

OBRAVNAVA IZBRUHA STAFILOKOKNE ZASTRUPITVE S HRANO V OSNOVNI ŠOLI

MANAGING OF THE OUTBREAK OF STAPHYLOCOCCAL FOOD POISONING IN PRIMARY SCHOOL

Irena Grmek Košnik¹, Andreja Krt Lah¹, Urška Dermota¹, Tatjana Frelih²

Prispelo: 5. 8. 2013 – Sprejeto: 14. 11. 2013

Izvirni znanstveni članek
UDK 615.9:613.22-053.5

Izvleček

Izhodišče: Oktobra 2010 smo imeli na Gorenjskem v eni izmed osnovnih šol z vrtcem izbruh stafilokokne zastrupitve s hrano.

Metode: Izvedli smo retrospektivno kohortno epidemiološko raziskavo in izračunali stopnjo obolevnosti v izbruhu ter relativno tveganje (RT) za vsako živilo. Pri obolelih smo kultivirali blato in izbruhanino. Opravili smo terenski ogled z odvzemom vzorca hrane, brisov delovnih površin na snažnost in brisa rok zaposlenih v kuhinji. V okviru usmerjenega pregleda smo trem zaposlenim v kuhinji odvzeli kužnine za mikrobiološke preiskave. Izolat bakterije *Staphylococcus aureus* smo določili enterotoksine s testom aglutinacije SET RPLA (Oxoid). Za primerjavo sorodnosti bakterije *S. aureus* iz živila in humanih vzorcev smo opravili tipizacijo izolatov s pulzno elektroforezo (PFGE).

Rezultati: Obbolelo je 73 oseb od 374 izpostavljenih. Stopnja obolevnosti je bila 19,5-odstotna. Najpogostejši bolezenski znaki so bili: bruhanje (87,7 %), bolečine v trebuhu (75,3 %), driska (64,2 %) in slabost (59,3 %). Največje relativno tveganje (RT) za zastrupitev je bilo povezano z uživanjem mesnega sira (RT= 24,2 (95 % CI 12,1–48,5; $p<0,001$) in krompirjeve solate (RT= 19,4 (95 % CI 10,7–35,2; $p<0,001$)). S kože rok osebe, zaposlene v kuhinji, iz vzorca hrane in kužnin obolelih otrok smo izolirali bakterijo *S. aureus*, ki je izločala enterotoksina A; po občutljivosti za antibiotike se ni razlikovala od drugih; z metodo PFGE se je pokazala 96,3-odstotna sorodnost med sevi.

Zaključki: Opisana raziskava je vzorčen primer dela in ukrepanja področnega epidemiologa in mikrobiologa ob pojavu izbruha. V izbruhu smo dokazali epidemiološko povezane izolate in opredelili pomen posameznih preiskav.

Ključne besede: *Staphylococcus aureus*, zastrupitev s hrano, stafilokokni enterotoksini, klicenosci, tipizacija, pulzna elektroforeza

Original scientific article
UDC 615.9:613.22-053.5

Abstract

Background: In October 2010 an outbreak of staphylococcal food poisoning occurred in an elementary school with a kindergarten in Gorenjska.

Methods: Using a questionnaire we performed a retrospective cohort analytical epidemiological study. We calculated attack rate (AR) and relative risk for each food item. In patients we cultivated stools and vomit. We performed an onsite audit where the food samples, environmental samples, and swabs of the hands of the cooks were taken. We performed medical examination of those employed in the kitchen where specimens were taken for microbiological examination. Staphylococcal enterotoxins were detected with agglutination test SET RPLA (Oxoid) and genotypes determined by the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

Results: Out of 374 exposed 73 subjects got ill. Attack rate in the outbreak was 19,5 %. The most frequent symptoms were vomiting (87,7 %), stomach ache (75,3 %), diarrhea (64,2 %) and nausea (59,3 %). The highest relative risk (RR) were found for the meatloaf (RR= 24,2 (95 % CI 12,1-48,5; $p<0,001$)) and potato salad (RR= 19,4 (95 % CI 10,7 – 35,2; $p<0,001$)). Enterotoxin A producing *S. aureus* was isolated from hand of a cook, from potato salad and meatloaf, from vomit and stools of patients. These strains had the same antibiotic sensitivity and were genetically closely related (96,3 %).

¹Zavod za zdravstveno varstvo Kranj, Gosposvetska 12, 4000 Kranj, Slovenija

²Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva 2, 1000 Ljubljana, Slovenija
Kontakti naslov: e-pošta: irena.grmek-kosnik@zzv-kr.si

Conclusions: In the article an optimal team approaches of a community epidemiologist and microbiologist in the occasion of outbreak are described. We confirmed epidemiologically related isolates and determined the importance of individual methods.

Key words: *Staphylococcus aureus*, food poisoning, staphylococcal enterotoxins, Carriers, typing, pulsed-field, gel electrophoresis

1 UVOD

Stafilokokna zastrupitev s hrano je posledica zaužitja enterotoksinov (ET) bakterije *Staphylococcus aureus*. Po navadi poteka kot izbruh; to je hkraten pojav bolezni pri več ljudeh na določeni lokaciji v danem časovnem obdobju, ki odstopa od običajnega obolenja, pri čemer ni pomembna množičnost pojava. Ko se pojavi izbruh, je najpomembnejši cilj ugotoviti njegov izvor, ga odstraniti in tako nadzorovati njegov potek (1–3). Najpogostejše opredeljene črevesne nalezljive bolezni v zadnjih 10 letih so salmoneloze, rotaviroze in kampilobakterioze. V letu 2010 je bilo vseh prijavljenih črevesnih nalezljivih bolezni 20.373, od tega kar 70 % neopredeljene etiologije. Od etiološko pojasnjenih črevesnih nalezljivih bolezni je bilo 1.593 rotavirusnih okužb, 999 kampilobakterioz, 347 salmoneloz. Glede na podatke letnih poročil o epidemiološkem spremljanju nalezljivih bolezni v Sloveniji sta bila v letu 2010 prijavljena dva izbruha stafilokokne zastrupitve s hrano oziroma je obbolelo 84 oseb (4).

