

食物中毒

一起由金黄色葡萄球菌引起食物中毒的实验室诊断

马鑫,李方,苏静,刘万里
(新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心,新疆 乌鲁木齐 830002)

摘要:**目的** 对一起食物中毒进行相关样品的实验室检测,针对分离病原菌进行分子分型溯源和耐药分析。**方法** 对可疑食品(冰激凌、牛奶)样品、患者呕吐物和粪便标本使用国家标准或其他方法进行沙门菌、志贺菌、致泻大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、蜡样芽胞杆菌和诺如病毒检测。对检出的金黄色葡萄球菌进行肠毒素检测、脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型和抗生素敏感性检测。**结果** 从生产冰激凌剩余牛奶及冰激凌样品中检出金黄色葡萄球菌 12 株,患者呕吐物和粪便标本中检出 4 株,菌株均产生 A+C+E 混合型肠毒素,PFGE 显示患者呕吐物、粪便、中毒同批冰激凌样品、生产冰激凌用牛奶中检出的金黄色葡萄球菌菌株同源性为 100.0%;药敏结果显示,这 16 株菌株均对青霉素和红霉素耐药。**结论** 本起事件是由冰激凌加工点使用了被金黄色葡萄球菌污染且产生大量肠毒素的牛奶生产冰激凌所致。建议监管部门加强对农村食品小作坊、牛奶供应站等生产经营场所的监管,预防类似事件的发生。

关键词:金黄色葡萄球菌;肠毒素;食物中毒;脉冲场凝胶电泳;耐药

中图分类号:R155 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-8456(2019)01-0084-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.01.018

Laboratory diagnosis of a food poisoning caused by *Staphylococcus aureus*

MA Xin, LI Fang, SU Jing, LIU Wanli
(Center for Disease Prevention and Control of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Xinjiang
Urumqi 830002, China)

Abstract: **Objective** Laboratorial detection were performed on a case of a food poisoning. Meanwhile, pulse field gel electrophoresis (PFGE) and antimicrobial susceptibility testing were carried out for pathogens obtained. **Methods** Suspected milk and ice cream, vomitus and feces specimens were tested for *Salmonella*, *Shigella*, diarrheogenic *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, and *Norovirus* in accordance with the method of national food safety standard and others. Analysis of enterotoxins, PFGE and antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* isolates were performed. **Results** Totally, twelve strains of *Staphylococcus aureus* from milk and ice cream specimens, four strains from the vomitus and the fecal specimens of the patient were cultured. All these strains were found to be able to produce type A, C, and E enterotoxins. Further molecular subtyping by PFGE analysis showed that these strains produced indistinguishable pulsotypes. Moreover, these strains were resistant to penicillin and erythromycin. **Conclusion** This food poisoning outbreak was associated with the milk contaminated with *Staphylococcus aureus* stains and produced large amounts of enterotoxin, and the ice cream processing centers used the contaminated milk. It is recommended that the supervision department should strengthen the supervision of the food producers especially in rural areas and milk supply stations in order to prevent the outbreaks of similar incident.

Key words: *Staphylococcus aureus*; enterotoxin; food poisoning; pulse field gel electrophoresis; antimicrobial resistance

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)广泛分布于自然界,是重要的食源性致病菌。金黄色葡萄球菌污染食品并繁殖产生肠毒素(*Staphylococcal enterotoxins*, SEs)等毒力因子,肠毒素极低浓度(微克数量级)就可引起食物中毒。2016 年 4 月,新疆某地农村多人因食用加工点的

自制冰激凌后短时间内出现不同程度的恶心、呕吐、腹痛、腹泻等症状。为探讨事件的暴发原因并为临床救治提供依据,本研究对该起事件进行了调查,并在暴发期间采集相关样品和标本进行实验室检验及溯源分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例基本情况

现场调查发现 140 例病例,均主诉于 2016 年

4月3日食用当地某加工点提供的自制冰激凌,症状以恶心(94%,131/140)、呕吐(92%,129/140)、腹痛(67%,94/140)、腹泻(54%,75/140)为主,均无发热,潜伏期为1~7.5 h,病程持续时间短,病程中位数为1 d。病例主要分布在某乡相邻的A、B、C三个村庄,主要集中在三个村庄交界处一个试营业冰激凌加工点的周围。病例年龄中位数为9岁,以散居儿童和学生为主,占76%(107/140)。

