

2016—2018 年湖南省含乳冷冻饮品生产加工过程 肠杆菌科和单核细胞增生李斯特菌监测

陈帅, 贾华云, 张林青, 湛志飞, 王岚

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** 了解含乳冷冻饮品生产加工过程中肠杆菌科和单核细胞增生李斯特菌(简称单增李斯特菌)的分布,分析其污染的来源。**方法** 对湖南省 4 家含乳冷冻饮品生产企业生产加工过程各个环节的样品进行监测,采用国家标准检测方法对肠杆菌科和单增李斯特菌进行检验,利用脉冲场凝胶电泳(pulse field gel electrophoresis, PFGE)技术对分离的单增李斯特菌进行分子分型。**结果** 2016—2018 年 4 家企业共监测 1 132 份样品。2018 年 66 份终产品样品中肠杆菌科定量检测有超标现象(计数结果 >100 CFU/g 的样品有 3 份),同时检出 2 株单增李斯特菌。非食品样品中肠杆菌科检出率最高是工具类样品(48.0%) ($\chi^2=28.440, P<0.001$),单增李斯特菌检出率最高是环境类样品(18.7%) ($\chi^2=41.193, P<0.001$)。分离的 102 株单增李斯特菌共有 11 种 PFGE 带型,其中有 6 组分离株分别具有同源性。终产品中单增李斯特菌的污染主要来自环境定植菌株。**结论** 该研究对掌握含乳冷冻饮品生产加工过程肠杆菌科和单增李斯特菌的污染分布及终产品中单增李斯特菌的可能污染源有重要意义,提示企业应加强生产监管,完善生产加工过程中的卫生控制措施,防止潜在风险以保障冷冻饮品终产品的食用安全。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌;肠杆菌科;冷冻饮品;生产加工过程

中图分类号:R155.6 文献标识码:A 文章编号:1006-3110(2021)04-0430-05 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2021.04.006

Surveillance of *Enterobacteriaceae* and *Listeria monocytogenes* in the production process of milk-containing frozen drinks in Hunan Province, 2016–2018

CHEN Shuai, JIA Hua-yun, ZHANG Lin-qing, ZHAN Zhi-fei, WANG Lan

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

Corresponding author: WANG Lan, E-mail: 576792514@qq.com

Abstract: **Objective** To characterize the occurrence of *Enterobacteriaceae* and *Listeria monocytogenes* in the production process of milk-containing frozen drinks, and to analyze the sources of contamination. **Methods** We monitored samples of each production process from four enterprises for milk-containing frozen drinks in Hunan Province. *Enterobacteriaceae* and *Listeria monocytogenes* were detected by the national standard method for testing. The isolates of *Listeria monocytogenes* were profiled by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** A total of 1,132 samples were monitored in the four enterprises from 2016 to 2018. The quantitative detection of *Enterobacteriaceae* in 66 end product samples in 2018 exceeded the standard (3 samples with count results >100 CFU/g), and 2 strains of *Listeria monocytogenes* were simultaneously detected. Among the non-food samples, the detection rate of *Enterobacteriaceae* in tool samples was the highest (48.0%) ($\chi^2=28.440, P<0.001$), and the detection rate of *Listeria monocytogenes* in environmental samples was the highest (18.7%) ($\chi^2=41.193, P<0.001$). Clonal analysis using PFGE divided 102 *Listeria monocytogenes* isolates into 11 patterns, and 6 patterns were homologous respectively. The contamination of *Listeria monocytogenes* in the end products mainly came from the environmental colonization strains. **Conclusions** This study is of great significance to understanding the distribution of *Enterobacteriaceae* and *Listeria monocytogenes* contamination in the production process of milk-containing frozen drinks and the potential contamination sources of *Listeria monocytogenes* in the end products, indicating that the enterprises should strengthen production supervision, develop better sanitary control measures of the production process, and prevent the potential risk so as to ensure the edible safety of end products of milk-containing frozen drinks.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; *Enterobacteriaceae*; frozen drink; production process

基金项目:湖南省卫健委科研项目(C20180793)

