

风险监测

宁波地区食品中致病菌监测与流行株分析

徐景野¹, 闫鹏¹, 杨元斌¹, 章丹阳¹, 胡荣华²

(1. 宁波市疾病预防控制中心 浙江 宁波 315010; 2. 宁波市卫生监督所 浙江 宁波 315010)

摘要:目的 了解宁波地区食品中致病菌检出情况和菌株的耐药性,发现其流行优势菌。方法 致病菌检测采用直接分离与增菌分离相结合的方法;细菌鉴定采用生化筛检和 API 等方法;细菌分型采用诊断血清和 PFGE 基因分型;药敏试验采用 K-B 法,耐药基因检测采用 PCR 法。结果 6 812 份食品样品中检出目标菌 7 类 12 种,共 2 331 份,检出率为 34.22%,致病性弧菌检出数最高,其次为沙门菌和致病性气单胞菌。副溶血性弧菌与其他致病菌差异有统计学意义($P < 0.01$),分离出 10 个血清群和 29 个 PFGE 型,其中 O6、O5 血清群和 PFGE 1 型是副溶血性弧菌的主要优势流行型。检出的致病菌对大多数抗生素敏感,其中 3 株气单胞菌为带 *aacc* 耐药基因的多重耐药菌。结论 宁波地区食品中致病菌种类较多,易引起食源性疾病;各类致病菌均有流行优势株,副溶血性弧菌是最主要的流行优势株;血清分型和 PFGE 型能发现优势菌,但均有一定的局限性。

关键词:食品;食源性致病菌;鉴定;分型;耐药性;流行株;宁波

中图分类号:R155;Q938 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)05-0562-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.05.018

Inspection of pathogenic bacteria in food and analysis of epidemic strains in Ningbo

XU Jing-ye, YAN Peng, YANG Yuan-bin, ZHANG Dan-yang, HU Rong-hua

(Ningbo Municipal Center for Diseases Control and Prevention, Zhejiang Ningbo 315010, China)

Abstract: Objective To study the contamination of pathogenic bacteria in food and their resistance to antibiotics, and to find the dominant epidemic strains in Ningbo. **Methods** Direct separation and culture enrichment were both used for pathogen isolation. The identification of bacteria was performed by Vitek 2 compact and API method. Sub-typing of bacterial was performed by serology and PFGE. Antibiotics resistances were tested by Kirby-Bauer method. Antibiotic resistance genes were detected by PCR. **Results** 7 categories and 12 kinds of bacteria (2 331 strains) were detected from 6 812 food samples. Most of them were pathogenic *Vibrio*, the second prevalent was *Salmonella*, and the third was *Aeromonas*. *Vibrio parahaemolyticus* was the major epidemic foodborne pathogenic strain in Ningbo. The detection rate had significant difference ($P < 0.01$) compared to other pathogens. 10 serum groups and 29 PFGE types were identified, in which O6 and O5 serum groups and type 1 of PFGE were the dominant epidemic. Pathogenic bacteria detected were sensitive to most antibiotics. There were three *Aeromonas* strains which were resistant to multi-drug with *aacc* genes.

Conclusion Foodborne pathogenic bacteria in Ningbo were various. All categories of pathogenic bacteria had their dominant epidemic strains, while *Vibrio parahaemolyticus* was the major contributor of foodborne diseases. Serotype and PFGE typing of bacteria could be applied to find their dominant epidemic strains, but either of them had certain limitations. The broad-spectrum antibiotic treatment was effective for foodborne bacterial illness.

Key words: Food; foodborne pathogen; identification; genotyping; resistance; epidemic strains; Ningbo

WHO 将食源性疾病定义为凡是通过摄食进入人体内的各种致病因子引起的、通常具有感染性质或中毒性质的一类疾病。目前已知的食源性疾病大约有 250 多种,其中有 85% 由病原微生物引起,

尤以细菌性食物中毒最为普遍,其临床表现主要为腹泻,该类疾病是宁波市最常见的夏秋季感染性疾病,有很高的发病率,受到政府和消费者的广泛关注。随着经济日益全球化和国际食品贸易的日益扩大,危及人类健康、生命安全的重大食品安全事件屡屡发生,是食品安全重要的公共卫生问题之一^[1]。监测食品中致病菌污染或携带程度,是保障食品安全和控制食源性疾病的重要手段。本课题组开展食品中致病菌污染检测,了解食品中致病菌种类、携带情况以及是否存在流行优势株,为食源

