

Angle

食品中沙門氏桿菌

酵素免疫分析法與傳統檢驗方法之比較

蘇 婷

第五組

摘 要

對於食品中沙門氏桿菌的檢驗，傳統方法較費時須五天才能獲知結果，遂尋求一快速檢驗方法俾縮短檢驗時間。本計劃以26株沙門氏桿菌接種於五種食品後，進行酵素免疫分析法(Enzyme Immunoassay, EIA)與傳統方法之比較，發現1. EIA之檢出率比傳統方法高3%。2. EIA具早期篩選之功能，至少可以提早24-48小時獲知結果。並比較檢驗流程中所使用培養基之效果發現木糖離胺酸去氧膽酸鹽瓊脂培養基(XLD)。海克頓腸內菌瓊脂培養基(HE)為較佳的沙門氏桿菌選擇性較差。一些非沙門氏桿菌之常見菌株如：大腸桿菌(*Escherichia coli*)，志賀氏桿菌屬(*Shigella*)，枸橼桿菌屬(*Citrobacter*)，金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)，克萊勃士桿菌屬(*Klebsiella*)，在利用酵素免疫分析法套組(EIA kit)檢驗時並無交叉反應。

前 言

沙門氏桿菌(*Salmonella* spp.)分佈廣泛，包括飲用水、牛乳及其製品、貝類、乾燥或冷凍蛋類、肉類及其製品，在食物中毒案及臨床上均為重要的病原性細菌¹。與美、英二國自食品中毒中檢出沙門氏桿菌之比率¹比較，台灣之檢出率雖然較低，但沙門氏桿菌為食物中毒之重要原因菌，其檢驗費時，因此就檢驗方法進行探討，並尋求快速檢驗方法，以節省檢驗時間，乃進行本研究。

材料與方法

食品檢驗：

本研究之檢體來源分為兩部分：漢堡、三明治、沙其馬、絞豬肉、鮮乳等五種檢體自市

面購回即儘速送回實驗室，分別進行接菌²及不接菌(對照組)等不同處理。接菌量為每25g檢體接入約 10^4 CFU/ml之菌液2.5ml。而市售雞肉檢體為經另調查檢驗方法檢驗得知有沙門氏桿菌污染者。

菌種來源：

沙門氏桿菌之菌株為由屏東農專獸醫科贈送之26株：*S. meleagridis*; *S. newport*; *S. panama*; *S. paratyphi* B; *S. pullorum*; *S. typhimurium*; *S. dublin*; *S. derby*; *S. enteritidis*; *S. gallinarum*; *S. infantis*; *S. kottbus*; *S. litchfield*; *S. manhattan*; *S. lanka*; *S. potsdam*; *S. weltevreden*; *S. choleroesuis*; *S. typhi*; *S. logos*; *S. azteca*; *S. bousso*; *S. ngor*; *S. potsmouth*; *S. muenster*; *S. muenchen*。係分別自家禽、畜排泄物中分離，菌種

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)

並經過生化及血清學鑑定。對照菌株包括：*Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* 係由本局第二組提供。

培養基及試劑：

乳糖肉羹(Lactose Broth, LB)、亞硒酸鹽胱氨酸肉羹(Selenite Cystine Broth, SC)、四硫代硫酸鹽肉羹(Tetrathionate Broth, TT)、M Broth、煌綠瓊脂培養基(Brilliant Green Agar, BGA)、沙門氏桿菌——志賀氏桿菌瓊脂培養基(Salmonella Shigella Agar, SSA)、亞硫酸鈹瓊脂培養基(Bismuth Sulfite Agar, BSA)、木糖離胺酸去氧膽酸鹽瓊脂培養基(Xylose Desoxycholate Agar, XLD)、海克頓腸內菌瓊脂培養基(Hektoen Enteric Agar, HE)、三糖鐵瓊脂培養基(Triple Sugar Iron Agar, TSIA)、離氨酸鐵瓊脂培養基(Lysine Iron Agar, LIO)、尿素肉羹(Urea Broth)均購自Difco公司；沙門氏桿菌多價本體(O)抗血清購自景祥公司，酵素免疫分析法套組(Elisa Kit)購自Organon Teknika Corporation。

