

速冻食品中李斯特菌污染状况研究

徐建辉, 屠俊玮*, 邱瑾芝

(象山县食品检验检测中心, 象山 315700)

摘要: **目的** 研究速冻食品中李斯特菌污染状况与检测方法。**方法** 于象山县各大超市及农贸市场内采购速冻肉类、海鲜与禽类、速冻面食类以及速冻蔬菜, 通过制备改良李氏增菌液, 使用该增菌液对采集的7类共1300个速冻食品样品增菌, 分离MMA平板, 根据国家标准检测李斯特菌污染情况; 开展鞭毛H抗原血清凝集试验和菌体O抗原血清凝集试验, 对照李斯特菌血清型判定标准鉴定试验样品血清型。**结果** 李斯特菌检测结果的阳性率达到7.46%; 其他李斯特菌检测结果显示速冻奶制品阳性率最高, 为38.46%, 出现2种以上李斯特菌污染; 检测出较强致病4b血清型, 严重污染隐患较大。**结论** 速冻食品中李斯特菌污染分析结果具有统计学意义, 需要以此不断优化检测范围和检测流程。

关键词: 速冻食品; 李斯特菌; 污染状况; 血清型

Study on *Listeria* contamination in quick-frozen food

XU Jian-Hui, TU Jun-Wei*, QIU Jin-Zhi

(Food Inspection and Testing Center of Xiangshan County, Xiangshan 315700, China)

ABSTRACT: Objective To study the contamination of *Listeria* in quick-frozen food and the detection method. **Methods** Quick-frozen meat, seafood and poultry, quick-frozen pasta and quick-frozen vegetables were purchased from all supermarkets and farmers' markets in Xiangshan county. Through preparation of improved *Listeria albicans* solution, the solution was used to increase bacteria in 1300 quick-frozen food samples of 7 categories, isolated MMA plate and detected the contamination of *Listeria* according to national standards. Serum agglutination test of flagellum H antigen and *Listeria albicans* O antigen serum agglutination test were carried out to identify the serum type of the samples by comparing with the serum type identification standard of *Listeria albicans*. **Results** The positive rate of *Listeria* was 7.46%, the positive rate of other *Listeria* showed that the highest positive rate of frozen dairy products, 38.46%, and there were more than 2 kinds of *Listeria* contamination. Serotype 4b was detected, which was a serious risk of contamination. **Conclusion** The results of *Listeria* contamination analysis in quick-frozen foods are statistically significant and need to optimize the detection range and process.

KEY WORDS: quick-frozen food; *Listeria*; contamination status; serotype

0 引言

李斯特菌又被称为单核球增多性李斯特菌或者李氏菌, 是一种较常见的食源性致病菌, 与大肠杆菌类似, 在

自然环境中广泛存在, 会污染如海鲜、肉制品、奶制品、蔬菜等食物, 导致食物出现污染变质。李斯特菌不会受到生长环境的限制, 即使在高盐、低温、高酸性的环境中仍旧能够正常生长。在欧美许多国家, 由李斯特菌引起的食

*通信作者: 屠俊玮, 助理工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: 363066795@qq.com

*Corresponding author: TU Jun-Wei, Assistant Engineer, Food Inspection and Testing Center of Xiangshan County, No.828 Danhe Dong Lu, Xiangshan County, Ningbo City, Zhejiang Province 315700, China. E-mail: 363066795@qq.com

物中毒已多次发生。如果人们误食用受李斯特菌污染的食物, 通常会在 8~24 h 内出现腹泻、呕吐、恶心等症状^[1], 如果病情较重, 会出现心内膜炎、败血症或脑膜炎, 而孕妇误食李斯特菌污染的食品会导致流产^[2-4]。李斯特菌的危险性引起了各国相关工作者极大关注^[5-6]。李斯特菌是一种寄生菌, 能够在上皮细胞、巨噬细胞、肝细胞、内皮细胞等部位寄生, 而且该菌引起的疾病属于人畜共患疾病, 一旦感染, 死亡概率在 30%~70%之间^[7]。野生动物、家庭饲养的牲畜或宠物以及健康人群都有可能携带李斯特菌。

