

进出口食品中肠炎沙门氏菌的脉冲场凝胶电泳分子分型分析

范放, 汤慕瑾*, 吕敬章, 万志刚, 吕东月, 张恒, 马淑棉

(深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 深圳市食品安全检测技术研发重点实验室, 广东 深圳 518000)

摘要:目的: 分析近年深圳市进出口食品中分离的肠炎沙门氏菌菌株之间的相关性, 初步建立食源性肠炎沙门氏菌脉冲场凝胶电泳分子分型数据库。方法: 58株肠炎沙门氏菌菌株基因组DNA经*Xba* I 酶切, 通过脉冲场凝胶电泳获得电泳图谱, 利用BioNumerics软件对图谱进行聚类分析。结果: 建立了深圳进出口食品中肠炎沙门氏菌DNA指纹图谱数据库。58株肠炎沙门氏菌分属18种脉冲场凝胶电泳图谱。聚类分析显示, 58株肠炎沙门氏菌包含2个群, 第1群主要为分离自美国进口禽肉的17株肠炎沙门氏菌, 其相似性为91.45%, 优势条带型为P2。第2群主要为分离自中国食品的36株肠炎沙门氏菌和分离自阿根廷的2株肠炎沙门氏菌, P8为优势条带型, 相似性达到91.03%。结论: 进出口食品中分离的肠炎沙门氏菌存在遗传谱系紧密相关的两个流行克隆群。

关键词: 食品; 肠炎沙门氏菌; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型

Molecular Subtyping of *Salmonella enteritidis* in Imported and Exported Foods Using Pulsed Field Gel Electrophoresis

FAN Fang, TANG Mu-jin*, LÜ Jing-zhang, WAN Zhi-gang, LÜ Dong-yue, ZHANG Heng, MA Shu-mian

(Shenzhen Key Laboratory of Detection Technology R & D on Food Safety, Food Inspection Center,

Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518000, China)

Abstract: Objective: To explore the relationship among *Salmonella enteritidis* strains isolated from imported and exported foods in Shenzhen during 2005–2011, and develop a DNA fingerprint database of *Salmonella enteritidis*. Methods: Chromosomal DNAs from 58 isolates in agarose were digested with the restriction enzyme *Xba* I, and then were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). PFGE patterns were clustered using BioNumerics software. Results: DNA fingerprint database of imported and exported foods in Shenzhen was successfully developed. The results showed that there were 18 distractive PFGE patterns including 2 clusters. In cluster 1, *Salmonella enteritidis* strains isolated from American poultry meat products had 91.45% similarity, and pattern 2 was the dominant type. In cluster 2, 38 *Salmonella enteritidis* strains isolated from Chinese and Argentinian poultry meat products had 91.03% similarity and its dominant type was P8. Conclusion: There were two closely correlated pandemic clones of *Salmonella enteritidis* isolated from imported and exported foods. The development of DNA fingerprint database of imported and exported foods can contribute to develop molecular subtyping surveillance network for active surveillance and source tracking of food-borne pathogenic bacteria.

Key words: food; *Salmonella enteritidis*; pulsed-field gel electrophoresis; molecular subtyping

中图分类号: R378

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)22-0198-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201322040

沙门氏菌被列为首选控制的食源性致病菌, 其引起的食源性疾病是危害人类健康的重大隐患, 其中以肠炎血清型的沙门氏菌最易引起食物中毒^[1]。沙门氏菌属型特别复杂, 传统的分型方法包括生化反应、耐药性、血清学、噬菌体分型等, 大多通过表型鉴定, 如依据菌体表

面脂多糖、鞭毛抗原分别携带的O、H抗原等, 存在较大的局限性, 不能满足在复杂的食源性疾病诊断中对传染源的追踪和菌株之间的差异分析^[2-4]。近年来, 针对沙门氏菌的多种分子分型技术得到快速发展, 如质粒指纹图谱分析、随机扩增多态性DNA分析、扩增片段长度多态

收稿日期: 2012-12-02

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2009IK145)

