

等温多自配引发扩增技术快速检测学校餐饮中三种食源性致病菌

焦强，陈万胜，周楠，张庆发，刘智勇

Rapid Detection of Three Foodborne Pathogenic Bacteria in School Catering by Isothermal Multiple Self-matching-initiated Amplification Technique

JIAO Qiang, CHEN Wansheng, ZHOU Nan, ZHANG Qingfa, and LIU Zhiyong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022110196>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光SPIA方法的建立

Establishment of real time fluorescence single primer isothermal amplification for *Listeria monocytogenes*

食品工业科技. 2017(16): 275-279 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.16.052>

IMSA技术快速检测肠出血大肠杆菌O157:H7方法的建立及应用

Development and Application of IMSA for Rapid Detection of Enterohaemorrhage *Escherichia coli* O157:H7

食品工业科技. 2021, 42(17): 263-269 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020100219>

食品中单核细胞增生李斯特氏菌两种定量检测方法的比较

Comparison of two methods for detection of *Listeria monocytogenes* in foods

食品工业科技. 2018, 39(7): 263-267 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.07.047>

即食食品中单增李斯特氏菌快速检测技术的研究进展

Research Progress of Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat Food

食品工业科技. 2020, 41(10): 358-362 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.10.060>

等温扩增技术在食源性致病菌检测中的研究进展

Research Progress of Isothermal Amplification in the Detection of Pathogenic Bacteria in Food

食品工业科技. 2019, 40(7): 362-367 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.07.063>

冷等离子体技术对黄瓜表面大肠杆菌O157 : H7生物膜的清除作用研究

Antimicrobial activity of cold nitrogen plasma against *Escherichia coli* O157 : H7 biofilms on cucumber

食品工业科技. 2017(02): 162-165 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.02.022>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

焦强, 陈万胜, 周楠, 等. 等温多自配引发扩增技术快速检测学校餐饮中三种食源性致病菌 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(18): 371–377. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110196

JIAO Qiang, CHEN Wansheng, ZHOU Nan, et al. Rapid Detection of Three Foodborne Pathogenic Bacteria in School Catering by Isothermal Multiple Self-matching-initiated Amplification Technique[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(18): 371–377. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110196

· 分析检测 ·

等温多自配引发扩增技术快速检测学校 餐饮中三种食源性致病菌

焦 强¹, 陈万胜¹, 周 楠¹, 张庆发², 刘智勇^{1,*}

(1. 河南省食品检验研究院, 国家市场监管重点实验室(食品安全快速检测与智慧监管技术),

河南郑州 450000;

2. 广州迪澳生物科技有限公司, 广东广州 510507)

摘要: 目的: 本文研究了一种适合学校餐饮中快速鉴别三种食源性致病菌的检测方法。方法: 基于等温多自配引发扩增技术 (isothermal multiple self-matching-initiated amplification, IMSA), 选择沙门氏菌的 *invA* 基因、大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 的 *rfbE* 基因和单核细胞增生李斯特氏菌的 *prfA* 基因设计特异性引物, 检测菌液灵敏度、特异性、最短增菌时间、最低含菌量检出限等指标; 以食品安全国家标准食品微生物学检验 (GB/T 4789.4-2016、GB/T 4789.30-2016、GB/T 4789.36-2016) 为参考方法, 比较两种方法的一致性。结果: 该方法对沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 和单核细胞增生李斯特氏菌的菌液灵敏度分别为 2.14×10^3 、 2.79×10^3 和 3.62×10^3 CFU/mL; 特异性高达 100%; 人工污染最短的增菌时间为 6、8 和 8 h; 最低含菌量检出限分别为 2.14、2.79 和 3.62 CFU/25 g; 74 例食品样本的 IMSA 法结果与国标法一致性达 100%。结论: IMSA 技术检测食源性致病菌的灵敏度高、特异性强、结果准确, 可在短时间内完成食品中三种致病菌的检测, 适合于学校餐饮中致病菌的快速鉴别。

关键词: 沙门氏菌, 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM, 单核细胞增生李斯特氏菌, 等温多自配引发扩增技术

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)18-0371-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110196

本文网刊:



Rapid Detection of Three Foodborne Pathogenic Bacteria in School Catering by Isothermal Multiple Self-matching-initiated Amplification Technique

JIAO Qiang¹, CHEN Wansheng¹, ZHOU Nan¹, ZHANG Qingfa², LIU Zhiyong^{1,*}

(1. Henan Province Food Inspection Research Institute, Key Laboratory of Food Safety Quick Testing and Smart Supervision Technology for State Regulation, Zhengzhou 450000, China;
2. Guangzhou DI'AO Bio-technology Co., Ltd., Guangzhou 510507, China)

Abstract: Objective: In this paper, a detection method suitable for rapid identification of three pathogenic bacteria from food in the school catering was studied. Method: Based on isothermal multiple self-matching-initiated amplification technology (IMSA), strain-specific primers were designed for *Salmonella invA* gene, *Escherichia coli* O157:H7/NM *rfbE* gene and *Listeria monocytogenes prfA* gene to test the sensitivity, specificity, shortest enrichment time, and minimum detection limit of bacterial content. Food microbiology inspection according to National Food Safety Standards (GB/T 4789.4-2016, GB/T 4789.30-2016, GB/T 4789.36-2016) were the reference methods, and compared the consistency of the two methods. Result: The results showed that the sensitivity of our method to *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7/NM and *Listeria monocytogenes* were 2.14×10^3 , 2.79×10^3 and 3.62×10^3 CFU/mL respectively, the specificity was 100%, the