据美国食品药品监督管理局介绍, 李斯特菌是美国引起食源性疾病最常见的 4 种致病菌之一; 世界卫生组织在 20 世纪 90 年代就将李斯特菌规定为食物源 4 大直接致病菌之一, 污染食品的可能性接近 19.5%。近年来, 我国检测机构多次从欧洲、美洲等国家进口的速冻食品中检测出携带李斯特菌的速冻肉制品^[8]。20 世纪末期, 我国云南某地曾经 2 次由于李斯特菌造成家畜大范围死亡, 牲畜死亡率高达 100%, 人群发病率也接近 10%^[9]。有研究表明, 加拿大每年大约超过 100 人感染李斯特菌, 其中死亡人数约为 30 人, 进入 21 世纪以后仍旧出现 20 人以上由于感染李斯特菌而死亡的人群^[10-12]。

李斯特菌主要通过污染食品进行传播, 特别是在速冻食品的运输和储存过程中。如果加热和烹调温度不够, 食用速冻食品会使人感染李斯特菌。近 90% 的李斯特菌感染是由李斯特菌污染速冻食品引起的, 即人们食用未加热的速冻肉、鱼、速冻蔬菜、牛奶、冰淇淋等食物, 感染李斯特菌^[13]。李斯特菌具有很强的适应性和繁殖能力, 在低温环境下仍能正常繁殖, 对速冻食品造成很大污染。目前, 我国还没有大面积李斯特菌中毒, 主要是因为具有食用加热速冻食品的习惯。目前, 我国的超市、集贸市场等地抽检结果显示, 销售的速冻食品中约有 10% 被检出李斯特菌, 说明李斯特菌广泛存在于我们的日常生活中。探索一种有效的检测方法是避免李斯特菌感染的有效途径, 因此, 本研究着重分析速冻食品中李斯特菌检测方法, 进行速冻食品中李斯特菌污染状况研究, 为避免李斯特菌感染提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

样品来源为象山县当地各大农贸市场采购的速冻肉类、海鲜与禽类、速冻面食类以及速冻蔬菜。

1.2 仪器与试剂

李氏增菌液(分析纯, 上海如吉生物科技发展有限公司); 吡啶黄(分析纯, 武汉科昊佳生物科技有限公司); 萘

啉酮酸(分析纯, 南京都莱生物技术有限公司); 柠檬酸铁铵水(高纯试剂, 青岛隆川生物科技有限公司); 氯化锂(分析纯, 汉南泰吉化工产品有限公司)。

RGK-80A 恒温培养箱(上海坤诚科学仪器有限公司); BIOBASE 高温灭菌锅(山东博科消毒设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 采样方法

对每份速冻食品实行样品采集, 每份速冻食品样品采集 25 g, 置于灭菌袋中, 标注样品编号及采样日期。

1.3.2 李斯特菌检测方法

(1) 制备改良李氏增菌液

取 100 mL 普通李氏增菌液, 添加 3 g 氯化锂, 混合均匀后每 20 mL 分装在 1 个三角烧瓶中, 在 120 °C 条件下实行高压灭菌操作, 时间设定为 20 min, 高压灭菌结束后, 在每个三角烧瓶中分别加入 0.5 mL 1% 的吡啶黄和 0.4 mL 1% 萘啉酮酸以及 2 mL 5% 的柠檬酸铁铵水溶液, 分别在 10 mL 试管中无菌分装待用。

(2) 样品增菌

在 225 mL 普通增菌液中添加速冻食品样本 25 g, 实行均质处理, 置于恒温培养箱中培养 24 h, 温度设置为 30 °C, 去除后添加 10 mL 改良李氏增菌液开展二次增菌, 仍旧在 30 °C 下置于恒温培养箱中静置 24 h, 取出后如果混合物没有变黑可以继续培养 24 h, 如果仍旧没有发生变化直接判定为李斯特菌阴性; 如果混合物变为黑色可以分离平板。挑选 6 个蓝色或灰蓝色原型小菌落接种选择性离子检测(selected ion monitor, SIM)动力培养基和三糖铁琼脂斜面, 恒温培养箱温度设置为 25 °C 培养 24~48 h, 如果培养结束后 SIM 动力培养基仍旧具有动力, 同时该培养基上出现月牙状或者伞状的生长物, 三糖铁琼脂斜面和底层都产生气体但是不产生酸性物质, 此时能够鉴定检测培养物质。

