

单增李斯特氏菌 SureTect 实时 PCR 检测方法的比较研究

马云^{1*}, 王明鑑¹, 贾臻¹, 罗世芝², 王蕾¹

(1. 山东出入境检验检疫局, 青岛 266002; 2. 山东一品农产集团有限公司, 莱芜 271114)

摘要: **目的** 评估食品中单增李斯特氏菌 SureTect 实时 PCR 检测方法的性能。**方法** 按照 ISO 16140:2003/Amd 1:2011《食品和动物饲料微生物学-可替代方法的验证方案》的要求对该方法进行了实验室内的方法比较研究(即实验室内的验证)。**结果** 对于不同的食品类别, 该方法的相对准确性在 77%~85%之间, 相对特异性在 72%~83%之间, 相对灵敏度在 72%~91%之间, 相对检测限在 0.02~0.06 CFU/g。统计检验表明, 该方法与参照方法在相对准确性、相对特异性和相对灵敏度方面无显著性差异, 两种方法的相对检测限也无显著性差异。使用 50 株目标菌株和 30 株非目标菌株进行方法选择性实验, 两种方法检测结果均一致。**结论** 单增李斯特氏菌 SureTect 实时 PCR 检测方法是一种快速、准确和灵敏的检测方法。

关键词: 单增李斯特氏菌; Sure Tect 实时 PCR 检测方法; 方法验证; 方法比较研究

Comparison study on SureTect real-time PCR test methods for *Listeria monocytogenes*

MA Yun^{1*}, WANG Ming-Jian¹, JIA Zhen¹, LUO Shi-Zhi², WANG Lei¹

(1. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China;
2. Shandong YiPin Group CO. Ltd, Laiwu 271114, China)

ABSTRACT: Objective In order to validate the SureTect real-time PCR test for *Listeria monocytogenes* in food. **Methods** Comparison study was conducted between the method and the reference method detailed in National Standard GB 4789.30 Microbiological examination of food Hygiene-Examination of *Listeria monocytogenes* according to ISO 16140:2003/Amd:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs-protocol for the validation of alternative method. **Results** For different food categories, the relative accuracy of the method was between 77% and 85%, the relative specificity was between 72% and 83%, and the relative sensitivity was between 72% and 91%. The relative detection level was between 0.02 CFU/g and 0.06 CFU/g. Statistical tests proved that there were no significant difference between the relative accuracy of two methods for relative specificity, relative sensitivity and relative detection level. As to the selectivity, fifty target strains and thirty non-target strains were tested by the two methods. The results of the strains were congruent by the SureTect real-time PCR test. **Conclusion** Results proved that the SureTect *Listeria monocytogenes* assay is a rapid, accurate, and sensitive detection method.

KEY WORDS: *Listeria monocytogenes*; SureTect real-time PCR analysis; validation of methods; methods comparison study

*通讯作者: 马云, 硕士, 主要研究方向为微生物检测及科研。E-mail: yuan6152@163.com

*Corresponding author: MA Yun, Master, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Qingdao 266002, China. E-mail: yuan6152@163.com

1 引言

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)是一种人畜共患致病菌。该菌在自然界分布广泛,极易通过受污染的食品传播,感染人与动物引起食源性李斯特病,病死率高达30%~70%。单增李斯特氏菌病已被世界卫生组织列为20世纪90年代四大食源性疾病之一^[1-5]。长期以来,为了最大程度上降低食品中Lm污染风险,人们不断探索,开发了各种Lm的检测方法。目前,Lm的检测方法大致分三类,传统的分离培养法,免疫学方法和分子生物学方法^[6]。随着食品工业的快速发展,由于不能及时发现生产过程中的问题,传统方法已不适应生产的需要,迫切需要快速、准确的“可替代方法”(alternative methods)用于食品原料、加工过程以及终产品的实时检测。赛默科技 SureTect Lm 实时 PCR 检测方法(以下简称“SureTect 方法”)就是这样一种快速而简便的 Lm 检测的可替代方法。该方法采用了包括 Lm 目的基因和扩增内标的一套复合实时 PCR 检测体系,整个检测系统整合了预分装裂解液、冻干药片化的 PCR 试剂,以使检测过程操作简便和质量可控,再配以专用软件控制检测过程并显示 PCR 结果。

