

实时定量荧光 PCR 快速鉴定食品中单核细胞增生李斯特氏菌

刘万静¹, 刘斌², 李湘平², 李海燕², 石红¹, 吴友伟¹, 答嵘^{1*}

(1. 西安交通大学第一附属医院检验科, 西安 710061; 2. 安康市疾病预防控制中心生物检验科, 安康 725000)

摘要: **目的** 建立实时定量荧光 PCR 法(real-time PCR)快速鉴定食品中的单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, LM)。**方法** 选取 2016 年国家食品风险监测样本 134 例与模拟灭活 LM 样本 10 例, 采用 GB/T4789.30-2010 与 real-time PCR 方法同步检测单核细胞增生李斯特氏菌。**结果** 共检测食品 134 份, 包括肉制品、水产品、快餐和即食食品等。共检出 8 株 LM, 检出率为 5.97%。以 GB/T4789.30-2010 为金标准判断, real-time PCR 方法检测样本中 LM 的灵敏度与特异性均达到 100%。模拟灭活 LM 样本 real-time PCR 方法检出率为 100%, 标准法检出率为 0%。**结论** 本方法可以简化实验程序, 减少工作量, 节约检测试剂, 为可能发生的食物中毒尽早提供实验依据。

关键词: 单核细胞增生李斯特氏菌; 实时定量荧光 PCR; 食品

Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food by real-time PCR

LIU Wan-Jing¹, LIU Bin², LI Xiang-Ping², LI Hai-Yan², SHI Hong¹, WU You-Wei¹, DA Rong^{1*}

(1. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. Department of Microbiology Laboratory, Center for Disease Control and Prevention of Ankang, Ankang 725000, China)

ABSTRACT: Objective To establish the method for rapid identification of *Listeria monocytogenes* (LM) in food by real-time PCR. **Methods** One hundred and thirty-four cases of national food risk monitoring samples in 2016 and 10 cases of simulated inactivated LM samples were simultaneously detected by GB/T4789.30-2010 method and real-time PCR method. **Results** A total of 134 samples of food including meat products, aquatic products, fast food and instant food etc. were enrolled. Totally 8 strains of LM were detected and the detection rate was 5.97 %. Using GB/T4789.30-2010 as the gold standard, the sensitivity and specificity of real-time PCR were both up to 100%. In 10 samples of simulated inactivated LM, the detection rate of real-time PCR method was 100%, but that of the standard method was 0%. **Conclusion** The established real-time PCR method can simplify the experiment procedure, reduce the workload and save the reagent, which can provide experimental basis for probable food poisoning as early as possible.

KEY WORDS: *Listeria monocytogenes*; real-time PCR; food

*通讯作者: 答嵘, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为病原微生物诊断。 E-mail: da_rong@163.com

*Corresponding author: DA Rong, Ph.D, Professor, Postgraduate Tutor, Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China. Email: da_rong@163.com

1 引 言

2002 年, WHO 将单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, LM)列为“四大食源性致病菌”之一^[1]。它可引起食物中毒, 在自然界广泛存在并具有在冷藏温度下繁殖的生物学特性。LM 是胞内条件致病菌, 能够穿越肠系膜、血脑屏障、胎盘屏障, 在免疫功能下降的个体能够引起血流感染、中枢神经系统感染, 并会引起孕妇流产、早产甚至胎儿死产等严重后果^[2]。

目前检测 LM 的方法为食品安全国家标准 GB/T 4789.30-2010^[3]《食品微生物学检验 LM 检验方法》, 标准程序至少需要 4~5 d, 操作繁琐复杂。实时定量荧光 PCR(real-time PCR)是近年来迅速发展并广泛应用于临床实验室的分子生物学技术, 由于其具有高敏感性与特异性, 能够快速、准确地检测病原体的存在。本研究采用 real-time PCR 技术与 GB4789.30-2010 标准方法同步检测食品样本与模拟灭活 LM 样本中的 LM, 旨在为采用 real-time PCR 技术进行食品卫生 LM 检验提供依据。

2 材料与方法

2.1 材料来源

按照国家食品风险监测的要求采样, 选取安康市疾病预防控制中心生物检验科 2016 年 4 月到 2016 年 9 月检验标本共计 134 份, 包括肉制品、水产品、快餐和即食食品等。

