

- mild curing, with additives, of hog and sheep sausage casings on their microbial quality and mechanical properties after storage at difference temperatures[J]. *Meat Sci*,1999,51:163-174.
- [9] Chawla S P, Chander R, Sharma A. Safe and shelf-stable natural casing using hurdle technology[J]. *Food Control*,2006,17:127-131.
- [10] 仇保丰,蔡宝亮,宋鸿雁,等. 冷冻原肠中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的研究[J]. *中国人兽共患病学报*,2012,28(2):191-192.
- [11] Houben J H. A Survey of dry-salted natural casings for the presence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and sulphite-reducing *Clostridium* spores[J]. *Food Microbiol*,2005,22:221-225.
- [12] Wijnker J J, Koop G, Lipman L J A. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings[J]. *Food Microbiol*,2006,23:657-662.
- [13] 郭海勇,吴静,许磊,等. 16S rRNA 基因序列在动物消化道细菌鉴定中的应用研究[J]. *安徽农业科学*,2008,36(17):7152-7154.
- [14] 周琳,张杰. 群落分析中的 16S rRNA 及其基因 16S rDNA 优化扩增[J]. *微生物学报*,2010,51(1):7-14.
- [15] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *Journal of Bacteriology*,1991,173(2):697-703.

调查研究

大连地区水产企业加工用水肠球菌检测和分析

田卓¹,麻丽丹²,陈晓东²,崔妍¹,闫平平¹

(1. 大连出入境检验检疫局,辽宁 大连 116000;2. 丹东出入境检验检疫局,辽宁 丹东 118000)

摘要:目的 对大连地区水产企业生产加工用水进行肠球菌检测,判断其卫生状况。方法 根据水质检测 ISO 标准(ISO 7899—2:2000)薄膜过滤法,进行肠球菌分离培养和生化反应鉴定,并根据肠球菌的高度保守的特异性 *tuf* 基因,合成了特异性引物进行 PCR 扩增。结果 在 41 份检测样品中,两种方法的肠球菌检出率均为 14.6%,主要为群 II 菌株。结论 本地区加工用水卫生状况不理想,应采取行之有效的措施,加强预防和治理。

关键词:肠球菌;大连地区;加工用水;食品安全;水产品

中图分类号:R123.1;TS201.6 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2013)05-0461-04

The detection and analysis of *Enterococcus* in processing water for seafood enterprises in Dalian

TIAN Zhuo, MA Li-dan, CHEN Xiao-dong, CUI Yan, YAN Ping-ping

(Dalian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian Qingdao 116000, China)

Abstract: Objective The aim of the study was to investigate the hygiene and sanitation of seafood enterprises according to *Enterococcus* in processing water. **Methods** According to the method of ISO7899-2:2000 (Water quality-Detection and enumeration of *Enterococcus*-Part 2: Membrane filtration method), *Enterococcus* was isolated and identified. Primers and probes were designed and synthesized targeting *tuf* gene. **Results** The results showed that 14.6% of the 41 isolates were *Enterococcus* positive. Most of them were Group II strains. **Conclusion** We should take effective measures of prevention and control because the health status was not satisfying.

Key words: *Enterococcus*; Dalian; processing water; food safety; aquatic products

在细菌学分类上,肠球菌(*Enterococcus*)属原归属于链球菌属。1989年,依据 Facklam 和 Collins 的分类,划分出肠球菌,该属共有 12 个种和 1 个变异株,包括寄生于人类、牛及其他反刍动物的粪肠球菌以及寄生于人类、牛及其他反刍动物、家禽和猪中的屎肠球菌等。

肠球菌通常寄生于各种温血和冷血动物的腔

肠,也是健康人体的上呼吸道、口腔或肠道的常居菌,其在宿主组织寄生,导致宿主非特异及免疫防御机制紊乱,并引起病理改变,能导致感染,可以引起宿主心内膜炎、胆囊炎、脑膜炎、尿路感染及伤口感染等多种疾病^[1]。此属细菌极易污染食品、生活和加工用水,易传播疾病。并且由于肠球菌具有天然耐药和获得性耐药的征^[2-4],使所致感染治疗困难^[5],因此,肠球菌成为食品、水质、加工设备卫生和生产环境卫生状况的评估指标。我国国家标准对饮用水中肠球菌无明确限量要求,欧盟饮用水

指令中,食品加工企业肠球菌不得检出。因此,我们对大连地区进出口水产企业的加工用水的肠球菌污染情况进行了普查,以评估其卫生状况。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株:肠球菌标准菌株 CICC 21606(中国工业微生物菌种保藏管理中心),

