

# 北京市顺义区家用冰箱中嗜冷菌的检测分析

朱美娟\*<sup>1</sup>, 邵占涛, 李颖, 王彦波, 王园园

北京市顺义区疾病预防控制中心, 北京 顺义 101300

**[摘要]** **目的:** 了解北京市顺义区居民家用冰箱中致病性嗜冷菌的污染状况。**方法:** 在北京市顺义区分层随机采集 300 台冰箱冷藏室涂抹样本, 利用常规细菌分离方法从样本中分离单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) 和小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*, *Ye*), 并用 PCR 进行毒力基因检测。**结果:** 300 个样本中, 共检出致病菌 (*Lm*、*Ye*) 38 株, 阳性率为 12.67%, 其中 *Lm* 阳性率为 3.00%, *Ye* 阳性率为 9.67%。其中, 9 株 *Lm* 和 1 株 *Ye* 携带致病性毒力因子。嗜冷致病菌检出率在不同使用年限的冰箱中差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 在不同清洗频率的冰箱中差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 且呈线性趋势。**结论:** 北京市顺义区居民家用冰箱中致病性嗜冷菌污染状况不容乐观, 对居民需加强正确使用冰箱的知识宣教和指导。

**[关键词]** 嗜冷菌; 单核细胞增生李斯特菌; 小肠结肠炎耶尔森菌; 毒力基因

## Analysis and detection of psychrophilic bacteria in household refrigerator

ZHU Mei-juan, SHAO Zhan-tao, LI Ying, WANG Yan-bo, WANG Yuan-yuan

Shunyi District center for disease control and prevention, Beijing, 101300

**[Abstract]** **Objective** To understand the contamination status of psychrophilic bacteria in household refrigerator in Shunyi district, Beijing. **Methods** A total of 300 dabus of refrigerator were collected by stratified random sampling. *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* were isolated and the virulence genes were detected by PCR method. **Results:** 9(3.00%) strains of *Listeria monocytogenes* and 29(9.67%) strains of *Yersinia enterocolitica* were isolated in this study. Virulence factors were found in 9 strains of *Listeria monocytogenes* and 1 strain of *Yersinia enterocolitica*. There was significant difference in the distribution of psychrophilic bacteria among refrigerators with different cleaning frequencies. **Conclusion** Sanitation situations of the household refrigerator of Shunyi district is not optimistic. It is necessary to strengthen the knowledge of using the refrigerator correctly for residents to prevent the outbreak of foodborne illness

**[Key words]** Psychrophilic bacteria; *Listeria monocytogenes*; *Yersinia enterocolitica*; Virulence gene

嗜冷菌, 是一类菌的总称, 这类菌一般在 0-20℃之间最适宜生长, 常见的能致病的嗜

---

<sup>1\*</sup>作者简介: 朱美娟 (1979-), 女, 湖北蕲春人, 汉族, 本科, 副主任检验师, 主要研究方向为病原微生物学。

冷菌有单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称 *Lm*) 和小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*, 简称 *Ye*)。这两种嗜冷菌可在 2-8℃ 的普通家用冰箱中生长、繁殖, 从而给人的健康带来威胁。为了解 *Lm* 和 *Ye* 在家用冰箱中的分布及危害, 我们对顺义区 300 台家用冰箱涂抹进行了检测分析。

## 1 材料与方法

**1.1 样品来源:** 从顺义区所辖的 6 个街道、19 个镇各选取一个社区或村庄, 每个社区或村庄按照冰箱的使用年限 (0~、6~、10~、15~年) 各随机选取 3 户居民的家用冰箱, 并对冰箱的清洗频率和使用年限进行问卷调查, 共计 300 台。参照 GB18204.4-2013 附录 A 公共场所公共用品用具微生物采样方法, 在冰箱冷藏室隔板选点采集 2 份涂抹拭子, 分别放入 2 个 10ml 李氏增菌液 LB1、10ml 改良 PBS 增菌液的无菌大试管中。

