

国内外李斯特菌检测及其快检技术的发展

陶文靖

北京良润生物科技有限公司

摘要: 本文比较分析了国内外李斯特菌的检测方法、不同标准限量值的差异。介绍了国内外李斯特菌快速检测技术的应用及存在的问题,对我国微生物快速检测的现状进行了概述,探讨了李斯特菌快速检测技术的未来发展方向,对李斯特菌检验方法探索及快速检测技术的发展具有一定的借鉴意义。

关键词: 李斯特菌; 快速检测; 免疫学检测; 分子学检测

Development of the detection of *Listeria* and rapid test internal and abroad

Wencas Tao

Beijing Longrun Biological Technology Co., Ltd.

Abstract: This paper describes the difference of detection methods and limits for *Listeria monocytogenes* at home and abroad and introduces the current application and problems of rapid detection technology of *Listeria monocytogenes*. The overview of the progress of rapid detection of microorganisms in China is presented in this paper. Meanwhile, this paper discusses the future development trend of rapid detection technology of *Listeria monocytogenes*. This paper has a certain significance for *Listeria monocytogenes* inspection and development of rapid detection technology in China.

Keywords; *Listeria* spp. ;test method ; immunoassay; molecular biological assay

李斯特菌 (*Listeria* spp.) 广泛存在于环境中,并且在很多食品有检出,该菌在低温的条件下仍能存活和增殖,其中单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)是食源性疾病的主要致病菌之一,也是食品安全控制的重要病原体,感染后会造造成不同程度的人员死亡,受到各国的高度重视。。传统方法检测费时费力而灵敏性较差,因此,快速、高效、灵敏可信的检测方法能够更加有效判定李斯特氏菌污染风险并且控制其危害。

1 李斯特菌的污染及危害

李斯特菌在环境中普遍存在,也是污染食品的主要病原菌,往往侵染肉类、蛋类、禽类、海产品、乳制品、蔬菜等食品。其中,单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)是食源性疾病的重要病原菌,WHO 将其列为 21 世纪四大食源性致病菌之一^[1]。单核细胞增生李斯特氏菌广泛存在于土壤、人和动物的粪便中,在 4℃ 的环境中仍能生长繁殖,是冷藏食品中主要的病原菌之一,往往污染食品导致食源性疾病的暴发。近年来,单核细胞增生李斯特氏菌引起的食源性疾病事件时有发生(表 1),并造成不同程度的人员死亡,受到各国的高度重视。就美国而言,每年约有 2,600 人感染李斯特菌(美国疾病预防控制中心估计),其中 1500 人住院治疗,260 人死亡。李斯特菌致死率远高于沙门氏菌 (*Salmonella* spp.) 及大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7)。老年人、孕妇、新生儿等免疫系统较弱人群为易感人群。我国国家风险评估中心 2014 年 7 月开展的单增李斯特氏菌(*Li. monocytogenes*)感染病例监测结果显示,监测病例数 7,534 人,阳性病例 14 人。其中,围产期病人 9 例,包括 2 例流产,1 例引产,1 例死胎,1

例新生儿死亡，4 例婴儿存活；非围产期病人 5 例，包括 3 例治愈，2 例死亡。

表 1 近年来各国李斯特氏菌引起的食源性疾病情况

Table 1 The case of illness caused by food borne *Listeria* in recent years in different countries

时间	国家	污染食品	感染人数	致死率
1981	加拿大	沙拉制品	41	41%
1983	美国	巴氏奶	56	29%
1985	美国	干奶酪	142	33%
1983-1989	瑞士	软质干奶酪	122	33%
1994	美国	牛奶	52	0
1994-1995	瑞典	冷熏晕	9	25%
1998	美国	热狗	-	21 人
1999	美国	热狗、熟肉污染	103(其中 6 名妇女流产)	-
2000	法国	奶酪	-	6 人
2011	美国	香瓜	72	22%
2014	丹麦	调味肉卷、香肠、热狗	38	38%

