



肉类微生物学

- 1 肉类微生物学概论
 - 1.1 微生物的概念
 - 1.2 微生物的生物学特性
 - 1.3 肉类微生物学历史
 - 1.4 肉类微生物学的内容与研究任务
 - 1.5 微生物在肉制品中的控制
- 2 革兰氏阳性食源性致病菌
 - 2.1 肉毒梭菌
 - 2.2 产气荚膜梭菌
 - 2.3 单核增生性李斯特菌
 - 2.4 蜡样芽胞杆菌
 - 2.5 金黄色葡萄球菌
- 3 革兰氏阴性食源性致病菌
 - 3.1 沙门氏菌
 - 3.2 出血性大肠杆菌
 - 3.3 小肠结肠炎耶尔森氏菌
 - 3.4 空肠弯曲杆菌
 - 3.5 志贺氏菌
 - 3.6 副溶血性弧菌
 - 3.7 霍乱弧菌
 - 3.8 变形杆菌
 - 3.9 布氏杆菌
- 4 其他重要的肉类微生物
 - 4.1 霉菌
 - 4.2 酵母
 - 4.3 病毒
 - 4.4 肉类发酵剂
 - 4.5 肉类腐败菌
- 5 肉类微生物的控制
 - 5.1 化学性方法
 - 5.2 物理性方法
 - 5.3 抗生素类
 - 5.4 HACCP 体系
 - 5.5 食品微生物的快速检验

本期作者简介:

龚霄: 1984 年生 山西大同人,
西南大学 食品科学学院 硕士
研究方向: 食品科学
写作题目: 革兰氏阳性食源性致病菌
E-mail: gongxiao1025@yahoo.com.cn

陈盼: 1984 年生, 贵州安顺人,
西南大学 食品科学学院 硕士
研究方向: 食品微生物与发酵工程
写作题目: 革兰氏阳性食源性致病菌
E-mail: pan0423@163.com

发表论文:

- 1 酶制剂在食品保鲜中的应用研究
《粮食与油脂》2007 年 11 期
- 2 发酵法生产木糖醇的研究进展
《粮食与油脂》2007 年 3 期
- 3 酶制剂微胶囊技术研究新进展
《中国食品添加剂》2007 年 5 期

- 1 食品中大肠杆菌的快速检测方法
《食品工程》2008 年 1 期



肉类微生物学(二)

Meat Microbiology(part 2)

革兰氏阳性食源性致病菌

龚霄, 陈盼

(西南大学食品学院, 重庆 400715)

摘要: 本文针对肉制品中常常出现的肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、产气荚膜杆菌(*Clostridium perfringens*)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等五种重要的G⁺食源性致病菌的生物学特性、致病性、流行病学特征、检测方法和控制措施作一综述。

关键词: 革兰氏阳性菌; 食物中毒; 致病性

G⁺ Food-borne Pathogens Bacteria

Gong Xiao, Chen Pan

(College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715)

Abstract: This paper summarized biological characteristics, pathogenicity, epidemiology, detection methods and preventive measures of five important foodborne diseases gram-positive bacteria——*Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogene*, *Bacillus cereus* and *staphylococcus aureus*, which are often founded in the meat and meat products.

Key words: Gram-positive bacteria; Foodborne disease; Pathogenicity

中图分类号: TS201.3 文献标志码: A 文章编号: 1001-8123 (2008)05-0052-09

近年来, 世界各地相继发生重大的食品安全事件, 如2005年在东南亚爆发的禽流感, 2001年欧洲发生的疯牛病等, 不仅带来巨大的经济损失, 还是对社会稳定和安全的考验, 使得食品安全问题成为人们日益关注的问题。对此, 世界各国和组织都设定了多种食品安全相关的法律法规, 以达到预防和控制食品安全问题的目的。微生物是污染食品的重要因素之一, 由于其个体微小、分布广泛、生存能力强、繁殖迅速等特点, 使得如何避免和减少微生物污染成为食品加工和流通等环节考虑的首要问题。本文就引发食源性疾病的几种重要革兰氏阳性菌(肉毒梭菌、产气荚膜梭菌、单核细胞增生性李斯特菌、蜡样芽胞杆菌和金黄色葡萄球菌)的生物学特性、致病性、流行病学特征、检测方法和预防措施等内容进行了综述。

近年来, 世界各地相继发生重大的食品安全事件, 如2005年在东南亚爆发的禽流感, 2001年欧洲发生的疯牛病等, 不仅带来巨大的经济损失, 还是对社会稳定和安全的考验, 使得食品安全问题成为人们日益关注的问题。对此, 世界各国和组织都设定了多种食品安全相关的法律法规, 以达到预防和控制食品安全问题的目的。微生物是污染食品的重要因素之一, 由于其个体微小、分布广泛、生存能力强、繁殖迅速等特点, 使得如何避免和减少微生物污染成为食品加工和流通等环节考虑的首要问题。本文就引发食源性疾病的几种重要革兰氏阳性菌(肉毒梭菌、产气荚膜梭菌、单核细胞增生性李斯特菌、蜡样芽胞杆菌和金黄色葡萄球菌)的生物学特性、致病性、流行病学特征、检测方法和预防措施等内容进行了综述。

