

- [4] Verma IM, Somia N. Gene therapy: promises, problems and prospects [J]. Nature, 1997, 389(6648): 239-42.
- [5] Han K, Jeon MJ, Kim KA, et al. Efficient intracellular delivery of GFP by homeodomains of Drosophila Fushi-tarazu and engrailed proteins[J]. Mol Cells, 2000, 10(6): 728-32.
- [6] Yoon HY, Lee SH, Cho SW, et al. Tat-mediated delivery of human glutamate dehydrogenase into PC12 cells[J]. Neurochem Int, 2002, 41(1): 37-42.
- [7] Kwon HY, Eum WS, Jang HW, et al. Transduction of Cu, Zn-superoxide dismutase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain into mammalian cells[J]. FEBS Lett, 2000, 485(2-3): 163-7.
- [8] Jin LH, Bahn JH, Eum WS, et al. Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(11): 1509-9.
- [9] Morris MC, Depollier J, Merry J, et al. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(12): 1173-6.
- [10] 林澄涛, 姜燕芳, 阴彬, 等. 同尾酶技术再构建疟疾多价重组 DNA 疫苗中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(6): 974-7.
- [11] Lin CT, Jiang YF, Yin B, et al. Construction of malaria multivalent recombinant DNA vaccine with isocaudarner technique [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 1999, 15(6): 974-7.
- [11] Zimmernann K, Schogl D, Mannhalter JW. Digestion of terminal restriction endonuclease recognition sites on PCR products [J]. Biotechniques, 1998, 24(4): 582-4.
- [12] 丁鹏, 王家宁, 黄永章, 等. 利用 TA 克隆载体构建 pET15b-SOD1 重组质粒[J]. 邵阳医学院学报, 2005, 24(2): 65-8.

自动酶联荧光免疫分析系统检测冻肉中李斯特氏菌

孙素霞¹, 陈思强², 罗海吉¹ (¹南方医科大学营养与食品卫生学系, 广东 广州 510515; ²佛山出入境检验检疫局, 广东 佛山 528000)

摘要:目的 评价自动酶联荧光免疫分析系统(VIDAS)检测冻肉中李斯特氏菌的灵敏度和特异度。方法 采用 VIDAS 法和常规细菌培养法(GB 4789.30-2003)平行检测 148 份进境冻肉样品中李斯特氏菌,以常规细菌培养法作为参照,对 VIDAS法进行评价。结果 148 份样品中 VIDAS 法检测李斯特氏菌阳性 28 份;常规细菌培养法检测阳性 16 份,这 16 份皆是 VIDAS 法检测阳性的样品。VIDAS 法用于冻肉李斯特氏菌检测的灵敏度为 100%,特异度为 90.9%。结论 VIDAS 法检测冻肉中李斯特氏菌具有很高的灵敏度和较高的特异度,用于进境冻肉的检测,既可有效把关,又大大缩短检验时间,加快通关速度。

关键词:李斯特氏菌;自动酶联荧光免疫分析系统;冻肉;细菌检测

中图分类号:R155.55 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4254(2006)09-1325-02

李斯特氏菌(*Listeria*)是近年来报道较多的食源性病原菌之一,可引起人兽共患病,其致病性强,病死率高达 30%~70%,轻者为一般胃肠炎症状,重者可表现为败血症、脑膜炎、神经症状等,尤其是老人、小孩和孕妇更容易发病^[1]。有报道,美国最多的一年约有 1850 人死于李斯特氏菌引发的严重疾病,其中 400 多人是孕妇和新生儿^[2]。法国、日本、瑞士、英国等都相继发生李斯特氏菌污染事件,但在我国仅有少数散发李斯特氏菌报道,原因可能有两个:一是饮食习惯的差异,发达国家居民膳食以动物类食物为主,而我国居民膳食以植物性食物为主,李斯特氏菌主要污染动物类食物,尤其是冻肉、生乳制品;二是我国此类疾病并不少,是由于我们对李斯特氏菌及其引起的疾病认识不足,将其中毒事件归为“不明原因的食物中

毒”。为防止李斯特氏菌在我国造成食品安全事件,其检测方法的研究已成为食品安全方面研究人员的重要任务之一,也是口岸食品卫生工作者的重要任务之一。对李斯特氏菌的检测,一般采用我国国家标准(GB 4789.30-2003)规定的方法,即常规的细菌培养法,检测时间需 1~2 周。为缩短检测时间,加快食品口岸通关速度,本研究采用一种快速、简便、敏感的方法——自动酶联荧光免疫分析系统(VIDAS)结合常规的细菌培养法对 148 份样品进行检测,其结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品 2003 年 12 月~2005 年 12 月从美国、加拿大、丹麦、巴西等国进口的猪、鸡、牛等冻肉产品 148 份。

1.1.2 培养基 李斯特氏菌的增菌液(LB1, LB2)、李

收稿日期:2006-03-20

作者简介:孙素霞(1976-),女,硕士,助教,电话:020-62789127,E-mail:sunsuxia@fimmu.com

斯特氏菌选择性培养基(MMA)、三糖铁琼脂(TSI)、胰酪大豆琼脂(TSA-YE)、SIM 动力培养基等均购于北京陆桥商检新技术公司,均在有效期内使用。

1.1.3 试剂 李斯特氏菌生化微量鉴定管购于广东环凯生物科技有限公司,VIDAS 检测试剂购于法国生物一梅里埃公司,均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 VIDAS 法 具体检测步骤如下:25 g 样品均质于 225 ml LB1 中,30 ℃培养 24 h;取 0.1 ml 转种于 10 ml LB2 中,30 ℃培养 24 h;取约 3 ml 培养液于小试管中,100 ℃水浴 15 min。用 mini-VIDAS 仪器及其试剂进行检测,报告结果。