收稿日期: 2022-11-17

基金项目: 2021 年度市场监管总局科技计划项目 (2021MK065)。

作者简介: 焦强 (1980-), 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 快速检验检测方法, E-mail: jimmyjiaoq@163.com。

* 通信作者: 刘智勇 (1971-), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 食品安全风险评估与控制, E-mail: liuzhiyong9@126.com。

shortest enrichment time of artificial contamination were 6, 8 and 8 hours respectively. The detection limits of the lowest bacteria content were 2.14, 2.79 and 3.62 CFU/25 g respectively, and the consistency of the results of 74 food samples using IMSA method and the reference method was 100%. Conclusion: IMSA technology of pathogenic bacteria detection in food had the advantage of having high sensitivity, strong specificity and accurate results, which could complete the detection of three pathogenic bacteria in food in a short time and was suitable for the rapid identification of pathogenic bacteria in school catering.

Key words: *Salmonella; Escherichia coli O157:H7/NM; Listeria monocytogenes; isothermal multiple self-matching-initiated amplification*

感染食源性致病微生物导致食物中毒是目前食品安全的主要问题^[1-2], 食源性致病菌能利用肉制品、乳制品、蛋制品等媒介进行人体的消化系统, 通过释放致病因子引起机体中毒^[3]。据世界卫生组织统计, 全世界每年有约 10% 的人因食源性致病微生物而引起中毒, 其中主要的致病微生物为沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 和单核细胞增生李斯特氏菌^[4]。我国的食源性疾病情况也较为严重, 在食源性中毒事件中有 70%~80% 是由沙门氏菌污染引起的^[5], 而学校食堂的食源性疾病也屡见不鲜, 其直接影响了全校师生的身体健康^[6]。目前大部分学校对食品检验缺乏配套的快检实验室, 只有少数学校配备快检实验室, 但也只是对消耗量大、操作较容易、成本较低廉的蔬菜农药残留项目进行检测, 对使用量较大的生鲜肉类、植物油及微生物等, 由于操作较复杂、耗时长、设备试剂较昂贵等原因, 基本不进行检测^[7]。一旦有学生发生呕吐、腹泻或其他疑似食物中毒的病症, 难以及时发现问题。因此, 急需建立一种快速、灵敏、高效、准确地鉴别学校餐饮中食源性致病菌的方法。

等温多自配引发扩增技术(IMS A)是一种新型的分子生物学技术, 该技术的特点是针对靶基因序列设计了 6 条特异性引物:一对茎引物和两对杂交嵌套引物, 能识别靶基因上 7 个位点, 在等温(60~65 ℃)条件下进行核酸扩增, 可产生多倍数的能自我配对继而引发循环扩增的特殊核苷酸结构^[8-9]。乐振窃等^[10]使用 IMSA 技术检测转基因豆奶中外源基因成分, 其灵敏度和特异性优于 FQ-PCR 法, 但引物设计复杂、产物结核复杂, 难以进行后续的回收克隆鉴定。Liu 等^[11]利用 IMSA 技术建立检测产肠毒素大肠杆菌Ⅱ型不耐热肠毒素(LT-Ⅱ)的体系, 可快速检测 LT-Ⅱ, 与 LAMP 和 CPA 法相比, 具有检测范围更广、检测限更低、耗时更短和特异性更好等优点, 但扩增结果需要通过观察副产物焦磷酸镁白色沉淀进行结果判定, 易受主观因素影响。王琪等^[12]使用 IMSA 技术建立检测食品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的方法, 可在 11~12 h 内得到准确的检测结果, 但检测的目标致病菌只有一种, 无法进行多种食源性致病菌的分析, 应用范围有限。

本研究在扩增体系中加入一种荧光染料 SYTO-9, 可以实现设备自动判读结果, 实时监控靶基因的扩

增情况, 避免主观因素影响。选择沙门氏菌的 *invA* 基因、大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 的 *rfbE* 基因和单核细胞增生李斯特氏菌的 *prfA* 基因设计特异性引物, 建立食源性致病菌的 IMSA 检测方法, 并将该方法应用到食品样本的检测中, 为学校餐饮快速检测食源性致病菌提供有力的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鼠伤寒肠道沙门氏菌等 15 株菌种 ATCC 菌种保藏管理中心(表 1); 凉拌牛肉等 74 例食品样本

河南省中小学等学校食堂及周边餐饮店; 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒 广州迪澳生物科技有限公司; 荧光染料 SYTO-9、*Bst* 聚合酶、buffer 纽英伦生物技术(北京)有限公司; 缓冲蛋白胨水、改良 EC 肉汤、李氏增菌肉汤 LB 等培养基 北京陆桥技术股份有限公司。

表 1 菌株信息
Table 1 Strains information

序号	菌株中文名称	菌种拉丁文名称	菌株编号
1	鼠伤寒肠道沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC14028
2	大肠埃希氏菌 O157:H7/NM	<i>Escherichia coli</i> O157:H7/NM ATCC43888	
3	单核细胞增生李氏特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19111
4	阪崎肠杆菌	<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC29544
5	产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC13048
6	枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633
7	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853
8	荧光假单胞菌	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC13525
9	乙型溶血性链球菌	<i>Hemolytic streptococcus</i>	ATCC21059
10	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538
11	小肠结肠炎耶尔森氏菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC23715
12	空肠弯曲菌	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC33291
13	霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i>	ATCC14035
14	创伤弧菌	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC27562
15	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC17802

