

食源性致病菌快速检测方法的探索研究

高飞, 曹进, 骆海鹏, 任秀, 刘娜, 陈怡文, 余文, 谢冠东, 崔生辉*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 探讨传统细菌培养法及荧光定量 PCR 检测两种检测方法在食源性致病菌上的检出效果。**方法** 对 2015 年采集的 7 类食品共 600 例样品采用传统细菌培养法及增菌后的增菌液荧光定量 PCR 检测, 对检测结果进行分析比较。**结果** 被检食品存在食源性致病菌污染, 600 例样品共检测出 35 株致病菌, 食品致病菌的总检出率为 5.83%, 其中副溶血性弧菌与金黄色葡萄球菌检出率最高, 达到 15%。蜡样芽胞杆菌检出率较高, 达到 10.00%。传统细菌培养法致病菌阳性检出率为 2.67%, 荧光定量 PCR 检测致病菌阳性检出率为 3.17%, 两种检测方法下的检出率差异没有明显差异($X^2=1.882$, $P>0.05$)。**结论** 检测中将传统细菌培养法同荧光定量 PCR 检测这两种检测方法结合起来, 不仅提高了食源性致病菌检出率, 也可缩短检测时间, 提高检出率。后续研究将继续加大样本量并覆盖更多食品种类。

关键词: 食源性致病菌; 传统细菌培养法; 荧光定量 PCR 检测法

Comparative research of different detection methods of foodborne bacteria

GAO Fei, CAO Jin, LUO Hai-Peng, REN Xiu, LIU Na, CHEN Yi-Wen, YU Wen,
XIE Guan-Dong, CUI Sheng-Hui*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To discuss the detection results by using the traditional bacterial culture method and the fluorescence quantitative PCR detection method. **Methods** Totally 7 kinds of food overall 600 samples were collected in 2015, and analyzed by the methods of fluorescence quantitative PCR detection and traditional bacterial culture, and test results were compared and analyzed. **Results** The foodborne pathogenic bacteria pollution was occurred in the food, 35 strains of pathogenic bacteria were detected in 600 samples, total detection rate of food pathogenic microbe was 5.83%, and the detection rates of *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aerogenes* were the highest, reaching 15.00%. Meanwhile, the detection rate of *Bacillus cereus* was relatively high, reaching 10.00%. The positive rate of pathogenic bacteria by traditional bacterial culture method was 2.67%, by fluorescence quantitative PCR detection method was 3.17%, and there was no significant difference ($X^2=1.882$, $P>0.05$) between the two kinds of detection methods. **Conclusion** The detection combined with the traditional bacterial culture method and the fluorescence quantitative PCR method, not only improved foodborne pathogen detection rate, but also shortened the detection time, and improved the detection sensitivity. Subsequent research will continue to focus on increasing the sample size and cover more types of food.

KEY WORDS: foodborne pathogens; traditional bacterial culture method; fluorescence quantitative PCR detection

基金项目: 北京市科技计划项目(D161100002116003)

Fund: Supported by the Beijing Municipal Science and Technology Project (D161100002116003)

*通讯作者: 崔生辉, 研究员, 主要研究方向为食源性病原菌鉴定与追踪技术、食源性病原菌耐药机制分析。E-mail: cuihenghui@aliyun.com

*Corresponding author: CUI Sheng-Hui, Research Fellow, National Institutes for Food and Drug Control, No.2, Tiantan West, Doncheng District, Beijing 100050, China. E-mail: cuihenghui@aliyun.com

1 引言

食源性疾病是指通过摄食而进入人体的包括食源性致病菌在内的致病因子所造成的疾病,食源性致病菌(金黄色葡萄球菌、沙门菌、大肠菌群等)对人类健康及食品安全造成了日益严重的威胁。WHO 报告表明,全球食源性疾病发病率呈上升趋势,在发展中国家,每年因腹泻致死的儿童达到 240 万人^[1],每年约有 180 万人死于食源性疾病^[2]。因此,对这些致病微生物怎样快速准确地检测,对危害因子如何有效遏制,是保证食品安全的一项首要任务。传统细菌培养法主要通过多次增菌及选择性分离培养等方法,过程复杂,耗时长,同当前快速发展的食品安全检测领域不相适应。而荧光定量 PCR 检测技术具有简单快速的特点,特别在样本量较大的食品应急检测中尤其重要^[3]。

本研究通过对 2015 年采集的 7 类共 600 例食品样品进行 10 种常见食源性致病菌的传统增菌法及增菌后增菌液的荧光定量 PCR 法的对比检测,列举了两种方法结合的优缺点,分析了两种方法的准确度和差异性,指出了方法中存在的问题和应对措施,为食品中食源性致病菌的快速检测提供参考。

