

文章编号: 1000-8020(2015)06-0918-04

·调查研究·

北京市售即食熟肉制品中单核细胞增生 李斯特菌定量污染水平研究

王伟 闫韶飞 白莉 李志刚 杜春明 李凤琴¹

国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险
评估重点实验室 北京 100021



摘要:目的 了解北京市售即食熟肉制品中单核细胞增生李斯特菌污染情况及污染来源。方法 采用 MPN 法定量检测即食熟肉制品中的单核细胞增生李斯特菌,在对分离菌株正确鉴定的基础上,对单核细胞增生李斯特菌分离株进行脉冲场凝胶电泳分型研究。结果 197 份即食熟肉制品中有 14 份检出单核细胞增生李斯特菌,检出率为 7.11%,平均污染水平为 14.31 MPN/g。其中农贸市场采集的样品单核细胞增生李斯特菌污染率(13.89%)高于熟肉专卖店(8.57%)、超市(5.75%)和饭馆(2.56%)。而超市采集样品中该菌的平均污染水平最高,为 22.78 MPN/g。共发现 13 种单核细胞增生李斯特菌 PFGE 型,其中从同一农贸市场采集的样品中分离到两株同一个 PFGE 型别的单核细胞增生李斯特菌,提示加工环境存在单核细胞增生李斯特菌的污染或加工过程的交叉污染。结论 北京市售即食熟肉制品中存在单核细胞增生李斯特菌污染,农贸市场出售产品污染状况高于超市、熟肉专卖店和饭馆。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌 即食熟肉制品 定量检测 脉冲场凝胶电泳
中图分类号: R155.51 文献标志码: A

Quantitative detection on contamination of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat meats in Beijing

WANG Wei, YAN Shaofei, BAI Li, LI Zhigang, DU Chunming, LI Fengqin

Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, Ministry of Health, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China

Abstract: Objective To survey the contamination of *L. monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat meats in Beijing. **Methods** Ready-to-eat meats were quantitatively detected for *L. monocytogenes* using MPN method. *L. monocytogenes* isolates were analyzed by PFGE. **Results** Fourteen out of 197 ready-to-eat meat samples were positive for *L. monocytogenes* with the contamination rate of 7.11% and the geometry mean contamination level of 14.31 MPN/g. The contamination of *L. monocytogenes* isolated from free trade market (13.89%) was more severe than those from specificity store (8.57%), supermarket (5.75%) and restaurant (2.56%), while supermarket had the highest mean contamination level of 22.78 MPN/g. A total of 13 PFGE types were characterized using DICE-UPGMA analysis through BioNumerics 7.1 software. There were two isolates from the same free trade market share the same PFGE type, which suggested the same contamination source of both samples. **Conclusion** Contamination of *L.*

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(No. 2012AA10163)

作者简介: 王伟,男,研究方向: 食品微生物, E-mail: wangweisw@cfsa.net.cn

1 通信作者: 李凤琴,女,博士,研究员,研究方向: 食品微生物, E-mail: lifengqin@cfsa.net.cn

monocytogenes exist in retail ready-to-eat meats. The contamination level of *L. monocytogenes* isolated from free trade market is more severe than those from specificity store, supermarket and restaurant.

Key words: *L. monocytogenes*, ready-to-eat meats, quantitative detection, PFGE

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种重要的食源性致病菌, 人感染后的主要临床表现为败血症、脑膜炎和单核细胞增多等。易感人群为孕妇、婴幼儿、老人及免疫力低下者^[1]。由于该菌在 4 °C 环境中仍可生长繁殖, 因此被称为“冰箱菌”, 这一特性增加了被单核细胞增生李斯特菌污染食品的控制难度。被单核细胞增生李斯特菌污染的食品种类主要包括未经巴氏灭菌的牛奶、即食熟肉制品及生食鱼类等^[2]。酱卤肉、熏烧烤肉、肉干、熏煮香肠火腿、发酵肉、熟制腌腊制品等我国居民喜爱的即食熟肉制品^[3], 由于在摄入前大多不经过加热, 同时该类食品无论是在常温还是 4 °C 的环境中储存, 均易被单核细胞增生李斯特菌污染^[4], 因此, 该类食品是单核细胞增生李斯特菌污染的高风险食品, 已引起国内外学者和食品加工业者的高度关注。本研究对 197 份北京市售即食熟肉制品中单核细胞增生李斯特菌的定量污染水平进行检测, 并对分离的菌株进行 PFGE 分型研究。

