

实验技术与方法

免疫磁珠富集联合荧光定量 PCR 快速检测
牛肉馅中产志贺毒素大肠埃希菌 O26:H11白莉¹, 王伟¹, 胡豫杰¹, 吴青¹, 赫英英², 徐进¹, 韩春卉¹, 李凤琴¹

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021;

2. 山东大学公共卫生学院营养与食品卫生研究所, 山东 济南 250012)

摘要:目的 建立肉制品中免疫磁珠富集(IMS)联合实时荧光定量 PCR(qPCR)技术快速检测牛肉馅中产志贺毒素大肠埃希菌(STEC)O26:H11的方法。方法 建立针对编码 O26 抗原 *wzx* 基因实时荧光定量 PCR 方法,并验证其特异性和敏感性;人工污染不同浓度 STEC O26:H11 的牛肉馅样品,在增菌不同时间后,将增菌液原液、增菌液经免疫磁珠特异性捕获分离物分别进行 qPCR 检测及平板分离。结果 qPCR 检测 O26:H11 可产生特异性荧光信号,而 23 株其他血清型的大肠埃希菌及 7 株其他种属细菌均未见荧光信号;本方法对纯培养的检测限为 5×10^2 cfu/ml。人工染菌试验中,当初始染菌浓度达到或高于 3×10^2 cfu/25 g 时,增菌培养 6 h 后 IMS 捕获物可以检测到荧光信号。培养 20 h 后,初始染菌浓度为 3×10^{-1} cfu/25 g 以上,对增菌液直接检测和 IMS 捕获物检测都可以检测到荧光信号。初始污染浓度较低时,增菌 6 h 后 IMS-qPCR 的检测灵敏度高于增菌液直接 qPCR 检测;IMS 捕获物涂布显色培养基分离目标菌检测灵敏度高于增菌液直接涂布;CHROMagar STEC 显色培养基分离 STEC O26:H11 的检测灵敏度高于山梨醇麦康凯培养基(SMAC)。结论 IMS 联合 qPCR 检测食品中的 STEC O26:H11 具有特异性强、敏感度高、快速、易操作等特点,可以提高样品中 STEC O26:H11 菌的检出率,适用于牛肉制品中 STEC O26:H11 的快速检测。

关键词:产志贺毒素大肠埃希菌 O26:H11; 牛肉馅; 免疫磁珠分离; 实时荧光定量 PCR; 食源性致病菌; 食品安全
中图分类号:R155.5;R378.2⁺1;TS207.4 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)01-0030-06

Rapid detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 in ground beef by immunomagnetic separation coupled with quantitative real-time PCR

BAI Li, WANG Wei, HU Yu-jie, WU Qing, HE Ying-ying, XU Jin, HAN Chun-hui, LI Feng-qin

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China

National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To establish a rapid method for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26:H11 in ground beef using immunomagnetic separation (IMS) and quantitative real-time PCR. **Methods** Primers and TaqMan probe were designed to amplify fragments for *wzx* gene of STEC O26. Specificity and sensitivity of the method was evaluated. **Results** The results obtained from qPCR showed that only STEC O26:H11 was positive, while 23 other serovars of *Escherichia coli* and seven species of bacteria other than *Escherichia coli* were negative. The detection limit for pure colonies by real-time PCR was 5×10^2 cfu/ml. After 6 h enrichment, samples with the initial STEC O26 contamination level of 5×10^2 cfu/25 g were positive by IMS combined with real-time PCR method. The fluorescence signal of enrichment of samples with the initial STEC O26 contamination level of 3×10^{-1} cfu/25 g or above could be detected by both IMS-qPCR and qPCR method after 20 h enrichment. IMS-qPCR was more sensitive than qPCR only for the lower initial contamination level after a 6h pre-enrichment time. Chromogenic medium combined with IMS had a higher recovery than chromogenic medium only in isolation of STEC O26. Meanwhile, the recovery of STEC O26:H11 isolated from CHROMagar medium was higher than that from SMAC medium. **Conclusion** The improved IMS-qPCR method for detection of *E. coli* O26:H11 in ground beef is highly specific, sensitive, simple and fast. It could be used for fast detect of STEC O26:H11 in ground beef.

