

# 沙门氏菌检验及鉴定方法研究进展

段星星, 曾晓琮, 周 露\*

(广东省食品检验所, 广州 510435)

**摘 要:** 沙门氏菌在一个多世纪以来被认为是引起人类和动物疾病的主要食源性病原体, 因此也导致了高昂的医疗和经济成本。努力开发有效和可靠的沙门氏菌检测方法至关重要。本文主要对目前用于沙门氏菌检测的技术和方法进行了综述, 根据检测原理的不同分为常规培养方法、基于免疫学测定的方法、基于核酸测定的方法和生物传感器。传统常规培养法虽然在沙门的鉴定方面的准确性和特异性有不可否认的优势, 但是也具有一定的缺陷, 比如耗时长等。新兴的分子生物学快速检测及鉴定等方法能够快速、准确的对沙门氏菌进行鉴定, 但可能对设备、技术人员、环境要求较高。随着生物学、化学、物理等学科快速发展, 应寻求多学科结合、取长补短, 使准确、快速、灵敏检测食品中沙门氏菌成为现实。

**关键词:** 沙门氏菌; 检测技术; 鉴定方法

## Research progress on the detection and identification methods of *Salmonella*

DUAN Xing-Xing, ZENG Xiao-Cong, ZHOU Lu\*

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

**ABSTRACT:** *Salmonella* has been considered as a major and important foodborne pathogen for humans and animals for more than a century, leading to a high medical and economic costs. Efforts for developing effective and reliable *Salmonella* detection methods are essential. This article mainly reviewed the current technologies and methods for the detection of *Salmonella*. According to different detection principles, they were divided into conventional culture methods, immunological-based assays, nucleic acid-based assays, and biosensors. Although the traditional conventional culture method has undeniable advantages in the accuracy and specificity of the identification of *Salmonella*, it also has certain shortcomings, such as time-consuming. Emerging methods such as rapid detection and identification of molecular biology can quickly and accurately identify *Salmonella*, but many have a higher demand for equipment, technical personnel and the environment. With the rapid development of biology, chemistry, physics and other disciplines, we should seek multi-disciplinary combination, learn from each other and make it possible to detect *Salmonella* in food accurately, quickly and sensitively.

**KEY WORDS:** *Salmonella*; detection technology; identification methods

基金项目: 广东省市场监督管理局科技项目(2020ZS02)、广东省食品检验所 2019 年科技创新项目(2019JS01)

**Fund:** Supported by the Science and Technology Project of Guangdong Market Supervision Administration (2020ZS02) and the Science and Technology Innovation Project of Guangdong Institute of Food Inspection (2019JS01)

\*通讯作者: 周露, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。E-mail: zhoululu1982@sohu.com

\*Corresponding author: ZHOU Lu, Ph.D, Senior Engineer, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China. E-mail: zhoululu1982@sohu.com

## 1 引言

沙门氏菌(*Salmonella*)是 100 多年来在许多国家引起食物中毒的最常见和主要诱因<sup>[1]</sup>。沙门氏菌作为一种革兰氏阴性菌,分为 6 个亚属,目前已经有超过 2500 种血清型被鉴定<sup>[2,3]</sup>,是重要的人畜共患病的病原体。其能损伤人体免疫系统,造成多种疾病。多数沙门氏菌能够引起肠胃炎,少数血清型如伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌 A、副伤寒沙门氏菌 B 和副伤寒沙门氏菌 C(伤寒沙门氏菌)能够引起肠热,是一种严重的疾病<sup>[4]</sup>。与人类疾病相关的最常见的血清型还有肠炎沙门氏菌等<sup>[5,6]</sup>。

据报道,在美国每年有超过 140 万人向疾病控制和预防中心报告感染沙门氏菌<sup>[7]</sup>;在欧洲,每年有超过 16 万人感染沙门氏菌,发生率为 0.035%<sup>[8]</sup>;在中国最近 2 年,出现了多起由沙门氏菌感染引起的中毒事件<sup>[9]</sup>。细菌性食物中毒中 70%~80%是由沙门氏菌引起,严重危害人民身体健康和生命安全,已成为目前最为关注的公共卫生问题之一<sup>[10]</sup>。

在 1990 年以前,大多数由沙门氏菌引起的疾病都是由于食用动物产品引起的,例如家禽、家禽产品、奶制品等。但是目前越来越多的疾病与食用新鲜的农产品有关,如西红柿、瓜、豆芽、绿叶蔬菜和浆果等<sup>[11]</sup>。因此开发出快速检测沙门氏菌的检测方法,对减少饲料和食品生产任何阶段的沙门氏菌病原体至关重要<sup>[12]</sup>。

