

• 短篇论著 •

农村宴席沙门菌食物中毒脉冲场凝胶电泳溯源及药敏分析*

王文斟¹,李志峰¹,王红¹,赵婷¹,廖春艳¹,代裕露²,王子豪^{1△}

(1. 重庆市疾病预防控制中心, 重庆 400042; 2. 重庆市綦江区疾病预防控制中心, 重庆 401420)

摘要:目的 对引起食物中毒的 21 株沙门菌进行表型分型以确定该菌型别, 并进行脉冲场凝胶电泳分型溯源, 查明事件暴发原因, 了解菌株的耐药状况。方法 21 株沙门菌采用全自动细菌鉴定系统进行生化鉴定, 采用沙门菌属诊断血清对该菌株进行血清学鉴定。对 21 株沙门菌以限制性内切酶 Xba I 酶切后进行脉冲场凝胶电泳, 得到的图谱用生物分析软件 BioNumerics 进行同源性分析, 微量肉汤稀释法对沙门菌进行耐药性检测。结果 本起食物中毒的沙门菌经过生化复核、血清学检测确定为肠炎沙门菌。来源于患者的 15 株肠炎沙门菌和分离至食品的 6 株肠炎沙门菌指纹图谱经 BioNumerics 软件分析具有极高相似性。该肠炎沙门菌对青霉素类的氨苄西林、β-内酰胺类的氨苄西林/舒巴坦、头孢类的头孢唑啉、喹诺酮类的茶啶酸、氨基糖苷类的庆大霉素、大环内酯类的红霉素与阿奇霉素耐药。结论 引起宴席食物中毒的病原为肠炎沙门菌。通过药敏检测发现该菌多重耐药。来源于患者的菌株和食品的菌株有高度同源性, 结合流行病学调查结果判断为餐饮从业人员在加工食品环节中受到肠炎沙门菌污染所致。

关键词:沙门菌; 脉冲场凝胶电泳; 药敏分析**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.17.025**文章编号:**1673-4130(2019)17-2151-03**中图法分类号:**R446.5**文献标识码:**B

2018 年 1 月 17 日, 綦江区疾病预防控制中心接到辖区内某中心卫生院报告, 该院陆续收治了多个腹泻病例, 腹泻患者均参加某镇某村一农户家的宴席后, 出现不同程度腹痛、腹泻、呕吐、发热等症状。疾病预防控制中心相关人员立即开展流行病学调查、现场危害因素调查、卫生学调查和采样工作, 经实验室检测共分离到 21 株生化特性一致的 D1 群沙门菌, 其中 6 株分离至宴席晚餐中的剩余菜品。綦江区疾病预防控制中心将收集到的 21 株 D1 群沙门菌送至重庆市疾病预防控制中心微生物检测所实验室进行菌株生化复核、血清型复核、脉冲场凝胶电泳、药敏检测。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 本次食物中毒分离到 21 株 D1 群沙门菌; 相对分子质量标准菌株为 H9812, 由中国疾病预防控制中心流行病研究所下发。药敏质控标准菌株大肠杆菌 ATCC25922 购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.1.2 培养基及试剂 增菌液、选择性培养基、营养琼脂平板为青岛海博产品; 细菌生化鉴定卡 (GN) 为生物梅里埃产品; 沙门菌属诊断血清为泰国 S&A 产品; 革兰阴性菌药敏检测卡 (CHNMCM2) 为 Ther-

moFisher 产品; 限制性内切酶 Xba I 为 TAKARA 产品, 蛋白酶 K 为上海生工产品, 乙二胺四乙酸、Tris、十二烷基硫酸钠、TBE、Gelred 染料为 Solarbio 产品或代理; 所有试剂耗材均在有效期内使用。

