2017~2019 年福建省预包装食品中致病菌污染状况调查与分析

林碧莲, 柯振华*

(福建省产品质量检验研究院, 国家加工食品质量监督检验中心(福州), 福州 350000)

摘 要: 目的 了解福建省市售预包装食品中致病菌的污染状况。**方法** 根据相关抽检细则收集 2017~2019 年福建省市售预包装食品 8088 份食品样品, 分析检测金黄色葡萄球菌、单增李斯特氏菌、沙门氏菌、副溶血性弧菌、克罗诺杆菌 5 种致病菌, 并将不合格样品及一部分合格样品进行实时荧光 PCR 法测试。**结果** 不合格样品共 14 份, 检出率为 0.17%(14/8088), 其中速冻食品 1.80%(9/487); 豆制品检出率为 0.61%(1/163); 肉制品的检出率为 0.34%(2/589); 婴幼儿配方乳粉第一段 0.31%(1/325); 调味品检出率 0.19%(1/516); 实时荧光 PCR 法检测所有不合格样品均为阳性。**结论** 福建省预包装食品致病菌污染率较低, 总体状况良好, 速冻食品为主要被污染物, 应加强监管; 婴幼儿配方乳粉中仍有致病菌检出, 仍要严防。由于样品量大, 检出率低, 建议检验实验室先采用实时荧光 PCR 法筛选, 阳性样品再采用传统微生物法确认, 节省人力物力。

关键词: 预包装食品; 食源性致病菌; 实时荧光 PCR; 调查分析

Investigation and analysis of pathogenic bacteria contamination in pre-packaged food in Fujian province from 2017 to 2019

LIN Bi-Lian, KE Zhen-Hua*

(*Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality*, *National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food* (*Fuzhou*), *Fuzhou* 350000, *China*)

ABSTRACT: Objective To investigate the contamination status of pathogenic bacteria in pre-packaged food on the market in Fujian province. **Methods** According to the relevant rules of sampling inspection, 8088 samples of pre-packaged food sold in Fujian province from 2017 to 2019 were collected. The pre-packaged samples were tested for the contamination with 5 kinds of foodborne pathogens, including *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Cronobacter* spp., and the unqualified samples and some qualified samples were tested by real-time fluorescent PCR. **Results** There were 14 unqualified samples with the detection rate of 0.17% (14/8088), including quick-frozen food 1.80% (9/487). The detection rate of soybean products was 0.61% (1/163), the detection rate of meat products was 0.34% (2/589), the first stage of infant formula milk powder was 0.31% (1/325), the detection rate of condiments was 0.19% (1/516). All the unqualified samples tested were positive by real-time PCR. **Conclusion** The pathogen contamination rate of prepackaged food is low in Fujian,

基金项目: 福建省科技计划项目(2018Y0019)、福建省产品质量检验研究院科技项目(KY201939A)

Fund: Supported by the Fujian Science and Technology Planning Project (2018Y0019), and the Science and Technology Project of Fujian Institute of Product Quality Inspection (KY201939A)

***通讯作者:** 柯振华, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检验检测。E-mail: Kzhunter@163.com

***Corresponding author:** KE Zhen-Hua, Master, Engineer, Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350000, China. E-mail: Kzhunter@163.com

and the overall condition is good. Quick-frozen food is the main be contaminated food and should be strengthened to decrease the occurrence of foodborne infectious isease. The infant formula milk powder still has the pathogenic bacteria detection, should continue to be strengthen the safety supervision. The sample size is large and the detection rate is low. It is suggested that testing laboratory should use the real-time fluorescent PCR method to screen the samples, and then use the traditional microbial method to confirm the positive samples, so as to save manpower and material resources.