本文对目前对沙门氏菌的检验及鉴定的最新方法进行概述,并对各种沙门氏菌检测方法进行比较,为发展快速、高效、准确的沙门氏菌检测方法提供参考。

## 2 传统沙门氏菌鉴定方法

传统沙门氏菌的分离包括对指定重量或体积的样品进行非选择性预富集,然后进行选择富集步骤,铺在选择性琼脂上,并对可疑菌落进行生化和血清学确认。目前国内检验其主要参考依据为 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验沙门氏菌检验》<sup>[13]</sup>,其主要包括在缓冲液(buffer peptone water)中样品的预富集,然后在亚硒酸盐胱氨酸(selenite cystine)肉汤和四硫磺酸钠煌绿(tetrasulphonate brilliant)肉汤中进行选择性增菌。最后对筛选的可疑菌株进行生化鉴定及血清分型。在国际上目前也是采用类似的方法检验沙门氏菌,如 ISO 6579-2017<sup>[14]</sup>,其主要包括在缓冲液中样品的预富集,然后在 Rappaport-Vassiliadis Soya 肉汤和 Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin 肉汤中进行选择性增菌。最后在选择培养基上划线分离,对筛选的可疑菌株进行生化鉴定及血清分型。传统方法的结果在可靠性、灵敏性和特异性方面具有一定的优势<sup>[15]</sup>,但是传统的检验方法存在耗时等

问题,在食品快速应急响应方面回应不及时。

## 3 免疫学分析检验方法

免疫分析检测技术是利用与体细胞或鞭毛抗原结合的特异性单克隆或多克隆抗体的测定方法,目前已被广泛用于沙门氏菌的检测<sup>[15]</sup>。基于免疫学的测定主要包括酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫荧光法和免疫磁珠分离技术、胶乳凝集试验、免疫扩散和免疫色谱法等。

### 3.1 酶联免疫吸附法

在基于免疫学的测定中,ELISA 是检测沙门氏菌属抗原或产物的最常用测定法。已经开发了不同的 ELISA 系统。在 ELISA 分析中,沙门氏菌属特异性的抗原与结合至固体基质的适当抗体结合。形成抗原抗体复合物后,通过生色底物的酶促裂解引起的颜色变化来测量沙门氏菌的浓度<sup>[16,17]</sup>。伍燕华等<sup>[18]</sup>研究以福尔马林灭活的鼠伤寒沙门氏菌免疫雌性日本大耳兔,制备抗沙门氏菌多克隆抗体。以抗沙门氏菌多克隆抗体作为捕获抗体,以抗沙门氏菌单克隆抗体 C1359 作为检测抗体,对 A、B、C、D、E 等 5 种典型的沙门氏菌,对沙门氏菌纯培养液的最低检测量为  $1 \times 10^4$  CFU/mL。Febo 等<sup>[19]</sup>选择了特异性单克隆抗体 4E6F11 检测了 84 个样品并与用 ISO 6579:2002 相比显著一致。相对灵敏度、特异性和准确性分别为 100%、81.0% 和 90.5%。目前基于 ELISA 的商业化试剂盒市面上已经有多种,其在特异性及准确性上具有优势,在沙门氏菌的筛查方面已经发挥了巨大的作用。

### 3.2 胶乳凝集法

凝集技术采用乳胶粒子,其表面涂有抗体,这些抗体与沙门氏菌细胞表面的抗原发生反应,形成可见的聚集物,可用于鉴定沙门氏菌阳性样本<sup>[20]</sup>。杨磊<sup>[21]</sup>用反相微乳体系制备彩色二氧化硅微球,再通过化学交联法将抗体修饰到彩色二氧化硅微球表面制备得到免疫彩色二氧化硅微球。通过对鸡白痢鸡伤寒沙门氏菌检测得到其凝集结果醒目、直观、易于肉眼判别,且耗用抗体不到常规凝集试验的 1/500,对目标菌的检测范围为  $10^2 \sim 10^9$  CFU/mL;重复性和稳定性好,4 °C 放置 28 d 后,凝集效果与放置前无显著差异;具有较好的特异性和准确性。其在沙门氏菌的检测方面可能在灵敏度上有一定的补足,后期可以在筛选灵敏性更高、特异性更强的抗体方面进行研究。

### 3.3 免疫磁珠分离法

免疫磁珠分离技术是将直径为 0.02 ~ 5  $\mu\text{m}$  具有超顺磁性的微粒的表面经化学修饰,使之与特异性抗体牢固结合,成为能与特异性抗原(待测菌)结合且有磁性的微珠,即免疫磁珠<sup>[22]</sup>。

赵瑞雪等<sup>[23]</sup>通过对免疫磁珠制备条件的优化,使制备的免疫磁珠分散性好、捕获率高、特异性强,依据国标采样方法,在 25 mL 体系牛奶样品对痕量鼠伤寒沙门氏菌进行捕获分离,检出率达到 100%,可以满足大体积捕获要求。Du 等<sup>[24]</sup>制备了免疫磁珠,沙门氏菌含量低于  $10^6$  CFU/mL 时,其捕获效率超过 90%。IMS 在没有预富集的情况下对 25 mL 样品进行吸附,将捕获的目标病原体在缓冲蛋白水中短时间培养。再与酶联免疫吸附测定,环介导等温扩增和荧光定量实时 PCR 结合,可在 6.5~8 h 内检测到大约  $10^{-1}$  CFU/mL 的沙门氏菌(25 mL 牛奶中 12.3 CFU)。免疫磁珠分离法已经被广泛的应用于食源性致病菌的检测,说明其在食源性具有巨大的前景,后期可以朝着开发分散性更好、捕获率更高、特异性更强的免疫磁珠的方向努力。

