

RSK 法快速测定食品中李斯特氏菌 (译文)

李斯特氏菌作为一种主要的食源性致病菌, 仅在近几年内才被人们所认识。由于接连爆发了几起与李斯特氏菌有关的食物中毒, 致死者皆因食入由李斯特氏菌污染的奶酪引起, 所以人们更加关注奶制品中李斯特氏菌的污染。据文献报导, 李斯特氏菌可污染生奶、消毒奶、奶酪及冰淇淋。奶制品易受李斯特氏菌污染是因为: 感染有李斯特氏菌的奶牛产奶的带菌量可达 $1 \times 10^3/\text{L}$ 。污染的奶随之带进奶类加工厂, 进入被污染奶制成的其它各类食品。

李斯特氏菌还可由肉类和禽肉中分离得出。据对一些由李斯特氏菌污染的事件调查得知: 牛肉馅污染率为 70%; 猪肉、腊肠污染率为 43%; 禽肉污染率为 48%。曾有报导李斯特氏菌可由植物、地面水、土壤、饲料、下水道污物、奶及人畜粪便、家畜、禽类中分离出。在卷心菜和新鲜的蔬菜中也可发现有李斯特氏菌。

李斯特氏菌污染食物可引起食物中毒这点已很明显。它能威胁一般人群的健康, 其中威胁最大的是老人、孕妇、新生儿……免疫抑制者。因而改进检验程序对可疑食品进行李斯特氏菌的快速测定是十分重要的。目前的检验方法至少需要 3 天才能得出阳性或阴性的结果。近来, 单克隆和多克隆抗体法由选择性培养基上检测李斯特氏菌的方法有了改进。然而, 在通常的检验程序中, 人们对受损伤的微生物缺乏认识, 常用的一些选择性培养基对受损伤的微生物检出率偏低。

虽然法定的培养基几经改进, 但仍不能应对受损伤微生物复苏的需要。如一种含有丙酮酸钠、酵母提取液和过氧化氢酶的前增菌培养基虽能起些复苏作用, 但既不能对修复细胞壁提供必要的脂肪酸也不能对加快修复提供厌氧条件。有的作者认为, 厌氧条件有助于细胞修复的假设得到了证实。

对存在于食品中致病菌快速检测的真正问题不在于最终的确证而在于富集或选择性增菌一步。本篇文章的目的在于阐述能快速测出李斯特氏菌的前增菌方法。RSK (resuscitation selection kit) 法选用了一种能在 4h 内向受加热和冷冻损伤的李斯特氏菌提供复苏的营养和条件的培养基。其它增菌所需的试剂可直接加至前增菌培养基内, 过夜培养后, 用市售的单克隆抗体检测可在约 24h 内得出是否存在李斯特氏菌的检测结果。

材料及方法

两种培养基

前增菌培养基——用 0.5% 酵母提取液 (Difco 或 BBC)、0.25% 丙酮酸钠 (Sigma)、0.01% 巯基醋酸钠 (Sigma) 和 0.1% 鸡脂肪 (Capital City Products Co) 补充至胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB)、(Difco 或 BBC) 内, 用 3 份此混合液添加 1 份吐温—80 来溶解脂肪。

选择性培养基——为增强对李斯特氏菌的选择性培养, 可用含有 0.5% 酵母提

取液与 100mg 亚胺环己酮、30mg 吡啶黄和 80mg/mL 的萘啶酸补充至 TSB 中（为二倍浓度的选择性试剂）。再以灭菌的等量 TSB 添至含有前增菌液的样液中，于 35℃ 培养 16h。

受热和冷冻损伤细胞的制备

一般来说，与食品污染有关的 4 种致病菌是沙门氏菌属、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和李斯特氏菌。

用 Ray 法制备热、冷损伤细胞。制备冷冻损伤细胞是将样品于 -30℃ 鼓风式冰箱中放置 24h。试验前取出于 6℃ 放置 30min。制备热损伤细胞是用加热冲洗细胞 52℃ 30min，试验前冷至室温。

为确定损伤的等级，可由含有损伤细胞的样液中取出少量在分别含有 1% 丙酮酸钠和含有 2% 氯化钠的胰蛋白酶大豆琼脂上以不同的稀释度划线。于 35℃ 培养 16h 后进行菌落计数（FUs）。能在丙酮酸钠—TSB 培养基上生长的为受损伤及未受损伤的菌落总数。能在含有氯化钠培养基上生长的为未损伤的细菌菌落总数。由二种平板上菌落数之差可测出损伤的等级。此数值是受损伤微生物的本底，可为前增菌的研究作参考。

2 种方法的比较

取 50g 样品放在盛有 250mL 灭菌生理盐水的搅拌缸中混匀制成匀液，各取半量样液于二个灭菌的 500mL 锥形瓶内，往其中一份添加 125mL 双倍量的 BAM 增菌肉汤并按微生物手册 BAM 常规步骤操作。

添加 125mL 灭菌的双倍量前增菌液于另一锥形瓶内，搅拌混匀后于 35℃ 培养 4h。取出后添加补充有双倍量增菌试剂的等体积 TSB 液，培养 4h。在第二次培养后，由每个锥形瓶中各取部分，用