(3) 李斯特菌检测方法

根据 GB 4789.30—2016《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》检测以上方法获得的实验样品^[14], 挑选培养基上的阳性菌落实行鉴定并且作保存处理。

1.3.3 血清学分型方法

血清学分型阳性菌落, 如果一个样品的菌落具有相同血清型可以记录为同一种血清; 如果血清型不相同需要把全部血清型记录下来。菌体抗原鞭毛 H 抗原与 O 抗原共同决定李斯特菌血清型, 判定标准见表 1。

使用试管凝集法开展鞭毛 H 抗原血清凝集实验, 运用玻片凝集法开展菌体 O 抗原血清凝集实验, 实验结果与表 1 对照, 鉴定血清型。

表 1 血清型判定标准
Table 1 Serotype determination criteria

血清型	H 抗原	O 抗原
7	ABC	XII
4e	ABC	V, VI
4d	ABC	VI, VIII
4c	ABC	VI, VII
4b	ABC	V, VI
4ab	ABC	V, VI, VII, IX, X
4a	ABC	VII, IX
3c	BD	III, IV, XII
3b	ABC	III, IV, XII
3a	AB	II, III, IV
1/2c	BD	I, II, III
1/2b	ABC	I, II, III
1/2a	AB	I, II, III

2 结果与分析

2.1 李斯特菌检测结果

李斯特菌直接引起人类患病, 是李斯特菌污染中最主要的菌株^[15-16]。对 1300 份速冻食品样品实行李斯特菌污染状况检测, 李斯特菌检测结果如表 2 所示。

表 2 李斯特菌污染状况检测结果
Table 2 Detection results of *Listeria* contamination

速冻食品类别	速冻食品名称	样品数量/个	检测结果阳性个数/个	阳性率/%
速冻生肉	猪肉	151	11	7.28
	牛肉	172	11	6.40
	羊肉	189	12	6.35
	鸡肉	193	11	5.70
速冻禽类	鸭肉	91	5	5.49
	鸽肉	95	7	7.37
速冻主食	水饺	73	2	2.74
	米类制品	85	9	5.88
	速冻即食	64	11	17.19
速冻海鲜	鱼类	75	3	4.00
	贝类	52	2	3.85
速冻豆制品	虾类	15	1	6.67
	豆腐	15	0	0.00
速冻蔬菜	蔬菜类	17	1	5.88
速冻零食	冰激凌	13	1	7.69
总数		1300	97	7.46

分析表 2 可知, 在检测的 1300 个速冻食品中, 检测出 97 个样品呈现出李斯特菌阳性, 总体阳性率为 7.46%; 速冻生肉以及速冻禽类李斯特菌阳性率较高, 尤其猪肉的李斯特菌阳性率最高, 速冻豆制品中没有检测出李斯特菌。速冻肉类以及速冻禽类食品李斯特菌检测阳性率最高, 分析原因可能是这些食品在活体阶段污染程度较高, 在屠宰加工过程中也不能保证统一严格卫生管控, 因此检测出李斯特菌的阳性率较高。速冻海鲜类食品中也检测出较高阳性率的李斯特菌, 这主要是由于海鲜类产品一般缺乏检疫消毒等环节, 直接捕捞直接销售, 没有有效的杀菌灭菌环节。速冻冰淇淋的阳性率也较高, 主要是由于冰淇淋属于奶制品, 牛奶蛋白质含量较高极易滋生各类细菌, 李斯特菌耐热性较强, 如果巴氏消毒不彻底会造成李斯特菌增长。速冻水饺和速冻米面类食品由于经过精细加工且有良好的包装, 所以李斯特菌阳性率较低;

