

广东省食物中毒暴发疫情中沙门菌和金黄色葡萄球菌自动化核糖体基因分型研究

何冬梅 朱海明 赖蔚琴 王海燕 柯碧霞 谭海玲 李柏生 邓小玲 柯昌文

【摘要】 目的 为了解广东省常见食源性致病菌沙门菌和金黄色葡萄球菌(金葡菌)的遗传物质多态性特征,探索其鉴定及溯源方法。方法 运用自动化核糖体基因分型系统,用 *EcoR* I 酶或 *Pvu* II 酶,对广东省分离的沙门菌和金葡菌进行分子分型研究。应用 BioNumerics 软件比对不同来源、时间和地点的分离株,分析菌株间的相关性。结果 使用 *Pvu* II 酶对 32 株沙门菌酶切,分为 19 个核糖体型,使用 *EcoR* I 酶对 14 株沙门菌酶切,分为 2 个核糖体型。使用 *EcoR* I 酶对 49 株金葡菌酶切,分为 31 个核糖体型,表现出较大的遗传多样性。结论 自动化核糖体基因分型能有效鉴定沙门菌和金葡菌。沙门菌血清分型与 Ribotyping 分型无高度相关性,但两者结合,能更有效鉴定菌株间的亲缘关系,确定食物中毒的来源和传染途径。

【关键词】 沙门菌;金黄色葡萄球菌;核糖体基因分型

Automated ribotyping of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in food poisoning of Guangdong province HE Dong-mei, ZHU Hai-ming, LAI Wei-dong, WANG Hai-yan, KE Bi-xia, TAN Hai-ling, LI Bo-sheng, DENG Xiao-ling, KE Chang-wen. Institute of Pathogenic Microorganisms, Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510300, China
Corresponding author: HE Dong-mei, Email: gzhdm@21cn.com

【Abstract】 **Objective** To understand the genetic polymorphism of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in Guangdong province, as well as to explore methods for identifying and tracing the source of these two foodborne pathogens. **Methods** Using the automated ribotyping system, two foodborne pathogens were tested with either *EcoR* I or *Pvu* II restriction enzymes. BioNumerics software was then applied for image analysis, database establishment and other corresponding analysis. **Results** Digestion of 32 *Salmonella* isolates with *Pvu* II yielded 19 different ribotypes, and digestion of 14 *Salmonella* isolates with *EcoR* I yielded 2 different ribotypes. *Staphylococcus aureus* isolates showed greater genetic diversity, whereas *EcoR* I digestion of 49 different isolates yielded 31 different ribotypes. **Conclusion** Unique *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* isolates could be identified through ribotyping. Although *Salmonella* serotyping and ribotyping were not strongly correlated, the combination of both restriction enzymes could be used to more effectively identify the genetic relationship among different strains as well as the source of food poisoning. Thus, not only could the genetic relationships amongst the different strains be inferred through ribotyping skills, the source of food poisoning and mode of transmission could also be determined under the use of this method.

【Key words】 *Salmonella*; *Staphylococcus aureus*; Ribotyping

我国食源性疾病监测网数据显示,由微生物引起的食源性疾病事件和涉及人数最多,其中沙门菌占 17.9%,葡萄球菌肠毒素占 8.9%^[1]。RiboPrinter 是美国 DuPont 公司推出的一套全自动微生物核糖体基因分型(ribotyping)系统,适用于致病菌的分子流行病学研究,得到美国食源性细菌监测分子分型国

家电子网络(PulseNet)认可及运用。为了解广东省食源性致病菌沙门菌(SAL)和金黄色葡萄球菌(SA)的 DNA 多态性特征,建立相应数据库,探索这两种常见食源性致病菌的鉴定及溯源方法,本研究运用 RiboPrinter 分析系统,对省内部分地区分离的 SAL 和 SA 菌株进行研究。

材料与方法

1. 菌株:均来源于 2001、2003—2006、2008 年食

品和食物中毒分离株,其中 SAL 46 株来自番禺、澄海、广州、增城、湛江、肇庆、惠州、仁化、海丰、揭阳地区,SA 49 株来自中山、佛山、广州、花都、珠海、惠州、肇庆、新会地区。

