

调查研究

部分市售农副产品李斯特菌污染情况调查及毒力基因检测

骆玲飞 王小光 刘继倩 汪萍 张颖华 陈秀华 欧阳霖
(上海市闵行区疾病预防控制中心,上海 201100)

摘要:目的 了解上海市闵行区农贸市场食品中李斯特菌的污染情况及其毒力基因的携带情况。方法 按国标方法 GB/T 4789.30—2008《食品卫生微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》,采用科玛嘉显色培养基,对食品进行李斯特菌的分离、API 试剂条进行生化鉴定,PCR 扩增进行 *hly*、*prfA*、*plcB*、*actA*、*inlA* 和 *iap* 6 种毒力基因的检测。结果 320 份样品中共检出李斯特菌 36 株,其中单核细胞增生李斯特菌 10 株;英诺克李斯特菌 23 株,其余 3 株。10 株单核细胞增生李斯特菌 *hly*、*prfA*、*plcB*、*iap*、*inlA*、*actA* 6 种毒力基因携带率分别为 100%、100%、100%、100%、100% 和 0,即 10 株菌株 *actA* 基因全部缺失。结论 本地区农贸市场食品存在李斯特菌的污染,生肉禽类食品中李斯特菌污染比较严重,应加强监督管理;单核细胞增生李斯特菌菌株 *actA* 毒力基因均表现为缺失,是否为本地区特性,还有待研究。

关键词:李斯特菌;单核细胞增生李斯特菌;食品;污染;毒力基因

中图分类号:R378.99 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)03-0275-03

Investigation on the Contamination Status and the Virulence Genes of *Listeria* in Some Commercially Available Agricultural By-Products in Minhang District of Shanghai

LUO Ling-fei, WANG Xiao-guang, LIU Ji-qian, WANG Ping,
ZHANG Ying-hua, CHEN Xiu-hua, OUYANG Lin

(Shanghai Minhang District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 201100, China)

Abstract: Objective To investigate the contamination of *Listeria* in some foods from farm markets and to detect the virulence genes of *Listeria monocytogenes* in Minhang district of Shanghai. **Method** Based on the national standard methods GB/T 4789.30—2008, *Listeria* in food was separated and biochemically identified by using CHROM agar color medium and API reagent strips. The virulence gene of *hly*, *prfA*, *plcB*, *iap*, *inlA* and *actA* were detect by PCR methods. **Results** There were 36 strains of *Listeria* isolated and identified from 320 samples, including 10 strains of *Listeria monocytogenes*, 23 strains of *Listeria innocua* and 3 strains of other *Listeria*. Excepting the absence of *actA*, virulence genes *hly*, *prfA*, *plcB*, *iap*, *inlA* were identified in all 10 strains of *Listeria monocytogenes*. **Conclusion** The contamination of *Listeria* is existed in foods from farm market in Minhang district of Shanghai. Supervision and management should be strengthened on raw meat and poultry, which were serious contaminated. The absence of virulence gene *actA* in all *Listeria monocytogenes* isolated from local food needs further study.

Key words: *Listeria*; *Listeria monocytogenes*; Food; Contamination; Virulence Genes

李斯特菌属共有 6 种菌:单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、伊氏李斯特菌(*Listeria ivanovii*)、斯氏李斯特菌(*Listeria seeligeri*)、英诺克李斯特菌(*Listeria innocua*)、威氏李斯特菌(*Listeria welshimeri*)和格氏李斯特菌(*Listeria grayi*);其中单核细胞增生李斯特菌和伊氏李斯特菌均有致病性^[1]。研究发现单核细胞增生李斯特菌包括致病性、弱致病性和非致病性 3 种类型^[2],该菌在自然

界分布十分广泛,对多种食品均有不同程度的污染^[3]。为了解本地区农贸市场食品中李斯特菌的污染状况及其相关毒力基因的携带情况,采集了 4 大类共计 320 份样品进行了李斯特菌的检测,同时对单核细胞增生李斯特菌的 6 个相关毒力基因进行了检测。

