

冷冻饮品加工过程中单核细胞增生李斯特菌污染状况分析

王岚, 贾华云, 陈帅, 刘晓革, 刘建琪, 张林青, 张红, 湛志飞

湖南省疾病预防控制中心, 湖南省微生物分子生物学重点实验室, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 了解湖南省冷冻饮品生产加工过程中单核细胞增生李斯特菌(以下简称单增李斯特菌)污染状况,为食源性疾病预防和控制提供科学依据。**方法** 采集湖南省 2 家冷冻饮品生产企业的生产加工各个环节的样品,包括食物样品 75 份(原料类、中间产品、终产品)和非食物样品 279 份(环境、仪器设备、人员、工具等),参照 GB 4789.30-2010 中方法进行单增李斯特菌检测,分离菌株采用脉冲场凝胶电泳法(PFGE)进行分子分型。**结果** 两家企业共监测 354 份样品,检出 28 株单增李斯特菌,检出率为 7.91%,均在非食品样品中检出(检出率 10.04%),其中环境样品的检出率最高(16.07%),人员、仪器设备、工具检出率分别为 6.35%、6.58%、10.00%;与车间前处理区(0.96%)、整箱包装区相比(4.44%),灌装区检出率较高(12.20%);O 企业非食品样品的检出率(13.94%)高于 P 企业(4.39%)($\chi^2 = 6.815, P = 0.009$)。PFGE 结果显示,O 企业分离的 23 株单增李斯特菌,分为 4 个型别,其中有 82.6% 的菌株为同一型别, P 企业分离的 5 株单增李斯特菌,分为 2 个型别,其中有 4 株为同一型别。**结论** 两家冷冻饮品企业在生产加工过程中均检出单增李斯特菌,主要存在于车间灌装区的地面与地面接触物中,两企业检出的单增李斯特菌均存在优势型别,提示应加强消毒与监督,预防单增李斯特菌对冷冻饮品污染的潜在风险。

关键词: 单增李斯特菌; 冷冻饮品; 加工过程; 污染; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号:R378 文献标识码:A 文章编号:1006-3110(2017)11-1289-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2017.11.003

Contamination status of *Listeria monocytogenes* in the production process of frozen drinks

WANG Lan, JIA Hua-yun, CHEN Shuai, LIU Xiao-ge, LIU Jian-qi, ZHANG Lin-qing, ZHANG Hong, ZHAN Zhi-fei

Key Laboratory of Microbial Molecular Biology of Hunan Province, Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China

Corresponding author: ZHAN Zhi-fei, E-mail:190776969@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the contamination status of *Listeria monocytogenes* (hereinafter referred to as *L. monocytogenes*) in the production process of frozen drinks in Hunan Province so as to provide scientific evidence for prevention and control of foodborne diseases. **Methods** Seventy-five food samples from food material, intermediate and end products and 279 non-food samples from production environment, equipment, staff and tools were collected from each production process in 2 frozen drink manufactures in Hunan Province. *L. monocytogenes* was identified in accordance with the test methods specified in GB 4789.30-2010. And pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used for molecular typing of *L. monocytogenes* isolates. **Results** A total of 354 samples were monitored in the 2 manufactures, and 28 strains of *L. monocytogenes* were detected, with the detection rate being 7.91%. All the 28 strains were detected in the 279 non-food samples, with the detection rate being 10.04%, of which the detection rate of environment samples was the highest (16.07%), followed by the samples collected from the staff (6.35%), apparatuses (6.58%) and tools (10.00%). The detection rate of *L. monocytogenes* was higher in filling zones (12.20%) than in pre-treatment (0.96%) and packing zones (4.44%) as well as higher in manufacture O than in manufacture P (13.94% vs. 4.39%, $\chi^2 = 6.815, P = 0.009$). PFGE showed that 23 strains of *L. monocytogenes* isolated from the samples of manufacture O had 4 subtypes, and 82.6% shared the same subtype. 4 of the 5 strains isolated from the samples of manufacture P possessed the same subtype. **Conclusions** *L. monocytogenes* isolates are detected in the production process of the 2 frozen drink manufactures, especially detected in the samples collected from the ground and objects contacting with the ground in filling zones. *L. monocytogenes* isolates detected in the 2 frozen drink manufactures possess the dominant subtypes. Disinfection and supervision should be strengthened to prevent the potential risk of frozen drinks contaminated by *L. monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*; frozen drinks; production process; contamination; pulsed-field gel electrophoresis

