

全自动免疫磁珠分选系统检测沙门氏菌

杜强*, 屠博文

(常州市疾病预防控制中心, 常州 213022)

摘要: **目的** 研究全自动免疫磁珠分选系统对国标沙门氏菌检测方法的改进效果。**方法** 从肉鸡专项监测中选取 106 份样品, 采用全自动免疫磁珠分选系统和 GB 4789.4-2010《食品微生物学检验沙门菌检验》进行沙门氏菌对比检测。与国标法相比, 全自动免疫磁珠分选系统取消了 SC 和 TTB 增菌, 经 BPW 增菌后直接使用系统富集目标菌并接种显色平板。**结果** 免疫磁珠法阳性检出率为 32%, 国标法阳性检出率为 31%, 二者无显著性差异($P>0.05$)。但磁珠法取消了二次增菌的步骤, 检测时间比国标法节省 24 h, 且平板上的单个菌落生长率和菌株特异性也更好。采用磁珠法检测的 106 份样品中, 有 34 份样品检出可疑显色菌株, 都有单个可疑菌落生长, 最后均鉴定为目标菌沙门氏菌; 采用国标法有 38 份样品检出可疑显色菌株, 其中 3 份无单个可疑菌落生长经再次转种, 最后有 5 株经鉴定为嗜水气单胞菌等干扰性杂菌, 仅 33 株为目标菌沙门氏菌。**结论** 全自动免疫磁珠分选系统特异性好、单个菌落生长率高且检测时间短, 可以用于食品中沙门氏菌检验。

关键词: 全自动免疫磁珠分选系统; 沙门氏菌; 食源性监测

Detection of *Salmonella* by automatic magnetic activated cell sorting system

DU Qiang*, TU Bo-Wen

(Changzhou Center for Disease Control and Prevention, Changzhou 213022, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the improvement effect of detection of *Salmonella* by automatic magnetic activated cell sorting systems. **Methods** A total of 106 samples were selected from chickens special monitoring. GB 4789.4-2010 *Food Microbiological Examination: Salmonella* and automatic magnetic activated cell sorting system were used for detection of *Salmonella*. Compared with GB method, automatic magnetic activated cell sorting system canceled the enrichment of SC and TTB, enriched target bacteria after BPW enrichment, and then inoculated color plates. **Results** The positive rates of automatic magnetic activated cell sorting system and GB method were respectively 32% and 31%, with no significant difference ($P>0.05$). While automatic magnetic activated cell sorting system canceled secondary enrichment step, it saved detection time for 24 h compared with GB method, and single colony growth rate and specificity of strain were better. Among 106 samples, suspicious strains with a single suspicious colony growth of 34 samples by automatic magnetic activated cell sorting system were detected, and all were identified as targets *Salmonella*. Totally 38 samples of suspicious strains by GB method were detected, of which 3 samples without single suspicious colony growth were turned again. At last 5 suspicious strains were identified as *Aeromonas hydrophila* and *Morganella morganii*, only 33 strains of bacteria were identified as *Salmonella*. **Conclusion** Automatic magnetic activated cell sorting system has good specificity, high single colony growth rate, and short detection time, which can be used for detection of *Salmonella*.

*通讯作者: 杜强, 副主任检验技师, 主要研究方向为食品及水质微生物检验。E-mail: bodezhilang@sina.com

*Corresponding author: DU Qiang, Associate Chief Technician, Changzhou Center for Disease Control and Prevention, Changzhou 213022, China. E-mail: bodezhilang@sina.com

KEY WORDS: automatic magnetic activated cell sorting system; *Salmonella*; foodborne monitoring

1 引 言

免疫磁珠分离技术(immunomagnetic beads separation techniques, IMBS)最早出现于 20 世纪 70 年代, 基本原理是将磁性材料合成的均一超顺磁微球与经过亲和层析的抗体结合, 从复合悬浊液中捕捉和分离目标^[1], 并用于多种微生物和分子生物学的检测^[2], 它被认为是分离目标分析物敏感而简单的方法^[3]。其检出限理论上可以达到每克 1~10 个细菌^[4]。进入 21 世纪后, IMBS 在国际和国内的应用也逐渐增多^[5]。Dynabeads 分离的大肠埃希氏菌 O157 免疫磁珠就曾被列入中国国家标准^[6]。BeadRetriever™ 全自动免疫磁珠分选系统(BeadRetriever™ automatic magnetic activated cell sorting system)是由此发展而来的自动化操作系统。整个方案基于 Dynabeads 免疫磁珠分选技术(IMS), 配合 Dynal 701 全自动免疫磁珠分选机能够快速纯化和浓缩各种生物样本, 完成对致病菌的富集和分离。该系统使用 Invitrogen™ 公司提供的 Dynabeads^R, 主要包括沙门氏菌(Dynabeads^R anti-*Salmonella*), 李斯特氏菌(Dynabeads^R anti-*Listeria*), O157H7 大肠埃希氏菌(Dynabeads^R anti-*E.coli* O157)等。

