

实验技术与方法

上海市猪肉中金黄色葡萄球菌定量风险评估

骆璇¹ 郭红卫¹ 王颖² 李洁²(1. 复旦大学公共卫生学院营养与食品安全教研室, 公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032;
2. 上海市食品药品监督所, 上海 200233)

摘要:目的 了解上海居民因食用污染金黄色葡萄球菌的鲜猪肉而导致食物中毒的风险,为今后开展完善猪肉产品中金黄色葡萄球菌风险评估提供参考,为选择合适的风险管理措施提供依据。方法 采用倍数生长模型,估计6~10月在室温条件下储藏不超过1天时间的最终食用时猪肉内的金黄色葡萄球菌含量。结果 6~10月食用时猪肉中金黄色葡萄球菌含量超过 10^5 CFU/g的概率分别为3.3%、33.6%、21.4%、7.6%和0.3%。6、9、10月中初始污染水平与发生食物中毒风险的相关性最大,而在7、8月储藏时间与食物中毒的风险相关性最大。结论 7月通过食用猪肉发生葡萄球菌食物中毒的风险最大,接下来依次是8、9、6和10月。这一趋势与各月温度的分布基本一致,证明了温度越高越容易发生葡萄球菌食物中毒,该模型的预测结果比较合理。

关键词:金黄色葡萄球菌;猪肉;风险评估;模型**中图分类号:**R155.31;R155.55 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2010)03-0244-06**Quantitative Risk Assessment on *Staphylococcus aureus* in Pork in Shanghai**

LUO Xuan, GUO Hong-wei, WANG Ying, LI Jie

(Key Laboratory of Public Health and Safety, Ministry of Education, Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Objective To evaluate the risks associated with pork contaminated by *Staphylococcus aureus*, so as to provide references for improving the microbial risk assessment and adopting effective risk management measures. **Method** Multiple growth model was used to predict the growth of *Staphylococcus aureus* in pork stored under room temperature for not more than 24 h during the time period from June to October. **Results** The probabilities of occurring *Staphylococcus* food poisoning related to pork consumption from June to October were 3.3%, 33.6%, 21.4%, 7.6% and 0.3%. In June, September and October, the most related factor for *Staphylococcal* food poisoning was the contamination of *Staphylococcus aureus* at the time of purchasing. While in July and August, *Staphylococcal* food poisoning was most likely induced by long term storage of foods. **Conclusion** The risk of occurring *Staphylococcal* food poisoning caused by the consumption of pork was the highest in July, and then in August, September, June and October. The probability of *Staphylococcal* food poisoning in the five months was in consistent with the distribution of temperature, the higher the temperature the more susceptible to *Staphylococcus* food poisoning. It is suggested that the prediction model used in our study is valid.

Key words: *Staphylococcus aureus*; Pork; Risk Assessment; Model

微生物风险评估(microbiological risk assessment, MRA)是当今国际食品安全领域广泛应用的一种工具。它通过对因食用特定食品而感染特定微生物,从而对人体健康产生的不良后果进行综合的识别、确认以及定性和定量评价,估计最终发生食物中毒的概率。1999年食品法典委员会(Codex

Alimentarius Commission, CAC)拟定的《微生物风险评估的原则和指导方针》为进行微生物危害风险评估提供了分析框架^[1]。

本研究拟建立一种新的暴露评估模型,对上海市居民因食用鲜猪肉发生葡萄球菌食物中毒的风险进行定量风险评估,为今后进一步完善猪肉产品中金黄色葡萄球菌风险评估提供参考和依据。

收稿日期:2009-12-11

基金项目:上海市科委2007年度重大科技攻关项目(07dz19508-6)

