

现代实用医学实验技术丛书

SHIYUANXING
BINGYUANSHEGWU
JIANCE JISHU

食源性病原生物 检测技术

姜昌富 黄庆华 主编
湖北科学技术出版社

现代实用医学实验技术丛书

食源性病原生物检测技术

主 编:姜昌富 黄庆华

副主编:邱长源 华安龙 孙锡斌

编 者(以姓氏笔画为序):

甘 燕	石长华	朱晓华	华安龙
孙昌华	孙锡斌	时红波	邱长源
罗宇良	吴世俊	姜昌富	姜玲黎
胡 媛	黄庆华	龚新国	雷家慧
潘 虹	熊延彬	谢茂慧	魏兰英

湖北科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

食源性病原生物检测技术/姜昌富,黄庆华主编.

—武汉:湖北科学技术出版社,2003.4

ISBN 7-5352-2961-1/R·670

I.食… II.①姜… ②黄… III.病原微生物 检测 IV.R37

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 106949 号

现代实用医学实验技术丛书
食源性病原生物检测技术

© 姜昌富 黄庆华 主编

策 划: 冯友仁
责任编辑:

封面设计: 王 梅

出版发行: 湖北科学技术出版社
地 址: 武汉市武昌黄鹂路 75 号

电话: 86782508
邮编: 430077

印 刷: 中国科学院武汉分院科技印刷厂
督 印: 刘春尧

邮编: 430071

787mm×1092mm
2003 年 4 月第 1 版

16 开

19.75 印张

486 千字

2003 年 4 月第 1 次印刷

印数: 0 001—2 300
ISBN 7-5352-2961-1/R·670

定价: 35.00 元

本书如有印装质量问题 可找承印厂更换

《现代实用医学实验技术丛书》

编辑委员会

屈 伸	沈关心	王淳本
刘能保	姜昌富	吴雄文
黄庆华	余从年	梁智辉

丛书策划

冯友仁

前 言

全球食源性疾病已导致了亿万人发病和死亡,至今其发病率和死亡率仍呈居高不下趋势,在严重危害人类健康的同时也给世界经济带来了巨大损失。鉴此,建立有效的食品安全体系,完善其评估标准已被纳入 WHO 的行动议程。然而,迄今为止还没有一本关于检测食源性疾病病原体的技术专著。《食源性病原生物检测技术》一书旨在阐述食源性疾病病原生物的检测方法,为建立、健全食源性疾病的监测、预防和控制体系提供技术参考。

全书共分绪论、食源性病原生物分类、病原学检测技术、生物化学试验技术、免疫学检测技术、分子生物学检测技术、生物物理学测试技术和动、植物检疫等八章。其内容系统全面,不仅包括病原生物标本制作、显微镜检、分离培养、生化试验和动物试验等传统病原生物学检测方法,而且涵盖了免疫标记、多聚酶链式反应、核酸分子杂交、生物芯片以及噬菌体展现等多种现代免疫学和分子生物学检测技术。

编者在编写此书时注重了内容的科学性、技术性、实用性和可操作性。因此,该书是医学研究、临床检验、畜牧兽医、动植物检疫、海关检疫和高等医药(农学)院校相关专业的教学科研人员、研究生等人员必备且具有较高实用价值的专业参考书。

本书总结了诸位编者多年的实践经验,力求实验原理、操作步骤和资料数据等内容准确无误,但由于食源性疾病病原生物检测技术发展迅速,再加上受个人视野以及各自专业局限性的影响,如有不够全面或错误之处,敬请广大读者斧正,提出宝贵修改意见,以臻完善。

姜昌富

2003 年 3 月于华中科技大学同济医学院

目 录

第一章 绪 论

一、食源性疾病·····	(1)	四、食源性疾病对人类的危害·····	(2)
二、食源性病原生物·····	(1)	五、食源性疾病的控制对策与 展望·····	(3)
三、动、植物携带的食源性病原 生物·····	(2)		

