

# 生鲜乳中单核细胞增生李斯特菌的研究进展

兰欣怡<sup>1,2,3</sup>, 李发弟<sup>2</sup>, 王加启<sup>1,4,5</sup>, 郑楠<sup>1,4,5,\*</sup>

(1.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业部奶产品质量安全风险评估实验室(北京), 北京 100193;  
2.甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 3.湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128;  
4.农业部奶及奶制品质量监督检验测试中心(北京), 北京 100193;  
5.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193)

**摘要:**单核细胞增生李斯特菌是一种重要的人畜共患食源性致病菌, 普遍存在于生鲜乳中, 严重威胁生鲜乳质量安全。本文就单核细胞增生李斯特菌的生物学特征和致病性、检测方法和生鲜乳中单核细胞增生李斯特菌的检出率的研究进展以及对生鲜乳中单核细胞增生李斯特菌的防控措施进行综述, 为生鲜乳质量安全风险评估提供一定的理论基础。

**关键词:**生鲜乳; 致病菌; 单核细胞增生李斯特菌; 检出率

## Advances in Research on *Listeria monocytogenes* in Raw Milk

LAN Xin-yi<sup>1,2,3</sup>, LI Fa-di<sup>2</sup>, WANG Jia-qi<sup>1,4,5</sup>, ZHENG Nan<sup>1,4,5,\*</sup>

(1. Ministry of Agriculture-Milk Risk Assessment Laboratory, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 3. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 4. Ministry of Agriculture-Milk and Dairy Product Inspection Center, Beijing 100193, China; 5. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Raw milk from dairy cows can harbor a variety of microorganisms including *Listeria monocytogenes*, as a major foodborne that causes listeriosis in both animal and man, which poses a threat to the quality and safety of raw milk. A review of recent progress in the biological characteristics and pathogenicity of the pathogenic bacterium, existing assays for its detection, its detection rates in raw milk, and preventive and controlling measures against its occurrence in raw milk is provided in this paper with the aim to lay the theoretical basis for the quality and safety risk assessment of raw milk.

**Key words:** raw milk; pathogenic bacteria; *Listeria monocytogenes*; detection rate

中图分类号: TS252.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)19-0318-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201419063

牛奶营养价值极高, 富含蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素、矿物质、必需氨基酸等营养成分, 是人类的优质全价食品, 但同时也为各种微生物的滋长提供了理想环境<sup>[1]</sup>。致病菌作为牛奶质量安全卫生指标之一<sup>[2]</sup>, 对牛奶品质的评价具有重要作用。牛奶容易受多种致病菌污染, 包括单核细胞增生李斯特菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、结核杆菌、布氏杆菌等。本文重点对生鲜乳中易受污染的单核细胞增生李斯特菌的生物学特征及致病性、检测方法、各国家地区生鲜乳中单核细胞增生李斯特菌的检出率以及对生鲜乳中单核细胞增生李斯特

菌的防控措施进行综述, 以期对牛奶的风险评估提供一定的理论基础。

## 1 单核细胞增生李斯特菌的生物学特征及致病性

### 1.1 单核细胞增生李斯特菌的生物学特征

李斯特菌(*Listeria*)为革兰氏阳性菌, 形状为圆尾带状, 是一种非芽孢兼性厌氧菌<sup>[3]</sup>, 包括7个菌种: 单核细胞增生李斯特菌(*L. monocytogenes*, LM)、绵羊李斯特菌(*L. iuanuii*)、英诺克李斯特菌(*L. innocua*)、

收稿日期: 2013-10-29

基金项目: 农业部生鲜乳质量安全风险评估专项; 国家现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-04-01);

农业部引进国际先进农业科学技术自由申报项目(2013-Z10)

作者简介: 兰欣怡(1984—), 女, 博士研究生, 研究方向为牛奶质量安全与风险评估。E-mail: lanxinyi195@163.com

\*通信作者: 郑楠(1980—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为牛奶质量安全与风险评估。E-mail: nanzheng.cn@gmail.com

威尔斯李斯特菌 (*L. innocua*)、西尔李斯特菌 (*L. seeligeri*)、格氏李斯特菌 (*L. grayi*)、默氏李斯特菌 (*L. murrayi*)<sup>[4]</sup>。这些菌种中只有绵羊李斯特菌和LM两种为致病菌,其中绵羊李斯特菌只在反刍动物中感染,人感染绵羊李斯特菌的情况极少甚至未见报道,而LM是唯一能引起人畜共患病的主要致病菌<sup>[5]</sup>。

