

大肠杆菌 O157 快速检测板在肉与肉制品检测中的应用

肖 剑¹, 陈娟丽², 张彬彬¹, 孙 霞², 谢俊平², 宋安华^{1*}

(1. 广州市食品检验所, 广州 510410; 2. 广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司, 广州 510663)

摘 要: **目的** 研究大肠杆菌 O157 快速检测板在肉与肉制品检测中的应用。**方法** 以 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》作为参考方法, 研究大肠杆菌 O157 快速检测板在肉与肉制品检测中应用的灵敏度、特异性、假阳性率、假阴性率、准确度等指标, 同时利用卡方检验分析阳性率显著性差异。**结果** 大肠杆菌 O157 快速检测板灵敏度为 100%, 不存在假阴性, 特异性为 96.4%, 假阳性率为 3.6%, 准确度为 98%, 显著性差异卡方值卡 X^2 为 0, 均达到定性方法验证的相关指标。**结论** 大肠杆菌 O157 检测板技术具有快速准确、灵敏度高、操作简单的特点, 可以作为一种快速筛查方法广泛应用于肉与肉制品大肠杆菌 O157 的检测。

关键词: 大肠杆菌 O157; 快速检测板; 肉制品

Application of rapid petri-dish in the detection of *Escherichia coli* O157 in meat and meat products

XIAO Jian¹, CHEN Juan-Li², ZHANG Bin-Bin¹, SUN Xia², XIE Jun-Ping², SONG An-Hua^{1*}

(1. Guangzhou Institute of Food Inspection, Guangzhou 510410, China; 2. Guangdong Dayuan Oasis Food Safety Technology Co., Ltd, Guangzhou 510663, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the application value of rapid petri-dish in the detection of *Escherichia coli* O157 in meat and meat products. **Methods** The sensitivity, specificity, false positive rate, false negative rate and accuracy of *E. coli* O157 rapid petri-dish in detection of meat and meat products were investigated by using national standard GB/T 4789.36-2008 *Microbiological examination of food hygiene examination E. coli* O157:H7/NM. Meanwhile, the significant difference of positive rates was analyzed by the chi-square. **Result** The sensitivity of *E. coli* O157 petri-dish was 100%, the false negative rate was 0, the specificity was 96.4%, the false positive rate was 3.6%, the accuracy rate was 98%, and the chi-square (X^2) was 0. The results showed that all parameters conformed to the requirements of qualitative methods validation. **Conclusion** It is feasible to detect *E. coli* O157 by the rapid petri-dish as a rapid screening method for its speediness, accuracy, high sensitivity and easy operation.

KEY WORDS: *Escherichia coli* O157; rapid petri-dish; meat products

基金项目: 广州市科技创新委员会科学研究项目(201510010035)

Fund: Supported by Guangzhou Science Technology and Innovation Commission Technology Research Projects (201510010035)

*通讯作者: 宋安华, 副主任医师, 主要研究方向为食品卫生检验。E-mail: zpsah2@163.com

*Corresponding author: SONG An-Hua, Associate Chief Physician, Guangzhou Institute of Food Inspection, No.58 Tangxin West Street, Sanyuanli Road, Guangzhou 510410, China. E-mail: zpsah2@163.com

1 引 言

近年来, 食源性疾病发病率呈现不断上升的趋势, 其中最主要的原因是由致病微生物污染食品引起的。大肠杆菌、沙门氏菌等病原菌是重要的致病微生物, 其中以肉及肉制品的污染最为严重。肉及肉制品由于营养丰富, 不仅满足人类需求, 更是细菌生长的天然培养基, 极易滋生各类有害细菌^[1]。根据各地对肉与肉制品污染状况调查发现^[2-6], 生畜肉与生禽肉的致病菌平均检出率超过 10%, 熟肉制品的致病菌检出率为 4%左右, 检出致病菌包括沙门氏菌、单增李斯特菌和大肠埃希氏菌 O157 等。肉及肉制品是百姓日常生活消费的主要食品之一, 其卫生状况关系到消费者的身体健康, 因此快速检测和鉴别肉制品中的致病菌是保障肉品质量安全、防止食源性疾病爆发的有效手段。

