

调查研究

武汉市部分菜场肉类食品中产志贺毒素大肠杆菌污染状况分析

毕旺来,谈笑,陈程,程登陆,龙程钰,王宏勋,李睿

(武汉轻工大学生物与制药工程学院,湖北武汉 430023)

摘要:目的 对武汉市部分菜场肉类食品中产志贺毒素大肠杆菌(STEC)污染状况进行分析。方法 2011年7月至2012年10月期间,从武汉市汉口30个菜场和超市共采集样品196份,其中猪肉102份,牛肉60份,禽类34份。通过选择性增菌,提取DNA,PCR扩增 *stx1*、*stx2*、*rfb*₀₁₅₇、*wzy*₀₁₅₇ 基因,分析食品中产志贺毒素大肠杆菌的污染状况。结果 猪肉、牛肉、禽类食品中非O157型STEC的阳性检出率分别为18.6%、48.4%和2.9%;O157型STEC的阳性检出率分别为13.6%(猪肉)、6.7%(牛肉)和2.9%(禽类)。菜场样品STEC检出率(35.8%)略高于超市样品(32.4%)。结论 武汉市肉类食品中STEC检出率较高,应定期跟踪监测,了解菌株流行和毒力变化状况。

关键词:产志贺毒素大肠杆菌; O157; 肉类; PCR鉴定; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号:R155.5;TS207.4;TS251.4⁺3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)01-0067-04

Analysis on contamination status of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meats from some markets in Wuhan

BI Wang-lai, TAN Xiao, CHEN Cheng, CHENG Deng-lu, LONG Cheng-yu, WANG Hong-xun, Li Rui

(College of biological and pharmaceutical engineering, Wuhan Polytechnic University, Hubei Wuhan 430023, China)

Abstract: Objective To investigate the contamination of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in retail meats in Wuhan city. **Methods** A total of 196 samples were collected from 30 open markets and supermarkets during a two-year sampling period (from 2011 July to 2012 October). Specimens comprised 102 pork, 60 beef and 34 poultry samples. All samples were performed selective incubation, then screened by PCR amplification for the presence of *stx1*, *stx2*, *rfb*₀₁₅₇ and *wzy*₀₁₅₇ genes. **Results** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) were frequently detected in beef, pork and poultry products. 18.6% raw meats, 48.4% beef and 2.9% poultry samples had been tested positive for the presence of non-O157 STEC. The detection rate of O157 type STEC was 13.6% in pork, 6.7% in beef and 2.9% in poultry, respectively. The detection rate of STEC in open markets (35.8%) was a little higher than that in supermarkets (32.4%). **Conclusion** The STEC detection rate is a little high in retail meats in Wuhan, and it should be concerned.

Key words: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*(STEC); O157; meat; PCR detection; food-borne pathogen; food safety

产志贺毒素大肠杆菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)是引发食物中毒的致病菌,可引起胃肠道以及全身的疾病,如出血性肠炎和溶血性尿毒综合征,临床表现为溶血性贫血、急性肾衰竭、凝血功能障碍、血小板减少等,严重者死亡^[1]。STEC血清型很多,有174种O抗原血清型和53种H抗原血清型,最主要的流行株是O157:H7^[2]。STEC最重要的致病因子是位于Stx噬菌体上的志

贺毒素(Stx),有Stx1毒素和Stx2毒素两种类型,分别由*stx1*和*stx2*两种基因编码^[2]。

近年来美国、日本、德国等国科研工作者发现,STEC流行株类型在一定时间范围内出现了变迁。1986年以来,美国、日本等国报道的非O157血清型STEC感染引起的病例数不断增加,2008年美国由O111引起的食物中毒病例数为341例^[3]。非O157型STEC引起的食物中毒并发症严重程度也在不断增加,2011德国STEC暴发的元凶亦为1种罕见的血清型O104:H4^[4]。美国农业部食品安全检验局(FSIS)从2012年起对牛肉产品中的6种非O157大肠杆菌进行检测,分别为O26、O45、O103、O111、O121、O145,它们被认定为生鲜牛肉中的“有害掺入物”,对于含有该6种菌的生鲜碎牛肉及其组分、嫩牛排被禁止流入市场^[5]。

