

## 论著

## 上转换磷光免疫层析检测肠出血性大肠杆菌 O157

王 静<sup>1</sup> 周 蕾<sup>1</sup> 李 伟<sup>1</sup> 胡孔新<sup>1</sup> 陈维娜<sup>1</sup> 闫中强<sup>2</sup> 杨瑞馥<sup>2</sup>

(1. 中国检验检疫科学研究院卫生检疫研究所,北京 100025;

2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京 100071)

**摘要:**目的 建立一种肠出血性大肠杆菌 O157 的上转换磷光免疫层析快速检测方法。方法 利用上转换磷光标记和双抗体夹心免疫层析技术检测大肠杆菌 O157,评价了该法的敏感性和特异性,并用于模拟污染食品样品的检测。结果 该法能在 40 min 内完成检测,应用于不同的肠杆菌科细菌如其他大肠杆菌、沙门菌、志贺菌、变形杆菌、产气肠杆菌、枸橼酸杆菌、沙雷菌、耶尔森菌以及葡萄球菌、副溶血弧菌、单增李斯特菌等 23 种 28 株常见细菌,未发现交叉反应,检测灵敏度为  $5 \times 10^3$  CFU/ml,每次最低可检测 500 个细菌,对奶粉、咖啡粉、饼干、蛋糕、绿豆糕、果冻、燕窝、果汁等样品中的人工染菌均可检测,最低检测浓度为  $5 \times 10^3$  CFU/ml。结论 肠出血性大肠杆菌 O157 上转换磷光免疫层析方法简便快速,特异性和灵敏性好,适用于现场的快速检测。

**关键词:**大肠杆菌 O157; 发光; 上转换发光材料; 免疫学技术

**Development of UCP-immunochromatography Test for Rapid Detection of *E. coli* O157**

WANG Jing, ZHOU Lei, LI Wei, HU Kong-xin, CHEN Wei-na, YAN Zhong-qiang, YANG Rui-fu

(Institute of Health Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

**Abstract: Objective** To develop a method for rapid detection of Enterohemorrhagic *E. coli* O157 (EHEC O157) on the spot. **Method** An Up-Converting Phosphor (UCP)-immunochromatography test (ICT) based on double-antibody sandwich assay was developed for detection of EHEC O157. The sensitivity and specificity of the method were evaluated. The feasibility of screening the bacteria in food samples were evaluated by different food samples artificially contaminated with EHEC O157 H7, including milk, starch, coffee, biscuit, cake, juice, etc. **Results** Typical analysis time was less than 40 minutes per sample. The sensitivity of the test was  $5 \times 10^3$  CFU/ml. No cross reaction was found when the method was used to detect other *Enterobacteriaceae* (including *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*), *Staphylococcus* and *V. parahemolyticus*, confirming that the method is highly specific for *E. coli* O157. **Conclusion** The UCP-immunochromatography test provides a rapid, specific and sensitive measure for detecting EHEC O157 on the spot.

**Key word:** *Escherichia coli* O157; Luminescence; Up-Converting Phosphor; Immunologic Techniques

肠出血性大肠杆菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC) 可引起出血性肠炎 (HC)、溶血性尿毒综合征 (HUS) 和血栓形成性血小板减少性紫癜 (TTP), HUS 和 TTP 死亡率较高。O157:H7 是其主要血清型。据美国食品药品监督管理局 (疾控中心·CDC) 报道,美国每年有 2 万多 O157:H7 出血性肠炎患者,每年死亡约 300~500 例。出入境口岸快速检测是预防控制疫情传入传出的关键。常规的分离技术包括增菌、培养、生化和血清学鉴定,以及核酸检测方法如 PCR、多重 PCR 方法等,这些方法需要时间较长,不适合现场检测。免疫胶体金技术是一种

较成熟的快速诊断方法,但是检测灵敏度不十分理想。基于上转换发光材料 (Up-Converting Phosphor, UCP) 作为标记物的免疫层析方法,是近年国内外建立的新型快速检测方法,在用于一些传染病的检测中,取得了理想效果<sup>[2]</sup>。本研究建立了肠出血性大肠杆菌 O157 上转换磷光免疫层析技术,用于人为白色粉末、食品、环境样品中污染菌的快速检测,并通过基于上转换发光技术生物传感器 (UPT biosensor) 扫描获取检测结果,可用于口岸现场检测。

