

荧光酶标免疫分析在食品微生物检测中的应用

田晓菊 张宝善

(陕西师范大学食品工程系 西安 710062)

摘要: 荧光酶标免疫分析是一种新型的快速检测微生物的方法,具有方便、快速、灵敏、准确等优点,已越来越多地被用于进出口食品中致病菌的检测。本文介绍了荧光酶标免疫分析法的原理、特点以及在食品微生物检测中的应用和未来发展方向。

关键词: 荧光酶标免疫分析(ELFA);致病菌;食品微生物检测

中图分类号:Q503 文献标识码:A

Application of Enzyme-linked Fluorescent Immunoassay in Microbiological Detection of Foods

TIAN Xiao-ju, ZHANG Bao-shan,

Department of Food Engineering, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, Shanxi, China

ABSTRACT: Enzyme-linked fluorescent immunoassay(ELFIA) is a new-style and rapid method of microbiological detection, with advantages of convenience, speediness, sensitivity and accuracy, etc. It has been widely used in examining pathogen from import and export foods, and its theory, characteristics, applications in microbiological detection of foods and development in the future has been reviewed in this article.

Key words: Enzyme-linked fluorescent immunoassay(ELFIA); Pathogen; Microbiological detection of foods

荧光酶标免疫分析(enzyme-linked fluorescent immunoassay, ELFIA)是在酶联免疫吸附分析的基础上发展起来的,一种先进的现代食品微生物分析中的快速检测方法,它操作简便,检测速度快,灵敏度高,而且无传染危险^[1],适合快速检出食品中的微生物,适应了现代进出口食品对检测方法快速准确的要求。

1 ELFIA 的原理

ELFIA 的基本原理:首先把已知抗体吸附于固相载体,加入待测样本,样本中的抗原与固相载体上的抗体结合,然后酶标抗体再与样本中的抗原结合。加入酶反应的底物,底物被酶催化为带荧光的产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,然后根据荧光强度进行定性或定量分析。

ELFIA 法可用于测定抗原,也可用于测定抗体。在这种测定方法中有 3 种必要的试剂:①固相的抗原或抗体,②酶标记的抗原或抗体,③酶作用的底物。由于酶的催化频率很高,极大地放大了反应效果,从而使测定方法达到很高的敏感度。

法国生物梅里埃公司(bioMerieux)生产的荧光酶标分析仪(Vitek ImmunoDiagnostic Assay System, VIDAS)就是建立在 ELFIA 原理上的自动检测系统,该仪器已被应用于多种微生物的检测中。

2 ELFIA 的特点

荧光酶标免疫分析与传统的检测方法相比较,具有以下优点:

(1) 检测速度快。从样品制备到鉴定出结果,仅需几个小时;

(2) 自动化程度高,操作简便。只要把样品加入仪器,一切分析步骤均由仪器自动完成,因此操作人员不需要太多的专业知识,只需掌握操作过程即可;

(3) 灵敏度高、特异性强。荧光活性稳定性好,假阳性极少,结果准确可靠;

(4) 封闭式的设计,具有较高的预防感染能力,特别适合高危样品的检测^[2];

(5) 对被检细菌不需要纯培养,只要存在于增菌培养基中,即可检出^[1];

(6) 一次可检测多个样品。ELFIA 一次可检测 12 个样,因此可以同时检测多个样品。

3 在食品微生物检测中的应用

由于 ELFIA 法在食品致病菌检测方面的诸多优越性,目前已逐步应用于进出口食品卫生检测中。

3.1 食品中大肠杆菌的检测

大肠杆菌 O157:H7 是 1975 年在美国流行的一次出血性结肠炎患者检样中发现的,其菌体抗原血清型为 O157,鞭毛抗原为 H7,该菌能吸附在人体肠道并分泌类志贺毒素(Shiga-like toxins,简称 SLTEC 或 Verotoxin-producing E. coli),简称 VTEC。该菌主要通过食品传播,其媒介包括牛肉、烤肉、饮用水、水果、牛奶及其制品、鸡肉、蔬菜等。对老人和儿童的生命威胁较大。在比利时、加拿大、英国、南非和日本也曾有过大杨杆菌 O157:H7 感染的报导,在香港 1997 年 3 月也在牛肉中检出此菌。由于 E. coli O157:H7 在较高温度下生长缓慢,而传统的检测食品中大肠杆菌的方法是采用 44.5℃±1℃培养,因此不易分离到此菌。采用 ELFA 来检测食品中的大肠杆菌

作者简介:田晓菊(1982-),女,在读硕士,研究方向:食品生物

技术, E-mail: anthea@stu.snnu.edu.cn

(收稿日期:2006-03-19 接受日期:2006-03-31)

