

强,可对色谱上分离不好的峰进行分离,使定量和定性更加准确。用本方法分析污染食物中的毒鼠强比 GC – FID 法灵敏度高,抗干扰性好。

2.5 由于毒鼠强溶于丙酮,提取液经填冲硅镁吸附剂的小柱后,杂质被吸附在小柱上,毒鼠强在柱上没有保留。

2.6 毒鼠强不溶于石油醚,故可以用石油醚洗掉试样中酯溶性杂质。无水硫酸钠加入量应视试样含水量来定。将试样研成粉状(不结块)即可。

2.7 试样毒鼠强含量低时可先将试样浓缩再进行分析。

参考文献:

- 1 李树林.毒物的毒理与毒物分析[M].北京:人民卫生出版社,1989,189~ 225
- 2 周建华.生物检材中毒鼠强的气相测定方法[J].刑事技术,1994,(1):3
- 3 关福玉.血样和尿样中毒鼠强的 GC 测定方法的研究及初步应用[J].色谱,1993,11(6):33
- 4 秦益明.“424”特效灭鼠灵中毒的检验[J].刑事技术,1990,(3):19~ 20

中图分类号:O657.63;TS207.5+3 文献标识码:C 文章编号:1004-8456(2000)03-0017-03

食品中出血性大肠杆菌 O157:H7 检验方法的建立

陈倩¹ 贾珍珍¹ 郭福全²

(1.北京市卫生防疫站,北京 100013;2.卫生部北京生物制品研究所,北京)

O157:H7 大肠杆菌是出血性大肠埃希氏菌(Enterohemorrhagic *E. coli* EHEC)的一个常见的血清型。自 1982 年美国首次发生由 O157:H7 大肠杆菌引起的食物中毒小型爆发以来,欧美各国、日本相继有本菌所致疫情爆发的报道。已知 O157:H7 是一种以食物传播为主要传播途径的人畜共患疾病的病原菌,生食受污染的食品或饮用水可引发感染,有时可导致大规模爆发流行。我国同样存在 O157:H7 引发食物中毒的隐患,建立统一的食物中 O157:H7 检验方法迫在眉睫。为此,我们参考日本厚生省及 USDA 检验方法,^[2,5]建立了适用于我国基层大规模的检测食品中 O157:H7 的检测方法,并对其进行了方法验证和实际试样检测。

1 材料和方法

1.1 菌株 EHEC 882364 由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所提供。大肠杆菌 44113 来自中国药品生物制品检定所。鼠伤寒沙门氏菌、绿脓杆菌菌株为本室保存。

1.2 培养基和试剂 普通营养肉汤;普通营养琼脂平板;m(EC)增菌肉汤(卫生部北京生物制品研究所);新生霉素(n)(Sigma 公司产品),在 m(EC)增菌肉汤中终浓度为 20 μg/mL;山梨醇麦康凯分离培养基(SIB)(卫生部北京生物制品研究所);头孢拉定(C)(上海新亚药业有限公司)终浓度为 0.05 mg/L;亚碲酸钾(T)(陆桥新技术有限责任公司);CT-SIB 培养基,在 SIB 培养基中加入 0.05 mg/L 的头孢拉定、0.5 mg/L 的亚碲酸钾;LIG 培养基(卫生部北京生物制品研究所);TSI(三糖铁)培养基(陆桥新技术有限责任公司);肠出血性大肠杆菌 EHEC 诊断血清(卫生部北京生物制品研究所)。

1.3 食品试样 北京某超市鲜鸡肉、猪肉共 30 件。

1.4 染菌试样 采自菜市场的猪肉馅。将 EHEC 菌株用普通营养肉汤增菌,37℃培养 24 h,将增菌肉汤进行梯度稀释,用营养琼脂平板对 EHEC 计数,稀释度选择为 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 。吸取上述稀释液各 1 mL,分别均匀滴加到 25 g 猪肉馅中,成为人工染菌试样。

