

研究报告

两起肠炎沙门菌所致食物中毒的病原学研究及溯源分析

王炳发¹, 曹春远¹, 陈前进^{1,2}, 林英华¹, 廖琳虹¹, 何春荣¹, 李美华¹

(1. 龙岩市疾病预防控制中心, 福建 龙岩 364000;

2. 福建医科大学龙岩市疾病预防控制中心教学点, 福建 龙岩 364000)

摘要:目的 探讨两起同地区连续发生的肠炎沙门菌食物中毒分离株之间的分子流行病学关系。方法 参照 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》方法进行病原分离培养,对检出菌株进行表型鉴定;用 VITEK-II Compact 全自动微生物分析系统检测菌株抗生素敏感性;采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术对检出菌株进行分子分型和流行病学特征分析。结果 共检出 23 株肠炎沙门菌,其中从 25 份患者肛拭样本中检出 17 株,8 份从业人员肛拭样本中检出 2 株,8 份留样食物中检出 3 株,厨具涂抹样本中检出 1 株。23 株肠炎沙门菌血清抗原式均相同(9: g, m: -);生物学性状和药敏试验结果基本一致;PFGE 图谱带型完全一致(相似度为 100%),且与当地散发病例 PFGE 图谱带型相似。结论 综合流行病学调查、病原学检测和分子分型结果,证实这两起食物中毒是由同一来源的肠炎沙门菌污染所引起。

关键词:肠炎沙门菌;食源性疾病;脉冲场凝胶电泳;耐药性;食源性致病菌;食物中毒;分子分型;溯源

中图分类号:R155;Q93-3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)01-0032-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.01.007

An etiological survey and traceability analysis on two foodborne outbreak caused by *Salmonella enteritidis*

WANG Bing-fa, CAO Chun-yuan, CHEN Qian-jin, LIN Ying-hua, LIAO Lin-hong, HE Chun-rong, LI Mei-hua

(Longyan Center for Disease Control and Prevention, Fujian Longyan 364000, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular epidemiological relationship of *Salmonella enteritidis* strains isolated from 2 food poisoning events occurred successively in the same location. **Methods** Pathogen isolation and culture was conducted according to GB 4789.4-2010. The phenotype of isolates were identified. VITEK-II compact automatic bacteria identification system was used for the antibiotic resistance analysis. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was used for the molecular subtyping and epidemiological characteristics analysis. **Results** 23 strains of *Salmonella* were isolated, among which 17 strains were isolated from anal swab specimens of 25 patients, 2 strains from 8 employees, 3 strains from reserved sample of food and 1 strain from kitchenware. Serum antigen type were (9: g, m: -). The result of the biological characteristic and antibiotic resistance analysis were basically the same. PFGE pattern were the same. **Conclusion** Epidemiological investigation, pathogen detection and molecular typing indicated that these two cases of foodborne outbreaks were caused by the same source of *Salmonella enteritidis* contamination.

Key words: *Salmonella enteritidis*; foodborne disease; pulsed field gel electrophoresis; antibiotic resistance; foodborne pathogenic bacteria; food poisoning; molecular typing; trace to the source

沙门菌在自然界分布广泛,有 2 500 种以上血清型,是重要的人兽共患病原菌,广泛分布于家畜、

野禽、鼠类等各种动物的肠道和内脏,世界卫生组织(WHO)把沙门菌列入中等或严重的食物传染性病原菌,沙门菌是引起我国食源性疾病的主要致病菌,肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌、猪霍乱沙门菌等较为常见。沙门菌感染后能够产生发热、腹泻、腹痛,甚至伤寒、败血症等。近年来在美国发生了多起轰动全球的沙门菌感染事件^[1-2]。沙门菌感染在我国细菌性食物中毒中较常见,占感染总数的 70%~80%^[3]。2014 年 10 月 14 日,福建省龙岩市发生两

收稿日期:2015-09-18

基金项目:福建省卫生厅青年科研课题项目(2014-1-96);2014 年龙岩市第二批科技项目(2014LY29)