Enterotoksin deluje na osrednje živčevje, kjer vzburi nervus vagus. Stafilokokni ET povzročijo izrazito izgubo vode v prebavila; posledici tega sta bruhanje in driska. Do danes je opisanih že več kot 20 vrst toksinov: od ET A do ET E ter novi ET C do ET IX. Vsi imajo superantigensko aktivnost, polovica od njih tudi emetsko (5–10). ET so termostabilni in jih s kuhanjem hrane ne uničimo. Odporni so tudi proti kislinam in proteolitičnim encimom. Enterotoksini bakterije *S. aureus* so razen pri zastrupitvi s hrano pomembni tudi v patogenezi okužb (11, 12).

Posamezen sev lahko izloča enega ali več toksinov hkrati (13–14). Večina zastrupitev s hrano je posledica zastrupitve z ET A. Izsledki študij na živalih kažejo, da ima ET A močno superantigenski in emetski potencial brez učinka driske (15).

Izvor epidemije stafilokokne zastrupitve je običajno hrana. Hrana kontaminira človek, ki jo pripravlja, če je klicenosec ali ima stafilokokno okužbo. Izvor okužbe so lahko tudi krave, psi in perutnina. V živilih se stafilokoki razmnožujejo pri temperaturi od 10 do 45°C. V gramu hrane je lahko že v nekaj urah 10^5 – 10^9 bakterij. Največkrat kontaminirana živila so slanina, solate, majoneza, perutnina, kreme, mlečni proizvodi, sladoledi in slaščice. Kontaminirana živila imajo normalen videz, vonj in okus (1, 3, 15).

Interval med zaužitjem hrane in začetkom simptomov je od 30 minut do 8 ur. Bolezen se začne naglo s slabostjo, z bruhanjem in drisko. Iztrebki so tekoči brez primesi sluzi ali krvi. Bolezen spremljajo bolečine v trebuhu, slinjenje in glavobol. Večina bolnikov nima vročine. Pri zelo mladih in starih osebah se lahko razvije huda dehidracija. Bolezen traja od 24 do 48 ur (1, 3, 8).

Diagnozo stafilokokne zastrupitve s hrano potrdimo z dokazom ET ali več kot 10^5 kolonij stafilokokov v gramu hrane. Če se hrana pogreva, stafilokoki propadejo in jih ne moremo izolirati, lahko pa jih ugotovimo z barvanjem vzorcev hrane po Gramu (1–7).

1.1 Namen in cilji raziskave

V torek, 5.10.2010, ob 15.20 smo po telefonu prejeli obvestilo o bruhanju 30 varovancev vrtca in štirih zaposlenih vzgojiteljic v eni izmed osnovnih šol z vrtcem na Gorenjskem. Glede na bolezenske znake in množičen začetek težav kmalu po kosilu smo posumili, da je izbruh verjetno posledica okužbe iz skupnega vira in vezan na kosilo v šoli. Postavili smo hipotezo, da je šlo najverjetneje za zastrupitev s hrano, ki so jo zaužili za kosilo.

Namen epidemiološke raziskave je bil ugotoviti vzrok izbruha, ali je bila hrana vzrok za izbruh, katera hrana, kje je bil izvor izbruha, potrditi morebitno zastrupitev pri obolelih, ugotoviti dejavnike, ki so povzročili izbruh, in prikazati preventivne ukrepe, da bi se izognili podobnim primerom v prihodnje. Cilj raziskave je bil ugotoviti, ali z epidemiološko raziskavo, laboratorijskimi preiskavami, okoljskimi raziskavami in z usmerjenim pregledom zaposlenih, ki delajo z živili, pridemo do enakih zaključkov oziroma opredeliti pomen vsake metode posebej.

2 MATERIAL IN METODE

V preiskavi izbruha smo izvedli: epidemiološko raziskavo, laboratorijske preiskave, okoljsko raziskavo in usmerjen pregled zaposlenih, ki delajo z živili.

2.1 Epidemiološka kohortna raziskava

Prvi primer bruhanja otroka je bil 5. 10.2010 ob 14.30 v vrtčevski enoti omenjene osnovne šole. V ospredju

klinične slike je bilo pri vseh obolelih bruhanje, nekateri pa so imeli tudi drisko in krče v trebuhu. O izbruhu smo obvestili zdravstveno službo v omenjenem kraju in jih prosili za pomoč pri zbiranju kužnin obolelih.

Epidemiološko poizvedovanje smo začeli takoj po pridobitvi informacije o izbruhu, da bi ugotovili število obolelih v izbruhu, vir in potek izbruha. Hkrati s preiskavo smo priporočili takojšnje ukrepe za preprečevanje nadaljnjega širjenja morebitnega črevesnega nalezljivega obolenja.

Naslednji dan smo s pomočjo vprašalnika izvedli retrospektivno kohortno epidemiološko raziskavo. Z vprašalnikom smo zbirali podatke o spolu, starosti, zdravstvenem stanju oz. o pojavu bolezenskih znakov: slabo počutje, slabost, glavobol, bolečine v trebuhu, bruhanje, povišana telesna temperatura, driska, drugo in tudi o vrsti zaužite hrane.

Kot primer v izbruhu smo opredelili osebo, ki je bila 5.10. 2010 v šoli/vrtcu in je bruhal in/ali imela drisko. V raziskavo smo vključili vse otroke in zaposlene v vrtcu in osnovni šoli. Vprašalnik je bil razdeljen vsem skrbnikom predšolskih in šolskih otrok ter zaposlenim v vrtcu in osnovni šoli. Vprašalnike so izpolnjevali: vzgojiteljice, starši otrok, večji otroci in zaposleni. Podatke iz vrnjenih vprašalnikov smo vnesli in obdelali s pomočjo programa Epi Info 3.3. Izračunali smo stopnjo obolevnosti v izbruhu in relativno tveganje (RT) za vsako živilo. Statistično značilno povezanost med obolenjem in zaužitjem določenih živil smo potrdili s Fisherjevim eksaktnim testom (FET).