收稿日期:2013-09-18

基金项目:国家“863”计划项目(2012AA101703-3);武汉市科技局国际科技合作计划项目(2013030409020113)

作者简介:毕旺来 男 实验员 研究方向为食品安全和食品微生物
E-mail:605277709@qq.com

通讯作者:李睿 女 教授 研究方向为食品安全和食品微生物
E-mail:liruiwuhan@163.com

据美国疾病预防控制中心报告,1982—2002年 STEC 的传播途径中,52%是食源性的,14%是人与人之间接触传播,21%传播途径不明。牛肉、猪肉、鸡肉、奶制品和蔬菜等是 STEC 通过食品传播的主要渠道^[6]。本项目对武汉市部分菜场的肉类食品中 STEC 的污染状况进行研究,为国内 STEC 的流行调查和防控措施制定提供观测数据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品、菌株来源

样品采集:采样地点为武汉市汉口常青花园周边的30家大型农贸集市、连锁超市。其中超市10家,大型菜场20家。2011年7月—2012年10月,从这30个菜场和超市分批购买样品196份,其中猪肉102份,牛肉60份,禽类34份。食品样品采集后放入无菌均质袋,冰袋冷藏运回。采样当天进行富集培养。

阳性对照菌株:大肠杆菌 O157:H7 质控菌株,武汉市疾病预防与控制中心赠送。

1.1.2 主要仪器与试剂

台式冷冻高速离心机, Tgradient PCR 仪(德国 Biometra), GBox-HR-E-M 凝胶成像仪(英国 Syngene), DYY-8C 电泳仪、DYCP-31D 型电泳槽(均购自北京市六一仪器厂)。

GoldView 核酸染料(北京赛百盛基因技术有限公司), AxyPrep 细菌基因组试剂盒(美国 Axygen), DNA 分子质量标准、Taq 酶(5 U/ μ l)均购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 增菌培养

样品处理和检测参考 GB/T 4789.36—2008 和 SN/T 1869—2007 进行^[7-8]。无菌操作称取 25 g 肉样放入装有 225 ml TSB 增菌液的均质袋中,均质 6 min。将均质液转入无菌锥形瓶中,加 2 支新生霉素(2.0 mg/支),41 $^{\circ}$ C,180 r/min 摇床培养 18~22 h。

1.2.2 混合菌液 DNA 提取

取 1 ml 菌液于 1.5 ml 无菌 EP 管中,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1.5 ml 1 \times TE 缓冲液漩涡振荡混匀。加入 20 μ l(50 mg/ml)溶菌酶,37 $^{\circ}$ C 保温 2 h。加入 50 μ l(5 mol/L) NaCl,100 μ l 10% SDS,3 μ l(20 mg/ml)蛋白酶 K,漩涡振荡混匀,55 $^{\circ}$ C 水浴保温 50 min,直至混合液完全变为澄清透明液体,加入 5 μ l RNase A 温和混匀,室温静置 30 min。将混合液分装到 2 个无菌 EP 管中,加入等体积的苯酚-氯仿-异戊醇(25 + 24 + 1, V/V/V),温和混匀后,

12 000 r/min 离心 10 min。取上清于新的 EP 管中,加入等体积的氯仿-异戊醇(24 + 1, V/V),温和混匀,12 000 r/min 离心 10 min。重复氯仿-异戊醇抽提 1 次。将上清合并到新的 EP 管中,加入 0.6 倍体积的异丙醇(-20 $^{\circ}$ C 预冷),轻轻混匀,12 000 r/min 离心 10 min。弃上清,75% 乙醇洗涤沉淀,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清后室温晾干。将提取的总 DNA 溶解于 50 μ l TE 缓冲液中,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 质量。DNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存,用于后续 PCR 检测。

