

· 食品安全与食源性疾病 ·

中国 2001 年 11 省(市)食品中李斯特菌污染状况的主动监测

吴蜀豫 李迎惠 冉陆 付萍 李志刚 姚景会

【摘要】目的 监测中国主要食品中单核细胞增生李斯特菌(LM)的污染状况。方法 在 11 个省(市)抽检生肉、熟肉、生奶、生食蔬菜、酸奶、冰淇淋、生食水产品 7 类食物样品 4 034 份,采用国家标准方法(国标法)检测 LM,并经 BAX[®]系统(DuPont Qualicon, Wilmington, DE)鉴定。结果 4 034 份样品中,国标法检出 LM 70 株,分布于 7 省(市)4 类食品中,总阳性率为 1.74%,11 省(市)中福建省 LM 阳性率最高,7 类食品中生肉污染最严重。与国标法相比,BAX[®]系统鉴定结果敏感性 > 98%,特异性 > 97%。结论 各省 7 类食品不同程度受到 LM 污染,各地应加强相应卫生监督工作。BAX[®]系统可用于准确、快速检测 LM。

【关键词】单核细胞增多性李斯特菌;食品;主动监测;BAX[®]系统

Active surveillance on *Listeria monocytogenes* in seven kinds of food in 11 provinces of China in 2001 WU Shu-yu, LI Ying-hui, RAN Lu, FU Ping, LI Zhi-gang, YAO Jing-hui. National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China
Corresponding author: RAN Lu. E-mail: ranlu66@yahoo.com

【Abstract】Objective To carry out national active surveillance on *Listeria monocytogenes* in foods in China. Methods Four thousand and thirty-four random samples from raw meat, meat product, raw milk, vegetable, yoghurt, icecream and aquatic product were collected in 11 provinces (cities), and examined for *Listeria monocytogenes* according to the national standard method and confirmed by BAX[®] system (DuPont Qualicon, Wilmington, DE). Results Seventy isolates four kinds of foods in seven provinces were found to have LM according to the national standard method with a total isolate rate of 1.74%. In Fujian, the rate was higher than in the other provinces. Raw meat was found to be most heavily contaminated in seven kinds of foods. Comparing to national standard method, BAX[®] system showed good sensitivity (> 98%) and specificity (> 97%). Conclusion In each province seven kinds of food were all contaminated by *Listeria monocytogenes* to some degrees, suggesting that local sanitary surveillance should be strengthened. BAX system can be used to correctly and quickly screen *Listeria monocytogenes*.

【Key words】*Listeria monocytogenes*; Food; Active surveillance; BAX[®] system

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是一种人畜共患病原菌,它在自然界分布广泛,粪便污染食品后经口传播是其主要传播途径^[1],由该菌引起的疾病称为李斯特菌病(Listeriosis)。该病发病率不高,临床表现多样化,如胃肠炎、脑膜炎、菌血症、流产等,孕妇、婴儿、免疫力低下者最易感。LM 多年来在我国猪、羊、鸡、牛、兔等家禽

家畜中有流行^[2,3],迄今为止,我国还没有感染该菌引起爆发性流行的报告,已经报告的临床散发病例有数十例^[4-6]。加拿大、美国、英国等国家多次爆发由空心菜、奶酪等引起的 LM 食物中毒,死亡率达 30% 以上^[7]。在卫生部和科技部的支持下,全国食品污染物主动监测网于 2001 年对 11 个省(市)7 类食品中的 LM 污染状况进行了抽样调查。本项研究首次在国内采用自动聚合酶链反应(PCR)细菌鉴定系统——BAX[®]系统,对 LM 进行鉴定,并将其与传统国家标准方法(国标法)进行了比较,探索对 LM 的快速检测方法。

基金项目 科技部公益项目基金资助 科技部中丹政府间科技合作项目(AM13:18 NPP9)