1.5 检验方法

增菌 无菌称取试样 25 g,置于 225 mL m(EC)n 增菌肉汤,8 000 r/min 均质 2 min,41℃培养 18~24 h。

分离培养 取一环增菌液划线接种于 CT- SIB 平板 37℃培养 18~ 24 h,挑取可疑菌落,在 CT- SIB 平板上可疑 EHEC 菌落呈中心淡褐色,扁平透明,边缘光滑,直径约 2 mm。每个平板至少挑选不少于 5 个可疑菌落,同时接种于 LIG 和 TSI 培养基,37℃培养 18~ 24 h。凡 LIG 高层黄色,斜面红色,有动力,以 365 nm 紫外线照射无荧光,三糖铁底层、斜面均为黄色,符合一般大肠杆菌反应者,保留,做下一步鉴定试验。

生化和血清学试验 生化反应符合一般大肠杆菌特征,不发酵山梨醇,MUG 反应阴性菌株用 O157:H7 血清做试探性凝集,同时做进一步生化试验,或用 VITEK- AMS 细菌鉴定仪做全面生化分析,符合者以 O157:H7血清做最后确定。

报告 凡用上述方法在被检食品中分离获得的纯菌落,生化鉴定符合大肠杆菌特征,与 EHEC O157:H7 血清凝集阳性者,可报告该食品检出 O157:H7 大肠杆菌。

1.6 敏感性检测 对人工染菌试样应用前述方法检测。由增菌肉汤平板计数结果推算 3 个染菌试样中 O157:H7 的浓度。同时对试验用标准菌株进行血清学及生化试验,作为对照。

1.7 特异性鉴定 选用 EHEC O157:H7 为阳性质控菌株,大肠杆菌 E. coli 44113,鼠伤寒沙门氏菌,绿脓杆菌为阴性质控菌株。按前述程序分离,以检测杂菌对本方法的影响。

1.8 实际试样的检测 对 30 件超市试样依检验程序进行分离鉴定。

2 结果

2.1 按照检验程序对染菌试样进行 CT- SIB 平板分离,各稀释度染菌试样经培养后均发现在 CT- SIB 平板上有淡褐色,扁平透明,边缘光滑,直径 2 mm 的可疑菌落。挑取可疑菌落接种于 LIG 斜面和 TSI 培养基,37℃培养 24 h,可见 LIG 高层黄色,斜面红色,有动力,以 365 nm 紫外线照射无荧光;TSI 底层、斜面均为黄色。分离菌株和标准菌株均与 O157:H7 血清凝集,生理盐水对照阴性。分离菌株和标准菌株的生化反应结果相同,生化反应结果见表 1。

表 1 大肠杆菌生化反应表

项目	分离株	CMCC	项目	分离株	CMCC	项目	分离株	CMCC
氧化酶	-	-	动力	+	+	MR	+	+
VP	-	-	靛基质	+	+	尿素酶	-	-
硫化氢	-	-	乳糖	+	+	葡萄糖	+	+
甘露醇	+	+	山梨醇	-	-	赖氨酸	+	+
鸟氨酸	+	+	苯丙氨酸	-	-	氰化钾	-	-
硝酸盐	+	+	卫矛醇	+	+	棉子糖	+	+
柠檬酸盐	-	-						

2.2 检测方法的灵敏度 增菌肉汤平板计数的结果为 1.1×10^9 cfu/ mL。由此可推算出 3 个染菌试样中 O157:H7 浓度分别为 4 400 cfu/ g 440 cfu/ g 44 cfu/ g。各稀释度染菌试样均检出了 O157:H7。实验最低检出浓度 44 cfu/ g。

2.3 特异性鉴定 各菌株培养及反应见表 2。

对阳性和阴性质控菌株依检验程序鉴定,结果仅 EHEC O157:H7 有典型菌落生长、凝集阳性反应。大肠杆菌 44113 生长为红色菌落,荧光反应阳性。鼠伤寒沙门氏菌在 SID 培养基不生长;绿脓杆菌生长菌落略突出,颜色类似可疑菌落,但与 O157:H7 血清无凝集反应。

