

基于免疫磁分离的 7 种产志贺毒素大肠埃希氏菌快速检测方法的评价

赵 芳^{1,2}, 刘 莹^{1,2}, 邹岳源³, 牛 娜^{1,2}, 马淑棉^{1,2}, 涂晓波^{1,2}, 李丹丹⁴,
柯跃斌⁵, 吕敬章^{1,2*}

(1. 深圳市检验检疫科学研究院, 深圳 518045; 2. 深圳海关食品检验检疫技术中心, 深圳 518045;
3. 布里斯托大学, 布里斯托 BS8 1TD; 4. 海口海关技术中心, 海口 570311;
5. 深圳市疾病预防控制中心分子流行病学重点实验室, 深圳 518055)

摘 要: 目的 评价基于免疫磁分离(immunomagnetic separation, IMS)的 7 种产志贺毒素大肠埃希氏菌(*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC)快速检测方法的灵敏度与特异性。**方法** 将大肠埃希氏菌 O157:H7 和大肠埃希氏菌 O103 不同稀释度的菌悬液用免疫磁珠富集后, 检测其携带毒力基因 *stx1*、*stx2* 和黏附基因 *eae* 以及 O157:H7 和 O103 的抗原基因。同时, 对菌悬液进行活菌计数, 进行灵敏度研究。对 8 株携带 *stx1*、*stx2*、*eae* 基因的目标菌悬液和 25 株非目标菌的标准菌株及分离菌株的菌悬液用免疫磁珠富集后, 检测其携带毒力基因 *stx1*、*stx2* 和黏附基因 *eae* 以及抗原基因, 进行特异性研究。**结果** 本方法检测大肠埃希氏菌 O157:H7 的 *stx1*、*stx2*、*eae* 以及抗原基因的灵敏度为 10^2 CFU/mL, 检测大肠埃希氏菌 O103 抗原基因的灵敏度为 10^3 CFU/mL。8 株目标菌检测结果与其携带的基因一致, 没有假阴性, 包容性达到 100%。25 株非目标菌检测结果与其携带的基因一致, 未发现有假阳性, 排他性达到 100%。**结论** 该方法具有良好的灵敏性及特异性, 适用于食品中 7 种产志贺毒素大肠埃希氏菌的快速检测。

关键词: 免疫磁分离; 产志贺毒素大肠埃希氏菌; 快速检测

Evaluation of the rapid detection method for 7 kinds of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* based on immunomagnetic separation

ZHAO Fang^{1,2}, LIU Ying^{1,2}, ZOU Yue-Yuan³, NIU Na^{1,2}, MA Shu-Mian^{1,2}, TU Xiao-Bo^{1,2},
LI Dan-Dan⁴, KE Yue-Bin⁵, LV Jing-Zhang^{1,2*}

(1. Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, Shenzhen 518045, China; 2. Food Inspection and Quarantine Technology Center of Shenzhen Customs District, Shenzhen 518045, China; 3. University of Bristol, Bristol BS8 1TD, England; 4. Haikou Customs Technical Center, Haikou 570311, China; 5. Key Laboratory of Molecular Epidemiology, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the sensitivity and specificity of the rapid detection method for 7 kinds of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) based on immunomagnetic separation (IMS). **Methods** The

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1605402、2019YFC1605104)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1605402, 2019YFC1605104)

*通信作者: 吕敬章, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: jz_lu@yahoo.com.cn

*Corresponding author: LV Jing-Zhang, Master, Professor, Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, No.1011 Fuqiang Road, Shenzhen 518045, China. E-mail: jz_lu@yahoo.com.cn

bacterial suspensions of *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* O103 with different dilutions were enriched with immunomagnetic beads. The virulence genes *stx1*, *stx2*, adhesion gene *eae* and antigen genes of O157:H7 and O103 were detected. At the same time, the number of viable bacteria in bacterial suspension was calculated and the sensitivity was studied. The bacterial suspensions of 8 strains of target bacteria carrying *stx1*, *stx2* and *eae* genes and 25 strains of non target standard bacteria and isolated strains were enriched with immunomagnetic beads. The virulence genes *stx1*, *stx2*, adhesion genes *eae* and antigen genes were detected. Specific studies were conducted.

Results The sensitivity of this method to detect *stx1*, *stx2*, *eae* and antigen gene of *Escherichia coli* O157:H7 was 10^2 CFU/mL, and the sensitivity to detect antigen gene of *Escherichia coli* O103 was 10^3 CFU/mL. The detection results of 8 strains of target bacteria were consistent with their genes, there was no false negative, and the inclusiveness reached 100%. The detection results of 25 strains of non target bacteria were consistent with their genes, no false positive was found, and the exclusivity was 100%. **Conclusions** The method has good sensitivity and specificity, and is suitable for the rapid detection of 7 kinds of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food.