作者简介:王岚(1966-),女,大学学历,副主任技师,主要从事食品微生物检验工作。

通信作者:湛志飞, E-mail:190776969@qq.com。

单核细胞增生李斯特菌(以下简称单增李斯特菌)是一种重要的人畜共患病的病原菌,能引起人的李斯特菌病,主要表现为脑膜炎、败血症、心内膜炎、流产和死胎等,是病死率极高的致病菌,死亡率可达 20%~30%^[1-2]。李斯特菌病在欧美国家曾多次暴发流行^[3]。2015 年美国导致 3 人死亡的蓝铃公司冰激凌事件,怀疑是相关设备受李斯特菌污染所致^[4]。尽管我国尚未有相关冷冻饮品引起李斯特菌病的报导,但从多篇报道^[5-8]中显示,在冷冻饮品检出单增李斯特菌,给该类食品中带来安全隐患。

为了解湖南省冷冻饮品加工环节中单增李斯特菌污染状况,分析其污染来源和污染途径,针对性采取有效预防控制措施,为食源性疾病预防提供依据,于 2016 年 6-8 月对湖南省 2 家冷饮饮品生产企业,生产过程各个环节中李斯特菌污染状况进行调查和溯源分析,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 来自湖南省 2 家不同规模的含乳冷冻饮品生产企业,针对生产加工各个环节的样品,包括食物样品 75 份(原料类、中间产品、终产品)和非食物样品 279 份(环境、仪器设备、人员、工具等)。

1.1.2 培养基及试剂 李氏增菌液(LB1、LB2)、李斯特菌显培养基、血琼脂培养基均购自北京陆桥生物技术有限责任公司,采样海绵涂抹棒购自 3M 公司,GP 鉴定卡购自法国生物梅里埃公司。PFGE 分型试剂购自宝生物工程(大连)有限公司;均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 样品采集 参照国家食品安全风险监测专项《含乳冷冻饮品生产加工过程监测工作手册》中监测方法要求,食物样品每份 200 g(ml)左右,无菌操作装入无菌袋中,样品冷藏运送。非食物样品采用有柄海绵涂抹棒(含有 10 ml 中和缓冲液)“之”形方法进行擦拭,先按水平方向从左到右擦拭整个表面,翻转海绵,使用另一面再按照垂直方向从上到下擦拭整个表面,无菌操作,将擦拭后的海绵放回采样袋中密封。所有操作、运输过程避免交叉污染。

1.2.2 样品检验 参照国家食品安全风险监测专项《含乳冷冻饮品生产加工过程监测工作手册》进行样品处理,并结合国家标准 GB 4789.30-2010《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》中方法进行样品分离和菌株鉴定。

1.2.3 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行

数据分析,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。参照 TraNet China 单增李斯特菌 PFGE 操作程序进行,PFGE 图谱采用 Bio Numerics 6.6 软件 Dice-UPGMA 方法进行聚类分析。

2 结果

2.1 不同种类样品的监测结果分析 两家企业共检测 354 份样品,有 28 份样品检出单增李斯特菌,检出率 7.91%。其中食物样品 75 份(包括原料 30 份、中间产品 20 份和终产品 25 份),均未检出单增李斯特菌。非食物样品 279 份,有 28 份样品检出单增李斯特菌,检出率为 10.04%,经统计学分析,食物样品与非食物样品单增李斯特菌的检出率差异有统计学意义($\chi^2=8.173, P=0.004$)。