收稿日期:2015-06-19

基金项目:宁波市重大(重点)项目(2013C51014);宁波市创新团队项目(2012B82018)

作者简介:徐景野 男 主任技师 研究方向为微生物检验与研究

E-mail:xujy@nbcdc.org.cn

性疾病风险评估提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品种类与来源

从宁波地区 11 个县(市)区的部分农贸市场、超市和饭店(酒店)采集海产品 3 525 份(其中包括牡蛎、毛蚶、蚶子、海瓜子、蛏子、圆蛤、花蛤、芝麻螺、肉螺、海虾、泥螺、杂鱼等 12 种);淡水产品 169 份(鲫鱼、扁鱼、塘鱼等 3 种);生肉样品 1 756 份(猪肉、牛肉、鸡肉、羊肉等 4 种);腌制水产品 185 份(腌制泥螺、蟹糊等);熟食制品 350 份;冷冻饮品 147 份、饮料 113 份、奶粉 67 份、豆制品 171 份、生食蔬菜 167 份及酒店的冷菜或沙拉 162 份,共采集 6 812 份样品。由专业人员无菌采集、定型包装,在保质期内检测。

1.1.2 主要仪器与试剂

Mastercycler 梯度 PCR 扩增仪(美国 Eppendorf),脉冲场凝胶电泳仪、Versa Doc 凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad,拍打式均质器。亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)、四硫磺酸钠煌绿增菌液(TTB)、GN 增菌液、3.5% 氯化钠碱性蛋白胨水、Bolton 肉汤、7.5% 氯化钠增菌液、SS 琼脂、麦康凯琼脂、伊红-美蓝琼脂、TCBS 等均购自北京陆桥技术有限公司,沙门菌诊断血清、志贺菌诊断血清均购自卫生部兰州生物制品研究所,副溶血性弧菌“O”分群血清(日本生研力生株式会社),MH 琼脂及抗生素药敏纸片(英国 OXOID),蛋白酶 K(美国 Sigma),限制性内切酶 *Not* I 和 *Xba* I 均购自日本 TaKaRa,肠道致病性大肠埃希菌(宁波天润生物药业有限公司),20E 生化鉴定试剂条(法国生物梅里埃),DNA 提取试剂、PCR 反应试剂均购自大连宝生物公司(均在有效期内使用),显色培养基(郑州博赛生物制品研究所)。

1.2 方法

1.2.1 检测项目

本研究检测沙门菌、志贺菌、肠出血性大肠埃希菌 O157:H7、致病性弧菌(霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌等 10 种)、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、阪歧肠杆菌、空肠弯曲菌及致病性气单胞菌(嗜水气单胞菌、温和气单胞菌等 8 种)。

1.2.2 食源性致病菌分离与鉴定

沙门菌、志贺菌、空肠弯曲菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、阪歧肠杆菌、大肠埃希菌检测参照国标方法进行^[2-9],副溶血性弧菌

检测参照过筛法^[10-11],致病性气单胞菌筛检参照全国临检规范^[12-13]。检测采用直接分离与增菌分离相结合的方法,增菌分离称取食品样品 25 g 和 225 ml 增菌液加入到显色培养基或选择性培养基进行分离;鉴定采用从分离平板上挑取可疑菌落,转种于营养琼脂平板分纯,用氧化酶归类,典型生化筛选符合,最后用 API 生化鉴定条确定细菌类别。对沙门菌、志贺菌、致泻性大肠杆菌、O1 群和 O139 霍乱弧菌和副溶血性弧菌等致病菌进行血清分型。

1.2.3 药敏试验

采用 WHO 推荐的 K-B 法进行。药敏试验的质控方法和结果判定按照 2008 版美国临床和实验室标准化研究所(CLSI)抗菌药物敏感性试验执行标准^[14]执行;产超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)表型确证用 CLSI 推荐的纸片扩散法,头孢噻肟 30 μ g、头孢他啶 30 μ g、头孢噻肟/克拉维酸 30/10 μ g、头孢他啶/克拉维酸 30/10 μ g;质控菌株为大肠埃希菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853);对耐药菌株用 PCR 检测 11 种耐药基因,6 种 β -内酰胺酶类耐药基因(*bla-TEM*、*bla-CMY2*、*bla-SHV1*、*bla-OXA1*、*bla-OXA2*、*bla-PSE1/CARB-2*)、5 种氨基糖苷类耐药基因[*aac*(3)-I、*aadB*、*APHA2*、*aph*(3)-Ia(*aphA1*)、*aac*(3)-IIa(*aacC2*)]和磺胺类耐药基因。