KEY WORDS: immunomagnetic separation; Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; rapid detection

0 引 言

产志贺毒素大肠埃希氏菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)是一类可产生志贺毒素的大肠埃希菌,可引起包括出血性腹泻、溶血性尿毒症、肾衰竭在内的严重疾病甚至死亡,曾在世界范围内引起多起食物中毒事件^[1-2]。依据菌体抗原及鞭毛抗原可将 STEC 分为 400 多种血清型^[3],其中大肠埃希氏菌 O157:H7 及大肠埃希氏菌 O26、O45、O103、O111、O121、O145 这 7 种血清型(下文统称为 Top 7 STEC)为主要致病类型^[4],并且由非 O157 血清型 STEC 引发的病例数有逐年上升的趋势^[5]。大量证据表明,反刍动物是 Top 7 STEC 的主要宿主^[6],Top 7 STEC 可随宿主粪便排出体外,通过加工中受污染的动物源性食品致使人类感染^[7]。研究发现,食品中低于 100 CFU 的 Top 7 STEC 就可能导致人类患病,抗生素治疗反而还有加剧病情的危险,STEC 已成为严重威胁人类健康的重要致病菌^[8-9]。美国早就开始在生牛肉及其制品中强制检验 Top 7 STEC^[10],食品法典委员会也在考虑制定 STEC 的限量标准^[7]。STEC 引发致病的主要原因是其具有产志贺毒素的基因(*stx*)及黏附基因(*eae*),这 2 种基因也成了检测 STEC 的关键因素^[11-12]。

目前检测 Top 7 STEC 的方法有很多^[13-15],这些方法的主要流程是先用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术对选择性增菌液中的 *stx* 和 *eae* 基因进行检测,阳性者用分离平板进行分离,对可疑的菌落进行生化鉴定以及 *stx*、*eae* 基因和菌体抗原基因的检测。由于 Top 7 STEC 除了能产志贺毒素外,与普通大肠埃希氏菌在生化特性上没有差异,这导致食品中大量存在的普通大肠埃希氏菌在选择性增菌过程中不能受到抑制,普通大肠埃希氏菌在选择性增菌液与 Top 7 STEC 竞争生长常常将其掩盖,严重影响了后续的分离效果^[16]。近来出现了一种新型

基于免疫磁分离的 Top 7 STEC 的快速检测方法^[17],该方法先采用包被有 Top 7 STEC 抗体的免疫磁珠,对增菌液中的 Top 7 STEC 进行富集后,再进行 *stx* 和 *eae* 基因的检测,这极大地消除了增菌液中普通大肠埃希氏菌对 Top 7 STEC 的干扰,并为 Top 7 STEC 筛选分离效率的提升打下了良好的基础。本研究首次应用大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株、非 O157 STEC 菌株以及非目标菌株对这种新型的 Top 7 STEC 快速检测方法的特异性及灵敏度进行了评价,为探索食品中 Top 7 STEC 快速、精准的筛选与分离方法提供关键技术方向,为保障食品安全、提升行业精准监测水平提供有力技术储备。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 仪 器

KB240 恒温培养箱(德国 BINDER 公司);HV-85 高压蒸汽灭菌锅(日本 HIRAYAMA 公司);3500 mL VW 拍打式均质器(法国 INTERSCIENCE 公司);M37610-33 Vortex 漩涡振荡器(美国 THERMO 公司);Assurance GDS Rotor-Gene 1017503 实时荧光 PCR 仪(美国 BIOCONTROL 公司);Densi CHEK plus 电子比浊仪(法国梅里埃公司)。

1.1.2 试 剂

Assurance GDS MPX Top seven STEC 试剂盒(编号 71015-100 050319-05)、Assurance GDS MPX ID for Top STEC 试剂盒(编号 71019-52 011419-72)(美国 BIOCONTROL 公司);petrifilm 菌落总数测试片(编号 33ADA6,美国 3M 公司);血平板(编号 2101023,北京陆桥技术股份有限公司)。