已有研究表明, 牛、羊、猪、鸡等动物性肉及肉制品是大肠埃希氏菌 O157 的主要污染源^[7]。肠出血性大肠埃希氏菌 O157(entero-hemorrhagic *Escherichia coli* O157, EHEC O157)是一种严重威胁人类身体健康和公共安全的食源性致病菌, 为革兰氏阴性杆菌, 能产生志贺氏毒素, 感染力强, 在食入不足 10 个细菌的情况下就可能致病, 其感染人后经常导致严重的出血性腹泻和腹部绞痛, 约有 10%的患者发展为溶血性尿毒综合征及血栓性血小板减少性紫癜, 死亡率高达 30%^[8,9]。目前, 针对大肠埃希氏菌 O157 的检测方法主要有常规鉴别培养检测方法、噬菌体分型技术、胶体金免疫层析试纸条、免疫磁分离技术、单重及多重 PCR 快速检测法等^[10-13]。在对肉及肉制品的常规鉴别培养检测中, 由于样品成分复杂, 杂菌污染情况较严重, 同时检测时间需 4~5 d, 周期较长, 且敏感性和特异性不理想, 很大程度上影响了对该病原菌的及时防治。

本研究中所使用的大肠杆菌 O157 检测板是在传统鉴别培养方法的基础上, 根据酶触反应技术、液体凝胶技术及模板制备技术所研制开发的新型配方产品, 含有选择性培养基、特有酶的显色指示剂和高分子吸水凝胶, 是运用微生物检测板专有技术做成的一次性快速检验产品。使用时只需用无菌吸管吸取 1 mL 样品匀液滴加到检测板内, 迅速贴好上层膜并水平晃动检测板, 待样品匀液均匀吸附在滤纸上, 静置 10 s 左右, 即可放入培养箱培养, 培养 24 h 后观察菌落的显色结果。该产品克服了国标方法中检测周期长、灵敏度和特异性不理想的不足, 同时相比较于免疫学检测法与 PCR 检测法等快速检测法, 免去了高昂的成本, 降低了操作难度以及对检测人员的技术要求, 能更好地针对肉及肉制品进行快速检测。本研究以 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》^[14]为参考, 验证大肠杆菌 O157 检测板在肉及肉制品中应用的灵敏度、特异性及准确度等技术指标, 以便能够较快地将该方法推广应用于我国的食品安

全检测领域。

2 材料与方 法

2.1 标准菌株

试验使用的标准菌株见表 1。

表 1 试验使用的标准菌株
Table 1 Standard strains in the test

序号	名称	编号
1	大肠埃希氏菌 O157: H7	NCTC 12900
2	大肠埃希氏菌	ATCC25922
3	奇异变形杆菌	CMCC(B)49005
4	粪肠球菌	ATCC29212

2.2 样 品

生肉、熟肉、肉制品等样品, 购自广州市超市和市场。

2.3 主要培养基及试剂

大肠杆菌 O157 检测板(自制, 底板为 PVC 材质, 上有吸水凝胶和培养成分, 滤纸层和上盖膜层); 改良 EC 肉汤(mEC+n, 广东环凯生物科技有限公司); O157 弧菌显色培养基(法国科马嘉公司); 平 P 板计数琼脂(flat P plate count agar, CA, 广东环凯生物科技有限公司); VITEK2 阴性鉴定卡(法国梅里埃公司); 0.85%无菌生理盐水(自制)。

2.4 主要仪器

SP250 生化培养箱(广东环凯生物科技有限公司); VITEK2 全自动生化鉴定仪(法国梅里埃); Thermo 1379 生物安全柜(美国 Thermo 公司); 其他为微生物室常规设备。

2.5 试验方法

2.5.1 检测板性能测试

使用标准菌株测试检测板的灵敏度和特异性, 具体的测试方案见表 2, 试验 1~4 为灵敏度及特异性测试, 精确测试菌悬液的浓度为 1 个麦氏浊度(相当于 10^8 CFU/mL), 再进行 10 倍稀释至 10^0 CFU/mL, 检测浓度为 10^0 ~ 10^3 CFU/mL(同时接种平板计数琼脂); 试验 5~6 为干扰性试验, 取各菌株稀释至 10^3 CFU/mL 菌液进行等量混合, 再进行 10 倍稀释至 10^0 CFU/mL, 对以上稀释菌液混合液分别取 1 mL 接种检测板。

2.5.2 样品测试

样品测试采用人工污染的方式进行, 对不同类型样品选取部分进行污染, 使用大肠杆菌 O157 检测板进行检测, 并采用国家标准方法 GB/T 4789.36-2008^[14]进行对照检验。