1 肉毒梭菌

肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)是一种腐生型细菌, 广泛分布于土壤、霉干草、腐物和人畜粪便中, 亦可附着于水果、蔬菜和谷物上, 鱼类肠道、腮和内脏中也可分离出该菌, 容易造成食品污染, 在适宜条件下能产生肉毒毒素, 人进食这些含毒素食品后, 即发生肉毒中毒。首次于1897年, 由E. Van Ermengen调查比利时Ellezelles爆发的一次食源性传染病时发现。百余年来, 肉毒毒素中毒事件在全球各地时有发生。

据统计,1899年至1990年间,在美国共有2305人次肉毒中毒。自解放初期首次诊断“察布察尔病”为肉毒中毒以来,我国肉毒中毒的发生地域越来越广,有报道的地区主要集中在新疆、西藏、宁夏等地,此外,青海、甘肃、江苏、东北地区、某些沿海地区肉毒中毒的报道也屡有发生。发病往往和饮食习惯紧密相关,如欧洲多由火腿、腊肠和畜禽肉等引起中毒;美国多以果蔬罐头;日本等沿海国家主要是由于进食水产品引起;而我国主要是由自制豆制品(臭豆腐、豆豉)和面制品(发酵馒头、面酱等)等发酵食品引起的中毒。其它引起中毒的食品还有:填馅茄子、油浸大蒜、烧烤、蜂蜜制品等。在食品安全日益得到人们高度重视的今天,在食品的加工、运输、销售和消费的各个环节,如何采取科学有效的防控措施,避免和减少肉毒中毒的发生具有极其重要的社会意义。

1.1 肉毒梭菌的生物学特性

肉毒梭菌属于梭状芽胞杆菌属,严格厌氧,革兰氏阳性,多形态,大小为 $(4-6)\mu\text{m} \times (0.9-1.2)\mu\text{m}$,两端钝圆,直杆状或稍弯曲。有时形成长丝状或链状,有时能见到舟形、柠檬形、染色较深的球茎状,均属于退化型。无荚膜,周身有4-8根鞭毛,可运动。肉毒梭菌属于中温菌,生长温度为 $15-55^{\circ}\text{C}$,最适生长温度 $28-37^{\circ}\text{C}$,生长pH值为6-8,最适产毒pH为 8.0 ± 0.2 。位于菌体次极端或中央,常见很多游离芽胞。当pH小于4.5或大于9.0时,或当环境温度低于 15°C 或高于 55°C 时,肉毒梭菌芽胞均不能繁殖,也不产生毒素。

肉毒梭菌对营养要求不高,在普通琼脂培养基上生长良好,在固体培养基表面形成直径约3mm的近圆形菌落,菌落半透明,表面呈颗粒状,边缘不整齐,向外扩散,呈绒毛网状,常常扩散成菌苔;在血平板上,出现较大的溶血环。在乳糖卵黄牛奶平板上,菌落下培养基为乳浊,菌落表面及周围形成彩虹薄层,不分解乳糖;分解蛋白的菌株,菌落周围出现透明环。

肉毒梭菌繁殖体的抵抗力一般, 80°C 加热30 min或 100°C 下10 min即可杀死,但其芽胞抵抗力很强,各种类型肉毒梭菌芽胞对热抵抗力有一定差异,但总体而言,肉毒梭菌芽胞高度耐热,经湿热 121°C 10-30 min,或干热 180°C 5-15 min才能将其杀死,在75%的酒精中可以存活两个月之久。

肉毒毒素对消化酶、酸和低温比较稳定,但易

受碱和热破坏而失去毒性。A型毒素经 60°C 2 min加热,差不多能被完全破坏,而B、E二型毒素要经 70°C 2 min才能被破坏;C、D二型毒素对热的抵抗更大些;C型毒素要经过 90°C 2 min加热才能完全破坏,一般情况下, 85°C 热处理15 min便可使毒素完全失活。肉毒毒素污染食物和水源后,一般其毒性可保持数天乃至一周。同时,不易被胃肠液所破坏,在适宜条件下,毒性能被胰酶激活和加强,引起消化道中毒。

1.2 肉毒梭菌的致病性

肉毒梭菌引起的食物中毒是一种严重的毒素型食物中毒,肉毒毒素是目前已知在天然毒素和合成毒剂中毒性最强的生物毒素,比氰化钾强1万倍,其小鼠LD50介于 $0.1-1\text{ ng/kg}$ 体重,少至0.1-1g的毒素就可导致成人中毒死亡。肉毒毒素的产生与芽孢发芽和繁殖体的生长均有关,首先菌体内合成前体毒素,在生长晚期菌体裂解并释放至细胞外,随后被蛋白酶活化而成。

肉毒毒素通过消化道粘膜吸收,经血液扩散到全身,特异性地与胆碱能神经末梢突触前膜的表面受体相结合,然后通过吸附性胞饮而内转进入细胞内,使囊泡不能再与突触前膜融合,从而有效地阻抑了胆碱能神经介质——乙酰胆碱的释放。与此同时,毒素与突触前膜结合,还阻塞了神经细胞膜的钙离子通道,从而干扰了细胞外钙离子进入神经细胞内以触发胞吐和释放乙酰胆碱的能力。从而阻断神经传导,造成中枢神经系统损害,出现复视、眼睑下垂、瞳孔放大,引起肌肉松弛麻痹,特别是呼吸肌和心肌麻痹而导致死亡。据统计,肉毒梭菌食物中毒病例中约有60%因呼吸衰竭而死亡。