LM为革兰氏阳性短杆菌,大小为(0.4~0.5)  $\mu\text{m}$  × (0.5~2.0)  $\mu\text{m}$ ,直或稍弯,两端钝圆,常呈V字型排列,兼性厌氧、无芽孢(图1)。在20~25  $^{\circ}\text{C}$ 环境下可形成1~4根鞭毛,有运动性。一般不形成荚膜,但在营养丰富环境中可形成。在陈旧培养基中其菌体可呈丝状及革兰氏阴性<sup>[6]</sup>。LM的生长pH值范围为4.4~9.4,最适生长pH值范围为7.0~8.0;生长温度范围为-1.5~45  $^{\circ}\text{C}$ ,最适生长温度范围为30~37  $^{\circ}\text{C}$ 。LM有较强的耐热性,60  $^{\circ}\text{C}$ 加热20 min或70  $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min才能将其杀灭,能耐受牛奶巴氏消毒(71.7  $^{\circ}\text{C}$ 加热5 s)<sup>[6]</sup>。已知的LM血清型有16个,即1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4a、4ab、4b、4c、4d、4e、5、6a、6b、7,最常见的与人类患病有关的血清型为1/2a、1/2b和4b,在全世界范围内,所有与李斯特菌病相关的血清型中,有50%由4b菌株引起<sup>[7]</sup>。

LM是一种广泛存在于自然界中的致病菌,以食物为媒介传播,主要引起败血症、脑膜炎和流产等临床症状,严重危害公共健康。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)指出,目前包括蔬菜、奶及奶制品、肉制品在内的消费性食品均不同程度地受到LM污染<sup>[8]</sup>,特别在乳制品中普遍存在<sup>[9]</sup>。欧委会2073/2005条例将LM的安全标准列入婴幼儿食品标准中,并将其作为衡量包括乳及乳制品在内的食品安全和公共健康指标<sup>[10]</sup>。由于生鲜乳中LM能耐受巴氏消毒,因此生鲜乳、巴氏杀菌乳及其他乳制品中都有存在LM的风险,具有很大的安全隐患。Oliver等<sup>[11]</sup>第一次关注乳品工业领域的LM污染。

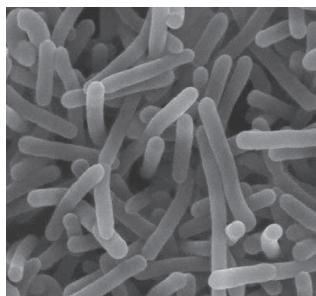


图1 LM形态

Fig.1 Morphology of *Listeria monocytogenes*

## 1.2 LM的致病性及发病率

李斯特菌病的典型症状包括发热、恶心、呕吐、腹泻和腹痛,更严重者会导致死亡<sup>[12]</sup>。抵抗力较弱的个体

(如孕妇、老人、婴幼儿和免疫力低的病人)容易感染LM,另外,乳品消费者也是主要易感染群体。美国疾病预防控制中心公布的数据显示,2009—2011年,美国共出现李斯特菌病1 651例,死亡率高达21%。高危感染人群中,65岁以上的老人和孕妇发病率分别为58%和14%;全美10万人口中的平均发病率为0.29%,与全国人口相比,65岁以上老人和孕妇的发病率明显高于其他人群<sup>[13]</sup>。Barton Behravesh等<sup>[14]</sup>报道,据美国食品网统计,1996—2005年美国发生的食物感染死亡病例中有30%由感染李斯特菌引起,并且致死率高达16.9%。1993—2006年美国因生鲜乳及乳制品中LM引起的食物中毒有1 571例,其中住院治疗202例,死亡2例<sup>[12]</sup>。据新西兰初级产业部公布数据显示,2012年新西兰10万人口中感染李斯特菌为25例,致病率为0.6%。据中欧食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)的最新报道显示<sup>[15]</sup>,在欧洲每10万人中有0.35人感染李斯特病。据统计,包括奥地利和西班牙在内的欧洲其他地区所报道的李斯特病例呈上升趋势,而比利时、捷克和斯洛伐克的发病率呈下降趋势<sup>[16]</sup>。在所有报道中,半数以上的李斯特病例是经生鲜乳及乳制品感染的<sup>[17]</sup>,尽管巴氏杀菌热处理能消除一部分LM,但是仍有一部分病源来源于巴氏杀菌乳<sup>[18]</sup>。美国疾病预防控制中心12项调查结果显示,38个州爆发李斯特菌病224例,其中5项调查中主要通过巴氏杀菌乳制成的奶酪传染,2项调查中李斯特菌污染源来自于生鲜乳及其乳制品<sup>[13]</sup>。