速冻蔬菜与速冻即食类食品李斯特菌阳性率分别达到 5.88% 和 17.19%, 国内外均有调查显示, 由于使用生冷带菌蔬菜和即食类食物导致大范围暴发李斯特菌病, 主要原因就是不加热食用速冻食品导致的李斯特菌病。综上所述, 李斯特菌大范围污染速冻食品主要是由于没有经过精细加工和检验检疫的管控, 所以需要关注食品生产过程李斯特菌的污染以及加工过程的二次污染。

2.2 其他李斯特菌检测结果

依据 GB 4789.30—2016 对单增李斯特菌进行分离、纯化及检测, 结合文献^[15], 将 Excel 2010 用于数据输入和排序, 采用 SPSS 23.0 进行统计分析, 在不同样本总数下, 以英诺客李斯特菌样品数、默氏李斯特菌样品数、威尔斯李斯特菌样品数、格氏李斯特菌样品数阳性样品数为污染检测指标, 进行多个样本的配对比较, 采用卡方检验, 分析不同样本中其他李斯特菌株污染情况即阳性检出率, 当 $P < 0.05$ 时, 此类差异具有统计学意义, 结果如表 3 所示。

在表 3 选取的 900 个样品中, 被各种李斯特菌株污染的速冻食品中, 速冻奶制品阳性率最高, 为 38.46%, 其次为速冻主食, 为 10.81%, 速冻海鲜的阳性率最低, 为 1.96%, 具有统计学意义, 且经上文分析可知速冻奶制品最易滋生细菌, 速冻主食中的即食产品也是李斯特菌大量滋生的温床。综上可知, 各监测样品中存在多重污染, 相同样品中可能被 2 种以上李斯特菌污染。

2.3 血清分型监测结果

在 2.1 节中, 共在 1300 个样品中检测出 97 个阳性李斯特菌污染样品, 经分析, 这 97 个样品的 3 株阳性菌落血清型都是相同的, 可以将它们记录为相同血清型, 这 97 个样品的李斯特菌血清分型结果如图 1 所示。

表 3 其他李斯特菌污染情况
Table 3 Other *Listeria* contamination

类别	速冻生肉	速冻主食	速冻海鲜	速冻奶制品
样品总数/个	512	222	153	13
英诺客李斯特菌样品数/个	3	5	2	1
默氏李斯特菌样品数/个	7	2	0	2
威尔斯李斯特菌样品数/个	11	0	1	1
格氏李斯特菌样品数/个	5	17	0	1
阳性样品数/个	26	24	3	5
阳性率/%	5.08	10.81	1.96	38.46

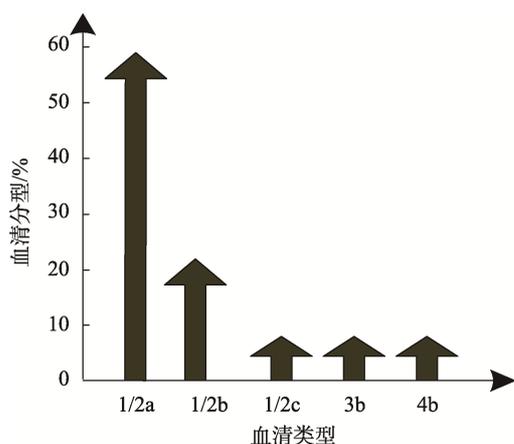


图 1 李斯特菌血清学分型

Fig.1 Serological typing of *Listeria*

通过图 1 可知, 97 株李斯特菌能够划分为 5 种血清型, 分别为 59% 1/2a、22% 1/2b、7.2% 2c、7.2% 3b、7.2% 4b。有研究表明^[17-20], 李斯特菌中 1/2a、1/2b、3a、3b、4b 等血清都是致病菌株, 其中以 4b 血清型致病性最强。本研究中, 各阳性样品中分离出的李斯特菌血清分型均为致病性血清型, 而且检测结果中还包含较强致病性的 4b 血清型, 说明该批样品需要深入检测, 严格控制问题样品的李斯特菌污染问题。