Deaou-308C 恒温扩增荧光检测仪 广州迪澳生物科技有限公司; HT-400B 电热恒温培养箱 江苏新春兰科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 公布的沙门氏菌 *invA* 基因(登录号: EU348365.1)、大肠埃希氏菌 O157:H7/NM *rfbE* 基因(登录号: S83460.1)、单核细胞增生李氏特氏菌 *prfA* 基因(登录号: LC00

6211.1)中的保守序列, 利用 Primer Explorer V4 在线软件设计之后手动修饰成 IMSA 引物(表 2), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequence

靶基因	引物	引物序列(5'-3')	长度(bp)
<i>iuvA</i>	DSF- <i>invA</i>	CCGGCAATAGCGTCACCT TGAAGCGTACTGGAAAGGG	37
	FIT- <i>invA</i>	CATTATTATCTTGTAACCT AAGCCAGTTACCGGTC	39
	steF- <i>invA</i>	TTGGCGGTATTCGGTGGG TTGGCGGTATTCGGTGGG	19
	steR- <i>invA</i>	CCGGCAATAGCGTCACCT AAGTTCACAAAGATAATAATGTA	19
	RIT- <i>invA</i>	TAAGTAGACAGGGCGGAG AAGTTCACAAAGATAATAATGTA	41
	DSR- <i>invA</i>	TTGGCGGTATTCGGTGGG CACCAATGGTCAGCATG	38
<i>rfbE</i>	DSF- <i>rfbE</i>	TCAGCTTGTCTAACGGGCTA GGATTAGCTGTACATAGGCAT	44
	FIT- <i>rfbE</i>	CACGAAAACGTGAAATTGCTGT TGGCATGACGTTATAGGC	40
	steF- <i>rfbE</i>	AACAGTCTTGTACAAGTCCACA TCAGCTTGTCTAACGGGCTA	22
	steR- <i>rfbE</i>	CAGCAAATTTCACGTTTCGTC TGCCTCCTAGTTAGAAT	22
	RIT- <i>rfbE</i>	AACAGTCTTGTACAAGTCCAC AGAGTACATTGGCATCGTGT	41
	DSR- <i>rfbE</i>	TGATGGTCCCCTCTCGCTA TGAACGCTCAAGCAGAAC	38
<i>prfA</i>	DSF- <i>prfA</i>	CTACAAAGGGGCTTCGTTATC CAATGGGATCCACAAGAAT	41
	FIT- <i>prfA</i>	TGATACAGAAACATCGGTTGGC ATAACGAAAGCCCCTTGTAG	22
	steF- <i>prfA</i>	TGATGGTCCCCTCTCGCTA ATAACGAAAGCCCCTTGTAG	20
	steR- <i>prfA</i>	TGATACAGAAACATCGGTTGGC TGATACAGAAACATCGGTTGGC	41
	RIT- <i>prfA</i>	GCTAGACTGTATGAAACTTGT GCTAGACTGTATGAAACTTGT	44

1.2.2 样本预增菌处理 在无菌条件下, 称取 25 g(mL) 食品样本, 置于盛有 225 mL 培养基的无菌均质袋中, 以 1000 r/min 均质 2~3 min, 转至 500 mL 锥形瓶内, 于 30±1 °C 或 36±1 °C 内培养。

1.2.3 增菌液 DNA 提取 取待用的增菌液, 10000×g 离心 2 min 后弃上清液, 沉淀中加入 100 μL 细菌 DNA 提取液, 涡旋混匀后, 100 °C 处理 10~15 min, 10000×g 离心 2 min, 吸取上清液至新的 EP 管内, 即为 DNA 模板。

1.2.4 IMSA 扩增反应 配制反应体系: 10×Thermo-Pol 缓冲液 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 4 μL, 5 mol/L 甜菜碱 5 μL, 150 mol/L 硫酸镁 1 μL, 8U Bst 聚合酶 1 μL, 10 μmol/L DsF/DsR 0.5 μL, 20 μmol/L SteF/SteR 1 μL, 40 μmol/L FIT/RIT 1 μL, DNA 模板 2 μL, 补超纯水至 25 μL。将配制好的反应体系混合后, 放入恒温扩增荧光检测仪 Deaou-308C 中, 反应条件为 63 °C 45 min。

1.2.5 菌液灵敏度实验 将培养后的菌液 10 倍梯度稀释至 10⁻⁹, 选择 3 个适宜稀释度菌液, 取 100 μL 进行平板计数, 每组设置 2 个重复。同时各稀释度菌液取 1 mL 进行 DNA 提取, 并进行菌液灵敏度

IMSA 检测, 用灭菌的去离子水作为阴性对照。根据检测结果分析三种食源性致病菌 IMSA 方法的灵敏度。

1.2.6 特异性实验 复壮 15 株菌种, 各取 1 mL 培养液进行 DNA 提取, 并进行特异性 IMSA 检测, 用灭菌的去离子水作为阴性对照。根据检测结果分析三种食源性致病菌 IMSA 方法的特异性。

1.2.7 样本的最短增菌时间和最低含菌量检出限确定实验 在无菌条件下, 将经培养法和 IMSA 检测过沙门氏菌为阴性的凉拌牛肉, 分别称取 25 g 加入 225 mL 的缓冲蛋白胨水、改良 EC 肉汤以及李氏增菌肉汤 LB 中, 然后将经平板计数确定浓度为 2.14×10³ CFU/mL 的鼠伤寒肠道沙门氏菌、2.79×10³ CFU/mL 的大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 和 3.62×10³ CFU/mL 的单核细胞增生李斯特氏菌的纯菌液 10 倍梯度稀释后, 各取 1 mL 加入到对应的培养基中。鼠伤寒肠道沙门氏菌于 36±1 °C 培养 4、6、8 h, 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 于 36±1 °C 培养 6、8、10 h, 单核细胞增生李斯特氏菌于 30±1 °C 培养 6、8、10 h。各时间点取 1 mL 增菌液进行 DNA 提取, 并进行 IMSA 检测, 用灭菌的去离子水作为阴性对照。根据检测结果分析三种食源性致病菌 IMSA 方法的最短增菌时间和最低含菌量检出限。

