

食品中单核细胞增生性李斯特氏菌的分离方法 (综述)

卫生部食品卫生监督检验所 王淑颖

单核细胞增生性李斯特氏菌是一种人类致病菌，主要引起脑膜脑炎，脓毒症，孕妇流产，新生儿细菌性脑膜脑炎；其主要是对免疫缺陷的病人致病，致病性很强，病死率可高达30%左右。关于它与食物中毒的关系是近十年才逐步认清的；近年来科学家们对其与食品的关系，以及从食品中分离和检验该菌的方法进行了深入的研究。从利用传统的细菌分离培养方法来分离鉴定食品中的该菌，到利用现代分子生物学的手段来快速检测食品中的该菌，科学家们都做了大量的工作；本文将对近年来国外学者的研究成果做

一简单介绍。

1 增菌分离培养方法

1.1 增菌

由于该菌在食品中含量较低，且食品中杂菌很多，因此首先要增菌。目前国际上常采用的是在增菌肉汤中加入一些选择剂，然后在适于该菌生长的温度(30~37℃)增菌24~48hr。

1.1.1 冷增菌⁽¹⁾

根据此菌可在冷的条件下生长，而将其保存在4℃，经7天至3个月，使大量的杂菌受到抑制或死亡，从而达到提高此菌检出率的

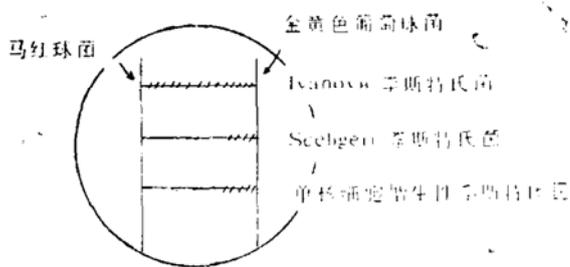


图5 CAMP 试验

单核细胞增生性李斯特氏菌是G⁺，无芽胞的，可以产生活泼动力(25℃)的短小杆菌。它在羊血琼脂上与金黄色葡萄球菌CAMP试验结果为阳性，而与马红球菌则为阴性。过氧化氢酶阳性，氧化酶阴性，MR和VP阳性；胆盐七叶苷阳性；发酵葡萄糖和鼠李糖，不发酵木糖和甘露醇，不降解硝酸盐。表2列出了单核细胞增生性李斯特氏菌和其他的李斯特氏菌的区别特点。

(卫生部食品卫生监督检验所 王淑颖编译)

表2 具有溶血性的李斯特氏菌的鉴别试验

鉴定试验	单核细胞增生性李斯特氏菌	Seeligeri 李斯特氏菌	Ivanovii 李斯特氏菌
过氧化氢酶试验	+	+	+
氧化酶试验	-	-	-
胆盐七叶苷试验	+	+	+
MR/VP	+ / +	+ / +	+ / +
O/F(葡萄糖)	+	+	+
CAMP试验			
金黄色葡萄球菌	+	+	+
马红球菌	-	-	+
硝酸盐降解试验	-	-	-
木糖	-	+	+
鼠李糖	+	-	-
甘露醇	-	-	-

参 考 文 献

1. McLain D and Lee WH.J. AOAC/1988; 71: 660
2. Donnelly CW and Baigent GJ Appl Microbiol/1986 52: 684
3. Fraser JA and Sperber WH J Food Drot/1988; 51 762
4. Curtis GDW et al Appl Microbiol/1989; 8: 95

效果。这是最早使用的增菌方式。迄今为止，此法仍然是从污染严重的食品样品中分离该菌的最好增菌方式。

1.1.2 TN增菌液⁽²⁾

首先由美国疾病控制中心(CDC)Hayes (1986年)提出。在营养肉汤中加入硫氰酸钾和耐丁酸两种抑菌剂。增菌条件为:37℃, 24hr。

1.1.3 SEP增菌液⁽³⁾

由美国威斯康星大学的Doyle和Schoeni(1986年)首次报道使用。是以胰胨为营养物质,加入葡萄糖、磷酸氢二钾和脱纤维的羊血,多粘菌素B,盐酸吡啶黄和耐丁酸而组成的。增菌条件为:37℃, 24hr。