2.2 Laboratorijske raziskave

Štirim obolelim otrokom, ki so poiskali zdravniško pomoč, so po našem predhodnem posredovanju odvzeli izbruhanino in/ali blato za preiskavo na patogene črevesne bakterije in viruse. Kužnine smo analizirali v Laboratoriju za medicinsko mikrobiologijo na Zavodu za zdravstveno varstvo Kranj (ZZV Kranj). Kužnine smo pregledali na prisotnost salmonel, šigel, kampilobaktrov, jersinij, patogenih *E. coli*, *S. aureus* ter tudi rotavirusov, adenovirusov in norovirusov. Identifikacijo bakterije *S. aureus* smo izvedli po standardnih mikrobioloških postopkih (2). Za testiranje občutljivosti stafilokokov smo uporabili modificirano Kirby-Bauerjevo metodo difuzije v agarju z diski – difuzijski antibiogram po navodilih CLSI – *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (16). Kot pomoč pri biotipizaciji bakterije *S. aureus* smo izolate iz kužnin bolnikov, zaposlenih in iz živila testirali na 12 antibiotikov: penicilin, oksacilin, tetraciklin, linezolid, eritromicin, klindamicin, kloramfenikol, rifampin, gentamicin, ciprofloksacin, teikoplanin, trimetoprim sulfametoksazol.

Vse izolate bakterije *Staphylococcus aureus* smo preiskali in ugotavljali, ali proizvajajo ET. Uporabili smo test SET-RPLA (Staphylococcal enterotoksin test kit, OXOID). Pri tem testu je na polistirenskih lateksnih delcih vezan antiserum kuncev, imuniziranih z očiščenimi ET A, B, C in D. V prisotnosti ustreznega ET lateksni delci aglutinirajo. Metoda omogoča ugotavljanje toksinov A, B, C in D neposredno v hrani in iz bujonske kulture izolirane bakterije. Test je semikvantitativen. Občutljivost testa je do 1,0 ng/g v hrani in do 0,5 ng/ml v bujonski kulturi.

Za primerjavo sorodnosti bakterije *Staphylococcus aureus* iz živila in humanih vzorcev so v Bolnišnici Golnik v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo opravili pulzno elektroforezo (PFGE) (17).

2.3 Okoljske raziskave

Terenski ogled z odvzemom kužnin

Sanitarno-higienski pregled smo opravili 6. 10. 2010 v sodelovanju z Oddelkom za higieno ZZV Kranj in OE ZIRS.

2.4 Usmerjen pregled zaposlenih, ki delajo za živili

Usmerjen pregled treh zaposlenih v kuhinji, ki so 5. 10. 2013 delali z živili, smo izvedli v ambulantni ZZV Kranj, in sicer 7. 10. 2010. Eden izmed zaposlenih je bil tudi oboleli v izbruhu.

2.5 Komunikacija z mediji

Že naslednje jutro, 6. 10. 2010, so se z vprašanji o izbruhu na nas obrnili različni mediji, ki so jih spodbudili starši obolelih otrok.

2.6 Javnozdravstveni ukrepi

Osebu kuhinje smo začasno svetovali pripravljati prilagojene jedilnike. Vsem zaposlenim v kuhinji šole sta bila odredjena zdravstveni pregled in 3-urno izobraževanje HACCP. Glede na laboratorijske izvide smo eni osebi omejili delo z živili. Pregledali smo njihova zdravstveno-higienska navodila in jim svetovali nekaj popravkov.

3 REZULTATI

3.1 Rezultati epidemiološke raziskave

V osnovni šoli je bilo 5. oktobra 2010 160 varovancev vrtca, 316 šolarjev in 75 zaposlenih. Od 551 poslanih vprašalnikov smo dobili vrnjenih 374 (67,9-odstotna

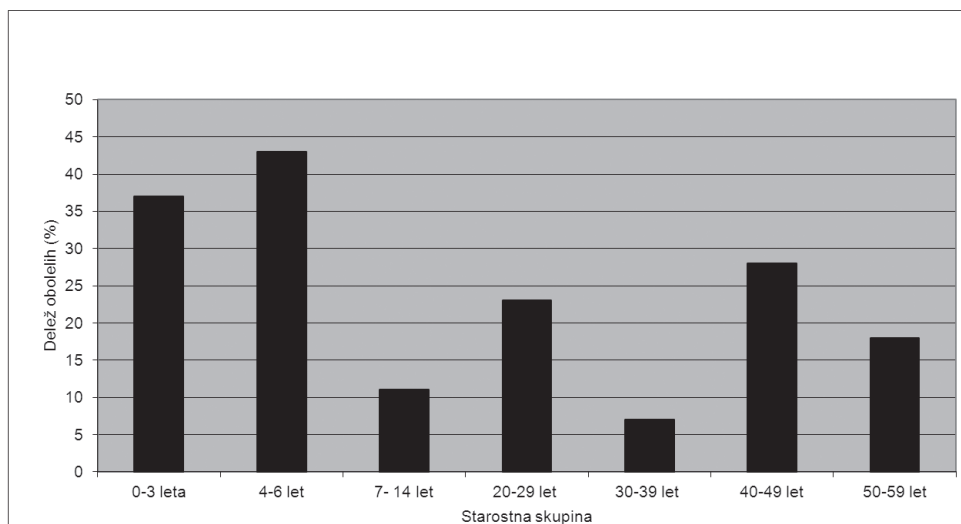
stopnja odgovora). Odgovorilo je 222 oseb ženskega spola (59,4 %) in 152 oseb moškega spola (40,6 %). Starostna struktura anketiranih, ki so vrnili vprašalnik, je prikazana v tabeli 1. Otrok, starih 0–6 let, je bilo 24,9 %, otrok, starih 7–14 let, 59,4 %. Glede na strukturo je bilo anketiranih otrok iz vrta 17,1 %, šolarjev 66,6 % in zaposlenih 16,3 %.

