

食品中产单核细胞李斯特病原菌的 分离检定与流行病学分析(综述)

袁宝民^{*} 李笃唐^{**} 许玉东^{***} 李宝兴^{***}

产单核细胞李斯特氏菌(简称李氏菌)是近年来报导较多的病原菌之一,能引起人畜共患性疾病,可使人 and 动物患脑膜炎、败血症、流产等疾病,死亡率较高^[1, 2]。该菌在自然界广泛存在,对多种食品均有不同程度的污染^[15],造成散发或爆发流行或致死,因此引起一些学者的注目^[3, 4, 5]。目前国内对本菌和所致的疾病报导的较少,本文拟对近年有关李氏菌的分离、检定方法、污染范围及流行病学等方面作一综合介绍。

1 命名与简史

产单核细胞李斯特菌最早由 Murray, Webb 和 Swann 等(1926)首先从患有大单核白血球增多症(Large mononuclear Leucocytosis)的病兔体内分离的,命名为单核细胞增多杆菌(*Bacterium monocytogenes*),后由 Pirie(1940)将本菌改名为李斯特氏菌(*Listeria*),并划入棒状杆菌科(*Corynebacteriaceae*)称为产单核细胞李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)^[6],该菌在《Bergey's 细菌学鉴定手册》第八版中被列入第十六部分,属于位置不定的乳杆菌科的一个属即李斯特氏菌属,包括有七个种:*Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria walshimer*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi*, *Listeria*

murrayi^[7]。并在《Bergey's 系统细菌学手册》第九版第十四部分中被描述为“无芽孢的革兰氏阳性杆菌”,属于七个菌属的第二位,还增加了 *L. Denitrificans* 菌株,总共有 8 个种。是目前对本菌属种间的检定与分类的参考依据。

2 细菌学特征

2.1 形态与染色 本菌为革兰氏阳性棒状短小杆菌,大小约 $0.4 \sim 0.5 \times 0.5 \sim 2\mu\text{m}$,两端正直钝圆或略弯曲,呈单个或 V 形排列,在陈旧的培养物常呈长杆或长丝状,染色呈阴性,无芽孢和荚膜,不抗酸。20 ~ 25 °C 时,生周鞭毛,在 37 °C 时不生或生单根鞭毛。

2.2 培养特性 本菌在 3 ~ 40 °C 均可生长。在含有 0.25% 琼脂、8% 明胶和 1% 葡萄糖半固体培养基中,37 °C、24h 沿穿刺线以不规则的云雾状扩展到整个培养基;在绵羊肝浸液琼脂上生长的菌落较小,圆、光滑、表面粘稠略扁平;在血液琼脂上,菌落周围呈 β 溶血,与链球菌很相似。新分离的菌株此现象更为明显。

2.3 理化特性 本菌能耐受 58 ~ 59 °C 10min,在 -20 °C 可存活一年, pH 范围为 5 ~ 9.6,对氯化钠的耐受力较强;在 10%NaCl 中

* 辽宁省食品卫生监督检验所 (110005)

** 中国药品生物制品检定所 (100050)

*** 辽宁省沈阳市和平区卫生防疫站 (110005)

可生长,在 20%NaCl 中 40℃ 可存活 8 周左右;在 16%NaCl、PH6 中能存活一年。在药物敏感性方面,对四环素、氯霉素、红霉素、 α 氨基苄青霉素、新霉素敏感,而对青霉素和磺胺

类为弱敏感,对多粘菌素 B 有抗药性。
2.4 李氏菌属的生化特征与种间鉴别
所有的菌种培养 24 ~ 48h 后,其生化反应见表 1、2。

表 1 李氏菌属对各种糖类的生化反应⁽⁷⁾

	L. Monocytogenes	L. Ivanovii	L. Innocua	L. Welshimen	L. Seelieri	L. Grayi	L. Murrayi
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+
七叶甙	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇	—	—	—	—	—	+	+
鼠李糖	+	—	d	d	—	—	d
木胶糖	—	+	—	+	+	—	—
尿素酶	—	—	—	—	—	—	—
M R	+	+	+	+	+	+	+
V P	+	+	+	+	+	+	+