作者单位:100021 北京,中国疾病预防控制中心营养与食品安全所

通讯作者:冉陆 E-mail: ranlu66@yahoo.com

材料与方 法

1. 样品来源 :全国食品污染物主动监测网监测点北京、重庆、吉林、河南、陕西、浙江、福建、广东、湖北、山东、江苏等 11 省(市),于 2001 年对所在省(市)的 7 类食品 :生肉(包括猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉)、熟肉制品(无定型包装)、生奶、冰淇淋、酸奶、生食水产品、生食蔬菜,抽取样品 4 034 份,无菌采样包装,每件样品至少 200 g(ml),样品在 4℃ 下,8 h 之内送达当地实验室并接种到增菌培养基中。

2. 当地实验室初步分离鉴定 :分离鉴定方法参照国标法(GB4789-94)^[8]。其中,增菌采用二次增菌(LB)法^[9] :样品 25 g + 225 ml LB1 增菌液,30℃ 培养 24 h;取 LB1 增菌液 0.1 ml 加至 10 ml LB2 增菌液 30℃ 培养 24 h 后,将 LB2 增菌液划线接种 CHROM(科玛嘉)李斯特菌显色培养基,35℃ 培养 24 h;挑取疑似菌落进行鉴定。各监测点实验室将初步分离鉴定的阳性(可疑)菌株的原代或二代培养物送中国疾病预防控制中心营养与食品安全所的食品源性致病菌国家参比实验室进行确证。

3. 国家参比实验室确证试验 :国家参比实验室参照国标法^[8],对送检菌株进行生化、溶血及小鼠毒力试验。将镜检革兰染色阳性小球杆菌,三铁糖产酸不产气,SIM 半固体上呈伞状,尿素酶、甘露醇、木糖、硝酸盐还原为阴性,过氧化氢、鼠李糖、七叶苷、MR、VP、溶血试验、小鼠毒力试验为阳性的菌株,判定为 LM,生化试验结果与前者相同但溶血试验和小鼠毒力试验为阴性的判为英诺克李斯特菌(*Listeria innocua*)。送检的所有菌株再经 BAX[®]系统鉴定。

4. BAX[®]系统鉴定 :将送检的菌株转种到脑心琼脂(英国 OXOID 公司产品)平板上,30℃ 培养 16~20 h,挑取 2~3 个菌落,用去离子水制成可见浊度的菌悬液,吸取 5 μl 菌悬液加入 200 μl 已配好的裂解剂中,在热裂解仪上进行热裂解 55℃ 60 min,然后 95℃ 10 min,转入冰盒中冷却 5 min,吸取 50 μl 裂解系统溶液,移入已装有 PCR 反应所需试剂片的反应槽中;将反应槽转入 BAX 自动 PCR 鉴定系统,启动程序,4 h 后,电脑自动显示记录结果,LM 记为阳性,其他李斯特菌或非李斯特菌记为阴性(裂解剂、热裂解仪、冰盒、PCR 反应试剂片等均为美国 DuPont 公司 BAX[®]系统配套产品)。

5. 统计学分析 :以国标法作为标准,比较 BAX[®]系统鉴定结果与国标法鉴定结果的一致程度,计算

BAX[®]系统鉴定结果的敏感度、特异度及假阴性率、假阳性率。

结 果

11 省(市)共抽检食物样品 4 034 份,当地实验室初步鉴定出阳性菌 104 株,经国家参比实验室确证为 LM 的有 70 株,31 株为英诺克李斯特菌,3 株为非李斯特菌属。

1. 各省(市)7 类食品中 LM 污染状况 :11 个省(市)共抽检食物样品 4 034 份,检出 LM 70 株,占 1.74%。其中,福建检出率最高为 7.45%,其次是北京、河南、浙江、重庆、吉林、江苏,检出率在 1.18%~2.96%,湖北、山东、广西、陕西未检出(表 1)。

表 1 2001 年 11 个省(市)食物样品 LM 检出率

省、市	样品份数	LM 阳性份数	阳性率(%)
福建	322	24	7.45
北京	135	4	2.96
河南	1 463	27	1.85
浙江	182	3	1.65
重庆	412	6	1.46
吉林	166	2	1.20
江苏	338	4	1.18
湖北	324	0	0.00
山东	362	0	0.00
广东	277	0	0.00
陕西	53	0	0.00
合计	4 034	70	1.74