1.3 肉毒梭菌食物中毒的流行病学

肉毒梭菌在自然界的分布上具有某种区域性差异,显示出生态上的差别倾向。肉毒中毒一年四季均可发生,发病急、病程快、病死率高。

根据毒素抗原性不同,目前已知A、B、C(1、2)、D、E、F、G等七个菌型,各型产生相应型的毒素。引起人群中中毒的主要有A、B、E三型,A、B型的分布最广,各大洲的许多国家均有报道;C、D型主要存在于动物的尸体或在腐尸附近的土壤中,引起畜禽中毒。E型能适应深水低温,在海洋地区的广泛分布,如海洋沉积物、海水生物的肠道;F、G型肉毒梭菌极少分离,还未曾有G型菌

引起人群中中毒的报道。

1.4 肉毒梭菌及其毒素的检验

预防肉毒中毒最有效的措施是加强监测。关于肉毒中毒的诊断,关键是毒素的检出及定型;关于罐装食品细菌学检验,有时需要证实肉毒梭菌的存在,不过,最终还要根据产毒试验来确定细菌及其类型。

国家标准《食品卫生检验方法微生物学部分》的GB/T4789.12-2003规定了肉毒梭菌及其毒素检验的方法。程序如下图,样品经均质处理后,及时接种培养,进行增菌、产毒和毒素检测试验。毒素检测试验结果可以证明检样中有无肉毒毒素以及有何型肉毒毒素存在。

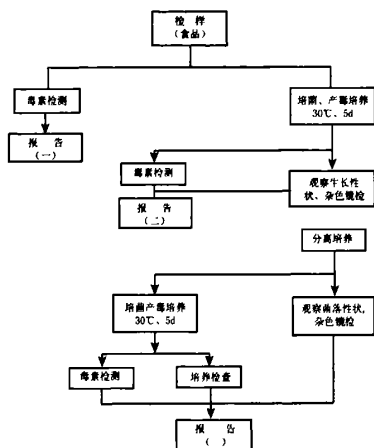


图1 肉毒梭菌及其毒素的检验程序

注1:报告一检样含有某型肉毒毒素

注2:报告二检样含有某型肉毒梭菌

注3:报告三由样品分离的菌株为某型肉毒毒素

对增菌产物培养物,一方面做一般的生长特性观察,同时检测肉毒毒素的产生情况。结果可以证明检样中有无毒素以及有何型肉毒毒素存在。

为其它特殊目的而欲获得纯化菌株,可以用增菌产毒培养基进行分离培养,对所得纯化菌株进行形态特性、生长特性的观察和毒素的检测,其结果可证明所得纯化菌株为何型肉毒梭菌。

该方法繁琐、耗时,不易推广,因此人们不断探索一些更简便、快捷、灵敏的方法。免疫血清学的方法可直接从病人的食物、呕吐物、粪便及血清等临床样品中检测出肉毒毒素,其具体方法有:

放射免疫技术(RIA)该法具有很强的灵敏度和较高的特异性,但是所用仪器昂贵,尤其潜在放射

性污染,所以不宜推广。

反向间接血凝法(RPHA),反向乳胶凝集实验(RPLA):灵敏度和RIA法相当,一般可以达到10 ng/ml,但是比传统血清法更加快速、简便,已经有商品试剂盒生产,在快速诊断肉毒中毒的检测中发挥了重要作用,该法常用于实验室条件下肉毒毒素的检测。不足是容易受特异性干扰而是结果呈现假阳性。

酶联免疫吸附实验(ELISA)及其扩展的酶联凝集实验(ELCA):该实验检测特异性和灵敏度达到了一个新的水平(pg/ml),而且使检测时间缩短在2-3 h。

聚合酶链式反应(PCR):分离提取待检试样中病原菌菌体,然后通过扩增其DNA模板,比较电泳图谱来确定是否存在肉毒梭菌。现在已成功用于检测各种类型的肉毒毒素,该法灵敏度比ELISA高1000倍,特异性强、重复性好,可及时提供快捷、准确的病原学诊断,但不适合非实验环境进行。而且PCR技术是通过检测肉毒梭菌间接检测肉毒毒素,因此具有一定的局限性。

随着科学技术的不断进步,相信会有更加快速、灵敏、准确的新方法出现。

1.5 预防和控制肉毒梭菌食物中毒的基本措施

肉毒中毒的发生,一般有以下几种情况:即食食品原料中带有肉毒梭菌芽孢,食品加工过程中芽孢未被完全杀灭;食品加工或贮藏过程中,适宜芽孢繁殖和产毒的条件;熟食在食用前未经充分加热使毒素完全破坏。最根本的预防方法是加强食品卫生管理,改进食品的加工、调制及贮藏方法,改善饮食习惯,因此,为预防本病的发生可采取以下措施:

(1)食品原料在加工前进行必须的清洁处理,使用合格的饮用水除去污泥和粪便等带菌杂质,制作发酵食品时,在谷豆、果蔬和畜禽肉等原料药经彻底杀菌处理。尤其在肉毒多发地区要求更要严格。