### 1 材料与方法

1.1 菌株 肠出血性大肠杆菌 O157:H7,大肠杆菌 O26:H11、大肠杆菌 O111:K74 由中国检验检疫科学研究院收集保存并经血清学方法和多重 PCR 方法鉴定;假结核耶尔森菌、鼠疫耶尔森菌 EV76 疫苗株由军事医学科学院微生物流行病学研究所保存;普通

基金资助:国家自然科学基金资助 (30500455); 国家质量监督检验检疫总局重大科研专项资助 (20051K0143)。

作者简介:王静 女 副研究员

等同第一作者:周蕾 女 博士生

通讯作者:杨瑞馥 男 研究员

大肠杆菌、沙门菌、志贺菌、变形杆菌、产气肠杆菌、枸橼酸杆菌、沙雷菌、葡萄球菌、副溶血弧菌、单增李斯特菌等购自中国药品生物制品鉴定所。

1.2 抗体及纯化 大肠杆菌 O157 抗血清购自兰州生物制品所,大肠杆菌 O157 单抗腹水购自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG购自鼎国生物制品公司。血清及腹水中抗体 IgG 的提取纯化采用正辛酸 - 过硫酸铵沉淀法。

1.3 细菌培养 EHEC O157 H7 经科玛嘉显色培养基培养鉴定,并经血清凝集方法综合确认。其余对照菌株经点种各类科玛嘉显色培养基快速鉴定。普通琼脂常规培养细菌,比浊法初步计数后,平板计数确定。

1.4 样品制备及处理 PBS 缓冲液稀释培养细菌;试验 Tween 等表面活性剂最佳使用浓度后,确定样品处理液(含 BSA、Tween 等的 PBS 缓冲液)。

1.5 上转磷光颗粒的制备及标记 上转磷光(UCP)颗粒制备和 EHEC O157 抗体标记 UCP 颗粒参照文献[3]。

1.6 免疫层析条的制备 样品垫(采用玻璃纤维素膜)、结合垫(标记抗 EHEC O157 抗体的 UCP 颗粒,干燥)、硝酸纤维素膜(检测带:2 mg/ml, 1 μl/cm;质控带:1 mg/ml, 1 μl/cm)及吸收垫依次贴在带有粘合剂的底衬卡,切成 4 mm 宽的条,装壳备用。

1.7 UPT 生物传感器扫描检测及结果判读处理 UPT 生物传感器为中国科学院上海光学精密机械研究所、军事医学科学院微生物流行病学研究所、中国检验检疫科学院联合研制。

加样 100 μl 于试样孔中, 30 min 后,用 UPT 生物传感器扫描,以软件 Origin 6.0 和 Excel 分析结果并作图表,确定阈值,判断阴阳性检测结果<sup>[3]</sup>。

1.8 特异性实验 以试样处理液分别稀释各种细菌至 10<sup>7</sup> CFU/ml,以制备好的上转磷光免疫层析试纸条检测。

1.9 敏感性实验 菌悬液系列稀释菌落计数后,稀释成 10<sup>8</sup> CFU/ml 数量级的菌悬液,以试样处理液 10 倍系列稀释后检测。

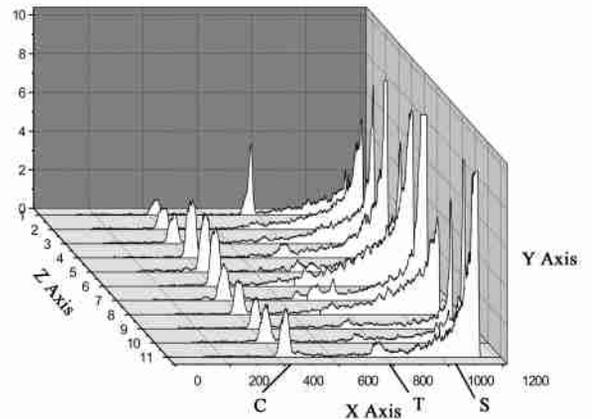
1.10 不同模拟试样人工染菌检测 奶粉、淀粉、面粉、咖啡、饼干、蛋糕、果冻、燕窝和果汁等食品和环境试样各 50 mg,加入到 1 ml 含目标菌的试样稀释液中,混匀,静置 10 min 或短暂离心(3 000 r/s 15 s),吸取上层液体直接用于检测。