作者简介: 范放(1957—), 女, 高级工程师, 本科, 研究方向为食品微生物检测。E-mail: fanfang3393@163.com

*通信作者: 汤慕瑾(1977—), 女, 高级工程师, 博士, 研究方向为食品中有害物质和致病菌检测。E-mail: tmj1113@hotmail.com

性分析、多位点测序分型和脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)技术。其中PFGE方法具有重复性好、分辨率高、易于标化等优点,被推崇为细菌分子分型的金标准^[5-6]。PFGE电泳结果是条带图谱,分离出的DNA片段大,谱型简单,与表型鉴定结果一致性较高;即使同一血清型之间的PFGE图谱也有差异,可以应用于细菌同一血清型内进一步的菌株分型及溯源,是食源性病原菌溯源的有力工具^[7-9]。Tenover等^[10]提出了关于菌株同源性的判别标准,即根据PFGE的DNA电泳图谱条带差异,可判断菌株间是否相同或相关。建立食品中肠炎沙门氏菌DNA指纹图谱数据库不仅可为进出口食品贸易争端提供了确凿的依据,同时还可建立食源性致病菌分子分型监测网络打下了良好的基础,有助于食源性疾病的及时主动监测和传染来源追踪。本研究应用脉冲场凝胶电泳分型技术,对2005—2011年深圳进出口食品中分离的58株肠炎沙门氏菌菌株之间的相关性进行分析,旨在建立深圳市进出口食品中肠炎沙门氏菌的DNA指纹图谱数据库,为进行肠炎沙门氏菌的分子流行病学研究及肠炎沙门氏菌引起的食源性疾病溯源提供技术基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

自2005—2011年间由深圳出入境检验检疫局食检中心自进出口食品中分离得到的58株肠炎沙门氏菌菌株。所有食品均按照国家标准方法进行检测并分离鉴定出阳性菌株,并用丹麦SSI沙门氏诊断血清进行分型鉴定。分子质量参考标准菌株为PulseNet中使用的沙门氏菌标准菌株H9812^[11],由深圳市疾病预防控制中心提供。

血琼脂平板 北京陆桥技术有限责任公司; Seakem Gold胶 美国Cambraex Bio Science Rockland公司; 蛋白酶K 美国Sigma公司; 限制性内切酶*Xba* I 美国New England Biolabs公司; 琼脂糖 基因科技(上海)有限公司。

1.2 仪器与设备

CHEF MAPPER™脉冲场凝胶电泳系统 美国Bio-Rad公司; IS4000MM凝胶成像系统 美国Carestream公司; 恒温水浴摇床 德国Mettler公司; Vitek2 Compact微生物鉴定仪、Vitek Colorimeter比浊仪 法国BioMerieux公司。

1.3 方法

参照美国疾病预防控制中心杂志公布的沙门氏菌脉冲场凝胶电泳标准分型方法。

1.3.1 胶块制备

将58株肠炎沙门氏菌和标准菌株H9812分别接种于TSA琼脂平板, 37℃培养14~18h。用无菌棉签取适量细菌, 均匀悬浮于2mL细胞悬浮液中, 用比浊仪调整菌

液浓度为4.3麦氏单位。取200μL细菌悬液于1.5mL离心管中, 加入10μL蛋白酶K溶液(储存液质量浓度为20mg/mL)混匀。再加入200μL熔化的琼脂糖溶液(含1%琼脂糖和1% SDS), 混匀后立即加入一次性模具制胶, 4℃放置5min凝固。

1.3.2 蛋白消化

在50mL聚丙烯螺口盖管上做好标记。每管中加入5mL细胞裂解液, 将凝固好的胶块转入相应标记的螺口管中, 54℃水浴摇床中孵育3h, 转速约170r/min。消化后的模块用50℃纯水洗涤2次, 50℃ TE缓冲液洗涤3次, 每次洗涤15min。

1.3.3 酶切

将消化后的胶块切下2mm薄片, 转入200μL酶切缓冲体系中(含*Xba* I 酶50U), 于37℃酶切3h。

1.3.4 电泳

弃去酶切缓冲液, 将酶切后的胶块置于15孔梳子上, 其中标准菌株H9812于1、5、10和15四个位置放置。缓慢倒入1%的琼脂糖凝胶, 待胶块凝固后, 放入盛有2.2L 0.5×TBE缓冲液的电泳槽中。在14℃、脉冲时间2.16~63.8s条件下电泳19h。电泳结束后, 用GelRed染色20min, 脱色80min, 最后用凝胶成像仪拍摄图像。

