

一起由金黄色葡萄球菌引起幼儿园食源性 疾病暴发事件的病原学分析

侯少华¹, 李国明², 安锋涛¹, 张莉¹, 郑建忠¹, 张莹²

1. 咸宁市疾病预防控制中心, 湖北 咸宁 437100; 2. 湖北省疾病预防控制中心, 湖北 武汉 430079

摘要: **目的** 对一起疑似为金黄色葡萄球菌导致的幼儿园食源性疾病暴发事件进行葡萄球菌肠毒素检测, 结合病原学分析, 为明确食源性疾病诊断提供依据。 **方法** 对分离自某起食源性疾病暴发事件的 6 株金黄色葡萄球菌分离株进行生化鉴定, 采用微孔板酶联免疫法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 进行肠毒素型别检测, 并应用脉冲场凝胶电泳 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 法对菌株进行分子分型, 应用 BioNumerics 软件对不同来源的菌株进行比对, 分析菌株之间的相关性。 **结果** 34 份样品检出 6 株金黄色葡萄球菌, 肠毒素检测均为阳性, 其中 3 株 (分别来源于患者呕吐物、患儿粪便、切菜台) 检出 SEA、SEC、SEE 等 3 种肠毒素, 2 株 (分别来源于食物样本、生活老师粪便) 检出 SEE 1 种肠毒素, 1 株 (来源于食物样本) 检出 SEA、SEC 等 2 种肠毒素。PFGE 分型结果显示, 1 株来源于患者呕吐物的菌株和 1 株来源于切菜台的菌株具有高度同源性 (96.8%)。 **结论** 本起食源性疾病暴发事件由具有肠毒素的金黄色葡萄球菌污染切菜台导致, 葡萄球菌肠毒素检测对明确食源性疾病的病因十分重要, PFGE 分型技术有助于食源性疾病的溯源分析。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 肠毒素; 食源性疾病

中图分类号: R155.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)07-0847-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.07.020

金黄色葡萄球菌广泛分布于自然界, 是一种引起人类和动物化脓性感染的重要致病菌, 也是造成人类食物中毒的常见致病菌之一^[1]。金黄色葡萄球菌不仅能引起人和动物的化脓性感染, 同时也是一种重要的食源性致病菌。由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒在细菌性食物中毒中占有较大比例^[2]。据报道, 每 100 g 食物中含有 18 μ g 葡萄球菌肠毒素时, 即能引起金黄色葡萄球菌食物中毒^[3]。金黄色葡萄球菌肠毒素 (SEs) 是引起金黄色葡萄球菌食物中毒的主要原因, 到目前为止, 根据等电点和抗原性的不同, 已经确认了 20 种不同的葡萄球菌肠毒素。金黄色葡萄球菌肠毒素以 SEA ~ SEE 等 5 种常见传统毒素基因为主^[4], 商用试剂盒也是针对这 5 类肠毒素检测来确定是否产生 SE^[5]。

分子分型方法常用于确定公共卫生事件暴发和相关病原菌溯源^[6]。脉冲场凝胶电泳分型结果重复性好, 能对金黄色葡萄球菌提供可靠的基因组关系数据, 在金黄色葡萄球菌所导致的公共卫生事件流行病学调查中得到广泛应用^[7]。本研究通过检测肠毒素及细菌分子分型, 对某幼儿园暴发的一起疑似金黄色葡萄

球菌引起的食源性疾病事件进行病因分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集和菌株分离 采集到可疑食物 4 份, 患者呕吐物 1 份, 饮用水 2 份, 患者粪便 (或肛拭) 15 份, 物体表面涂抹物 12 份, 对采集的 34 份样品进行沙门氏菌、志贺氏菌、致泻大肠埃希氏菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、变形杆菌检测, 检测方法依据 GB 4789.4-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》、GB 4789.5-2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验》、GB 4789.6-2003《食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》、GB 4789.7-2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》、GB 4789.10-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》、GB 4789.14-2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》、GB 4789.30-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》、WS/T 9-1996《变形杆菌食物中毒诊断标准及处理原则》进行。

1.1.2 主要仪器与试剂 全自动微生物鉴定仪 VITEK2 Compact (法国生物梅里埃公司); CHEF MammperXA 脉冲场电泳系统 (美国 BIO-RAD 公司); GelDocXR+ 凝胶成像分析系统 (美国 BIO-RAD 公

