

实验技术与方法

生肉中单核细胞增生性李斯特菌的分离与鉴定

邵美丽^{1,2} 遇晓杰³ 杨 帆² 刘 娣¹

(1. 黑龙江省农科院博士后工作站,东北林业大学博士后流动站,黑龙江 哈尔滨 150086;
2. 东北农业大学,黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 黑龙江省疾病预防控制中心,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:目的 了解哈尔滨市售生肉中单核细胞增生性李斯特菌的污染状况。方法 将显色培养基法、API 试剂条法和 PCR 法联合应用对哈尔滨市售 128 份生肉进行单核细胞增生性李斯特菌的分离鉴定。结果 共分离出单核细胞增生性李斯特菌 18 株,检出率为 14.06 %。其中生猪肉检出率最高,达 20.00 %。结论 哈尔滨市售生肉中单核细胞增生性李斯特菌污染状况比较严重,应引起有关部门的重视,加强管理和监测。
关键词:李斯特菌,单核细胞增生;食品污染;生肉;鉴定;分离

Isolated and Identification of *Listeria Monocytogenes* in Raw Meat

SHAO Mei-li , YU Xiao-jie , YANG Fan , LIU Di

(Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences post-doctoral workstations , Harbin 150030 , China)

Abstract : **Objective** To understand the contaminant situation of *Listeria monocytogenes* in raw meat on the market in Harbin. **Method** *Listeria monocytogenes* in 128 raw meats on the market in Harbin were isolated and identificated by three methods of Coloration medium , API reagent strip and PCR. **Results** A total of 18 *Listeria monocytogenes* were isolated. The isolating rate is 14.06 % . Among them the isolating rate of raw pork was the highest , and reached more 20.00 % . **Conclusion** The contaminant situation of *Listeria monocytogenes* in raw meat on the market in Harbin was more serious , which should be seriously paid attention by the relevant departments , which should strengthen management and monitoring.
Key words : *Listeria Monocytogenes* ; Food Contamination ; Raw Meat ; Identificaton ; Isolation

单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes* , 以下简称单增李斯特菌) 是一种人畜共患病 ——李斯特菌病的致病菌,主要侵袭孕妇、新生儿、免疫功能低下的成人,特别是老年人。感染后

主要表现为败血症、脑膜炎和单核细胞增多^[1]。食品是该致病菌的主要载体。历史上该病的多次流行、暴发或食物中毒等都是通过食物传播造成的^[2]。该菌广泛存在于自然界,各类食品包括蔬菜类、乳

Determination of Chloramphenicol in Milk [J]. J Assoc Off Anal Chem, 1980 , 63 (5) :1044-1048.

[6] PILAR V , NURIA B. Determination of Chloramphenicol Residues in Animal Feeds by Liquid Chromatography with Photo-diode Array Detection, Manuel Herrpandez Cporodoba [J]. Analytica Chimica Acta , 2006 , 558 : 11-15.

[7] CORNELIS , VAN DE WATER , NEL HAGSMA. Sensitive Strep Tavidin-Biotin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Rapid Screening of Chloramphenicol Residues in Swine Muscle Tissue [J]. J Assoc of Anal Chem , 1990 , 73 (4) : 5342-540.

[8] 王海涛,陈中祥,战培荣,等. 竞争性酶联免疫法检测水产品中氯霉素[J]. 水产学杂志,2004,17(2) :82-85.

[9] 刘文卫,钮伟民,许伟芳. 氯霉素残留检测技术的研究进展[J]. 现代预防医学,2007,34(1) :67-75.

[10] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000 : 231-236.

[11] 吴媛媛,包永明,李晓晖,等. 抗氯霉素卵黄抗体的制备及其分离纯化[J]. 过程工程学报,2006,6(2) :281-284.

[12] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,1999 : 54-64.