(2)罐头食品的生产,除建立科学严密的工艺流程和卫生制度以防止污染外,应严格执行灭菌操作规程。在运输和贮藏过程中一旦发现胖听或破裂外,不能食用。

(3)加工后的鱼肉制品,应避免二次污染;盐腌或熏制肉类,原料应该新鲜并清洗;加工后、食用前的食品应该严格控制运输和贮藏条件以确保抑制肉毒梭菌产生毒素。

(4)肉毒毒素不耐热,尤其对可疑食品使用前进行充分加热是破坏毒素和预防肉毒中毒的可靠措施。

2 产气荚膜梭菌

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)是引起水源性胃肠炎最常见的病原之一。最早于1892年由英国人 Welchii 等从一具腐败的人类尸体产生气泡的血管中分离得到,又称魏氏梭菌(*Clostridium welchii*),在自然界广泛分布,存在于人畜粪便、土壤、污水和动物肠道中,健康人群粪检率2%~22%,肠道疾病患者带菌率高达56%,是一种严重的人畜共患病原菌。

被产气荚膜梭菌污染的肉、禽等生食品,由于加热不彻底或后污染而在缓时冷却过程中,繁殖体大量繁殖并形成芽胞,进入肠道后产生肠毒素,当菌体细胞自溶和芽胞游离时,肠毒素将被释放,引起食物中毒、非水源性胃肠道疾病和散发性腹泻。据美国疾病控制中心报道,在美国每年因产气荚膜梭菌引起的食物中毒约近1万人,占细菌性食物中毒的30%左右。该菌引起的食物中毒与公共饮食密切相关。

2.1 产气荚膜梭菌的生物学特性

产气荚膜梭菌是一种严格厌氧革兰氏阳性、梭状芽孢杆菌,两端平直或钝圆,多成双或短链排列。能形成荚膜,无鞭毛,不能运动。在菌体中央或次级端形成卵圆形芽胞。生长温度范围为10~50℃,适宜生长的pH范围在5.5~8.0之间。对营养要求严格,生长时需要14种氨基酸和5种维生素,在营养丰富的培养基上8~10min便可繁殖一代,是目前已知生长最快的细菌。

产气荚膜梭菌能产生致死毒素、溶血毒素、肠毒素、卵磷脂酶、胶原酶等多种外毒素和酶类。依据毒素致病性和中和试验将其分为A、B、C、D、E和F等6种类型,其中引起人类中毒的主要是A型,也有少数C型。

产气荚膜梭菌对食盐敏感,5%浓度便可抑制其生长。不同产气荚膜梭菌菌种所产生的孢子有不同的耐热性。A型产气荚膜梭菌多为耐热菌,它的芽胞在100℃1~4h才能被完全破坏,而有些芽胞在100℃下经几分钟就死亡。肠毒素对酸碱和热抵抗力明显不强。

2.2 产气荚膜梭菌的致病性

大量流行病学资料表明产气荚膜梭菌产生的

肠毒素是引起食物中毒的一个重要原因。肠毒素具有细胞毒性,可与真核细胞的蛋白结合,在胞浆膜穿入细胞或其他肠毒素敏感细胞上形成大的复合物,导致细胞膜形成小孔,从而改变了胞膜的通透性,造成小分子的流失,引起胶质渗透的失衡和上皮细胞的死亡。肠毒素在小肠内也能造成大量上皮细胞脱落和纤毛缩短,各种组织病理学损伤会造成相关细胞水分和电介质转移的改变,进而引起腹泻等症状。

2.3 产气荚膜梭菌食物中毒的流行病学

产气荚膜梭菌引起食物中毒的食品多为同批大量加热烹煮后在较高温度下长时间缓慢冷却且不经再加热而直接供餐的食品。大多为动物性食品,如畜禽肉、奶制品、水产品或其他菜肴及其汤汁。

该菌引发的食物中毒多发生于集体用餐者,或广泛散发于进食同一中毒食品的人群。需要强调的是:只有摄入大量(1.0×10^7 或更多)活菌后,才能在肠道中产生肠毒素。本病潜伏期短,一般只有8~24 h。病程快,摄食被该菌污染的食品后数小时后开始发病。病死率极高,往往来不及治疗即死亡。临床上主要表现为腹痛、腹泻,伴随恶心、呕吐等症状,除老幼体弱者外,一般预后良好。

2.4 产气荚膜梭菌及其毒素的检验

食品中产气荚膜梭菌检验的主要目标是食品被污染的程度,主要检验项目是细菌计数和确证试验。具体方法可参照国家标准《食品卫生检验方法微生物学部分》的GB/T4789.13-942003。此外,还可以采用动物试验、毒素检测试验及荧光抗体技术进行检测。

2.5 预防和控制产气荚膜梭菌食物中毒的基本措施

预防该菌食物中毒的发生应加强食品卫生管理,并从控制污染、抑制繁殖和杀灭病原菌和毒素等三方面进行。

(1)加强畜禽卫生管理,严格执行原料检疫检验制度。

(2)在加工过程中,特别是放置时,对食品进行快速冷却和适当的卫生处理。使食品尽可能远离产气荚膜梭菌大量繁殖的危险区域(10~50℃)。

(3)重新加热放置过的食品,加热温度至少要达到60℃。

3 单核增生性李斯特菌

单核增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*), 简称单增李斯特菌, 是一种人畜共患的重要食源性致病菌, 于2000年被WHO食品安全工作计划列为重点检测的食源性致病菌之一。该菌广泛存在于自然界, 如土壤、污水、青贮饲料、动物肠道, 可以在从农田到餐桌的任一环节传播。鲜奶、冰淇淋等一般冷藏食品不能保证其安全性, 食用生牛排、生蔬菜等饮食习惯最可能导致感染而引起李斯特菌病。