2 李斯特菌的传统检测方法

2.1 国内外关于食品中李斯特菌限量的规定

李斯特菌极易污染食品，其中冷藏食品和即食食品危害最为严重，各国均制定了食品中李斯特菌的限量值和监测计划。美国对即食食品中单增李斯特菌的限量规定为 0/25g，并要求企业实施 GHP 和 HACCP^[2]。日本规定了非加热肉食制品和天然奶酪中的李斯特菌的限量要求为 100 cfu/g；其他产品中没有规定李斯特菌的限量要求。韩国规定了食用肉制品（生产、加工用原料除外）以及那些无需其他加工、无需加热直接食用的杀菌或灭菌产品中的李斯特菌限量要求：n=5, c=0, m=0/25 g。中国香港 2014 年修订了即食食品和指定食品中单增李斯特菌的限量值并分别做了规定。冷藏食品（冷凝食品除外）或婴儿食品中单增李斯特菌必须“在 25g 食物样本中没有发现”，其他即食食品中单增李斯特菌的限量为食物样本中小于 100CFU/g^[3]。中国大陆 2013 年颁布的《食品中致病菌限量标准 GB29921-2013》中规定^[4]，在即食肉制品中，单增李斯特菌按照二级采样方法取样不得检出（n=5, c=0, m=0）。也有一些国家，如新西兰等国家并没有制定相关的规定，仅制定了一个对人类健康不存在风险的可接受水平。综上，各国均对单增李斯特做出了限量要求，但是对李斯特个菌各国的要求不一，例如中国对李斯特属没有特殊要求，美国的西方国家要求企业运行 HACCP 体系，对环境中李斯特的检测提出了要求。

表 2 部分国家和地区对即食食品中单增李斯特菌的限量规定

Table 2 Limit regulation of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from several countries and regions

国家	产品种类	评价			
		满意	可接受	不满意	潜在危害

	特殊医学目的即食食品 和婴儿即食食品		n=10,c=0, 0/25g		
欧盟	能支持单核球增多性李斯特菌生长的即食食品,其他为特殊医学目的和婴儿的即食食品		n=5,c=0, 100CFU/g		
	不能支持单核球增多性李斯特菌生长的即食食品,其他为特殊医学目的和婴儿的即食食品		n=5,c=0, 100CFU/g		
美国	即食食品		0/25g		
日本	非加热肉食制品和天然奶酪 食用肉制品(生产、加工用原料除外)以及那些无		100 cfu/g		
韩国	需其他加工、无需加热直接食用的杀菌或灭菌产品		n=5,c=0, 0/25g		
加拿大	即食食品(即食食品中不支持生长,在良好的加工规范条件下生产)		n=5,100CFU/g		
丹麦	生食		m=10CFU/g, M=100 CFU/g		
意大利	生食食品 冷冻食品 香肠(热处理)		n=3,c=2,m=12 CFU/g, M=110 CFU/g n=5,c=2,m=12 CFU/g, M=110 CFU/g n=5,c=1,m=12 CFU/g, M=110 CFU/g		
瑞士	冷冻制品(直至食用)		100 CFU/g		
英国	所有即食食品	<20 CFU/g	20-100 CFU/g	不适用	≥100 CFU/g
澳大利亚	货架期长的冷藏食品 其他即食食品	0/25g 0/25g	0/25g <100CFU/g	不适用 不适用	≥100 CFU/g
新西兰	货架期长的冷藏食品 其他即食食品	0/25g 0/25g	0/25g <100CFU/g	不适用 不适用	≥100 CFU/g
中国香港	冷藏食品(冷凝食品除		0/25g		

中国大陆	外)或婴儿食品 即食肉制品	n=5, c=0, 0	
------	------------------	-------------	--

2.3 国内外主要检验方法

目前,食品微生物检测体系主要包括,中国的国家标准(GB4789)和检验检疫行业标准(SN)、国际化标准化组织(ISO)方法、美国食品药品监督管理局(FDA)、美国农业部(USDA)、美国官方分析化学师协会(AOAC)、加拿大健康保护部(MFLP)、欧盟食品安全局(EFSA)等检测体系^[5]。