KEY WORDS: prepackaged food; foodborne pathogenic bacteria; real-time PCR; investigation and analysis

1 引 言

预包装食品相对散装食品在运输、储存、销售过程中不易受到污染，因此越来越受到人们的青睐，且随着生活节奏的提高，人民对预包装食品的需求量越来越多，要求也日益多样化，市场上出现的预包装食品品种越来越丰富。存在一定的食品安全隐患，其中食源性致病菌污染是较突出的公共卫生问题，是影响预包装食品安全的重要原因之一。因此对预包装食品中食源性致病菌的监测具有重要意义。

实时荧光 PCR 法具有快速、简便、灵敏的特点，被广泛应用于致病菌[1-3]、肉源性[4-6]、转基因[7]、及其他[8,9]等涉及食品安全领域的检测，国内也出台了很多关于实时荧光 PCR 法的行业标准[10-12]，实时荧光 PCR 法得到大力的推广并应用于实际检测中。

为了解福建省预包装食品的致病菌污染状况，评估其安全风险，对 2017~2019 年福建省预包装食品 8088 份样品进行致病菌检测，并挑取阳性样品及一些阴性样品进行实时荧光 PCR 法验证，评估实时荧光 PCR 法的准确性，为致病菌的实时荧光 PCR 法推广提供科学依据，同时为食品安全保障和食源性疾病预警提供数据资源，也为我国制定和修订预包装食品抽检细则及标准中致病菌指标提供有力的技术支撑。

2 材料与方法

2.1 样品来源

根据《国家食品安全监督抽检实施细则》要求，2017~2019 年在福建省内 9 个行政区采集样品，共计 8088 份，包括肉制品、调味品、乳制品、婴幼儿配方乳粉(婴儿配方乳粉和较大婴儿及幼儿配方乳粉)、饮料、方便食品、饼干、薯类及膨化食品、糖果制品、水果制品、蛋制品、水产、糕点、豆制品、速冻食品(速冻米面和速冻调理肉)等 15 类预包装食品。

2.2 仪 器

LRH 系列生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)；Vitek 2 全自动微生物鉴定系统(法国梅里埃公司)；Steril GARD III Advance 生物安全柜(美国贝克公司)；JJ1000 电子天平(美国双杰兄弟集体有限公司)；SILVER 拍击式均质器(西班牙 IUL 公司)；HVE50 高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司)；ABI 7500 荧光 PCR 仪器(美国 Life Tech 公司)；Mini spin 小型离心机(德国 Eppendorf 公司)；IKA MS3 basic 涡旋混合器(上海琪特分析仪器有限公司)。

2.3 菌株与试剂

2.3.1 试验菌株

共 9 株菌株，其中 4 株作为阳性对照：金黄色葡萄球菌(菌株编号：ATCC 25923)，克罗诺杆菌(菌株编号：ATCC 51329)，单核细胞增生李斯特氏菌(菌株编号：ATCC 19115)，鼠伤寒沙门氏菌(菌株编号：CGMCC 1.1174)；6 株作为阴性对照：表皮葡萄球菌(菌株编号：ATCC 12228)，伊氏李斯特氏菌(菌株编号：ATCC 19119)，英诺克李斯特氏菌(菌株编号：ATCC 33090)，斯氏李斯特菌(菌株编号：ATCC 35967)，大肠埃希氏菌(菌株编号：ATCC 25922)；菌株编号带有 ATCC 购自美国模式培养物集存库，菌株编号带有 CGMCC 购自中国微生物菌种保存中心。这些菌株为传统微生物检测法的阳性/阴性对照菌，其提取的 DNA，作为实时荧光 PCR 法的阳性/阴性对照，提取方法见文献[2]。

2.3.2 引物探针

参考多篇文献中针对目标菌核酸的多对引物探针，进行单重荧光 PCR 扩增比较，筛选最佳引物探针，沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌的最佳引物探针序列参考 SN/T 1870-2016《出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法》[10]，克罗诺杆菌的最佳引物探针序列参考庞杏林等的文章[13]，引物探针均委托上海生工生物工程有限公司合成。