作者简介:王炳发 男 副主任技师 研究方向为传染性疾病预防与实验室检测 E-mail:lyedcbf@sina.com

通信作者:陈前进 男 主任技师 研究方向为传染性疾病预防与控制 E-mail:chenqj222@sina.com

起由肠炎沙门菌污染食物所致食物中毒事件。本研究采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型方法对两起事件中检出的菌株进行分子分型和流行病学特征分析,为疾病防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

沙门菌标准株 H9812、沙门菌研究用标准菌株(ATCC 13076)均购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.1.2 样本采集

采集 33 份肛拭样本(患者 25 份,从业人员 8 份),2 份末梢水(某酒家厨房),4 份厨房用具(菜刀 2 份、砧板 2 份)涂抹样本,2 份餐具(方盘、汤碗),4 份调味品(包括猪油、蒜蓉辣酱、锦珍老抽、五羊蚝油),某酒家食物未留样,采集当日宾客打包回家剩余食物 8 份(包括鸡蛋干、笋干肉、焖肉、鸭汤、猪脚包、酱鸭、鱿鱼)。

1.1.3 主要仪器与试剂

VITEK 浊度仪、VITEK-II Compact 全自动微生物分析系统均购自法国 bioMérieux,脉冲场凝胶电泳仪、凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad,水浴摇床。

缓冲蛋白胨水、亚硫酸铋琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂、四硫磺酸钠煌绿增菌液、亚硒酸盐胱氨酸增菌液均购自英国 Oxoid,沙门菌选择性培养基(HE,北京陆桥技术有限责任公司),VITEK GN 鉴定卡(法国 bioMérieux),沙门菌诊断血清(泰国 S&A),Seakem Gold Agarose 低熔点琼脂糖(美国 Cambrex),蛋白酶 K(德国 Merck),限制性内切酶 *Xba* I 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 背景资料及现场调查

龙岩市 X 区 S 镇某酒家,2014 年 10 月 14 日共承办 3 场宴席,中午婚宴 51 桌(约 400 人)、满月宴 15 桌(约 120 人),晚上婚宴 7 桌(约 50 人),无散客,总就餐人数约 570 人。2014 年 10 月 15 日 18:40、19:50、21:45 X 区疾病预防控制中心(简称为疾控中心)分别接到 S 镇卫生院、区人民医院和市第一医院报告,有多名参加某酒家宴席后出现以“腹泻、发热、呕吐”等症状为主诉的患者。接到报告后,X 区疾控中心立即组织人员分别前往 3 家医院和该酒家进行流行病学调查及样本采集,同时调查可疑食品和加工环境卫生状况,追踪可疑食品。

1.2.2 菌株分离鉴定

细菌分离鉴定根据 GB 4789.4—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门菌检验》^[4]进

行。即对所有样本先进行增菌,接种选择性平板。在选择性平板上挑取可疑菌落,革兰染色显微镜镜检为革兰阴性杆菌、氧化酶阴性、三糖铁琼脂发酵葡萄糖产酸产气、不发酵乳糖与蔗糖、硫化氢阳性,用 VITEK II Compact 全自动微生物分析系统进行系统生化鉴定,确定沙门菌属。沙门菌研究用标准菌株为(ATCC 13076)。

1.2.3 血清学分型

用生理盐水做对照。先用沙门菌属多价诊断血清进行玻片凝集试验,呈阳性反应者再与该血清所包含的单价血清做凝集,单价血清呈强凝集者,根据 Kauffman-White 血清分型标准,确定每株菌的血清型别。

1.2.4 药敏试验

根据美国临床实验标准委员会 NCCLS(2012 年版)推荐的肠杆菌科抗生素,采用 VITEK II Compact AST-GN08 药敏卡检测,按照说明书进行操作。

1.2.5 PFGE 分型

参照国际食源性致病菌病原细菌分子分型监测网络(PulseNet)中沙门菌 PFGE 分型的标准操作方法进行,使用 *Xba* I 限制性内切酶(40 U),37 ℃ 酶切 3 h;电泳参数 2.2 ~ 63.8 s,19 h;胶块电泳后使用 GelRed 染色,脱色后读取电泳图谱;沙门菌标准株 H9812 的分子量作为分子量标准。PFGE 图像录入 BioNumerics 软件,非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析,相似系数用 *Dice* 表示。

