

调查研究

成都市冷藏即食预包装熟肉制品中单核细胞增生李斯特菌定量检测
及污染风险研究蔡炯¹, 陈潇², 朱虹霖¹, 张彪¹, 张熲迪¹, 张梦姣¹, 王家祺², 闫韶飞², 李莹², 刘丽莎², 孙宏虎¹, 白莉²

(1. 成都市食品检验研究院, 辐照保藏四川省重点实验室, 四川 成都 610045;

2. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100021)

摘要:目的 为探明了解冷藏即食预包装熟肉制品中单核细胞增生李斯特菌(单增李斯特菌)污染情况及潜在风险,本研究针对短保质期的冷藏即食预包装熟肉制品开展单增李斯特菌定量污染风险调查。方法 2022年5~8月,从成都市采集样品64份,依据采用传统培养分离鉴定和RT-PCR分子检测方法进行单增李斯特菌的定性和定量检测,分离菌株提取DNA后进行二代全基因组测序并开展相关流行病学特征分析。结果 检测结果发现64份即食熟肉样品中,6份样品检出单增李斯特菌,检出份数为6/64。6份阳性样品均由某同一工厂生产,其中5份为卤肉三拼样品。定量检测结果表明,卤肉三拼的单增李斯特菌污染水平为30~200 CFU/g;单增李斯特菌阳性的猪肉样品污染水平为<10 CFU/g。阳性样品中的6株分离菌株经全基因组测序分析鉴定为单增李斯特菌,均含有LIPI-1毒力岛相关基因,多序列位点分型发现主要的序列型(ST)为ST3(n=2)和ST121(n=2),其次是ST8和ST9。单核苷酸多态性(SNP)结果分析发现同一工厂分离到的单增李斯特菌菌株LM22071911和LM22080802之间检测到23个SNP差异,单增李斯特菌株LM22062706和LM22080806之间检测到13个SNP差异,说明在该工厂加工环节存在两种克隆群的单增李斯特菌直接传播的风险。结论 成都市部分市售冷藏即食预包装熟肉制品污染多种李斯特菌,需加强源头控制。

关键词:冷藏即食食品;预包装食品;单核细胞增生李斯特氏菌;定量检测;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)04-0426-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.04.010

Research on quantitative and contamination level of *Listeria monocytogenes* from pre-packaged refrigerated ready-to-eat meat in Chengdu CityCAI Jiong¹, CHEN Xiao², ZHU Honglin¹, ZHANG Biao¹, ZHANG Mandi¹, ZHANG Mengjiao¹,
WANG Jiaqi², YAN Shaofei², LI Ying², LIU Lisha², SUN Honghu¹, BAI Li²

(1. Irradiation Preservation Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu Institute of Food Inspection, Sichuan Chengdu 610045, China; 2. Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective In order to find out the contamination situation and potential risk of *Listeria monocytogenes* in refrigerated ready-to-eat prepackaged foods. This study carried out a quantitative contamination risk survey of *L. monocytogenes* for ready-to-eat cooked meat products with short shelf life. **Methods** We collected 64 samples of ready-to-eat cooked meat from Chengdu, and carried out qualitative and quantitative detection of *L. monocytogenes* according to traditional culture method and RT-PCR molecular detection method. Additionally, the second generation of the whole genome sequencing was performed after DNA extraction of the isolated strains, and relevant epidemiological characteristics were analyzed. **Results** The results showed that *L. monocytogenes* were isolated from 6 samples of cooked meat (6/64). All 6 *L. monocytogenes* positive samples were produced by the same manufactory, of which 5 were three platters of marinated meat. The results of quantitative detection showed that the contamination level of *L. monocytogenes* in three platters of marinated meat was 30-200 CFU/g, and the contamination level of cooked pork samples with positive *L. monocytogenes*

收稿日期:2023-07-14

基金项目:预制调理食品中新发生物危害物分布与迁移规律(2022YFF1100701)

作者简介:蔡炯 女 副主任技师 研究方向为食品微生物检验 E-mail:1958783946@qq.com

通信作者:白莉 女 研究员 研究方向为食源性致病菌 E-mail:baili@cfssa.net.cn

was lower as <10 CFU/g. Six isolates were identified as *L. monocytogenes* harboring LIPI-3 virulence island related genes by whole genome sequencing analysis. In silico MLST analysis found that the main ST types were ST3 ($n=2$) and ST121 ($n=2$), followed by ST8 and ST9. Single nucleotide polymorphisms (SNP) results showed that 23 SNP difference was detected between *L. monocytogenes* strains LM22071911 and LM22080802, and 13 SNP differences were detected between *L. monocytogenes* strains LM22062706 and LM22080806. All four strains above were isolated from the same factory, indicating that there was a risk of direct transmission of two clonal groups of *L. monocytogenes* in the processing of the factory.

