

食品污染产单核李斯特菌不同检测方法学评估

王冰¹, 扈庆华¹, 石晓路¹, 李庆阁², 郑琳琳², 林一曼¹, 张顺祥¹, 林世平³, 邓辉萍¹

摘要:目的 评价以不同方法检测食品中污染产单核李斯特菌(LMO)效果,并对其进行检测方法进行优化。方法 同时用国标法、改良国标法、改良分子信标-实时荧光 PCR 法、免疫磁性分离法对深圳市 2004~2006 年食品样品进行 LMO 分离鉴定并进行比较。结果 228 份样品中 8 份增菌液 LMO 实时荧光 PCR 阳性,其中 6 份 LMO 细菌培养阳性。国标法、改良国标法,改良分子信标-实时荧光 PCR 法、免疫磁性分离法都能检出 LMO,检出率分别为 2.63%、2.63%、3.50%、2.63%。深圳市食品中 LMO 的污染率为 2.63%(国标法),速食类冻品污染率为 12.8%(国标法)。结论 荧光 PCR 法检出率最高,将检测时间由原来的至少 4~5d 缩短至 1d,可用于食品污染 LMO 状况调查的初筛和食物中毒的快速诊断;国标法与改良国标法的检出率相等,而后的操作更方便。免疫磁性分离法的检出率最低。

关键词: 产单核李斯特菌;改良分子信标;实时荧光 PCR;免疫磁性分离;检测方法评估

中图分类号:R517.7 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2007)4-506-02

Assessment of different methods in detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated food products. WANG Bing¹, HU Qing-hua¹, SHI Xiao-lu¹, et al. (1. Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, Guangdong, P. R. China; 2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, P. R. China)

Abstract: Objective To investigate *Listeria monocytogenes* contamination in food of Shenzhen City. To find out a better method for detection of *Listeria monocytogenes* (LMO). **Methods** Traditional method, the modified traditional method, the modified molecular beacons and real-time PCR and the immunomagnetic separation were used for isolation, identification of *Listeria monocytogenes* and the results were compared. **Results** LMO were detected by the traditional method, the modified traditional method, the modified molecular beacons and real-time PCR and the detection rates were 2.63%、2.63%、3.50% and 2.19%. LOM were detected from 8 samples by modified molecular beacons and real-time PCR. Among these 8 positive samples, LOM were detected. The detection rate of LMO in food in Shenzhen was 2.63% (traditional method). **Conclusion** Compared with other three methods, the modified molecular beacons and real-time PCR was the most sensitive. The detection time was reduced from at least five days to only one day. It can be employed for detection of LMO from large quantity of samples. The detection rate of the traditional method was equal to the modified traditional method, but the latter was easier. The detection rate of the immunomagnetic separation was the lowest, but the detection time of it was shorter than the traditional method and the modified traditional method. There the food has been contaminated with LMO in food in Shenzhen City and monitoring work is indicated.

Key words: *Listeria monocytogenes*; Modified molecular beacons; Real-time PCR; Immunomagnetic separation; Evaluation of detection methods

产单核细胞李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, 以下简称 LMO)属于李斯特菌属(*Listeria*),能引起人和动物脑膜炎、败血症、流产等症状,病死率达 20%~30%^[1],国际上已将其列为食品四大致病菌(致病性大肠杆菌、肉毒梭菌、亲水气单胞菌和 LMO)之一^[2]。为了解深圳市 LMO 的污染情况,做好细菌性食源性疾病的监测及技术平台的构建,我们开展了 LMO 检测技术的研究,于 2004 年 3 月~2006 年 4 月在深圳市采集生(冻)肉、冻禽、水产品、奶制品、速食冻品样品等各类样品共 228 份进行检测。

