

一起由产气荚膜梭菌引起的聚集性腹泻事件的实验室检测方法及结果分析

苏东霞, 崔玉娟*, 陈艳, 陈静, 赵辉, 赵璐, 张莹

(北京市延庆区疾病预防控制中心, 北京 102100)

摘要: **目的** 通过实验室病原学检测, 分析一起由产气荚膜梭菌引起的聚集性腹泻事件。**方法** 采集此次事件涉及的环境、食品、粪便及肛拭子标本 132 件, 运用多重 PCR 检测方法筛选出目标菌, 针对目标菌进行针对性分离培养, 对分离培养出的菌株进行毒素测定及耐药基因检测。**结果** 在 132 件样本中 24 件食品样本和 39 件环境样本均未检出致病菌, 61 件肛拭子中 22 件样本检出产气荚膜梭菌, 阳性率为 36.1%, 8 件粪便标本均检出产气荚膜梭菌, 阳性率 100%。对 30 株产气荚膜梭菌进行毒素测定, 除 2 株为 C 型, 其余全部为 A 型。对 30 株菌株进行测序, 其耐药基因以肽类及四环素类耐药基因为主。**结论** 此次事件是由 A 型产气荚膜梭菌引起的细菌性聚集性腹泻事件, 综合使用各种检测方法, 可以尽快检出产气荚膜梭菌, 为爆发性事件的分析处理提供参考依据。

关键词: 产气荚膜梭菌 腹泻 多重 PCR 检测 毒素基因 耐药基因

0 引言

气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, CP)是革兰阳性产芽孢专性厌氧杆菌, 该菌广泛存在于土壤、空气、食品、人及动物的肠道中^[1], 是一种条件致病菌, 一般不发病^[2]。由于外在原因, 当它在肠道过度繁殖时, 就会导致腹泻等症状, 能够引起人畜共患的食源性疾病^[3]。产气荚膜梭菌含有 6 种毒素基因(cpa、cpb、etx、iA、cpe 和 cpb2), 根据毒素基因不同分为 A、B、C、D、E 5 个菌型^[4], 其中 A 型是产气荚膜梭菌引起的食物中毒的主要型别。据报道, 产气荚膜梭菌已成为法国和英国食源性疾病暴发的第三常见病因, 在美国高居第二位^[5]。近年来, 我国陆续有产气荚膜梭菌引起的聚集性腹泻的研究报道^[6-8], 本地区未有相关报道。由于产气荚膜梭菌受厌氧培养条件的限制, 在常规检测过程中容易被漏检, 多重 PCR 分子检测技术具有灵敏度高、特异性强、时间短的特点, 可以在检测初期使用, 能够迅速锁定目标菌, 为后续检测工作提供依据。本文通过对样本进行多重 PCR 检测筛查、细菌分离培养、毒素测定及分型、耐药基因检测几个方面的综合研究, 不仅为今后处理类似突发公共事件应急检测提供参考, 而且为防控提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 流行病学调查资料

2022 年 4 月 19 日接到报告, 延庆区两个学校共 52 名学生从 4 月 18 日到 4 月 19 日先后出现腹痛、腹泻、恶心等症状。据调查, 首发病例于 4 月 18 日 12 时 30 分发病, 出现腹痛、腹泻(≥ 3 次/24 h)症状, 末例疑似病例 4 月 19 日 14 时发病, 最短潜伏期 0.5 h, 最长潜伏期 26 h, 这两个学校由同一供餐公司提供午餐。

1.2 样本类型

此次事件共采集 132 件标本, 其中配餐公司及学校环境涂抹 39 件, 病例及厨师肛拭子 61 件, 病例便标本 8 件, 食品样本 24 件。

1.3 主要试剂及仪器

主要仪器: 全自动核酸提取仪(江苏硕世生物科技股份有限公司)、实时荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司)、全自动微生物质谱检测系统(郑州安图生物工程股份有限公司)、全自动微生物鉴定和药敏分析系统(美国 BD 公司 Phoenix™ M50)。

主要试剂: 核酸提取或纯化试剂(江苏硕世生物科技股份有限公司)

