



Detection and Analysis of Yersinia Contamination in Meat Products in Changchun City

Liu Guihua¹, Huang Xin¹, Wang Yan Qiu¹, Zhang Weiyu¹, Gong Yunwei², Huang Biao¹

¹Jilin Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changchun, China

²Changchun City Center for Disease Control and Prevention, Changchun, China

Email address:

liugh0523@sina.com (Liu Guihua)

To cite this article:

Liu Guihua, Huang xin, Wang Yan qiu, Zhang Weiyu, Gong Yunwei, Huang Biao. Detection and Analysis of Yersinia Contamination in Meat Products in Changchun City. *Asia-Pacific Journal of Food Science and Technology*. Vol. 2, No. 1, 2020, pp. 1-5.

Received: February 25, 2020; Accepted: April 17, 2020; Published: June 8, 2020

Abstract: Objective To understand the contamination of Yersinia in meat products sold in Changchun city. Measures and suggestions to reduce and control Yersinia contamination in food were put forward. Methods 300 fresh pork samples were collected. 150 portions of fresh beef; 150 whole chickens; A total of 600 copies. Cold enrichment of collected samples after treatment; multiple PCR detection of target genes; separate culture; primary screening of urease; API20E system biochemical identification. Results The total detection rate of Yersinia was 13.8% (83/600). The detection rate of Yersinia enterocolitica (YS) was 9.7% (58/600). The detection rate of Yersinia flexneri (YF) was 4.0% (24/600). The detection rate of Yersinia kjeldahl (YK) was 0.2% (1/600). The highest positive rate in Yersinia enterocolitica was 17.3% (26/150) in chicken. The second is pork 9.0% (27/300); Beef 3.3% (5/150). The highest positive rate of Yersinia flexneri was 7.3% (11/150) in chicken. The second is beef 3.3% (5/150); Pork 2.7% (8/300). In addition, the detected Yersinia was mainly distributed in the samples collected from farmers' markets, with a detection rate of 17.4% (60/345) far higher than 9.0% (23/255) in supermarkets, $p < 0.01$. Conclusion Our monitoring shows that the contamination of Yersinia in meat products is serious, with the highest detection rate in Yersinia enterocolitica, followed by Yersinia flexneri. Positive samples were mainly collected from chicken in farmers' markets. Pork and beef were also contaminated to varying degrees. There are obvious differences between Yersinia in samples collected from farmers' markets and supermarkets. It suggests that we should strengthen the supervision of meat products. To ensure the food safety of meat and meat products.

Keywords: Meat Products, Yersinia, Multiple PCR, Analysis of Test Results

长春市肉类食品中耶尔森菌污染状况的检测及其结果分析

刘桂华¹, 黄鑫¹, 王艳秋¹, 张炜煜¹, 龚云伟², 黄飏¹

¹吉林省疾病预防控制中心, 长春, 中国

²长春市疾病预防控制中心, 长春, 中国

邮箱

liugh0523@sina.com (刘桂华)

摘要: 目的 掌握长春市市售肉类食品中耶尔森菌污染状况; 提出降低和控制食品中耶尔森菌污染的措施和建议。方法 采集新鲜猪肉300份; 新鲜牛肉150份; 整只鸡150只; 共计600份。采集的样品经处理后进行冷增菌; 多重PCR检测目的基因; 分离培养; 尿素酶初筛; API20E系统生化鉴定。结果 耶尔森菌总检出率为13.8% (83/600); 其中小肠结肠炎耶尔森菌 (YS) 检出率9.7% (58/600); 弗氏耶尔森菌 (YF) 检出率4.0% (24/600); 克氏耶尔森菌 (YK) 检出率0.2% (1/600)。小肠结肠炎耶尔森菌阳性率最高的是鸡肉17.3% (26/150); 其次是猪肉9.0% (27/300); 牛肉3.3% (5/150)。弗氏耶尔森菌阳性率最高的是鸡肉7.3% (11/150); 其次是牛肉3.3% (5/150); 猪肉2.7% (8/300)。另外检出的耶尔森菌主要分布在农贸市场

采集的样品中其检出率为17.4%（60/345）远高于超市9.0%(23/255), $P<0.01$ 。结论 通过我们的监测提示肉类食品中耶尔森菌的污染是严重的，其中小肠结肠炎耶尔森菌检出率最高，其次是弗氏耶尔森菌。阳性样品主要集中在采自农贸市场的鸡肉中，猪肉和牛肉也有不同程度的污染。农贸市场采集的样品中耶尔森菌与超市相比有明显差异。提示我们要加强肉类食品的监管；才能保证肉及肉制品的食品安全。