作者简介:陈帅(1984-),女,湖南人,主管技师,研究方向:食品微生物检验。

通信作者:王岚, E-mail: 576792514@qq.com。

单核细胞增生李斯特菌(简称单增李斯特菌)属于李斯特菌属,革兰氏阳性小杆菌,广泛存在于自然界中,为人畜共患病原菌。食源性的李斯特菌发病率虽然不高,但死亡率可高达 20%~30%^[1]。2015 年美国的“蓝铃冰淇淋”受单增李斯特菌污染,导致 8 人患病,其中 3 人死亡,既往研究^[2-5]也表明该菌在冷冻饮品中存在一定风险隐患。

肠杆菌科是一大类革兰氏阴性菌,常见的致病菌如沙门氏菌、大肠杆菌、志贺氏菌等都属于肠杆菌科。欧盟食品微生物限量标准规定冰淇淋和冷冻奶制品甜点生产加工过程中终产品及其未包装成品中,肠杆菌科的控制标准为 $n=5$ 、 $c=2$ 、 $m=10$ CFU/g、 $M=100$ CFU/g^[6],即在 5 个样品中,允许全部样品中肠杆菌科检验值小于或等于 10 CFU/g;允许有 ≤ 2 个样品其肠杆菌科检验值在 10 CFU/g 和 100 CFU/g 之间;不允许有样品肠杆菌科检验值大于 100 CFU/g^[7]。

本研究在湖南省选择了 4 家不同规模的含乳冷冻饮品生产企业,收集生产加工过程中原辅料、中间产品、终产品、环境等样品中肠杆菌科和单增李斯特菌等的污染信息,以掌握冷冻饮品生产过程各个环节的卫生状况以及单增李斯特菌的分布和来源。

1 材料与方法

1.1 样品采集 2016—2018 年的第二季度和第三季度,在湖南省选取 4 家含乳冷冻饮品生产企业(HN1 企业、HN2 企业、HN3 企业和 HN4 企业),针对企业某一批次含乳冷冻饮品生产加工过程各个环节的样品进行监测,包括原料类、中间产品、终产品、环境、仪器设备和人员等。按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,所有采集的样品,均须同一批次(批号)的样品,即可追溯;所有操作、运输过程避免交叉污染。

1.2 检验方法 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。

1.2.1 肠杆菌科检验 食品相关样品(定量检测):

①样品稀释:取 25 g/ml 样品置盛有 225 ml BPW 无菌容器中,均质混匀,10 倍系列稀释。②选择适宜的连续稀释度的样品匀液,每个稀释度接种 2 个无菌平皿。非食品相关样品(定性检测)的样品处理:①管道清洗水:取 1 ml 接种 1 个无菌平皿;②涂抹海绵:将装有海绵涂抹棒的无菌袋中加入 90 ml BPW,混匀,取 1 ml 接种 1 个无菌平皿。将 VRBGA 倾注于接种了食品和非食品样品的平皿中混匀,36 ℃ 培养 24 h。具体

分离、鉴定和计数方法参考《食品安全国家标准 食品微生物学检验 肠杆菌科检验》(GB 4789.41-2016)^[8]。

1.2.2 单增李斯特菌检验与脉冲场凝胶电泳(Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE)分型 食品样品:25 g(ml)样品加入 225 ml LB1 增菌液;管道清洗水:200 ml 水样加入 200 ml 双料 LB1 增菌液;涂抹海绵:50 ml 海绵擦拭的 BPW 液加入 50 ml 双料 LB1 增菌液,混匀,30 ℃ 培养 24 h,取 0.1 ml 加入 10 ml LB2 增菌液,30 ℃ 培养 24 h,接种李斯特显色培养基。具体分离、鉴定方法参考《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》(GB 4789.30-2016)第一法^[9]。参照 TraNet China 单增李斯特菌 PFGE 操作程序,对分离的 102 株菌株进行 PFGE 分型,获得的脉冲场电泳图谱用 Bio Numerics 7.6 数据库软件处理,进一步溯源分析。

1.2.3 统计学方法 应用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析,计数资料以率(%)表示,采用 χ^2 检验分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况 2016—2018 年共监测 4 家含乳冷冻饮品生产企业共 1 132 份样品,其中食品样品 211 份,占 18.6%(211/1 132),包括原料(98 份)、中间产品(47 份)、终产品(66 份);非食品样品 921 份,占 81.4%(921/1 132),采集自前处理区(289 份)、罐装区(465 份)和整箱包装区(167 份)。