现在食源性疾病已经成为我国重要的公共卫生问题, 而微生物则是主要的食源性疾病致病因子^[7]。我国作为世界第二鸡肉生产国、第一鸡蛋生产国^[8], 生禽肉(蛋)的沙门氏菌污染状况一直是关注的重点。沙门氏菌(*Salmonella*)是对人和动物具有极大危害的革兰氏阴性肠道病原菌, 蛋、家禽和肉类是其主要的传染源^[9]。在世界各地的食物中毒病例中, 沙门氏菌导致的病例占第一位^[10], 常引起患者急性腹泻、呕吐、腹部疼痛、高烧和败血症等疾病^[11]。据统计, 2006 年欧盟调查发现大约有 160049 人被确认感染了沙门氏菌^[12]。2010 年在亚洲, 日本从 4090 个农场中抽取 203 个调查, 结果有 48 个农场显示阳性, 占 23.6%^[13]。而 2012 年美国食品和药品监督管理局统计显示, 美国每年大约有 400 人死于沙门氏菌感染^[14]。在我国, 由沙门氏菌引起的食物中毒也屡居首位, 沙门氏菌是细菌性食物中毒的主要病原菌之一^[15]。所以对食源性监测检验人员来说, 提高沙门氏菌检出率具有重要的现实意义。

2010 年更新的国标沙门氏菌检验方法引入了选择性显色平板和商品化生化鉴定系统^[16], 大大加强了平板分离和确认这两个环节, 但从增菌液到平板这一步, 还是存在着接种环菌量少、干扰菌和杂菌生长可能盖过目标菌等问题。全自动免疫磁珠分选系统具有的磁珠特异性富集捕获^[17]和自动化操作理论上正好可以弥补这方面的不足, 从而提高检测效率。2012 年江苏省疾病预防控制中心下达了沙门氏菌肉鸡专项监测的任务, 考虑到生禽肉的高浓度背景

菌, 本研究抽取部分样品使用全自动免疫磁珠分选系统和 GB 4789.4-2010^[16]进行对比检测研究, 为今后检测方法的改进积累数据。

2 材料与方 法

2.1 样 品

依照 2012 江苏省食源性致病菌检测工作手册, 2012 年 3~11 月在常州市市郊数个大型白羽肉鸡屠宰场采集样本, 包括宰杀前活体、分割后冷冻鸡肉、工人手拭子, 共计 3 类 106 份。宰杀前活体使用肛拭法, 分割后冷冻鸡肉直接取样, 工人手拭子采用涂抹法。

2.2 仪器和试剂

SBG 选择性增菌液(批号: 20120213)、BPW 增菌液(批号: 20120211)、SC 增菌液(批号: 20120218)、TTB 增菌液(批号: 20120114)、BS 琼脂平板(批号: 20120107)、沙门氏菌属显色平板(批号: 20120122)、普通营养琼脂平板(批号: 20120215)等试剂均由上海科玛嘉生物技术有限公司提供, 其中各类干粉培养基由本实验室配制成相应琼脂和增菌液并高压蒸汽消毒灭菌(121 °C, 15 min)后使用。

BeadRetriever™ 全自动免疫磁珠分选系统和免疫磁珠 Dynabeads^R(anti-*Salmonella*)(批号: 20111207)由 Invitrogen™ 公司提供。全自动微生物鉴定及药敏系统(型号: VITEK2 COMPACT 30)及 VITEK2 GN 测试卡(批号: 20120206)由法国生物梅里埃有限公司提供, 上述所有试剂均在有效期内。实验室的无菌室温度保持 15~20 °C, 湿度保持 30%~60%。孵室温度保持 37 °C。

2.3 实验方法

2.3.1 国标法

依照 GB 4789.4-2010 沙门氏菌检验^[16], 取宰杀前活体肛拭子和工人手拭子, 装入 10 mL BPW 增菌液, 37 °C 培养 18 h。分割后冷冻鸡肉, 取 25 g 置于盛有 225 mL BPW 增菌液的无菌匀质杯内, 8000 r/min 匀质 1 min, 37 °C 培养 18 h。之后均按照国标法操作检测。

2.3.2 磁珠法

直接取国标法的 BPW 增菌液(37 °C 培养 18 h 后)使用。按照全自动免疫磁珠分选系统的操作说明(Invitrogen™ Dynal 701), 向 5 管反应板中加入以下试剂: 第一管和第二管各 500 μL 缓冲液、10 μL Dynabeads^R(anti-*Salmonella*)磁珠、500 μL 样品增菌液。第三管和第四管各 1 mL 缓冲液, 第五管 100 μL 缓冲液。然后启动机器, 按 10 min 孵育期、1 min 洗涤期、1 min 洗涤期和 10 s 释放的沙门氏菌程序模块运行, 最终得到第五管中的磁珠和抗体混合物。