2. 试剂和仪器:包括缓冲液、裂解液 A 和 B、酶(*EcoR* I 或 *Pvu* II)、探针、反应基质、纯净水、菌落采集棒、样本盛放管、尼龙膜、1%琼脂糖凝胶盒等(均购自 Dupont 公司),脑心浸液琼脂(OXOID 公司),Eppendorf 微量离心管和 RiboPrinter 全自动微生物指纹鉴定系统(Dupont 公司,美国)。

3. 方法:利用 RiboPrinter 全自动微生物指纹鉴定系统和配套试剂。将分纯后的 SAL 和 SA 接种脑心浸液琼脂,37 °C 培养过夜。检测革兰阴性菌(SAL)是将 200 μl 样品缓冲液加入 1.5 ml 离心管中;检测革兰阳性菌(SA)是将 40 μl 样品缓冲液加入 1.5 ml 离心管中;然后用菌落采集棒取菌,用手持式搅拌机搅拌,制成均匀菌悬液。吸取 30 μl 菌悬液于加热器中加热灭活后冷却,加入裂解液 A 和 B 各 5 μl,制成上样液。按仪器操作要求进行自检,输入参数,按照程序提示在指定位置安装酶管、尼龙膜、1%琼脂糖凝胶盒、基质盒、纯净水和样品盛放管,仪器自动运行 8 h 后可得到杂交图谱。

4. 聚类分析:采用比利时 Applid Maths 公司的 BioNumerics V4.0 关系数据库软件进行 rDNA 图谱分析,聚类分析采用 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic averages, 组间非加权的几何平均数)方法,聚类相似系数采用基于曲线比较的 Pearson 系数进行计算,建立数据库。

结 果

1. SAL 的核糖体基因分型:46 株 SAL 来源于 2001、2003—2006、2008 年广东省番禺、澄海、广州、增城、湛江、肇庆、惠州、仁化、海丰、揭阳地区食物中毒事件样品(致病食品、肛拭子和砧板拭子)和市售食品分离株,分别为 29 株和 17 株。

使用 *Pvu* II 限制性内切酶对 32 株 SAL 进行酶切,可产生 9~12 条 DNA 片段,分子量 2~50 kb。采用 BioNumerics V4.0 软件对 rDNA 图谱进行聚类分析,根据电泳产生条带的位置和相关条带的强度不同,32 株 SAL 分为 19 个核糖型,相似值为 4.6%~98.6%(图 1)。其中核糖类型为 P408-5-S-4、P408-16-S-5、P408-5-S-2 各 2 株,P408-26-S-1、P408-7-S-2 各 3 株,P408-7-S-1 有 7 株(表 1)。使用 *EcoR* I 限制性内切酶对 14 株 SAL 食物中毒分离

株进行酶切,可产生 9~10 条 DNA 片段,分子量 1.1~48 kb。采用 BioNumerics V4.0 软件对 rDNA 图谱进行聚类分析,14 株 SAL 分为 2 个核糖型,相似值为 5.3%~98.7%(图 2)。其中核糖类型为 E408-50-S-1 有 10 株,E408-51-S-3 有 4 株(表 1)。

表 1 46 株 SAL 核糖体型及其分布

核糖体型	菌株来源	分离年份	分离地点	菌株数
P408-5-S-4	食品	2003	番禺、澄海	2
P408-16-S-5	食品	2004	增城	2
P408-5-S-2	食品	2003	澄海	2
P408-26-S-1	食物中毒	2005	肇庆	3
P408-7-S-1	食物中毒、食品	2004	惠州、仁化、增城	7
P408-7-S-2	食物中毒	2004	惠州	3
E408-50-S-1	食物中毒	2006	广州	10
E408-51-S-3	食物中毒	2008	揭阳	4

注:其他核糖型各 1 株;RiboGroup 命名根据探针(*Pvu* II、*EcoR* I)、仪器编号(408)、程序号(5、16 等)、RiboPrinter 图谱分离顺序号(4、5 等)确定

图 1 中菌株 03S3473 和 03S269 为里丁沙门菌(*S. reading*),04S-118 和 04S-114 为德比沙门菌(*S. derby*),03S2667 和 03S2661 为韦太夫登沙门菌(*S. weltevreden*),这些菌株两两之间血清型相同,具有相同的核糖体型。菌株 05SA014(F)和 05SA006(F)为慕尼黑沙门菌(*S. muenchen*),05SA015(F)为利尔沙门菌(*S. lille*),这些菌株血清型不同但核糖体型相同(P408-26-S-1),结合血清分型和核糖体基因分型,提示分离自红豆糖水的菌株 05SA014(F)是真正的污染源。

