

快速筛检食源性致病菌方法的比较分析

李晓虹, 李珮

(上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

[摘要] 目的: 对目前采用的快速筛检食源性致病菌的检测试剂盒进行比较。从中优选出较好的试剂盒, 为 2010年世博会现场快速检测提供依据。方法: 对食源性致病细菌(单核细胞增生李斯特菌、大肠埃希氏菌 O157 H7、志贺菌)快速检测试剂盒进行灵敏度和特异性比较。结果: 通过比较试验, 单核细胞增生李斯特菌快速检测北京宝特斯生物科技有限公司的产品较好; 大肠埃希氏菌 O157 H7快速检测上海博赛生物公司的产品较好; 志贺菌的快速检测广州华峰科技有限公司的产品较好。结论: 通过此项试验, 可以建立现场快速检测筛查检测程序, 有效应对 2010年世博会及口岸突发公共卫生事件的发生。

[关键词] 食源性致病菌; 单增李斯特菌; 大肠杆菌 O157; 志贺菌

[中图分类号] R446.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-8685(2010)06-1397-03

Researching of fast detect food-borne pathogens

LI Xiao-hong, LI Li

(Shanghai Entry-Exit Inspection And Quarantine Bureau Shanghai 200135 China)

[Abstract] **Objective** To compare the fast detecting kits available on the market which were used to test the food-borne pathogens. We chose the best one to supply the field fast detection for 2010 Shanghai Expo. **Methods** Compared with the sensitivity and specificity of the fast detecting kits with *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 H7 and *Shigella* spp. **Results** Through the tests, the products of Beijing Baotesi corporation was better in detecting *Listeria monocytogenes*. The products of Shanghai Bosai biotechnology company showed better results in testing *Escherichia coli* O157 H7. And the products produced by Guang Zhou Huafeng technology Co., Ltd. were better in testing *Shigella* spp. **Conclusion** According to the tests, we could set up field-fast-detecting course in order to deal with emergency public health incidents on port effectively.

[Key words] Fast-detecting Food-borne pathogen; *Listeria monocytogenes*; *Escherichia coli* O157; *Shigella* spp

2010年上海世博会以“城市, 让生活更美好”为主题, 历时6个月, 预计吸引海内外7000多万人次的游客前来参观。上海世博会举办期间面临输入性传染病和病媒生物传入、发生生物恐怖袭击和突发食源性公共卫生事件等多重风险的考验。而解决这些问题的关键便在于实现事发现场实时准确的病原检测, 从而迅速启动相应的应急措施将可能造成的危害降至最低限度。通过开展快速筛检突发群体性消化道传染病病原体的研究, 针对每种疾病病原体及危害因子建立快速筛检识别方法和检测规程, 所获得的预期成果具有技术先进、操作简便、快速准确、灵敏度高等优点^[2-14]。

通过实验, 建立国境口岸突发公共卫生事件应急处置体系, 降低输入性传染病和病媒生物及危害因子传入我国的风险, 同时有效应对防控国境口岸突发群体性疫情、生物恐怖和食源性疾病等重大公共卫生事件的发生, 为2010年上海世博会的成功举办提供检验检疫技术保障。

本实验研究了几种食源性致病菌单核细胞增生李斯特

菌、大肠埃希菌 O157与志贺菌的快速检验方法^[9-10, 15], 能够快速检测出目的菌, 实现现场检验的目的, 提高大批量检测的检验效率。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, ATCC54003); 英诺克李斯特菌 (*Listeria innocua*, ATCC33090); 大肠杆菌 O157 H7 (*E. coli* O157 H7, ATCC43889); 福氏志贺菌 (*Shigella*, ATCC51311); 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 51816); 肠炎沙门菌 (*Salmonella enteritidis*, ATCC 49214)。

样品均来自本实验室日常检验样品及购自超市的样品。

1.2 仪器

法国梅里埃公司的全自动荧光酶检测系统 (mini-Vidas); 60℃恒温孵育器。

1.3 试剂

Reveal microbial screening test Listeria Test System (9780), 美国 NEOGEN 公司; 单增李斯特杆菌快速检测试纸卡 (北京宝特斯生物科技有限公司); DuPont Lateral Flow System Listeria Test Kit Part D12457Q6Q 大肠杆菌 O157检测试剂盒 (中国博