+ : 24 ~ 48h 产酸 (90% 或更多) —: 21 天不产酸 (90% 或更多) d : 有些株呈阳性或阴性

表 2 李氏菌属种间特性鉴别⁽⁸⁾

试验项目	L. Monocytogenes	L. Innocua	L. Seeligeri	L. Weelshimeri	L. Ivanovii	L. Grayi	L. Murrayi	L. Denitrificans
β 溶血	+	—	+	—	+	—	—	—
CAMP 试验								
金黄色葡萄菌	+	—	+	—	—	—	—	—
马红球菌	—	—	—	—	+	—	—	—
甘露醇	—	—	—	—	—	+	+	—
α -甲基-D 乙糖苷	+	+	—	+	—	—	—	—
α -甲基-D 葡萄糖苷	+	+	+ / —	—	+	+	+	—
L- 鼠李糖	—	d	—	d	—	—	d	—
D- 木胶糖	—	—	+	+	+	—	—	+
V - P	+	+	+	+	+	+	+	—
盐酸盐还原	—	—	—	—	—	—	+	—

+ : 24 ~ 48h 产酸 (90% 或更多) —: 21 天不产酸 (90% 或更多) d : 有些株呈阳性或阴性

3 血清学分型与分类

早在 1935 年 Schultz Julianelle 等将李氏菌分为两组血清型,1 组为啮齿类动物型;2 组为反刍动物型。1940 年 Patterson 氏对各种动物及人体分离的 54 株进行了研究,将其分为 4 个血清型,有 O 和 H 抗原成分,1945 年 Robbis Grinrid 将不同的 O 抗原分为 I、II、III、IV 和 V 型。H 抗原有 A、B、C 和 D。1958 年 Seeliger 根据 O 抗原的不同,将 O 抗原的 4 型又分 4a 和 4b;1959 年 Donkervoet 发

现 4 型株上存有不同的抗原因子,进一步又分有 4c、4d 和 4e。1 型株和 3 型株上也发现存有共同的抗原成分,进一步定为 1a 和 3a,具体区分见表 3。

血清学的分型为以型别区分李氏菌致病菌株和非致病株提供了重要依据。从人体中分离的菌株大部分属于血清型 1/2a 和 4b,被认为是有致病性的主要血清型株。Emody 和 Ralovien 建议用 23 种糖类发酵,将 55 株李氏

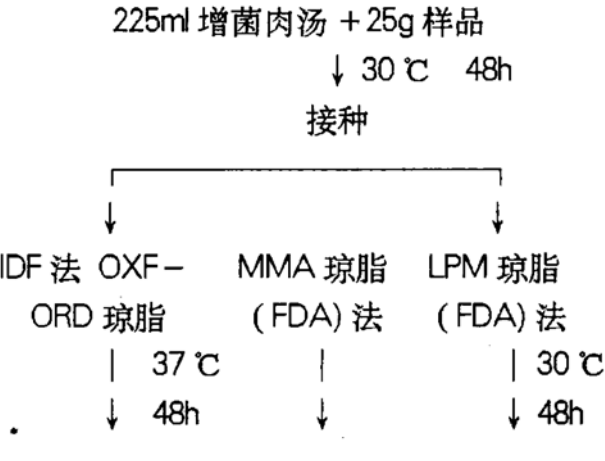
菌分为 24 个不同的生化发酵谱作为生物分 采纳。
型。但因有一些菌株的反应不稳定,而未被