关键词：肉类食品，耶尔森菌，多重PCR，检测结果分析

1. 概述

耶尔森氏菌属包括11个种，其中对人有致病性的有三种：小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌和鼠疫耶尔森菌。只有小肠结肠炎耶尔森氏菌和假结核菌已确定是食源性病原体。与小肠结肠炎耶尔森氏菌极为密切3个同源群被作为耶尔森氏菌的新种命名，它们是弗氏耶尔森氏菌（*Y·frederiksenii*）、中间型耶尔森氏菌（*Y·intermedia*）和克氏耶尔森氏菌[1-3]。小肠结肠炎耶尔森菌（*Yersinia enterocolitica*）广泛分布于自然界，有着广泛的动物宿主，是重要的人兽共患致病菌，主要通过粪口途径传播[4-6]。人感染小肠结肠炎耶尔森菌后，除可引起胃肠道症状外，还可引起反应性关节炎、突眼性甲状腺肿、结节性红斑、心内膜炎等肠外疾患，严重影响患者的生活质量。特别是小肠结肠炎耶尔森菌具有嗜冷性，能在冷藏条件下生长和繁殖，对冷链条件下储运食品的安全性提出了严峻挑战[7-9]。为掌握我国部分地区市售肉类食品中小肠结肠炎耶尔森菌的污染情况，探索人、畜、禽源小肠结肠炎耶尔森菌的进化机制，提出降低和控制食品中小肠结肠炎耶尔森菌污染的措施和建议。本实验室受国家食品安全评估中心委托,开展了本次监测。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 样品的种类及数量

从2018年8月至2019年10月，每月自长春市多家农贸市场和超市采样，每月采集生猪肉20份（肉馅或分割肉）、牛肉10份（肉馅或分割肉）、整鸡10只（每个采样点，一个摊位采集样品一份），监测15个月共计600份样品。

2.1.2. 培养基和试剂

耶尔森菌选择性琼脂培养基购于英国OXOID公司；耶尔森菌显色培养基购于法国科玛嘉公司；CIN-I购于广州环凯生物有限公司；蛋白胨山梨醇胆汁肉汤购于美国SIGMA-ALORICH公司；尿素培养基购于北京路桥技术有限公司；Api20E 购于法国梅里埃；小肠结肠炎耶尔森菌

标准菌株CMCC52203.细菌基因组DNA提取试剂盒；PCR检测所需试剂由国家食品安全评估中心提供。所有培养基均在有效期内。

2.2. 方法

2.2.1. 增菌培养

取25g猪肉和牛肉样品，置入225mL蛋白胨山梨醇胆汁肉汤（或改良磷酸盐缓冲液）中增菌培养，整鸡则按照500mL/kg的量加入蛋白胨山梨醇胆汁肉汤（或改良磷酸盐缓冲液中）淋洗后增菌，所有样品增菌液于4℃中冷增菌20天。

2.2.2. 样品增菌液中耶尔森菌的初筛

使用普通PCR方法对冷增菌20天后的样品增菌液进行小肠结肠炎耶尔森菌初筛，具体步骤如下：

(i)细菌基因组DNA的提取

将冷增菌20天后的增菌液充分混匀，待肉渣稍沉后，吸取上层增菌液1.5mL于2mL离心管中，1000rpm离心5min，弃去上清。使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取肉类样品增菌液的细菌基因组DNA，使用粪便细菌基因组DNA提取试剂盒提取患者粪便中细菌基因组DNA。对提取的基因组DNA进行PCR分析，如提取的基因组DNA样品暂时不进行PCR扩增，应于-20℃保存。

(ii)目的基因检测

- a) *foxA* (铁草胺菌素受体蛋白基因): 是小肠结肠炎耶尔森菌的一个保守基因,可用于小肠结肠炎耶尔森菌的种水平鉴定。
- b) (侵袭素基因): 编码侵袭素(Invasion), 可使假结核耶尔森菌能够直接粘附到细胞膜上, 促进细菌与宿主细胞膜的融合而侵入宿主细胞。所有假结核耶尔森菌均携带该基因。
- c) (粘附侵袭位点基因): 位于染色体上, 介导小肠结肠炎耶尔森菌的侵袭性。所有致病性耶尔森菌均携带该基因[10-12]。

(iii)引物序列及产物片段大小(见表1)