1.1.2 样品/标本采集

从三个场所分别采集样品/标本:①从中毒所在地医疗机构采集患者呕吐物6份、粪便3份;②从冰激凌加工点采集与中毒同批次的冰激凌及生产用原料共14份,包括盒装冰激凌2份、冰激凌机桶内冰激凌2份、加工冰激凌剩余牛奶1份(该牛奶为2016年4月2日购进,室温放置24 h后用于冰激凌加工)、待用牛奶1份(为4月3日购进后倒入盛装过4月2日原料牛奶却未经清洗的锅中待用)、生产冰激凌用生鸡蛋4份、冰激凌棒3份、砂糖1份;③供应冰激凌加工点牛奶的奶站采集牛奶4份;共计27份样品/标本送实验室检测。

1.1.3 标准菌株

沙门菌(ATCC 14028、H9812)、志贺菌(ATCC 51572)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)、大肠埃希菌(ATCC 25922)、单核细胞增生李斯特菌(ATCC 33090,以下简称单增李斯特菌)、蜡样芽胞杆菌(ATCC 11778)标准菌株均购自上海北诺生物科技有限公司。

1.1.4 主要仪器与试剂

Vitek2 Compact 细菌全自动生化鉴定仪(法国生物梅里埃),7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国ABI),WellscanMK3 多功能全自动酶标仪(芬兰雷勃),CHEF Mapper 脉冲场凝胶电泳(PFGE)系统(美国Bio-Rad)。

7.5%氯化钠肉汤、血平板均购自北京陆桥技术股份有限公司,脑心浸液肉汤(BHI)、脑心浸液琼脂(BHA)培养基均购自英国Oxoid、Baird-Parker培养基、兔血浆均购自美国BD,细菌鉴定卡GP(法国梅里埃),金黄色葡萄球菌肠毒素检测试剂(德国拜发),限制性内切酶 *Sma* I(大连Takara),诺如病毒PCR试剂盒(北京卓诚惠生生物科技股份有限公司),革兰阳性需氧菌药敏检测板(包括青霉素、苯唑西林、利奈唑胺、万古霉素、克林霉素、四环素、庆大霉素、达托霉素、红霉素、氯霉素、环丙沙星、复方新诺明、头孢西丁等13种抗生素,上海星佰生物技术有限公司),所有试剂均在有效期内。

1.2 方法

1.2.1 致病菌分离检测项目及方法

可疑食品:依据相应国家标准^[1-6]对沙门菌、志贺菌、致泻大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌、单增李斯特菌进行检测。

生物标本:依据WS 271—2007《感染性腹泻诊断标准》^[7]附录B检测沙门菌、致泻大肠埃希菌,WS 287—2008《细菌性和阿米巴性痢疾诊断标准》^[8]检测志贺菌,参考相应国家标准^[4-6]检测金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌、单增李斯特菌。诺如病毒检测依据试剂盒说明书,取5 μl 标本,提取RNA,加入至含有诺如病毒GI型和GII型特异性引物及探针的诺如病毒PCR反应体系(15 μl)中,同时设立阴性、阳性对照和空白对照,选择荧光通道羧基荧光素(FAM,诺如病毒GI型)、绿色荧光蛋白(VIC,诺如病毒GII型)。反应条件:45℃反转录20 min,1个循环;95℃预变性5 min,1个循环;95℃变性15 s,55℃退火45 s,45个循环。样品为S型扩增曲线且循环阈值(Ct)≤35为阳性,根据荧光通道判定检测结果。