表 3 李氏菌的血清学分型表⁽⁸⁾

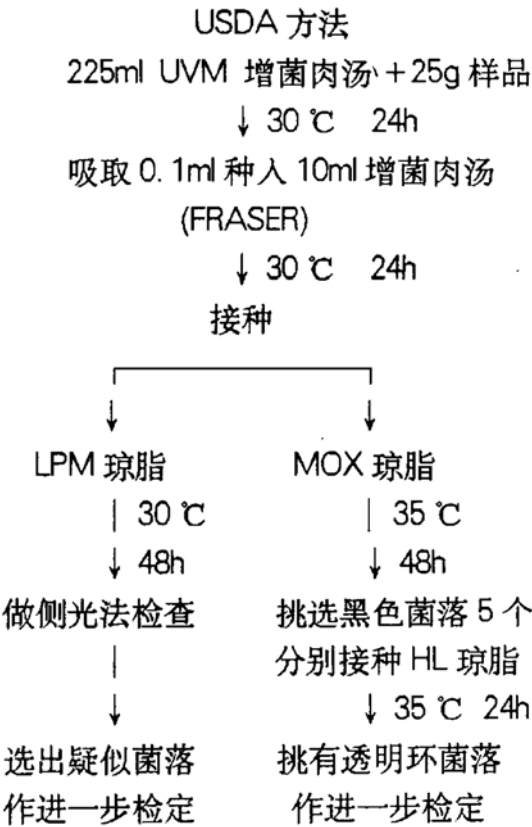
血清型	O 抗原										H 抗原
1/2a	I	II	(III)								AB
1/2b	I	II	(III)								ABC
1/2c	I	II	(III)								BD
3a		II	(III)	IV							AB
3b		II	(III)	IV		(VII)	(VIII)				ABC
3c		II	(III)	IV		(VII)	(VIII)				BD
4a			(III)	(V)		VII		I X			ABC
4ab			(III)	V VI		VII		I X X			ABC
4b			(III)	(V) VI							ABC
4c			(III)	V		VII					ABC
4d			(III)	V VI			VIII				ABC
4e			(III)	V VI			(VIII) (I X)				ABC
5			(III)	V VI			(VIII)				ABC
6a(4f)			(III)	V (VI) (VII)			I X			X V	ABC
6b(4g)			(III)	(V) (VI) (VII)			I X X X I				ABC
7 ?			(III)					X II X III			ABC
L. Grayi			(III)					X II X IV			E
L. Murrayi			(III)					X II X IV			E

注: () 不常有

4 李氏菌分离程序与检定(介绍两种程序)



均用侧光法检查平皿, 观察可疑菌落
并各选出 5 个细落, 作进一步检定



以上为美国农业部食品安全管理局(USDA-FSIS)、美国食品药品监督管理局(FDA)和国际乳品协会(IDF)的方法。

5 致病性与致病机理

李氏菌的致病性主要是能引起致死性的脑膜炎和脓毒症、孕妇流产和新生儿细菌性脑膜炎。该菌的致病性很强,尤其对免疫缺陷的病人,病死率高达30%。Nieman等报道,在成人中李氏菌主要引起脑膜炎。根据西班牙1983~1987年临床病例统计,在136例中,有48例(35.3%)为脑膜炎患者;其次为菌血症45例(33.1%);新生儿败血症有29例(21.3%)^[9]。此菌还可以引起原发性菌血症、心内膜炎、非脑膜炎型的中枢神经系统疾病、及肺炎性呼吸窘迫、急性肝炎、妊娠淋巴瘤、糖尿病、酒精性肝病等。胎儿和新生儿对本菌极为易感,其原因可能与其免疫系统不成熟有关。Rappaport等对有自发性流产史的妇女阴道分泌物作李氏菌分离,结果34人中有25例为阳性,而87名对照者皆为阴性。但目前对此种看法尚有分歧。致病机理:李氏菌属于胞内细菌,在巨嗜细胞中可存活和生长,本菌产生两种溶血作用的酶。一种是 α 李氏菌溶血素,具有抗原性和与链球菌溶血素“O”相关的细胞毒素;另一种是 β