1.1.3 仪器设备 恒温培养箱 (型号: MIR-254) 为松下公司产品; 全自动细菌生化鉴定系统 (型号: Vitek2) 为生物梅里埃公司产品; 全自动药敏检测系统 (型号: 430-A)、二级生物安全柜 (型号: 1300 SE-RIES A2) 为 ThermoFisher 公司产品; 脉冲场凝胶电泳系统 (型号: CHEF-Mapper XA/CHEF-DR III) 及凝胶成像仪 (型号: XRS+) 为 BIO-RAD 公司产品; 比浊仪 (型号: DMtm) 为西门子公司产品; 所有仪器设备均使用正常。

1.2 方法

1.2.1 菌株表型分型 按照 GB4789.4-2016 中的方法进行生化鉴定、血清学试验^[1]。

1.2.2 药敏检测 采用微量肉汤稀释法进行药敏检测, 所使用的商品化 CHNMCM2 革兰阴性菌药敏检测板中包含氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦 (2:1 比例)、四环素等 15 种抗菌药物, 每种抗菌药物有 5~11 个倍比稀释浓度; 同时用标准菌株 ATCC25922 对本次试验进行质量控制。

1.2.3 脉冲场凝胶电泳分型 检测程序按照中国疾

* 基金项目: 重庆市卫生健康委员会医学科研项目 (2017ZDXM003)。

△ 通信作者, E-mail: 47722371@qq.com。

病预防控制中心流行病所致病菌识别网提供的标准程序进行,主要步骤:将培养 18 h 的新鲜菌落制备菌悬液(0.52 透光率),取等体积菌悬液与恒温至 56 ℃ 的 SKG1%琼脂糖混匀,制备成 Plug。将 Plug 置于细胞裂解液,54 ℃ 裂解 1 h,然后用超纯水和 TE 溶液清洗。用限制性内切酶 Xba I 在 37 ℃ 进行酶切 2 h,酶切后的胶块用于脉冲场凝胶电泳。电泳条件:最小相对分子质量为 30 kb,最大相对分子质量为 700 kb (2.16~63.80 s),电压 6 V,转换角度 120°,电泳时间 18.5 h,电泳温度 14 ℃,起始电流强度为 123~125 mA。电泳结束后,Gelred 染料染色 30 min,纯水中脱色 60 min,凝胶成像仪生成指纹图谱保存。

1.2.4 脉冲场凝胶电泳分子分型图谱的聚类分析
使用 BioNumerics 生物分析软件对 21 株沙门菌的指纹图谱进行聚类分析。

2 结果

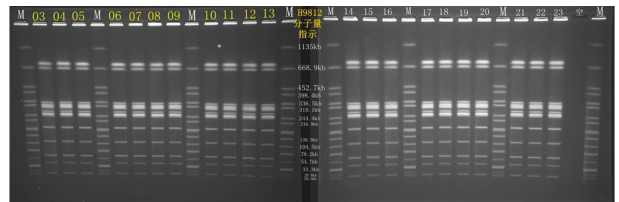
2.1 生化及血清学试验复核结果 21 株 D1 群沙门菌经过全自动细菌鉴定系统鉴定为可信度 98% 的沙门菌属。挑取营养琼脂上的纯培养菌落进行血清凝集试验,实验结果为:A-F 多价+++ ,O9+++ ,O12+++ ,生理盐水对照:-,证实该菌为 D1 群沙门菌。鞭毛抗原没有立即凝集,经过琼脂含量 3% 的半固体琼脂传代以后该菌表达鞭毛抗原:HMB++ ,HG++ ,Hg++ ,Hm++ ,其余血清不凝集。经 Hg、Hm 诱导血清进行相位诱导试验后无第二相出现;根据 Kauffman-Whit 血清分型标准,得出该菌抗原式为:“9, 12 : g, m: -”,判定该沙门菌为肠炎沙门菌。

2.2 药敏检测结果 本次试验标准菌株 ATCC 25922 质控结果均在质控范围内,试验结果有效。21 株肠炎沙门菌耐药谱完全一致,结果判定参照美国临床实验室标准协会(CLSI)出版的药敏试验指南(2018 版)^[2],试验结果见表 1。