1.4 数据分析

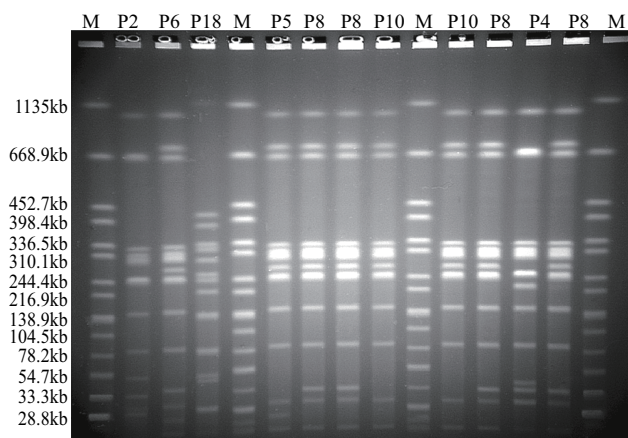
用BioNumerics数据库软件对电泳图像进行数据分析, 得出聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

所有实验菌株均经过Vitek2 Compact微生物检测仪进行生化鉴定和血清学鉴定, 鉴定结果为肠炎沙门氏菌。

2.2 菌株PFGE分型



M. 沙门氏标准菌株H9812; P2、P4、P5、P6、P8、P10、P18分别为不同的PFGE型菌株。

图1 部分肠炎沙门氏菌株PFGE凝胶电泳图

Fig.1 PFGE results for partial *Salmonella enteritidis*

由图1可知, 58株肠炎沙门氏菌菌株基因组DNA片段得到良好分离, 各菌株DNA条带为11~14条, 分子质量最大的片段出现在1400kb位置, 分子质量最小的片段出现在20kb位置。58株沙门氏菌包含18种PFGE型别, 指定为P1~P18型, 各种PFGE型别代表DNA片段数目和大小一致的电泳图谱。其中, P2、P6、P8型为优势型别, 分别占20.7%、10.3%、31.0%, 其余各型各有1~3株不等(表1)。

表1 肠炎沙门氏菌PFGE聚类分析结果
Table 1 Cluster analysis of PFGE patterns of *Salmonella enteritidis*

	型别	酶切后条带数	菌株数量	占总菌数的百分比/%	菌株年份	食品来源国家
第1克隆群	P1	11	3	5.2	2008、2010	美国
	P2	12	12	20.7	2007、2008、2009	美国
	P3	14	2	3.4	2007、2008	美国
	P4	13	1	1.7	2009	中国
	P5	13	2	3.4	2009	中国
	P6	14	6	10.3	2009、2010	中国
	P7	13	1	1.7	2006	中国
第2克隆群	P8	13	18	31.0	2005、2007、2008、2009、2010、2011	中国
	P9	14	1	1.7	2011	中国
	P10	12	3	5.2	2009、2011	中国
	P11	14	1	1.7	2007	中国
	P12	13	1	1.7	2010	中国
	P13	14	1	1.7	2010	中国
	P14	13	2	3.4	2007、2009	中国
	P15	12	1	1.7	2009	阿根廷
	P16	11	1	1.7	2007	阿根廷
	P17	12	1	1.7	2008	美国
	P18	14	1	1.7	2005	中国