食品中单增李斯特菌(*Li. monocytogenes*)的传统检测方法主要包括增菌、分离和鉴定3个环节^[6]。目前,分离环节常会采用显色培养基,使其菌落颜色不同于其它干扰菌,实现快速分离。鉴定常采用生化反应和血清学反应。目前,生化反应的鉴定技术多采用数值分类鉴定和自动化检测技术。该技术主要包括:

(1) API Listeria 生化鉴定试纸条;(2)全自动微生物分析系统,如 VITEK 系统、MIDI 系统及 BIOLOG 系统等。虽然该方法结果互认程度高,但操作强度大、检验周期长,需 6~7 d,无法实现快速检测。表 3 介绍了 ISO、USDA、FDA、中国国标和行标等检测方法。

表 3 国际上单增李斯特菌不同检测体系介绍

Table 3 Introduce of different detection systems of Listeria internationally

方法名称	一次增菌	二次增菌	分离	鉴定	快速方法
SN 0184-2005	加工 FB1 3±1℃, 25h±h	FB2 3±1℃, 25h±h	PALCAM/ OXA (35±℃, 24-48h)	蓝色菌落;典型运动;过氧化氢酶;革兰氏染色;溶血试验;尿素酶试验;硝酸盐还原;MR-VP;三糖铁;糖发酵;动力试验;溶血*;硝酸盐还原实验	免疫磁珠、胶体金、PCR
GB/T 4789.30-2010	LB ₁ (30±1℃, 24h)	LB ₂ (30±1℃, 18-24h)	PALCAM (36±1℃, 24-48h)	动力试验;染色镜检(革兰氏染色、典型运动);生化特性(MR-VP、糖发酵);溶血试验;协同溶血;或生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统	无
FDA	BLEB+Phy y (30℃, 4h)	BLEB+Phy+ 三种抑菌剂 (30℃, 20/44h)	OXA/PALCAM/MOX /LPM+七叶灵+Fe ³⁺ 推荐 BCM /ALOA / RapidL'mono /CHROMagarListeria	蓝色菌落*;典型运动或动力试验;过氧化氢酶;革兰氏染色;溶血试验;硝酸盐还原*;糖发酵;协同溶血;血清学检验;小鼠毒力试验*	筛选、鉴定都可以使用快速方法

USDA	UVM (30±2°C, 22±2h)	FB (35±2°C, 26-48±2h)	MOX (35±2°C, 26-48±2h)	初步鉴定: 纯菌菌落形态; 典型运动; 生化鉴定: MICRO-ID [®] <i>Listeria</i> 或 Api [®] <i>Listeria</i> 或 BAM 等方 法中的传统生化反应; 协 同溶血 遗传鉴定: 核糖体 RNA 检测; PFGE*	筛选用的快速方法 必须经过确认后 才可使用 鉴定中用到 MICRO-ID [®] 、Api [®] 、 GenProbeAccuProbe [®] 、 GENE-TRAK [®]
ISO 11290-1 (E)	半量 Fraser 肉 汤 (30°C, 24±2h)	Fraser 肉汤 (35 或 37°C, 48±2h)	OXA 和 PALCAM (30、35 或 37°C, 24-48h,) PALCAM 平板微需氧 或好氧条件培养	蓝色菌落*; 过氧化氢酶; 革兰氏染色; 动力试验或 典型运动*; 溶血试验; 糖 发酵试验; 协同溶血; 送 参考实验室 (血清或噬菌 体分型)	无

3. 李斯特菌快速筛查技术

传统方法检测费时费力操作要求高, 因此, 李斯特菌快速检测技术和产品的开发是必要的。美国、欧盟等发达国家对微生物快速检测方法的研究和产品认证体系相对成熟, 各种不同的快检系统和自动化仪器被推出, 并得到广泛的应用。

3.2 常见的李斯特菌快速检测技术

当前, 李斯特菌快速检测方法为增菌以后, 生化鉴定之前, 对样本进行快速筛选, 以缩小检测范围, 减少检测任务, 提高检测效率。快速检测方法主要包括酶底物显色技术、免疫学和分子生物学检测三大类。

