

云南省牛乳中单核细胞增生李斯特氏菌的分布特征、耐药性及毒力研究

苏荣镇¹, 范 琨¹, 邹颜秋硕², 任 翔², 汤晓召², 夏继蓉¹, 李凌飞^{1*}, 黄艾祥^{1*}

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 昆明 650201; 2. 云南省疾病预防控制中心, 昆明 650022)

摘 要: 目的 分析云南省牛乳中单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的分布特征、耐药性及毒力现状。**方法** 采集云南省主要奶产区牛乳样本, 按照 GB 4789.30—2016 方法分离单核细胞增生李斯特氏菌疑似菌株, 采用飞行时间质谱技术结合 16S rDNA 测序对疑似菌株进行鉴定; 采用微量肉汤稀释法对分离菌株进行抗生素药敏实验; 通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术检测单核细胞增生李斯特氏菌中 7 种毒力基因的存在状况。**结果** 158 份样品共有 4 份检出单核细胞增生李斯特氏菌, 检出率为 2.53%; 共分离获得 8 株菌。其中, 生鲜乳中检出率为 3.36%, 巴氏杀菌乳中未检出。在生鲜乳中, 荷兰牛乳、水牛乳、牦牛乳检出率分别为 2.13%、0.00%和 20.00%; 标准化牛场、奶牛合作社和个体户的检出率分别为 2.50%、1.51%和 15.38%; 手工挤奶和机械挤奶检出率为 11.76%和 1.96%。药敏实验结果显示 8 株菌均对青霉素耐药, 对四环素、复方新诺明、红霉素耐药率分别为 87.50%、75.00%和 50.00%; 多重耐药率为 75.00%; 但所有菌株对氨苄西林均敏感。8 株菌对 7 种毒力基因的携带程度从 12.50%~75.00%不等。**结论** 云南省牛乳尤其其生鲜乳中存在一定程度的单核细胞增生李斯特氏菌污染, 且该菌具有普遍耐药性并携带一定程度的毒力基因, 对消费者的安全具有潜在风险, 应加强卫生监督管理。

关键词: 牛乳; 单核细胞增生李斯特氏菌; 耐药性; 毒力基因

Distribution characteristics, drug resistance and virulence of *Listeria monocytogenes* in milk in Yunnan province

SU Rong-Zhen¹, FAN Kun¹, ZOU Yan-Qiu-Shuo², REN Xiang², TANG Xiao-Zhao², XIA Ji-Rong¹,
LI Ling-Fei^{1*}, HUANG Ai-Xiang^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the distribution characteristics, drug resistance and virulence of *Listeria monocytogenes* in the milk of Yunnan province. **Methods** Collected milk samples from major milk producing areas

基金项目: 云南省重点研发计划项目(2018BC006)、云南省教育厅科学研究基金项目(2021 年度研究生类项目)

Fund: Supported by the Key Research and Development Plan of Yunnan Province (2018BC006), and the Scientific Research Project of Education Department of Yunnan Province (Postgraduate Project in 2021)

***通信作者:** 李凌飞, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: lingfeili@163.com

黄艾祥, 博士, 教授, 主要研究方向为食物新资源开发与乳品科学。E-mail: aixianghuang@126.com

***Corresponding author:** LI Ling-Fei, Ph.D, Associate Professor, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China. E-mail: lingfeili@163.com

HUANG Ai-Xiang, Ph.D, Professor, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China. E-mail: aixianghuang@126.com