Key words: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11; ground beef; immunomagnetic separation; real-time PCR; food-borne pathogen; food safety

收稿日期:2013-10-14

基金项目:国家高技术研究计划(863计划)(2012AA101603)

作者简介:白莉 女 副研究员 研究方向为食品微生物 E-mail:baili@cfsa.net.cn

通讯作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail:lifengqin@cfsa.net.cn

产志贺毒素大肠埃希菌 (shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC) 是一类携带了前噬菌体编码一种或两种志贺毒素基因 (shiga toxin gene, *stx*) 的食源性致病菌, 可导致患者出现腹泻症状, 部分患者可发展为溶血性尿毒综合征, 严重者死亡^[1]。目前已经发现的 STEC 血清型多达 200 余种, 其中与人类疾病相关的血清型就有 150 多种^[2]。在 STEC 的众多血清型中, O157:H7 是世界范围内导致食源性疾病暴发最常见的血清型^[3]。我国多地也曾出现 STEC O157:H7 引起的局部暴发疫情^[4]。但近年来, O26、O45、O103、O121、O111 和 O145 等 6 个非 O157 血清型的 STEC 也有引起人类疾病的报道, 由此引起科学家和食品安全监管部门的广泛关注^[5]。据不完全统计, 美国 1983—2002 年发生的非 O157 STEC 感染者中, 70% 是由上述 6 个血清型所致^[6]。2011 年 9 月, 美国食品安全检验局发布通告, 强调 STEC O26 是美国各地从标本中分离、提交到美国疾病预防控制中心最常见的非 O157 STEC^[7]。其他国家对于非 O157 血清型 STEC 的分布特征研究发现, O26 也是引起人类食源性疾病最主要的非 O157 血清型 STEC^[8]。我国的研究发现, 从健康奶羊中分离到的 STEC 优势血清型也为 O26^[9]。其他国家也从牛及牛肉制品中分离到 STEC O26^[5,7-8,10]。特别是 STEC O26:H11 血清型由于其毒力较强、可导致腹泻和溶血性尿毒综合征, 一直以来被视为风险最高的非 O157 STEC^[11]。目前由于我国缺乏灵敏特异分离检测 STEC O26 的方法, 使得针对食品中该血清型 STEC 的研究较少^[12], 特别是 O26 血清型在生肉、蔬菜等食品中污染水平较低, 加上背景菌的

干扰, 用传统的分离方法检测该菌极易漏检^[13], 因此急需发展食品中 STEC O26 的敏感、特异的检测方法, 以便进行 STEC O26 在宿主、环境、食物链中迁移及人类致病性的研究。

免疫磁珠分离法 (immunomagnetic separation, IMS) 是用抗目标微生物特异性抗体包被磁珠表面来捕获待检样品中的目标微生物, 捕获微生物的磁珠在磁场作用下, 被吸附沉淀而与其他杂菌分开的方法。免疫磁珠的使用, 大大提高了对目标微生物的分离率^[14]。实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 具有特异性好、灵敏度高、检测速度快、自动化程度高等特点, 免疫磁珠富集捕获与实时荧光定量 PCR 配合 (IMS-qPCR) 用于检测食源性致病菌, 不仅检出率高, 还可以缩短检出时间。本研究通过针对 STEC O26 特异基因 *wzx* 设计引物及探针^[15], 建立了检测生肉制品中 STEC O26:H11 的 IMS-qPCR 方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

STEC O26:H11 (*stx2a*) 及 23 株不同血清型、不同毒力基因亚型的大肠埃希菌 (购于丹麦血清研究所), 具体信息见表 1; 单核细胞增生李斯特菌 CMCC 54004、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、副溶血性弧菌 ATCC 17802、福氏志贺菌 fx301、肠炎沙门菌 CMCC 50041、鼠伤寒沙门菌 CMCC 50013、阪崎克罗诺杆菌 ATCC 51329 为本实验室保存菌种。