作者简介:骆璇 男 硕士生 研究方向为食品安全 E-mail:
072102108@fudan.edu.cn

通信作者:郭红卫 女 教授 Email:hwguo@shmu.edu.cn

1 材料和方法**1.1 模型设计**

暴露评估模型以居民购买猪肉为起点,最终食

用为终点,描述在6~10月不同室温条件下的储藏过程。可分为两个阶段:购买时猪肉中金黄色葡萄

球菌的初始污染和常温储藏时其在猪肉中的生长。模型中所有变量参数的设置汇总于表1。

表1 暴露评估模型中的参数设置

过程	变量	定义	单位	公式
购买	P_p	猪肉中金黄色葡萄球菌的污染率		Beta{31,371}
	L_p	阳性样品中金黄色葡萄球菌的污染水平	log CFU/g	Cumulative(1,4,{1,1.3,1.6,1.7,1.9,2,2.08,2.26,2.3,2.43,2.48,2.6,2.7,2.78,2.9,3,3.43,3.78},{0.097,0.226,0.258,0.290,0.323,0.387,0.419,0.452,0.548,0.581,0.710,0.742,0.774,0.806,0.871,0.903,0.935,0.968})
储藏	Ln	阴性样品中金黄色葡萄球菌的污染水平	log CFU/g	Cumulative(-6,1,-6,-2.5,1,[0.01,0.5,0.99])
	C	猪肉中金黄色葡萄球菌的污染水平	log CFU/g	Discrete($L_p; Ln, P_p; (1 - P_p)$)
	T	储藏温度	℃	Pert(minimum, mean, maximum)
	T	储藏时间	h	Uniform(0,24)
	LT	生长停滞期	h	$LT = (\exp(1.12056 - 0.05434T + 0.00093T^2) - 1)/\exp(-6.76516 + 0.24987T - 0.00273T^2)$
	GT	猪肉中金黄色葡萄球菌的生长代时	h	$GT = (-0.0185T^3 + 2.1314T^2 - 82.205T + 1083.5)/60$
	Ct	最终食用时猪肉中金黄色葡萄球菌的污染水平	log CFU/g	$Ct = C_0 + [(t - LT)/GT] \times \log_{10}(2)$
风险阈值	发生葡萄球菌食物中毒的浓度水平	log CFU/g	5	

1.1.1 购买时猪肉中金黄色葡萄球菌的初始污染采用上海市食品药品监督所提供的2008年6~10月间市售猪肉产品中金黄色葡萄球菌监测数据。监测样品采集于上海市范围内的饭店、超市、菜场等各种猪肉销售场所。检出限为10 CFU/g。最终400份样品中共有370份结果为阴性。详见表2。

表2 2008年上海市猪肉产品中金黄色葡萄球菌监测结果

检测浓度 (CFU/g)	检测浓度 (log CFU/g)	样品数
< 10	< 1.00	370
10	1.00	3
20	1.30	4
40	1.60	1
50	1.70	1
80	1.90	1
100	2.00	2
120	2.08	1
180	2.26	1
200	2.30	3
270	2.43	1
300	2.48	4
400	2.60	1
500	2.70	1
600	2.78	1
800	2.90	2
1000	3.00	1
2700	3.43	1
6000	3.78	1

假设以所有样品中的金黄色葡萄球菌污染的平均水平作为鲜猪肉中的污染水平。为了模拟不确定性,采用贝塔分布的形式描述其中金黄色葡萄球菌的污染率,公式为 Beta($s+1, n-s+1$)。其中 n 表示总样品数, s 表示阳性样品数^[2]。阳性样品中的污染水平采用累积分布的形式描述。为了估计阴性样品中的未检出浓度,用 Jarvis 等式计算其中的实际污染水平^[3],公式如下。

$$M = -(2.303/V) \times \log(Z/N) \quad (1)$$

其中 M 表示样品中真实浓度(CFU/g), V 表示检测时所用样品量(g), Z 表示阴性样品数量, N 为检测样品总数。

实际检测中采用的是国标法,取样量为25 g,结合检测结果一起代入等式,计算得出猪肉中金黄色葡萄球菌的未检出浓度大概为 $-2.5 \log \text{CFU/g}$ 。假设以其作为平均值,通过 left-hand-tailed cumulative 分布来表示阴性样品中的浓度,则 $-6 \log \text{CFU/ml}$ 的最小值(1.0%)和最大值 $1 \log \text{CFU/ml}$ (99.0%)可以表示阴性样品中金黄色葡萄球菌实际浓度的不确定性。最终,估计销售时猪肉中的污染水平采用离散分布的形式^[4]。