in Yunnan province, and isolated suspected *Listeria monocytogenes* strains according to GB 4789.30—2016 method, and time-of-flight mass spectrometry technology combined with 16S rDNA sequencing was used to identify the suspected strains. Antibiotic susceptibility test was performed by micro broth dilution method on the isolated strains, and polymerase chain reaction (PCR) technology was used to detect the existence of 7 virulence genes in *Listeria monocytogenes*. **Results** *Listeria monocytogenes* were detected in four of the 158 samples. The detection rate was 2.53%; eight strains were isolated. Among them, the detection rate in raw milk was 3.36%, and it was not detected in pasteurized milk. In raw milk, the detection rates of Holstein milk, buffalo milk, and yak milk were 2.13%, 0.00% and 20.00%, respectively; the detection rates of standardized cattle farms, dairy cooperatives, and self-employed were 2.50%, 1.51% and 15.38%, the detection rates of manual milking and mechanical milking were 11.76% and 1.96%. The drug sensitivity results showed that eight strains were resistant to penicillin. Their resistance rates to tetracycline, compound trimethoprim and erythromycin were 87.50%, 75.00%, and 50.00%, respectively, and their multi-drug resistance rate was 75.00%. But all strains were sensitive to ampicillin. The seven virulence genes were distributed in different degrees in eight strains, ranging from 12.50% to 75.00%. **Conclusion** There is a certain degree of *L. monocytogenes* contamination in milk in Yunnan province, especially raw milk. Moreover, these *L. monocytogenes* strains from milk have universal drug resistance and carry a certain degree of virulence genes, which have potential risks to the safety of consumers. Therefore, the health supervision and management of milk should be strengthened.

KEY WORDS: milk; *Listeria monocytogenes*; drug resistance; virulence genes

0 引言

近年来,随着食品安全事故在世界范围内的不断出现,食品安全问题已经成为备受关注的世界性问题。有关资料显示^[1-2],有害微生物污染食品一直是影响我国食品安全的首要危害和决定因素。单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*),简称单增李斯特菌,是影响公共卫生安全的重要食源性病原菌之一。其广泛存在于自然界中,是一种极易被动物食用后,以口腔、粪便作为传播载体感染人类的细菌^[3]。单增李斯特菌具有较强的耐受性,在高渗透压、低温等不良条件下仍可生长繁殖。相对于其他食源性致病菌,单增李斯特菌的感染率相对较低。感染单增李斯特菌通常是由于食用了受污染的食品,很少存在人与人之间相互传播的情况。但一经感染,它能够突破被感染者的肠道、血脑和血胎屏障,引发肠胃炎、败血症、脑膜炎等疾病,还可能造成孕妇流产、死胎。在免疫能力较低的人群中,发病者死亡率高达20%~30%^[4]。单增李斯特菌也因此被世界卫生组织定义为全球四大食源性病原菌之一^[5-6]。

单增李斯特菌作为一种治疗难度较大的胞内寄生菌,在感染过程中有多种毒力基因参与作用,其毒力水平取决于其分泌和调控毒力因子的能力^[7]。目前,临床治疗细菌感染常用的方法为抗生素治疗,但由于抗生素的滥用以及缺乏明确的制度管理,导致耐药菌株出现。相关研究^[8-10]表明,食源性单增李斯特菌对常见抗生素的耐药水平普遍偏高,几乎半数以上的菌株具有多重耐药性。单增李斯特

菌日趋严重的耐药现象是导致李斯特氏菌病治疗难度不断增大的原因之一。

牛乳作为一种古老的天然饮品,有着“白色血液”的美誉。牛乳来源于奶牛,牦牛,水牛等。其中富含钙、锌、镁等微量元素和多种优质蛋白,对营养不良、身体虚弱等症状具有良好疗效,但也因其丰富的营养成分和低温储藏条件,为单增李斯特菌的生长繁殖提供了良好的条件^[11-13]。据国外相关报道,乳源单增李斯特菌是引起李斯特氏菌疾病爆发的主要原因之一^[14]。在国外,单增李斯特菌已成为研究热点;但在国内,尚未见乳品中单增李斯特菌分布特征、耐药性及毒力基因相关研究报道。本研究旨在调查云南省主要奶产区牛乳中单增李斯特菌的分布特征、耐药性和毒力水平,以期为云南省牛乳中食品安全风险评估提供基础数据,同时为有效预防和控制牛乳中食源性疾病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 培养基

LB1、LB2 李氏增菌肉汤基础、李斯特氏菌显色培养基、PALCAM 琼脂、5%~8%羊血琼脂(广东环凯微生物科技有限公司)。

1.1.2 试剂盒及药敏板

单增李斯特菌生化试剂盒(广东环凯微生物科技有限公司);细菌DNA提取试剂盒、DL2000 DNA Marker、PCR Master mix(日本 TaKaRa 公司);革兰阳性需氧菌药敏检测

板: 氨苄西林(ampicillin, AMP)、青霉素(penicillin, PEN)、四环素(tetracycline, TET)、复方新诺明(trimethoprim-sulfamethoxazole, SXT)、红霉素(erythromycin, ERY)(上海星佰生物技术有限公司)。