[13] SHELVER WL ,SMITH DJ , Development of Animmunoassay for the β-adrenergic agonist ractopamine[J]. J Immunoassay,2000 , 21(1) : 1-23.

[14] 董志伟,王琰. 抗体工程[M]. 北京:北京医科大学出版社, 2002 :19-47.

[收稿日期:2009 - 03 - 07]

中图分类号:S859.84;TS207.5 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2009)04 - 0357 - 05

基金项目:黑龙江省博士后基金(LBH-Z07015),黑龙江省青年基金(QC08C100),东北农业大学博士启动基金
作者简介:邵美丽 女 副教授

类、肉类、水产品类均能被该菌污染,尤其肉类食品极易被污染,污染率高达 10 %~30 %^[3]。由于该病致死率较高,已严重威胁我国畜牧业生产安全和人类健康。目前,我国现行国家卫生标准已把单增李斯特菌列为致病菌常规检验项目。为了解哈尔滨地区生肉中单增李斯特菌的污染状况,本研究将三种快速检测方法联合应用,对该地区的市售四大类生肉进行了单增李斯特菌的分离鉴定,这不仅对于预防和控制由该菌引发的食物中毒和食源性疾病有着重要意义,同时可以为该菌建立 HACCP 系统提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 随机从哈尔滨市 6 个区 10 个集贸市场采集生猪肉、生牛肉、生羊肉、生鸡肉等 4 类食品,共计 128 份,其中生猪肉 60 份,生牛肉 24 份,生鸡肉 28 份,生羊肉 16 份。

1.1.2 标准菌株 单核细胞增生性李斯特菌 CMCC54007 由黑龙江省疾病预防控制中心提供。

1.1.3 主要试剂及培养基 科玛嘉李斯特菌显色培养基、李氏增菌液(LB1, LB2)、血琼脂培养基、SIM 动力培养基、TSA - YE 培养基、TSB - YE 培养基均购自北京陆桥生物技术有限责任公司,API Listeria 试剂条购自生物梅里埃公司,Taq DNA 聚合酶购自 MBI 公司。

1.1.4 引物 单核细胞增生性李斯特菌特异性引物^[4](检测溶血素基因 hlyf 的引物)由上海博亚公司合成。引物序列如下:

Hlyf (F) : 5'- CGCAACAACTGAAGCAAAGG- 3'
Hlyf (R) : 5'- TTGCCGGCACATTTGTCAC- 3'

1.1.5 主要仪器 API 鉴定系统(法国生物梅里埃公司),电泳仪和电泳槽(北京六一仪器厂),PCR 仪(GeneAmp PE2400,日本)。

1.2 方法

1.2.1 增菌与分离培养 无菌取样 25 g 进行二次增菌。将菌液接种于科玛嘉李斯特显色培养基上筛选疑似菌落。然后将疑似菌落接种于血琼脂平板进行溶血特性鉴定,将具有β溶血环的菌落穿刺于 SIM 半固体培养基,进行动力学试验。最后对疑似菌落进行纯培养。

1.2.2 染色镜检 革兰氏染色镜检。且用生理盐水制成菌悬液,在油镜下观察该菌的运动情况。

1.2.3 API Listeria 鉴定试验 将上述鉴定为疑似单增李斯特菌的菌落制成菌悬液,注入 API Listeria 试剂条上的每一个小管,在需氧条件下,36 °C培养

24 h,然后参考说明书中鉴定表进行结果判定。
1.2.4 PCR 鉴定 将 API Listeria 试剂条初步鉴定为阳性的菌落接种于 TSB - YE 培养基,30 °C培养 24 h 后,取菌液 1 ml 提取基因组,进行特异性基因片段 hlyf 的扩增,具体反应体系见表 1。

表 1 基因片段 hlyf 扩增反应体系	
加入物质	体积(μl)
ddH ₂ O	38.0
10 ×Taq Buffer	5.0
dNTP (2.5mM each)	4.0
模板	0.5
上游引物	1.0
下游引物	1.0
Taq 酶(5U/μl)	0.5