基金项目: 北京市延庆区金桥工程种子资金 A 类项目, 项目编号 NO.24001

第一作者: 苏东霞, 副主任技师, 研究方向为微生物检验。

*** 通信作者:** 崔玉娟, 博士, 研究方向为微生物检验。E-mail: cuiyajuan1982@126.com

限公司)、食源性致病菌核酸多重实时荧光 PCR 检测试剂盒(14 种)、5 种常见致腹泻病毒实时荧光 PCR 检测试剂盒、CP 核酸实时荧光 PCR 检测试剂盒、CP 肠毒素(cpe、β2)基因实时荧光 PCR 检测试剂盒、CP 毒素(α、β、ε、ι)基因实时荧光 PCR 检测试剂盒(北京卓诚惠生生物科技股份有限公司)、胰脲-亚硫酸盐-环丝氨酸(TSC)琼脂、液体硫乙醇酸盐培养基(FTG)、含铁牛乳培养基(北京陆桥技术股份有限公司)、血平板(广东环凯技术股份有限公司)、质谱样本预处理试剂(郑州安图生物工程股份有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 病原体初筛

粪便及肛拭子样本使用全自动核酸提取仪提取细菌及病毒 DNA/RNA 核酸,使用食源性致病菌(沙门菌、志贺菌、致泻大肠埃希菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌、空肠弯曲菌、结肠弯曲菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、克罗诺杆菌属、小肠结肠炎耶尔森菌、气单胞菌属、产气荚膜梭菌、单增李斯特氏菌)和 5 种常见致腹泻病毒(诺如病毒、轮状病毒、札如病毒、腺病毒、星状病毒)核酸多重实时荧光定量 PCR 检测试剂按照试剂盒说明书要求对肠道样本核酸进行扩增及结果判读。

1.4.2 细菌分离培养及鉴定

挑取 1 g(黄豆粒)大小粪便标本(水样便 300~500 μL)加入 1 mL 无菌生理盐水稀释后直接接种血平板,环境涂抹及肛拭子样本直接接种血平板,放入(36±1)℃厌氧培养 20~24 h,血平板上产气荚膜梭菌菌落呈乳白色,较扁平,呈现 α 溶血环,典型的产气荚膜梭菌在菌落和 α 溶血环之间形成透明的 β 溶血环

组成典型的双层溶血环。挑取可疑菌落用全自动微生物质谱检测系统进行快速鉴定,并进行镜检及牛乳“爆裂发酵”实验。食品及粪便标本制备成 10⁻¹~10⁻⁶ 个系列的稀释液,每个稀释度各取 1 mL,倾倒入冷却至 50℃ 的 TSC 琼脂混匀,凝固后进行厌氧培养,进行定量检测。

1.4.3 毒力基因检测及分型

将 CP 核酸阳性样本使用全自动核酸提取仪提取细菌 DNA 基因,使用 CP 肠毒素(cpe、β2)及 CP 毒素(α、β、ε、ι)基因实时荧光 PCR 检测试剂盒进行检测,分离出阳性菌株后,对其再次进行毒素测定,通过 α、β、ε、ι 毒素基因进行型别判断。

1.4.4 基因测序

将分离到的 CP 阳性菌株按照细菌 DNA 基因组试剂盒说明书要求进行菌株基因组的提取和分离,经美国 Illumina 公司 HiSeq 平台进行测序。将原始数据通过 fastqc^[9] 和 fastp^[10] 进行质控和数据清洗,获得高质量的数据。再使用 Spades^[11] 对质控后的数据进行拼接和序列校正得到基因组序列。将拼接好的序列与数据库进行比对,得到耐药基因的结果。

2 结果与分析

2.1 肠道样本初筛 PCR 检测结果

69 件肠道标本,5 种致腹泻病毒均未检出,病例肛拭子标本 48 件,检出 CP 阳性 35 件;病例便标本 8 件,检出 CP 阳性 8 件;厨师肛拭子标本 13 件,检出 CP 阳性 11 件。对检出的 54 件 CP 核酸阳性样本进行了 CP 肠毒素检测,检出阳性样本 35 件。具体检出情况见表 1。

