

[9] TANG Suni, SINGH C, NALL D, et al. The dietary bioflavonoid quercetin synergizes with epigallocatechin gallate (EGCG) to inhibit prostate cancer stem cell characteristics, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition [J]. J Mol

Signal, 2010, 18(5): 14.

[10] 徐静, 郭长江, 韦京豫, 等. 蔬菜中类黄酮物质的高效液相色谱测定法[J]. 营养学报, 2005, 27(4): 276-279.

实验技术与方法

食品中大肠杆菌 O157: H7的几种检测方法的比较

周勇, 张晶, 侯水平, 邓志爱, 吴新伟, 陈守义, 杨智聪
(广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510440)

摘要:目的 评估平板分离培养法、免疫磁珠分离(IMS)法、VIDAS全自动酶标免疫测试系统、BAX全自动病原菌检测系统及环介导等温扩增(LAMP)技术在食品中检验肠出血型大肠埃希菌 O157: H7的特异性、敏感性。方法 使用平板分离培养法、免疫磁珠分离法、VIDAS法、BAX法及LAMP法对人工制备的染菌猪肉样本进行检测,并对这几种方法进行比较。结果 BAX法和LAMP法的检出率最高,分别是89.1%和85.9%,免疫磁珠法和VIDAS法检出率次之,分别是75.0%和78.1%,传统分离培养法为43.8%。结论 BAX法和LAMP法具有快速、高效、特异性好、敏感性高的特点,可快速筛选食品中可能存在的肠出血型大肠埃希菌 O157: H7。

关键词:大肠杆菌 O157: H7; BAX全自动病原菌检测系统; 环介导等温扩增; 检测方法; 食源性致病菌

中图分类号: R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2012)01-0027-04

Comparison of methods detecting *Escherichia coli* O157: H7 in foods

Zhou Yong, Zhang Jing, Hou Shuiping, Deng Zhiai, Wu Xinwei, Chen Shouyi, Yang Zhicong
(Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440, China)

Abstract: Objective To examine the specificity and sensitivity of traditional cultural method, immunomagnetic beads separation method (IMS), VIDAS, BAX and Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the detection of O157: H7 in foods. **Methods** Traditional cultural method, IMS, VIDAS, BAX and LAMP method were used and compared in detecting O157: H7 in pork samples. **Results** The detection rate of BAX, LAMP, IMS and VIDAS method was 89.1%, 85.9%, 75.0% and 78.1% respectively, while that of traditional cultural method was only 43.8%. **Conclusion** BAX and LAMP method were proved to be rapid, highly effective, specific and sensitive for the detection of O157: H7 in foods.

Key words: *Escherichia coli* O157: H7; BAX; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); detection methods; foodborne pathogens

肠出血型大肠埃希菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157: H7是导致肠出血性大肠杆菌食源性疾病暴发的主要血清型,儿童易感,夏季多见,症状可为轻度水泻到剧烈腹痛的血便,能引起人出血性肠炎(hemorrhagic colitis, HC),严重者可发生溶血性尿毒综合征(hemolytic uremic

syndrome, HUS)和血栓性血小板减少性紫癜(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)。自1982年美国首次分离该菌以来^[1],世界各地不断有EHEC O157: H7感染病例的报道。1999—2000年我国苏皖等地也曾发生EHEC O157: H7大规模暴发流行。O157: H7感染已成为严重的公共卫生问题,因此,快速、敏感、特异的检测方法对于防控工作具有重要意义。

本研究对平板分离培养法、免疫磁珠分离法(IMS)、VIDAS全自动酶标免疫测试系统、BAX全自动病原菌检测系统及环介导等温扩增法(LAMP)进行比较,评估这几种检验方法在检验食品中EHEC O157: H7的特异性、敏感性。

收稿日期: 2011-07-26

基金项目: 广州市医药卫生科技项目(2009-YB-125); 广州市卫生局医药卫生科技重点项目(2006-Zdi-11)