1.2.2 金黄色葡萄球菌肠毒素及分型

将纯化培养的金黄色葡萄球菌接种于BHI培养基,37℃培养18~24 h,以8 000 r/min 低温(10℃)离心10 min(离心半径10 cm),取上清液无菌过滤,按试剂盒说明书检测肠毒素:每孔加入100 μl 滤液,设立阴性、阳性质控,35~37℃孵育1 h。分步加入酶底物1和酶底物2,分别在35~37℃条件下孵育1 h和30 min,重复洗涤进行四遍。加入100 μl 底物发色剂,35~37℃暗处孵育15 min,加入100 μl 反应终止液。酶标仪在(450±10)或(630±10) nm 处测量吸光度(OD)值。临界值(cut-off)=阴性质控的OD值+0.15。样品/标本的OD值≥临界值,则该样品/标本为阳性。肠毒素阳性的样品/标本再进行分型,为避免交叉反应,对于肠毒素总量检测OD值高于2.5的样品/标本,用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至OD值在1.5~2.0之间进行分型检测。

1.2.3 PFGE

按《2016年食源性疾病预防工作手册》^[9]要求配制菌悬液,琼脂糖包埋制备DNA胶块,裂解并进行清洗,利用*Sma* I限制性内切酶对胶块进行酶切并制胶,通过PFGE分离DNA片段,获取图谱并导入BioNumerics软件分析,选择Dice相关系数和非加权组平均(UPGMA)法,条带位置差异容许度选择1.5%,优化值选择1.0%,相似度100%认定为相同PFGE带型。

1.2.4 菌株耐药性检测

采用美国临床实验室标准协会 (CLSI) 推荐的微量肉汤稀释法^[10]测定金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度 (MIC)。将稀释至合适浓度的 100 μl 菌悬液加入药敏板孔,37 ℃ 培养 18~20 h 后判读结果,S 为敏感,M 为中介,R 为耐药。

2 结果

2.1 致病菌分离培养及鉴定

取可疑食品和标本 25 g 于 7.5%氯化钠肉汤增菌,(36±1) ℃ 培养 18~24 h,划线接种 Baird-Parker

平板和血平板,分别于 (36±1) ℃ 培养 48、18 h。在 Baird-Parker 平板上挑取圆形、凸起、表面光滑湿润、灰黑色至黑色、周围有不透明圈的典型菌落,在血平板上挑取较大、圆形湿润、光滑凸起、周围可见透明溶血圈的金黄色菌落,进行革兰染色镜检、血浆凝固酶试验及生化鉴定仪进行鉴定。从患者呕吐物和粪便标本、患者主诉吃过的冰激凌加工点现场采集的同批次冰激凌、加工冰激凌剩余牛奶、牛奶供应站采集的牛奶等样品/标本中共检出 22 株金黄色葡萄球菌,见表 1。上述样品均未检出其他肠道致病菌和诺如病毒。

表 1 中毒相关样品/标本中金黄色葡萄球菌检测结果
Table 1 Detection of *Staphylococcus aureus* in samples related to food poisoning

样品/标本名称	采集地点	采集日期	菌株编号
盒装冰激凌 1	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	XJ1601、XJ1602
盒装冰激凌 2	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	XJ1603、XJ1604
牛奶 1	牛奶供应站	2016 年 4 月 4 日	XJ1605、XJ1606
牛奶 2	牛奶供应站	2016 年 4 月 4 日	XJ1607、XJ1608
牛奶 3	牛奶供应站	2016 年 4 月 4 日	XJ1609、XJ1610
牛奶 4	牛奶供应站	2016 年 4 月 4 日	未检出
呕吐物 1	医院	2016 年 4 月 3 日	未检出
呕吐物 2	医院	2016 年 4 月 3 日	未检出
呕吐物 3	医院	2016 年 4 月 3 日	XJ1612
呕吐物 4	医院	2016 年 4 月 3 日	XJ1613
呕吐物 5	医院	2016 年 4 月 3 日	XJ1614
呕吐物 6	医院	2016 年 4 月 3 日	未检出
粪便 1	医院	2016 年 4 月 3 日	XJ1611
粪便 2	医院	2016 年 4 月 3 日	未检出
粪便 3	医院	2016 年 4 月 3 日	未检出
锅中待用牛奶	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	XJ1615、XJ1616
桶内冰激凌 1	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	XJ1617、XJ1618
桶内冰激凌 2	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	XJ1619、XJ1620、XJ1621
加工冰激凌剩余牛奶	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	XJ1622
生鸡蛋 1	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	未检出
生鸡蛋 2	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	未检出
生鸡蛋 3	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	未检出
生鸡蛋 4	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	未检出
冰激凌棒 1	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	未检出
冰激凌棒 2	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	未检出
冰激凌棒 3	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	未检出
砂糖	冰激凌加工点	2016 年 4 月 3 日	未检出