表 1 21 株肠炎沙门菌 15 种抗菌药物药敏试验结果

抗菌药物	最低抑菌浓度(μg/mL)	结果判定
氨苄西林	>64	耐药
氨苄西林/舒巴坦(2:1 比例)	64/32	耐药
四环素	2	敏感
红霉素	>64	耐药
氯霉素	8	敏感
头孢唑啉	4	耐药
环丙沙星	0.5	敏感
甲氧苄啶/磺胺甲噁唑	≤0.25/4.75	敏感
头孢他啶	≤1	敏感
亚胺培南	0.5	敏感
萘啶酸	>64	耐药
头孢西丁	4	敏感
头孢噻肟	≤0.25	敏感
庆大霉素	>32	耐药
阿奇霉素	8	耐药

2.3 脉冲场凝胶电泳结果 21 株肠炎沙门菌经过酶切、电泳后产生了 12 条片段条带,见图 1,将指纹图谱导入生物分析软件 Bionumerics,用 UPGMA 进行聚类分析并生成聚类分析图,结果显示 21 株肠炎沙门菌聚类分析相似度为 100%,见图 2。



注:M 为相对分子质量标准菌株 H9812,AB 两图谱之间为 H9812 电泳条带相对分子质量指示;03~17 号泳道为分离至患者的菌株,18~23 号泳道为食品中分离到的菌株

图 1 脉冲场凝胶电泳后生成的指纹图谱

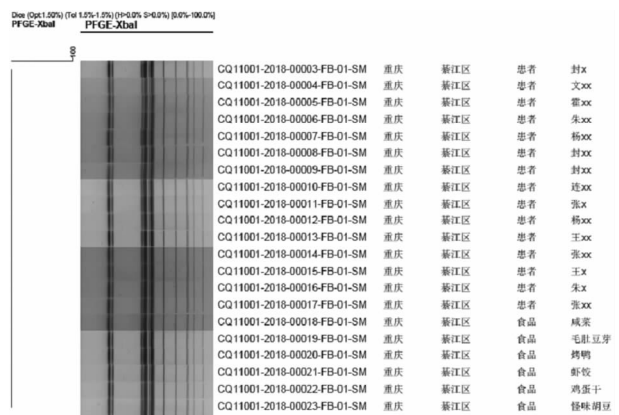


图 2 聚类分析图

3 讨论

沙门菌是世界范围内食源性疾病主要的致病菌之一,其感染所致食物中毒发生数一直居细菌性食物中毒发生数的前 2 位^[3],其中与人类密切相关的有肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌、德比沙门菌等 10 余种。我国发生的食物中毒中由沙门菌引起的占首位,其中肠炎沙门菌感染较为常见^[4],该病主要通过粪-口途径传播,亦可通过污染的肉类、禽蛋类等食物传播。本次食物中毒事件源于綦江区某镇某村村民封某的一起丧宴,由当地“一条龙”餐饮服务公司承办宴席,约 480 人次就餐,累计出现 73 例病例。实验室人员对患者(粪便、肛拭)、剩余菜品、“一条龙”餐饮服务公司从业人员肛拭、市售制作菜品同一批次主要原材料(没有开封的鸡蛋干、烤鸭、虾饺、怪味胡豆等)、自来水、井水等进行检测。从患者粪便、肛拭中分离到 15 株肠炎沙门菌,从不同种类剩余菜品中分离到 6 株肠炎沙门菌;而从从业人员肛拭、制作菜品同一批次主要原材料、自来水、井水未检出沙门菌。食品和患者标本中同时检出肠炎沙门菌,且两者分离的菌株脉冲场凝胶电泳带型一致,从基因上证明了病原的关联性,证实本次食物中毒是食用受肠炎沙门菌污染的菜品所致。从业人员肛拭、制作菜品同一批次主要原材料、自来水、井水未检出沙门菌,可以排除从业人员带菌者污

