

- analysis of food dyes on reversed-phase thin-layer plates [J]. Chromatogr, 1987, 411:437.
- [9] HUANG H Y, SHIH Y C, CHEN Y C. Determining eight colorants in milk beverages by capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 2002, 959:317-325.
- [10] PRADO M A, VILAS BOAS L F, BRONZE M R, et al. Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 2006, 1136:231-236.
- [11] COMBEAU S, CHATELUT M, VITTORI O. Identification and simultaneous determination of Azorubin, Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography: application to soft drinks [J]. Talanta, 2002, 56:115-122.
- [12] MERCADO M A, MORALES-LINARES J C, GRANADOS-GARCIA J, et al. Simultaneous adsorptive voltammetric analysis of mixed colorants by multivariate calibration approach [J]. Anal Chimica Acta, 1996, 329:65-72.
- [13] 徐业平, 郑屏, 汤峻松. 食品中偶氮染料丽春红 2R 的鉴定 [J]. 理化检验-化学分册, 2002, 38(9):457-461.

实验技术与方法

基于噬菌体特异性的新型荧光酶联方法检测 食品中大肠埃希菌 O157: H7

吕敬章, 刘慧玲, 黄李华, 赵芳, 马淑棉, 洪小柳
(深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518045)

摘要:目的 对一种基于噬菌体特异性的检测食品中大肠埃希菌 O157: H7 的新型荧光酶联方法 (VIDAS® ECPT) 进行了评价。方法 利用 VIDAS® ECPT、VIDAS® ECO、BAX® O157 三种快速方法检测不同浓度大肠埃希菌 O157: H7 标准菌株的生理盐水悬浮液, 并对 VIDAS® ECPT 和常规培养法检测食品中大肠埃希菌 O157: H7 进行了比对。结果 VIDAS® ECPT 检测大肠埃希菌 O157: H7 的检出限为 10^4 CFU/ml, 并且不受大肠埃希菌背景菌的干扰, 其他两种快速方法的检出限均为 10^5 CFU/ml, 其中 VIDAS® ECO 易受到背景菌的干扰; 检测不同食品基质中大肠埃希菌 O157: H7, 当大肠埃希菌 O157: H7 的浓度为 10^4 CFU/ml 时, VIDAS® ECPT 与常规培养法无统计学差异。结论 VIDAS® ECPT 方法检测大肠埃希菌 O157: H7 具有快速、灵敏、抗干扰性强的特点。

关键词: 大肠埃希菌 O157: H7; VIDAS® ECPT; VIDAS® ECO; BAX® O157

中图分类号: S852.61; Q503 文献标识码: B 文章编号: 1004-8456(2012)03-0000-00

A novel phage-derived ligand in enzyme-linked fluorescent assay for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 in food

Lü Jingzhang, Liu Huiling, Huang Lihua, Zhao Fang, Ma Shumian, Hong Xiaoliu
(Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of People's Republic of China,
Guangdong Shenzhen 518045, China)

Abstract; Objective Examining and analyzing the sensitivity of phage protein ligand assay to find out a more effective alternative method for detecting *E. coli* O157: H7 (VIDAS® ECPT). **Methods** Detection Limits of VIDAS® ECPT, VIDAS® ECO and BAX® O157 for *E. coli* O157: H7 were determined by changing the concentration of *E. coli* O157: H7 suspension; and comparative evaluation of VIDAS® ECPT with conventional culture-based method for the detection of *E. coli* O157: H7 in foods was conducted. **Results** *E. coli* O157: H7 suspension at the level of 10^4 CFU/ml could be detected by VIDAS® ECPT, however, the minimum concentration of *E. coli* O157: H7 suspension that could be detected by the other two methods (VIDAS® ECO and BAX® O157) was 10^5 CFU/ml. There was no significant difference between VIDAS® ECPT and conventional culture-based method for the detection of *E. coli* O157: H7 in foods. **Conclusion** VIDAS® ECPT is superior to the other two alternative methods for the detection of *E. coli* O157: H7.

