

新型HK-MID-Listeria 生化鉴定系统的鉴定效果评估

田亮¹, 卢勉飞¹, 林干¹, 陈霖熙¹, 蔡芷荷¹, 吴清平^{2,*}

(1. 广东环凯微生物科技有限公司, 广东广州 510663; 2. 广东省微生物研究所, 广东广州 510663)

摘要: 对新型 HK-MID-Listeria 生化鉴定系统的鉴定性能进行评估。以传统的生化鉴定为基准方法, 对分离自食品的 101 株李斯特氏菌野生株用 HK-MID-Listeria 和 API-Listeria 两种鉴定方法进行鉴定比对。结果表明: HK-MID-Listeria 和 API-Listeria 两种鉴定系统分别与传统鉴定方法符合率分别为 100% 和 93.1%; HK-MID-Listeria 与 API-Listeria 两者的符合率为 93.1%。鉴定数据经过统计学处理, HK-MID-Listeria 与 API-Listeria 对李斯特氏菌属的鉴定结果并无显著性差异 ($P > 0.05$)。HK-MID-Listeria 鉴定李斯特氏菌属具有快速、简便的特点, 不需要特殊的仪器, 成本低廉, 更适合应用在食品卫生方面的检测。

关键词: 生化鉴定系统; HK-MID; API

Evaluation of the New Biochemical Identification System- HK- MID - Listeria

TIAN Liang¹, LU Mian-fei¹, LIN Gan¹, CHEN Lin-xi¹, CAI Zhi-he¹, WU Qing-ping^{2,*}

(1. Guangdong Huankai Microbial Sci.&Co., Ltd., Guangzhou 510663, Guangdong, China 2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510663, Guangdong, China)

Abstract: Identification performance of the new HK-MID-Listeria biochemical identification system was assessed. Based on traditional biochemical identification method, the HK-MID-Listeria identification system has been compared with that of the API-Listeria for the identification of 101 wild strains isolated from food. Results showed: the coincidence rate of the HK-MID-Listeria and the API-Listeria respectively compared with the traditional biochemical identification methods were 100% and 93.1%; The coincidence rate of the HK-MID-Listeria compared with API-Listeria the was 93.1%. Base on the statistical analysis, there is no significant difference among two identification system ($P > 0.05$) in this study. The new HK-MID-Listeria biochemical identification system has a good prospect in estimating to be attributable to consumption of foods contaminated by *Listeria*. Because HK-MID-Listeria is a rapid, simple and economical method to identify *Listeria*.

Key words: biochemical identification system; HK-MID; API

李斯特氏菌属 (*Listeria*) 为一种短小的革兰氏阳性无芽孢杆菌, DNA 碱基组成 G+C 含量为 36 mol %~38 mol %^[1-2], 广泛存在于环境当中, 仅部分种对人及动物致病, 导致脑膜炎、菌血症和孕妇早产等^[3]。在李斯特氏菌属中, 单增李斯特氏菌 (*L. Monocytogenes*) 是一种重要的病原菌, 宿主主要是人和动物。人感染李斯

特氏菌 99% 是食用了单增李斯特菌污染的食品, 尤其是即食类的食品。在美国每年大约有 2 500 人患李斯特氏菌病, 病死率高达 20%~30%^[4]。因此, 李斯特氏菌的分离和鉴定仍然是当今研究的热点。

从食品或者临床样本分离的李斯特氏菌的鉴定方法主要有以下几种: 一种是基于免疫学的方法主要有 Vidas-Lis (法国梅里埃)、Listeria 免疫试剂盒 (法国 Transia 产品) 和 Listeria 快速检测产品 (英国 Oxoid) 等, 这些方法都是基于李斯特氏菌单克隆或多克隆抗体, 能特异与李斯特氏菌鞭毛蛋白发生免疫学反应,

基金项目: 广东省财政厅项目 (2011S-P1881)

作者简介: 田亮 (1984—), 男 (汉), 研究生, 主要从事卫生微生物检验技术研究。

* 通信作者

主要是针对李斯特氏菌属特异性进行鉴定^[10]。另外一种是基于数值分类鉴定的方法-细菌数值鉴定法,是数理统计学与细菌鉴定学相结合产生的一种细菌概率鉴定方法。由于其具有快速、鉴定率高、便于实现自动化等优点,现已成为临床和食品卫生等领域细菌鉴定的主导方法。采用该技术的产品主要有 API (Analytic Products INC) 鉴定系统、罗氏公司的 Micro-ID、Biolog 和 Microgen-ID 鉴定系统等。