Conclusion Some refrigerated ready-to-eat prepackaged foods sold in Chengdu are facing the contamination by *L. monocytogenes*, and it is necessary to strengthen the control in processing.

Key words: Refrigerated ready-to-eat food; prepacked food; *Listeria monocytogenes*; quantitative detection; foodborne pathogens

单核细胞增生李斯特菌(简称单增李斯特菌)广泛存在于自然环境中,可以在低氧和冷藏温度条件下生长,是冷藏食品中威胁人类健康的主要病原菌之一^[1]。全球范围内单增李斯特菌曾引起多起疫情暴发,最严重的如 2017—2018 年南非序列型(Sequence typing, ST)6 的单增李斯特菌污染肉制品,造成 937 人感染,其中一半为孕产妇,在 728 名已知结果的患者中,193 人(27%)死亡^[2],病因食品为肉肠。2022 年 10 月,联合国粮农组织/世界卫生组织(FAO/WHO)发布《单核细胞增生李斯特菌在即食食品中的归因、特征和监测》报告中也提到肉制品是单增李斯特菌病排名第一的病因食品^[3]。近年来,我国已发生多起因食用即食食品引发的单增李斯特菌感染事件^[4-5],对个人造成严重的疾病负担,特别是北京报道一例白血病患者食用冷藏即食食品后导致感染的事件,引起监管者的关注^[6]。

单增李斯特菌可引起李斯特菌病,高危人群包括:糖尿病、营养不良、艾滋病等慢性疾病患者,孕妇、老人,以及免疫抑制患者^[7]。个体感染单增李斯特菌后可出现温和的流感样症状,包括发热、肌肉酸痛及呕吐腹泻等。高危人群可能出现更严重的病症,例如菌血症、败血症、脑膜炎、脑炎、亦可导致流产、新生儿疾病、早产儿、死胎等^[8]。食源性李斯特菌的暴发涉及到软质奶酪、熟肉制品、沙拉、烟熏海产品、甜瓜等食品^[9]。单增李斯特菌污染食品的典型危险因素有:即食、长时间冷藏的货架期、加工后再污染、无包装后续灭菌操作、食物营养利于单增李斯特菌生长等^[10]。

随着大中城市生活节奏的加快,消费者的消费习惯也随之发生变化,方便快捷的冷藏即食熟肉制品消费量不断增加,因其无须清洗和加热就可直接食用的特点,对其生产加工过程的清洁度与安全性有着更高的要求。本研究关注的即食熟肉制品为预包装(非真空包装)、冷藏保质期 2~20 d,产品熟制后封装,包材采用臭氧、辐照等方式单独杀菌,这

类食品包装过程工人、器具、案板等易引入单增李斯特菌的交叉污染,冷藏保存条件下单增李斯特菌仍有生长繁殖扩大污染的风险。目前此类新兴冷藏即食食品的单增李斯特菌污染数据尚有缺口。本研究通过从流通环节采集冷藏即食食品样品,开展单增李斯特菌的定性和定量检测,高效、准确地获得致病菌定性和定量污染数据,将了解该类型产品单增李斯特菌污染风险及后期风险管理措施制定提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2022 年 5~8 月,从成都市 6 个区县 14 家超市和门店采集零售的冷藏保藏、短保质期(2~20 d)的即食预包装熟肉制品,每个采样点不超过 5 份样品,共计 64 份。样品包括鸭肉 18 份、鸡肉 13 份、猪肉 11 份、牛肉 8 份、鹅肉 5 份、卤肉三拼 5 份、虾肉 2 份、兔肉 1 份以及鱿鱼 1 份。样品采集后,于冷藏条件下保存,4 h 内转运至实验室进行检测。