Key words: *Escherichia coli* O157: H7; VIDAS® ECPT; VIDAS® ECO; BAX® O157

收稿日期: 2012-02-10

基金项目: 深圳出入境检验检疫局科技计划项目 (SZ2009013)

作者简介: 吕敬章 男 副主任医师 硕士生 研究方向为食品安全与检验 E-mail: jz_lu@yahoo.com.cn

大肠埃希菌 O157: H7 是肠出血性大肠埃希菌 (EHEC) 中最重要的血清型^[1], 很少量的该菌即可致人发生出血性结肠炎、溶血性尿毒综合征、血小板减少性紫癜等严重并发症, 抗生素治疗还有加剧病情的危险^[2], 感染所致病死率高。食品中大肠埃希菌 O157: H7 污染已成为全球关注的公共卫生问题。

食品中大肠埃希菌 O157: H7 检测的基准方法是传统的微生物培养法^[3], 此外国内外还报道过许多快速检测方法, 如基于抗原抗体的 ELISA 法^[3-4]、免疫磁珠法^[5]、胶体金免疫层析法^[6], 以及检测大肠埃希菌 O157: H7 特有基因的 PCR 法^[7]、荧光 PCR 法^[3,8] 等。传统的培养方法检测周期长, 一些快速方法又存在灵敏度或特异性低、仪器耗材昂贵等缺点^[9]。由于食品加工工艺等因素的影响, 肠出血性大肠埃希菌 O157: H7 在食品中一般呈现低含量污染状况, 因此检测食品中大肠埃希菌 O157: H7 需要简单、快速、灵敏度高、特异性强的方法。

噬菌体 (bacteriophage, phage) 是一类感染细菌等微生物的病毒, 噬菌体有严格的宿主特异性, 只寄居在易感宿主菌体内, 故可利用噬菌体进行细菌的流行病学鉴定、分型与溯源以及细菌感染的治疗^[10]。近来发现, 利用噬菌体特异性识别细菌宿主黏附结构, 可建立一种检测宿主细菌的新型荧光酶联方法, 该方法与现有的方法相比有更强的特异性和抗干扰能力^[11]。本文采用这种基于噬菌体特异性的新型荧光酶联方法 VIDAS® UP *E. coli* O157: H7, 并与目前常见的检测食品中大肠埃希菌 O157: H7 的方法进行比较^[3]。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

1.1.1 标准菌株

大肠埃希菌 O157: H7 ATCC12900 (美国 MBL 公司); 大肠埃希菌 ATCC 11775 (美国 MBL 公司)。

1.1.2 主要试剂

VIDAS® UP *E. coli* O157: H7 (E^CPT) 试剂盒 (法国 Biomerieux 公司); VIDAS® *E. coli* O157 (ECO) 试剂盒 (法国 Biomerieux 公司); BAX® system PCR Assay *E. Coli* O157: H7 (BAX® O157) 试剂盒 (美国 DuPont 公司); VITEK-GN 鉴定卡 (法国 Biomerieux 公司); EC 肉汤 (英国 Oxoid 公司); 山梨醇麦康凯琼脂 (英国 Oxoid 公司); O157 显色琼脂 (法国 CHROMagar 公司); 0.85% NaCl 生理盐水 (法国 Biomerieux 公司); 三糖铁琼脂 (北京陆桥公司); LST-MUG (北京陆桥公司); 大肠埃希菌

O157: H7 血清 (泰国 S&A 公司); 血平板 (北京陆桥公司)。

1.2 仪器与设备

mini VIDAS® 全自动酶联荧光免疫系统 (法国 Biomerieux 公司); BAX® System Q7 全自动病原微生物检测系统 (美国 DuPont 公司); VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统 (法国 Biomerieux 公司); KB240 恒温冷冻培养箱 (德国 Binder 公司); HIRAYAMA HV 50 高压灭菌器 (日本 HIRAYAMA 公司)。