儀器及設備：

EIA Reader 係由英國 Flow Laboratories 公司出品(MR 700 Microplate Reader)；37°C培養箱附有100rpm 轉速的旋轉軸，係由 Organon Teknika 公司出品；Magnetic Transfer Device 係由 Organon Teknika 公司出品。

檢驗沙門氏桿菌方法：

(一)傳統檢驗方法：

依據美國 FDA 細菌學分析手冊³(Bacteriological Analytical Manual, BAM)及中國國家標準⁴(10952 N693)所載之方法，其檢驗步驟為檢體先經 LB, 37°C培養18-24小時，再接入 SC、TT 內，37°C培養18-24小時，分別劃線於 BSA、BGA、SSA、XLD、HE, 37°C培養18-24小時，鈎取可疑菌落劃線及穿刺於 TSIA, LIA, 並接入 Uea Broth, 37°C培養24小時，自可疑沙門氏桿菌反應之 TSIA 中鈎菌配成菌液作血清學試驗及生化反應。

(二)酵素免疫分析法：

自傳統方法之 SC、TT 中各取0.5ml 菌液接入9ml M Broth, 37°C培養6小時後，離心(3000xg, 20分鐘)，取沈澱物加 1ml APBS (PH7.5±0.2)於100°C水浴加熱20分鐘，冷卻至室溫，得到檢液，隨即進行試驗。

取檢液(或陽性抗原)0.2ml 加入 microplate 的孔內，每一孔內加一顆鐵珠(coat 抗體)。利用磁鐵吸附鐵珠力量將鐵珠由一種試劑移轉到另一種試劑，使檢液與 conjugate 結合，於37°C恒溫培養20分鐘後，以洗液清洗，續加入 Substrate ABTS(2,2'-Azino-di-[3-ethylbenthiazolin sulfonate [b]])，靜置於室溫10分鐘，每一孔內加入0.025ml 之停止液以終止此反應，並取出鐵珠。抗原與抗體之反應模式如圖一。

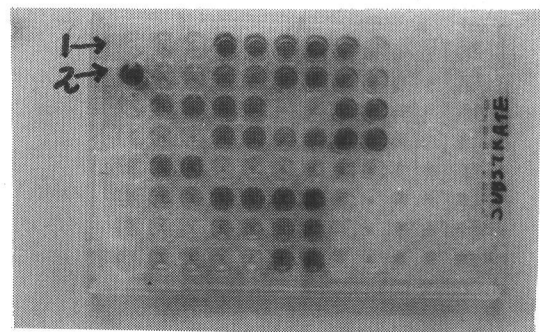
用光電比色計(EIA Reader)測405nm 之吸光度。

並以非沙門氏桿菌菌株配成菌液接入 EIA Kit 作為陰性反應對照組(negative control)，以檢測此類菌株對於本試驗是否有交叉反應。

若 EIA 套組判為陽性者，取原來之 M Broth 培養液再作確認試驗。

結 果

沙門氏桿菌之菌量須在10⁶CFU/ml 以上，在 EIA microplate 孔內呈深綠色，判為陽性；若孔內呈淺綠色或近於透明，則判為陰性。



圖一 酵素免疫吸附測定平板孔內之陽性反應及陰性反應結果 1, 代表陰性反應；2, 陽性反應

食品中沙門氏桿菌酵素免疫分析法與傳統檢驗方法之比較

表一：食品中沙門氏桿菌酵素免疫分析法及傳統方法檢出率之比較

食品檢體	檢驗件數	沙門氏桿菌檢出陽性件數		EIA檢出陽性且傳統方法檢出陰性件數		X ^{2c}
		傳統檢驗法 ^a	EIA ^b	EIA檢出陽性且傳統方法檢出陰性件數	傳統方法檢出陽性且EIA檢出陰性件數	
污染之雞肉	28	7	6	4	3	0.00
接菌之檢體	130	107	109	4	6	0.10
未接菌之檢體	30	3	0	0	3	1.33
共計	188	117	115	8	12	0.45

