

食品中沙门氏菌快速检测技术方法对比结果分析

钟卫烨, 韦云, 杨丹婷, 丁清龙, 曾晓琮, 周露*

(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘要: 目的 比较 VITEK 2 COMPACT、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)、实时荧光 PCR 法(real-time PCR)、环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)4 类方法, 分析其对沙门氏菌的快速检测效果。

方法 挑取 12 株阳性野生菌株复苏, 配以 1 株标准菌株作为对照, 分别用 VITEK 2 COMPACT、MALDI-TOF-MS、Real-time PCR、LAMP 四类方法对其进行检测, 并比较 4 类方法的结果差异。**结果** Real-time PCR 与 LAMP 单对通用引物能鉴定到属水平, 此外, LAMP 测定沙门氏菌时会有假阴性的情况出现; VITEK 2 生化鉴定能将少数沙门菌株鉴定到种的水平; 质谱方法能鉴定到亚种水平, 同时会出现鉴定不准确的情况。**结论** 基于沙门氏菌属水平上, 4 类方法都能快速准确鉴定沙门氏菌, 但在使用快速检测技术时均应考量该方法的优点对实际工作的帮助以及缺点对检验结果的影响, 才能提高检测效率。

关键词: 沙门氏菌; VITEK 2 COMPACT; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法; 实时荧光 PCR 法; 环介导等温扩增法; 效率

Comparison of rapid detection techniques of *Salmonella* in food

ZHONG Wei-Ye, WEI Yun, YANG Dan-Ting, DING Qing-Long, ZENG Xiao-Cong, ZHOU Lu*

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

ABSTRACT: Objective To compare the determination of *Salmonella* in food by VITEK 2 COMPACT, matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), real-time PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP), and analyze their rapid detection effect on *Salmonella*. **Methods** 12 positive wild strains of *Salmonella* were selected for resuscitation with one standard strain of *Salmonella* as control. They were detected by the methods of VITEK 2 COMPACT, MALDI-TOF-MS, Real-time PCR and LAMP, and the results of the four methods were compared. **Results** Real-time PCR and LAMP with single pair of universal primers were used to identify *Salmonella* at the genus level, and false negative results were observed with LAMP; VITEK 2 COMPACT identified a few *Salmonellas* at the species level; *Salmonella* could be identified on subspecies level with MALDI-TOF-MS, and there will be inaccurate identification. **Conclusion** Based on *Salmonella* at the genus level, the four kinds of methods can identify *Salmonella* quickly and accurately, but the advantages of the method to the actual work and the impact of the shortcomings on the test results should be considered when using the rapid detection technology, that can improve the detection efficiency.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1606305)、广东省市场监督管理局科研攻关项目(2020ZS02)

Fund: Supported by the National Key R&D Program of China (2019YFC1606305), and the Scientific Research Project of Guangdong Market Supervision and Administration Bureau (2020ZS02)

*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

KEY WORDS: *Salmonella*; VITEK 2 COMPACT; matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; real-time PCR; loop-mediated isothermal amplification; efficiency

1 引言

“民以食为天, 食以安为先”, 在全国各级食药监部门高度重视食品安全, 不断加大食品安全监督抽检力度的大环境下, 我国食品安全得到有力保障, 但由沙门氏菌引起的食物中毒事件依然情况严峻。据统计, 我国细菌性食物中毒中 70%~80%是由沙门氏菌引起, 人一旦摄入含有大量沙门氏菌($10^6\sim 10^7$ 个/g)的动物性产品, 就会引起细菌性感染, 进而在毒素的作用下发生食物中毒导致肠胃炎、伤寒、副伤寒, 且沙门氏菌的传播媒介众多, 肉、蛋以及食品从加工到出售的过程中都十分容易发生污染^[1,2]。因此, 如何对食源性致病菌进行高效鉴定, 对食品安全有重要意义。