1.1.4 FDA—EB增菌液⁽⁴⁾

由Lovett等(1987年)提出,被FDA采用。以胰酶消化大豆肉汤为基础,加入酵母浸膏,耐丁酸、盐酸吡啶黄和放线菌酮而组成。增菌条件为30℃, 24hr和7天。可直接接种分离培养基,或以1:10的稀释度经0.5% KOH处理后再接种分离培养基。

1.1.5 USDA—FSIS的两步增菌法^{5、6)}

由Mcclain和Lee(1988年)首先报导。初增菌:增菌液由胰胨、胰胨、酵母浸膏、牛肉膏、NaCl、磷酸氢二钠、七叶苷、耐丁酸、盐酸吡啶黄组成。增菌条件为30℃, 24hr
 第二步增菌:增菌液与初增菌液相同,只是盐酸吡啶黄的含量增大,并加入柠檬酸铁铵;取0.1ml初增菌液(能分解七叶苷,产生黑色者)加入第二步增菌液中,于30℃培养24hr。

此增菌方式的特点是在初增菌时筛去一些阴性反应样品;目前这种增菌方式被美国农业部的FSIS机构采纳。

1.1.6 改良的FSIS增菌(PE/FSIS)法⁽⁶⁾

在上述增菌液中都不加入盐酸吡啶黄和耐丁酸;第一步增菌培养24hr后,取10ml转入90ml第二步增菌液,再在37℃培养24hr,直接接种分离用培养基。

1.2 分离用培养基

根据所选用的选择剂不同,目前国际上曾使用的分离培养基有十几种。

1.2.1 MLA培养基⁽⁷⁾

McBride等(1960年)最早将选择剂加入苯乙醇基础培养基中,从而形成对李斯特氏菌具有选择性的培养基。所用的选择剂为可以抑制G⁻菌的亚硝酸钾;后来Khan等(1973年)发现将亚硝酸钾和耐丁酸结合使用时分离效果最好,从而进一步完善了此培养基。

1.2.2 MYJA培养基⁽⁸⁾

由于李斯特氏菌可以还原亚硝酸钾长成黑色菌落,因此Buchanan等(1987年)在Vogel Johnson平板中加入亚硝酸钾,杆菌肽和耐丁酸、甲氧噻吩头孢菌素(moxalactam);虽然用这个培养基从食品中分离该菌分离率很低,但是菌落易于辨别。

1.2.3 LPM培养基⁽⁹⁾

其组成与MLA相近;将氯化锂的含量扩大10倍,用甘氨酸酞来代替甘氨酸,不加羊血,加入甲氧噻吩头孢菌素。LPM对法国布里干酪,圆白菜和火腿中存在的杂菌有很强的抑制作用。Swaminathan等报道这种培养基比MLA的选择性更强⁽¹⁰⁾。美国的USDA—FSIS机构曾将这种培养基做为从肉、禽中分离该菌的培养基⁽⁵⁾。

1.2.4 MMLA培养基⁽⁴⁾

Lovett等(1987年)去除MLA中的血成份,加入放线菌酮形成MMLA。他们用这种培养基分离乳及其制品中的李斯特氏菌⁽¹¹⁾目前这种培养基已被FDA采纳。

1.2.5 ARS—MMA培养基⁽⁸⁾

Buchanan等(1987年)在MMLA的基础上,又加入了耐丁酸,甲氧噻吩头孢菌素和杆菌肽,形成ARS-MMA培养基。Cassiday等(1988年)的研究表明:由于这种培养基抑制力极强,对巴氏消毒奶,混合冰淇淋,圆白菜,法国布里干酪等食品中该菌的检出率