2 结果

2.1 流行病学调查结果

通过查阅当地卫生院和区、市医院等多个医疗机构门诊记录,并按照宴席召集者提供的名单进行病例搜索,共搜索到 25 例(午宴 22 例、晚宴 3 例)就诊病人,涉及到 3 批宴席,分散于各桌就餐。首发病例:男,66 岁,2014 年 10 月 14 日参加中午婚宴,2014 年 10 月 14 日 18:00(餐后 5.5 h)出现腹泻(8 次/当天)、发热(39.0 ℃)、腹痛、恶心、头痛、头晕等症状,无紫绀、呼吸困难等症状,随后到卫生院就诊,经抗生素(头孢唑肟钠)、西米替丁和对症、补液等治疗,3 d 后痊愈。25 例就诊病例均有腹泻,呈水样便或稀便,腹痛 24 例、发热(腋下 ≥ 38 ℃)20 例、恶心 18 例、头痛 17 例、头晕 17 例、呕吐 6 例,潜伏期最短 5.5 h,最长 28.5 h,平均 17.7 h;最小 5 岁,最大 71 岁,平均年龄 36.9 岁;男性 14 人,女性 11 人。

午/晚宴均有 20 道菜,菜名共有 30 种,其中 8 种菜名在 3 批宴席中均有出现,包括早生贵子(花

生糖果)、鸭汤、猪肚汤、牛肉、猪脚包、炒面、冷盘(冷盘由牛肉、鸡蛋干、猪心3种菜组成)和水果,所调查病例均有食用。酒家所使用的食品原料分别在8个供货商中采购,供货商经营与既往比较未发生变化。该酒家厨房卫生状况较差,厨房内无功能分区,未设置粗加工间、餐具洗消间、食品库房。砧板、刀具分别存放于地面上的铝锅内,未加盖,无生、熟食品使用标识,厨房内未见餐具消毒柜,未设置熟食凉菜专间,未配备留样冰箱,未按规定留样,未取得《餐饮服务许可证》开展餐饮服务经营活动,从业人员均无健康证,调查发现近期均无腹痛、腹泻症状。

2.2 实验室检测结果

2.2.1 病原菌分离培养鉴定结果

在25份患者肛拭样本中,检出17株肠炎沙门菌。8份从业人员肛拭样本中,检出2株肠炎沙门菌(其中1人主要负责蒸汤,另1人主要负责切

菜);2份末梢水中未检出致病菌,但菌落总数、总大肠菌群均高于标准;4份厨房用具中,从砧板涂抹样中检出1株肠炎沙门菌;2份餐具均检出大肠菌群;8份剩余食物中,检出3株肠炎沙门菌(焖肉、猪脚包、鸡蛋干);4份调味品未检出致病菌。23株分离菌经系统生化鉴定,均为沙门菌属;23株分离菌均与沙门菌属多价血清发生凝集,与单价O1、O9发生凝集反应,与H相血清Hg、m发生凝集反应,生理盐水对照均无自凝现象。根据Kauffman-White血清分型标准,判定23株沙门菌血清型均为肠炎沙门菌(1,9:g,m:-),且均为肠炎沙门菌。

2.2.2 药敏试验结果

两起事件肠炎沙门菌分离株,除1株分离自1例10岁男孩外,其余22株具有相同的耐药谱,其中对头孢替坦、头孢唑啉、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素均耐药,对环丙沙星、左氧氟沙星、复方新诺明均敏感。结果见表1。

表1 肠炎沙门菌药敏试验结果($n=23$)