## 4 分子生物学分析检验方法

分子生物学检测技术是以特异性核酸序列检测为基础,并在遗传物质水平的基础上来鉴定某种致病菌种属的方法<sup>[25]</sup>。在过去的 20 年中,该检测方法在沙门氏菌检测方法中进行了最深入的研究和开发,因为它们与其他方法相比具有灵敏度、特异性和包容性方面的优势,可快速鉴定沙门氏菌而无需获得纯培养物<sup>[26]</sup>。目前常用的分子生物学方法有常规 PCR、实时荧光定量 PCR、环介导等温扩增、DNA 探针杂交等。

### 4.1 常规 PCR

PCR 是一种基于特异性引物的设计和靶序列的选择,并在体外酶促合成特异 DNA 片段,类似于 DNA 天然复制的分子生物学技术<sup>[27]</sup>。刘艳环等<sup>[28]</sup>利用人为污染沙门氏菌的方法,对鱼罐头、蛋制品、鱼粉、肉骨粉进行不同程度

地沙门氏菌人为污染,对样品进行适当处理后进行 PCR 检测。结果显示鱼罐头、鱼粉、蛋制品、肉骨粉均能达到理想检测效果,敏感性为 10~100 CFU/50 L。Vinayaka 等<sup>[29]</sup>用磁珠对鼠伤寒沙门氏菌进行浓缩,捕获效率达 95%。然后进行 PCR,观察到细菌浓度与循环数之间存在很强的线性关系,相对 PCR 效率约为 92%,检测限约为 2 CFU/mL。对加标食品样本(包括蔬菜沙拉、蛋黄、蛋清、全蛋和猪肉末)相对准确度为 98.3%,灵敏度为 91.6%,特异性为 100%。

### 4.2 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 是一种在 DNA 扩增反应中加入荧光化学物质,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 过程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的一种方法<sup>[34]</sup>。不同的物种其包含的特异性基因也存在差异,针对不同基因序列设计不同的引物及探针可以对沙门氏菌进行鉴定,具体见表 1。

与常规 PCR 检测技术相比,荧光定量 PCR 技术是菌的扩增和检测做到了一步完成,省去了电泳的过程,使检测时间得到进一步提高。而且操作更简单且仪器自动化程度更高,同时也不需要进行后期的处理。与普通 PCR 技术相比,该方法人为污染的可能性更低。

### 4.3 环介导等温扩增

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术,是利用具有链置换活性的 BstDNA 聚合酶,通过识别靶序列上 6 段特异区域的 2 条内引物(FIP 和 BIP)和 2 条外引物(F3 和 B3)在恒温条件下短时间内催化合成新的链,并通过靶基因的扩增产物产生反应出现焦磷酸镁的白色沉淀来判断靶基因是否存在<sup>[35]</sup>。

表 1 不同荧光定量方法检测沙门氏菌  
Table 1 Detection of *Salmonella* by different real-time PCR

作者	特定基因	结果
Nair 等 <sup>[30]</sup>	<i>ttr</i> (沙门氏菌属)、 <i>tviB</i> (伤寒沙门氏菌和副伤寒沙门氏菌 C)、 <i>SPA2308</i> (副伤寒沙门氏菌 A)、 <i>staG</i> (伤寒沙门氏菌)、 <i>SPC0869</i> (副伤寒沙门氏菌 C)、 <i>sseJ</i> 和 <i>stfJ</i> (副伤寒沙门氏菌 B)	与英国公共卫生局目前使用的沙门氏菌全基因组测序鉴定方法相比,218 种分离物鉴定结果具有 100%的敏感性和 100%的特异性。
胡兴娟等 <sup>[31]</sup>	<i>ompC</i> (沙门氏菌属)、 <i>sdjI</i> (肠炎沙门氏菌)、 <i>STM4495</i> (鼠伤寒沙门氏菌)和 <i>STY202</i> (伤寒沙门氏菌)	结果表明 28 株不同血清型的沙门氏菌均扩增出 <i>ompC</i> 基因,其他 13 株非沙门氏菌均未出现 <i>ompC</i> 的非特异性扩增。敏感性试验显示,上述 4 种最低检测限分别为 48、560、530 和 35 pg/mL。
Nurjayadi 等 <sup>[32]</sup>	<i>fim-C</i> (伤寒沙门氏菌)	对伤寒沙门氏菌的检测限为 4.528 pg/ $\mu$ L。仍可以检测出鸡蛋中鼠伤寒沙门氏菌的浓度高达 $10^6$ CFU/mL。
Bai 等 <sup>[33]</sup>	<i>invA</i> 、 <i>pagC</i> (肠炎沙门氏菌)和 <i>18S rRNA</i> 基因	通过 qPCR 检出的预富集和富集淋巴结的沙门氏菌患病率分别为 19.8%和 94.9%。大多数 qPCR 阳性预富集样品(105/128)的浓度在 $10^4$ 和 $10^5$ CFU/mL 之间。