Tabela 1. *Starostne skupine anketiranih oseb.*
Table 1. *Respondent age group.*

Starostna skupina/ Age group	Število/ Number	Delež (%) / Proportion (%)
0-3	38	10,2
4-6	55	14,7
7-14	222	59,4
20-29	13	3,5
30-39	15	4,0
40-49	19	5,1
50-59	11	2,9
60-69	1	0,3
Skupaj/ Total	374	100,0

Stopnja obolevnosti v izbruhu (AR)

Skupaj je zbolelo 73 oseb, od tega največ (61) 5.10.2010, štiri osebe so kot datum začetka obolenja navedle 6.10.2010, osem obolelih pa ni navedlo datuma o začetku obolenja. Ker anketiranci povečini niso odgovorili na vprašanje glede ure začetka bolezenskih znakov, ni bilo mogoče izdelati epidemijske krivulje. Kosilo so začeli deliti po 11. uri; prva oseba je obolela ob 14.30, temu primeru pa je še isti dan sledila večina primerov. Tako lahko govorimo o nekajurni inkubacijski dobi. Stopnja obolevnosti v izbruhu je bila 19,5-odstotna. Med obolelimi je bilo 38 moških (52,1 %) in 35 žensk (47,9 %). Obolevnost po starostnih skupinah prikazuje Slika 1.



Slika 1. *Deleži obolelih v izbruhu po starostnih skupinah.*
Figure 1. *Attack rate by age group.*

Posamezni oboleli so iskali zdravniško pomoč. Povečini je zadoščal telefonski posvet z zdravnikom. Pri zdravniku se je oglasilo pet oseb. Nihče izmed obolelih ni bil sprejet v bolnišnico.

Najpogostejši bolezenski znaki so bili: bruhanje (87,7 % obolelih), bolečine v trebuhu (75,3 %), driska (64,2 %),

slabost (59,3 %), slabo počutje (46,0 %), glavobol (23,9 %) in povišana telesna temperatura $\geq 37^{\circ}\text{C}$ (10,1 %).

V retrospektivni kohortni raziskavi smo ugotavljali, kako močno sta povezana uživanje določenih živil in obolenje. Najvišje relativno tveganje (RT) je bilo

povezano z uživanjem mesnega sira – RT= 24,2 (95 % CI 12,1–48,5) in krompirjeve solate RT= 19,4 (95 % CI 10,7–35,2). Statistično značilno povezanost smo potrdili s testom χ^2 (FET). Na podlagi izsledkov

lahko s 95-odstotno verjetnostjo (p-vrednost < 0,001) trdimo, daje bila obolevnost med otroki v vrtcu, šolarji in zaposlenimi v OŠ povezana z uživanjem krompirjeve solate in mesnega sira.

Tabela 2. Delež obolelih v izbruhu; RT, povezan z uživanjem različnih živil.

Table 2. Food-specific attack rates and RR.

Živilo/ Foodstuff	Jedli/pili/ Ate/drank				Niso jedli/pili/ Did not eat/ drink				RT (RR)	95% CI
	Bolni/ Ill	Zdravi/ Healthy	Skupaj/ Together	AR (%)	Bolni/ Ill	Zdravi/ Healthy	Skupaj/ Together	AR (%)		
Čaj/ Tea	51	131	182	28	22	170	192	11	2,4	1,5-3,8
Črna žemlja/ Brown bread	19	18	37	57	54	283	337	16	3,2	2,2-4,8
Krompirjeva solata/ Potato salad	62	22	84	74	11	279	290	3,8	19,4	10,7- 35,2
Sadni sok/ Fruit juice	24	15	39	62	49	286	335	15	4,2	2,9-6,0
Ovseni kruh/ Oat bread	53	150	203	26	20	151	171	12	2,2	1,4-3,6
Pečen mesni sir/ Grilled meatloaf	65	29	94	69	8	272	280	3	24,2	12,1- 48,5
Polenta z mlekom/ Cornmeal mush with milk	20	12	32	63	53	289	342	16	4,0	2,8-5,8
Rezine sveže paprike/ Paprica	39	93	132	30	34	208	242	14	2,1	1,4-3,2
Sadje/ Fruit	42	28	70	60	31	273	304	10	5,9	4,0-8,6
Špargljeva juha/ Asparagus soup	23	19	42	55	50	282	332	15	3,6	2,5-5,3
Turistična pašteta/ Fish spread	46	145	191	24	27	156	183	15	1,6	1,0-2,5
Vodovodna voda/ Tape water	57	219	276	21	16	82	98	16	1,3	0,7-2,1

Stopnja obolevnosti je bila najvišja med tistimi, ki so jedli krompirjevo solato (74 %), in tistimi, ki so jedli pečen mesni sir (69 %), ter najmanjša med tistimi, ki teh živil niso jedli (3,8 % obolelih ni jedlo krompirjeve solate, 3 % obolelih niso jedli pečenega mesnega sira). Tudi v multivariatni analizi smo kot dejavnik tveganja prepoznali uživanje pečenega mesnega sira – RT= 16,8 (95 % CI 58,8; p< 0,001) in krompirjeve solate – RT= 11,6 (95 % CI 40,8, p< 0,001).

3.2 Rezultati laboratorijskih preiskav

Iz vseh štirih kužnin (1 otrok izbruhanina, 3 otroci blato) obolelih smo izolirali bakterijo *S. aureus*. Izolat *S. aureus* iz izbruhanine in dveh blat so izločali enterotoksina A.

Tudi iz vzorca hrane (mesni sir in krompirjeva solata, 5.10.2010, shranjena v isti posodi) so v Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo IVZ RS izolirali bakterijo *Staphylococcus aureus*, ki je izločala enterotoksin A. Brisi na snaznost in brisi rok zaposlenih, odvzeti na terenskem ogledu, so bili negativni. Iz brisov nosu, žrel, rok vseh treh zaposlenih, odvzetih na usmerjenem pregledu, smo izolirali bakterijo *S. aureus*. Izolat *S. aureus* s kože rok le ene zaposlene je izločal enterotoksina A, iz nosu iste zaposlene enterotoksin C. Izolati bakterije *S. aureus* iz hrane, iz kužnin obolelih in izolat s kože rok zaposlene se po občutljivosti za antibiotike niso razlikovali (tabela 3). Drugih patogenih bakterij in tudi virusov nismo zaznali.