第二章 食源性病原生物分类

第一节 病毒·····	(5)	十一、炭疽芽胞杆菌·····	(27)
一、轮状病毒·····	(5)	十二、耶尔森菌属·····	(28)
二、肠道腺病毒·····	(6)	十三、气单胞菌属和邻单胞 菌属·····	(29)
三、杯状病毒·····	(7)	十四、蜡样芽胞杆菌·····	(30)
四、星状病毒·····	(7)	十五、空肠弯曲菌·····	(31)
五、脊髓灰质炎病毒·····	(8)	十六、土拉弗菌·····	(32)
六、柯萨奇病毒和埃可病毒·····	(9)	十七、椰毒假单胞菌酵米面 亚种·····	(33)
七、甲型肝炎病毒·····	(9)	十八、单核细胞增生李斯特 氏菌·····	(34)
八、戊型肝炎病毒·····	(11)	十九、结核分枝杆菌·····	(35)
九、口蹄疫病毒·····	(11)	第三节 真菌·····	(36)
十、疯牛病病毒·····	(13)	一、曲霉菌属·····	(36)
第二节 细菌·····	(13)	二、青霉菌属·····	(38)
一、大肠埃希菌·····	(13)	三、镰刀霉菌属·····	(39)
二、志贺菌属·····	(15)	四、毒菌·····	(40)
三、沙门菌属·····	(16)	第四节 原虫·····	(41)
四、变形杆菌属·····	(18)	一、刚地弓形虫·····	(41)
五、葡萄球菌·····	(19)	二、肉孢子虫·····	(42)
六、霍乱弧菌·····	(20)	三、贝氏等孢子虫·····	(43)
七、副溶血性弧菌·····	(22)	四、微孢子虫·····	(43)
八、产气荚膜梭菌·····	(23)		
九、肉毒梭菌·····	(24)		
十、布鲁菌·····	(26)		

五、人芽囊原虫	(44)	四、牛带绦虫	(54)
六、隐孢子虫	(44)	五、细粒棘球绦虫	(54)
七、溶组织内阿米巴	(45)	六、多房棘球绦虫	(55)
八、蓝氏贾第鞭毛虫	(45)	七、微小膜壳绦虫	(56)
九、结肠小袋纤毛虫	(46)	八、缩小膜壳绦虫	(56)
第五节 吸虫	(46)	第七节 线虫	(56)
一、卫氏并殖吸虫	(46)	一、旋毛虫	(56)
二、斯氏狸殖吸虫	(48)	二、东方毛圆线虫	(57)
三、布氏姜片吸虫	(48)	三、广州管圆线虫	(58)
四、华支睾吸虫	(49)	四、异尖线虫	(58)
五、肝片形吸虫	(50)	五、棘颚口线虫	(59)
六、异形吸虫	(50)	六、蛔虫	(59)
七、棘口吸虫	(51)	七、鞭虫	(60)
第六节 绦虫	(52)	八、蛲虫	(60)
一、曼氏迭宫绦虫	(52)	九、猪巨吻棘头虫	(60)
二、阔节裂头绦虫	(52)	第八节 节肢动物	(61)
三、猪带绦虫	(53)		

第三章 病原学检测技术

第一节 病原体分离培养与 接种技术	(62)	五、鞭毛染色法	(95)
一、消毒与灭菌技术	(62)	六、芽胞染色法	(95)
二、培养基的制备技术	(64)	七、布鲁菌柯兹罗夫斯基 染色法	(96)
三、病原体培养技术	(80)	八、墨汁染色法	(96)
四、动物接种与感染技术	(87)	九、Fontana 镀银染色法	(96)
第二节 检测标本制作技术	(90)	十、乳酸酚棉蓝染色法	(96)
一、标本采集	(90)	十一、墨汁硫堇染色法	(97)
二、标本固定	(90)	十二、姬氏染色法	(97)
三、标本染色	(92)	十三、瑞氏染色法	(97)
四、标本脱水	(92)	十四、瑞氏与姬氏复合染色	(98)
五、标本透明	(92)	十五、碘染色法	(98)
六、标本封固	(92)	十六、金胺 - 酚染色法	(98)
第三节 病原体染色技术	(93)	十七、卡红染色法	(98)
一、革兰染色法	(93)	十八、苏木素染色法	(99)
二、萼 - 纳抗酸染色法	(94)	十九、伊红染色法	(100)
三、结核杆菌金胺“O”染色法	(94)	第四节 组织活检技术	(101)
四、荚膜染色法	(95)	一、穿刺活检法	(101)

二、压片活检法····· (101)	一、显微镜····· (102)
第五节 显微镜检测技术····· (102)	二、常用检测方法····· (103)