嵇常宇<sup>[36]</sup>利用沙门氏菌 *invA* 基因设计引物, 进行特异性验证, 并对灵敏度和人工污染蛋糕的检出限进行测定。结果显示, 沙门氏菌呈阳性结果, 非沙门氏菌呈阴性结果, 表明特异性良好。该方法检测纯培养物的灵敏度为 6.3 CFU/mL, 人工污染蛋糕样品的检出限为 63 CFU/g。Hu 等<sup>[37]</sup>利用肠炎沙门氏菌 *Prot6E* 基因设计引物, 通过优化引物比例、DNA 模板量、反应温度和反应时间。通过测定 114 株沙门氏菌, 结果显示 97.4% 显示阳性。随后又对 34 株非肠炎沙门氏菌和 35 株非沙门氏菌进行检测, 结果显示全部为阴性。

虽然 LAMP 技术一直在改良, 但是这一技术还是存在很多问题。比如在引物上的设计, 它相对于 PCR 技术来说要难, 而且要筛选出合适的引物还需要大量的工作来验证引物的可靠性, 不合理的引物放在同一个管内反应出现假阳性的可能性比较大。

#### 4.4 单引物等温扩增

单引物等温扩增技术 (single primer isothermal amplification) 是近年报道的一种新型线性核酸等温扩增技术。该技术主要是通过一条 3' 端是 DNA 片段、5' 端是 RNA 片段的组合引物、RNase H 及具有强链置换活性的 DNA 聚合酶实现 DNA 的体外线性等温扩增。在扩增反应中, RNase H 不断降解引物与模板 DNA 所形成的 DNA/RNA 杂合链中 RNA 部分, 使未结合的引物能够不断获得结合位点并与模板结合进行链置换合成, 并在模板链末端或链终止序列 (Blocker) 结合处终止, 最终扩增出大量的具有高度忠实性 cDNA 单链<sup>[38]</sup>。Wang 等<sup>[39]</sup>基于荧光 SPIA 的定量沙门氏菌检测方法, 以鼠伤寒沙门氏菌基因组 DNA 为模板, 以沙门氏菌 *invA* 基因为引物, 结果显示 SPIA 的检出限为  $2.0 \times 10^1$  fg DNA。它成功扩增了不同血清型沙门氏菌基因组 DNA, 但没有非沙门氏菌细菌 DNA。显示出 SPIA 的高灵敏度和特异性。

SPIA 技术不需要昂贵的热循环装置, 较高的灵敏度和特异性使其迅速成为微生物检测的研究热点, 随着对 SPIA 技术研究的不断深入, 将不断完善、发展这种新型的技术, 使之在食源性致病菌检测方面发挥更大优势, 得到更广泛的应用。

#### 4.5 基因芯片

基因芯片技术是指 DNA 片段经过 PCR 扩增之后, 将这些基因序列标记为未知靶基因序列, 将其与集合了大量已知序列探针的基因芯片上特定的基因位点上的探针进行杂交, 再通过检测杂交信号来对基因信息进行分析<sup>[36]</sup>。饶宝等<sup>[40]</sup>通过 16S rRNA 基因序列设计了通用引物和特异性探针, 并对下游引物进行荧光标记, 通过 PCR 扩增、基因芯片杂交和信号扫描。结果显示沙门氏菌的阳性菌显示出荧光信号。

与其他方法相比, 基因芯片测定在鉴定样品中沙门氏菌的特异性和敏感性方面具有一些优势。该测定法能够有效地快速筛选大量样品, 并且高度特异性地检测靶细胞而不会与其他生物发生交叉反应。但是仅在预富集后存在足够浓度的目标生物时, 才能达到所需的敏感性。靶核酸序列和 DNA 探针的扩增可能是增加测定灵敏度的另一种方法。

## 5 生物传感器

生物传感器技术涵盖了一种用于细菌检测的应用微生物学方法, 该方法通过掺入固定在理化换能器或传感微系统表面的材料来定义一个分子或一组分子。当特定分析物与生物识别元件结合时, 会生成识别信号。该信号可以是质量、耗氧量、电势差、折射率、pH、电流和其他参数的变化<sup>[40-42]</sup>。生物传感器应用中使用的生物识别元件包括酶、抗体、核酸、全细胞、组织/整个生物和仿生材料。

### 5.1 酶生物传感器

酶生物传感器是一种将酶与换能器整合在一起以产生信号的分析设备, 该信号是由酶催化反应引起的不同物理化学变化产生的。信号被转换为可测量的响应, 例如电流、温度变化和光吸收, 以确定目标分析物浓度<sup>[43]</sup>。Song 等<sup>[44]</sup>开发了一种生物传感器, 用切口酶和碳纳米颗粒 (carbon nanoparticles) 基于荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer) 检测肠炎链球菌。由于黑洞淬灭剂 1 (BHQ 1) 的淬灭作用, CNP 在反应系统中不发出荧光。添加目标细菌后, 切口酶会识别并切割由探针与目标细菌之间的相互作用所制造的 dsDNA。结果, CNP 从 BHQ 1 解离并发出强荧光。使用切口酶, 生物传感器的荧光信号被大大放大。该生物传感器与肠炎沙门氏菌的浓度在水中的线性关系为  $10^2 \sim 3 \times 10^3$  CFU/mL, 在牛奶中为  $1.5 \times 10^2 \sim 3 \times 10^3$  CFU/mL。结果表明, 基于 FRET 的检测系统可广泛用于有效检测病原体。