1.2.4 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型

参照美国 Pulse-Net PFGE 分子分型标准化实验室操作规程进行 PFGE 分型^[15],分子量标记沙门菌(参考菌株 H9812)由浙江省疾病预防控制中心微生物室惠赠。挑取菌株新鲜培养物加入蛋白酶 K 制胶块,用 1% Gold Agarose(含 1% SDS)等体积混合蛋白消化,切 1~3 mm 胶块,浸入 150 μ l 酶切体系中(其中含 *Xba* I 酶 50 U),37 $^{\circ}$ C 过夜。将胶块放入已加入 0.5 \times TBE 缓冲液的电泳槽中。电压 6 V/cm,电泳时间 19 h,脉冲参数(2~10 s,13 h;20~25 s,6 h)。电泳温度 14 $^{\circ}$ C。电泳结束后,将凝胶取出,0.5 μ g/ml 的 Goldview 染色 30 min,去离子水脱色 30 min,凝胶成像仪读胶分析。

2 结果

2.1 检出情况

6 812 份食品样品中有 2 331 份食品样品检出沙门菌、志贺菌、致病性弧菌(副溶血性弧菌、非 O1 群霍乱弧菌、拟态弧菌、溶藻弧菌等 4 种)、致病性气单胞菌(嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌等 3 种)、致病性大肠杆菌、单核细胞增生李斯

特菌和金黄色葡萄球菌等食源性致病菌,检出率为34.22%。O1群和O139群霍乱弧菌、梅氏弧菌、美人鱼弧菌、创伤弧菌等致病性弧菌,简达气单胞菌、舒伯特气单胞菌、中间气单胞菌等致病性气单胞菌,侵袭性大肠杆菌、产毒性大肠杆菌、肠聚集性大肠杆菌等致泻性大肠杆菌,阪崎肠杆菌、空肠弯曲菌等均未检出。各监测点食源性致病菌检出情况,见表1;食源性致病菌在样品中的分布情况,见表2。检出的食源性致病菌以副溶血性弧菌最高,检出率为22.86%(1557/6812),占检出致病菌的66.79%(1557/2331),与其他致病菌比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表1 食源性致病菌检出情况

Table 1 Regional distribution of pathogens detected in food in Ningbo

检测地点	检出数/份	检出株数/株	检出率/%
海曙	523	132	7.68(523/6812)
江东	604	169	8.87(604/6812)
江北	719	258	10.55(719/6812)
鄞州	742	283	10.89(742/6812)
镇海	632	176	9.28(632/6812)
北仑	507	145	7.44(507/6812)
慈溪	470	122	6.90(470/6812)
余姚	785	312	11.52(785/6812)
奉化	530	146	7.78(530/6812)
宁海	662	286	9.72(662/6812)
象山	638	302	9.37(638/6812)
合计	6812	2331	100.00(6812/6812)

表2 食品样品中致病菌检出情况

Table 2 Distribution of seven kinds of pathogenic bacteria in different food

食品类别	样品数/份	检出数/份(检出率/%)						
		金黄色葡萄球菌	致病性弧菌	沙门菌	致病性气单胞菌	单增李斯特菌	志贺菌	致泻性大肠杆菌
海产品	3525	8(0.23)	1760(49.93)	36(1.02)	120(3.40)	15(0.43)	0(0)	0(0)
淡水产品	169	2(1.18)	20(11.83)	2(1.18)	26(15.38)	0(0)	1(0.59)	0(0)
生猪肉	825	30(3.64)	16(1.94)	80(9.70)	8(0.97)	20(2.42)	0(0)	3(0.36)
生牛肉	350	10(2.86)	8(2.29)	28(8.00)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
生鸡肉	486	8(1.65)	3(0.62)	50(10.29)	2(0.41)	4(0.82)	0(0)	0(0)
生羊肉	95	6(6.32)	0(0)	12(12.63)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
腌制产品	185	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
奶粉	67	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
冷冻饮品	147	2(1.36)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
饮料	113	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
生食蔬菜	167	0(0)	0(0)	0(0)	8(4.79)	3(1.80)	0(0)	0(0)
熟食制品	350	16(4.57)	3(0.86)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
豆制品	171	10(5.85)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
冷菜	162	0(0)	1(0.62)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

