

求,提出设置加工专间的卫生要求^[4],严把卫生许可关^[5];同时加强风险监测,打击违法经营行为,督促餐饮经营者认真执行《规范》;还应加强标准宣贯和卫生知识宣传力度,提高餐饮单位经营者的自律意识,从各方面出发,减少食源性疾病的发生频率^[6]。

3.4 餐饮单位日常卫生管理是落实《规范》的保障

调查结果表明,当前餐饮单位卫生管理、人员管理未能适应即食生食动物性水产品的制售需求,建立并落实卫生管理制度、对从业人员进行水产加工专项食品安全知识培训的仅占10%(8/80)。而如何选择合格原料,如何尽量做到不混用养殖水^[7],如何保障专人、专间、专用具等,这些操作过程具体要求都离不开日常卫生管理。因为缺少了热加工这道杀菌工序,只有通过强化卫生管理,将《规范》的每个操作要求落到实处,才能有效避免二次污染,保障即食生食动物性水产品的食用安全。

(志谢 许庆忠、邱景邦、顾雪峰、巫明鉴等同志参加了本项目调查工作,在此一并志谢)

参考文献

- [1] 秦品章.生食水产品的卫生(综述)[J].中国食品卫生杂志,2000,12(5):40-43.
- [2] 高培.生食水产品食用安全性研究[J].食品研究与开发,2005,26(5):200-203.
- [3] 季建刚,王美珍,谢坚.苏州新区生食水产品的卫生学调查[J].上海预防医学杂志,2000,12(11):536-537.
- [4] 张卫兵,王咸钢,熊海平,等.南通市区餐饮单位生食贝类微生物污染状况调查[J].南通大学学报:医学版,2007,27(4):281-282.
- [5] 翟文慧,王爱月,张濛.河南省2011年生食水产品监测结果分析[J].中国卫生检验杂志,2013,23(5):1271-1285.
- [6] 汤志荣,张磊,滕迪云.上海市生食水产品安全监管研究[J].上海食品药品监管情报研究,2012(119):18-21.
- [7] 金国农,胡小玲,徐仲仙,等.市售海水产品副溶血性弧菌带菌状况调查[J].浙江预防医学,2011,23(6):60-61.

调查研究

石家庄市市售婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌的监测及溶血素基因的分析

秦丽云¹,吕国平¹,郭玉梅¹,齐惠荣²,潘琢¹

(1.石家庄市疾病预防控制中心,河北 石家庄 050011;

2.石家庄市桥西区疾病预防控制中心 河北 石家庄 050091)

摘要:目的 了解目前市售婴幼儿配方奶粉、谷基辅助食品样品中蜡样芽胞杆菌的污染及其毒素基因的携带情况。方法 采集石家庄市23个区县市售婴幼儿配方粉、谷基辅助食品共399份,依照国家标准GB/T 4789.14—2003《食品卫生微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》和《食源性致病菌监测工作手册》进行蜡样芽胞杆菌检测并计数,应用荧光PCR方法检测蜡样分离株的溶血素基因和非溶血素基因。结果 399份样品中蜡样芽胞杆菌检出85份,其中婴幼儿配方奶粉检出36份,检出率22.8%(36/158);谷基辅助食品检出49份,检出率20.3%(49/241)。85份阳性样品中有48份呈溶血素基因阳性,检出率56.5%,非溶血素基因均为阴性。结论 婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌的污染较严重,存在潜在的食品风险。分析结果可为婴幼儿食品卫生学检验标准及监督管理等方面提供参考。

关键词: 幼儿食品;蜡样芽胞杆菌;溶血素基因;婴幼儿配方奶粉;谷基辅助食品;荧光PCR

中图分类号: R155.51;Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2014)04-0388-03

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.04.021

Survey and hemolysin gene analysis of *Bacillus cereus* in infant food from Shijiazhuang market

QIN Li-yun, LV Guo-ping, GUO Yu-mei, QI Hui-rong, PAN Zhuo

(Shijiazhuang Center for Disease Control and Prevention, Hebei Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective To investigate the contamination of *Bacillus cereus* in infant formula milk powder and cereal-based complementary foods from Shijiazhuang market, and also to monitor the toxin genes of the isolated strains. **Methods** Infant formula powder and cereal-based complementary foods from 23 counties of Shijiazhuang city were collected. *Bacillus*

cereus strains were tested and counted according to the national standard GB/T 4789.14-2003 and foodborne pathogenic bacteria monitoring manual. The hemolytic toxin genes and non-hemolytic toxin genes of isolates were detected by real-time PCR. **Results** 85 strains of *Bacillus cereus* were detected from 399 samples. The detection rate of infant formula powde was 20.3% (36/158) and cereal-based complementary foods was 22.8% (49/241). The hemolysin gene was positive in 48 isolated strains and the detection rate was 56.5% with no isolates carrying non-hemolytic toxin gene. **Conclusion** The contamination of *Bacillus cereus* in infant food was quite severe. These foods had a potential food poisoning risk. Our results could provide reference for the infant food hygiene inspection standard setting, supervision and management.

