



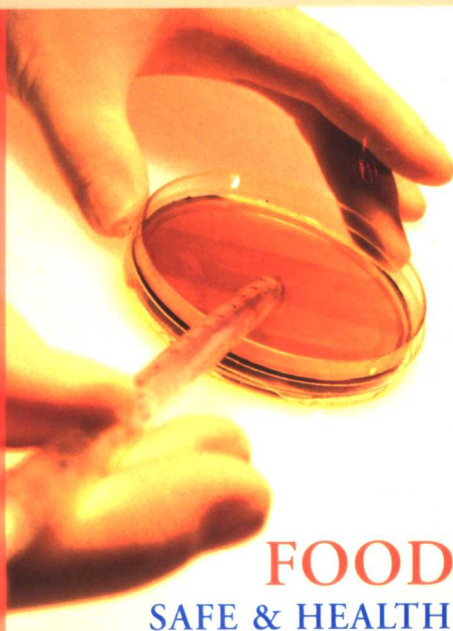
食品安全与健康系列

SHIPIN ANQUAN YU JIANKANG XILIE

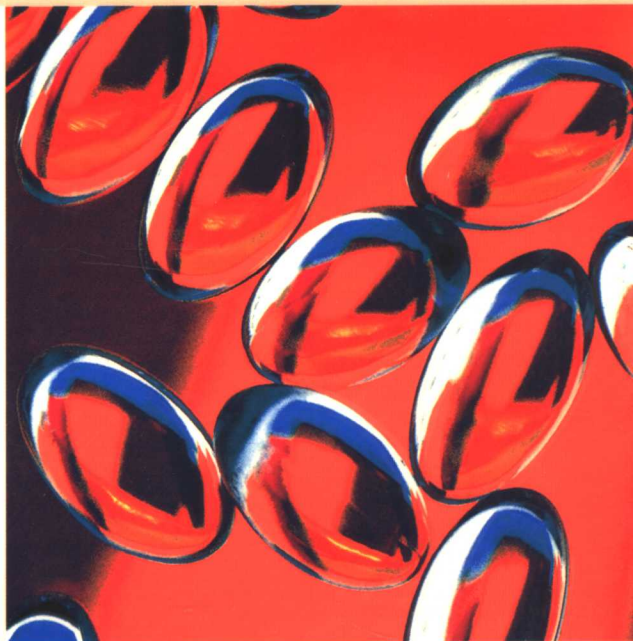
食源性病原微生物及防控

Precaution and Control of
Pathogenic Microorganism in Food

刘绍军 主编



FOOD
SAFE & HEALTH



中国轻工业出版社



食 品 安 全 与 健 康 系 列

SHIPIN ANQUAN YU JIANKANG XILIE

食源性病原微生物及防控

刘绍军 主 编

周丽艳 刘秀清 崔蕊静 副主编



中国轻工业出版社

图书在版编目(CIP)数据

食源性病原微生物及防控 / 刘绍军主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2006. 5
(食品安全与健康系列)
ISBN 7-5019-5311-2

I. 食... II. 刘... III. ①食物性传染病—病原微生物—基本知识②食物中毒—病原微生物—基本知识
IV. ①R512.99②R595.7③R372

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 019159 号

责任编辑: 姚怀芝 涂润林

策划编辑: 白洁 责任终审: 劳国强 封面设计: 王佳芃
版式设计: 马金路 责任校对: 燕杰 责任监印: 胡兵

出版发行: 中国轻工业出版社(北京东长安街6号, 邮编: 100740)

印刷: 利森达印务有限公司

经销: 各地新华书店

版次: 2006年5月第1版第1次印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 8.75

字数: 212千字

书号: ISBN 7-5019-5311-2/TS·3093 定价: 20.00元

读者服务部邮购热线电话: 010-65241695 85111729 传真: 85111730

发行电话: 010-85119817 65128898 传真: 85113293

网址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换

50942K1X101ZBW

前 言

随着人类社会的持续发展和人民生活水平的日益提高,人们对食品安全性的要求也越来越严格,食品质量与安全已经成为全世界共同关注的重大问题,它不仅关系到广大消费者的经济利益,更重要的是关系到人类的健康状况乃至生命安全。食品安全已经成为一个至关重要的全球性课题。

食品中含有人类需要的各种营养物质,同时也是各种微生物生长繁殖的良好培养基。在食品生产、加工、贮运、销售及消费等环节中,一些有害微生物的污染和活动影响了食品的卫生质量,甚至给消费者带来严重的危害。近年来,由微生物引起的食源性疾病在食品安全事件中占有很大比例并有上升趋势。了解食源性病原微生物的特性,对食品实行从田地到餐桌全过程的有效控制,无论对食品专业人员还是对普通消费者来说都具有重要的现实意义。故此,笔者搜集整理了关于食源性病原微生物的大量资料,撰写本书,专门介绍食源性病原微生物的生物学特性、致病性、对环境的抵抗力、相关事件和防控方法,旨在帮助读者了解食源性病原微生物的有关知识,尽量避免有害微生物的危害,减少食品卫生事件的发生。

本书第一章由河北科技师范学院刘绍军、周丽艳和唐山市开平区医院刘秀清完成,第二章由河北科技师范学院刘绍军、崔蕊静、李润丰完成,第三章由河北科技师范学院刘绍军、赵希艳、朱凤妹完成,第四章由河北科技师范学院刘绍军、李汉臣、张建才、刘畅完成。