1.2 实验菌株

单增李斯特菌(*L. monocytogenes*) ATCC 19111、英诺克李斯特菌(*L. innocua*) ATCC 33090、伊氏李斯特菌(*L. ivanovii*) ATCC 19119、斯氏李斯特菌(*L. seeligeri*) ATCC 35967、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923、马红球菌(*Rhodococcus equi*) ATCC 6939,均为本实验室保存。

1.3 仪器和试剂

电子天平(瑞士梅特勒-托利多,ME2002)、恒温培养箱(日本松下公司,MIR-254-PC)、离心机(德国 EPPENDORFF 公司,5424R)、荧光 PCR 仪(美国伯乐,CFX96 TM)。李氏增菌肉汤 LB(LB1, LB2)、李斯特菌显色培养基、PALCAM 琼脂均购于北京陆桥技术有限责任公司,API Listeria 生化鉴定试剂盒购于法国梅里埃公司。荧光 PCR 试剂盒 QuantiNova Probe PCR Kit 购于(美国 QIAGEN)。

1.4 单增李斯特菌检测

1.4.1 定性检测

实验室接收样品后,立即按照 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》和 SN/T 5224—2019《出口食品中单核细胞增生李斯特氏菌检验方法 实时荧光 PCR 内标法》描述的定性方法进行检测^[11-12],检测过程如下:取 25 g 样品接种 LB1 增菌液,30 °C 培养(24±2) h;取培养后的 LB1 增菌液 1 mL 转至 10 mL 的 LB2 增菌液中,30 °C 培养(24±2) h;培养后的 LB2 增菌液按照 SN/T 5224—2019 使用水煮法提取 DNA 后进行 PCR 检测,单增李斯特菌上游引物:5'-CATGGCACCACCAGCATC-3',下游引物:5'-CATCCGCGTGTTCCTTTTCG-3',靶标探针 5'-FAM-CCGCTGCAAGTCCTAAGACGCCA-ECLIPCE-3',内标探针 5'-HEX-ATAGGAGCACTCGCCGCCACATC-ECLIPCE-3'。荧光 PCR 反应循环参数为 95 °C 预变性 4 min;95 °C 变性 5 s,65 °C 退火延伸 20 s,45 个循环。PCR 阳性及可疑样品再按照 GB 4789.30—2016 分离后经 API Listeria 生化鉴定。

1.4.2 定量检测

定量检测按照 GB 4789.30—2016 第二法平板计数法,样品经 10 倍梯度稀释后涂布李斯特显色平板,36 °C 培养 48 h,剩余样品转至无菌袋中冷藏留存。若平板计数无典型菌落生长或者杂菌过多导致无法计数,且定性检测为阳性时,则将冷藏的留存样品按照 GB 4789.30—2016 第三法 MPN 计数法进行 9 管 MPN 定量检测,培养鉴定后查询 MPN 表获得定量结果。

1.5 全基因组测序分析

使用 Promega 基因组 DNA 提取试剂盒提取李斯特菌的基因组 DNA。利用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行测序建库和二代基因组测序,每株菌获得 >2 Gbp 的高质量清洁的读长数据(诺禾致远测序质控获得 clean data),并使用 SPAdes v. 3.9.0 从头组装^[13]。使用基因组流行病学中心(Center for Genomic Epidemiology, CGE)CGE 细菌分析程序

(<https://cge.cbs.dtu.dk/>)分析 7 株分离株的遗传特征,包括种属鉴定[SpeciesFinder 2.0, Database version:(Release 138)]、毒力基因[VirulenceFinder 2.0.3, Database version:(2022-12-02)]和 ST 序列类型[MLST 2.0.9, Database version:(2023-03-27)]等^[14]。对相同 ST 型的菌株使用 roary 3.13.0 进行核心基因组序列比对^[15],对获得的 core_gene_alignment.aln 文件使用 snp-sites 2.5.1 软件进行单核苷酸多态性(SNP)统计^[16]。

2 结果

2.1 细菌分离和鉴定

64 份即食肉制品样品中,从同一厂家生产的 5 份卤肉三拼和 1 份猪肉样品中检出单增李斯特菌,检出份数为 6/64,荧光 PCR 检测结果与分离培养结果一致(表 1)。6 株分离株经李斯特菌 API 鉴定卡试验鉴定为单增李斯特菌。另从 1 份即食牛肉样品 M22071917 中分离到 1 株单增李斯特菌疑似菌株,其生化鉴定结果与单增李斯特菌相似有弱的溶血现象。