2.2 肠杆菌科检出情况 非食品样品中工具样品检出率最高(48.0%),其次是其他(47.6%)、人员(33.9%)、仪器设备(29.6%)、环境(25.7%),检出率最低是包装类样品(6.9%),不同种类样品中肠杆菌科检出率差异有统计学意义($\chi^2=28.440$, $P<0.001$);不同采样地点肠杆菌科检出率差异也有统计学意义($\chi^2=318.876$, $P<0.001$),其中罐装区检出率最高(57.2%),其次是整箱包装区(8.4%),前处理区检出率最低(0.3%),见表 1 和表 2。食品样品参照欧盟食品微生物限量标准食品样品终产品中肠杆菌科定量检测结果,2016 年、2017 年均合格,2018 年出现超标情况,超标率为 14.3%,见表 3。

2.3 单增李斯特菌检出情况 在 921 份非食品样品中,有 100 份样品检出单增李斯特菌,其中环境样品检出率最高(18.7%),其次是工具(14.0%)、人员(6.5%)、其他(6.3%)、仪器设备(5.2%),包装类样品未检出单增李斯特菌,检出率差异有统计学意义

($\chi^2=41.193, P<0.001$);不同采样地点单增李斯特菌检出率差异也有统计学意义($\chi^2=8.363, P=0.015$),其中罐装区检出率最高(14.0%),其次是整箱包装区(10.2%),前处理区检出率最低(6.2%),见表1和表2。