2.3.3 其他试剂

Baird Parker 琼脂培养基、NA 平板、BHI 肉汤、BPW 肉汤、7.5 %NaCl 肉汤(北京陆桥技术股份有限公司)；沙门氏菌显色琼脂、克罗诺杆菌显色琼脂、金黄色葡萄球菌显色琼脂(法国科马嘉公司)；沙门菌鉴定血清(泰国)、兔血浆(广东环凯微生物科技有限公司)；GN(批号：2410874103)和 GP(批号：2420763403)生化鉴定卡、细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)；10×PCR Buffer、

$MgCL_2$、dNTP 溶液、*Taq* 酶(上海生工生物工程有限公司)。

2.4　检测方法

检测项目: 沙门氏菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、克罗诺杆菌。

2.4.1　传统微生物检测法

对应的检测依据是 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》[14], GB 4789.7-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》[15], GB 4789.10-2016《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》第二法[16], GB 4789.30-2016《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氏菌检验》第一法[17], GB 4789.40-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌)检验》[18]。所有样品的检测工作均在洁净室内进行, 可疑菌的分离在生物安全柜里进行。

2.4.2　实时荧光 PCR 法

取经传统微生物法检测结果为不合格样品和同批次的 5 份合格样品, 增菌后提取细菌 DNA, 放置-20 ℃备用, 积累一定量后根据 SN/T 1870-2016《出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法》[10]进行检测。

3　结果与分析

3.1　不同类别预包装食品中致病菌污染状况

15 类食品中只有 5 类食品有检出致病菌, 8088 份样品中检出致病菌 14 株, 总检出率为 0.17%(14/8088); 检出率从高到低分别是速冻食品 1.80%(9/487); 豆制品检出率为 0.61%(1/163); 肉制品的检出率为 0.34%(2/589); 婴幼儿配方乳粉第一段 0.31%(1/325); 调味品检出率 0.19%(1/516); 其余均未检出, 见表 1。

3.2　各种致病菌检出情况及样品名称

2017~2019 年从预包装食品中检出的各种致病菌的菌株数量很少, 8088 份样品共检出 4 种致病菌, 检出率从高到低分别是克罗诺杆菌、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌, 见表 2。

表 1　各类预包装食品致病菌检测结果

Table 1　Pathogenic bacteria monitoring results of pre-packaged food

样品类别	样品份数	被污染样品份数					
		沙门氏菌	副溶弧菌	金黄色葡萄球菌	单增李斯特氏菌	克罗诺杆菌	检出率/%
肉制品	589	0	-	2	0	-	0.34
乳制品	521	0	-	0	-	-	0
婴儿配方乳粉	325	0		0	-	1	0.31
较大婴儿和幼儿配方乳粉	761	0		0	-	-	0
饮料	690	0	-	0	-	-	0
调味品	516	0	-	1	-	-	0.19
方便食品	352	0	-	0	-	-	0
饼干	386	0	-	0	-	-	0
薯类及膨化食品	471	0	-	0	-	-	0
糖果制品	583	0	-	0	-	-	0
水果制品	748	0	-	0	-	-	0
蛋制品	142	0	-	0	-	-	0
水产制品	54	0	0	0	-	-	0
糕点	1300	0	-	0	-	-	0
豆制品	163	0	-	1	-	-	0.61
速冻食品(速冻米面, 速冻调理肉)	487	5	-	3	1	-	1.80
合计	8088	5	0	7	1	1	0.17

注: “-”表示不测项目。

3.3 实时荧光 PCR 法检测结果

取 14 份不合格样品及 60 份合格样品进行实时荧光 PCR 法检测，结果 14 份不合格样品的检出率为 100%，35 份合格样品进行金黄色葡萄球菌检测，有检出一份，其余都未检出。因传统检测法中金黄色葡萄球菌是定量的，超过一定值为不合格样品，实时荧光 PCR 法为定性检测,样品中少量的金黄色葡萄球菌经过增菌后，数量达到检出限即可检出。数据统计见表 3，检测结果图见图 1~4。

