

食物中毒事件中致病菌肠毒素检测和分子分型研究

吴灿权*, 刘绮明, 仇绮琳, 袁展红
(中山市疾病预防控制中心, 中山 528403)

摘 要: 目的 为了检测一起食物中毒事件样本, 并进行相关性分析、分离菌株。**方法** 参照国家标准方法 GB 4789 系列, 对采集样本进行细菌学检验。应用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测葡萄球菌肠毒素。通过脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)进行分子分型, 分析菌株之间的相关性。**结果** 食物中毒事件中 5 名患者均检测出 E 型葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxin E, SEE)。3 株分离菌株 PFGE 分子分型提示来源不同克隆株, 除了产生 E 型葡萄球菌肠毒素外, 还有 B、C、D 型。**结论** 该起食物中毒由不同 PFGE 型产毒金黄色葡萄球菌污染食物引起, 菌株产葡萄球菌肠毒素的型别不完全相同。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 食物中毒; 葡萄球菌肠毒素; 脉冲场凝胶电泳

Molecular typing and enterotoxin detection in food poisoning case

WU Can-Quan*, LIU Qi-Ming, QIU Qi-Lin, YUAN Zhan-Hong
(Zhongshan Center for Disease Control and Prevention, Zhongshan 528403, China)

ABSTRACT: Objective To detect a food poisoning event samples, and conduct correlation analysis, isolate the strain. **Methods** According to the national standard methods GB 4789 series, the collected samples were tested for bacteriology. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect staphylococcal enterotoxin. Molecular typing was performed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) to analyze the correlation between strains. **Results** Staphylococcal enterotoxin E (SEE) was detected in all 5 cases of food poisoning. The PFGE molecular typing of the 3 isolates indicated that the clones from different sources produced types B, C and D besides E. **Conclusion** The food poisoning is caused by contamination of food by different strains of PFGE toxigenic *Staphylococcus aureus*, with different types of staphylococcal enterotoxin.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*; food poisoning; staphylococcal enterotoxin; pulsed field gel electrophoresis

0 引 言

金黄色葡萄球菌广泛存在于自然界中, 它为哺乳动物和鸟类皮肤及粘膜的正常菌群^[1]。该菌营养要求不高, 耐盐、耐热、耐干燥、耐高渗, 具有较强抵抗力, 在合适

的条件下容易大量繁殖造成食物中毒, 成为细菌性食物中毒的重要病原菌之一。相关研究显示, 由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒在世界范围都是非常普遍的, 在各个国家和地区细菌性食物中毒案例中所占比例均位居前列^[2]。金黄色葡萄球菌的致病性并不是通过菌体自身, 主要取决

*通信作者: 吴灿权, 主管技师, 主要研究方向为微生物检验。E-mail: ZSCDCWCQ@163.com

*Corresponding author: WU Can-Quan, Technician, Zhongshan Center for Disease Control and Prevention, No.70, Changjiang Road, Zhongshan 528403, China. E-mail: ZSCDCWCQ@163.com

于其产生的毒素和侵袭性酶。肠毒素在结构和功能上具有一定的相似性,是一类在特定的生长条件下合成的耐热性外毒素^[3]。金黄色葡萄球菌产生的肠毒素也会污染食品,引起食物中毒^[4]。在我国,金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒,约占细菌性食物中毒事件的 20%^[5]。迄今为止已发现的肠毒素有 22 种不同类型,其中 A~E 型葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxin A~E, SEA~SEE)为常见类型^[6],约占金黄色葡萄球菌肠毒素所致食物中毒的 95%^[7]。这 5 种肠毒素在动物实验中只需要 5~100 µg,即可导致呕吐反应,具有较强的毒力^[8]。