第四章 生物化学试验技术

第一节 糖发酵试验····· (107)	第十八节 耐热核酸酶的测定····· (112)
第二节 靛基质试验····· (107)	第十九节 噬菌体分型····· (112)
第三节 甲基红试验····· (107)	第二十节 卵磷脂酶试验····· (112)
第四节 V-P 试验····· (108)	第二十一节 脂酶试验····· (113)
第五节 枸橼酸盐利用试验····· (108)	第二十二节 大肠埃希菌耐热肠毒素
第六节 硫化氢试验····· (108)	(ST)的检测····· (113)
第七节 快速 MUG 试验····· (108)	第二十三节 大肠埃希菌不耐热肠毒素
第八节 EaggEC 细胞粘附试验	(LT)检测法····· (113)
(CVD 法)····· (109)	第二十四节 产气荚膜梭菌毒力
第九节 尿素分解试验····· (109)	试验····· (113)
第十节 霍乱红试验····· (109)	第二十五节 马尿酸水解试验····· (114)
第十一节 嗜盐性试验····· (109)	第二十六节 氧化酶试验····· (114)
第十二节 明胶液化试验····· (109)	第二十七节 触酶试验····· (114)
第十三节 葡萄球菌凝固酶试验····· (110)	第二十八节 Hela 细胞侵袭试验····· (114)
第十四节 胆汁溶菌试验····· (110)	第二十九节 反向被动血凝试验····· (115)
第十五节 Optochin(乙基羟基奎宁盐	第三十节 豚鼠角膜结膜试验(Sereny)
酸盐)敏感试验····· (110)	····· (115)
第十六节 菊糖发酵试验····· (110)	第三十一节 氧化-发酵试验(OF 试验)
第十七节 葡萄球菌肠毒素检测····· (111)	····· (115)

第五章 免疫学检测技术

第一节 检测抗原制备技术····· (117)	三、免疫固定电泳····· (131)
第二节 检测抗体制备技术····· (118)	四、交叉免疫电泳····· (131)
一、多克隆抗体制备技术····· (118)	第五节 免疫微粒技术····· (132)
二、单克隆抗体制备技术····· (120)	一、胶乳凝集试验····· (132)
第三节 免疫凝集试验····· (125)	二、乳胶免疫测定法····· (133)
一、直接凝集试验····· (125)	三、免疫磁性微粒分离与纯化技术
二、间接凝集试验····· (126)	····· (133)
第四节 免疫电泳技术····· (129)	第六节 免疫荧光技术····· (133)
一、对流免疫电泳····· (129)	第七节 放射免疫技术····· (137)
二、火箭免疫电泳····· (130)	第八节 免疫酶技术····· (139)

一、酶标抗体制备技术·····	(140)	二、亲合素标记技术·····	(153)
二、酶联免疫吸附试验·····	(143)	第十节 免疫金技术·····	(155)
三、斑点酶联免疫吸附试验·····	(145)	一、胶体金制备技术·····	(155)
四、斑点酶免疫渗滤试验·····	(146)	二、胶体金标记技术·····	(157)
五、酶联免疫印迹技术·····	(146)	三、斑点免疫金银染色法·····	(159)
第九节 生物素-亲合素标记技术		四、斑点金免疫渗滤测定法·····	(159)
·····	(151)	第十一节 免疫层析测定技术·····	(160)
一、生物素标记技术·····	(151)		

第六章 分子生物学检测技术

第一节 聚合酶链反应(PCR)		(核酸探针技术)·····	(199)
技术·····	(162)	第三节 噬菌体表面呈现技术·····	(201)
第二节 核酸分子杂交技术·····	(165)	一、噬菌体生物学特性·····	(202)
一、探针的种类及其选择·····	(165)	二、噬菌体表面呈现技术的建	
二、核酸探针标记·····	(166)	立与发展·····	(202)
三、探针与靶核酸的杂交·····	(180)	三、噬菌体肽库·····	(202)
四、杂交信号检测·····	(196)	四、噬菌体抗体库·····	(207)
五、核酸探针杂交新技术·····	(197)	第四节 细菌质粒指纹图谱分析·····	(215)
六、病原体的基因诊断			

第七章 生物物理学测试技术

第一节 气相色谱方法·····	(220)	三、热裂解气相色谱技术·····	(222)
一、细菌全细胞脂肪酸分析		第二节 电子显微镜技术·····	(223)
技术·····	(220)	一、透射电子显微镜技术·····	(223)
二、细菌全细胞单糖成分分析		二、扫描电子显微镜技术·····	(226)
技术·····	(222)		

第八章 动、植物检疫及其食品检验

第一节 动、植物携带的食源性病原		二、观(玩)赏动物(野生动物)携带的	
生物·····	(227)	食源性病原生物·····	(229)
一、家畜携带的食源性病原		三、禽鸟类携带的病原生物·····	(231)
生物·····	(227)	四、植物携带的病原生物·····	(231)

五、药用食品携带的病原生物····· (232)	二、食品病原生物学检验····· (237)
第二节 动、植物检疫及其食品的检疫	第四节 食源性疾病控制与管理····· (243)
检验目的与内容····· (232)	一、国际有关食品卫生法规····· (243)
一、疫源检索检验····· (232)	二、国内有关食品卫生法规····· (246)
二、国境口岸检疫检验····· (234)	三、食品安全卫生控制的现代先进
第三节 食品病原生物检测····· (235)	方法····· (252)
一、食品卫生微生物学检验····· (235)	
附录 常用化学试剂及配方····· (256)	