2001—2008年,我国质检部门多次在由美国、加拿大、法国、比利时、丹麦等发达国家进口的肉制品中检出LM。1997年,我国云南地区曾爆发两次由LM引起的大规模人畜共患疾病,导致疫区大牲畜几乎全部死亡,其中牛发病率为71.04%,猪发病率为72.01%,羊发病率为36.13%,动物病死率接近100%,两次感染LM事件中,人群发病率分别为8.2%和8.6%<sup>[19]</sup>。

由此可见,食品中感染LM是全球性问题。LM致病性较强,严重时会导致死亡,人类经生鲜食品感染LM的风险较高,而生鲜乳及其制品成为LM的主要感染源,因此,生鲜乳中感染LM对人类健康存在潜在风险,加强对生鲜乳LM的防控尤为重要。

## 2 生鲜乳中LM的检测方法

### 2.1 传统培养方法

我国针对食品中LM的检测通常采用传统培养方法<sup>[20]</sup>。传统培养方法包括增菌、分离、初筛和鉴定4个步骤,其中鉴定部分包括染色镜检、动力实验、生化鉴定、溶血实验和协同溶血实验。早期的研究中,研究者大都采用传统培养方法对牛奶中的LM进行检测分析<sup>[21-22]</sup>。此方法

操作简单,成本低,但是检验周期较长,需要6~7 d才能完成。该方法的成功取决于样本中细菌的数量、检测过程中合理的稀释倍数、培养基的灵敏度以及分离培养基的选择性等多种因素,不能满足对生鲜乳中LM快速、灵敏的检测要求,不利于生鲜乳质量安全监测和风险评估。因此,为了实现快速检测,提高检测效率和精确率,研究者结合分子生物技术、免疫学技术等开发了一些新的快速检测鉴定方法。

## 2.2 聚合酶链反应技术 (polymerase chain reaction, PCR) 及相关方法

随着PCR技术的不断发展,各种新方法不断出现,主要包括普通PCR方法、实时荧光定量PCR (real-time PCR, RT-PCR)、多重PCR等,并广泛应用于牛奶LM检测研究中,其中普通PCR方法应用最为广泛。2011年,国际标准组织针对食品和动物饲料中包括LM在内的食源性致病菌制定了PCR方法检测标准<sup>[23]</sup>。PCR技术基本原理是用一对寡聚DNA作为引物,将要扩增的DNA经过高温解链,退火,最后进行复制延伸。如此重复25~35个循环就可以得到大量DNA<sup>[24]</sup>。用于单核细胞增生李斯特氏菌PCR检测的特异性引物包括两种:一种是依据其特异毒力基因序列设计,另一种是以其16S rDNA或16SP23S rDNA中间保守区域为靶序列设计。目前用于检测的靶基因主要有:*hlyA*、*iap*、*inlA*、*inlB*、*prfA*、*plcA*、*plcB*、*mpl*等<sup>[25]</sup>。Allmann等<sup>[26]</sup>以*hlyA*为靶序列,利用PCR技术检测分析90个生鲜乳样品中的LM;Moon等<sup>[27]</sup>利用一种优化PCR方法检测牛奶、鸡肉、牛肉和猪肉中的LM,最低检测限为1 CFU/g,结果表明,利用PCR方法检测食品中的致病菌更加快速、敏感、高效;Kalorey等<sup>[28]</sup>采用PCR方法对印度中部地区生鲜乳中LM进行检测,并对其他5种李斯特菌株进行鉴定;Ning Pengbo等<sup>[9]</sup>以*hlyA*为靶基因,采用PCR方法对中国地区生鲜乳样品中的LM进行定性检测分析。普通PCR方法不能分辨死菌和活菌,因此不排除出现假阳性结果的可能,但由于其具有快速和灵敏的特点,该方法经常应用于大规模生鲜乳微生物质量安全监测调查。

PCR技术还可对LM进行定量检测。RT-PCR是在普通PCR反应体系中加入一条与模板特异性结合并且标记2个荧光基团的探针,并在传统PCR仪上增加了荧光信号检测系统,将检测结果以荧光信号的形式表现出来。de Martinis等<sup>[29]</sup>以mRNA为基础建立了对LM的*hlyA*基因进行检测的RT-PCR方法,该方法比传统培养方法的检测时间缩短了2~4 d<sup>[30]</sup>;尽管普遍认为RT-PCT能减少假阳性的出现率,但是Ning Pengbo等<sup>[9]</sup>认为与传统培养方法相比,采用RT-PCR方法检测牛奶中的LM,会出现假阳性结果;Omiccioli等<sup>[31]</sup>基于RT-PCR方法,建立了一种多重RT-PCR方法检测生鲜乳中的LM,最低检测限为