2019 年 6 月,中山市某三甲医院先后收治多名进食后出现恶心、呕吐等胃肠道症状的患者,均来自同一公司,具有共同进餐史,疑似食物中毒。调查显示该公司 5 名员工购买了某小吃店的花甲粉,于当天中午 12 时在公司办公室共同进食,1~3 h 内陆续出现恶心、胸闷、呕吐等症状,并陆续就医。本研究通过对采集的样本进行相关检测,并对分离到菌株应用脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)技术进行分子分型,找到事件发生的原因,以期为今后类似事件的检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本来源

本起疑似食物中毒事件,实验室共收到患者洗胃液 5 份(编号依次为 1#、2#、3#、4#、5#)、食物(半成品花甲)1 份,共 6 份样本。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器

CHEF MAPPER XA 脉冲场凝胶电泳仪、Gel Doc XR+ 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);DENSIMAT 浊度测定仪、Vitek 2 Compact 全自动微生物鉴定仪(法国梅里埃公司);sunrise 酶标仪(奥地利 Tecan 公司)。

1.2.2 主要试剂

Baird-Parker 平板、冻干血浆(广东环凯生物科技股份有限公司);血平板(郑州人福博赛生物技术有限公司);Vitek 2 GP 细菌鉴定卡(法国梅里埃公司);RIDASCREEN SET A, B, C, D, E 肠毒素检测试剂盒(德国 r-biopharm 公司);Sma I 限制性内切酶、Xba I 限制性内切酶(美国 Promega 公司);蛋白酶 K (MercK 公司);Seakem Gold Agarose (瑞士 Lonza 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 致病菌分离鉴定

参照 GB 4789.4—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》、GB 4789.5—2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验》、GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检

验》、GB 4789.10—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》、GB 4789.14—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》的方法流程对采集样本进行沙门氏菌、志贺氏菌、副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌共 5 项致病菌指标检测。

1.3.2 葡萄球菌肠毒素检测

参照 GB 4789.10—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》附录 B 和酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒说明书对分离菌株、患者洗胃液、食物进行葡萄球菌肠毒素检测。

1.3.3 脉冲场凝胶电泳分型

参照《现场细菌学》^[9]中金黄色葡萄球菌 PFGE 实验方法进行分子分型。将 3 株分离菌株纯培养后制成悬浊液,用浊度仪调整浓度为 4.0~4.5 麦氏单位之间。取 250 µL 菌悬液加 3 µL (1 mg/mL)溶葡萄球菌酶混匀。制成胶块后,用刀片切下 2 mm 宽胶块放入 10 U 的 Sma I 酶切液中,30 °C 酶切 4 h。电泳参数:起始转换时间 4.0 s,最后转换时间 40.0 s,电压 6.0 V/cm,电场夹角 120 °,电泳时间为 18 h,电泳温度 14 °C。电泳后用 GelRed 染色 30 min,后用去离子水脱色。最后通过凝胶成像仪进行图像的获取。

1.3.4 PFGE 分子分型图谱的聚类分析

使用 BioNumerics 6.6 软件对 3 株菌株分子分型图谱进行聚类分析。聚类算法采用非加权配对平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA),差异容许度设为 1%,相相似度用 Dice 系数表示,相似度 100%认定为同一 PFGE 带型,从而得到分离菌株的聚类图。

2 结果与分析

2.1 致病菌分离鉴定

检测样本中 3 份患者洗胃液(1#、2#、4#)在 Baird-Parker 平板和血平板上疑似有金黄色葡萄球菌生长。挑取上述可疑菌落进行纯培养、革兰染色镜检、血浆凝固酶实验,结果显示 3 株细菌均为革兰氏阳性球菌,排列呈葡萄状,无芽胞,无荚膜;血浆凝固酶实验呈阳性。最终经 Vitek 2 Compact 全自动微生物鉴定仪鉴定 3 株细菌均为金黄色葡萄球菌。另外 2 份患者洗胃液(3#、5#)和食物均未检出金黄色葡萄球菌。