2.2 分离株种属鉴定

通过 CGE 平台上的基于 16S rRNA 物种鉴定的 SpeciesFinder 2.0 模块,获得了 6 株单增李斯特菌和 1 株疑似李斯特菌分离菌株的种属鉴定信息。6 株分离株的种属鉴定结果与李斯特菌 API 鉴定卡方试验一致为单增李斯特菌。值得注意的是,从即食牛肉 M22071917 中分离到菌株 LM22071917,生化鉴定与单增李斯特菌相似有弱的溶血现象,但 RT-PCR 检测为阴性,经全基因组测序后种属比对鉴定为英诺克李斯特菌 *L. innocua*(表 2)。

2.3 毒力基因特征

经基于 WGS 数据的毒力基因筛选和 BLAST 序列比对分析^[17],4 株单增李斯特菌含有 LIPI-1 毒力岛相关的 *prfA*、*hly*、*plcA/B*、*mpl*、*actA* 基因,2 株单增李斯特菌含有 LIPI-1 毒力岛相关的 *prfA*、*hly*、*plcA/B*、*mpl* 基因,而英诺克李斯特菌株 LM2207191 含有 LIPI-3 毒力岛相关的 *llyA*、*llyX* 基因,以及 LIPI-4 毒

表 1 预包装冷藏即食肉类中分离的单增李斯特菌的检测和计数结果

样品编号	样品类型	保质期	采样点	生产厂家	采用时间	平板计数 CFU/g	MPN/g	API <i>Listeria</i>	RT-PCR
M22062706	卤肉三拼	4 d	超市 A	工厂 1	2022 年 6 月	UC	240	阳性	阳性
M22071911	卤肉三拼	4 d	超市 B	工厂 1	2022 年 7 月	UC	93	阳性	阳性
M22071916	卤肉三拼	4 d	超市 C	工厂 1	2022 年 7 月	30	—	阳性	阳性
M22080802	卤肉三拼	4 d	超市 D	工厂 1	2022 年 8 月	200	—	阳性	阳性
M22080806	卤肉三拼	4 d	超市 E	工厂 1	2022 年 8 月	100	—	阳性	阳性
M22080807	猪肉	2 d	超市 E	工厂 1	2022 年 8 月	<10	<3	阳性	阳性

注:UC 表示由于杂菌覆盖无法计数

表2 7株李斯特菌分离株中全基因组测序(WGS)数据的MLST、种属和毒力鉴定结果

菌株	<i>abcZ</i>	<i>bglA</i>	<i>cat</i>	<i>dapE</i>	<i>dat</i>	<i>ldh</i>	<i>lhkA</i>	ST	克隆复合群	种属	谱系 Lineage	毒力基因
LM22062706	7	6	8	8	6	37	1	121	CC121	<i>L. monocytogenes</i>	II	<i>prfA, hly, plcA/B, mpl</i>
LM22071911	4	4	4	3	2	1	5	3	CC3	<i>L. monocytogenes</i>	I	<i>prfA, hly, plcA/B, mpl, actA</i>
LM22071916	5	6	2	9	5	3	1	8	CC8	<i>L. monocytogenes</i>	II	<i>prfA, hly, plcA/B, mpl, actA</i>
LM22071917	26	21	30	33	55	69	17	536	CC133	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>llsA, llx, licA, licB, licC, glvA, ptsP</i>
LM22080802	4	4	4	3	2	1	5	3	CC3	<i>L. monocytogenes</i>	I	<i>prfA, hly, plcA/B, mpl, actA</i>
LM22080806	7	6	8	8	6	37	1	121	CC121	<i>L. monocytogenes</i>	II	<i>prfA, hly, plcA/B, mpl</i>
LM22080807	6	5	6	4	1	4	1	9	CC9	<i>L. monocytogenes</i>	II	<i>prfA, hly, plcA/B, mpl, actA</i>

