

食品中单增李斯特菌检测技术研究进展

付瑞燕¹, 周 阳¹, 祝长青²

(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230000; 2. 江苏出入境检验检疫局, 南京 210001)

摘 要: 单增李斯特菌是一种重要的人畜共患食源性致病菌, 如何有效控制食品(尤其是即食食品)中的单增李斯特菌, 是食品安全的重要任务, 其中快速、准确的检测技术是关键因素之一。作者对单增李斯特菌的传统检测法、免疫学检测法和分子生物学检测法进行综述, 并对目前国内单增李斯特菌检测过程中所存在的问题进行探讨, 以期今后的研究提供参考。

关键词: 单增李斯特菌; 传统检测法; 免疫学检测法; 分子生物学检测法

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2012)06-0940-04

Progress in the investigation of detection methods of *Listeria monocytogenes* in food

FU Rui-yan¹, ZHOU Yang¹, ZHU Chang-qing²

(1. School of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Jiangsu Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001)

Abstract: *Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogen in both human beings and animals, which has already aroused great concern from various countries. How to control *L. monocytogenes* in food (especially ready-to-use food) is one of the important tasks of food safety. Fast and sensitive detection technology is one of the key factors. This paper summarized the traditional detection method, immunoassay and molecular biological assay of *L. monocytogenes*. To provide reference for further research, the problems that exist in the domestic detection process of *L. monocytogenes* at present also had been discussed.

Key words: *Listeria monocytogenes*; traditional detection method; immunoassay; molecular biological assay

单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM) 是食源性疾病的重要病原菌, 世界卫生组织 WHO 将其列为 20 世纪 90 年代四大食源性病原菌之一^[1-2]。该菌广泛存在于土壤、人和动物的粪便中, 很容易污染食品而引起食物中毒和李斯特病暴发, 临床表现为人和动物脑膜炎、败血症及孕妇流产等^[3], 以妊娠期妇女、新生儿及免疫功能低下者易感染^[4]。该病发病率低但临床死亡率较高, 其主要致病因子是由 *hly* 基因编码的李氏杆菌溶血素。此外, 该菌在 4℃ 冰箱保存的食物中也可生长繁殖, 大大增加了该菌的危害性。近年来, 由该菌引起的食物中毒事件时有发生, 并造成人员死亡^[5-6], 引起各国的高度关注。本文将针对单增李斯特菌的传统检测法、免疫学检测法和分子生物学检测法进行综述, 以期今后的研究及检测工作提供参考。

1 单增李斯特菌的检测方法

1.1 传统检测方法

食品中单增李斯特菌的传统检测方法^[7]包括增菌、分离和鉴定 3 个环节。目前, 分离环节常会采用显色培养基, 使其菌落颜色不同于其它干扰菌, 实现快速分离。鉴定常采用生化反应和血清学反应。目前, 生化反应的鉴定技术多采用数值分类鉴定和自动化检测技术。该技术主要包括: (1) API *Listeria* 生化鉴定试纸条; (2) 全自动微生物分析系统, 如 VITEK 系统、MIDI 系统及 BIOLOG 系统等^[8]。虽然该方法实验设备要求不高, 可操作性强, 但检验周期长, 需 6~7 d, 无法实现快速检测^[9]。

单增李斯特菌的检测除传统检测方法外还有多种快速检测方法, 主要应用于增菌以后, 生化鉴定

收稿日期: 2012-06-12

基金项目: 国家质检总局课题(2012IK168)资助。

作者简介: 付瑞燕, 女, 博士, 副教授。E-mail: furuiyan@189.cn

之前,对阴性样本进行快速筛选,以缩小检测范围,减少检测任务,提高检测效率及准确率。快速检测方法主要包括免疫学和分子生物学检测两大类。

1.2 免疫学检测技术

该技术以抗原抗体免疫为基础,制备特异性克隆抗体检测细菌。主要包括:酶联免疫吸附分析法(ELISA)、聚合酶免疫检测方法(EIA)、酶联荧光分析法(ELFA)等。

1.2.1 ELISA 法 将抗原或抗体吸附于固相载体,再在载体上进行免疫酶染色,可用肉眼直接观察结果,也可借助分光光度计对显色底物进行测定。段霞等^[10]将 0.5%福尔马林灭活的单增李斯特菌作免疫原免疫日本大耳兔,获得抗单增李斯特菌的多克隆抗体,并将其作为捕获抗体,以抗单增李斯特菌 Internalin A (InIA)单克隆抗体作为检测抗体,建立检测该菌的双抗夹心 ELISA 方法,灵敏度较高。

