

PCR 法快速检测三种食源性致病菌的研究

王攀*, 王萍, 高林

(通标标准技术服务(上海)有限公司, 上海 200233)

摘要: **目的** 探讨用 PCR 方法快速检测食品中沙门氏菌(*Salmonella* spp.)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和志贺氏菌(*Shigella* spp.)的实用性。**方法** 采用能力验证实验和超市样品检测实验对 PCR 方法与传统检测方法进行比较。**结果** 与传统检测方法相比, PCR 方法检测以上三种食源性致病菌的结果准确率达到 99% 以上, 假阳性率低于 1%, 假阴性率为 0。**结论** PCR 检测方法具有检测周期短等优点, 可以在当前的食品安全检测工作中应用推广。

关键词: PCR 方法; 沙门氏菌; 金黄色葡萄球菌; 志贺氏菌; 食品检测

Rapid determination of three food-borne bacterial pathogens using PCR method

WANG Pan*, WANG Ping, GAO Lin

(SGS-CSTC Standards Technical Services Co., Ltd. Shanghai Branch, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To rapidly detect *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Shigella* spp. in food by PCR. **Methods** The detection performance of PCR method was compared with that of traditional method by proficiency testing and testing of supermarkets samples. **Results** The correct rate of PCR method was more than 99%, the false positive rate was less than 1%, and the false negative rate was zero. **Conclusion** The PCR method is high-effective in testing three food-borne bacterial pathogens, with the advantage of a short detection period, which could be applied in present food safety testing.

KEY WORDS: PCR method; *Salmonella* spp.; *Staphylococcus aureus*; *Shigella* spp.; food testing

食源性致病菌是引起食源性疾病的首要原因, 食源性致病菌对人类健康造成的危害极大, 是食品安全的重大隐患。据 WHO 估计, 发达国家每年约 30% 的人口患食源性疾病, 发展中国家情况更为严重, 估计每年腹泻及相关疾病约有 2.7 亿病例, 导致 240 万 5 岁以下儿童死亡^[1]。

当前, 在食品生产和流通中, 企业和政府监管部门均需对大批食品进行致病菌的检测, 样本量大、时间紧。而传统的食源性致病菌检测方法主要是细菌学培养法, 通常需经富集培养、形态观察、生理生化

鉴定等过程, 操作复杂、耗时费力^[2]。针对这种情况, 多种食源性致病菌的 PCR 快速检测方法被建立起来。如 2001 年 Ferretti 等^[3]采用多重聚合酶链反应 (PCR) 技术对食品中的沙门氏菌进行了快速检测, 2012 年荣策等^[4]建立了检测鼠伤寒沙门氏菌的实时荧光 PCR 法, 2003 年许龙岩等^[5]做了 PCR 方法检测志贺氏菌的研究, 2006 年杨洋等^[6]建立了乳品中金黄色葡萄球菌的 PCR 检测方法等。另外, 多个国家颁布了检测食源性致病微生物的 PCR 方法标准, 但基于 PCR 技术的普及程度和 PCR 技术的特点, 很多食

*通讯作者: 王攀, 主要研究方向为食品安全检测技术。E-mail: Jason-p.wang@sgs.com

*Corresponding author: WANG Pan, SGS-CSTC Standards Technical Services Co., Ltd. Shanghai Branch, 5/F, The 3rd Building, No.889 Yishan Road, Xuhui District, Shanghai 200233, China. E-mail: Jason-p.wang@sgs.com

品安全检测人员对 PCR 方法检测食源性致病菌的准确性仍有怀疑,且缺乏 PCR 检测方法实际应用的数据,因此在日常的食品安全检测中不能很好的接受和推广 PCR 法检测食源性致病菌。本研究通过对 PCR 方法快速检测沙门氏菌(*Salmonella* spp.)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和志贺氏菌(*Shigella* spp.)的实用性展开探讨,希望为广大食品致病菌检测人员提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂和设备

沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌能力验证样品由通标标准技术服务(上海)有限公司(下简称 SGS 上海)能力验证中心制备。

超市采样检测的样品,包括自制熟食、米面点心、烘焙食品、水产品、蔬菜水果、肉类及食品接触表面涂抹取样。

Oxoid 致病菌分离及鉴定培养基购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;DNA 提取试剂盒、DNA Ladder Marker、核酸回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;PCR 反应液、*Taq* 酶购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司;PCR 引物由 Invitrogen 上海英骏生物技术有限公司合成。

Verity 梯度 PCR 仪购自美国应用生物系统公司;高速台式离心机购自德国 Eppendorf 公司;生物电泳图像分析系统购自上海复日科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 传统食源性致病菌检验方法

