

了一些基体改进剂的配方,其结果(1%草酸+10%铁氰化钾+1:1HCl)配方优于其它配方。

2.10 2种方法的比较

本试验与石墨炉原子吸收光谱分析(G—AAS)进行了比较,其值基本相同,结果见表4。本法具有干扰少,测定快速等优点,特别在减少高盐分的样品干扰方面尤

其显著。

5 参考文献

- 1 李有胜,氢化物原子化法测定痕量铅,理化检验(化学分册), 1992;28(1):11
- 2 李述信,原子吸收光谱分析中的干扰及消除方法,北京:北京大学出版社, 1987,350

多聚酶链反应 (PCR) 扩增技术 检测生肉中单核细胞增生性李斯特氏菌

杜 蕾 任保国 北京市卫生防疫站 (100013)

单核细胞增生性李斯特氏菌(以下简称单增李斯特氏菌)是影响食品卫生的重要病原菌,可以引起食物中毒的李斯特氏菌病在人群和动物中暴发流行,已经引起世界各国食品卫生界的高度重视。我国没有报道人类李斯特氏菌病的流行,但是猪的李斯特氏菌病的爆发流行已有报道。1993年大连某大型养猪场发生李斯特氏菌病的爆发,最严重时,每天百余头猪死亡。^[1]近年来随着现代分子生物学的不断发展,人们对单增李斯特氏菌的生物学特性已有了比较全面的认识,出现了用分子生物学方法检测食品中李斯特氏菌污染的技术。^[3,4]为了将PCR技术应用于食品中单增李斯特氏菌的检测以及建立该菌引起食物中毒的快速诊断方法,我们于1993年11~12月对北京某地区4种生肉50件样品中的单增李斯特氏菌用PCR方法进行了检测分析。

1 材料与方法

1.1 材料

单增李斯特氏菌的标准株由中国商检技术研究所惠赠。

生肉样品 分3批用棉拭子采集北京市某集贸市场生肉摊点猪、牛、羊和鸡肉样品

共50件。

引物 由中国人民解放军军事医学科学院微生物学流行病学研究所提供。它是根据单增李斯特氏菌内化素(internalin)基因序列设计的一对各为20个核苷酸的引物,其扩增产物为446pb的核苷酸片断。

主要试剂 dNTPs、TaqDNA多聚酶、琼脂糖等均购自华美生物工程公司。

API试剂盒 BioMerieux提供。

1.2 方法

PCR试验 参照军事医学科学院微生物学流行病学研究所建立的PCR试验方法,^[3]向每只0.5mL Eppendorf管中依次加入41μL裂解液(含1×PCR Buffer, 0.5%NP-40, 0.5%Tween-20)混合物, 1μL dNTPs(每种含2μmol/L混合物, 2μL引物(各5μmol/L)混合液, 4μL肉样涂抹菌液(待测模板), 4μL无菌液体石蜡油,将反应管置于DNA热循环仪中, 97℃变性10min, 72℃时加入TaqDNA聚合酶2μL(含1单位), 然后进入DNA扩增阶段。

PCR条件 94℃变性1min, 56℃退火1min, 72℃延伸1.5min, 共35个循环, 最后72℃保持5min以保证延伸完成。

扩增产物分析 取40μL PCR产物直接

中国食品卫生杂志 1996年第8卷第1期

经 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭) 水平电泳, 100V, 1 ~ 2h, 紫外灯下观察结果。阳性为一清楚的长度为 446pb 的区带。

阳性和阴性对照 分别为单增李斯特氏菌标准株和金黄色葡萄球菌。

常规检测方法 采用中国国家进出口商品检验局推行的行业标准方法。对检出阳性的单增李斯特氏菌再用 API 试剂盒进行验证。

2 结果

2.1 内化素基因 PCR 扩增方法检测单增李斯特氏菌敏感性试验

根据实验设计, 用标准单增李斯特氏菌进行检测敏感性测定。该方法最低检出限为 581/200 μL 单增李斯特氏菌, 其最低检测极限为 3/5 μL 单增李斯特氏菌, 结果见表 1。

表 1 PCR 敏感性测定结果

检样	检测菌量 (200 μL)	PCR 结果
1	278,400	阳性
2	42,240	阳性
3	7,464	阳性
4	581	阳性
5	61	阳性
6	13	阴性

表 2 几种生肉样品单增李斯特氏菌 PCR 检测结果

样品种类	件数	阳性数	阳性率 (%)
牛 肉	7	0	0
羊 肉	16	3	18.8
猪 肉	12	1	8.3
鸡 肉	15	0	0

2.2 内化素基因 PCR 扩增方法检测各种生肉中的单增李斯特氏菌

用 PCR 法和常规分离培养法对 50 件生肉涂抹样品进行了分析。结果见表 2。在 50 件样品中检出了 4 株单增李斯特氏菌, 其阳性检出率为 8%。以羊肉单增李斯特氏菌污染最为严重, 检出率为 18.8%, 其次是猪肉 (1/12), 在本次检测中未发现鸡肉和牛肉的李斯特氏菌污染。在 3 份 PCR 阳性的羊肉样品中, 常规分离培养法有 1 件羊肉样品为阴性。其它结果都一致。常规方法阳性的单增李斯特氏菌经 API 试剂盒检测均为阳性。

3 讨论

PCR 扩增技术检出单增李斯特氏菌不受污染杂菌的影响, 并表现出较高的特异性和敏感性。

生肉样品直接 (未经增菌) PCR 扩增法大大缩短了试验时间, 只要 9h 即可以完成试验。如果采用 PCR 扩增前增菌, 可在 3d 内出结果。这比常规方法 (需要 7d 以上) 缩短了 3 ~ 4d 时间。因此, 内化素基因 PCR 扩增技术为单增李斯特氏菌引起的食物中毒和李斯特氏菌病的爆发流行提供了敏感、特异的快速诊断方法。

在本次调查的 50 件样品中发现羊肉单增李斯特氏菌污染最为严重。提醒人们注意羊肉可能是造成人类食物中毒和李斯特氏菌病流行的主要传染源。尤其是对食涮羊肉者构成了极大的威胁。

4 参考文献

1 生物—梅里埃 (BioMerieux) 公司, 第五届 VITEK 用户学术交流会议资料, 1994, 27
2 军事医学科学院微生物学流行病学研究所, PCR 诊断技术操作讲义, 北京: 1993
3 杨百亮, 等, PCR 检测单核细胞增多症李氏菌的研究, 中华流行病学杂志, 1992;13(特刊 2 号): 87