表 2 各种致病菌的检出率

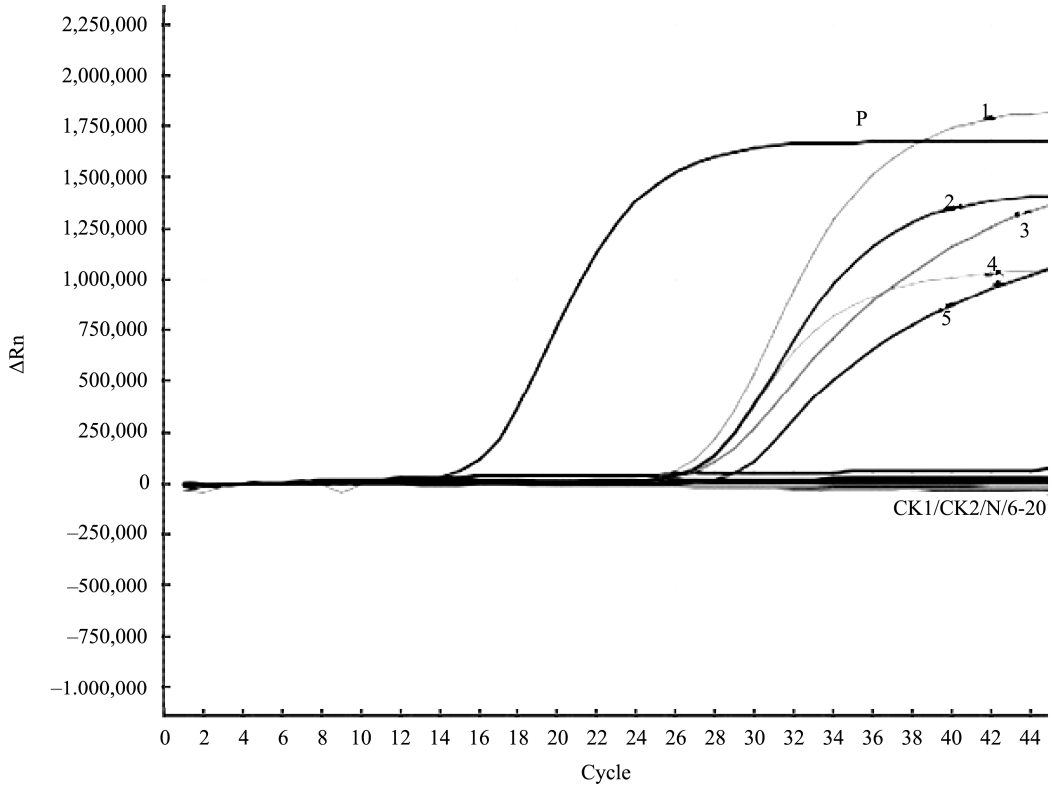
Table 2 Detection rate of various pathogenic bacteria

致病菌	检测样品数/份	阳性数/份	检出率/%
沙门氏菌	8088	5	0.06
金黄色葡萄球菌	8088	7	0.09
单增李斯特氏菌	691	1	0.14
克罗诺杆菌	325	1	0.31

表 3 实时荧光 PCR 法检测结果

Table 3 Pathogenic bacteria monitoring results of the real-time fluorescent PCR method

