



食源性沙门氏菌快速检测技术

李 鑫¹, 刘 骞²

(1. 哈尔滨市顺达实业发展有限公司, 哈尔滨 150070; 2. 东北农业大学 食品学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 本文主要介绍了食源性沙门氏菌污染的危害, 并探讨了几种常见的先进的快速检测方法。这些快速检测方法对于沙门氏菌的检测具有良好的应用前景。

关键词: 食源性; 沙门氏菌; 快速检测

The Rapid Detection Methods of Food-borne *Salmonella*

LI Xin¹, LIU Qian²

(1. Harbin Shunda Industrial Development Co., Ltd., Harbin 150070, China;

2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: This passage mainly introduced the impairment of food-borne salmonella, and several mainly and advanced detection methods for it were also discussed. These rapid detection methods were of good application for detecting salmonella.

Key words: food-borne; *Salmonella*; rapid detection

中图分类号: TS201.3 文献标识码: B 文章编号: 1001-8123(2008)10-0067-04

0 引言

沙门氏菌是引起食物中毒的重要病原菌。在世界各国的各类细菌性食物中毒中, 沙门氏菌引起的食物中毒常居榜首。沙门氏菌病的临床症状主要包括头痛、恶心、腹痛、寒战、呕吐、腹泻和发热, 对人危害很大。Thunberg 等人^[1]指出沙门氏菌是一种与水果、蔬菜相关的细菌性肠病原体。在英国, 食物中毒就以沙门氏菌为首位, 美国则为第二位。我国内陆地区食物中毒则以沙门氏菌为首位。世界上最大的一起沙门氏菌食物中毒是1953年于瑞典由于猪肉引起的鼠伤寒沙门氏菌中毒, 7717人中毒, 90人死亡。沙门氏菌菌型繁多, 已确认的沙门氏菌有2500个以上的血清型。

沙门氏菌是肠杆菌科(Enterobacteriaceae)沙门氏菌属(*Salmonella*)的革兰氏阴性需氧或兼性厌氧杆

菌, 菌体大小为 $(1\sim3)\mu\text{m}\times(0.4\sim0.6)\mu\text{m}$, 无芽孢, 一般无荚膜, 除鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌外, 大多有周身鞭毛。沙门氏菌对营养要求不高, 分离培养常采用肠道选择鉴别培养基。生化反应对本属菌的鉴别具有重要参考意义。该属细菌不液化明胶, 不分解尿素, 不产生吲哚, 不发酵乳糖和蔗糖, 能发酵葡萄糖、甘露醇、麦芽糖和卫芽糖, 大多产酸产气, 少数只产酸不产气。VP试验阴性, 有赖氨酸脱羧酶。DNA的G+C含量为50~53%。对热抵抗力不强, 在60℃, 15分钟可被杀死。在水中存活2~3周。在5%的石炭酸中, 5分钟死亡。

有关沙门氏菌的检测方法的研究表明, 传统沙门氏菌检测方法, 由于其检测周期长、漏检率

收稿日期: 2008-07-07

作者简介: 李鑫, (1981-), 女, 哈尔滨市顺达实业发展有限公司研发中心研发员。 E-mail: xinxin030921@163.com Tel: 15945052964.

高、程序复杂、所需试剂繁多等缺点已远远不能满足现代检测要求。因此,多年来,建立快速而准确的检测方法一直是沙门氏菌检验研究的核心问题。目前,主要有以下几种。

1 分子生物学方法

1.1 聚合酶链反应技术

PCR 技术因具有简便、快速、敏感性高和特异性强的优点,现已广泛应用于微生物检测、遗传病诊断等领域。

在鄢志刚等人^[2]的研究中,免疫胶体金技术、直接 ELISA、PCR 法对鸡蛋、水样、牛奶、猪肉、牛肉、虾仁等样品 401 份进行沙门氏菌检测,并与常规国标方法对比,直接 ELISA 法的敏感性和特异性达 100% 和 97.3%,免疫胶体金技术敏感性和特异性达 100% 和 95.3%,PCR 法的敏感性和特异性均为 100%。通过对样品的检测,最终确定较优化的沙门氏菌检测程序。PCR 法的特异性优于免疫胶体金技术和直接 ELISA 法。