1929年发现了首例因食物中毒而患单增李斯特菌病的病例, 此后相关报道逐渐增多。据报道, 美国每百万感染性食物中毒病例中有7.4例是单增李斯特菌的感染, 平均病死率达40%。为确定单增李斯特菌在公共卫生方面的危险性, 美国FDA及USDA联合对20多种食品进行合作研究, 结果发现, 肉制品和海产品最容易污染该菌。国内周丽萍等曾采集484份生肉制品进行检验, 结果单增李斯特菌检出率高达5.79%。大量研究表明, 生肉、散装熟肉和海产品在单增李斯特菌的传播链中起着重要的作用。

3.1 单增李斯特菌的生物学特性

单增李斯特菌为革兰氏阳性、无芽孢、兼性厌氧短小杆菌, 老龄培养物呈阳性, 形态与培养时间有关。37℃培养3~6h, 菌体主要呈杆状, 随后以球形为主, 培养3~5d后呈6~20 μm的丝状。室温下为有4根鞭毛的周毛菌, 呈特殊的翻滚式; 37℃时鞭毛较少, 运动缓慢。生长温度范围为3℃~45℃, 且4℃~6℃繁殖最快, 为嗜冷菌, 并能耐受-20℃的低温且部分存活, 能抵抗反复冷冻、紫外线照射。营养要求不高, 可在普通培养基上生长, 加入葡萄糖、血液、肝浸出物则生长更好, 最适pH为7.0~7.2。

单增李斯特菌具有12个血清变种, 即1/2a、1/2b、3a、3b、3c、4a、4ab、4b、4c、4d、4e和7, 其中90%以上的李斯特菌病是由1/2a、1/2b和4b三种血清型引起的。

3.2 单增李斯特菌的致病性

单增李斯特菌通过小肠粘膜进入血液, 在肝中大量繁殖, 若机体免疫系统不能清除该菌, 则会形成败血症, 或通过损伤的黏膜经神经末梢的鞘膜直接感染中枢神经系统, 病死率高达20%~50%。单增李斯特菌能够感染和侵入单核细胞、巨噬细胞和许多非吞噬性哺乳动物细胞, 并在细胞间扩散, 这种致病方式是由溶血素、磷脂酶C、肌动蛋

白Act A、内化素(internalin)和侵袭性P60蛋白等毒力因子所决定。

李斯特菌溶血素O(Listeriolysin O, LLO)是单增李斯特菌的重要毒力因子, 能溶解宿主细胞, 逃离噬菌体, 避免吞噬体中杀菌物质的毁灭。此外, 还能在感染细胞诱导和定向免疫应答中发挥致病作用; 单增李斯特菌能产生两种磷脂酶C, 即磷脂酰肌醇磷脂酶C(phosphatidylinositol phospholipase C, PI-PLC)和磷脂酰胆碱磷脂酶C(phosphatidylcholine phospholipase C, PC-PLC), 协助细菌的胞内复制; 肌动蛋白Act A是个多功能毒力因子, 以肌动蛋白的运动为基础, 对宿主细胞趋向和侵入, 使单增李斯特菌能在宿主细胞间扩散; 内化素与侵袭力有关, 介导细菌侵入无吞噬力的上皮细胞; P60蛋白是单增李斯特菌的主要免疫原性抗原, 参与该菌对宿主细胞的粘附及内化。

3.3 单增李斯特菌食物中毒的流行病学

单增李斯特菌为细胞内寄生的条件致病菌, 主要影响孕妇、婴儿、50岁以上老人或免疫功能低下的人。人摄入被该菌污染的食品后, 表现为脑膜炎型、败血症型、妊娠感染型和新生儿败血性肉芽肿型症状, 其中脑膜炎型和败血症型在非妊娠的免疫力低下的成人中最常见。

Gravain报道(1987年), 成人感染此菌常见的表现是脑膜炎和脊髓灰质炎。中等程度患者的中毒表现是流感症状、败血症、脓肿、局部障碍或小肉芽瘤(在脾脏、胆囊、皮肤和淋巴结)及发热。怀孕3个月以上的妇女感染此菌, 可能会引起流产或死胎, 幸存的婴儿也易患败血症或在新生儿患脑膜炎。新生儿的死亡率约为30%, 如果在出生4d内被感染, 则死亡率接近50%。

3.4 单增李斯特菌的检验

食品中李斯特菌的检验参照国家标准《食品卫生检验方法微生物学部分》的GB/T4789.30-2003进行。国家标准有两种方法, 即EB法和LB法。但两种方法相比较, EB法要求的时间较长, 对操作人员的要求较高, LB法的检测步骤相对简单, 需要5~6天获得结果, 时间较短, 而且有实验室对这两种方法进行比较发现LB法优于EB法。