1.1.2 储藏阶段 拟采用倍数生长模型作为最终的预测生长模型,表达式见表1。模型中包括储藏时间、储藏温度、生长代时和生长停滞期等影响因素。

储藏时间 6~10月温度较高,不论居民购买猪肉后是否当天食用,都会置于冰箱内储藏。处于常温下的时间主要包括购买后回家的途中及到家后常温下短时间存放这两部分。一般来说绝不会超过

24 h。因此,在模型中假设储藏时间大概在0~24 h,并采用均匀分布(Uniform)来描述。

储藏温度 采用中国气象局气象科学数据共享服务网中上海市2008年6~10月每月的平均温度数据,详见表3。并以Pert分布模拟每月温度的分布情况。假设将月平均温度作为Pert分布中最有可能出现的值,最终可表达为Pert(minimum, mean, maximum)。

表3 上海市2008年6~10月气温(℃)

月份	平均最低温度	月平均温度	平均最高温度
6月	21.7	24.0	27.1
7月	27.2	30.3	34.1
8月	25.7	28.4	31.8
9月	23.4	25.7	28.8
10月	17.8	20.7	23.7

生长代时 在国际食品微生物标准委员会(International Commission on Microbiological Specification for Foods, ICMSF)的一份报告中研究了接种于pH 5.8和水分活度0.98的牛肉中金黄色葡萄球菌在不同温度下生长的代时(generation time, GT),得到公式如下。

$$GT = -0.0185T^3 + 2.1314T^2 - 82.205T + 1083.5 \quad (2)$$

其中GT为不同温度下生长的代时(min),T为温度(℃)^[5]。

Baeza等^[6]在建立对加热灭菌过的肉类产品中金黄色葡萄球菌随温度生长模型时也采用了这一公式。目前现有以猪肉为基质的金黄色葡萄球菌预测生长模型较少,由于猪肉的pH值、水分活度及其他一些金黄色葡萄球菌生长影响因素与ICMSF报告中的牛肉相似,故在模型中使用了上述公式。其中GT改为以h为单位。修改后最终公式如下。

$$GT = (-0.0185T^3 + 2.1314T^2 - 82.205T + 1083.5)/60 \quad (3)$$

生长迟滞期 Buchanan等^[7]使用模拟出来的表面效应模型评价了温度、pH值、氯化钠、亚硝酸钠等因素对金黄色葡萄球菌196E在有氧和厌氧条件下生长的影响。其中以冈泊茨模型为一级模型,而二级模型则描述了上述4因素对于一级模型中的参数B、M和MPD(最大菌群密度)的影响,有氧生长表达式如下。

$$\begin{aligned} \ln B &= -10.8812 + 0.2551T + 1.0648P - 0.2653S \\ &+ 0.000379N - 0.00133TP + 0.00516TS - 0.0000335TN \\ &- 0.00723PS - 0.000845PN + 0.000199SN - 0.00273T^2 - 0.0563P^2 + 0.00308S^2 + 0.0000270N^2 \end{aligned} \quad (4)$$

$$\ln M = 24.1321 - 0.3667T - 4.5705P + 0.0536S +$$

$$\begin{aligned} &0.0155N + 0.0110TP - 0.00324TS + 0.000103TN \\ &+ 0.0369PS - 0.00241PN - 0.000449SN + 0.00366T^2 + 0.301P^2 - 0.00372S^2 + 0.0000117N^2 \end{aligned} \quad (5)$$

其中T为温度(℃),P为pH值,S为氯化钠的百分比,N为亚硝酸钠浓度(μg/ml)。

以此模型为基础,金黄色葡萄球菌生长迟滞期(lag time, LT)与M和B的关系可用公式表达如下

$$LT = M - 1/B \quad (6)$$

其中LT为生长迟滞期(h)^[8]。

鲜猪肉的pH值约在5.5~6.3之间^[9],水分活度一般在0.99左右。有文献报道生碎猪肉的pH值为5.7,氯化钠的百分比小于0.05^[10]。在我国食品中污染物限量国家标准中规定肉类食品中亚硝酸钠的限量标准为3 mg/kg^[11]。故在评估中鲜猪肉的pH值定义为生长模型来源食品中的pH值为5.8,氯化钠百分比采用冈泊茨模型中限定的最小值0.5%,亚硝酸钠浓度采用国标限量值3 mg/kg。将这些值代入B、M表达式中,并将得到的两个表达式代入LT计算公式(6)最终得到生长迟滞期的表达式。