基金项目: “艾滋病和病毒性肝炎”等“十三五”国家科技重大专项-湖北及周边省传染病病原谱和流行规律研究之子课题 “湖北省五大症候群病原体常规监测” (2017ZX10103005-003)
作者简介: 侯少华 (1983-), 女, 本科学历, 主管技师, 主要从事微生物检验检测工作。
通信作者: 李国明, E-mail: 343042482@qq.com。

司);BioNumerics 生物信息分析软件(比利时 Ap-plied Maths 公司)。VITEK2 GP 卡(法国生物梅里埃公司);Baird-Parker 培养基(北京陆桥);肠毒素培养基(北京陆桥);RIDAS-CREEN SET A,B,C,D,E 金黄色葡萄球菌肠毒素分型检测试剂盒(德国 R-Biopharm 公司);试验对照菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923、ATCC6538、沙门菌 H9812,所有试剂和培养基均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 流行病学调查 通过现场询问,实地调查等方式收集发病人群分布特征,临床症状分布和发病前进食情况等信息,采用描述性分析方法对相关信息进行分析。

1.2.2 细菌鉴定 参照国标方法对采集的样品进行增菌、分离和鉴定。按照 GB 4789.10-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》^[8]将分离到的疑似金黄色葡萄球菌菌株用 VITEK GP 卡进行生化鉴定,并做血浆凝固酶实验。

1.2.3 肠毒素检测 参照 GB 4789.10-2010,取待测菌的 BHI 24 h 增菌液离心(5 000 r/min,10 min),取上清进行无菌过滤,每孔取 100 μl 进行检测,采用德国 R-Biopharm 公司的 RIDAS-CREEN SET A,B,C,D,E 金黄色葡萄球菌肠毒素分型检测试剂盒进行毒素分型检测。

1.2.4 PFGE 分型 按国家食品安全风险评估中心提供的金黄色葡萄球菌 PFGE 标准操作程序进行,Marker 为沙门菌 H9812 菌株。

2 结果

2.1 流行病学调查结果

2.1.1 发病情况 2017 年 3 月 31 日,某幼儿园 7 名

幼儿在 11:30 进食中餐后,陆续出现呕吐、腹痛、腹泻,随后到医院就诊。后因类似症状到医院就诊的幼儿陆续增多,经核实有 43 人因此原因到医院就诊,43 人中,男 21 名、女 22 名,年龄最小 2 岁,年龄最大为 9 岁。所有患儿对症治疗后病情均好转,其中 36 人留观一夜后由家长带回,至 4 月 3 日 7 名住院患儿全部出院。7 名住院患儿主要症状为呕吐(7/7)、腹泻(5/7)、食欲欠佳(7/7)、精神不佳(7/7)、睡眠不佳(6/7)、脱水(3/7)、腹痛(4/7)、腹胀气(4/7),呕吐 1~3 次,为胃内容物。首发病例出现在 3 月 31 日 14:30,末发病例出现在当日 17:00,潜伏期最短 3 h,最长 5.5 h。

2.1.2 食物调查 3 月 29 日、30 日、31 日早餐和午餐患者均在幼儿园食用,29 日早餐为炒粉,午餐为豆腐、冬瓜、火腿肠、30 日早餐为小米粉,午餐为干子、胡萝卜、豆油汤,31 日早餐为面条和麻花,午餐为冬瓜肉丝汤、卤鸡蛋、土豆伴胡萝卜,晚餐均各自在家食用,无明显聚集性。

2.2 样品检测结果 采集到的 34 份样品中分离到 6 株金黄色葡萄球菌,其中 2 株来自粪便(一株来自患儿,1 株来自生活老师)、1 株来自患者呕吐物、2 株来自可疑食品、1 株来自切菜台。

2.3 肠毒素分型检测 6 株来源于患者、食物样本和环境样本的菌株经 ELISA 法检测,结果均为阳性,其中 3 株(分别来源于患者呕吐物、患儿粪便、切菜台)同时检出 SEA、SEC、SEE 等 3 种肠毒素,2 株(分别来源于食物样本、生活老师粪便)检出 SEE 1 种肠毒素,1 株(来源于食物样本)同时检出 SEA、SEC 等 2 种肠毒素,见表 1。