2.2 金黄色葡萄球菌肠毒素检测

患者呕吐物和粪便标本、加工点现场采集与病例食用为相同批次的冰激凌、加工冰激凌剩余牛奶中分离的 16 株金黄色葡萄球菌均产肠毒素,且肠毒素型别均为 A+C+E 混合型;中毒次日 (2016 年 4 月 4 日) 从牛奶供应站采集的牛奶样品中共检出金黄色葡萄球菌 6 株,其中 2 株产 E 型肠毒素,4 株不产肠毒素,见表 2。

2.3 PFGE 分型

22 株金黄色葡萄球菌被分为 3 种 PFGE 带型,患者粪便和呕吐物标本、冰激凌加工点采集的样品及加工冰激凌剩余牛奶样品中分离的 16 株金黄色葡萄球菌 PFGE 带型完全一致,同源性的 100.0%,且所产肠毒素型别均为 A+C+E 混合型;中毒次

表 2 金黄色葡萄球菌肠毒素和血浆凝固酶检测结果
Table 2 Results of enterotoxin produced by *Staphylococcus aureus* and method coagulase

样品名称	金黄色葡萄球菌肠毒素检测	血浆凝固酶
盒装冰激凌 1	A+C+E	阳性
盒装冰激凌 2	A+C+E	阳性
牛奶供应站牛奶 1	E	阳性
牛奶供应站牛奶 2	未检出	阳性
牛奶供应站牛奶 3	未检出	阳性
粪便 1	A+C+E	阳性
呕吐物 3	A+C+E	阳性
呕吐物 4	A+C+E	阳性
呕吐物 5	A+C+E	阳性
锅中待用牛奶	A+C+E	阳性
桶内冰激凌 1	A+C+E	阳性
桶内冰激凌 2	A+C+E	阳性
加工冰激凌剩余牛奶	A+C+E	阳性