## 2 结果

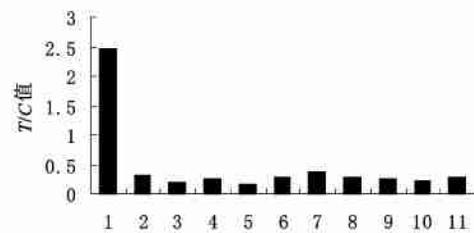
2.1 样本处理方法及系统优化 实验不同 pH、盐

离子浓度、表面活性剂及浓度、缓冲液、检测时间、BSA 量、样品加样量、UCP 加样饱和量和量对结果的影响,确定了本试验所用的最佳反应条件。

2.2 检测特异性实验 以试样稀释液分别处理不同细菌至 10<sup>7</sup>/ml,以试样处理液作为空白对照,检测结果显示 UCP 免疫层析检测系统可检测大肠杆菌 O157 H7 为阳性,而对于肠杆菌及其它常见细菌检测均为阴性,说明无交叉反应现象出现,见图 1。



X 轴为膜上的不同位点, Y 轴为检测磷光信号峰度, Z 轴为不同样品, C 峰为质控带, T 为检测带, S 为滞留本底。



- 1. EHEC O157 H7; 2. 沙门菌; 3. 44014 大肠杆菌 O111 K74; 4. 11732 弗氏柠檬酸杆菌; 5. 大肠杆菌 O111 K74; 6. 50004 乙型副伤寒沙门菌; 7. 50001 甲型副伤寒沙门菌; 8. 50041 肠炎沙门菌; 9. 51315 鲍氏志贺菌; 10. 51571 福氏志贺菌; 11. 空白对照。

图 1 不同细菌的 UPT 检测试验结果(扫描图和矩形图)

2.3 检测灵敏度测定 以 5 × 10<sup>8</sup> CFU/ml 菌样本 10 倍系列稀释,不含菌的试样液为空白对照,检测结果见图 2,设定检测 cut-off 值为 0.7 (99 % 可信度区间),结果显示检测灵敏度为 5 × 10<sup>3</sup> CFU/ml,每次最低检测拷贝数为 500 CFU。

2.4 不同模拟染菌样品的检测 分别将奶粉、淀粉、面粉、咖啡粉、饼干、蛋糕、绿豆糕、果冻、燕窝和果汁等不同的固体、半固体、液体食品样本以样品稀释液稀释,并添加肠出血性大肠杆菌 O157:H7 至 10<sup>7</sup> CFU/ml,静置 10 min 或短暂离心(3 000 r/s 15 s),吸取上层液体进行检测,部分结果见图 3,可见这些样品对检测结果无影响,对处理后样品检测灵敏度可达到 10<sup>3</sup> CFU/ml。

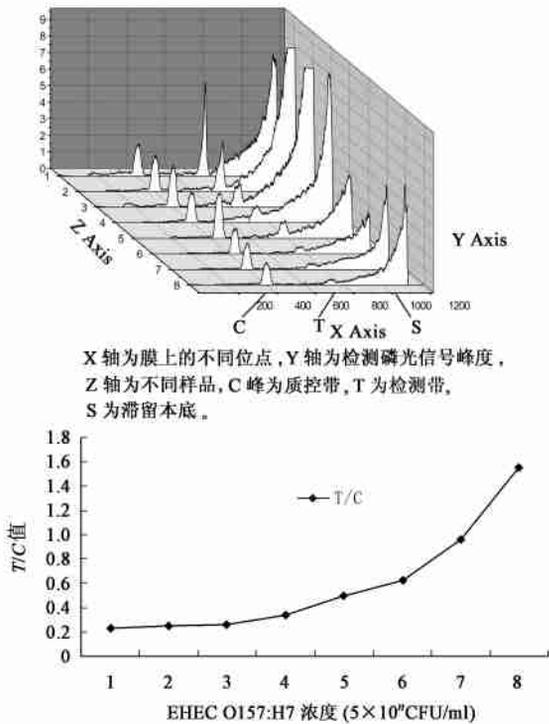
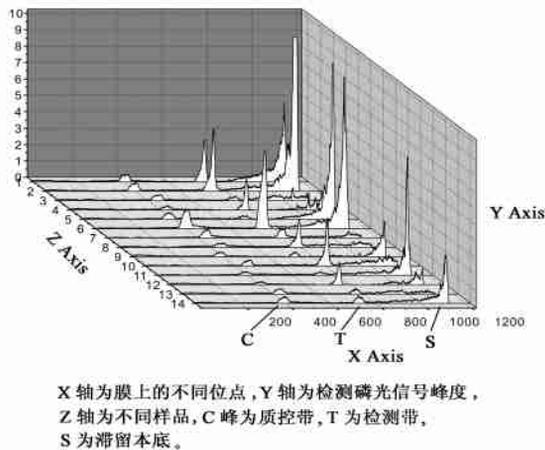