3.2.1 即用培养技术

即用培养基技术则省掉了前期准备工作, 可以直接检测样品, 从而节约了大量人力成本。目前, 商业化的固定培养基技术主要有两种: 纸片法和即用平皿法。纸片法是指将显色培养基固定于纸片上, 上方再盖一层带有方格的透明薄膜, 以方便计数。即用平皿法是指用已倒有培养基的平皿, 接种操作与传统涂板、划线法一样。其优点和纸片法一样, 即省掉了前期准备工作, 可以直接接种培养。此类产品主要有 3M 的 Petrifilm 试纸片、良润生物的 MicroFast[®] 测试片、北京陆桥的 Easy test 系列产品及绿洲生化的微生物测试片等, 已被许多研究被证明与传统方法的检测结果无显著性差别。

3.2.2 免疫学检测法

该技术以抗原抗体免疫为基础, 制备特异性克隆抗体检测细菌。目前国内外李斯特菌快速检测的此类技术主要包括: 酶联荧光分析法(ELFA)、金标免疫层析技术、流式细胞技术等。

3.2.2.1 酶联荧光分析法(ELFA)

该方法是将李斯特菌抗原与单克隆抗体相结合, 然后再将结合有碱性磷酸酶的抗体与李斯特菌抗原结合。通过检测荧光强度(荧光强度与抗原含量成正比)可推算出样品中李斯特菌的数量。ELFA 灵敏度比 ELISA 高, 并省去了 ELISA 中的颜色反应, 缩短反应时间; 但缺点是成本较高, 目前主要应用在自动酶联荧光免疫检测系统(VIDAS)上^[7]。

3.2.2.2 金标免疫层析技术

该技术的原理是将高度特异性抗单增李斯特菌抗原的抗体束缚在色原载体上, 且可与固相支撑基质相分离。当检测样品中存在李斯特菌时, 测试单元的试剂将会被展开, 产生肉眼可见的确定性反应。阳性结果会在试纸窗有一指示阳性的检测线, 有效测试还需要进一步确认控制线的存在, 若无此线检测无效。北京良润生物科技有限公司开发的李斯特菌快速检测卡, 可在 5~10 min 完成检测, 样品处理简单、操作灵活、运输方便、不需要其他辅助仪器, 结果明显, 是现场检测的理想方法, 尤其是针对食品生产环境、即食食品中李斯特菌的检测。

3.2.3 流式细胞术

流式细胞术是一种在功能水平上对单细胞或其他生物粒子进行定量分析和分选的检测手段^[6], 它可以高速分析上万个细胞, 并能同时从一个细胞中测得多个参数。流式细胞技术检测微生物主要是基于单个细胞的荧光标记技术, 可对样品中死活菌总数、活菌数或特定细菌进行定量检测。该检测技术平均 1min 即可得到检测结果, 无需培养和样品制备, 灵敏度可以达到 1~100CFU, 但仪器投入较大, 检测成本相对较高, 对样本的要求高, 严重的制约这该技术在食品微生物检测中的应用。

3.2.4 分子学检测方法

分子生物学检测方法主要包括核酸探针杂交技术、PCR 检测技术等。

3.2.4.1 DNA 探针检测技术

DNA 探针法是将 2 条碱基互补的 DNA 链在适当的条件下杂交, 通过检测样品与标记性 DNA 探针之间形成的杂交分子来检测样品中的单增李斯特菌, 测定放射性或荧光强度即可得出样品中单增李斯特菌的个数^[8]。随着探针技术的逐渐成熟, 人们将多个 DNA 特异性探针固定到芯片上, 制成基因芯片, 采用荧光标记法提高检测灵敏度。该技术可同时用于多种不同种类病原菌或毒素的检测, 减少实验次数, 减小工作量。

3.2.4.2 PCR 检测技术

PCR 是近年来广泛应用的分子生物学检测方法, 在单增李斯特菌的检测中以其遗传物质高度保守的核酸序列(常用的靶序列包括 hly、actA、prfA 等)设计引物进行扩增。该方法特异性好, 但灵敏度低, 对样品进行前处理后再进行扩增, 可以提高检出率和检测灵敏度。PCR 技术还可对单增李斯特菌进行定量检测。国内外目前主要应用的 PCR 技术包括: 实时荧光 PCR(Real-time PCR)、多重 PCR、恒温扩增、RT-PCR 方法、IMS-PCR 检测技术等^[9]。