2.3 菌株聚类分析结果与菌株来源的关系

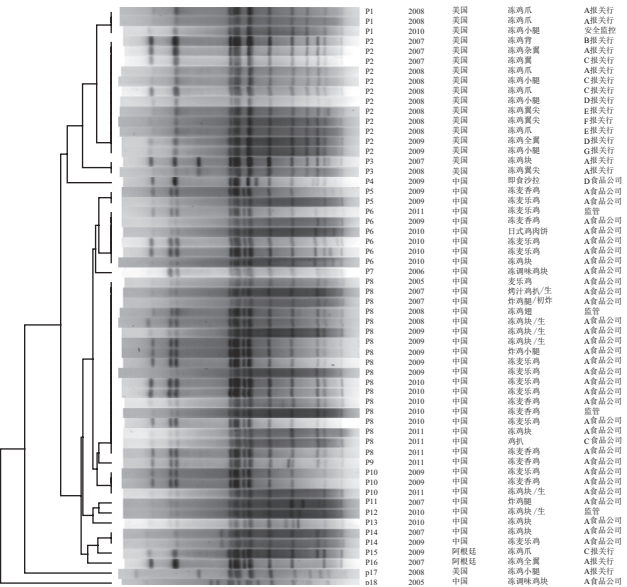


图2 肠炎沙门氏菌PFGE聚类分析结果
Fig.2 PFGE profile of *Salmonella enteritidis*

58株肠炎沙门氏菌分属18种聚类分析图谱。根据菌株图谱类型, 这些菌株有两个明显的大克隆群, 其中图谱类型为P1~P4菌株属于第1克隆群, P5~P16属于第2克隆群(表1、图2)。在每个克隆群内菌株图谱条带的差异均小于3条, 菌株之间具有很近的亲缘关系。P17和P18的相似性分别为84.88%和74.09%, 不属于这两个克隆群。第1克隆群中18株菌株, 其中17株来自美国进口的禽肉食品, 只有1株来自中国的即食沙拉, 相似性为86.85%。第2克隆群中38株菌株, 其中36株来自中国禽肉食品, 其余两株来自阿根廷进口的禽肉食品。图谱结果表明, 第1克隆群内的17株分离株相似性达到91.45%, 第2克隆群内的38株分离株相似性达到91.03%, 属于高度同源。

2.4 菌株分型结果与菌株分离时间的关系

同一年份分离得到的肠炎沙门氏菌表现出不同的PFGE型别(表2), 其中2009年从中国食品中分离肠炎沙门氏菌的PFGE型别最多(7个型别)。2007—2009年从美国进口食品中分离的菌株的优势型别都为P2。自2005年分离到P8型别后, 2007—2011年从中国食品中分离的菌株的优势型别都为P8, 说明在所检的食品中, 这两个型别的肠炎沙门氏菌污染源始终存在。

表2 不同年份肠炎沙门氏菌PFGE的分析结果
Table 2 PFGE analysis of *Salmonella enteritidis* from Chinese and American foods during 2005—2011

年份	食品来源国家	菌株数	PFGE型别	优势型别
2005	美国	0		
	中国	2	P8、P18	
2006	美国	0		
	中国	1	P7	P7
2007	美国	4	P2、P3	P2
	中国	5	P8、P11、P14、P16	P8
2008	美国	11	P1、P2、P3、P17	P2
	中国	2	P8	P8
2009	美国	2	P2	P2
	中国	13	P4、P5、P6、P8、P10、P14、P15	P8
2010	美国	1	P1	P1
	中国	11	P6、P8、P12、P13	P8和P6
2011	美国	0		
	中国	6	P6、P8、P9、P10	P8

3 结论与讨论

本研究对2005—2011年从深圳市进出口食品中所检出的58株肠炎沙门氏菌分离株进行分型分析, PFGE分析结果显示, 58株肠炎沙门氏菌主要包括两个克隆群, 第1克隆群内, 分离自美国进口禽肉的17株肠炎沙门氏菌为遗传紧密相关菌株, 值得注意的是该克隆群内还有1株分离自中国食品中的肠炎沙门氏菌, 但相似度不高, 为

86.85%。第2克隆群内, 38株肠炎沙门氏菌相似性达到91.03%, 菌株间亲缘关系接近。其中, 31株肠炎沙门氏菌分离株均来自中国A食品公司, 在2005—2011年均有分离得到, 提示A食品公司可能存在污染源, 应尽快做出应对措施。另外, 2株自中国公司禽肉分离出的P14型的肠炎沙门氏菌和自阿根廷进口的禽肉中分离出的2株肠炎沙门氏菌相似性达到93%, 有待进一步分析调查。

结合所分离食品的信息, PFGE分析得到的两大克隆群与食品的来源密切相关, 第1克隆群基本由美国进口食品中检出, 第2克隆群基本由中国出口和监管食品中检出, 验证了不同地区食品中分离出的肠炎沙门氏菌的DNA指纹图谱分析的相关性的不同。出入境微生物检测实验室主要从事进出口食品的检测, 分离到的病原菌不仅应保存病原菌的血清型、菌种来源等信息, 建议还应建立其相应的分子指纹图谱, 通过分子指纹图谱的信息分析, 可以进一步确认所检出病原菌的来源, 排除实验室污染的可能, 在敏感的进出口食品贸易争端中提供确凿的实验证据。