1.1.3 实验菌株

实验用的菌株名称及信息见表 1。

表 1 本实验用菌种信息
Table 1 Strains informations in this experiment

菌种名称	来源/编号	菌种名称	来源/编号
大肠埃希氏菌 O157:H7	CMCC 44828	大肠埃希氏菌	ATCC 8739
大肠埃希氏菌 O157:H7	CICC 21530	大肠埃希氏菌	ATCC 35218
大肠埃希氏菌 O103	丹麦国家血清研究院	大肠埃希氏菌	ATCC 8099
大肠埃希氏菌 O26	丹麦国家血清研究院	阴沟肠杆菌	ATCC 700323
大肠埃希氏菌 O45	丹麦国家血清研究院	阴沟肠杆菌	ATCC 13047
大肠埃希氏菌 O121	丹麦国家血清研究院	阴沟肠杆菌	ATCC 23355
大肠埃希氏菌 O145	丹麦国家血清研究院	宋内氏痢疾杆菌	ATCC 9290
大肠埃希氏菌 O111	丹麦国家血清研究院	宋内氏痢疾杆菌	ATCC 25931
双相亚利桑那菌	ATCC 29934	福氏志贺氏菌	ATCC 9199
双相亚利桑那菌	ATCC 12325	鲍氏志贺氏菌	ATCC 9207
阿巴特图巴沙门氏菌	ATCC 35640	莫金斯科罗诺杆菌	ATCC 51329
弗氏柠檬酸杆菌	ATCC 43864	鼠伤寒沙门氏菌分离株 1	鸡肉
鼠伤寒沙门氏菌分离株 2	鸡肉	鼠伤寒沙门氏菌分离株 3	淡水鱼肉
鼠伤寒沙门氏菌分离株 4	猪肉	鼠伤寒沙门氏菌分离株 5	猪饲料
大肠埃希氏菌分离株 1	水果	大肠埃希氏菌分离株 2	水果
大肠埃希氏菌分离株 3	蔬菜	大肠埃希氏菌分离株 4	鸡肉
大肠埃希氏菌分离株 5	乳制品		

1.2 实验方法

1.2.1 灵敏度实验

分别选取了携带 *stx1*、*stx2*、*eae* 基因的大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株(CMCC 44828)和大肠埃希氏菌 O103 接种于血平板, 36 °C培养过夜, 挑取单个菌落用 0.85%生理盐水配制成 0.5 MCF 的菌悬液(其浓度约为 10⁸ CFU/mL), 用 0.85%的生理盐水将该菌悬液进行梯度稀释。取大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株(CMCC 44828)不同稀释度的菌液, 按照 Assurance GDS MPX Top seven STEC 试剂盒说明书所述检测流程, 用包被特异性抗体的免疫磁珠富集后, 对其携带的 *stx* 和 *eae* 基因以及 O157:H7 的抗原基因进行检测。同时, 用 petrifilm 菌落总数测试片对大肠埃希氏菌 O157:H7 的菌液进行计数, 做 4 个平行。

取大肠埃希氏菌 O103 不同稀释度的菌液, 按照 Assurance GDS MPX ID for Top STEC 试剂盒说明书所述检测流程, 用包被特异性抗体的免疫磁珠富集后, 对其携带的抗原基因进行检测。同时, 用 petrifilm 菌落总数测试片对大肠埃希氏菌 O103 的菌液进行计数, 做 4 个平行。

1.2.2 特异性实验

(1)*stx* 和 *eae* 以及 O157:H7 的抗原基因的特异性实验

将携带 *stx1*、*stx2*、*eae* 基因的大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株(CMCC 44828)和大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株(CICC 21530)在血平板上 36 °C过夜培养, 挑取单个菌落

用生理盐水制成菌悬液, 按照 Assurance GDS MPX Top seven STEC 试剂盒说明书所述的检测流程, 用包被特异性抗体的免疫磁珠富集后, 对 *stx* 和 *eae* 基因以及 O157:H7 的抗原基因进行检测。

将表 1 中携带 *eae* 基因的大肠埃希氏菌 O26、O111、O145, 以及不携带 *stx* 和 *eae* 基因的其他菌株在血平板上 36 °C过夜培养, 挑取单个菌落用生理盐水制成菌悬液, 按照 Assurance GDS MPX Top seven STEC 试剂盒说明书所述的检测流程, 用包被特异性抗体的免疫磁珠富集后, 对 *stx* 和 *eae* 基因以及 O157:H7 的抗原基因进行检测。

(2)大肠埃希氏菌 O26、O45、O103、O111、O121、O145 抗原基因的特异性实验

将表 1 中除大肠埃希氏菌 O157:H7 (CMCC 44828)、大肠埃希氏菌 O157:H7 (CICC 21530)外所有菌株, 在血平板上 36 °C过夜培养, 挑取单个菌落用生理盐水制成菌悬液, 按照 Assurance GDS MPX ID for Top STEC 试剂盒说明书所述检测流程, 用包被特异性抗体的免疫磁珠富集后, 对其携带的抗原基因检测。

2 结果与分析

2.1 *stx* 和 *eae* 以及大肠埃希氏菌 O157:H7 抗原基因的灵敏度结果

如表 2 和图 1 所示, 大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株

(CICC 21530)菌悬液的浓度为 94、900 CFU/mL 时,可以检测出其携带 *stx1*、*stx2*、*eae* 基因以及 O157:H7 抗原基因;当该标准菌株菌悬液的浓度为 8 CFU/mL 时,未能检出其携带的上述基因。由此可见 Assurance GDS MPX Top seven STEC 检测 *stx1*、*stx2*、*eae* 以及 O157:H7 抗原基因的灵敏度为 10^2 CFU/mL。

表 2 *stx* 和 *eae* 以及 O157:H7 抗原基因的灵敏度结果
Table 2 Sensitivity results for *stx*, *eae* and O157:H7 antigenic gene