1.2.2 常规细菌培养法 按照 GB 4789.30-2003 方法进行检验,具体检测步骤如下:25 g 样品均质于 225 ml LB1 中,30 ℃培养 24 h;取 0.1 ml 转种于 10 ml LB2 中,30 ℃培养 24 h。按照标准进行分离培养及生化鉴定,报告结果。

2 结果

2.1 VIDAS 法与常规细菌培养法检测李斯特氏菌的结果比较

采用 VIDAS 法和常规细菌培养法平行检测 148 份冻肉样品中的李斯特氏菌,VIDAS 法检出阳性样品 28 份;常规细菌培养法检出阳性样品 16 份,这 16 份皆是 VIDAS 法检出阳性的样品。也就是说,VIDAS 法检测阴性结果与常规细菌培养法相符,但存在假阳性结果。

2.2 VIDAS 检测李斯特氏菌的灵敏度和特异度

根据阳性样品数可计算出 VIDAS 法检测冻肉中李斯特氏菌的灵敏度和特异度,灵敏度(真阳性率): $16/16 \times 100\% = 100\%$,特异度(真阴性率): $120/132 \times 100\% = 90.9\%$ 。该结果表明,VIDAS 法检测冻肉中李斯特氏菌具有很高的灵敏度和较高的特异性。

3 讨论

随着分子生物学理论和技术的不断发展,分子生物学方法的广泛使用,李斯特氏菌的检测技术也在不断改进。Jung 和 Frank 等^[3]用 in-IAB 的基因序列设计引物,PCR 方法检测李斯特氏菌,检测限可达 10^5 cfu/ml,虽然检测速度快,检测限低,但具有 PCR 常见的缺点,易污染,易出现假阳性等。Kang 等^[4]利用单克隆抗体建立了检测李斯特氏菌的 ELISA 系统,该方法虽然操作简便,但由于抗原及其丰富,且大部分优势表位与属内外细菌有广泛的交叉抗原,故易出现假阳性。另外,还有一些其他的检测李斯特氏菌的方

法,如荧光定量 PCR、显色培养基快速鉴定系统等,都因假阳性率高、操作不方便、容易交叉污染等种种原因没有得到推广使用。

本实验采用的 VIDAS 是以碱性磷酸酶(ALP)作为酶标记用酶,以反应管作为固相载体,以 4-甲基伞型酮磷酸盐(4-MUP)为酶反应荧光基质。由于 4-MUP 在 ALP 的作用下分解,脱磷酸基团生成 4-甲基伞酮,其在 360 nm 激光照射下,发出 448 nm 荧光,最终根据荧光计数仪记录所产生的荧光强度计算所测物质浓度。其中 ALP 和 4-MUP 的化学反应作为放大系统,故灵敏度达到或超过放免水平^[5]。同时具有操作简便、整个反应在再试纸条上完成,无管道,避免了交叉污染,不足之处就是检测特异性不是非常理想,但是它的灵敏度非常高,完全可以作为一种筛检试验,用于李斯特氏菌的筛查。当 VIDAS 法结果为阴性时,我们可以完全放弃检测,报告结果为阴性。这样在 48 h 左右就可获得结果,比常规细菌培养法节省至少 48 h,提高了效率;如果 VIDAS 法检测得到的是阳性结果,需作进一步的常规细菌学确证,如果结果也是阳性才可以出实验室检测阳性的报告和进一步的处理,如果确证为阴性则按阴性结果报告。

综上所述,VIDAS 法可用于李斯特氏菌的快速筛检。经检测得到阴性结果的货物可以获得放行和使用,加快了通关速度,并能减少货主费用。VIDAS 法检测结果阳性的,则需进一步做细菌学检测,确证为阳性的则作无害化处理,假阳性的作阴性结果处理。因此,VIDAS 法大大节省了检测时间,可获得相当大的经济效益,是检验检疫部门科学把关的手段之一。另外,该方法也可应用到公共卫生领域中,对怀疑污染了李斯特氏菌的食物和环境进行快速检测,可在数小时内有初步结论,从而及时采取措施,以减少经济和社会损失。

参考文献:

- [1] 黄愈玲,何晖,李秀珍,等.食品中李斯特菌污染状况调查[J].疾病监测,2005,20(7):359-61.
- [2] 田霞,李远钊,张培正.李斯特菌的污染现状及控制措施[J].现代食品科技,2005,21(1):160-2.
- [3] Jung YS, Frank JE, Brackett RE, et al. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* on frank furthers using oligo-nucleotide primers targeting the genes encoding internalin AB[J]. J Food Prot, 2003, 66(2): 237-41.
- [4] Kang YY, Youngsoon N, Minsub C, et al. Use of monoclonal antibodies that recognize p60 for identification of *Listeria monocytogenes* [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11: 446-51.
- [5] 李倩,高学慧,甘勇,等.电化学发光与酶联免疫检测血清甲胎蛋白的比较[J].中华检验医学杂志,2001,24(4):243.