表 1 非食品样品中肠杆菌科和单增李斯特菌检测结果

样品种类	2016 年			2017 年			2018 年			合计		
	份数	肠杆菌科	单增李斯特菌	份数	肠杆菌科	单增李斯特菌	份数	肠杆菌科	单增李斯特菌	份数	肠杆菌科	单增李斯特菌
		阳性数(%)	阳性数(%)		阳性数(%)	阳性数(%)		阳性数(%)	阳性数(%)		阳性数(%)	阳性数(%)
环境样品	112	37(33.0)	18(16.1)	131	30(22.9)	27(20.6)	100	21(21.0)	19(19.0)	343	88(25.7)	64(18.7)
地面	58	23(39.7)	14(24.1)	50	11(22.0)	21(42.0)	40	7(17.5)	10(25.0)	148	41(27.7)	45(30.4)
踏步梯台阶	15	4(26.7)	4(26.7)	17	5(29.4)	1(5.9)	6	0(0.0)	2(33.3)	38	9(23.7)	7(18.4)
踏步梯扶手	5	2(40.0)	0(0.0)	9	2(22.2)	2(22.2)	4	1(25.0)	2(50.0)	18	5(27.8)	4(22.2)
墙壁	16	3(18.8)	0(0.0)	22	3(13.6)	1(4.5)	19	3(15.8)	1(5.3)	57	9(15.8)	2(3.5)
排水口/地漏	2	0(0.0)	0(0.0)	4	2(50.0)	0(0.0)	10	3(30.0)	1(10.0)	16	5(31.3)	1(6.3)
可疑的细菌滋生处	-	-	-	6	3(50.0)	1(16.7)	5	2(40.0)	1(20.0)	11	5(45.5)	2(18.2)
门	16	5(31.3)	0(0.0)	23	4(17.4)	1(4.3)	16	5(31.3)	2(12.5)	55	14(25.5)	3(5.5)
人员样品	63	25(39.7)	4(6.4)	63	21(33.3)	3(4.8)	60	17(28.3)	5(8.3)	186	63(33.9)	12(6.5)
手	21	8(38.1)	0(0.0)	21	6(28.6)	0(0.0)	22	6(27.3)	1(4.5)	64	20(31.3)	1(1.6)
衣服	21	9(42.9)	2(9.5)	22	6(27.3)	0(0.0)	20	6(30.0)	0(0.0)	63	21(33.3)	2(3.2)
鞋底	21	8(38.1)	2(9.5)	20	9(45.0)	3(15.0)	18	5(27.8)	4(22.2)	59	22(37.3)	9(15.3)
仪器设备样品	76	25(32.9)	5(6.6)	82	21(25.6)	2(2.4)	92	28(30.4)	6(6.5)	250	74(29.6)	13(5.2)
操作台	13	4(30.8)	0(0.0)	19	4(21.1)	0(0.0)	19	6(31.6)	0(0.0)	51	14(27.5)	0(0.0)
设备紧邻产品的外表面	8	2(25.0)	1(12.5)	6	2(33.3)	0(0.0)	5	4(80.0)	0(0.0)	19	8(42.1)	1(5.3)
模具	-	-	-	4	3(75.0)	0(0.0)	2	2(100.0)	0(0.0)	6	5(83.3)	0(0.0)
传送带/传送器具	17	7(41.2)	0(0.0)	8	1(12.5)	1(12.5)	12	5(41.7)	1(8.3)	37	13(35.1)	2(5.4)
称量器具	4	0(0.0)	0(0.0)	7	1(14.3)	0(0.0)	17	3(17.6)	0(0.0)	28	4(14.3)	0(0.0)
可移动设备接触地面的部件	9	6(66.7)	4(44.4)	15	5(33.3)	0(0.0)	13	3(23.1)	5(38.5)	37	14(37.8)	9(24.3)
控制按钮	25	6(24.0)	0(0.0)	23	5(21.7)	1(4.3)	24	5(20.8)	0(0.0)	72	16(22.2)	1(1.4)
包装样品	11	1(9.1)	0(0.0)	8	0(0.0)	0(0.0)	10	1(10.0)	0(0.0)	29	2(6.9)	0(0.0)
直接接触产品的包装材料	11	1(9.1)	0(0.0)	8	0(0.0)	0(0.0)	10	1(10.0)	0(0.0)	29	2(6.9)	0(0.0)
工具样品	10	6(60.0)	1(10.0)	15	9(60.0)	0(0.0)	25	9(36.0)	6(24.0)	50	24(48.0)	7(14.0)
清洁工具	10	6(60.0)	1(10.0)	6	4(66.7)	0(0.0)	17	4(23.5)	6(35.3)	33	14(42.4)	7(21.2)
维修工具	-	-	-	9	5(55.6)	0(0.0)	8	5(62.5)	0(0.0)	17	10(58.8)	0(0.0)
其他样品	7	5(71.4)	0(0.0)	11	3(27.3)	0(0.0)	45	22(48.9)	4(8.9)	63	30(47.6)	4(6.3)
管道清洗水	-	-	-	6	1(16.7)	0(0.0)	1	1(100.0)	0(0.0)	7	2(28.6)	0(0.0)
其他	7	5(71.4)	0(0.0)	5	2(40.0)	0(0.0)	44	21(47.7)	4(9.1)	56	28(50.0)	4(7.1)
合计	279	99(35.5)	28(10.0)	310	84(27.1)	32(10.3)	332	98(29.5)	40(12.0)	921	281(30.5)	100(10.9)