惠州地区食物中毒分离菌株 1、6b、103a、5d、4a 为同一核糖体型(P408-7-S-1),相似值为 96.4%~98.2%(图 1);菌株 49、3b 和 11d 为同一核糖体型(P408-7-S-2),相似值为 95.8%~98.3%。这两种核糖体型电泳产生条带的数目和位置相同,只有 1~2 条 DNA 片段的强度不同,相似值为 92.4%,菌株间可能有某种亲缘关系。菌株血清型分别为肠炎沙门菌(*S. enteritidis*)、利尔沙门菌(*S. lille*)和基夫沙门菌(*S. give*),可能是混合型感染导致的食物中毒。菌株 04S-28(1)和 04S-120 分别分离自仁化地区的生鸡肉和增城地区的生猪肉,21.88%(7/32)菌株的核糖类型为 P408-7-S-1,从食品和患者肛拭分离株均可获得此型别,为优势核糖体型。

对 2006 年广州大学城肠炎沙门菌食物中毒分离株进行核糖体分型,10 株菌均为同一核糖体型(E408-50-S-1),相似值为 89.8%~98.7%(图 2)。提示食品菇炒鸡与砧板存在交叉污染,学生食入污染的食品导致该起食物中毒暴发。对揭阳地区一起

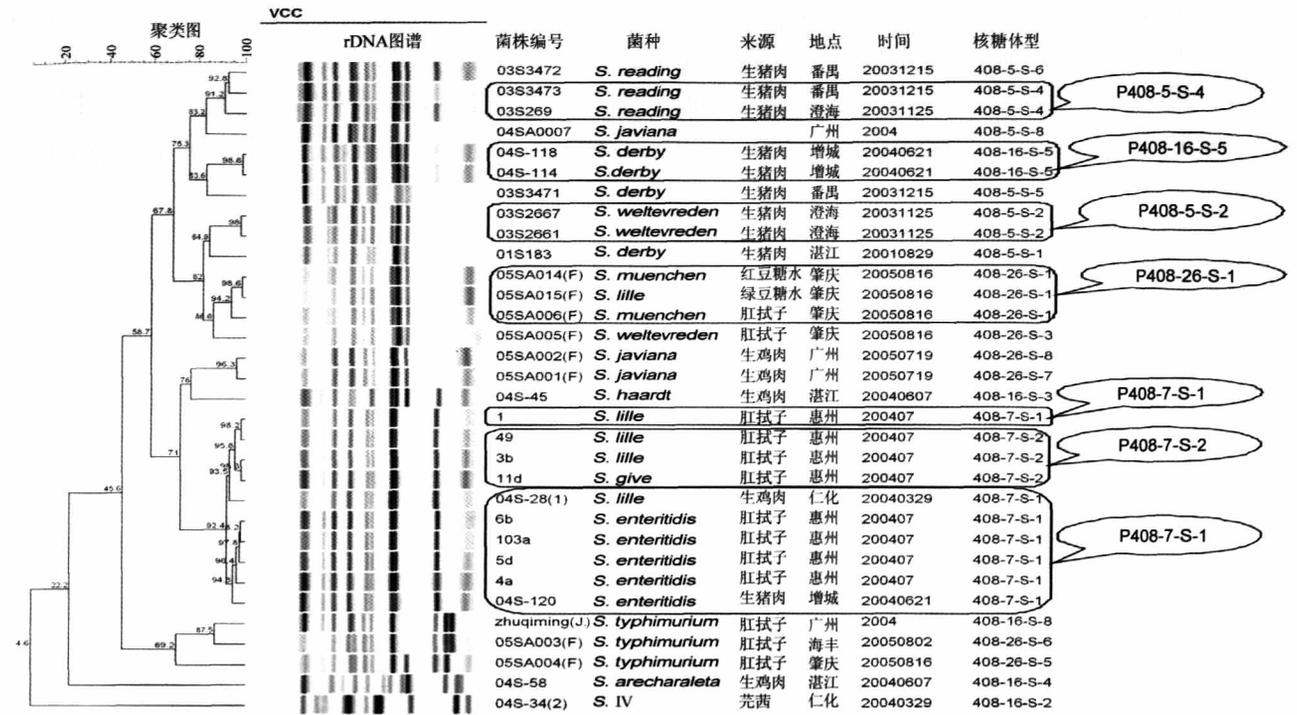


图1 32株SAL的核糖体基因分型结果(*Pvu* II 酶)