由于编写人员水平所限,书中内容可能存在缺点错误,恳请读者批评指正。

目 录

第一章 与畜产品有关的病原微生物.....	1
第一节 沙门氏菌.....	1
第二节 致病性大肠杆菌.....	4
第三节 葡萄球菌.....	8
第四节 肉毒梭菌	13
第五节 李斯特杆菌	16
第六节 结核分枝杆菌	21
第七节 布氏杆菌	25
第八节 炭疽杆菌	28
第九节 多杀性巴氏杆菌	35
第十节 蜡样芽孢杆菌	37
第十一节 志贺氏菌	41
第十二节 变形杆菌	45
第十三节 产气荚膜梭菌	49
第十四节 空肠弯曲杆菌	52
第十五节 丙型肝炎病毒	54
第十六节 丁型肝炎病毒	58
第十七节 戊型肝炎病毒	60
第十八节 疯牛病毒	63
第十九节 口蹄疫病毒	66
第二十节 肾综合征出血热病毒	69
第二十一节 禽流感病毒	72
第二章 与粮油有关的病原微生物	77
第一节 假单胞菌属及其检验	77
第二节 黄曲霉	79
第三节 其它产毒霉菌	82
第三章 与水产品有关的病原微生物	85
第一节 副溶血性弧菌	85
第二节 霍乱弧菌	88
第三节 螺旋体	90
第四节 甲型肝炎病毒	94
第四章 其它病原微生物	97
第一节 猪链球菌病	97
第二节 耶尔森氏菌.....	101
第三节 节菱孢霉.....	106

第四节 非典型性肺炎病毒·····	108
第五节 埃博拉病毒·····	110
第六节 马尔堡病毒·····	113
附录·····	115
附录一 中华人民共和国食品卫生法·····	115
附录二 中华人民共和国传染病防治法·····	121
主要参考文献·····	134

第一章 与畜产品有关的病原微生物

第一节 沙 门 氏 菌

沙门氏菌(*salmonella*)是一种致病性细菌,可引起细菌性食物中毒。1885年沙门氏等在一类霍乱病流行时分离到猪霍乱沙门氏菌,故定名为沙门氏菌属。据统计,在世界各国的细菌性食物中毒事件中,沙门氏菌引起的食物中毒常列榜首,我国内陆地区食物中毒事件中也以沙门氏菌为首位。沙门氏菌主要寄居在人和温血动物的肠道内,可引起多种性质的疾病,根据其致病范围的不同,可将它们分为以下三大类群。第一群:专门对人致病的沙门氏菌,如伤寒沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌;第二群:专门对动物致病的沙门氏菌,很少感染人,如马流产沙门氏菌、雏白痢沙门氏菌等,近年来也有感染人的报道;第三群:引起人类食物中毒的沙门氏菌称之为食物中毒沙门氏菌群,如鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、纽波特沙门氏菌等。

一、生物学特性

1. 菌体形态

在1000倍显微镜下,沙门氏菌为革兰氏阴性短小杆菌,两端钝圆,大小约为 $(1\sim3)\mu\text{m}\times(0.4\sim0.9)\mu\text{m}$,不产生荚膜和芽孢,除鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌外,均具有周身鞭毛,能运动,多数细菌具有菌毛,能吸附于细胞表面或凝集豚鼠的红细胞。

2. 培养特性

沙门氏菌为需氧及兼性厌氧菌,最适生长温度为 37°C ,在 $10\sim42^{\circ}\text{C}$ 范围内均生长。最适生长pH为6.8~7.8。对营养要求不高,在普通琼脂培养基上均能生长良好,培养24h,可形成中等大小、圆形、表面光滑、无色半透明、边缘整齐的菌落,但有些菌种如鸡白痢、鸡伤寒和羊流产沙门氏菌形成菌落较小。本菌在S.S琼脂上生成无色半透明的菌落,如果是产生 H_2S 的菌株,菌落中心带黑色;在远藤氏琼脂上形成淡粉色或无色菌落;在胆盐(煌绿或亚硝酸盐)肉汤中生长良好,均匀混浊。

3. 生化特性

沙门氏菌的生化特性比较一致,但也有个别菌株的个别特性有差异。本属菌可发酵葡萄糖、麦芽糖、甘露醇和山梨醇产酸产气;不发酵乳糖、蔗糖和侧金盏花醇;吲哚试验和V-P反应阴性;不水解尿素和对苯丙氨酸不脱氨。伤寒、鸡伤寒及部分鸡白痢沙门氏菌不发酵麦芽糖。除鸡白痢、猪伤寒、甲型副伤寒、伤寒和仙台等沙门氏菌外,均能利用柠檬酸盐。除牛流产等少数沙门氏菌外,凡第一亚属的菌型都不能液化明胶。

4. 血清学特性

沙门氏菌抗原结构复杂,一般沙门氏菌具有菌体(O)抗原、鞭毛(H)抗原和表面(Vi)抗原(荚膜或包膜抗原)三种抗原。

O 抗原: 存在于菌体表面,其化学性质为类脂-多糖-多肽复合物,由多糖决定其特异性。该抗原对热稳定。一个菌体有一种或多种不同的 O 抗原。沙门氏菌的 O 抗原共有 65 种,以阿拉伯数字 1、2、3……代表,有的 O 抗原是几个菌群共有的,如 1、5、6、12 等,这些被称为次要抗原,有些 O 抗原是某一菌群特有的,如 2、3、4、7、8、9、10、11 等,其它菌群不具有,这些抗原被称为主要抗原。根据主要抗原可将沙门氏菌属分为 50 个 O 群,即由 OA 至 OZ 和 O51 至 O67。由人及温血动物中分离到的沙门氏菌 98% 以上在 A 至 E 群中。

