检测结果

3 份样品的 2 个不同生产厂家 Real-time PCR 方法检测结果均为肉毒梭菌阳性和 E 型肉毒毒素基因阳性, 结果见表 1, 实时荧光定量 PCR 扩增曲线见图 2~图 5(图 2~图 5 中, 1 为剩余的卤猪肝; 2 为患者家庭垃圾; 3 为患者医院呕吐物; 4 为阳性对照; 5 为阴性对照)。从结果可看出, 3 份样品均检出 E 型肉毒梭菌, Ct 值均在阳性结果的判定范围内, 且

2 个不同生产厂家的检测结果具有高度的一致性。

4 结论与讨论

现场采集的 3 份样品用庖肉培养基增菌后均混浊、产气, 并有明显异臭味, 镜检结果符合典型的肉毒梭菌的特征, 用 2 个不同生产厂家的试剂进行 Real-time PCR 方法检测均检出 E 型肉毒梭菌及 E 型肉毒毒素, 按照《食物中毒诊断及技术处理原则》^[10]和《肉毒梭菌食物中毒诊断标准及处理原则》^[11], 结合流行病学调查、临床表现及实验室检测结果, 很快对此事件作出判定, 确定此次事件为食用被 E 型肉毒梭菌及其毒素污染自制卤猪肝而引起的细菌性食物中毒事件。

肉毒梭菌只在厌氧及有适宜的营养、温度、时间等条件下才能大量繁殖和产毒。其生长最适温度为 25 ~ 37 ℃, 最适 pH 为 6.0 ~ 8.2, 其产毒最适温度为 20 ~ 35 ℃^[12]。污染的食品原料, 在厌氧环境中发酵, 为肉毒梭菌芽胞成为繁殖体并产生毒素提供了条件, 食品制成后, 一般不经加热而食用, 可引起中毒的发生^[6]。引起本次中毒的自制卤猪肝、在其加工制作和存放过程中污染的肉毒梭菌具备了产毒所需的厌氧环境、温度和时间, 在食用时又未能加热处理, 从而造成了本次中毒的发生。

表 1 Real-time PCR 检测结果
Table 1 Testing results of Real-time PCR

样品名称	结果	肉毒梭菌 Ct 值		肉毒梭菌 E 型 Ct 值	
		生科原	硕世	生科原	硕世
剩余的卤猪肝	+	30.2	30.4	35.4	30.9
患者家庭垃圾	+	29.9	30.5	33.4	31.9
患者医院呕吐物	+	25.9	23.9	26.6	25.7
阳性对照	+	23.6	30.9	17.4	26.2
阴性对照	-	>37.5	>38	>37.5	>38

注: 表中“+”代表阳性结果, “-”代表阴性结果。

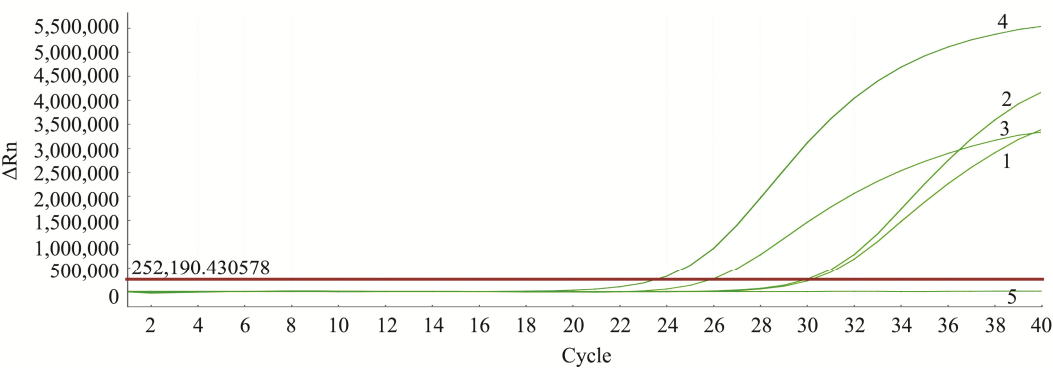


图 2 肉毒梭菌实时荧光定量 PCR 扩增曲线图(生科原)
Fig.2 Real-time PCR curve of *C. botulinum*(shengkeyuan)