1.2.2 聚合酶免疫检测法(EIA) 基本原理是将样品增菌液和阳性对照加到酶标板的微孔内(微孔的内壁上固定着对单增李斯特菌抗原高度特异性的抗体),单增李斯特菌抗原便在微孔内形成抗原-抗体复合物。该方法需要进行 2 次前增菌,每次增菌时间 24 h,后续的检测过程大约需要 2~4 h,比传统方法更快速。Feldsine 等^[11]选用 EIA 方法检测食品样品以及环境中物体表面的单增李斯特菌和李斯特氏菌属,并与 USDA/FSIS(U.S. Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service)检测方法进行对比,从统计学的角度进行分析,二者的检测结果是相一致的。EIA 法还可以与 PCR 技术相结合,建立一种新的检测方法——PCR-EIA 法,该方法明显的提高检测灵敏度和特异性,进一步扩大了 EIA 的应用范围。

1.2.3 酶联荧光分析法(ELFA) 该方法是将单增李斯特菌抗原与单克隆抗体相结合,然后再将结合有碱性磷酸酶的抗体与单增李斯特菌抗原结合。当底物 4-甲基伞形磷酸酯被磷酸酶转换成 4-甲基伞形酮时会发出荧光。通过检测荧光强度(荧光强度与抗原含量成正比)可推算出样品中单增李斯特菌的数量。ELFA 灵敏度比 ELISA 高,并省去了 ELISA 中的颜色反应,缩短反应时间;但缺点是成本较高,目前主要应用在自动酶联荧光免疫检测系统(VIDAS)上。吕均^[12]等将 mini-VIDAS 与 PCR 技术相结合快速检测食品中单增李斯特菌,检测周期 48 h,结果比应用单一的方法准确。

1.2.4 金标免疫层析技术 该技术的原理是将高度特异性抗单增李斯特菌抗原的抗体束缚在色原载体

上,且可与固相支撑基质相分离。当检测样品中存在单增李斯特菌时,测试单元的试剂将会被展开,产生肉眼可见的确定性反应。阳性结果会在试纸窗有一指示阳性的检测线,有效测试还需要进一步确认控制线的存在,若无此线检测无效。熊国华等^[13]利用免疫胶体金试纸条快速检测单增李斯特菌,可在 5~10 min 完成检测,样品处理简单、操作灵活、运输方便、不需要其他辅助仪器,结果明显,是现场检测的理想方法,尤其是针对即食食品中单增李斯特菌的检测。

1.2.5 免疫磁性分析(IMS) 以及 IMS-ELISA 法 IMS 的基本原理是抗原抗体反应,免疫磁珠捕集(Listeria-Test)法可分为样品处理、菌体捕集、平板分离培养、李斯特菌属及单增李斯特菌确认等步骤,该方法的**最大优势是对单增李斯特菌的捕集和确认。徐金亨等^[14]制备单增李斯特菌免疫磁珠用于食品中单增李斯特菌的检测,明显缩短检验周期。将 IMS 应用于免疫分析构建 IMS-ELISA 检测方法,优点是菌液浓度较低时可通过免疫磁珠进行菌体富集,缩短增菌时间,提高检测效率;缺点是免疫磁性分析缺乏种间特异性,容易受到干扰,很难消除交叉反应,影响检测结果的准确性。

1.3 分子生物学检测方法

分子生物学检测方法主要包括核酸探针杂交技术、PCR 检测技术等,下面将对几种主要方法进行介绍。

1.3.1 探针检测技术 DNA 探针法是将 2 条碱基互补的 DNA 链在适当的条件下杂交,通过检测样品与标记性 DNA 探针之间形成的杂交分子来检测样品中的单增李斯特菌,测定放射性或荧光强度即可得出样品中单增李斯特菌的个数^[15]。随着探针技术的逐渐成熟,人们将多个 DNA 特异性探针固定到芯片上,制成基因芯片,采用荧光标记法提高检测灵敏度。该技术可同时用于多种不同种类病原菌或毒素的检测,减少实验次数,减小工作量。

1.3.2 PCR 检测技术 PCR 是近年来广泛应用的分子生物学检测方法,在单增李斯特菌的检测中以其遗传物质高度保守的核酸序列(常用的靶序列包括 *hly*、*actA*、*prfA* 等)设计引物进行扩增。该方法特异性好,但灵敏度低,对样品进行前处理后再进行扩增,可以提高检出率和检测灵敏度。PCR 技术还可对单增李斯特菌进行定量检测,Long 等^[16]以 *hly* 为靶基因,采用定量 PCR 对样品中的单增李斯特菌进行定量检测。近年来,在 PCR 基础上又开发了一些新的检测技术。

(1) 实时荧光 PCR(Real-time PCR)。实时荧光 PCR 是近几年兴起的分子生物学检测技术,在常规 PCR 反应体系中加入了一条与模板特异性结合且标记 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,省去了凝胶电泳的繁琐操作,避免了实验过程中 EB 等致癌物质的使用,减少假阳性的发生率,缩短检测周期,弥补了常规 PCR 技术灵敏度低,特异性差等缺点。*hlyO* 基因^[17-18]具有较高的保守性、易于设计探针,不易导致假阴性等特点,王娉等^[19]选用该基因作为靶基因,建立了奶液模拟标本中单增李斯特实时荧光 PCR 检测方法。