很低；特别是在菌体存损伤时。

1.2.6 TNA培养基¹²⁾

研究发现硫氰酸钾和耐丁酸可以抑制水和粪便中的大量杂菌，因此Walkins和Sleath将这两种成份加入营养肉汤中，并加入琼脂形成了TNA培养基。但是李斯特氏菌在这种培养基上长得不好，食品中的分离率也很低。

1.2.7 GBNTSM培养基¹³⁾

这个培养基的全称叫做胶基础耐丁酸大豆胰酶琼脂。此培养基适于计数巴氏消毒奶和冰淇淋中的该菌。

1.2.8 TNSA培养基¹⁴⁾

这个培养基叫吡啶黄耐丁酸血清琼脂，它比仅含耐丁酸的血清琼脂(NSA)对阳性菌的抑制性强。

1.2.9 DRIA培养基¹⁵⁾

这个培养基以七叶苷做为唯一碳源，含有柠檬酸铁、耐丁酸和吡啶黄。由于该菌能水解七叶苷，与柠檬酸铁结合形成黑色菌落，其形态与背景菌完全不同；这是唯一的可以直接在平板上鉴别菌落的培养基，因此DRIA可以用来准确地计数牡蛎中的李斯特氏菌。Netten等证实了此结果⁷⁾。

1.2.10 MDA培养基

在DesPierres肉汤¹⁶⁾ (含有耐丁酸、多粘菌素B和亚甲基兰)中加入琼脂^{17、18)}；这种培养基对于圆白菜中该菌的计数极其有用。

1.2.11 AC培养基¹⁹⁾

在哥伦比亚琼脂基础中加入盐酸吡啶黄、头孢氨噻啶。此培养基比MMLA(含甘氨酸酞，氯化锂和放线菌酮)对污染严重的食品中该菌的分离率要高得多。

1.2.12 PALCAM培养基²⁰⁾

此培养基中含有头孢氨噻啶、多粘菌素β，吡啶黄、氯化锂、七叶苷、柠檬酸铁铵，甘露醇和酚红。这种培养基可以在抑制其他杂

菌的同时，而该菌长得良好。李斯特氏菌在此培养基上为直径2mm的灰绿色中凹的带黑环的菌落，而培养基本身呈草莓红色。这个培养基是目前分离效果最好的培养基。

1.2.13 Oxford培养基

OXOID公司已有成品生产，产品号为CM856和SR140。该菌在此培养基上长成为黑色，扁平中凹的菌落。日本已用这种培养基从欧洲进口的奶酪中分离到该菌。

1.2.14 MOX培养基²¹⁾

这种培养基是由Curtis (1989年)提出的；在哥伦比亚血琼脂基础上加入七叶苷，柠檬酸铁铵、氯化锂、粘菌素和甲氧噻吩头孢菌素。这个培养基具有很强的选择性，在此培养基上该菌生长为具有黑色环带的菌落一般在培养24hr时就可以观察到这个结果。目前USDA-FSIS规定这个培养基为检验肉、禽中该菌的分离培养基。

2 其他的分离检测技术

2.1 流动细胞计法

Donnelly和Baigent(1986年)²²⁾首先用此法快速检测生牛奶中的李斯特氏菌。但这种方法缺少特异性，假阳性很高²³⁾。

2.2 单克隆抗体方法

Farber等发现了一种对李斯特氏菌特异的，可用于几种酶免疫分析的单克隆抗体。将污染的牛奶样品用硝化纤维膜过滤，然后放在改良的MLA上于30℃培养48hr，然后取下膜，做单克隆抗体酶免疫分析。奶酪可在陈水中匀浆后接种厚的改良MLA平板，在30℃培养48hr，用硝化纤维膜涂抹培养物，然后做单克隆抗体酶免疫分析。过滤膜法适于牛奶等液体，而涂抹法则可应用在其他食品，如碎肉等²⁵⁾。此法的优点是时间短(2~3天)。本方法的缺点是缺乏种的特异性，且结果不能确证。