1.2.8 食品样本检测实验 在无菌条件下, 将 74 份食品样本分别称取 25 g(mL) 加入 225 mL 的缓冲蛋白胨水、改良 EC 肉汤以及李氏增菌肉汤 LB 中, 缓冲蛋白胨水的样本于 36±1 °C 培养 6 h, 改良 EC 肉汤的样本于 36±1 °C 培养 8 h, 李氏增菌肉汤 LB 的样本于 30±1 °C 培养 8 h。培养结束后各取 1 mL 培养液提取 DNA, 进行 IMSA 检测; 同时, 按照国标培养法 GB 4789.4-2016、GB4789.30-2016 和 GB4789.36-2016 分别对 74 例样本进行沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌以及大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检测。根据检测结果分析比较三种食源性致病菌 IMSA 方法与国标培养法的一致性。

1.3 数据处理

食品样本 IMSA 检测和国标培养法实验各重复 2 次, 得到的检测结果按表 3 定性方法的性能指标进行统计分析。

表 3 统计分析方法
Table 3 Statistical analysis method

项目	国标培养法阳性	国标培养法阴性	合计
IMSA 法阳性	A	B	A+B
IMSA 法阴性	C	D	C+D
合计	A+C	B+D	N=A+B+C+D

注: 一致性=(A+D)/N。

2 结果与分析

2.1 菌液灵敏度实验

经过平板计数确定, 鼠伤寒肠道沙门氏菌的纯

培养液浓度为 2.14×10^9 CFU/mL, 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 的纯培养液浓度为 2.79×10^9 CFU/mL, 单核细胞增生李斯特氏菌的纯培养液浓度为 3.62×10^9 CFU/mL。经过 10 倍梯度稀释后, 对各浓度稀释液进行 IMSA 检测, 结果如图 1 所示。建立的沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7/NM、单核细胞增生李斯特氏菌 IMSA 检测方法的纯菌液灵敏度分别为 2.14×10^3 、 2.79×10^3 、 3.62×10^3 CFU/mL。

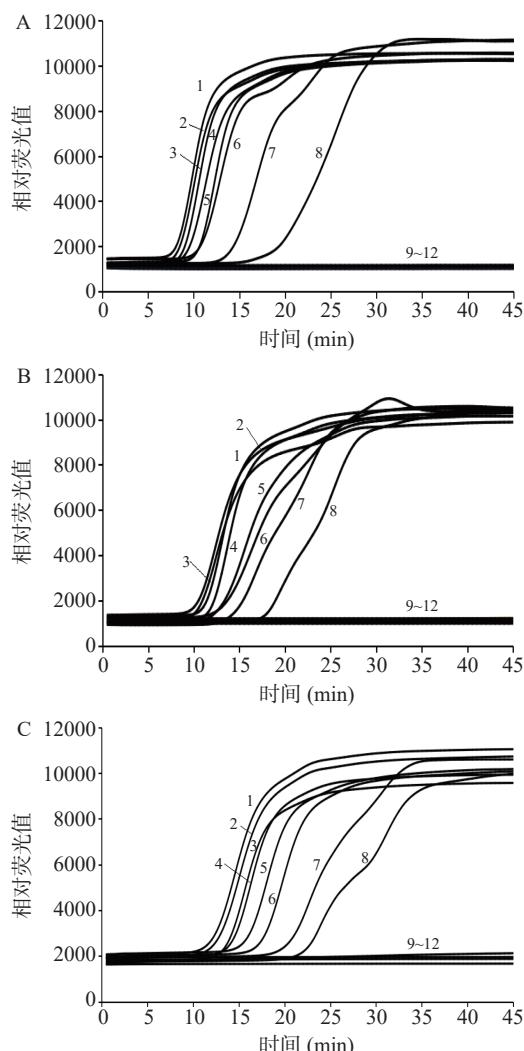


图 1 3 种菌液灵敏度

Fig.1 Sensitivity of three bacterial solutions

注: A: IMSA 检测沙门氏菌, B: 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM, C: 单核细胞增生李斯特氏菌; 1~12 依次为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 、 10^{-1} CFU/mL 和阴性对照。

2.2 特异性实验

对 15 株菌种的纯培养液进行 IMSA 检测, 结果如图 2 所示。建立的沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7/NM、单核细胞增生李斯特氏菌 IMSA 检测方法均只对本身所属的菌株存在特异性的扩增曲线, 其他菌株均无扩增曲线, 特异性达到 100%。