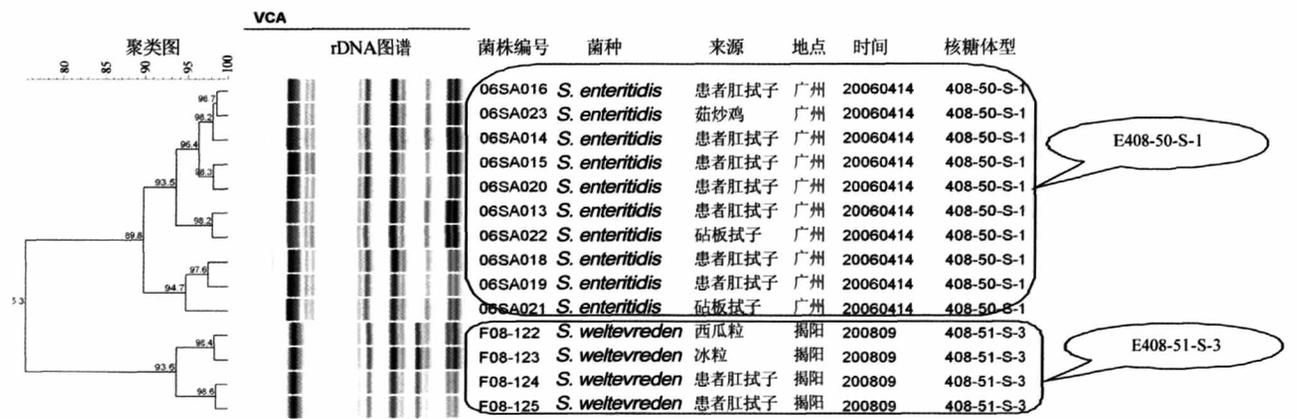


图2 14株SAL的核糖体基因分型结果(*EcoR* I 酶)

韦太夫雷登沙门菌食物中毒分析表明,4株菌均为同一核糖体型(E408-51-S-3),相似值为93.6%~98.6%(图2)。结合流行病学调查发现,某供货商在制作西瓜粒与冰粒混合刨冰时受韦太夫雷登沙门菌污染而致食物中毒。

2. SA的核糖体基因分型:49株SA源自2003、2005、2006、2008年广东省食物中毒分离株和市售食品,分别来自中山、佛山、广州、花都、珠海、惠州、肇庆、新会地区,其中47株分离自食物中毒事件样品(致病食品、呕吐物和棉拭子),另外2株分离自冰淇淋和炸豆腐。

通过RiboPrinter系统(使用*EcoR* I 酶)对49株SA进行Ribotyping分型,结果得到1.1~48 kb的

rDNA 指纹图谱。采用BioNumerics V4.0软件对rDNA图谱进行聚类分析,49株SA分为31个核糖体型,相似值为9.2%~99.3%(图3)。其中核糖体型为E408-33-S-3有3株,E408-22-S-2型有5株,E408-39-S-1和E408-43-S-1分别有4株,E408-44-S-4和E408-30-S-1分别有3株,E408-39-S-4和E408-44-S-5分别有2株,其他核糖体型均仅有1株菌(表2)。

对分离自花都地区7株SA进行核糖体分型(图3),其中菌株05ST007、05ST002、05ST001和05ST006分离自餐具、食物和患者肛拭,均属于相同的核糖体型E408-22-S-2,而菌株05ST012、05ST010(分离自酒店员工肛拭)和05ST005(分离自

表 2 49 株 SA 核糖体分型及分布

核糖体型	来源	年份	地点	菌株数
P408-33-S-3	食品、患者呕吐物	2006、2008	佛山、广州	3
P408-22-S-2	餐具、食品、患者肛拭、厨工手拭子	2005、2008	中山、花都	5
P408-39-S-1	患者呕吐物	2008	珠海	4
P408-43-S-1	工人手拭子、患者呕吐物	2008	珠海、中山	4
P408-44-S-4	食品、工人手拭子	2008	珠海	3
P408-39-S-4	患者呕吐物、食品	2008	新会	2
E408-30-S-1	患者肛拭、呕吐物	2005	肇庆	3
E408-44-S-5	食品	2008	珠海	2