3 结 论

本研究对速冻食品中李斯特菌的污染及检测方法进行了研究, 通过采集速冻食品样品, 检测速冻食品中李斯特菌和其他类型李斯特菌的污染情况, 其创新之处在于本研究将检测分为 3 个部分, 分别是李斯特菌检测结果、其他李斯特菌检测结果和血清分型监测结果, 其中, 李斯特菌检测结果将不同的速冻食品分类, 检测数据的针对性更

强, 为精细加工和检验检疫流程的具体优化提供数据参考; 其他李斯特菌检测结果进行多个样本的配对比较, 分析不同样本中其他李斯特菌株污染情况即阳性检出率, 具有统计学意义; 血清分型监测结果显示, 在阳性菌落血清型中, 大多为致病性血清型, 以此探讨相关样品李斯特菌污染检测深度的问题。

在未来的研究中, 为了更科学地预防食源性李斯特菌中毒, 有必要重点对珠海、渤海等主要海鲜产地的沿海地区进行污染源的识别, 进而优化检测方案, 为该领域的相关研究提供理论参考。

参考文献

- 张鸾, 林晓洁, 王芳芳, 等. 早发型新生儿李斯特菌临床特征和治疗分析[J]. 临床儿科杂志, 2019, 37(3): 165-169.
ZHANG L, LIN XJ, WANG FF, *et al.* Clinical characteristics and treatment of early-onset neonatal *Listeriosis* [J]. *J Clin Pediatr*, 2019, 37(3): 165-169.
- 王斌, 梁明, 陈杰峰, 等. ID-MSPD-UHPLC-MS/MS 检测烘焙食品及原料中的 8 种酚类污染物[J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 261-266, 98.
WANG B, LIANG M, CHEN JF, *et al.* Determination of 8 phenols in bakery food and raw material by isotope dilution-dispersive solid phase extraction couple with UHPLC-MS/MS [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2019, 35(7): 261-266, 98.
- 周振森, 丁梦璇, 梁玉林, 等. 单增李斯特菌 RT-LAMP 快速检测方法的建立[J]. 食品工业, 2019, 40(4): 184-189.
ZHOU ZS, DING MX, LIANG YL, *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by reverse transcriptase-loop-mediated isothermal amplification [J]. *Food Ind*, 2019, 40(4): 184-189.
- 张文敏, 石育娇, 戚成, 等. 恒温实时荧光法快速检测不同样品中的单增李斯特菌[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(5): 44-50.
ZHANG WM, SHI YJ, QI C, *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in different samples by real time fluorescence isothermal amplification [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2019, 38(5): 44-50.
- 江荣花, 杜建萍, 崔旸, 等. 整合低温乳化香肠加工过程交叉污染的单增李斯特菌定量风险评估[J]. 食品科学, 2018, 39(23): 134-141.
JIANG RH, DU JP, CUI Y, *et al.* Quantitative risk assessment of cross-contamination of *Listeria monocytogenes* during low-temperature emulsified sausage processing [J]. *Food Sci*, 2018, 39(23): 134-141.
- 钱凌霄, 康立超, 李红欢, 等. 单增食源性李斯特菌 14 种潜在毒力基因的检测[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(10): 878-882.
QIAN LX, KANG LC, LI HH, *et al.* Detection of 14 potential virulence genes on food-borne *Listeria monocytogenes* [J]. *Chin J Zoonoses*, 2018, 34(10): 878-882.
- 沈晓盛, 蔡友琼. 鲜活贝类水产品中单核细胞增生李斯特菌的污染状况检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(1): 85-86.
SHEN XS, CAI YQ. Detection of *Listeria monocytogenes* in fresh shellfish aquatic products [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2005, 15(1): 85-86.
- 吴玲玲, 李艳芬, 炊慧霞, 等. 河南省学生餐食源性致病菌污染状况调查[J]. 中国学校卫生, 2018, 39(1): 54-56.
WU LL, LI YF, CHUI HX, *et al.* Investigation on food-borne pathogens of

