

3种大肠埃希氏菌O157:H7筛检方法的比较

张婧, 王利刚, 张磊, 费云滢, 付莎莉, 吴丹, 陈欣, 杨小珊*

(重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121)

摘要: 比较 mini-VIDAS、膜芯片两种快速筛检方法和常规培养法, 以确定两种快速筛检方法对大肠埃希氏菌 O157:H7 筛检的效果。以大肠埃希氏菌 O157:H7 为目标菌, 针对 3 种方法设计灵敏性、特异性、抗干扰性试验和人工污染试验。结果表明, 常规培养法和 mini-VIDAS 法的灵敏性较高, mini-VIDAS 法和膜芯片法的特异性和抗干扰性较高, 人工污染试验三者表现符合预期。日常检验中可采用国标法和 mini-VIDAS 法进行筛检工作, 应急检验可使用膜芯片法缩短筛检时间, mini-VIDAS 法和膜芯片法可作为初步筛检的工具使用。

关键词: 大肠埃希氏菌 O157:H7; mini-VIDAS; 膜芯片; 筛检

Comparison of Three Pre-detection Methods for Detection of *Escherichia coli* O157:H7

ZHANG Jing, WANG Li-gang, ZHANG Lei, FEI Yun-yan,

FU Sha-li, WU Dan, CHEN Xin, YANG Xiao-shan*

(Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China)

Abstract: This study aimed to compare of two rapid pre-detection methods and traditional culture method for detection of *Escherichia coli* O157:H7. Experiments were designed to test the sensitivity, specificity and anti interference of these methods, artificially contaminated samples were tested and verified. The results showed that, traditional culture method and mini-VIDAS method with high sensitivity, mini-VIDAS and membrane-based array method with specificity and high anti-interference, artificially contaminate test was as expected. Traditional culture method and mini-VIDAS method can be used for pre-detection in daily inspections, membrane-based array method could shorten the pre-detection time in emergency testing. Additionally, mini-VIDAS and membrane-based array are good tools for pre-detection of the *Escherichia coli* O157:H7.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7; mini-VIDAS; membrane-based array; pre-detection

大肠埃希氏菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7, *E.coli* O157) 是一种食源性致病菌, 是肠出血性大肠埃希氏菌的主要血清型, 感染后会出现腹泻、出血性肠炎等症状, 进而引发溶血性尿毒综合征、血栓形成性血小板减少性紫癜等严重并发症, 两种并发症的致死率高达 30%^[1-2]。1982 年美国爆发了由 *E.coli* O157 导致的流行感染, 之后世界各国相继发生, 美国、加拿大、日本等国发病案例较多, 1997 年, 世界卫生组织

将 *E.coli* O157 列为新的食源性致病菌^[3-4]。我国 *E.coli* O157 流行多为散发案例, 但在江苏、安徽、河南等地出现过流行爆发的报道^[5-7]。为控制食品中 *E.coli* O157 污染, 预防 *E.coli* O157 导致食源性疾病发生, 国家卫生计生委对其在食品中的限量进行了规定^[8]。

E.coli O157 的常规检验方法为培养法^[9], 操作步骤繁琐, 人员素质要求高, 且耗时较长, 已经不能满足现在食品检测中高通量、短时效的要求。随着检验技术的进步, 基于分子技术、免疫学技术的快速筛检方法^[10-13]逐步进入检验行业, 可靠稳定的技术被开发为商业化的产品。本试验将 VIDAS 大肠杆菌 O157(ECO) 筛选法^[14]和膜芯片法两种快速筛检方法与常规培养法进行对比, 从灵敏性、特异性、抗干扰性等方面进行试验, 评估两种快速筛检方法在检验工作中的可操作性。

基金项目: 重庆市社会民生科技创新专项项目(cstc2015shmszx00002); 重庆市科技计划项目(cstc2015jcsf8001)

作者简介: 张婧(1985—), 女(汉), 工程师, 硕士研究生, 研究方向: 食源性致病菌检验。

* 通信作者: 杨小珊(1975—), 女(汉), 高级工程师, 博士, 研究方向: 食品安全与监管。

1 试验材料

1.1 菌株与样品

大肠埃希氏菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7, CICC 21530)、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*, CICC 10865)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, CICC 21636/ATCC[®] 27853[™]):中国工业微生物菌种保藏管理中心;大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*, ATCC[®] 25922[™])、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC[®] 14028[™])、单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, ATCC[®] 19115[™]):美国菌种保藏中心。