1.2.3 PCR 检测 *rfb*₀₁₅₇ 基因

参考文献[9]合成引物。上游引物(5'-3'): CGGACATCCATGTGATATTGG;下游引物(5'-3'): TTGCCTCTGTACAGCTAATCC。预期产物大小为 259 bp。PCR 扩增反应体系:10 \times buffer 2.5 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ l,10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ l, Taq DNA 聚合酶 0.15 μ l,模板 DNA 1.5 μ l,如无菌双蒸水至总体积 25 μ l。PCR 扩增反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,59 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。以 O157 质控菌株的 DNA 模板作为阳性对照,普通大肠杆菌 DNA 模板作为阴性对照,无菌双蒸水作为空白对照,每个样品做 2 个 PCR 管。取 5 μ l PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查。

1.2.4 PCR 检测 *stx* 基因

分别采用 EVT 和 EVS(TaKaRa Code:RR105A)引物对扩增 *stx1* 和 *stx2* 基因。PCR 扩增反应体系为:10 \times buffer 2.5 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ l, 20 μ mol/L 上下游引物各 0.25 μ l, Taq 酶 0.15 μ l,模板 DNA 1 μ l,加无菌双蒸水至总体积 25 μ l。PCR 扩增反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。*stx1* 的 PCR 产物大小为 349 bp。*stx2* 的 PCR 产物大小为 404 bp。后续操作同 1.2.3,所有 *stx* 阳性样品都由不同操作者经过 PCR 扩增重复验证无误后,方能报告为阳性。

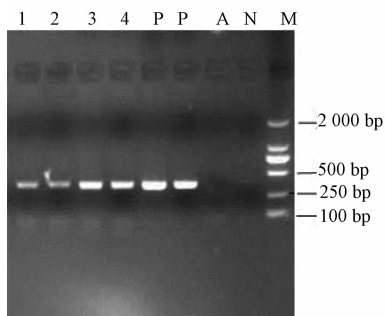
1.2.5 PCR 检测 *wzy*₀₁₅₇ 基因

自行设计 *wzy*₀₁₅₇ 基因引物。上游引物(5'-3'): CTTTTCTAACTCTGGTGTCCG;下游引物(5'-3'): TTGGTAGGGTTGTATGC。预期产物大小为 183 bp。PCR 扩增反应体系:10 \times buffer 2.5 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ l, 10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ l, Taq DNA 聚合酶 0.2 μ l,模板 DNA 1 μ l,加无菌双蒸水至总体积 25 μ l。PCR 扩增反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。后续操作同 1.2.3。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

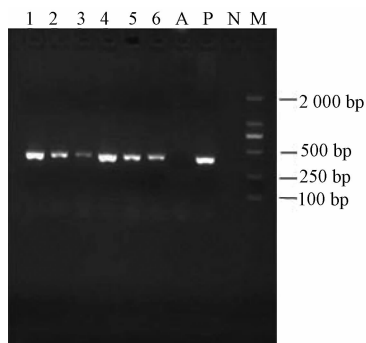
混合样品提取总 DNA 后,用 PCR 检测 *stx1*、*stx2*、*rfb*₀₁₅₇、*wzy*₀₁₅₇ 基因。PCR 扩增和电泳的部分结果见图 1~4。



注:M:DL2000 分子量标准;A:阴性对照;P:阳性对照;N:空白对照;
1~4:样品总 DNA 的 *stx1* 基因扩增结果(1 和 2、3 和 4 点样孔
分别为同一样品的平行管 PCR 扩增产物)

图 1 样品 *stx1* 基因 PCR 产物电泳结果

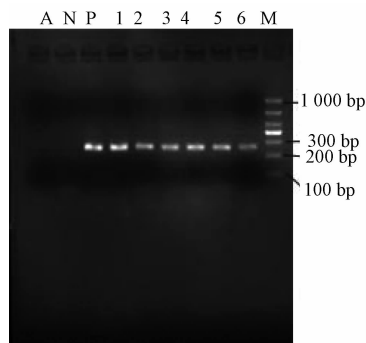
Figure 1 The PCR products of *stx1* gene of food samples



注:M:DL2000 分子量标准;A:阴性对照;P:阳性对照;N:空白对照;
1~6:样品总 DNA 的 *stx2* 基因扩增结果(1 和 4、2 和 5、3 和 6 点
样孔分别为同一样品的平行管 PCR 扩增产物)