1.1.3 金黄色葡萄球菌产毒浓度 目前为止尚未有研究能明确表明金黄色葡萄球菌产毒与其菌数的定量联系,故无法得知金黄色葡萄球菌菌数水平与产毒之间的关系。ICMSF的报告中指出摄入0.1~1.0 μg的肠毒素即可能对人体健康造成危害^[12]。美国食品和药物管理局(FDA)的研究也得出肠毒素含量只要高于1.0 μg即可造成葡萄球菌食物中毒,而食物中菌数含量达到10⁵ CFU/g即可产生足够致病的肠毒素,这一个浓度值可被作为导致食物中毒的最小浓度^[13]。国外一些金黄色葡萄球菌定量风险评估同样也采用了此浓度作为判断标准^[4,14]。综合上述信息,本次评估以10⁵ CFU/g作为发生葡萄球菌食物中毒的阈值标准。

1.2 模型模拟

以表1中的各参数设置为基础,在Excel中建立起模型,并采用蒙特卡罗模拟技术,运用@RISK5.0软件对模型中所有参数和最终结果进行模拟分析。在实际操作中每一次模拟进行1万次运算,每一次运算均采用Latin Hypercube抽样方法从模型各变量的概率分布中抽取一个值,以这些随机抽取的数值进行计算。

2 结果

2.1 最终食用时猪肉中金黄色葡萄球菌的污染水平 模拟计算得到6月份储藏不超过1天时间后最

终食用时猪肉中金黄色葡萄球菌的最终暴露浓度为 $-5.0 \log \text{CFU/g}$ (5%)到 $4.4 \log \text{CFU/g}$ (95%),平均值为 $-0.4 \log \text{CFU/g}$ 。大于 $5 \log \text{CFU/g}$ 的概率为3.3%,见图1。7月份的最终暴露浓度为 $3.1 \log \text{CFU/g}$ (5%)到 $10.5 \log \text{CFU/g}$ (95%),平均值为 $3.1 \log \text{CFU/g}$ 。大于 $5 \log \text{CFU/g}$ 的概率为33.6%。8月份的最终暴露浓度为 $1.8 \log \text{CFU/g}$ (5%)到 $8.3 \log \text{CFU/g}$ (95%),平均值为 $1.8 \log \text{CFU/g}$

CFU/g 。大于 $5 \log \text{CFU/g}$ 的概率为21.4%。9月份的最终暴露浓度为 $-4.8 \log \text{CFU/g}$ (5%)到 $5.6 \log \text{CFU/g}$ (95%),平均值为 $0.3 \log \text{CFU/g}$ 。大于 $5 \log \text{CFU/g}$ 的概率为7.6%。10月份的最终暴露浓度为 $-5.6 \log \text{CFU/g}$ (5%)到 $2.8 \log \text{CFU/g}$ (95%),平均值为 $-1.5 \log \text{CFU/g}$ 。大于 $5 \log \text{CFU/g}$ 的概率仅为0.3%。