参照 GB/T 4789.4-2010 食品微生物学检验 沙门氏菌检验^[7]; GB/T 4789.10-2010 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验^[8]; GB/T 4789.5-2012 食品微生物学检验 志贺氏菌检验^[9]。

1.2.2 食源性致病菌 PCR 检测法

沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和志贺氏菌的检测参照 SN-T 1869-2007 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法^[10]。

2 结果与分析

2.1 能力验证实验结果

借助已通过英国皇家认可委员会(UKAS)认可的 SGS 上海能力验证中心制备了沙门氏菌、金黄色葡萄

球菌、志贺氏菌的能力验证食品样品,并设计无杂菌污染、轻度杂菌污染和全为杂菌污染三种样品类型,分别采用食源性病原菌传统检测方法和 PCR 检测方法进行对比性实验,进而评价以上三种食源性病原菌的 PCR 检测方法。

能力验证实验的结果见表 1,对于无杂菌和轻度杂菌污染(菌体数量按 1:1 掺入非目标菌)的样品,两种检测方法均检测出阳性结果;对于全为杂菌的样品,两种检测方法的检测结果均为未检出致病菌。从能力验证实验的结果来看,食源性致病菌传统检测方法和 PCR 检测方法的检测结果完全一致。

2.2 超市采样检测结果

为了比较食源性致病菌传统检测方法和 PCR 检测法在检测常规食品上的差异,本研究从食品超市采集食品及相关样品 427 份进行食源性致病菌检测。检测结果(表 2)表明,在 118 份沙门氏菌测试样品中,传统检测方法与 PCR 检测方法均检测出 2 份样品为沙门氏菌阳性;在 197 份金黄色葡萄球菌测试样品中,传统检测方法确认有 2 份样品为金黄色葡萄球菌阳性,而 PCR 检测方法检测出 3 份样品为金黄色葡萄球菌阳性;在 112 份志贺氏菌测试样品中,传统检测方法未检测出志贺氏菌阳性样品,PCR 检测方法检测出 1 份样品为志贺氏菌阳性。按照 SN-T 1869-2007 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法的要求,所有 6 份 PCR 法检测出的致病菌阳性样品通过 GB/T 4789 的相关方法最终确认出其中 4 份样品为致病菌阳性,且样品编号与传统方法检测结果相同。

为了更加直观地比较食源性致病菌传统检测方法和 PCR 检测方法,本研究以食源性致病菌传统检测方法的检测结果为真实值,计算出食源性致病菌 PCR 检测方法的结果准确率(即 PCR 法检测结果正确的样品数/样品总数)、结果假阳性率(即 PCR 法检测结果为阳性但传统检测方法确认为阴性的样品数/样品总数)、结果假阴性率(即 PCR 法检测结果为阴性但传统检测方法确认为阳性的样品数/样品总数)。计算结果见表 3,在本次研究中,PCR 方法检测沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和志贺氏菌测试样品的结果正确率分别为 100.0%、99.5%和 99.1%,结果假阳性率分别为 0、0.5%和 0.9%,而结果假阴性率均为 0。总计本次研究检测的 427 份样品中,食源性致病菌 PCR 检测方法检测结果的准确率达到 99.5%,假阳性率仅为 0.5%,而假阴性率为 0,即没有出现漏检致病菌阳性的情况。

表 1 能力验证实验比较食源性致病菌传统检测方法和 PCR 检测方法

Table 1 Comparison of traditional method and PCR method for foodborne pathogens detection by proficiency testing experiments

能力验证项目	样品设计杂菌污染程度	传统方法检测结果	PCR 法检测结果
沙门氏菌	无	+	+
	轻度	+	+
	全为杂菌	-	-
金黄色葡萄球菌	无	+	+
	轻度	+	+
	全为杂菌	-	-
志贺氏菌	无	+	+
	轻度	+	+
	全为杂菌	-	-

注: +: 检出; -: 未检出

表 2 超市采样检测比较食源性致病菌传统检测方法和 PCR 检测方法

Table 2 Comparison of traditional method and PCR method for foodborne pathogens detection by supermarket sampling and testing

检测致病菌	样品数量	传统检测方法		PCR 检测法	
		阴性结果	阳性结果	阴性结果	阳性结果
沙门氏菌	118	116	2	116	2
金黄色葡萄球菌	197	195	2	194	3
志贺氏菌	112	112	0	111	1
合计	427	423	4	421	6

表 3 PCR 方法检测三种食源性致病菌的结果准确率、假阳性率和假阴性率

Table 3 Accuracy, false positive rate and false negative rate of three foodborne pathogens by PCR method

