

实时荧光 PCR 法和国标法检测乳粉中 单增李斯特菌的比较研究

林玉双, 蓝福胜, 廖燕萍, 刘晓玲, 周双辉*

(福建省食品药品质量检验研究院, 福州 350001)

摘要: **目的** 探究实时荧光 PCR 法是否可用于实验室乳粉中单增李斯特菌的检测。**方法** 依据 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》和能力验证作业指导书对乳粉中单增李斯特菌进行检测。利用实时荧光 PCR 法(real-time fluorescent polymerase chain reaction, RT-PCR)对能力验证中的 2 个样品进行快速检测, 同时采用 VITEK2 Compact30 全自动微生物鉴定系统对国标法中挑取的可疑菌落进行鉴定, 比较国标法和 RT-PCR 法的检测结果。**结果** RT-PCR 法和国标法对 2 个样品的检测结果一致, 即样品 CODE: FC02220028 检出单增李斯特菌, 样品 CODE: FC02220098 未检出单增李斯特菌。**结论** RT-PCR 法可用于实验室乳粉中单增李斯特菌的检测。

关键词: 乳粉; 单增李斯特菌; 实时荧光 PCR 法

Comparative study for detection of *Listeria monocytogenes* by real-time fluorescent polymerase chain reaction and national standard method in milk powder

LIN Yu-Shuang, LAN Fu-Sheng, LIAO Yan-Ping, LIU Xiao-Ling, ZHOU Shuang-Hui*

(Fujian Institute for Food and Drug Quality Control, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: Objective To explore whether real-time fluorescent polymerase chain reaction(RT-PCR) method can be used to detect *Listeria monocytogenes* from milk powder in laboratory. **Methods** *Listeria monocytogenes* testing was carried out according to GB 4789.30-2016 *National food safety standard-Food microbiological examination-Listeria monocytogenes* and ability verification guidance book. RT-PCR method was used for testing the 2 samples, and suspicious strains of 2 samples were identified by automatic microbial identification system VITEK2 Compact 30. Then the results of national standard method and RT-PCR method were compared. **Results** Both national standard method and RT-PCR method proved that *Listeria monocytogenes* was detected in CODE: FC02220028, not detected in CODE: FC02220098. **Conclusion** RT-PCR method can be used to detect *Listeria monocytogenes* from milk powder in laboratory milk powder.

KEY WORDS: milk powder; *Listeria monocytogenes*; real-time fluorescent polymerase chain reaction

*通讯作者: 周双辉, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: 675161367@qq.com

*Corresponding author: ZHOU Shuang-Hui, Master, Pharmacists, Fujian Institute for Food and Drug Quality Control, No.330, Tonghu Road, Gulou District, Fuzhou 350001, China. E-mail: 675161367@qq.com

1 引言

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*), 简称单增李斯特菌, 运动性革兰氏阳性短杆菌, 生长温度为 $-1.5\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 兼性厌氧, 耐冷、耐盐、耐干燥, 是人畜共患病原菌之一^[1]。该菌广泛存在于自然界中, 可通过污染冰箱^[2]、储奶罐^[3]、即食食品^[4]等途径感染老人、儿童、孕妇等免疫力低下人群, 感染者会出现发热、头痛、胃肠不适等症状, 可能引发败血症或脑膜炎^[5-7]。单增李斯特菌不仅会导致疾病发生, 严重时还会引起感染者死亡, 致死率为 $20\%\sim 30\%$ ^[8], 故食品中单增李斯特菌的检测显得尤为重要。

目前, 食品中单增李斯特菌的标准检测方法有 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》^[9]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》^[10]。其他方法有: 基于核酸检测的分子生物学法^[11,12]、基于特有蛋白的免疫学法^[13-15]、基于信号转换的生物传感器法^[16]、基于振动光谱的检测技术^[17]以及多技术联合法。国标检测法是各实验室普遍采用的方法, 它根据单增李斯特菌的生长特点和生化特性, 经过前增菌-增菌-选择培养基分离纯化和生化鉴定, 方法准确可靠, 但工序较繁琐, 检测周期约为 $4\sim 7\text{ d}$, 耗时较长, 影响检测时效。实时荧光 PCR 法(real-time fluorescent polymerase chain reaction, RT-PCR)是基于单增李斯特菌毒力基因的保守序列设计双向引物和荧光探针, 特异性强、灵敏度高, 模板既可以是纯化的 DNA, 又可以是菌液或菌落^[18], 检测周期以分钟计。