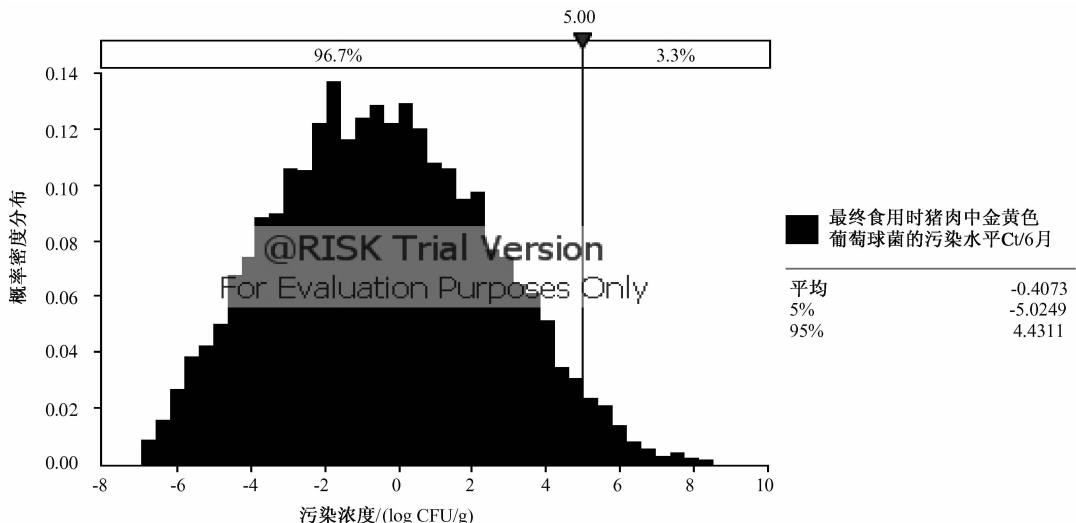


图1 6月食用时猪肉中金黄色葡萄球菌的污染水平分布

各月份储藏后食用时猪肉中金黄色葡萄球菌的最终污染水平累积概率分布对比如图2所示。最终暴露浓度大于阈值的概率以7月份最大,为33.6%,接着是8月,为21.4%。而9月超过阈值发生食物中毒的概率下降到了10%以内,为7.6%。6月份比9月更低,为3.3%。10月经过模拟后发生

食物中毒的概率最低,仅为0.3%。最终食用时猪肉中的污染水平分布趋势与各月温度的趋势基本一致。从各月份的模拟结果上看,7月通过食用猪肉发生葡萄球菌食物中毒的风险最大,是10月的112倍,接下来依次是8、9、6月,发生食物中毒的风险分别是10月的71倍、25倍和11倍。

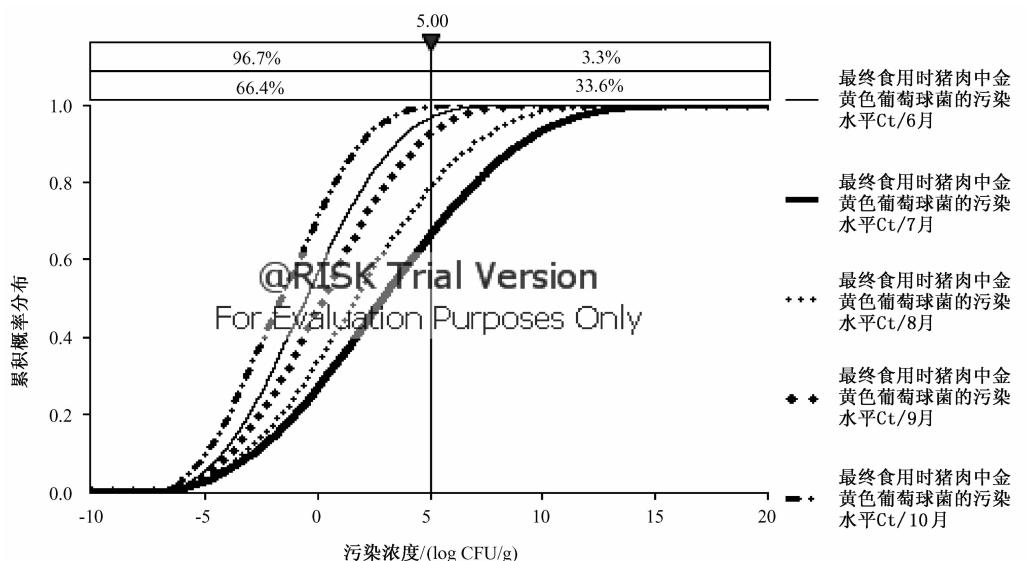


图2 6~10月食用时猪肉中金黄色葡萄球菌污染水平累积概率分布对比

2.2 敏感度分析

敏感度分析是风险评估的重要组成部分,用于

分析评估模型中产生的各变量参数对于模型结果的影响,以获得降低风险的有效控制措施。本次评估

模型中涉及的主要变量为初始污染水平、储藏时间和储藏温度。

6月份的敏感度分析如图3所示。变量D11、D14、D13依次代表初始污染水平、储藏时间和储藏温度。分析结果表明以上3个变量中初始污染水平与发生食物中毒风险的相关性最大,相关系数为

0.82;其次为储藏时间,相关系数为0.54;储藏温度与风险的相关性最小,相关系数为0.12。9月和10月3个变量和风险的相关性顺序与6月相同。而7月和8月3个变量按与风险的相关系数从大到小排列依次为储藏时间、初始污染水平、储藏温度。