反应条件为:94 °C预变性 3 min;94 °C变性30 s, 61 °C退火35 s,72 °C延伸 35 s,30 个循环;72 °C终延伸 5 min;反应结束后,用 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。

2 结果

2.1 生肉中单增李斯特菌的检出情况

四种生肉样品 128 份,共检出单增李斯特菌 18 株,检出率为 14.06 %。各种生肉中该菌的具体检出情况如表 1 所示。其中生猪肉检出率最高,达 20.00 %,其次是生鸡肉,为 15.00 %,生羊肉检出率最低,为 6.20 %。见表 2。

表 2 四种生肉中单增李斯特菌的检出情况			
样品名称	样品数量	单增李斯特菌 检出菌株数	检出率(%)
生猪肉	60	12	20.00
生鸡肉	28	3	15.00
生牛肉	24	2	8.33
生羊肉	16	1	6.20
合计	128	18	14.06

2.2 菌落特征

在科玛嘉李斯特菌显色培养基上形成蓝色带有白色晕环的圆形菌落,大小为 1~2 mm。且此菌落在血平板上可形成狭窄、透明的β溶血环。

2.3 API 鉴定结果

API 生化反应结果具体见表 3,查李斯特菌数码图谱(2510)提示为单核细胞增生性李斯特菌。

2.4 PCR 鉴定结果

从 API Listeria 试剂条初步鉴定为阳性的菌株中均扩增到大小约 210bp 的特异性基因片段 hlyf,证实分离到的菌株为单增李斯特菌。具体结果见图 1。

表 3 API Listeria 生化反应结果

试验	反应	结果
DIM	鉴定无害李斯特氏菌/单核细胞增生李斯特氏菌	阴性
ESC	七叶苷(水解)	阳性
α-MAN	α-甘露糖苷酶	阳性
DARL	D-阿拉伯醇(产酸)	阳性
XYL	D-木糖(产酸)	阴性
RHA	鼠李糖(产酸)	阳性
MDG	α-甲基-D-葡萄糖苷(产酸)	阳性
RIB	核糖(产酸)	阴性
GIP	1-磷酸葡萄糖(产酸)	阴性
TAG	D-塔格糖(产酸)	阴性



1~6、8~13 为生猪肉中分离菌株的 hlyf 基因扩增产物；7、14 为 DNA 分子量标准；21 为阳性对照；22 为阴性对照；15~17 为生鸡肉中分离菌株的 hlyf 基因扩增产物；18、19 为生牛肉中分离菌株的 hlyf 基因扩增产物；20 为生羊肉中分离菌株的 hlyf 基因扩增产物。

图 1 生肉中分离到的单增李斯特菌的 hlyf 基因的扩增结果

3 讨论

3.1 三种快速检测方法的联合应用

食品安全问题是公共健康面临的主要威胁,也是一个全球性的问题。近年来,食源性疾病在全球范围内呈上升趋势^[5,6]。其中引发食源性疾病的首要因素是食源性病原菌对食品的广泛污染。且作为四大致病菌之一的单增李斯特菌成为食品安全部门监管监测的重点对象之一。以往人们通常采用传统的方法对该菌进行分离鉴定,但由于传统方法步骤繁琐、耗时较长,而且分离率较低,已经远远不能满足食品卫生安全质控的要求^[7]。而不断出现的一些快速检测方法如显色培养基法、API 法、VITEK 法、miniVIDAS 法和 PCR 法等因其节省时间、分离率高等优点被人们广泛应用^[8-12]。但是由于单独使用某一种快速检测方法有时也会出现假阳性的情况,所以为了既能提高检测效率又能避免假阳性的出现,本试验将三种快速检测方法联合起来使用。首先采用科玛嘉李斯特显色培养基代替国标法中的 MMA 培养基,在显色培养基上筛选的菌落特征明显,蓝色带白色光环的晕轮,更易于判读和挑取。且已有研究表明科玛嘉李斯特显色培养基上生长的可疑菌落最终被确定为单增李斯特菌的概率为 97.8%,而 MMA、OXA 最终被确定为单增李斯特菌的概率只有