1 CFU/25 g;丁久法等<sup>[32]</sup>建立多重PCR方法研究食品中的LM,结果表明该方法不仅能同时检测到0.50 ng LM不同基因DNA,而且操作简便、快速,具有良好的敏感性和特异性,能够实现对食品中多种致病菌的快速诊断和监控;王耀等<sup>[33]</sup>应用多重PCR,结合变性高效液相色谱技术,建立了食品中LM的快速高通量检测方法;Bai Yalong等<sup>[34]</sup>开发了一种基于氨基硅壳磁性纳米颗粒和PCR技术的多重PCR检测方法,该方法检测生鲜乳中LM的最低检测限为25 CFU/mL。多重PCR方法最大的优点是能同时检测牛奶中包括LM在内的多种致病菌,但该方法也存在一些缺点,如引物间相互干扰、检测效率低等<sup>[30]</sup>。Bang等<sup>[35]</sup>对LM的随机基因组DNA片段进行研究,开发了一种利用随机基因组DNA微阵列检测牛奶中LM的方法,该方法的检测限为8 lg (CFU/mL),结果显示DNA微阵列法可检测实验室培养基和牛奶中的LM,并且能将其与其他李斯特菌种和食源性致病菌区分。DNA微阵列可以同时应用多对引物通过多重PCR扩增多个病原体的特异基因,因此该方法最大的优点是能够同时检测不同种类的致病菌。

## 2.3 其他检测方法

除上述方法外,还有多种简便、快速的新技术方法应用于牛奶中LM的检测。Kalorey等<sup>[28]</sup>研究证明,利用抗生素-生物素酶联免疫测定 (antibiotic-biotin enzyme-linked immunosorbent assay, A-B ELISA) 方法检测牛奶样品中的LM比传统检测方法更加快速。ELISA检测方法是一种免疫学检测技术,主要基于抗原和抗体反应来检测牛奶中的LM,该技术具有操作简便、快速等优点,缺点是容易受到污染,灵敏度受抗体吸附能力影响,难以进行李斯特菌种间特异性分析,主要技术难点是实如何制备高特异性的抗体<sup>[7]</sup>。徐义刚等<sup>[8]</sup>基于LM胞壁质水解酶*iap*基因设计引物,利用环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术建立灵敏度为8 CFU/管的检测方法,该方法操作简单,特异性强,灵敏度高,并能达到快速检测的目的。为追踪在生产过程中的污染来源,对菌株鉴定十分有必要,血清分型可以作为菌株鉴定的常规方法,但是要进一步鉴定分离菌株还需要使用其他分型方法。用于牛奶中LM鉴定的分子生物学方法包括核糖体基因型技术、脉冲场凝胶电泳技术、多位点可变量目串联重复序列分析、多位点序列分型技术和多毒力位点连续分型技术。与其他鉴定方法相比,扩增片段长度多态性技术对LM菌株的鉴定分辨率和灵敏度更高,并且与多位点序列分型技术具有极高的相关性<sup>[36]</sup>。

综上所述,目前的检测方法在实际应用中还存在一些缺陷,比如传统培养方法虽然操作简单,但是耗时长,不能满足致病菌检测快速、灵敏的需要,不适用于



大规模的生鲜乳中LM的检测。PCR方法以及基于PCR方法建立的其他检测方法由于其具有快速、简便、高效的优点已逐渐取代传统培养方法,普遍应用于生鲜乳中LM的分析研究,但是均不能分辨死菌活菌,因此容易出现假阳性的现象,对阳性样品仍要用传统方法进行验证,虽然增菌能减少假阳性的结果,但并不能完全杜绝。ELISA等方法尽管快速、简便、灵敏,但成本较高。因此,为满足生鲜乳中LM的实时、快速、准确的检测要求,以提高检测方法特异性、缩短检测时间为目标,改进现有的牛奶中LM检测方法,结合新型鉴定培养、PCR技术和免疫学方法开发一种灵敏、方便、价廉的检测方法是今后的研究重点,为生鲜乳质量安全,特别是为生鲜乳中LM的监控提供技术支持。