H 抗原: 存在于鞭毛中,其化学性质是蛋白质,由肽链中氨基酸的排列顺序及空间构型决定其特异性。该抗原不耐热,酒精也可破坏其抗原性。H 抗原常常有两相的变异。第一相为特异相,用英文小写字母表示;第二相为非特异相,用阿拉伯数字表示,但也有少数菌含有第一相中的抗原 e、n、x 等成分。凡有两相抗原的成为双相菌,大多数沙门氏菌属此类。含有一相 H 抗原的成为单相菌,如肠炎沙门氏菌。极少数无鞭毛细菌两相抗原均没有,成为无相菌,如鸡白痢沙门氏菌。

Vi 抗原: 少数沙门氏菌,如丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌,新分离出来的菌株,常具有这种包膜(Vi)抗原,经过几次传代、60℃ 加热处理或石炭酸处理易于消失,Vi 抗原可阻止 O 抗原与抗体结合,因此要进行 O 凝集反应,必须先去掉 Vi 抗原。

二、致病性

沙门氏菌引起的食物中毒一般认为包括两个方面:一方面是沙门氏菌大量地随食物进入人体内,首先在肠道中大量繁殖,然后经淋巴系统侵入血液,造成一过性的菌血症,引起感染;另一方面是肠道和血液内的沙门氏菌细胞在人体免疫系统的作用下发生裂解,释放出大量的菌体内毒素,使人体组织中毒,出现中毒症状。沙门氏菌食物中毒的主要症状是急性胃肠炎。潜伏期一般为 6~12h,长者可达 24h,临床上表现为头痛、恶心、面色苍白、出冷汗,继而出现呕吐、腹泻、体温升高,达 38~40℃,有水样大便,有时还带有脓血和黏液,重者出现寒战、惊厥抽搐和昏迷等,病程一般为 3~7d。

三、对外界环境的抵抗力

本菌在水中能存活 2~3 周,在粪便中能存活 2~3 个月,在牛乳及肉类中能存活数月,在含有 10%~15% 食盐的腌肉中可存活 2~3 个月。对消毒剂及外界不良环境抵抗力较弱。当烹煮食品时,若食品内部达不到足以杀死本菌的温度条件,本菌可存活下去,由此常常引起食物中毒。本菌对低温的抵抗力较强,在 -25℃ 低温下可存活 10 个月左右。

四、传播途径与方式

沙门氏菌对各种食品都可以造成污染,特别是动物性食品被污染的机会更多。沙门氏菌污染食品的途径主要有两种:一种为内源性污染,因为沙门氏菌广泛地存在于各种动物的肠道中,甚至存在于内脏和禽、鸟的蛋中,因此,被屠宰的畜禽机体在生前就可能带菌,且会在机体抵抗力下降,条件适宜时进入血液、内脏和肌肉,造成动物性食品的内源污染。另一种为外源性污染,因为沙门氏菌分布广泛,可以通过粪便污染各处环境、用具等,造成食品在原料生产、加工、运输、贮存、销售和消费等过程中被沙门氏菌污染。这些沙门氏菌遇到适宜条件就会在食品中大量生长繁殖,食品中的沙门氏菌达到一定数量就会造成食物中毒。

五、相关事件

世界上最大的沙门氏菌食物中毒事件于 1953 年发生在瑞典,因食用猪肉引起 7 717 人鼠伤寒沙门氏菌中毒,90 人死亡。

1977 年食品的沙门氏菌污染造成德国经济损失达 2.4 亿马克。

2001 年我国广东省某中学 81 名学生在校晚餐后出现腹痛、发热、头晕等症状,个别学生呕吐、腹泻等。经当地卫生部门、公安机关查实,此次食物中毒事件致病菌是都柏林沙门氏菌,中毒原因是因为致病菌交叉污染食物引起。

六、防 控

沙门氏菌食物中毒的预防,除加强一般食品卫生管理监测外,还应注意下列各点:

- (1) 严禁食用病死畜禽;
- (2) 严格执行急宰牲畜的肉产品的处理办法;
- (3) 严格执行生、熟食品分开制度;
- (4) 未变质的剩菜、饭等食品充分加热后再食用;
- (5) 肉类至少应蒸煮到肉块中心呈现灰白硬固的熟肉状态;
- (6) 鸡蛋应煮沸 8min 以上,鸭蛋应煮沸 10min 以上;
- (7) 禁止家畜、家禽进入厨房和其它食品加工场所;
- (8) 彻底消灭厨房、食品加工厂、贮藏室和食堂等处的苍蝇和老鼠等;
- (9) 注意饮食、饮水卫生。炊具、食具必须经常清洗、消毒;
- (10) 注意食品的加工管理。对牲畜的屠宰要定期进行卫生检查,屠宰过程要遵守卫生操作规程,以避免肠道细菌污染肉类。在肉类、牛乳等加工、运输、贮藏过程中必须注意清洁、消毒。

七、检验及诊断

根据中华人民共和国国家标准《食品卫生检验方法微生物学部分》的沙门氏菌检验方法 GB/T 4789.4—2003,它包括五个基本步骤:

前增菌,用无选择性使濒死状态的沙门氏菌恢复活力;选择性增菌,用选择性培养基,使沙门氏菌得以增殖,而大多数其它细菌受到抑制;选择性平板分离沙门氏菌;生化试验,鉴定到亚属;最后经血清学进行分型鉴定。

1. 前增菌和选择性增菌

蛋品、乳品、冻肉及其它食品均需要前增菌。方法如下:取检样 25g,加入装有 225mL 缓冲蛋白胨水的三角瓶中,待溶解后,于 37℃ 培养 24h,再移取 10mL 加入 100mL 氯化镁孔雀绿增菌液或四硫磺酸钠煌绿增菌液中,于 42℃ 培养 24h,同时另取 10mL 加入 100mL 亚硒酸盐胱氨酸增菌液中,37℃ 培养 24h。鲜肉、鲜蛋、鲜乳或其它未加工的食品不需要前增菌,检样用灭菌盐水 10 倍稀释后可直接接种于选择性增菌液中增菌培养。