图2 不同浓度 EHEC O157:H7 检测结果



1. 阳性菌; 2. 菌 + 饼干; 3. 饼干; 4. 菌 + 蛋糕; 5. 蛋糕; 6. 菌 + 果汁; 7. 果汁; 8. 菌 + 咖啡; 9. 咖啡; 10. 菌 + 绿豆糕; 11. 绿豆糕; 12. 菌 + 燕窝; 13. 燕窝; 14. 试样处理液。

图3 模拟染菌食品样品 UPT 扫描结果

### 3 讨论

免疫层析是一种快速免疫分析技术,以微孔膜为固相载体,膜上包被已知抗原或抗体,加入待测样本后,经微孔膜的毛细虹吸作用使标本中的抗体或抗原与膜上包被的抗体或抗原结合,通过标记物标示反应结果。它不需进行结合标记物与自由标记物的分离,省去了繁琐的加样、洗涤步骤,因而操作简便快速,非常适合现场快速检测之用。当前示踪材料技术迅猛发展,常见的示踪材料包括放射性同位素、酶、胶体金颗粒、发光标记材料等,其中发光标记

材料又分为荧光、磷光、化学发光和生物发光材料等<sup>[2]</sup>。上述各种示踪材料各有优缺点,放射性同位素易衰变,存在放射污染;酶学反应敏感性较高,但酶不稳定,易受生物样品的干扰;荧光材料受许多生物材料存在自然荧光的影响,背景噪音高,且荧光存在自然淬灭现象;化学发光标记物检测所需瞬时发光检测设备昂贵;胶体金材料较便宜,但敏感性不足且难以定量分析<sup>[2]</sup>。

UCP 是新近发展起来的示踪材料,UCP 颗粒为纳米晶体颗粒,它由包埋于氧化硫等惰性材料中的稀土镧系元素组成,在红外线激发下可发射不同波长的可见光,故为上转磷光。其光学性质不受环境和加样条件的限制,由于天然生物材料不具备上转磷光的特性,因此,检测不受载体或样品自然磷光的干扰;颗粒稳定,信号不易衰减<sup>[3-6]</sup>。应用 UPT 技术检测的磷光信号与 UCP 含量成正比,因而在双抗体夹心检测抗原的反应中通过收集检测带 (T) 检测信号和质控带 (C) 检测信号,计算 T/C 值即可消除试纸条和加样的系统误差,达到定性检测和定量的目的<sup>[2]</sup>。

本研究通过实验条件的优化,建立了敏感性高、特异性好的 UCP 免疫层析方法检测 EHEC O157。用优化的试样处理液,模拟奶粉、咖啡粉、饼干、蛋糕、果冻、燕窝、果汁等固体、半固体、液体食品样品染菌检测,对处理后试样检测灵敏度最低可达到 5 000 CFU/ml,这与 Niedbala 报道的菌悬液大肠杆菌 O157 H7 的 UCP 免疫检测方法灵敏度在相同的数量级  $10^3$  org/ml<sup>[6]</sup>。可见,上转磷光免疫层析方法敏感性高于胶体金免疫层析方法 (Takeda 等用胶体金免疫层析条直接检测水样便中的大肠杆菌 O157 H7,报道检测限为  $5 \times 10^5$  CFU/ml<sup>[7]</sup>;本研究室建立的胶体金免疫层析方法检测限为  $1 \times 10^5$  CFU/ml)。EHEC O157 H7 的致病量为  $10^5$  个活菌<sup>[1]</sup>,本方法的检测底限为单条测定 EHEC O157 菌数 500 个,加上上转磷光免疫层析技术具备简便、快速可定量等特点,可应用于口岸等特殊场所可疑样品现场检测。

[致谢:在抗体制备和纯化过程得到军事医学科学院全军微生物检验研究中心王津老师以及中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所景怀琦老师的支持和帮助,在此表示衷心的感谢!]

### 参考文献

- [1] 周蕾,纪军,杨瑞霞. 上转磷光技术在快速生物分析中的应用[J]. 生物技术通报,2003,3:20-25.
- [2] 赵永凯,周蕾,黄惠杰,等. 基于上转换发光技术的生物传感器及其应用[J]. 光学学报,2005,25(6):841-847.
- [3] NIEDBALA R S, VAIL T L. Multiphoton up-converting phosphors for use in rapid immunoassays[J]. SPIE, 2000, 3913: 193-203.