27.9%和 28.5%^[13]。其次采用 API Listeria 试剂条代替传统的生化反应试验,大大简化了实验步骤,节省了反应时间。最后,采用 PCR 法对已经初步鉴定的阳性菌株进行特异性基因片段 hlyf 的扩增试验,该试验为一个验证性试验,以此方法对已经初步鉴定为单增李斯特菌的菌株进行最后一步的确认。三种快速检测方法的联合应用,大大增加了试验结果的准确性和可靠性,同时比国标方法减少了试验步骤,节省了时间,提高了工作效率。

3.2 单增李斯特菌在食品中的污染情况

单增李斯特菌造成的食品污染是目前国际上极为关注的问题。由该菌引发的食物中毒在欧美国家一般呈爆发型,且近年来有上升趋势,由此给这些国家带来了巨大经济损失^[14]。虽然我国尚未有李斯特菌病的暴发流行,但却散在出现。而由于该菌的广泛分布,在外环境适应能力强,对不利因素如低温、高渗、抗菌物质有抵抗能力,还能在物体表面形成生物膜,所以更加剧了该菌潜在的威胁性。

从我国各地开展单增李斯特菌的污染调查来看,多种食品均检出单增李斯特菌,包括生肉类、熟肉类、家禽类、水产品类、乳制品类及蔬菜类等。但不同省份该菌的总检出率不同,且不同种类的食品检出率也不相同。2000 以来,浙江、北京、上海、广东、湖北和广西等省市分别进行了单增李斯特菌的污染状况调查,结果表明该菌在以上省市的总检出率分别为 7.11%、21.15%、19.13%、1.50%、4.10%和 4.00%。且生肉类食品的检出率分别达到 12.18%、18.13%、19.13%、1.70%、11.40%和 5.17%,绝大部分高于各自省市的总检出率,且浙江、湖北和广西等地各类食品中,生肉类食品污染率最高^[15-20]。从以上分析调查不难看出,尽管各地的污染率有差异,但生肉类食品在当地均为污染率较高的一类食品,也是引发食物中毒的一个比较重要的污染源。而本研究针对哈尔滨市这类食品进行的污染调查结果也证实了这一点。

以上结果提示,哈尔滨市售生肉中单核细胞增生性李斯特菌污染状况比较严重,应引起有关部门的高度重视。且生肉中的单增李斯特菌主要来自环境,其在 Lm 的传播链中可能起着重要的作用,而畜类屠宰和销售过程中的交叉污染更会加剧这种传播,导致该菌在哈尔滨市食品中的污染范围增大。因此,需要食品卫生监管部门加大对生肉食品的监督监测,加强个别市场的整改工作,加大对该菌传播、危害及预防的宣传力度,尽力将该菌带来的危害降到最低,确保人们的身心健康。

实验技术与方法

容量法测定保健食品中钙的不确定度分析

肖香兰¹ 田庆民²

- (1. 北京市疾病预防控制中心营养与食品卫生所,北京 100013;
2. 北京市丰台区疾病预防控制中心业务部,北京 100071)

摘 要:依据容量法测定保健食品中钙的含量,分析了测量不确定度的主要来源,即滴定管不确定度和移液管不确定度,计算得到食品中钙的测定结果的合成标准不确定度为 0.012%,伸展不确定度为 0.03%。
关键词:保健食品;钙;不确定度

Evaluation on the Uncertainty of Calcium in Health Food Determined by Volumetric Analysis
XIAO Xiang-lan, TIAN Qing-min
(Institute of Nutritional and Food Hygiene, Beijing CDC, Beijing 100013, China)

Abstract: The calcium content of health food was determined by volumetric analysis. The main source of uncertainty on detection was analyzed, including the uncertainty of calibrated burette and pipette. The compound standard uncertainty of calcium determination was 0.012%, the extended uncertainty was 0.03%.
Key words: Dietary Supplements; Calcium; Uncertainty Evaluation

参考文献

[1] 沈莹.单核细胞增生性李斯特菌在食品安全中的研究近况[J].中国热带医学,2008,8(3):484-487.