样品为实验室日常检验样品。

1.2 主要仪器

ZDP-2106 常规生化培养箱:上海智城分析仪器制造有限公司;mini-VIDAS 全自动免疫分析仪:法国生物梅里埃股份有限公司;MFS-8 膜芯片杂交仪、IMG-1 膜芯片成像仪:四川华汉三创生物科技有限公司。

1.3 主要试剂

常规培养基、大肠杆菌 O157 显色培养基:北京陆桥技术股份有限公司;VIDAS 大肠杆菌 O157(ECO)试剂条:法国生物梅里埃股份有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒:天根生化科技有限公司;致病微生物检测芯片:四川华汉三创生物科技有限公司。

2 方法

2.1 3种方法操作步骤

2.1.1 常规培养法

按照 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》第一法检验流程,转接大肠杆菌 O157 显色培养基,36℃培养 24 h,观察筛检结果。

2.1.2 mini-VIDAS 法

按照 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》第三法检验流程,培养后上机检验,检验结束后仪器报告并打印筛检结果。

2.1.3 膜芯片法

接种产品自带培养基,并按照其要求培养温度、时间培养后,使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌总 DNA,使用自带的 PCR Mix 对提取的 DNA 进行扩增,扩增产物 99℃变性 10 min,膜芯片杂交仪进行杂交、洗脱等操作,结束后使用膜芯片成像仪观察筛检结果。

2.2 灵敏性试验

标准菌株大肠埃希氏菌 O157:H7 接种到改良 EC 肉汤培养基中,36℃培养 24 h,按照 1:10 进行梯度稀释,获得 10³ CFU/mL~10⁶ CFU/mL 浓度的菌悬液,不同浓度视作不同方法液体培养基培养物,并分别采用 2.1.1、2.1.2、2.1.3 的方法进行筛检。

2.3 特异性试验

大肠埃希氏菌 O157:H7、福氏志贺氏菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌分别进行培养,培养物按照 1:10 进行梯度稀释,获得 10⁵ CFU/mL 浓度的菌悬液,分别采用 2.1.1、2.1.2、2.1.3 的方法进行筛检。

2.4 杂菌干扰试验

大肠埃希氏菌 O157:H7、福氏志贺氏菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌分别进行培养,按照 1:10 进行梯度稀释,以大肠埃希氏菌 O157:H7 为目标,设定 3 组混合菌。第一组福氏志贺氏菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌的浓度为 10³ CFU/mL,按照体积比 1:1:1:1:1 混合,第二组 5 种菌的浓度为 10⁴ CFU/mL,按照体积比 1:1:1:1:1 混合,第三组 5 种菌的浓度为 10⁵ CFU/mL,按照体积比 1:1:1:1:1 混合。以上混合菌按照体积比 1:1 的比例与浓度 10⁵ CFU/mL 大肠埃希氏菌 O157:H7 混合,同时分别使用浓度 10⁵ CFU/mL 大肠埃希氏菌 O157:H7 和浓度 10⁵ CFU/mL 混合菌作为阳性和阴性对照,分别采用 2.1.1、2.1.2、2.1.3 的方法进行筛检。

2.5 人工污染试验

收集实验室检验的大肠埃希氏菌 O157:H7 阴性样品 20 批次,其中畜肉制品 5 批次、禽肉制品 5 批次、动物内脏制品 5 批次、蔬菜制品 5 批次,每批次样品分为两组,一组为阳性组,按照每 25g 样品添加 1mL 浓度 10³ CFU/mL 大肠埃希氏菌 O157:H7 的比例进行人工污染,一组为阴性对照组,不进行人工污染,分别采用 2.1.1、2.1.2、2.1.3 的方法进行筛检。

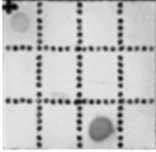
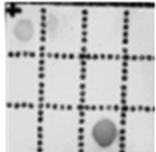
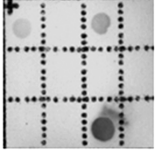
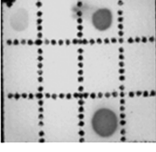
3 结果与讨论

