

致病菌快速检测管联合基质辅助激光解吸电离 飞行时间质谱法鉴定即食食品中的 大肠埃希氏菌 O157:H7

史方¹, 李轲^{2*}, 阴甜甜³, 张莹莹³, 张璐³, 唐慧骥²

(1. 安阳海关, 安阳 455000; 2. 郑州海关技术中心, 郑州 450003;
3. 河南德仕人力资源服务有限公司, 郑州 450003)

摘要: **目的** 建立基于致病菌快速检测管技术联合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)快速、高效、准确鉴定即时食品中大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) O157:H7的方法。**方法** 选取改良胰蛋白胨大豆肉汤(modified tryptone soya broth, mTSB)为初筛培养基, 制作出针对即时食品中*E. coli* O157:H7的致病菌快速检测管, 初筛阳性结果采用MALDI-TOF MS技术鉴定。**结果** 5株常见*E. coli* O157:H7菌株均能特异检出, 而其他非*E. coli* O157:H7均未检出, 灵敏度可达51 CFU/mL; 通过对人工污染样品和自然样品检测, 鉴定结果和GB 4789.36—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验》方法完全一致, 且检测效率提高了30%。**结论** 两种技术联合应用建立的鉴定即时食品中*E. coli* O157:H7的新方法, 操作简便、成本低廉, 适合推广, 为快速、准确鉴定即时食品中*E. coli* O157:H7打开了新思路。

关键词: 即时食品; 致病菌快速检测管; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法; 大肠埃希氏菌 O157:H7

Identification of *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to-eat food by rapid detection tube of pathogenic bacteria combined with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

SHI Fang¹, LI Ke^{2*}, YIN Tian-Tian³, ZHANG Ying-Ying³, ZHANG Lu³, TANG Hui-Ji²

(1. Anyang Customs, Anyang 455000, China; 2. Technical Center of Zhengzhou Customs District, Zhengzhou 450003, China; 3. Henan Deshi Human Resources Service Co., Ltd., Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid, efficient and accurate method for the identification of *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 in ready-to-eat food based on the rapid detection tube of pathogenic bacteria combined with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Methods** Modified tryptone soya broth (mTSB) was selected as the primary screening medium to prepare *E. coli* O157:H7 rapid detection tube for pathogenic bacteria, and the positive result of preliminary screening was identified by MALDI-TOF MS

基金项目: 郑州海关 2021 年度关级科研项目(2021ZZHGKY03)

Fund: Supported by the Scientific Research Projects of Zhengzhou Customs in 2021 (2021ZZHGKY03)

*通信作者: 李轲, 硕士, 高级兽医师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: like77312@163.com

*Corresponding author: LI Ke, Master, Senior Veterinarian, Technical Center of Zhengzhou Customs District, No.9-1, Jinshui East Road, Jinshui District, Zhengzhou 450003, China. E-mail: like77312@163.com

technology. **Results** Five common *E. coli* O157:H7 strain could be specifically detected, while other non-*E. coli* O157:H7 were not detected, with a sensitivity of 51 CFU/mL. Through the detection of artificially contaminated samples and natural samples, the identification results were completely consistent with the methods of GB 4789.36—2016 *National standard for food safety-food microbiological examination-Escherichia coli O157:H7/NM examination*, and the detection efficiency had been improved by 30%. **Conclusion** The new method for the identification of *E. coli* O157:H7 in ready-to-eat food established by the combined application of the two techniques is simple, inexpensive and suitable for dissemination, and opens up new ideas for the rapid and accurate identification of *E. coli* O157:H7 in ready-to-eat food.

KEY WORDS: ready-to-eat food; rapid detection tube of pathogenic bacteria; matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; *Escherichia coli* O157:H7

0 引言

即食食品(ready-to-eat food, RTE),是指简单加工处理、打开包装(或散装)可直接入口食用或简单冲调、加调料、佐料后即可食用的一类食品^[1-2]。随着人们生活节奏的加快、生活方式的改变,即时食品应运而生,随即消费席卷全球。由于配料繁多、种类丰富、生产加工工艺复杂、销售渠道不一等原因,更加大了食品卫生安全控制难度^[3]。目前,全球范围内,沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特氏菌已成为威胁人类健康的3大食源性致病菌^[4-6]。据食品伙伴网讯,仅2021年,全球贸易因大肠杆菌 O157:H7 污染即食食品被召回事件达10起之多,涉及的即食食品主要包括冰点心、奶酪产品、香肠、猪肉盖浇饭、牛肉切片、发酵乳、黄油产品、阿尔卑斯雪糕糖、大麦嫩芽粉、芝士猪排等,涉及国家大多是和我国跨境贸易往来密切的东南亚、北美洲国家,对此,我国国门生物安全多次提示高度预警。

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) O157:H7 是肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)主要血清型之一^[7-8],耐低温,能在冰箱内长期生存,在自然界的水中可存活数周至数月^[9-10],能引起人的出血性腹泻和肠炎^[11-12],并发症的死亡率高达30%^[13]。近年,即食食品3大食源性致病菌污染问题已引起食品安全专家高度关注,在我国,香港地区2014年颁布了《香港微生物含量指引》^[14],该指引对大部分即食食品的微生物限量进行了规定;2021年发布的GB 31607—2021《食品安全国家标准 散装即食食品中致病菌限量》,对散装即食食品的致病菌指标进行了规定。因此开发即时食品致病菌快速检测技术已成为行业内研究热点。