2. 分离培养

用接种环挑取一环增菌液分别划线接种于亚硫酸铋琼脂平板和 DHL 琼脂平板(或 HE 琼脂平板、S.S 琼脂平板)各一个,分别于 37℃ 培养 48h 或 24h,观察分离菌落,找出沙门氏

菌的可疑菌落。

3. 生化试验

挑取可疑菌落接种于三糖铁琼脂上,并进行葡萄糖、甘露醇、蔗糖、山梨醇、卫矛醇等发酵试验,再进行 H₂S 试验、尿素水解、胍基质产生、氰化钾、赖氨酸脱羧酶试验和 β -半乳糖苷酶试验(ONPG)进行属及亚属的鉴定。

4. 血清学分型鉴定

抗原的制备:一般采用 1.5%~2.0% 琼脂斜面培养物制备平板凝集抗原,如果 O 血清不凝集,可采用 2.5%~3.0% 琼脂斜面培养物再检查,如果是由于 Vi 抗原阻止凝集反应时,可用生理盐水洗一下,煮沸后,再检查。H 抗原发育不良时,将菌种接种在 0.7%~0.8% 半固体琼脂平板中央,待菌落蔓延生长时,在其边缘部分取菌检验。

抗原式的鉴定:将抗原与 A—F 群多价抗 O 血清作平板凝集试验,同时用生理盐水做对照,在生理盐水中自凝者为粗糙型菌株,不能分型。能被 A—F 多价 O 血清凝集,再依次用 O₂、O₃、O₄、O₇、O₈、O₉、O₁₀ 因子血清做凝集试验,判定 O 群,再用 O 单因子血清最后定型。如果没有 O 单因子血清须用两个 O 复合因子血清进行核对。不被 A—F 多价 O 血清凝集者,先用 57 种或 44 种沙门氏菌因子血清中的 7 种多价 O 血清检查,如果一种血清凝集者,则用其包含的 O 群血清逐一检查,以确定 O 抗原。如果再查表取可能的第一相及第二相抗 H 血清以测定其单相抗原式,再用含有该相抗 H 血清的半固体培养基作成 U 形管,在一端接种被检菌,经培养后在另一端蘸取培养物作纯培养,就得到了有另一相鞭毛的菌种,再用抗 H 单因子血清作凝集试验以测出另一相 H 抗原式。上述全部过程至少需要一周以上时间,如果只作一般性鉴定,可在三糖铁培养基上蘸取可疑菌落进行 A—F 多价抗血清平板凝集试验,即可较快地作出判断和鉴定。

第二节 致病性大肠杆菌

致病性大肠杆菌(*Pathogenic escherichia coli*.)是指那些能够引起人类和动物(尤其是婴儿和幼龄动物)感染及人类食物中毒的一类大肠杆菌。本菌是一类条件性致病菌,在自然界分布广泛,但主要寄居在人类及动物的肠道内。致病性大肠杆菌与非致病性大肠杆菌在形态、培养特性及生化特性上很难区分,但能用血清学方法从抗原结构的差别上进行区分。

一、生物学特性

1. 菌体形态

致病性大肠杆菌属于肠杆菌科埃希氏杆菌属中的细菌,革兰氏阴性,两端钝圆,长 1~3 μ m,宽 0.6 μ m,有时呈卵圆形。本菌周身鞭毛能运动,不产生荚膜,对碱性染料着色良好,有时两端浓染,要注意与巴氏杆菌区别。需氧及兼性厌氧菌,对营养要求不高,在普通琼脂培养基上生长良好,最适生长温度为 37℃,在 15~45℃ 温度范围内均可生长,最适 pH 为 7.2~7.4。

2. 培养特性

新分离出来的大肠杆菌一般是光滑型(S)菌株,在普通琼脂平板上培养 24h 可形成圆形、凸起、光滑、湿润、半透明的或接近无色中等大菌落,与沙门氏菌的菌落很相似,但大肠杆

菌菌落对光(45°角折射)观察可见荧光。在血液培养基上部分菌落出现 β 型溶血。用鉴别培养基培养时,在远腾氏琼脂上形成带金属光泽的红色菌落;在S.S琼脂平板上多不生长,少数生长的细菌形成红色菌落;在伊红美兰琼脂上形成带金属光泽的黑色菌落;在麦康凯琼脂上24h后形成的孤立菌落呈红色。在液体培养基肉汤中培养18~24h后呈均匀混浊,随时间延长,管底出现黏性沉淀。

3. 生化特性

致病性大肠杆菌数量大,菌型繁多,大多数菌生化特性是比较一致的,但也有些不典型菌株的生化特性不规则。一般生化特性如下:可发酵葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇产酸产气,个别不典型菌株可迟发酵或不发酵乳糖;各菌株对蔗糖、卫矛醇、水杨苷发酵结果不一致。本菌可使赖氨酸脱羧、但苯丙氨酸脱羧为阴性。本菌不产生 H_2S 、不液化明胶、不分解尿素,不能在氯化钾培养基上生长,能产生靛基质,M.R试验阳性,V-P试验阴性,不利用柠檬酸盐。符合最后四项生化特性结果的是典型的大肠埃希氏菌,此外的反应类型为非典型大肠杆菌。

近些年,肠出血性大肠杆菌(EHEC)引起了人们的关注,肠出血性大肠杆菌是能引起人类出血性腹泻和肠炎的一群大肠埃希氏菌,以O157:H7血清型为代表菌株。

EHEC O157:H7属于肠杆菌科埃希氏菌属。革兰氏染色阴性,无芽孢,有鞭毛,动力试验呈阳性。其鞭毛抗原可丢失,动力试验阴性。

EHEC O157:H7具有较强的耐酸性,pH 2.5~3.0,37℃可耐受5h;耐低温,能在冰箱内长期生存;在自然界的水中可存活数周至数月;不耐热,75℃ 1min即被灭活;对氯敏感,被1mg/L的余氯浓度杀灭。EHEC的最适生长温度为33~42℃,37℃繁殖迅速,44~45℃生长不良,45.5℃停止生长。