a. 檢體於 405 nm 測得吸光度 O.D. ≥ 0.200 後並經生化試驗確認者。

b. 檢體於 405 nm 測得吸光度 O.D. ≥ 0.200 者。

$$c. X^2 = \frac{(|EIA \text{ 檢出陽性且傳統方法檢出陰性件數} - \text{傳統方法檢出陽性且EIA檢出陰性件數}| - 1)^2}{EIA \text{ 檢出陽性且傳統方法檢出陰性件數} + \text{傳統方法檢出陽性且EIA檢出陰性件數}}$$

表二 食品中沙門氏桿菌之回收率

食品檢體	食品中沙門氏桿菌之回收率(%)	
	SC ^a	TT ^b
鮮乳	76	100
三明治	81	100
絞豬肉	78	100
漢堡	100	93
沙其馬	100	92
市售雞肉	40	60

a. SC, Selenite Cystine Broth (亞硒酸鹽胱胺酸肉羹)；b. TT, Tetrathionate Broth (四硫代硫酸鹽肉羹)。

表三 食品中沙門氏桿菌之回收率

食品檢體	食品中沙門氏桿菌之回收率(%)				
	BS ^a	SS ^b	BG ^c	XLD ^d	HE ^e
鮮乳	67	4	100	95	49
三明治	100	5	90	85	60
絞豬肉	63	18	100	82	57
漢堡	94	5	68	89	50
沙其馬	64	5	76	64	47
市售雞肉	80	0	65	80	66

a. BS, Bismuth Sulfite (亞硫酸鈹瓊脂培養基)；b. SS, Salmonella Shigella (沙門氏桿菌-志賀氏桿菌瓊脂培養基)；c. BG, Brilliant Green (煌綠瓊脂培養基)；d. XLD, Xylose Desoxycholate (木糖離胺酸去氧膽酸鹽瓊脂培養基)；e. HE, Hektoen Enteric (海克頓腸內菌瓊脂培養基)。

(圖一)。

EIA 與傳統方法檢出率之比較：沙門氏桿菌污染之28件雞肉檢體中，酵素免疫分析法檢出陽性者7件，傳統方法檢出陽性者6件(表一)，經 McNemar⁵ 分析 $X^2=0.00 < X^2(P=0.05)=3.84$ ；接種沙門氏桿菌之130件檢體中，酵素免疫分析法檢出陽性者109件，傳統方法檢出陽性者107件， $X^2=0.10$ ；未接菌(對照組)之30件檢體中，酵素免疫分析法檢出4件，傳統方法檢出1件， $X^2=1.33$ ；總件數188件中，酵素免疫分析法檢出120件，傳統方法檢出114件， $X^2=1.78$ 。結果顯示酵素免疫分析法與傳統方法用於各類檢體之檢驗，其檢驗結果均不具顯著差異性。

傳統方法之評估：比較增菌液 SC 及 TT 所得之回收率(表二)，六種食品檢體中，以 TT 所得回收率較高，但仍有部分自 SC 中有檢出(如雞肉檢體中，SC 回收率為40%)，故此二增菌液須配合使用為宜。比較五種培養基所得之回收率(表三)：SSA 之分離率由0-18%，效果不好，其他四種培養基之分離率均甚佳，如果同時使用三種以上培養基相互配合，其結果會更好。