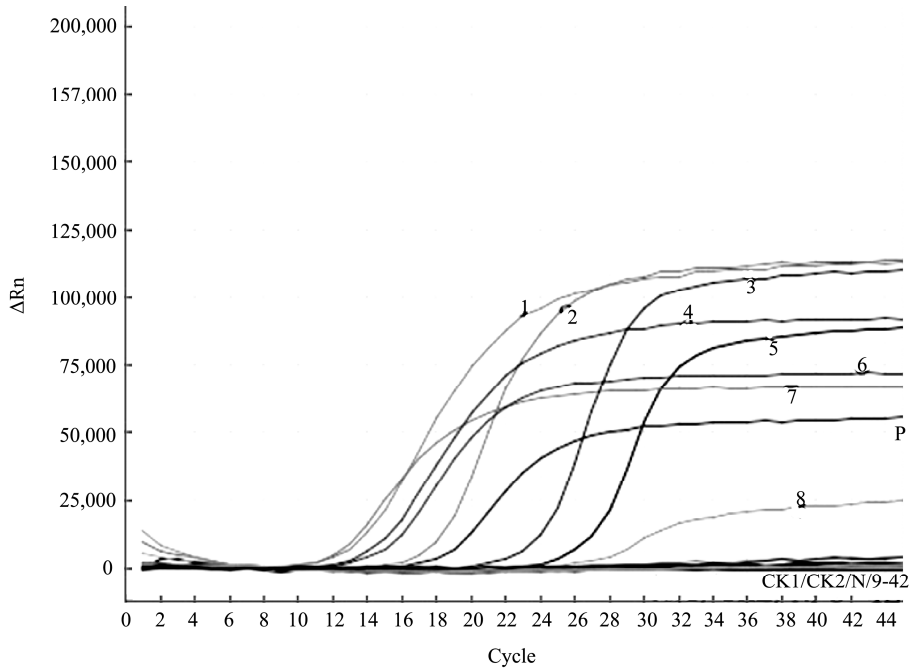
致病菌	检测样品数/份			
	阳性样品	检测结果	阴性样品	检测结果
沙门氏菌	5	5	15	0
金黄色葡萄球菌	7	7	35	1
单增李斯特氏菌	1	1	5	0
克罗诺杆菌	1	1	5	0



注: P: 鼠伤寒沙门氏菌(CGMCC 1.1174); 1-6: 不合格样品; 6-20: 合格样品; CK1: 空白对照; CK2: 提取空白对照; N: 阴性对照。

图 1 沙门氏菌的实时荧光 PCR 扩增结果

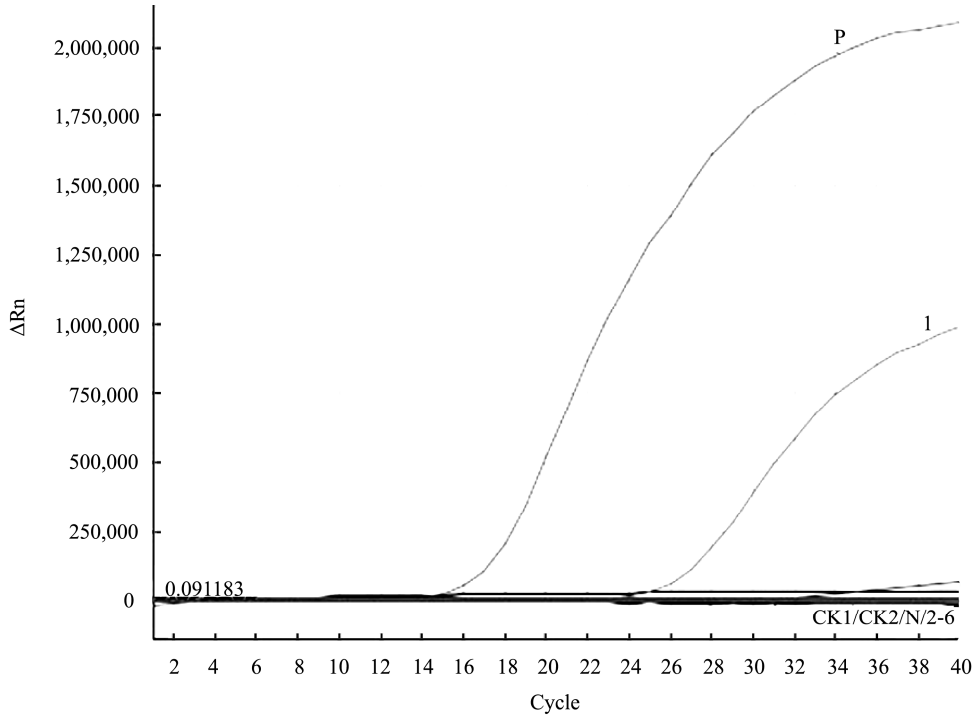
Fig.1 Results for detecting *Salmonella* spp. with real-time fluorescent PCR method



