

动物性食品中金黄色葡萄球菌产肠毒素的研究^{*}

胡东良¹ 品川邦凡² 刘佩红¹ 刘清河³ 王振国⁴

摘要 采用微板凝胶扩散法,对我国动物性食品中金黄色葡萄球菌产肠毒素

1985

金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)食物中毒是国内外主要细菌性食物中毒之一。金葡菌可在食品中生长繁殖,产生肠毒素,当人食入含有一定量肠毒素的食物时,即可发生恶心、呕吐、腹泻等食物中毒症状。

该菌肠毒素具有耐热性,100℃ 30min不被破坏,食物经加热处理后,金葡菌可被杀死,但肠毒素仍然存在,并引起食物中毒发生。所以,在评价食品的卫生学状况和确定金葡菌食物中毒时,必须检查是否产生肠毒素,方能做出可靠的判断。^{〔2〕}

目前,根据肠毒素抗原性的不同,将其分为A、B、C、D、E和F等血清型。^{〔1〕}主要的检测方法有双向凝胶扩散,反向间接凝集试验(RDHA、RPLA),微板凝集扩散试验,放射免疫测定法,酶联免疫吸附试

验标准中采用RPLA。^{〔5〕}为进一步了解我国动物性食品中金葡菌的污染状况、产毒特性,探索简易、敏感、特异的肠毒素检测方法,我们采用改进的微板凝胶双扩散试验,对部分食品中分离出的金葡菌进行了产毒特性和型别的研究。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 肠毒素与抗肠毒素血清的制备

用于肠毒素制备的各型标准菌株、标准肠毒素及标准抗肠毒素血清,均由日本岩手大学教授Shinagawa博士惠赠。抗肠毒素血清的制备,按Shinagawa,^{〔6〕}胡东良等方法^{〔7〕}进行。

1.2 被检菌株肠毒素检样的制备

将待检菌株接种于10%葡萄糖肉汤,培养24h,取0.7%,溶解、分装,121℃灭菌10min,使用前浇板。^{〔4〕}

1.2.3 莫法兰德1号标准管(Mcfarland Standard)的制备 将1份1%

3 吉林农业大学动科科学系 (130118)

4 吉林进出口商品检验局 (130062)

^{*} 本文为吉林省科委资助项目

BaCl₂和 99 份 1% H₂SO₄混合,即为 1 号比浊管。〔4〕

1.2.4 肠毒素的制备方法 将纯培养的被检菌取一环至 3~5mL 的灭菌生理盐水中,制成菌悬液,其浓度为 3 × 10⁸ cfu/mL,相当于 Mcfarland 标准 1 号管的浊度。取 1mL 加到 BHI 培养基上,均匀涂布于表面,37℃培养 48h。培养物 3000r/m 离心 10min,弃去琼脂和菌体,上清液用于肠毒素的检测与分型。〔4〕

1.3 微板凝胶双扩散试验 (Microslide gel double diffusion test)

1.3.1 微板装置 由日本木村制作所制造,组成及规格如图 1 所示。使用时用夹子将其余三部分按图中顺序夹在一起即可。

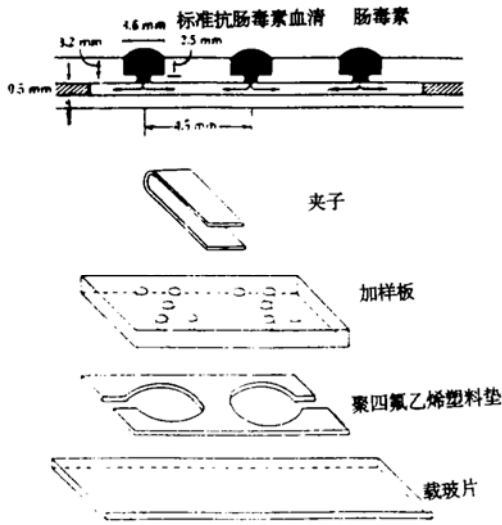


图 1 微板凝胶双扩散试验装置图

1.3.2 1.2% 凝胶扩散琼脂的制备 将 NaCl (0.85g)、巴比妥钠 (0.8g)、硫柳汞 (0.01g) 溶于 90mL 蒸馏水中,调 pH 至 7.4。加蒸馏水至 100mL,然后加 1.2g Noble 琼脂,溶化后两层分析滤纸超热过滤,每 15mL 分装 1 管,冰箱保存。

1.3.3 凝胶板的制备 上述琼脂加热溶

化,用一毛细吸管沿塑料垫两侧缺口分别缓慢加入,至填满整个空间,注意避免产生气泡。

1.3.4 加样 准备好记录纸,将加样板上的孔画在记录纸上,标明每孔的内容物,并编好与玻片号码一致的号码。用 30 μL 或 40 μL 的加样器于每孔中加入试剂。中央孔分别加入各型标准抗肠毒素血清,周围孔一孔加入标准肠毒素,其余孔加入待检肠毒素样品。加样至孔内呈凸状。用玻棒将孔内气泡赶走。微板置于保湿盒中,37℃反应 24h。