2.2 血清分型

550株副溶血性弧菌随机从各监测点选取50株,分为10个血清群,见表3;208株沙门菌分为15个血清型,见表4;1株志贺菌为福氏2a志贺菌;3株致泻性大肠杆菌为2株O119、1株O128。

表3 550株副溶血性弧菌血清分型情况

Table 3 Serotype distribution of 550 strains of *V. parahaemolyticus*

血清群	检出株数/株	检出数/份
O1	49	49
O2	60	60
O3	18	18
O4	52	52
O5	83	83
O6	95	95
O7	36	36
O9	41	41
O10	28	28
O11	68	68
未定型	30	30

2.3 药敏试验

对760株副溶血性弧菌、208株沙门菌、164株

表4 208株沙门菌血清分型情况

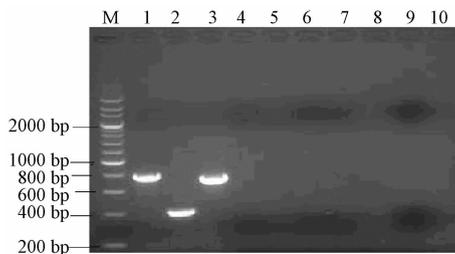
Table 4 Serotype distribution of 208 *Salmonella* strains

血清型	检出株数/株	血清型	检出株数/株
肠炎	26	斯坦利	10
德尔卑	30	汤卜逊	3
鸭沙	6	圣保罗	12
阿贡纳	18	布利丹	8
猪霍乱	2	伦敦	13
波茨坦	12	纽波特	8
鼠伤寒	15	未定型	36
山夫登堡	9		

气单胞菌、3株致泻性大肠杆菌、92株金黄色葡萄球菌、42株单核细胞增生李斯特菌和1株志贺菌分别进行药敏试验,菌株对大多数抗生素敏感,但对氨苄西林等青霉素类抗生素有一定的耐药性,见图1。有3株致病性气单胞菌耐氨苄西林、氯霉素、头孢唑啉、环丙沙星等多种抗生素,为多重耐药菌。检出*aacc*、*bla-TEM*和*sull*耐药基因,见表5。

2.4 副溶血性弧菌 PFGE 分型

选每监测点检出的副溶血性弧菌30株,共330株,经制胶、酶切、电泳,菌株的DNA片段得到



注: M: Marker; 1: bla-TEM; 2: sull; 3: aac

图1 耐药基因阳性图谱

Figure 1 Electrophoresis result of pathogenic bacteria with resistance gene positive

良好分离。29 个 PFGE 型分布见表 6。根据 Tenover 的同源性判定标准^[16],各菌株图谱间 DNA 条带数量和位置完全相同为同一型别,若有 1 条或 1 条以上的条带差别,即判为不同的型别,以阿拉伯数字表示,如 1~3 条带差异说明菌株间有相近关系,只有单基因的改变;如有 4~6 条带差异表明菌株间可能亲缘关系相对较远,PFGE 条带用丹麦 Bionumerics 4.6 版软件进行聚类分析,见图 2。

表5 菌株的抗生素药敏试验结果(%)