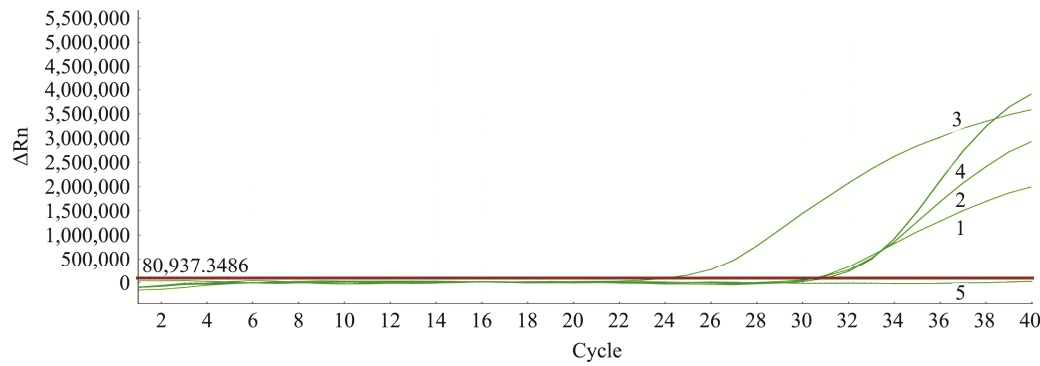


图 3 肉毒梭菌实时荧光定量 PCR 扩增曲线图(硕世)
Fig.3 Real-time PCR curve of *C. botulinum*(shuoshi)

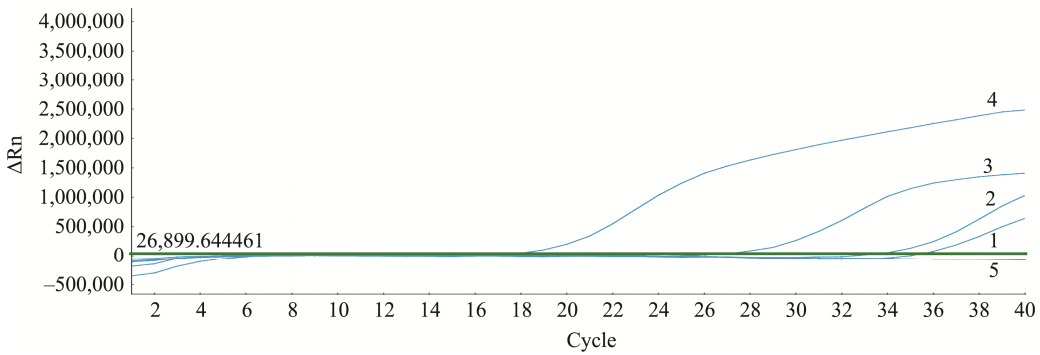


图 4 肉毒梭菌 E 型实时荧光定量 PCR 扩增曲线图(生科原)
Fig.4 Real-time PCR curve of *C. botulinum* type E(shengkeyuan)