目前 LMO 的检验仍以传统培养法为主,但操作繁琐,耗时长,且阳性率低。而传统 PCR 技术易污染,造成检测失败。实

时荧光 PCR(下称荧光 PCR)以其快速、定量、无需后电泳、无交叉污染等突出优点而被广泛采用。改良分子信标是我们分子信标探针基础上提出的一种新型分子探针,以它为基础建立的实时荧光 PCR 技术,可以更好地实现多重实时 PCR 检测多种致病菌。将我们设计的改良国标法与其它三种方法(免疫磁性分离法、荧光 PCR 法和国标法)同时对样品进行检测,比较评价四种方法的优劣,并应用于深圳市食品中 LMO 污染状况的调查。

1 材料与方

1.1 试验材料

1.1.1 样品 取自深圳市的某肉菜市场、某超市、光明农场晨

y 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300281),广东省卫生厅资助项目(A2003709),深圳市科技局资助项目(200404139)

作者单位:1. 深圳市疾病预防控制中心,广东深圳 518020; 2. 厦门大学生命科学院,福建厦门 361005; 3. 深圳市慢性病防治院,广东深圳 518020

作者简介:王冰(1977-),女,汉族,本科,技师,主要从事微生物学研究。

通信作者:扈庆华,女,主任技师, E-mail: huqinghua03@163.com

光牛奶厂, 深圳市进出口检疫局蛇口分局、深圳市各商场及食品厂家等各类样品共 5 类 7 个品种 228 份。每份样品均无菌采样, 无菌独立包装, 放 4℃ 保存, 8h 内送达实验室进行检测。

1.1.2 试剂 李斯特增菌肉汤基础、1% 盐酸吡啶黄、1% 萘啶酮酸钠盐、SIM 琼脂、三糖铁琼脂均由北京陆桥技术有限公司提供; PALCAM 琼脂由英国 Oxoid 公司提供; Fraser 肉汤、API LISTERIA 鉴定试剂条由法国梅里埃公司提供; Taq E 由大连宝生公司提供; 荧光 PCR 引物与探针由上海生工生物工程公司合成并标记; LMO 标准株 (编号: 54001-4、54007-2) 由卫生部药品生物制品检定所提供; Dynabeads anti-Listeria (抗 LMO 免疫磁性分离套装) 由挪威 Dynal 公司提供。

1.2 主要仪器及设备 iCycler 实时 PCR 扩增仪 (美国 Bio-Rad 公司出品); 日本奥林巴斯公司荧光显微镜; Ultraspec2000 紫外可见光蛋白核酸分析仪 (Pharmacia 公司)。

1.3 检测方法

1.3.1 国标法 按照国标 GB/T 4789.30-2003^[3] 对样品进行检测。对 SIM 琼脂中生长成伞状、三糖铁斜面中产酸不产硫化氢、羊血平板有溶血环的菌株上 API LISTERIA 鉴定试剂条做进一步生化鉴定。上述过程, 使用 LMO 参考菌株进行质量控制。

1.3.2 改良国标法 用 Fraser 肉汤和 PALCAM 平板分别代替国标法中的 LB2 增菌液和 MMA 平板, 其余操作与国标法相同。其中, Fraser 肉汤于 30℃ 培养 24h, 变黑者划 PALCAM 平板, 不变黑者再观察 24h, 如仍不变色则做阴性处理。PALCAM 平板于 30℃ 培养 24~48h, 李斯特菌在该平板上为湿润、菌落中心有黑点或凹陷的细小圆形菌落。

1.3.3 免疫磁性分离法 按照试剂盒说明书操作。将带有 LMO 的悬浮液分离于 PALACM 平板。其余培养鉴定步骤同上 1.3.2。

1.3.4 实时荧光 PCR 法 样品模板处理: 样品前处理、LB1 增菌等步骤同国标法。取 1ml LB1 24h 增菌肉汤于 EP 管, 12 000rpm 离心 2min, 弃去上清, 加 1 000μl 无菌水洗涤两次, 12 000rpm 离心 2min, 弃去上清, 加 100μl 无菌水混匀, 100℃ 干浴器中裂解 10min, 10 000rpm 离心 1min, 取 5μl 上清液加入荧光 PCR 体系中。