1 材料与方法

1.1 样品来源与种类

2008—2009 年 5—10 月份期间,定点随机采集闵行区农贸市场 4 大类食品(生肉禽类、蔬菜类、熟食类、水产品)共计 320 份,其中生肉禽类 120 份、蔬

收稿日期:2009-11-09

基金项目:上海市闵行区科委自然科学基金项目(2007MH005)

作者简介:骆玲飞 女 主管技师 研究方向为病原微生物

E-mail:anfcd@sohu.com

菜类 80 份、熟食类 60 份、水产品 60 份。

1.2 主要试剂

LB₁、LB₂ 增菌液, TSB-YE 琼脂平板由上海市疾病预防控制中心提供, API 生化试剂条由法国生物梅里埃提供, 科玛嘉显色培养基由郑州博赛生物技术研究所提供。

聚合酶链反应 (PCR) 引物^[4] 及 10 × buffer、dNTP、Taq 酶、琼脂糖、EB、100 bp DNA Mark 均购自上海赛百盛基因技术有限公司。引物序列 *hly* (上游: 5'-ACGCAGTAAATACATTAGTG-3', 下游: 5'-AATAAACTTGACGGCCATAC-3', 372bp); *prfA* (上游: 3'-CGTACAGGACGATGAACCC-5', 下游: 5'-ATCACAAAGCTCACGAG-3', 571bp); *plcB* (上游: 3'-TGTCGTTTGAAACCGTCCA-5', 下游: 5'-AGTGT-TCTAGTCTTTCCGG-3', 795bp); *actA* (上游: 5'-GCAGCGACAGATAGCGAAGA-3', 下游: 5'-CACTCAACGCCTACGAAGAC-3', 472bp); *iap* (上游: 5'-TTTGCTAAAGCGGGTATCTC-3', 下游: 5'-AGCCGTGGATGTTATCGTAT-3', 205bp); *inlA* (上游: 5'-CCGCACTCACTAACTTAGAG-3', 下游: 5'-GTTGTTTCTTTGCCGTCCAC-3', 580bp)。

1.3 方法

1.3.1 菌种分离及鉴定 按 GB/T 4789.30—2008《食品卫生微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌

检验》^[1], 无菌称取 25 g 样品加入 225 ml LB₁ 增菌液中, 30 °C 培养 24 h, 取 0.1 ml 接种到 10 ml LB₂ 增菌液中, 30 °C 培养 24 h, 然后接种科玛嘉李斯特菌显色培养基, 36 °C 培养 48 h。挑取可疑的菌落进行常规生化鉴定, API 生化试剂条鉴定。

1.3.2 毒力基因检测 接种单个菌落于 TSB-YE 琼脂平板, 30 °C 过夜培养, 挑取适量纯菌接种到 100 μl 无菌去离子水中, 振荡混匀, 即可用于 PCR 扩增。PCR 反应体积为 20 μl, 其中 10 × buffer 2 μl, 20 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl, 10 mmol/L dNTP 0.8 μl, 2 U/μl Taq 酶 0.5 μl, 20 μmol/L 引物一对各 1 μl, DNA 模板 1 μl, 去离子水 12.2 μl。PCR 扩增反应条件: 95 °C 2 min 预变性, 然后 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 以 100 bp DNA Mark 作参照, 用 EB 进行染色观察结果。

2 结果

2.1 李斯特菌污染情况

4 大类(生肉禽类、蔬菜类、熟食类、水产品) 320 份食品中共检出李斯特菌 36 株, 阳性率为 11.25%。其中单核细胞增生李斯特菌 10 株, 阳性率为 3.13%, 英诺克李斯特菌 23 株, 格氏李斯特菌 2 株, 威氏李斯特菌 1 株。具体结果见表 1。