[基金项目] 国家科技支撑计划项目-世博科技专项 (2009BAK43B31)

[作者简介] 李晓虹 (1965-), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事食品微生物检验研究。

赛生物科技有限公司);志贺菌 LAMP检测试剂盒 (Loop-mediated Isothermal Amplification Method)购自广州华峰科技有限公司;其它培养基及生化试剂购自上海市疾病预防控制中心。

1.4 方法

1.4.1 灵敏度和特异性试验

1.4.1.1 细菌培养:将标准菌株单核细胞增生李斯特菌、大肠杆菌 O157:H7、志贺菌、英诺克李斯特菌、福氏志贺菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门菌于普通营养肉汤中 37℃培养 24 h 增菌。取培养的上述 7 种目标菌按 1:10 稀释后,麦氏比浊法检测各菌液浓度。

1.4.1.2 灵敏度检测:用相应试纸卡分别检测上述经 10 倍系列稀释的各菌浓度,出现阳性结果的最低稀释度为检测试剂卡的灵敏度^[3]。

1.4.1.3 特异性试验:用各种检测卡分别与上述 7 种标准菌液作特异性试验检测。

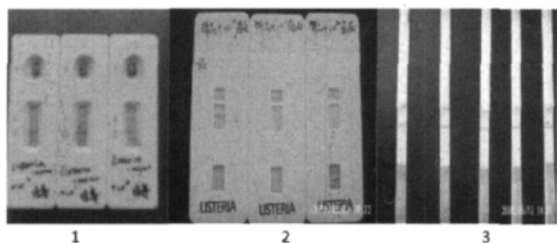
1.4.2 人工染菌样品的制备及检测 选用传统检测结果为阴性的样品作为实验样品。将样品无菌均质称取 25 g 分装于相应的增菌培养液中^[1]。选取 1.4.1.1 中梯度稀释浓度为 10⁰~10³ 的菌液,分别移取 1 ml 菌液添加入相应样品后置 37℃培养 24 h 分别进行免疫胶体金和 LAMP 检测。同时与传统方法进行比较,在血平板与普通营养琼脂平板涂布培养,24 h 后观察培养结果。

1.4.3 常规样品检测 选用美国 Neogen Reveal 李斯特快速检测试剂盒、博赛大肠杆菌 O157 检测试剂盒、广州华峰志贺菌 LAMP 检测试剂盒对来源于本室日常检测样品及购自超市的样品进行检测。检测样本数分别为 69 个、55 个、55 个,检测的同时均与传统检测方法相比较。

2 结果

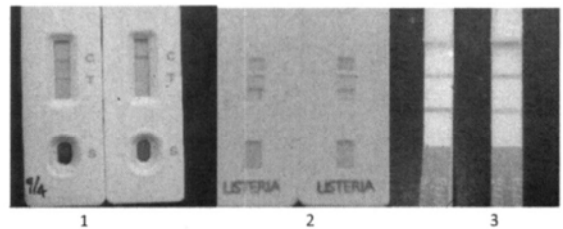
2.1 试剂卡的敏感度和特异性实验结果

2.1.1 单增李斯特菌所用试剂盒分别为:北京宝特斯生物科技有限公司单增李斯特杆菌快速检测试纸卡、美国 Neogen Reveal 李斯特快速检测试纸卡、美国杜邦李斯特检测试剂条。对李斯特菌的灵敏度分别为:10⁷、10⁷ 和 10⁸ cfu/ml 其中北京宝特斯生物科技有限公司生产的单增李斯特杆菌快速检测试纸卡特异性好。另两种试纸卡均为李斯特菌属试纸卡,特异性也较好,见图 1、图 2。



1. 北京宝特斯单增李斯特菌快速检测试纸卡灵敏度结果。从左到右依次为 10⁶ 菌液、10⁷ 菌液、10⁸ 菌液; 2. Reveal 李斯特快速检测试剂条灵敏度结果。从左到右依次为 10⁷ 菌液、10⁶ 菌液、10⁵ 菌液; 3. 美国杜邦李斯特检测试剂条灵敏度结果。从左到右依次为 10³ 菌液、10⁴ 菌液、10⁵ 菌液、10⁶ 菌液、10⁷ 菌液