染和食品原材料被污染的可能性,所以食品加工环节暴露出极大的污染风险。经流行病学调查发现,“一条龙”餐饮服务公司无固定加工场所,餐饮制作多个工序为露天作业,现场操作时生熟未分区,卫生状况差。多个塑料盆放在院内地上作为清洗池,用于蔬菜、生肉类等食材和餐具的清洗加工;加工用水用 10 米左右塑料管从室内自来水管接到塑料盆中,且塑料管出水口长期拖放在地面;大块塑料布铺放于地面存放各类食材、加工用具、餐具等;院内散养了十几只鸡,地面上有淤泥和鸡粪;以上各种原因极易导致加工用具、加工容器、餐具、食材、食品受到外界沙门菌污染。

脉冲场凝胶电泳技术是基于 DNA 结构研究的一种细菌分子分型方法,其原理是在琼脂糖凝胶上加正交的交变脉冲电场,方向、时间、电流大小交替变换,从而将相对分子质量不同大小的 DNA 分子分开,分离到的 DNA 片段较大,谱型稳定,分辨率高、重复性好,因而成为肠炎沙门菌流行病学调查及溯源工作中非常有效的手段^[5-6]。在利用脉冲场凝胶电泳方法对肠炎沙门菌分型的时候有多种内切酶可以选择,限制性内切酶的选择非常重要,多选用 Xba I、Spe I 等,Xba I 的区分能力最好^[7]。本次事件中 21 株肠炎沙门菌通过 Xba I 酶切,应用脉冲场凝胶电泳技术进行分子分型,经电泳产生 12 条 30~700 kb 的条带,指纹图谱经生物分析软件 Bionumerics 分析,聚类分析相似度为 100%。根据菌株同源性判断标准,从基因组的 DNA 水平,提示 21 株肠炎沙门菌为同一克隆菌株,结合流行病学调查表明该起事件是餐饮从业人员在加工食品环节中受到肠炎沙门菌污染所致。

抗菌药物的使用是治疗沙门菌感染的有效办法,但随着抗菌药物的不合理使用,沙门菌属耐药问题越来越严重。尤其是在 20 世纪 90 年代首次出现沙门菌多重耐药菌株 104 型(DT104)^[8],使沙门菌对抗菌药物耐药成为全球共同关注的问题。引起本次事件的肠炎沙门菌经过药敏试验发现该菌对青霉素类的氨苄西林、β-内酰胺类的氨苄西林/舒巴坦、头孢类的头孢唑啉、喹诺酮类的萘啶酸、氨基糖苷类的庆大霉素、大环内酯类的红霉素与阿奇霉素耐药,存在多重耐药现象。近年国内外流行病学分析发现,对喹诺酮敏感性下降或耐药的沙门菌比例呈上升趋势,尤其是非伤寒沙门菌属更为明显^[9]。目前,氟喹诺酮类药物和头孢类药物作为临床治疗沙门菌感染的一线治疗药物,本次事件中的肠炎沙门菌对喹诺酮类萘啶酸耐药表现提示,喹诺酮类药物对沙门菌感染的治疗有可能失效。在一些国家已报道了对氟喹诺酮类药物敏感性降低的沙门菌分离株的出现^[10-11],甚至同时对 3 代头孢菌素、环丙沙星和阿奇霉素耐药的沙门菌菌株在 2014 年被报道^[12]。