Table 5 Antimicrobial sensitivity results of 7 kinds of pathogenic bacteria

抗生素名称	耐药率						
	副溶血性弧菌 (n=760)	沙门菌 (n=208)	气单胞菌 (n=164)	志贺菌 (n=1)	致泻性大肠菌 (n=3)	金黄色葡萄球菌 (n=92)	单增李斯特菌 (n=42)
氨苄西林	50.79(386/760)	57.69(120/208)	82.93(136/164)	100(1/1)	66.67(2/3)	10.87(10/92)	11.90(5/42)
氨苄西林/舒巴坦	0.00(0/760)	0.00(0/208)	18.29(30/164)	0(0/1)	0.00(0/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
哌拉西林	0.00(0/760)	54.33(113/208)	3.66(6/164)	0(0/1)	0.00(0/3)	28.26(26/92)	0.00(0/42)
头孢唑啉	0.00(0/760)	0.00(0/208)	3.05(5/164)	0(0/1)	0.00(0/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
头孢噻肟	0.00(0/760)	0.00(0/208)	1.83(3/164)	0(0/1)	0.00(0/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
头孢曲松	0.00(0/760)	0.00(0/208)	0.00(0/164)	0(0/1)	33.33(1/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
头孢他啶	0.00(0/760)	0.00(0/208)	1.83(3/164)	0(0/1)	0.00(0/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
亚胺培南	0.00(0/760)	0.00(0/208)	0.00(0/164)	0(0/1)	0.00(0/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
氨曲南	0.00(0/760)	0.00(0/208)	2.44(4/164)	0(0/1)	0.00(0/3)	1.09(1/92)	0.00(0/42)
庆大霉素	0.00(0/760)	9.13(19/208)	0.00(0/164)	0(0/1)	66.67(2/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
阿米卡星	0.00(0/760)	5.29(11/208)	1.83(3/164)	0(0/1)	0.00(0/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
四环素	0.00(0/760)	0.00(0/208)	4.88(8/164)	0(0/1)	33.33(1/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
强力霉素	0.00(0/760)	29.81(110/208)	3.66(6/164)	0(0/1)	0.00(0/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
萘啶酸	0.00(0/760)	0.00(0/208)	0.00(0/164)	0(0/1)	0.00(0/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
环丙沙星	0.00(0/760)	0.00(0/208)	2.44(4/164)	0(0/1)	0.00(0/3)	2.17(2/92)	0.00(0/42)
诺氟沙星	0.00(0/760)	0.00(0/208)	0.00(0/164)	100(1/1)	0.00(0/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
氯霉素	0.00(0/760)	0.00(0/208)	21.95(36/164)	0(0/1)	0.00(0/3)	0.00(0/92)	0.00(0/42)
复方 SMZ	11.71(89/760)	26.92(56/208)	42.68(70/164)	100(1/1)	33.33(1/3)	9.78(9/92)	0.00(0/42)

表6 不同地区食品样品中副溶血性弧菌 PFGE 型(株)

Table 6 PFGE patterns of *V. parahaemolyticus* from food in different areas of Ningbo

菌株来源	PFGE 型别																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
海曙	8	2	2	1	1	0	2	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0
江东	5	2	2	0	2	1	0	0	2	1	2	0	0	0	1	0	2	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
江北	5	3	2	1	0	1	1	1	1	1	1	0	2	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	2
鄞州	4	1	3	1	0	2	0	2	0	0	1	1	0	1	2	0	1	0	2	1	1	1	2	0	0	2	1	0
镇海	4	1	3	1	1	1	2	1	1	1	0	2	1	0	0	1	0	1	0	1	0	2	1	1	1	1	0	2
北仑	5	1	0	0	2	1	1	0	3	0	2	0	2	1	0	2	0	1	0	2	1	0	2	0	1	0	1	1
余姚	3	2	4	1	0	2	0	1	1	2	1	0	1	0	1	0	2	2	1	0	1	1	0	2	0	1	0	1
慈溪	6	0	1	0	2	0	3	0	0	1	2	2	1	1	1	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	1
奉化	3	1	1	3	0	2	0	1	2	0	1	1	0	1	0	1	2	1	0	2	1	2	1	1	0	1	1	0
宁海	7	1	1	0	2	1	1	0	0	1	2	1	0	0	1	0	1	1	1	2	1	0	1	1	0	0	1	2
象山	5	2	1	2	1	2	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	2	1	0	1	1	1	1	1	1	1
合计	55	16	20	10	11	13	10	8	11	8	13	9	7	8	8	7	10	7	11	10	9	9	10	9	7	7	8	10

3 讨论

检测食品中致病菌种类、了解污染状况及主要流行菌株是评估食品安全的关键^[17]。检测显示宁波地区零售的农副产品和熟肉制品、企业生产的冷冻食品与饮料、饭店宾馆制作的冷菜等 28 种食品

6 812 份样品检出致病菌 7 类 12 种,检出率为 34.22%,高于席昭雁等 30.95% 报道^[18],表明宁波地区食品受食源性致病菌污染严重。副溶血性弧菌是宁波市主要食源性致病菌,其次是沙门菌、致病性气单胞菌。摄食受致病菌污染的食品,是诱发或引起宁波地区食源性疾病的主要原因,应引起关