可替代方法需要与参照方法(基准方法)进行比较来证明其有效性,这个过程就是方法验证(validation of methods)。对于微生物检测的可替代方法的验证,国际上有明确的规范,例如:ISO 16140:2003/Amd 1:2011《食品和动物饲料微生物-可替代方法的验证方案》(以下简称“ISO 16140”)和《AOAC 国际方法委员会关于食品和环境表面微生物方法的验证指南》等,而且国际上的微生物检测方法在颁布标准之前大都经过广泛而深入的方法验证。但是,国内在方法验证方面还缺乏权威和系统的标准或规程,仅有关于试剂盒评价的行业标准 SN/T 2775-2011《商品化食品检测试剂盒评价方法》和 SN/T 2435-2010《出入境动物检疫诊断试剂盒质量评价规程》等,也未见有系统地进行食品微生物检测方法验证的相关报道,国内广大食品微生物检测人员对于如何做方法验证认识十分模糊。根据 ISO 16140,方法验证包括“实验室内的方法比较研究”(即实验室内的验证,或称“单实验室方法验证”)以及“实验室之间的协作研究”(即实验室间的验证)两大部分。协作研

究为获取检测方法的精密度数据,涉及多个(通常10个以上)实验室,在样品制备、组织协调、结果计算等方面更为复杂,实验室开展协作研究的可能性较小,在此不进行介绍。本研究以 ISO 16140 为验证依据,参照 GB 4789.30-2010《食品卫生微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验》(以下简称“GB 4789.30”),对 SureTect 方法进行全面的实验室内方法比较研究,希望为微生物检测方法的实验室内方法验证提供参考。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 菌株

菌株包括 Lm50 株和干扰菌 30 株。菌株来源包括:美国 Microbiologics 公司(ATCC 菌株)、中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)、中国医学细菌保藏管理中心(CMCC)和本实验室日常检测分离菌株。

2.1.2 主要仪器

生物安全柜,型号:SG603Aint,美国贝克公司;生化培养箱,型号:MIR-553,日本三洋公司;实时 PCR 仪,型号:SureTect,美国赛默飞世尔公司;恒温摇床,型号:Excella E25R,美国 New Brunswick Scientific。

2.1.3 培养基及试剂

单增李斯特氏菌增菌肉汤(LB1, LB2, LEB);李斯特氏菌显色培养基;胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂(TSA-YE);Lm 生化鉴定套装;血平板(以上试剂均购自北京陆桥技术有限责任公司);SureTect Lm PCR 配套试剂盒(美国赛默飞世尔科技公司);测试片(美国 3M 公司)。

2.2 方法

2.2.1 样品基质的制备

根据 ISO 16140 附表 B.1 选取肉、水产品、果蔬、乳品四大类食品为样品基质。样品均购自大型购物超市,无菌包装后 0~4℃ 运回,立即实验。

2.2.2 菌液的制备

菌株取自-80℃ 冰箱,经过活化,挑取单菌落在 TSA-YE 上 37℃ 过夜进行纯培养。挑取纯培养后的菌到 10 mL 的营养肉汤中,120 r/min 摇床培养 24 h。取 1 mL 菌液加入 9 mL 生理盐水中梯度稀释,备用,同时用 3M 细菌测试纸片计数菌液浓度。

2.2.3 相对准确性、相对特异性和相对灵敏度

无菌混匀的肉、水产品、果蔬和乳品各称取 60 份, 每份 50 g, 放于无菌均质袋中, 加入 50 mL 的 BPW 彻底混匀, 等分成 2 份。采用人工污染的方式制备样品, 样品的污染水平大约在 0~10 CFU/g。人工污染样品添加的阳性菌株选用标准菌株, 干扰菌株选取与目标菌相近的种属并且干扰菌的添加水平比阳性菌株高约一个数量级。每个样品添加 1 mL 稀释好的阳性菌液和 1 mL 干扰菌液。制备好的样品分别按 GB 4789.30 和 SureTect 两种方法进行检测。记录所有检测结果, 按下列公式计算 SureTect 方法相对准确性、相对特异性和相对灵敏度:

$$AC=\frac{(PA+NA)}{N}\times100\%$$
$$SP=\frac{NA}{N_-}\times100\%$$
$$SE=\frac{PA}{N_+}\times100\%$$