序号	菌液梯度/(CFU/mL)	计数结果/(CFU/mL)	<i>stx</i> 和 <i>eae</i> 基因检测结果			O157:H7 抗原检测结果
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	
1	10^3	900	+	+	+	+
2	10^2	94	+	+	+	+
3	10^1	8	-	-	-	-

注: +表示检出, -表示未检出, 下同。

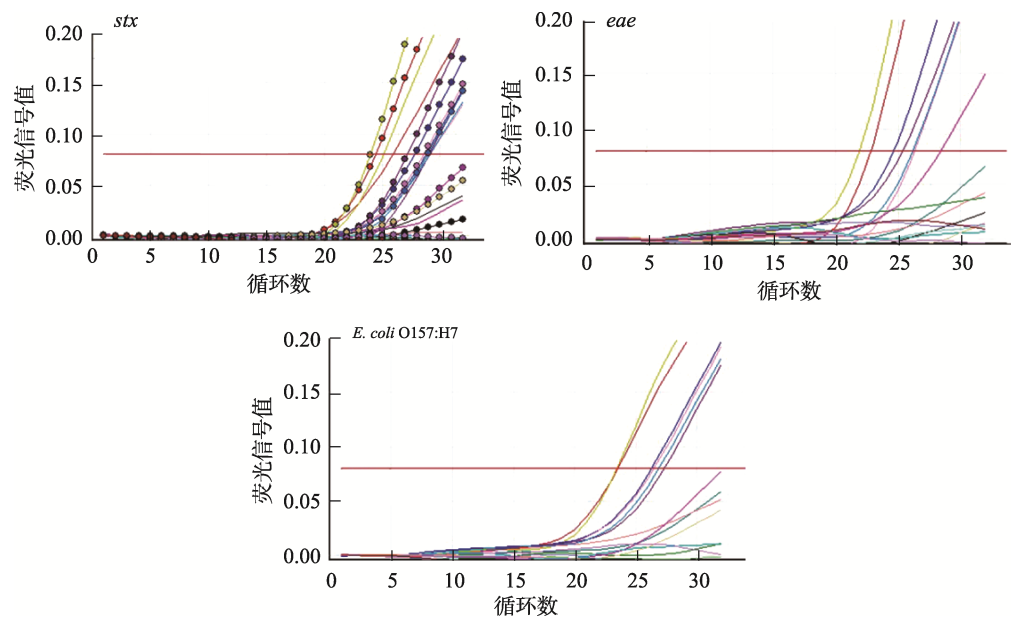


图 1 *stx* 和 *eae* 以及 O157:H7 抗原基因的扩增曲线图

Fig.1 Amplification curve diagrams for *stx*, *eae* and O157:H7 antigenic gene

2.2 大肠埃希氏菌 O103 抗原基因的灵敏度结果

如表 3 和图 2 所示, 大肠埃希氏菌 O103 菌悬液的浓度为 1000 CFU/mL 时,可以检测出大肠埃希氏菌 O103 抗原基因;当该菌株菌悬液的浓度为 11、92 CFU/mL 时,未能检出大肠埃希氏菌 O103 抗原基因。由此可见 Assurance GDS MPX ID for Top STEC 检测大肠埃希氏菌 O103 抗原基因的灵敏度为 10^3 CFU/mL。

表 3 O103 抗原基因的灵敏度结果
Table 3 Sensitivity results for O103 antigenic gene

序号	菌液浓度/(CFU/mL)	计数结果/(CFU/mL)	O103 抗原基因结果
1	10^3	1000	+
2	10^2	92	-
3	10^1	11	-

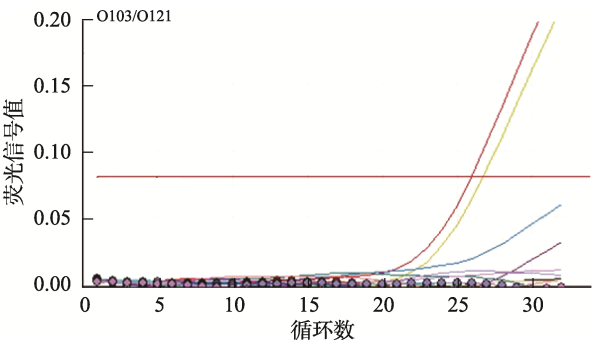


图 2 O103 抗原基因的扩增曲线图

Fig.2 Amplification curve diagrams for O103 antigenic gene

2.3 *stx* 和 *eae* 以及 Top 7 STEC 抗原基因的特异性实验结果

由表 4 和图 3 可见, 携带 *stx1*、*stx2*、*eae* 基因的大肠

埃希氏菌 O157:H7 标准菌株(CMCC 44828)和大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株(CICC 21530)均检出 *stx1*、*stx2*、*eae* 基因以及大肠埃希氏菌 O157:H7 抗原基因; 携带 *eae* 基因的大肠埃希氏菌 O26、O111、O145 均检出了 *eae* 基因; 大肠埃希氏菌 O26、O111、O145、O103、O121、O45 均检