培养基:slanetz and bartley 琼脂(OXOID公司)、胆盐七叶苷叠氮钠琼脂、脑心浸液、脑心浸液琼脂(BD公司),DNA提取试剂盒及PCR相关试剂(TAKARA公司,引物由大连宝生物公司合成)。

生化鉴定系统:生物梅里埃 VITEK 2 Compact 鉴定系统。

1.2 方法

1.2.1 样品采集及处理

水样采集于2012年5月,每份样品约250 ml,用0.45 μm 带网格滤膜过滤,富集微生物。

1.2.2 肠球菌培养

参照ISO 7899—2:2000^[6],将富集微生物的滤膜置于slanetz and bartley 琼脂上,36℃培养44 h。

1.2.3 菌株分离及鉴定

培养后,将所有中心或全部为红色、紫红色或粉红色的凸起菌落判断为典型菌落。用无菌镊子将其滤膜转移到已预先加热到44℃的胆盐七叶苷叠氮钠琼脂上,44℃培养2 h后,立即读数。菌落周围的培养基为褐色、黑色的为典型菌落的阳性反应。

挑取上述典型菌落,参照VITEK 2 Compact 鉴定系统的说明,进行菌种的生化鉴定。

1.2.4 特异性片段的扩增

根据文献[7]合成引物如下:上游引物 Ent1 为:5'-TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT G-3';下

游引物 Ent2 为:5'-AAC TTC GTC ACC AAC GCG AAC-3'。

反应体系及扩增。反应体系:10×Buffer(无Mg²⁺)2 μl,氯化镁溶液(25 mmol/L)1.2 μl,DNA模板0.5 μl,Taq酶(5 U/μl)0.3 μl,dNTPs(2.5 mmol)0.5 μl,上下游引物(25 mmol/L)各0.2 μl,双蒸水补足20 μl。反应条件:94℃预变性3 min;94℃30 s,55℃30 s,72℃30 s,30个循环;最后72℃延伸10 min,于4℃结束反应。

1.2.5 PCR产物鉴定

PCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭0.5 μg/ml)上以溴酚蓝做指示剂,于1×TAE中200 V电压电泳30 min,取凝胶置于紫外灯下电脑图像分析仪分析、摄像、检测扩增产物,以PCR产物出现112 bp条带的分离株为肠球菌。

2 结果与分析

2.1 胆盐七叶苷叠氮钠琼脂培养结果

送检样品共计41份,其中6份在胆盐七叶苷叠氮钠琼脂上产生典型菌落,阳性检出率为14.6%。

2.2 分离菌株鉴定结果

使用法国梅里埃公司生产的VITEK 2 Compact 鉴定系统(VITEK GP)对可疑分离菌株进行生化鉴定,鉴定结果和生化反应结果见表1~4。

表1 6株菌鉴定结果

菌株编号	分离日期	鉴定结果	符合百分率/%
W1-cq	2012.5.18	鸪鸡肠球菌	99
W9-cq	2012.5.18	粪肠球菌	97
W11-cq	2012.5.18	鸪鸡肠球菌	99
W15-cq	2012.5.18	铅黄肠球菌	85
W29-cq	2012.5.18	鸪鸡肠球菌	99
W30-cq	2012.5.18	粪肠球菌	98

表2 鸪鸡肠球菌生化反应结果

Table 2 Biochemistry effect of *Enterococcus gallinarum*

序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果
2	AMY	+	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	+	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	+	15	AspA	+	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	Tyra	+	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	Dmne	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

注:“+”为呈阳性;“-”为呈阴性;AMY为苦杏仁苷;PIPLC为磷脂酰磷脂酶C;dXYL为D-木糖;ADH1为精氨酸双水解酶1;BGAL为β-D-半乳糖苷酶;AGLU为α-葡萄糖苷酶;APPA为丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶;CDEX为环式糊精;AspA:L-天冬氨酸芳胺酶;BGAR为β-半乳糖吡喃糖苷酶;AMAN为α-甘露糖苷酶;PHOS为磷酸酶;LeuA为亮氨酸芳胺酶;ProA为L-脯氨酸芳胺酶;BGURr为β-葡萄糖醛酸酶;AGAL为α-半乳糖苷酶;PyrA为焦谷氨酸芳胺酶;BGUR为β-D-葡萄糖醛酸酶;AlaA为丙氨酸芳胺酶;Tyra为酪氨酸芳胺酶;dSOR为D-山梨醇;URE为尿素酶;POLYB为多粘菌素B耐受;dGAL为D-半乳糖;dRIB为D-核糖;ILATk为L-乳酸盐产碱;LAC为乳糖;NAG为N-乙酰-D-氨基葡萄糖;dMAL为D-麦芽糖;BACI为杆菌肽耐受;NOVO为新生霉素耐受;NC6.5为6.5% NaCl生长;dMAN为D-甘露醇;Dmne为D-甘露糖;MBdG为甲基-B-D-葡萄糖吡喃糖;PUL为支链淀粉;dRAF为D-椰子糖;O129R为O/129耐受;SAL为水杨素;SAC为蔗糖;dTRE为D-海藻糖;ADH2s为精氨酸双水解酶2;OPTO为奥普托欣耐受。表3~表4“注”同