表 1 试验用菌株信息

Table 1 Information of strains used in this study

菌株号	血清型	特征毒力基因	菌株号	血清型	特征毒力基因	菌株号	血清型	特征毒力基因
CH_CNC_582	O26: H11	<i>stx2a</i>	D3431	O157: H7	<i>stx2c</i>	CH_CNC_2460	O111: [H8]	<i>stx1a</i>
D2653	O157: H7	<i>stx1a</i> + <i>stx2a</i>	D4134	O166: H15	<i>stx2d</i>	CH_CNC_2457	O103: H2	<i>stx1a</i>
D3602	O107: H8	<i>stx1c</i> + <i>stx2b</i>	CH_CNC_1166	O121: H19	<i>stx2a</i>	CH_CNC_1706	O78: H11	<i>estApelt</i>
D3522	O8: K85ab: Hrough	<i>stx1d</i>	CH_CNC_2638	O177: H25	<i>eae</i>	CH_CNC_1767	O146: H21	<i>stx2d</i>
D3428	O118: H12	<i>stx2b</i>	CH_CNC_410	O104: H4	<i>AggR aaiC aatA</i>	CH_CNC_2567	O157: H7	<i>stx2a</i>
D3648	O139: K12: H1	<i>stx2e</i>	CH_CNC_2700	O128ab: [H2]	<i>stx1c</i>	CH_CNC_1190	O157: H7	<i>stx2a</i> + <i>stx2c</i>
D3546	O128ac: [H2]	<i>stx2f</i>	CH_CNC_2194	O41: H26	<i>stx1d</i>	CH_CNC_1226	O124: H30	<i>ipaH</i>
D3509	O2: H25	<i>stx2g</i>	CH_CNC_1878	O113: H4	<i>stx1c</i> + <i>stx2b</i>	MG1655	OR: H48: K-	—

注: —表示 MG1655 不携带已公布的肠致病菌性大肠埃希菌毒力基因

1.1.2 主要仪器与试剂

恒温培养箱 (美国 3M)、恒温振荡器 (德国 IKA)、酶标仪 (美国 BIO-TEK)、iQ5 荧光定量 PCR 仪 (美国 BIO-RAD)、Dynal MPC-S 磁珠收集器 (美国 Invitrogen)、均质器 (德国 Interscience)。

Premix Ex Taq™ (大连 TaKaRa), CHROMagar STEC 显色培养基 (郑州博赛生物技术股份有限公司), 抗大肠埃希菌 O26 免疫磁珠 (美国 Invitrogen), Tween-20 (北京化工厂), O26 血清和 H11 血清 (丹麦 SSI), PBS (美国 Hyclone), 脑心浸液

琼脂、脑心浸液肉汤、PCA 计数琼脂、EC 肉汤、新生霉素及山梨醇麦康凯 (Sorbitol Maconkey Agar, SMAC) (均购于北京陆桥技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 方法的优化

表2 STEC O26 鉴定用引物和探针序列

Table 2 Primers and probe used for identification of O26 STEC by qPCR

引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
O26 上游引物 F	CGCGACGCGCAGAGAAAATT	135
O26 下游引物 R	AGCAGGCTTTTATATTCTCCAACCTTT	
O26 探针 P	ROX-CCCCGTTAAATCAATACTATTTCACGAGGTTGA-BHQ	

1.2.1.2 qPCR 反应体系及条件

qPCR 扩增体系 25 μl : Premix Ex TaqTM (2 \times) 12.5 μl , 上、下游引物和探针(浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μl , DNA 模板 1 μl , ddH₂O 8.5 μl 。

扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火、延伸 30 s, 40 个循环, 60 $^{\circ}\text{C}$ 收集荧光。

1.2.1.3 方法的特异性分析

将于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存的 STEC O26: H11、23 株其他血清型的大肠埃希菌以及副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特菌、福氏志贺菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌、阪崎克罗诺杆菌等标准菌株接种于脑心浸液琼脂 (brain heart infusion agar, BHA) (副溶血性弧菌的 NaCl 含量为 3%) 上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 次日挑取单克隆再次接种于 BHA 上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。分别取一定量第 2 次 BHA 上传代的细菌于双蒸馏水中, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水煮 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min 后吸取上清, 即得 DNA 模板。用针对 STEC O26 设计的引物和探针, 分别以上述 DNA 为模板进行 qPCR 扩增, 以验证所用引物及探针的特异性。