### 3 生鲜乳中LM的检出率

许多消费者认为,生鲜乳比巴氏杀菌乳和奶粉营养价值更高,因此一些国家有人将生鲜乳直接包装成即食食品<sup>[37]</sup>,乳制品容易受到致病菌污染,以生鲜乳为原料生产的乳制品尤为突出<sup>[38]</sup>。随着生鲜乳消费量的增加,由于饮用生鲜乳而感染致病菌的病例也有所增加<sup>[39-40]</sup>。因此,调查研究生鲜乳中LM的检出率对乳及乳制品的风险评估具有重要意义。

研究者对不同国家和地区的生鲜乳中致病菌进行调查,发现各地区生鲜乳中LM的检出率差异较大,美国和加拿大的牛奶样品LM检出率为0%~7%,亚洲此检出率范围为0%~1.9%<sup>[36]</sup>。各地区及各洲生鲜乳中LM检出率见表1和图2。土耳其Antakya地区生鲜乳中LM的检出率为0%<sup>[41]</sup>,是此类调查中的最低数据,但有可能是因为其样品数量少导致未检出的结果。Vanegas等<sup>[42]</sup>的研究显示,哥伦比亚的生鲜乳中LM检出率为25.93%,高于其他地区。研究发现新西兰生鲜乳中致病菌出现率相当低,特别是LM和大肠杆菌的检出率低于其他地区,这与新西兰牛场良好的环境、高水平饲养条件有关<sup>[40]</sup>。Bianchi等<sup>[43]</sup>对意大利比蒙特地区自动售卖机中的生鲜乳中致病菌进行研究,发现所调查的618个样品中LM的检出率为1.6%,多元分析结果显示,季节、平均日温、牛场规模、采样点和牛场到自动售卖机的距离对LM的检出率没有影响,但是,LM的再发率与检出率之间存在显著相关性,此监测调查结果证实,未经巴氏杀菌的牛奶能被多种微生物感染,并且成为包括LM在内的食源性疾病爆发的重要途径。在Ruusunne等<sup>[44]</sup>的研究中,5.5%的牛奶样品中检出含LM,其检出量<1~30 CFU/mL,该研究显示,大肠杆菌、菌落总数与LM的检出率之间没有相关性,这意味着即使在卫生条件良好的牛场中致病菌也能存在。van Kessel等<sup>[21]</sup>对牛奶中体细胞数与LM检出率的

相关性进行研究,结果表明两者不存在相关性。由图2可知,美洲地区生鲜乳中LM检出率高于其他地区。其中哥伦比亚最高,这可能与检测方法有关,有研究认为RT-PCR方法由于其高灵敏度导致检测样品中呈阳性样品数量比传统方法有所增加<sup>[45]</sup>。欧洲地区生鲜乳中LM检出率最低,说明欧洲生鲜乳中存在LM的风险较低,但不可避免的会受LM等致病菌污染,因此生鲜乳的巴氏杀菌或者具有等效的热处理十分重要。非洲生鲜乳中LM平均检出率相对较高,这可能与当地的生产卫生条件、奶农操作、运输过程管理和农场中贮奶设备等因素有关。由表1可知,日本牛奶中的LM检出率高于亚洲平均水平,这可能是因为该研究是在2004年进行的,而其他亚洲地区的研究都在近几年内完成的,当时的生产条件、饲喂水平、贮存条件以及消毒水平较低,导致牛奶中LM的检出率较高。

表1 各地区生鲜乳中LM的检出率

Table 1 Detection rates of *Listeria monocytogenes* in raw milk from different countries or areas

地区	样品总数/个	样品来源	阳性样品检出数/个	检出率/%	检测方法	参考文献
土耳其 (Antakya)	47	奶罐	0	0	微生物学CAMP检测法	[41]
中国	5 211	自动挤奶机	19	0.36	PCR方法	[9]
新西兰	300	奶罐	2	0.68	平板计数法	[40]
伊朗 (Isfahan)	90	奶罐	1	1.1	PCR方法	[46]
土耳其 (Burdur)	85	奶罐	1	1.18	微生物学CAMP检测法	[47]
土耳其 (Van)	250	奶罐	3	1.20	微生物学CAMP检测法	[48]
意大利 (比蒙特)	618	自动售卖机	10	1.6	RT-PCR	[43]
伊朗 (Noorabad)	120	奶罐	3	2.5	微生物学CAMP检测法	[49]
阿尔及利亚	153	奶罐	4	2.6	抗补体免疫酶法	[50]
西班牙	774	奶罐	28	3.62	DNA杂交检测法	[51]
意大利南部	27	奶罐	1	3.7	AFLP方法	[10]
印度中部	2 060	自动挤奶机	90	4.37	PCR方法	[28]
南科达他	131		6	4.6	传统培养法	[11]
日本	139	收奶桶	7	5.0	未标注	[52]
芬兰	183	奶罐	10	5.5	微生物自动鉴定系统	[44]
印度	210	奶罐	16	7.62	PCR方法	[4]
美国	861	奶罐	90	10.4	传统培养法	[21]
埃塞俄比亚	100	奶罐	13	13.0	微生物学CAMP检测法	[53]
墨西哥	1 300	收奶桶	169	13.0	微生物学CAMP检测法	[54]
哥伦比亚	81	奶罐	21	25.93	RT-PCR	[42]