表 1 金黄色葡萄球菌生化鉴定及肠毒素检测结果

项目	菌株编号					
	BQ17009	BQ17010	BQ17011	BQ17012	BQ17013	BQ17014
样本来源	土豆胡萝卜菜	剩饭菜	呕吐物	患儿粪便	生活老师粪便	切菜台
血浆凝固酶	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
VITEK2 结果	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌
肠毒素结果	A、C	E	A、C、E	A、C、E	E	A、C、E

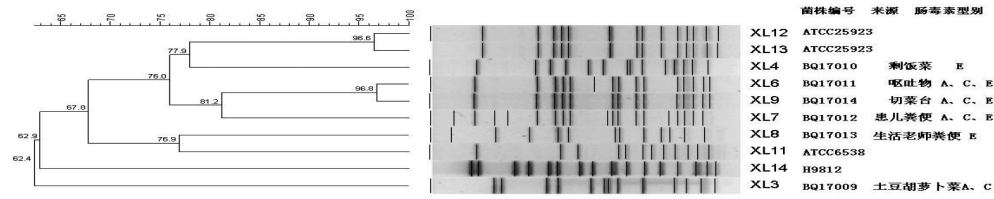


图 1 金黄色葡萄球菌 PFGE 聚类分析图

2.4 PFGE 结果 参照《国家致病菌识别网技术规范 金黄色葡萄球菌》方法,采用限制性内切酶 SmaI 对金

黄色葡萄球菌 DNA 酶切后制胶进行 PFGE,EB 染色后凝胶成像系统成像,用 BioNumerics 6.1 软件对图

谱进行聚类分析,BQ17011(呕吐物)、BQ17012(患儿粪便)、BQ17014(切菜台)三株菌带型一致,BQ17009、BQ17010、BQ17013 三株菌带型则均不相同,其中 BQ17011(呕吐物)和 BQ17014(切菜台)相关性高达 96.8%,提示污染源可能来自同一金黄色葡萄球菌克隆株。聚类分析结果见图 1。

3 讨论

金黄色葡萄球菌所致的食物中毒主要由肠毒素引起,肠毒素是一类结构相关、独立相似、抗原性不同的外毒素,一株金黄色葡萄球菌能分泌一型或两型以上的肠毒素^[9],经 100℃ 30 min 仍然保持部分活性^[10],一般的烹调加热只能杀死金黄色葡萄球菌的菌体,不能灭活其肠毒素,被污染食品在 25℃~30℃ 环境下放置 5~10 h,就能产生足以引起食物中毒的葡萄球菌肠毒素^[11],当人们食入含有肠毒素的食品就会可能引起食物中毒。本起食源性疾病暴发事件是由携带有 A、C、E 肠毒素的金黄色葡萄球菌污染切菜台所致,经由切菜台污染菜品,从而致使患儿出现呕吐、腹泻等中毒症状。检出 6 株金黄色葡萄球菌均携带有肠毒素,其中 3 株(呕吐物、患儿粪便、切菜台)同时检出 SEA、SEC、SEE 等 3 种肠毒素,2 株(剩饭菜、生活老师粪便)检出 SEE 1 种肠毒素,1 株(土豆胡萝卜菜)同时检出 SEA、SEC 等 2 种肠毒素。其中产 SEE 的菌株比例最高(5/6),但 SEE 引起的症状较轻,所以由 SEE 引起食物中毒的报道不多,未引起人们重视^[12]。各肠毒素型之间关系最为密切的是 SEA 与 SEC,呈现出一定的连锁关系^[13],本次调查结果中 6 株菌株中有 4 株检出 SEA 的同时也检出了 SEC,这点与陈智等^[14]研究结果相近。

PFGE 分型技术是目前细菌分子分型最佳方法,对细菌的染色体 DNA 酶切电泳后进行分析,具有重复性好、分辨力高等优点。本研究采用 PFGE 分子分型对 6 株不同来源的金黄色葡萄球菌分离株 DNA 进行酶切电泳。若各菌株产生相同的条带数且相应条带的大小相同,可认为来源于同一克隆;若分离株有 6 个以上电泳条带的差异,说明它们之间有 3 个或更多遗传性状的改变,可以认为不具相关性^[15]。由图 1 可见,BQ17011(呕吐物),BQ17012(患儿粪便),BQ17014(切菜台)带型一致,而其余三株带型均不相同。结合流行病学调查结果,可判定该起食物中毒是由同一金黄色葡萄球菌克隆株污染所引起的,即可能是切菜台受到携带肠毒素的金黄色葡萄球菌污染所致的食物中毒。BQ17009(土豆和胡萝卜菜)、BQ17010(剩饭菜)、