1.2.1.4 方法的敏感性分析

挑取 1.2.1.3 中 BHA 上二次传代的 STEC O26: H11 单克隆接种于脑心浸液肉汤 (brain heart infusion broth, BHI) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜, 取 100 μl 过夜培养肉汤接种于 10 ml BHI 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 4 h 至 OD 值约为 1.0 时, 用灭菌 PBS 对该培养液依次进行 10 倍系列稀释 (至 10⁻⁸), 取各稀释度的稀释液 100 μl 涂布于 BHA 平板上进行计数, 另取 100 μl 于灭菌 Eppendorf 管中, 制备 DNA 模板并进行 qPCR 检测, 每个稀释度做 3 个平行管。

1.2.2 人工污染样品的制备

将 1.2.1.3 中在 BHA 上二次传代的 STEC O26: H11 菌株接种于 BHI 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜, 对菌液进行 10 倍系列稀释 (至含菌量达 10⁻¹ cfu/ml), 取各稀释度的菌悬液 1 ml 接种到 25 g 牛肉馅中, 同

1.2.1.1 qPCR 引物及 Taqman 探针合成。

STEC O26 血清型鉴定用引物和探针参照 ISO/TS 13136:2012 推荐序列^[15], 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 具体见表 2。

时用 1 ml 的 PBS 做空白对照; 另取各稀释度的菌悬液 100 μl 涂布于 BHA 平板进行计数。结果显示, 牛肉馅中微生物实际本底污染水平平均为 2.5 $\times 10^5$ cfu/g, 牛肉馅中人工污染的 STEC O26: H11 实际最终浓度依次为 3 $\times 10^{-1}$ 、3 $\times 10^0$ 、3 $\times 10^1$ 、3 $\times 10^2$ 、3 $\times 10^3$ cfu/25 g, 满足试验要求。在上述染菌的牛肉馅中加入 225 ml EC 肉汤 (含新生霉素 16 mg/L), 8 000 ~ 10 000 r/min 均质 1 ~ 2 min 后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养、备用。上述试验重复两次。

1.2.3 人工污染牛肉馅样品中的 STEC O26: H11 的 IMS-qPCR 检测

在人工污染牛肉馅样品增菌分别培养 6 和 20 h 时, 分别吸取各稀释度的增菌液 1 ml 于 1.5 ml 灭菌 Eppendorf 管中, 每个稀释度做 2 个平行, 同时加入 20 μl 免疫磁珠, 将 Eppendorf 管插入 Dynal MPC-S 架上缓慢翻转 10 min 后插入磁板, 继续翻转数分钟后静止 3 ~ 5 min, 使得磁珠吸附在管壁上, 吸出悬浮液弃去; 加入灭菌 0.05% Tween20 的 PBS 重悬, 重复上述步骤 3 次; 最后用 100 μl PBS 反复吹吸重悬免疫磁珠。每个稀释度 2 个平行管的其中一管用于 DNA 模板的制备, 进行实时荧光定量 PCR 检测。从另一管中取 10 μl 接种于 90 μl PBS 中, 依次倍比稀释 (共 3 个浓度梯度), 分别取 50 μl 各稀释度的稀释液涂布于山梨醇麦康凯 (SMAC) 和 CHROMagar STEC 显色培养基上, 每个稀释度做两个平行, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜。次日从每个平皿上挑取 5 ~ 10 个典型菌落接种于 BHA 琼脂上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 进行 O26 和 H11 血清凝集, 对能够产生凝集反应的菌落制备 DNA 模板, 随后进行 qPCR 确认。

1.2.4 人工污染样品中的 STEC O26: H11 的 qPCR 方法直接检测

在人工污染样品增菌分别培养 6 和 20 h 时, 分别取 1 ml 增菌液, 1 500 $\times g$ 离心 1 min 后, 吸取上清至另一个灭菌的 Eppendorf 管中, 12 000 $\times g$ 离心 10 min 后弃上清, 沉淀部分加入 100 μl PBS 重悬, 用