O157:H7, 可以快速筛选掉阴性样品, 使不带此菌的食品得以快速放行。而筛选出的阳性样品再用选择性琼脂和乳胶凝集实验作进一步鉴定, 必要时增加生化反应作最后确认。

通过实验, 凡是试剂条上以含 *E. coli* O157:H7 的样品点样, ELFIA 结果都是阳性, 反之则为阴性。说明 ELFIA 的准确度是可靠的。以不同浓度的 *E. coli* O157:H7 标准菌株污染牛肉饼后, ELFIA 不但可以检出含大量 (560 个/g) 标准菌株的样品, 也可以检出含少量 (0.56 个/g) 标准菌株的样品, 说明其灵敏度较高。同时说明了运用 ELFIA 检测含标准菌株 O157:H7 的样品, 没有出现假阴性。检验样品分别用 EC 肉汤直接增菌后上机和用 EC 肉汤增菌 6h 再转入麦康凯肉汤增菌 18h 后上机进行比较。前者增菌方法上机后 ELFA 检验出现假阳性, 而改成间接方法增菌后假阳性可排除。说明用间接增菌法检验 *E. coli* O157:H7 结果准确^[3]。

E. coli O157:H7 从被发现至今不过二十多年时间, 在西方国家和日本等国已造成数起大规模的中毒事件。现国内大小规模的速食店如大快活、麦当劳、肯得基等随处可见, 许多人尤其是儿童喜欢吃汉堡包。因此建立快速检验 *E. coli* O157:H7 的方法势在必行。国外传统的方法是: 样品增菌 → 麦康凯山梨醇(MSA)平板分离 → 挑取若干菌落 → 生化实验与血清型鉴定, 整个过程较繁杂。而用 ELFIA 来检测则一次可检 12 个样, 45min 便知结果, 因此可以快速筛选掉 O157:H7 阴性样品, 使大批出口商品得以快速放行。

3.2 食品中沙门氏菌的检测

沙门氏菌是常见的肠道致病菌, 是食品和预防性健康检查的必检项目之一, 也是引起食物中毒的常见病原菌。传统的检测方法程序繁琐、培养时间长、工作量大、易漏检, 已经不太适应进出口食品快速检验的要求。

有人用 ELFIA 法对动物性食品中的沙门氏菌分别进行准确度、灵敏度和特异性试验。结果显示: ①ELFIA 法的检出率比常规方法略高, 两者结果的相符性较好, ELFIA 的结果是可以接受的; ②ELFIA 检测的特异性较好, 受相似菌的影响较小。ELFA 存在假阳性可能, 这需对 ELFIA 测定阳性的样品用其他方法确认; ELFIA 也存在假阴性可能, 虽然这种可能性很小; ③ELFIA 检测沙门氏菌的静态灵敏度为 $10^4 \sim 10^5$, 该数据略偏高。这就对增菌提出了较高的要求; ④ELFIA 性能稳定, 操作简便, 可大大缩短检验周期^[4]。由此可见, ELFIA 法用于出口动物性食品中的沙门氏菌检验, 结果是令人满意的。

此外, ELFIA 还可以用于脱水蔬菜中沙门氏菌的检测, 方法与禽肉制品、乳制品中沙门氏菌检测相近, 结果同样较为准确可靠, 检测时间也比常规培养方法大为缩短^[5]。因此作为一种快速初筛方法用来检测沙门氏菌是完全可行的, 符合快速检测的要求。

3.3 食品中金黄色葡萄球菌的检测

金黄色葡萄球菌是重要的食源性致病菌, 广泛存在于自然界中。约有 32% 的不同类食品存在有金黄色葡萄球菌, 若条件合适, 会大量繁殖产生肠毒素。肠毒素是金黄色葡萄球菌产生的一类结构上类似、能引起严重的食物中毒的碱性蛋白质 (A, B, C₁, C₂, C₃, D, E 和 F)。我国每年由金黄色葡萄球菌引起的食源性疾病不计其数, 而其所引起的食源性疾病也日益成为世界性的卫生问题。大多数食品及食品原料, 如肉、乳、蛋制品、糖果、糕点等, 在微生物检测中均要求进行金

黄色葡萄球菌肠毒素的测定, 因此建立快速检验方法势在必行。

研究表明, ELFIA 法检测金黄色葡萄球菌具有灵敏度高、特异性强、操作方便等优点^[6], 已逐步应用于食品卫生检测中。例如, ELFIA 法被用于由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒的鉴定^[7,8]。该快速检测方法填补了我们在日常工作中检测金黄色葡萄球菌肠毒素时因提取肠毒素难、试剂来源难、保存时间短、操作繁琐等原因而无法检测此毒素的空白, 弥补了用金黄色葡萄球菌计数来确定其是否影响进出口食品卫生质量的缺陷。但是目前用 ELFIA 法检测金黄色葡萄球菌肠毒素尚不能分型^[6]。若要确定最终型别, 必须另采用其它方法。