作者简介: 周勇 男 硕士 技师 研究方向为微生物检验

通信作者: 杨智聪 男 主任医师 研究方向为传染病预防控制

E-mail: yangzc@gzcdc.org.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

肠出血型大肠杆菌 O157: H7 菌株共 16 株用于敏感性实验(南方医科大学公共卫生与热带医学学院微生物学系万成松教授赠送)。金黄色葡萄球菌 6538、宋内志贺菌、痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏志贺菌、大肠杆菌 25922、大肠杆菌 8099、肠产毒型大肠杆菌、肠侵袭型大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、霍乱弧菌、甲型副伤寒沙门菌、肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌、单核细胞增生李斯特菌、变形杆菌、阪崎肠杆菌等 20 株菌用于特异性实验,由本实验室保存。

1.1.2 试剂

改良 EC 肉汤 + 新生霉素培养基(mEC + n)、改良山梨醇麦康凯(CT-SMAC)琼脂(英国 OXIOD)、CHROMagarO157 显色琼脂(郑州博赛);VIDAS *E. coli* O157 试剂盒、VITECK GN 鉴定卡(法国梅里埃);O157 和 H7 诊断血清(日本生研);抗 O157 免疫磁珠(丹麦 SSI);O157: H7 LAMP 检测试剂盒(广州华峰)。

1.1.3 仪器

Dynal 样品混合器;全自动酶联荧光免疫分析仪(mini VIDAS);全自动病原菌检测系统(BAX Q7);全自动微生物鉴定系统(VITEK Compact 2)。

1.1.4 食物样品

新鲜猪肉样品采集自本地超市,每份 250 ~ 500 g,经单独包装后立即送回实验室。

1.2 方法

1.2.1 实验设计

采用双盲实验设计,第 1 组实验人员负责复苏菌株、制备菌悬液。第 2 组实验人员将菌悬液与猪肉样品进行均质然后增菌培养。第 3 组实验人员进行检测。

1.2.2 菌株复苏

取 -80 °C 甘油保存菌种,加入适量营养肉汤配成菌种悬液。将菌种悬液加入 10 ml 营养肉汤中混匀,置 37 °C 培养 18 ~ 24 h。取第 1 代培养的菌悬液,接种于营养琼脂平板上,37 °C 培养 18 ~ 24 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落,接种于营养琼脂斜面,于 37 °C 培养 18 ~ 24 h,即为第 3 代培养物。取第 3 代营养琼脂斜面新鲜培养物,吸取 5 ml 稀释液(PBS, pH7.4)加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。随后移至另一无菌试管中,震荡使细菌悬浮均匀。初步制成的菌悬液,先用比浊仪粗测其菌浓度,然后进行 10 倍系列稀释。每个稀释度取 0.1 ml

菌液涂布平板,37 °C 培养 24 h,然后进行活菌计数。

1.2.3 人工污染食品的制备

在均质袋中加入预检 O157: H7 阴性的 25 g 猪肉样本,再加入 0.1 ml 菌液(16 株 O157: H7 每株菌选用 2 个稀释度,每个稀释度做双份样本,共 64 份样本),并在均质器上均质 1 min,最后加入 225 ml mEC + n,37 °C 培养 18 ~ 24 h。20 株非 O157: H7 食源性致病菌株稀释至约 10^5 cell/ml,按照上述方法制备猪肉样本,每株菌做双份样,共 40 份样本。

1.2.4 阳性样本的建立

16 株 O157: H7 培养物用 PBS 稀释至约 10^5 cell/ml,取 0.1 ml 菌液加入 25 g 猪肉样品,然后加入 225 ml mEC + n,37 °C 培养 18 ~ 24 h,作为实验的阳性对照。

1.2.5 敏感性实验

64 份人工污染 O157: H7 的猪肉样品采用平板分离培养法、免疫磁珠法、VIDAS、BAX 法、LAMP 法进行 O157: H7 检测。

1.2.6 特异性实验

40 份非 O157: H7 致病菌株污染的猪肉样品按照上述方法进行 O157: H7 检测,验证 5 种检验方法从食品中检验 O157: H7 的特异性。

1.2.7 数据分析

使用 χ^2 分割法对各种检验方法的阳性率进行两两比较。

2 结果

2.1 样本接种量的活菌平板计数结果

16 株 O157: H7 制备人工污染猪肉样品的接种量的活菌平板计数结果见表 1,低浓度接种量为 10 ~ 38 CFU/25 g,高浓度接种量为 58 ~ 112 CFU/25 g。有 5 株菌在极低浓度接种量下(10 ~ 18 CFU/25 g)5 种检验方法都无法检出,其余菌株制备的样本在各种浓度接种量下至少有 1 种检验方法可检出。