于 DNA 模板的制备,进行 qPCR 检测。同时取两个培养点的增菌液进行平板分离,方法同 1.2.3。

2 结果

2.1 qPCR 方法的特异性和敏感性

特异性: qPCR 扩增结果表明,所有受试菌株中,只有 STEC O26:H11 出现了 S 型扩增曲线, C_t 值为 16.75,检测结果为阳性,23 株其他血清型的大肠埃希菌以及其他不同种属的菌株均没有出现扩增曲线,检测结果均为阴性(见图 1)。表明本研究针对 STEC O26:H11 设计的引物及探针特异性高。

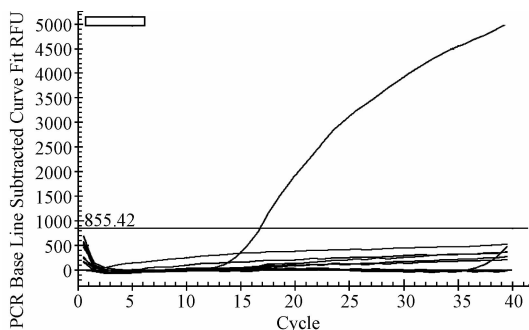
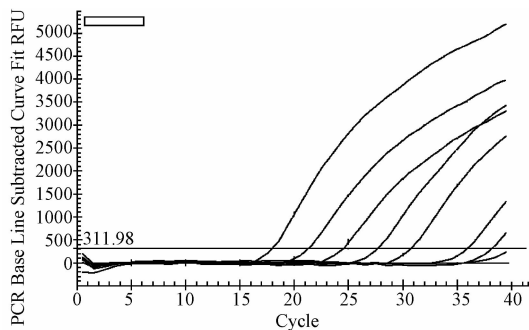


图 1 STEC O26:H11 中 wzx_{026} 基因的特异性扩增曲线

Figure 1 Specificity of wzx_{026} gene of STEC O26:H11 by qPCR

敏感性: qPCR 检测结果显示,各稀释度 STEC O26:H11 菌悬液 3 次平行 qPCR 检测结果基本一致(见表 3),说明所建检测 STEC O26:H11 的 qPCR 方法重复性好;用菌悬液浓度及 C_t 值作图汇制的标准曲线的 $r^2 = 0.992$,扩增效率为 0.957,说明本试验条件下引物和探针工作状态良好。当菌液浓度达到或高于 5×10^2 cfu/ml 时,均可检测到扩增曲线,而当菌液浓度低于 5×10^1 cfu/ml 时,均无扩增曲线(见图 2、表 3)。因此在本试验条件下,qPCR 对 STEC O26:H11 纯培养物的检测限为 5×10^2 cfu/ml。



注:从左至右浓度依次为 $5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^2$ cfu/ml

图 2 不同浓度 STEC O26:H11 qPCR 扩增图

Figure 2 Fluorescence graph of real-time PCR for STEC O26:H11 at different levels in cell populations

表 3 不同 STEC O26:H11 菌液浓度及其对应的 C_t 值

Table 3 STEC O26:H11 cell concentrations in PBS and the corresponding C_t value

细菌浓度 (cfu/ml)	C_t 值			C_t 均值
	C_{t1}	C_{t2}	C_{t3}	
5×10^8	18.96	19.40	18.67	19.01
5×10^7	21.31	20.82	21.59	21.24
5×10^6	24.50	23.62	24.71	24.27
5×10^5	27.68	27.45	27.64	27.59
5×10^4	30.75	29.62	30.81	30.39
5×10^3	35.91	35.48	35.98	35.79
5×10^2	38.18	38.09	37.95	38.07
5×10^1	ND	ND	ND	ND
5×10^0	ND	ND	ND	ND