IMS-PCR 检测技术是将免疫磁珠与 PCR 结合, 建立新的检测方法—磁免疫 PCR。此方法结合免疫磁性和 PCR 技术的优点如下: 首先, 利用免疫磁珠的抗原抗体反应, 与单增李斯特菌快速结合, 达到浓缩目的,

缩短检测周期；其次，利用 PCR 方法良好的特异性克服了免疫磁珠在这方面的不足，提高检测效率；再次，利用免疫磁珠良好的敏感性，提高 PCR 方法的灵敏度。操作流程如图 1 所示。



图 1 免疫磁珠技术检测示意图

Fig.1 MACS Technology

3.2.5 李斯特菌一步增菌快速检测技术介绍

不管是国标 GB 方法还是 ISO、FDA 等方法，李斯特菌检测必须经过 2 次增菌后再进行分离鉴定，操作比较繁琐，操作过程容易造成污染，且耗时较长。由北京良润生物科技有限公司研发 MicroFast®李斯特菌快速检测系统只需要一步增菌然后点卡检测即可，具体操作流程如下：

(1) 配制：称取 $50 \pm 0.5\text{g}$ 粉末，加入预热 $30 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 无菌水 1 L，充分溶解备用。

(2) 增菌：将称量的 25g 待检样品加入到无菌均质袋内，加入 225mL 培养基，均质 2min。 $30 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 静置培养 40-48 h。

(3) 检测：将培养物混合均匀，取 1 mL 到试管中沸水（ 100°C ）加热 5 分钟，冷却至室温，用滴管滴加 3-4 滴（约 $100\mu\text{L}$ ）至金标卡的样品孔，反应 5-10min，判读结果，超过 30min 显色无效。

(4) 结果判断：

阳性反应：C、T 线均显色。

阴性反应：C 线显色，T 线不显色。

失效反应：若 C 线不显色，则测试失败或检测卡失效。



图 2 结果判读显示图

Fig.2 Interpretation of result for *Li. Monocytogenes* of MicroFast

MicroFast®李斯特菌快速增菌培养基为一步增菌培养基，即在检测扩增李斯特菌的过程中不需要二次增菌，因此操作性更方便。具有如下优点：

3.2.5.1 最好的复苏效果 对冰激凌、奶酪类产品增菌效果尤为明显

在 450 个食品样本中添加一定量李斯特菌，建立感染模型，分别用 FM 快速增菌培养基和国标法规定对培养基进行增菌检测，结果发现 FM 培养基对李斯特菌复苏效果显著，尤其是检测冰激凌、奶酪类产品，具体对比如表 4 所示。

表 4 MF 培养基与国标培养基在实际样本检测中的效果

Table 4 Difference between MF media and GB media in actual sample detection

样本	接种水平 CFU/25g	FM 快增培养基		国标法检出
		金标卡法检出	培养法检出	
肉类	5	19	19	18
冰淇淋	8	20	20	3
牛奶	3.5	34	36	32
奶酪	3.5	19	21	15
海鲜、生鱼片	2.8	45	45	45
检出总数		137	141	113
检出率（总共 450 样本）		30%	31%	25%

3.2.5.2 扩增速度更快速

通过实验间比对李斯特菌在四种不同培养基中的生长速度，发现李斯特菌在 MicroFast®培养基（以下简称 MF）中具有最快的生长速度，图 3 表明李斯特菌在 MF 培养基的生长速度均优于 LB1、BLEB 和 UVM 培养基，进口 BLEB 培养基优于 UVM 及 LB1 培养基。