1.1.3 仪器

Autoflex Speed 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪(德国布鲁克公司); 全自动药敏试验菌液接种仪、ABI 2720 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司); H1650-W/H1650W 台式微量高速离心机(湖南湘仪有限公司); JY300C 电泳仪、JY04S-3C 凝胶成像仪(北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.1.4 质控菌株

粪肠球菌 ATCC 29212、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 由云南省疾病预防控制中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 样品采集

在云南省主要奶产区昆明、大理、保山、迪庆、红河、玉溪、曲靖和德宏的标准化牛场、奶牛合作社、个体户以及市售门店共采集 158 份牛乳样品(每份样品≥500 mL), 按照无菌采样操作步骤, 将牛乳放置于无菌采样袋中, 于 4℃冷藏条件下于 24~48 h 内送至实验室进行检测。

1.2.2 单增李斯特菌的分离鉴定

(1)菌株分离

参照 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》^[15]的操作程序对单增李斯特菌可疑菌株进行分离。

(2)基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测

将单增李斯特菌接种于胰蛋白酶大豆琼脂(TSA-YE)平板进行培养(37℃, 18~24 h), 挑取单个菌落, 涂布于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(stroma-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)靶板上, 在靶孔中加基质(1 μL/孔), 待基质晾干后, 将靶板放回仪器对菌株进行鉴定。

(3)16S rDNA 测序确定菌种

16S rDNA 扩增引物为 27F(5'-AGAGTTTGATC CTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-AGAGTTTGATC CTGGC TCAG-3'); PCR 反应体系(50 μL): dNTPs MIX 25 μL, ddH₂O 22 μL, 正反向引物各 2 μL(10 pmol/μL), DNA 模板 1 μL。PCR 反应条件为: 95℃预变性 5 min, (95℃ 35 s, 55℃ 30 s, 72℃ 100 s)×35, 72℃, 4.5 min。对扩增产物进行测序, DNA 序列与美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)核酸数据库进行对比分析。

1.2.3 耐药性分析

按照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的肉汤微量稀释法, 按照《革兰阳性需氧菌药敏检测板》^[16]对治疗单增李斯特菌常用抗生素进行耐药性测定。

1.2.4 毒力基因检测

(1)引物合成

单增李斯特菌的 7 个常见毒力基因扩增引物均由昆明海魂科技有限公司合成。基因引物名称、引物序列、扩增片段大小等见表 1。

表 1 毒力基因引物序列、扩增片段大小
Table 1 Primer sequences of virulence genes and the size of amplified products

目的基因		PCR 引物序列(5'→3')	扩增片段大小(bp)	参考文献
fbp	F	ATACTTCTTCGACCGGCTTAAC	198	[17]
	R	TCGAATAATAGGCKGCAATC		
ami	F	TATGCCTATTATGCTGCGTACC	115	[17]
	R	CGCCTAAATAACGTGTAAGTGC		
PrfA	F	CTCAAGCAGAAGAATTCA	695	[18]
	R	TCCCCAAGTAGCAGGACA		
iap	F	TTTGCTAAAGCGGGTATCTC	205	[18]
	R	AGCCGTGGATGTTATCGTAT		
Hly	F	ACGCAGTAAATACATTAGTG	372	[18]
	R	AATAAACTTGACGGCCATAC		
plcA	F	AAATTCGGCATGCAGTTCGG	185	[19]
	R	GCAGCATACTGACGAGGTGT		
plcB	F	AGTGTTCTAGTCTTTCCGG	793	[18]
	R	ACCTGCCAAAGTTTGCTGT		

(2)PCR 扩增体系及条件

PCR 扩增体系: 1×PCR mix 45 μL, 正向引物 (10 pmol/μL)与反向引物(10 pmol/μL)各 2 μL, DNA 模板 1 μL, 总体积 50 μL。

PCR 反应条件: (1)Hly: 95 °C 5 min; 94 °C 50 s, 50 °C 60 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。(2)PrfA、iap: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 53 °C 60 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。(3)fbp: 95 °C 5 min; 94 °C 50 s, 54 °C 60 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。(4)plcA、plcB、ami: 94 °C 5 min; 95 °C 40 s, 56 °C 60 s; 72 °C 20 s, 35 个循环, 72 °C 10 min。