目前致病菌快速检测管是食品致病菌快速检测技术中一种较为新颖的检测手段,致病菌快速检测管分为上部孵育区和底部检测区,孵育区有特异性增菌培养基,检测区安装有二氧化碳传感器^[15]。孵育区加入样本后,将检测管放入设定好温度的恒温箱中,一定时间内,若目标微生

物在检测管内生长产生 CO₂,引起 CO₂ 传感器颜色改变,则目标微生物存在^[16-17]。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是近年发展起来的一种高分辨检测技术,该技术已成为检测、鉴定病原菌的强有力工具^[18-19]。其原理是菌体样本与基质形成共结晶薄膜,经过一定强度的激光照射,基质从激光中吸收能量,基质-菌体样本之间发生电荷转移导致样本分子电离,电离的样本分子在电场作用下加速穿过飞行管道被检测器捕捉并采集数据,分子量不同到达检测器的飞行时间不同,从而生成不同的蛋白谱图,通过系统软件对这些谱图进行处理并和数据库中各种已知微生物的标准图谱进行比对,从而完成对病原菌的鉴定^[20-21]。MALDI-TOF MS 的准确度高达0.1%~0.01%,远远高于目前常规应用的十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)电泳、高效凝胶色谱技术等致病菌终端鉴定手段^[22-23]。尤其是近年通过业内研究人员共同努力, MALDI-TOF MS 技术所依赖的核心数据库联网共享且不断更新完善,极大地提高了鉴定效率及地域兼容性。

目前 MALDI-TOF MS 技术已成熟应用于临床、食品、纺织品等领域。随着科学技术发展, MALDI-TOF MS 技术价值不断被探索、拓展,部分集成创新方法已被开发利用,如刘单单等^[24]联合环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术与 MALDI-TOF MS 技术建立的新方法鉴定食品中的沙门氏菌;李珂等^[25]利用实时荧光聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术联合 MALDI-TOF MS 技术建立的新方法鉴定纺织品中白假丝酵母菌等。但致病菌快速检测管技术联合 MALDI-TOF MS 技术鉴定即时食品中致病菌鲜有报道。

检测管技术主要核心是选择性培养基,目前市场上选择性培养基在优化技术上达不到对单一致病菌进行精准选择,因此单独利用检测管技术仅是一种初筛手段。为达到快速对致病菌进行精准鉴定目的,本研究选取改良胰蛋白胨大豆肉汤(modified tryptone soya broth, mTSB)为初筛培养基,结合致

病菌快速检测管选择性初筛, 结合 MALDI-TOF MS 技术, 研发出一种检测即食食品中 *E. coli* O157:H7 快速检测方法, 以期对食品安全监测、溯源、鉴定提供了新思路, 能满足消费者和监管机构对食品质量与安全的要求。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株

E. coli O157:H7 (E-1)、*E. coli* O157:H7 (E-2)(郑州海关技术中心保存); *E. coli* O157:H7 (ATCC 700728)、*E. coli* O157:H7 (NCTC 12900)、*E. coli* O157:H7 (CICC 21530)、单增李斯特菌(CICC 21633)、副溶血性弧菌(ATCC 10782)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)、沙门氏菌(CICC 21493)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)。

1.2 主要试剂及仪器

mTSB、改良 EC 肉汤(mEC+n)、EC 肉汤、营养肉汤、改良山梨醇麦康凯琼脂(modified sorbi tol macconkey agar, CT-SMAC)(北京陆桥技术股份有限公司); 乙腈、三氟乙酸(色谱纯, 美国 Sigma 公司); Biotyper 系统专用的标准品(bacterial test standard, BTS)、Biotyper 系统专用基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA)(德国布鲁克公司)。

致病菌快速检测管[检测区域内含有酚红指示剂, 纽勤生物科技(上海)有限公司]; Masticator 拍击式均质器(西班牙 IUL 公司); ME203 电子天平[精度 0.01 g, 梅特勒-托利多科技(中国)有限公司]; INE500 恒温培养箱(德国美墨尔特公司); 1379 生物安全柜(美国赛默飞公司); IKA VORTEX GENIUS3 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); Sigma 3K15 离心机(美国 Sigma 公司); BD Biotyper 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪(德国布鲁克公司)。

1.3 致病菌快速检测管检测

mTSB 肉汤培养基 0.105 MPa 压力下, 121°C 时, 灭菌 30 min, 分别分装均质袋和致病菌快速检测管中, 每袋 225 mL, 每瓶 5 mL。无菌称取样本 25 g, 加入含有 225 mL mTSB 肉汤的均质袋中, 拍击氏均质器上拍击 1 min; 移取均质后的样本 0.1 mL 加入含有 5 mL mTSB 肉汤检测管内, 具塞密封。(36±1)°C 增菌培养 22 h。增菌后若测试管检测区颜色变化, 则挑取同一样品均质袋内增菌液划线接种改良山梨醇麦康凯琼脂平板, 36°C 培养 22 h, 有可疑菌落长出, 则进行 MALDI-TOF MS 鉴定。

1.4 MALDI-TOF MS 鉴定

1.4.1 点 靶

挑取改良山梨醇麦康凯琼脂平板上单个菌落, 按实验布控顺序均匀涂抹于 MALDI 靶板圆形测试点位内, 室温下晾干; 用标准溶剂溶解基质 HCCA, 涡旋振荡混匀,