70%。有调查表明人类携带此菌作为传染源,可通过阴道、子宫颈、咽部及性接触传播。现在食品作为传播李氏菌的媒介亦渐被重视^[10、11、12]。1981年加拿大沿海发生的4b型李氏菌爆发性流行中,有7例成年人和34例产妇发病。经流行病学调查表明,是由于李氏菌污染的卷心菜色拉所致。1983年6月在美国的马萨诸塞州发生李氏菌中毒有49例患者。其中7例是新生儿或婴儿,42例是免疫缺陷成年人,14例感染后死亡。经分离鉴定,证实是李氏菌4b型。流行病学调查发现是由于饮用了含有血清4b型李氏菌的巴斯德消毒奶,虽未从消毒的奶中分离出李氏菌,但从牛奶中检出了流行菌株及血清型1a菌株。调查结果表明为存在于患病牛奶中细胞内部的李氏菌有很强的耐热力所致。由此可见,牛奶经巴斯德消毒后李氏菌仍有生存的可能。奶的污染主要来自粪便及被污染的青贮饲料,并指出患有乳腺炎的牛,其奶中排出的李氏菌为 $10^3/\text{ml}$ 。其它食品如肉类,在生的和直接入口肉制品中被李氏菌污染率高达30%,受热处理过的香肠加工时刻可引起再污染。很多哺乳动物和鸟类,通过粪便携带李氏菌,在屠宰场促成交叉污染,故从生肉和家禽中分离到李氏菌是不足

内,当宿主的抵抗力降低时,L型可复成杆状菌形态而致病。

6 流行病学 李氏菌是近年来已被重视的病原菌。本菌在自然界分布甚广,不易被寒冷日晒等强烈因素所杀灭,可在 -20°C 生长。实验证明在土壤、烂菜、江河水、污染水及青饲料中均可分离到。人类粪便携带率达0.6~1.6%,人群中短期带菌者占

导致脑膜炎,甚至死亡。由李氏菌侵袭脑的患者在美国每年大约有1600人,约有400人致死^[14]。据美国疾病控制中心(CDC)证实,从病人体内及开封或密封的香肠袋中都曾分离出1/2a血清型李氏菌。也曾从病人的冰箱中的食品中培养出同一血清型李氏菌,证实在冰箱中有交叉污染的可能。

7 小结 综上所述,李氏菌对人类所致疾病

已日益引起重视。特别是该菌具有耐寒性能和广泛分布于自然环境等特点,是对当前国内冰箱储存食品的广泛应用的一新的挑战。但是,目前国内对李氏菌工作开展得不够,对它的危害性认识不足,所以本文对国外近年来有关李氏菌的研究、分离、培养、检定及流行病学方面作一综合介绍,为国内开展工作提供参考和借鉴。同时希望引起国内有关部门的重视,并采取有效控制措施,加强食品卫生监督和管理,开展宣传教育,提高人们对李氏菌危害性的认识,改善卫生环境,消除李氏菌传播媒介,及早防止李氏菌在我国的流传和传播。

附件

分离李氏菌用的增菌培养基

1、EB 增菌肉汤配方

胰酶消化大豆肉汤 (BBL) 30g
酵母浸膏 (BBL) 6g
蒸馏水 1000ml pH7.3

上述成分混合后高压灭菌,以无菌操作加入下列成分:

盐酸 Y 啉黄 (Sigma) 15mg
耐丁酸 (钠盐) 40mg
放线菌酮 (Sigma) 50mg

2、UVM 肉汤

蛋白胨 5g 胰胨 5g
牛肉膏粉 5g 酵母浸膏 5g
氯化钠 20g 磷酸二氢钾 1.35g
磷酸氢二钠 12g Y 啉黄 12mg
耐丁酸 (溶于 0.1M 氢氧化钠 2% 浓度)

1ml

3、改良琼脂 (MMA)

苯乙醇琼脂 (Difco) 35.5g
甘氨酸胨 (Sigma) 10g
氯化锂 0.5g
放线菌酮 (高压灭菌再加入) 200mg
蒸馏水 1000ml pH7.3 121 °C 15min

4、FRASER 肉汤

蛋白胨 5g 胰胨 5g
牛肉膏粉 5g 酵母浸膏 5g
氯化钠 20g 磷酸二氢钾 1.35g
磷酸氢二钠 12g 七叶灵 1g
耐丁酸 (溶于 0.1M 氯化钠, 2% 浓度) 1ml

氯化锂 3g

蒸馏水 1000ml 121 °C 15min

使用前每 10ml 肉汤中再加入 0.1ml 浓度为 2.5mg/ml 消毒过滤的 Y 啉黄 (Sigma) 和 0.1ml, 5% 消毒过滤的柠檬酸铁铵。

5、氯化锂—苯乙醇—Moxalactam (LPM)