2. 各类食品中 LM 分布情况 :7 类食品中 4 类(生肉、生食蔬菜、熟肉、冰淇淋)检出 LM,生肉检出 44 株,检出率为 3.88%,其中生猪肉污染最严重,其次是生鸡肉、生牛肉、生羊肉。熟肉制品、冰淇淋检出率分别为 1.59% 和 0.97%。280 份生食蔬菜样品均由河南省监测网抽检,检出 LM 污染率达 2.50%,仅次于生肉。生牛奶、酸奶、生食水产品中未检出(表 2)。

表 2 我国 11 省(市)2001 年 7 大类食物样品 LM 检出率

样品种类	样品份数	LM 阳性份数	阳性率(%)
生肉	1 134	44	3.88
生食蔬菜	280	7	2.50
熟肉制品	941	15	1.59
冰淇淋	412	4	0.97
生牛奶	843	0	0.00
酸奶	218	0	0.00
生食水产品	206	0	0.00
合计	4 034	70	1.74

3. 国标法与 BAX[®]系统鉴定结果比较 :经国标

法确证的 70 株 LM, BAX[®]系统鉴定结果 69 株为阳性, 1 株为阴性, 经国标法鉴定为非 LM 的 34 株细菌, BAX[®]系统鉴定结果有 1 株为阳性, 其余 33 株为阴性。以国标法为标准, BAX[®]系统鉴定 LM 的敏感度为 98.6%, 特异度为 97.1%, 假阳性率为 2.9%, 假阴性率为 1.4%, 两种方法的吻合程度达 98.1%。

讨 论

本次调查食品中 LM 的阳性检出率平均为 1.74%, 低于国外报道水平^[1]。但比 1996 年和 2000 年两次全国范围调查的结果(0.72% 和 0.96%) 明显增高^[10, 11]。2000 年全国食品污染物主动监测网在 10 个省(市) 监测 6 大类食物(无生食蔬菜) 样品 1 896 份, LM 污染率生肉为 0.96%, 熟肉为 0.99%, 其余未检出^[11]。2001 年几类食品的污染率均有所上升, 其中生肉为 2.47%, 熟肉为 1.38%, 且冰淇淋中也检出了 LM(0.97%)。综合 1996、2000 和 2001 年三次的监测数据, 李斯特菌污染在食品中普遍存在。熟肉作为直接入口食品, LM 的污染连续两年处于较高水平, 且有增高趋势, 表明熟肉制品的加工、运输、储藏等环节卫生状况亟待改善, 应引起有关部门及消费者的警惕。河南省以往调查显示蔬菜中该菌的检出率为 5.3%^[12]。本次监测生食蔬菜样品 280 份, 检出率达 2.5%, 结合生食蔬菜在欧美部分国家曾经引起 LM 感染的爆发性流行, 提示生食蔬菜是我国食品中 LM 的又一大污染来源。2000、2001 年均未在生奶、生食水产品中检出 LM。

LM 广泛分布于自然界, 畜禽肉、蔬菜、熟肉制品、奶制品等是其主要传播途径, 要预防控制 LM 感染, 必须从控制食物链入手。在世界范围内经确认的 LM 爆发事件只有不到 20 起, 引起爆发的食物有蔬菜、奶酪、肉制品、熏制的海产品等(表 3)。美国食品和药品管理局(FDA) 和美国农业部(USDA) 为了确定 LM 在公共卫生方面的危险性, 联合对 20 多种食品进行合作研究; 结果发现, 肉食品和海产品最容易感染 LM, 而乳制品污染的危险性较小。研究中还发现, 在冰淇淋之类食品中存在少量 LM 的污染, 但在公共卫生上不显示危险性, 因此将对这个领域内的某些法规限制进行重新评价。国际乳制品协会的法规制定部门认为, 通过此类法规的修改, 将有助于降低由于存在极微量 LM 时因召回产品所造成的数百万美元的损失。这次合作研究还判明, 冷冻餐后甜食和加热处理的奶酪, 由 LM 引起健康上的