(2) 多重 PCR。多重 PCR 是在同一 PCR 反应体系中加入 2 对或 2 对以上的引物,可同时扩增出多个核酸片段进行检测,该方法能同时检测出多种病原菌。钱志伟等^[20]建立同步速测食品中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生性李斯特菌的多重 PCR 检测方法,结果显示该方法简便、快速、灵敏度高。Kérouanton 等^[21]利用多重 PCR 对食品中的单增李斯特菌及李斯特菌属进行鉴定,结果比较理想。但是,该方法也存在一些问题,如引物间互相干扰、检测效率低等。

(3) 恒温扩增。核酸恒温扩增是一种以恒温方式扩增 DNA 及 RNA 的方法,包括 LAMP、NASBA、RCA 等,其特点是操作简便、灵敏度高、特异性好、不需使用特定的基因扩增仪。其基本原理是两条特异的引物,利用 AMV RTase、T₇ RNA 聚合酶、RNase H 及相应的缓冲成分,在 42℃ 条件下形成一个连续稳定的扩增系统,该系统中位于 5' 末端的引物加上 T₇ 噬菌体的启动子序列,通过 AMV RTase 的作用,在扩增区域内形成 cDNA:RNA 的杂合分子,由 RNase H 将杂合分子中的 RNA 消化掉,第 2 段引物与 cDNA 结合,合成出具有转录活性的双链 DNA,然后通过 T₇ RNA 聚合酶的作用得到大量 RNA 分子,转录出的 RNA 分子又可作为模板,重复以上过程,使靶序列大量扩增。李秀敏^[22]等以单增李斯特菌的 *hlyA* 基因作为靶序列,采用环介导等温扩增技术(LAMP)检测样品中单增李斯特氏菌,建立了食品中单增李斯特菌 LAMP 检测方法。

(4) RT-PCR 方法。PCR 技术能提高检测速度和灵敏度,但由于 DNA 比较稳定,容易出现假阳性;而 mRNA 不稳定,在死菌中能很快降解,以 mRNA 为检测分子建立的 RT-PCR 方法可有效区分死菌活菌,一定程度上解决常规 PCR 方法带来的假

阳性问题。原理是先将 RNA 反转录成 cDNA,然后利用 PCR 方法进行扩增,分析结果即可完成检测。闫冰^[23]等采用实时 RT-PCR 方法检测乳中的单增李斯特菌,周期(包括样品的增菌和前处理)12~16 h,该方法能较好的区分样品中的死菌活菌。

(5) IMS-PCR 检测技术。鉴于 PCR 技术灵敏度低这一缺点,将免疫磁珠与 PCR 结合,建立新的检测方法—免疫磁珠 PCR。用单增李斯特菌单抗包被磁珠,对样品进行前处理,然后将菌体进行富集裂解,设计引物进行 PCR,结果显示该方法特异性好,灵敏度高。李敏^[24]等利用该技术将带有单增李斯特菌 O 多抗的磁珠与检测样本充分结合,若样本中含有单增李斯特菌 O,免疫磁珠便与其发生特异性结合,通过富集纯化,然后借助 PCR 技术进行检测。此方法结合免疫磁性和 PCR 技术的优点如下:首先,利用免疫磁珠的抗原抗体反应,与单增李斯特菌快速结合,达到浓缩目的,缩短检测周期;其次,利用 PCR 方法良好的特异性克服了免疫磁珠在这方面的不足,提高检测效率;再次,利用免疫磁珠良好的敏感性,提高 PCR 方法的灵敏度。翁文川等^[25]将免疫磁分离技术与荧光 PCR 结合检测肉类中的单增李斯特菌,避免了常规 PCR 因污染而引起的假阳性,提高检测效率,缩短检验周期。王冰等^[26]建立了检测单增李斯特菌的改良分子信标荧光 PCR-磁捕获快速检测体系,该体系快速、灵敏度高,特异性强。

2 现阶段存在的问题

食品中病原菌检测主要考虑的是如何实现样品的快速准确检测。目前我国主要以传统检测方法为主,该方法耗时,工作量大,不能实现快速检测。如前所述,许多单增李斯特菌的快速检测方法已在研发,但目前大部分处于实验室阶段,尚未商品化。因为这些方法在实际应用中,尤其是准确性方面存在一些弊端:比如免疫学方法检测中某些死细胞会与免疫球蛋白结合,使检测结果呈假阳性;PCR 技术和探针杂交法也均不能分辨死菌活菌,因此阳性样本仍要用传统方法验证。尽管增菌可使死菌比例减小,减少假阳性结果,但并不能完全杜绝。RT-PCR 法虽然能较好的区分样品中的死菌活菌,准确率高,但是 RT-PCR 方法变数较大,不稳定。