2000 r/min 瞬时离心; 在上述样本点位上覆盖 1 μ L HCCA 溶液, 室温下晾干。

1.4.2 数据采集及匹配性分析

晾干的靶板放入仪器, 打开 Flex Control3.4 软件采集蛋白峰数据信息(实验前用 BST 标准品进行仪器质量校准), 设定参数: 355 nm 波长, 最大频率 60 Hz, 正线性模式, 采集图谱质量范围 2000~20000 Da, 单次操作激光轰击点数 100 次, 加速电压 20 kV, 提取电压 18.6 kV, 聚焦电压为 6.5 kV, 提取延迟时间为 150 ns。数据采集完毕, 打开 MALDI Biotyper 3.1 软件, 导入采集到的蛋白峰信息, 进行匹配性分析。

1.5 实验菌液制备

取 1.1 各实验菌株, 营养肉汤增菌培养, 各取 1 mL 培养物稀释至 10^8 ; 另各取 1 mL 培养物混合制成混合菌液, 取混合菌液 1 mL 稀释至 10^8 , 保存以上各稀释度菌液实验备用。

1.6 特异性培养基选择

mTSB 肉汤培养基、mEC+n 肉汤培养基、EC 肉汤培养基高压灭菌后分装致病菌快速检测管, 每管 5 mL, 每种培养基分装 21 瓶。每种培养基接种 3 种代表实验菌株[大肠杆菌 O157:H7 (ATCC 700728)、沙门氏菌(CICC 21493)、金黄色葡萄球菌(ATCC29213)]各 7 个稀释度菌液, 36°C 增菌培养 22 h。

1.7 特异性(p-)验证

取 1.5 中各实验菌株 10^4 稀释度菌液 0.1 mL 接种到含有 mTSB 肉汤培养基的检测管, 每种实验菌株接种 10 管; 同时移取 25 mL 各实验菌株 10^4 稀释度菌液接种含有 mTSB 肉汤均质袋内增菌培养, 培养物划线接种改良山梨醇麦康凯琼脂平板, 36°C 培养 22 h, 并按照 1.4 进行 MALDI-TOF MS 鉴定。

1.8 灵敏度(p+)验证

取 1.5 增菌后的 *E. coli* O157:H7 菌液各 10 mL 制成混合菌液, 取混合菌液 1 mL 稀释至 10^8 , 各取 10^6 、 10^7 、 10^8 稀释度 1 mL 菌液涂布接种至改良山梨醇麦康凯琼脂平板, 36°C 需氧培养 22 h 后计数菌落数, 计算出每个稀释度的细菌浓度。取 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 稀释度菌液各 0.1 mL 加入含有 5 mL mTSB 肉汤检测管内, 具塞密封, 进行培养验证灵敏度, 每个稀释度 3 次平行实验; 同时移取 25 mL 混合菌液 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 稀释度菌液接种含有 mTSB 肉汤均质袋内增菌培养, 培养物划线接种改良山梨醇麦康凯琼脂平板, 36°C 培养 22 h, 并按照 1.4 进行 MALDI-TOF MS 鉴定。

1.9 稳定性验证

1.9.1 样品制作

随机市购 150 份不同来源、不同种类的即食食品, 依据 GB 4789.36—2016《食品安全国家标准 食品微生物学

检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验》检测大肠埃希氏菌 O157:H7, 23 份样品检出 *E. coli* O157:H7。余下 127 份 *E. coli* O157:H7 阴性的样品, 按 GB 4789.36—2016 制样, 取 1.8 中 10^5 稀释度混合菌液, 分别加入制作好的样品中, 每个样品 1 mL, 混匀隔夜放置。

1.9.2 人工污染样品验证

对 127 份人工污染样品按上述致病菌快速检测管检测和 MALDI-TOF MS 鉴定, 同时用 GB 4789.36—2016 第 5 节平行检测。

1.9.3 自然样品验证

对 23 份自然污染阳性的样品按上述方法进行致病菌快速检测管检测和 MALDI-TOF MS 鉴定。

1.10 数据处理

采集到的蛋白峰信息导入 MALDI Biotyper 3.1 软件

进行匹配性分析, 特异性、灵敏性、稳定性验证数据导入 Flex Analysis 3.4 软件进行质谱数据分析。

2 结果与分析

2.1 特异培养基的选择

根据 *E. coli* O157:H7 生理特性, 选用 mTSB 肉汤、mEC+n 肉汤、EC 肉汤, 对 1.5 中 *E. coli* O157:H7 (ATCC 700728)、沙门氏菌 (CICC 21493)、金黄色葡萄球菌 (ATCC29213) 菌液进行增菌培养, 结果见表 1, EC 肉汤配制过程中未加入抗生素, 依赖营养直接选择, 选择能力较弱, mTSB、mEC+n 选择能力差别不大, 对沙门氏菌抑制作用明显, 对金黄色葡萄球菌则几乎完全抑制。综合成本比较本研究选择 mTSB 作为增菌培养基。

表 1 3 种培养基中实验菌株生长比较
Table 1 Comparison of growth of experimental strains in 3 kinds of culture media

增菌液	菌株名称	菌液稀释度						
		10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
mTSB	<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 700728)	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
	沙门氏菌 (CICC 21493)	++	++	+	+	+	-	-
	金黄色葡萄球菌 (ATCC29213)	+	-	-	-	-	-	-
mEC+n	<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 700728)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
	沙门氏菌 (CICC 21493)	++	++	+	+	-	-	-
	金黄色葡萄球菌 (ATCC29213)	+	-	-	-	-	-	-
EC	<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 700728)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
	沙门氏菌 (CICC 21493)	+++	+++	++	++	++	+	-
	金黄色葡萄球菌 (ATCC29213)	+	+	+	-	-	-	-