其它主要包括显色培养基法、分子生物学检测方法、免疫学检测方法等。目前已有商品化的显色培养基, 如CHROMagar Listeria和HKListeria,

相对于传统平板 OXA 和 MMA 有更高的特异性,分子生物学检测方法主要是各种 PCR 法,包括常规 PCR 法、双重 PCR 法、实时荧光定量 PCR 法、多重-巢式 PCR 等。PCR 方法中最常选择的靶基因是李斯特菌属的特异性 *iap* 基因和毒力因子 *hly* 基因,其它的靶基因还有 *Dth-18* 基因、*16sRNA* 基因和 *inlA* 基因等。该类检测方法大大缩短检测时间,可同时进行大量样品的检测,灵敏度远远高于常规检测方法,如徐德顺等人建立的实时荧光定量 PCR 检测的灵敏度达到 19cfu/mL ,对英诺克李斯特菌等 10 种相关细菌均无交叉反应,从细菌核酸提取至完成检测仅需 3h 左右。但是往往对试验设备要求和操作人员要求较高,需要较多的资金投入,对一些基层实验室不实际;免疫学方法应用较多的是 ELISA 法,而且有许多对传统 ELISA 的改良方法,如对抗原或抗体改良以提高反应的灵敏度等。姜迪来等用 SPA-ELISA 检测单增李斯特菌,样品中最低检出量为 5 个/10g,经增菌后的培养液最低检测限可达到 10^3cfu/mL ,并可在 48h 内报告结果,适用于 LM 的快速筛选。此外,罗立新等用柠檬酸钠改良法制备胶体金,标记抗体制备免疫层析试剂,用免疫层析作用检测不同食品中的单增李斯特菌,灵敏度达 87.5%,具有良好的重现性,而且适用于野外和不具备实验条件的场所。

3.5 预防控制单增李斯特菌食物中毒的基本措施

控制食品中的单增李斯特菌可综合利用各种方法,如加入消毒剂,降低储存温度,改进食品组成以降低水分活度,进行巴氏杀菌等。由于该菌耐热性较好,因此加工时要使中心温度达到 70°C 并持续 2 分钟以上。单增李斯特菌在环境中广泛存在,食品加工和流通中要避免二次污染和交叉污染。使原料和成品操作分离,保持区域干燥,减少微生物扩散,定期清洗设备和厂房,保持清洁。还应重点预防冷藏食品尤其是冷藏乳制品和熟肉制品的污染,不食用生牛乳、生肉和由污染原料制成的食品;食用前彻底加热已经在冰箱中冷藏了一段时间的消毒牛乳、熟肉制品、直接入口的食品。

4 蜡样芽胞杆菌

蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)简称蜡样杆菌,在空气、土壤、灰尘、水中广泛存在。食品加工、运输、贮藏和销售过程中,通过灰尘、土壤、昆虫、

不洁的用具和容器污染食品。蜡样芽胞杆菌过去一直被认为是非致病菌,1950 年 Hauge 对挪威奥斯陆某医院职工和病员进食甜食后引起的食物中毒研究中,首次明确指出蜡样芽胞杆菌的致病作用,从此,被确认为食源性致病菌。

目前,已从多种食品中分离出该菌,包括肉、乳制品、鱼、蔬菜、酱油、米饭、米粉和各种甜点等。肉比蔬菜更容易繁殖蜡样芽胞杆菌。即食的食品中蜡样芽胞杆菌也是优势菌群之一,所占比例为 27.5%~34.0%。1994~2003 年 10 年内,国内报道的蜡样芽胞杆菌食物中毒共 47 起,其中 2541 人进食了被该菌污染的食品,1758 人中毒,发病率 69.19%,无人死亡。据报道正常成人一次服用 106 的蜡样芽胞杆菌即能引起食物中毒。该菌一旦污染了食品生产环节,有了生长繁殖点即能不断污染,产生肠毒素,引起食物中毒。

4.1 蜡样芽胞杆菌的生物学特性

蜡样芽胞杆菌为兼性需氧、革兰氏阳性大杆菌,大小为 $1\sim 1.3\mu\text{m} \times 3\sim 5\mu\text{m}$,菌体正直或稍弯曲,菌体两端较平整,多数呈链状排列,具周身鞭毛,能运动,无荚膜。可在菌体中央形成芽胞,芽孢不突出菌体。此外,菌体细胞内有球状类脂颗粒、异染颗粒或空泡样构造,已命名的亚种有蜡样芽胞杆菌荧光变种、蜡样芽胞杆菌白乳变种和蜡样芽胞杆菌蕈状变种。

蜡样芽胞杆菌生长温度为 $25^\circ\text{C}\sim 37^\circ\text{C}$,最适生长温度 32°C ,在 10°C 以下或 63°C 以上均不繁殖, $65^\circ\text{C}\sim 70^\circ\text{C}$ 菌体易死去。生长 pH 范围为 6~11, pH 9.3 繁殖迅速。在普通琼脂上形成的菌落较大,直径 $3\sim 10\text{mm}$,灰白色,不透明,表面粗糙似熔蜡状,边缘呈扩散状。在普通肉汤中呈均等大量混浊生长,并有容易散开的沉淀物,有的形成菌膜。偶尔有黄绿色色素产生,有的菌株产生淡红褐色弥漫性色素,有的在含铁丰富的淀粉培养基上产生红色色素,在甘露醇-卵黄多黏菌素琼脂平板上菌落常为伊红粉色,在血琼脂平板上呈草绿色溶血。

蜡样芽胞杆菌繁殖体不耐热,但是其游离芽胞需经 $100^\circ\text{C} 30\text{min}$ 杀死,所以即使是热加工的食品也有污染蜡样芽胞杆菌的可能,而且检出率也随着加工步骤的增加而升高,在加工过程中不断繁殖。蜡样芽胞杆菌能产生腹泻毒素和呕吐毒素共 2 种肠毒素。腹泻毒素是一种大分子量蛋白,不