非食物样品中环境样品的检出率最高 16.07%,其次是工具 10.00%、仪器设备 6.58%,人员 6.35%;经统计学分析,环境样品的检出率与人员、仪器设备、包装、工具、其他类之和检出率差异有统计学意义($\chi^2=7.55, P=0.006$),其中可移动设备接触地面的部件、踏步梯的台阶、地面的检出率较高,分别为 44.44%、26.67%和 24.14%。见表 1。

表 1 非食物类样品单增李斯特菌检测结果

样品属性	样品种类	检测样品数(份)	检出数(份)	检出率(%)
环境	总计	112	18	16.07
	地面	58	14	24.14
	墙壁	16	0	0.00
	门	16	0	0.00
	踏步梯的扶手	5	0	0.00
	踏步梯的台阶	15	4	26.67
	排水口/地漏	2	0	0.00
	其他	11	0	0.00
人员	总计	63	4	6.35
	手	21	0	0.00
	衣服	21	2	9.52
	鞋底	21	2	9.52
仪器设备	总计	76	5	6.58
	操作台	13	0	0.00
	称量器具	4	0	0.00
	传送带/传送器具	17	0	0.00
	可移动设备接触地面的部件	9	4	44.44
	控制按钮	25	0	0.00
	设备接近产品的外表面	8	1	12.50
	其他	10	0	0.00
包装	总计	11	0	0.00
	直接接触产品的包装材料	11	0	0.00
工具	总计	10	1	10.00
	清洁工具	10	1	10.00
其他	总计	7	0	0.00
合计		279	28	10.04

2.2 不同类型采样地点的监测结果分析 前处理区、灌装区(含单支包装区)和整箱包装区样品中单核细胞增生李斯特菌的检出率分别为 0.96%、12.20%和 4.44%。不同类型采样地点之间单增李斯特菌的检出

率差异有统计学意义($\chi^2 = 12.803, P = 0.002$)。结果见表 2。

表 2 不同类型采样地点单增李斯特菌监测结果

采样地点	样品种类	检测样品数(份)	检出数(份)	检出率(%)
前处理区	总计	104	1	0.96
	食物	25	0	0.00
	环境	46	1	2.17
	人员	12	0	0.00
	仪器设备	19	0	0.00
	工具	2	0	0.00
灌装区	总计	205	25	12.20
	食物	32	0	0.00
	环境	59	16	27.12
	人员	42	3	7.14
	仪器设备	51	5	9.80
	包装	11	0	0.00
	工具	4	1	25.00
	其他	6	0	0.00
	总计	45	2	4.44
整箱包装区	食物	18	0	0.00
	环境	7	1	14.29
	人员	9	1	11.11
	仪器设备	6	0	0.00
	工具	4	0	0.00
	其他	1	0	0.00
合计		354	28	7.91

2.3 不同企业的监测结果分析 O 企业和 P 企业非食物样品单增李斯特菌的检出率分别为 13.94%、4.39%,不同企业之间非食物样品单增李斯特菌的检出率差异有统计学意义($\chi^2 = 6.815, P = 0.009$)。两企业食物样品单增李斯特菌均未检出。监测结果见表 3。

表 3 不同企业食物类样品单增李斯特菌监测结果

企业	样品种类	检测样品数(份)	检出数(份)	检出率(%)
O	总计	210	23	10.95
	食物	45	0	0.00
	非食物	165	23	13.94
P	总计	144	5	3.47
	食物	30	0	0.00
	非食物	114	5	4.39
合计		354	28	7.91