表1 PCR检测用引物及扩增产物信息。

基因	引物名称	引物序列	产物大小 (bp)
foxA	foxA836	GGTTCCTTGAGCGTATTGATG	1049
	foxA1950	GGTCATCGGTTTCAGCAGTTT	
inv	Inv-1	CGGTACGGCTCAAGTTAATCTG	183
	Inv-2	CCGTTCTCCAATGTACGTATCC	
ail	ail-1	TAATGTGTACGCTGCGAG	351
	ail-2	GACGTCTTACTTGCCTG	

(iv)PCR扩增体系

总体积20μL, 2×PCR Pre-mix10μL, Primer-1 1μL; Primer-2 1μL; 模板DNA 1μL; ddH₂O 7μL。

(v)PCR扩增及电泳:

PCR扩增参数: 94℃预变性5min; 94℃变性30s; 57℃退火30s; 72℃延伸30s; 30个循环; 最后72℃延伸5min。扩增产物用毛细管电泳检测目的条带。

2.2.3. 碱液处理

取PCR方法检测出目的基因片段的样品增菌液0.5mL加入到含有4.5mL碱液的螺旋管中摇匀。

2.2.4. 分离接种

将含有碱液和增菌液的螺旋管充分混匀15秒后, 三区划线接种于CIN-1耶尔森菌选择性平板、耶尔森菌显色培养基、进口耶尔森菌选择性琼脂各1块, 放温箱26℃±1℃培养48h。典型的耶尔森菌在CIN-1耶尔森菌选择性平板上为“公牛眼”状菌落, 中心呈深红色(发酵D-甘露醇的结果), 菌落光泽、圆润、中央凸起, 周围具有无色透明圈, 直径约为1mm-2mm。显色琼脂上为淡紫色或深蓝色菌落。

2.2.5. 尿素分解试验

挑取各平板上的可疑菌落5-8个转种于脑心琼脂(BHA)平板, 26℃±1℃培养24h后, 挑取BHA平板上的可疑菌落, 接种于尿素培养基, 26℃±1℃培养2h-4h后,

选择分解尿素(尿素培养基变红)的菌株进行下一步实验。如果在4h内尿素培养基颜色变化不明显, 则应延长培养至24h后观察结果。

2.2.6. 系统生化鉴定

对分解尿素的菌株阳性培养物使用API20E生化试剂条鉴定。对鉴定为小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、中间型耶尔森菌、弗氏耶尔森菌、克氏耶尔森菌等所有耶尔森菌属的菌株, 均需保留做进一步试验。

3. 结果

3.1. 不同月份采集的600份肉类样品中耶尔森的检测情况

耶尔森菌总检出率为13.8% (83/600); 其中小肠结肠炎耶尔森菌(YE)检出率9.7%(58/600); 弗氏耶尔森菌(YF)检出率4.0%(24/600); 克氏耶尔森菌(YK)检出率0.2%(1/600)。小肠结肠炎耶尔森菌阳性率最高的是鸡肉17.3% (26/150); 其次是猪肉9.0%(27/300); 牛肉3.3%(5/150)。弗氏耶尔森菌阳性率最高的是鸡肉7.3% (11/150); 其次是牛肉3.3%(5/150); 猪肉2.7%(8/300)。这说明耶尔森菌污染比较严重, 并且以小肠结肠炎耶尔森菌(YE)检出率最高; 弗氏耶尔森菌(YF)检出率检出率次之。YE和YF主要存在于鸡肉中, 见表2。

表2 600份肉类样品中耶尔森的检测情况。

结果 时间	YE (株)			YF (株)			YK (株)			合计 (株)	检出率 (%)
	猪肉	鸡肉	牛肉	猪肉	鸡肉	牛肉	猪肉	鸡肉	牛肉		
2018.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2018.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2018.10	1	1	1	1	1	1	0	0	0	6	1.0
2018.11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2018.12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0.3
2019.1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0.7
2019.2	6	4	0	3	0	0	0	0	0	13	2.2
2019.3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0.3
2019.4	4	2	0	1	0	0	0	0	0	7	1.2
2019.5	3	6	0	2	4	0	0	0	0	15	2.5
2019.6	1	6	0	0	0	1	0	0	0	8	1.3
2019.7	2	2	1	1	1	1	0	0	0	8	1.3
2019.8	3	1	0	1	3	1	0	0	0	9	1.5
2019.9	2	0	0	1	1	0	0	1	0	5	0.8
2019.10	2	1	0	1	1	1	0	0	0	6	1.0
3类食品各型别株数	27	26	5	8	11	5	0	1	0	83	13.8
3类食品各型别百分比	9.0	17.3	3.3	2.7	7.3	3.3	0	0.7	0		
各型别株数 (株)		58.0			24.0			1			
各型别检出率 (%)		9.7			4.0			0.2			