图 2 样品 *stx2* 基因 PCR 产物电泳结果

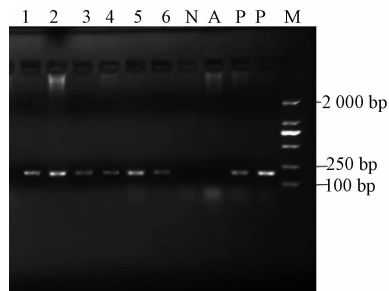
Figure 2 The PCR products of *stx2* gene of food samples



注:M:DL1000 分子量标准;A:阴性对照;P:阳性对照;N:空白对照;
1~6:样品总 DNA 的 *rfb*₀₁₅₇ 基因扩增结果(1 和 2、3 和 4、5 和 6 点
样孔分别为同一样品的平行管 PCR 扩增产物)

图 3 样品 *rfb*₀₁₅₇ 基因 PCR 产物电泳结果

Figure 3 The PCR products of *rfb*₀₁₅₇ gene of food samples



注:M:DL2000 分子量标准;A:阴性对照;P:阳性对照;N:空白对照;
1~6:样品总 DNA 的 *wzy*₀₁₅₇ 基因扩增结果(1 和 2、3 和 4、5 和 6 点
样孔分别为同一样品的平行管 PCR 扩增产物)

图 4 样品 *wzy*₀₁₅₇ 基因 PCR 产物电泳结果

Figure 4 The PCR products of *wzy*₀₁₅₇ gene of food samples

2.2 各肉类食品中非 O157 型 STEC 分布状况

对采集的不同样品中的 STEC 污染状况进行分析。*stx* 基因 PCR 扩增阳性、*rfb*₀₁₅₇ 基因 PCR 扩增阴性样品的分析结果提示有非 O157 型 STEC 的感染。具体阳性样品检出率见表 1。

表 1 不同样品中的非 O157 型 STEC 分布状况

Table 1 The distribution of non-O157 STEC in deferent samples

种类	样品/ 份	检出率/%		
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1</i> + <i>stx2</i>
猪肉	102	0.98(1/102)	13.70(14/102)	3.90(4/102)
牛肉	60	10.00(6/60)	16.70(10/60)	21.70(13/60)
禽类	34	0.00(0/34)	2.90(1/34)	0.00(0/34)

2.3 各肉类食品中 O157 型 STEC 分布状况

*wzy*₀₁₅₇ 是大肠杆菌 O157 的 O 抗原聚合酶基因,与其他非 O157 血清型菌株的 *wzy* 基因同源性极低,和编码脂多糖的 *rfb*₀₁₅₇ 基因一样可作为靶基因来区分 O157 菌株与非 O157 菌株^[10-11]。除了设定阴性和空白两组对照外,将 *rfb*₀₁₅₇ 基因 PCR 扩增阳性的样品,再通过 PCR 扩增 *wzy*₀₁₅₇,可以很大程度上避免 PCR 出现假阳性的情况。两组 PCR 扩增结果具有 100% 的一致性。

从表 2 可以看出,各肉类样品中携带 *stx* 基因的 O157 检出率较低,多份猪肉、禽类样品均污染了不携带 *stx* 基因的 O157。

3 讨论

国外一项调查显示,牛肉中 STEC 的检出率为 12.1%~40.8%,猪肉检出率为 4.0%~18.0%^[12],另外一项调查显示,牛肉和猪肉的 STEC 流行率分别是 36.4% 和 10.6%^[13]。最近由美国农业部农业研究局(USDA-ARS)完成的一项调查发现了类似的结果,测试的牛肉样本中 STEC 的阳性检出率为 24.3%^[3]。本次研究 STEC 在猪肉和牛肉中的检出

表2 不同样品中的 O157 型 STEC 分布状况

Table 2 The distribution of O157 type STEC in deferent samples

种类	样品/份	检出率/%			
		<i>stx1 + rfb_{O157}</i>	<i>stx2 + rfb_{O157}</i>	<i>stx1 + stx2 + rfb_{O157}</i>	<i>rfb_{O157}</i>
猪肉	102	1.96(2/102)	7.80(8/102)	3.80(4/102)	10.80(11/102)
牛肉	60	5.00(3/60)	1.70(1/60)	0.00(0/60)	1.70(1/60)
禽类	34	2.90(1/34)	0.00(0/34)	0.00(0/34)	8.80(3/34)