表 1 闵行区农贸市场食品中李斯特菌的污染情况

李斯特菌类型	生肉禽类(120份)		蔬菜类(80份)		熟食类(60份)		水产品(60份)		合计(320份)	
	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
单增李斯特菌	8	6.67	2	2.50	0	0	0	0	10	3.13
英诺克李斯特菌	10	8.33	6	7.50	3	5.00	4	6.67	23	7.19
格氏李斯特菌	2	1.67	0	0	0	0	0	0	2	0.62
威氏李斯特菌	0	0	0	0	1	1.67	0	0	1	0.31
斯氏李斯特菌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
伊氏李斯特菌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合计	20	16.67	8	10.00	4	6.67	4	6.67	36	11.25

2.2 毒力基因携带情况

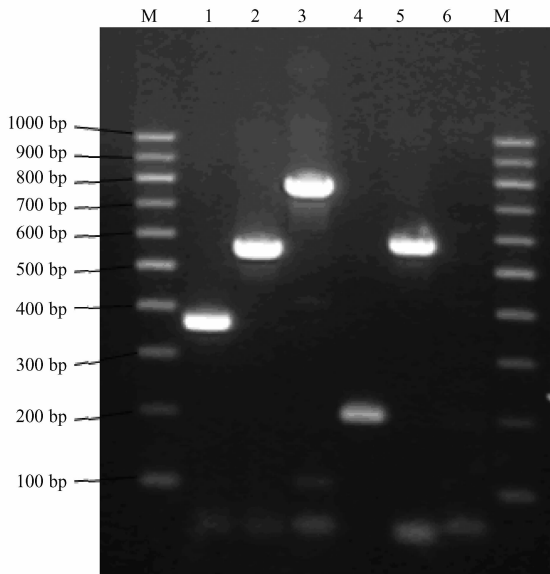
10 株单核细胞增生李斯特菌 *hly*、*prfA*、*plcB*、*iap*、*inlA*、*actA* 6 种毒力基因携带率分别为 100%、100%、100%、100%、100%、0, 即 10 株菌株 *actA* 基因全部缺失, 见图 1。

3 讨论

本次调查发现, 上海市闵行区农贸市场食品中存在着李斯特菌的污染。英诺克李斯特菌的阳性率最高, 为 7.19%, 其次为单核细胞增生李斯特菌, 为 3.13%; 4 大类食品中生肉禽类李斯特菌的阳性率最高, 为 16.67%; 其次为蔬菜, 为 10.00%; 生肉禽类和蔬菜类食品的单核细胞增生李斯特菌阳性率分别为 6.67% 和 2.50%。单核细胞增生李斯特

菌的阳性率比国内相关地区报道的偏低^[5,6], 可能与采样的地点——农贸市场有关。根据相关报道, 农贸市场较超市的阳性率低^[7], 可能与李斯特菌为“嗜冷菌”, 在 4 °C 环境下仍可以生长有关, 超市有较多的冰鲜食品, 而农贸市场多为生鲜食品。在样品检测时, 英诺克李斯特菌会在增菌过程中产细菌素样物质 (bacterioein-like substance, BLS) 抑制单核细胞增生李斯特菌的生长, 从而常检出英诺克李斯特菌, 这也与实际检测的情况一致。

对 10 株单核细胞增生李斯特菌 6 种毒力基因的检测发现, 全部菌株 *actA* 基因均表现为缺失, 与相关报道有所不同^[4]。*actA* 基因编码的表面蛋白 *actA* 在单增李斯特菌胞内运动中起着重要作用, 能产生一种使肌动蛋白聚合的因子, 诱导单极的肌



注:M为100bp Mark; 1为 *hly*; 2为 *prfA*; 3为 *plcB*;
4为 *iap*; 5为 *inlA*; 6为 *actA*。

图1 李斯特菌毒力基因 PCR 产物电泳图

动蛋白的聚合,以促进单增李斯特菌在宿主细胞内的极向运动^[8]。该基因的缺失,可能会造成单增李斯特菌毒力的下降,使之变成弱致病性^[9,10]。*actA*基因的缺失是否为本地区单增李斯特菌的特性,还有待进一步研究,其可能是本地区未有记录