	结果准确率(%)	结果假阳性率(%)	结果假阴性率(%)
沙门氏菌测试样品	100.0	0	0
金黄色葡萄球菌测试样品	99.5	0.5	0
志贺氏菌测试样品	99.1	0.9	0
全部测试样品	99.5	0.5	0

3 讨 论

本研究以通过了 CNAS(China National Accreditation Service for Conformity Assessment)和 CMAF(China Metrology Accreditation for Food)认可的传统检测方法 GB/T 4789.4-2010、GB/T 4789.10-2010 和 GB/T 4789.5-2012 的检测结果为真实值,通过能力验证实验和超市样品检测实验比较了沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和志贺氏菌的传统检测方法和 PCR 检测方法。其中能力验证实验的结果显示,PCR 方法检测以上三种食源性致病菌的检测结果与传统检测方法完全一致;超市采样检测以上三种食源性致病菌的实验结果表明,PCR 检测方法检测结果的准确率达到

99%以上,假阴性率为 0,说明 PCR 检测方法对以上三种食源性病原菌均有很好的检测特异性,且对以上三种食源性致病菌阳性样品未存在漏检。另一方面,PCR 检测方法在检测超市食品样品时约有 1%的结果呈现致病菌假阳性,分析其原因,可能是有致病菌死细胞 DNA 残留或者外源的致病菌 DNA 污染检测样品所致^[11],如果检测实验室的质量管理更加严格,PCR 检测方法的假阳性率应该可以控制在更低水平。在本研究中,PCR 方法检测以上三种食源性致病菌从样品制备到得到检测结果所需时间约 30 h 左右,相比于传统检测方法 4~7 d 的检测时间,大大缩短了检测周期。

目前,食品安全问题日益严峻,如何快速的排

查食品生产、流通及消费等环节中潜在的食源性致病菌隐患已是当务之急。本研究的结果表明,PCR检测方法检测沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和志贺氏菌具有特异性强、检测周期短等优点,可以在食品企业的质量控制、政府部门的市场监管及第三方检测中发挥更大的作用和价值。

参考文献

- [1] 蔡亦红,姚余有. 3种食源性致病菌的多重PCR快速检测方法的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(11): 1959-1962.
Cai YH, Yao YY. Establishment and application of multiple PCR for diagnosing three food-borne bacterial pathogens [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(11): 1959-1962.
- [2] 韦兵,刘永松,赵明. 食源性致病菌快速检测方法研究进展[J]. 河北农业科学, 2008, 12(2): 3-5.
Wei B, Liu YS, Zhao M, *et al.* Advance on methods for fast detection of foodborne pathogenic bacteria [J]. J Hebei Agr Sci, 2008, 12(2): 3-5.
- [3] Ferretti R, Mannazzu I, *et al.* Twelve-Hour PCR-Based method for detection of *Salmonella spp.* in food [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(2): 977-978.
- [4] 荣策,赵彤彤,许龙岩,等. 实时荧光PCR法检测鼠伤寒沙门氏菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(4):300-305.
Rong C, Zhao TT, Xu LY, *et al.* Detection of *Salmonella typhimurium* by real-time fluorescent PCR [J]. J Food Safe Qual, 2012, 3(4): 300-305.
- [5] 许龙岩,李志勇,王志强,等. PCR方法检测志贺氏菌的研究[J]. 检验检疫科学, 2003, 13(5): 28-29.
Xu LY, Li ZY, Wang ZQ, *et al.* Study on detection of *Shigella* by PCR method [J]. J Inspect Quarantine, 2003, 13(5): 28-29.
- [6] 杨洋,张伟,袁耀武,等. PCR检测乳制品中金黄色葡萄球菌[J]. 中国农业科学, 2006, 39(5): 990-996.
Yang Y, Zhang W, Yuan YW, *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus* in dairy products by polymerase chain reaction assay [J]. Sci Agr Sin, 2006, 39(5): 990-996.
- [7] GB 4789.4-2010 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2010 National food safety standard Food microbiological examination: *Salmonella* [S].
- [8] GB 4789.10-2010 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S].
GB 4789.10-2010 National food safety standard Food microbiological examination: *Staphylococcus aureus* [S].
- [9] GB 4789.5-2012 食品微生物学检验 志贺氏菌检验[S].
GB 4789.5-2012 National food safety standard Food microbiological examination: *Shigella* [S].
- [10] SN/T 1869-2007 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR法[S].
SN/T 1869-2007 Rapid detection methods for pathogens in foods—PCR method [S].
- [11] 张永祥,辛锡龙. PCR技术在致病菌检测中的应用[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2003, 26(2): 116-118.
Zhang YX, Xin XL. Application of PCR method for detection of pathogens [J]. Chin J Front Health Quarantine, 2003, 26(2): 116-118.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



王攀, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: Jason-p.wang@sgs.com