表3 粪肠球菌生化反应结果

Table 3 Biochemistry effect of *Enterococcus faecalis*

序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果
2	AMY	+	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADHI	+	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	+	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	+	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	+	29	Tyra	+	30	dSOR	+	31	URE	-	32	POLYB	-	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	Dmne	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

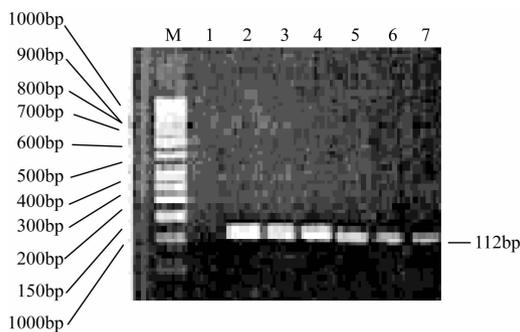
表4 铅黄肠球菌生化反应结果

Table 4 Biochemistry effect of *Enterococcus casseliflavus*

序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果	序号	生化反应	结果
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADHI	+	9	BGAL	+	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	+	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	Tyra	+	30	dSOR	+	31	URE	-	32	POLYB	-	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	Dmne	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

2.3 PCR 反应结果

通过对分离株进行 PCR 扩增,均得到约为 112 bp 的特异性条带,PCR 结果见图 1。



注:M 为 DNA Marker DL 1000;1 为阴性对照;2~7 为 W1-cq、W9-cq、W11-cq、W15-cq、W29-cq、W30-cq。

图1 试验菌株的 PCR 结果

Figure 1 PCR results of test strains

3 小结

在本试验中,共采集样本 41 份,分离出 6 株革兰氏阳性、成链状排列的球菌。根据 VITEK 2 的结果,分离株的生化特性符合肠球菌特性,其中鹌鹑肠球菌 3 株、粪肠球菌 2 株、铅黄肠球菌 1 株。针对肠球菌高度保守的特异性 *tuf* 基因设计的特异性引物对 6 株不同来源分离株进行 PCR 扩增,均能扩增出长 112 bp 的肠球菌特异性条带,进一步证明了结果的准确性。

目前,肠球菌作为生活饮用水、管道水和一些水质的指示菌。但卫生学家认为,肠球菌对恶劣的外环境和冷冻条件具有较强的抵抗力,作为监测水

质、环境卫生质量的污染指标更具有卫生学意义。美国研究人员在《医学微生物学杂志》上发表文章指出,粪肠球菌能产生有害化学物质,破坏 DNA,进而引起促发直肠癌的基因活动。肠球菌是人类和动物肠道正常菌群,通常不引起疾病,为一种重要的机会致病菌,该菌对多种抗生素特别是万古霉素具有高水平耐受性^[8-10],其耐药性可通过食品链转移到人群,从而引发更大的食品安全隐患。有些国家已经制定了针对肠球菌污染限量标准,大多制定在 0~10⁵ cfu/g 范围内。通过此试验,证实了水产企业加工用水中肠球菌的存在,并测出其带菌率为 14.6%,带菌率较高,而且分布广泛。加工用水的卫生质量是影响食品卫生的关键因素^[11-12],因此,应对本地区水产企业加工用水加大监测力度。

参考文献

[1] 赵红艳,孙艳平,张静凯,等. 肠球菌的致病性及耐药性分析[J]. 中国厂矿医学,2009,22(2):198-199.

[2] 瞿婷婷,陈亚刚,俞云松,等. 肠球菌耐药性研究[J]. 浙江预防医学,2004,16(7):3-5.

[3] 李建升. 243 株肠球菌感染菌种分布及其耐药性观察[J]. 南华大学学报:医学版,2006,34(1):102-103.

[4] Andresa M. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* sp. isolated from the intestinal tract of patientd from a university hospital in Brazil[J]. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,2004,99(7):303-308.