基于PFGE方法, 美国和加拿大等国家已建立了细菌分子分型国家电子网络(PulseNet), 通过国际互联网, 在各实验室之间进行病原菌PFGE分子分型指纹图谱的快速传递与比较, 以确定致病菌的亲缘关系, 追溯共同的致病食品源头所在^[12]。中国于2004年已建立了中国病原性细菌分子分型网络(PulseNet China), 但是其中主要收录的是患病人群中的病原菌的DNA指纹图谱^[13-14]。近年来, 我国已逐步开展将PFGE应用于食品中分离得到的致病菌的分析研究^[15-20]。本研究初步建立了深圳进出口食品中的肠炎沙门氏菌分子分型数据库, 但是由于本研究只是局限于深圳口岸进出口食品中所分离到的肠炎沙门氏菌菌株, 数量、食品种类和来源有限, 尚不能据此得出我国不同进出口食品中肠炎沙门氏菌的分子型别特征, 需要在今后分离更多的菌株, 以便从地区分布、时间分布、食品种类分布等多个方面进行多项分子流行病学研究, 建立大型的食源性菌株数据库, 为我国的食源性疾病预防工作服务。同时结合医院中从患病人群中分离的肠炎沙门氏菌分子分型数据库, 以及健康人群体检尤其饮食行业从业人员体检分离株的数据库, 有助于确定肠炎沙门氏菌爆发的潜在源头, 对食源性疾病预防菌株进行有效的溯源和预警。这些分子分型数据库的建立和完善, 以及彼此数据的共同分析应用, 将成为进一步研究的方向。

参考文献:

- [1] 冉陆. 世界卫生组织全球沙门氏菌监测网2001—2005年规划简介[J]. 中国食品卫生杂志, 2001, 13(5): 44-46.
- [2] 李燕俊, 赵熙, 杨宝兰, 等. 肠沙门氏菌脉冲场凝胶电泳分型研究[J]. 卫生研究, 2005, 34(3): 338-340.
- [3] 张东方, 袁飞, 陈颖, 等. 沙门菌分子分型方法研究进展[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(1): 117-119.
- [4] 马俊英, 刘建华, 陈杖榴, 等. 细菌分型的分子生物学技术研究进展[J]. 中国兽医学, 2007, 37(10): 914-918.
- [5] LU P L, CBANG S C, PAN H J, et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the investigation of a nosocomial outbreak of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2000, 33(1): 33-39.
- [6] WONG H C, LU K T, PAN T M, et al. Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34(6): 1535-1539.
- [7] 孙贵娟, 黄彦, 黄纯健, 等. 脉冲场电泳技术在一起鼠伤寒沙门菌食物中毒病原溯源中的应用[J]. 应用预防医学, 2009, 15(5): 259-261.
- [8] 王丽丽, 徐建国. 脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)在分子分型中的应用现状[J]. 疾病监测, 2006, 21(5): 276-279.
- [9] LONG S G, DUPONT H L, GAUL L, et al. Pulsed-field gel electrophoresis for Salmonella infection surveillance, Texas, USA, 2007[J]. Emerging Infectious Disease, 2010, 16(6): 983-985.
- [10] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [11] HUNTER S B, VAUTERIN P, LAMBERT-FAIR M, et al. Establishment of universal size standard, strain for use with the pulse net standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(3): 1045-1050.
- [12] SWAMINATHAN B, BARRETT T J, HUNTER S B, et al. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States[J]. Emerging Infectious Disease, 2001, 7: 382-389.
- [13] 李伟, 崔志刚, 阚飙, 等. 中国细菌性传染病分子分型实验室监测网络-PulseNet China[J]. 疾病监测, 2011, 26(1): 1-4.
- [14] 马宏, 王建丽, 黄丽莉, 等. 伤寒沙门氏菌PFGE基因分型研究[J]. 医药论坛杂志, 2006, 27(19): 4-7.
- [15] 王晓泉. 不同来源多重耐药性沙门氏菌分离株的耐药机制和脉冲场凝胶电泳分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2007.
- [16] 陈太基, 封幼玲. 脉冲场凝胶电泳用于李斯特菌分型及分子流行病学研究[J]. 中国人畜共患病杂志, 2000, 16(1): 90-93.
- [17] 贾静, 毕振旺, 陈玉贞, 等. 山东省食品中单核细胞增生李斯特菌脉冲场凝胶电泳分型[J]. 山东大学学报: 医学版, 2011, 49(8): 153-160.
- [18] 许龙岩, 袁慕云, 刘静宇, 等. 阪崎肠杆菌脉冲场凝胶电泳分型及耐药研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 205-209.
- [19] 贺连华, 吴平芳, 陈妙玲, 等. 食品中副溶血弧菌血清学分型与分子分型的研究[J]. 中国热带医学, 2011, 11(11): 1373-1375.
- [20] 杨保伟, 申进玲, 席美丽, 等. 2007—2008年西安地区鸡肉源沙门氏菌相关性分析[J]. 食品科学, 2011, 32(19): 130-136.