1.3 方法

1.3.1 三种快速检测方法检出限的比较

标准菌株悬浮液的准备: 将标准菌株大肠埃希菌 O157: H7 接种在血平板上, 36 °C 培养 18 ~ 20 h 后, 小心刮取菌苔在 0.85% NaCl 生理盐水中混匀, 再用生理盐水稀释成不同浓度的菌悬液。取一定量的菌悬液涂布在血平板上, 36 °C 培养 18 ~ 20 h 后进行计数, 验证菌悬液的浓度。

检测: 对五份浓度分别为 10¹、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ CFU/ml 的系列大肠埃希氏菌 O157: H7 菌悬液, 按试剂盒说明书分别用 VIDAS® ECPT 试剂盒、VIDAS® ECO 试剂盒、BAX® O157 试剂盒进行检测。

1.3.2 背景菌对三种快速检测方法的影响

标准菌株悬浮液的准备: 按 1.3.1 的方法制备标准菌株大肠埃希菌 O157: H7 和大肠埃希菌悬浮液。

检测: 根据 1.3.1 试验得到三种快速检测方法检出限的结果, 选择浓度为各方法检出限的大肠埃希菌 O157: H7 菌悬液, 在其中分别添加 10、100、1 000、10 000 倍浓度的大肠埃希菌菌悬液, 按试剂盒说明书分别用 VIDAS® ECPT 试剂盒、VIDAS® ECO 试剂盒、BAX® O157 试剂盒进行检测。试验重复 5 次。

1.3.3 VIDAS® ECPT 与传统微生物培养法的比较实验

标准菌株悬浮液的准备: 按 1.3.1 的方法准备浓度为 10¹ CFU/ml 大肠埃希菌 O157: H7 标准菌株的菌悬液, 并涂布血平板验证菌悬液的浓度。

基质制备: 准备经检测确认大肠埃希菌 O157: H7 为阴性的牛肉、生奶、蔬菜、鸡肉、鱼肉五种食物各 10 份, 每份分别称取 25 g 至均质袋中, 加入 225 ml 添加有新生霉素的 mEC 肉汤^[3], 充分均质后添加浓度为 10¹ CFU/ml 大肠埃希菌 O157: H7 标准菌株的菌悬液后, 再充分均质。将添加的标准菌株改为大肠埃希菌, 重复以上步骤。

检测:将上述添加菌株及充分均质的 mEC 肉汤置 36 °C 培养 18 ~ 20 h,按试剂盒说明书用 VIDAS® ECPT 试剂盒进行检测;同时按文献[3]中所述的微生物培养法进行检测:将培养后的 mEC 肉汤划线接种在分离琼脂改良的山梨醇麦康凯琼脂(SMAC-CT)或 O157 显色琼脂上,36 °C 培养 18 ~ 20 h后,挑取疑似菌落接种在三糖铁琼脂和 LST-MUG 中进行初步生化鉴定,对疑似细菌,再用 VITEK-GN 卡进行生化鉴定,并用大肠埃希菌 O157: H7 血清进行血清学试验。

2 结果与分析

2.1 三种快速检测方法检出限试验结果

三种快速检测方法检出限试验结果见表 1。当大肠埃希菌 O157: H7 标准菌株悬浮液浓度为 10^4 CFU/ml 时,VIDAS® ECPT 检测结果为阳性,而 VIDAS® ECO 和 BAX® O157 检测结果为阴性;当大肠埃希菌 O157: H7 标准菌株悬浮液浓度为 10^5 CFU/ml 时,三种快速检测方法结果均为阳性。可见,VIDAS® ECPT 检测大肠埃希菌 O157: H7 的检出限为 10^4 CFU/ml,而 VIDAS® ECO 和 BAX® O157 检测大肠埃希菌 O157: H7 的检出限为 10^5 CFU/ml。

表 1 三种快速检测方法检出限试验结果

Table 1 Detection limit for the three fast detection methods

大肠埃希菌 O157: H7 悬浮液 浓度(CFU/ml)	检测结果		
	VIDAS® ECPT	VIDAS® ECO	BAX® O157
10^1	-	-	-
10^2	-	-	-
10^3	-	-	-
10^4	+	-	-
10^5	+	+	+
10^6	+	+	+