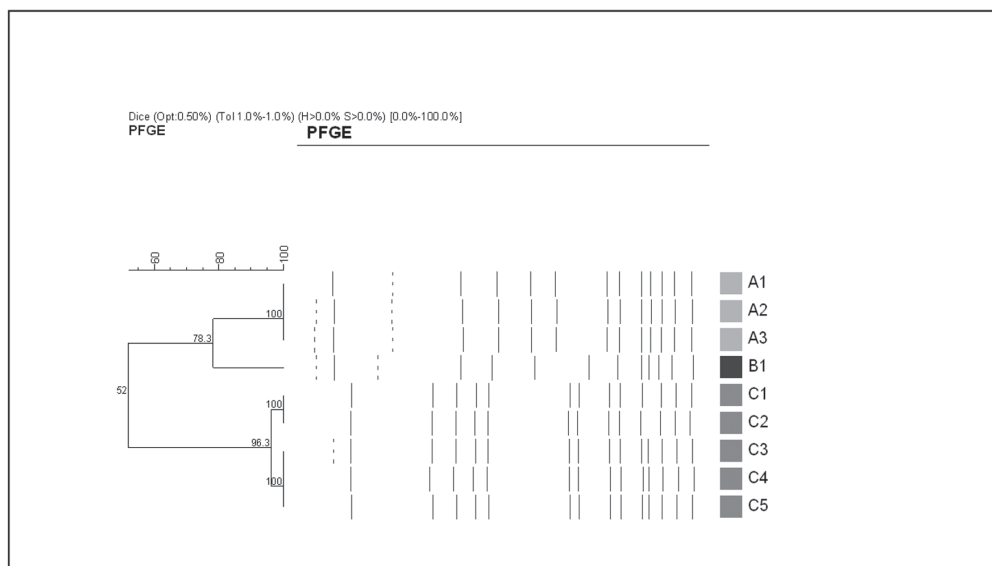
Tabela 3. Izolati *S. aureus* iz vzorcev, odvzetih v epidemiji, njihovi enterotoksini, odpornost proti antibiotikom in genotipi.Table 3. *S.aureus* isolates from samples taken in the epidemics, their enterotoxins, antibiotic resistance and genotypes.

	Vzorec/ Sample	Enterotoksin/ Enterotoxin	Odporen proti antibiotiku/ Antibiotic resistance	Genotip/ Genotype
1	Prva zaposlena oseba v kuhinji bris žrela/ 1 st person in kitchen swab throat	Neg.	P	a
2	Prva zaposlena oseba v kuhinji bris rane na roki/ 1 st person in kitchen swab wound on hand	Neg.	P	a
3	Druga zaposlena oseba v kuhinji bris nosu/ 2 nd person in kitchen swab nose	Neg.	P	a
4	Druga zaposlena oseba v kuhinji bris rane na roki/ 2 nd person in kitchen swab wound on hand	Neg.	P	a
5	Tretja zaposlena oseba v kuhinji bris nosu/ 3 rd person in kitchen swab nose	C	P	b
6	Tretja zaposlena oseba v kuhinji bris rane na roki/ 3 rd person in kitchen swab wound on hand	A	P	c
7	Pečen mesni sir in krompirjeva solata/ Grilled meatloaf and potato salad	A	P	c
8	Oboleli otrok 1 izbruhanina/ Patient 1 vomit	A	/	c
9	Oboleli otrok 2 blato/ Patient 2 stool	A	/	c
10	Oboleli otrok 3 blato/ Patient 3 stool	A	/	c
11	Oboleli otrok 4 blato / Patient 4 stool	Neg.	/	/

Legenda/ Legend: P-penicilin

Z metodo elektroforeze v pulzirajočem polju (PFGE) smo ugotovili 96,3-odstotno sorodnost med sevi bakterije *S. aureus* s kože rok tretje zaposlene osebe

v kuhinji, sevom *S. aureus* iz živila ter osamljenimi sevi iz kužnin obolelih otrok – genotip C (Slika 2).



Slika 2. Rezultati PFGE.

Figure 2. PFGE results.

Legenda/ Legend:

- A1 - Prva zaposlena oseba bris žrela/ 1st person in kitchen swab throat
- A2 - Prva zaposlena oseba bris rane na roki/ 1st person in kitchen swab wound on hand
- A3 - Druga zaposlena oseba bris nosu/ 2nd person in kitchen swab nose
- B1 - Tretja zaposlena oseba bris nosu/ 3rd person in kitchen swab nose
- C1 - Oboleli otrok 1 izbruhanina/ Patient 1 vomit
- C2 - Tretja zaposlena oseba bris rane na roki/ 3rd person in kitchen swab wound on hand
- C3 - Živilo – krompirjeva solata/mesni sir/ Food - Potato salad/ Grilled meatloaf
- C4 - Oboleli otrok 2 blato/ Patient 2 stool
- C5 - Oboleli otrok 3 blato/ Patient 3 stool

3.3 Rezultati okoljskih raziskav

Rezultati terenskega ogleda z odvzemom kužnin

Kuhinja je bila videti urejena; zaposleni so povedali, da imajo vzpostavljen sistem HACCP. V kuhinji so na dan pregleda pripravili 270 malic in 100 kosil, izdelujejo tudi več dietnih jedilnikov.

Med razgovorom z zaposlenimi smo ugotovili, da so bile na dan zastrupitve v kuhinji zaposlene štiri osebe, dva

kuharja in dve pomočnici. Kuhar je bil kronični bolnik in invalid III. kategorije. 5. in 6. 10. 2010 so delale v kuhinji tri osebe, ena od pomočnic je bila zaradi bolezni odsotna. Kljub temu niso spremenili jedilnika (tabela 4), ampak so že en dan prej skuhal krompir, ga ohladili s hladno vodo, olupili in do naslednjega dne pustili stati na sobni temperaturi v koritu. Naslednje jutro so krompirju dodali polivko in ga premešali z rokami.

Tabela 4. Jedilnik dne 5. 10. 2010.

Table 4. Menu on 5th October 2010.