2.3 样本的最短增菌时间和最低含菌量检出限确定实验

建立的 IMSA 方法检测沙门氏菌结果如图 3 所示, 增菌时间不少于 6 h 时, 人工污染浓度为 $2.14 \times$

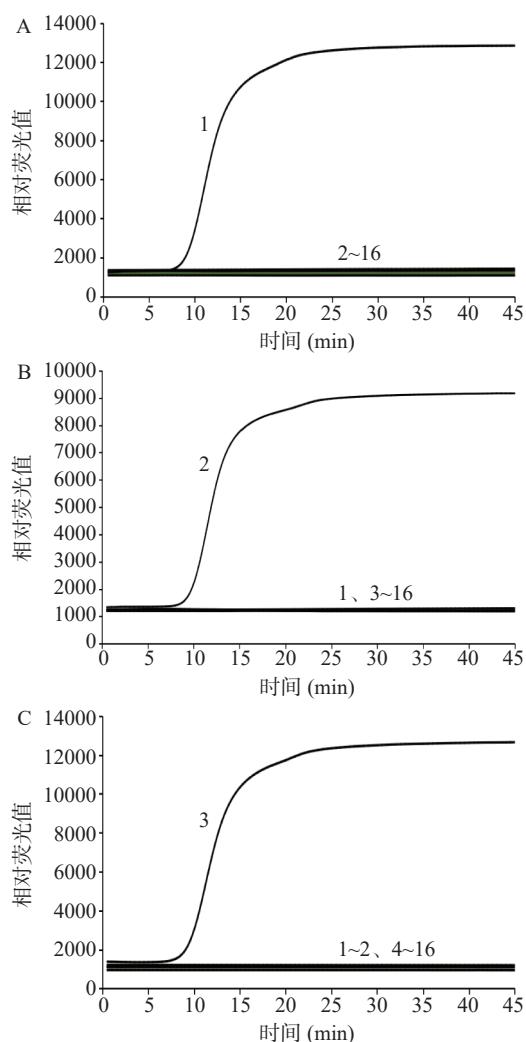
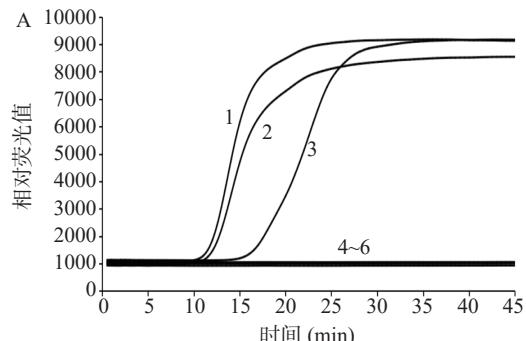


图 2 IMSA 检测 3 种菌株的特异性

Fig.2 Specificity of IMSA to detect three bacterial

注: A: 沙门氏菌, B: 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM, C: 单核细胞增生李斯特氏菌; 1~16 依次为鼠伤寒肠道沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7/NM、单核细胞增生李氏特氏菌、阪崎肠杆菌、产气肠杆菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌、乙型溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、空肠弯曲菌、霍乱弧菌、创伤弧菌、副溶血性弧菌和阴性对照。

10^9 CFU/mL 以上的样本均能稳定检出鼠伤寒肠道沙门氏菌, 人工污染浓度为 2.14×10^{-1} CFU/mL 的样本延长培养时间依然无法检出鼠伤寒肠道沙门氏菌。由此可知, 建立的 IMSA 方法检测沙门氏菌的



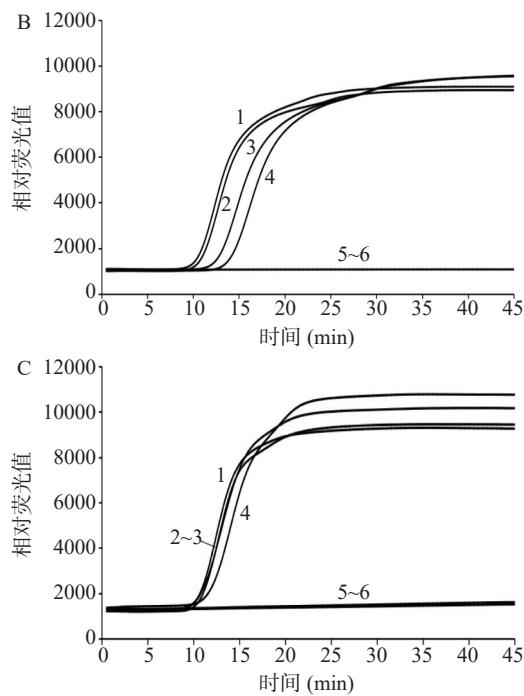


图 3 人工污染鼠伤寒肠道沙门氏菌培养 4 h(A)、6 h(B)、8 h(C)IMSA 检测结果

Fig.3 IMSA test results of artificially contaminated *Salmonella typhimurium* cultured for 4 h (A), 6 h (B), 8 h (C)

注: 1~6 依次为 2.14×10^3 、 2.14×10^2 、 2.14×10^1 、 2.14×10^0 、 2.14×10^{-1} CFU/mL 和阴性对照。

最短增菌时间为 6 h, 最低含菌量检出限为 2.14×10^0 CFU/25 g。建立的 IMSA 方法检测大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 结果如图 4 所示, 最短增菌时间为 8 h, 最低含菌量检出限为 2.79×10^0 CFU/25 g。建立的 IMSA 方法检测单核细胞增生李斯特氏菌结果如图 5 所示, 最短增菌时间为 8 h, 最低含菌量检出限为 3.62×10^0 CFU/25 g。