表 2 不同采样地点非食品样品中肠杆菌科和单增李斯特菌检测结果

采样地点	2016 年			2017 年			2018 年			合计		
	份数	肠杆菌科	单增李斯特菌	份数	肠杆菌科	单增李斯特菌	份数	肠杆菌科	单增李斯特菌	份数	肠杆菌科	单增李斯特菌
		阳性数(%)	阳性数(%)		阳性数(%)	阳性数(%)		阳性数(%)	阳性数(%)		阳性数(%)	阳性数(%)
前处理区	79	1(1.3)	1(1.3)	104	0(0.0)	9(8.7)	106	0(0.0)	8(7.5)	289	1(0.3)	18(6.2)
环境	46	1(2.2)	1(2.2)	54	0(0.0)	8(14.8)	42	0(0.0)	5(11.9)	142	1(0.7)	14(9.9)
人员	12	0(0.0)	0(0.0)	17	0(0.0)	1(5.9)	23	0(0.0)	0(0.0)	52	0(0.0)	1(1.9)
仪器设备	19	0(0.0)	0(0.0)	28	0(0.0)	0(0.0)	30	0(0.0)	1(3.3)	77	0(0.0)	1(1.3)
工具	2	0(0.0)	0(0.0)	3	0(0.0)	0(0.0)	8	0(0.0)	2(25.0)	13	0(0.0)	2(15.4)
其他	-	-	-	2	0(0.0)	0(0.0)	3	0(0.0)	0(0.0)	5	0(0.0)	0(0.0)
罐装区	173	95(54.9)	25(14.5)	159	82(51.6)	16(10.1)	133	89(66.9)	24(18.0)	465	266(57.2)	65(14.0)
环境	59	36(61.0)	16(27.1)	59	30(50.8)	14(23.7)	29	19(65.5)	10(34.5)	147	85(57.8)	40(27.2)
人员	42	25(59.5)	3(5.1)	33	19(57.6)	1(3.0)	19	14(73.7)	3(15.8)	94	58(61.7)	7(7.4)
仪器设备	51	25(49.0)	5(9.8)	41	21(51.2)	1(2.4)	36	24(66.7)	3(8.3)	128	70(54.7)	9(7.0)
包装	11	1(9.1)	0(0.0)	6	0(0.0)	0(0.0)	8	1(12.5)	0(0.0)	25	2(8.0)	0(0.0)
工具	4	4(100.0)	1(25.0)	11	9(81.8)	0(0.0)	14	9(64.3)	4(28.6)	29	22(75.9)	5(17.2)
其他	6	4(66.7)	0(0.0)	9	3(33.3)	0(0.0)	27	22(81.5)	4(14.8)	42	29(69.0)	4(9.5)
整箱包装区	27	3(11.1)	2(7.4)	47	2(4.3)	7(14.9)	93	9(9.7)	8(8.6)	167	14(8.4)	17(10.2)
环境	7	0(0.0)	1(14.3)	18	0(0.0)	5(27.8)	29	2(6.9)	4(13.8)	54	2(3.7)	10(18.5)
人员	9	0(0.0)	1(11.1)	13	2(15.4)	1(7.7)	18	3(16.7)	2(11.1)	40	5(12.5)	4(10.0)
仪器设备	6	0(0.0)	0(0.0)	13	0(0.0)	1(7.7)	26	4(15.4)	2(7.7)	45	4(8.9)	3(6.7)
包装	-	-	-	2	0(0.0)	0(0.0)	2	0(0.0)	0(0.0)	4	0(0.0)	0(0.0)
工具	4	2(50.0)	0(0.0)	1	0(0.0)	0(0.0)	3	0(0.0)	0(0.0)	8	2(25.0)	0(0.0)
其他	1	1(100.0)	0(0.0)	-	-	-	15	0(0.0)	0(0.0)	16	1(6.3)	0(0.0)