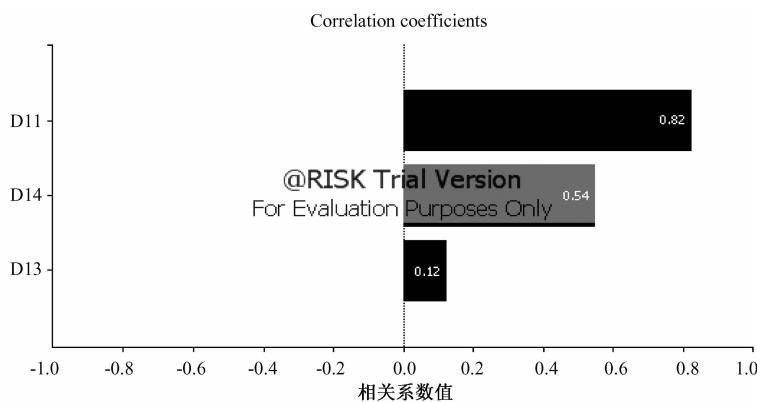


图3 敏感度分析(6月)

因而,在温度较高的7、8两月应以尽量减少室温下储藏的时间作为控制葡萄球菌食物中毒的首要措施。另外降低猪肉在销售时的污染水平的措施效果也较好。而在6、9、10这3个月温度相对较低,食物中毒的风险管理应以减少猪肉中的初始污染水平为主,其次应注意减少猪肉在室温下储藏的时间。

3 讨论

金黄色葡萄球菌在自然界中广泛存在,是一种常见的致病菌。猪肉作为我国食用最为普通的肉类食品,同时也是金黄色葡萄球菌的重要污染源。有研究报道金黄色葡萄球菌在生猪肉中的检出率达到18%^[15]。

葡萄球菌食物中毒是由肠毒素引起的。肠毒素的热稳定性比菌体高,家庭日常各种烹调方式虽然对菌体具有一定的杀灭能力,但一般较难破坏肠毒素^[16,17]。故研究中假设烹调前后食物中肠毒素的含量水平几乎一致。同时,我国居民购买猪肉之后若不立即烹调,都是常温储存或置于冰箱冷藏或冷冻储存。由于在冷藏或冷冻时金黄色葡萄球菌一般不能生长产毒,故可认为常温储藏期末的肠毒素含量即等同于食用时猪肉中的含量。

目前为止,国内外已进行的金黄色葡萄球菌定量风险评估较少,且主要以紫菜包饭、奶酪等作为评估目标食品,大部分评估都不完善。猪肉中金黄色葡萄球菌的定量风险评估研究之前从未有过,难度很大。由于相关资料的缺乏,本研究在尝试建立一种新模型的过程中使用了许多假设,并以概率分布

的形式描述各参数,评估中必然存在很多不确定性。因缺乏金黄色葡萄球菌的剂量-反应模型,本次评估以 10^5 CFU/g作为发生食物中毒的阈值标准,这是不确定性的主要来源之一。上海市金黄色葡萄球菌监测仅从部分区域抽检样品,代表性方面存在局限。同时监测样品中包括各种猪肉产品,若分不同种类进行单独的风险评估则过于繁杂,现有资料也不允许,故只能将各种产品都默认为鲜猪肉,以监测的总样品污染水平作为模型中的初始污染水平进行模拟。评估中只建立起生长预测模型,估计室温储藏条件下的生长情况。选择在食物内环境因素与鲜猪肉相近的其他食物中模拟得到的表达式来描述生长代时。上述诸方面所产生的不确定性对于最终的评估结果的准确性和有效性都会造成影响。

剂量-反应关系对于定量风险评估是必要的^[18]。尽快建立起剂量-反应模型是今后金黄色葡萄球菌定量风险评估研究的重点和难点。本次评估中的模型并没有考虑猪肉中存在的其他微生物的种类和数量,也没有研究微生物之间的相互作用。这些对于模型的实际应用方面是否会造成影响还有待进一步研究。本次评估并未建立起低温残存模型和高温失活模型,没有开展各种烹调方式对于食物中肠毒素含量的影响方面的研究,已建立的生长模型也不完善。这些模型的建立也有待今后风险评估进一步研究。同时,有条件的话还可继续开展以各种不同种类的猪肉产品为目标食物的金黄色葡萄球菌风险评估工作。