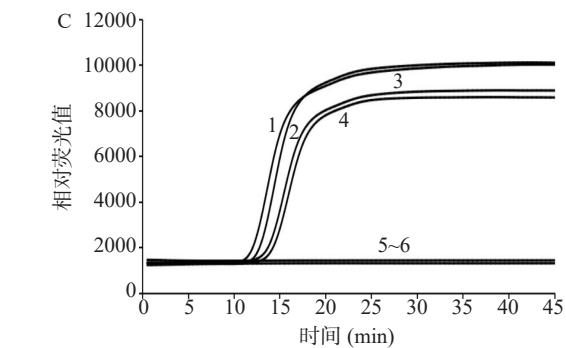
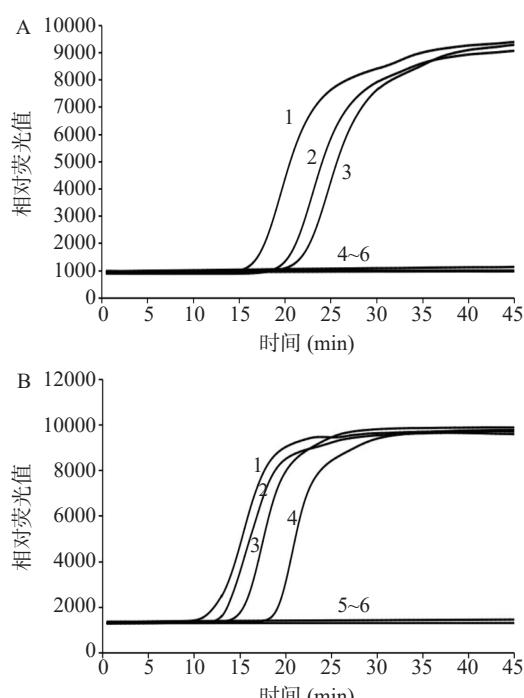


图 4 人工污染大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 培养 6 h(A)、8 h(B)、10 h(C)IMSA 检测结果

Fig.4 IMSA test results of artificially contaminated *Escherichia coli* O157:H7/NM cultured for 6 h (A), 8 h (B), 10 h (C)
注: 1~6 依次为 2.79×10^3 、 2.79×10^2 、 2.79×10^1 、 2.79×10^0 、 2.79×10^{-1} CFU/mL 和阴性对照。

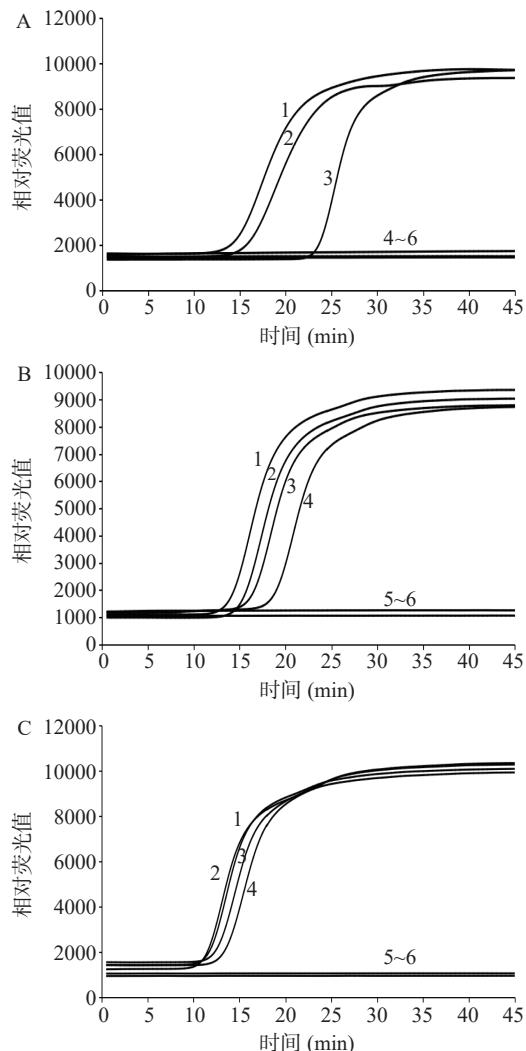


图 5 人工污染单核细胞增生李斯特氏菌培养 6 h(A)、8 h(B)、10 h(C)IMSA 检测结果

Fig.5 IMSA test results of artificially contaminated *Listeria monocytogenes* cultured for 6 h (A), 8 h (B), 10 h (C)

注: 1~6 依次为 3.62×10^3 、 3.62×10^2 、 3.62×10^1 、 3.62×10^0 、 3.62×10^{-1} CFU/mL 和阴性对照。

2.4 食品样本检测实验

对 74 份食品样本进行 IMSA 和国标培养法

检测,结果如表 4 所示。其中 4 份样本利用建立的 IMSA 方法检出沙门氏菌,与国标培养法的检测结果一致;3 份样本检出大肠埃希氏菌 O157:H7/NM,与国标培养法的检测结果一致;1 份样本检出单核细胞增生李斯特氏菌,与国标培养法的检测结果一致。由此可见,IMSA 方法与国标培养法的一致性高达 100%,说明建立的 IMSA 方法对于检测食品样本中沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 和单核细胞增生李斯特氏菌具有很好的效果。

表 4 两种方法检测结果统计分析

Table 4 Statistical analysis table of test results of two methods

指标	项目	国标培养法		合计
		阳性	阴性	
沙门氏菌	IMSA 法阳性	4	0	4
	IMSA 法阴性	0	70	70
	合计	7	70	74
大肠埃希氏菌 O157:H7/NM	IMSA 法阳性	3	0	3
	IMSA 法阴性	0	71	71
	合计	3	71	74
单核细胞增生李斯特氏菌	IMSA 法阳性	1	0	1
	IMSA 法阴性	0	73	73
	合计	1	73	74