耐热, 45℃30min 或 65℃5min 失活, 易被胃蛋白酶和胰蛋白酶消化破坏; 呕吐毒素相对分子量较小, 耐热, 126℃90min 不被破坏, 对酸碱、胃蛋白酶和胰蛋白酶均有抗性。

4.2 蜡样芽胞杆菌的致病性

蜡样芽胞杆菌食物中毒是由于食物中带有大量活菌和该菌产生的肠毒素所引起, 其中肠毒素是主要致病因素, 已知该菌有三种毒素, 包括溶血致死性肠毒素 BL(Hbl)、非溶血性肠毒素(non-haemolytic enterotoxin, Nhe)和细胞毒性肠毒素(cytotoxin CytK)。可引起眼部、心血管、呼吸、中枢神经、创伤等部位的感染。吴寒冰曾报道该菌感染致颈部坏死性淋巴结炎, 但发病机制不明。

4.3 蜡样芽胞杆菌食物中毒的流行病学

蜡样芽胞杆菌是一种条件致病菌, 该菌污染食品后, 在 20℃ 的环境中能快速繁殖并产生肠毒素, 而且因不分解蛋白质使得不能由感官判断食品污染情况。临床上分为腹泻型和呕吐型, 其中腹泻型由不耐热的肠毒素引起, 可在各种食物中形成, 进食被污染的食物后发生胃肠炎症状, 潜伏期为 10–12h, 能在 24h 内恢复正常; 而呕吐型由耐热的肠毒素引起, 常存在于米饭中, 进食后 1–6h 发作, 多在 10h 左右恢复, 症状与葡萄球菌中毒类似。

蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒和饮食习惯紧密相关, 在美国, 炒米饭是引发蜡样芽胞杆菌呕吐型食物中毒的主要原因; 在欧洲大多由甜点、色拉、奶和肉制品引起; 在我国主要与受污染的米饭或淀粉类制品有关。

4.4 蜡样芽胞杆菌的检验

食品中蜡样芽胞杆菌的检验参照国家标准《食品卫生检验方法微生物学部分》GB/T 4789.14–2003 的进行。该菌的微生物学检验步骤主要是取可疑食物或者患者呕吐物及粪便进行检查; 检查方法包括直接镜检观察形态, 活菌计数以确定是否为该菌引起食物中毒, 在普通琼脂及血液琼脂平板上分离培养为下一步生化鉴定准备, 再根据菌落形态染色和生化反应等特点做初步鉴定, 还需做与其它类似菌, 如炭疽杆菌、枯草杆菌、苏云金杆菌等的鉴别试验。

此外, 还可利用 PCR 技术检测该菌, 以溶血素 hblA 基因作为检测致病性蜡样芽胞杆菌的靶基因, 通过设计合适的 PCR 引物, 特异地扩增出溶血素 hblA 基因, 从而实现快速检测, 其最低检出限可达

9cfu/mL, 其结果与普通生化检测方法一致。生物梅里埃公司的 VITEK 微生物自动鉴定仪同样可快速检测该菌, 并提供大量的生理生化特征, 具有高度的特异性、敏感性和重复性, 系统可联机孵育、定时扫描、自动分析, 操作简便, 人为误差小。

4.5 预防控制蜡样芽胞杆菌食物中毒的基本措施

土壤和灰尘中常带有蜡样芽胞杆菌, 昆虫、鼠类和不洁食品用具、容器都能传播该菌。为此, 食堂和食品企业都必须严格遵守卫生管理制度, 做好防鼠、防蝇和除尘工作。食品加工仪器设备要经常清洗, 防止蜡样芽胞杆菌的残留和二次污染。肉乳及其制品和剩饭等熟食制品只能低温短时存放, 食用前要经过彻底加热。

5 金黄色葡萄球菌

葡萄球菌(*Staphylococcus*)是革兰氏阳性球菌的一种, 广泛分布与自然界, 如土壤、空气、水, 动物的鼻腔、咽喉、皮肤、肠道的带菌率很高, 绝大多数对人无致病, 少数属于人畜共患病原菌, 可引起动物和人类化脓感染。食品中的致病葡萄球菌主要是金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*), 其中以金黄色葡萄球菌的致病能力最强, 是国内外医院获得性感染最常见的细菌之一。金黄色葡萄球菌引起的毒素型食物中毒是一个世界性公共卫生问题。在我国, 由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒约占细菌性食物中毒事件的 25%, 在美国、加拿大等发达国家高达 50%, 该菌容易在各类乳制品、肉制品、鱼类和罐头食品中生长、繁殖, 并产生毒素。此外, 由油煎蛋、糯米糕和凉粉等食品引起的中毒事件也有报道。

5.1 金黄色葡萄球菌的生物学特性

金黄色葡萄球菌是一种球形、革兰氏阳性菌, 无芽孢, 无鞭毛, 无荚膜, 不能运动, 常堆积成葡萄状排列。生长温度范围为 6.5–46℃, 最适生长温度为 30–37℃, 产毒素最适温度为 21–37℃, 生长 pH 范围为 4.2–9.8, 最适 pH 为 7.2–7.4。大多数金黄色葡萄球菌为需氧或兼性厌氧菌, 值得注意的是: 在 20% 的 CO₂ 环境中有利于毒素的产生。