**1.2 主要试剂:** 李氏增菌肉汤 LB1/LB2、李斯特显色培养基、TSA-YE 琼脂、改良 PBS 增菌液、CIN-1, 耶尔森菌属生化鉴定试剂盒, 均由北京陆桥生物技术有限公司提供。PCR 扩增体系液购自大连 TaKaRa 公司, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

**1.3 主要仪器:** VITEK 2 compact 全自动细菌鉴定仪, BIO-RAD PCR 扩增仪, Qiaxcell 毛细管电泳仪

**1.4 检测方法:** *Lm* 和 *Ye* 分离鉴定参照文献<sup>[1-2]</sup>, *Lm* 和 *Ye* 毒力基因测定参照文献<sup>[3-4]</sup>。

**1.5 统计学分析** 采用 Excel 2003 和 SPSS17.0 进行数据统计和分析, 率的比较采用  $\chi^2$  检验, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 嗜冷致病菌检出情况

300 件冰箱涂抹中, 两种致病性嗜冷共检出 32 株, 总阳性率为 12.67%。其中 *Lm* 9 株, 阳性率为 3.00%, *Ye* 29 株, 阳性率为 9.67%。

### 2.2 不同使用年限的冰箱中嗜冷致病菌检出情况:

对冰箱的使用年限按照 0~、6~、10~、15~年进行分组, 比较 4 个组间致病菌检出率, 组间差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.47$ ,  $p=0.997$ )。见表 1。

表 1 不同使用年限冰箱中致病菌检出率

使用年限 (年)	冰箱数 (台)	冰箱构成比 (%)	<i>Lm</i> 检出台数 (率, %)	<i>Ye</i> 检出台数 (率, %)	总检出台数 (率, %)
0~	81	27	2 (2.47)	8 (9.88)	10 (12.35)
6~	75	25	3 (4.00)	7 (9.33)	10 (13.33)
10~	79	26.33	2 (2.53)	8 (10.13)	10 (12.66)
15~	65	21.67	2 (3.08)	6 (9.23)	8 (12.31)
合计	300	100	9 (3.00)	29 (9.67)	38 (12.67)

2.3 不同清洗频率的冰箱中致病菌检出情况：

对冰箱的清洗频率按照<1、1~、3~、12~次/年进行分组，比较各组间的致病性嗜冷菌检出率，经卡方线性趋势性检验分析，组与组间嗜冷致病菌总检出率（ $\chi^2=30.20$ ， $p=0.001$ ）差异有统计学意义，而且呈线性趋势（ $\chi^2=23.43$ ， $p=0.001$ ）。冰箱的清理周期频率越高，嗜冷致病菌的检出率越低。对 *Lm* 和 *Ye* 的检出率分别做卡方线性趋势性检验发现，*Lm* 的检出率（ $\chi^2=1.90$ ， $p=0.59$ ）没有显著性差异，这和每组 *Lm* 的检出数量太低有关；而 *Ye* 的检出率有显著性差异（ $\chi^2=29.01$ ， $p=0.001$ ），且呈线性趋势（ $\chi^2=22.38$ ， $p=0.001$ ）。见表 2。

表 2 不同清洗频率冰箱中致病菌检出情况

清洗频率（次/年）	冰箱数(台)	冰箱构成比（%）	<i>Lm</i> 检出台数（率，%）	<i>Ye</i> 检出台数（率，%）	总检出台数（率，%）
<1	52	17.33	3（5.77）	15（28.85）	18（34.62）
1~	98	32.67	3（3.06）	9（9.18）	12（12.24）
3~	94	31.33	2（2.13）	4（4.26）	6（6.38）
12~	56	18.67	1（1.78）	1（1.78）	2（3.57）
合计	300	100.00	9（3.00）	29（9.67）	38（12.67）