日(2016年4月4日)从牛奶供应站采集的牛奶样品中分离的6株菌株分为2种PFGE带型,与上述

16株菌的PFGE带型不同。分子分型与肠毒素分型结果可对应,见图1。

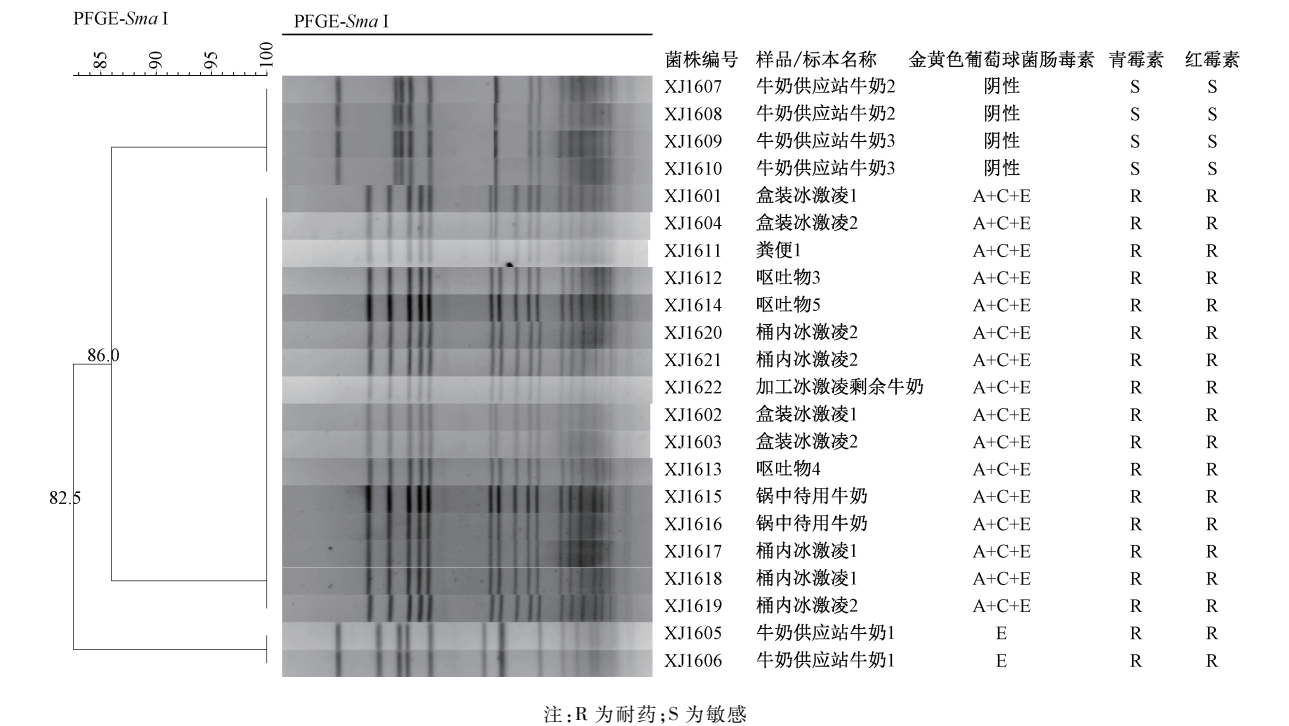


图1 金黄色葡萄球菌 PFGE 聚类分型结果

Figure 1 PFGE analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from samples related to food poisoning

2.4 抗生素敏感性检测

青霉素、苯唑西林、利奈唑胺、万古霉素、克林霉素、四环素、庆大霉素、达托霉素、红霉素、氯霉素、环丙沙星、复方新诺明、头孢西丁等13种抗生素敏感性试验结果显示,青霉素和红霉素耐药率均为82%(18/22),4株对青霉素和红霉素敏感的菌株均不产肠毒素,分离自牛奶供应站采集的牛奶样品;所有菌株对其他11种抗生素均敏感,见表3。

表3 22株金黄色葡萄球菌的耐药性特征						
Table 3 Antimicrobial susceptibility characteristics of 22 <i>Staphylococcus aureus</i> isolates						
抗生素	折点/(μg/ml)			菌株数		
	敏感	中介	耐药	敏感	中介	耐药
青霉素	≤0.125	—	≥0.25	4	0	18
利奈唑胺	≤4	—	≥8	22	0	0
苯唑西林	≤2	—	≥4	22	0	0
红霉素	≤0.5	1~4	≥8	4	0	18
克林霉素	≤0.5	1~2	≥4	22	0	0
环丙沙星	≤1	2	≥4	22	0	0
达托霉素	≤1	—	—	22	0	0
复方新诺明	≤2/38	—	≥4/76	22	0	0
万古霉素	≤2	4~8	≥16	22	0	0
四环素	≤4	8	≥16	22	0	0
氯霉素	≤8	16	≥32	22	0	0
庆大霉素	≤4	8	≥16	22	0	0
头孢西丁	≤4	—	≥8	22	0	0

注:—表示 CLSI 标准中无该抗生素的中介或耐药折点

3 讨论

2016年4月,新疆某地发生一起急性胃肠炎疫情暴发。实验室检测结果显示,从患者呕吐物和粪便标本、剩余样品(引起中毒同批次的加工点冰激凌样品)及加工冰激凌剩余牛奶检出相同型别肠毒素的金黄色葡萄球菌,PFGE分型溯源结果同源性为100.0%,结果显示该起食物中毒是因加工冰激凌所用原料牛奶受到金黄色葡萄球菌污染并产生大量肠毒素所致。根据WS/T 80—1996《葡萄球菌食物中毒诊断标准及处理原则》^[11]中的判定原则,结合患者的临床表现、流行病学特征和实验室检测结果,判定此次食物中毒为金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒。2016年4月4日在牛奶供应站采集的牛奶样品与中毒事件发生当天冰激凌制作所用的牛奶批次不同,检出的金黄色葡萄球菌PFGE型别与中毒菌株不同,但该批次牛奶中检出产肠毒素金黄色葡萄球菌的结果提示,奶站供应的生鲜乳持续存在引起食物中毒的风险。