表 1 肠道样本初筛 PCR 检测结果

样本分类		样本数量(件)	CP 核酸阳性数(件)	阳性率(100%)	cpe 阳性数(件)	cpe 阳性率(100%)	β2 阳性数(件)	β2 阳性率(100%)
病例	肛拭子	48	35	72.9	26	54.2	0	0
	粪便	8	8	100	8	100	0	0
厨师	肛拭子	13	11	84.6	1	7.7	0	0
合计	—	69	54	78.3	35	50.7	0	0

2.2 细菌分离培养鉴定及定性结果

用全自动微生物质谱检测系统对可疑菌落进行快速分析鉴定。镜检可见革兰氏阳性短粗的杆菌,部分有芽孢。含铁牛乳“爆裂发酵”实验阳性。环境及食品样本共 63 件,未检出 CP;采集厨师肛拭子 13 件,检出 CP 5 件,未检出 cpe;病例样本 56 件,肛拭子 48 件,检出 CP 17 件,其中 1 件检出 cpe,其中 8 件便标本检出 8 件 CP,其中 2 件检出 cpe。其中 3 件便标本的 CP 计数结果大于 1.0×10⁶ CFU/g。详细结果见表 2。

2.3 毒力基因的检测

将分离到的 30 株 CP 菌株进行毒力基因 PCR 检测,结果厨师肛拭子样本 5 件 α 毒素阳性 2 件 β 毒素阳性,病例肛拭子及粪便样本全部 α 毒素阳性,其中 3 株 cpe 基因阳性。通过 CP

毒素 α、β、ε、ι 基因检测结果判定分离到的 30 株产气荚膜梭菌除 2 株为 C 型,其余全部为 A 型。详细结果见表 3。

表 2 细菌分离培养及鉴定结果

样本类型	环境	食品	厨师	病例		合计
			(肛拭子)	肛拭子	便	
件数(件)	39	24	13	48	8	132
CP 阳性数	0	0	5	17	8	30
阳性率(%)	0	0	38.5	35.4	100	22.7
cpe 阳性数	0	0	1	0	2	3

2.4 耐药性检测

采用二代测序技术对 30 株 CP 进行耐药基因检测分析,30 株产气荚膜梭菌均携带多重耐药基因,其中主要有 25 株

携带肽类抗生素耐药基因 *Clostridium perfringens* *mprF*, 占全部的 83.3%, 23 株携带四环素类抗生素耐药基因 *tetA(P)* 占全部 76.7%, 20 株携带四环素类抗生素耐药基因 *tetB(P)* 占全部 66.7%, 12 株携带大环内脂类抗生素耐药基因 *ErmQ* 占全部的 25.0%。其中有 4 株 PE, 耐药性高达 6 类抗生素 10 个基因以上。详细结果见图 1。

表 3 毒力基因检测及分型

菌株编号	菌株来源	毒素基因						型别
		α 毒素	β 毒素	ε 毒素	ι 毒素	肠毒素 cpe	肠毒素 β2	
YQC001	厨师肛拭子	+	+	-	-	-	-	C
YQC002-004	厨师肛拭子	+	-	-	-	-	-	A
YQC005	厨师肛拭子	+	+	-	-	-	-	C
YQC006-011	病例肛拭子	+	-	-	-	-	-	A
YQC012	病例肛拭子	+	-	-	-	+	-	A
YQC013-022	病例肛拭子	+	-	-	-	-	-	A
YQC023-024	病例便标本	+	-	-	-	+	-	A
YQC025-030	病例便标本	+	-	-	-	-	-	A