酶生物传感器具有高度的选择性、快速性和易用性, 但价格昂贵, 并且固定在换能器上有时会失去活性。在这种类型的生物传感器中使用的酶包括葡萄糖氧化酶、半乳糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、乳酸氧化酶和其他酶等。

### 5.2 抗体生物传感

基于抗体的生物传感器是使用抗体作为信号识别器上附着的生物识别元件来定量目标分析物浓度的分析设备。Melo 等<sup>[45]</sup>用伏安法优化了前处理、生物分子固化 (一抗和蛋白浓度) 和分析响应 (对苯二酚和过氧化氢的浓度), 使用半胱胺硫醇和蛋白 A 通过自组装单层技术 (self-assembled monolayer, SAM) 对金表面进行修饰, 以固定鼠伤寒沙门氏菌抗体, 结果表明检测限达到了 10 CFU/mL, 检测时间 125 min。叶雪梅等<sup>[46]</sup>制备了用于检测食品中沙门氏菌的磁致伸缩生物传感器, 以磁致伸缩膜

片作为物理传感器,多克隆抗体作为生物识别元件,采用 Langmuir-Blodgett(LB)技术将多克隆抗体固定在磁致伸缩膜片表面。

由于抗体对抗原的高度特异性和亲和力、多样性和市场上的可获得性,因此它们是最常用的生物识别元件。基于抗体的生物传感器可分为 3 种主要的测定形式,包括固定化抗体、固定化抗原和非固定化抗体或抗原,其特征很大程度上取决于信号转导机制的类型。

### 5.3 核酸生物传感器

基于核酸的生物传感器,是以核酸为分子识别元件,利用其特有的结构和功能特性设计并用于目标物检测的一类传感装置。在传感器中,目标分子在于核酸分子作用时发生能量转变,经由换能器转变成可检测的缸垫物理信号输出,从而达到检测微生物的目的<sup>[47-49]</sup>。Zhang 等<sup>[50]</sup>构建了一种无标记、级联扩增可视化生物传感器,根据 RDTG 原理(重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification),双链特异性酶(duplex-specific enzyme)裂解,末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase)延伸和 G-四链体输出原理用于快速检测肠炎沙门氏菌亚种。经过 3 次扩增,其检测限达到 6 CFU/mL。它是一种无恒温的仪器,操作简单,能够在 1.5 h 内快速检测沙门氏菌。此外,它可以通过酶标仪在视觉上表征和定量,以检测食品和环境样品中的沙门氏菌,具有广阔的应用前景。Lee 等<sup>[51]</sup>开发了一种一次性电位计传感器,用于核酸的扩增偶联检测。在核酸的等温扩增期间通常会释放氢离子。使用带有商业金属氧化物半导体场效应晶体管(metal oxide semiconductor field effect transistor)和环形振荡器组件的完整电路直接测量扩展栅极的氧化物功能化电极上的表面电势,从而实现了经济高效,便携式且可扩展的时核酸分析。在等温放大过程中,电流不足的环形振荡器会根据 pH 值变化的平方将表面电势更改为其频率,并具有较高的信噪比。该器件可实现 20.5 kHz/mV 的转换速率和 200  $\mu$ V 的表面电位检测分辨率。

随着对核酸研究的不断深入,更多的优势凸显出来,如稳定性高、易于合成与修饰、对人体无毒性、组织穿透性好等。因此,它被认为是优良的生物识别元件。但是目前核酸传感器大部分为概念性的模型体系,而真正应用于实际相关的检测项目较少。其次,目前大部分的核酸传感器的分析是基于实验室的缓冲体系下进行的。

### 5.4 纳米生物传感器

纳米生物传感器是在生物传感器领域引入纳米材料与纳米技术以期获得灵敏度高、抗干扰性强、长效稳定、分析实时迅速、简单便携和成本低廉的检测器件<sup>[52]</sup>。其常用的材料只要有碳纳米材料、氧化锌(ZnO)纳米材料、贵金属金纳米材料等。而其中常用的主要有碳纳米材料,碳纳米材

料是指由碳原子组成且粒径小于 100 nm 的碳材料。宁毅<sup>[53]</sup>设计了一种新颖、便宜的基于碳纳米管的双重荧光猝灭的生物传感器,该传感器用于检测含有 SSeC 基因的鼠伤寒沙门氏菌,其检测下限可达 50 nmol/L,而且柔红霉素的荧光增加值与靶标 DNA 的浓度在 0.2~0.7  $\mu$ mol/L 之间呈线性关系,且检测样品时,菌体检测下限达  $10^5$  CFU/mL,且柔红霉素的荧光增加值与加入菌体的浓度在  $10^5$ ~ $5 \times 10^7$  CFU/mL 之间呈线性关系。靶标的荧光值均远远高于非靶标。因此该生物传感器具有很高的灵敏性和特异性。

随着纳米技术的介入为生物传感器的发展新添了活力。纳米材料,特别是纳米材料与其他材料或纳米材料之间的联用,将使生物传感器的灵敏度、检测范围、重复性得到明显增强,拓宽生物传感器的应用领域。