为了增加实验室乳粉中单增李斯特菌的检测手段、缩短检测时长、快速对可疑样品做出结果预判, 本研究采用 RT-PCR 法检测乳粉样品中单增李斯特菌, 以国标法的检测结果为对照, 验证 RT-PCR 法是否可用于实验室乳粉中单增李斯特菌的检测。

2 材料与方法

2.1 样品来源

编号为 NIFDC-PT-248 的能力验证样品 2 个, 编码为 CODE: FC02220028、CODE: FC02220098 的铝箔袋乳粉样品(各 25 g, 以下简称 CODE 28、CODE 98)以及相同编码的密封西林瓶菌球(白色小球), 均由中国食品药品质量检定研究院提供。

2.2 主要仪器与试剂

IC812C 恒温培养箱(重庆雅马拓科技有限公司); KB240 恒温培养箱(德国宾得公司); Sigma 3K30 冷冻离心机(北京五洲东方科技发展有限公司); JULABO SW23 恒温水浴槽(德国优莱博公司); QuantStudio 7Flex 荧光定量 PCR

仪(美国 Applied Biosystems 公司); VITEK2 Compact30 全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃公司)。

李斯特菌选择性 LB₁ 增菌液、LB₂ 增菌液(*Listeria enrichment broth*)、单增李斯特菌显色培养基 CRM013 (chromogenic *Listeria monocytogenes* agar)(以下简称李显培养基)+单增李斯特氏菌显色培养基配套试剂 SR0480、PALCAM 琼脂基础(palcam arar base)、含 0.6%酵母膏的胰酪胨大豆琼脂 TSA-YE(tryptic agar with 0.6% yeast extract)、血平板(blood agar plate)、鼠李糖 075110、木糖 075070(广东环凯生物科技有限公司)。

单增李斯特菌荧光定量 PCR 试剂盒(北京陆桥技术股份有限公司); VITEK2 Compact 革兰氏阳性细菌鉴定卡(法国生物梅里埃公司)。

2.3 实验方法

依据 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》^[9]第一法和作业指导书的要求进行增菌。增菌液经实时荧光 PCR 法快速检测, 同时进行李显平板和 PALCAM 平板分离, 选取可疑菌落进行木糖和鼠李糖发酵以及溶血实验, 最后利用全自动微生物鉴定系统 VITEK2 Compact30 对疑似菌进行鉴定, 综合以上实验结果出具检测报告。期间, 以单增李斯特菌 ATCC19115 作为阳性对照菌进行阳性对照实验。

2.3.1 样品处理

在二级生物安全柜内开启西林瓶, 将瓶内菌球加入到 225 mL LB₁ 增菌液中, 充分溶解, 再将与西林瓶相同编码的奶粉样品 25 g 加入到上述 LB₁ 增菌液中, 充分均质混匀。

2.3.2 二次增菌

将上述 LB₁ 增菌液, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h; 移取 0.1 mL 培养物转种于 10 mL LB₂ 增菌液中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。

2.3.3 实时荧光 PCR

取增菌液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 10000 g 离心 2 min, 弃去上清, 取沉淀加入 200 μL 裂解液, 涡旋混匀, $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ 裂解 10 min, 12000 g 离心 2 min, 取上清即为模板。取 23 μL 反应液和 2 μL 模板配制反应, 混匀, 离心。经 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min 预变性, 以 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s 作为一个循环, 35 个循环。荧光通道选择 FAM 和 VIC(FAM 为检测通道, VIC 为对照通道)。