注：其他核糖体型各 1 株；RiboGroup 命名根据探针名称(*EcoR* I)、仪器编号(408)、程序号(33、22 等)、RiboPrint 图谱分离顺序号(2、3 等)确定

患者肛拭)与上述 4 株菌 rDNA 图谱相似性较低。结合流行病学调查,认为这起食物中毒事件的感染源

为污染的食物和餐具,而非带菌的从业人员。对分离自珠海、新会地区的 SA 进行核糖体分型(图 3),菌株 08ST002(F)和 08ST003(F)分别分离自新会地区高钙奶和患者呕吐物,为同一核糖体型 E408-39-S-4,相似值为 98.2%,提示该患者因进食污染的高钙奶而引起食物中毒。菌株 08ST004(F)~08ST006(F)、08ST008(F)分别分离自珠海地区患者呕吐物,为同一核糖体型(E408-39-S-1),与分离自新会地区 SA 的核糖体型不同,排除两地同源暴发的可能。菌株 08ST010(F)、08ST013(F)和 08ST015(F)分离自工人手拭子和奶粉,为同一核糖

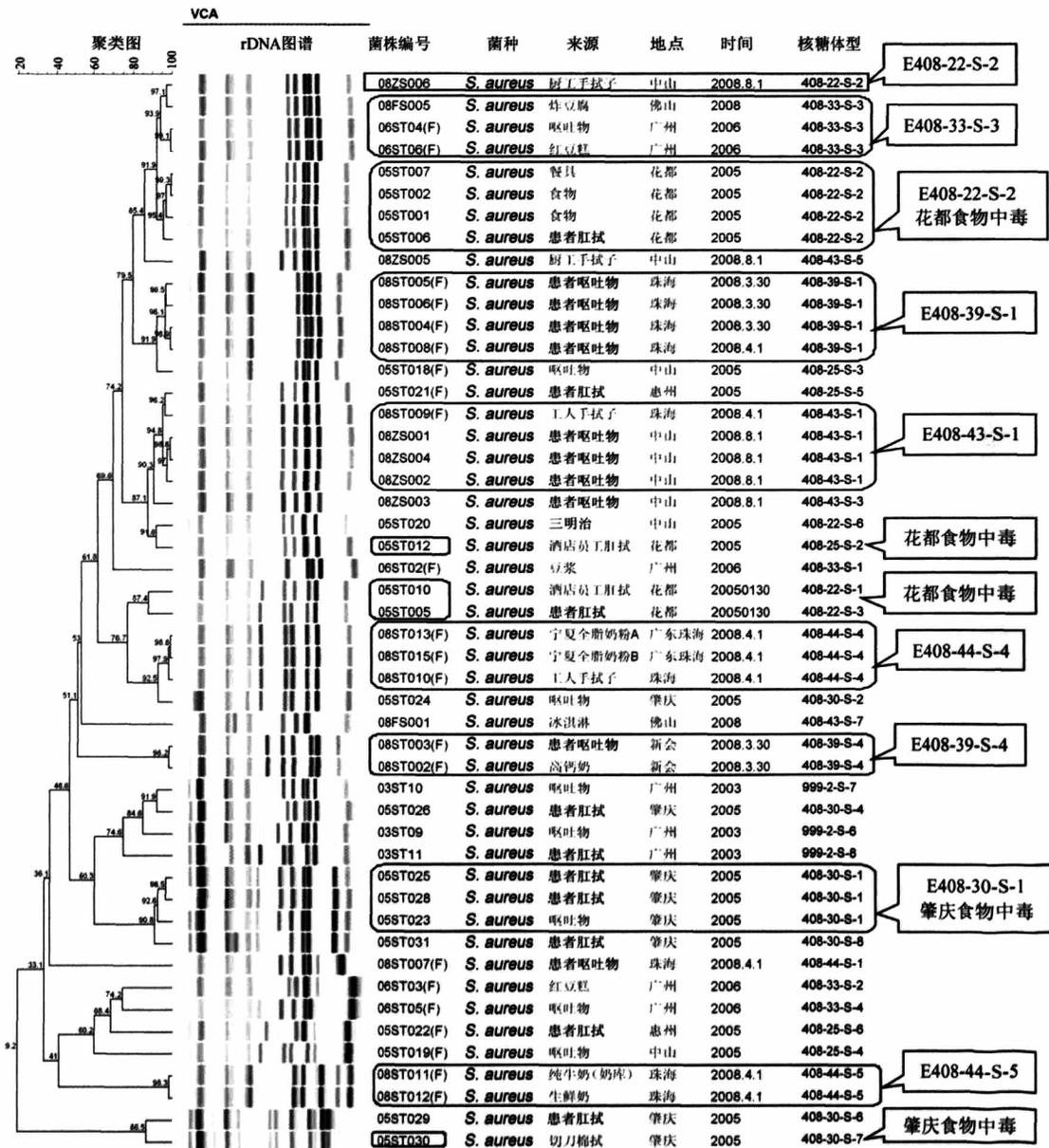


图 3 49 株 SA 的核糖体基因分型结果(*EcoR* I 酶)

体型 E408-44-S-4, 相似值为 97.9%, 提示工人手上的伤口感染了 SA, 由此污染了生产线上的奶粉。菌株 08ST011(F) 和 08ST012(F) 分离自牛奶, 为同一核糖体型 (E408-44-S-5), 提示珠海地区的奶源受到 SA 污染。对分离自肇庆地区的 SA 进行核糖体分型 (图 3), 其中菌株 05ST023、05ST025 和 05ST028 分离自患者的呕吐物和肛拭, 为同一核糖体型 (E408-30-S-1), 而菌株 05ST030 分离自切刀棉拭子, 核糖体型为 E408-30-S-7, 与上述 3 株菌相似值低, 排除因切刀污染食品而引起的感染。