3.1 灵敏性试验结果

用 3 种方法对不同浓度的大肠埃希氏菌 O157:H7 菌悬液进行灵敏性试验的结果如表 1 所示,在常规培养法中,显色培养基上出现典型菌落的浓度为 10⁴ CFU/mL,mini-VIDAS 法判定阳性的浓度为 10⁴ CFU/mL,膜芯片法检出浓度为 10⁵ CFU/mL,mini-VIDAS 法灵敏性高于其他两者。在常规培养法中采用

表1 不同检测方法灵敏性比较

Table 1 Comparison of sensitivity of three methods

菌悬液浓度/ (CFU/mL)	常规培养法		Mini-VIDAS 法		膜芯片法	
	现象描述	判定	TV 值	判定	芯片成像图片	判定
10 ³	无可疑菌落生长	-	0.02	-		-
10 ⁴	可疑菌落生长	+	0.72	+		-
10 ⁵	可疑菌落生长	+	1.87	+		+
10 ⁶	可疑菌落生长	+	2.36	+		+

注:-表示未检出,+表示检出;芯片中相关位点为:第一排第一列对应细菌通用内参基因;第一排第三列对应大肠埃希氏菌 O157:H7;第三行第三列对应 Positive Control(PC 质控),第三行第四列对应 Negative Control(NC 质控)。

的显色培养基选择性强,因此对灵敏性有一定影响,在显色培养基上的生长状态符合其典型菌落特征。mini-VIDAS 法基于抗原抗体反应,灵敏性较高,当检测阈值(TV, test value)值大于 0.10 时,系统判定检出大肠埃希氏菌 O157:H7。膜芯片法通过核酸杂交显色后观察是否阳性,但在杂交前还经过了 DNA 提取、PCR 扩增、高温变性等过程,操作步骤越多对灵敏度的影响越大。

3.2 特异性试验结果

常规培养法中,显色培养基上大肠埃希氏菌

O157:H7 的生长特征明显,同菌属的大肠埃希氏菌也可以有效分离,但是福氏志贺氏菌与大肠埃希氏菌 O157:H7 生长情况相似,还需进行下一步试验才能确定。基于抗原抗体特异结合反应的 mini-VIDAS 法对大肠埃希氏菌 O157:H7 的特异性较强,除单核细胞增生李斯特氏菌判定阳性外,其他几种菌的判定均为阴性。膜芯片法针对大肠埃希氏菌 O157:H7 的 eaeA 基因设计探针,特异性较好。不同检测方法特异性比较见表 2。

表2 不同检测方法特异性比较

Table 2 Comparison of specificity of three methods

方法	大肠埃希氏菌 O157:H7	福氏志贺氏菌	铜绿假单胞菌	大肠埃希氏菌	鼠伤寒沙门氏菌	单核细胞增生李 斯特氏菌
常规培养法	+	+/-	-	-	-	-
mini-VIDAS 法	+	-	-	-	-	-
膜芯片法	+	-	-	-	-	-

注:-表示未检出;+表示检出;+/-表示有疑似菌落生长,但不能确定是否检出。

3.3 杂菌干扰试验结果

按照 2.4 的设计,干扰菌的总浓度水平为 10⁴、10⁵、

10⁶ CFU/mL,分别处于高于、相当、低于大肠埃希氏菌 O157:H7 的浓度水平,阳性对照和阴性对照的结果显

示3种方法的操作正常。常规培养法中在3个设计中均有典型菌落生长,但由于其中有其他干扰菌的存在,故无法直接判定,还需进一步试验才能确定,同时由于杂菌存在,进行鉴定时应该选择多个菌落进行鉴定,以防发生漏检的情况。Mini-VIDAS法的筛检结果均为阳性,阴性对照结果为阴性,显示了该方法的特异性较强。膜芯片法在干扰菌浓度低或者相当时检出,干扰菌浓度高时未检出的原因分析为,DNA提取后总DNA浓度不变,但是目标菌的DNA浓度相对降低,影响判定结果。不同检测方法抗干扰性比较见表3。

表3 不同检测方法抗干扰性比较

Table 3 Comparison of anti-interference of three methods

方法	干扰菌总浓度/(CFU/mL)			阳性对照	阴性对照
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶		
常规培养法	+/-	+/-	+/-	+	+/-
mini-VIDAS法	+	+	+	+	-
膜芯片法	+	+	-	+	-