危险性也很小。

BAX[®]系统是一种基于 PCR 技术的快速细菌检测系统, 已获得美国分析化学家协会(AOAC) 认证, 目前能针对大肠埃希菌 O157、沙门菌属、李斯特菌属、LM 做出快速检测。2002 年 4 月 USDA 和食品安全检验局(FSIS) 正式将该系统用于肉类、禽类供应中 LM 的检测, 2003 年 3 月又正式将其用于即食食品中沙门菌的检测, 对大肠埃希菌 O157:H7 的检测正在评价中^[13]。本次研究率先在国内应用该系统对 LM 进行检测。采用分纯的菌株培养至对数生长期时进行鉴定, 系统鉴定结果的敏感度达到 98.6%, 特异度为 97.1%, 与国外报道值(敏感度 > 98%, 特异度 > 97%) 相符^[14]。

表3 世界各地经确认的 LM 爆发事件分布

年代	地点	病例数(死亡数)	感染源
1981	加拿大	4(18)	生卷心菜
1983~1987	瑞士	12(34)	软奶酪
1985	美国	14(48)	软奶酪
1987~1989	英国	> 350	馅饼
1989~1990	丹麦	2(6)	奶酪
1992	法国	27(85)	猪舌豚
1993	法国	39	rillettes
1993	新西兰		熏制贝类
1994	美国	45	巧克力奶
1995	瑞士	5(18)	软奶酪
1995	法国	3(4)	软奶酪
1997	意大利	748	corn flower
1998~1999	美国	10(15)	热狗
1998~1999	芬兰	1(4)	奶油
1999~2000	法国	3(10)	猪舌豚
2000	美国	29	熟火鸡肉
2002	加拿大	21	奶酪
2002	美国	12(23)	熟火鸡肉

传统检测 LM 的方法要经过一次或二次增菌后分离培养, 再经生化、溶血试验、动物实验等证实, 耗时 5~12 天, 操作繁琐。BAX[®]系统基于特异性引物进行 PCR, 可以直接对增菌液进行筛检, 试验周期短(48 h), 灵敏度高^[14]。随着我国经济发展及国际间食品贸易交流, 必将要求提高食品卫生检验的时效性、准确性, BAX[®]系统无疑为准确、快速检测食品中致病菌提供了新的选择。

(感谢北京、重庆、吉林、河南、陕西、浙江、福建、广东、湖北、山东、江苏等 11 省(市) 参加全国食品污染物监测网致病菌监测的全体同志)

参 考 文 献

Microbiol Rev, 1991, 55:476-551.

2 滕振文, 孙让林. 由产单核细胞李氏杆菌引起母牛流产和犊牛腹泻的诊断报告. 中国畜禽传染病, 1989, 2:25-26.

3 郭仰霖, 曾凡伟. 上杭县禽、畜李斯特氏杆菌携带状况调查. 海峡预防医学杂志, 2002, 6:251.

4 唐德秦, 吴恒莲. 李斯特菌败血症. 中级医刊, 1990, 5:270-271.

5 张经. 围产期李斯特菌病-附八例报告. 中华围产医学杂志, 2000, 3:56.

6 高双燕, 万建华, 张静萍, 等. 李斯特菌病临床分析. 中国医科大学学报, 2000, 29:470.

7 王捷. 李斯特菌食物中毒. 现代预防医学, 1999, 26:550-552.

8 中华人民共和国国家标准. GB4789.30-94. 单核细胞增生李斯特菌的检验方法.

9 付萍, 李志刚, 白竟玉. 食品中李斯特菌检验方法的比较与探讨. 中国食品卫生杂志, 1995, 7:28-31.

10 付萍, 冉陆, 李志刚, 等. 中国七类食品中单核细胞增生李斯特氏菌污染状况调查. 卫生研究, 1999, 28:106-107.

11 王茂起, 王竹天, 包大跃, 等. 中国 2000 年食品污染状况监测与分析. 中国食品卫生杂志, 2002, 14:3-8.

12 张秀丽, 廖兴广, 张丁, 等. 河南省李斯特菌种特征和生态分布研究. 河南医学研究, 2001, 10:71-76.