反应体系: 反应总体积为 25μl, 内含 5μl 模板、2.5μl 10×PCR 缓冲液、1.5mmol MgCl₂、0.25mmol/LdNTP、1U Taq 酶、25pmol 引物、25pmol 探针。反应参数为: 94℃ 预变性 5min, 进行 94℃ 变性 20s, 52℃ 退火 25s, 72℃ 延伸 20s。40 个循环。采用退火阶段的反应液检测荧光。

2 结果

2.1 5 类食品中 LMO 的污染情况 在荧光 PCR 法中, 以样本 0≤Ct 值≤35 为阳性, 其他三法以分离到 LMO 菌株为阳性。在受检的 228 份食品中, 8 份增菌液 LMO 荧光 PCR 阳性, 其中 6 份分离到 LMO 菌株, 总污染率为 2.63% (6/228)。对所分离的可疑菌株, 采用 API LISTERIA 生化试剂条进行鉴定, 结果编码均为 6510, 经查 API 编码手册, 鉴定为 LMO, 与参考菌株一致。国标法、改良国标法, 荧光 PCR 法、免疫磁性分离法都能检出 LMO, 检出率分别为 2.63%、2.63%、3.50%、2.63%, 见表 1。

2.2 4 种方法检测结果比较 见表 2。

表 1 5 类食品 LMO 检出情况 (国标法)

食品类别	检测份数	阳性份数 (%)
生肉	96	0
冻肉	25	1 (4.0)
冻禽	51	3 (5.88)
生奶	40	0
速食类冻品	16	2 (12.5)
总数	228	6 (2.63)

表 2 4 种方法检测 228 份样品中 LMO 的结果比较

方法	阳性份数 (%)	检测时间
国标法	6 (2.63)	4~5d
改良国标法	6 (2.63)	4~5d
免疫磁性分离法	5 (2.19)	3~4d
荧光 PCR 法	8 (3.50)	3h~1d

3 讨论

1988 WHO 关于 LMO 菌食物中毒的报告中指出, 有 4%~8% 的水产品、5%~10% 的奶及奶制品、30% 以上的肉制品被 LMO 污染^[4]。广东省 CDC 曾于 2002 年和 2003 年对 5 个城市 (伍华、深圳、广州、澄海、湛江) 的食品进行 LMO 污染状况调查, 2002 年全省的平均污染率为 1.5%, 2003 年为 3.95%^[5,6]。而国内其他城市报道的 LMO 检出率在 0.72%~6.4% 之间, 这表明我国产单李斯特菌的污染比较轻微, 这可能是我国现在还未出现李斯特菌病大面积爆发的原因。本次调查阳性率为 2.63% (国标法), 低于国外, 也低于国内报导的某些省市 (如福建省的 7.45%、江苏省的 2.96%)。但是 LMO 病的病死率高达 30%~70%^[7], 所以仍然不能忽视对本菌的检测。

此次调查样品来源于深圳市各市场商场及食品厂家等, 包括 5 类 7 个品种的各类食品共 228 份, 能够较全面、真实的反映深圳市常见食品中 LMO 的污染状况。5 类食品中, 速食类冻品的 LMO 检出率最高为 12.5%, 其次为冻禽的 5.88%, 与文献报告的速冻食品 LMO 阳性率较高^[8] 一致。本次调查表明, 我市食品中 LMO 的总体污染状况不算很严重, 但是速食类冻品污染率较高, 而且此类食品的储藏温度适合 LMO 长期存活, 该类食品被污染将会对市民健康造成潜在危险。因此建议有关部门及早制定相应的管理措施, 特别是加强对冻品的监测, 发现污染应及时对产品溯源, 并要求厂家采取卫生处理措施, 规范加工、销售等环节的卫生条件。