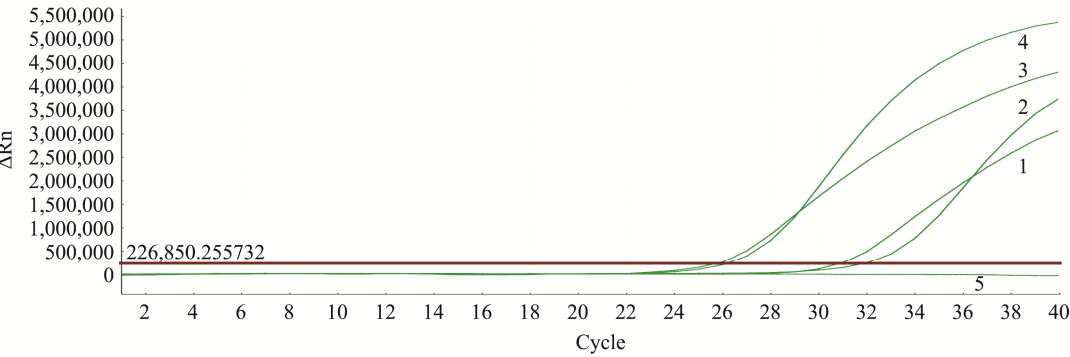


图 5 肉毒梭菌 E 型实时荧光定量 PCR 扩增曲线图(硕世)
Fig.5 Real-time PCR curve of *C. botulinum* type E(shuoshi)

肉毒毒素中毒的临床表现与其他食物中毒不同,除 E 型外,一般无胃肠道症状,主要为运动神经末梢麻痹。针对肉毒毒素中毒症状的特殊性,其临床表现可作为确定食物中毒事件中实验室进行肉毒梭菌项目检测的重要指征。这次食物中毒事件中,患者同时存在胃肠道症状和运动神经末梢麻痹,症状与实验室检测为 E 型肉毒毒素的结果符合。肉毒毒素须在 80℃加热 30 min 或 100℃加热 10~20 min 方可完全被破坏^[13,14],建议食用前充分加热以杀灭毒素。

肉毒梭菌和其他种类的梭菌如:生孢梭菌、巴氏梭菌、丁酸梭菌在分离平板上的形态相近,难以区分,通过经典的细菌学方法难以鉴定分型^[15]。且 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]方法规定用于分离培养的卵黄琼脂培养基并无选择性,挑取目标菌相当困难。且需培养 48 h,后续纯化培养也需 48 h,耗时较长。小鼠毒素中和试验能灵敏的检测肉毒毒素并分型,但在食物中毒事件的检测中,需要

更加快速准确的方法对事件进行判定。肉毒毒素为肉毒毒素基因编码的蛋白质,所有产肉毒毒素的菌株都携带有肉毒毒素基因,菌株中肉毒毒素基因型别直接决定了菌株毒素的型别,因此肉毒毒素基因分型与毒素分型有高度的一致性。在本次食物中毒事件的样品检测中,采用了庖肉培养基增菌后进行镜检和 Real-time PCR 检测,在未获得肉毒梭菌纯培养物的情况下,增菌后 4~6 h 就得到准确的实验结果,充分证明 Real-time PCR 检测灵敏度高、特异性强、速度快^[16],可在混合样本中快速准确地特异检测目标菌体 DNA。并且使用 2 个不同生产厂家的试剂进行对比,结果一致。对于肉毒梭菌等难分离的此类厌氧菌,检测时使用不同生产厂家的试剂进行对比,可使检测结果的正确性得到可靠的保障。使用 Real-time PCR 方法进行检测,很快对事件作出了判定,充分体现了此方法在此次食物中毒检测中的明显优势。

Real-time PCR 具有灵敏度高、特异性强、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应、无污染、不需后期处理等特点^[16],肉毒梭菌 Real-time PCR 分型鉴定方法,避免了动物试验,无需采购昂贵且难以获得的各种抗血清。在检测周期上与动物试验比较,Real-time PCR 检测只需在增菌后 4~6 h 的检测时间,即可得到结果,比纯化培养鉴定节约至少 96 h,更加适合肉毒梭菌食物中毒事件的快速检测。