发生过单增李斯特菌的散发或暴发的原因之一。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 30—2008 食品卫生微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [2] CONNER D E. Pathogenicity of foodborne environmental and clinical isolates of *Listeria monocytogenes* in mice[J]. J Food Sci, 1989,54(6):1553-1556.
- [3] 郁庆福,蔡宏道,何晓管,等. 现代卫生微生物学[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:116-117.
- [4] 官照龙,祝仁发,叶长芸,等. 118株单核细胞增生李斯特菌的毒力基因检测[J]. 疾病监测,2007,22(5):299-301.
- [5] 梅玲玲,程苏云,朱敏,等. 2000-2004年浙江省食品中产单核李斯特菌污染状况调查[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(7):784-785.
- [6] 陈太基,封幼玲,戴建华,等. 南京地区李斯特菌污染状况研究[J]. 中国公共卫生,2000,16(1):45-46.
- [7] 吴晓芳,程平庆,徐德顺. 湖州市食品中单增李斯特菌的污染状况调查[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(10):1876-1877.
- [8] COSSART P, SANSONETTI P J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens[J]. Science, 2004, 304: 242-248.
- [9] 殷月兰,朱国强,耿士忠,等. 产单核细胞李斯特菌 *actA/plcB* 缺失株的构建及其生物学特性[J]. 微生物学报,2008,48(3):299-303.
- [10] RAFELSKIS M, THERIOT J A. Mechanism of polarization of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA [J]. Mol Microb, 2006,59(4):1262-1279.

调查研究

上海市静安区食源性腹泻病的发生状况及对策分析

颜士勇¹ 刘 弘² 陈毅琼¹ 征 柏¹ 徐惠珠¹ 高国激² 王李伟²

(1. 上海市静安区疾病预防控制中心, 上海 200041; 2. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200051)

摘要:目的 全面了解静安区食源性腹泻病发生状况,为建立食源性疾病监测网络提供基础资料,以便提出相应的控制措施。方法 采用整群抽样的方法选择静安区常住居民201人,入户调查,询问基本情况、食品卫生知识和行为、食源性腹泻病、食品卫生状况评价及需要。用Epidata建数据库,用SAS进行统计分析。结果 静安区居民腹泻年患病率为25.87%,两周患病率为4.98%;食源性腹泻年患病率为5.97%,两周患病率为1.49%。性别、年龄、职业、文化程度、婚姻状况、健康状况对患病率的影响差异无统计学意义。但不同经济收入的调查对象腹泻年患病率差异有统计学意义($P < 0.01$),其中收入较高者腹泻年发生率有高发倾向。食品加工用具是否生熟分开对腹泻年患病率的影响差异有统计学意义($P < 0.05$),刀具不专用患病的危险是专用的6.41倍,砧板不专用患病危险是专用的5.23倍;异味或变质食品处理方式对腹泻两周患病的影响差异有统计学意义($P < 0.05$),加工后再吃患病危险是不吃的10.50倍;家庭冰箱使用状况对食源性腹泻的年患病的影响有差异统计学意义($P < 0.05$),不使用冰箱患病危险是使用冰箱的5.03倍;未发现其他生活方式对患病的影响。结论 食源性腹泻病仍有发生,居民要加强厨房卫生意识和养成良好的个人卫生饮食习惯,要大力宣传食品卫生知识。

关键词:食源性疾病;腹泻;调查;患病率

中图分类号:R442.2;R821.35 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)03-0277-04

收稿日期:2009-11-27

作者简介:颜士勇 男 博士 副研究员 研究方向为公共卫生 E-mail:yanshiyong1967@yahoo.com.cn