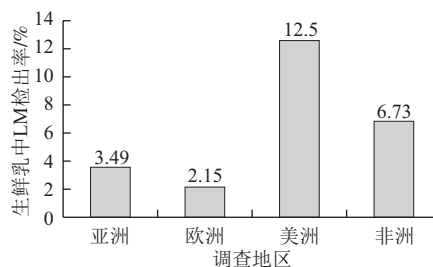


图2 各洲生鲜乳中LM的检出率

Fig.2 Detection rates of *Listeria monocytogenes* in raw milk from different continents

Ning Pengbo等<sup>[9]</sup>对我国生鲜乳中LM进行调查研究,结果显示,5 211个样品中LM的检出率为0.36%,其中被调查的19个省中只有6个省出现了LM阳性样品,规模养殖场生鲜乳样品的LM检出率显著低于散户养殖牛场的生鲜乳样品。养殖牛场低劣的卫生水平是生鲜乳感染LM的首要原因,我国规模化标准化的牛场管理有利于降低生鲜乳中LM的风险,但对于散户来说,由于没有标准化的管理以及能及时预防和诊断疫病的兽医导致生鲜乳易受到LM污染。Ning Pengbo等<sup>[9]</sup>研究表明,我国生鲜乳中LM检出率低于其他国家和地区,并显著低于亚洲平均检出率(3.49%),说明我国生鲜乳中存在LM的风险低,这与我国推进建设标准化管理和良好卫生条件的规模化养殖牛场有关。由于目前我国生鲜乳中LM的检出率的相关报道还不够全面,因此在以后的研究中,还需对生鲜乳在贮存、运输和加工过程中LM的检出率进行调查。

#### 4 生鲜乳中LM的污染控制与预防措施

生鲜乳作为一种易被LM污染的食品,成为LM的主要载体,为降低生鲜乳中LM污染,提高生鲜乳质量安全,建议采取以下措施:首先,在管理范畴,必须对生鲜乳中LM进行风险评估,包括危害识别、危害特征描述、暴露评估和风险特征的研究<sup>[55]</sup>;制定合理的微生物限量标准;进一步推荐标准化养殖,提高牛场的管理水平和卫生条件,严格控制生产、加工、贮存、销售等过程,运用HACCP科学管理体系保证乳品质量安全。其次,就个人而言,注意不食用生鲜乳或用生奶加工的奶酪等乳制品;生的动物性食品如牛肉、猪肉和家禽肉食用前要彻底加热;生食蔬菜前要彻底清洗;未加工的肉类与蔬菜、已加工的食品和即食食品要分开;接触生食后的手、刀具和砧板要洗净<sup>[19]</sup>。

#### 5 结 语

生鲜乳中含有LM等对人体健康有害的致病菌。各地区曾多次报道因食用LM污染生鲜乳导致的食物中毒事件,目前,生鲜乳中LM的风险评估已成为一个科学问题。尽管所报道的生鲜乳中LM含量总体相对较低,但由于李斯特菌病的发病率极高,食用生鲜乳(特别来自散户的生鲜乳)的消费者仍然存在感染风险,如感染后免疫力会降低。因此,以降低人类健康风险为目的,有规律地开展生鲜乳中LM的相关调查研究十分有必要。未来研究重点是对生鲜乳中LM进行监测,为牛奶风险评估提供依据,并通过研究影响LM检出率的因素,建立有效防护措施降低其存在风险。除此之外,结合或优化现有的检测方法,开发并建立更加快速、简便、准确的检测体系也需要重点关注。