参考文献

- [1] Fach P, Micheau P, Mazuet C, et al. Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum* [J]. J Appl Microbiol, 2009, 107(2): 465–473.
- [2] Dong YP, Wang W, Jiang T, et al. Molecular and epidemiological characterization of infant botulism in Beijing, China [J]. Biomed Environ Sci, 2017, 30(6): 460–464.
- [3] Wangroongsarb P, Kohda T, Jittaprasartsin C, et al. Molecular characterization of *Clostridium botulinum* isolates from foodborne outbreaks in Thailand 2010 [J]. PLoS ONE, 2014, 9(1): e77792.
- [4] 葛华, 席陪华, 来身德, 等. 青海省 13 起肉毒毒素中毒检测结果分析 [J]. 中华预防医学杂志, 2008, 42(4): 287.
- [5] 蔺春玲, 郭莉莎, 杨玲, 等. 新疆伊犁地区察布查尔病 10 年分布现状调查分析 [J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(5): 572–574.
- [6] 陈炳卿. 营养与食品卫生学第 4 版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [7] 刘发科, 甘辞海, 高晓岚, 等. 个体因素对家族性肉毒杆菌中毒的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(32): 121–122.

Liu FK, Gan CH, Gao XL, et al. Effects of individual factors on familial

Bacillus botulinus food poisoning [J]. Chin J Mod Med, 2018, 28(32): 121–122.

- [8] 高庆仪, 刘洪道, 姚景惠, 等. 我国沿海地区肉毒梭菌分布调查 [J]. 中华预防医学杂志, 1984, 18(3): 129–131.
- [9] Gao QY, Liu HD, Yao JH, et al. Investigation on the distribution of *clostridium botulinum* in coastal areas of China [J]. Chin J Prev Med, 1984, 18(3): 129–131.
- [9] 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 [S].
- [9] GB 4789.12-2016 National food safety standard-Food microbiology test-*Clostridium botulinum* and botulinum toxin test [S].
- [10] GB 14938-94 食物中毒诊断标准及技术处理总则 [S].
- [10] GB 14938-94 General principles of diagnostic criteria and technical management of food poisoning [S].
- [11] WS/T 83-1996 肉毒梭菌食物中毒诊断标准及处理原则 [S].
- [11] WS/T 83-1996 Diagnostic criteria and principle of management for food poisoning of *Clostridium botulinum* [S].
- [12] 赵思俊, 李雪莲, 曹旭敏, 等. 肉毒杆菌及肉毒毒素研究进展 [J]. 中国动物检疫, 2013, (8): 36–39, 54.
- [12] Zhao SJ, Li XL, Cao XM, et al. Progress in research on *Bacillus botulinus* and botulinum toxins [J]. Chin J Anim Quar, 2013, (8): 36–39, 54.
- [13] 朱芳麟. 青海省 1960~1995 年肉毒毒素中毒分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 1997, 9(2): 43–45.
- [13] Zhu FL. Analysis of botulinum toxin poisoning in Qinghai province from 1960 to 1995 [J]. Chin J Food Hyg, 1997, 9(2): 43–45.
- [14] 朱子扬, 龚兆庆, 汪国良. 中毒急救手册 (3 版) [M]. 上海: 科学技术出版社, 2007.
- [14] Zhu ZY, Gong ZQ, Wang GL. Poisoning first aid manual (3rd Edition) [M]. Shanghai: Science and Technology Press, 2007.
- [15] Collins MD, East AK. Phylogeny and taxonomy of the foodborne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins [J]. J Appl Microbiol, 1998, 84(1): 5–17.
- [16] 刘婧, 王景林, 王汉斌. 肉毒毒素的实验室检测方法 & 检测技术的研究进展 [J]. 毒理学, 2016, 30(2): 158–160.
- [16] Liu J, Wang JL, Wang HB. Investigation on the distribution of *Clostridium botulinum* in coastal areas of China [J]. Toxicology, 2016, 30(2): 158–160.

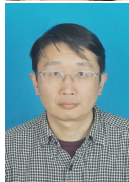
(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



李桂满, 副主任技师, 研究方向为微生物检验与研究。

E-mail: 471492183@qq.com



侯敏, 主任技师, 主要研究方向为微生物检验与研究。

E-mail: houmin7250@163.com