2.3 酶联免疫吸附分析法(ELISA)

Butman等²⁶⁾制备了15种不同的李斯

特氏菌单克隆抗体; Mattingly等⁽²⁷⁾介绍了一种用两种单克隆抗体来检测李斯特氏菌的ELISA法。先将肉和乳样在肉汤中于30℃培养40~48hr; 然后再做ELISA试验。用两种抗体的方法很敏感, 并对从食品中检出该菌很特异; 但是缺乏种的特异性。

2.4 基因探针法

这是目前应用的最新方法。Klinger等⁽²⁸⁾介绍了基于16SrRNA排列顺序的核酸融合分析法来检出乳品和环境中的李斯特氏菌。将样品于30℃培养22~26hr, 肉汤中含有吡啶黄、耐丁酸、放线菌酮, 用增菌液1:100稀释后, 再于35℃培养22~26hr, 然后融合。这个方法只需2天半就可以检出李斯特氏菌; 且此法优于FDA的乳品分离培养法。

对于具有 β -溶血性的单核细胞增生性李斯特氏菌, Datta等⁽²⁹⁾用DNA探针检测具有溶血性的李斯特氏菌的方法。食品先接种LPM, 在37℃培养过夜后, 用滤膜压在培养基上将培养物都复制下来做DNA融合。这个方法可以快速准确地检出生牛奶, 软奶酪中的该菌; 也可用来计数污染量在10个/g菌以上的食品中的李斯特氏菌。

3 计数

随着从食品中分离李斯特氏菌方法的发展, 对该菌的计数变得越来越重要。由于FDA规定食品中单核细胞增生性李斯特氏菌的卫生标准为零(即在25g样品中不得检出一个菌), 更增加了计数准确度的重要性。往往有不同种的李斯特氏菌和单核细胞增生性李斯特氏菌同时存在于被污染的食品中,

但是需要经口摄入多少个单核细胞增生性李斯特氏菌才能引起人类疾病, 目前还不清楚。

3.1 MPN法

Watkins和Fenlon^{12, 30}等用这种方法来计数李斯特氏菌。将培养液稀释为一系列不同的浓度, 培养后再接种选择性分离培养基, 观察是否有单核细胞增生性李斯特氏菌存在, 根据最大可能数量表来计算每克样品中的该菌数。

3.2 平板计数法

直接将稀释的食品样品接种平板, 于30℃培养48hr后计数可疑菌落, 并做生化鉴定。对于一些培养基计数效果的研究^(17, 18)表明: GBNTSM适于巴氏消毒奶和冰淇淋李斯特氏菌的计数; LPM适于法国布里干酪, 圆白菜和火腿, DR1A适用于生牡蛎。用这种方法计数和鉴定需要4天。

3.3 其他方法:

Datta⁽²⁹⁾ DNA探针计数和免疫分析方法计数⁽²⁸⁾。

最近的研究表明⁽³¹⁾, 用直接平板计数法不能得到满意的计数结果, 特别是有热损伤的菌存在时; 因为选择性平板中含有苯乙醇, 吡啶黄, 亚硝酸钾等选择性试剂。

现在还没有一套完全适于各种食品的分离和计数方法。冷增菌可以在污染量较高时得到最好的分离效果; 而直接划平板分离适于低污染量的食品。将直接分离技术和分子生物学技术结合在一起, 是科学家们下一步需要进一步重点研究的方向。

参 考 文 献

1. Gray ML, et al. A New Technique for Isolating *Listerellae* from the Bovine Brain J. Bacteriol /1948, 55: 471
2. Hayes PS, et al. Isolating of *Listeria monocytogenes* from Raw Milk Appl. Environ. Microbiol /1986, 51:438
3. Doyle MP, et al. Selective-enrichment Procedure for Isolation of *Listeria monocytogenes* from Fecal and Biological Specimens Appl. Environ. Microbiol /1986, 51: 1127
4. Lovett JD et al. *Listeria monocytogenes* in Raw Milk: Detective, Incidence, and Pathogenicity J. Food Prot. /