#### 参考文献:

- [1] HAUG A, HØSTMARK A T, HARSTAD O M. Bovine milk in human nutrition-a review[J/OL]. *Lipids in Health and Disease*, 2007, 6: 25. doi: 10.1186/1476-511X-6-25.
- [2] 王加启, 赵圣国. 我国牛奶质量安全的现状、问题和对策[J]. *中国奶牛*, 2009(11): 3-6.
- [3] JEYALETCHUMI P, TUNUNG R, MARGARET S P, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods[J]. *International Food Research Journal*, 2010, 17(1): 1-11.
- [4] SWAPNIL D, BARBUDDHE S B, SANDEEP G, et al. Incidence and genetic variability of *Listeria* species from three milk processing plants[J]. *Food Control*, 2011, 22(12): 1900-1904.
- [5] GUILLET C, JOIN-LAMBERT O, LE MONNIER A, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16(1): 136-138.
- [6] 李郁, 魏建忠, 王桂军. 产单核李斯特菌的研究进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(8): 1018-1020.
- [7] 吴雁军, 曹亢, 郭慧媛, 等. 单增李斯特菌检测方法的最新研究进展[J]. *中国乳业*, 2011(4): 38-42.
- [8] 徐义刚, 崔丽春, 李丹丹, 等. 食品中单核细胞增生李斯特菌DNA环介导恒温扩增快速检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2012, 33(16): 137-141.
- [9] NING Pengbo, GUO Kangkang, CHENG Liang, et al. Pilot survey of raw whole milk in China for *Listeria monocytogenes* using PCR[J]. *Food Control*, 2013, 31(1): 176-179.
- [10] PARISI A, LATORRE L, FRACCALVIERI R, et al. Occurrence of *Listeria* spp. in dairy plants in Southern Italy and molecular subtyping of isolates using AFLP[J]. *Food Control*, 2013, 29(1): 91-97.
- [11] OLIVER S P, JAYARAO B M, ALMEIDA R A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2005, 2(2): 115-129.
- [12] LANGER A J, AYERS T, GRASS J, et al. Nonpasteurized dairy products, disease outbreaks, and state laws—United States, 1993—2006[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(3): 385-391.
- [13] CDC. Vital signs: *Listeria* illnesses, deaths, and outbreaks—United States, 2009—2011[R]. U.S.: CDC, 2013.
- [14] BARTON BEHRAVESH C, JONES T F, VUGIA D J, et al. Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996—2005[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2011, 204(2): 263-267.
- [15] EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010[R]. Parma: European Food Safety Authority, 2012.
- [16] ALLERBERGER F, WAGNER W. *Listeriosis*: a resurgent foodborne infection[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010, 16(1): 16-23.
- [17] PRICOPE-CIOLACU L, NICOLAU A I, WAGNER M, et al. The effect of milk components and storage conditions on the virulence of *Listeria monocytogenes* as determined by a Caco-2 cell assay[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(1): 59-64.
- [18] KOCH J, DWORAK R, PRAGER R, et al. Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006—2007[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7(12): 1581-1584.
- [19] 沈莹. 单核细胞增生性李斯特菌在食品安全中的研究近况[J]. *中国热带医学*, 2008, 8(3): 484-487.
- [20] 中国国家标准化管理委员会. GB 4789.30—2010食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [21] van KESSEL J S, KARNS J S, GORSKI L, et al. Prevalence of