1 材料与方法

1.1 样品

2015 年 5-6 月, 从北京市超市、农贸市场、熟肉专卖店以及饭馆购买 197 份即食熟肉制品, 所有样品均为加工后经过切片的散装食品。

1.2 仪器和试剂

PCR 仪、电泳仪和凝胶成像系统(美国伯乐公司); 恒温培养箱(美国热电公司); Vitek2 全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司); CLASS II B2 型生物安全柜(美国 LABCONCO 公司); 电子天平(感量 0.01g, 郑州南北仪器设备有限公司); 高压蒸汽灭菌器(日本三洋公司); 隔水式恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司); 台式小型离心机(德国 Sigma 公司); 纯水仪(美国 Millipore 公司); 涡旋混合器(德国 IKA 仪器公司)。

缓冲蛋白胨水(BPW)、脑心琼脂培养基(BHA)、缓冲李斯特菌增菌肉汤(BLEB)及其选择性添加剂(γ-吡啶黄素、萘啶酮酸、放线菌酮)(北京路桥生物技术有限公司); 李斯特菌显色培养基(郑州博赛生物技术股份有限公司); Vitek2 GN 鉴定卡(法国生物梅里埃公司); 100 bp DNA

Ladder(MD109)及 2 × Taq PCR MaterMix(KT201-02)(北京天根生化有限公司); 限制性内切酶 *Asc* I 及 *Xba* I(NEB 公司); Seakem Gold(SKG) 琼脂糖、溶菌酶和蛋白酶 K(均为德国 Sigma 公司产品); 所用 PCR 引物由英潍捷基公司合成。

1.3 标准菌株

单核细胞增生李斯特菌标准菌株 ATCC 19115 为本实验室保藏。

1.4 单核细胞增生李斯特菌的分离

参照美国细菌学分析手册(Bacteriological Analytical Manual, BAM)中单核细胞增生李斯特菌的最大可能数(most probable number, MPN)检测方法^[5]对所采样品进行检测。无菌操作剪取 25 g 熟肉样品放于盛有 225 ml BPW 的均质袋中, 快速拍打 1~2 min 至样品完全混匀后, 用 BPW 进行 10 倍系列稀释, 取 10⁻¹、10⁻²和 10⁻³三个稀释度的样品匀液各 1 ml, 分别接种于 10 ml 缓冲李斯特菌增菌肉汤中, 每一稀释度接种 3 管, 共计 9 管。30 °C 培养 48 h 后, 从变浑浊的阳性培养管中取一环增菌液划线接种于李斯特菌显色平板, 于 37 °C 培养 24 h 后进行鉴定。

1.5 单核细胞增生李斯特菌的鉴定

从每个李斯特菌显色平板上分别挑取 5 个单核细胞增生李斯特菌疑似菌落, 转种到 BHA 平板 37 °C 培养 24 h 后, 挑取菌落于双蒸水中, 煮沸 10 min 后, 进行细菌基因组 DNA 模板提取, 用 PCR 方法对单核细胞增生李斯特菌特异性基因 *hly* 进行鉴定。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环后, 72 °C 10 min。 *hly* 上下游引物序列分别为: CACTCAGCATTGATTTGCCA 和 ATTTTCCCTTCACTGATTGC, 扩增片段大小为 274 bp, 同时以单核细胞增生李斯特菌 ATCC 19115 作为 PCR 实验的阳性对照菌株。

对所有 *hly* 基因阳性的菌株用 Vitek2 全自动细菌鉴定仪进行生化鉴定。生化鉴定为单核细胞增生李斯特菌的菌株用于后续的 PFGE 分型实验。

1.6 脉冲场凝胶电泳(PFGE)