国标法使用的 MMA 平板杂菌多, 菌落小, 很难挑出可疑菌落。本组采用的改良国标法是用 Fraser 肉汤和 PALCAM 平板分别代替国标法中的 LB2 肉汤和 MMA 平板。Fraser 肉汤和 PALCAM 平板均有较强的选择性, LMO 在 PALACM 平板上菌落形态典型, 容易识别。本次试验运用国标法和改良国标法都从 6 份食品中分离出 LMO, 但这两法检出阳性的 6 份标本不尽相同, 两法共计检出阳性标本 8 份。由此可见, 国标法和改良国标法都存在漏检的可能。免疫磁性分离法只检出 5 份阳性, 阳性率比国标法低, 但其优点是增菌时间缩短 1d, 平板上杂菌少, 易挑选可疑菌落。荧光 PCR 法的阳性检出率最高, 说明该方法灵敏度高, 特异性好, 优于其他三种方法。我(下转第 570 页)

而采用雾化吸入给药时 70% 药物可直接分布到呼吸道表面,使呼吸道利巴韦林浓度迅速达到高峰,约为血浆高峰浓度的 500~1000 倍,足以抑制病毒复制^[7]。由于利巴韦林在呼吸道分泌物中的半衰期仅为 2h,以及进入呼吸道后分泌物的稀释作用,所以高浓度的利巴韦林并不对呼吸道组织,特别是纤毛产生毒性作用^[8]。临床研究已证实利巴韦林雾化吸入能有效治疗病毒性上呼吸道感染,且安全性较高^[7,9]。因此利巴韦林雾化吸入给药能迅速在呼吸道局部产生有效抑制病毒的药物浓度,疗效高且副作用小,优于口服或静脉用药。

吸入型表面激素布地奈德混悬液是一种新合成的非卤化激素^[10],其优点是:①具有高亲脂性,可减慢药物从脂质中的释放,延长激素的局部抗炎作用时间;②抗炎作用强,体外研究结果表明其抗炎作用比可的松高 1000 倍,可减轻气道炎症渗出,抑制炎症细胞向炎症部位移动,阻止炎症介质的释放和降低各种炎症介质的活性;③采用雾化吸入给药,直接作用于气道黏膜,起效迅速,对气道炎性细胞局部选择性高,吸入布地奈德可在气道黏膜上形成微仓库,增加药物在局部的沉积;④经口咽部吞入的布地奈德 90% 左右在肝脏通过首过效应而清除,进入体循环的药量明显减少。

本文研究结果显示,3 组间咳嗽及睡眠质量的改善有统计学差异,而流涕症状的改善无统计学差异,总有效率比较联合雾化组>单一雾化组>口服药物组,有统计学差异。研究表明加用雾化吸入治疗儿童上呼吸道感染导致的急性咳嗽比单纯口服镇咳药物疗效好,其中单一雾化组总有效率为 69.0%,联合雾化组总有效率达 88.9%,说明两组雾化吸入均能有效控制症状。而联合雾化除能有效抑制病毒外,还可减轻气道炎症反应,明显提高治疗有效率,且无明显不良反应。因此,布地奈德与利巴韦林联合雾化吸入治疗儿童上呼吸道感染的优点是:①治疗效果好,能在较短时间内控制症状,避免发生并发症;②不良反应少,局部用药可避免全身用药引起的不良反应,患儿在

雾化治疗后洗脸漱口,可明显减少口腔真菌感染的机会,而在本研究中发生口腔真菌感染;④依从性高,在雾化治疗时,采用百瑞压缩雾化吸入机,其特点是雾化率高,雾滴均匀,用药量少,治疗时间短,接受治疗的患儿只需被动配合,无需患儿配合深呼吸,较口服或静脉用药提高了用药的依从性,避免了静脉用药的痛苦,深受患儿及家长的欢迎。

参考文献:

- [1] 袁壮. 要重视儿童慢性咳嗽的诊断和治疗[J]. 国际儿科学杂志, 2006, 33(1): 1~2.
- [2] 吴梓梁. 小儿内科学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2003, 1639~1640.
- [3] 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床研究指导原则汇编[C]. 1993, 51~53.
- [4] Anne B Chang, Lou I Landau, Peter P Van Asperen, et al. Cough in children: definitions and clinical evaluation[J]. The Medical Journal of Australia, 2006, 184(8): 398~403.
- [5] 闵秀全, 李敏. 急性上呼吸道感染对儿童的危害及其预防[J]. 湖北民族学院学报. 医学版, 2003, 20(2): 30~32.
- [6] Monto AS. Viral respiratory infections in the community: epidemiology, agents and interventions[J]. Am J Med, 1995, 99: 24.
- [7] 申昆玲. 小儿呼吸道感染的抗病毒治疗[J]. 中国实用儿科杂志, 1997, 12(1): 6~9.
- [8] 汪复, 张婴元. 实用抗感染治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004, 389~390.
- [9] 洪建国, 李臻, 曹兰芳, 等. 利巴韦林气雾剂治疗小儿上呼吸道感染病毒性感染的多中心临床观察[J]. 临床儿科杂志, 2006, 24(6): 525~528.
- [10] 黄丹和, 谈秀莲, 屈悦. 新剂型-布地奈德混悬液雾化吸入剂[J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(1): 72~73.

收稿日期: 2007-02-02

(上接第 507 页)

们对 28 株经 API LISTERIA 试剂条鉴定为 LMO 的菌株和 2 株 LMO 参考菌株进行荧光 PCR 检测, 结果均为阳性; 被上述生化试剂条鉴定为其它型别的李斯特菌进行 PCR 结果均为阴性。证明运用荧光 PCR 做样品初筛和菌株鉴定, 结果可信。由于荧光 PCR 灵敏度高于传统检验方法, 因此在检测食品中 LMO 或调查由 LMO 引起的食物中毒时, 可先用荧光 PCR 进行筛检, 以节省人力物力和时间。

改良分子信标探针是为了提高杂交效率, 在原来分子信标原理基础上提出的。改良分子信标的突出特点是将分子信标的臂部分也作为靶识别序列, 而不仅仅是用于形成发夹结构的无关添加序列。对于同样长度的检测靶序列, 改良分子信标比分子信标更短, 而且由于臂序列不再悬空, 因而与靶序列的结合更趋紧密。已经证明, 改良分子信标比分子信标更易设计且成功率更高, 同时对扩增条件要求不严, 因此对于多个靶序列的同时检测, 改良分子信标的优势更加明显。检索食源性爆发疾病的病原时, 常常需要同时检测多种细菌才能确定病原, 因此采用多重实时荧光 PCR 技术同时检测多种细菌是未来发展的需要和趋势。

参考文献:

- [1] Flening DW, Coshi SL, MacDonald KL, et al. Pasteurized milk as vehicle of infection in an outbreak of listeriosis[J]. New Engl J Med, 1985, 312(1): 404~407.
- [2] 杜蕾. 内化素基因扩增技术检测生肉中单核增生性李斯特氏菌[J]. 首都报, 1995, 1(专刊): 87.
- [3] 卫生部, 国家标准化管委会发布. 中华人民共和国国家标准-食品卫生微生物学检验(GB/T4789 30-2003), 2003, 240~241.
- [4] Food borne Listeriosis Report of a WHO Informal Working Group. Geneva: 1988.
- [5] 宋曼丹, 倪汉中, 杨冰. 广东省食品中单核细胞增生李斯特菌污染状况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(1): 81~82.
- [6] 何冬梅, 倪汉中, 严纪文. 2003 年广东省食品中李斯特菌污染状况调查[J]. 华南预防医学, 2004, 30(5): 48~49.
- [7] Schlech WF, et al. Epidemic listeriosis - evidence for transmission by Food[J]. Med, 1983(3): 203~206.
- [8] 李小春, 陈慧燕, 李毅. 速冻食品中李斯特菌检测方法探讨与结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(1): 88~89.

收稿日期: 2007-01-15