2.3.4 分离初筛

取 LB₂ 二次增菌液划线接种于 PALCAM 琼脂平板和李显培养基上, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24~48 h, 观察生长的菌落, 挑取可疑菌落进行木糖、鼠李糖发酵和溶血实验, 同时在 TSA-YE 平板上划线, 于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。

2.3.5 鉴定

取初筛菌落的 TSA-YE 平板纯培养物, 以及单增李斯特菌标准菌株染色镜检后, 分别制成 $0.5\sim 0.63$ 浊度的菌悬

液, 使用 VITEK2 Compact30 全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定(GP 鉴定卡)。

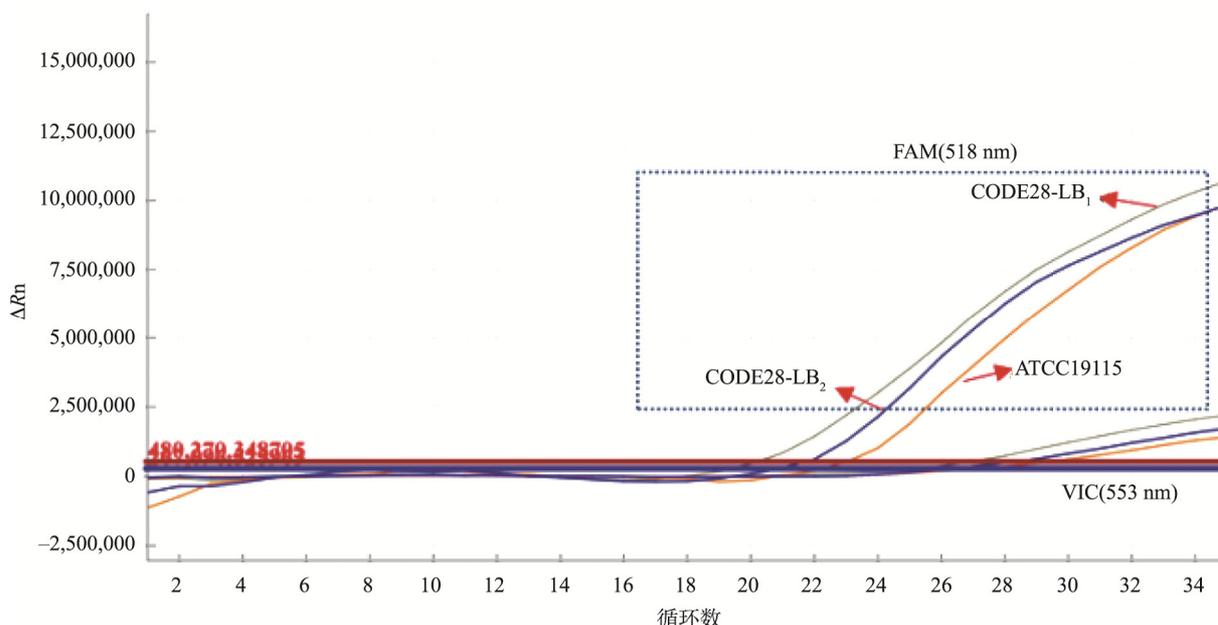
3 结果与分析

3.1 实时荧光 PCR

样品按 2.3.3 方法进行实时荧光 PCR 检测, 每个样品做 2 个平行管。若阳性对照管 FAM (518 nm)通道有

扩增, VIC (553 nm)通道有无扩增均可, 而阴性对照管 FAM (518 nm)通道无扩增, VIC (553 nm)通道有扩增, 则本次实验结果有效。

如图 1 所示, 对照 ATCC19115 和样品 CODE28 在 FAM 和 VIC 均有扩增, 而样品 CODE98 在 FAM 无扩增, VIC 有扩增(见图 2)。因此, 报告样品 CODE28 为阳性, 样品 CODE98 为阴性。



注: ΔRn 指 Rn 扣除基线后得到的标准化结果($\Delta Rn=Rn$ -基线), Rn 是荧光报告基团的荧光发射强度与参比染料的荧光发射强度的比值。下同。