在我国农村普遍存在家中办宴席现象,其中大部

分为流水席,这种宴席一般承接人数较多,为此产生了一种承办宴席的服务行业,俗称“一条龙”。“一条龙”餐饮服务一般从业人员较少,但要承担上百人甚至几百人的餐饮服务,在餐饮制作过程中多个工序为露天作业,很多不具备制作大型宴席的条件。在从业服务人员少、食品安全意识淡薄、宴席得不到卫生部门的监管等情况下难以保障食品安全。本起事件有 6 名餐饮从业人员,仅公司负责人 1 人持有健康证明,餐饮服务公司亦无食品安全管理制度、厨师食品安全的培训记录等资料。为预防此类公共卫生事件的发生,卫生行政部门应加强这一领域的监管工作,制订承办家庭宴席食品卫生管理办法,加强对农村宴席、流水席的卫生管理,加大食物中毒防治知识的宣传教育力度。医疗部门在治疗细菌性腹泻中应合理使用抗菌药物,加强细菌的耐药监测,遏制细菌的耐药发展趋势,降低细菌的耐药水平,防止更多、更广谱的耐药菌出现。同时,加强溯源网络实验室建设以保证溯源试验的时效性,使分子溯源技术在暴发疫情、食物中毒等突发公共卫生事件处置中更及时发挥作用。

参考文献

- [1] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品微生物学检验沙门氏菌检验: GB4789. 4-2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing--twenty second informational supplement;M100[M]. Wayne,PA, USA:CLSI,2018.
- [3] CALLAN E, HOEKSTRA R M, ANGULO F J, et al. Foodborne illness acquire in the United States- major pathogens[J]. Emerg Infect Dis,2011,17(1):7-15.
- [4] 朱超,许学斌. 沙门菌属血清型诊断[M]. 上海:同济大学出版社,2009:140
- [5] PANG J C, CHIU T H, HELMUT H, et al. A pulsed field gel electrophoresis study that suggests a major worldwide clone of Salmonella enterica serovar Enteritidis[J]. Int J Food Microbiol,2007,116(3):305-312.
- [6] HEIR E, LINDSTEDT B A, NYGARD I, et al. Molecular epidemiology of Salmonella typhimurium isolates from human sporadic and outbreak cases[J]. Epidemiol Infect, 2002,128(3):373-382.
- [7] LIEHANA E, GARCIA-MIGURA L, BRESLIN M F, et al. Diversity of strains of Salmonella enteric serotype enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting [J]. J Clin Microbiol,2001,39(1):154-161.
- [8] WANG J, LI Y, XU X, et al. Antimicrobial resistance of salmonella enterica serovar typhimurium in Shanghai, China[J]. Front Microbiol,2017,8(2):510.
- [9] 郭仲辉,陈冬雅,黎毓光,等. 脉冲场凝胶电泳和质粒图谱分析人和猪来源德尔卑沙门菌多重耐药株的同源性[J] 中国抗菌药物杂志,2014,(39)10:758-762.

- [10] WEILL F X, GUESNIER F, GUIBERT V, et al. Multi-drug resistance in salmonella enterica serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003) [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 700-708.
- [11] ROTIMI V O, JAMAL W, PAL T, et al. Emergence of multidrug-resistant salmonella spp. and isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Kuwait and the United Arab Emirates [J]. Diagn Microbiol Infect Dis,

2008, 60(1): 71-77.

- [12] WONG M H, YAN M, CHAN E W, et al. Emergence of clinical salmonella enterica serovar Typhimurium isolates with concurrent resistance to ciprofloxacin, ceftriaxone, and azithromycin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(7): 3752-3756.

(收稿日期: 2019-02-18 修回日期: 2019-05-28)

• 短篇论著 •

丝裂霉素 C 抑制 FOXO1 磷酸化调控结直肠癌细胞增殖和活力研究

龙道国, 徐细明[△]

(武汉大学人民医院/湖北省人民医院肿瘤科, 湖北武汉 431900)