出了相应的抗原基因。其余的 25 株非 Top 7 STEC 菌株, 均未检出 *stx1*、*stx2*、*eae* 基因以及 Top 7 STEC 抗原基因, 其扩增曲线见图 4。

33 株目标菌及非目标菌的 *stx1*、*stx2*、*eae* 基因以及 Top 7 STEC 抗原基因的检测结果显示, 未出现假阳性和假阴性。

表 4 特异性实验结果
Table 4 Specificity test results

序号	菌株	stx 和 eae 基因检测结果			抗原基因检测结果
		stx1	stx2	eae	
1	大肠埃希氏菌 O157: H7 (CMCC 44828)	+	+	+	O157:H7
2	大肠埃希氏菌 O157:H7 (CICC 21530)	+	+	+	O157:H7
3	大肠埃希氏菌 O26	-	-	+	O26
4	大肠埃希氏菌 O111	-	-	+	O111
5	大肠埃希氏菌 O145	-	-	+	O145
6	大肠埃希氏菌 O103	-	-	-	O103
7	大肠埃希氏菌 O121	-	-	-	O121
8	大肠埃希氏菌 O45	-	-	-	O45
9	大肠埃希氏菌 (ATCC 8739)	-	-	-	-
10	大肠埃希氏菌 (ATCC 35218)	-	-	-	-
11	大肠埃希氏菌 (ATCC 8099)	-	-	-	-
12	阴沟肠杆菌 (ATCC 700323)	-	-	-	-
13	阴沟肠杆菌 (ATCC 13047)	-	-	-	-
14	阴沟肠杆菌 (ATCC 23355)	-	-	-	-
15	宋内痢疾杆菌 (ATCC9290)	-	-	-	-
16	宋内氏痢疾杆菌 (ATCC 25931)	-	-	-	-
17	福氏志贺氏菌 (ATCC 9199)	-	-	-	-
18	鲍氏志贺氏菌 (ATCC 9207)	-	-	-	-
19	弗氏柠檬酸杆菌 (ATCC 43864)	-	-	-	-
20	双相亚利桑那菌 (ATCC 29934)	-	-	-	-
21	双相亚利桑那菌 (ATCC 12325)	-	-	-	-
22	阿巴特图巴沙门氏菌 (ATCC 35640)	-	-	-	-
23	莫金斯科罗诺杆菌 (ATCC 51329)	-	-	-	-
24	鼠伤寒沙门氏菌分离株 1	-	-	-	-
25	鼠伤寒沙门氏菌分离株 2	-	-	-	-
26	鼠伤寒沙门氏菌分离株 3	-	-	-	-
27	鼠伤寒沙门氏菌分离株 4	-	-	-	-
28	鼠伤寒沙门氏菌分离株 5	-	-	-	-
29	大肠埃希氏菌分离株 1	-	-	-	-
30	大肠埃希氏菌分离株 2	-	-	-	-
31	大肠埃希氏菌分离株 3	-	-	-	-
32	大肠埃希氏菌分离株 4	-	-	-	-
33	大肠埃希氏菌分离株 5	-	-	-	-