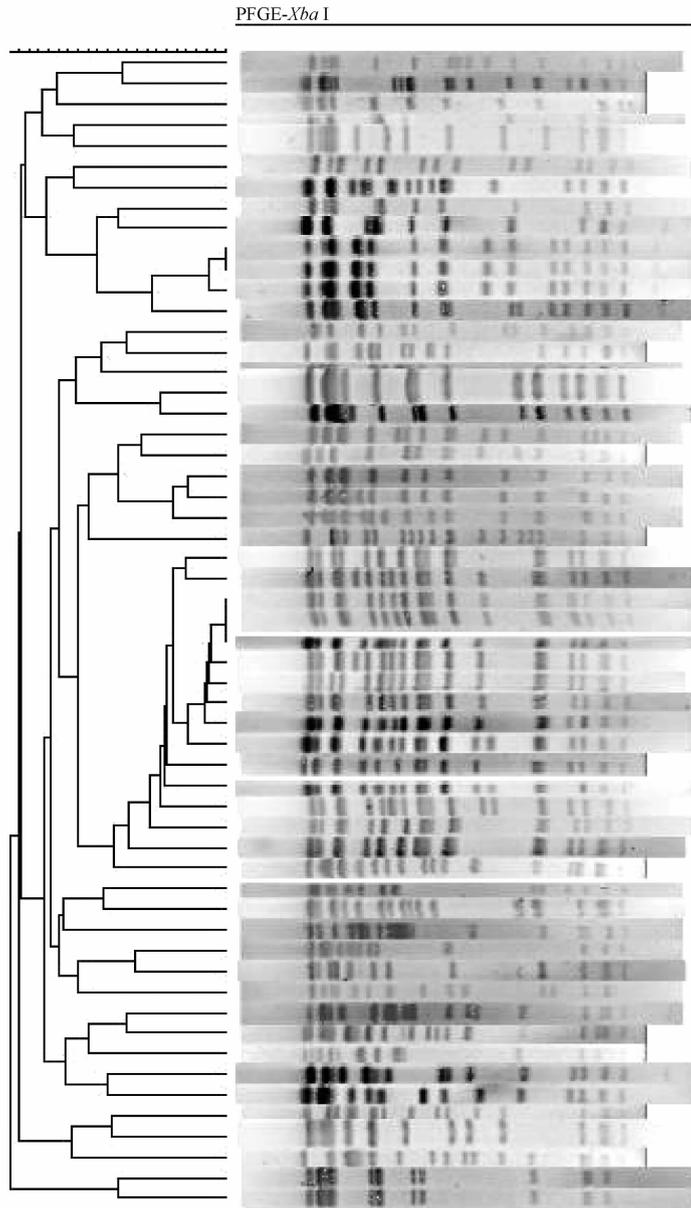


图 2 食品中检出的副溶血性弧菌 PFGE 聚类树状图
Figure 2 PFGE clustering tree of *V. parahaemolyticus* from food

注^[19]。据此认定,控制食品中副溶血性弧菌的携带或污染,能有效减少食源性疾病在宁波地区的发生。

血清分型显示,208 株沙门菌分出 15 个血清型,未检出传染性和致病性较强的伤寒、副伤寒沙门菌。志贺菌检出 1 个血清型;致泻性大肠杆菌检出 2 个血清型;550 株副溶血性弧菌,分为 10 个血清群,06 群和 05 群为优势血清群,与病人中 O3 群为优势血清群不同^[20]。但检出一定数量的 O3 群副溶血性弧菌,提示食品仍是引起副溶血性弧菌食物中毒或食源性疾病的主要原因,应加强监测。其他致病菌由于缺少血清而未作分型。

对致病菌进行分型,发现流行优势株,为追踪传染源和疾病的防控提供重要的依据。血清分型虽然能从血清型中发现流行优势型而进行溯源,但

由于流行优势株有动态变化特征,使血清分型变得复杂;其次是血清学分型显示的仅仅是表型特征,虽能区分致病株与流行优势型,但其可靠性和重复性不佳,分型率及分辨力不高,操作费时,且无法确定是否为同一起暴发事件及菌株间的亲缘关系,因此,不适用于致病菌的追踪;很多菌株当抗原位点受环境等因素的影响,发生突变出现新的血清型时,就可能给食源性疾病流行病学调查和溯源带来困难。因此,血清学虽能获得分型结果,但在追踪致病菌来源以及确定暴发性感染菌株特征等方面仍受到一定的制约,难以满足流行病学和食品安全风险评估的需求。随着分子生物学技术的进步,开发出了多种分型方法,PFGE 分型被认为是细菌分子流行病学研究的“金标准”^[21]。本文用该分型方法