式中, AC 表示相对准确性;
SP 表示相对特异性;
SE 表示相对灵敏度;
PA 表示阳性符合(真阳性)的数目;
PD 表示阳性偏差(假阳性)的数目;
ND 表示阴性偏差(假阴性)的数目;
NA 表示阴性符合(真阴性)的数目;
N 是样品总数(NA+PA+PD+ND);
N₋是参照方法确定的阴性结果总数(NA+PD);
N₊是参照方法确定的阳性结果总数(PA+ND)。

按照 ISO 16140 附件 F 的统计检验方法判断两种方法的相对准确性、相对特异性和相对灵敏度是否一致。

2.2.4 相对检测限

混匀的肉、水产品、果蔬和乳品各称取 18 个样品, 每个样品 25 g, 放于无菌均质袋中。每类食品的 18 个样品平均分成 3 组, 每组接种不同水平的菌液形成低、中、高三个污染水平的样品。第一个水平是阴性对照(不接种 Lm)。第二个水平是理论上的检测限(大约 0.04 CFU/g)。第三个水平略高于理论检测限(大约 0.12 CFU/g)。每一个样品分别用两种方法进行检测。根据菌液的原始浓度换算出每个测试水平的菌液实际浓度。

相对检测限位于大约 50%检出水平的两个污染水平之间, 是一个范围。用 Fisher 确切概率法^[7]来检验每一水平两种方法间是否存在差异。

2.2.5 包含性和排它性

目标菌选取 50 株纯培养物, 同时选取 30 株与目标菌相近的菌和食品中天然存在的菌的纯培养物为非目标菌。每一株测试菌株接种到培养基中测试一次。目标菌的接种水平是 SureTect 方法相对检测限的 10 到 100 倍。当目标菌的测试结果假阴性时, 此菌株应该再测一次并且用 GB 4789.30 做对照。非目标菌的接种水平是估计样品中细菌的最大污染水平(约为 10⁵ CFU/g)。当非目标菌的 SureTect 方法测试结果假阳性或可疑时, 此菌株应该再用此法重测一次, GB 4789.30 不再测。

3 结果和讨论

3.1 相对准确性、相对特异性和相对灵敏度

相对准确性、相对特异性和相对灵敏度的结果见表 1。

表 1 SureTect 方法的相对准确性、相对特异性和相对灵敏度的计算
Table 1 Calculation of the relative accuracy, the relative specificity and the sensitivity of SureTect method

样品类别	SureTect 阳性	SureTect 阴性	GB 4789.30 阳性	GB 4789.30 阴性	阳性符合(真阳性, PA)	阳性偏差(假阳性, PD)	阴性偏差(假阴性, ND)	阴性符合(真阴性, NA)	相对准确性(AC)	相对特异性(SP)	相对灵敏度(SE)
肉	33	27	38	22	29	4	9	18	78%	82%	76%
水产品	37	23	35	25	30	7	5	18	80%	72%	86%
果蔬	30	30	36	24	26	4	10	20	77%	83%	72%
乳品	36	24	33	27	30	6	3	21	85%	78%	91%

从表 1 可以看出, 4 类食品的这 3 个指标看上去偏低, 最低的只有 72%, SureTect 方法的性能似乎并不突出。但是, 根据 ISO 16140, 由表 1 可得出 4 类食品都符合 $6 \leq Y(Y=PD+ND) \leq 22$ 的情况, PD 和 ND 中较小的值都大于 ISO 16140 附表 F.1 中的 M 值, 因此两种方法的相对准确性、相对特异性和相对灵敏度无显著性差异($\alpha<0.05$)。

ISO 16140 的附表 B.1 对各类别(categories)食品的不同种类(types)可能污染的微生物指标做出了归纳, 方法验证时应针对微生物种类优先选取其对应的食品类别中推荐的种类。本研究选取了所有食品类别为代表进行验证, 因此验证结果适用于所有食品类别。