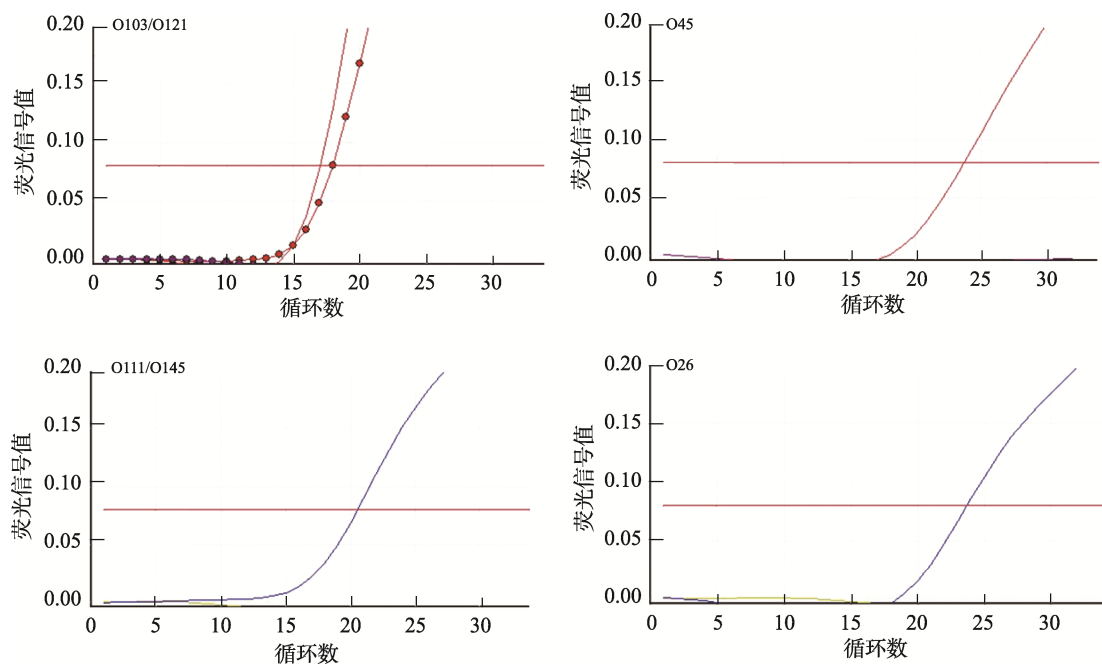


图 3 大肠埃希氏菌 O26、O45、O103、O111、O121、O145 抗原基因扩增曲线图
Fig.3 Amplification curve diagrams for O26、O45、O103、O111、O121、O145 antigenic gene

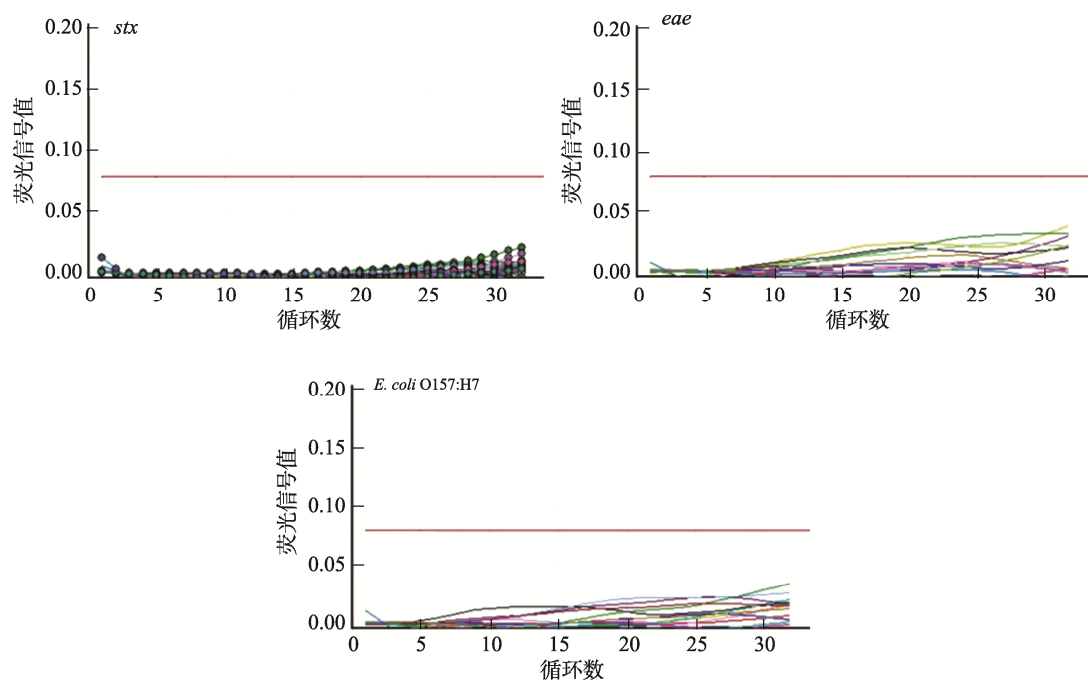


图 4 25 株非 Top 7 STEC 菌株基因扩增曲线图
Fig.4 Amplification curve diagrams for 25 strains of non Top 7 STEC strains gene

3 讨 论

由于 STEC 血清型众多, 且自然界中存在大量与之生化特性相似的背景菌, 对其的针对性筛选分离一直是各类检测方法中有待攻克的重点难题。此外, 由于牛肉等食品

中不动杆菌、嗜水气单胞菌、柠檬酸杆菌也可能携带 *stx* 基因, 一些普通大肠埃希氏菌也会携带 *eae* 基因^[18–20], 在增菌液中大量存在 *stx* 和 *eae* 基因分布于不同菌株上, 这给后续的分​​离鉴定带来了极大的干扰^[21]。免疫磁珠分离技术是采用特异性抗体包被磁珠与样品或增菌液混合, 捕获其

中的目标菌体后在磁场作用下分离磁珠,从而达到浓缩纯化的效果,可大大提高分离效率和灵敏度^[22]。新型基于免疫磁珠分离的 Top 7 STEC 快速检测方法在采用多重实时荧光定量 PCR 技术对 *stx* 和 *eae* 基因初筛前,设计添加了免疫磁珠分离的富集步骤,力求在消除增菌液中背景菌干扰的基础上进一步提高方法的特异性和灵敏度。