Key words: Infant food; *Bacillus cereus*; hemolysin gene; infant formula powde; cereal-based complementary foods; real-time PCR

蜡样芽胞杆菌是一种革兰氏阳性需氧芽胞杆菌,常存在于土壤、灰尘和污水中,植物和许多生熟食品中均能分离到(如乳及乳制品、禽畜类制品、蔬菜、淀粉类制品等),并可在其中生长繁殖,产生大量肠毒素,引起人类食物中毒^[1]。蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒在我国也很常见^[2],该菌可引起呕吐型和腹泻型两种不同类型的食物中毒^[3],腹泻型食物中毒则为多种肠毒素作用的结果,因此,除了监测食物中蜡样芽胞杆菌的数量外,了解其致病性也很重要。而婴幼儿食品是婴儿感染蜡样芽胞杆菌的主要途径,为了解石家庄市场上出售的部分婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌的污染状况,2012年对石家庄市23个区县开展了婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌监测工作,对市场上出售的部分婴幼儿配方奶粉、谷基辅助食品进行随机抽样监测(每个季度各个区县采样5份),采用稀释培养计数法(MPN)进行定量检验,并将分离到的菌株以溶血素基因和非溶血素基因为目的基因进行荧光PCR检测,实现对致病蜡样芽胞杆菌肠毒素的监测,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 设立监测点和样品采集

在石家庄市内5区及管辖的18个县区设立监测采样点,从监测点各超市或零售商店等场所购买各类婴幼儿配方奶粉和谷基辅助食品。

1.1.2 主要仪器与试剂

ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI)。胰酪胨大豆多粘菌素肉汤(TSB)、营养琼脂、甘露醇卵黄多粘菌素琼脂(MYP)、多粘菌素 B、血琼脂平板、蜡样芽胞杆菌生化鉴定试剂均购自北京陆桥技术公司,50% 卵黄液(美国 BD),革兰氏染液试剂盒(珠海贝索公司),蛋白质结晶紫毒素染色液(广东环凯微生物科技有限公司),蜡样芽胞杆菌核酸测定试剂盒(荧光 PCR 法,上海之江科技技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 蜡样芽胞杆菌检验

蜡样芽胞杆菌检验方法参照 GB/T 4789.14—2003《食品卫生微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》^[4]和《食源性致病菌监测工作手册》进行菌株分离试验,采用 MPN 计数法进行蜡样芽胞杆菌计数。

1.2.2 毒素基因的检测试验

挑取蜡样芽胞杆菌单个菌落,放置有 100 μ l DNA 提取液中充分混匀,沸水浴 10 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清 4 μ l,参照蜡样芽胞杆菌核酸测定试剂盒做 PCR 反应。肠毒素基因检测为双重反应,一个反应为检测溶血素基因,标记荧光检测为 FAM 通道,另一个反应为检测非溶血素基因,标记荧光检测为 VIC 通道。反应体系总体积为 40 μ l,分别为 36 μ l 反应混合液和 4 μ l 待测样品模板。循环参数设置:37 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 2 min,一个循环;93 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,40 个循环;单点荧光检测在 60 $^{\circ}$ C。同时以阳性对照品为阳性对照,以灭菌水作为阴性对照。

1.3 统计学分析

采用 B \times C 列联表卡方 χ^2 检验。

2 结果

2.1 蜡样芽胞杆菌监测情况

2012 年在石家庄市 23 个监测点采集婴幼儿食品样品 399 份,检出 85 株蜡样芽胞杆菌,检出率为 21.3%。其中采集谷基辅助食品 241 份,检出 49 株蜡样芽胞杆菌,检出率为 20.3%;婴幼儿配方奶粉 158 份,检出 36 株蜡样芽胞杆菌,检出率为 22.8%,蜡样芽胞杆菌在两类食品中的检出率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.34, P > 0.05$),见表 1。

表 1 婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌检出情况

Table 1 Detection of *Bacillus cereus* in infant food

婴幼儿食品种类	监测数 /份	检出数 /份	检出率 /%	MPN 值范围 /(MPN/g)
谷基辅助食品	241	49	20.3	1.50 ~ 46
婴幼儿配方奶粉	158	36	22.8	0.36 ~ 24
合计	399	85	21.3	

注:—为无数据

将23个监测地区按照市内五区、县级市、平原县、山区县来划分,各个监测点均有蜡样芽胞杆菌检出,检出率差异无统计学意义, ($\chi^2 = 4.66, P > 0.05$),见表2。

表2 各监测地区婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌监测情况(%)