注: +++表示生长良好, ++表示一般生长, +表示生长, -表示不生长。

2.2 特异性结果分析

2.2.1 检测管特异性结果分析

各实验菌株菌液接种含有 mTSB 培养基的致病菌快速检测管, 培养后肉眼观察, 接种 *E. coli* O157:H7 的检测管下部检测区域全部变黄色, 接种沙门氏菌有 1 管变黄色, 2 管变浅黄色, 接种绿脓杆菌的有 1 管变黄色, 其余检测管均未有颜色改变。计算 $p=96\%$, 假阳性率为 4%, 参照 SN/T 3266—2012 《食品微生物检验方法确认技术规范》, 定性方法性能指标 $p \geq 90.4\%$, 符合微生物定性检测方法技术指标要求。

2.2.2 MALDI-TOF MS 特异性结果分析

经培养后改良山梨醇麦康凯琼脂平板上 *E. coli* O157:H7 生长良好, 大多革兰氏阴性菌生长受到抑制, 副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌完全被抑制; 挑选出所有有菌落生长的平板, 进行 MALDI-TOF MS 鉴定, 分析出不同质谱峰, 成功得出 *E. coli* O157:H7 特征谱图(图 1、图 2), 整体鉴定结果和预期结果 100%符合, 如表 2, MALDI-TOF MS 特异鉴定图谱见图 3。

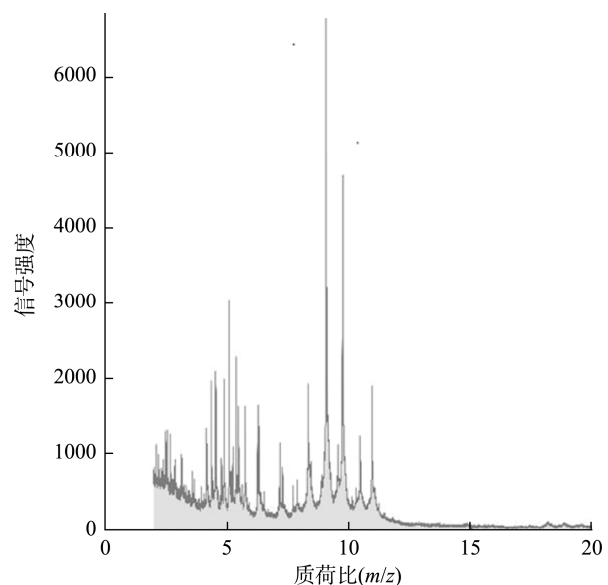


图 1 *E. coli* O157:H7 经 MALDI-TOF MS 鉴定的蛋白图谱
Fig.1 *E. coli* O157: H7 protein profile identified by MALDI-TOF MS

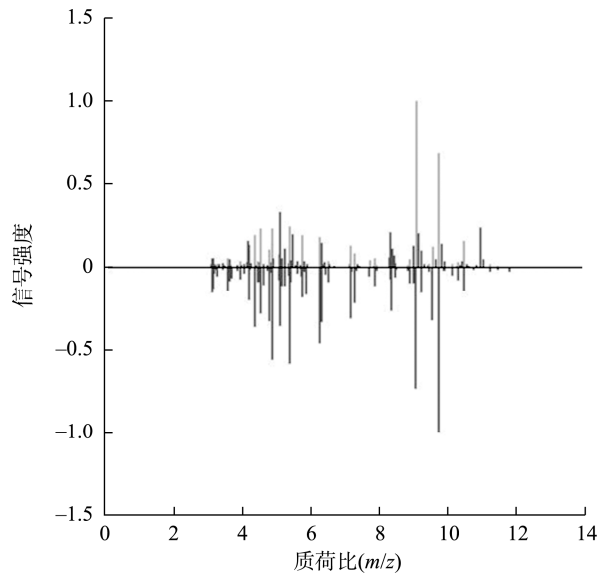


图 2 *E. coli* O157:H7 的 MALDI-TOF MS 蛋白图谱匹配性分析
Fig.2 Matching analysis results of protein profile of *E. coli* O157:H7 by identifying MALDI-TOF MS

2.3 灵敏度(p+)结果分析

混合菌液各浓度接种改良山梨醇麦康凯琼脂平板培养后计数, 10^7 平板计数结果为 51 CFU/mL, 依次推断 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 倍稀释度计数结果理论值分别为 5.1×10^6 、 5.1×10^5 、 5.1×10^4 、 5.1×10^3 、 5.1×10^2 、51、5.1 CFU/mL, 接种检测管培养后, 当菌液浓度为 5.1 CFU/mL 时, 检测区颜色变化不明显; 同样, 改良山梨醇麦康凯琼脂平板经培养后 10^8 稀释度菌液接种后未有菌落长出, 其余稀释度对应平板均有可疑菌落生长, MALDI-TOF MS 鉴定结果如图 4。因此本研究灵敏度约为 51 CFU/mL。

2.4 重复性结果分析

2.4.1 人工污染样品验证结果

127 份不同来源、不同配料的 RTE 样本, 人工污染后进行检测管初筛和 MALDI-TOF MS 鉴定, 同时用 GB 4789.36—2016 第 5 节平行检测。结果检测管全部阳性, MALDI-TOF MS 鉴定也全部阳性, 如图 5, 结果和 GB 4789.36—2016 第 5 节检测 100% 相符。