第一章 绪 论

过去的几年,食源性疾病导致了全球亿万人发病和死亡。至今,食源性疾病仍然呈不断上升趋势,通常累及儿童、孕妇、老年人和某些疾病患者,不仅危害人们的身体健康,而且严重影响个人、家庭、社会、商业及整个国家的经济利益,同时增加了保健体系的负担,已成为一个重要的公共卫生和公共健康问题,引起了各国政府和有关专家学者的极大关注。

一、食源性疾病

(一)食源性疾病的概念

供人类食用或者饮用的成品、原料以及既可食用或者饮用又是药品(不包括以治疗为目的)的物品,称为食品。如肉与肉制品、乳与乳制品、蛋与蛋制品、水产品、饮料、瓜果和蔬菜制品等。

食品是人类赖以生存的能源和发展的物质基础,其卫生状况的好坏,直接关系到人体的生命健康。如果食品受到包括病原生物在内的各种有害因子的污染,并会导致各种肠道传染病、食物中毒或人畜共患病等食源性疾病,损害人体健康,甚至危及生命和殃及子孙。

由致病因子通过污染食物、水源或者动植物食品内含有的病原体等进入人体引起的食物中毒或疾病,称食源性疾病(foodborne disease)。

(二)食源性疾病流行的主要因素

(1)生物因素:有害生物是导致食源性疾病的主要因素。过去几十年,全球因进食被沙门氏菌、空肠弯曲菌、大肠杆菌等污染食品而引起的食源性疾病的发病率居高不下;发达国家每年约有 1/3 的人患食源性疾病,美国每年约有 7 600 万例食源性疾病患者,其中 325 000 人入院治疗,5 000 人死亡。

(2)化学因素:有害化学物质是导致食源性疾病的重要因素。食品中的有害化学物质包括天然有毒物质(如霉菌毒素、海洋类毒素)、环境污染物如汞、铅、二恶英和天然植物毒素(如马铃薯中的龙葵素)等;食品添加剂、营养素、农药和兽药残留物等。

(3)社会因素:食品生产模式及饮食方式的改变、消费者中对食源性病原菌易感人群的增加、食品流通的广泛性、发展中国家对肉、禽的需求量增加等。由活牛及其肉骨饲料的输出,而引起疯牛病(牛海绵状脑 BSE 的俗称)的流行即为一例,它可传染给人类而引发人类克雅病(CJD)。

二、食源性病原生物

食品加工过程中即使原料新鲜,由于多种原因(如原料积压、工艺不合理、卫生消毒不严、生产环境不洁以及操作人员带菌等),也有可能不同程度地污染各种微生物。特别是以体内或体外携带病原生物的动植物生产出来的食品,往往也会带有病毒、病菌或寄生虫等。被病原生物感染或污染了的食用动植物及其食品以及饮料、水和调料等均可成为传染源。所以,食源性病原生物是导致食源性疾病的主要原因之一。

(一)食源性病原生物的概念

食品是人类生物性致病因子(即微生物和寄生虫)的主要暴露源。这些暴露于食物、水源或者肉类食品的生物性致病因子,称食源性病原生物(foodborne biologic pathogen)。

(二)食源性病原生物的种类

90%的重大食物传播疾病是由大约 30 种病原生物引起的,如各种病毒、细菌、真菌、原虫、吸虫、绦虫、线虫和昆虫等。其中人兽共患病(zoonoses)的病原生物有口蹄疫、新城疫、沙门氏菌属、弯曲杆菌属、李斯特氏杆菌、大肠杆菌各类菌株和多种寄生虫等。

有高百分比的貌似健康的动物,其相关器官也匿藏着各种病原生物,例如从牛、猪和马的肌肉、肺、肝、肾、睾丸、皮肤、血液和肠道中能分离出肠道病毒、轮状病毒、牛病毒性腹泻病毒、肉孢子虫、弓形虫、猪囊尾蚴、牛囊尾蚴、裂头蚴、肝吸虫、肝片吸虫、棘口吸虫、旋毛虫等。由这些健康带菌(虫)动物制成的食品亦可导致食源性疾病。

三、动、植物携带的食源性病原生物

(一)动物携带的食源性病原生物

动物(包括食用动物和野生动物),如牛、马、羊、猪、狗、兔、鸡、鸭、鹅、鱼、虾、蟹、贝、龟、蛇和蛙等,均可感染或者携带有多种食源性病原生物,其种类有:

(1)病毒:狂犬病毒、牛痘病毒、口蹄疫病毒、疱疹病毒、乳多空病毒、细小病毒、呼肠弧病毒、粘液瘤病毒、副粘液瘤病毒、肠道病毒、冠状病毒、轮状病毒、牛病毒性腹泻病毒、反转录病毒等。