2.4 PFGE 分型结果

2.4.1 O 企业 从 O 企业分离的 23 株单增李斯特菌经 AscI 酶切后,PFGE 分为 4 个型别,相似度在 71.3%~100%,其中有 82.6%(19/23)的菌株为同一型别,为企业污染单增李斯特菌的优势型别,PFGE

分型图谱见图 1。

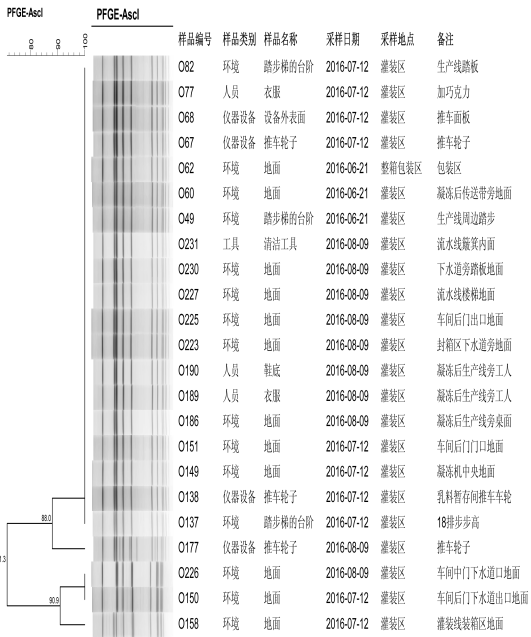


图 1 O 企业单增李斯特菌 PFGE 分析图谱

2.4.2 P 企业 从 P 企业分离的 5 株单增李斯特菌经 AscI 酶切后,PFGE 分为 2 个型别,相似度在 60.4%~100%,其中有 4 株为同一型别,为企业污染单增李斯特菌的优势型别,PFGE 分型图谱见图 2。



图 2 P 企业单增李斯特菌 PFGE 分型图谱

3 讨论

单增李斯特菌广泛存在于自然界,能抵抗极端环境条件(低温、高盐),可在环境、食品、加工厂中长期存活^[9]。该菌在食品加工环节中主要分布在地板、排水沟、墙壁、天花、狭小通道等车间内基础实施;在加工工具、清洁工具、维修工具、设备框架等设备工具;以及员工手部、衣物等^[10];据研究报道^[11-12]单增李斯特菌能在食品加工环境和设备的表面粘附生长并形成菌膜,菌膜能抵御消毒剂的伤害,难以彻底根除,从而增加食品在加工过程中被污染的几率,成为食品安全的隐患。

此次监测结果显示:冷冻饮品生产加工环节检出的 28 株单增李斯特菌,检出率为 7.91%,均在非食品样品中检出,主要来自于企业车间环境中,是污染的主要来源,其次仪器设备、人员、清洁工具和包装材料均有检出,说明非食品样品中污染的单增李斯特菌没有

造成交叉污染到半成品和成品中,可能是因为该菌经过热杀菌、添加剂等加工环节已被杀灭,以及样品的代表性有关。

前处理区、灌装区(含单支包装区)和整箱包装区样品中单增李斯特菌的检出率差异有统计学意义,提示灌装区是生产过程中污染主要环节。灌装区车间空间大、潮湿、温度较高有利于菌膜形成,增加污染机会;特别是细菌滋生处主要是地面、排水口、推车以及操作人员可能是主要的污染来源。对于两家企业单增李斯特菌检出率差异较大,可能与企业车间卫生消毒措施及环境表面是否干燥有关。

单增李斯特菌 PFGE 分型结果显示,O 企业分离的 23 株单增李斯特菌分为 4 个型别,说明该企业单增李斯特菌污染可能存在多种来源;其中 82.6% 的菌株为同一型别,为企业污染的单增李斯特菌的优势型别。从采样地点来看,该优势型别菌株均分布于车间灌装区,主要分布于灌装区地面和地面接触物,在工作人员的衣服和仪器设备表面也有分布,提示同一来源的污染在此企业灌装区车间存在的广泛性,且人员、移动设备、地面疑为同一污染源。从采样时间来看,该优势型别分布于三个不同采样日期,可推断该污染源持续存在,说明该企业清洗、消毒不彻底,整改和监管措施不到位,导致反复污染了同一型别的单增李斯特菌。表明该型菌更适用于 O 企业车间的环境,容易造成交叉污染^[13],单增李斯特菌可在食品环境中长期存在,有报道某一型的单增李斯特菌在一家冰淇淋厂滋长了 7 年^[14],因此企业应该继续进行单增李斯特菌监测,特别关注此优势型别是否持续存在。