EHEC O157:H7除不发酵或迟缓发酵山梨醇外,其它常见的生化反应与大肠埃希氏菌基本相似,但也有某些生化反应不完全一致,具有鉴别意义。EHEC O157:H7虽然有uidA基因,但其编码的 β -葡萄糖醛酸酶无活性,不能分解4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷(MUG)产生荧光,即MUG阴性。

4. 血清学特性

致病性大肠杆菌抗原结构非常复杂,主要由菌体抗原(O)、鞭毛抗原(H)和包膜抗原(K)三部分组成。

O抗原:指光滑大肠杆菌的菌体抗原,其组成是细胞壁上的糖、类脂、蛋白质复合物,也是细菌的内毒素,对热非常稳定,经高压蒸汽处理2h而不被破坏。每一种血清型只含有一种O抗原,现已发现本菌共有167种O抗原,分别以阿拉伯数字表示之。

H抗原:指鞭毛抗原,为蛋白质构成。一种大肠杆菌只有一种H抗原。H抗原能被80℃热处理或酒精所破坏,H抗原共有64种。

K抗原:指包于细胞外部的荚膜物质或包膜物质的表面抗原。新分离的大肠杆菌70%具有K抗原。根据K抗原对热的敏感性,可将K抗原分为A、B、L三类,目前发现有103种,致病性大肠杆菌的抗原主要为B抗原,少数为L抗原。B抗原与L抗原均可经煮沸所破坏。L抗原且可被酒精和盐酸所破坏。A抗原可耐受煮沸1h不破坏。

O抗原可将大肠杆菌分成若干血清群,然后再根据K抗原和H抗原进一步分为若干血清型或亚型。根据对大肠杆菌抗原的鉴定,可确定其抗原式,O111:K58(B)H12。一般认为

H 抗原与致病性无关,因此一般不需要进行 H 抗原的鉴定。除上述血清学分型外,还可利用大肠杆菌噬菌体和生化反应的特性进行分型。

EHEC 除其代表菌株 O157:H7 外,还包括 O157:NM、O26:H11、O111:H8、O125:NM、O121:H19、O45:H2、O4:NM、O145:NM、O5:NM、O91:H21、O103:H2、O113:H2 等血清型的部分菌株。血清学鉴定包括 O 抗原和 H 抗原的鉴定。前者可使用玻片凝集试验或胶乳凝集试验;后者则应先进行动力试验,动力活泼者再进行玻片和试管凝集试验。

二、致病性

在致病性大肠杆菌中,有些血清型能引起食物中毒,有些血清型能引起婴儿腹泻与人类肠道内外感染。肠道内感染主要引起腹泻与痢疾样疾患,肠道外感染主要引起尿路感染。还有些血清型主要引起畜禽疾病,危害畜牧业。目前,致病性大肠杆菌的致病性被认为是一个复杂的问题,涉及因素很多,并非由一个单一因子决定的。根据各血清型的致病特点可将致病性大肠杆菌分为三大类,即产毒素性大肠杆菌,侵袭性大肠杆菌和肠道致病性大肠杆菌。

大肠杆菌引起的食物中毒主要表现为急性胃肠炎的症状,其潜伏期为 12~24h,临床表现为呕吐、腹泻(严重的急性腹泻,呈水样便),伴有头痛、发热(体温不超过 39℃)、腹痛等症状,病程一般为 1~3d。

EHEC O157:H7 的另一个显著特征是可产生大量的 Vero 毒素(VT),也称作类志贺氏毒素(SLT),是 EHEC 的主要致病因子。Vero 毒素按免疫原性等方面的不同可分为 VT1 和 VT2。该毒素有一个 A 亚单位和 5~6 个 B 亚单位组成。B 亚单位与宿主肠壁细胞糖脂受体结合,具有毒素活性的 A 亚单位进入细胞,改变 60s 核糖体的组分,干扰蛋白质的合成。编码 VT 的基因位于噬菌体上,可缺失而不产生 VT。

EHEC O157:H7 引起的感染有明显的季节性,多发生于夏秋两季,7~8 月为发病高峰。

在地区分布上,多发生于发达国家,主要以散发性感染为主。

在年龄分布上,儿童与老年人的发病率明显高于其它年龄组。最易分离到 O157:H7 的年龄为 5~9 岁(0.9%)和 50~59 岁(0.89%)。

农场动物,尤其是反刍动物,构成 EHEC O157:H7 在世界范围内的主要贮存宿主。

O157:H7 在牛群中的流行报告范围为 0.1%~16%;羊、猪、鸡、马、鹿、鸽子、海鸥等动物均可能为 EHEC 的携带者。

EHEC 的感染可形成直接传播(动物→人,人→人),也可以通过间接传播(食物→水源→人)。

食源性的 EHEC 感染中,牛肉、生乳、鸡肉及其制品,蔬菜、水果及其制品等均可能受其污染。其中牛肉是最主要的传播载体。

EHEC O157:H7 的感染剂量极低。潜伏期为 310d,病程 2~9d。通常是突然发生剧烈腹痛和水样腹泻,数天后出现出血性腹泻,可发热或不发热,严重者可导致死亡。