力岛相关的 *licA*、*licB*、*licC*、*glvA*、*ptsP* 基因。

2.4 ST序列类型

在基于全基因组测序(WGS)数据的多位点序列分型 MLST 分析中,经鉴定为 5 种已知的序列类型(ST),2 株为 ST3 型,2 株为 ST121 型,其余为 ST8、ST9 和 ST536,如表 2 所示。值得注意的是,ST3、ST121、ST8 和 ST9 的菌株均来自同一家工厂,且分别是其各自克隆复合体 CCs 的中心序列类型,即 CC3、CC121、CC8 和 CC9。上述 CCs 属于两个不同的谱系 Lineage I 和 Lineage II。SNP 分析结果表明,7 月和 8 月分别从工厂 1 生产的产品获得的 ST3 菌株 LM22071911 和 LM22080802 之间检测到 23 个 SNP 差异。相似地,在 6 月和 8 月从工厂 1 生产的产品分离的 ST121 菌株 LM22062706 和 LM22080806 之间也只检测到 13 个 SNP 的差异。

2.5 定量污染水平

针对所有 64 个样本,进行了单增李斯特菌直接涂布计数。李斯特菌阳性的 6 份样本中,只有 4 个样本 M22071916、M22080802、M22080806 和 M22080807 获得了有效的单增李斯特菌菌落计数结果(表 1)。样本 M22062706 和 M22071911 由于杂菌的覆盖,无法获得准确的 CFU 数值。因此,对样本 M22062706、M22071911 和平板计数值为 <10 CFU/g 的阳性样本 M22080807 进行了 MPN 多管发酵定量计数测试。定量检测结果表明,卤肉三拼的单增李斯特菌污染水平分别为 30~200 CFU/g 或 93~240 MPN/g。单增李斯特菌阳性的猪肉样品 M22080807 的污染水平较低,定量检测结果为 <10 CFU/g,仅在定性检测中检出。

3 讨论

本研究对短保质期冷藏即食预包装熟肉制品中单增李斯特菌进行定性和定量检测,发现其检出份数为 6/64,部分样品污染水平较高为 30~200 CFU/g,提示此类产品具有潜在的单增李斯特菌污染风险。国内其他研究报道山东德州市、浙江杭州市、广东广州市、上海市、北京通州区监测市售

包装或散装熟肉制品中单增李斯特菌检出率为 2.7%~5.7%^[18-22]。2020 年 LIU 等^[23]对 2007—2017 年间发表的 112 篇文献报道的肉制品中单增李斯特菌检出情况进行系统分析,发现即食肉制品中单增李斯特菌检出率为 3.2%,远高于 2021 年欧盟 One Health 熟肉制品单增污染情况的报告(检出率 0.19%)^[24]。本研究中单增李斯特菌检出情况明显高于国内外研究的报道,可能的原因为本研究将样品范围限定为冷藏保存的短保质期(2~20 d)熟肉制品,这类食品的加工工艺、保存条件等具备较高单增李斯特菌的污染风险。另外,本研究样品采集时间段为炎热的夏季,食品在加工生产过程和环境条件上都更易导致单增李斯特菌的生长和繁殖。

本研究结合食品安全国家标准(GB 4789.30—2016)传统培养生化鉴定法和进出口行业标准(SN/T 5224—2019)实时荧光 PCR 法,对分离出的 7 株李斯特菌检测鉴定,其中 6 株菌结果一致为单增李斯特菌。另一株 LM22071917 菌株结果不一致,经传统生化鉴定为单增李斯特菌,而 RT-PCR 检测为非单增李斯特菌。后通过全基因组测序分析 16S rRNA 基因序列,比对鉴定为英诺克李斯特菌。此结果说明对于部分李斯特菌株,传统的增菌培养生化鉴定的方法,可能出现假阳性结果,将近缘的某些英诺克李斯特菌株误判为单增李斯特菌。单增李斯特菌和英诺克李斯特菌因其菌株亚型差异性,在菌落形态、生化实验和 16S rRNA 基因序列等水平都存在难以区分的问题,需要多种鉴定手段联合使用^[25]。在单增李斯特菌定量检测方面,6 株单增李斯特阳性样本中大部分(4/6)可以通过平板计数法直接涂布后鉴定获得定量检测结果,但对于 M22062706 和 M22071911 样品,由于杂菌干扰严重,直接涂布的方法不能有效准确地获得定量计数结果,需要通过 MPN 多管发酵法获取定量污染水平。平板计数法具有操作简单快捷的优势,但在方法的灵敏度、重现性、抗干扰能力和损伤菌恢复等方面存在不足;MPN 法检出限和灵敏度更高,但操作繁琐、实验工作量^[26]。