表 3 食品样品中肠杆菌科和单增李斯特菌检测结果

样品种类	2016 年					2017 年					2018 年					合计				
	肠杆菌科定量计数结果				单增李斯特菌 阳性数(%)	肠杆菌科定量计数结果				单增李斯特菌 阳性数(%)	肠杆菌科定量计数结果				单增李斯特菌 阳性数(%)	肠杆菌科定量计数结果				单增李斯特菌 阳性数(%)
	份数	分层(%,CFU/g)				份数	分层(%,CFU/g)				份数	分层(%,CFU/g)				份数	分层(%,CFU/g)			
		≤10	10-100	>100			≤10	10-100	>100			≤10	10-100	>100			≤10	10-100	>100	
原料类	40	39(97.5)	0(0.0)	1(2.5)	0(0.0)	25	25(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	33	29(87.9)	1(3.0)	3(9.1)	0(0.0)	98	93(94.9)	1(1.0)	7(4.1)	0(0.0)
生产用水	10	10(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3	3(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4	4(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	17	17(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
麦芽糊精	3	3(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4	4(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3	3(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	10	10(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
果葡糖浆	4	4(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1	1(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1	0(0.0)	0(0.0)	1(100.0)	0(0.0)	6	5(83.3)	0(0.0)	1(16.7)	0(0.0)
奶粉	5	5(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4	4(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5	4(80.0)	0(0.0)	1(20.0)	0(0.0)	14	13(92.9)	0(0.0)	1(7.1)	0(0.0)
奶油	1	1(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	-	-	-	-	2	2(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3	3(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
糖类	4	4(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4	4(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3	3(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	11	11(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
其他	13	12(92.3)	0(0.0)	1(7.7)	0(0.0)	9	9(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	15	13(86.7)	1(6.7)	1(6.7)	0(0.0)	37	34(91.9)	1(2.7)	2(5.4)	0(0.0)
中间产品	20	16(80.0)	3(15.0)	1(5.0)	0(0.0)	19	14(73.7)	3(15.8)	2(10.5)	0(0.0)	8	3(37.5)	3(37.5)	2(25.0)	0(0.0)	47	33(70.2)	9(19.1)	5(10.6)	0(0.0)
冷却后	3	2(66.7)	1(33.3)	0(0.0)	0(0.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2(66.7)	1(33.3)	0(0.0)	0(0.0)
老化后	5	5(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2	2(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2	1(50.0)	1(50.0)	0(0.0)	0(0.0)	9	8(88.9)	1(11.1)	0(0.0)	0(0.0)
凝冻后	5	5(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5	5(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2	1(50.0)	1(50.0)	0(0.0)	0(0.0)	12	11(91.7)	1(8.3)	0(0.0)	0(0.0)
成型罐装后	3	2(66.7)	1(33.3)	0(0.0)	0(0.0)	5	5(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1	0(0.0)	1(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	9	7(77.8)	2(22.2)	0(0.0)	0(0.0)
剩余物	4	2(50.0)	1(25.0)	1(25.0)	0(0.0)	7	2(28.6)	3(42.9)	2(28.6)	0(0.0)	3	1(33.3)	0(0.0)	2(66.7)	0(0.0)	14	5(35.7)	4(28.6)	5(35.7)	0(0.0)
终产品	25	25(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	20	20(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	21	11(52.4)	7(33.3)	3(14.3)	2(9.5)	66	56(84.8)	7(10.6)	3(4.5)	2(3.0)
合计	85	80(94.1)	3(3.5)	2(2.4)	0(0.0)	64	59(92.2)	3(4.7)	2(3.1)	0(0.0)	62	43(69.4)	11(17.7)	8(12.9)	2(3.2)	211	182(86.3)	17(8.1)	12(5.7)	2(0.9)

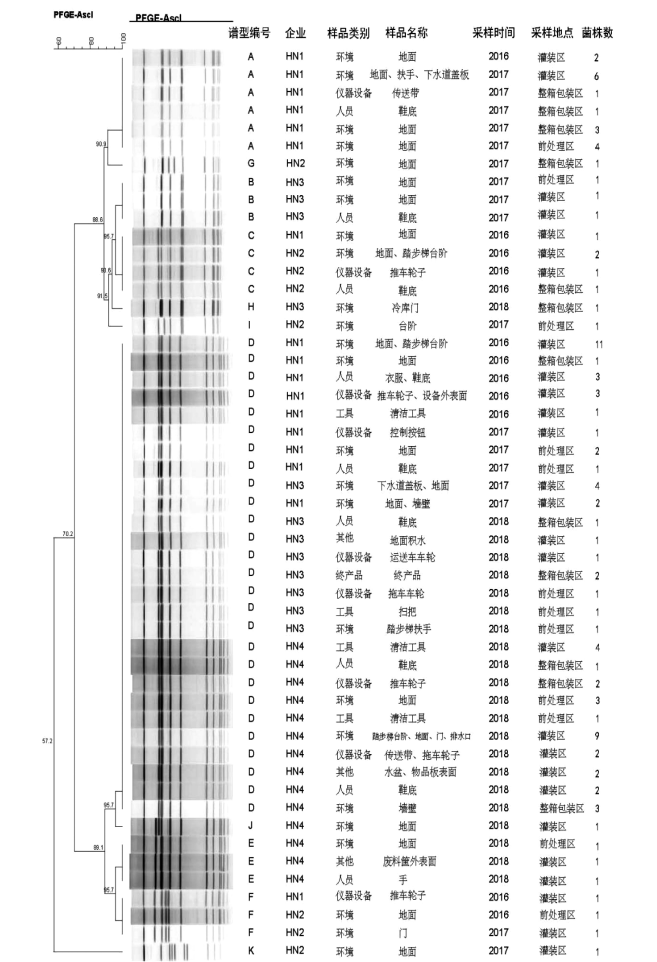


图 1 食品和非食品中单增李斯特菌 PFGE 分型树状图

2.4 PFGE 分型结果 对食品和非食品中分离的单增李斯特菌进行 PFGE 分型,102 株菌的带型在 57.2%~100.0%之间,共产生了 11 种不同谱型(*F* 值大于 85%的视为同一谱型的菌株),其中 6 组分离株的 PFGE 酶切图谱(谱型 A、谱型 B、谱型 C、谱型 D、谱型 E、谱型