2 材料及方法

2.1 材料、试剂与仪器

2.1.1 样品来源及种类

依据食源性致病菌监测方案的要求,2015 年采集婴幼儿配方奶粉、熟肉制品、即食面制品、调味品、果蔬类、烘烤食品、生食动物性水产品这 7 类食品的 600 例样品进

行传统细菌培养及荧光定量 PCR 检测。这 7 类食品样品主要来自本市的农贸市场、酒店餐馆、及大型超市。

2.1.2 实验菌株

实验中使用的阳性对照菌株如表 1 所示。

2.1.3 试剂

GN 增菌液, LB1、LB2 增菌液, 7.5% NaCl 肉汤增菌液, 亚硝酸盐脱氢酶增菌液(SC), 缓冲蛋白胨水(BPW), 3% 氯化钠碱性蛋白胨水, 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(mLST-Vm)、基础亚硫酸铋琼脂(BS)、TSI 琼脂、HE 琼脂、BP 琼脂、TSA 琼脂、弧菌显色培养基, 以上培养基均购自北京陆桥技术有限责任公司。志贺氏菌显色培养基和沙门氏菌显色培养基购自法国科玛嘉公司。所有培养基均在有效期内使用。各种食源性致病菌的 Real-time PCR 检测试剂盒均购自大连宝生物公司。

2.1.4 仪器

CFX96 型 PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)、DSS IX71 型显微镜(日本 OLYMPUS 公司)、MLS-3780 型高压灭菌器(日本 SANYO 公司)、MIR-262 型恒温培养箱(日本 SANYO 公司)、DW-FW351 型超低温冰箱(中国美菱公司)、ND 2000 型核酸蛋白分析仪(美国 THERMO SCIENTIFIC 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 传统细菌培养法

将各种样品严格按照 GB 4789 中的相关方法对上述食品进行 10 种致病菌的选择性增菌、平板分离培养、血清学鉴定、生化鉴定。

2.2.2 荧光定量 PCR 检测

对样品完成选择性的增菌之后,将增菌液取 1 mL,对其提取 DNA,按照产品说明书进行荧光定量 PCR 检测。

表 1 菌株信息
Table 1 Bacteria information

序号	菌种	拉丁名	菌株编号
1	沙门氏菌	<i>Salmonella</i>	CICC 21482
2	志贺氏菌	<i>Shigella</i>	CICC21679
3	单增李斯特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	CMCC(B)54002
4	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	CMCC44113
5	弗氏枸橼酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	CMCC(B) 48016
6	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aerogenes</i>	ATCC26003
7	蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	CMCC63511
8	空肠弯曲菌	<i>Campylobacter jejuni</i>	CICC22936
9	副溶血弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CICC21617
10	阪崎肠杆菌	<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29544

2.3 观察指标及统计方法

对样品内致病菌的阳性检出率进行统计, 并对传统细菌培养法及荧光定量 PCR 检测两种检测方法下的阳性检出率进行比较。

数据分析采用 SPSS 13.0 软件, 计量资料进行 *t* 检验, 并进行卡方检验, 当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 检测结果统计

实验中细菌纯培养物的灵敏度是 4.9×10^2 CFU/mL, DNA 检测的灵敏度是 0.1 pg, 分离菌株检测的符合率为 100%。利用传统细菌培养法及荧光定量 PCR 检测两种检测方法在 7 类食品中共检测出 35 株致病菌, 食品致病菌的总检出率为 5.83% (35/600)。具体如表 2 所示。

3.2 食品致病菌检出率比较

传统细菌培养法致病菌阳性检出率为 2.67%, 荧光定量 PCR 检测致病菌阳性检出率为 3.17%, 两种检测方法下的检出率未见统计学显著差异 ($X^2=1.882, P>0.05$)。具体如表 3 所示。

4 讨论与结论

食品安全与人类健康息息相关, 而病原微生物导致的食源性疾病是对食品安全产生影响的重要因素。对食品内病原菌进行快速检测, 为控制病原微生物传播的有效方法。传统细菌培养法步骤繁琐, 检测的周期长, 对病原体不能进行实时监测, 同现代化快速检测要求不相适应^[4]。而荧光定量 PCR 检测敏感性高、特异性强, 同通过核酸定量进行快速检测, 在食品微生物检测中被广泛应用^[5]。近年来, 食品检测领域的学者又在常规 PCR 检测技术上添加了多对引物^[6], 并将 DNA 片段进行多条目扩增^[7], 使得 PCR 检测技术具有如下优势: (1) 高效性: 能对多种病原体进行一次性检测^[8]; (2) 准确性: 漏检率低, 检测准确率高^[9]; (3) 系统性: 对成组的病原微生物检测比较适合^[10]。