参照美国 PulseNet 中单核细胞增生李斯特菌脉冲场凝胶电泳标准方法操作, 使用 *Asc* I 进行酶切, 对上述分离菌株进行 PFGE 分型。结果使用

BioNumerics 7.1 软件、采用加权组平均法 (unweighted pair group method using arithmetic averages,UPGMA) 进行聚类分析。条带位置差异容忍度选择 1%,优化值选择 0%。使用 Band based/Dice 方法计算不同菌株电泳条带的相似性系数,并按照 PulseNet 的命名原则,对每一种不同的带型进行命名 (GX6A16. BJ01 ~ GX6A16. BJ13),下文简称为 BJ01 ~ BJ13。将相似度 $\geq 85\%$ 的指纹图谱划分至同一基因簇 (clusters) 将相似度为 100% 的指纹图谱归为相同 PFGE 带型 (patterns)。

2 结果

2.1 北京市售即食熟肉制品中单核细胞增生李斯特菌污染状况

由表 1 可见,14 份样品检出单核细胞增生李

斯特菌,检出率为 7.11%,污染水平范围 3 ~ 460 MPN/g,污染水平的几何均值为 14.31 MPN/g。其中 7 份样品中单核细胞增生李斯特菌的污染水平在 3 ~ 10 MPN/g,6 份样品的污染水平介于 11 ~ 50 MPN/g,1 份样品的污染水平高达 460 MPN/g。

对不同采样地点样品的检验结果显示,采自农贸市场的样品中单核细胞增生李斯特菌污染率 (13.89% 5/36) 高于熟肉专卖店 (8.57% 3/35) 和超市 (5.75% 5/87)。而从污染水平看,超市样品中单核细胞增生李斯特菌的平均污染水平 (22.78 MPN/g) 高于农贸市场 (17.59 MPN/g) 和熟肉专卖店 (7.88 MPN/g)。采自饭馆的样品单核细胞增生李斯特菌的检出率和污染水平均较低,分别为 2.56% (1/39) 和 3 MPN/g。

表 1 北京市售即食熟肉制品中单核细胞增生李斯特菌污染情况

Table 1 Detection of *L. monocytogenes* in retail ready-to-eat meats in Beijing

样品	样品份数	阳性份数	检出率/%	污染水平/(MPN/g)		分布				
				均值	范围	<3	3~10	11~50	>50	
采样地点										
农贸市场	36	5	13.89	17.59	3~43	31	1	4	0	
熟肉专卖店	35	3	8.57	7.88	7.2~9.2	32	3	0	0	
超市	87	5	5.75	22.78	3~460	82	2	2	1	
饭馆	39	1	2.56	3	3	38	1	0	0	
食品种类										
猪肉	146	9	6.16	18.84	3~460	137	3	5	1	
牛肉	20	2	10.00	15.76	9.2~27	18	1	1	0	
鸭肉	15	1	6.67	7.4	7.4	14	1	0	0	
驴肉	4	1	25.00	3	3	3	1	0	0	
鸡肉	6	1	16.67	9.2	9.2	5	1	0	0	
羊肉	5	0	0	0	0	5	0	0	0	
加工类型										
麻辣拌	9	3	33.33	11.32	3~23	6	1	2	0	
酱卤	100	10	10.00	16.45	3~460	90	5	4	1	
香肠火腿	61	1	1.64	7.2	7.2	60	1	0	0	
熏烧烤	11	0	0	0	0	11	0	0	0	
萨拉米	15	0	0	0	0	15	0	0	0	
腌腊和风干	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
合计	197	14	7.11	14.31	3~460	183	7	6	1	

2.2 单核细胞增生李斯特菌分离株 PFGE 分型结果

由图 1 可见,此次检出的 14 株单核细胞增生李斯特菌被分为 13 个 PFGE 型别 (BJ01 ~ BJ13)。其中 BJ01 型包含了两株菌,为采自同一摊位不同类别食品 (酱牛肉和猪肚丝) 中污染的菌株,提示可能存在加工过程或分切过程的交叉污染。其余