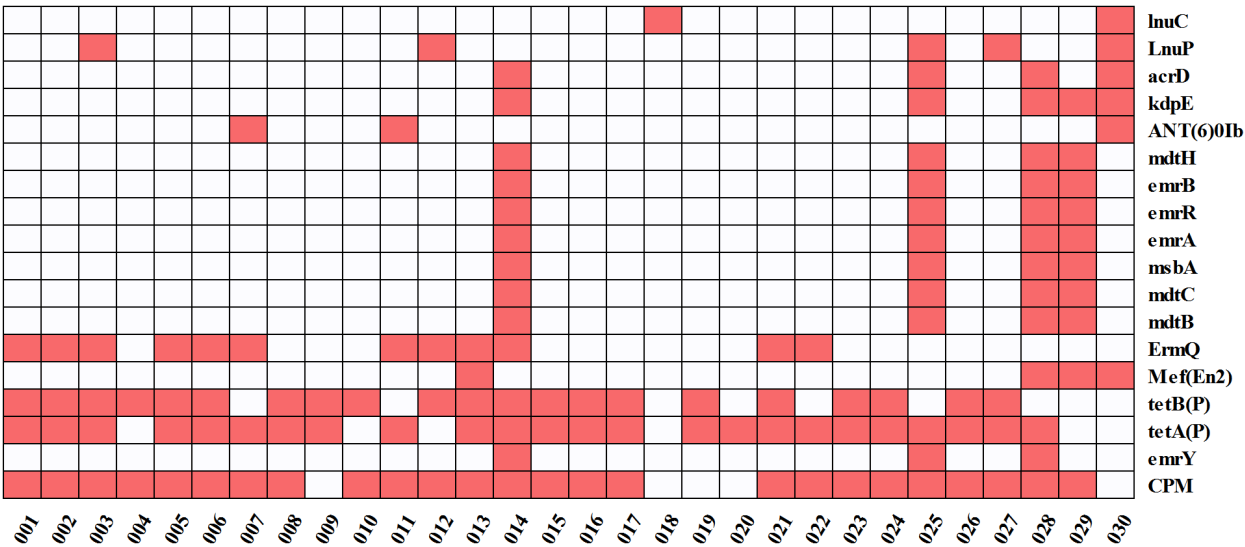


图 1 菌株耐药基因检测情况

3 讨论与结论

此次事件共采集食品、环境涂抹、厨师肛拭子和病例肛拭子及粪便标本 132 件，其中 24 件食品标本和 39 件环境标本均未检出致病菌，厨师肛拭子和病例标本 69 件标本中 30 件检出 CP，剩余食品与环境样本中未检出 CP，可能与未采集到中毒食品和食堂后续环境消毒有关，此次检测未能成功溯源存在遗憾。但是通过患者临床表现、实验室检测结果以及流行病学调查综合分析，可以判定此次事件为一起由产气荚膜梭菌引起的聚集性腹泻事件。此次事件在检测初期应用多重 PCR 分子检测技术进行初筛^[12-14]，尽快找到目标菌进行针对性的细菌分离培养，最终培养结果与初筛结果一致。多重 PCR 分子检测技术的应用与传统方法^[2]相比不仅有效地提高了检测时限，降低了工作量，同时避免了漏检现象的发生^[15]。近年来食物中毒的主要致病因子为沙门氏菌、副溶血性弧菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色

葡萄球菌及肠毒素、致泄大肠埃希氏菌等，此类致病菌均为常规检测，CP 由于其生长需要厌氧条件培养，常规条件无法生长，因此容易被漏检。

本次事件检测过程中，对原始肛拭子及粪便样本直接进行分子生物学检测结果与培养后检测的结果相比，PC 阳性率及携带 *cpe* 毒素基因的 PC 阳性率均有所下降，尤其是 *cpe* 毒素基因的检出率大幅下降，在细菌分离培养后阳性率及携带 *cpe* 毒素基因的阳性率大幅降低的原因有待商榷^[16]。对分离到的 30 株 CP 阳性菌株进行分型，除 2 株菌为 C 型，其余全部为 A 型。这与 A 型和 C 型产气荚膜梭菌与人致病性相关的文献报道相符合^[17-19]。

本次事件检出的菌株进行耐药基因检测后发现大多数菌株含有肽类、四环素类抗生素耐药基因，少数菌株含有大环内脂类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类等抗生素的耐药基因，与闫爱霞等^[20]研究相似。近年来，由于牲畜中抗生素的不受控制使用，产气荚膜梭菌耐药性问题逐渐显露出来并且日趋严重，已成为

潜在的公共卫生问题^[21-23],CP耐药基因的研究对于临床用药具有重要意义。

本次检测从采用多重PCR检测技术进行致病菌快速初筛找到目标菌,到细菌分离培养鉴定、毒素基因测定及分型,再到耐药基因测序一系列实验,将分子生物学与细菌培养方法相结合,能够增大致病菌覆盖面避免漏检现象的发生,尽快发现致病因子进行针对性培养,节约人力物力,为今后处理同类事件提供新的思路和方向。同时耐药基因的检测为临床用药提供参考。