F) 分别相同,谱型 C 分离株来自不同的企业(HN1 企业和 HN2 企业),谱型 D 分离株来自不同企业(HN1 企业、HN3 企业和 HN4 企业)和不同采样时间(2016 年、2017 年和 2018 年)。HN1 企业分离的 44 株单增李斯特菌经 *AscI* 酶切后,PFGE 分为 4 个不同谱型,其中谱型 C 和谱型 D 为该企业的优势谱型,分别占 38.6%(17/44)和 56.8%(25/44);HN2 企业分离的 9 株菌经 *AscI* 酶切后,分为 5 个不同谱型,其中谱型 C 为该企业的优势谱型,占 44.4%(4/9);HN3 企业分离的 16 菌经 *AscI* 酶切后,分为 3 个不同谱型,其中谱型 D 为该企业的优势谱型,占 75.0%(12/16);HN4 企业分离的 33 株菌,PFGE 分为 3 个不同谱型,其中谱型 D 为该企业的优势谱型,占 87.9%(29/33),见图 1。

3 讨论

肠杆菌科在欧洲食品行业中常被作为卫生指示菌而广泛监测,它对环境耐受性很强,非常容易在不清洁的区域定植,若食品中肠杆菌科的计数超过一定限量,则表明在加工过程中有一个或多个缺陷环节,可能存在致病菌污染^[10]。单增李斯特菌可引起人类致病,主要表现为脑膜炎、脑炎、败血症、流产等。该菌对低温和环境压力(如低 pH 和高盐)耐受性较强,可在 4℃的环境中生长繁殖,并且在物体表面形成生物膜,这些特性使其成为冷藏和冷冻食品工业的重要污染源之一。

本研究调查了湖南省 4 家含乳冷冻饮品企业生产加工过程中各个环节肠杆菌科和单增李斯特菌污染状况,样品包括原辅料、中间产品、终产品、环境、人员、仪器设备、包装、工具、其他等。采样地点按生产流程分为前处理区(包括混合配料、过滤、定容、均质、巴氏杀菌、

冷却、老化环节)、罐装区(包括凝冻、灌装成型、插筷、冻结、涂挂、单支包装环节)、整箱包装区(对单支包装后进行整箱包装的区域)。其中罐装区最容易受到微生物污染,清洁度要求最高。从结果来看,肠杆菌科检出率罐装区(57.2%)显著高于整箱包装区(8.4%)以及前处理区(0.3%),表明罐装区卫生状况不佳,是生产过程中微生物污染的主要环节,同时提示该区域生产过程可能存在缺陷,如罐装区空间大,环境闷热、潮湿,有利于菌膜形成,如果车间环境卫生条件较差、人员操作不规范、生产设备及器具清洗消毒不彻底,很容易增加产品的微生物污染风险;其次罐装区没有灭菌工艺流程,与其他类别食品在包装前杀菌的工艺不同,冷冻饮品的原辅料经配料、过滤、定容、均质后,立即进行灭菌,然后再进行后续的冷却、老化、凝冻等一系列的工艺,对于在后续生产过程中微生物的二次污染无法进行消除^[11]。

在不同检测样品种类中,单增李斯特菌除包装材料类样品中未检出,其余各类样品均有不同程度的检出,在生产活动中交叉污染到中间产品和终产品的风险很高。提示企业应加强环境、仪器、人员、工具等的卫生管理以及消毒措施。人员相关样品中单增李斯特菌检出率最高是人员鞋底 15.3%,其次衣服 3.2%,最低是手 1.6%,应该与企业要求在岗操作人员定时手消毒有关,工作人员鞋和衣服检出率较高,提示不仅要重视操作人员手消毒,还应重视工作服和鞋底的卫生,要定期进行统一的清洗和消毒,同时规范人员的工作卫生习惯,做好个人卫生管理。