Zajtrk/ Breakfast	Malica/ Snack	Kosilo/ Lunch
Starostna skupina 1- 3 let/ Age group 1-3 years Polenta in mleko/ Cornmeal mush with milk	Sadje/ Fruit	Špargljeva juha/ Asparagus soup Pečen mesni sir/ Grilled meatloaf Krompirjeva solata/ Potato salad Sadni sok/ Fruit juice
Starostna skupina 3 in več let/ Age group 3 years and older Turistična pašteta/ Fish spread Paprika/ Paprica Ovseni kruh/ Oat bread Čaj/ Tea		

3.4 Rezultati usmerjenega pregleda zaposlenih, ki pri svojem delu prihajajo v stik z živili

Med pregledom smo ugotovili, da so bili vsi zaposleni zdravi. Kuhar, invalid III. Kategorije, je povedal, da ima med delom občasne vročice. Pri njem smo po rokah ugotovili ureznine, rane na obnohtju in posamezne mozolje na obrazu. Pri vseh zaposlenih smo odvzeli bris nosu, žrela in kože s področja vnetja obnohtja in ureznin ter blato za mikrobiološke preiskave.

3.5 Komunikacija z mediji

6. 10. 2010 smo pripravili izjavo, v kateri smo pojasnili podatke in svetovali ukrepe za preprečevanje nadaljnjih okužb oz. zastrupitev.

3.6 Rezultati javnozdravstvenih ukrepov

S svetovanjem higienskih ukrepov in prilagoditvijo jedilnikov smo osebju kuhinje pomagali, da so uspeli premostiti kadrovsko in psihično stisko, v kateri so se znašli.

4 RAZPRAVA

Opravili smo preiskavo izbruha zastrupitve s hrano, ki je imela klinične in epidemiološke značilnosti stafilokokne zastrupitve. Ugotovili smo, da način priprave hrane in higiena osebja nista bila ustrezna, čeprav je to kuhinja, ki se trudi ugoditi vsem zdravstvenim zahtevam glede diet, ki ima vzpostavljen sistem HACCP ter ustrezno usposobljene in izobražene zaposlene. Ob kadrovske stiski so se pojavile nepravilnosti, katerih posledica je bila množično obolevanje. V kuhinji, v kateri je delala ena oseba z omejeno delovno sposobnostjo, ena oseba pa je bila zaradi bolezni odsotna z dela, so krompir za krompirjevo solato skuhalo že en dan vnaprej. Krompir se je kontaminiral z bakterijo *S. aureus*, ki je izločala

enterotoksin A. Ker so ga pustili do naslednjega dne na sobni temperaturi, so bile izpolnjene ugodne razmere za njegovo razmnoževanje. Obolelo je 19,5 % oseb, ki so jedle v šolski menzi.

S pomočjo analitične epidemiološke raziskave in molekularnih mikrobioloških metod smo dokazali živilo in povzročitelja zastrupitve. Pri obravnavi epidemije smo bili vključeni epidemiologi, mikrobiologi, sanitarni inženirji in higieniki. Uspešna preiskava in obvladovanje izbruha nalezljive bolezni namreč zahtevata sodelovanje različnih strok. Takšno organizacijsko strukturo trenutno nudijo le območni Zavodi za zdravstveno varstvo.

Z retrospektivno epidemiološko študijo smo ugotovili, da je bil izbruh povezan z uživanjem pečenega mesnega sira in krompirjeve solate oz. da so imeli otroci in zaposleni, ki so jedli mesni sir, 24,2-krat višje tveganje, da zbolijo, kot tisti, ki sira niso jedli, ter otroci in zaposleni, ki so jedli krompirjevo solato, 19,4-krat višje tveganje kot tisti, ki solate niso jedli.

Stopnja obolevnosti v izbruhu je bila največja pri uživanju krompirjeve solate (74 %) in mesnega sira (69 %). Odgovor na vprašanje v anketi, ali so jedli določeno hrano, ni popolnoma zanesljiv. Mesni sir in krompirjeva solata sta bila postrežena na istem krožniku, ker sta bila skupni obrok. Tudi vzorčenje je bilo skupno, tako da tudi iz izsledka mikrobiološke preiskave dejansko ne vemo, katero živilo je bilo kontaminirano z bakterijo *S. aureus*, ki je izločalo ET A. Glede na izsledke v anketi je ostalo zdravih kar 22 oseb, ki so jedli krompirjevo solato, in 29 oseb, ki je jedli mesni sir. Po drugi strani pa je obolelo tudi 11 oseb, ki niso jedle krompirjeve solate, in 8 oseb, ki niso jedle mesnega sira. Sumimo, da je bila v anketiranju prisotna določena napaka. Anketni vprašalnik so izpolnjevali vzgojiteljice, starši, večji otroci in zaposleni. Vzgojiteljice si zaradi velikega števila otrok v skupinah težko zapomnijo, kaj so otroci zares pojedli. Prav tako odgovori majhnih otrok niso zanesljivi, še posebej, če sta bili živili skupaj

na krožniku. Izkušnje kažejo, da otrok hrano poskusi, in če mu okus ne ustreza, hrano pusti. Količine živila, potrebne za stafilokokno zastrupitev, so pri veliki koncentraciji ET lahko zelo majhne. Predvidevamo, da je že samo okušanje hrane zadosten razlog za blago zastrupitev. Za nastanek in resnost stafilokokne zastrupitve s hrano sta pomembna količina zaužitega ET in sprejemljivost osebe. Količina ET v hrani je odvisna od števila bakterije *S. aureus* v hrani, lastnosti seva, sestave hrane, temperature in od prisotnosti zaviralcev rasti stafilokokov. V hrani je dovolj toksina, kadar je število kolonij bakterije *S. aureus* več kot 10^5 kolonij/g. Najmanjši odmerek, ki že lahko povzroči zastrupitev s hrano, je 1 ng ET/g. Mikrobiološki izvid hrane v našem izbruhu ni podajal kvantitativne količine bakterij *S. aureus* na gram živila, na kar nismo imeli vpliva, saj nismo bili naročnik preiskave, poleg tega pa je bil vzorec preiskovan v drugem laboratoriju.

Z laboratorijskimi preiskavami smo potrdili prisotnost bakterije *S. aureus* v vseh prejetih kužninah obolelih (v izbruhani enega izmed obolelih in tudi v vseh treh blatih obolelih). To, da je izolat *S. aureus* s kože roke zaposlene izločal enterotoksina A, iz nosu iste zaposlene pa enterotoksin C, ni nič nenavadnega, saj je posameznik lahko nosilec več sevov iste bakterije hkrati. Klasična mikrobiološka diagnostika temelji na tem, da po videzu ločujemo različne bakterijske kolonije in iz njih delamo čiste kulture.