通过此次研究证实, 熟制米面食品内蜡样芽孢杆菌检出率高, 达到了 10.00%, 我国的相关食品标准内对蜡样芽孢杆菌残留的限定值没有明确规定, 但有学者认为当蜡

样芽孢杆菌 $> 10^6$ /g 食品时就可能导致食品中毒^[11]。副溶血弧菌多在生食类的动物性水产品中检出率高^[12], 随经济发展, 我国沿海居民有生食海鲜的习惯, 感染该菌的风险增大。金黄色葡萄球菌是导致食品污染, 造成食品中毒的一种最常见致病菌, 因此检出率高。阪崎肠杆菌易从婴幼儿配方奶粉的样品中检出, 阪崎肠杆菌为食源性致病菌, 对婴幼儿危害大, 本次研究中也检出。鉴于检测结果, 今后应加强对婴幼儿食品致病微生物的实时监测及预警。

此次研究中我们对各种增菌液进行荧光定量 PCR 检测, 并同传统细菌培养法进行比较。传统细菌培养法致病菌阳性检出率为 2.67%, 荧光定量 PCR 检测致病菌阳性检出率为 3.17%, 两种检测方法下的检出率差异没有明显差异 ($X^2=1.882, P>0.05$)。但荧光定量 PCR 检测同传统细菌培养法相比, 操作更为简单, 检测时间缩短, 病原体检出率高。但是在检测过程中, 部分样品通过荧光定量 PCR 检测呈现阳性, 但是却并没有将相应菌株培养出, 荧光定量 PCR 检测对副溶血弧菌及金黄色葡萄球菌检测各出现 5 例阳性样品, 我们分析出现这种情况有两种原因: (1) 假阳性: 增菌液出现了外源性 DNA 污染或者扩增过程中产生了非特异性的产物, 导致检测的灵敏度降低^[13]。(2) 分离成功率低: 传统细菌培养检测的敏感度低, 增菌液内的目标菌数量少^[14]。

表 2 食品中致病菌的检出率 (%)
Table 2 Detection rate of pathogenic bacteria in food (%)

序号	菌种	样品份数	检出数 (%)
1	沙门氏菌	60	4(6.67)
2	志贺氏菌	60	0
3	副溶血弧菌	60	9(15.00)
4	单增李斯特氏菌	60	2 (3.33)
5	空肠弯曲菌	60	0
6	阪崎肠杆菌	60	2 (3.33)
7	金黄色葡萄球菌	60	9(15.00)
8	蜡样芽孢杆菌	60	6(10.00)
9	大肠埃希氏菌	60	3(5.00)
10	弗氏枸橼酸杆菌	60	0

注: 对同一份样品同时进行多种致病菌的检测。

表 3 两种方法比较食品致病菌检出率结果 (%)
Table 3 Comparison of foodborne pathogenic bacteria detection rate of two methods (%)

方法	副溶血弧菌	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌	阪崎肠杆菌	蜡样芽孢杆菌	单增李斯特菌	大肠杆菌	检出率 (%)
荧光定量 PCR 检测	5	2	5	1	3	1	2	3.17%
传统细菌培养法	4	2	4	1	3	1	1	2.67%
X^2								1.882
<i>P</i> 值								0.068

通过研究发现在对食品进行食源性致病菌的检测过程中,可以将传统细菌培养法同荧光定量 PCR 检测这两种检测方法结合起来,首先进行选择性的增菌,随后对增菌液进行荧光定量 PCR 检测,检测阳性者直接对病原菌进行选择性的分离培养及生化检查。这样不仅能让食源性致病菌检出率大大提高,同时也能缩短时间,提高检测阳性率。同时,荧光定量 PCR 技术在食品转基因检测、食品掺假检测等方面也有广泛的应用空间^[15]。