13 DuPont Qualicon BAX[®] system adopted by USDA Food Safety and Inspection Service to detect Salmonella in ready-to-eat foods. <http://www.qualicon.com/pressreleases/>

14 Hochberg AM, Roering A, Ganger V, et al. Sensitivity and specificity of the BAX for screening/*Listeria monocytogenes* assay: internal validation and independent laboratory study. J AOAC Int, 2001, 84:1087-1097.

(收稿日期 2003-03-06)
(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

贵州省 1999 ~ 2001 年麻疹流行状况分析

朱青 李胜 叶绪芳 任刚 周晖 杜雯

了解分析贵州省麻疹流行病学特征和流行因素,探讨加速麻疹控制策略。

1. 材料与与方法:①资料来源:麻疹病例资料来自我省法定传染病常规报告系统和麻疹监测专报系统,人口及出生率资料来源于贵州省统计局出版的《贵州年鉴》中省统计局人口变动抽样调查数据。②实验方法:疑似麻疹病例早期血清 IgM 抗体检测采用抗体捕捉酶联免疫吸附试验(ELISA),试剂盒由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所提供。本省省级麻疹实验室完成检测。③统计学分析:用 FoxPro 5.0 建立数据库,采用 Excel 97 软件进行统计学分析。

2. 结果:①发病概况:1999~2001 年 3 年全省共报告麻疹病例 34 287 例,各年发病数分别为 10 129 例、12 821 例和 11 337 例,发病率 28.28/10 万、36.38/10 万和 32.17/10 万,位居全国前 3 名。②流行病学特征:3 年分别有 85 个、85 个和 86 个县(市、区)报告麻疹病例,分别占全省 87 个县的 97.7%、97.7% 和 98.9%,呈高度分散状态。3 年中报告麻疹病例数在 1~10 例、11~100 例、101~200 例和 201 例以上的县分别占应报告县数的 12%(31/256)、40%(103/256)、24%(61/256)和 24%(61/256),而病例数在 201 例以上县的发病数占总报告发病数的 59.5%(20 399/34 287)。3 年间麻疹发病年龄分布基本一致,主要集中在小年龄组儿童,1 岁(11.6%)、5~7 岁(25.5%)各有一个发病高峰。总体趋势以 10 岁以下儿童发病为主,占总报告病例数的 81.5%,10~14 岁发病次之,占总报告病例数的 12.8%。全年各月均有发病,但以

春季为主,发病高峰均基本在 3~6 月(54.4%)。3 年全省分别发生麻疹爆发 83 起(1 489 例)、124 起(2 900 例)和 66 起(2 199 例),占各年病例总数的 14.7%、22.6% 和 19.4%,且有漏报现象。③流行因素分析:报告的 34 287 例病例中,46.6% 的病例有麻疹疫苗接种史,22.3% 无接种史。我省属边远贫困山区,常规免疫工作难度较大。漏种现象较多,易引发麻疹爆发性流行。

3. 讨论:我省麻疹发病一直维持在较高的水平,且以小年龄为主,其原因主要是:①各地计划免疫工作发展不平衡,且未切实掌握超生、流动儿童,使基础免疫实际接种率低,存在免疫空白点。②由于采用走村串户上门接种的接种模式,疫苗损耗大,有限的疫苗用于保证基础免疫,造成 7 岁组加强免疫疫苗不足,政府财政又难于增加购苗费用。另外,部分地区视入校开展免疫接种为乱收费,使 7 岁组加强免疫工作难于开展,造成 7 岁组加强免疫实际接种率低。③乡级冷链设备不完善,上门接种模式使接种周期延长,不能保证疫苗冷藏,以及接种技术存在问题等,不能保证高水平的接种质量,使疫苗保护率低。④疫情迟报,延误处理,造成流行。

建议为迅速控制贵州省麻疹流行,应开展一次 8 月龄至 14 岁儿童麻疹疫苗普种,以迅速提高免疫覆盖率,并逐步开展麻疹实验室网络建设和麻疹个案调查,提高麻疹专报系统资料的利用价值,及时为调整麻疹控制策略提供科学依据。加强冷链管理,大力推行定点接种,安全接种,保证接种质量。

(收稿日期 2002-09-10)
(本文编辑:尹廉)