图 1 样品 CODE28 扩增曲线
Fig.1 Amplification curve of sample CODE28

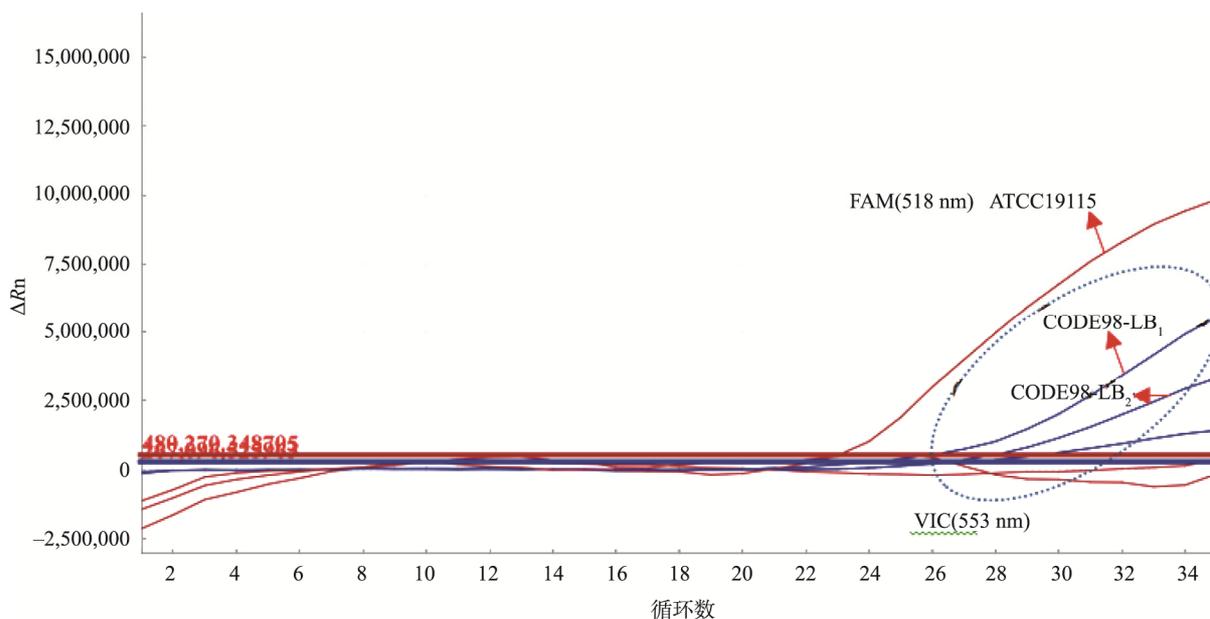


图 2 样品 CODE98 扩增曲线
Fig.2 Amplification curve of sample CODE98

3.2 分离初筛

2 份样品的增菌液在 PALCAM 琼脂平板生长的菌落无明显差异, 多为灰绿色圆形光滑小菌落、中间有黑色凹陷、周围有棕褐色水解圈; 在李显培养基上差异明显, 阳性对照和 CODE28 多为蓝绿色光滑、细小的圆形菌落(与产品说明书中单增李斯特菌典型菌落形态一致), 而 CODE98 多为无色或半透明、圆形光滑规则菌落。自选择性琼脂平板上分别挑取 5 个典型或可疑菌落, 分别接种在木糖、鼠李糖发酵管, 所有菌落木糖发酵均为阴性, 鼠李糖发酵均为阳性。将血平板底面划分小格, 刺种纯培养单个菌落, 36 °C 培养 24 h, 于明亮处观察到阳性对照和

CODE28 的菌落均能产生狭窄、清晰、明亮的溶血圈, 而 CODE98 的菌落均无溶血圈。由表 1 可见, CODE28 与阳性对照特征一致, 为单增李斯特菌可疑样品。

3.3 鉴定

挑取初筛的 6 个菌落, 进行 VITEK2 Compact30 确证性检测, 结果见表 1。由表 1 可知, 1~3 号菌均为单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*), 与阳性对照菌株 ATCC19115 一致, 可信度 95%~99%; 4~6 号菌为英诺克李斯特菌 (*Listeria innocua*), 可信度 99%。因此, 报告样品 CODE28 检出单增李斯特菌, 样品 CODE98 未检出单增李斯特菌。