1987, 50 : 188

5. McClain D et al. Development of USDA-FSIS Method for Isolation of *Listeria monocytogenes* from Raw Meat and Poultry J. Assoc. Off. Anal. Chem. /1988, 71 : 660
6. Lemmerding AM et al. Evaluation of Enrichment Procedure for Recovering *Listeria monocytogenes* from Dairy products J. Food Microbiol. /1989, 9 : 249
7. Van Netten p et al. A Selective and Diagnostic Medium for Use in the Enumeration of *Listeria* spp. in Foods Int. J. Food Microbiol. /1988a, 6 : 187
8. Buchanan RL et al. Improved Plating Media for Simplified Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods Food Microbiol. /1987, 4 : 269
9. Lee WH et al. Improved *Listeria monocytogenes* Selective Agar Appl. Environ. Microbiol. /1986, 52 : 1215
10. Swaminathan B et al. Evaluation of Enrichment and Plating Media for Isolating *Listeria monocytogenes* J. Assoc. Off. Anal. Chem. /1988, 71 : 664
11. Lovett J. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* in Dairy Products J. Assoc. off. Anal. Chem /1988, 71 : 658
12. Watkins J et al. Isolation and Enumeration of *Listeria monocytogenes* from Sewage, Sewage Sludge and River Water J. Appl. Bacteriol. /1981, 50 : 1
13. Martin RS et al. A Synthetic Based Medium for the Isolation of *Listeria monocytogenes* Clin. Invest. Med. /1984, 7 : 233
14. Ralovich B et al. New Selective Medium for Isolation of *Listeria monocytogenes* Zbl. Bzkt. I. Abt. Ovig. /1971, 216 : 88
15. Dominguez Rodriguez L et al. New Methodology for the Isolation of *Listeria* microorganism from Heavily Contaminated Environments Appl. Environ. Microbiol. /1984, 47 : 1188
16. Despiesses M et al. Isolation of *Listeria monocytogenes* in Medium Inhibitory to *Streptococcus Faecalis* Ann. Inst. Pasteur. /1971, 121 : 493
17. Golden DA et al. Direct Plating Technique for Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods J. Assoc. Off. Anal. Chem. /1988, 71 : 647
18. Golden DA et al. Evaluation of Selective Direct Plating Media for Their Suitability to Recover Uninjured, Heat and Freeze-injured *Listeria monocytogenes* from Foods Appl. Environ. Microbiol. /1988, 54 : 1451
19. Bannerman ES et al. A New Selective Medium for Isolating *Listeria* spp. from Heavily contaminated material Appl. Environ. Microbiol. /1988, 54 : 165
19. Bannerman ES et al. A New Selective Medium for Isolating *Listeria* spp from Heavily contaminated material Appl. Environ. Microbiol. /1988, 54 : 165
20. Van Netten P et al. Liquid and Solid Selective Differential Media for the Detection and Environment of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. Int. J. Food Microbiol. /1984, 8 : 299
21. Curtis GBW et al. A Selective Medium for the Isolation of *Listeria monocytogenes* Appl. Microbiol. /1989, 8 : 95
22. Donnelly CW et al. Methods for Flow Cytometric Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk Appl. Environ Microbiol. /1986, 52 : 689
23. Donnelly CW et al. Flow Cytometry for Automated Analysis of Milk Containing *Listeria monocytogenes* J. Assoc. Off. Anal. Chem. /1988, 71, 655
24. Farber JM et al. Monoclonal Antibodies Directed Against the Flagella Antigens of *Listeria* species and Their Potential in EIA-based Methods J. Food Prot. /1987, 50 : 479
25. Farber JM et al. Methodology for Isolation of *Listeria* from Foods----A Canadian Perspective J. Assoc. Off Anal. Chem. /1988, 71 : 675
26. Butman BJ et al. Monoclonal Antibodies Which Identify a Genus-specific *Listeria* Antigen Appl. Environ.