2.2 敏感性实验

平板分离法采用 CT-SMAC 和 CHROMagarO157 两种平板,在高浓度接种量的分离率达 53.1%,在低浓度接种量下只有 34.4%,与其余 4 种检验方法比较都有明显差异(表 2)。而其余 4 种检验方法的阳性率之间没有统计学意义。2 种分子生物学方法 BAX 和 LAMP 法的阳性率最高,分别是 89.1% 和 85.9%,2 种免疫学方法免疫磁珠法和 VIDAS 法的阳性率次之,分别是 75.0% 和 78.1%。在高浓度接种量的 32 份样品,BAX 法可全部检出,LAMP 法检出 30 份阳性,而这两种方法对低浓度接种量的样

表1 16株 O157 样本的接种量以及5种方法的检测结果

Table 1 Inoculation quantity of sixteen *E. coli* O157 strains and the results detected by five methods

O157: H7菌株	样本接种量(CFU/25 g)	检测结果				
		培养法	免疫磁珠法	VIDAS	BAX	环介导增温
00E066	10/17 ^a	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+
	65/60 ^b	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-
882364	22/19	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
	77/82	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
246	14/20	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+
	69/78	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+
85933	19/23	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+
	86/97	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
01A002	12/19	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+
	63/72	-/-	+/-	-/-	+/+	+/+
edl933	34/38	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	97/89	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
01F065	21/30	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
	79/77	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
00H112	16/20	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	83/79	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
49	23/29	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+
	97/102	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
B II a212	12/15	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+
	58/61	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+
85988	19/28	+/-	-/+	-/+	+/+	+/+
	91/87	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
A1a10	27/31	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	84/76	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
A1c23	21/23	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+
	69/72	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+
00F082	30/34	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
	112/104	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
A1b61	18/29	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	77/75	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+
Cua9	23/36	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	89/96	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+

注:a 低浓度接种量,10/17 表示一个稀释度双份样本的活菌计数结果;b 高浓度接种量,65/60 表示一个稀释度双份样本的活菌计数结果。

表2 5种方法检测 O157 的敏感性

Table 2 The sensitivity of five methods in detecting *E. coli* O157

接种量(CFU/25 g)	菌株数	阳性样本数(阳性率%)				
		平板分离法	免疫磁珠法	VIDAS	BAX	环介导增温
高浓度 58 ~ 112	32	17(53.1)	28(87.5)	28(87.5)	32(100)	30(93.8)
低浓度 10 ~ 38	32	11(34.4)	20(62.5)	22(68.8)	25(78.1)	25(78.1)
合计	64	28(43.8) ^a	48(75.0)	50(78.1)	57(89.1)	55(85.9)

注:a 与其他方法相比, $P < 0.0045$ 。

品检出率相同。值得注意的是,有2株菌的样品在低浓度接种量(菌株246 14 CFU/25g和菌株B II a212 12 CFU/25g)用BAX法和LAMP法检测阳性,但不能分离出活菌,这2株菌的检测结果未被计入阳性结果。

2.3 特异性实验

5种检验方法对20株非O157菌株制备的40份猪肉样本进行检测,均无阳性报告。

3 讨论

传统的平板分离培养技术准确性较高,但检验

周期长。VIDAS、BAX、LAMP则具有快速、特异性高等特点,适合肠出血型大肠埃希菌O157:H7的快速筛选^[2-4]。BAX系统使用PCR技术扩增目标片段,其配套的试剂盒将扩增引物、酶以及PCR反应所需的各种成分制备成一个固态试剂装入PCR反应管中,检测时只需要在管中加入提取的模板即可。反应开始后,其试剂中的荧光染料就与双链DNA结合,扩增结束后,BAX系统通过分析荧光信号判断出结果。BAX系统由于其操作简便、污染少、特异性、敏感性高等特点已经成为多种致病微生物的检测标准^[5]。本研究中,BAX系统检测样本中O157