1.3 数据分析

使用 Excel 2010 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定结果

分离得到可疑菌株后, 结合生理生化特征及 MALDI-TOF MS 检测结果进行初步鉴定, 再将其 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库比对后, 最终结果表明分离到的 8 株菌均为单核细胞增生李斯特氏菌, 见表 2。

2.2 乳源单增李斯特菌的分布特征

158 份牛乳样品中, 共 4 份样品检出单增李斯特菌, 总检出率为 2.53%。每份阳性样品随机选择 2 株可疑菌, 共获得 8 株单增李斯特菌。

2.2.1 巴氏杀菌乳和生鲜乳中单增李斯特菌检出情况

巴氏杀菌乳和生鲜乳中单增李斯特菌的检出情况见

表 3。生鲜乳中单增李斯特菌检出率为 3.36%, 巴氏杀菌乳未检出。单增李斯特菌广泛存在于自然界中, 具有高耐受性和高致死率等特点, 是污染牛乳等冷藏食品的最主要食源性致病菌之一。本研究表明生鲜乳存在一定程度的单增李斯特菌污染, 而经巴氏杀菌处理后基本消除了这种安全隐患。因此, 在以生鲜乳作为原材料加以利用时, 应进行杀菌处理, 努力权衡好保留牛乳营养成分和杀菌之间的平衡点^[20], 确保食用牛乳的食用安全性。

2.2.2 不同奶牛品种的牛乳中单增李斯特菌检出情况

不同奶牛品种的牛乳中单增李斯特菌的检出情况见表 4。结果显示, 牦牛乳检出率最高(20%), 其次是荷斯坦牛乳(2.13%), 水牛乳中未检出。本研究所检测的牦牛乳样品购于农贸市场或是个体售卖的生鲜乳, 而荷斯坦牛乳和水牛乳样品多数来自标准化农场、奶牛合作社等规范养殖场。个体养殖奶牛的养殖环境相对简陋、挤奶方式落后, 这可能是导致牦牛乳中单增李斯特菌检出率较高的原因。

2.2.3 不同养殖方式的牛乳中单增李斯特菌检出情况

不同养殖方式的牛乳中单增李斯特菌检出情况见表 5。结果显示, 个体养殖户中检出率最高(15.38%), 其次是标准化牛场(2.50%), 奶牛合作社检出率最低(1.51%)。养殖环境的最主要区别是在于养殖条件、养殖方法的差异。标准化牛场和奶牛合作社具有较科学、标准化的饲养管理水平、先进的挤奶设备以及合理的养殖环境规划; 而个体户养殖户养殖条件相对简陋、卫生环境状况较差, 缺乏基本的疾病防控及科学治疗等相关知识, 导致牛乳容易受到细菌污染。因此, 我们应该规范奶牛养殖技术和环境, 从源头把控好生鲜乳的质量。

表 2 单核细胞增生李斯特氏菌鉴定结果
Table 2 Identification results of *L. monocytogenes*

菌株编号	SIM 动力培养基	鼠李糖	木糖	麦芽糖	MR-VP	甘露醇	七叶苷	溶血实验	MALDI- TOF MS	16S rDNA 比对结果
YNND-KM-2019-034-1	伞状	+	-	+	+/+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> 100.00%
YNND-KM-2019-034-2	伞状	+	-	+	+/+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> 100.00%
YNND-DQ-2019-065-1	伞状	+	-	+	+/+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> 100.00%
YNND-DQ-2019-065-2	伞状	+	-	+	+/+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> 99.72%
YNND-DQ-2019-066-1	伞状	+	-	+	+/+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> 100.00%
YNND-DQ-2019-066-2	伞状	+	-	+	+/+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> 100.00%
YNND-DL-2020-146-1	伞状	+	-	+	+/+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> 100.00%
YNND-DL-2020-146-2	伞状	+	-	+	+/+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> 100.00%

注: +阳性; -阴性。

表 3 巴氏杀菌乳和生鲜乳中单增李斯特菌污染情况
Table 3 Contamination of *L. monocytogenes* in pasteurized milk and raw milk