表 2 MALDI-TOF MS 鉴定情况
Table 2 MALDI-TOF MS identification

实验菌株	编号	菌液稀释倍数	改良山梨醇麦康凯琼脂平板上菌落生长情况	MALDI-TOF MS 鉴定情况
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 700728	10^4	无色透明菌落, 褐色中心	<i>E. coli</i> O157: H7
<i>E. coli</i> O157:H7	NCTC 12900	10^4	无色透明菌落, 褐色中心	<i>E. coli</i> O157:H7
<i>E. coli</i> O157:H7	CICC 21530	10^4	无色透明菌落, 褐色中心	<i>E. coli</i> O157:H7
<i>E. coli</i> O157:H7	E-1	10^4	无色透明菌落, 褐色中心	<i>E. coli</i> O157:H7
<i>E. coli</i> O157:H7	E-2	10^4	无色透明菌落, 褐色中心	<i>E. coli</i> O157:H7
单核细胞增生李斯特菌	CICC 21633	10^4	少量浅白色小菌落	单核细胞增生李斯特菌
副溶血性弧菌	ATCC 10782	10^4	未生长	/
金黄色葡萄球菌	ATCC 29213	10^4	未生长	/
沙门氏菌	CICC 21493	10^4	菌落较大, 呈玫瑰红色	沙门氏菌
绿脓杆菌	ATCC 27853	10^4	少量无色大菌落	绿脓杆菌