高浓度接种量时的阳性率达 100%，在总共 64 份样本中的检出率是 89.1%，是几种检验方法中最高的。

LAMP 是一种新型的核酸扩增技术，其操作简便，不需要 PCR 扩增仪；检测时间短，一般只需要 60 min；特异性高，针对目的片段上 6 个位点设计 4 条引物；结果可用肉眼观察。目前 LAMP 技术已经被广泛应用于致病微生物的检测，并且已有很多商品化的试剂盒面世^[6-7]。本研究中用 LAMP 检测样本中 O157 高浓度接种量时的阳性率达 93.8%，总体阳性率为 85.9%。

BAX、LAMP 法敏感性较高，但可能出现阳性结果后在样本中却分离不到活菌，有一种可能是由于食品中杂菌较多，某些菌在和 O157:H7 竞争生长中占有优势导致 O157:H7 死亡或数量减少，这两种方法能检测出 O157:H7 死菌或少量活菌的核酸但却无法通过分离培养方法分离到活菌，这需要研究更好的选择性增菌培养基来解决这些问题。

参考文献

[1] RILEY L W, REMIS R S, HELGERSON S D, et al. Outbreaks

of hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype[J]. *N Engl J Med*,1983, 308(12) :681-685.

[2] JOHNSON J L, BROOKE C L, FRITSCHER S J. Comparison of the BAX for screening *E coli* O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef[J]. *Appl Environ Microbiol*,1998,64(11) :4390-4395.

[3] 王燕琴,朱健勇. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 检测方法研究进展[J]. *内蒙古农业科技*,2010(3) :113-114.

[4] 易海华,赵金伟,徐波,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.

[5] 杜邦BAX[™] 系统被定为病原菌检测标准方法[J]. *中国食品学报*,2008,(4) :112.

[6] NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*,2000,28(12) :63.

[7] HARA-KUDO Y, KONISHI N, OHTSUKA K, et al. Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: a collaborative study[J]. *In J Food Microbiol*,2008,(122) :156-161.

实验技术与方法

阪崎肠杆菌 *zpx* 基因的分子信标-实时 PCR 技术研究

李雪玲,陈勇,张莉,张健,王慧芳

(陕西省产品质量监督检验所,陕西 西安 710054)

摘要:目的 建立分子信标-实时 PCR 技术检测婴幼儿乳粉中阪崎肠杆菌的快速方法。方法 在 PCR 反应体系中加入分子信标探针,探针的 5'端标记 FAM,3'端标记 TAMRA,建立阪崎肠杆菌 *zpx* 基因分子信标-实时 PCR 技术快速检测方法。结果 检测方法特异性强,无非特异性扩增;分子信标-实时 PCR 反应体系 DNA 灵敏度为 180 fg/PCR 反应体系,纯阪崎肠杆菌菌液的检出限为 10² CFU/ml,无交叉反应;以此反应体系检测 23 份样品,其中 2 份为阳性,余未检出,与传统检测方法结果一致。结论 分子信标-实时 PCR 检测体系快速、灵敏度高、特异性强,可用于婴幼儿乳粉中阪崎肠杆菌的快速检测。

关键词:阪崎肠杆菌;分子信标;实时 PCR;*zpx* 基因;食源性致病菌

中图分类号:TS252.7 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)01-0030-04

A real-time PCR with molecular beacon assay for the detection of *zpx* gene of *Enterobacter Sakazakii* in food

Li Xueling, Chen Yong, Zhang Li, Zhang Jian, Wang Huifang

(Shaanxi Provincial Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Xi'an 710054, China)

收稿日期:2011-07-08

基金项目:国家质检总局科技计划项目(SNQTS-2010QK269);陕西省科技计划资助项目(2011K12-03-12)

作者简介:李雪玲 女 硕士 工程师 研究方向为微生物检测技术 E-mail:lxlmorenake@yahoo.com.cn

通讯作者:陈勇 男 高级工程师