菌株的 PFGE 型别不同,说明污染来源各异。

3 讨论

本研究单核细胞增生李斯特菌检出率为 7.11%,低于崔京辉等^[6]的报道结果 (48%,24/50) 这可能与政府加大即食肉制品的监管力度,整体食品卫生状况提高有关。本研究中虽然 14



图 1 14 株单核细胞增生李斯特菌熟肉制品分离株 PFGE 分型结果

Figure 1 PFGE of 14 *L. monocytogenes* isolates from read-to-eat meats

份被单核细胞增生李斯特菌污染的样品中的 13 份污染水平低于 50 MPN/g,但由于单核细胞增生李斯特菌即使在 4 °C 的环境中也能够生长繁殖,因此被单核细胞增生李斯特菌污染的食品即使冷藏条件下放置,若食用前不经彻底加热,则消费者摄入后对其健康影响的风险仍然较高,应引起关注。

本研究中农贸市场采集样品中单核细胞增生李斯特菌检出率(13.89%, 5/36)分别高于熟肉专卖店、超市和饭馆产品,说明农贸市场的熟肉制品加工储藏条件较差,被污染的机会较高,应重点加强监管。而超市平均污染水平高于其他来源样品,则可能是因为虽然超市出售的熟肉制品在运输、储存过程中保持冷链,但由于进样量大,交叉污染的机会较多,增加了单核细胞增生李斯特菌繁殖的可能性。在所有的产品中麻辣拌的污染率最高,这可能是麻辣拌在其制作过程中使用的刀和案板反复使用而疏于清洗,造成交叉污染的可能性增加所致。

对单核细胞增生李斯特菌分离株的 PFGE 指纹图谱分析结果显示,PFGE 型别分布较为分散,这与文献报道一致^[7-8]。而从同一农贸市场采集的酱牛肉和猪肚丝中分离的单核细胞增生李斯特菌具有相同的 PFGE 型别,两种食品均为散装的酱卤肉。鉴于本研究所采样品均为二次切割后出售的熟肉制品,提示该农贸市场的摊贩在二次切割肉制品时可能使用了相同的刀板,切割过程中存在交叉污染,也可能是加工环境存在单核细胞增生李斯特菌污染,或盛放肉制品的容器生熟不分存在交叉污染的可能。关于单核细胞增生李斯特菌污染的来源和污染环节需对熟肉制品的加工

原料、环境等进行深入调查方可确认。建议监管部门加强对现制现售熟肉制品的监管,并加大宣传力度,教育消费者食用即食熟肉制品时尽量做到加热后食用,以降低污染的单核细胞增生李斯特菌对人体健康的危害。

参考文献

[1] CORR S C, O'NEILL L A. *Listeria monocytogenes* infection in the face of innate immunity [J]. Cell Microbiol 2009, 11(5): 703-709.

[2] CARTWRIGHT E J, JACKSON K A, JOHNSON S D, et al. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998 - 2008 [J]. Emerg Infect Dis 2013, 19: 1-9.

[3] 翟明爽,徐斐,曹慧,等.即食熟肉制品中主要致病菌的半定量风险评估[J].微生物学杂志,2014(2):92-98.

[4] 翠焕,王艳华,朱万芹,等.肉制品腐败变质原因分析[J].微生物学杂志,2011,31(3):106-109.

[5] ANTHONY D H, KAREN J. *Listeria monocytogenes*, Bacterial Analytical Manual [R]. U. S. Food and Drug Administration, 2013.

[6] 崔京辉,李达,王永全,等.2004~2005年北京市食品中单核细胞增生性李斯特菌的污染状况调查[J].中国卫生检验杂志,2006,12:1508-1509.

[7] 俞骅,郑伟,王艳,等.2007年-2011年杭州地区食品中单核细胞增生李斯特菌 PFGE 型别分析[J].中国卫生检验杂志,2013(5):1189-1192.

[8] 贾静,毕振旺,陈玉贞,等.2009-2010年山东省食品中单核细胞增生李斯特菌的耐药性和分子分型研究[J].中华预防医学杂志,2011,45(12):1065-1067.

收稿日期:2015-08-21