注:-表示未检出;+表示检出;+/-表示有疑似菌落生长,但不能确定是否检出。

3.4 人工污染试验

人工污染试验中,常规培养法对于阳性组的筛检效率为100%,仍需进行下一步试验;对阴性组的筛检效率为5%,其中有1批次牛肉有典型菌落,进一步试验后确定非肠埃希氏菌O157:H7。mini-VIDAS法对于阳性组筛检效率为100%,对阴性组筛检效率为0%,完全符合人工污染设计。膜芯片法对于阳性组筛检效率为100%,但是阳性结果观察显色程度不同,个别显色较浅,肉眼几乎无法分辨,借助膜芯片成像仪可见显色,分析原因为增殖过程中由于杂菌较多大肠埃希氏菌O157:H7未形成优势菌株,进而影响以后的一系列操作,符合预期。人工污染试验筛检结果比较见表4。

表4 人工污染试验筛检结果比较

Table 4 Comparison of the screening for artificially contaminated samples

筛检情况	阳性组的筛检效率/%			阴性组的筛检效率/%		
	+	-	+/-	+	-	+/-
常规培养法	0	0	100	0	95	5
mini-VIDAS法	100	0	0	0	100	0
膜芯片法	100	0	0	0	100	0

注:-表示未检出;+表示检出;+/-表示有疑似菌落生长,但不能确定是否检出。

4 结论

从两种快速筛检方法与常规培养法的比较结果

可以看出,常规培养法的灵敏性较优,但是某些细菌在显色培养基上的生长状态与目标菌相似,使其特异性和抗干扰性受到一定影响;mini-VIDAS法在特异性、灵敏性和抗干扰上表现良好,可作为较好的筛选方法应用到检验工作中;膜芯片法的特异性较好,但是该方法要从菌株水平转换到分子水平,操作人员的熟练程度对其灵敏性有一定的影响。实际操作中3种方法的筛检时间差异较大,常规培养法为78h,mini-VIDAS法为30h,膜芯片法为14h。综合以上情况,建议日常检验中可以采用国标法和mini-VIDAS法进行筛检工作,对于应急任务可使用膜芯片法缩短筛检时间,同时用mini-VIDAS法进行验证,确保试验结果的准确。

参考文献:

[1] 王燕,谢贵林,杜琳. 大肠杆菌 O157:H7 感染流行概况[J]. 微生物学免疫学进展, 2008(1):51-58

[2] 刘翔,李淑清,杨景波,等. 肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 研究进展[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(5):630-631

[3] 冉陆. 肠出血性大肠杆菌(EHEC)流行趋势[J]. 中国食品卫生杂志, 1999, 11(3):31-35

[4] WHO. Prevention and Control of Enterohaemorrhagic Escherichia Coli(EHEC) Infections[R]. World Health Organization-WHO, 1997

[5] 汪华,景怀琦,李红卫,等. 江苏省淮地区肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 感染性腹泻并发性肾衰的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(11):938-940

[6] 陆美娟,胡万富,陶涛,等. 安徽省 1999~2003 年 O157:H7 大肠杆菌实验监测及其意义[J]. 中华疾病控制杂志, 2005, 9(5):441-443

[7] 张锦,夏胜利,马宏. 河南省出血性大肠杆菌 O157:H7 监测研究[J]. 疾病监测, 2003, 18(9):325-327

[8] 中华人民共和国卫生部.GB 29921-2013 食品安全国家标准 食品中致病菌限[S].北京: 中国标准出版社,2013

[9] 中华人民共和国卫生部.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

[10] 李瑞,王建昌,李静,等. 实时荧光单引物等温扩增(SPIA)技术检测大肠杆菌 O157 的方法研究[J]. 现代食品科技, 2016(2):317-322

[11] 陈玲,王少辉,任建鸾,等. 饲料中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 双重 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(8): 73-76

[12] 王乃福,吴冬雪,张霞,等. 致泻性大肠杆菌基因芯片检测方法的建立[J]. 食品研究与开发, 2014(7):5-9

[13] 黄海燕,陈亮,陈萍. 双抗体夹心 ELISA 法检测食品中出血性大肠杆菌 O15[J]. 食品工业科技, 2016(11):171-175

[14] 范放,赵国俊. 用“自动荧光酶标免疫分析仪”快速检测食品中大肠杆菌 O157:H7[J]. 广东食品, 1998(4):9-10