3.2. 不同采样点检测结果

检出的耶尔森菌主要分布在农贸市场采集的样品中, 其检出率为17.4% (60/345) 远高于超市9.0%(23/255)。农贸市场采集的样品耶尔森菌检出率为17.4% (60/345) 明显高于超市采集的样品 (P<0.01), 说明超市摊位生肉卫生状况要好于农贸市场, 见表3。

表3 不同采样点耶尔森菌的分布。

采样地点	结果 阳性样品数	检测样品数	检出率 (%)
农贸市场	60	345	17.4
超市	23	255	9.0
合计	83	600	13.8

$X^2=8.62$ $P<0.01$ 。

4. 小肠结肠炎在国内外污染的状况及其检测意义

4.1. 小肠结肠炎在国内外污染的状况

小肠结肠炎耶尔森菌分布广泛, 到目前为止, 已有至少40个国家报道过小肠结肠炎耶尔森菌的感染, 主要分布在日本、欧洲等国家或地区。自该菌被发现以来, 已经在国内外引起多次爆发流行。我国在上个世纪80年代曾有过两次流行, 造成了有500多人感染的事件。一次是86年发生于甘肃省兰州市, 爆发原因是人们食用了死牛肉; 另一次发生于沈阳, 原因是食用了食堂自制的凉拌小菜。小肠结肠炎耶尔森菌病是一种比较特殊的肠道传染病, 该菌主要通过粪-口传播, 人与感染动物粪便密切接触、或食用被污染的食品造成感染, 本次监测在本地农贸市场、超市中销售的生鸡肉、猪肉、牛肉600份样品中耶尔森菌总检出率为13.8% (83/600); 其中小肠结肠炎耶尔森菌 (YS) 检出率9.7% (58/600); 弗氏耶尔森菌 (YF) 检出率4.0% (24/600); 克氏耶尔森菌 (YK) 检出率0.2% (1/600)。这说明食品受到小肠结肠炎耶尔森菌污染是相当严重的, 如果加热不彻底, 或生熟交叉污染, 势必会造成小肠结肠炎耶尔森菌病的发生。虽然污染率这么高, 但本地区因小肠结肠炎耶尔森菌引起的污染事件近几年无报道, 可能是因为我们的检测方法存在问题、检测能力有限、或近些年因中毒事件发生后检测机构很难采集到可疑食品的缘故。生畜肉、生禽肉是我国居民的蛋白质的主要来源, 可制作多种美味佳肴, 深受人们的欢迎, 因此控制肉类食品在屠宰、加工、储存等环节的污染, 特别是生熟食品的交叉污染, 确保其食品的卫生与安全, 就显得十分重要[13-16]。

4.2. 小肠结肠炎耶尔森菌在我省肉类食品的分布

小肠结肠炎耶尔森菌有着广泛的动物宿主, 是重要的人兽共患致病菌。据报道猪是小肠结肠炎耶尔森菌的重要宿主, 因此猪肉及其制品是人感染小肠结肠炎耶尔森菌的主要食物载体。本次监测小肠结肠炎耶尔森菌阳性率最高的是鸡肉17.3% (26/150); 其次是猪肉9.0% (27/300); 牛肉3.3% (5/150)。弗氏耶尔森菌阳性率最高的是鸡肉7.3% (11/150); 其次是牛肉3.3% (5/150); 猪肉2.7% (8/300)。与以往报道有些差异。国家食品安全风险评估中心的前期研究结果显示, 猪源致病性小肠结肠炎耶尔森菌和市售生禽来源菌株的亲缘关系极为相近, 因此推测猪、禽中分离的小肠结肠炎耶尔森菌可能具有共同的来源或禽源小肠结肠炎耶尔森菌源自于生猪, 可能是因摊位交叉污染所致。检出的耶尔森菌主要分布在农贸市场采集的样品中其检出率为17.4% (60/345) 远高于超市9.0% (23/255)。说明超市的卫生状况要比农贸市场好, 另外超市销售的肉类食品一般都是品牌食品, 被耶尔森菌污染的可能性较小。