将 330 株副溶血性弧菌分为 29 个型,依据同源性判定标准,1 型菌株数最多(55/330)为优势流行型,其他各型在 7~20 株之间,与食物中毒病人株 1~2 个 PFGE 型相比^[22],显示出食品中副溶血性弧菌的 PFGE 型别较为分散,可能是环境株副溶血性弧菌的特征,且大多数菌株不带 *tdh* 和 *trh* 基因,因此,认为食品株副溶血性弧菌大多不会引起食物中毒,但确切的结论有待于进一步研究。

随着抗生素的广泛使用,细菌的耐药性问题越来越引起人们的重视。检测显示,食品中分离的菌株对 AMP 和复方 SMZ 耐药性较高(92.64%),而对其他抗生素有较高敏感性,与叶茂华等^[23]副溶血弧菌对 AMP 有 89.29%(25/28)耐药的调查结果相似,但不同于宁波地区 2007 年检测的 37% 菌株对阿米卡星、庆大霉素耐药结果^[24]。说明细菌的耐药性是动态变化的,耐药性差异可能由不同地区、医院使用抗菌素的习惯、经验用药的种类及菌株来源不同等因素综合所致。本次调查表明所分离菌株对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类都较敏感,故临床治疗用药上可有较多的选择。氨苄西林的高耐药性提示应该加强对水产品使用抗生素的限制,若长期超量使用抗生素和抗菌药物,势必造成细菌耐药基因转移、耐药性增加、药物残留等严重后果。同时应密切关注副溶血性弧菌的耐药状况,为预防和控制副溶血性弧菌引起的感染性腹泻提供科学依据。

由于食品中携带的致病菌有限,加上有些菌株的生化反应不稳定(如副溶血性弧菌等)^[25],重复和系统鉴定会增加工作量和延长检测工作周期,而分离致病菌是进行风险检测的关键。为此本研究采用典型生化分步筛检方法,对可疑菌落先用氧化酶和无盐进行初筛,划分细菌的归属,再用蔗糖、葡萄糖产气、6% NaCl 蛋的胨水、阿拉伯胶糖 4 项试验复筛,以区别其他弧菌和气单胞菌等细菌,最后经系统生化鉴定确认。结果筛检菌株与鉴定确认菌株的一致率达 100%,表明分步筛检有较好的实用性及较高的准确性。PCR 能快速发现样品中的目标菌基因,提高检测速度和检出率,但需创建合适的检测平台;显色培养基方便获得目标菌,分步生化筛简化了系统生化鉴定的步骤,加快了检测速度,提高了工作效率,提升了实验室开展食品致病菌监测工作的能力,具有切实的推广应用价值。

参考文献

[1] 刘秀梅,陈艳,王晓英,等. 1992—2001 年食源性疾病暴发资料分析—国家食源性疾病监测网[J]. 卫生研究, 2004, 33(6): 725.

- [2] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 4—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 10—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 30—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [5] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB 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.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 40—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [7] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789. 9—2008 食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [8] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789. 5—2003 食品卫生微生物学检验 志贺菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [9] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB 4789—2003 食品卫生微生物学检验 致泻性大肠埃希氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [10] 周伟艳, 徐景野, 章丹阳, 等. 应用筛检方法快速检测小海产品中副溶血性弧菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(3): 639-641.
- [11] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 7—2008 食品卫生微生物学检验 副溶血性弧菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [12] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 第 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2003: 822-824.
- [13] 徐景野, 于梅, 杨元斌, 等. 筛选试验在检测致病性气单胞菌中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(4): 411-413.
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S17 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement[S]. CLSI, 2007.
- [15] Parsons M B, Cooper K L, Kubota K A, et al. PulseNet USA standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Food Borne Pathogens Dis, 2007, 4(3): 285-292.
- [16] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis; criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [17] 张红波. 我国食品安全现状分析及其对策[J]. 中国食品安全科学学报, 2004, 14(1): 15-17.
- [18] 席昭雁, 汪改宁, 薛行彩, 等. 陕西省食品中食源性致病菌监测研究[J]. 中国卫生检验, 2010, 20(12): 3439-3442.
- [19] 刘秀梅, 苏云, 陈艳, 等. 2003 年中国部分沿海地区零售海产品中副溶血性弧菌污染状况的主动监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 97-99.
- [20] Bag P K, Nandi S, Bsadra R K, et al. Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 associated with pandemic spread[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(7): 2354-2357.