Table 2 Detection of every monitoring area's *Bacillus cereus* in infant food

监测地区	检出率	
	谷基辅助食品	婴幼儿配方奶粉
市内五区	24.0(12/50)	24.0(6/25)
县级市	26.1(12/46)	31.4(11/35)
平原县	19.1(17/89)	20.0(12/60)
山区县	14.3(8/56)	18.4(7/38)
合计	20.3(49/241)	22.8(36/158)

2.2 溶血素基因和非溶血素基因的检测结果

85株蜡样芽胞杆菌分离菌进行荧光PCR反应,检测溶血素基因和非溶血素基因,48株溶血素基因阳性,检出率为56.5%;非溶血素基因均为阴性。两类食品携带溶血素基因差异无统计学意义($\chi^2 = 0.02, P > 0.05$),见表3。

表3 蜡样芽胞杆菌肠毒素基因在婴幼儿食品中检出情况

Table 3 Detection of *Bacillus cereus* enterotoxin gene in infant food

婴幼儿食品种类	HBL 检出率 /%	NHE 检出率 /%
谷基辅助食品	57.1(28/49)	0(0/49)
婴幼儿配方奶粉	55.6(20/36)	0(0/36)
合计	56.5(48/85)	0(0/85)

注:HBL为溶血素基因;NHE为非溶血性基因

3 讨论

蜡样芽胞杆菌属条件致病菌中的一种,可引起胃肠道外感染及胃肠道感染。胃肠道外感染主要可导致支气管炎、脑膜炎、骨髓炎及菌血症。胃肠道感染主要以肠毒素为主,可引起食物中毒^[1],菌量、毒力、摄入量及个人体质等都与能否引起中毒有着密切关系,目前我国蜡样芽胞杆菌食物中毒的实验室诊断标准是中毒食品中蜡样芽胞杆菌菌数测定一般为 $\geq 10^5$ cfu/g^[5],但也曾报道有菌数低于 10^5 cfu/g引发的食物中毒^[6-7]。本文通过对23个区县婴幼儿食品中蜡样芽胞杆菌监测,蜡样芽胞杆菌污染率为21.3%,各地样品中均有污染,地区差异无统计学意义,蜡样芽胞杆菌污染较广泛,虽然

计数结果均 $< 10^5$ cfu/g,但对婴幼儿食品仍存在着潜在危害。

蜡样芽胞杆菌所造成腹泻食物中毒的致病因子是肠毒素,目前至少已经发现4种不同的肠毒素,其中溶血素是我国食源性蜡样芽胞杆菌的主要毒力基因之一^[8],蜡样芽胞杆菌在配方奶粉和谷基辅助食品中都有不同程度污染,且溶血素基因在两类样品中均有检出,样品类别差异无统计学意义,表明两类样品中蜡样芽胞杆菌有可能对进食者产生严重危害。

婴幼儿食品不同于一般食品,有其特殊的营养,初生到3岁年龄阶段的婴幼儿,由于身体的特殊条件决定了配方乳粉、米粉等食品是其主要辅助食物,一旦此类样品被蜡样芽胞杆菌污染,其对免疫系统发育尚未完全的婴儿构成严重的感染威胁。目前蜡样芽胞杆菌还不是婴幼儿食品的常规检测项目,即使婴幼儿配方食品中菌落总数和大肠菌群污染水平符合现行卫生标准,也可能由于存在蜡样芽胞杆菌的污染而引起婴幼儿食品安全问题。本研究对覆盖石家庄市23个区县市售婴幼儿配方粉、谷基辅助食品等样品中的蜡样芽胞杆菌监测结果显示,蜡样芽胞杆菌污染较广泛,对婴幼儿食品安全构成了威胁,提示相关部门和生产厂商应采取应对措施,以降低婴幼儿配方奶粉因蜡样芽胞杆菌污染所带来的风险,保障婴幼儿的健康。

参考文献

- [1] 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:760-764.
- [2] 郑文湖,叶慧,鲍志华. 赣州市1983—2002年食物中毒特征分析[J]. 中国预防医学杂志,2004,(5):369-370.
- [3] 张伟伟,鲁维,张金兰,等. 食品中蜡样芽胞杆菌的研究进展[J]. 中国酿造,2010,218(5):1-4.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.14—2003 食品卫生微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验国家标准[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [5] 中华人民共和国卫生部. WS/T 82—1996 蜡样芽胞杆菌食物中毒诊断标准及处理原则[S]. 北京:中国标准出版社,2005.
- [6] 殷全喜,张秀红,杜欣. 一起蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒的调查报告[J]. 中国预防医学杂志,2006,7(2):115-117.
- [7] 高景枝,郑向梅,王滨. 一起由蜡样芽胞杆菌引起食物中毒的调查分析[J]. 中国公共卫生管理,2008,24(4):387-388.
- [8] 庄子慧,何丽,郭云昌. 我国食源性蜡样芽胞杆菌毒力基因和药物敏感性研究[J]. 中国食品卫生杂志,2013,25(3):198-201.