参考文献

- [1] RAYMOND K, HALL LJ. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens* [J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(01): 141.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 产气荚膜梭菌食物中毒诊断标准及处理原则: WS/T7—1996 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- [3] STAGNITTA PV, MICALIZZI B, DE GUZMÁN AM. Prevalence of some bacteria yeasts and molds in meat foods in San Luis, Argentina [J]. Cent Eur J Public Health, 2006, 14(03): 141-144.
- [4] 中华人民共和国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产气荚膜梭菌检验: GB4789.13—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [5] BRYNESTAD S, GRANUM PE. *Clostridium perfringens* and foodborne infections [J]. Int J Food Microbiol, 2002, 74(03): 195-202.
- [6] 付萍, 刘志涛, 梁骏华, 等. 2014年中国大陆食源性疾病暴发事件监测资料分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(06): 628-634.
- [7] 付萍, 王连森, 陈江, 等. 2015年中国大陆食源性疾病暴发事件监测资料分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(01): 64-70.
- [8] 韩海红, 寇柏洋, 马洁, 等. 2018年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(04): 822-829.
- [9] DE SENA BRANDINE G, SMITH AD. Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data [J]. F1000Res, 2019, 8: 1874.
- [10] CHEN S. Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp [J]. iMeta, 2023: e107.
- [11] PRJIBELSKI A, ANTIPOV D, MELESHKO D, et al. Using SPAdes De Novo Assembler [J]. Curr Protoc Bioinform, 2020, 70(01): e102.
- [12] 程春荣, 周鹏, 戴蕾, 等. 一起疑似产气荚膜梭菌食物中毒事件的实验室检测分析 [J]. 疾病监测, 2022, 37(08): 1124-1127.
- [13] 刘海波, 王云霞, 刘颖, 等. 一起由产气荚膜梭菌引起的聚集性腹泻事件的病原学分析 [J]. 江苏预防医学, 2023, 34(04): 469-478.
- [14] 张晓媛, 刘玉竹, 张鹏航, 等. 一起疑似产气荚膜梭菌食物中毒事件的病原学分析 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 6022-6026.
- [15] 赵凤玲, 高翔, 邹林, 等. 2022年北京市一起产气荚膜梭菌引起的食源性疾病暴发事件病原学分析 [J]. 疾病监测, 2024, 39(03): 382-387.
- [16] 李颖, 李长青, 王彦波, 等. 一起由C型产气荚膜梭菌引起的食源性致病因子检测 [J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(23): 3379-3381.
- [17] NAKANO V, IGNACIO A, LLANCO L, et al. Multilocus sequence typing analyses of *Clostridium perfringens* type A strains harboring tpeL and netB genes [J]. Anaerobe, 2017, 44: 99-105.
- [18] SARKER MR, SINGH U, MCCLANE BA. An update on *Clostridium perfringens* enterotoxin [J]. J Nat Toxins, 2000, 9(03): 251-266.
- [19] BA-THEIN W, INUI S, SHIMIZU T, et al. Genomic diversity in the pfoA region of theta-toxin-deficient strains of *Clostridium perfringens* [J]. Microbiol Immunol, 1997, 41(08): 629-631.
- [20] 闫爱霞, 潘艳艳, 康颖, 等. 基于全基因组测序分析一起产气荚膜梭菌导致的腹泻暴发事件 [J]. 中国人兽共患病学报, 2024, 40(08): 758-762.
- [21] 钟佳鑫, 王媛媛, 白璐璐, 等. 山东某地区产气荚膜梭菌的分子型别与耐药特征 [J]. 中国抗生素杂志, 2023, (09): 183-187.
- [22] VERMA AK, ABDEL-GLIL MY, MADESH A, et al. Multilocus sequence typing of *Clostridium perfringens* strains from neonatal calves, dairy workers and associated environment in India [J]. Anaerobe, 2020, 63: 102212.
- [23] SÁRVÁRI KP, SCHOBLOCHER D. The antibiotic susceptibility pattern of gas gangrene-forming *Clostridium* spp. clinical isolates from South-Eastern Hungary [J]. Infect Dis (Lond), 2020, 52(03): 196-201.