### 5.5 微流控生物传感器

微流控芯片技术(microfluidic chip)又被称为芯片实验室(lab on a chip),是把化学和生物学等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成到厘米级的芯片上,由微通道形成网络,以可控流体贯穿整个系统,用以取代常规化学或生物实验室的各种功能的一种高新技术平台<sup>[54]</sup>。近年来,微流体技术因其体积小,试剂消耗少,反应效率高,成本低,易于集成,自动操作和即时诊断等突出优点而受到广泛关注并被广泛用于生物检测。Wang 等<sup>[55]</sup>开发了一种基于免疫磁分离、荧光标记和智能手机视频处理在线检测沙门氏菌的微流控生物传感器。在最佳条件下,该生物传感器能够定量检测鼠伤寒沙门氏菌,范围为  $1.4 \times 10^2$ ~ $1.4 \times 10^6$  CFU/mL,其下限为 58 CFU/mL。Srbova 等<sup>[56]</sup>报道的带有磁化流化床的微流控芯片,用于免疫分离牛奶中的沙门氏菌。该微流控芯片对沙门氏菌的分离效率高达 99%。

## 6 小 结

沙门氏菌病对动物及人体都会造成一定的病菌感染,应对其防治加以重视。随着人们对沙门氏菌关注度的提高,沙门氏菌检测及鉴定也得到了不断发展,利用传统方法在准确性方面具有不可否认的优势,但是存在耗时长、操作过程复杂,不能及时给出食品安全性评价等问题。现代分子生物学检测虽然快速、准确、灵敏、特异性较强,但是也存在一定的障碍,如 PCR 可能存在假阴性与假阳性的结果,引物设计、操作技巧等问题也会对结果产生一定的影响。另外一些技术可能对设备、技术人员、环境要求较高,难以在欠发达地区推广普及。

每一种检测技术都有一定的优缺点,应对检测方法进行交叉使用,随着生物学、化学、物理等学科的发展,应将传统的微生物检测技术与新兴的分子生物学手段相结,取长补短,使准确、快速、灵敏检测食品中沙门氏菌成为现实。