2.2 葡萄球菌肠毒素检测

采用 ELISA 检测试剂盒对 5 份患者洗胃液、食物、3 株分离菌株进行葡萄球菌肠毒素检测。5 份患者洗胃液、食品均检出 1 种葡萄球菌肠毒素,为 E 型。3 株分离菌株均检出 E 型葡萄球菌肠毒素,同时还存在其他型别葡萄球菌肠毒素。具体结果详见表 1。

表 1 葡萄球菌肠毒素检测结果
Table 1 Test results of staphylococcal enterotoxin

样本来源	葡萄球菌肠毒素类型				
	SEA	SEB	SEC	SED	SEE
1#患者洗胃液	-	-	-	-	+
2#患者洗胃液	-	-	-	-	+
3#患者洗胃液	-	-	-	-	+
4#患者洗胃液	-	-	-	-	+
5#患者洗胃液	-	-	-	-	+
食品(半成品花甲)	-	-	-	-	+
金黄色葡萄球菌 (分离自 1#患者洗胃液)	-	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌 (分离自 2#患者洗胃液)	-	-	-	-	+
金黄色葡萄球菌 (分离自 4#患者洗胃液)	-	-	-	+	+

注:“+”表示检出,“-”表示未检出。

2.3 PFGE 分子分型结果

采用限制性内切酶 Sma I 对 3 株分离菌株进行酶切,然后制胶、电泳,染色后成像分析。3 株菌株之间相似性系数为 42.6%~51.6%,菌株间相关性较低,提示 3 株菌株可能来源不同克隆株。详见图 1。

将本次食物中毒(中毒事件 1)分离的 3 株金黄色葡萄球菌与同年另一起食物中毒(中毒事件 2)分离的 4 株金黄色葡萄球菌进行聚类分析。两起食物中毒分离的 7 株菌株

之间相似性系数均低于 0.85,提示分离的菌株可能来源不同克隆株。详见图 2。

3 结论与讨论

金黄色葡萄球菌在自然界中空气、水、灰尘、人和动物的排泄物中均可找到,食物受其污染的机会很多。国内吉林省^[10]、成都市^[11]、宝鸡市^[12]等地报道多种类别食品中存在金黄色葡萄球菌污染的情况,国外^[13]也有相关报道。当食物被污染后,在 25~30 ℃温度下放置 5~10 h,就能产生足以引起中毒的肠毒素,温度越高,产生肠毒素的时间越短^[14]。由于肠毒素对热的抵抗力极强,加热至 100 ℃,30 min 不能完全破坏,仍能使人致病。因此,一旦食物受到肠毒素污染,就无法通过常规加热处理来清除危害。

本起食物中毒事件中,对 5 名患者洗胃液及食物进行细菌学检验,在其中 3 名患者洗胃液中分离到金黄色葡萄球菌。对洗胃液、食物和分离菌株进行葡萄球菌肠毒素检测,均能检出 E 型葡萄球菌肠毒素。依据 WS/T 80—1996《葡萄球菌食物中毒诊断标准及处理原则》,从流行病学特点、临床表现、实验室诊断综合判定,这是一起金黄色葡萄球菌引起的食物中毒。从葡萄球菌肠毒素检测结果分析可发现,5 份患者洗胃液和食物的肠毒素都只有单一的 E 型,而分离的菌株经培养可检测 E 型外,还检出 B、C、D 型肠毒素。李孟寒等^[15]应用 PCR 扩增法研究食源性监测分离的金黄色葡萄球菌中 71.5%含肠毒素基因,同时存在携带有 2 种或以上肠毒素基因的情况。黄耀雄等^[16]应用酶