表 1 样品分离鉴定结果
Table 1 Separation and identification result of samples

样品	编号	李显培养基	PALCAM	革兰氏染色	木糖	鼠李糖	溶血	VITEK2 鉴定结果	可信度
CODE28	1	蓝绿色菌落	灰绿色, 有水解圈	G+杆菌	-	+	有	单增李斯特菌	95%
	2	蓝绿色菌落	灰绿色, 有水解圈	G+杆菌	-	+	有	单增李斯特菌	99%
	3	蓝绿色菌落	灰绿色, 有水解圈	G+杆菌	-	+	有	单增李斯特菌	99%
CODE98	4	无色菌落	灰绿色, 有水解圈	G+杆菌	-	+	无	英诺克李斯特菌	99%
	5	白色菌落	灰绿色, 有水解圈	G+杆菌	-	+	无	英诺克李斯特菌	99%
	6	半透明菌落	灰绿色, 有水解圈	G+杆菌	-	+	无	英诺克李斯特菌	99%
阳性对照	ATCC19115	蓝绿色菌落	灰绿色, 有水解圈	G+杆菌	-	+	有	单增李斯特菌	99%

注: 在木糖、鼠李糖发酵结果中“+”代表阳性,“-”代表阴性。

4 结论与讨论

本研究使用 RT-PCR 法检测乳粉样品中单增李斯特菌, 以国标法的检测结果为对照。结果显示: RT-PCR 法和国标法对 2 个样品的检测结果一致, 即样品 CODE: FC02220028 检出单增李斯特菌, 样品 CODE: FC02220098 未检出单增李斯特菌, 结果满意。因此, RT-PCR 法可用于实验室乳粉中单增李斯特菌的检测。

检测过程中出现了几个现象, 值得探讨。首先, 对多数李斯特菌而言, PALCAM 平板上七叶苷的水解反应均为阳性, 无法区分单增李斯特菌和其他李斯特菌, 而显色培养基的色素只与单增李斯特菌产生的酶发生特异性反应, 选择性更强, 不同厂家配方不同, 呈现出的菌落颜色也不同, 检验人员要注意区分。其次, 实验当选取溶血实验阳性菌落的 TSA-YE 纯培养物进行 VITEK2 Compact30 鉴定时, 可疑菌落在软件 8.0 版本仪器上判定为单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) (可信度 > 95%), 而在软件 7.0 版仪器上被判定为英诺克李斯特菌 (*Listeria innocua*) (可信度均为 99%)。这可能是软件版本的影响, 也可能是菌株生长

状态的差异, 此时可以结合溶血实验结果、李显平板菌落形态和 RT-PCR 结果综合判断, 也可以选用 API[®] *Listeria* 专利生化实验 DIM 替代 VITEK2 Compact30 对单增李斯特可疑菌进行鉴定。当 RT-PCR 法检测结果为阳性时, 须将样品转接至合适培养基培养, 进一步判断是否为活菌。

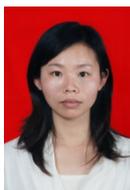
参考文献

- [1] 逯岩, 祝琳. 食品中单增李斯特菌的存在现状及检测方法研究[J]. 中国医药指南, 2020, 18(21): 289-290.
Lu Y, Zhu L. Study on the present situation and detection method of *Listeria monocytogenes* in food [J]. Guide China Med, 2020, 18(21): 289-290.
- [2] 罗超, 李妍, 赵珂珂, 等. 单核细胞增生李斯特氏菌标准物质冻干保存方法[J]. 上海计量测试, 2019, (4): 6-9.
Luo C, Li Y, Zhao KK, et al. Freeze-drying and preservation method studies on standard reference materials of *Listeria monocytogenes* [J]. Shanghai Meas Test, 2019, (4): 6-9.
- [3] Iannetti L, Acciari VA, Antoci S, et al. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Italy: Prevalence of contamination at retail and characterisation of strains from meat products and cheese [J]. Food Control, 2016, 68: 55-61.