表 1 磁珠法和标准法 3 类样品对比
Table 1 Comparison of 3 kinds of samples by methods of magnetic beads and GB

样品名称	样品数	磁珠法阳性数	磁珠法阳性率	国标法阳性数	国标法阳性率
宰杀前活体	50	23	46%	23	46%
分割后冷冻鸡肉	50	10	20%	9	18%
工人手拭子	6	1	17%	1	17%
合计	106	34	32%	33	31%

吸取第五管吸附后的 Dynabeads^R(anti-Salmonella)磁珠再接种沙门氏菌属显色培养基平板, 37 °C 培养 24 h。之后按照国标法操作检测。

3 实验结果与分析

在抽取的 106 份样品中, 磁珠法共检出沙门菌 34 份, 阳性率为 32%; 国标法共检出沙门菌 33 份, 阳性率为 31%, 仅分割后冷冻鸡肉有 1 份编号 M4057 的样品磁珠法阳性而国标法阴性, 见表 1。建立 Excel 数据库, 应用 SAS 9.2 进行统计分析。二者相较, 根据 X^2 (卡方检验)计算 $P>0.05$, 不认为 2 种方法阳性检出率有显著性差异。

尽管本实验中磁珠法阳性检出率未能显著提高, 但磁珠法的检测速度更快, 因为取消了 SC 和 TTB 的二次增菌, 比国标法减少了 24 h。此外, 磁珠法的选择性平板上目标菌生长的特异性也更好。磁珠法 106 份样品中, 有 34 份样品检出可疑显色菌株, 最后均鉴定为目标菌沙门氏菌; 国标法 38 份样品检出有可疑显色菌株, 仅 33 株鉴定为目标菌沙门氏菌。其他 5 株鉴定为干扰性杂菌, 其中 3 株嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 2 株摩氏摩根氏菌(*Morganella morganii*)。在可疑菌落单个生长情况方面, 磁珠法都有单个菌落生长; 国标法则有 3 份无单个菌落生长, 经再次转种纯化才得到单个可疑菌落。

4 结论

从实验过程来看, 全自动免疫磁珠分选系统取消了 SC 和 TTB 增菌的步骤, BPW 增菌后使用系统富集目标菌, 直接接种显色平板, 其他检测步骤和国标法一致。从实验结果来看, 相较国标法, 磁珠法阳性检出数仅多 1 个, 阳性检出率无显著性差异。而类似的磁珠法却可以提高食品中单核细胞增生李斯特菌的阳性检出率^[18]。初步推测可能的原因是, 肉鸡屠宰场样品作为天然污染源, 样品中沙门氏菌的浓度较高, 导致磁珠法吸附少量目标菌, 富集捕获的最大优点没有完全体现出来。在这些样品的沙门氏菌定量检测中, 沙门氏菌自然浓度最高甚至达到 93 MPN/g。

尽管本实验中全自动免疫磁珠分选系统检测沙门氏菌的阳性检出率未能显著提高, 但免疫磁珠在实际操作中

还是体现出了检测效率高的优点。首先, 由于全自动免疫磁珠分选系统特异性富集捕获的特点, 该方法取消了标准法的 SC 和 TTB 二次增菌步骤, 从结果来看, 在检测时间节省了 24 h 的基础上, 阳性检出率也并没有降低。其次, 磁珠法的特异性和机器的自动化洗涤排除了背景干扰菌和人工操作误差, 提高了菌株筛选的特异性。在选择性平板上生长的可疑菌株分离生长效果很好且少有杂菌干扰, 而且最后均证实为目标菌沙门氏菌。而国标法增菌液划线分离生长时, 常有少量可疑菌落混杂在杂菌中, 需要经过检验人员转种纯化来分离。还有经分离后才发现是非目标菌的情况, 如本实验中检出的嗜水气单胞菌和摩根氏菌等, 这些都增加了检验人员的工作量, 降低了检测效率。因此, 全自动免疫磁珠分选系统可以用于检测食品中的沙门氏菌, 具有快速、高效、特异性强的特点, 具有重要的应用价值以及良好的发展前景。