由于 STEC 抗体常常存在交叉反应,本研究用 2 株大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株、6 株非 O157 的 STEC 菌株,进行了 *stx* 和 *eae* 基因以及抗原基因的检测,结果与这 8 株菌本身携带的基因一致,没有假阴性,包容性达到 100%。此外,采用了 25 株非 Top 7 STEC 的标准菌株及分离菌株,进行了 *stx* 和 *eae* 基因以及抗原基因的检测,未发现有假阳性,排他性达到 100%。实验结果表明,包被有 Top 7 STEC 抗体的免疫磁珠具有较好的特异性。

灵敏度是评价检测方法的另一个重要指标,据报道,增菌液中目标菌的浓度达到 10^4 CFU/mL 时,进行 PCR 检测和选择性分离才有较好的效果^[23-25],本研究对不同浓度大肠埃希氏菌 O157:H7 和大肠埃希氏菌 O103 标准菌株的菌悬液进行检测。结果发现,检测 *stx* 和 *eae* 以及 O157:H7 抗原基因的灵敏度为 10^2 CFU/mL,检测大肠埃希氏菌 O103 抗原基因的灵敏度为 10^3 CFU/mL,较先前报道的夹心酶联免疫吸附分析(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)方法(5×10^5 CFU/mL)^[26]、重组酶聚合扩增微流控芯片技术(9.5×10^3 CFU/mL)^[27]以及多重实时荧光 PCR 方法(2×10^4 CFU/mL)^[28]的灵敏度都高。

受污染的食品样本中往往同时存在多种微生物,因此如何快速、精准地实现对目标微生物分离筛选,减少背景影响,成为了发展食源性致病微生物鉴定技术的关键。新型 Top 7 STEC 快速检测方法兼具了免疫磁珠富集分离技术的高效、特异以及多重实时荧光 PCR 技术快速、灵敏的特点,在大幅缩短检测时长的同时有效避免了漏检,特别适用于食品检测实验室对 Top 7 STEC 的流行病学的精准监测及分析。该方法不仅为我国现行的食品中检测 STEC 的标准方法提供了技术发展方向,也为及时监督国内外食品卫生状况、保障人民生命健康安全提供了有效技术储备。

4 结 论

新型基于免疫磁珠分离的 Top 7 STEC 快速检测方法,不需要手动提取步骤,只需要使用磁珠和洗液进行预处理后,加入到反应管中即可上机检测,操作简单又减少了不必要的人为误差;采用的磁珠可精确地捕捉需要的抗原类型,避免了其他物质对荧光定量检测造成的干扰,减小了背景杂菌对筛选的影响,并且适用于不同基质及增菌液培养基中的筛选,最大程度避免了假阳性和假阴性。该方法检测 *stx* 和 *eae* 以及 Top 7 STEC 抗原基因的灵敏度可达

10^3 CFU/mL,具有操作简便、灵敏度高及特异性良好的特点,适用于食品中 Top 7 STEC 的快速检测。

参考文献

- [1] MAJOWICZ SE, SCALLAN E, JONES-BITTON A, et al. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: A systematic review and knowledge synthesis [J]. Foodborne Pathog Dis, 2014, 11(6): 447-455.
- [2] KIRK MD, PIRES SM, BLACK RE, et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis [J]. PLoS Med, 2015, 12(12): e1001921.
- [3] MORA A, HERRERA A, LOPEZ C, et al. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain [J]. Inter Microbiol, 2011, 14(3): 121-141.
- [4] NOLL LW, SHRIDHAR PB, DEWSBURY DM, et al. A comparison of culture- and PCR-based methods to detect six major non-O157 serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle feces [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135446.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention. National Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) surveillance [EB/OL]. [2017-10-23]. <https://www.cdc.gov/national-surveillance/ecoli-surveillance.html> [2021-06-17].
- [6] MIR RA, SCHAUT RG, ALLEN HK, et al. Cattle intestinal microbiota shifts following *Escherichia coli* O157:H7 vaccination and colonization [J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0226099.
- [7] MAJOWICZ S, PIRES SM, DEVLEESSCHAUWER B. Attributing illness caused by Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) to specific foods [Z].
- [8] MIR RA, KUDVA IT. Antibiotic-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview of prevalence and intervention strategies [J]. Zoonos Pub Health, 2019, 66(1): 1-13.
- [9] YANG G, ZHANG S, HUANG Y, et al. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods sold at retail markets in China [J]. J Food Prot, 2020, 83(3): 460-466.
- [10] FSIS/USDA. Fsis verification testing for non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC) in imported product under the MT51 sampling program [EB/OL]. [2012-08-18]. <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISNotices/30-12.pdf> [2021-06-17].
- [11] BEZANSON G, MADER D, FILLMORE S, et al. Reaction of surrogate *Escherichia coli* serotype O157:H7 and Non-O157 strains to nutrient starvation: Variation in phenotype and transcription of stress response genes and behavior on lettuce plants in the field [J]. J Food Prot, 2019, 82(11): 1988-2000.
- [12] VAN HOEK AHAM, VAN VELDHUIZEN JNJ, FRIESEMA I, et al. Comparative genomics reveals a lack of evidence for pigeons as a main source of *stx2*-carrying *Escherichia coli* causing disease in humans and the common existence of hybrid Shiga toxin-producing and enteropathogenic *E. coli* pathotypes [J]. BMC Genom, 2019, 20(1): 271.
- [13] 杨斌, 邹杰, 羊扬, 等. 产志贺毒素大肠杆菌检测技术研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(2): 209-213.
- [13] YANG B, ZOU J, YANG Y, et al. Research progress on detection