1.3.5 结果判定 打开夹子,拿掉加样板,将被测的微板置于有黑色背景的光源上面,观察沉淀线的产生与连接情况,记录反应结果。〔4,7〕

2 结果

2.1 从各类食品中分离出的金葡萄的产毒状况

表 1 食品中金葡萄的产毒状况

检样名称	金葡萄 菌株数	产毒阳性 菌株数	%
乳及乳制品			
直接挤出牛乳	88	31	35.2
混装桶牛乳	43	15	34.9
果味奶	1	1	100.0
雪糕冰淇淋	3	1	33.3
小计	135	48	35.6
肉及肉制品			
鲜猪肉	2	0	0.0
鲜牛肉	12	6	50.0
鲜鸡肉	25	11	44.0
零售熟食	7	3	42.9
小计	46	20	43.5
水产食品			
鲜鱼类	2	1	50.0
小计	2	1	50.0
合计	183	69.0	
%	100	37.7	

由表 1 可见, 183 株金葡菌中有 69 株可产生肠毒素, 产毒率为 37.7%。其中乳及乳制品中分离出 135 株菌产毒率为 35.6%; 肉及肉制品中检出的 46 株菌产毒率为 43.5%, 水产品中分离出 2 株菌, 有 1 株产生肠毒素。

2.2 从各类食品中分离出的金葡菌肠毒素的类型

表 2 食品中金葡萄菌肠毒素的分型结果										
检 样 产 毒 名 称 菌株数	产 毒 类 型									
	A	B	C	D	E	AB	AC	CD		
生鲜牛乳	46	18	8	16	1	-	-	2	1	
乳 制 品	2	1	-	-	-	-	1	-	-	
小 计	48	19	8	16	1	0	1	2	1	
鲜肉类	17	6	3	6	-	1	-	1	-	
肉 制 品	3	3	-	-	-	-	-	-	-	
小 计	20	9	3	6	0	1	0	1	0	
鲜鱼类	1	-	-	1	-	-	-	-	-	
合 计	69	28	11	23	1	1	1	3	1	
%		40.6		33.3		1.45		4.35		
			15.9		1.45		1.45		1.45	

由表 2 可见, 从乳及乳制品中分离出 48 株产毒菌, 主要产 A 型肠毒素 (19 株) 和 C 型 (16 株), 其次为 B 型 (8 株)。从肉及肉制品中分离出 20 株产毒菌, 肠毒素类型主要为 A 型 (9 株) 和 C 型 (6 株), 其次为 B 型 (3 株), 水产品中分离出 1 株产 C 型肠毒素。

3 讨论

3.1 金葡菌肠毒素的检测方法

金葡菌肠毒素的检测, 过去多采用生物测定法,〔1,2〕但因动物来源不易, 个体差异大, 且不够敏感, 已逐渐被免疫学检测方法所取代。目前免疫学检测肠毒素的方法很多, 其中反向间接凝集试验 (RPHA 和 RPLA) 敏感性较高, 但操作较复杂, 且非特

异性反应和假阳性较多; 酶联免疫吸附试验敏感性最高, 但在肠毒素型与型之间易发生交叉反应, 多用于直接从食品中检出肠毒素, 在肠毒素分型上应用较少, 微板凝胶双扩散试验敏感性不如 RPLA 和 RPHA, 但特异性强, 常用于分离菌株的肠毒素检测与分型。〔3,8,9〕目前, 美国 FDA 用微板凝胶扩散法检验肠毒素,〔4〕日本用 RPLA 法。〔5〕

我们应用改良的微板凝胶扩散法, 对从我国食品中分离的金葡菌进行了产毒状况和肠毒素分型研究。为在我国完善肠毒素检验方法和规程, 提供了理论和试验依据。

3.2 金葡菌产毒状况及肠毒素分型研究

我们用微板凝胶扩散法对 183 株金葡菌进行了肠毒素检测与分型。结果表明, 有 37.7% 的菌株产生肠毒素。分型结果表明, 产 A 型肠毒素菌株最多, 占产毒菌株的 40.6%。其它依次为 C 型 (33.3%), B 型 (16.0%) 和 AC 型 (4.4%) 等。Shinagawa 等报道, 从各类食品中检出的 115 株金葡菌, 产毒率为 30.4%, 其中产 C 型最多 (48.6%), 其它依次为 A 型 (28.6%), B 型 (20.0%) 和 AC 型 (2.9%)。〔10〕寺山武等报道, 从 330 株金葡菌中检出 93 株 (28.1%) 产毒菌, 肠毒素分型结果与 Shinagawa 相同。〔11〕本次结果比上述报道略高, 产毒类型也有所不同。今后, 应进一步扩大被检食品的种类和数量, 以便进一步反映我国各类食品中金葡菌的污染状况和产毒特性。

致谢: 我系研究生王丽哲、王玉华、莫日根同学参加了部分试验, 在此表示感谢。

4 参考文献

1 胡东良, 等. 食品微生物学专集. 全国食品微生物学讲习班教材, 1991, 57 ~ 90

(下接第 15 页)