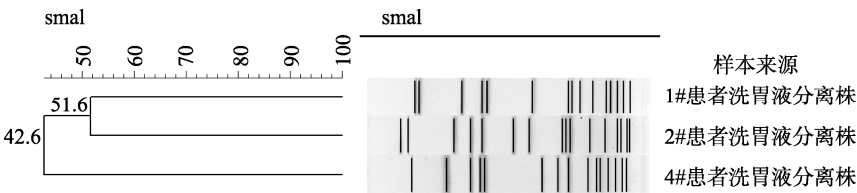


图 1 3 株金黄色葡萄球菌分离株聚类图
Fig.1 PFGE analysis of 3 strains of Staphylococcus aureus

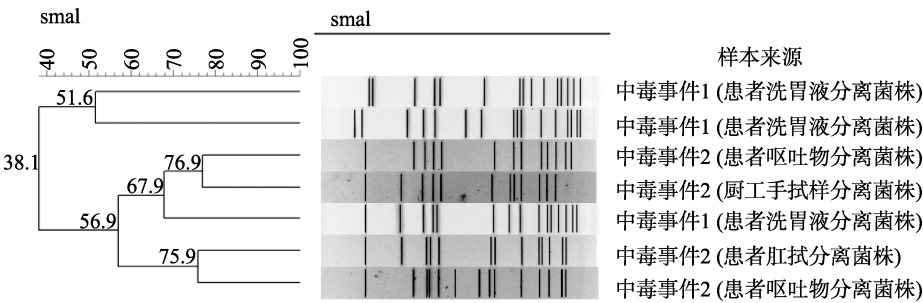


图 2 2019 年 2 起食物中毒金黄色葡萄球菌分离株聚类图
Fig.2 PFGE analysis of Staphylococcus aureus from 2 cases of food poisoning outbreaks in 2019

联免疫法研究从食品监测中分离的菌株, 显示 69.1% 的菌株能产生 2 种或 2 种以上肠毒素。金黄色葡萄球菌携带有多种肠毒素基因, 生长环境条件不同, 其毒素基因表达也会有所不同。张婧等^[17]研究显示 33 株含有 1 种或以上肠毒素基因的金黄色葡萄球菌经培养能产生相应肠毒素的有 21 株。相关研究显示肠毒素的产生与环境的水活度、酸碱度和温度密切相关^[18]。因此按照 WS/T 80—1996《葡萄球菌食物中毒诊断标准及处理原则》, 对金黄色葡萄球菌引起的食物中毒进行检测, 应充分考虑分离菌株的肠毒素基因表达情况, 当出现分离菌株肠毒素分型不一致的情况, 应考虑多次诱导产毒, 或者调整培养条件, 确保肠毒素基因的充分表达。有研究显示由 5 种常见肠毒素引起的中毒占金黄色葡萄球菌食物中毒的 95%, 另外 5% 是由其他类型肠毒素引起^[19]。酶联免疫法目前仅能对 5 种常见葡萄球菌肠毒素进行检测, 已经确认的葡萄球菌肠毒素基因很多, 要考虑其他型别葡萄球菌肠毒素致病的可能性。因此增加 PCR 法进行肠毒素基因的分型检测, 能更好地弥补酶联免疫法的不足。

PFGE 分型技术是对细菌的染色体进行 DNA 酶切电泳后再通过软件进行关联性分析, 是以核酸分析为手段的分型技术。它有别于传统的细菌表型分型, 具有重复性好、特异度高、结果容易判断的优点, 被认为是细菌分子流行病学研究的“金标准”。目前在国内外得到广泛使用, 特别是传染病疫情、食源性等疾病等突发公共卫生事件的流行病学溯源中发挥重要作用。本起食物中毒分离的 3 株金黄色葡萄球菌经 PFGE 分型, 3 者之间相似性系数较低, 提示来源于不同克隆株。将 3 株菌株与 2019 年另外一起食物中毒分离的菌株进行比较, 发现 2 起食物中毒分离的菌株相似性系数均较低, 来源不同克隆株。由于金黄色葡萄球菌在环境、人与动物中普遍存在, 因此食物受污染的风险很高, 途径多样, 存在同时受多株金黄色葡萄球菌污染的可能性。张颖等^[20]对广州市的一起金黄色葡萄球菌食物中毒应用 PFGE 进行分子分型, 显示存在多克隆系的情况。吕国平等^[21]利用多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)技术对一起食物中毒分离菌株进行回顾性分析, 显示同一起食物中毒事件检出的菌株属于不同的分子型别, 其污染源来自不同的克隆系。