2.4 致病菌的毒力因子检测结果

对分离的 9 株 *Lm* 进行了李氏溶血素基因 *hly*、调控蛋白因子 *prfA*、卵磷脂酶编码基因 *plcB*、内化素基因 *inlA*、肌动蛋白聚集因子 *actA*、细胞壁水解酶 p60 蛋白编码基因 *iap* 这 6 种毒力基因的检测，9 株 *Lm* 该 6 种毒力基因均为阳性。对 29 株分离的 *Ye* 进行了 5 种毒力基因的检测：粘附素基因（*yadA*）、毒力因子基因（*virF*）、粘附侵袭位点基因（*ail*），肠毒素基因（*yst A* 和 *B*）。除 1 株毒力基因结果为 *yadA+*，*virF+*，*ail+*，*yst A+*，*ystB-*外，其它的有 11 株仅 *ystB+*，另 17 株均为阴性。引物序列和具体结果分别见表 3。

表 3 毒力基因检测用引物及检测结果

基因	引物	退火温度(℃)	产物长度(bp)	检测数	阳性数/阳性率(%)
<i>yadA</i>	CTTCAGATACTGGTGTGCTGT ATGCCTGACTAGAGCGATATCC	58	849/759*	29	1(3.45)
<i>virF</i>	GGCAGAACAGCACTCAGACATA GGTGAGCATAGAGAATACGTCG	55	561	29	1(3.45)
<i>ail</i>	TAATGTGTACGCTGCGAG GACGTCTTACTTGCACTG	57	351	29	1(3.45)
<i>ystA</i>	ATCGACACCAATAACCGCTGAG CCAATCACTACTGACTTCGGCT	61	79	29	1(3.45)
<i>ystB</i>	GTACATTAGGCCAAGAGACG GCAACATACCTCACAACAAC	61	146	29	11(37.93)
<i>prfA</i>	CCCAAGTAGCAGGACATGC ATCACAAAGCTCACGAG	56	571	9	9(100)

<i>plcB</i>	ACCTGCCAAAGTTTGCTGT AGTGTCTAGTCTTTCCGG	56	795	9	9 (100)
<i>hly</i>	ACGGAGTAAATACATTAGTG AATAAACTTGACGGCCATAC	56	372	9	9 (100)
<i>actA</i>	GCAGCGACAGATAGCGAAGA CAGTCAACGCCTACGAAGAC	56	472	9	9 (100)
<i>iap</i>	TTTCCTAAACCGGTATCTC AGCCGTGGATGTTATCGTAT	56	205	9	9 (100)
<i>intA</i>	CCGCACTCACTAACTTAGAG GTTGTTTCTTTGCCCTCCAC	56	580	9	9 (100)

\*表示 O:8 血清型小肠结肠炎耶尔森氏菌扩增产物片段大小

### 3 讨论

冰箱冷藏室的温度一般为 2-8℃，该环境能抑制大多数细菌的生长繁殖，但嗜冷菌却生长活跃，并能产生胞外热稳定性蛋白酶和脂肪酶。嗜冷菌在加热过程中能被杀死，但它们产生的酶类仍有部分活性残留，从而引起食品中蛋白质分解，游离脂肪酸增加，致使食品的保质期缩短<sup>[5]</sup>。除影响食物的品质外，还有一些嗜冷菌对人具有致病性。目前，威胁人类健康的嗜冷菌主要是 *Lm* 和 *Ye*，它们广泛存在于自然界中，主要通过食物经粪口途径传播。其中 *Lm* 被 WHO 列为 4 大食源性致病菌之一<sup>[6]</sup>，可引起人和动物的胃肠炎、脑膜炎、败血症、孕妇流产、热性胃肠炎等，且死亡率达 30%以上<sup>[7]</sup>。据报道，熟食中 *Lm* 的检出率达 17.9%-30.0%<sup>[8,9]</sup>。冰箱中的 *Lm* 多为污染的食品交叉污染冰箱隔层所致，本监测中 *Lm* 共检出 9 株，检出率为 3.00%，与熟食中的检出率相比，明显偏低，但分离的 9 株均携带目前功能较为清楚的 6 种毒力基因（*hly*、*prfA*、*plcB*、*inlA*、*actA*、*iap*），没有基因缺失的情况，其潜在的致病性，不容忽视。*Ye* 主要侵染人和动物肠道，由其感染引起的一些慢性迁延型疾病还比较严重<sup>[10]</sup>，而且可引起胃肠炎、心肌炎、脑膜炎等。本监测发现，冰箱涂抹中 *Ye* 共检出 29 株，检出率为 9.67%，其中 1 株毒力基因结果为 *yadA+*，*virF+*，*ail+*，*ystA+*，*ystB-*，是典型的致病性 *Ye*。还有 11 株仅 *ystB+*。*ystB* 仅存在于生物 1A 型菌株，在这个生物型中，这类菌株通常是非致病性菌株，但已有许多报道此类菌株在腹泻患者中能够分离到，而且有许多研究报道，携带 *ystB* 的生物 1A 型菌株与人类腹泻之间有较明显的流行病学关联<sup>[11]</sup>，所谓“非致病性 *Ye*”可能在某种情况下具有潜在致病能力及流行危险。因此非致病性 *Ye* 菌株也需要引起足够重视。