金黄色葡萄球菌对不良的环境抵抗能力较强, 在干燥空气中可以存活数月, 但不能繁殖。繁殖体对热抵抗力比一般无芽孢细菌强, 70℃ 下 1h, 80℃ 下 30min 才可被杀死; 可以在含水量极低的食物(水分活度小

于0.86)中生长,也能在冰冻环境下生存,某些菌株的耐盐性强,可在含10%—18% NaCl的培养基上生长。对营养的要求不高,普通培养基上生长良好。

该菌分泌的肠毒素耐热性强,而且不易受胰蛋白酶的影响。据报道,其肠毒素在131℃下加热30min以上才能被破坏,因此,大部分食物的蒸煮温度和时间均不能对其造成破坏。

5.2 金黄色葡萄球菌的致病性

金黄色葡萄球菌是人类化脓性感染中最常见的病原菌,可以产生溶血素、杀白细胞素、肠毒素、凝血酶、DNA酶等致病性毒素和酶,它们均可增强该菌毒力和侵袭力。研究发现:30%—50%的金黄色葡萄球菌菌株可以产生肠毒素,是引起食物中毒的主要原因。

金黄色葡萄球菌肠毒素(Staphylococcal enterotoxins, SEs)是由金黄色葡萄球菌分泌的一组低分子量、具有超抗原活性的可溶性毒蛋白,能够激发淋巴细胞使其产生强烈的细胞毒性作用及高水平的细胞因子。据统计,20%—25%的食源性疾病是由SEs引起。根据其肠毒素抗原性的不同,目前已发现A、B、C1、C2、C3、D、E和F等八种肠毒素,其中A、D型引起的食物中毒最多,B、C次之,其中以A型毒性最强,每千克体重1 μg便能引起中毒。

5.3 金黄色葡萄球菌食物中毒的流行病学

金黄色葡萄球菌极易在水分、蛋白质和淀粉含量较高的食品中极易生长、繁殖,并产生大量毒素。据报道:受到该菌污染的食品25—30℃下放置5—10h,就能产生足以引起中毒的肠毒素,但食品的颜色、风味和气味不一定会产生能觉察到的变化。一旦误食便会引起恶心、呕吐、腹部痉挛、水性或血性腹泻等胃肠道症状,严重者可以引起局部化脓感染,如肺炎、盆腔炎、心包炎,甚至败血症、脓毒症等全身性感染。虽然这类食物中毒很少致死,但是患者的中枢神经系统往往会受到影响。金黄色葡萄球菌引起的食物中毒带有很强的季节性,多见于春夏季。

5.4 金黄色葡萄球菌的检验

食品中金黄色葡萄球菌及其肠毒素的检测可参照国家标准GB/T4789.10—2003的进行。主要检验项目是细菌计数、血浆凝固酶试验、肠毒素检查、生物动物实验和血清学试验。

常规微生物学方法,一般需要5—7d,费时费

力,近年来发展的免疫酶技术、免疫荧光试验等检测方法比较快速、方便,但又会出现假阳性或假阴性的结果,特异性不高。刘开华等人利用PCR技术扩增SEA基因来直接检测金黄色葡萄球菌,结果发现,样品中模板DNA含量仅有0.05 Pg即可检出金黄色葡萄球菌,24h即可报告结果,可用于食品中金黄色葡萄球菌的快速检测。

5.5 预防控制金黄色葡萄球菌食物中毒的基本措施

人畜化脓性感染部位往往是重要的污染源,因此,可以从以下几方面来预防金黄色葡萄球菌食物中毒:

避免食物染菌。加大食品卫生监督力度,强化监测检验以发现传染源,严格禁止患乳房炎的牛乳或受畜禽局部化脓而污染的其他肉类混入食品加工原料中,加工用具使用前后要进行彻底清洗消毒;加强对食品从业人员的卫生知识培训和健康体检,拒绝患有化脓性炎症和上呼吸道感染的工作人员进行食品加工操作。

防止肠毒素形成。在低温、通风良好条件下贮藏食物可以有效防止该菌的生长及其毒素的形成。因此,要尽量减少加热后半成品的积压时间,必要时进行冷藏或置于阴凉通风的地方,食用前还应彻底加热。

6 小结

食品安全是当今世界一个重要的主题,G⁺致病菌食物中毒作为严重的食源性疾病之一已经越来越引起人们的重视,G⁺致病菌及其毒素的分布、检测方法、产生原因、降解解毒等方面均成为研究的热点。

为确保我国食品安全,保证人民健康,我们应当对政府部门、企业和消费者进行长久、具有本国文化特色的健康教育,不断提高人们的防范意识,培养良好的饮食习惯,建立并严格执行食品安全管理体系,如将GMP, HACCP和GAP系统应用在食品生产上,确保食品从原料到餐桌每个加工环节安全卫生;应用流行病学、分子生物学和计算机等学科的新技术和新方法来探索食品中G⁺致病菌及其毒素分布规律并开发适合我国国情的简单、灵敏、快速、准确的检测方法;研究各种G⁺致病菌及其毒素的致病机理、建立并完善食源性疾病监测体系和预警机制以及时发现、检测、评价食源性疾病的危险性;此外,积极开展G⁺致病菌及其毒素与相关疾病关系的研究,研制高效、安全、廉价的抗菌剂和毒素疫苗也是刻不容缓的任务。真正做到预防为主,防治并举。