2.2 仪器与试剂

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); LM Real-time PCR 试剂盒(上海之江生物公司); VITEK 2 GP 鉴定卡(法国梅里埃生物公司)。

李氏增菌肉汤(LB1、LB2)、萘啶酮酸(P-18C1、P-18C2)和丫啶黄素(P-19C1、P-19C2)(北京路桥技术有限公司); 单增李斯特菌显色平板(郑州博赛生物有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 标准组

样本参照国家标准 GB/T 4789.30-2010^[3]《食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》进行。

2.3.2 实验组

取标准组的第一次增菌液 1.5 mL 于 1.5 mL EP 管中, 沸水浴 10 min, 以 13000 r/min 离心 5 min, 弃去上清。加入无菌双蒸水 50 μ L 涡旋振荡混匀, 13000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行 real-time PCR 扩增, 扩增体系与条件按照试剂盒说明书进行, 实验中采用试剂盒阳性质控物与阴性质控物进行质量控制。该检测试剂盒最低检测限为 10³ copies/mL, 线性检测范围为 2 $\times$ 10³~1 $\times$ 10⁸ copies/mL。

2.3.3 模拟灭活 LM 标本

取已鉴定的 LM 进行模拟实验, 将 10 株 LM 分别用无菌生理盐水制备成 0.5 麦氏单位的菌悬液。沸水浴 10 min 灭活, 分别取上述菌悬液 5 μ L 加入 225 mL 无菌生理盐水中, 分别按照实验组方法与标准组方法进行检测。

3 结果与分析

3.1 不同种类食品中 LM 的检测

本实验检测食品 134 份, 其中共检出 8 株 LM, 检出率为 5.97%(见表 1)。

表 1 不同种类食品的 LM 检出情况
Table 1 Detection of LM in different kinds of food

食品种类	数量(份)	LM(株)	检出率(%)
散装熟肉制品	27	3	11.11
冷冻饮品	20	1	5.00
动物性淡水产品(鱼、虾、贝)	9	0	0.00
动物性海水产品(鱼、虾、贝)	5	2	40.00
地方食品-凉拌米、面皮	26	2	7.69
街头快餐(米饭和菜为主)	32	0	0.00
学校周边即食儿童食品	15	0	0.00
总计	134	8	5.97

3.2 样本检测

对 134 份样本分别采用 real-time PCR 方法与 GB 标准方法进行检测, 2 种方法检测结果的一致率为 100%。以 GB/T4789.30-2010 为标准判断, real-time PCR 方法检测样本中 LM 的灵敏度与特异度均达到 100%(见表 2)。

表 2 Real-time PCR 对样本中 LM 的检测结果
Table 2 Detection results of LM in the samples by real-time PCR

real-time PCR	GB 4789.30-2010		总计(例)
	阳性(例)	阴性(例)	
阳性	8	0	8
阴性	0	126	126
合计	8	126	134

3.3 模拟灭活 LM 标本检测

将 10³ CFU/mL 浓度菌液制备的 10 份模拟样本进行加热灭活后, 采用 real-time PCR 方法与标准方法进行检测。real-time PCR 方法检出率为 100%, 标准方法检出率为 0%(见表 3)。由表 3 结果分析, real-time PCR 只能识别目的基因, 只要存在一定量的目的基因就可以被检测到; 标准方法只能检测活菌, 因此对于模拟灭活标本检测不出来。

表3 Real-time PCR 对模拟灭活 LM 样本中的检测结果
Table 3 Detection results of simulated inactivated LM samples by real-time

real-time PCR	GB 4789.30-2010		总计(例)
	阳性(例)	阴性(例)	
阳性	0	10	10
阴性	0	0	0
合计	0	10	10