对分离自 2008 年中山市的 SA 进行核糖体分型 (图 4), 其中菌株 08ZS001、08ZS002 和 08ZS004 分离自患者呕吐物, 为同一核糖体型 (E408-43-S-1); 菌株 08ZS005 和 08ZS006 分别分离自厨工手拭, 核糖体型分别为 E408-43-S-5 和 E408-22-S-2, 与患者呕吐物分离株相似值为 83.2%, 核糖体型 E408-43-S-1 与 E408-43-S-5 只有一条 DNA 片段的差异, 与 E408-22-S-2 有两条 DNA 片段的差异, 它们之间是否存在亲缘关系, 有待进一步研究。

对分离自广州市产肠毒素的 SA 进行核糖体分型 (图 5), 菌株 06ST02(F) ~ 06ST06(F) 为 2006 年某小学暴发食物中毒的分离株, 其中菌株 06ST04(F) 和 06ST06(F) 分离自呕吐物和红豆糕, 为同一核糖体型 (E408-33-S-3), 相似值为 93.3%。菌株 06ST02(F) 分离自豆浆, 核糖体型为 E408-33-S-1, 与上述 2 株菌 rDNA 图谱相似值为 71.8%, 相似性较低。结合流行病学调查, 认为这起食物中毒的感染源为污染的红豆糕, 而非污染的豆浆。由此可见, 根据核糖体分型和聚类分析结果, 相似值为 93%^[2] 以上者, 可基本作为食源性疾病暴发的溯源依据。

对 2005 年分离自中山市一起食物中毒的 3 株产肠毒素 SA 进行核糖体分型 (图 6), 其中 2 株分离自学生呕吐物, 1 株分离自三明治, 菌株 rDNA 图谱相似值较低分别为 68.7% 和 11.1%, 同源性较差, 提示三明治不是污染源。

讨 论

核糖体基因分型是限制性酶切技术与 Southern

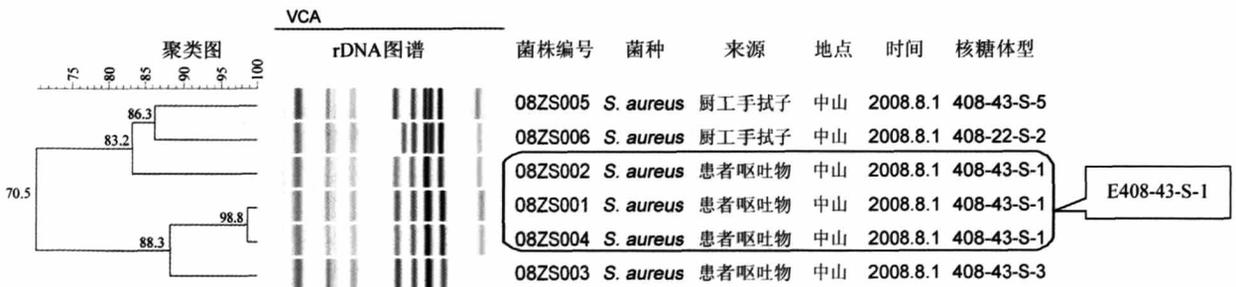


图 4 2008 年中山市食物中毒 SA 的核糖体基因分型 (EcoR I 酶)