3 讨论与结论

IMSA 技术的一大难点是引物设计复杂,IMSA 引物由一对茎引物和两对杂交嵌套引物组成,有别于 FQ-PCR 引物,因此靶基因序列需要较长的高度保守序列。沙门氏菌毒力岛 SPI 在其对宿主细胞的粘附、侵袭等致病过程中起着重要的作用^[13]。而 *inv* 基因位于 SPI-1 上,最早由 Galan 等人提出,包括 *invA*、*invB*、*invC* 等多个基因,其中 *invA* 基因通过参与细菌侵入宿主并启动感染,从而影响沙门氏菌致病力^[14]。*invA* 在沙门氏菌中具有高度保守性,常常被用作分子生物学的检测中^[15]。出血性大肠杆菌的主要血清型为大肠埃希氏菌 O157:H7/NM,可导致出血性结肠炎等严重性疾病,具有感染剂量小和感染症状反应剧烈等特点^[16]。而 O157 抗原编码基因 *rfbE* 在大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 中具有很高的种特异性,常用于分子生物学检测^[17]。在单核细胞增生李斯特菌中,起到调控绝大多数毒力基因转录表达的蛋白因子是 PrfA 蛋白^[18],而编码 PrfA 蛋白的 *prfA* 基因自然成了许多学者研究的对象。综上,本研究选择 *invA*、*rfbE* 和 *prfA* 基因的高度保守序列设计 IMSA 引物进行检测,菌液灵敏度检测结果分别为 2.14×10^3 、 2.79×10^3 和 3.62×10^3 CFU/mL,特异性达到 100%。

目前食源性致病菌的检测方法以国家标准 GB4789 为主,一般分为预增菌、选择性增菌、分离培养、生化鉴定等多个步骤^[19]。现今培养法检测技术已成熟,检测结果准确可靠,有商品化的检测试剂,一定程度上能减少工作量。但检测时长依然需要 3~6 d、操作繁琐、耗时费力,不能满足现今快速的检

测要求,是其最大的弊端^[20]。免疫学检测方法近年来也常被用到检测微生物、疾病的诊断中,主要有酶联免疫技术、免疫荧光检测技术、免疫磁珠分离技术和蛋白芯片技术等^[21]。免疫学检测方法是运用抗原和抗体间能够相互特异性识别,并牢固结合的原理,该方法具有特异性好、敏感度高、检测时间短等优势^[22]。但其缺点也比较明显,反应过程易受环境因素以及酶的纯度等因素影响,重复性和稳定性欠缺,容易造成漏检和假阳性^[23]。分子生物学检测方法是利用核酸具有的特异性,检测是否含有特异性的基因片段^[24]。目前用于食源性致病菌检测的分子生物学技术有聚合酶链式反应技术、实时荧光 PCR 技术、等温扩增技术、基因芯片技术等^[21]。IMSA 技术是一种新型的等温扩增技术,该技术具有快速、高效、灵敏、准确等特点,已被广泛应用于微生物、医疗检测等领域^[25~26]。本研究建立的 IMSA 检测方法可在 12 h 内完成三种食源性致病菌的检测,与国标培养法相比,大大缩短了检测时间,且结果一致性高达 100%。

学校食品安全问题是食安重点关注的问题,它不仅关系到师生的身体健康和生命安全,同时也关系到社会的和谐稳定。但是目前大部分学校未配备食源性致病菌快速检测实验室,只有发生食物中毒时才会对留样食品进行检测,无法及时监控食品加工过程中的问题。而本研究建立的沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 和单核细胞增生李斯特氏菌 IMSA 快速检测技术,具有灵敏度高、特异性强、操作简单、成本低等优点,可以在短时间内完成食品中致病菌的检测,非常适合学校餐饮食源性致病菌的快速检测,具有很好的实用价值和前景。

尽管建立的 IMSA 检测方法对三种食源性致病菌有很好的检测效果,但该方法依然有不足之处:第一,三种食源性致病菌的检测需要分三次进行,无法做到在同一管内完成检测。第二,引物设计复杂,扩增产物复杂,不利于后续产物的鉴定工作。

参考文献

- [1] ROBERT L S, JOHN B, DONALD J S, et al. An economic evaluation of PulseNet: A network for foodborne disease surveillance [J]. American Journal of Preventive Medicine, 2016, 50(5S1): S66~S73.
- [2] 岳思远, 苏亮, 任鹏程, 等. 食源性致病菌生长延滞期建模的研究进展 [J]. 食品科学, 2019, 40(1): 313~318. [YUE Saiyuan, SU Liang, REN Pengcheng, et al. Progress in modeling of food-borne pathogen growth at lag phase [J]. Food Science, 2019, 40(1): 313~318.]
- [3] 樊晓洁. 食源性致病菌大肠杆菌 O157: H7 检测方法的研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(7): 2144~2149. [FAN Xiaojie. Research progress on detection methods of foodborne pathogenic *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(7): 2144~2149.]
- [4] SCALLAN E, HOEKSTRA R M, MAHON B E, et al. An assessment of the human health impact of seven leading foodborne