三、对外界环境的抵抗力

致病性大肠杆菌具有中等程度的抵抗力,各菌型之间有一定的差异。本菌在土壤、水及粪便中可存活数月以上。本菌对热抵抗力不强,巴氏消毒可杀死绝大多数菌体,仅少数耐热

菌株可存活,但煮沸数分钟即被杀死。本菌对消毒剂敏感,水中若含有 0.2mg/L 游离氯时,即可达到杀死本菌的目的。

四、传播途径与方式

在大肠杆菌中,一般认为能够产生耐热(ST)与不耐热肠毒素(LT)的菌株均可引起食物中毒。致病性大肠杆菌可通过各种途径污染到食品中引起疾病发生。引起食物中毒的食品多为乳与乳制品、肉类、水产品类等。在动物中,牛和猪的带菌是传播本菌引起食物中毒的主要原因。致病性大肠杆菌可以从病人粪便、饮水、未消毒牛乳、肉类、病畜脏器、禽类及可能被人畜粪便污染的各种其它食物中分离出来。本菌引起的食物中毒是感染型和毒素型的综合作用。

五、相关事件

1982 年美国首次报道了由 EHEC O157:H7 引起的出血性肠炎暴发。此后,世界各地陆续报道了该菌引起的感染,并有上升趋势。1996 年在日本发生的 EHEC O157:H7 的暴发流行,引起出血性腹泻,先后波及 30 多个都、府、县,感染近万人,并造成 12 人死亡,引起了全世界的关注。

此外,美国、加拿大、瑞典、澳大利亚、英国的苏格兰和威尔士等国家和地区也相继报道了 EHEC 的散发性感染和暴发流行。日本、加拿大及瑞士等国已将 EHEC O157:H7 列为必须报告的传染病,予以高度重视。

我国于 1988 年首次分离到 EHEC O157:H7,从已有的流行病学调查资料来看,我国亦存在 EHEC 的散发病例,但尚未有暴发流行的报道。

六、防 控

- (1) 要加强食品卫生管理,尽一切可能防止食品污染。
- (2) 杜绝可能被人畜粪便污染的一切环节与途径。
- (3) 食品要充分加热,以消灭污染的大肠杆菌。
- (4) 凉拌菜和熟食(特别是熟肉类)等加工时要注意卫生,菜板、刀具等用具要洗净,要注意防蝇,防止其带菌污染。

七、检验与诊断(大肠杆菌 O157:H7)

1. 培养基制备

改良 EC 新生霉素增菌肉汤 (mEC): EC 肉汤灭菌后添加 20mg/mL 过滤除菌的新生霉素,使终浓度为 20 μ g/mL。

改良山梨醇麦康凯琼脂(TC-SMAC): 山梨醇麦康凯琼脂加入过滤除菌的 1% 亚硝酸钾溶液,使亚硝酸钾浓度达 2.5mg/L,再加入头孢克污,使头孢克污浓度达到 0.05mg/L。

MUG-LST 肉汤: LST 肉汤中添加 4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷(MUG),使终浓度为 0.1g/L。

2. 增菌培养

称取 25g 样品放入 225mL mEC 中,均质。于(41 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 培养 18~24h。

3. 分离

将 mEC 肉汤培养物 10 倍递增稀释。从 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 稀释度各取 0.1mL 涂布于 TC-SMAC 平板。于 $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24h。

可疑 EHEC O157:H7 菌落扁平, 透明或半透明, 边缘光滑, 呈淡褐色中心, 直径约 2mm。

4. 鉴定

挑取 TC-SMAC 上的可疑菌落, 接种 MUG-LST, 于 $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24h, 出现产气, 且无荧光者, 分离到普通营养琼脂。

对纯菌落用 EHEC O157:H7 标准血清或胶乳凝集试剂作凝集试验, 必要时进行生化试验。

在检测过程中, 也可以在选择性增菌后, 取出 5mL 增菌液, 经 100°C 水浴 15min 灭活后, 供自动酶联荧光免疫测试 (VIDAS), 迅速获得初步结果, 阳性反应者需作进一步证实。

用上述方法在样品中分离获得的纯菌落, 经抗大肠杆菌 O157:H7 标准血清或 EHEC O157:H7 胶乳凝集测试为阳性者, 报告检出肠出血性大肠杆菌 O157:H7。

如需要进一步检测 Vero 毒素基因的存在, 可通过接种 Vero 细胞或 Hela 细胞, 观察细胞病变进行判定, 或使用基因探针检测和聚合酶链反应 (PCR) 检测法。

第三节 葡萄球菌

葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 可引起毒素性食物中毒。在食物中毒中, 葡萄球菌引起的食物中毒是一个世界范围的问题, 过去在我国也是比较常见的一种食物中毒。本菌引起的食物中毒主要是由于致病性葡萄球菌产生的肠毒素所引起的。葡萄球菌可产生多种毒素和酶, 主要有: 溶血素、杀白细胞素、肠毒素、凝血酶、DNA 酶、溶纤维蛋白酶、透明质酸酶和脂酶等, 这些毒素和酶与葡萄球菌的致病性有关, 它们可以增强葡萄球菌的毒力和侵袭力。与食物中毒有密切关系的主要是肠毒素。

一、生物学特性

1. 菌体形态

葡萄球菌呈圆形或卵圆形, 直径为 $0.8 \sim 1.0 \mu\text{m}$, 致病性葡萄球菌比非致病性葡萄球菌要小些。本菌繁殖时沿多个平面不规则分裂, 堆成葡萄串状。但在液体培养基和乳汁中, 常呈双或短链排列。易被误认为是双球菌或链球菌。本菌无鞭毛, 无芽孢, 除个别菌株外, 一般不形成荚膜。本菌革兰氏染色呈阳性。