- [4] 李骏, 王晔茹, 诸寅, 等. 餐饮厨房中单增李斯特菌污染的分布特征及风险分析[J]. 生物加工过程, 2018, 16(4): 99–102.
Li J, Wang YR, Zhu Y, *et al.* Distribution and risk of *Listeria monocytogenes* in caterin kitchen [J]. Chin J Bioproc Eng, 2018, 16(4): 99–102.
- [5] 苏彦萍, 高静, 赵凤玲, 等. 1 例孕妇感染单增李斯特菌病例的风险因素流行病学调查[J]. 实用预防医学, 2020, 27(1): 94–96.
Sun YP, Gao J, Zhao FL, *et al.* Epidemiological investigation of risk factors in a pregnant woman infected with *Listeria monocytogenes* [J]. Pract Prev Med, 2020, 27(1): 94–96.
- [6] 王园园, 张晓夏, 吴晓天. 李斯特菌脑炎 1 例[J]. 影像研究与医学应用, 2019, 3(24): 234–236.
Wang YY, Zhang XX, Wu XT. A case *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis [J]. J Imag Res Med Appl, 2019, 3(24): 234–236.
- [7] Blanca N, Beamonte V, Rafael GC, *et al.* *Listeria monocytogenes* infections: Analysis of 41 patients [J]. Med Clin, 2020, 155(2): 57–62.
- [8] Rand AO, Nischal R, Medina GS, *et al.* *Listeria* spondylodiscitis: An uncommon etiology of a common condition; a case report [J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1): 16–23.
- [9] 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[S].
GB 4789.30-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-*Listeria monocytogenes* [S].
- [10] 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[S].
SN/T 5224-2019 Detection of *Listeria monocytogenes* in food for export-Real-time PCR with internal amplification control method [S].
- [11] Wang Y, Li H, Wang Y, *et al.* Development of multiple cross displacement amplification label-based gold nanoparticles lateral flow biosensor for detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Int J Nanomed, 2017, 12: 473–486.
- [12] 郑兰, 高飞, 曹进, 等. 环介导等温扩增法检测动植物源性单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(2): 550–555.
Zheng L, Gao F, Cao J, *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* in animal and plant derived food by loop-mediated isothermal amplification [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(2): 550–555.
- [13] Liu A, Xiong Q, Shen L, *et al.* A sandwich-type ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes* using the well-oriented single chain Fv antibody fragment [J]. Food Control, 2017, 79: 156–161.
- [14] Tominaga T. Enhanced sensitivity of lateral-flow test strip immunoassays using colloidal palladium nanoparticles and horseradish peroxidase [J]. LWT-Food Sci Technol, 2017, 86: 566–570.
- [15] 朱海华, 谭静, 平洋, 等. 一种快速检测乳与乳制品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(10): 55–58.
Zhu HH, Tan J, Ping Y, *et al.* Rapid method for detecting *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products [J]. China Dairy Ind, 2019, 47(10): 55–58.
- [16] 刘红平, 朱永恒, 刘海泉, 等. 基于 SnO₂ 纳米花气体传感器快速检测牛奶中的单增李斯特菌[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 228–233.
Liu HP, Zhu YH, Liu HQ, *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in milk base on SnO₂ nanoflower gas sensor [J]. Food Sci, 2017, 38(16): 228–233.
- [17] Donoso W, Castro RI, Guzman L, *et al.* Fast detection of *Listeria monocytogenes* through a nanohybrid quantum dot complex [J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(22): 5359–5371.
- [18] Yan M, Li W, Zhou Z, *et al.* Direct detection of various pathogens by loop-mediated isothermal amplification assays on bacterial culture and bacterial colony [J]. Microb Pathog, 2017, 102: 1–7.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



林玉双, 硕士, 主要研究方向为食品微生物检测。

E-mail: 122665090@qq.com



周双辉, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品微生物检测。

E-mail: 675161367@qq.com