注:ND 表示未检出

2.2 免疫磁珠富集人工污染样品中 STEC O26:H11 的检测结果

2.2.1 IMS-qPCR 的检测结果

研究结果显示,样品增菌培养 6 h 时,初始污染浓度在 $10^{-1} \sim 10^1$ cfu/25 g 范围内的增菌液在本试验条件下均未检测到荧光信号;而初始污染浓度在 $10^2 \sim 10^3$ cfu/25 g 范围内的增菌液分别在 C_t 值为 35.16 和 37.78 时检测到较弱的荧光信号。增菌至 20 h 时,各污染浓度的样品增菌液均检测到荧光信号,其中最低初始污染浓度 (10^{-1} cfu/25 g) 和最高初始污染浓度 (10^3 cfu/25 g) 的 C_t 值分别为 37.81 和 26.02。因此用 IMS-qPCR 检测人工污染牛肉馅中的 STEC O26:H11 时,检测结果受菌体初始污染浓度和增菌时间的影响,菌体初始污染度越高、增菌时间越长,菌体检出的几率越大(见表 4)。

2.2.2 IMS 平板分离结果

增菌培养 6 h 时,初始污染浓度在 $10^1 \sim 10^3$ cfu/25 g 范围内的 IMS 捕获物在 SMAC 和 CHROMagar STEC 培养基上均分离到目标菌;但是两个较低污染浓度 (10^{-1} 和 10^0 cfu/25 g) 的 IMS 捕获物在两种培养基上均没有分离到目标菌。增菌培养 20 h 时,初始污染浓度为 10^2 和 10^3 cfu/25 g 的 IMS 捕获物在 SMAC 培养基上可以分离到目标菌;而初始污染浓度在 $10^0 \sim 10^3$ cfu/25 g 范围内各增菌液的 IMS 捕获物在 CHROMagar STEC 培养基上均可分离到目标菌落,可知增菌 20 h 时,CHROMagar STEC 培养基分离目标菌的能力是 SMAC 培养基的 100 倍。因此使用 CHROMagar STEC 培养基分离 STEC O26 较 SMAC 培养基具有更好的分离效果(见表 4)。

2.2.3 IMS-qPCR 检测与 IMS 平板分离结果比较

综合 2.2.1 和 2.2.2 所述,增菌 6 h 时,人工污染 STEC O26:H11 牛肉馅的增菌液经免疫磁珠富集后,初始污染浓度较高 (10^2 cfu/25 g 以上) 时,qPCR

表4 不同方法检测人工污染 STEC O26:H11 牛肉馅的增菌液中结果对比

Table 4 Comparison of the results obtained from ground beef artificially contaminated with STEC O26:H11 at different levels detected by different methods

添加的菌量 /(cfu/25 g)	增菌液免疫磁珠富集后 qPCR 检测和平板分离						增菌液直接 qPCR 检测和平板分离						
	qPCR		SMAC		CHROMagar STEC		qPCR		SMAC		CHROMagar STEC		
	6 h	20 h	6 h	20 h	6 h	20 h	6 h	20 h	6 h	20 h	6 h	20 h	
10 ³	2 ^a /2 ^b	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
10 ²	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
10 ¹	0/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2
10 ⁰	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
10 ⁻¹	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
空白	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

注:a/b,a代表阳性数,b代表试验次数

与选择培养基直接分离两种方法的检测限没有差异;当初始浓度较低(10¹ cfu/25 g)时,选择性平板分离略优于 qPCR,且 CHROMagar STEC 选择培养基优于 SMAC 培养基。增菌 20 h 时,qPCR 方法的敏感性高于平板分离。

2.2.4 与人工污染样品中 STEC O26:H11 的直接检测结果的比较

2.2.4.1 qPCR 的检测效果

增菌培养 6 h 后,增菌液不经 IMS 富集直接经 qPCR 的检测结果显示,各初始污染浓度的样品增菌液均未检测到荧光信号。增菌至 20 h 时,各初始污染浓度的样品增菌液均检测到荧光信号,其中最低初始污染浓度(10⁻¹ cfu/25 g)和最高初始污染浓度(10³ cfu/25 g)样品增菌液的 Ct 值分别为 38.40 和 27.89,增菌 20 h 的检测结果明显优于 6 h,但与经 IMS 富集后的 qPCR 检测结果相比,增菌 6 h 后样品直接 qPCR 检测灵敏度低于 IMS-qPCR(见表 4)。