- technology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. Chin J Prev Vet Med, 2019, 41(2): 209–213.
- [14] 宋路, 曾晓燕, 史凤娟, 等. 产志贺毒素大肠杆菌志贺毒素 1 型双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(8): 18–21.
SONG L, ZENG XY, SHI FJ, *et al.* Establishment of double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of shiga toxin type I in shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. Anim Husb Vet Med, 2016, 48(8): 18–21.
- [15] EKIRI AB, LANDBLOM D, DOETKOTT D, *et al.* Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O113, O121, O145, and O157 shed from range and feedlot cattle from postweaning to slaughter [J]. J Food Prot, 2014, 77(7): 1052–1061
- [16] KANG S, RAVENSDALE JT, COOREY R, *et al.* Changes in STEC and bacterial communities during enrichment of manufacturing beef in selective and non-selective media [J]. Food Microbiol, 2021, 96: 103711.
- [17] FELDSINE P, LIENAU AH, SHAH K, *et al.* Comparison of assurance GDS MPX ID for top STEC with reference culture methods for the detection of *E. coli* Top 6 STEC; direct confirmation of Top 6 STEC from isolation plates and determination of equivalence of pickpen and FSIS OctoMACS concentration protocols [J]. J AOAC Int, 2016, 99(2): 428–443.
- [18] MCCARDELL BA, MADDEN JM, KOTHARY MH, *et al.* Purification and characterization of a CHO cell-elongating toxin produced by *Aeromonas hydrophila*-science direct [J]. Microbial Pathogenesis, 1995, 19(1): 1–9.
- [19] GROTIUZ G, SIROK A, GADEA P, *et al.* Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(10): 3838–3841.
- [20] THOMAS SG, GLOVVER MA, PARTHASARATHY A, *et al.* Expression of a Shiga-Like toxin during plastic colonization by two multidrug-resistant bacteria, *Aeromonas hydrophila* RIT668 and *Citrobacter freundii* RIT669, isolated from endangered turtles (*Clemmys guttata*) [J]. Microorganisms, 2020, 8(8): 1172.
- [21] HAMNER S, FENSTER SD, NANCE BT, *et al.* Unexpected prevalence of *eae*-positive *Escherichia coli* in the Animas river, Durango, Colorado [J]. Int J Environ Res Publ Health, 2019, 17(1): 195.
- [22] 白向宁, 孟琼, 赵爱兰, 等. 非 O157 产志贺毒素大肠杆菌分离培养方法研究进展[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(8): 764–766.
BAI XN, MENG Q, ZHAO AIL, *et al.* Research progress on isolation and culture methods of non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* [J]. Chin J Prev Med, 2013, 47(8): 764–766.
- [23] SATA S, OSAWA R, ASAI Y, *et al.* Growth of starved *Escherichia coli* O157 cells in selective and non-selective media [J]. Microbiol Immunol, 1999, 43(3): 217–227.
- [24] BURNS F, FLECK L, ANDALORO B, *et al.* DuPont qualicon BAX system real-time PCR Assay for *Escherichia coli* O157:H7 [J]. J AOAC Int, 2011, 11(4): 1117–1124.
- [25] KRAFT AL, LACHER DW, SHELVER WL, *et al.* Comparison of immunomagnetic separation beads for detection of six non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in different matrices [J]. Lett Appl Microbiol, 2017, 65(3): 213–219.
- [26] HEGDE NV, COTE R, JAYARAO BM, *et al.* Detection of the top six non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O groups by ELISA [J]. Foodborne Pathog Dis, 2012, 9(11): 1044–1048.
- [27] 范一灵, 王淑娟, 李琼琼, 等. 重组酶聚合酶扩增检测产志贺毒素大肠埃希菌的微流控芯片技术[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 297–304.
FAN YL, WANG SJ, LI QQ, *et al.* Rapid detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by recombinase polymerase amplification combined with centrifugal compact disc microfluidic chip [J]. Food Sci, 2021, 42(10): 297–304.
- [28] LI B, LIU H, WANG W, *et al.* Multiplex real-time PCR assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and screening for non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* [J]. BMC Microbiol, 2017, 17(1): 215.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



赵 芳, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 5021665571@163.com



吕敬章, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: jz_lu@yahoo.com.cn