[2] 巢国祥,焦新安,徐勤,等.8类食品单核细胞增生李斯特菌流行特征及耐药性状研究[J].中国卫生检验杂志,2005,15(5):19-521.

[3] 沈红,蒋兴祥,赵霞,等.食品中单核细胞增生性李斯特氏菌检测及污染现状分析[J].中国人兽共患病学报,2007,23(4):417.

[4] PARK Y S, LEE S R, KIM Y G. Detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Kimchi by Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR) [J]. Journal of Microbiology, 2006, 44(1): 92-97.

[5] WHO. Food safety and foodborne illness [EB/OL]. http://www.who.int/inf-fs/en/fact237,html,2002.

[6] WHO. WHO global strategy for food safety[S]. 2002.

[7] 金莉莉,王芳,郭振坤,等.食品中单核增生李斯特氏菌检测研究进展[J].微生物学杂志,2001,21(2):63-65.

[8] 张淑红,吴清平,张菊梅,等.显色培养基在几种食源性致病菌快速检测中的应用[J].微生物学通报,2006,33(6):108-111.

[9] 韩斌,刘战民,高海燕,等.单核细胞增生李斯特菌的检测技术[J].中国生物工程杂志,2008,28(6):125-128.

[10] KOO K, JAYIKUS L A. Detection of *Listeria monocytogenes* from a model food by fluorescence resonance energy transferbased PCR with an asymmetric fluorogenic probe set [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(2): 1082-1088.

[11] LIU D Y. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen[J]. Journal of Medical Microbiology, 2006, 55: 645-659.

[12] 陈敏,王颖,顾其芳,等.食品中李斯特菌快速检测方法的建立与研究[J].中国卫生检验杂志,2001,11(3):286-287.

[13] 居建华,叶虹,顾伟忠,等.应用不同培养基检测单增李斯特菌结果比较[J].上海预防医学,2008,20(1):23-24.

[14] 杜萍,王心祥,付竹霓.食源性疾病及食源性致病菌微生物的监测是全球性工作[J].医学动物防制,2008,24(3):221-222.

[15] 崔京辉,李达,王永全,等.2004-2005年北京市食品中单核细胞增生性李斯特菌的污染情况调查[J].中国卫生检验杂志,2006,16(12):1508-1509.

[16] 陆屹.2003年上海市部分食品中食源性致病菌污染情况分析[J].上海预防医学杂志,2004,16(9):449-4511.

[17] 梅玲玲,程苏云,朱敏,等.2000-2004年浙江省食品中产单核李斯特菌污染状况调查[J].中国卫生检验杂志,2006,16(7):784-8151.

[18] 宋曼丹,倪汉忠,杨冰,等.广东省食品中单核细胞增生李斯特菌污染状况调查[J].中国卫生检验杂志,2004,4(1):81-82.

[19] 李秀桂,吕素玲,唐振柱,等.2002-2004年广西食品中单核细胞增生李斯特氏菌的监测[J].广西预防医学,2005,11(3):140-142.

[20] 马弋,吴杨,吕斌,等.湖北省食品中李斯特氏菌污染现状分析[J].中国食品卫生杂志,2003,15(3):222-223.

[收稿日期:2009-03-16]

中图分类号:R15;R155;Q93-332;R194;TS207.4 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2009)04-0361-04

作者简介:肖香兰 女 主管检验技师