- 862 student meal samples in Henan province [J]. *Chin J School Health*, 2018, 39(1): 54–56.
- [9] 张引成. 单增李斯特菌在鲜切结球莴苣中生长和抑菌预测模型的建立 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
ZHANG YC. Prediction model of growth and bacteriostasis of *Listeria monocytogenes* in fresh cut lettuce [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [10] KICH JD, SOUZA AIA, MONTES JL, *et al.* Investigation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pig carcasses in southern Brazil [J]. *Pesquisa Vet Brasil*, 2020, 40(10): 781–790.
- [11] 孙静娟, 邱景璇, 曾海娟, 等. 李斯特菌 CdaA 的抗原表位分析及抗体的制备 [J]. *生物技术通报*, 2018, 34(5): 163–171.
SUN JJ, QIU JX, ZENG HJ, *et al.* Antigenic epitope analysis and preparation of antibody of *Listeria monocytogenes* CdaA [J]. *Biotechnol Bull*, 2018, 34(5): 163–171.
- [12] 牛犇, 穆丽丽, 张昭寰, 等. 低温条件下即食虾中单增李斯特菌与副溶血性弧菌共存分子预测模型的建立 [J]. *食品科学*, 2018, 39(23): 1–6.
NIU B, MU LL, ZHANG ZH, *et al.* Development of predictive models based on qPCR for the growth of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* coexisting on cooked shrimps stored at low temperatures [J]. *Food Sci*, 2018, 39(23): 1–6.
- [13] 朱雅慧, 王佳莹, 朱洪日, 等. 单增李斯特菌在模拟人体胃环境中的耐受性 [J]. *中国食品学报*, 2018, 18(12): 39–45.
ZHU YH, WANG JY, ZHU HR, *et al.* Tolerance of *Listeria monocytogenes* to the simulating human stomach [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2018, 18(12): 39–45.
- [14] 柴云美, 王高, 王森, 等. 云南淡水鱼中单增李斯特氏菌污染状况及耐药性分析 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(4): 1468–1474.
CHAI YM, WANG G, WANG M, *et al.* Pollution and drug resistance analysis of *Listeria monocytogenes* in freshwater fish in Yunnan [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(4): 1468–1474.
- [15] 范张玲, 肖盟, 王怡倩, 等. 李斯特菌感染病例的临床及病原学分析 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2019, 19(5): 524–529.
FAN ZL, XIAO M, WANG YQ, *et al.* Clinical and pathogenic analysis of *Listeriosis* patients [J]. *Chin J Infection Chemoth*, 2019, 19(5): 524–529.
- [16] 孙澜, 邹伟, 刘晓华. 葡萄球菌凝集试验方法的评价与对比研究 [J]. *中国医药指南*, 2019, 17(21): 42–43.
SUN L, ZOU W, LIU XH. Evaluation and comparative study of staphylococcal agglutination test methods [J]. *Guide China Med*, 2019, 17(21): 42–43.
- [17] 闫鹤, 王彬, 师宝忠, 等. 单增李斯特菌血清型、耐药性研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2010, 35(10): 774–778.
YAN H, WANG B, SHI BZ, *et al.* Study on serotype and antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* [J]. *Chin J Antibiot*, 2010, 35(10): 774–778.
- [18] MEAD GC, HUDSON WR, ARIFFIN R. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on irradiated poultry carcasses [J]. *Lancet*, 2019, 335(8696): 1036.
- [19] KEET R, RIP D. *Listeria monocytogenes* isolates from western cape, south Africa exhibit resistance to multiple antibiotics and contradicts certain global resistance patterns [J]. *AIMS Microbiol*, 2021, 7(1): 40–58.
- [20] ELHAJJAJI S, GÉRARD A, DE LAUBIER J, *et al.* Study of the bacterial profile of raw milk butter, made during a challenge test with *Listeria monocytogenes*, depending on cream maturation temperature [J]. *Food Microbiol*, 2021, 98: 103778.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



徐建辉, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。

E-mail: 363066795@qq.com



屠俊玮, 助理工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。

E-mail: 363066795@qq.com