检测板试验操作: 取样品 25 g 置于含有 225 mL 无菌磷酸盐缓冲液(或生理盐水)的均质杯或均质袋中, 制成

表 2 标准菌株测试方案
Table 2 Test plan of standard strains

试验类别	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4	试验 5	试验 6
标准菌株	大肠埃希氏菌 O157:H7	大肠埃希氏菌	奇异变形杆菌	粪肠球菌	大肠 O157:H7、大肠埃希氏菌、 奇异变形杆菌、粪肠球菌	大肠埃希氏菌、奇异变形 杆菌、粪肠球菌

1:10 的样品匀液, 根据样品污染程度及检验需要, 可进一步制成 10 倍递增的样品稀释液; 将大肠杆菌 O157 检测板置于平坦实验台面, 揭开上层盖膜, 用无菌吸管或移液枪吸取 1 mL 样品匀液滴加到检测板内, 迅速贴好上层盖膜并水平晃动检测板, 待样品匀液均匀吸附在吸收膜上, 静置 10 s 左右, 倒置放入培养箱内, (36±1) °C, 培养 20~24 h, 观察菌落形态, 呈紫红色的菌落为大肠杆菌 O157:H7, 呈蓝色的菌落为其他菌群。

2.6 统计分析方法

2.6.1 检测板性能测试

根据检测板上菌落的生长情况及特征, 结合平板计数琼脂菌落数量, 分析检测板灵敏度及特异性。

2.6.2 样品测试

(1) 定性方法的性能指标

表 3 统计分析表
Table 3 Statistical analysis table

	国标阳性	国标阴性	合计
检测板阳性	A	B	A+B
检测板阴性	C	D	C+D
合计	A+C	B+D	N=A+B+C+D

1) 灵敏度(p+)= A/(A+C) × 100%

2) 特异性(p-)= D/(B+D) × 100%

3) 准确度(relative accuracy)=(A+D)/N × 100%

4) 假阴性率(pf-)=(1-灵敏度) × 100%

5) 假阳性率(pf+)=(1-特异性) × 100%

(2) 方法的显著性差异检验

方法的显著性差异检验适用于实验室内确认试验, 用于判断待确认方法和参考方法阳性比例的差异显著性, 采用 McNemar's 检验(χ^2 检验)比较 2 种方法, 计算方法^[15]见下式:

$$\chi^2 = \frac{(|a-b|-1)^2}{a+b}$$

式中:

a—待确认方法证实为阳性而参考方法检验为阴性的数目;

b—待确认方法证实为阴性而参考方法检验为阳性的数目。

3 结果

3.1 检测板性能测试

3.1.1 灵敏度试验

采用大肠埃希氏菌 O157:H7(NCTC 12900)制备的菌悬液进行测试, 结果详见表 4, 6 次试验数据结果表明, 同一浓度菌液在 PCA 计数琼脂上有生长, 且数量低于 10 CFU, 检测板上均有菌落生长。因此, 以 PCA 计数琼脂为对照, 对菌液浓度进行定量, 可测出检测板能检出样品中含量低于 10 CFU/mL 的大肠杆菌 O157:H7。

表 4 菌悬液测试检测板和 PCA 平板结果
Table 4 Results of rapid plate and PCA by bacterial suspension

序号	检测板结果	PCA 平板结果(CFU)
1	检出	4
2	检出	6
3	检出	2
4	检出	2
5	检出	5
6	检出	4

3.1.2 特异性和干扰性试验

根据试验方案, 选取几种有代表性的标准菌株进行测试, 结果详见表 5。大肠埃希氏菌 O157:H7 菌落为紫红色, 且经过滤纸扩散后, 菌落色泽和大小特征明显, 大肠埃希氏菌为蓝色, 奇异变形杆菌生长受到抑制, 无菌落生长, 粪肠球菌为蓝色; 阳性干扰试验结果表明, 大肠埃希氏菌 O157:H7 能够较好地培养出来, 且数量上占据一定优势; 阴性干扰试验表明, 在无大肠埃希氏菌 O157:H7 竞争情况下, 大肠埃希氏菌或粪肠球菌也能够正常生长。

3.2 样品测试

3.2.1 样品测试结果

选取部分样品, 通过自然样品及人工污染样品的形式进行试验, 检验结果见表 6。

参照 2.6.2 统计分析方法, 对表 6 中检验数据进行整理统计, 以国标法结果为参照, 得出大肠杆菌 O157 检测板快速方法的统计结果, 详见表 7。

表 5 特异性和干扰性试验结果
Table 5 Results of specificity and anti-interference

序号	试验	结果	描述
1	大肠埃希氏菌 O157: H7		紫红色菌落
2	大肠埃希氏菌		蓝色菌落
3	奇异变形杆菌		不生长
4	粪肠球菌		蓝色菌落
5	大肠埃希氏菌 O157:H7、大肠埃希氏菌、奇异变形杆菌、粪肠球菌		紫红色菌落
6	大肠埃希氏菌、奇异变形杆菌、粪肠球菌		蓝色菌落