(2)细菌:结核杆菌、布氏菌、沙门氏菌、大肠杆菌、炭疽杆菌、魏氏梭杆菌、弧菌、葡萄球菌等。

(3)真菌(霉菌):镰刀菌、曲霉菌、隐球菌、钱癣菌等。

(4)原虫:弓形虫、肉孢子虫、隐孢子虫等。

(5)吸虫:肝片吸虫、肝吸虫、肺吸虫、棘口吸虫等。

(6)绦虫:无钩绦虫囊虫、有钩绦虫囊虫、粗颈绦虫、裂头绦虫和棘球绦虫等。

(7)线虫:蛇形毛圆线虫、肠结节线虫、鞭虫、蛲虫、旋毛虫、广州管圆线虫、棘颚口线虫等。

(8)昆虫:蝇蛆、螨等。

(二)植物携带的病原生物

食用植物(包括各类粮食、蔬菜、瓜、果和多种水生植物)可携带或污染有上述多种病原微生物;还可携带肝片吸虫和姜片吸虫等寄生虫。

四、食源性疾病对人类的危害

有关资料表明,全球每年有近 15 亿人有食源性疾病最常见的腹泻症状,其中 70% 是食品生物性污染引起的,结果造成每年有 3 百万 5 岁以下儿童死于腹泻(主要是在发展中国家)。

1987 年,上海市暴发甲肝,其原因就是食用了被甲型肝炎病毒污染的毛蚶;2 000 年的法国肉制品被李氏杆菌污染导致 7 人死亡、日本雪印牛奶被金黄色葡萄球菌污染导致多人中毒,2002 年俄罗斯暴发痢疾流行导致 2 000 余人发病,原因就是食用了被痢疾杆菌污染的牛奶所致,等等;在许多工业化国家里,最近几十年中,已检测到诸如沙门氏菌病、弯曲杆菌病和大肠杆菌 0157 感染等多种食源性疾病,且呈上升的发病趋势,据估计,每年有 30% 的人口可能患食

源性疾病。

食品污染现在被认为是霍乱和其他传染性腹泻流行的重要流行病学因素。食源性寄生虫病(foodborne parasitic disease)也是食源性疾病中的一个重要问题。1999年,全球4千万人感染了食源性吸虫病,这意味着超过世界人口10%的人有感染食源性寄生虫病的危险。

食源性疾病除带给患者痛苦外,对许多国家的经济损失则数以亿计。特别是以农业为基础经济的发展中国家,由于进口国拒绝污染物超标的食品而造成外贸损失已成为严重问题。同时,一个国家如果被认为食品安全存在问题,其旅游业也会遭到冲击。由于没有或不能充分利用适当存储和(或)加工工艺造成的丰收后粮食的损失,使以上问题更加严重。

五、食源性疾病的控制对策与展望

(一)建立、健全食品安全体系

目前,全球的食品安全问题不容乐观的一个重要原因就是食源性疾病的不断上升。为了转变由于摄入不安全食品导致患病数和死亡数上升的趋势,联合国粮农组织和世界卫生组织以及世界各国都把食品安全卫生放在突出位置,采取了新的行动和举措。要求加强食源性疾病的监测体系、改进危险性评价的方法、创建食品安全性的评价新技术、提高WHO在法典中的科学和公共卫生作用、加强对危险因素的宣传和宣传、增进国际、国内协作和加强发展中国家食品安全职能部门的建设。

(二)食源性病原生物的检测

(1)传统检测方法的改进和应用。病原生物标本制作、显微镜检、分离培养、生化试验和动物试验等传统病原生物学检测方法的改进和应用,仍然是检测食源性病原生物和食品危险性评价最基本的方法。

(2)现代检测新技术的创建与应用。

1)免疫标记技术:以荧光、酶、胶体金等标记已知的多克隆或单克隆抗体,用该标记抗体检测标本中有无相应抗原的技术。

2)免疫印迹技术(immunoblot or Western blot):由SDS-PAGE、电泳转印、免疫标记技术结合而成的技术,可用于分析病原生物的蛋白质抗原。

3)多聚酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR):能在体外经数h即可将某一基因或其片段的分子进行数百万倍扩增,具有快速、灵敏和特异性强等特点的分子生物学技术已用于细菌、病毒、寄生虫的病原学诊断。

4)核酸分子杂交技术:应用已知的特异性DNA寡核苷酸或一定长度的DNA片段作为探针,检测标本中有无相应的DNA片段。如检测DNA的southern杂交、检测RNA的northern杂交以及原位杂交等技术。

5)生物芯片技术:DNA芯片又称基因芯片,是指将大量DNA探针固定于体积极小的支持物上,然后与标记的标本进行杂交,通过检测杂交信号的强弱来判断标本中有无靶分子及其数量。蛋白质芯片的原理与DNA芯片相似,但固定在支持物上的是抗体或多肽配体,然后检测标本中有无相应的标记抗原或受体。前者可用于病原生物核酸的检测,后者可用于病原生物蛋白质表达产物的检测。