参考文献

- [1] WHO. Background paper: Developing a food safety strategy draft [Z]. 2001
- [2] 总局全面部署打击保健食品“四非”专项行动 [EB/OL]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1523/81960.html>. 2013-05-20.
The special action of "four not" against health food was comprehensively deployed by Administration [EB/OL]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1523/81960.html>. 2013-05-20
- [3] 周千渝, 张延国, 黄成才, 等. 食源性致病菌 MALDI-TOF MS 检测方法的建立与应用 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(18): 59-64.
Zhou QY, Zhang YG, Huang CC, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification and detection of foodborne pathogens [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(18): 59-64.
- [4] 周晓红, 徐佩华, 孙明华, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在食源性致病菌快速检测中的应用 [J]. 上海预防医学, 2014, (6): 313-317.
Zhou XH, Xu PH, Sun MH, et al. Application of real time fluorescent quantitative PCR technology in rapid detection of food borne pathogens [J]. Shanghai J Pre Med, 2014, (6): 313-317.
- [5] 耿蕊, 刘继超, SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法快速检测沙门氏菌 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(3): 147-150.
Geng R, Liu JC. Rapid detection of *Salmonella* spp. by SYBR Green I real-time polymerase chain reaction [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(3): 147-150.
- [6] 白卫滨, 曹春廷. 采用多重 PCR 技术检测转基因番木瓜华农一号 [J]. 食品与发酵工业, 2015, (6): 165-169.
Bai WB, Cao CT, Zhu CJ, et al. Detection of transgenic papaya Huanong No.1 by universal multiple-primer PCR [J]. Food Ferment Ind, 2015, (6): 165-169.
- [7] Franciosa G, Pourshaban M, et al. Identification of type A, B, E, and F botulinum neurotoxin genes and of botulinum neurotoxicogenic clostridia by denaturing high-performance liquid chromatography [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 4170-4176.
- [8] Koontz D, Baecher K, Amin M, et al. Evaluation of DNA extraction methods for the detection of Cytomegalovirus in dried blood spots [J]. J Clin Virol, 2015, 66: 95-99.
- [9] 何海宁, 洪鑫, 冯玉升, 等. 加工食品中动物源 DNA 的提取和多重 PCR 检测方法的建立 [J]. 食品与机械, 2015, (6): 79-83.
He HN, Hong X, Feng YS, et al. Extraction of animal-derived DNA in processed food and establishment of multiplex PCR method [J]. Food Mach, 2015, (6): 79-83.
- [10] 于淼, 薛惠昌, 王卓, 等. 沈阳地区致泻性大肠埃希菌的多重 PCR 检测及流行特征分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2015, (11): 1017-1019.
Yu M, Xue HC, Wang Z, et al. Use of multiplex PCR to identify diarrheagenic *Escherichia coli* in the Shenyang area and an analysis of its epidemiological characteristics [J]. J Pathogen Biol, 2015, (11): 1017-1019.
- [11] 曹伟丽, 汪崇文, 肖瑞, 等. 表面增强拉曼光谱在食源性致病菌检测中的应用 [J]. 生物技术通讯, 2015, (4): 591-594.
Cao WL, Wang CW, Xiao R, et al. Surface enhanced Raman spectroscopy and its application in the detection of foodborne pathogens [J]. Lett Biotechnol, 2015, (4): 591-594.
- [12] 纪懿芳, 胡文忠, 姜爱丽等. 海产品中副溶血弧菌检测方法研究进展 [J]. 食品工业科技, 2015, (5): 365-368.
Ji YF, Hu WZ, Jiang AL, et al. Advancement of detection techniques for *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, (5): 365-368.
- [13] 李春风, 赵勇, 王晓英, 等. 基于上转换发光免疫层析技术的常见食源性致病菌快速检测方法研究与评价 [J]. 军事医学, 2015, 39(2): 128-132.
Li CF, Zhao Y, Wang XY, et al. Development of up-converting phosphor technology based lateral flow assay for quantitative detection of foodborne pathogens [J]. Military Med Sci, 2015, 39(2): 128-132.
- [14] 金玉娟, 陈应坚, 甘莉萍, 等. 应用液相芯片技术联合多重 PCR 快速检测四种常见食源性致病菌的研究 [J]. 热带医学杂志, 2015, 15(6): 735-740.
Jin YJ, Chen YJ, Gan LP, et al. Application of a suspension array technology and the multiplex PCR for rapid detection of four common food-borne pathogens [J]. J Trop Med, 2015, 15(6): 735-740.
- [15] 程海星, 郭月英, 任霆, 等. 实时荧光定量 PCR 技术原理及在食品检测中的应用 [J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(3): 243-246.
Cheng HX, Guo YY, Ren T, et al. Principle and application of fluorogenic real-time PCR in food detection [J]. Food Ferment Ind, 2015, 41(3): 243-246.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



高飞, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为微生物检验与分析。

E-mail: cosmetic_detection@163.com



崔生辉, 研究员, 主要研究方向为食源性致病菌鉴定与追踪技术、食源性病原菌耐药机制分析。

E-mail: cuishenghui@aliyun.com