- pathogens in the United States using disability adjusted life years [J]. *Epidemiology and Infection*, 2015, 143(13): 2795–2804.
- [5] 刘卫德, 刘绪平, 章瑛, 等. 中成药中沙门氏菌实时荧光 PCR 检测法的建立及优化[J]. 中国医药生物技术, 2022, 17(1): 59–63. [LIU Weide, LIU Xuping, ZHANG Ying, et al. Establishment and optimization of real-time fluorescent PCR detection method for *Salmonella* in Chinese patent medicine[J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2022, 17(1): 59–63.]
- [6] 李琴, 仵军红, 贾涛. 学校及托幼机构食堂餐饮食品的风险评估[J]. 食品工业, 2022, 43(4): 335–337. [LI Qin, WU Junhong, JIA Tao. Risk assessment of schools and kindergartens[J]. The Food Industry, 2022, 43(4): 335–337.]
- [7] 郑玲玲, 陈仲元. 高校食堂快检实验室检测项目探讨[J]. 食品安全导刊, 2022(3): 1–3. [ZHENG Lingling, CHEN Zhongyuan. Discussion on the test items of fast inspection laboratory in university canteen[J]. China Food Safety Magazine, 2022(3): 1–3.]
- [8] DING XIONG, KAI NIE, LEI SHI, et al. Improved detection limit in rapid detection of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 by a novel reverse transcription-isothermal multiple-self-matching-initiated amplification assay[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(6): 1862–70.
- [9] 李鑫娜, 聂凯, 马学军, 等. 埃博拉病毒扎伊尔亚型多引物自配引发等温扩增方法的建立[J]. 病毒学报, 2016, 32(1): 1–6. [LI Xinna, NIE Kai, MA Xuejun, et al. Detection of the Zaire subtype of the Ebola virus by isothermal multiple self-matching initiated amplification[J]. Chinese Journal of Virology, 2016, 32(1): 1–6.]
- [10] 乐振穷, 许泽仰, 张细玲, 等. FQ-PCR 与 IMSA 检测转基因豆奶外源基因的比较研究[J]. 大豆科学, 2018, 37(6): 943–949, 954. [LE Zhenqiao, XU Zeyang, ZHANG Xiling, et al. Comparison of FQ-PCR and IMSA for detecting exogenous genes in genetically modified soymilk[J]. Soybean Science, 2018, 37(6): 943–949, 954.]
- [11] LIU Wenxin, YUAN Chaowen, ZHANG Liguo, et al. Establishment and application of isothermal multiple-self-matching-initiated amplification (IMSA) in detecting type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*[J]. Plos One, 2019, 14(5): 1–14.
- [12] 王琪, 徐文娟, 石盼盼. IMSA 技术快速检测肠出血大肠杆菌 O157: H7 方法的建立及应用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 263–269. [WANG Qi, XU Wenjuan, SHI Panpan. Development and application of IMSA for rapid detection of enterohaemorrhage *Escherichia coli* O157: H7[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 263–269.]
- [13] RAO S, LINKE L, DOSTER E, et al. Genomic diversity of class I integrons from antimicrobial resistant strains of *Salmonella typhimurium* isolated from livestock, poultry and humans[J]. *PLoS One*, 2020, 15(12): e0243477–e0243477.
- [14] KUPPUSWAMY N K, TOMAS D. Real-time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in environmental samples[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(14): e00644–17.
- [15] ABENI B, ISOKEN H I, ETINOSA O I. Prevalence of antimicrobial resistance and virulence gene elements of *Salmonella* serovars from ready-to-eat (RTE) shrimps[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1613.
- [16] TÓTH ISTVÁN, BAGYINSZKY EVA, SVÁB DOMONKOS. Multiplex PCR typing scheme based on *Escherichia coli* O157: H7 Sakai prophage (Sp) associated genes[J]. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 2022, 120: 68–76.
- [17] MOSTAFA B, FIROUZ E, SHAHRAM N, et al. Identification of *E. coli* O157: H7 by using specific primers for *rfbE* and *stx2b* genes[J]. *Iranian South Medical Journal*, 2017, 20(3): 267–277.
- [18] WITTE A K, MESTER P, ROSSMANITH P. qPCR Validation on the basis of the *Listeria monocytogenes* *prfA* assay[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2220: 41–53.
- [19] AWANG M S, YAZMIN B, HAIRUL H H, et al. Advancement in *Salmonella* detection methods: From conventional to electrochemical-based sensing detection[J]. *Biosensors*, 2021, 11(9): 346–346.
- [20] 顾雨熹, 王锦, 陈帅, 等. 食品中两种沙门氏菌检测方法的比较[J]. 粮食储藏, 2022, 51(2): 35–40. [GU Yuxi, WANG Jin, CHEN Shuai, et al. Comparison of two detection methods for *Salmonella* spp. in food[J]. Grain Storage, 2022, 51(2): 35–40.]
- [21] 康招娣, 李红娜, 袁飞. 快速检测技术在食源性沙门氏菌检测中的应用研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(4): 848–855. [KANG Zhaodi, LI Hongna, YUAN Fei. Research progress on the application of rapid detection technology for foodborne *Salmonella*[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(4): 848–855.]
- [22] WANG Minglu, ZHANG Yilun, TIAN Fangyuan, et al. Overview of rapid detection methods for *Salmonella* in foods: Progress and challenges[J]. *Foods*, 2021, 10(10): 2402.
- [23] 范龙兴, 宁保安, 孙智勇, 等. 基于化学发光磁酶免疫分析技术检测单增李斯特菌[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(3): 124–129. [FAN Longxing, NING Baoan, SUN Zhiyong, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* through chemiluminescent magnetic enzyme immunoassay[J]. Food Research and Development, 2017, 38(3): 124–129.]
- [24] 苏丹, 吴天琪, 杨雨, 等. 量子点标记免疫分析技术在食品安全检测中的应用现状[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(10): 210–216. [SU Dan, WU Tianqi, YANG Yu, et al. Application of quantum dots-based immunoassay in food safety detection[J]. Food Research and Development, 2022, 43(10): 210–216.]
- [25] NUGRAHA R, NURILMALA M, NURJANAH, et al. Detection of *Salmonella* sp. in fisheries product using real-time PCR[J]. IOP Conference Series:Earth and Environmental Science, 2019, 404: 012012–012012.
- [26] CHEN Xuelong, WANG Honghai, LIU Chang, et al. Technical note: Development of a closed-tube isothermal multiple self-matching-initiated amplification assay for visual detection of *Staphylococcus aureus* in milk samples[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 104(3): 3569–3574.