摘要:目的 探讨丝裂霉素 C、FOXO1 磷酸化与结直肠癌细胞增殖、活力的关系。方法 选用结直肠癌细胞系 HCT116, PBS 处理的 HCT116 为对照组, 丝裂霉素 C 处理的 HCT116 为丝裂霉素 C 处理组, HA-Foxo1-WT 转染的 HCT116 为 FOXO1-WT 组, HA-Foxo1-MT 转染的 HCT116 为 FOXO1-MT 组, 每组 3 例。通过免疫印迹试验检测 FOXO1 的磷酸化水平, 通过 MTT 试验检测细胞增殖情况, 通过 CCK-8 试验检测细胞活力。结果 与对照组比较, 丝裂霉素 C 处理组的 FOXO1 的总量无明显差异, 但是 S256 位点的磷酸化 FOXO1 的蛋白量明显减少 ($t=4.801, P=0.039$), 结直肠癌细胞 HCT116 的增殖在第 3 天和第 4 天受到明显抑制 ($t=8.023, P=0.016; t=6.814, P=0.021$), 其细胞活力在第 2 天、第 3 天和第 4 天受到明显的抑制 ($t=8.472, P=0.014; t=13.887, P=0.007; t=2.943, P=0.042$)。同时用丝裂霉素 C 处理, FOXO1-WT 组的 HCT116 的增殖在第 2 天和第 3 天均明显小于 FOXO1-MT 组 ($t=4.926, P=0.031; t=7.037, P=0.019$); FOXO1-WT 组 HCT116 的细胞活力在第 3 天和第 4 天均明显小于 FOXO1-MT 组 ($t=14.089, P=0.005; t=13.741, P=0.008$)。结论 丝裂霉素 C 通过抑制 FOXO1 磷酸化来降低结直肠癌细胞的增殖和活力。

关键词: 丝裂霉素 C; FOXO1; 磷酸化; HCT116; 结直肠癌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.17.026

中图法分类号: R735.3

文章编号: 1673-4130(2019)17-2154-04

文献标识码: B

结直肠癌是许多国家发病率和病死率的主要原因, 尽管近年来其发病率在世界发展中国家增加, 但在较发达国家更严重^[1]。目前, 丝裂霉素 C 是最常用于加热腹腔内化疗的化学治疗剂^[2], 是一种具有抗肿瘤活性的天然抗菌药物, 已被用于多种实体肿瘤, 包括乳腺癌、结直肠癌、非小细胞癌和膀胱癌^[3]。WU 等^[4]研究发现, FOXO1 的表达水平和磷酸化水平与结直肠癌细胞的增殖密切相关。SHEN 等^[5]研究发现, 丝裂霉素 C 能调控肿瘤细胞中蛋白的磷酸化水平。本研究旨在探讨丝裂霉素 C、FOXO1 磷酸化与结直肠癌细胞增殖和活力的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 丝裂霉素 C 购自北京百奥莱博科技有限公司(货号: BP1618-KWB)。HA-Foxo1-WT 和 HA-Foxo1-MT 的质粒购自北京中原公司(ADDGNE 货号: # 10693、# 9025)。HA、FOXO1A (phospho S256)、FOXO1A、TUBULIN 抗体购自 Abcam 公司(货号: ab18181、ab131339、ab39670、ab32124)。结直

肠癌细胞 HCT116 购自上海子实生物科技有限公司(货号: Qs101092)。RPMI 培养基购自上海优予生物科技有限公司(货号: lffs1847), 胎牛血清购自赛默飞世尔科技公司(货号: 10099-133)。蛋白酶抑制剂 Cocktail (不含 EDTA, mini 片剂) 购自 Bbimake 公司(货号: B14011)。PBS 购自生工生物工程(上海)股份有限公司(货号: E607008)。青链霉素混合液(100×) 购自北京索莱宝科技有限公司(货号: P1400)。2×十二烷基硫酸钠(SDS)蛋白电泳上样缓冲液购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司(货号: WB-0081)。蛋白裂解液购自碧云天生物技术有限公司(货号: P0013)。NanoFect 转染试剂购自南通柯徕克生物科技有限公司(货号: NF100)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、药物处理和转染 结直肠癌细胞 HCT116 维持在补充有 2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 10% 热灭胎牛血清

[△] 通信作者, E-mail: 78316825@qq.com。