4 讨论

4.1 样本的 LM 检出率结果分析

LM 广泛存在于多种食物中,是引起食物污染的重要因素^[4,5]。我国食品中 LM 污染较为严重,约在 10%左右。各地污染率不尽相同,部分地区可达 20%。动物亦存在带菌现象,因而具有爆发性流行的风险^[6]。前期调查显示,安康市 2012~2014 年 LM 在食品中的污染率为 3.21%^[7]。本研究对 2016 年 4 月到 8 月的食品样本进行检测,LM 检出率为 5.97%,安康市食品中 LM 污染率低于平均污染率。可能引起本市 LM 食物污染的食品为散装熟肉制品、凉拌米面皮,因为该类食品可直接使用,同时符合地域饮食习惯,食用范围较广。动物性海水产品中 LM 分别来自秋刀鱼和小黄鱼。冷冻饮品中也有 LM 污染的发生。针对食品中 LM 的检测,按照国标 GB/T4789.30-2010 的标准程序,至少需要 4 d,这仅仅针对的是阴性标本;若是阳性标本至少 6~7 d。为提高实际检测工作的时效性,本研究将 real-time PCR 技术应用于 LM 的检测。

4.2 real-time PCR 方法与 GB/T4789.30-2010 测定样品的结果比较

本研究对 134 份样本分别采用 RT-time PCR 方法与标准方法进行同步检测,两种方法检测结果的一致率为 100%。以 GB/T4789.30-2010 为标准判断,RT-time PCR 方法检测样本中 LM 的灵敏度与特异性均达到 100%。本研究选取的标本量足够大、涉及范围广,能够说明实验方法的广泛适用性。研究结果表明,real-time PCR 阴性的标本培养一定为阴性,因此二次增菌、分离培养、细菌生化鉴定等操作无需进行,24 h 左右即可确定 LM 是否存在,同时缩小实验室检测的范围,而且可以节省大量的后续试剂,在实现经济价值的同时,减轻了实验操作者的工作量。

4.3 real-time PCR 方法阳性样品结果的分析

王晓梅、梁暄等^[8,9]报道的 PCR 检测为阳性的标本,培养分离为阴性的占一定比例。本研究利用模拟灭活 LM 标本进行检测,结果标准方法全部为阴性,real-time PCR 全部阳性。出现上述情况,是由于标本中含有死亡的目的菌基因。基于此原因,在检测中利用 PCR 的快速、灵敏的特

点,可在检测的 24 h 左右为后续的实验操作提供参考。由于存在 PCR 阳性、培养阴性的问题,所以针对 PCR 阳性这类标本继续按照标准组程序培养,在分离培养时平行接种 2 块平板,以增加分离的准确性,同时使 real-time PCR 和培养结果相互验证,增加实验的可靠性。

4.4 食物中致病菌检测的其他方法展望

对于食物中毒标本,若采取加少量生理盐水,取洗脱液接种或离心提取核酸的方法进行检测,这样在 24 h 或 2~3 h 就可初步进行疫情预测。同时针对 PCR 阳性、常规培养阴性的问题,可以采用基于 mRNA 反转录 PCR 技术,该技术可以区分活菌和死菌^[10-12],若利用此技术则可在 4~6 h 确定可疑标本中有无目标菌。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)可在 1 h 左右完成目的基因扩增^[13,14];相比 real-time PCR,实验时间节约一半左右。多重 PCR 可以同时检测 2 种以上的目的基因^[15,16],相比 real-time PCR 检测效率更高,更适合处理食物中毒应急事件。姜侃等^[17]报道了采用三重 LAMP 法检测食品中沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌,一个反应体系可测以在 1 h 内检测 3 种致病菌。伴随上述实验技术的成熟,必将更加高效、精准地应用于食物中致病菌检测及食物中毒事件的处置。

5 结论

本研究证实了 real-time PCR 方法的有效性,通过应用改进的实验方法,可以对疑似 LM 污染的食物或由其引起的食物中毒 36 h 左右预报或排除;PCR 阳性既可以起到导向作用,又可以缩小实验范围。PCR 阴性的标本则直接报告未检出,节约了后续二次增菌、培养分离平板等试剂,同时为实验者减轻了工作量。

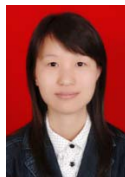
参考文献

- [1] 赵一鸣. 三种分型技术对食源性单增李斯特菌分型研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
Zhao YM. Study on the classification of food-borne *Listeria monocytogenes* by three typing techniques [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015.
- [2] Wing EJ, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update [J]. J Infect Dis, 2002, 185(Suppl 1): 18-24.
- [3] GB/T4789.30-2010 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S].
GB / T4789.30-2010 *Listeria monocytogenes* test [S].
- [4] Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV. Epidemiology of human listeriosis [J]. Clin Microbiol Rev, 1991, 4: 169-183.
- [5] Kusunoki K, Jin M, Iwaya M, et al. *Salmonella* contamination in domestic raw chickens in Tama, Tokyo and serovar or drug-resistance of isolates (1992-1999) [J]. Japan J Food Microbiol, 2000, 17: 207-212.
- [6] 王艳. 模拟标本中单增李斯特菌 real-time PCR 检测方法的建立及单增李斯特菌多位点序列分析[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2009.
Wang Y. Establishment of *Listeria monocytogenes* real-time PCR assay