- salmonellae, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies[J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(9): 2822-2830.
- [22] JAYARAO B M, HENNING D R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84(10): 2157-2162.
- [23] International Organization for Standardization. ISO 22118:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs-polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens-performance characteristics[S]. Switzerland: International Organization for Standardization, 2011.
- [24] 郭桂萍, 葛红梅, 王匀, 等. 单增李斯特菌检测技术研究进展[J]. *中国食物与营养*, 2011, 17(3): 12-15.
- [25] 徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 等. PCR技术检测食源性致病菌的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(5): 970-972.
- [26] ALLMANN M, HÖFELEIN C, KÖPPEL E, et al. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products[J]. *Research in Microbiology*, 1995, 146(1): 85-97.
- [27] MOON G S, KIM W J, SHIN W S. Optimization of rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* by PCR and application to field test[J]. *Journal of Food Protection*, 2004, 67(8): 1634-1640.
- [28] KALOREY D R, WARKE S R, KURKURE N V, et al. *Listeria* species in bovine raw milk: a large survey of Central India[J]. *Food Control*, 2008, 19(2): 109-112.
- [29] de MARTINIS E C, DUVAL R E, HITCHINS A D. Real-time PCR detection of 16S rRNA genes speeds most-probable-number enumeration of foodborne *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(7): 1650-1655.
- [30] 付瑞燕, 周阳, 祝长青. 食品中单增李斯特菌检测技术研究进展[J]. *安徽农业大学学报*, 2012, 39(6): 146-149.
- [31] OMICCIOLI E, AMAGLIANI G, BRANDI G, et al. A new platform for real-time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk[J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(6): 615-622.
- [32] 丁久法, 潘迎捷, 赵勇, 等. MPCR 检测食品中大肠杆菌O157和单核增生李斯特氏菌的研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(20): 375-378.
- [33] 王耀, 曹际娟, 闫平平, 等. 食品中3种致病李氏菌 MPCR-DHPLC检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2010, 31(8): 158-162.
- [34] BAI Yalong, SONG Minghui, CUI Yan, et al. A rapid method for the detection of foodborne pathogens by extraction of a trace amount of DNA from raw milk based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles and polymerase chain reaction[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 787(7): 93-101.
- [35] BANG J, BEUCHAT R L, SONG Han, et al. Development of a random genomic DNA microarray for the detection and identification of *Listeria monocytogenes* in milk[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 161(2): 134-141.
- [36] QUIGLEY L, O'SULLIVAN O, STANTON C, et al. The complex microbiota of raw milk[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(5): 664-698.
- [37] BROOKS J C, MARTINEZ B, STRATTON J, et al. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens[J]. *Food Microbiology*, 2012, 31(2): 154-158.
- [38] HILL B, SMYTHE B, LINDSAY D, et al. Microbiology of raw milk in New Zealand[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 157(2): 305-308.
- [39] OLIVER S P, BOOR K J, MURPHY S C, et al. Food safety hazards associated with consumption of raw milk[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2009, 6(7): 793-806.
- [40] FRETZ R, PICHLER J, SAGEL U, et al. Update: multinational listeriosis outbreak due to "Quargel" a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009—2010[J/OL]. *Eurosurveillance*, 2010, 15(16). <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19547>.
- [41] AYGUN O, PEHLIVANLAR S. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey[J]. *Food Control*, 2006, 17(8): 676-679.
- [42] VANEGAS M C, VÁSQUEZ E, MARTINEZ A J, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by realtime PCR[J]. *Food Control*, 2009, 20(4): 430-432.
- [43] BIANCHI D M, BARBARO A, GALLINA S, et al. Monitoring of foodborne pathogenic bacteria in vending machine raw milk in Piedmont, Italy[J]. *Food Control*, 2013, 32(2): 435-439.
- [44] RUUSUNEN M, SALONEN M, PULKKINEN H, et al. Pathogenic bacteria in finnish bulk tank milk[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2013, 10(2): 99-106.
- [45] VANEGAS M C, VÁSQUEZ E, MARTINEZ A J, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk by real-time PCR[J]. *Food Control*, 2009, 20(4): 430-432.
- [46] RAHIMI E, AMERI M, MOMTAZ H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran[J]. *Food Control*, 2010, 21(11): 1448-1452.
- [47] TASCI F, TUIUTOGLU H, OGUTCU H. Investigations of *Listeria* species in milk and silage produced in Burdur province[J]. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 2010, 16(Supple 1): 93-97.
- [48] EMRULLAH S, YAKUP C S, ÖZGÜR İ, et al. The presence and prevalence of *Listeria* species in milk and herby cheese in and around Van[J]. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2001, 25(1): 15-19.
- [49] MAHMOODI M M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk and dairy products in Noorabad, Iran[J]. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2010, 9(1): 16-19.
- [50] HAMDI T M, NAÏM M, MARTIN P, et al. Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria)[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 116(1): 190-193.
- [51] GAYA P, SANCHEZ J, MEDINA M, et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain[J]. *Food Microbiology*, 1998, 15(5): 551-555.
- [52] OKUTANI A, OKADA Y, YAMAMOTO S, et al. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 93(2): 131-140.
- [53] GEBRETSADIK S, KASSA T, ALEMAYEHU H, et al. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in foods of animal origin in Addis Ababa, Ethiopia[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2011, 4(1): 22-29.
- [54] VÁZQUEZ-SALINAS C, RODAS-SUÁREZ O, QUIJONES-RAMÍREZ E I. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city[J]. *Food Microbiology*, 2001, 18(2): 177-181.
- [55] 田静, 刘秀梅. 即食食品中单核细胞增生李斯特菌风险管理措施的研究[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(2): 163-168.