牛乳类别	样品数	单增李斯特菌	
		检出数/份	检出率/%
生鲜乳	119	4	3.36
巴氏杀菌乳	39	0	0.00

表 4 不同奶牛品种的牛乳中单增李斯特菌污染状况
Table 4 Contamination status of *L. monocytogenes* in the milk of different cow breeds

牛乳种类	样品数/份	单核细胞增生李斯特氏菌	
		检出数/份	检出率/%
荷斯坦牛乳	94	2	2.13
水牛乳	15	0	0.00
牦牛乳	10	2	20.00

表 5 不同养殖方式的牛乳中单增李斯特菌污染状况
Table 5 Pollution status of *L. monocytogenes* in the milk of different breeding methods

养殖方式	样品数/份	单增李斯特菌	
		检出数/份	检出率/%
标准化牛场	40	1	2.50
奶牛合作社	66	1	1.51
个体户	13	2	15.38

2.2.4 不同挤奶方式的牛乳中单增李斯特菌检出情况

不同挤奶方式的牛乳中单增李斯特菌检出情况见表 6。手工挤奶和机械挤奶的牛乳中单增李斯特菌检出率分别为 11.76%和 1.96%。表明手工挤奶相对于机械挤奶具有更高的单增李斯特菌污染风险。机械挤奶是一种相对规范和现代化取奶方式,具有节省人力、效率高、受污染机率小等优点。而手工挤奶在挤奶过程中,原料乳在环境中暴露时间较长,增大了与细菌接触的机率。因此,我们应该规范挤奶操作程序,缩短原料乳在环境中暴露的时间,保证操作人员的卫生状况,定期对挤奶器具进行清洁,严格对生鲜乳的生产过程进行质量监控,尽量减少或杜绝各个取奶环节中牛乳污染情况的发生。

表 6 不同挤奶方式的牛乳中单增李斯特菌污染状况
Table 6 Contamination status of *L. monocytogenes* in milk collected by different milking methods

挤奶方式	样品量/份	检出数/份	检出率/%
手工挤奶	17	2	11.76
机械挤奶	102	2	1.96

2.2.5 云南不同地区牛乳中单增李斯特菌检出情况

云南省不同地区单增李斯特菌的检出状况如表 7 所示。迪庆的检出率最高(20%),其次为大理(1.92%)和昆明(1.85%),其余地方未检出。本研究在迪庆所采集的牛乳样品均为农民自家养殖的牦牛生鲜乳,相对于其他地区的牛乳样品而言,缺乏科学的养殖规范和良好养殖环境,这可能是导致迪庆地区检出率偏高的原因。建议在以生鲜乳作为原料加工食用时,应充分加热灭菌后再食用。

表 7 云南省不同地区牛乳中单核细胞增生李斯特氏菌污染情况
Table 7 Contamination of *L. monocytogenes* in milk from different areas of Yunnan province

地点	样品数	单核细胞增生李斯特氏菌	
		检出数/份	检出率/%
昆明	54	1	1.85
大理	52	1	1.92
红河	17	0	0.00
曲靖	9	0	0.00
迪庆	10	2	20.00
德宏	8	0	0.00
保山	7	0	0.00
玉溪	1	0	0.00

2.3 乳源单增李斯特菌耐药情况分析

2.3.1 药物敏感实验结果

8 株单增李斯特菌对 5 种抗生素的耐药情况见表 8。结果显示,8 株乳源单增李斯特菌对不同的抗生素表现出不同程度的耐药情况。所有菌株对青霉素(PEN)、四环素(TET)、复方新诺明(SXT)和红霉素(ERY)的耐药率分别为 100%、87.5%、75%和 50%;乳源单增李斯特菌耐药菌株的产生可能与错误、过量使用抗生素预防和治疗奶牛疾病有关。据报道^[21],青霉素是牛场养殖过程中临床治疗使用的最常见抗生素。本研究结果显示,所有菌株对青霉素耐药,这与前人的研究结果基本一致^[22]。本研究中,单增李斯特菌所有菌株对氨苄西林敏感,表明氨苄西林通常不被考虑或很少用于奶牛疾病的治疗。因此,氨苄西林可能是今后治疗单增李斯特菌感染的有效方法之一,在科学给药的前提下可作为防控单增李斯特菌感染的抗生素。