3.2.2 方法性能指标及显著性差异分析

通过表 7 统计结果, 按照 2.6.2 中的计算方法, 得出大肠杆菌 O157 检测板快速方法的性能指标, 详见表 8。根据方法确认性能指标要求^[15]: 灵敏度 $\geq 98\%$, 特异性 $\geq 90.4\%$, 假阴性率 $< 2\%$, 假阳性率 $< 9.6\%$, 准确度 $\geq 94\%$, 显著性差异卡方值 < 3.84 进行判定。大肠杆菌 O157 检测板灵敏度、特异性、假阳性率、准确度、显著性差异卡方值均超过了指标要求。

4 讨论与结论

肉与肉制品因含有丰富的蛋白质及其他营养成分, 而成为细菌生长繁殖的天然培养基, 在各地样品污染情况调查中亦发现致病菌检出率较高, 更是大肠埃希氏菌 O157 公认的宿主, 因此, 研究与建立一种灵敏度高、特异性强的快速检测技术已经成为当今社会中肉与肉制品安全监测发展的必然趋势。本研究中应用的大肠杆菌 O157 检测板作为一系列病原微生物快速检测技术产品之一, 是在参考国家标准方法同时对酶触反应技术进行研究的基础上, 克服现有纸片法在应用过程中遇到的一些技术难题, 专门针对肉与肉制品所研制开发出的一款灵敏度高、特异性强的新型产品。

大肠杆菌 O157 检测板在肉与肉制品中应用时, 操作简单, 灵敏度与特异性均达 90% 以上, 最低检出限亦可达到 10^0 CFU/mL, 总体性能优于国内相关纸片检测产品。同时, 与国标定性方法相比, 该技术方法未经前增菌而直接检测, 在一定程度上可反映出所检样品受大肠杆菌 O157 污染的程度。通过本研究, 亦发现部分技术性问题, 例如, 对于一些加工工艺简单粗放、产品质量控制不到位的散装肉制品, 由于细菌污染程度较高, 含杂菌较多较复杂, 大肠杆菌 O157 检测板在应用过程中受干扰程度较大, 检测

表 6 样品中大肠杆菌 O157:H7 阳性结果数量
Table 6 Positive numbers of *E. coli* O157 in samples

序号	食品类别	检测板阳性数量	国标阳性数量	样品数量	人工污染样品
1	肉及肉制品	23	22	50	25 份样品污染

表 7 统计分析表
Table 7 Statistical analysis table

项目	国标阳性	国标阴性	合计
检测板阳性	22	1	23
检测板阴性	0	27	27
合计	22	28	50

表 8 大肠杆菌 O157 检测板快速检测法与国标法比较性能指标及显著性差异结果
Table 8 Performance indexes and significant differences of rapid petri-dish method and national standard method in the detection of *E. coli* O157

检测项目	灵敏度(%)	特异性(%)	假阴性率(%)	假阳性率(%)	准确度(%)	χ^2
大肠杆菌 O157:H7	100	96.4	0	3.6	98	0

结果存在不稳定性,可能存在假阴性情况;另外,针对一些长期冷冻包装肉制品,因细菌细胞处于休眠状态或受损伤,在含量较低时,未经前增菌可能会降低阳性检出率,故建议该类产品经前增菌后再进行检测。

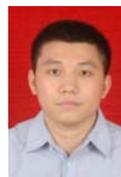
综上所述,大肠杆菌 O157 检测板技术方法具有快速、准确、灵敏度高、操作简单的特点,可以作为肉制品中大肠杆菌 O157 检测的一种快速筛查方法而被广泛运用于食品安全微生物检测领域。