O uspešnosti izolacije stafilokokov je v literaturi malo podatkov (18). V tem izbruhu smo tudi iz izbruhanine obolelega otroka uspeli izolirati bakterije *S. aureus*, verjetno zato, ker je bilo v zaužiti hrani veliko bakterij oz. smo pridobili kužnine takoj oz. le nekaj ur po zaužitju hrane. Izolat iz izbruhanine je izločal enterotoksin A. *S. aureus*, ki je izločal enterotoksin A, je bil izoliran tudi iz skupnega vzorca živila in poškodovane kože rok ene izmed zaposlenih. En izolat *S. aureus* iz blata obolelega otroka in trije izolati od zaposlenih v kuhinji niso izločali enterotoksinov. Tudi v literaturi so podatki o tem, da vsi izolati *S. aureus* obolelih v izbruhih ne izločajo toksinov. V študiji Brizzio s sodelavci so pri vseh izolatih *S. aureus* ugotovili, da ima le 58 % izolatov gene za toksine – v največjem deležu gene za ET A in ET B (29 %), medtem ko so geni za preostale ET C, ET D, ET E v nižjem deležu (14 %) (6).

Med zdravimi ljudmi je od 10 do 50 % nosilcev bakterije *S. aureus* in okoli 30 % teh sevov je enterotoksigenih (7). V novejši argentinski študiji so ugotovili, da je 37,5 % oseb, ki dela s hrano, nosilcev bakterije *S. aureus*, od katerih izolati izražajo gene za ET kar v 39,4 % oz. da kar 14,7 % oseb, ki dela s hrano, nosi potencialne bakterije za zastrupitev (13).

Verjetnejši dokaz za potrditev povzročitelja izbruha je ugotovitev istega enterotoksina pri osebju v kuhinji, hrani in bolnikih. S trenutno dosegljivimi reagenti je mogoče prepoznati 21 različnih enterotoksinov (19). Ker je kolonizacija z bakterijo *S. aureus* pogosta in ker večina sevov ne izloča enterotoksina, sama izolacija tega mikroorganizma ni zadosten dokaz za etiološko potrditev zastrupitve s hrano. Ker pa obstaja omejeno število različnih ET, je mogoče, da gre kljub enakemu profilu ET pri stafilokokih, izoliranih pri osebju v kuhinji, hrani in pri bolniku, za kolonizacijo z različnimi sevi bakterije *S. aureus*.

Šele z genotipizacijo lahko zanesljivo potrdimo, da gre za epidemiološko povezan izolat. Epidemiološko povezani izolati so izolati iz kužnin bolnikov ali okolja, odvzeti v določenem času in kraju kot del epidemiološke raziskave, ki kažejo, da so pridobljeni iz skupnega vira. Glede na kategorije genetske in epidemiološke povezanosti izolatov ločimo štiri kategorije: neločljive, tesno povezane, mogoče povezane in nepovezane izolate. Neločljivi izolati so genetsko enaki. S PFGE imajo enako število pasov. Epidemiološka razlaga te kategorije je, da izolati predstavljajo isti sev. Tesno povezani izolati v izbruhu so sevi, ki se s PFGE razlikujejo od izolata izbruha. Spremembe so nastale s posameznim genetskim dogodkom, kot je npr. točkovna mutacija ali insercija ali delecija DNA. Takšne spremembe se odražajo s PFGE v dveh ali treh pasovih. Takšne spremembe lahko nastanejo spontano tudi pri sevih med ponavljajočimi nasaditvami na gojiščih. Mogoče povezani izolati v izbruhu se razlikujejo od izolata izbruha s spremembami, ki izvirajo iz dveh neodvisnih genetskih dogodkov oz. razlikovanja s štirimi ali šestimi pasovi, ki jih razlagamo z večjimi genetskimi spremembami. Ti izolati imajo lahko skupen izvor, vendar niso tesno povezani. Takšne spremembe opazimo med izolati po daljšem obdobju več – kot šestih mesecih – ali so odvzeti večjemu številu bolnikov v izbruhu večjega obsega. Nepovezani izolati v izbruhu so izolati, pri katerih s PFGE dokažemo razlike v sedmih ali več pasovih oz. gre za manj kot 50 % pasov (16). Pri eni izmed treh zaposlenih oseb v kuhinji, v vzorcu hrane in pri treh obolelih smo izolirali bakterijo *S. aureus*, ki je izločala enterotoksin A. Te izolate smo fenotipsko in genotipsko tipizirali. Sevi so imeli enako občutljivost za antibiotike in tudi morfološko so bili videti enako. Vendar tudi to še ni zadosten dokaz, da so sevi enaki. To je razvidno iz naših izsledkov, pri katerih smo enak antibiogram ugotovili tudi pri sevih, ki niso izločali enterotoksina A (Tabela 3). Enakost sevov smo potrdili šele z genetsko tipizacijo.

Med sevi, ki so izločali stafilokokni enterotoksin A, smo s PFGE dokazali 96,3-odstotno sorodnost. Izolati, ki kažejo več kot 80-odstotno ujemanje profilov PFGE, so tesno sorodni in tvorijo skupek. V našem primeru smo dokazali, da gre za enak sev, ki se je prenesel z zaposlene na živilo in prek živila na obolele (9, 14, 17–20).

Zastrupitvam s hrano se lahko izognemo, če upoštevamo preventivne ukrepe (20). Vse osebe, ki pripravljajo hrano, je treba poučiti o higieni v kuhinji, umivanju in o negi rok. Hrano smemo dlje časa hraniti pri temperaturi, nižji od 4 °C, kajti pri tej temperaturi se stafilokoki ne razmnožujejo. Osebe, ki imajo gnojne okužbe rok, obraza in nosu, ne smejo pripravljati hrane (1, 3, 6). Med izbruhom smo izvedli javnozdravstvene ukrepe. Osebu kuhinje smo začasno svetovali pripravljati prilagojene jedilnike, kar pomeni, da je jedilnik postal preprostejši, z manj različnimi dietami, preprost za pripravo s hrano, ki je bila temeljito toplotno obdelana. Vsem zaposlenim v kuhinji šole sta bila odrejena zdravstveni pregled in 3-urno izobraževanje iz higiene živil. Glede na laboratorijske izvide smo zaposleni osebi, ki je bila kolonizirana s sevom *S. aureus*, ki je izločal enterotoksin A, omejili delo z živilom. Pozneje smo pregledali tudi zdravstveno-higienska navodila in jim svetovali nekaj popravkov. Svoj pomen v mozaiku razlage izbruha sta vsekakor imela tudi terenski ogled z odvzemom kužnin, ki je pokazal kadrovske primanjkljaje, in tudi usmerjeni pregled treh zaposlenih v kuhinji, ki je omogočil odvzem kužnin.