金黄色葡萄球菌可产生多种致病性物质,如毒素、酶类和菌体的一些成分,肠毒素在金黄色葡萄球菌的致病性中起着重要的作用^[12]。乳及乳制品是极易污染金黄色葡萄球菌的食品,我国原料奶中金黄色葡萄球菌的污染率一般在15%~30%,由其

引起的食物中毒事件频发^[13-15]。建议政府监管部门加强对食品尤其是乳与乳制品加工、贮藏、销售环节的监管及控制,特别是加强对农村小作坊、小摊贩违法生产、经营行为的排查,并加强对从业人员的教育培训,提高从业人员的食品安全意识和责任意识,以预防和控制食品中金黄色葡萄球菌及其肠毒素的污染,减少和避免类似食物中毒事件的发生。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验:GB 4789. 4—2010[S].北京:中国标准出版社,2010.

[2] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验:GB 4789. 5—2012[S].北京:中国标准出版社,2012.

[3] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. 食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验:GB/T 4789. 6—2003[S].北京:中国标准出版社,2003.

[4] 中华人民共和国卫生部. 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. 10—2010[S].北京:中国标准出版社,2010.

[5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验:GB 4789. 14—2014[S].北京:中国标准出版社,2014.

[6] 中华人民共和国卫生部. 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:GB 4789. 30—2010[S].北京:中国标准出版社,2010.

[7] 中华人民共和国卫生部. 感染性腹泻诊断标准:WS 271—2007[S].北京:人民卫生出版社,2007.

[8] 中华人民共和国卫生部. 细菌性和阿米巴性痢疾诊断标准:WS 287—2008[S].北京:人民卫生出版社,2008.

[9] 国家食品安全风险评估中心. 2016 年食源性疾病监测工作手册[Z]. 2016.

[10] Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A9 methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

[11] 中华人民共和国卫生部. 葡萄球菌食物中毒诊断标准及处理原则:WS/T 80—1996 [S]. 北京:中国标准出版社,1996.

[12] 梁毅珊. 金黄色葡萄球菌肠毒素及其检测方法的研究进展[J]. 中国热带医学, 2008, 8(9): 1658-1659.

[13] 陈艳, 刘秀梅, 樊永祥, 等. 2004 年中国食源性疾病暴发事件监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20 (6): 503-506.

[14] 刘秀梅, 陈艳, 郭云昌, 等. 2005 年中国食源性疾病暴发事件监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20 (6): 506-509.

[15] 崔莹, 张丁, 张秀丽. 一起由金黄色葡萄球菌及其肠毒素引起的食物中毒实验室分析[J]. 中国卫生检验, 2014, 24 (8): 1162-1164.

· 资 讯 ·

欧盟修订豆类蔬菜等食品中多效唑等农药最大残留限量

2019 年 1 月 18 日, 欧盟委员会发布法规(EU)2019/89, 对欧盟议会和理事会条例(EC)No 396/2005《食品中农药最大残留限量》的附件 II、III 和 V 进行修订, 对豆类蔬菜等食品中溴敌隆(bromadiolone)、依托芬酯(etofenprox)、多效唑(paclobutrazol)和戊康唑(penconazole)的最大残留限量进行修订, 修订后的限量标准自欧盟官方公报发布后起第 20 日生效。部分修订限量如下:

序号	农药名称	商品名称	MRL/(mg/kg)
1	溴敌隆	新鲜蔬菜或冷冻蔬菜	0. 01
2	依托芬酯	树坚果	0. 01
3	多效唑(成分异构体的总和)	树坚果	0. 01
		块根和块茎蔬菜	0. 01
4	戊康唑	番茄	0. 1

(来源食品伙伴网, 相关链接: <http://news.foodmate.net/2019/01/504282.html>)