率高于国外的报道,可能和本地区 STEC 的流行状况有关,或者是与选购的样品所在的超市、菜场环境卫生不规范有关。此次研究表明菜场样品 STEC 检出率(35.8%)略高于超市样品(32.4%)。

PCR 方法灵敏,能检测出样本中数量极少的 STEC 或者难培养的 STEC,而平板分离方法难以从大量杂菌中将 STEC 筛选出来,因此一般认为采用 PCR 方法 STEC 的检出率要远高于平板筛选得到的检出率。本课题组随后采用免疫磁珠和平板分离法从一些带菌的肉样中分离筛选 STEC 菌株,最终得到 12 株携带 *stx* 基因的菌株。用 RPLA 法测定这些分离株的志贺毒素滴度,结果发现这些分离株志贺毒素产量很低(数据本文未附)。已有报道指出很多地区检出不产毒或不携带 *stx* 基因的大肠杆菌 O157^[14-15],本次研究在猪肉、禽类制品中均检出此类细菌,这或许是武汉地区食品中 STEC 检出率虽高,但至今未有大的爆发流行的原因之一。

目前非 O157 型 STEC 的检验方法并不完善,由于 STEC 血清型的复杂多样,至今尚未找到某种特定的生化特征能有效地从食品或临床样本中分离非 O157 型 STEC^[16]。定期对市售肉类食品 STEC 的污染流行状况进行监测,很大程度上可提高对该类食源性疾病的溯源及鉴定能力。

参考文献

- [1] Karmali A K, Gannon V, Sarqant J M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC)[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 140(3-4): 360-370.
- [2] Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*[J]. *J Appl Microbiol*, 2000, 88(5): 729-745.
- [3] Bosilevac J M, Koohmaraie M. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(6): 2103-2112.
- [4] Dirk W, Gérard K, Christina F, et al. Outbreaks of virulent diarrhoeagenic *Escherichia coli*-are we in control? [J]. *BMC Med*, 2012(10): 11-16.
- [5] Paddock Z, Shi X R, Bai J F, et al. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces[J]. *Vet Microbiol*, 2012, 156(3-4): 381-388.
- [6] Mainil J G, Daube G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? [J]. *J Appl Microbiol*, 2005, 98(6): 1332-1344.
- [7] 中华人民共和国卫生部, GB/T 4789.36—2008 食品卫生微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [8] 中国质量监督检验检疫总局, SN/T 1869—2007 食品中多种致病细菌快速检测方法 PCR 法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [9] Paton A W, Paton J C. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx₁*, *stx₂*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb_{O111}*, and *rfb_{O157}*[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 598-602.
- [10] Fratamico P M, Roy D C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food using real-time multiplex PCR assays targeting the *stx₁*, *stx₂*, *wzy_{O157}*, and the *fliC_{H7}* or *eae* genes[J]. *Food Anal Methods*, 2010, 3(4): 330-337.
- [11] Wang L, Reeve P R. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes[J]. *Infect Immun*, 1998, 66(8): 3545-3551.
- [12] Brooks H J L, Mollison B D, Bettelheim K A, et al. Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand[J]. *Lett in Appl Microbiol*, 2001, 32: 118-122.
- [13] Read S C, Gyles C L, Clarke R C, et al. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario[J]. *Epidemiol Infect*, 1990, 1(105): 11-20.
- [14] Koitabashi T, Cui S, Kamruzzaman M, et al. Isolation and characterization of the Shiga toxin gene (*stx*)-bearing *Escherichia coli* O157 and non-O157 from retail meats in Shandong province, China, and characterization of the O157-derived *stx2* phages[J]. *J Food Protect*, 2008, 71(4): 706-713.
- [15] Li R, Harada T, Honjoh K, et al. Phylogenetic analysis and Shiga toxin production profiling of Shiga toxin-producing *Enterohemorrhagic Escherichia coli* clinical isolates[J]. *Microb Pathogenesis*, 2010, 49: 246-251.
- [16] Mariapia V M. Detection of bacteria, viruses, parasites and fungi [M]. New York: Springer, 2010.