Table 1 Results of antimicrobial susceptibility testing of *S. enteritidis*

药物种类	药物名称	耐药		中介		敏感	
		株数/株	比例/%	株数/株	比例/%	株数/株	比例/%
青霉素类	氨苄西林	1	4.3	0	0	22	95.7
	头孢他啶	1	4.3	0	0	22	95.7
	头孢吡肟	1	4.3	0	0	22	95.7
头孢菌素类	头孢曲松	1	4.3	0	0	22	95.7
	头孢替坦	23	100	0	0	0	0
	头孢唑啉	23	100	0	0	0	0
碳青霉烯类	亚胺培南	1	4.3	0	0	22	95.7
	厄他培南	1	4.3	0	0	22	95.7
单环β内酰胺酶类	氨基南	1	4.3	0	0	22	95.7
头孢复合制剂	氨苄西林/舒巴坦	1	4.3	0	0	22	95.7
	哌拉西林/他唑巴坦	1	4.3	0	0	22	95.7
氨基糖苷类	阿米卡星	23	100	0	0	0	0
	庆大霉素	23	100	0	0	0	0
	妥布霉素	23	100	0	0	0	0
喹诺酮类	环丙沙星	0	0	0	0	23	100
	左氧氟沙星	0	0	0	0	23	100
磺胺类	复方新诺明	0	0	0	0	23	100
呋喃类	呋喃妥因	14	60.9	9	39.1	0	0

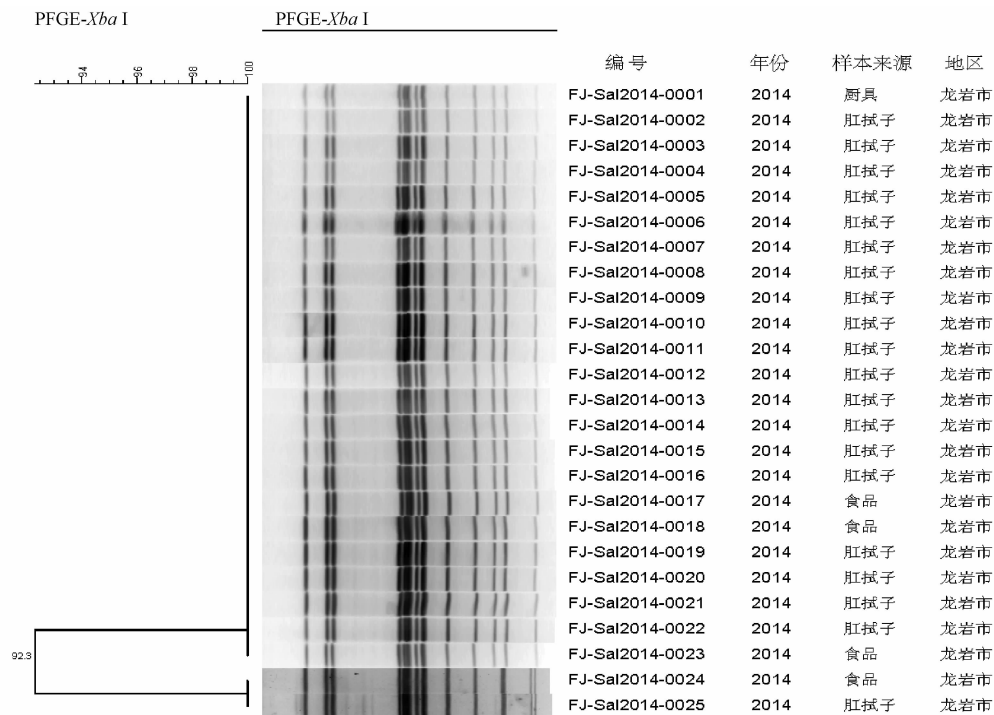
2.2.3 PFGE分型与聚类结果

分离自患者、从业人员、厨房用具和剩余食物中的23株肠炎沙门菌,通过PFGE分型后,均产生13条图谱清晰且带型一致的电泳条带。菌株间聚类分析表明:菌株间条带相似度为100%,且与当地散发肠炎沙门菌PFGE带型相似,提示这可能由同一传染源引起的肠炎沙门菌暴发,图1。