3.2 相对检测限

根据测试片计数结果推算, 第一个水平接种浓度是 0 CFU/g, 第二个接种水平的浓度约是 0.02 CFU/g, 第三个水平的接种浓度约是 0.06 CFU/g。由于第一个水平出现了全部阴性的结果不能用于相对检测限, SureTect 方法的相对检测限位于第二个水平和第三个水平之间。

相对检测限的实验结果如下表 2。

表 2 中所有 P 值都大于 0.05, 因此在 $\alpha=0.05$ 水平, 对于所有 4 类食品类别, 两种方法的相对检测限都无显著性差别。4 类食品基质对检测限几乎没有影响。

吴晓芳等^[8]采用荧光定量 PCR 检测 Lm, 发现检测限是 19 CFU/mL。李盛丰等^[9]采用单个 PCR、多重 PCR 和套式 PCR 等方法检测 Lm, 发现检测限分别是 10^3 CFU/mL、 10^4 CFU/mL 和 10^2 CFU/mL。王海艳等

^[10]采用普通 PCR 法检测人工污染 Lm 的消毒奶、冰淇淋、酸奶、熟肉和香肠, 发现这 5 种食品的检测限是 1 CFU/25 g, 在原奶和生肉中的检测限分别为 1~10 CFU/25 g 和 25 CFU/25 g。巢国祥等^[11]采用普通 PCR 法检测人工污染 Lm 的生猪肉、水和牛奶, 发现检测限是 10 CFU/25 g。邵美丽等^[12]采用 TaqMan 探针实时定量 PCR 检测人工污染 Lm 的生鲜猪肉, 发现检测限是 2.8×10^2 CFU/g。徐伟等^[13]采用多重 PCR 技术检测人工污染的脱脂灭菌乳, 发现检测限是 2 CFU/25 mL。SureTect 方法的相对检测限明显优于上述方法。其检测限在 0.02~0.06 CFU/g 之间意味着, 只要 25 g 样品中 Lm 达到 $0.5(0.02 \times 25) \sim 1.5(0.06 \times 25)$ CFU, Lm 就能够在 LEB 中成功增殖, 一旦增殖成功, 只需要吸取很少的量就可以被 SureTect 实时 PCR 方法检出。

3.3 包含性和排他性

50 株目标菌和 30 株非目标菌检测结果如下表 3。

从上表结果可以看出, 在包含性和排他性实验中, 两种方法的检测结果一致。

3.4 结 论

依据 ISO 16140, SureTect 单增李斯特氏菌实时 PCR 检测方法与 GB 4789.30 在相对准确性、相对特异性和相对灵敏度、相对检测限、包含性和排他性等指标上性能一致。因此, SureTect 单增李斯特氏菌实时 PCR 检测方法是一种准确、灵敏、快速和方便的检测方法, 适用于各种食品基质。此次实验室内方法比较研究可以为微生物检测方法的验证工作提供参考。

表 2 相对检测限
Table 2 Relative detection level

样品	第一个水平					第二个水平					第三个水平				
	SureTect		GB 4789.30		Fisher 确切概率 检验 P 值	SureTect		GB 4789.30		Fisher 确切概率 检验 P 值	SureTect		GB 4789.30		Fisher 确切概率 检验 P 值
	阴性	阳性	阴性	阳性		阴性	阳性	阴性	阳性		阴性	阳性	阴性	阳性	
肉	6	0	6	0	1.00	4	2	2	4	0.57	3	3	2	4	1.00
水产品	6	0	6	0	1.00	2	4	4	2	0.57	1	5	2	4	1.00
果蔬	6	0	6	0	1.00	5	1	4	2	1.00	2	4	3	3	1.00
乳品	6	0	6	0	1.00	4	2	3	3	1.00	3	3	2	4	1.00

表3 包含性和排他性数据表
Table 3 Data of inclusivity and exclusivity

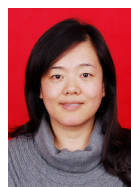
	GB 4789.30	SureTect
目标菌 50 株	50 个阳性	50 个阳性
非目标菌 30 株	30 个阴性	30 个阴性