4.3. 耶尔森菌检测方法的优化

刚刚开始检测时, 由于增菌液使用的国产培养基和检测方法上未使用碱处理液, 因此没有阳性样品的检出。4个月后国家食品安全评估中心提供了进口增菌液, 检测环

节增加了碱液处理步骤, 使得对碱液敏感的其它革兰氏阴性菌受到抑制, 分离平板上杂菌减少, 目标菌菌落得到增殖, 因此提高了检出率。耶尔森菌是嗜冷菌, 在低温下也可疑生长繁殖, 所以在连续15个月的检测中, 在不同气温下都有检出。

foxA 是小肠结肠炎耶尔森菌的一个保守基因, 可用于小肠结肠炎耶尔森菌的种水平鉴定。ail 位于染色体上, 介导小肠结肠炎耶尔森菌的侵袭性。所有致病性耶尔森菌均携带该基因。本次监测利用foxA和ail基因联合PCR扩增法与常规分离培养法, 即结合耶尔森菌的特点, 采用4℃ 20d冷增菌、碱液处理、三种培养基分离培养。挑取15~20个可疑菌落鉴定、尿素酶2~4h初筛。大大节省了实验的成本, 减少了工作量, 增加了目标菌检出的概率, 使细菌的分离鉴定结果准确性更高, 效率更好。本次监测为我们进一步的血清、生物分型和抗药性奠定了基础。

5. 结论

耶尔森菌是我省肉类食品中主要污染菌之一。其中小肠结肠炎耶尔森菌是一种人畜共患病原菌, 广泛分布于自然界。家畜家禽等是其主要宿主。为防止由其所引起的食源性疾病的发生, 保证消费者的健康、保证肉类及肉制品的食品安全, 要加强对肉类食品的监测和监管。

基金项目

吉林省卫生技术创新项目 (2016J034)。

致谢

感谢中国疾病预防控制中心流行病所景怀奇老师和国家食品安全评估中心彭子欣博士对本次监测给予的技术指导和培养基的提供。

参考文献

- [1] 陈邬锦, 王鹏. 中国小肠结肠炎耶尔森菌流行现状及其研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(04): 380-384.
- [2] 郑浩轩, 姜泊. 小肠结肠炎耶尔森菌研究概况[J]. 中国微生物学杂志, 2006, 18(5): 416-419.
- [3] 黄英, 景怀琦. 耶尔森菌侵袭性研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(7): 669-672.
- [4] 王鑫. 中国小肠结肠炎耶尔森菌分子流行病学研究[D]. 中国疾病预防控制中心, 2009.
- [5] 王晓英. 生奶中小肠结肠炎耶尔森菌和嗜水气单胞菌的复合和巢穴PCR检测方法[J]. 国外医学卫生学分册, 2002, 29(2): 127-128.
- [6] 郝琼, 刘翔, 郭邦成, 等. 1997-2010年宁夏回族自治区小肠结肠炎耶尔森菌致病性的基因特征[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(10): 886-889.

- [7] 刘振,吴旭东,刘宗东.冷冻食品中小肠结肠炎耶尔森菌检测[J].中国公共卫生.2005,21(11):1322。
- [8] 杨卫,丁业荣,常宏伟.冷冻冷藏食品小肠结肠炎耶尔森菌病原学检测[J].中国公共卫生.2017,33(2):338-341。
- [9] 景怀琦,王鑫.小肠结肠炎耶尔森菌实验室分离与鉴定手册[M].3版.北京,2013:14-37。
- [10] 苗辉,林静.PCR技术及其在食品微生物检测中的运用研究[J].食品安全导刊,2020(Z2):80-81。
- [11] 潘彤媛,张伟.三重PCR(聚合酶链式反应)检测鸡肉中常见病原菌的研究[J].食品研究与开发,2016,37(14):140-143。
- [12] 冯育芳,邢进,岳秉飞,贺争鸣.小肠结肠炎耶尔森氏菌、假结核耶尔森氏菌、志贺氏菌和空肠弯曲菌多重PCR方法的建立[J].实验动物科学,2016,33(01):1-6。
- [13] 刘婧文,黄成栋,凌莉,王菊芳,李志勇.致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌实时荧光RPA检测方法的建立[J].现代食品科技,2020,36(02):255-262。
- [14] 章志超,龙慧,吴鑫,刘德.食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌分离鉴定方法研究进展[J].食品安全质量检测学报,2020,11(02):455-461。
- [15] 王爱华,赵德东,韦杰.散装生肉中小肠结肠炎耶尔森氏菌的污染状况分析[J].大家健康(学术版),2014,8(11):26-27。
- [16] 张蕴哲,杨倩,马晓燕,杨澜,张伟.RF-LAMP技术检测鸡肉中小肠结肠炎耶尔森氏菌[J].食品研究与开发,2018,39(04):133-138。

作者简介



刘桂华（1962-），女，长春市人，本科，主任医师，主要从事微生物检验及方法研究工作。