6)噬菌体展现技术:噬菌体表面呈现技术是一种噬菌体表面表达筛选技术。利用该技术构建的噬菌体肽库、抗体库、cDNA文库、重组DNA文库可广泛应用于多个领域,包括抗原表位

的定位、分子间识别的研究、人工抗体和疫苗的制备等。

7)噬菌体及细菌素分型诊断技术:根据噬菌体对细菌宿主细胞的选择性和细菌素杀菌谱的差异,用已知的噬菌体或细菌素检测标本中有无相应的细菌,并可进一步分型。这些方法目前仅用于细菌性疾病的流行病学调查。

8)气液相色谱法:借气液相色谱技术测试细菌在代谢过程中产生的挥发性脂肪酸,对细菌进行鉴别。该方法已广泛应用于厌氧菌的检测。

(姜昌富)

参 考 文 献

1. 彭文伟主编. 现代感染性疾病与传染病学. 北京: 科学出版社, 2000
2. 裘维蕃主编. 菌物大全. 北京: 科学出版社, 1998
3. 石佑恩主编. 病原生物学. 北京: 人民卫生出版社, 2001
4. 潘贤主编. 卫生监督执法全书. 北京: 中国人民公安大学出版社, 1999
5. 李怀林主编. 食品安全控制体系(HACCP)通用教程. 北京: 中国标准出版社, 2002
6. 郭栾懿主编. 食品卫生监督员工作规范. 北京: 人民卫生出版社, 1988
7. 田润之主编. 出入境检验检疫公务员初任培训专业教材. 北京: 中国对外经济贸易出版社, 2000
8. 杨鹏飞, 洪民荣等主编. WTO 法律规则与中国农业. 上海: 上海财经大学出版社, 2000
9. 洪虎主编. 中国口岸机构法律法规汇编. 北京: 改革出版社, 1996
10. 杜平、朱关福、刘湘云主编. 现代临床病毒学. 北京: 人民军医出版社, 1991
11. 程天民主编. 军事预防医学概论. 北京: 人民军医出版社, 1999
12. 卫生部政策法规司编. “二五”普法卫生专业法规选编. 北京: 中国法制出版社, 1989
13. 中华人民共和国卫生部. 《中华人民共和国传染病防治法》规定管理的传染病诊断标准(试行), 1990
14. 滨田辅一著. 陈志平, 王志等译. 人兽共患传染病. 成都: 四川人民出版社, 1980

第二章 食源性病原生物分类

食品是人类生物性致病因子(即微生物与寄生虫)的主要暴露源。这些暴露于食物、水源或者肉类食品的生物性致病因子,称食源性病原生物(foodborne biologic pathogen)。90%的重大食物传播疾病是由大约 30 种病原生物(如各种病毒、细菌、真菌、原虫、吸虫、绦虫、线虫和昆虫等)所引起的。

第一节 病 毒

目前已把所有的已知病毒分为 233 个属,其中 204 个属归类于 64 个科,另 29 个尚未归类。此外,还增加了亚病毒与未分类的病毒。64 个科的病毒分为 DNA 病毒(包括 DNA 逆转录病毒)和 RNA 病毒(包括 RNA 逆转录病毒)两大类。常见的食源性病毒约 20 余种。

一、轮 状 病 毒

轮状病毒(rotavirus)呈世界性分布,于 1973 年由澳大利亚 Bishop 等在急性胃肠炎儿童的十二指肠粘膜超薄切片中首次发现,是人类和动物腹泻的重要病原体,属急性胃肠炎病毒。

急性胃肠炎是人类最常见的疾病之一,主要以细菌、寄生虫和病毒引起。由病毒引起的胃肠炎临床表现以腹泻与呕吐为主,故又称病毒性腹泻。急性胃肠炎病毒分别属于 4 个不同的病毒科,即呼肠病毒科(*Reoviridae*)的轮状病毒;腺病毒科(*Adenoviridae*)的肠道腺病毒 40、41、42 型;杯状病毒科(*Caliciviridae*)的小圆形结构化病毒和“典型”杯状病毒以及星状病毒科(*Astroviridae*)的星状病毒。