[5] 周倩宜,张坚磊,卫京平. 粪肠球菌和屎肠球菌耐药性分析[J]. 微生物与感染,2008,3(2):70-72.

[6] ISO 7899-2:2000 Water quality-Detection and enumeration of *Enterococcus* Part 2-membrane filtration method[S]. 2000.

- [7] 陈玉. 新疆部分地区绵羊及相关环境肠球菌的生态分布及部分生物特性研究[D]. 新疆: 石河子大学, 2008.
- [8] 姚杰, 徐元宏. 耐万古霉素肠球菌检测的研究进展[J]. 安徽医药, 2009, 13(10): 1274-1276.
- [9] 李春艳, 杨青. 肠球菌耐药性及万古霉素耐药基因研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(12): 2244-2247.
- [10] Muhammad W R. Penetration and activity of antibiotics in brain abscess[J]. JCPSP, 2005, 15(3): 165-167.
- [11] 阮国洪. 水环境中微生物的分析进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(5): 119-124.
- [12] 刘静, 叶劲, 谢海英. 强化消毒法对水中粪肠球菌灭活效果研究[J]. 供水技术, 2011, 5(5): 12-14.

调查研究

柳江县市售国产婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌污染监测分析

宋蕴如

(柳江县疾病预防控制中心, 广西 柳江 545100)

摘要:目的 了解市售国产婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌污染状况, 为消费预警提供科学依据。方法 分别按2011、2012年版国家食源性致病菌监测工作手册对市场上11家国内生产的32份婴幼儿配方粉进行检测。结果 32份样品检出2株阪崎肠杆菌, 检出率为6.25%。其中婴幼儿配方奶粉中阪崎肠杆菌检出率4.35%(1/23); 婴幼儿谷物食品中阪崎肠杆菌检出率11.11%(1/9)。结论 柳江县市售部分婴幼儿配方粉中存在阪崎肠杆菌污染, 食用安全隐患不容忽视, 应加强监测力度, 预防和控制阪崎肠杆菌引起的食物中毒事件发生。

关键词: 婴幼儿配方粉; 阪崎肠杆菌; 污染监测; 食物中毒

中图分类号: R155.3⁺1; TS201.6 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2013)05-0464-03

Survey of *Enterobacter sakazakii* contamination in homemade infant formula powder

SONG Yun-ru

(Liujiang Center for Disease Control and Prevention, Guangxi Liujiang 545100, China)

Abstract: Objective To know the *Enterobacter sakazakii* contamination in homemade infant formula powder which provides scientific basis for consumers. **Methods** 32 bags of Infant formula powder bought from supermarket and the retail market were checked according to the 2011 and 2012 editions of the national foodborne pathogen monitoring manual. **Results** 2 strains of *Enterobacter sakazakii* were found from 32 samples, the detection rate was 6.25%. Among them, The detection rate of *Enterobacter sakazakii* from Infant formula powder was 4.35% (1/23); and The detection rate of *Enterobacter sakazakii* from Infant cereal food formula was 11.11%(1/9). **Conclusion** *Enterobacter sakazakii* contamination exists in infant formula which sales form Liujiang County. Food security can not be ignored, monitor of infant food should be strengthen, which can prevent and control the food poisoning incident caused by *Enterobacter sakazakii*.

Key words: *Enterobacter sakazakii*; infant formula powder; pollution survey; food poisoning

阪崎肠杆菌为食源性致病菌, 能引起严重的新生儿脑膜炎、小肠结肠炎和菌血症, 致死率高达50%以上^[1]。国际微生物标准委员会将阪崎肠杆菌称为严重危害特定人群、威胁生命或导致慢性实质性后遗症的细菌^[2]。自2002年美国某公司生产的婴儿配方奶粉中检出阪崎肠杆菌并从市场召回了该公司的相关产品后, 阪崎肠杆菌污染问题引起了国际相关机构的重视。近几年我国各地都相继开展了婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌污染监测, 本研

究为了解柳江县市售国产婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌污染情况, 于2011—2012年按柳江县食品安全风险监测实施方案从市场购得11家国内生产的32份婴幼儿配方粉进行检测, 阪崎肠杆菌检出率为6.25%(2/32), 提示柳江县市售国产婴幼儿配方粉存在阪崎肠杆菌的污染, 婴幼儿配方食品安全不容乐观, 现将检测结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

样品为柳江县内部分超市及食品零售店销售

收稿日期: 2013-07-02

作者简介: 宋蕴如 女 主管技师 主要研究方向为卫生检验

E-mail: yunyuguo@126.com