- and multiple sequence analysis of *Listeria monocytogenes* in mock samples [D]. Beijing: China Center for Disease Control and Prevention, 2009.
- [7] 刘万静, 刘斌, 李湘平, 等. 2012-2014 年安康市食品风险监测概况[J]. 食品与发酵科技, 2016, 52(4): 72-74.
- Li WJ, Liu B, Li XP, et al. An overview of food risk monitoring in Ankang city from 2012 to 2014 [J]. Food Ferment Technol, 2016, 52(4): 72-74.
- [8] 王晓梅, 王多春, 阚斌, 等. 实时聚合酶链反应检测 01 群和 0139 群霍乱弧菌方法的建立及应用[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(8): 768-771.
- Wang XM, Wang DC, Kan B, et al. Development and application of real-time polymerase chain reaction for detection of 01 groups and 0139 *Vibrio cholerae* method [J]. Chin J Epidemiol, 2007, 28(8): 768-771.
- [9] 梁暄, 李柏生, 牟成惠, 等. 实时荧光 PCR 技术检测珠江水霍乱弧菌[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(8): 2000-2001.
- Liang X, Li BS, Mou CH, et al. Real-time fluorescence PCR detection of cholera in the Pearl River water [J]. J Southern Med Univ, 2010, 30(8): 2000-2001.
- [10] 罗予, 李杰, 刘娜. RT-PCR 检测金黄色葡萄球菌[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(8): 714-716.
- Luo Y, Li J, Liu N, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* by RT-PCR [J]. Chin J Microecol, 2011, 23(8): 714-716.
- [11] Sheridan GEC, Masters CI, Shallcross JA, et al. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(4): 1313-1318.
- [12] Nancy R, Geert J, Lieve H. Messenger RNA-based RT-PCR detection of viable *Salmonella* [J]. Int Dairy J, 2002, 6(12): 233-238.
- [13] 韩小龙. 基于 LAMP 法分离贝类中致病性副溶血弧菌及其生长模型的建立[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- Han XL. Establishment of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* and its growth model in seashells based on LAMP method [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- [14] 李红梅, 江晓, 刘助红, 等. 白班综合症病毒实时荧光 LAMP 检测方法的建立及应用[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 142-148.
- Li HM, Jiang X, Liu ZH, et al. Establishment and application of real time fluorescence lamp assay for white spot syndrome virus [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2015, 39(1): 142-148.
- [15] 蒋蔚, 易力, 陈永军, 等. 水产品中霍乱弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国动物传染病学报, 2016, 24(1): 44-51.
- Jiang W, Yi L, Chen YJ, et al. Establishment of multiplex PCR detection method for *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in aquatic products [J]. China J Anim Infect Dis, 2016, 24(1): 44-51.
- [16] 张网, 白向宁, 赵爱兰, 等. 多重 PCR 方法鉴定六类致泻性大肠埃希菌和志贺菌[J]. 疾病监测, 2016, 31(5): 416-421.
- Zhang W, Bai XN, Zhao AL, et al. Determination of six diarrheogenic *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* by multiplex PCR [J]. Dis Surveill, 2016, 31(5): 416-421.
- [17] 姜侃, 吕沁风, 汪新, 等. 三重 LAMP 法检测食品中沙门氏、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌[J]. 食品科学杂志, 2013, 34(24): 182-187.
- Jiang K, Lv QF, Wang X, et al. Detection of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in food by triple LAMP method [J]. Food Sci, 2013, 34(24): 182-187.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



答 嵘, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为病原微生物诊断。
E-mail: da_rong@163.com



刘万静, 硕士研究生, 检验师, 主要研究方向为微生物学研究。
E-mail: 137787975@163.com