Sunil 等人^[3]用浓缩肉汤培养基和 PCR 联合方法建立了一种迅速的,敏感的,有效的检测食源性沙门氏菌的方法。该方法比传统的检测法耗时短。该法能检测出 4 CFU 沙门氏菌/25g 食品样品。用两种合成引物,分别是 TS11 和 TS4,一个 1.2 kb 的片段被放大,作为扩增引物。反应产生了一个单独的沙门氏菌的条带,使分析简单化。

黄金林等人^[4]根据沙门氏菌组氨酸转运操纵子基因序列设计引物,对沙门氏菌属 A~F 各群中共 15 株沙门氏菌标准菌株、27 株沙门氏菌现场分离菌株和其他 10 株非沙门氏菌菌株进行聚合酶链反应(PCR)扩增,结果沙门氏菌均出现 495 bp 特异性 DNA 扩增条带,所有对照均未出现特异条带,提示这对引物具有很强的沙门氏菌属特异性。PCR 敏感性试验显示,该体系能检出 14 pg 以上的沙门氏菌 DNA。通过对 5 种不同的 DNA 模板提取方法的比较,选择操作简便、快速、成本低廉的热裂解法。采用该方法,对生鲜奶样进行检测,经与国家标准卫生检验方法相比较,两者符合率达 100%。

1.2 荧光定量 PCR

荧光实时定量 PCR 技术是近年来广泛应用于快速检测的现代方法之一,它不仅实现了对 DNA 的定量检测,而且具有较高的敏感性、特异性、可靠性和时效性,且自动化程度高、无污染性,能够同时完成多样品的扩增及定量,适宜于大批样品的检测。

钟伟军等人^[5]研究发现,根据编码鼠伤寒沙门氏菌肠毒素 stn 基因的核苷酸序列设计 1 对引物和荧光探针,通过对荧光定量 PCR 反应体系和反应条件的摸索,建立了检测沙门氏菌的核酸荧光定量 PCR 方法。对该方法的特异性与敏感性研究结果显示,该方法检测沙门氏菌结果均为阳性,而非沙门氏菌均为阴性;对带有沙门氏菌肠毒素 stn 基因的阳性质粒的检测敏感性为 4 个/μL。用该方法对人工污染沙门氏菌的鲜猪肉和鲜鸡蛋进行检测,当检样中沙门氏菌初始含菌量分别为 1 CFU/g(鲜猪肉)和 1 CFU/g(鲜鸡蛋),经过 12h 的增菌后,检测结果均为阳性。该方法具有简便、快速、特异性强、敏感性高等特点。此研究为食品中沙门氏菌快速检测试剂盒的研制打下了良好的基础。

另外,Patricia 等人^[6]的研究则采用一种新的多重单管装置实时 PCR 技术来检测沙门氏菌,研究包括设计一种新的特异的沙门氏菌探针。反应条件调整到同时放大和检测特殊的片段,如复制起点片段顺序。分析用 SYBR Green I RTi-PCR 方法得溶解曲线,表明 Tm 值证明了对片段的放大是有效的。确定了 TapMan RTi-PCR 技术,使用荧光标记特殊的探针自动检测技术。

O'Connell 等人^[7]研究了应用实时 PCR 技术定量检测沙门氏菌时对电离辐射的作用。通过用三种商用试剂盒,在肉汤培养基中受到辐射的沙门氏菌中,InstaGene Matrix 是最有效的准备模板 DNA 程序。最低检测水平是 3log 单位/1000 个沙门氏菌。然而,当纯培养的沙门氏菌在 3 和 5 kGy 剂量下辐射,比起在 0~1 kGy 下辐射,CT 值会增加 1~1.5 倍。这表明辐射处理或许使细菌计数偏低,因为辐照导致了 DNA 片段损伤。