综上,目前单增李斯特菌检测面临的主要问题是改进现有的快速检测方法或将已有的方法有机结合,建立一套快速、准确、简便的检测体系。此外,还需要降低检测成本,提高其实用性,这些

将是今后研究的重要内容。

参考文献:

- [1] Oevermann A, Zurbriggen A, Vandeveld M. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise[J]. *Interdisciplinary Perspectives Infectious Diseases*, 2010, 11(5): 142-168.
- [2] Freitag N C, Port G C, Miner M D. *Listerial monocytogenes* from saprophyte to intracellular pathogen[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 7(9): 623-637.
- [3] Jackson K A, Iwamoto M, Swerdlow D. Pregnancy-associated listeriosis [J]. *Epidemiol Infect*, 2010, 17: 1-7.
- [4] 刘秀峰, 江建真, 林萍. 单核细胞增生李斯特菌研究进展[J]. *海峡预防医学杂志*, 2010, 16(5): 23-25.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy-Massachusetts [J]. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2008, 57(40): 1097-1100.
- [6] Gilmour M W, Graham M, Domselaar G V, et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 120-135.
- [7] 刘秀梅, 杨洋, 陈伟伟, 等. GB/T4789.30-2008 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 段霞, 黄欣, 黄岭芳, 等. 双抗夹心 ELISA 方法检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌[J]. *食品科学*, 2010, 31(24): 272-276.
- [11] Feldsine P T, Lienau A H, Leung S C, et al. Method extension study to validate applicability of AOAC Official Method 996.14 Assurance polyclonal enzyme immunoassay for detection of *Listeria monocytogenes* and related *Listeria* spp. from environmental surfaces: collaborative study[J]. *J AOAC Int*, 2002, 85(2): 460-469.
- [12] 吕均, 郑华英. PCR 与 mini-VIDAS 相结合快速检测食品中单增李斯特菌[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(7): 1705-1706.
- [13] 熊国华, 于莉, 曹际娟, 等. 单增李斯特菌免疫胶体金试纸条快速检测[J]. *中国公共卫生*, 2008, 24 (2): 248-249.
- [14] 徐金亭, 李志清, 向军俭, 等. 单增李斯特菌免疫磁珠的制备研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(5): 323-327.
- [15] 华晓芳, 黄雪松. 食品中单增李斯特菌的检测新技术[J]. *食品科技*, 2007(6): 230-232.
- [16] Long F, Zhu X N, Zhang Z M, et al. Development of a quantitative polymerase chain reaction method using a live bacterium as internal control for the detection of *Listeria monocytogenes*[J]. *Diagn Micr Infec Dis*, 2008, 62(4): 374-381.
- [17] Kastbjerg G, Larsen H, Gram L. Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(1): 303-309.
- [18] Ollinger J, Bowen, B, Wiedmann M, et al. *Listeria monocytogenes* δ B modulates prfA-mediated virulence factor expression[J]. *Infect Immun*, 2009, 77(5): 2113-2124.
- [19] 王娉, 袁飞, 杨海荣, 等. 奶液模拟标本中单增李斯特 real-time PCR 检测方法的建立[J]. *卫生研究*, 2011, 40(6): 765-768.
- [20] 钱志伟, 孙新城. 食品中 3 种致病菌多重 PCR 检测体系的建立及初步应用[J]. *食品科学*, 2011, 32(16): 236-239.
- [21] K rouanton A, Marault M, Petit L, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping[J]. *J Microbiol Methods*, 2010, 80(2): 134-137.
- [22] 李秀敏, 王羽, 张先舟, 等. 环介导等温扩增技术快速检测单核细胞增生性李斯特氏菌的研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(24): 13122-13123; 13134.
- [23] 闫冰, 姜毓君, 曲妍妍, 等. 实时 RT-PCR 检测存活于乳中的单核细胞增多性李斯特菌[J]. *食品科学*, 2008, 9(2): 292-296.
- [24] 李敏, 孟瑾, 郑小平, 等. IMS-PCR 对食品中单增李斯特菌快速检测[J]. *乳业科学与技术*, 2010(3): 131-134.
- [25] 翁文川, 杨汝德, 焦红, 等. 免疫磁分离-荧光 PCR 应用在肉类单增李斯特氏菌的检测[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(6): 547-550.
- [26] 王冰, 扈庆华, 石晓路, 等. 产单核李斯特菌的改良分子信标荧光 PCR-磁捕获快速检测体系的建立[J]. *现代预防医学*, 2009, 36 (13): 2512-2514.