- [21] Oliv D M, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(6):1661-1669.
- [22] 徐丽萍, 张育禾, 张朝阳. 一起副溶血性弧菌食物中毒的检测与溯源[J]. *浙江预防医学*, 2011, 23(3):94-96.
- [23] 叶茂华, 柳付明, 陈秀英, 等. 丽水市贝类产品中副溶血性弧菌的血清分型及耐药性研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2008, 3(9):657-658.
- [24] 徐奋奋, 徐景野, 宋启发, 等. 宁波市小水产品中副溶血性弧菌的血清型、毒力及耐药性研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2007, 19(4):307-309.
- [25] Thomson F, Lida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrio* [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(3):403-431.

风险监测

2013年河北省159份生乳中硫氰酸盐含量分析

高淑琴¹, 刘玉欣¹, 卢振敏¹, 燕阔¹, 李锦¹, 常凤启¹, 魏青², 崔诗悦³

(1. 河北省疾病预防控制中心, 河北 石家庄 050021; 2. 廊坊市疾病预防控制中心, 河北 廊坊 065000;
3. 河北联合大学, 河北 唐山 063009)

摘要:目的 了解河北省生牛乳中硫氰酸盐含量情况。方法 遵循代表性、随机性和适时性的采样原则, 采得全省范围内2013年159份生乳样品, 按照食品中硫氰酸钠测定的标准操作程序, 采用离子色谱法进行硫氰酸盐含量测定。结果 111份样品检出硫氰酸盐, 48份未检出, 检出含量最高为6.45 mg/kg, P50为1.32 mg/kg, P95为2.94 mg/kg。结论 159份生乳样品中硫氰酸盐含量均低于GB 2760—1996《食品添加剂使用卫生标准》中规定的硫氰酸钠添加量(≤15 mg/kg), 河北省生乳中硫氰酸盐污染情况相对较轻。

关键词: 硫氰酸盐; 生乳; 离子色谱法; 保鲜; 违法添加; 食品安全

中图分类号: R155; O657.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)05-0568-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.05.019

Analysis of thiocyanate content of 159 raw milk samples in Hebei Province in 2013

GAO Shu-qin, LIU Yu-xin, LU Zhen-min, YAN Kuo, LI Jin, CHANG Feng-qi, WEI Qing, CUI Shi-yue
(Hebei Province Center for Disease Prevention and Control, Hebei Shijiazhuang 050021, China)

Abstract: Objective To find out the content of thiocyanate in raw milk of Hebei Province. **Methods** Following the principles of representativeness, randomness and timeliness, 159 raw milk samples were collected from Hebei Province in 2013, including 100 samples from dairy farmers, 32 samples from milking workshop, 27 samples from milk tankers in a dairy plant. Thiocyanate were determined by ion chromatography referring to standard determination operating procedures of sodium thiocyanate in foods in *National food contamination and harmful risk handbook*. **Results** The content of 48 samples were below the detection limit, the maximum value was 6.45 mg/kg, P50 was 1.32 mg/kg, and P95 was 2.94 mg/kg.

Conclusion Thiocyanate levels of 159 raw milk samples were lower than the values reported in the literature.

Key words: Thiocyanate; raw milk; ion chromatography; refreshment; illegal to add; food safety

自从2008年“三鹿三聚氰胺”事件发生后,乳制品的安全就成为了社会高度关注的问题,同时也是食品监督管理部门重点监测的内容之一。硫氰酸盐是牛乳中固有的一种代谢物质,所以牛乳

中会存在一定的本底值。我国曾于1995和1996年公布了使用过氧化氢-硫氰酸钠体系用于原料乳保鲜的相关标准^[1-2]。但由于其对碘吸收的影响、对婴儿的潜在风险^[3]以及不法商贩的滥用,我国2007年公布GB 2760—2007《食品添加剂使用卫生标准》^[2]取消了硫氰酸钠的保鲜用途,中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会于2008年12月12日明确规定乳及乳制品中的硫氰酸钠属于非法添加物质,但未出台相应的检测方法和限值标准。

收稿日期: 2015-03-22

作者简介: 高淑琴 女 主管技师 研究方向为食品理化检验

E-mail: gaoshuqin99@163.com

通讯作者: 刘玉欣 女 主任技师 研究方向为食品理化检验

E-mail: hbcdc1208@163.com