图 5 2003、2006 年广州市食物中毒 SA 的核糖体基因分型 (EcoR I 酶)



图 6 2005 年中山市一起食物中毒 SA 的核糖体基因分型 (EcoR I 酶)

印迹杂交相结合以分析基因多态性的分子分型方法,被广泛用于致病菌的分子流行病学研究。与其他分子分型方法相比,具有重复性好、稳定和结果易于解释的优点,但由于核糖体基因分型仅分析全基因的0.5%^[3],因此只具有中等分辨力^[4,5],通过选择理想的酶可提高核糖体基因分型的灵敏度^[6]。

本研究选用 *Pvu* II 和 *EcoR* I 酶对 SAL 进行核糖体基因分型,均能获得清晰的 rDNA 图谱,表明 *Pvu* II 和 *EcoR* I 限制性内切酶对 SAL 具有良好的分型能力。通过对 SAL 进行血清分型和核糖体基因分型,发现血清型不同可有相同的核糖体型,说明 rDNA 图谱与血清型无高度相关性,但两者结合起来,能更有效地鉴定菌株间的亲缘关系,发现食物中毒的起源。如本研究中肇庆地区 SAL 食物中毒的起源是污染红豆糖水;惠州地区 SAL 食物中毒可能是由于混合型感染引起。此外, SAL 的 P408-7-S-1 为优势核糖体型(21.88%, 7/32),从食品和患者肛拭分离株均可获得此型别,提示此核糖体型可引起暴发感染的可能。

选用 *EcoR* I 酶,对 49 株 SA 进行核糖体基因分型,结果得到 1.1 ~ 48 kb 的 rDNA 指纹图谱。根据电泳产生条带的位置和相关条带的强度不同,49 株 SA 分为 31 个核糖体型,相似度在 9.2% ~ 99.3%,表现出较大的遗传多样性。其中花都、珠海(新会)和广州市 3 起食物中毒事件均能准确追踪到食物中毒的起源。2008 年中山市食物中毒事件是否由于厨工手上的伤口感染了 SA,在加工时污染了食品,后又通过污染的食品而感染消费者,有待进一步研究。菌株 08ZS005 和 08ZS006 可能由于长期存在于环境中,与周围的食物、环境发生交叉污染和传播,多次

传代后发生菌株变异,与患者呕吐物分离株存在 1 ~ 2 条 DNA 片段的差异,相似值为 83.2%,是否有亲缘关系,有待进一步的研究。

综上所述,利用 BioNumerics 软件对 rDNA 指纹图谱进行分析,不仅可以推断菌株间的亲缘关系,还可以追踪食物中毒的传染源和传播途径。

(感谢解放军第四五八医院王洪敏博士对本文的指导)

参 考 文 献

- [1] Liu XM, Chen Y, Wang XY, et al. Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001 national foodborne disease surveillance system. *J Hyg Res*, 2004, 33(6): 725-727. (in Chinese)
刘秀梅,陈艳,王晓英,等. 1992—2001 年食源性疾病暴发资料分析——国家食源性疾病监测网. *卫生研究*, 2004, 33(6): 725-727.
- [2] Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al. *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice*. Washington DC: ASM Press, 2004.
- [3] Inglis TJ, O'Reilly L, Foster N, et al. Comparison of rapid, automated ribotyping and DNA macrorestriction analysis of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(9): 3198-3203.
- [4] Lukinmaa S, Aarnisalo K, Suihko ML, et al. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10(6): 562-568.
- [5] Grif K, Heller I, Wagner M, et al. A comparison of *Listeria monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin in Austria by automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Foodborne Pathogens Dis*, 2006, 3(1): 138-141.
- [6] Bouchet V, Huot H, Goldstein R. Molecular genetic basis of ribotyping. *J Clin Microbiol Rev*, 2008, 21(2): 262-273.

(收稿日期:2011-03-30)

(本文编辑:张林东)