注:“+”为阳性,“-”为阴性。

2.2 背景菌对三种快速检测方法的影响

背景菌对三种快速检测方法影响的试验结果见表 2。当添加 $10 \sim 10\,000$ 倍大肠埃希菌作为背景菌,不影响 VIDAS® ECPT 对大肠埃希菌 O157: H7 的检出;当添加 $10 \sim 1\,000$ 倍大肠埃希菌作为背景菌,不影响 BAX® O157 对大肠埃希菌 O157: H7 的检出;当添加 $10 \sim 100$ 倍大肠埃希菌作为背景菌,不影响 VIDAS® ECO 对大肠埃希菌 O157: H7 的检出。而当添加 $1\,000$ 倍大肠埃希菌作为背景菌时,VIDAS® ECO 对大肠埃希菌 O157: H7 的检出受到了干扰。

2.3 VIDAS® ECPT 与传统微生物培养法的比较

VIDAS® ECPT 与传统微生物培养法的比较试验结果见表 3。根据文献^[12-13]计算 VIDAS® ECPT

方法的性能指标:相对灵敏度为 97.83%,相对特异性为 94.44%,相对准确度为 96%,假阴性率为 2.17%,假阳性率为 5.56%。统计学分析^[14], $P > 0.05$,表示新型荧光酶联方法(VIDAS® ECPT)与基准方法微生物培养法之间无显著性差异。

表 2 背景菌对不同检测方法的影响

Table 2 The influence of background flora on the detection of *Escherichia coli* O157: H7

标准菌株悬浮液 浓度(CFU/ml)		检测结果		
大肠埃希 菌 O157: H7	大肠埃 希菌	VIDAS® ECPT	VIDAS® ECO	BAX® O157
10^4	10^5	+	-	-
	10^6	+	-	-
	10^7	+	-	-
	10^8	+	-	-
10^5	10^6	+	+	+
	10^7	+	+	+
	10^8	+	-	+

注:“+”为阳性,“-”为阴性。

表 3 VIDAS® ECPT 与传统微生物培养法的比较

Table 3 Evaluation of phage protein ligand assay with reference method

VIDAS® ECPT 结果	微生物培养法结果		总计
	阳性	阴性	
阳性	45	3	48
阴性	1	51	52
总计	46	54	100

注: $\chi^2 = 0.25$; $P > 0.05$ 。

3 讨论

大肠埃希菌 O157: H7 在食品中一般呈低剂量污染状态^[15],人感染后会引发严重症状,治疗缺乏有效措施,因此研究食品中大肠埃希菌 O157: H7 的检测方法受到广泛关注。由于食品基质复杂,背景干扰菌多^[16],大肠埃希菌 O157: H7 与其他大肠埃希菌不易区分,这给检测食品中大肠埃希菌 O157: H7 带来了很大困难。食品中大肠埃希菌 O157: H7 的检测方法各有特点^[17],传统的微生物培养法是基准方法,但耗时费力,检测时间长;对于常用的快速方法,由于食品中存在许多与大肠埃希菌 O157: H7 抗原有交叉反应的细菌^[18],会导致免疫学检测方法出现假阳性和灵敏度下降;培养基成分以及一些食品基质,可抑制 PCR 反应^[19],对检测大肠埃希菌 O157: H7 特有基因的 PCR 方法带来不利影响。近来,一种基于噬菌体特异性的新型荧光酶联方法(VIDAS® ECPT)可以检测食品中大肠埃希菌 O157: H7^[11],该方法用噬菌体尾丝蛋白特异性识别大肠埃希菌 O157: H7,结合荧光酶联技术检测大肠埃希菌 O157: H7,灵敏度高,抗干扰能力强,增菌时间短,检测样品量大。