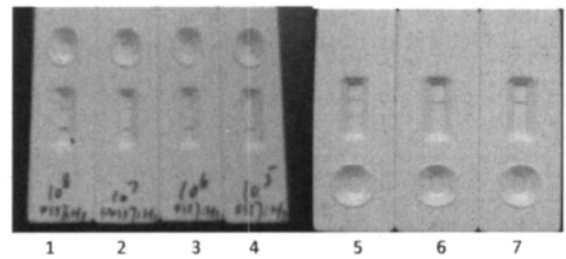
图 1 单增李斯特菌快速检测试纸卡灵敏度结果



1. 北京宝特斯单增李斯特菌快速检测试纸卡; 2. Reveal 李斯特快速检测试剂条灵敏度结果; 3. 美国杜邦李斯特检测试剂条灵敏度结果。以上图中左为单增李斯特菌, 右为英诺克李斯特菌

图 2 李斯特菌快速检测试纸卡特异性试验结果

2.1.2 大肠杆菌 O157 检测试剂盒选用的为上海博赛公司的产品,其检测灵敏度为 10⁶ cfu/ml 对非目的菌均无条带,特异性好,见图 3。

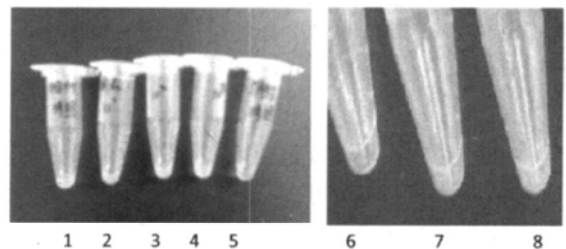


1. 10⁸ 菌液; 2. 10⁷ 菌液; 3. 10⁶ 菌液; 4. 10⁵ 菌液; 5. *E. coli* O157:H7; 6. 金黄色葡萄球菌; 7. 肠炎沙门菌

图 3 *E. coli* O157 灵敏度和特异性实验结果

从图 3 可看出:上海博赛公司的 O157 胶体金检测试纸条的灵敏度为 10⁶, 特异性好。

2.1.3 志贺菌 LAMP 检测试剂盒选用的为广州华峰公司的产品,其检测限为:10² cfu/ml 对非目的菌呈阴性反应。特异性好,见图 4。



1. 阳性对照; 2. 10¹ 菌液; 3. 10² 菌液; 4. 10³ 菌液; 5. 阴性对照; 6. 金黄色葡萄球菌; 7. 肠炎沙门菌; 8. 志贺菌

图 4 志贺菌试剂盒灵敏度和特异性检测结果

从图 4 可看出:广州华峰志贺菌 LAMP 检测试剂盒的灵敏度为 10². 特异性良好。

2.2 污染样品的检测结果

试剂盒名称	各目标菌培养前加入菌液浓度 (cfu/ml)			
	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
北京宝特斯单增李斯特杆菌快速检测试纸卡	+	+	-	-
美国 Neogen Reveal 李斯特快速检测试纸卡	+	+	+	+
美国杜邦李斯特检测试剂条	-	-	-	-
上海博赛公司大肠杆菌 O157 检测试剂盒	+	+	+	+
广州华峰志贺菌 LAMP 检测试剂盒	+	+	+	-

2.3 实际检测样品结果

2.3.1 根据上述实验结果,将美国 Neogen Reveal李斯特快速检测试纸卡应用于检测单增李斯特菌样品中。共检测样品 69个。胶体金检测呈阳性结果共 5个。阳性检出率为 7.2%。与 VIDAS检测仪检测结果相同。

2.3.2 将上海博赛公司大肠杆菌 O157检测试剂盒应用于批量检测中,共检测样品 55个。结果均为阴性,与常规检测结果一致。

2.3.3 将广州华峰志贺菌 LAMP检测试剂盒应用于批量检测中,共检测样品 55个。结果均为阴性,与常规检测结果一致。

3 讨论

随着全球化、城市化快速发展,人口流动和旅游等因素影响,生态环境变化、人类活动范围拓展、国际流动加大、技术和工业发展等因素也大大加剧了传染病大规模爆发流行的可能,使得食源性和输入性传染病传入的风险进一步加大,这都给上海世博会的成功举办带来了重大安全隐患。