Listeria-Tek ELISA 法（Orgnon-Teknika, Durham, NC）再次培养样液 12h 后检查李斯特氏菌。

对于经 Listeria-Tek 法检出的可疑李斯特氏菌阳性的样品在 Modified Mebrides 琼脂上划线，于 35℃ 过夜培养，挑出典型菌落于 API50CH 及 BAM 法进行确证。

结果与讨论

本文所介绍的方法能对食品中的李斯特氏菌进行快速检测。一般的检验程序中预富集、富集及选菌几步花费时间冗长，最后以单克隆或多克隆抗体法测定。复苏或选择性培养基的使用能缩短前过程，使检验工作在 20 ~ 24h 内测出李斯特氏菌的存在与否。

值得注意的是对受损伤的微生物来说复苏培养基是十分有益的，未损伤的微生物在其内存活能力未增加才有实际意义。无论如何，在经加工制造的食品中，存在致病菌的被损伤细胞这点不容忽视。

损伤能导致微生物细胞活性氧的产生。例如：过氧化氢、过氧化物阴离子和羟基。在特殊的环境里，各种细菌总是通过产生过氧化氢酶来对抗。若细胞膜受损伤，细菌则力求修复大分子来弥补。复苏培养基提供丙酮酸钠来营养活性氧类。鸡脂肪内的脂肪酸及酵母提取液中的肽类能提供修复细胞膜所需的营养，巯基醋酸钠能降低培养基的氧化还原电位，故使修复作用在产生活性氧类最少的状态下进行。

很多微生物由于受热、冷却、低 pH、杀菌及受低活性水份（aw）的影响遭到非致命性的损伤，进而导致细胞膜受损、核糖体退化、酶活性减弱及动力变异。不论损伤的形式如何，各种损伤细胞一般均不能

接受选择性培养基中的各种成分及生长条件,完整、正常的细胞则能在其中生长繁殖。

混合菌群中李斯特氏菌的复苏

通常来说,食品中的李斯特氏菌含量低,其它正常的微生物大量存在,致病菌如大肠菌也较李斯特氏菌多。这就需要:

(1) 当有其它能较快繁殖且能复苏的菌群存在时,测定李斯特氏菌的复苏能力。

(2) 测定在选择性培养基上李斯特氏菌属和李斯特氏菌特异性生长的能力。

将等量受热损伤的李斯特氏菌与大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及沙门氏菌属(大约 10^6 个/mL)同放于一个复苏培养基内于加选择性试剂前培养4h,将受损伤细胞菌株加至BAM法的培养基中。测定结果表明95%以上的细胞均受损伤。而相同数量的金黄色葡萄球菌、大肠菌及沙门氏菌属均对李斯特氏菌的复苏无影响,且干扰本法对李斯特氏菌的检测。

与BAM法比较

方法的比较多集中在会引起食物中

毒,能危及生命的奶酪样品。FDA/BAM法与RSK法相比概括如下:在22份天然污染的奶酪样品中,8份样品2种方法均能给出阳性结果。RSK(Resuscitation selection kit)法可对另外4份样品确证检验为李斯特氏菌。所有的阳性样品可经典型菌落的分离及用API—50CH法及BAM法的确证实验证实。

在第二次随机取样的调查中,6份鸡肉馅均能用BAM及RSK法检出存在李斯特氏菌。此小样本调查说明,当样品不含李斯特氏菌时,RSK法不产生假阳性。另外,6份由超级市场购买的奶酪和牛肉用两种方法均未检出李斯特氏菌。

本文推荐所用的试剂是可行的,因大部分试剂的使用已被报导过。这些试剂均在实验室内作过条件试验。Farber和Peterkin已在他们的文章中对培养基和试剂的选择作过详尽的探讨。

需要时可用经典法来对李斯特氏菌作确证试验。此法与市售大部分抗体法及DNA法有很高的相关性。

(陈森译,辛显桐审校 天津市食品卫生监督检验所)

植物中多糖的测定(综述)

韩玉莲 罗雪云 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

从60年代开始,国内外医学专家就对多糖进行了广泛的研究。研究资料^[1~4]表明,多糖类成分不仅是一种非特异性免疫增强剂,而且具有降血糖、降血脂、抗血凝及止吐等多种生理活性。特别是多聚葡萄糖具有显著的抗癌活性,更引起广泛的注意。据报道^[5]这种主要由D-葡萄糖 $\beta_{1\rightarrow3}$ 键相互缩合所成的

多糖,用量在 $2\sim 15\text{mg/kg.Bw}$ 时,在鼠体内就能发挥抗肿瘤作用,其有效率可高达90%。例如:从香菇(*lentinus edodes*)分离出的香菇多糖(*lentinan*),^[6]具有 $1\rightarrow 3-\beta-D$ -葡萄糖糖链,从灵芝属真菌树舌(*Ganoderma applanatum*)(pers)子实体中分离出的多种灵芝糖^[7]都具有显著的