参考文献

- [1] 刘桂华, 乔风, 黄鑫, 等. 食品中单增李斯特菌 PCR 检测方法建立与评价[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(1): 60–61.
Liu GH, Qiao F, Huang X, et al. Establishment of PCR method for *Listeria monocytogenes* in food[J]. Chin J Public Health, 2007, 23(1): 60–61.
- [2] 刘仲敏, 郑鸣, 王永芬. 食源性单增李斯特菌的实时定量 PCR 检测[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(5): 100–104.
Liu ZM, Zheng M, Wang YF. Study on detection of food-borne *Listeria monocytogene* by the real-time quantitative PCR[J]. Food Ferment Ind, 2007, 33(5): 100–104.
- [3] 杨松, 曲祖乙, 刘永华. 单增李斯特氏菌定量检测方法研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(23): 85–89.
Yang S, Qu ZY, Liu YH. Detection of *Listeria monocytogenes* by real-time fluorescent PCR Assay[J]. Chin Agric Sci Bull, 2012, 28(23): 85–89.
- [4] 徐德顺, 吴晓芳, 程平庆. 实时荧光定量 PCR 与常规 PCR 法及细菌培养法检测单增李斯特菌的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(5): 861–863.
Xu DS, Wu XF, Cheng PQ. Comparison of real-time fluorescence PCR with PCR and bacterium culture in detection of *Listeia monocytogenes*[J]. Chin J Health Lab Technol. 2007, 17(5): 861–863.
- [5] 吴平芳, 贺连华, 王冰, 等. 深圳市食品中单核细胞增生性李斯特菌的污染状况调查[J]. 中国热带医学, 2005, 5(3): 593–594.
Wu PF, He LH, Wang B, et al. Investigation of the contamination status of food with *Listeria monocytogenes* in Shenzhen city[J]. China Tropical Med, 2005, 5(3): 593–594.
- [6] 宋丽娟, 侯浩. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌检测技术方法进展[J]. 中外健康文摘, 2013, 10(15): 112.
Song LJ, Hou H. Progress on detection methods of technology of *Listeria monocytogenes* in food[J]. World Health Digest Med Periodical, 2013, 10(15): 112.
- [7] Hubaux A, Vos G. Decision and detection limits for linear calibration curves[J]. Anal Chem, 1970, 42(8): 849–855.
- [8] 吴晓芳, 徐德顺. 两种方法检测单增李斯特菌的比较研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2008, 14(2): 62–64.
Wu XF, Xu DS. Comparative study of two methods for dection of *Listeria monocytogenes*[J]. Strait J Prev Med, 2008, 14(2): 62–64.
- [9] 李盛丰, 赵姣, 钟名华, 等. 单增李斯特不同 PCR 快速检测方法比较[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(8): 1021–1023.
Li SF, Zhao J, Zhong MH, et al. Comparison of three rapid PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes*[J]. Chin J Public Health, 2008, 24(8): 1021–1023.
- [10] 王海艳, 刘中学, 刘虹, 等. 食品中单增李斯特菌快速、敏感、特异 PCR 检测方法的建立[J]. 检验检疫科学, 2006, 16(1): 3–6.
Wang HY, Liu ZX, Liu H, et al. Establishment of a rapid sensitive and specific PCR detection method of *Listeria monocytogenes* in food[J]. Inspection Quarantine Sci, 2006, 16(1): 3–6.
- [11] 巢国祥, 徐勤, 周晓辉, 等. 单核细胞增生性李斯特 PCR 快速检测方法建立及应用[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(9): 797–799.
Chao GX, Xu Q, Zhou XH, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR[J]. Chin J Zoonoses, 2004, 20(9): 797–799.
- [12] 邵美丽, 刘思国, 赵燕丽, 等. TaqMan 探针实时定量 PCR 检测肉中单增李斯特菌的研究[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(8): 1–5.
Shao ML, Liu SG, Zhao YL. et al. Real-time TaqMan PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in meat [J]. J Northeast Agric Univ, 2012, 43(8): 1–5.
- [13] 徐伟, 刘军, 李素芳. 单增李斯特菌与志贺氏菌多重 PCR 检测技术的建立[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 201–207.
Xu W, Liu J, Li SF. The development of multiplex PCR technique for detection of *Listeria monocytogenes* and shigella[J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2009, 9(1): 201–207.

(责任编辑: 邓伟)

作者简介



马云, 硕士, 主要研究方向为微生物检测及科研。

E-mail: yuan6152@163.com