2.3.2 单增李斯特菌的耐药谱

如表 9 所示,8 株单增李斯特菌共表现出 4 种耐药谱,其中 1 株具有单一耐药性,占菌株总数的 12.5%;1 株具有双重耐药性,占 12.5%。其余为多重耐药菌株,占 75%。多重耐药菌株又分三重耐药和四重耐药 2 种耐药谱,其中,四重耐药菌株占比最高(50%),为优势耐药谱。从耐药谱来看,乳源单增李斯特菌对 PEN 和 TET 具有较强的耐药性。

本研究与国外研究结果一致^[10,14], 均表明乳源单增李斯特菌对 PEN 与 TET 的耐药率普遍较高。尤其是最早发现的抗生素青霉素, 由于长期不加节制的使用, 几乎所有单增李斯特菌菌株对青霉素均耐药^[23]。因此在饲养奶牛的用药过程中, 应该注意给药方式和时间, 避免使用高耐药水平的抗生素, 尽量减少菌株耐药性的产生。

表 8 8 株乳源单增李斯特菌对 5 种抗生素的耐药情况
Table 8 Resistance status of eight *L. monocytogenes* strains from milk to five antibiotics

抗生素/耐药性	耐药(耐药率)	中度耐药 (中度耐药率)	敏感(敏感率)
氨苄西林	0 (0)	0 (0)	8 (100%)
青霉素	8 (100%)	0 (0)	0 (0)
四环素	7 (87.5%)	0 (0)	1 (12.5%)
复方新诺明	6 (75%)	0 (0)	2 (25%)
红霉素	4 (50%)	0 (0)	4 (50%)

表 9 乳源单增李斯特菌的耐药谱
Table 9 Resistance spectrums of *L. monocytogenes* from milk

耐药状况(耐药谱)	耐药菌株数/株	所占比例/%
PEN	1	12.5
PEN+TET	1	12.5
PEN+TET+SXT	2	25
PEN+TET+SXT+ERY	4	50

2.4 乳源单增李斯特菌的毒力基因检测

8 株乳源单增李斯特菌中 7 个毒力基因的检出情况见

表 10。结果显示, 在 8 株菌中, prfA 基因检出率为 75%; plcA 和 ami 基因检出率均为 62.5%; iap 和 fbp 基因检出率均为 50%; hly 基因检出率为 25%; plcB 基因检出率最低, 仅为 12.5%。据相关研究表明^[7,24], fbp、hly、plcA、plcB 是具有侵入、感染、胞内传染相关作用的毒力基因; iap、aim、prfA 则是关于黏附、调控的毒力基因。本研究结果显示, 虽然 7 个毒力基因的检出率参差不齐, 但总体来说, hly、plcA、plcB、fbp 的检出率低于 iap、aim、prfA, 表明乳源单增李斯特菌附着于食物表面的情况居多, 不易侵入到食物中造成增殖。此外, 本研究结果还表明, 不同地区、不同养殖方式分离获得的单增李斯特菌中存在的毒力基因呈不规则分布, 没有明显的区域性。可见, 乳源单增李斯特菌毒力基因的分布与来源具有较低的相关性。

3 结 论

云南省主要产奶区的单增李斯特菌污染水平较低, 158 份样品中仅 4 份样品检出该菌, 检出率为 2.53%, 且巴氏杀菌乳均未检出, 表明云南省牛乳尤其生鲜乳中存在一定程度的单增李斯特菌污染。药敏实验结果表明, 所有菌株均对青霉素耐药, 75% 的菌株表现出多重耐药性。8 株菌携带不同程度的毒力基因, 对消费者的安全具有潜在风险。因此, 我们应该重视牛乳从养殖、加工、运输到食用各环节的安全性, 确保养殖、加工环境和操作人员的卫生状况, 依靠良好的卫生规范, 从源头阻断单增李斯特菌的传播; 此外, 应把控好在奶牛养殖过程中抗生素的选择、用量的控制以及给药方式, 减少耐药菌株的产生; 在以生奶做为原材料加工时, 应充分加热杀菌后再食用; 建议有关部门加强对牛乳的监管力度, 明确和完善食品中微生物监测职能和监管机制, 及时向大众提供有效、权威的食品安全信息, 促进云南省奶业的健康发展。