本研究用三种快速方法检测大肠埃希菌 O157: H7 标准菌株的生理盐水悬浮液, VIDAS® ECPT 可检出浓度为 10^4 CFU/ml 的大肠埃希菌 O157: H7, 灵敏度要比 VIDAS® ECO 和 BAX® O157 高 10 倍; 即使添加 10 000 倍浓度的大肠埃希菌作为背景干扰菌, 检出限也不受影响。而在本实验条件下, 当背景菌大肠埃希菌的浓度为大肠埃希菌 O157: H7 的 1 000 倍时, VIDAS® ECO 检测大肠埃希菌 O157: H7 会受到干扰。通过与基准方法进行配对比较, VIDAS® ECPT 检测大肠埃希菌 O157: H7 的方法性能指标能满足要求^[12-13], 与基准方法相比无显著性差异。这表明, VIDAS® ECPT 检测大肠埃希菌 O157: H7 的方法具有快速、灵敏、抗干扰性强的特点。

参考文献

- [1] JAEGER J L, ACHESON D W. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2000, 2(1): 61-67.
- [2] WONG C S, JELACIC S, REBECCA L H, et al. The Risk of the Hemolytic-Uremic Syndrome after Antibiotic Treatment of *Escherichia coli* O157: H7 Infections [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342:1930-1936.
- [3] 卫生部. GB/T 4789. 36—2008 食品卫生微生物学检验大肠埃希菌 O157: H7/NM 检验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [4] 葛萃萃, 钟青萍, 张旺, 等. 双抗夹心 ELISA 检测食品中大肠埃希菌 O157: H7 方法研究 [J]. *食品科学*, 2007, 28(1): 171-175.
- [5] GEHRING A G, TU S I. Enzyme-linked immunomagnetic electrochemical detection of live *Escherichia coli* O157: H7 in apple juice [J]. *J Food Protec*, 2005, 68: 146-149.
- [6] 王静, 陈维娜, 胡孔新, 等. 大肠杆菌 O157 胶体金免疫层析快速筛查方法的建立 [J]. *卫生研究*, 2006, 35(4): 439-441.
- [7] 巢强国, 杨学明, 葛宇, 等. PCR 法检测食品中大肠埃希氏菌 O157: H7 [J]. *食品科学*, 2010, 31(8): 212-215.
- [8] 易海华, 赵金伟, 徐波巢, 等. 使用环介导等温扩增技术快速检测食品中肠出血性大肠杆菌 O157: H7 的初步研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2010, 22(3): 206-213.
- [9] 宋宏新, 李宏. 肠出血性大肠杆菌 O157: H7 的检测方法进展 [J]. *食品科学*, 2007, 28(11): 607-610.
- [10] WALDOR M K, FRIEDMAN D I, ADHYA S L. 噬菌体——在细菌致病机理及生物技术中的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 375-432.
- [11] SAVOYE F, FENG P, ROZAND C, et al. Comparative evaluation of a phage protein ligand assay with Real-Time PCR and a reference method for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 in raw ground beef and trimmings [J]. *J Food Protec*, 2011, 74(1): 6-12.
- [12] The International Organization for Standardization. ISO 16140: 2003 Microbiology of food animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods [S]. Geneva: ISO copyright office, 2003.
- [13] AOAC. Guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis [EB/OL]. (2002-03) [2011-06-18] http://www.aoac.org/Official_Methods/Food_Micro_Validation_Guidelines.pdf.
- [14] 罗明奎. 配对资料 McNemar 检验法的适用范围 [J]. *中国卫生统计*, 1999, 16(3): 191.
- [15] GE B, LARKIN C, AHN S, et al. Identification of *Escherichia coli* O157: H7 and other enterohaemorrhagic serotypes by EHEC-hly A targetting, strand displacement amplification, and fluorescence polarization [J]. *Molecul Cellular Probes*, 2002, 16(2), 85-92.
- [16] VOLD L, HOLCK A, WASTESON Y, et al. High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef [J]. *Int J Food Microbiol*, 2000, 56(2-3): 219-225.
- [17] DEISINGH A K, THOMPSON M. Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 in foods [J]. *J Appl Microbiol*, 2004, 96: 419-429.
- [18] 王岚, 贾华云, 张林清, 等. 能与沙门菌及 O157 诊断血清交叉凝集的细菌分离与鉴定 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(8): 212-215.
- [19] GIBB A P, WONG S. Inhibition of PCR by Agar from Bacteriological Transport Media [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 275-276.