注: P: 金黄色葡萄球菌(ATCC25923); 1-7: 不合格样品; 8: 合格样品; 9-42: 合格样品; CK1: 空白对照; CK2: 提取空白对照; N: 阴性对照。

图 2　金黄色葡萄球菌的实时荧光 PCR 扩增结果

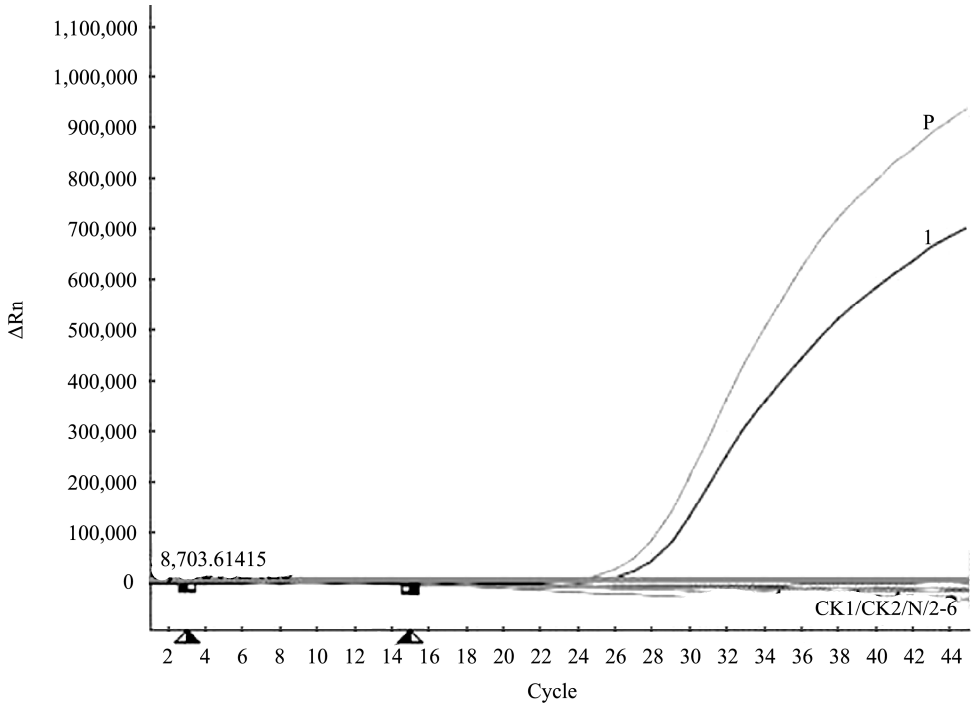
Fig.2　Results for detecting *Staphylococcus aureus* with with real-time fluorescent PCR method



注: P: 单核细胞增生李斯特氏菌(菌株编号: ATCC 19115); 1: 不合格样品; 2-6: 5 份合格; 样品 CK1: 空白对照; CK2: 提取空白对照; N: 阴性对照。

图 3　单核细胞增生李斯特氏菌的实时荧光 PCR 扩增结果

Fig.3　Results for detecting *Listeria monocytogenes* with real-time fluorescent PCR method



注: P: 克罗诺杆菌(ATCC51329); 1: 不合格样品; CK1: 空白对照; CK2: 提取空白对照; N: 阴性对照; 2-6: 5 份合格样品。

图 4 克罗诺杆菌的实时荧光 PCR 扩增结果

Fig.4 Results for detecting *Cronobacter* with real-time fluorescent PCR method

4 结论与讨论

监测结果显示, 15 类预包装食品, 除速冻食品、肉制品、豆制品、婴儿配方乳粉、调味品有检出致病菌, 其余种类食品均未检出致病菌。8088 份预包装食品中各种致病菌的检出率均很低, 但样品间的阳性率差异非常大, 其中速冻食品的检出率最高, 为 1.80%, 速冻食品中的速冻调理肉致病菌检出份数最高, 速冻调理肉在加工、储存、运输、销售过程中很容易受致病菌的污染, 应提醒广大消费者购买速冻调理肉后应高温煮熟煮透, 才可食用, 降低中毒风险。这也提示卫生监督部门应加强速冻调理肉运输、加工、储存、销售过程中的卫生管理措施, 防止交叉污染[19]。