2.2.4.2 直接平板分离结果

增菌培养 6 h 后,初始污染浓度为 10² cfu/25 g 以上的各样品增菌液在 SMAC 培养基上可以分离到目标菌株;而 CHROMagar STEC 培养基对初始污染浓度在 10¹ cfu/25 g 以上的各样品增菌液均可分离到目标菌。增菌培养 20 h 时,两种选择性培养基仅从初始污染浓度为 10² cfu/25 g 以上的样品增菌液中分离到目标菌。因此当增菌 6 h 时,选择性培养基分离方法较 qPCR 方法的检测灵敏度高 1 000 倍。而当增菌至 20 h 时,qPCR 的检测灵敏度是选择培养基分离方法的 1 000 倍。与 IMS 富集后分析方法相比,样品增菌后直接用 qPCR 和选择培养基分离目标菌的灵敏度均低于免疫磁珠富集方法(见表 4)。

3 讨论

大肠埃希菌的 O 抗原在一定的序列上具有高度的异源性^[16]。O 抗原脂多糖的基因主要负责编码合成、转运异构酶及其他一些酶^[16]。尽管编码这些特异蛋白的基因在功能上很相似,但是在序列上

可能具有多样性。其中主要负责跨膜转运和聚合 O 抗原的两个基因翻转酶基因 *wzx* 和多聚酶基因 *wzy* 在每一种血清型中都是特异的^[16]。所以这两个基因常常用于菌株血清学分子水平的特异鉴定。本次试验基于 O26 抗原序列的 *wzx* 基因设计引物和探针,建立并优化了生肉制品中 STEC O26 的快速检测方法,所建方法特异、灵敏、准确、简便,可用于实际检测中 STEC O26 菌株的筛查。

食品中致病微生物的污染水平常常处于一个很低水平,且食源性致病微生物在食品加工、运输和储存过程中可能会受到一定程度的损伤,需要通过前增菌和选择性增菌,使样品中的目标致病菌修复并增殖到可检测水平^[17]。目前针对产志贺毒素大肠埃希菌,往往前增菌和选择性增菌的效果会因为背景菌数量过高及构成的复杂性而干扰目标菌的分离。免疫磁珠分离技术可以大大提高产志贺毒素大肠埃希菌的分离效率,已广泛应用于产志贺毒素大肠埃希菌的分离^[9,17]。本次研究使用了针对 STEC O26 的免疫磁珠联合 qPCR 方法,可在较短的培养时间内对目标菌进行定量检测。该方法对于食品中污染水平较高的 STEC O26,可以在 6~8 h 得到结果;对于较低污染水平的 STEC O26,延长培养时间到 20 h 可以得到满意的结果。这与近期发表的文献结论一致^[18]。

食品中目标致病菌的检测常因基质中存在其他微生物的干扰而降低灵敏度^[17]。本研究对不同前处理方式的样品使用不同的选择性培养基进行菌株分离培养。在较短增菌时间内,IMS 捕获物涂布培养和增菌液直接培养检测没有太大的差异,且涂布培养较 qPCR 更为敏感,可能在样品中的致病菌污染浓度较低时,较短时间内基质中的目标菌尚未增殖到 qPCR 检出限所需的水平,而背景菌也还处于对数生长中期,对目标菌的干扰有限所致。延长增菌时间,IMS 捕获涂布检出目标菌的能力大大提高,是直接增菌液检测的 100 倍。这与随着增菌时间的延长,样品中背景菌和目标菌都大量繁殖,