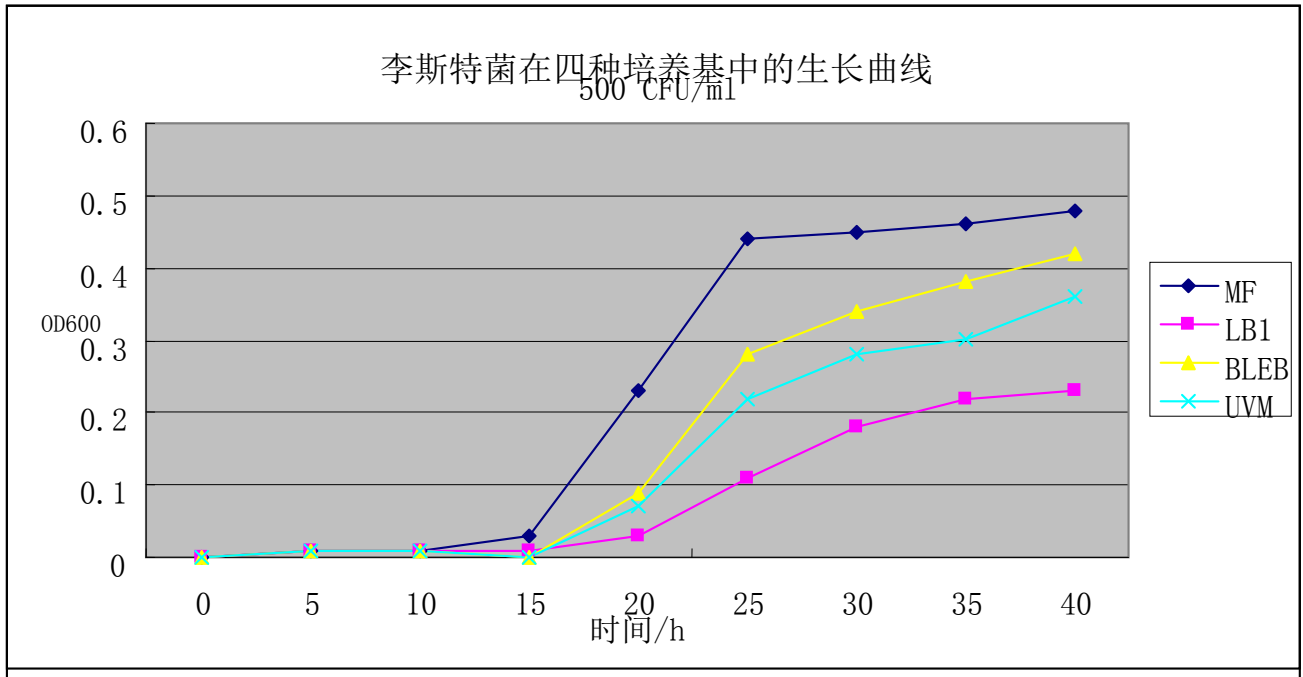


图 3 李斯特菌在不同培养基中的生长曲线

Fig.3 Growth of different strains in MF media

3.2.5.3 具有更强的选择特异性

通过实验测试，该培养基可以抑制绝大多数干扰菌的生长（1/115，即 115 株非李斯特菌种仅有 1 株能够生长）。图 4 说明了李斯特属的菌在 FM 培养基中都能正常生长，而主要干扰菌不能在 MF 培养基中生长，尤其是乳酸杆菌的抑制，对提高发酵乳中的李斯特菌检出作用明显。