参考文献

- [1] 牟钰, 吴楠. 影响肉制品安全的因素与控制措施[J]. 现代食品, 2016, (16): 22-23.
Mu Y, Wu N. Affect factors and control measures of meat safety [J]. Mod Food, 2016, (16): 22-23.
- [2] 傅景春, 钮伟民, 蒋立凤, 等. 无锡市肉与肉制品微生物污染状况调查结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(12): 1496-1502.
Fu JC, Niu WM, Jiang LF, et al. Microbial pollution condition investigation result analysis of meat and meat products in Wuxi city [J]. Chin J Health Lab Technol, 2006, 16(12): 1496-1502.
- [3] 孙晓林, 许敬东, 马军武, 等. 兰州市肉与肉制品微生物污染状况的研究[J]. 中兽医医药杂志, 2008, (3): 22-25.
Sun XL, Xu JD, Ma JW, et al. Researching the microbial contamination condition of meat and meat products in Lanzhou [J]. J Tradit Chin Vet Med, 2008, (3): 22-25.
- [4] 王爱华, 赵德东. 食品中大肠埃希菌 O157 的检验分析[J]. 中国保健营养, 2013, (4): 1007.
Wang AH, Zhao DD. The detection and analysis of *E.coli* O157 in food [J]. China Health Care Nutr, 2013, (4): 1007.
- [5] 董峰光, 宫春波, 王朝霞, 等. 2011 年烟台市市售肉及肉制品污染状况调查[J]. 职业与健康, 2013, 29(9): 1096-1098.
Dong FG, Gong CB, Wang ZX, et al. Investigation on pollution status of meat and meat products sold in Yantai city in 2011 [J]. Occup Health, 2013, 29(9): 1096-1098.
- [6] 赖则冰, 张淑红, 朱雪梅, 等. 肉类及蔬菜食品中 EHEC O157 污染分布及分型研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 290-296.
Lai ZB, Zhang SH, Zhu XM, et al. Prevalence and ERIC-PCR typing of EHEC O157 in meat and vegetables [J]. Mod Food Sci Technol, 2014, 30(9): 290-296.
- [7] 徐锋, 陈冈, 王建, 等. 动物及动物产品中大肠埃希氏菌 O157 带菌情况的调查[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2009, (1): 29-30.
Xu F, Chen G, Wang J, et al. The investigation of *E.coli* O157 carrying-situation in animals and animal products [J]. Shanghai J Anim Husb Vet Med, 2009, (1): 29-30.
- [8] 孟祥升, 辛崇兴, 邵晔. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 研究进展[J]. 中国动物检疫, 2011, 28(11): 69-72.
Meng XS, Xin CX, Shao X. Advances in the study of Enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7 [J]. Chin J Anim Health Inspect, 2011, 28(11): 69-72.
- [9] 赖卫华, 冯贻泽, 白熙安·克罗泽道森. 大肠杆菌 O157:H7 快速培养的初步研究[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 145-147.
Lai WH, Feng YZ, Beth Ann CD. Preliminary study on rapid culture of *E. coli* O157:H7 [J]. Food Sci, 2009, 30(7): 145-147.
- [10] 唐倩倩, 王剑平, 叶尊忠, 等. 免疫磁分离技术在 *E. coli* O157:H7 检测中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(10): 2614-2618.
Tang QQ, Wang JP, Ye ZZ, et al. Application of immunomagnetic separation to *E.coli* O157:H7 detection [J]. Spectrosc Spect Anal, 2009, 29(10): 2614-2618.
- [11] 孙洋, 冯书章, 郭学军, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157 胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(4): 356-359.
Sun Y, Feng SZ, Guo XJ, et al. Development of immunochromatographic strip for detection of Enterohemorrhagic *E. Coli* O157 [J]. Chin J Zoonoses, 2008, 24(4): 356-359.
- [12] 朱文冠, 薛素强, 洪洁心, 等. 多重 PCR 方法检测大肠杆菌 O157:H7 的初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(5): 428-432.
Zhu WG, Xue SQ, Hong JX, et al. Detection of *E. Coli* O157:H7 by multiplex polymerase chain reaction [J]. Chin J Zoonoses, 2006, 22(5): 428-432.
- [13] 崔希, 熊齐荣, 熊勇华, 等. 免疫磁分离结合胶体金免疫层析法快速检测大肠杆菌 O157:H7[J]. 分析化学, 2013, 41(12): 1812-1816.
Cui X, Xiong QR, Xiong YH, et al. Establishment of a method combined immunomagnetic separation with colloidal gold lateral flow assay and its application in rapid detection of *E. coli* O157:H7 [J]. Chin J Anal Chem, 2013, 41(12): 1812-1816.
- [14] 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].
GB/T 4789.36-2008 Microbiological examination of food hygiene examination *E. coli* O157:H7/NM [S].
- [15] 李宏, 雷质文. 食品微生物检测方法确认和证实手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
Li H, Lei ZW. Handbook of validation and confirmation of food microbiological methods [M]. Beijing: China Standard Publishing House, 2013.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



肖 剑, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测技术。
E-mail: xjhq521@163.com



宋安华, 副主任医师, 主要研究方向为食品卫生检验。
E-mail: zpsah2@163.com