金黄色葡萄球菌在这次监测的多种食品中广泛检出, 采用定量法检测, 样品中菌株数量超过标准指标(n=5, c=1, m=100, M=1000)为不合格, 不合格食品中既有即食食品, 也有速冻食品, 包括肉制品、调味品、豆制品、速冻面米、速冻调理肉等, 金黄色葡萄球菌检出份数是最多的。由于即食食品一般不经过加热或消毒处理即直接食用, 而速冻食品等虽然要经过加热处理, 但有可能存在金黄色葡萄球菌肠毒素不易破坏, 因此金黄色葡萄球菌有较高的食物中毒风险, 这与国内一些学者的调查一致[20,21]。

最近几年, 随着人们对婴幼儿配方乳粉关注度的提高及国家加大力度清理打击不合格婴幼儿配方乳粉, 市面上的婴幼儿配方乳粉在微生物污染方面得到了很大的改善, 此次监测中所有奶粉样品均未检出沙门氏菌、金黄色葡萄球菌, 但有检出一株克罗诺杆菌。克罗诺杆菌作为食源性条件致病菌, 对健康成人无较大影响, 但对婴幼儿却是高危致病菌, 感染主要引起菌血症、脑膜炎、坏死性小肠结肠炎等, 致死率高达 40%~80%[22]。婴幼儿配方乳粉的监管不得松懈。

8088 份预包装食品中检出不合格样品 14 份, 检出率为 0.17%, 在这样低检出率的情况下, 可采用实时荧光 PCR 法进行致病菌初筛, 若检测到阳性样品, 再采用传统的微生物检测法进行菌株分离, 减少人力物力的消耗。研究显示实时荧光 PCR 法较传统微生物检测法更快速、灵敏、简便, 传统检测法需要 5~7 d, 实时荧光 PCR 法只需要 2~3 d, 其优越性也得到了广大学者的验证, 建议在食品监测中推广实时荧光 PCR 检测法。

参考文献

[1] 熊苏玥, 米瑞芳, 陈曦, 等. 多重 PCR 同时检测食品中 4 种细菌与常见霉菌[J]. 食品科学, 2019 , 40(4): 305–311.
Xiong SY, Mi RF, Chen X, *et al.* Multiplex PCR for simultaneous detection of four food-borne bacteria and common mold [J]. Food Sci, 2019, 40(4): 305–311.

[2] 林碧莲, 柯振华, 陈筱婷, 等. 多重实时荧光定量 PCR 快速检测婴幼儿奶粉中 沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(11): 4375–4381.
Lin BL, Ke ZH, Chen XT, *et al*. Simultaneous detection of *Salmonella*

spp., *Staphylococcus aureus* and *Cronobacter* in infant milk powder by multiplex quantitative real-time PCR [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(11): 4375–4381.

[3] 王晓. 多重实时荧光定量 PCR 同时检测冷冻蔬菜中 4 种食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(22): 5918–5921.
Wang X. Simultaneous determination of 4 kinds of foodborne pathogens in frozen vegetables by multiplex quantitative real-time PCR [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(22): 5918–5921.

[4] 罗建兴, 海小, 刘国强, 等. 利用实时荧光定量 PCR 法检测食品中鹌鹑源性成分[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(3): 177–183.
Luo JX, Hai X, Liu GQ, *et al.* Detection of quail origin in foods by real time quantitative PCR [J]. Food Res Dev, 2019, 40(3): 177–183.