参考文献

- [1] CAC. Principles and guidelines for the conduct of Microbiological Risk Assessment [Z]. CAC/GL 30-1999.
- [2] VOSE D. Risk analysis: A quantitative guide [M]. Wiley, New York, 2000:401-462.
- [3] JARVIS B. Sampling for microbiological analysis [M]//Lund B M, Baird-Parker T C, Gould G W, ed. The microbiological safety and quality of food. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000: 1727-1728.
- [4] BAHK G J, HONG C H, OH D H, et al. Modeling the level of contamination of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat kimbab in Korea [J]. J Food Protect, 2006, 69(6): 1340-1346.
- [5] International Commission on Microbiological Specification for Food. Microorganismos de los alimentos [M]. Características de los patógenos microbianos. España: E. Acibia S A., 1996: 358-359.
- [6] BAEZA R, ROSSLER C, MIELNICKI D, et al. Theoretical modelling of *Staphylococcus aureus* growth in a cooked meat product kept at ambient temperature using temperature profiles of selected Mexican cities [J]. Ciencia E Tecnología De Alimentos, 2009, 29(1): 81-84.
- [7] BUCHANAN R L, SMITH J H, MCCOLGAN C, et al. Response-surface models for the effects of temperature, pH, sodium-chloride, and sodium-nitrite on the aerobic and anaerobic growth of *staphylococcus-aureus* 196E [J]. J Food Safety, 1993, 13 (3): 159-175.
- [8] LINDQVIST R, SYLVEN S, VAGSHOLM I. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk [J]. Int J Food Microbiology, 2002, 78 (1-2): 155-170.
- [9] 许益民. 肌肉 pH 值变化在肉检中的应用 [J]. 中国畜牧兽医, 1983, 5:24-26.
- [10] INGHAM S C, FANSLAU M A, BURNHAM G M, et al. Predicting pathogen growth during short-term temperature abuse of raw pork, beef, and poultry products: Use of an isothermal-based predictive tool [J]. J Food Protect, 2007, 70 (6): 1446-1456.
- [11] 中华人民共和国卫生部. GB 2762—2005 食品中污染物限量 [S]. 北京:中国标准出版社, 2005.
- [12] ICMSF. Microorganisms in Food 5:Microbiological Specifications of Food Pathogens [M]. London: Blackie Academic and Professional, 1996: 426-435.
- [13] U. S. Food and Drug Administration. Bad bug book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook *Staphylococcus aureus* [R/OL]. [2009-11-12]. <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html>.
- [14] RHO M J, SCHAFFNER D W. Microbial risk assessment of *Staphylococcal* food poisoning in Korean kimbab [J]. Int J Food Microbiol, 2007, 116 (3): 332-338.
- [15] 索玉娟, 于宏伟, 凌巍, 等. 食品中金黄色葡萄球菌污染状况研究 [J]. 中国食品学报, 2008, 8(3): 88-93.
- [16] 吴坤. 营养与食品卫生学 [M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 368.
- [17] 李毅. 金黄色葡萄球菌及其肠毒素研究进展 [J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14 (4): 392-395.
- [18] FAO/WHO. Food safety risk analysis-a guide for national food safety authorities [M]. FAO Food and Nutrition Paper, NO. 87.



卫生部监督局关于委托开展完善食品添加剂质量规格标准工作的函

卫监督食便函[2010] 85号

中国疾病预防控制中心：

根据卫生部等 9 部门《关于加强食品添加剂监督管理工作的通知》(卫监督发[2010]89 号), 对尚无质量规格标准的食品添加剂, 由卫生部会同有关部门指定。

为做好食品添加剂质量规格标准指定工作, 现委托你中心营养与食品安全所对现行食品添加剂质量规格标准进行梳理, 收集有关部门、协会和企业提出的指定食品添加剂质量规格标准材料, 参照国际组织和相关国家的标准, 组织相关机构起草标准草案报我局。有关工作进展请及时函告我局。

联系人: 张俭波

联系电话: 87776914

传真: 87776914