2. 培养特性

葡萄球菌大多数为需氧或兼性厌氧菌, 但在 $20\% \text{CO}_2$ 环境中有利于毒素的产生。本菌对营养要求不高, 在普通培养基上生长良好, 最适生长温度为 37°C , 最适 pH 为 $7.2 \sim 7.4$, 在普通琼脂平板上, 经 18~24h 培养后, 形成圆形隆起、边缘整齐、表面光滑、湿润、不透明的菌落, 直径为 $1 \sim 2 \text{mm}$, 不同菌株可产生不同的色素, 使菌落呈现不同的颜色, 菌落一般在初期呈灰白色, 继而转变为金黄色、白色或柠檬色。在血液琼脂平板上, 多数致病菌可产生溶血素, 呈 β 型溶血, 非致病菌无溶血现象。在普通肉汤中培养 24h 后, 均匀混浊, 2~3d 后能

产生菌膜,管底形成多量黏稠沉淀。

3. 生化特性

葡萄球菌的生化反应并不恒定,常因菌株及培养条件不同而异,本属细菌不产生靛基质, M. R 试验阳性, V - P 试验不定,能使硝酸盐还原为亚硝酸盐,可凝固牛乳,有时被胨化,能产生氨和少量的硫化氢,致病菌株可产生凝血浆酶。

二、致病性

葡萄球菌可在乳品类、肉类、鱼类及罐头等食品中生长繁殖并产生肠毒素。研究证明:在 25~30℃ 条件下,5h 就有肠毒素产生,经过 8~10h 即可产生大量的肠毒素。人们食入这样的食品就会引起食物中毒。其临床特点是:突然发病,在食入后 1~16h 即可出现症状,主要为恶心,大量分泌唾液,频频呕吐,在呕吐物和粪便中常见有带血现象。严重者有头痛,肌肉痛,心跳减弱,盗汗和虚脱现象。中毒时体温不高,这点与沙门氏菌食物中毒不同。病程 1~2d,很少死亡。年龄越小,对本菌的肠毒素越敏感,因此儿童中毒病例较多,症状也比较严重。

三、对外界环境的抵抗力

葡萄球菌对外界的抵抗力较强,是非芽孢菌中最强的一种,加热 80℃ 30min 至 1h 才能杀死,在干燥的脓液和血液中可存活数月,本菌可耐受冷藏。在含有 50%~60% 蔗糖或 15% 以上食盐的食品中可被抑制。

四、传播途径与方式

葡萄球菌在自然界分布广泛,在土壤、空气、水及生活常用物品上,特别是在人和动物的皮肤、鼻、喉及手等部位大量存在。可通过多种途径污染到食品,主要有:由于患有皮肤化脓性疾病或患葡萄球菌性咽病的人通过某种途径污染食品;由于患有葡萄球菌性乳腺炎的奶牛分泌的乳汁中带有本菌;或由于食品加工者在食品加热处理后,因环境卫生不好而污染食品等。这些带有葡萄球菌的食品,一旦遇到适宜条件,葡萄球菌就会生长繁殖,产生肠毒素,被人食用后就可能会引起食物中毒。

葡萄球菌中的金黄色葡萄球菌在自然界中无处不在,空气、水、灰尘及人和动物的排泄物中都可找到。作为人和动物的常见病原菌,其主要存在于人和动物的鼻腔、咽喉、头发上,研究测试表明 50% 以上健康人的皮肤上都有金黄色葡萄球菌存在。因而,食品受其污染的机会很多。近年来,美国疾病控制中心报告,由金黄色葡萄球菌引起的感染占第二位,仅次于大肠杆菌。

金黄色葡萄球菌的流行病学一般有如下特点:

季节分布,多见于春夏季;中毒食品种类多,如乳、肉、蛋、鱼及其制品。此外,剩饭、油煎蛋、糯米糕及凉粉等引起的中毒事件也有报道。上呼吸道感染患者鼻腔带菌率 83%,所以人畜化脓性感染部位常成为污染源。

一般说,金黄色葡萄球菌可通过以下途径污染食品:

食品加工人员、炊事员或销售人员带菌,造成食品污染;食品在加工前本身带菌,或在加工过程中受到了污染,产生了肠毒素,引起食物中毒;熟食制品包装不严,运输过程受到污

染;奶牛患化脓性乳腺炎或禽畜局部化脓时,对肉体其它部位的污染。

金黄色葡萄球菌肠毒素是个世界性卫生问题,在美国由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒占整个细菌性食物中毒的 33%,加拿大则更多,占 45%,我国每年发生的此类中毒事件也非常多。肠毒素形成条件:

存放温度,在 37℃ 内,温度越高,产毒时间越短;

存放地点,通风不良氧分压低易形成肠毒素;

食物种类,含蛋白质丰富,水分多,同时含一定量淀粉的食物,肠毒素易生成。

五、相关事件

2000 年,日本雪印乳业公司的金黄色葡萄球菌毒素中毒事件较为典型。总部设在北海道首府札幌市的雪印乳业公司是日本著名乳制品厂家。该公司在全国共拥有 35 家工厂,其中 21 家工厂加工生产牛乳、牛乳饮料、酸奶等乳制品。

据化验,该工厂生产的一些乳制品中含有金黄色葡萄球菌,这种细菌可产生使人出现腹泻、呕吐症状的 A 型肠毒素。该厂乳制品染菌是生产设备没有按规定定期清洗而造成的。

当时,大阪市政府宣布的调查结果显示,因食用日本雪印乳业公司大阪工厂生产的乳制品而中毒者已逾万人。在大阪府和京都府以及附近 6 县,因食用雪印乳业公司大阪工厂生产的乳制品而中毒发病者已达 10 682 人,其中有 155 人被送往医院。

事件发生后,日本各地超市和食品店都停止销售雪印牌乳制品,一些地方政府已下令禁止食用雪印牌食品。大阪雪印厂被当地政府勒令无限期停产,并且大规模回收 6 月下旬出厂的几种染菌食品。