综上所述, 食物中毒事件复杂程度是无法预料。在金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件检测中应充分考虑多克隆株污染致病、多肠毒素基因携带等可能性。特别是在患者较多、可疑食物较多的规模较大的食物中毒事件处理中, 在应用 PFGE、MLST 等分子溯源技术进行分析时, 应考虑对同一样本多株菌株进行溯源, 确保溯源能真实、全面反映食物中毒事件的发生。肠毒素检测在金黄色葡萄球菌食物中毒事件中非常重要, 在应用常规酶联免疫法检测肠毒素的同时应结合肠毒素基因的检测, 考虑毒素基因表达的

情况。只有充分考虑多种情况, 才能给污染责任的判定和传染源的处置工作提供科学依据。

参考文献

- [1] HENNEKINNE JA, DE BUYSER ML, DRAGACCI S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation [J]. *Namia*, 2012, 36(4): 815–836.
- [2] 向红, 周黎, 廖春, 等. 金黄色葡萄球菌及其引起的食物中毒的研究进展[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(2): 196–199.
XIANG H, ZHOU L, LIAO C, et al. Progress of *Staphylococcus aureus* and food poisoning [J]. *Chin J Food Hyg*, 2015, 27(2): 196–199.
- [3] 周伟艳, 郑剑, 高红, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素与脉冲场凝胶电泳分型分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2020, 30(18): 2200–2203.
ZHOU WY, ZHENG J, GAO H, et al. Typing analysis of *Staphylococcus aureus* enterotoxin and pulsed field gel electrophoresis [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2020, 30(18): 2200–2203.
- [4] 骆业巧, 王进, 司波. 一起由沙门氏菌和金黄色葡萄球菌混合引起的食物中毒病原分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(19): 6947–6951.
LUO YQ, WANG J, SI B. Pathogen analysis of a food poisoning event caused by *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus* [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(19): 6947–6951.
- [5] 王霄峰, 任婧寰, 王哲, 等. 2017 年全国食物中毒事件流行特征分析[J]. *疾病监测*, 2018, 33(5): 359–364.
WANG XY, REN JH, WANG Z, et al. Epidemiological characteristics of food poisoning events in China, 2017 [J]. *Dis Surv*, 2018, 33(5): 359–364.
- [6] 伊怀文. 金黄色葡萄球菌肠毒素分型及药敏分析[J]. *口岸卫生控制*, 2020, 25(1): 16–19.
YI HW. Enterotoxin typing and drug sensitivity analysis of *Staphylococcus aureus* [J]. *Port Health Control*, 2020, 25(1): 16–19.
- [7] 王园园, 李颖, 朱美娟, 等. 北京市顺义区食源性金黄色葡萄球菌肠毒素分型方法研究[J]. *首都公共卫生*, 2015, 9(3): 123–125.
WANG YY, LI Y, ZHU MJ, et al. Study on enterotoxin genotyping of foodborne *Staphylococcus aureus* in Shunyi district [J]. *Capit J Public Health*, 2015, 9(3): 123–125.
- [8] HU DL, NAKANE A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis [J]. *Eur J Pharm*, 2014, 7: 22.
- [9] 徐建国. 现场细菌学[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
XU JG. Scene bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 2011.
- [10] 王太君, 刘思洁, 王娟, 等. 2016–2019 年吉林省食源性金黄色葡萄球菌监测数据分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(24): 9366–9370.
WANG TJ, LIU SJ, WANG J, et al. Analysis of surveillance data of foodborne *Staphylococcus aureus* in Jilin province from 2016 to 2019 [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(24): 9366–9370.
- [11] 魏星, 罗棵源, 罗丽, 等. 成都市售食品及加工环节金黄色葡萄球菌的污染状况及半定量风险评估[J]. *卫生研究*, 2020, 49(4): 608–612.
WEI X, LUO KB, LUO L, et al. Investigation on contamination status of *Staphylococcus aureus* from food and processing in Chengdu [J]. *J Hyg Res*, 2020, 49(4): 608–612.
- [12] 魏雯, 王明旭, 高涛, 等. 2014–2018 年宝鸡市市售散装即食食品中金黄色葡萄球菌污染状况[J]. *职业与健康*, 2021, 37(2): 262–265.
WEI W, WANG MX, GAO T, et al. Contamination status of *Staphylococcus aureus* in commercially available ready-to-eat food in bulk