注: /表示未检出。

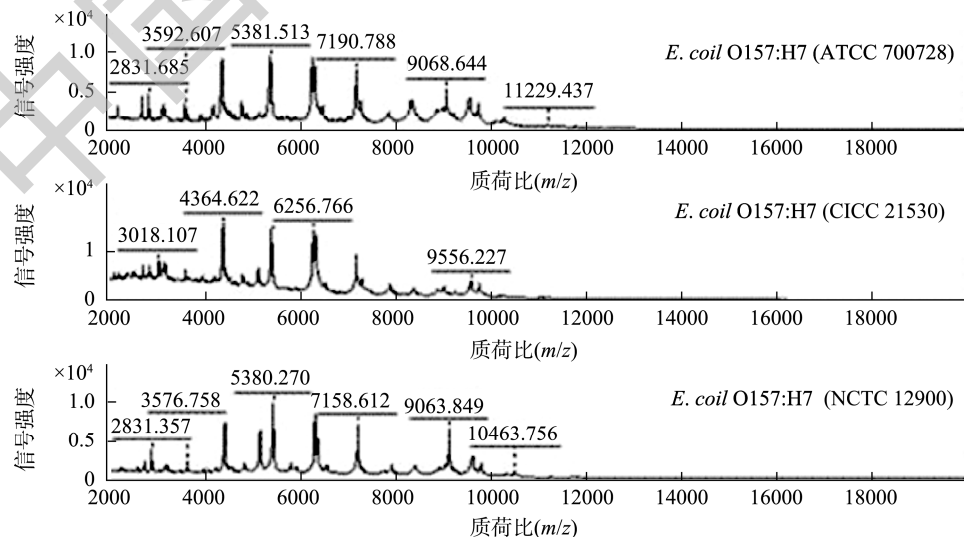


图 3 MALDI-TOF MS 鉴定图谱
Fig.3 MALDI-TOF MS identification spectrums

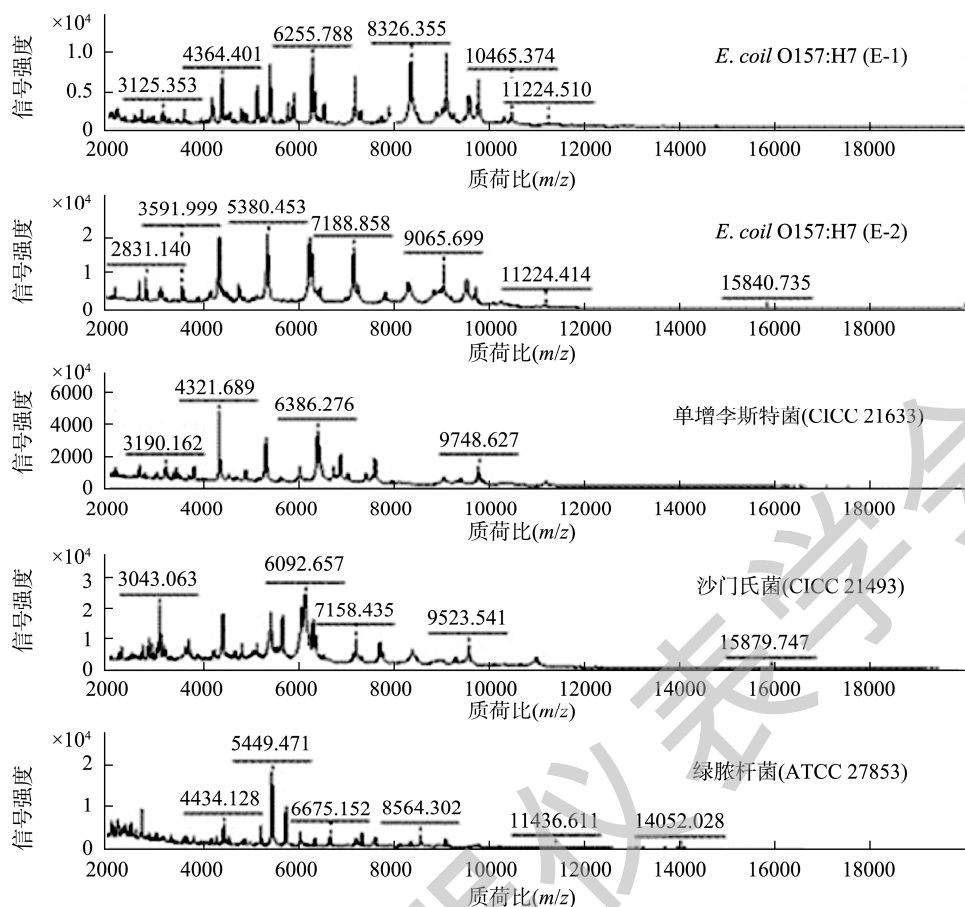


图 3(续) MALDI-TOF MS 鉴定图谱

Fig.3 MALDI-TOF MS identification spectrums

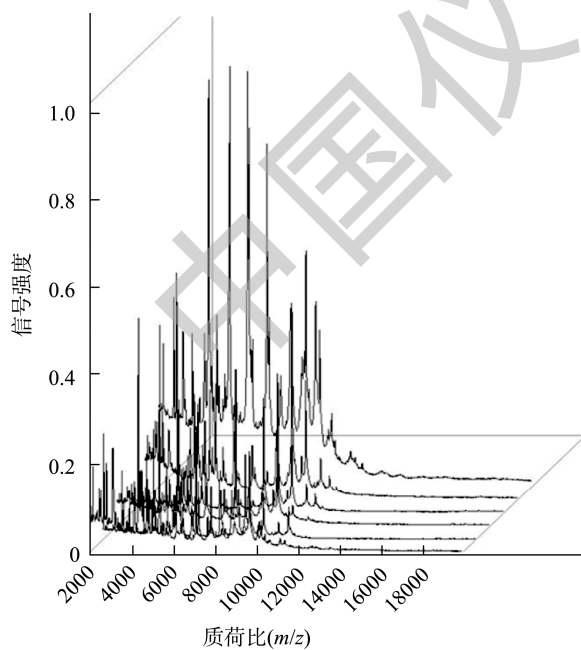


图 4 各稀释度 MALDI-TOF MS 鉴定图谱

Fig.4 MALDI-TOF MS identification spectrums of each dilution

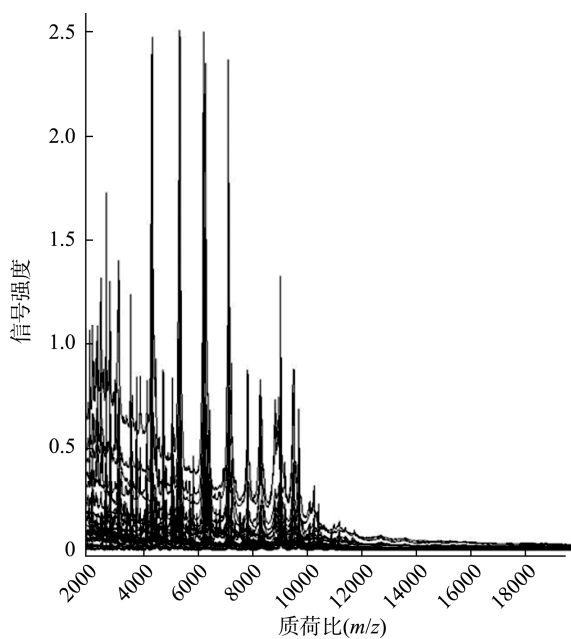


图 5 人工污染样本 MALDI-TOF MS 鉴定图谱

Fig.5 MALDI-TOF MS identification spectrums of artificially contaminated samples

2.4.2 自然样品验证结果

对23份检测 *E. coli* O157:H7 为阳性的自然污染样品接种检测管,培养后结果全部阳性;分离后 MALDI-TOF MS 鉴定结果均为阳性(图6),与 GB 4789.36—2016 第5节检测完全一致,检测效率提高了30%。

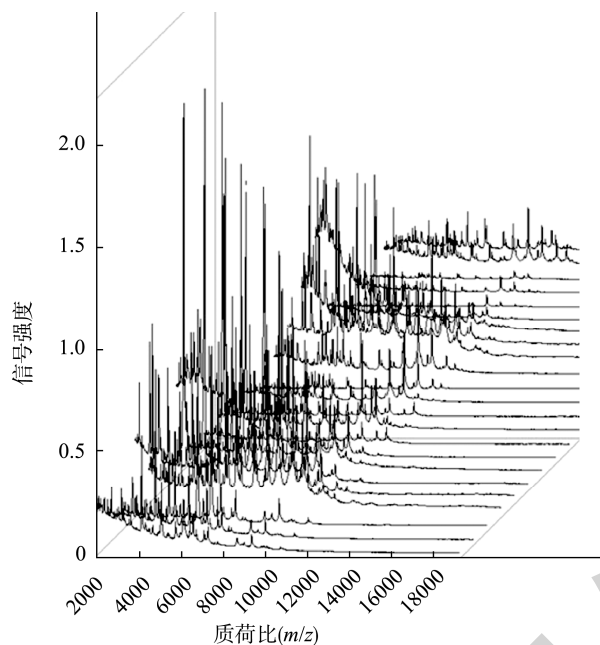


图6 自然样品 MALDI-TOF MS 鉴定图谱

Fig.6 MALDI-TOF MS identification spectrums of natural samples

3 讨论

本研究选取 mTSB 肉汤作为选择性初筛培养基, mTSB 中的新生霉素能对革兰氏阳性球菌有很强的抗菌作用,对变形杆菌也有很强的杀伤作用,起到有效的初步选择作用;新生霉素具左旋性,含有两个羧基,因此可以制成新生霉素中性盐溶液,比较稳定,其盐溶液的抗菌作用和新生霉素相同且经过肾脏代谢,毒副作用比较小,因此使用过程中能减少对操作者的危害。另外本研究选用 mTSB 中的新生霉素和检测管检测感应器使用的有机硅材料及酚红指示剂,对准确度 and 灵敏度有一定的贡献。