六、防 控

葡萄球菌的防控,除一般食品的卫生措施外,应注意以下几点。

1. 防止食品受到葡萄球菌的污染

主要要注意食品工作人员的卫生与健康状况,患有化脓性感染的人不能搞食品加工工作;要严格控制患乳腺炎的奶牛乳混入乳品加工原料中;食品加工工具用过后,要严格消毒,以防污染食品。

2. 防止葡萄球菌的生产与毒素产生

可采取以下措施:控制食品温度,在食品温度低于 4℃ 或高于 46℃ 时,可以阻止本菌在食品中生长繁殖;食品在室温下不宜存放很长的时间,应及时进行冷藏,防止葡萄球菌生长繁殖;控制食品水分活性值(A_w 值),当 A_w 低于 0.83 时,葡萄球菌的生长繁殖受到抑制。可通过干燥、添加盐和糖等方法降低食品的水分活度。

七、检验与诊断

1. 检样处理

称取 25g 固体样品;吸取 25mL 液体样品,加入 225mL 灭菌生理盐水,固体样品研磨或置均质器中制成混悬液。

2. 增菌及分离培养

吸取 5mL 上述混悬液,接种于 7.5% 氯化钠肉汤或胰酪胨大豆肉汤 50mL 培养基内,置

(36 ± 1)℃温箱培养 24h,转接于血平板和 Baird-Parker 平板,(36 ± 1)℃培养 24h,挑取金黄色葡萄球菌菌落进行革兰氏染色镜检及血浆凝固酶试验。

(1) 形态观察:本菌为革兰氏阳性球菌,排列是葡萄球状,无芽孢,无荚膜,致病性葡萄球菌菌体较小,直径为 $0.5 \sim 1 \mu\text{m}$ 。

(2) 培养形状观察:在肉汤中呈浑浊生长,在胰酪胨大豆肉汤内有时液体澄清,菌量多时呈浑浊生长,血平板上菌落呈金黄色,有时为白色,大而突起、圆形、不透明、表面光滑,周围有溶血圈。在 Baird-Parker 平板上为圆形、光滑凸起、湿润、直径为 $2 \sim 3 \text{mm}$,颜色呈灰色到黑色,边缘为淡色,周围为一浑浊带,在其外层有一透明圈。用接种针接触菌落似有奶油树胶的硬度,偶尔会遇到非脂肪溶解的类似菌落;但无浑浊带及透明圈。长期保存的冷冻或干燥食品中所分离的菌落比典型菌落所产生的黑色较淡些,外观可能粗糙并干燥。

3. 血浆凝固酶试验

吸取新鲜兔血浆 0.5mL ,放入小试管中,再加入培养 24h 的金黄色葡萄球菌肉汤培养物 0.5mL ,振荡摇匀,放(36 ± 1)℃温箱或水浴内,每半小时观察一次,观察 6h,如呈现凝固,即将试管倾斜或倒置时,呈现凝块者,被认为阳性结果。同时以已知阳性和阴性葡萄球菌株及肉汤作为对照。

4. 计数

(1) 吸取上述 1:10 混悬液,进行十倍递次稀释,根据样品污染情况,选择不同浓度的稀释液 1mL ,分别加入三块 Baird-Parker 平板,每个平板接种量分别为 0.3 、 0.3 、 0.4mL ,然后用灭菌 L 棒涂布整个平板。如水分不多吸收,可将平板放在(36 ± 1)℃温箱 1h,等水分蒸发后反转平皿置(36 ± 1)℃温箱培养。

(2) 在三个平板上点数周围有浑浊带的黑色菌落,并从中任选 5 个菌落,分别接种血平板,(36 ± 1)℃ 24h 培养后进行染色镜检、血浆凝固酶试验,步骤同增菌培养法。

(3) 菌落计数:将三个平板中疑似金黄色葡萄球菌黑色菌落数相加,乘以血浆凝固酶阳性数,除以 5,再乘以稀释倍数,即可求出每克样品中金黄色葡萄球菌数。

附:金黄色葡萄球菌肠毒素检测

1. 从菌株中提取肠毒素

(1) 液体透析培养法:用宽 2.5cm 、长 80cm 的透析袋装入 60mL 产毒培养基,两端扎紧,将透析袋装入 250mL 三角瓶内,加入 15mL 灭菌生理盐水,透析袋两端留在瓶口,用棉塞塞好, 121°C 高压灭菌 30min ,待测的菌株接种营养琼脂斜面(试管 $18 \text{mm} \times 180 \text{mm}$), 37°C 培养 24h,用生理盐水 5mL ,洗下菌落,倾入上述培养瓶中,每个菌种接种一瓶, 37°C 振荡培养 48h,振速为 100次/min 。吸出菌液离心, 8000r/min 下离心 30min ,取上清液做双向琼脂扩散,如为阴性,再装入透析袋内,用电风扇吹,或用多聚乙二醇浓缩至 $1 \sim 2 \text{mL}$,再做琼脂扩散。

(2) 固体透析培养法:向直径 150mm 的灭菌平皿或带盖搪瓷盘中倾入灭菌产毒培养基约 $100 \sim 120 \text{mL}$,凝固后表面铺一灭菌玻璃纸,待测菌株接种在营养琼脂上, 37°C 培养 24h,用约 3mL 灭菌盐水洗下菌苔,倾在玻璃纸上,用灭菌三角棒涂满平皿, 37°C 培养 48h,加入 $10 \sim 20 \text{mL}$ 灭菌生理盐水,用灭菌三角棒刮取菌苔,吸取菌液离心,以下步骤同液体透析培养法。

2. 从食品中提取肠毒素方法

(1) 直接浓缩法:取食品样品 100g ,加入无菌 0.2mol/L pH 7.5 磷酸盐缓冲液,均质成