免疫磁珠可以特异性捕获目标菌而提高其检出率^[18]有关。此外,与 STEC O157 不同的是,非 STEC O157 菌株可以发酵山梨醇,在 SMAC 培养基上与其他大大肠埃希菌一样呈现粉红色菌落,难以和其他大肠埃希菌区别,因此在 SMAC 上较难辨识到目的菌落,在一定程度上造成漏检^[19]。已有文献报道,IMS 捕获可以富集分离过夜培养中极低浓度的 STEC O157:H7 菌株^[18]。笔者也做过同样的试验,当初始浓度为 1 cfu/25 g 时,运用 IMS 可以分离到目标菌。但是在本次试验中,从较低染菌浓度(0.3~0.5 cfu/25 g)的样品中未分离到目标菌,可能与使用的新生霉素抗生素浓度较分离 STEC O157 少(STEC 非-O157 为 16 mg/ml, STEC O157:H7 为 20 mg/ml)、基质中脂肪含量较大干扰目标菌的分离有关。由于产志贺毒素大肠埃希菌耐酸,在 IMS 捕获后,若降低溶液的 pH 值(如加入 pH=2 的处理液)则可以大大降低背景菌株的干扰^[20],这也是后续在实际工作中可以进一步完善的地方。

按照国标进行产志贺毒素大肠埃希菌的检测,全过程至少需要 4~7 d^[19]。而 IMS-qPCR 方法检测 STEC 血清型 O26 仅需要 20 h,大大缩短了检测周期,可以对生肉制品中 STEC O26 菌的污染进行早期预警,对于受 STEC O26 污染的食品及时采取控制措施。

参考文献

- [1] Nataro J P, Kaper J B. Diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(1):142-201.
- [2] Vallières E, Saint-Jean M, Rallu F. Comparison of three different methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a tertiary pediatric care center [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(2):481-486.
- [3] Boyce T G, Swerdlow D L, Griffin P M. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome [J]. New England Journal of Medicine, 1995, 333(6):364-368.
- [4] 汪华,景怀琦,李红卫,等.江苏省淮北市地区肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 感染性腹泻并发急性肾衰的研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(11):938-940.
- [5] Madic J, Vingadassalon N, de Garam C P, et al. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(6):2035-2041.
- [6] Gould H L. Update on the epidemiology of Shiga toxin-producing

E. coli in the United States [C]//Capital Area Food Protection Association Meeting, 2009.

- [7] USDA/FSIS. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in certain raw beef products [J]. Federal Register, 2011, 76(182):58157-58165.
- [8] Monaghan Á, Byrne B, Fanning S, et al. Serotypes and virulence profiles of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from bovine farms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(24):8662-8668.
- [9] USDA. Detection and isolation of non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) from meat products [R]. USDA, 2011.
- [10] Bielaszewska M, Prager R, Köck R, et al. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(10):3144-3150.
- [11] Werber D, Fruth A, Liesegang A, et al. A multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 infections in Germany, detected by molecular subtyping surveillance [J]. Journal of Infectious Diseases, 2002, 186(3):419-422.
- [12] 顾丛丛,薛涛,徐婷婷,等.江苏某地健康绵羊群产志贺毒素大肠杆菌体内分离株的分子流行病学及致病力 [J]. 微生物学报, 2011, 51(5):676-683.
- [13] Allende A, McEvoy J, TAO Y, et al. Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite, and citric acid on *Escherichia coli* O157:H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro [J]. Food Control, 2009, 20(3):230-234.
- [14] 闻一鸣,李志清,童吉宇,等.免疫磁珠富集技术联合选择性培养基快速检测单增李斯特菌 [J]. 生物工程学报, 2013(5):672-680.
- [15] ISO. ISO/TS 13136:2012 Microbiology of food and animal feed—Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens—Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups [S]. 2012.
- [16] DebRoy C, Roberts E, Fratamico P M. Detection of O antigens in *Escherichia coli* [J]. Anim Health Res Rev, 2011, 12(2):169-185.
- [17] Dwivedi H P, Jaykus L A. Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2011, 37(1):40-63.
- [18] Yoshitomi K J, Jinneman K C, Zapata R, et al. Detection and isolation of low levels of *E. coli* O157:H7 in cilantro by real-time PCR, immunomagnetic separation, and cultural methods with and without an acid treatment [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(8):M481-M489.
- [19] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.36—2008 食品卫生微生物学检验大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验 [S]. 北京:中国标准出版社, 2008.
- [20] Bhagwat A A, CHAN L, HAN R, et al. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains based on acid resistance phenotypes [J]. Infection and Immunity, 2005, 73(8):4993-5003.