本研究旨在利用新型 HK-MID-Lister 鉴定系统对分离自食品的李斯特氏菌野生株进行鉴定,以便于对 HK-MID-Lister 鉴定效果进行评估。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基和试剂

API-Listeria 试剂盒:生物-梅里埃公司;TSA-YE 平板、血平板、HK-MID-Listeria 鉴定试剂盒和传统的生化鉴定试剂:广东环凯微生物科技有限公司提供。

1.1.2 测试菌株

广东省微生物研究所提供的 101 株分离自食品

的李斯特氏菌野生株,参考了食品安全国家标准李斯特氏菌检验方法^[5],利用传统的生化试剂对这些菌株进行了鉴定,其中单增李斯特氏菌(*L. monocytogenes*) 69 株,英诺克李斯特氏菌(*L. innocua*) 25 株,西尔李斯特氏菌(*L. seeligeri*) 2 株,威尔斯李斯特氏菌(*L. welshimeri*) 3 株,格式李斯特氏菌(*L. grayi*) 2 株。

1.2 实验方法

测试菌株在 TSA-YE 培养基上进行转接,按照 API-Listeria 和 HK-MID-Listeria 鉴定系统的说明书进行鉴定,传统方法参考食品安全国家标准食品微生物学检验-单核细胞增生李斯特氏菌检验^[5]。

2 结果与分析

2.1 三种鉴定方法的比较

用传统方法、API-Listeria 和 HK-MID-Listeria 同时对 101 株野生分离株进行鉴定,鉴定结果见表 1。

2.1.1 API-Listeria、HK-MID-Listeria 分别与传统的的方法鉴定比较

从表 1 中可以得出,与传统方法对李斯特氏菌属的鉴定结果相比较,整体符合率 HK-MID-Listeria 和

表 1 三种方法鉴定结果的符合率

Table 1 The coincidence rate of the three methods

李斯特菌属菌属 <i>Listeria sp.</i>	HK-MID(株)	API(株)	传统方法(株)	符合率/%		HK-MID 和 API
				HK-MID 和传统方法	API 和传统方法	
单增生李斯特氏菌 <i>L. monocytogenes</i>	69	67	69	100	97.1	97.1
英诺克李斯特氏菌 <i>L. innocua</i>	25	24	25	100	96.0	96.0
西尔李斯特氏菌 <i>L. seeligeri</i>	2	0	2	100	0.0	0.0
威尔斯李斯特氏菌 <i>L. welshimeri</i>	3	2	3	100	66.7	66.7
格式李斯特氏菌 <i>L. grayi</i>	2	1	2	100	50.0	50.0
合计	101	94	101	100	93.1	93.1

API-Listeria 分别达到了 100% 和 93.1%。传统方法和 HK-MID-Listeria 对李斯特氏菌的鉴定完全相符,这两种鉴定方法都是以糖发酵为主,两种方法区别单增李斯特氏菌和无害李斯特氏菌都应用了关键性的试验-溶血试验。而 API-Listeria 有两个测定酶的反应:甘露糖苷酶和芳基酰胺酶试验(DIM)。由此可见,生化反应原理的差异可以引起具体结果的不同。

2.1.2 API-Listeria 和 HK-MID-Listeria 的鉴定比较

从表 1 中我们可以得出,API-Listeria 和 HK-MID-Listeria 两种方法的符合率为 92.1%(93/101×100%)。其中,有 2 株单增李斯特氏菌不相符,其中 1 株单增李

斯特氏菌 API-Listeria 不能鉴定,API 的生化反应 DIM、RIB(甘露糖苷酶)两个生化反应全为阳性,与李斯特氏菌的典型生化反应不符。补做传统的 RIB 生化实验和溶血性试验进行鉴定,接种血平板出现溶血环,为溶血性反应,RIB 结果为阴性,该菌株鉴定为单增李斯特氏菌。另外 1 株单增李斯特氏菌,API-Listeria 鉴定为英诺克李斯特氏菌,其中 DIM 实验为阳性,补做血平板的实验,出现了溶血,这两株菌鉴定为单增李斯特氏菌。此外,API-Listeria 对 1 株英诺克李斯特氏菌、2 株西尔李斯特氏菌、1 株威尔李斯特氏菌和 1 株格式李斯特氏菌不能给出鉴定结果。

2.2 HK-MID-Listeria 和 API-Listeria 的鉴定差异

应用两种鉴定系统对李斯特菌属的菌株进行鉴定的数据经过统计学处理,结果见表 2, HK-MID-Listeria 鉴定系统和 API-Listeria 鉴定系统二者之间并无显著性差异($P>0.05$)。