## 参考文献

- [1] Hannam EA, Saarela M. *Salmonella* importance and current status of detection and surveillance methods [J]. Qual Assur Saf Crop Food, 2009, 1(3): 142–152.
- [2] 李红, 刘成倩, 孙凤萍, 等. 上海部分鸡场禽沙门菌血清学检测分析 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2019, (1): 57–58.  
Li H, Liu CQ, Sun FP, et al. Serological detection and analysis of *Salmonella* in some chicken farms in Shanghai [J]. Shanghai J Anim Husb Veter Med, 2019, (1): 57–58.
- [3] Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection [J]. J Clin Invest, 2001, 107(7): 775–780.
- [4] Bell RL, Jarvis KG, Ottesen AR, et al. Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: a food and environmental perspective [J]. Microb Biotechnol, 2016, 9(3): 279–292.
- [5] Lee KM, Runyon M, Herrman TJ, et al. Review of *Salmonella* detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety [J]. Food Control, 2015, 47: 264–276.
- [6] 赵建梅, 李月华, 张青青, 等. 2008—2017 年我国部分地区禽源沙门氏菌流行状况及耐药分析 [J]. 中国动物检疫, 2019, 36(8): 27–35.  
Zhao JM, Li YH, Zhang QQ, et al. Analysis of the epidemic status and drug resistance of *Salmonella* avian-derived in parts of China from 2008 to 2017 [J]. China Anim Quar, 2019, 36(8): 27–35.
- [7] Turner CW. Microbiology of ready-to-eat poultry products [J]. Handbook Poultry Sci Technol, 2010, 2: 507–515.
- [8] 罗荣, 任秀, 崔生辉. 食品中沙门氏菌快速检测技术研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(4): 116–120.  
Luo R, Ren X, Cui SH. Research progress on rapid detection of *Salmonella* in food [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(4): 116–120.
- [9] 陈凤格, 冯冬颖, 赵伟, 等. 一起沙门氏菌引起的自助餐食物中毒案例分析 [J]. 现代预防医学, 2016, 43(19): 3609–3610, 3619.  
Chen FG, Feng DM, Zhao W, et al. Analysis of a case of food poisoning caused by *Salmonella* in buffet [J]. Mord Prev Med, 2016, 43(19): 3609–3610, 3619.
- [10] 戴邵亮. 基于适配体的沙门氏菌检测方法研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4589–4596.  
Dai SL. Research progress of aptamer-based detection methods for *Salmonella* [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(14): 4589–4596.
- [11] Painter JA, Hoekstra RM, Ayers T, et al. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008 [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(3): 407.
- [12] De JB, Ekdahl K. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries [J]. BMC Public Health, 2006, 6(1): 4.
- [13] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准食品微生物学检验沙门氏菌检验 [S].  
GB 4789.4-2016 National food safety standard-Food microbiology test *Salmonellatest* [S].
- [14] ISO 6579-2017 Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* [S].
- [15] Maciorowski KG, Herrera P, Jones FT, et al. Cultural and immunological detection methods for *Salmonella* spp. in animal feeds—a review [J]. Vet Res Commun, 2006, 30(2): 127–137.
- [16] 张帅, 齐颖颖, 张红星, 等. 双抗夹心酶联免疫吸附快速检测鲜肉类中的 6 种血清型沙门氏菌 [J]. 食品科学, 2016, 37(16): 211–215.  
Zhang S, Qi YY, Zhang HX, et al. Rapid detection of 6 serotypes of *Salmonella* in cold meat by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Food Sci, 2016, 37(16): 211–215.
- [17] 张丹, 刘兆臣, 邴欣, 等. 新型试纸条在食源性致病菌检测中的应用 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38(15): 206–210.  
Zhang D, Liu ZC, Bing X, et al. Application of a new type of test strip in the detection of foodborne pathogens [J]. Food Res Dev, 2017, 38(15): 206–210.
- [18] 伍燕华, 牛瑞江, 赖卫华, 等. 双抗夹心酶联免疫吸附法检测沙门氏菌 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 62–65.  
Wu YH, Niu RJ, Lai WH, et al. Detection of *Salmonella* by double antibody sandwich ELISA [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(10): 62–65.
- [19] Febo DT, Schirone M, Visciano P, et al. Development of a capture ELISA for rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples [J]. Food Anal Method, 2019, 12(2): 322–330.
- [20] Tietjen M, Fung DYC. *Salmonellae* and food safety [J]. Crit Rev Microbiol, 1995, 21(1): 53–83.
- [21] 杨磊. 基于免疫彩色二氧化硅微球新型凝集技术研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2013.  
Yang L. Study on a new agglutination technology based on immune colored silica microspheres [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Commerce and Industry, 2013.
- [22] 余晓峰, 张萍, 宗凯, 等. 免疫磁珠法检测脱水蒜制品中沙门氏菌 [J]. 食品科学, 2012, 33(24): 257–259.  
Yu XF, Zhang P, Zong K, et al. Detection of *Salmonella* in dehydrated garlic products by immunomagnetic bead method [J]. Food Sci, 2012, 33(24): 257–259.
- [23] 赵瑞雪, 杜美红, 李静雯, 等. 国产沙门氏菌免疫磁珠的制备及其应用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(4): 843–850.  
Zhao RX, Du MH, Li JW, et al. Preparation and application of domestic *Salmonella* immunomagnetic beads [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(4): 843–850.
- [24] Du M, Li J, Zhao R, et al. Effective pre-treatment technique based on immune-magnetic separation for rapid detection of trace levels of *Salmonella* in milk [J]. Food Control, 2018, 91: 92–99.
- [25] 黄静玮, 汪铭书, 程安春. 沙门氏菌分子生物学研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(7): 649–652.  
Huang JW, Wang MS, Cheng AC. Research progress in molecular biology of *Salmonella* [J]. Chin J Zoonoses, 2011, 27(7): 649–652.
- [26] Glynn B, Lahiff S, Wernecke M, et al. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety [J]. Int J Dairy Technol, 2006, 59(2): 126–139.
- [27] 孟圆圆, 刘莉莉, 代晓凝, 等. 沙门氏菌快速检测技术的研究现状 [J]. 肉类工业, 2018, (12): 42–46.  
Meng YY, Liu LL, Dai XN, et al. Research status of rapid detection of *Salmonella* [J]. Meat Ind, 2018, (12): 42–46.
- [28] 刘艳环, 朱言柱, 王玉方, 等. 食品和动物性饲料中沙门氏菌 PCR 检测方法的建立 [J]. 特产研究, 2019, 41(2): 42–45.  
Liu YH, Zhu YZ, Wang YF, et al. Establishment of PCR detection method for *Salmonella* in food and animal feed [J]. Spec Prod Res, 2019, 41(2): 42–45.
- [29] Vinayaka AC, Ngo TA, Kant K, et al. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR [J]. Biosens Bioelectron, 2019, 129: 224–230.
- [30] Nair S, Patel V, Hickey T, et al. A real-time PCR for the differentiation of

- typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 7: 16–19.
- [31] 胡兴娟, 徐君辉, 张静, 等. 四重荧光定量 PCR 法鉴定肠炎、鼠伤寒以及伤寒沙门氏菌[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(7): 1837–1843.  
Hu XJ, Xu JH, Zhang J, *et al.* Identification of *Enteritis*, *Typhoid Typhoid* and *Salmonella Typhoid* by quadruplex quantitative PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(7): 1837–1843.
- [32] Nurjayadi M, Pertiwi YP, Islami N, *et al.* Detection of the *Salmonella typhi* bacteria in contaminated egg using real-time PCR to develop rapid detection of food poisoning bacteria [J]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2019, 2(4): 101–104.
- [33] Bai J, Trinetta V, Shi X, *et al.* A multiplex real-time PCR assay, based on *invA* and *pagC* genes, for the detection and quantification of *Salmonella enterica* from cattle lymph nodes [J]. *J Microbiol Method*, 2018, 148: 110–116.
- [34] 周晓清. 食源性沙门氏菌的 PCR 快速检测技术研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.  
Zhou XQ. Study on rapid detection of foodborne *Salmonella* by PCR [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2012.
- [35] 杨柳, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 分子生物学方法检测沙门氏菌的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(9): 372–375, 379.  
Yang L, Hu WZ, Jiang AL, *et al.* Research progress in molecular biology methods for detection of *Salmonella* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2016, 37(9): 372–375, 379.
- [36] 嵇常宇. 基因芯片技术及其应用[J]. *黑龙江生态工程职业学院学报*, 2014, 27(2): 23–24.  
Ji CY. Gene chip technology and its application [J]. *J Heilongjiang Ecol Eng Vocat Coll*, 2014, 27(2): 23–24.
- [37] Hu L, Ma LM, Zheng S, *et al.* Development of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Salmonella ser.* Enteritidis from egg products [J]. *Food Control*, 2018, 88: 190–197.
- [38] 李静, 段永生, 王建昌, 等. 实时荧光单引物等温扩增检测阪崎克罗诺杆菌方法的建立[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(5): 524–530.  
Li J, Duan YS, Wang JC, *et al.* Development of a real-time fluorescent single primer isothermal amplification method for detection of *Kronobacter sakazakii* [J]. *Chin J Food Hyg*, 2015, 27(5): 524–530.
- [39] Wang J, Li R, Hu L, *et al.* Development of a quantitative fluorescence single primer isothermal amplification-based method for the detection of *Salmonella* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2016, 219: 22–27.
- [40] 饶宝, 唐桂芬, 刘玲玲, 等. 沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的基因芯片检测技术研究[J]. *郑州牧业工程高等专科学校学报*, 2012, 32(3): 3–5, 23.  
Rao B, Tang GF, Liu LL, *et al.* Gene chip detection technology of *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *E. coli* [J]. *J Zhengzhou Anim Husb Eng Coll*, 2012, 32(3): 3–5, 23.
- [41] Eijkelkamp JM, Aarts HJM, Vander FHJ. Suitability of rapid detection methods for *Salmonella* in poultry slaughterhouses [J]. *Food Anal Method*, 2009, 2(1): 1–13.
- [42] Wu Q, Zhang Y, Yang Q, *et al.* Review of electrochemical DNA biosensors for detecting food borne pathogens [J]. *Sensors*, 2019, 19(22): 49–56.
- [43] Bäumner AJ. Biosensors for environmental pollutants and food contaminants [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 377(3): 434–445.
- [44] Song Y, Li W, Duan Y, *et al.* Nicking enzyme-assisted biosensor for *Salmonella enteritidis* detection based on fluorescence resonance energy transfer [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 55: 400–404.
- [45] Melo AMA, Alexandre DL, Oliveira MRF, *et al.* Optimization and characterization of a biosensor assembly for detection of *Salmonella Typhimurium* [J]. *J Solid State Electrochem*, 2018, 22(5): 1321–1330.
- [46] 叶雪梅, 胡佳佳, 胡静. 检测食品沙门氏菌的生物传感器持久性研究[J]. *农业工程学报*, 2014, 30(20): 334–338.  
Ye XM, Hu JJ, Hu J. Study on persistence of biosensors for food *Salmonella* [J]. *Transact Chin Soc Agric Eng*, 2014, 30(20): 334–338.
- [47] Lazcka O, Del CFJ, Munoz FX. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22(7): 1205–1217.
- [48] Eijkelkamp JM, Aarts HJM, Vander FHJ. Suitability of rapid detection methods for *Salmonella* in poultry slaughterhouses [J]. *Food Anal Method*, 2009, 2(1): 1–13.
- [49] 高小尧. 基于核酸的生物传感器的研究与应用[D]. 福州: 福州大学, 2014.  
Gao XY. Research and application of nucleic acid-based biosensors [D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2014.
- [50] Zhang Y, Tian J, Li K, *et al.* Label-free visual biosensor based on cascade amplification for the detection of *Salmonella* [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1075: 144–151.
- [51] Lee KH, Lee D, Yoon J, *et al.* A sensitive potentiometric sensor for isothermal amplification-coupled detection of nucleic acids [J]. *Sensors*, 2018, 18(7): 2277.
- [52] 赵艳光. 氧化锌纳米材料基生物传感器的构建及性能研究[D]. 北京: 北京科技大学, 2015.  
Zhao YG. Construction and performance of zinc oxide nanomaterial-based biosensors [D]. Beijing: University of Science and Technology Beijing, 2015.
- [53] 宁毅. 高特异性碳纳米生物传感器快速检测沙门氏菌的研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2014.  
Ning Y. Study on rapid detection of *Salmonella* by highly specific carbon nano-biosensor [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2014.
- [54] 张望. 集成化微流控芯片的研制及其在大肠埃希菌 O157: H7 检测中的应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.  
Zhang W. Development of integrated microfluidic chip and its application in detection of *Escherichia coli* O157:H7 [D]. Nanchang: Nanchang University, 2014.
- [55] Wang S, Zheng L, Cai G, *et al.* A microfluidic biosensor for online and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using fluorescence labeling and smartphone video processing [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 140: 111.
- [56] Srbova J, Krulisova P, Holubova L, *et al.* Advanced immunocapture of milk-borne *Salmonella* by microfluidic magnetically stabilized fluidized bed [J]. *Electrophoresis*, 2018, 39(3): 526–533.

(责任编辑: 于梦娇)

## 作者简介



段星星, 硕士, 主要研究方向为食品卫生与安全。  
E-mail: 1401632838@qq.com



周露, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。  
E-mail: zhoulul1982@sohu.com