2.4 实际试样检测 依据检验程序对超市采集的猪肉 15 件、鸡肉 15 件进行 EHEC O157:H7 检测,结果鸡

表 2 实验菌株的生物学特性

菌株名称	mEC 增菌	SIB 培养	荧光试验	血清凝集
O157:H7	+	扁平透明中心褐色	-	+
鼠伤寒沙门菌	+	不生长	/	/
E. Coli	+	红色菌落	+	/
绿脓杆菌	+	有可疑菌落	+	-

肉中分离出 2 株可疑 O157:H7 菌株。分离菌株在 CT-SIB 平板上呈圆形、扁平透明、中心淡褐色。LIG 反应为高层黄色、斜面红色,有动力;MUG 酶阴性反应。应用 VITEK 全自动微生物鉴定系统鉴定,结果符合大肠杆菌特性。与 EHEC O157:H7 血清凝集反应阳性。^[6]猪肉中未检出 EHEC O157:H7。

3 讨论

3.1 我国国内尚无统一的食物中 EHEC O157:H7 检验方法,目前多以山梨醇发酵为筛选指标,^[4]导致工作量巨大。本方法借鉴日本厚生省 EHEC O157:H7 检验方法,^[2]采用 m(EC)n 肉汤 41℃增菌,^[1,5]以排除杂菌生长。依据 O157:H7 不含有 β-葡萄糖醛酸酶,不分解 MUG 产生荧光的特点,采用国产 LIG 培养基,将 MUG 反应作为初筛指标,结合山梨醇发酵试验,从而增加了筛选作用,大大减少了工作量,同时提高了对靶细胞检出的特异性。

3.2 由人工染菌试验结果可见:该方法最低检出率达 44 cfu/g。检测灵敏度较高。特异性检测结果表明本方法能够排除沙门氏菌属、大肠杆菌等肠道菌的干扰,具有高度特异性。

3.3 应用本方法进行实际试样 30 件检测,结果检出 2 株 EHEC O157:H7 野毒株。

3.4 该方法适用于食物(肉制品、蔬菜)的 EHEC O157:H7 检测。在 4 个工作日可报告结果,不需特殊设备,操作简便,易于掌握。适用于基层大量食物检测工作,具有良好的实用价值。

参考文献:

[1] 李学景,等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的实验室诊断[J]. 国外医学(微生物学分册), 1993, (2): 76~ 79
[2] 江成博, 岛田园子, 荻原博和, 等. 肠出血性大肠菌的检索次序的试行案[R]. 第六次日本临床微生物学会, 1995
[3] 徐建国, 祁国明. O157:H7 和肠出血大肠杆菌[J]. 疾病监测, 1996, 11(8)
[4] 徐建国, 等. 肠出血性大肠杆菌微生物学流行病学和临床特征[J]. 中华流行病学杂志, 1988, (腹泻病特刊): 174~ 176
[5] F J Bolton, et al. Isolation of escherchia coli O157 from raw meat products[J]. Aapplied Microbiology. 1996, 23: 317~ 321
[6] 陈倩, 等. 从宰鸡肉、市售鸡肉分别检出一株出血性大肠杆菌 O157:H7 [J]. 中国食品卫生杂志, 1999, 11(3): 22~ 23
中图分类号: Q939. 121; TS201. 3; R15 文献标识码: C 文章编号: 1004- 8456(2000) 03- 0019- 03

卫生部司(局)文件
卫法监食发[1999]第 153 号

卫生部法监司关于“卫生部制止保健食品
夸大宣传保健功能的紧急通知”中
有关问题的请示答复函

海南省卫生厅:

你厅“关于贯彻卫生部制止保健食品夸大宣传保健功能的紧急通知中有关问题的请示”(琼卫防(1999)第 85 号)收悉。经研究,答复如下:

一、根据《中华人民共和国广告法》第七条第二款第(二)项“广告不得使用国家机关和国家机关工作人员的名义进行宣传”的规定,我部“紧急通知”重申,不得以卫生部的名义进行保健功能宣传。

二、保健食品生产企业按照卫生部《保健食品标识规定》的要求,在其产品的最小销售包装上配套使用保健食品批准文号与保健食品标志,不在“紧急通知”自查清理范围内。

卫生部卫生法制与监督司
一九九九年十一月二十一日