MALDI-TOF MS 技术是一种基于强大数据库的软电离物质谱技术^[26],具有简单、快速、准确、灵敏等特点,已经成熟应用病原菌鉴定,现已被公认为致病菌快速鉴定的里程碑^[27]。尽管 MALDI-TOFMS 谱库强大,但因其分型和传统血清学分型原理不同,因此两种方法所得结果没有一一对应关系^[28-30]。因此本研究选用实验室自建数据库对 *E. coli* O157:H7 进行了精准鉴定,自建数据库标准谱图大部分来自本实验室多年收集的 *E. coli* O157:H7 分离菌株,地域包容性非常强大,因此标准谱图不够整齐划一(图4)。后续研究可考虑对自建数据库继续扩大的同时进行多平台

验证,申报提交总库推广应用,以期补充 MALDI-TOF MS 自带谱库,提高对 *E. coli* O157:H7 的分型鉴定能力。

4 结论

本研究在基于选定选择性鉴别培养基培养的基础上,应用致病菌快速检测管联合 MALDI-TOF MS 技术,创新建立了一种快速、高效、准确鉴定即时食品中 *E. coli* O157:H7 的新方法,经验证灵敏度可达 51 CFU/mL,通过对人工污染样品和自然样品检测,通过 MALDI-TOF MS 技术鉴定后,成功剔除了致病菌快速检测管检测假阳性结果,结果和标准方法结果 100%符合。该方法采用两种成熟应用的技术相结合,较标准方法成本低廉,操作简便,适于推广应用,为快速、准确鉴定即时食品中 *E. coli* O157:H7 打开了新思路,为食品安全预警、口岸执法把关等方面提供了一种强有力的鉴定手段。

参考文献

- [1] 邓梁虹, 张方, 王晗, 等. 我国即食食品的开发现状与市场前景展望[J]. 保鲜与加工, 2017, 17(6): 112-121.
DENG LH, ZHANG F, WANG H, *et al.* Development status and market prospect of instant food in China [J]. Storage Process, 2017, 17(6): 112-121.
- [2] 郑雅雯, 韩慧, 米热依·奴尔沙热普, 等. 阿拉尔市部分即食食品中单增李斯特氏菌分离鉴定和药敏试验[J]. 动物医学进展, 2022, 43(9): 49-52.
ZHENG YW, HAN H, MIREYI NRSRP, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity test of listeria monocytogenes from some ready to eat foods in Alar City [J]. Prog Vet Med, 2022, 43(9): 49-52.
- [3] 尤祯丹, 陈传君, 蒋玉涵, 等. 即食食品中单增李斯特氏菌快速检测技术的研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 358-362.
YOU ZD, CHEN CJ, JIANG YH, *et al.* Research progress of rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(10): 358-362.
- [4] 康鹏伟, 袁志敏, 朱文刚. 2015—2017 年濮阳市即食食品中微生物污染状况调查[J]. 实用预防医学, 2019, 26(1): 86-88.
KANG PW, YUAN ZM, ZHU WG. Investigation on microbial contamination of ready to eat food in Puyang City from 2015 to 2017 [J]. Pract Prev Med, 2019, 26(1): 86-88.
- [5] IANNETTI L, ACCIARI VA, ANTOCI S, *et al.* *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Italy: Prevalence of contamination at retail and characterisation of strains from meat products and cheese [J]. Food Control, 2016, 68: 55-61.
- [6] 李莹, 裴晓燕, 张秀丽, 等. 2015—2016 年全国网售自制即食食品中微生物污染状况[J]. 卫生研究, 2019, 48(1): 144-146, 150.
LI Y, PEI XY, ZHANG XL, *et al.* Microbial contamination of home-made instant food sold online from 2015 to 2016 [J]. J Hyg Res, 2019, 48(1): 144-146, 150.
- [7] MIR RA, BRUNELLE BW, ALT DP, *et al.* Supershed *Escherichia coli* O157:H7 has potential for increased persistence on the rectoanal junction squamous epithelial cells and antibiotic resistance [J]. Int J Microbiol, 2020, 2020: 2368154.
- [8] AMIN MA, HASHEM HR, EL-MAHALLAWY HS, *et al.* Characterization