分离出的6株单增李斯特菌, MLST型别包括ST3、ST121、ST8和ST9, 分别属于CC3、CC121、CC8和CC9克隆复合群, 来源于谱系I和谱系II。这些菌株分离自同一家生产企业6~8月生产的产品, 其中5份样品为卤肉三拼, 表明多种不同的单增李斯特菌克隆复合群已在该生产企业传播, 卤肉三拼可能是由于其特定的加工工艺导致更易受到单增李斯特菌污染。近年来ST121型别在我国的屠宰加工厂、即食肉制品加工环境以及肉及肉制品中都有分离报道^[27-30], ST8和ST9是上海地区2009—2019年食品中分离的最主要的单增李斯特菌流行菌株^[31], 也是2008—2016年国内报道的文献综述中发现的食品中单增李斯特菌最主要的传播型别^[14]。这说明本研究成都地区冷藏即食预包装熟肉制品中分离的单增李斯特菌株是国内流行的优势型别, 具有高的传播和流行风险。值得注意的是, SNP差异分析发现同一工厂不同月份分离到的ST3李斯特菌菌株LM22071911和LM22080802之间检测到23个SNP差异, ST121李斯特菌菌株LM22062706和LM22080806之间检测到13个SNP差异, 表明其各自为同一克隆群, 说明了在该工厂加工环节存在着两种克隆群的单增李斯特菌直接传播的风险。

值得注意的是英诺克李斯特菌LM22071917, 该菌从熟牛肉样品中分离得到, 样品的生产厂家和其他6份单增李斯特菌阳性样本不一样, 且该样品的保质期最短, 仅2d。通过全基因组序列分析发现该菌株MLST型别为ST536, 属于CC133克隆复合群。早期文献报道认为英诺克李斯特菌是非致病菌, 且常伴随单增李斯特菌出现, 因此被视为单增李斯特菌污染的指示菌^[32]。SCHMID等^[33]基于管家基因的序列分析将李斯特菌分为3个分支, 英诺克李斯特菌和单增李斯特菌为同一分支, 亲缘关系近。前期的研究已报道了部分非典型英诺克李斯特菌具有LIPI-1毒力岛(李斯特菌PrfA依赖型毒力基因簇)^[34], 并推测具有毒力的英诺克李斯特菌可能是由古老的单增李斯特菌进化而来^[35-36]。在临床病例中也报道发现英诺克李斯特菌导致的严重感染^[37]。本研究中英诺克李斯特菌LM22071917含有部分LIPI-3毒力岛相关基因*llsA*、*llsX*, 缺少*llsB*、*llsD*、*llsY*, 这与CLAYTON等^[38]报道的从环境、食品和人体分离的具有部分或完整LIPI-3的非典型英诺克李斯特菌相类似。LI等^[39]在2021年也报道了从我国生肉中分离的英诺克李斯特菌具有LIPI-4毒力岛基因。相似地, 2022年南非的MAFUNA等^[40]也报道了从生肉和即食肉制品中分离到LIPI-4阳性的英诺克李斯特菌。本研究在成都地区的冷

藏即食预包装熟肉制品中发现携带LIPI-1毒力岛的单增李斯特菌, 这提示存在潜在的致病菌污染和传播风险。携带LIPI-3和LIPI-4毒力岛的英诺克李斯特菌的致病风险有待进一步研究。本研究对分离的致病菌进行全基因组测序分析可获得菌株毒力和传播详细的遗传特征, 可见WGS数据可帮助食品管理者更加精准快速的识别风险, 且菌株的异质性越来越引起科学家的关注, 各国科学家也在开发基于WGS的定量微生物风险评估, 更加准确地进行暴露评估, 避免过高或过低的估计致病菌的最终健康风险^[41]。

本研究发现短保质期的冷藏即食预包装熟肉制品, 特别是某些特定的产品类型中单增李斯特菌的检出, 可能存在工厂加工环节的直接传播。针对此类高风险食品, 建议监管部门开展专项生产过程检查和监督抽检及风险监测抽样检测, 进一步掌握我国预包装冷藏即食熟肉制品单增李斯特菌加工环节的污染状况和特点, 指导企业针对加工过程中的关键危害控制点做好过程管理, 从源头降低单增李斯特菌污染水平。同时, 食品生产企业应严格落实食品安全主体责任, 确保生产卫生规范标准的有效实施, 加强高风险产品和生产环节的单增李斯特菌污染控制。