1.3 基因芯片技术

又称为 ONA 芯片或者 ONA 微阵列是生物芯片技术中发展最成熟和最先实现商品化的技术。它是基于核酸探针互补杂交技术原理而研制的。唐晓敏等人^[8]应用该技术于水中致病菌的快速检测,通过对分离的 20 株细菌(包括沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌等)进行了基因芯片的杂交检测,并用传统方法对这些菌株进行了鉴定,基因芯片检测结果与传统方法鉴定结果的一致性为 95%。

靳连群等人^[9]采用基因芯片技术对水中常见肠道致病菌进行检测和鉴定,对涉及 9 个菌属的 143 株致病菌在相同的条件下进行了杂交检测,得到菌属(科)特异性的杂交图谱,从而达到对细菌进行检测鉴定的目的。常见食源性致病菌基因芯片鉴

定技术,可为常规细菌检验方法的最终鉴定提供进一步佐证,尤其在一些培养条件苛刻的致病菌(产单核李斯特菌、弯曲杆菌等)的鉴定,以及在VI下EK仪无法鉴定和手工鉴定判断误差大的情况下,基因芯片方法将发挥其独特的技术性优势,大大提高检验鉴定结果的准确性。目前已有定型的产品用于食品中病原菌的检测,可以肯定这种检测技术有着良好的发展前景。

2 免疫学方法

2.1 酶联免疫吸附

1977年,Krynski与Heimsch首次将酶联免疫吸附测定法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay,简称ELISA)用于食品沙门氏菌的检测。

在检测猪感染沙门氏菌时总能发现不同的ELISA有大的偏差。因此Mainar-Jaime等人^[10]通过使用Bayes氏法对两种商业测定(Svanovir™和HerdCheck™)的准确性进行了评价,以此来检测猪胴体的沙门氏菌抗体的检测水平。研究结果表明,两种检测方法的整体的细菌学相对感受性都低(30%),但是Svanovir™的相对特异性比HerdCheck™显著性低(88%比95%)。但是两种方法都不能检测到猪感染一些沙门氏菌的血清型B和C1。

2.2 免疫磁性分离技术

Hagren等人^[11],用免疫磁珠分离法和实时PCR结合,建立起一个8小时的检测系统。样品制备在肉汤中扩增6小时,然后用免疫磁珠颗粒收集沙门氏菌。然后清洗颗粒,使用PCR反应器,反应器中用干的特异性反应试剂和内部放大装置。PCR是用一种新的实时荧光敏感标签技术进行的。定性分析结果是自动给出的,在样品加入后45分钟可得到。整体的准确性,敏感性,特异性分别是99.1%,98.4%和100.0%。

2.3 mini VIDAS

VIDAS沙门氏菌试剂盒(SLM)是检测食品和环境样品中沙门氏菌的全自动酶免疫分析技术。沙门氏菌抗原复杂,通过对菌体(O)脂多糖和鞭毛(H)蛋白抗原的鉴别可区分为2200个血清型。VIDASSLM技术应用针对(O)和(H)抗原的高特异性单克隆抗体,能够检测有动力或无动力的沙门氏菌^[12]。VIDAS系统自动完成全部实验程序。

3 沙门氏菌显色培养基法

以选择性培养基为基础,经过改良,使目标菌

在培养基上的菌落显示出一定颜色,便于识别。其原理是利用细菌特有生理生化反应,使培养基中指示剂产生颜色变化,以将目标菌与其他菌区分^[11]。其操作简便,即将食品样品增菌后直接划平板,置37℃培养18-24h,取出并观察培养皿上生长菌落的颜色。此外,其它沙门氏菌检测方法还有电导测定法、增菌血清学方法、微量热量测定法、生物发光法等等。

4 环状介导的等温放大测定法(LAMP)

Okamura等人^[13],用环状介导的等温放大测定法(LAMP)检测O9沙门氏菌特异的插入成分片段,在实验室水平上评估了该法在农田条件下的潜在性。LAMP检测法的检测限是 10^3 CFU/ml,比PCR法更敏感(10^6 CFU/ml)。用LAMP法只需30分钟,而PCR需要120分钟。总之,LAMP法是对O9属沙门氏菌血清型的一种有效地特异的检测方法。