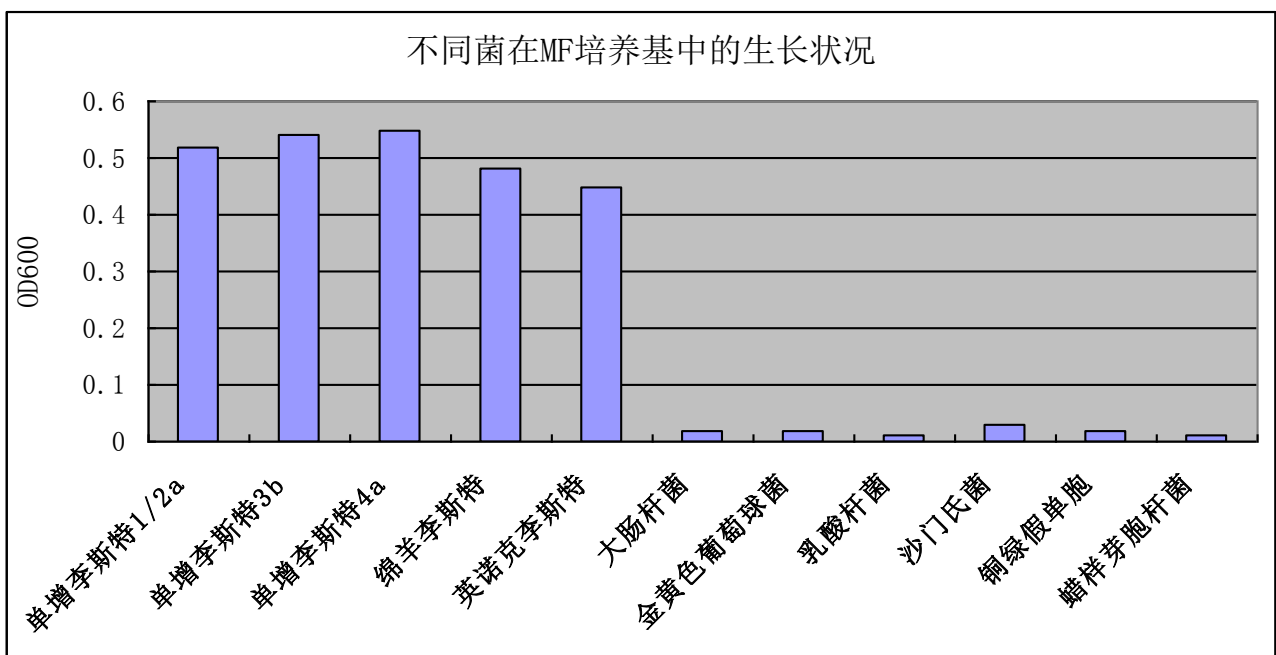


图 4 不同菌在 MF 培养基的生长状况

Fig.4 Growth of different strains in MF media

4 小结

微生物检测包括前处理、增菌、富集、检测等环节。为实现快速、实时、准确的监测食品微生物，每个环节都应有相应的筛查技术及产品。微生物快速检测今后的发展趋势主要是免疫学方法和核酸方法，分子检测技术具有高灵敏、高特异、快速等特点，在近几十年得到快速发展与应用，但相关技术还应向标准化、产品化方向发展，且开发更适合实时监测微生物的现场快速筛查技术与设备。免疫技术以高特异、快速特点而得到广泛应用，但由于微生物抗原种类各异、抗体制备昂贵等特点而滞后了该类产品的的发展，所以更低廉且特异性强的抗体制备技术还有待继续发展，如重组抗体、适配体等。我国在微生物快速检测技术的应用及技术研发方面相对欧洲国家比较落后，快速检测技术的发展和應用需要政府相关机构、科研单位、企业共同的努力建立一套快速、准确、简单的检测体系，此外，还需要降低检测成本，提供检测灵敏度和实用性，这些是今后微生物快速检测的发展趋势。

参考文献:

- [1] Oevermann A, Zurbriggen A, Vandeveld M. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise[J]. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2010, 11(5): 142-168.
- [2] FAO/WHO. Food safety risk analysis-A guide for national food safety authorities[M]. FAO Food and nutrition paper 87. 2006
- [3] 香港食品环境卫生署. 香港食品微生物含量指引 [S]. 2014
- [4] GB 29921-2013 食品安全国家标准 食品中致病菌限量标准 [S]. 2013
- [5] 何景, 程楠, 许文涛, 等. 食品微生物新型快速筛查技术研究发展[J]. *食品科学*, 2014, 10: 1-8.
- [6] 刘秀梅, 杨洋, 陈伟伟, 等. 单核细胞增生李斯特氏菌检验 (GB/T 4789.30-2010) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [7] 吕均, 郑华英. PCR 与 mini-VIDAS 相结合快速检测食品中单增李斯特菌[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(7): 1705-1706.
- [8] 华晓芳, 黄雪松. 食品中单增李斯特菌的检测新技术 [J]. *食品科技*, 2007(6): 230-232.
- [9] 付瑞燕, 周阳, 祝长青, 等. 食品中单增李斯特菌检测技术研究进展[J]. *安徽农业大学学报*, 2012, 3(6): 940-943.