本計劃所使用的非沙門氏桿菌與酵素免疫分析法套組之沙門氏桿菌抗體並無法交叉反應。

討論

EIA 與傳統方法之檢驗結果，並不具顯著差異性；表示此分析法之準確性甚高。沙門氏桿菌量超過 10^6 CFU/ml 時 EIA test 才會呈現陽性結果，故菌量不足可能是偽陰性的原因之一。本套組對於沙門氏桿菌某些血清型無法檢測，如 *S. typhi*, *S. paratyphi* B, *S. java*, *S. stanley*, *S. halmstad*, *S. huttingfoss*，其原因為酵素免疫分析法套組內之抗體 MOPC 467⁶ 無法辯認這些菌株。此分析法仍具有早期篩選之功能，可提早 48 小時得到初步結果。只需針對可疑者進行鑑定，故較經濟省時。

比較五種培養基 BSA、BGA、SSA、HE、XLD 對於食品中沙門桿菌回收率，Andrews et al⁷ 之報告指出 SSA 須與 XLD、HE 配合使用，也可同時採用三種培養基 (XLD、BSA、BGA 或 XLD、BSA、HE)，或同時採用四種培養基 (BSA、BGA、XLD、HE)，其回收率更高 (94.6%)。與本計劃檢驗之結果亦吻合，故建議食品中沙門氏桿菌選擇性培養基使用三種以上，且最好不用 SSA。

EIA 靈敏度的提高必須於前期增殖以提高檢液內沙門氏桿菌之菌數，及在選擇性培養基上沙門氏桿菌須占絕對優勢。

參考文獻

1. Bryan, F.L. 1981 Current Trends in

Foodborne Salmonellosis in the United States and Canada. *J. Food Prot.* 44(5): 394-402.

2. Flowers, R.S. 1985 Comparison of Rapid Salmonella Screening Methods and the Conventional Culture Method. *Food Tech.* 39(3): 103-108.
3. FDA, 1984. The Bacteriological Analytical Manual, 6th ed, Food & Drug Administration, Washington, D.C.
4. 經濟部中央標準局·73年·中國國家標準 10952號·沙門氏桿菌之檢驗。
5. Siegel, S. 1956. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. McGrawHill Book Co., New York, N.Y.
6. D'Áoust, J.Y. and A.W. Sewell 1986. Detection of Salmonella by the Enzyme Immunoassay Technique. *J. Food Sci* 51(2):484-488.
7. Andrews, W.H., P.L. Poelma and C. R. Wilson. 1981 Comparative Efficiency of Brilliant Green, Bismuth Sulfite, Salmonella-Shigella, Hektoen enteric, and Xylose desoxycholate Agars for the Recovery of Salmonella From Foods: Collaborative Study. *J. Assoc. off Ana. Chem* 64(4): 899-927.

食品中沙門氏桿菌酵素免疫分析法與傳統檢驗方法之比較

COMPARATIVE EFFICIENCY OF EIA, CONVENTIONAL METHOD FOR THE DETECTION OF SALMONELLA IN FOODS

TING-SU

ABSTRACT

The official culture method for detection of Salmonella in food products requires at least four days to obtain negative results. Development of a practical, rapid Salmonella detection method would be beneficial to the food industry. An enzyme immunoassay, (EIA) has been developed. In this project, twenty-six Salmonella serotypes were inoculated into five food types, the EIA and the official culture method were compared, the results showed: (1) The detection rate of EIA is higher than that of official method by 3%; (2) EIA has the screening function and the results could be obtained 24-48 hours earlier than the official culture method. A study of the performance of five agars

(Brilliant Green Agar, Bismuth Sulfite Agar, Hektoen Agar, Salmonella-Shigella Agar and Xylose Desoxycholate Agar), used individually or in combinations, showed that only the Salmonella-Shigella agar could not be used to satisfactorily detect Salmonella in the five food types. The particular four-agar combination, along with three-agar combinations (Brilliant Green Bismuth Sulfite Xylose Desoxycholate agars, and Bismuth Sulfite Hektoen Enteric Xylose Desoxycholate agars), were able to recover more Salmonella isolates than the combination currently recommended by the AOAC. Cross-reactivity with non-Salmonellae was not observed.