表 10 8 株乳源单增李斯特菌中 7 个毒力基因的存在状况
Table 10 Existence status of seven virulence genes in eight strains of *L. monocytogenes* from milk

编号/来源	hly	prfA	iap	fbp	plcA	plcB	ami
NDKM-BR-034-1(昆明)	+	+	+	-	+	-	+
NDKM-BR-034-2(昆明)	+	+	+	-	+	+	+
NDDQ-BR-065-1(香格里拉)	-	+	+	+	+	-	+
NDNQ-BR-065-2(香格里拉)	-	-	-	+	-	-	-
NDDQ-BR-066-1(香格里拉)	-	+	-	+	-	-	-
NDDQ-BR-066-2(香格里拉)	-	+	-	+	-	-	-
NDDL-BR-146-1(大理)	-	+	+	-	+	-	+
NDDL-BR-146-2(大理)	-	-	-	-	+	-	+
检出率/%	25	75	50	50	62.5	12.5	62.5

参考文献

- [1] 卢葛锦. 隐丹参酮对单增李斯特菌感染的保护作用及机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- LU GJ. The protective effect and mechanism of cryptotanshinone on *Listeria monocytogenes* infection [D]. Changchun: Jilin University, 2020.
- [2] 苏丹萍, 吴云凤. 食源性致病菌风险评估研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(18): 6511–6517.
- SU DP, WU YF. Research progress in risk assessment of food-borne pathogens [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(18): 6511–6517.
- [3] 王伟杰. 2017~2018年辽宁省市售食品中常见食源性致病微生物污染情况及其趋势分析[D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- WANG WJ. Contamination and trend analysis of common food-borne pathogenic microorganisms in foods sold in Liaoning Province from 2017 to 2018 [D]. Changchun: Jilin University, 2020.
- [4] 余琪, 吴忠红, 谭慧林. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检验探讨[J]. 现代食品, 2020, (10): 146–147.
- YU Q, WU ZH, TAN HL. Discussion on the detection of *Listeria monocytogenes* in food [J]. Mod Food, 2020, (10): 146–147.
- [5] 吴诗. 食源性单增李斯特菌数值鉴定系统及其遗传多样性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- WU S. Numerical identification system and genetic diversity of food-borne *Listeria monocytogenes* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016.
- [6] PAPIC B, GOLOB M, KUSAR D, *et al.* Source tracking on a dairy farm reveals a high occurrence of subclinical mastitis due to hypervirulent *Listeria monocytogenes* clonal complexes [J]. J Appl Microbiol, 2019, 127(5): 1349–1361.
- [7] 亢春雨, 于宏伟, 郭润芳, 等. 食源性单核增生李斯特氏菌毒力基因的分布[J]. 中国食品学报, 2017, 17(3): 241–249.
- KANG CY, YU HW, GUO RF, *et al.* Distribution of virulence genes in food-borne *Listeria monocytogenes* [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2017, 17(3): 241–249.
- [8] TAHOUN A, ABOU ER, ABDELFAH EN, *et al.* *Listeria monocytogenes* in raw milk, milking equipment and dairy workers: Molecular characterization and antimicrobial resistance patterns [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2017, 10: 264–270.
- [9] SKOWRON K, KWIECINSKA-PIROG J, GRUDLEWSKA K, *et al.* The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant [J]. Int J Food Microbiol, 2018, 282: 71–83.
- [10] SKOWRON K, WALECKA-ZACHARKSA E, GRUDLEWSKA K, *et al.* Characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated from milk and humans and the possibility of milk-borne strains transmission [J]. Pol J Microbiol, 2019, 68(3): 353–369.
- [11] 龚婷, 王宣敬. 牛乳的营养价值及功能特性研究进展[J]. 甘肃畜牧兽医, 2019, 49(12): 12–15.
- GONG T, WANG XJ. Research progress on the nutritional value and functional characteristics of milk [J]. Gansu Animal Husbandry Vet, 2019, 49(12): 12–15.
- [12] 张养东, 刘月娟, 王宗伟, 等. 牛奶 人类最接近完美的食物[J]. 中国乳业, 2017, (6): 18–20.
- ZHANG YD, LIU YJ, WANG ZW, *et al.* Milk is the closest human food to perfection [J]. China Dairy, 2017, (6): 18–20.
- [13] 杨晋辉, 王孟辉, 李洪亮, 等. 牛奶中助眠功能成分研究进展[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(4): 30–34.
- YANG JH, WANG MH, LI HL, *et al.* Research progress of sleep aid functional components in milk [J]. China Dairy Ind, 2020, 48(4): 30–34.
- [14] OBAIDAT MM, STRINGER AP. Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 on dairy cattle farms in Jordan [J]. J Dairy Sci, 2019, 102(10): 8710–8720.
- [15] 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[S].
- GB 4789.30—2016 National food safety standard-Food microbiology examination-*Listeria monocytogenes* testing [S].
- [16] 革兰氏阳性需氧菌药敏检测板使用说明书[Z].
- Instructions for use of gram positive aerobic bacteria drug sensitive test board [Z].
- [17] GELBICOVA T, PANTUCEK R, KARPISKOVA R. Virulence factors and resistance to antimicrobials in *Listeria monocytogenes* serotype 1/2c isolated from food [J]. J Appl Microbiol, 2016, 121(2): 569–576.
- [18] CAO X, WANG Y, WANG Y, *et al.* Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from the black-headed gull feces in Kunming, China [J]. J Infect Public Health, 2018, 11(1): 59–63.
- [19] RAJABI S, DARBAN D, TABATABAEI RR, *et al.* Antimicrobial effect of spore-forming probiotics *Bacillus laterosporus* and *Bacillus megaterium* against *Listeria monocytogenes* [J]. Arch Microbiol, 2020.
- [20] 杨怀谷, 郑楠, 王加启. 巴氏杀菌乳和超高温灭菌乳营养价值及卫生安全对比研究[J]. 中国乳业, 2016, (7): 62–67.
- YANG HG, ZHENG N, WANG JQ. Comparative study on the nutritional value and hygiene safety of pasteurized milk and UHT milk [J]. China Dairy Ind, 2016, (7): 62–67.
- [21] 郝晋国. 呼和浩特地区牛乳及其乳制品中兽药残留现状调查[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- HAO PG. Investigation of veterinary drug residues in milk and its dairy products in Hohhot area [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural

University, 2018.

- [22] 朱静静, 杨嘉颖, 杨越超, 等. 云南乳饼中金黄色葡萄球菌污染状况及其耐药性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(9): 2958–2962.

ZHU JJ, YANG JY, YANG YC, *et al.* Contamination status and drug resistance analysis of *Staphylococcus aureus* in Yunnan milk cakes [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(9): 2958–2962.

- [23] DAHSHAN H, MERWAD AM, MOHAMED TS. *Listeria* Species in broiler poultry farms: Potential public health hazards [J]. J Microbiol Biotechnol, 2016, 26(9): 1551–1556.

- [24] JOHNSON J, JINNEMAN K, STELMA G, *et al.* Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(7): 4256–4266.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



苏荣镇, 硕士, 主要研究方向为营养与食品安全。

E-mail: 326060528@qq.com



李凌飞, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: lingfeili@163.com



黄艾祥, 博士, 教授, 主要研究方向为食物新资源开发与乳品科学。

E-mail: aixianghuang@126.com

“保健食品的研发与检测”专题征稿函

保健食品是指具有特定保健功能或者以补充维生素、矿物质为目的的食品。保健食品亦称功能性食品, 是特定的食品种类, 有调节人体功能的作用。

本刊特别策划了“保健食品的研发与检测”专题, 由北京联合大学 闫文杰副教授 担任专题主编。专题围绕但不限于保健食品的开发、功能性活性成分提取与检测、新型保健食品研发、功能性食品添加剂、保健食品配料、保健功能性物质(肽与蛋白质、功能性油脂、多糖、微量元素、维生素等)应用、研发与检测等方面, 或您认为有意义的相关领域开展论述和研究。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 本刊主编吴永宁研究员、专题主编闫文杰副教授及编辑部全体成员特别邀请您为本专题撰写稿件。研究论文、综述、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划于 2021 年 5~6 月出版, 请您于 2021 年 3 月 31 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

希望您通过各种途径宣传此专题, 并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(注明保健食品的研发与检测专题)

E-mail: jfoodsq@126.com(注明保健食品的研发与检测专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部