论著

# 食品中李斯特菌污染状况研究

冯家望 吴小伦 陈静静 王小玉 李丹琳 唐食明 游淑珠  
(珠海出入境检验检疫局,广东 珠海 519015)

**摘要:**目的 了解冷藏冷冻食品中李斯特菌污染状况。方法 采用 PCR 方法对样品中的李斯特菌进行初筛,阳性样品用国标法确证,对 6 类冷藏冷冻食品共 3 586 份样品进行了李斯特菌带菌状况调查。结果 珠海地区李斯特菌污染较为普遍,且存在着多重污染现象,生鲜奶、生肉禽类、蔬菜类样品不仅带李斯特菌率高,且带单增李斯特菌率高。结论 应加强冷冻食品的李斯特菌监测与管理。

**关键词:**李斯特氏菌属;李斯特氏菌,单核细胞增生;食品污染

## Investigation of Contamination Status of Foods by *Listeria* in Zhuhai

FENG Jia-wang, WU Xiao-lun, CHEN Jing-jing, WANG Xiao-yu, LI Dan-ling, TANG Shi-ming, YOU Shu-zhu  
(Zhuhai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of the P. R. C, Guangdong Zhuhai 519015, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the contamination status of foods by *L. monocytogenes*. **Method** In the summer months of recent years, 3 586 food samples of 6 kinds of chilled and frozen foods were collected from supermarkets in Zhuhai and examined for *L. monocytogenes*. PCR was applied first to detect *Listeria* in food samples, and then the national standard method, GB/T 4789.30—2003, was used to validate the positive results. **Results** The results showed that there were heavy contamination of foods by *Listeria* in Zhuhai, and there existed multiple contamination. Raw fresh milk, raw meat, poultry and vegetables had high contamination rates of both *Listeria* and *L. monocytogenes*. **Conclusion** Inspection and management of chilled and frozen foods should be enhanced to prevent *Listeria* infection.

**Key word:** Listerial; *Listeria monocytogenes*; Food Contamination

李斯特菌属共有 7 个种,即单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 以下简称单增李斯特菌)、默氏李斯特菌 (*L. murrayi*)、西尔李斯特菌 (*L. seeligeni*)、格氏李斯特菌 (*L. grayi*)、威尔斯李斯特菌 (*L. welshimeri*)、绵羊李斯特菌 (*L. ivanovii*)、英诺克李斯特菌 (*L. innocua*),其中单增李斯特菌和绵羊李斯特菌有致病性,单增李斯特菌的致病力较强。

单增李斯特菌是一种革兰阳性无芽孢兼性厌氧短小杆菌,广泛存在于自然界,如土壤、污水、青贮饲

料、牛奶、人和动物的粪便中等,该菌容易污染食品引起人的食物中毒,是人畜共患的重要食源性致病菌,被 WHO 列为 20 世纪 90 年代食品中 4 大致病菌之一<sup>[1]</sup>。近年来,单增李斯特菌在法国、美国、加拿大等国曾多次引起食物中毒<sup>[2,3]</sup>,轻者为一般胃肠炎症状,重症者主要表现为败血症、脑膜炎、神经症状及单核细胞增多等,临床死亡率高达 20% ~ 70%<sup>[4,5]</sup>,引起了世界各国的高度关注。

单增李斯特菌能在 (4 ±2) 环境中生长、繁殖,

[4] ZANGJINGCUN, LIU YANXING. Progress of study on upconversion materials and its application on laser technology[J]. High Technology Letters, 1996, 3: 58-61.  
[5] NIEDEBALA R S, FEINDT H, KARDOS K, et al. Detection of analytes by immunoassay using up-converting phosphor technology[J]. Analytical Biochemistry, 2001, 293:22-30.

[6] TAKEDA T, YAMAGATA K, YOUHIDA Y, et al. Evaluation of immunochromatography based rapid detection kit for fecal Escherichiacoli O157[J]. Kansenshogaku Zasshi, 1998, 72(8):834-839.

[收稿日期:2006-10-20]

中图分类号:R15;R117;R378.21 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2007)01-0041-04

基金项目:国家质量监督检验检疫总局科研项目(2002IK002-08)  
作者简介:冯家望 男 高级工程师