目前胶体金试纸条或试剂盒国内外有很多种,其最大的优点是简便、快速。但是胶体金试纸条或试剂盒稳定性不高,容易产生假阳性与假阴性情况^[6,8],仅能作为一种快速筛选方法,提供大批量的产品的现场检测,并不能代替传统的检测方法。其检测结果需进一步验证。

相对而言,LAMP法检测步骤较胶体金法步骤稍多,等待时间较长,不需要大型仪器设备,具有较高的灵敏度及稳定性^[7],也是一种快速检测的好方法。

目前,一般微生物检测采用传统常规方法,检测时限长,通常增菌培养需 24 h,分离培养需 24 h或更长,初步报告需 72 h以上,检测报告需要 3~5 d以上。而胶体金免疫层析法一般增菌 18 h后检测,阴性结果即可报告,这有利于加快检测及报告速度,提高快速通关的时间,进一步提高检验检疫的服务质量^[4,5]。

现在市场上存在的胶体金试剂盒普遍存在灵敏度不高,稳定性不够,且价格较高的情况。但鉴于其方便快捷、检测时间短、试剂和样本用量少、不需要特殊设备和试剂、结果判断直观等特点,因此胶体金免疫技术和 LAMP技术在生物学各研究领域得到了日益广泛的应用。总之这两种方法对于食源性致病菌的快速检测无疑具有重要意义,在 2010年世博会期

间食品现场快速检测中将起到重要的作用。

[参考文献]

- [1] GB/T 4789-2008. 食品卫生微生物检验[S].
- [2] 宾羽琳,陈艳,邱灿林,等.胶体金免疫层析法应用于感染性肠道疾病病原的快速检测[J].中国卫生检验杂志,2008,18(5):854-859.
- [3] 方莹.免疫胶体金技术及其在微生物检测中的应用[J].中国卫生检验杂志,2006,16(11):1399-1401.
- [4] 王东勇,张松乐.免疫胶体金技术在快速诊断中的应用[J].中国卫生检验杂志,2003,13(3):391-392.
- [5] 陈凤梅,李娟,曲文君,等.免疫胶体金技术的应用及研究进展[J].中国兽药杂志,2004,38(8):33-35.
- [6] 熊国华,于莉,曹际娟,等.单增李斯特菌免疫胶体金试纸条快速检测[J].中国公共卫生,2008,24(2):248-249.
- [7] 张如胜,魏泉德.LAMP技术在病原微生物检测中的应用[J].华南预防医学,2007,33(5):45-49.
- [8] JA Hudson, RJ Lake, MG Savill *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction[J]. J Appl Microbiol, 2001, 90(1): 614-621.
- [9] 唐静,金燕,袁涛,等.层次分析法在比较大肠埃希氏菌 O157:H7 快速监测方法中的运用[J].中国卫生检验杂志,2009,19(4):831-840.
- [10] 张树宏,阮寅,顾鸣,等.大肠杆菌 O157微孔板法与经典方法的比较研究[J].现代食品科技,2009,25(4):455-457.
- [11] 孔蕾,周健勇,叶磊海,等.胶体金免疫层析技术及其在水产养殖业中的应用[J].河北渔业,2009,1(3):49-50.
- [12] 黄素玲.免疫法快速检测进口食品中大肠杆菌 O157抗原[J].中国卫生检验杂志,2009,10(1):104-106.
- [13] 刘培,张海滨,张霞,等.肉制品中的肠出血性大肠杆菌 O157:H7快速检测方法的建立[J].食品研究与开发,2009,30(3):139-140.
- [14] 许如苏,林彩华,亢卫民,等.应用测试片快速检测食品中的大肠杆菌 O157:H7[J].中国检验检疫,2009,6(5):54-56.
- [15] 黄宝华,陈庆森,庞广昌,等.志贺氏菌研究及其快速检测技术发展现状[J].食品科学,2004,25(11):333-336.

(收稿日期:2010-02-04)