3.4 食品中弯曲菌属的检测

在全球范围内, 弯曲菌属感染是急性肠胃炎的主要病因之一。弯曲菌属是一类革兰氏阴性、微需氧生长、有动力的弯曲型杆菌, 是一组人畜共患的病原微生物, 其感染在世界范围内相当普遍, 多为急性、自愈性的肠胃炎。目前已鉴定出的 14 个种中, 空肠弯曲菌 (*Camp. jejuni*) 和结肠弯曲菌 (*Camp. coli*) 是引起腹泻的主要病原体 (65% 和 13%)。该菌属的其他细菌如猪肠弯曲菌 (*Camp. hyoilei*)、红嘴鸥弯曲菌 (*Camp. lari*) 等也有致病的报道^[9]。弯曲菌属对许多环境条件敏感, 其自然宿主主要是禽类 (多为空肠弯曲菌) 和家畜 (多为结肠弯曲菌)。弯曲菌属细菌在其宿主外可能很长时间内代谢活力低下, 处于一种称为“非可培养状态” (viable but nonculturable, VNC) 的休眠状态 (这种状态在水中尤为常见), 那些无增殖能力的弯曲菌在潮湿低氧条件下可能在环境中存活数周。在条件适宜时, 可增殖生长, 通过环境及食物链进入人体。接触禽畜类、或食入受到污染的水源、原奶以及禽制品是弯曲菌属感染人体的主要媒介。

作为一种食源性致病菌, 弯曲菌属的确定有赖于细菌培养。但由于该菌属特殊的微需氧培养条件 (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂), 及其特有的“非可培养状态” (VNC), 常规的培养中检出率很低。但是有人用 ELFIA 法对弯曲菌属进行检测, 其检出率为 75.7%^[10]。在检测周期上, 从样品制备开始, ELFIA 法可在 72h 内给出结果, 期间仅需 1 次微需氧培养; 而常规分离及生化鉴定方法得阳性结果至少需要连续 7 天, 期间至少需要 4 次微需氧培养, 实验条件高且相对较难控制。因此, 与常规分离及生化鉴定法相比, ELFIA 法具有快速、简便、灵敏、特异的特点。目前 ELFIA 法已广泛用于弯曲菌属检验的初筛。

4 发展前景

ELFIA 法现能对细菌、病毒、衣原体、支原体、免疫化学等方面近 80 种项目进行检测。近年来生产厂商已对涉及食品卫生的致病菌及有害毒素的检测项目进行了开发, 特别是对食品中李氏杆菌和沙门氏菌的检测和鉴定结果比较成熟, 并已先后被美国 FDA, AOAC, USDA 等部门认可^[11]。本仪器已经被越来越多的用于进出食品中致病菌的检测, 使大批出口商品得以快速放行, 尤其适合样品检测量多的检验机构, 食品企业以及医疗卫生机构。随着其功能范围开发的不断扩大, 我们认为其应用价值亦必将有进一步的提高。

(下转第 51 页)

道: 提取率较传统的汽油和稀乙醇溶剂法提高 11% ~ 59%; 可从黄花蒿中分离得 β - 谷甾醇和十八醇。实际应用证明它耗时短, 选择性好, 易于与多种分析仪器联用实现自动化分析。而且超临界流体 (SF) 的溶解力可随压力和温度变化, 这种可变的溶解力为选择性萃取提供可能, 这对基体复杂的天然产物样品尤为重要。

4 结语

超临界萃取技术在食品工业领域中是一个具有相当发展潜力的高新提取分离方法。在食品工业运用该技术可以对咖啡豆脱咖啡因、烟草脱尼古丁、奶制品脱胆固醇, 从鱼油中提取不饱和脂肪酸 DHA, EPA, 萃取啤酒花中的有效成分, 以及从天然植物中提取食品添加剂如卵磷脂、麦胚油、茶油、食用香料如八角油、茴香油、食用色素如辣椒红、番茄红等, 其中对啤酒花有效成分的萃取、咖啡豆脱咖啡因等已实现了工业化和产业化。

超临界二氧化碳萃取技术应用在食品工业领域中, 存在着许多传统提取方法无法相比的优点, 但对大规模的工业化应用还需深入研究, 尚需研制高效率的耐压装置以降低成本, 推动超临界流体萃取技术由实验研究转化为工业化生产。但目前由于存在缺少生物化合物在超临界 CO₂ 中的溶解度和平衡数据及设备装置投资大等缺点, 实现规模化, 工业化尚存