琼脂

苯乙醇琼脂 (Difco) 35.5g

甘氨酸胨 10g

氯化锂 5g

蒸馏水 1000ml

1% Moxalactam 储备液 2ml

(溶于 pH6.0 磷酸盐缓冲液中) 培养基经 121 °C 15min 再加入 Moxalactam。)

6、改良 OXFORD 培养基 (MOX)

MOX 基础: 哥伦比亚血琼脂基础 39 ~ 44g/L

琼脂 2g/L

七叶灵 1g/L

柠檬酸铁铵 0.5g/L

氧化锂 (Sigma L 0505) 15g/L

1% 多粘菌素溶液 1ml

蒸馏水 1000ml pH7.2

121 °C 10min 冷至 46 °C, 再加入 2ml 1% 消毒过滤的 Moxalactam 溶液。1% 多粘菌素和 1% Moxalactam 溶液皆以 pH6.0 的磷酸盐溶液做溶剂。

7、CAMP 试验培养基

用胰酶消化大豆琼脂加 5% 羊血配制, 以 8ml 倒入直径 10cm 的平皿中。

8、马血盖顶培养基 (HL)

哥伦比亚血琼脂基础 100ml 121 °C 15min

取上述 10ml 倒入 10cm 直径的平皿内,使凝固,在温热时再倾注入薄层血琼脂。

上层加 5 ~ 6ml 4% 马血于哥伦比亚血琼脂内(冷至 46 °C)均匀地混合。

国际已使用的还有其它种分离用培养基,如 MLA, MYJA, ARS-MMA, TNA, TA, MBG, MBGA, ACA, RISA, CNPA, AC, MDA, DRI-A, TNSA, GBNTSM, PALCAM, OXFORD 培养基,要根据选择剂的差异,构成有不同的选择性的培养基。

参 考 文 献

[1] martin R S, et al • Asynthetic based medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* Clin. Invest. Med, 1984;7:233-237.

[2] 余贺 • 李斯特氏菌属 • 医学微生物学 • 第一版 • 北京:人民卫生出版社, 1983:536-538。

[3] Schlech W F et al • Epidemic listeriosis—evidence for trasmission by Food • New England Journal of Medicine/1983; 312: 203-206.

[4] Fleming D W, et al • Pasteurized mild as a vehicle of infection in an outbreak of Listriosis • New England Journal of Medicine/1985;312:404-407.

[5] Hayes P S, Feeley J C, et al • Isolation of

Listeria monocytogene from Raw milk • Appl. Environ microbiol/ 1986;51(2):438-439.

[6] 陈少伯 • 医用细菌学 • 中册 • 第一版 • 北京:人民卫生出版社, 1982:504-505。

[7] Seeliger H P R • Liseriosis S. Karger, Basel.

[8] Peter H A Sneath, et al • *Listeria monocytogenes* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1984;2:1235.

[9] 美国疾病控制中心 (CDC) • 发病率与死亡周报 • 1989;15:38。

[10] 刘俊译 • 李斯特氏菌病 • 流行病学周报 • 1989;2(5):167。

[11] Lovett J, et al • *Listria monocytogenes* in raw milk Detection Incidence and pathogenecity • J Food Pro-t/1987;50:88-92.

[12] Doyle M P, Schoeni J L • Selective-Enrich-ment procedure for Isolation of *Listeria monocytogenes* from Fecal and biologic specimens • Appl Environ Microbiol/1986;51:1127-1129.

[13] Kerr K • *Listeria* in Cook-Chill Food • The Lancet/1988.

[14] 晓俊摘译 • 国外科学信息 1989;24。

[15] Foodborne Listeriosis Report of a WHO Informal Working Group Geneva/1988.

流动注射分析技术 (FIA) 简介 及在食品化学分析上的应用展望(综述)

王 林 苏德昭 李 群 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

流动注射分析技术 (Flow Injection Analysis, 以下简称 FIA) 最初由丹麦学者

Ruzicka 和 Hansen 于 1975 年提出^[1], 它是溶液化学快速自动分析的新成就。能以简单