表 2 HK-MID-Listeria 和 API-Listeria 鉴定李斯特氏菌结果差异

属种	HK-MID	API	P 值
单增李斯特氏菌	69	67	0.653
其它李斯特氏菌	32	27	
合计	101	94	

3 讨论

3.1 两种鉴定方法的使用方便性和培养时间

通过本实验的初步研究,可以得出,两种鉴定系统在鉴定李斯特菌属方面并无显著差异。Microgen 公司的 HK-MID-Listeria 鉴定条已通过了国际 AOAC 的认证。其鉴定系统中含有的 12 种生化反应中,有 3 种特征性反应:七叶苷、阿拉伯糖和海藻糖,这 3 种生化反应中任意一种为阴性即可判定鉴定的菌株为非李斯特菌属,这 3 种生化反应可以提高 HK-MID-Listeria 鉴定结果的准确性^[6]。HK-MID-Listeria 的接种和培养明显优于 API-Listeria,一方面对菌悬液的浓度没有严格的要求;另外, HK-MID-Listeria 鉴定条上面覆盖有封口薄膜,可以防止在培养过程中液体过度蒸发,不需要额外维持湿室的湿度。此外, HK-MID-Listeria 可以从选择性平板或者显色培养基平板上挑取单菌落进行鉴定;而 API-Listeria 对于鉴定的可疑菌落要求在非选择性平板上生长的纯培养物,无论使用方便性还是鉴定过程的时间都明显优于 API 的鉴定方法。

3.2 单增李斯特和英诺克利特特异性的生化反应

在李斯特氏菌鉴定中,单增李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌生物学特征和生化反应基本一致,但是,单增李斯特氏菌能够产生溶血素,这也成为单增李斯特氏菌与英诺克李斯特氏菌区别的关键性反应。

HK-MID-Listeria 鉴定系统利用了这个非常重要的生化反应-溶血实验,用来区分单增李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌。在鉴定条上,第 12 孔为空白孔,添加血红素到加有 100 μ L 菌悬液的第 12 个空的孔中培养,通过是否产生沉淀分层即可判断阴阳性,因此 HK-MID-Listeria 的鉴定实验不需要做溶血的补充实

验。

API-Listeria 鉴定系统也设计了用于区分单增李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌的特异性试验:“DIM”即芳基酰胺酶试验。“DIM”的反应结果通过颜色变化来判读,阳性反应为橙色,阴性反应为淡粉色或浅橙色,由于各种因素的影响,如:添加试剂不稳定等因素,常常会造成反应结为中间色,结果判读比较困难,容易导致误判。API-Listeria 鉴定系统的“DIM”的反应并不能完全替代溶血反应,需要补充溶血性试验。

本实验中, API-Listeria 鉴定系统对几个菌株不能鉴定其模式菌与其数据库有很大的关系。API-Listeria 鉴定系统的数据库主要是根据常见李斯特氏菌和临床分离样本建立的数据库,致使从食品中分离的部分菌株的生化反应模式不包含在 API-Listeria 的数据库中^[7]。

HK-MID-Listeria 鉴定系统模式菌数据库是基于从食品、药品和临床诊断等分离的菌株的鉴定来建立的。因此, HK-MID-Listeria 鉴定系统更适合应用从食品、药品中分离的李斯特氏菌的鉴定。相对于 API-Listeria 鉴定系统来说, HK-MID-Listeria 鉴定系统的数据库中缺乏环境如土壤等中李斯特氏菌的数据。

参考文献:

- [1] Pongpan L, Scott AJ, Mark KM, et al. High Density Microarray Analysis Reveals New Insights into Genetic Footprints of *Listeria monocytogenes* Strains Involved in Listeriosis Outbreaks[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32896
- [2] 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002
- [3] Abram M, Schlüter D, Vuckovic D, et al. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, 35(3):177-182
- [4] Roberts AJ, Williams SK, Wiedmann M, et al. Some *Listeria monocytogenes* Outbreak Strains Demonstrate Significantly Reduced Invasion, *inlA* Transcript Levels, and Swarming Motility In Vitro[J]. Appl Environ Microbiol., 2009, 75(17): 5647-5658
- [5] 中华人民共和国卫生部(发布). GB4789.30-2010 食品安全国家标准-食品卫生微生物学检验-单核细胞增生李斯特氏菌检验[S].北京:中国标准出版社,2010:2
- [6] 苏丽春,蔡芷荷,陈素云,等. 一种新的细菌生化鉴定系统-Microgen ID[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(2): 315-318
- [7] 谢小保,欧阳友生,陈仪本,等. API 系统鉴定化妆品及一次性卫生用品微生物种类的研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(1): 7-11

收稿日期 2013-02-27