3 讨论

两起事件的食物中毒人员分别在2014年10月14日中午、晚上在同一家酒家就餐过。流行病学调

查发现这两起事件的病例临床特征相似,流行曲线及潜伏期接近,且发生在同一就餐地点不同就餐时间。酒店被相关行政部门控制后未出现相关病例,患者经抗生素及对症治疗痊愈出院。根据流行病学资料及实验室PFGE结果,可以判定两起事件是由于肠炎沙门菌导致食源性疾病的发生。肠炎沙门菌易污染肉类、鱼类、奶类及蛋类食品,且在外环境的生活力较强,在水、牛乳及肉类制品中能生存数月^[3,5],是引起食物中毒的重要病原菌。由于该菌不分解蛋白质,被其污染的食品通常无感官性状的变化,易被忽略。烹调后的熟制品也可再次受



注:FJ-Sal2014-0002-0016、0019、0020 为病人分离菌株;FJ-Sal2014-0021、0022 为从业人员分离菌株;FJ-Sal2014-0001 为厨具分离菌株;FJ-Sal2014-0017、0018、0023 为食物分离菌株;FJ-Sal2014-0024、0025 为当地散发肠炎沙门菌食物中毒分离株

图1 PFGE 聚类分析结果

Figure 1 Results of the PFGE

到带菌容器、烹调工具等的污染,从而加大感染机会。

该酒家厨房卫生状况较差,厨房内无功能分区。砧板、刀具分别存放于地面上的铝锅内,未加盖,无生、熟食品使用标识。从业人员均无健康证,调查发现近期均无发烧、腹痛、腹泻等症状,也没有进食当日供宾客食用的食物。从两名厨工肛肠拭样本中检出的肠炎沙门菌,与两起事件中的患者及砧板上和剩余食物中检出肠炎沙门菌的带型完全一致,说明两名厨工为肠炎沙门菌的携带者。这两起事件的发生可能是两名厨工将所带的肠炎沙门菌污染了食物和用具,患者进食被污染的食物后被感染而引起食物中毒。在此次溯源的过程中及时采集到厨工的肛肠拭子、厨房用具涂抹样本,特别是在无留样的情况下,在流行病学调查过程中了解到部分宾客有剩余打包的食物,在确认无受到污染的情况下采集到8份样品。确保了在传播路径的各个环节都能分离到致病菌,从而形成一个完整的证据链。说明对于食源性疾病的采样务必做到及时、准确、全面,以免影响对事件性质的判断。PFGE已作为众多国家公共卫生实验室用以区分暴发菌株和溯源的“金标准”^[6-9],在这两起食物中毒事件中,PFGE对于传染源和传播路径的确定起到了关键的作用,将证据链的各个环节有效地串联了起来,为流行病学分析及后续的执法提供了病原学依据。

本次食物中毒中分离的肠炎沙门菌与同一时期2014年9月18日另一起食物中毒中分离到的两株沙门菌(FJ-Sal-2014-0024来源于食物,FJ-Sal-2014-0025来源于厨师肛肠拭)的相似系数>90%,属于同一克隆系,遗传关系密切。说明本地区该克隆株有可能为优势株,今后应将本地区不同年份、不同来源的分离株进行PFGE分子分型,完善本地区的食源性调查网络分子分型数据库。当地食品监管部门应加强本地区食品卫生监管,餐饮行业从业人员必须定期进行健康检查,加强食物中毒事件的监控及风险评估,开展包括健康宣传教育在内的食物中毒防控,防止类似食物中毒事件再次发生。

本次食物中毒分离的23株肠炎沙门菌对18种抗生素的耐药谱基本相同。除1株从10岁儿童患者分离到的肠炎沙门菌仅对环丙沙星、左氧氟沙星、复方新诺明敏感外,其余菌株对15种抗生素均耐药,提示临床儿科医生应谨慎使用抗生素。另外22株肠炎沙门菌耐药谱一致,对氨基糖苷类(阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素)、部分头孢菌素类(头孢替坦、头孢唑啉)完全耐药,对呋喃妥因耐药(60.9%)及中度敏感(39.1%),其余抗生素均敏感,与杨晋川^[9]、丁水军^[10]等的药敏研究结果有一定差异。本次研究发现此次事件中肠炎沙门菌的多重耐药现象严重,多重耐药菌达到60.9%(14/23)。此外本次事件中肠炎沙门菌与当地散发