5 ZAKLJUČEK

Opisana raziskava je vzorčen primer dela in ukrepanja področnega epidemiologa in mikrobiologa ob pojavi izbruha. V prispevku smo prikazali časovni potek dogodkov ob izbruhu zastrupitve s hrano – od komunikacije in svetovanja po telefonu, postavitve hipoteze, anketiranja, terenskega ogleda kuhinje, odvzema kužnin, higienskega pregleda zaposlenih, mikrobiološke laboratorijske diagnostike, epidemiološke raziskave in postavitve zaključkov. Ukrepi ob izbruhu sestavljajo zloženko, ki vključuje posamezne faze, da pripelje do objektivnih zaključkov in rezultatov. Tipizacija izoliranih mikroorganizmov nam pomaga pri potrjevanju identifikacije vira izbruha. Epidemični sev bakterije *S. aureus* z enterotoksinom A smo odkrili v hrani, pri osebi, ki je pripravljala hrano, in pri obolelih, sicer že s testom določevanja stafilokoknih toksinov. Za zanesljivo ugotovitev enakosti izolatov bakterije *S. aureus* pa ni dovolj le enak tip izločanja ET, ampak tudi potrditev enakega genotipa, kar smo potrdili s PFGE.

Analiza dogodka je pokazala, da bi bilo treba v kuhinjah, v katerih se kuha za občutljive skupine prebivalstva, točno opredeliti kadrovske normative in ob kadrovskih izpadih omejiti število obrokov ali prilagoditi jedilnike.

Zahvala

Avtorice se zahvaljujemo sodelavkam Urški Milič, Moniki Ribnikar, Nataši Selan in Veroniki Meglič za zavzeto pomoč pri obravnavi izbruha in tudi preostalim sodelujočim iz Zavoda za zdravstveno varstvo Kranj.

Literatura

1. Tauxe RV, Swerdlow DL, Hughes JM. Foodborne disease. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practise of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 1150-60.
2. Grmek-Košnik I, Mueller-Premru M, Seljak M, Pavlica T, Peternej B, Pohar M et al. Analiza epidemije stafilokokne zastrupitve s hrano. Zdrav Vestn 2000; 69: 439-43.
3. Kloos WE, Bannerman TL. Staphylococcus and micrococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology. 6th ed. Washington: ASM Press, 1995: 282-98.
4. Kraigher A, Sočan M, Klavs I, Frelih T, Grilc E, Grgič Vitek M. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2010. Inštitut za varovanje zdravja, 2010. Pridobljeno 23. 10. 2013 s spletne strani: http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=105&pi=5&_5_id=788&_5_PageIndex=0&_5_groupId=219&_5_newsCategory=&_5_action=ShowNewsFull&pi=105-5.0
5. Grmek-Košnik I, Virnik B, Pavlica T. Izolati proti metilicinu odpornega *S. aureus* (MRSA) iz blata bolnikov z akutnim gastroenterokolitisom pogosto izločajo enterotoksin (SE). Med Razgl 2000; 39: 144-5.
6. Brizzio AA, Tadeschi FA, Zalazar FE. Multiplex PCR strategy for the simultaneous identification of Staphylococcus aureus and detection of staphylococcal enterotoxins in isolates from food poisoning outbreaks. Biomedica 2013; 33: 122-7.
7. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiol Rev 2012; 36: 815-36.
8. Johler S, Tichaczek-Dischinger PS, Rau J, Sihto HM, Lehner A, Adam M et al. Outbreak of staphylococcal food poisoning due to SEA-producing Staphylococcus aureus. Foodborne Pathog Dis 2013; 10: 777-81.
9. Boost MV, Wong A, Ho J, O'Donoghue M. Isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from retail meats in Hong Kong. Foodborne Pathog Dis 2013; 10: 705-10.
10. Hyeon JY, Gyung TC, Sun HB, Kyung SK, Hyeon HL, Soo JK et al. A foodborne outbreak of Staphylococcus aureus associated with fried chicken in Republic of Korea. J Microbiol Biotechnol 2013; 23: 85-7.
11. Soares MJS, Tokumaru-Miyazaki NH, Noletto ALS, Figueiredo AMS. Enterotoxin production by Staphylococcus aureus clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from food handlers. J Med Microbiol 1997; 46: 214-21.
12. Villavicencio RT, Wall M. The pathogenesis of Staphylococcus aureus in the trauma patient and potential future therapies. Am J Surg 1996; 172: 291-6.
13. Jorda GB, Marucci RS, Guida AM, Pires PS, Manfredi EA. Carriage and characterization of Staphylococcus aureus in food handlers. Rev Argent Microbiol 2012; 44: 101-4.

14. Xiaomel Y, Bing W, Xiaoxia T, Qinghua H, Zhigang C, Jianzhong Z et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 6637-42.
15. Maina EK, Hu DL, Tsuji T, Omoe K, Nakane A. Staphylococcal enterotoxin A has potent superantigenic and emetic activities but not diarrheagenic activity. *Int J Med Microbiol* 2012; 302: 88-95.
16. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S20. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
17. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
18. Bergdoll MS. Detection of the staphylococcal toxins. *Adv Exper Med Biol* 1996; 391: 465-79.
19. Mendel F, Reuven R. Review of the inhibition of biological activities of food-related selected toxins by natural compounds. *Toxins* 2013; 5: 743-75.
20. Doyle ME, Hartmann FA, Lee Wong AC. Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? *Anim Health Res Rev* 2012; 13: 157-80.