5 SPR传感器快速检测

根据SPR生物传感器实时检测和高灵敏度的特点将其应用于食品中沙门氏菌的快速检测。通过采用亲和素-生物素系统保证检测的准确性,利用沙门氏菌抗体的免疫吸附反应,保证结果的特异性;引入复合抗体作为第二抗体放大检测的响应信号,使SPR生物传感器检测到沙门氏菌的浓度为 10^5 CFU/ml,并建立了细菌浓度与折射率对应的标准曲线。整个检测过程在1h以内完成,实现了快速检测。但由于检测到的细菌浓度较高,因此要提高实际应用价值需要进一步扩大传感器的检测限,相关研究正在进行中^[14]。

6 结论

近年来,人们一直致力于研究沙门氏菌的检测方法,但传统的检测方法,既消耗人力物力,又浪费时间,食品在上市前是否受到沙门氏菌的污染不能得到很好的检测。因此,科研工作者们一直在探索沙门氏菌的快速检测方法。随着分子生物学技术和免疫学技术的迅速发展,涌现出许多快速检测方法,其缩短了检测时间,提高了对致病菌的检测效率,也明显提高了检测方法的特异性和灵敏度。有关部门和食品企业应在此基础上对沙门氏菌的检测技术进行更深入的研究,研制出更快、更有效的检测方法,以保证食品的安全性和消费者的身体健康。

参考文献

- [1] Thunberg R L, Tran T T, Bennett R W, Matthews R N, Belay N. Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets[J]. *Journal of Food Protection*, 2002, 65, 677-682(6).
- [2] 郝志刚, 徐锋, 王建等. 食源性沙门氏菌快速检测技术的应用研究[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2008, 1, 19-20.
- [3] Saroj S D, Shashidhar R, Karani M, Bandekar J R. Rapid, sensitive, and validated method for detection of Salmonella in food by an enrichment broth culture Nested PCR combination assay[J]. *Journal of Molecular and Cellular Probes*, 2008, 22, 201-208.
- [4] 黄金林, 潘志明, 颜卫等. 沙门菌、产单核细胞李斯特菌多重PCR检测方法的建立及应用[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22, 1121-1123.
- [5] 钟伟军, 赵明秋, 邓中平等. 荧光定量PCR快速检测食品中沙门氏菌方法的建立及初步应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 3, 220-224.
- [6] Patricia E, Rosa A. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables[J]. *Journal of Food Microbiology*, 2008, 25, 705-713.
- [7] O'Connell K P, Bucher J R, Anderson P E, Cao C J, Khan A S, Gostomski M V, Valdes J J. Real-Time Fluorogenic Reverse Transcription-PCR Assays for Detection of Bacteriophage MS2[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72, 478-483.
- [8] 唐晓敏, 高志贤. 基因芯片快速检测常见水中致病菌的初步应用研究[J]. *解放军预防医学杂志*, 2003, 4, 94-96.
- [9] 靳连群, 李君文, 晁福寰等. 基因芯片检测肠道致病菌技术的建立和应用[J]. *中华传染病杂志*, 2004, 22, 24-26.
- [10] Mainar-Jaime R C, Atashparvar N, Chirino-Trejo M, Blasco J M. Accuracy of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Salmonella* spp. in slaughter pigs from Canada[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2008, 85, 41-51.
- [11] Hagren V, von Lode P, Syärjälä A, Korpimäki T, Tuomola M, Kauko O, Nurmi J. An 8-hour system for *Salmonella* detection with immunomagnetic separation and homogeneous time-resolved fluorescence PCR[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 125, 158-161.
- [12] 钟敏贤. 应用 miniVIDAS 检测食品中沙门氏菌效果分析[J]. *科技资讯*, 2008, 3, 231-232.
- [13] Okamura M, Ohba Y, Kikuchi S, Suzuki A, Tachizaki H, Takehara K, Ikeda M, Kojima T, Nakamura M. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid, sensitive, and specific detection of the O9 group of *Salmonella* in chickens[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 30, 154-160.
- [14] 王凯, 殷涌光. SPR 生物传感器快速检测沙门氏菌研究初探[J]. *食品科技*, 2007, 9, 192-197.