【生物学性状】

形状为直径 60~80nm 大小不等的球形,具有非常清晰的双层壳膜和车轮辐条结构,有鉴定价值。只有双壳颗粒结构才有感染性。基因组为双股 RNA 由 11 个基因片段组成。每个片段含一个开放读码框,分别编码 6 个结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4、VP6、VP7)和 5 个非结构蛋白(NSP1~NSP5)。VP1~VP3 位于内壳、为组和亚组特异性抗原。根据其抗原性的不同,将轮状病毒分为 A~G 7 个组,其中 A 组又根据 VP6 分为 4 个亚组;VP4 和 VP7 位于外衣壳,为轮状病毒主要的表面中和抗原,VP4 为蛋白质,是病毒的血凝素,与毒力有关;VP7 为糖蛋白,决定病毒血清型,根据 VP7 抗原性的不同可将 A 组轮状病毒分为 14 个 G 血清型和 19 个 P 血清型。轮状病毒在粪便中可存活数日或数周,耐乙醚、酸、碱,pH3.5~10 时仍保留其感染性。55℃ 30min 可被灭活,95%乙醇、酚、漂白粉等有较强的灭活作用。胰蛋白酶能增强其感染性。

轮状病毒 A~C 组能引起人和动物腹泻,D~G 组只引起动物腹泻。A 组轮状病毒为最常见,流行的血清型为 G1P8、G2P4、G3P8、G4P8,是引起 6 个月至 2 岁婴幼儿急性胃肠炎的重要病原,是导致婴幼儿死亡的主要原因之一,故亦称婴幼儿轮状病毒。传染源是患者和无症状带毒者,粪-口为主要传播途径,发病季节主要在较寒冷的晚秋和冬季。潜伏期 1~3d。发病急,腹泻、呕吐和低热为主要临床症状。若不及时补充体液及电解质,则是导致患儿死亡的主要原因。B 组轮状病毒仅在我国成人中引起暴发流行,故又称成人轮状病毒。自 1982 年发现以

来,已在 20 多个省引起大规模流行,累积上百万人。粪-口为主要传播途径,常呈水源性暴发流行。为自限性疾病,如能及时补液,病死率较低。无明显的季节性,在我国北方常见于冬季,南方多见于夏季。C 组轮状病毒主要在猪中发现,对人的致病率很低。

【微生物学检查法】

(1)检查病毒或病毒抗原:轮状病毒有特殊的形态和结构,应用电镜直接检查其诊断率可达 90%~95%。轮状病毒型单克隆抗体建立的 ELISA、免疫荧光等方法可用于粪便标本中病毒抗原的分型或定量检测,以及流行病学调查,敏感性和特异性均高。

(2)病毒基因组的检测:聚丙烯酰胺凝胶电泳在临床诊断和分型以及流行病学调查中具有重要意义。可提取粪便中的病毒核酸进行电泳,然后根据轮状病毒 11 个基因片段在凝胶上的特殊分布图形进行分析判断,将婴儿轮状病毒和成人轮状病毒进行区别。亦可用标记的轮状病毒组或型特异性探针进行检测。

设计一对针对轮状病毒某一基因片段的保守区序列作为引物,或利用血清型特异性引物进行 PCR 扩增,若得到相应的特异性片段,即可证实轮状病毒的存在或对病毒进行分型。本法特异性和敏感性均高,优于其他方法,但用于临床轮状病毒的检测要注意假阳性反应。

(3)细胞培养:轮状病毒可在 Vero、MA-104 等细胞中增殖。用胰蛋白酶预处理病毒标本可增强病毒的感染性。

二、肠道腺病毒

【生物学性状】

肠道腺病毒(enteric adenovirus)为双链 DNA 无包膜病毒。核衣壳呈 20 面体立体对称,直径 70~90nm,12 个顶角的五邻体(尚有非顶角颗粒,称为六邻体)由基底和一根纤维突起组成,对细胞有毒性,能引起细胞病变。纤维突起含有病毒吸附蛋白和型特异性抗原,还具有血凝性。

腺病毒约有 100 个血清型,其中能感染人类的至少有 42 个血清型,分为 A~F6 个亚组。腺病毒主要通过呼吸道、胃肠道和密切接触从人传播到人,能在呼吸道、肠粘膜上皮中引起溶解性感染。已证实 40、41、42 三型腺病毒是引起婴幼儿病毒性腹泻的第二位病原体,称为肠道腺病毒。根据 DNA 同源性和血凝特性,将它们归属于人类腺病毒 F 组。该病毒主要经粪-口途径传播,四季均可发病,以夏季多见,主要引起 5 岁以下小儿的腹泻,世界各地均有报道。

该病毒不易在常用的细胞培养中生长。用腺病毒 5 型 DNA 转染的人胚肾细胞系(带有 E1A 的 E1B 的 293 细胞或 Graham 细胞)对肠道腺病毒的多数毒株敏感。我国有学者应用 A549 细胞分离肠道腺病毒 40 型获得成功。电镜观察可见患儿粪便中有大量病毒颗粒。