[5] 王成程, 韩国全, 张琴, 等. 肉及肉制品真伪鉴别技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(22): 5930–5935.
Wang CC, Han GQ, Zhang Q, *et al*. Research progress on authenticity identification technology of meat and meat products [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(22): 5930–5935.

[6] 杨冬燕, 韦梅霞, 杨永存, 等. 多重荧光 PCR 鉴别羊肉掺假[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(2): 555–561.
Yang DY, Wei MX, Yang YC, *et al*. Identification of mutton adulteration by multiplex fluorescent PCR [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(2): 555–561.

[7] 闫伟, 龙丽坤, 李葱葱, 等. 三种转基因大豆品系的多重荧光 PCR 检测体系建立[J]. 大豆科学, 2019, 38(5): 712–718.
Yan W, Long LK, Li CC, *et al*. Establishment of detection system for three genetically modified soybean lines [J]. Soybean Sci, 2019, 38(5): 712–718.

[8] Lara SG, Santiago V, Jaime P, *et al*. Detection of honey adulteration by conventional and real-time PCR [J]. Food Control, 2019, 95: 57–62.

[9] Laube I, Hird H, Brodmann P, *et al*. Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey [J]. Food Chem, 2010, 118: 979–986.

[10] SN/T 1870-2016 出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法[S].
SN/T 1870-2016 Method for the detection of pathogens in food for export-Real-time PCR method [S].

[11] SN/T 1204-2016 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法[S].
SN/T 1204-2016 Protocol of the real-time PCR method for detecting genetically modified plants and their derived products [S].

[12] SN/T 2727-2010 饲料中禽源性成分检测方法 实时荧光 PCR 方法[S].
SN/T 2727-2010 Determination of poultry derived materials in feedstuff-Real-time fluorescent PCR method [S].

[13] 庞杏林, 张健, 张颖, 等. 婴幼儿配方奶粉中克罗诺杆菌分子检测方法探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(2): 208–210.
Pang XL, Zhang J, Zhang Y, *et al*. Detection of molecules of Enteroacter sakazakii in powdered infant formula [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(2): 208–210.

[14] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-*Salmonella spp.* [S].

[15] GB 4789.7-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验[S].
GB 4789.7-2013 National food safety standard-Food microbiological examination-*Vibrio parahaemolyticus* [S].

[16] GB 4789.10-2016 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].
GB 4789.10-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-*Staphylococcus aureus* [S].

[17] GB 4789.30-2016 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氏菌检验[S].
GB 4789.30-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-*Listeria monocytogenes* [S].

[18] GB 4789.40-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验[S].
GB 4789. 30-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-*Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* [S].

[19] 杨洪启, 张博. 公共场所卫生监督中存在的问题及对策[J]. 医学动物防制, 2012, 28(5): 565–568.
Yang HQ, Zhang B. The problems and countermeasures of health monitoring in public places [J]. J Med Pest Control, 2012, 28(5): 565–568.

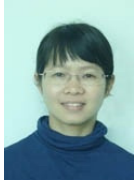
[20] 陆贞玉. 食品中金黄色葡萄球菌及检测方法现况[J]. 预防医学情报杂志, 2010, 11(26): 892–894.
Lu ZY. Status of *Staphylococcus aureus* in food and its detection methods [J]. J Prev Med Inf, 2010, 11(26): 892–894.

[21] 吕国平, 秦丽云, 王苋, 等. 食品金黄色葡萄球菌的污染调查[J]. 医学动物防制, 2013, 29(5): 541–545.
LV GP, Qin LY, Wang X, *et al*. Investigation on *Staphylococcus aureus* of food [J]. J Med Pest Control, 2013, 29(5): 541–545.

[22] Proudy I. Genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* isolates by PFGE, BOX-PCR and sequencing of the *fliC* gene [J]. J Appl Microbiol, 2008, 104(1): 26–34.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



林碧莲, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检验检测。
E-mail: 390005160@qq.com

柯振华, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检验检测
E-mail: Kzhunter@163.com