在一定难度。

参考文献

- [1] 李永安. 超临界二氧化碳萃取技术及其应用[J]. 科技情报开发与经济, 2003, 13(8): 114~ 116
- [2] 曾哲灵. 天然维生素 E 提取工艺研究[J]. 中国畜产与食品, 1997, (1): 27~ 29
- [3] 李少霞. 超临界流体萃取在食品工业中的运用[J]. 食品工程, 2000, (6): 39~ 40
- [4] 宋丽丽. 超临界流体技术在国内外天然药物研制中的应用及展望[J]. 开封医学学报, 2000, 19(3): 59~ 61
- [5] 吴卫生. 超临界流体技术发展动态[J]. 化学工程, 2000, 28(5): 45~ 47
- [6] 任轶错. 超临界技术的研究和应用进展[J]. 天津化工, 2003, 17(3): 14~ 15
- [7] 潘志彦. 聚苯乙烯在超临界二甲苯中的解聚[J]. 高校化学工程学报, 2002, 16(2): 227~ 231
- [8] 廖传华. 超临界 CO₂ 萃取 β - 胡萝卜素的实验研究[J]. 精细化工, 2002, 19(6): 365~ 366
- [9] 韩玉谦. 银杏叶活性成分提取与分离的研究[J]. 中国食品添加剂, 1999, (2): 25~ 27
- [10] 吕维忠. 超临界 CO₂ 萃取大豆磷脂的工艺研究[J]. 食品科学, 2000, (3): 28~ 30
- [11] 马海乐. 小麦胚芽油的超临界 CO₂ 萃取- 精馏的试验研究[J]. 农业工程学报, 1998, (4): 227~ 229

(上接第 48 页)

参考文献

- [1] 陶军, 张树宏, 吴仲梁. 应用“自动荧光酶标免疫测试仪”与常规培养法对冻禽肉中沙门氏菌的检测效果比较试验[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1996, 5
- [2] 刘忠民等. 心肌钙蛋白 I 酶联荧光免疫定量检测方法的方法学评价[J]. 热带医学杂志, 2005, 5(1)
- [3] 傅晓琴, 范放. 用微型自动免疫分析仪快速检测出口食品中大肠杆菌 O 157:H7[J]. 现代商检科技, 1997, 7(6)
- [4] 寇运同. 荧光酶标分析系统快速检测食品中的沙门氏菌[J]. 中国动物检疫, 2000, 17(9)
- [5] 陈炜. 脱水蔬菜中沙门氏菌不同检测方法的对比研究[J]. 宁夏农林科技, 2003, 1
- [6] 吴斌. 食品中金黄色葡萄球菌肠毒素的快速检测方法[J]. 微生物学通报, 2004, 31(5)
- [7] 李孝全. 金黄色葡萄球菌所致食源性疾病的病原学研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(3)
- [8] 吴奇志. 一起金黄色葡萄球菌伴蜡样芽胞杆菌食物中毒的实验诊断[J]. 浙江预防医学, 2004, 16(4)
- [9] Anon. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food[J]. Interim report on Campylobacter, London: HMSO, 1993
- [10] 韩伟. 聚合酶链反应与自动荧光免疫酶标检测弯曲菌属的试验[J]. 检验检疫科学, 2003, 13(3)
- [11] 黄玲, 孟冬丽. 利用 mini-VIDAS 和 GB 方法检测食品中沙门氏菌的比较试验[J]. 新疆师范大学学报, 2003, 22(1)
- [12] 王忠诚. 酶联荧光分析法测定血清心肌钙蛋白 I[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(7)
- [13] 倪安平. 全自动荧光酶免疫分析仪检测泌尿生殖道衣原体的评价[J]. 中国检验医学杂志, 2001, 24(3)
- [14] 陶凤蓉. 全自动荧光酶免疫分析仪检测沙眼衣原体临床应用评价[J]. 中国医学感染学杂志, 2005, 15(7)
- [15] 焦彦朝, 审时商. 食品中沙门氏菌酶联免疫荧光分析 VIDAS Salmonella (SLM) Assay 筛选方法[J]. 口岸卫生控制, 2001, 6(4)
- [16] 王少玲, 温瑞荣. 应用微型自动荧光酶标分析仪检测食品沙门菌效果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 12(2)
- [17] 顾鸣. 应用自动酶联免疫荧光仪 VIDAS 检测禽类组织中雌二醇水平[J]. 检验检疫科学, 2003, 13(4)
- [18] Dignum Marco, Hoogveld Hans L., Matthijs Hans C. P., et al. Detecting the phosphate status of phytoplankton by enzyme-labelled fluorescence and flow cytometry[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, (48): 29~ 38
- [19] Hadziyannis E, Sholtis W, Schindler S, Yen-Liebman B. Comparison of VIDAS with direct immunofluorescence for the detection of respiratory syncytial virus in clinical specimens[J]. Journal of Clinical Virology, 1999, (14): 133~ 136
- [20] Sewell A. M., Warbuton D. W., Boville A., et al. International Journal of Food[J]. Microbiology, 2003, (81): 123~ 129