参考文献

- [1] BUCHANAN R L, GORRIS L G M, HAYMAN M M, et al. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments[J]. Food Control, 2017, 75: 1-13.
- [2] THOMAS J, GOVENDER N, MCCARTHY K M, et al. Outbreak of listeriosis in South Africa associated with processed meat[J]. New England Journal of Medicine, 2020, 382(7): 632-643.
- [3] ALLENDE A, BARBUDDHE S B, DEVLEESSCHAUWER B, et al. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: attribution, characterization and monitoring: Meeting report[R]. 2022, FAO/WHO.
- [4] 李薇薇, 郭云昌, 刘志涛, 等. 2016年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(1): 86-91. LI W W, GUO Y C, LIU Z T, et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in China Mainland in 2016[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(1): 86-91.
- [5] 李红秋, 贾华云, 赵帅, 等. 2021年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(4): 816-821. LI H Q, JIA H Y, ZHAO S, et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in Chinese Mainland in 2021[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(4): 816-821.
- [6] 霍哲, 王永全, 徐俊, 等. 1例急性淋巴细胞白血病患者感染单核细胞增生李斯特菌病原学及分子分型特征分析[J]. 中

- 国食品卫生杂志, 2019, 31(1): 6-9.
- HUO Z, WANG YQ, Xu J, et al. An etiological and molecular characteristics analysis of *Listeria monocytogenes* isolated from an acute lymphoblastic leukemia patient[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(1): 6-9.
- [7] LI W W, BAI L, FU P, et al. The epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2018, 15(8): 459-466.
- [8] DOGANAY M. Listeriosis: clinical presentation [J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2003, 35(3): 173-175.
- [9] GOMBAS D E, CHEN Y, CLAVERO R S, et al. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods[J]. Journal of Food Protection, 2003, 66(4): 559-569.
- [10] LIANO A, SOFOS J N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(9): 2172-2198.
- [11] 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, 2017.
- National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National food safety standards - Food microbiological examination-Examination of *Listeria monocytogenes*: GB 4789.30—2016 [S] Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [12] 中华人民共和国海关总署. 出口食品中单核细胞增生李斯特氏菌检验方法 实时荧光 PCR 内标法: SN/T 5224—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
- General Administration of Customs of the People's Republic of China. Inspection method for *Listeria monocytogenes* in exported food - Real time fluorescence PCR internal standard method: SN/T 5224—2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019.
- [13] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. Journal of Computational Biology: a Journal of Computational Molecular Cell Biology, 2012, 19(5): 455-477.
- [14] THOMSEN M C, AHRENFELDT J, CISNEROS J L, et al. A bacterial analysis platform: an integrated system for analysing bacterial whole genome sequencing data for clinical diagnostics and surveillance[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0157718.
- [15] PAGE A J, CUMMINS C A, HUNT M, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis[J]. Bioinformatics, 2015, 31(22): 3691-3693.
- [16] PAGE A J, TAYLOR B, DELANEY A J, et al. SNP-sites: rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments [J]. Microbial Genomics, 2016, 2(4): e000056.
- [17] JOENSEN K G, SCHEUTZ F, LUND O, et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(5): 1501-1510.
- [18] 徐北霜, 董健, 王立友, 等. 预包装熟肉制品生产加工过程单核细胞增生李斯特菌污染及病原学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(2): 185-190.
- XU B S, DONG J, WANG L Y, et al. Analysis of the contamination and pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in the process of pre-packed cooked meat production [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(2): 185-190.
- [19] 斯国静, 俞骅, 王一泓. 杭州市市售肉类食品中单增李斯特菌污染状况调查研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(2): 408-409.
- SI G J, YU H, WANG Y H. Investigation on contamination status of meat food with *Listeria monocytogenes* in Hangzhou[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2009, 19(2): 408-409.
- [20] 李海麟, 余超, 刘于飞, 等. 2016年广州市市售食品中食源性致病菌监测结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(12): 3975-3980.
- LI H L, YU C, LIU Y F, et al. Analysis of monitoring results of foodborne pathogenic bacteria in foods sold in Guangzhou in 2016[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(12): 3975-3980.
- [21] 宋夏, 徐碧瑶, 蔡华, 等. 2016—2020年上海市市售即食食品微生物污染状况分析及评价[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(4): 767-772.
- SONG X, XU B Y, CAI H, et al. Analysis and evaluation of microbial contamination of retail ready-to-eat foods in Shanghai from 2016 to 2020[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(4): 767-772.
- [22] 苏彦萍, 高静, 江南, 等. 2014—2018年北京市通州区零售散装即食食品食源性致病菌污染状况调查结果分析[J]. 预防医学情报杂志, 2020, 36(4): 417-420.
- SU Y P, GAO J, JIANG N, et al. Analysis of monitoring results of food-borne pathogenic bacteria of the selling unpacked instant food in Tongzhou district of Beijing [J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2020, 36(4): 417-420.
- [23] LIU Y, SUN W, SUN T, et al. The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in China: a systematic literature review and novel meta-analysis approach [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 312: 108358.
- [24] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. The European union one health 2021 zoonoses report[J]. EFSA Journal European Food Safety Authority, 2022, 20(12): e07666.
- [25] CZAJKA J, BSAT N, PIANI M, et al. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(1): 304-308.
- [26] AUVOLAT A, BESSE N G. The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food[J]. Food Microbiology, 2016, 53(Pt B): 135-149.
- [27] WU L T, BAO H D, YANG Z Q, et al. Antimicrobial susceptibility, multilocus sequence typing, and virulence of listeria isolated from a slaughterhouse in Jiangsu, China[J]. BMC Microbiology, 2021, 21(1): 327.
- [28] CHEN M, CHENG J, ZHANG J, et al. Isolation, potential virulence, and population diversity of *Listeria monocytogenes* from meat and