- in Baoji city from 2014-2018 [J]. *Occup Health*, 2021, 37(2): 262-265.
- [13] SAVARIRAJ WR, RAVINDRAN NB, KANNAN P, *et al.* Occurrence and enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from retail chicken meat [J]. *Food Sci Technol Int*, 2020, (1): 1-7.
- [14] 于维森, 王伟栋, 孙建平. 常见细菌性食物中毒快速处置[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- YU WS, WANG WD, SUN JP. Rapid disposal of common bacterial food poisoning [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013.
- [15] 李孟寒, 李莹, 闫琳, 等. 中国食源性金黄色葡萄球菌耐药及肠毒素特征[J]. *中国公共卫生*, 2019, 35(5): 574-578.
- LI MH, LI Y, YAN L, *et al.* Antimicrobial resistance and enterotoxigenicity characteristics of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in China [J]. *Chin J Public Health*, 2019, 35(5): 574-578.
- [16] 黄耀雄, 杜少平, 胡海艳, 等. 120 株金黄色葡萄球菌产肠毒素的分析与研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(15): 2167-2169.
- HUANG YX, DU SP, HU HY, *et al.* Research on enterotoxin of 120 strains of *Staphylococcus aureus* [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 27(15): 2167-2169.
- [17] 张婧, 张易, 施春雷. 食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因及其表达检测[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(1): 246-251.
- ZHANG J, ZHANG Y, SHI CL. The detection of enterotoxin gene and its expression of foodborne *Staphylococcus aureus* [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2020, 20(1): 246-251.
- [18] 徐振波, 刘晓晨, 李琳, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素在食源性微生物中的研究进展[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(9): 2317-2324.
- XU ZB, LIU XC, LI L, *et al.* Development of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food-borne bacteria [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2013, 29(9): 2317-2324.
- [19] CHO SH, KIM JH, CHUL J, *et al.* Surveillance of bacterial pathogens associated with acute diarrheal disease in the republic of Korea during one year, 2003 [J]. *J Microbiol*, 2006, 44(3): 327-335.
- [20] 张颖, 莫自耀, 庞杏林, 等. 一起食物中毒事件的金黄色葡萄球菌分子分型研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2008, (9): 672-676.
- ZHANG Y, MO ZY, PANG XL, *et al.* Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from a severe food-poisoning [J]. *Chin J Prev Med*, 2008, (9): 672-676.
- [21] 吕国平, 秦丽云, 郭玉梅, 等. 一起食物中毒中金黄色葡萄球菌的分子特征分析[J]. *医学动物防制*, 2019, 35(1): 50-52.
- LV GP, QIN LY, GUO YM, *et al.* Characteristic analysis of *Staphylococcus aureus* in a food poisoning case [J]. *J Med Pest Control*, 2019, 35(1): 50-52.

(责任编辑: 王 欣 郑 丽)

作者简介



吴灿权, 主管技师, 主要研究方向为微生物检验。

E-mail: ZSCDCWCQ@163.com