P 企业分离的 5 株单增李斯特菌种有 4 株为同一型别,为企业污染单增李斯特菌的优势型别。从采样地点来看,它们分布于车间灌装区的设备轮子、地面环境和整箱包装区的人员鞋底,均为地面和地面接触物,提示可能为此企业生产车间单增李斯特菌污染来源。前处理区分离的菌株和其它区域分离的菌株相似性为 60.4%,说明前处理区污染来源和灌装区、包装区不同,且为第二次采样检出分离到的,可能是因为该型菌污染点有限,在此生产环境中适用能力差,也可能是新污染的,有待进一步监测。

从两个企业单增李斯特菌监测结果和分子分型特征分析,企业在生产加工过程中存在持续污染,对此生产企业应针对易滋生细菌的区域,车间地面、下水道和积液处等环境进行彻底清扫和消毒,并保持车间的表面干燥;定期针对加工设备器具进行清洗和杀菌,工作

人员应严格执行手清洗和消毒,并定期对工作服进行洗涤和消毒。因此冷冻饮食品的生产企业应严格遵守食品安全生产的相关规定,加强生产车间的清洗、消毒和监控,加强生产线上工作人员的培训及卫生监督,规范操作,防止产品的污染,确保冷冻饮食品的食品安全。

参考文献

- [1] 宋筱瑜,裴晓燕,徐海滨,等.我国零售食品单增李斯特菌污染的健康风险分级研究[J].中国食品卫生杂志,2015,27(4):447-450.
- [2] Gilmour MW, Graham M, Domselaar GV, et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak [J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 120-135.
- [3] Mccollum JT, Cronquist AB, Silk BJ, et al. Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe [J]. N Engl J Med, 2013, 369(10): 944-953.
- [4] 国家质量监督检验检疫总局.美国蓝铃冰激凌受李斯特杆菌污染事件舆情汇总[EB/OL].(2015-04-28)[2017-05-11].http://www.aqsiq.gov.cn/xxgk_13386/zxxxgk/201504/t20150428_437458.htm.
- [5] 崔京辉,李达,王永全,等.2004-2005 年北京市食品中单核细胞增生李斯特菌的污染情况调查[J].中国卫生检验杂志,2006,16(12):1508-1509.
- [6] 胡晓宇,苏诚玉,权玉玲.2007-2011 年甘肃省即食食品中单核细胞增生李斯特菌监测分析[J].疾病预防控制通报,2013,28(3):50-52.
- [7] 张淑红,侯凤伶,关文英,等.2005-2013 年河北省即食食品中单增李斯特菌污染及耐药特征研究[J].中国食品卫生杂志,2014,26(6):596-599.
- [8] 陈慧中,杨楠,刘博.2012-2014 年沈阳市食品中单核细胞增生李斯特菌污染状况分析[J].实用预防医学,2016,23(10):1216-1218.
- [9] Codex Alimentarius Commission. CAC/GL 61-2007, Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of *Listeria monocytogenes* in Foods [EB/OL].(2016-05-12)[2017-05-12].<http://www.codexalimentarius.org/standards>.
- [10] 林泽敏.运用 HACCP 原理对食品工厂单增李斯特菌的控制[EB/OL].(2013-08-27)[2017-05-11].<http://www.foodmate.net/haccp/11/lunwenji/1600.html>.
- [11] 马瑜丹,朱欣娜,龙飞,等.单核细胞增生李斯特菌菌膜形成突变株的筛选[J].中国食品学报,2009,9(1):11-17.
- [12] 王少辉,刘萍萍,魏建超,等.上海市动物源性食品中单增李斯特菌的流行病学及生物被膜形成能力研究[J].中国动物传染病学报,2015,23(4):31-36.
- [13] 张奕南,顾文佳,胡雪莲,等.糕点加工厂中单增李斯特菌 PFGE 分型及溯源[J].食品工业,2015,37(8):183-188.
- [14] 国际食品微生物标准委员会(ICMSF).微生物检验与食品安全控制[M].刘秀梅,陆苏彪,田静,译.北京:中国轻工业出版社,2012:204-207.

收稿日期:2017-05-19