参考文献

- [1] 张璇, 鲜瑶. 免疫磁珠技术及其在食品微生物检测中的应用[J]. 农产品质量与安全, 2011, (1): 40-43.
Zhang X, Xuan Y. Immunomagnetic beads (IMB) and its application in food microbiological testing [J]. Agric Qual Stand, 2011, (1): 40-43.
- [2] 寇运同, 雷质文, 林修光, 等. 用免疫磁珠补集法快速检测食品中的单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 检验检疫科学, 2001, 11(6): 11-12.
Kou YT, Lei ZW, Ling XG, et al. Use MACS complement rapid detection of food monocytogenes *Listeria* [J]. Inspect Quarant Sci, 2001, 11(6): 11-12.
- [3] 余楠, 车小燕. 免疫磁珠技术在病原微生物检测中的应用前景[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(3): 280-283.
Yu N, Ju XY. Application prospect of immunomagnetic separation in the detection of pathogenic microorganism [J]. Chin J Lab Med, 2011, 34(3): 280-283.
- [4] 王伟华, 张新武, 周靖波, 等. 食源性微生物快速检测研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2010, 27(4): 184-185.
Wang WH, Zhang XW, Zhou JB, et al. Research progress on fast detection methods of foodborne pathogenic microbe [J]. J Food Saf Qual, 2010, 27(4): 184-185.
- [5] 徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 等. 免疫磁珠分离技术在常见食源性致病菌检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, (5): 1196-1198.
Xu XK, Wu QP, Zhang JM, et al. Immune magnetic bead separation technology in foodborne pathogens Detection [J]. Chin J Health Lab

- Technol, 2009, (5): 1196–1198.
- [6] GB/T 4789.36-2008 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157: H7/NM 检验[Z].
GB/T 4789.36-2008 Food microbiological examination: *Escherichia coli* O157:H7/NM [Z].
- [7] 熊国权, 周红雨. 免疫磁珠分离技术及其在食源性致病菌监测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(12): 2840–2842.
Xiong GQ, Zhong HY. Application of immunomagnetic separation technology in monitoring of food borne pathogens [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(12): 2840–2842.
- [8] 陆昌华, 胡肆农, 谭业平, 等. 动物及动物产品质量安全风险评估与风险预警[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 03(1): 46–47.
Lu CH, HU SN, Tan YP, *et al.* Risk assessment and risk warning on quality and safety of animal and animal products [J]. J Food Saf Qual, 2012, 03(1): 46–47.
- [9] 沈莹. 沙门氏菌检测方法的研究进展[J]. 中国热带医学, 2008, 8(4): 678–679.
Sheng Y. Research progress on detection methods of *Salmonella* [J]. Chin Trop Med, 2008, 8(4): 678–679.
- [10] Manzano M, Cocolin L, Aatori G, *et al.* Development of a PCR microplate-capture hybridization method for simple, fast and sensitive detection of *Salmonella serovars* in food [J]. Mol Cell Probes, 1998, 12(4): 227–234
- [11] Liu YC, Che YH, Li YB. Rapid detection of *Salmonella typhimurium* using immunomagnetic separation and immuno-optical sensing method [J]. Sensors Actuators B, 2001, 72(3): 214–218
- [12] Noelle Mccarthy, Jerry Reen F, James F Buckley, *et al.* Sensitive and rapid molecular detection assays for *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium* and *Heidelberg* [J]. J Food Protect, 2009, 72(11): 2350–2357.
- [13] Eriko Iwabuchi, Noriko Maruyama, Ayumi Hara, *et al.* Nationwide survey of *Salmonella* prevalence in environmental dust from layer farms in Japan [J]. J Food Protect, 2010, 73(11): 1993–2000.
- [14] 山珊, 牛瑞江, 赖卫华, 等. 免疫磁珠法富集沙门氏菌的优化及应用[J]. 食品工业科技, 2013, 34(13): 153–156.
Shang S, Niu RJ, Lai WH, *et al.* Optimization and application of immunomagnetic beads for enriching *Salmonella* spp [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(13): 153–156.
- [15] 赵静, 孙海娟, 冯叙桥. 食品中食源性致病菌污染状况及其监测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 04(5): 1354–1355.
Zhang J, Shun HJ, Feng XQ. Advances on pollution of food-borne pathogens and its detection technology in food [J]. J Food Saf Qual, 2013, 04(5): 1354–1355.
- [16] GB 4789.4-2010 食品微生物学检验沙门菌检验[Z].
GB 4789.4-2010 Food Microbiological Examination: *Salmonella* [Z].
- [17] 盛跃颖, 陈敏. 免疫磁珠分离技术在病原微生物检测中的应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, (5): 478–480.
Sheng YY, Chen M. Application of immunomagnetic beads separation techniques in microbiology [J]. Chin J Food Hyg, 2011, (5): 478–480.
- [18] 杜强, 张露杰, 徐晓怡. 全自动微生物磁珠分选系统检测单核细胞增生李斯特氏菌研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(6): 1320–1321.
Du Q, Zhang LJ, Xu XY. Study on the effect of automated magnetic separation system in detection of *Listria monocytogenes* [J]. Chin J Health Lab Technol, 2012, 22(6): 1320–1321.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



杜 强, 副主任检验技师, 主要研究方向为食品及水质微生物检验。
E-mail: bodezhilang@sina.com