- of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from diarrhoeic patients with particular reference to production of Shiga-like toxin [J]. *Microb Pathogenesis*, 2022, 166: 105538.
- [9] RANI A, RAVINDRAN V, SURAPANENI A, *et al.* Re-view: Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157:H7 in food and water [J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 349: 109233.
- [10] 蔡欣, 王源林, 赵杰, 等. 重组酶介导的肠出血性大肠杆菌 O157:H7 等温扩增方法的建立[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(9): 1235-1239, 1252.
- CAI X, WANG YL, ZHAO J, *et al.* Establishment of recombinase-aided amplification method for EHEC O157:H7 [J]. *J Nanjing Med Univ (Nat Sci Ed)*, 2022, 42(9): 1235-1239, 1252.
- [11] FU JM, ZHOU YF, HUANG XL, *et al.* Dramatically enhanced immunochromatographic assay using cascade signal amplification for ultrasensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(4): 1118-1125.
- [12] FAN CC, TIE DD, SUN YB, *et al.* Characterization and genomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage FEC14, a new member of genus Kutter virus [J]. *Curr Microbiol*, 2021, 78(1): 159-166.
- [13] 张婧, 王利刚, 张磊, 等. 3 种大肠埃希氏菌 O157:H7 筛检方法的比较[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(19): 112-115.
- ZHANG J, WANG LG, ZHANG L, *et al.* Comparison of three pre-detection methods for detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Food Res Dev*, 2017, 38(19): 112-115.
- [14] Expert Committee on Food Safety of the Food and Environmental Hygiene Department. *Microbiological guidelines for food* [Z]. 2014.
- [15] 袁莉红, 李芳, 彭晰钰. 一种快速检测微生物的装置: 中国, 201610937788.8 [P]. 2019-05-17.
- YUAN LH, LI F, PENG XY. A device for rapid detection of microorganisms: China, 201610937788.8 [P]. 2019-05-17.
- [16] 彭志刚, 李芳, 彭晰钰. 一种微生物快速检测方法: 中国, 201610936062.2 [P]. 2018-10-12.
- PENG ZG, LI F, PENG XY. A rapid microbial detection method: China, 201610936062.2 [P]. 2018-10-12.
- [17] 李轲, 李可, 赵运胜, 等. 即时食品蜡样芽孢杆菌快速检测标准曲线模型的研究[J]. *粮食与食品工业*, 2022, 29(1): 59-64.
- LI K, LI K, ZHAO YS, *et al.* Study on a standard curve model for rapid detection of *Bacillus cereus* in ready-to-eat food [J]. *Cere Food Ind*, 2022, 29(1): 59-64.
- [18] TSAI Y, LIN T, CHOU H, *et al.* Shortening the time of the identification and antimicrobial susceptibility testing on positive blood cultures with MALDI-TOF MS [J]. *Diagnostics*, 2021, 11(8): 1514.
- [19] ABDEL M, AZAB M, MEIBED M, *et al.* Assessment of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) for accurate bacterial identification in clinical labs [J]. *Am J Clin Pathol*, 2020, 154: S143-S143.
- [20] BAR-MEIR M, BERLINER E, KASHAT L, *et al.* The utility of MALDI-TOF MS for outbreak investigation in the neonatal intensive care unit [J]. *Eur J Pediatr*, 2020, 179(12): 1843-1849.
- [21] OVIANO M, BOU G. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for the rapid detection of antimicrobial resistance mechanisms and beyond [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(1): e00037-18.
- [22] 黄丽群. 一种新型凝胶电泳技术 05SAR-PAGE 的建立、应用及机制研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2021.
- HUANG LQ. Establishment, application and mechanism study of a new gel electrophoresis technology 05SAR-PAGE [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2021.
- [23] 张海玲. 高效液相色谱技术在红曲中细菌分离、分析中的应用[D]. 福州: 福州大学, 2016.
- ZHANG HL. Application of high performance liquid chromatography in the isolation and analysis of bacteria in monascus [D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2016.
- [24] 刘单单, 李婉珊, 周露, 等. LAMP 和 MALDI-TOF-MS 技术在检测食品中沙门氏菌方面的应用[J]. *质量与安全检验检测*, 2021, 31(5): 27-34.
- LIU DD, L WS, ZHOU L, *et al.* LAMP and MALDI-TOF-MS in detection of *Salmonella* in food [J]. *Qual Saf Inspect Test*, 2021, 31(5): 27-34.
- [25] 李轲, 禹建鹰, 李传民, 等. 纺织品中白假丝酵母菌快速鉴定方法的研究[J]. *棉纺织技术*, 2021, 49(9): 42-47.
- LI K, YU JY, LI CM, *et al.* Study on rapid identification method of *Candida albicans* in textiles [J]. *Cotton Text Technol*, 2021, 49(9): 42-47.
- [26] FIESCHB K, SCHERER V, JUST B, *et al.* Molecular blood group screening in donors from Arabian countries and Iran using high-throughput MALDI-TOF mass spectrometry and PCR-SSP [J]. *Transfus Med Hemoth*, 2020, 47(5): 396-408.
- [27] JANG KS, KIM YH. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: A brief overview of their diverse applications [J]. *J Microbiol*, 2018, 56(4): 209-216.
- [28] ROTHEN J, SAPUGAHAWATTE DN, LI C, *et al.* A simple, rapid typing method for streptococcus agalactiae based on ribosomal subunit proteins by MALDI-TOF MS [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8788.
- [29] 张浩科, 赵智龙, 李紫薇, 等. MALDI-TOF MS 自建库对不同来源大肠埃希菌的鉴定能力验证[J]. *新疆医科大学学报*, 2022, 45(8): 818-822.
- ZHANG HK, ZHAO ZL, LI ZW, *et al.* Identification of *Escherichia coli* from different sources by MALDI-TOF MS self-built database [J]. *J Xinjiang Med Univ*, 2022, 45(8): 818-822.
- [30] 彭海, 周健武, 牟晓明, 等. MALDI-TOF MS 技术在多重耐药大肠埃希菌同源性分析及自建库中的应用研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(24): 3689-3694.
- PENG H, ZHOU JW, MU XM, *et al.* Application of MALDI-TOF MS technology in homology analysis and self-built library of multidrug-resistant *Escherichia coli* [J]. *Chin J Hosp Infect*, 2018, 28(24): 3689-3694.

(责任编辑: 黄周梅 张晓寒)

作者简介



史方, 中级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 729521505@qq.com



李轲, 硕士, 高级兽医师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: like77312@163.com