BQ17013(生活老师粪便)株菌株来自于不同的金黄色葡萄球菌克隆株,并且这 3 株菌株所携带的肠毒素也不同。该起食源性疾病事件是由携带金黄色葡萄球菌肠毒素的切菜台污染菜品,由于肠毒素耐热,不易被灭活,幼儿食用被污染的菜品后出现中毒反应,由于样品采集在使用抗生素以后,因此该起事件未能在其他患儿粪便中分离出金黄色葡萄球菌,这也是本次食源性疾病事件检测中的不足之处。

近年来多起学校公共卫生事件,大多由细菌引起^[16-17]。因此食品监管部门应加强校园内食品卫生安全宣传,监督从业人员健康检查。本次的食源性疾病暴发事件由污染金黄色葡萄球菌肠毒素的切菜台引起,因此食品原料和容器应经过认真清理消毒;食品加工人员操作前应认真洗手防止二次污染,防止由此引起的食源性疾病^[18]。本次食源性疾病暴发事件实验室检测表明,金黄色葡萄球菌肠毒素分型检测结合 PFGE 分子分型在明确病因和追踪溯源中起到关键作用。

参考文献

- [1] 张健,陈惠玲,邓志爱,等.广州市食源性金黄色葡萄球菌肠毒素及耐药分析[J].实用预防医学,2018,25(4):398-400.
- [2] 李月婷,龚云伟,刘桂华.吉林省 2014 年食源性金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J].中国卫生检验杂志,2015,25(21):3772-3774.
- [3] 张默宇,徐品.金黄色葡萄球菌食物中毒相关研究进展[J].职业与健康,2012,28(4):482-483.
- [4] 汪永禄,张萍,陶勇,等.不同来源金黄色葡萄球菌肠毒素及耐药性检测分析[J].实用预防医学,2014,21(4):488-491.
- [5] Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins [J]. Toxins, 2010, 2(7):1751-1773.
- [6] 叶硕,杨元斌,沈玄艺,等.一起食物中毒事件中产独特肠毒素表型的金黄色葡萄球菌病原学分析[J].中国食品卫生杂志,2016,28(3):301-305.
- [7] 盛东萍,杨元斌,徐景野.一起食物中毒病因的实验室分析[J].中国食品卫生杂志,2014,26(5):504-506.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.10-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S].北京:中国标准出版社,2010:1-5.
- [9] 张扬,张兰荣,周景林,等.2009-2011 年通州区食源性金黄色葡萄球菌的生物学及流行病学特征[J].中国微生态学杂志,2013,25(2):214-217.
- [10] 王秀茹.预防医学微生物学及检验技术[M].北京:人民卫生出版社,2002:56.
- [11] 王钊,王克安.中国疾病预防与控制指南[M].北京:华夏出版社,2000:505-506.
- [12] 刘伟,王菊光,孙晓华,等.日常食品及食物中毒样本中金黄色葡萄球菌肠毒素的分型检测分析[J].中国预防医学杂志,2013,14(8):608-611.
- [13] 曹虹,王敏,郑荣,等.金黄色葡萄球菌临床分离株肠毒素基因的调查分析[J].南方医科大学学报,2012,32(5):738-741,745.
- [14] 陈智,江元山,熊燕,等.金黄色葡萄球菌食物中毒分离株毒素基因的 PCR 分析[J].中国卫生检验杂志,2009,19(1):21-23.
- [15] 朱海明,陈秋霞,杨冰,等.一起食物中毒事件金黄色葡萄球菌肠毒素及肠毒素基因检测与分析[J].华南预防医学,2015,41(6):583-586.
- [16] 王海波,许国章.宁波市 2005-2007 年学校突发公共卫生事件监测结果分析[J].中国学校卫生,2008,29(7):661-662.
- [17] 陈玉娟,姚应水.2005-2009 年学校重大食物中毒事件分析[J].皖南医学院学报,2011,30(1):81-82,85.
- [18] 候少华,安锋涛,张莉,等.2011-2015 年咸宁市食源性致病菌监测结果[J].职业与健康,2017,33(9):1193-1196.

收稿日期:2018-11-06