【微生物学检查法】

(1)病毒的分离培养与鉴定:该病毒不易在常用的细胞培养中生长。用腺病毒 5 型 DNA 转染的人胚肾细胞系(带有 E1A 的 E1B 的 293 细胞或 Graham 细胞)对肠道腺病毒的多数毒株敏感。我国有学者应用 A549 细胞分离肠道腺病毒 40 型获得成功。将出现典型病变的培养细胞进行进一步鉴定。电镜观察可见患儿粪便中有大量病毒颗粒。

(2)血清学诊断:血清学方法常用于对肠道腺病毒感染的确诊。如中和试验可用来检测患病后血清中抗体的消长情况,在一定程度上可反应抗病毒的免疫力,且可区别肠道腺病毒的血清型。另外,还有免疫荧光试验、血凝抑制试验、补体结合试验等。

有报道采用分子生物学检测法用于肠道腺病毒的诊断,如核酸分子杂交法、PCR 技术测定法等。PCR 技术可从标本中检测 15fg 的肠道腺病毒 DNA,其特异性和敏感性均比分子杂交法

高。PCR 扩增产物可用于酶切分析、探针杂交以及对不同的型别进行鉴定。

三、杯状病毒

【生物学性状】

杯状病毒属(*calivirus*)包括小圆形结构化病毒(*small round structured virus*, SRSV)和“典型”杯状病毒(“*classia*”*cali*civirus),后者又称人类杯状病毒(HuCV)。杯状病毒为圆球形,表面有 32 个杯状凹陷。SRSV 大水约为 27nm, HuCV31 ~ 38nm,无包膜。基因组为一个传染性单正链 RNA,7.3 ~ 7.7kb,有三个开放读码框。只有一种衣壳蛋白。人类急性胃肠炎杯状病毒尚不能在体外细胞培养,亦无合适动物模型。

SRSV 和 HuCV 均可引起人类急性胃肠炎,其中 SRSV 是世界上病毒性腹泻的暴发流行的最重要的病原体,而 HuCV 发病则很低。SRSV 感染呈世界性分布,一年四季均可发病,以冬季为多见。可累积任何年龄组和地区,但我国目前尚未有报道。传染源为患者、隐性感染者和健康带毒者。通过污染的水源、食物等经粪-口途径传播,海产品是重要的传染源。潜伏期约 24h,突然发病,伴有恶心、呕吐、腹痛和轻度腹泻。本病为自限性,无死亡发生。

【微生物学检查法】

(1)标本采集:粪便、双份血清等。

(2)检测病毒抗原或抗体:可用免疫电镜技术、放射免疫技术等免疫学方法检测粪便标本中的病毒颗粒。用酶免疫测定法、杆状病毒重组表达的 SRSV 衣壳抗原建立的 ELISA 法检测患者血清中特异性抗体和作流行病学调查。

(3)病毒基因组的检测:可采用核酸分子杂交、RT-PCR 检测病毒核酸用于快速诊断和流行病学调查。

四、星状病毒

【生物学性状】

星状病毒科(*astrovirus*)是新设的病毒科,只有一个属,即星状病毒属。该属包括人和动物星状病毒,可引起人、牛、羊腹泻,其代表种为人星状病毒 1 型(*human astrovirus 1*)。星状病毒呈球形,直径为 28 ~ 30nm,无包膜,电镜下表面结构呈星形,有 5 ~ 6 个角。基因组为长 7.0kb 的正单链 RNA,有三个重叠的开放读码框。表面结构呈星形,有 5 ~ 6 个角。该病毒可在人胚肾细胞或在有胰蛋白酶存在下在大肠癌细胞中生长增殖并产生病变。人星状病毒有 7 个血清型。

星状病毒呈世界性分布。在温暖地区主要流行于冬季,粪-口途径传播,5 岁以下小儿易感,其中 5% ~ 20% 为隐性感染。潜伏期 3 ~ 4d。临床表现为腹泻、恶心发热和头痛等症状。腹泻可持续 2 ~ 3d 或更长时间。在病毒性腹泻中,由星状病毒引起的腹泻发病率仅 2.8%。

【微生物学检查法】

(1)标本采集:主要依赖病原学和血清学确诊,因此可取粪便和血清标本。

(2)检查病毒颗粒和病毒抗原:可用电镜和免疫电镜从病人粪便中查找病毒颗粒,或用星状病毒多克隆抗体,以 ELISA、RIA、EIA 等法直接从粪便中检测相应的病毒抗原。

(3)细胞培养与检测:星状病毒可在人胚肾细胞,大肠癌细胞中生长,然后在用多克隆抗体,以 EIA 等法检测细胞培养中的星状病毒。

(4)血清学检查:可采用 ELISA、RIA、EIA 等法检测病人血清中的特异性抗体,尤其是 IgM