单增李斯特菌 PFGE 分型结果显示,4 个企业分离的菌株都有多个型别,提示四个企业单增李斯特菌污染可能均存在多种来源;优势谱型同时出现在前处理区、灌装区、整箱包装区,提示单增李斯特菌会沿着生产加工链进行水平传播,且各个环节存在交叉污染现象;某些菌株可能长期存在于环境中,在生产活动中继而污染人员和设备,最终对中间产品、终产品造成污染:分离自 HN3 企业的 12 株相同 PFGE 图谱(谱型 D)的单增李斯特菌,2017 年监测在其罐装区地面、下水道盖板分离到,2018 年监测在前处理区拖车车轮、扫把、踏步梯扶手,罐装区运送车车轮、地面积水,整箱包装区人员鞋底、终产品中分离到,两次监测均未从其原辅料中分离出,怀疑是环境中的定植株,在适当的温湿度条件下不断增殖,并通过人员走动、空气流通、运输车车轮转移、灰尘扩散等方式污染了整个加工环境和生产线,最终导致终产品被污染。

本研究了解了本省含乳冷冻饮品生产加工过程中肠杆菌科和单增李斯特菌的分布,并对单增李斯特菌进行了有效溯源,发现了需要重点关注的高风险点(如地面、墙壁、移动设备接触地面的部件、人员鞋底、清洁工具等),对降低肠杆菌科和单增李斯特菌的污染,制定生产加工过程的卫生控制措施,确保终产品的安全具有重要意义。冷冻饮品的生产环境闷热、潮湿适合微生物繁殖,加之冷冻饮品杀菌工艺为前杀菌,既对原辅料进行巴氏杀菌后,中间产品、终产品再没有杀菌工艺,因此对冷冻饮品生产加工过程的微生物控制就极为重要。企业应制定良好的生产规范和质量控制体系并严格执行;提高实验室检验能力,完善对环境、原辅料、产品的监控措施,发现隐患及时排除^[12];同时还要注重加强对人员食品安全意识的培养,从源头上控制微生物的污染,以保障冷冻饮品终产品的食用安全。

参考文献

- [1] 李波. 食品检验操作技术规范[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2019:224.
- [2] 李会,全志琴,路立立,等. 洛阳市某冷冻饮品企业含乳冷冻饮品加工过程中单核细胞增生李斯特氏菌污染状况[J]. 河南预防医学杂志,2020,31(1):74-77.
- [3] 孙婷婷,孙岐峰,王伟杰,等. 2016—2018 年辽宁省食品中单增李斯特菌污染情况及毒力基因的检测[J]. 中国微生态学杂志,2020,32(2):156-160.
- [4] 王岚,贾华云,陈帅,等. 冷冻饮品加工过程中单增李斯特菌污染状况分析[J]. 实用预防医学,2017,24(11):1289-1292.
- [5] 陈慧中,杨楠,刘博. 2012—2014 年沈阳市食品中单增李斯特菌污染状况分析[J]. 实用预防医学,2016,23(10):1216-1218.
- [6] European Union. Commission regulation (EC) No.1441/2007 amending regulation (EC) No.2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs [EB/OL]. (2019-06-20) [2020-09-08]. <https://www.renrendoc.com/p-20062545.html>.
- [7] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验总则:GB 4789.1-2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016:2.
- [8] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 肠杆菌科检验:GB 4789.41-2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016:2-5.
- [9] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 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:GB 4789.30-2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016:2-4.
- [10] 徐进,庞璐. 食品安全微生物学指示菌国内外标准应用的比较分析[J]. 中国食品卫生杂志,2011,23(5):472-477.
- [11] 廖振宇,刘萍,曹东丽,等. 冷冻饮品微生物污染状况分析[J]. 食品研究与开发,2018,39(12):205-208.
- [12] 廖振宇,曹东丽,甄鹏,等. 冷冻饮品质量安全风险分析及防控措施[J]. 食品研究与开发,2018,39(13):210-214.

收稿日期:2020-09-10