的肠炎沙门菌表现出不同的耐药谱,说明同一克隆系的肠炎沙门菌株在龙岩当地已经形成了不同的耐药谱,提示应加强沙门菌耐药株的监控,临床应加强对抗生素使用的科学管理,尽可能在应用抗生素前,通过调查发病前的饮食史,患者症状及病原学诊断,结合药敏结果合理使用抗生素,避免经验用药,减少耐药株的产生。

(志谢 本文 PFGE 实验检测与分析得到福建省疾病预防控制中心细菌科的指导和帮助,特此表示感谢)

参考文献

- [1] Hedican E, Miller B, Ziemer B, et al. *Salmonellas* is outbreak due to chicken contact laeding to a foodborne outbreak associated with infected delicatessen workers [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2010, 7 (8): 995-997.
- [2] Schneider J L, White P L, Weiss J. Multistate outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Newport infections associated with ground beef, October to December 2007 [J]. *J Food Prot*, 2011, 74 (8): 1315-1319.
- [3] 张代涛, 阚颀. 沙门菌属分子分型技术研究进展 [J]. 中国人

兽共患病学报, 2009, 25 (5): 465-468.

- [4] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 4—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门菌检验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [5] Humphrey T J, Baskerville A, Mawer S, et al. *Salmonella enteritidis* phage type 4 from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected eggs [J]. *Epidemiol Infect*, 1989, 103 (3): 415-423.
- [6] 佐藤静夫. 鸡肠炎沙门氏菌感染症及防制效果 [J]. 中国家禽, 1996 (8): 39-40.
- [7] Thong K L, Ngeow Y F, Altwegg M, et al. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33 (5): 1070-1074.
- [8] Landeras E, Gonzalez-Hevia M A, Alzugaray R, et al. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella enteritidis* by ribotyping [J]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34 (9): 2294-2296.
- [9] 杨晋川, 夏杨, 郭惠, 等. 一起由肠炎沙门菌所致食源性疾病暴发疫情的病原学研究 [J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47 (2): 160-163.
- [10] 丁水军, 陈棋炯, 孙永祥, 等. 食物中毒肠炎沙门菌的生物学特性及分子分型研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20 (6): 1326-1328.

研究报告

椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒的病原分离鉴定

李晓琍, 杨祖顺, 国译丹, 周慧新, 范璐, 李璘
(云南省疾病预防控制中心, 云南 昆明 650022)

摘要:目的 通过对食物中毒病原菌的分离鉴定, 为查明中毒原因提供科学依据。方法 分离鉴定和毒性试验按照国家标准方法 WS/T 12—1996《椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒诊断标准及处理原则》和 GB/T 4789. 29—2003《食品卫生微生物学检验椰毒假单胞菌酵米面亚种检验》进行。米酵菌酸检测按照 GB/T 11675—2003《银耳卫生标准》执行, 采用液相色谱-质谱联用法对样品开展检测。结果 经 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物生化鉴定仪和基因指纹鉴定仪进行鉴定, 4 份样品中 3 份鉴定结果为唐菖蒲伯克霍尔德菌, 小鼠毒性试验阳性。4 份样品均检测出米酵菌酸。结论 本次食物中毒源于食源性椰毒假单胞菌酵米面亚种污染。

关键词:椰毒假单胞菌酵米面亚种; 食物中毒; 鉴定; 米酵菌酸; 食源性致病菌; 云南

中图分类号: R155; Q93-3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)01-0036-04

DOI: 10. 13590/j. cjfh. 2016. 01. 008

Isolation and identification of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farino fermentans* from food poisoning accident

LI Xiao-li, YANG Zu-shun, GUO Yi-dan, ZHOU Hui-xin, FAN Lu, LI Ying
(Yunnan Center of Disease Control and Prevention, Kunming Yunnan 650022, China)

Abstract: Objective To investigate the pathogen of a food poisoning accident and provide scientific evidence to identify

收稿日期: 2015-09-18

基金项目: 云南省卫生科技计划项目 (2014NS351)

作者简介: 李晓琍 女 主任技师 研究方向为卫生微生物 E-mail: 840700051@qq.com

通信作者: 杨祖顺 男 副主任技师 研究方向为食品安全风险监测 E-mail: 780187842@qq.com