- meat products in China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 946.
- [29] ZHANG H, WANG J, CHANG Z, et al. *Listeria monocytogenes* contamination characteristics in two ready-to-eat meat plants from 2019 to 2020 in Shanghai [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 729114.
- [30] LIU X, CHEN W, FANG Z, et al. Persistence of *Listeria monocytogenes* ST5 in ready-to-eat food processing environment [J]. *Foods*, 2022, 11(17): 2561.
- [31] ZHANG H, CHEN W, WANG J, et al. 10-year molecular surveillance of *Listeria monocytogenes* using whole-genome sequencing in Shanghai, China, 2009—2019 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 551020.
- [32] 陈健舜, 江玲丽, 方维焕. 李斯特菌毒力因子及其进化 [J]. *微生物学报*, 2007, 47(4): 738-742.
- CHEN J S, JIANG L L, FANG W H. Virulence determinants and its evolution of the genus *Listeria* [J]. *Acta microbiologica Sinica*, 2007, 47(4): 738-742.
- [33] SCHMID M W, NG E Y, LAMPIDIS R, et al. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28(1): 1-18.
- [34] JOHNSON J, JINNEMAN K, STELMA G, et al. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(7): 4256-4266.
- [35] VOLOKHOV D V, DUPERRIER S, NEVEROV A A, et al. The presence of the internalin gene in natural atypically hemolytic *Listeria innocua* strains suggests descent from *L. monocytogenes* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(6): 1928-1939.
- [36] MOURA A, DISSON O, LAVINA M, et al. Atypical Hemolytic *Listeria innocua* Isolates Are Virulent, albeit Less than *Listeria monocytogenes* [J]. *Infection and Immunity*, 2019, 87(4): e00758-e00718.
- [37] PERRIN M, BEMER M, DELAMARE C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(11): 5308-5309.
- [38] CLAYTON E M, DALY K M, GUINANE C M, et al. Atypical *Listeria innocua* strains possess an intact LIPI-3 [J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 58.
- [39] LI M, YAN S, FANNING S, et al. Whole genome analysis of three multi-drug resistant *Listeria innocua* and genomic insights into their relatedness with resistant *Listeria monocytogenes* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 694361.
- [40] MAFUNA T, MATLE I, MAGWEDERE K, et al. Comparative genomics of *Listeria* species recovered from meat and food processing facilities [J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(5): e0118922.
- [41] NJAGE P M K, LEEKITCHAROENPHON P, HANSEN L T, et al. Quantitative microbial risk assessment based on whole genome sequencing data: case of *Listeria monocytogenes* [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1772.