根据检测结果，居民冰箱中 *Lm* 和 *Ye* 总的检出率为 12.67%，经毒力基因检测验证，9 株 *Lm* 和 1 株 *Ye* 都是典型的致病性菌株。本监测使用的是传统的细菌培养方法，限于检测方法的敏感性，实际污染状况可能比检测结果更严重。对冰箱按使用年限分成 0~、6~、10~、15~年四组，每组间 *Lm*、*Ye* 和总的检出率经统计学检验分析，均无显著性差异，冰箱的使用年限和致病菌的检出率没有明显相关性。但对冰箱按清洗频率（次/年）分成<1、1~、3~、12~四组，经卡方线性趋势性检验分析发现，随着冰箱清洗频率的增加，*Ye* 和总的检出率明显下降，而且呈线性趋势。冰箱清洗频率越高，致病菌检出率越低。通过调查

发现, 38 株致病菌中, 18 株在长达一年未进行清洗的冰箱检出, 占 47.37%, 仅 2 株 (占 5.26%) 致病菌在冰箱清洗频率>12 次/年的冰箱中检出。冰箱是食品二次污染的重要媒介, 但居民家用冰箱中一年未进行清理的达到 17.33%, 居民对冰箱作为污染媒介的认知还较低。为防止食物的二次污染和交叉污染, 应加强对居民正确使用冰箱的宣传和指导。

#### 参考文献

- [1]中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.8-2008 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验[S].北京:人民卫生出版社,2008.
- [2]中华人民共和国卫生部. GB 4789.30-2010 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S].北京:人民卫生出版社,2010.
- [3] 宫照龙,祝仁发,叶长芸,等.118 株单核细胞增生李斯特菌的毒力基因检测[J],疾病监测,2007,22(5):299-301.
- [4] 郭惠,杨晋川,王鑫, 等.江苏省徐州地区小肠结肠炎耶尔森菌的病原学特征分析[J].中国卫生检验杂志,2007,17(1):60-62.
- [5] 纪振杰.原料乳中嗜冷菌数的检测方法比较[J].乳业科学与技术,2007,124(3),131.
- [6] 祝仁发,叶长芸.单核细胞增生李斯特菌的毒力因子[J].中国食品卫生杂志,2007,19(2):158-161.
- [7] Sleator RD,Hill C., et al. Patho-biotechnology: using bad bugs do good things[J].Curr Opin Biotechnol,2006,17(2):211-216.
- [8] 李镇. 熟肉中单增李氏菌污染调查[J]. 转化医学电子杂志, 2014,1(3):145-146
- [9] 张兰荣,唐一清.通州区 6 类食品单增李斯特菌污染状况及分子流行病学特征调查研究[J].中国卫生检验杂志,2007,17(12): 2306-2308.
- [10] 景怀琦, 徐建国, 小肠结肠炎耶尔森氏菌感染性疾病[J],疾病检测,2005,20 (9) , 449-450
- [11] Singh I,Virdi JS.Production of *Yersinia* stable boxin(YST)distribution of *yst* genes in biotype 1A Strains of *Yersinia enterocolitica*. Med Microbiol[J], 2004, 53: 1065-1068.