目前, 传统培养法是沙门氏菌鉴定的公认金标准, 但操作步骤比较繁琐, 依赖检测人员的感官经验, 对工作人员和实验环境都具有较高的要求, 检测周期长, 一般需要 4~7 d 才能确定检测结果, 时效性相较于其他方法存在劣势。近年来, 随着生物技术的迅猛发展, 微生物的检测鉴定技术已逐步现代化、自动化, 全自动微生物鉴定系统(VITEK 2 COMPACT)是目前世界上最先进、自动化程度最高的细菌鉴定仪器之一, 已被许多国家定为细菌最终鉴定设备, 并获美国药品食品管理局(Food and Drug Administration, FDA)认可。该系统有高度的特异性、敏感性和重复性, 还具有操作简便、检测速度快的特点, 绝大多数细菌的鉴定在 2~18 h 内可得出结果^[3]。分子生物学技术也被运用到微生物检测中, 极大地丰富了食品微生物检测体系, 这种方法检测量大, 操作简便, 而且灵敏度高, 大大提高了检测效率。此外, 基于细菌特征蛋白指纹图谱的基质辅助激光吸/电离飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)对致病菌进行快速识别技术在微生物领域得到了快速发展^[4,5], 尤其是关于 MALDI-TOF MS 鉴定微生物的方法与传统其他方法比较的研究, 该研究表明 MALDI-TOF MS 方法鉴定微生物具有准确性且时效性^[6-9]。本研究利用 VITEK 2 COMPACT、MALDI-TOF MS、实时荧光 PCR、环介导等温扩增法等 4 种方法分别对 1 株标准菌株和 12 株沙门氏菌野生菌株进行测定, 比较不同检测方法的优缺点, 为沙门氏菌快速检测提供数据支撑。另外, 本研究以 4 种方法的时效性、准确性作为出发点, 比较 4 种方法的总体准确率、假阴性率情况, 为快速检测方法的改进提

供数据参考。

2 材料与方法

2.1 菌株

本研究共使用 13 株沙门氏菌菌株, 其中 1 株为鼠伤寒沙门氏菌标准菌株(ATCC 14028), 均由广东省食品检验所微生物实验室保存。所有细菌菌株均经过 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》^[10]鉴定, 根据沙门氏菌属血清型鉴定和分型查找 Kauffman-White 表, 确定具体的血清型, 其菌株信息见表 1。

2.2 仪器与试剂

K 2 COMPACT 革兰氏阴性菌鉴定卡、CHCA 基质(法国梅里埃公司); 沙门氏菌核酸检测试剂盒、细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒(广州迪奥生物科技有限公司); 沙门氏菌免核酸提取核酸检测试剂盒(深圳绿诗源生物技术有限公司)。

AC2-4S1 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); VITEK 2 COMPACT 自动微生物分析系统(法国梅里埃公司); DHP-9052 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); MALDI-TOF/TOF 4800 基质辅助激光吸/电离飞行时间质谱仪(法国梅里埃公司); Deaou-308C 恒温扩增荧光检测系统(广州迪奥生物科技有限公司); QuantStudio 6 Flex 实时荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 菌株复苏与分纯

将瓷珠捕获的菌株, 至于 5 mL 脑心浸出液肉汤(brain heart infusion broth, BHI)中, (36 ± 1) °C 培养 24 h 备用。取培养物一环, 接种营养琼脂(nutrient agar, NA)平板, (36 ± 1) °C 培养 24 h 纯化出单菌落。

2.3.2 VITEK COMPACT 2 生化鉴定菌株

挑取 2.3.1 所述 NA 平板中的新鲜单菌落, 依照 VITEK 2 COMPACT 革兰氏阴性菌鉴定卡说明书操作, 使用 VITEK 2 COMPACT 对菌种进行鉴定, 并重复以上步骤, 共鉴定 2 次。

2.3.3 MALDI-TOF MS 鉴定菌株

挑取 2.3.1 所述 NA 平板中的新鲜单菌落, 厚薄均匀地涂布于 VITEK MS 靶板上, 为防止空气中气溶胶中的微生物对实验所造成的影响, 立即在靶孔加上 HCCA 基质液(1 μ L/孔), 待基质晾干后, 将靶板信息输入质谱仪中, 对菌株种属进行鉴定, 并重复以上步骤, 共鉴定 2 次。

2.3.4 环介导等温扩增法鉴定菌株

(1)DNA 模板制备

以 2.3.1 中所备的 BHI 菌液为沙门氏菌增菌液, 依照细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒说明进行提取操作。

(2)试剂配制、加样与检测

依照沙门氏菌核酸检测试剂盒(恒温荧光法)的说明进行试剂配制、加样与检测, 并重复以上步骤, 共鉴定 2 次。

2.3.5 Real-time PCR 法鉴定菌株

依照沙门氏菌免核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)的操作说明书对 2.3.1 所备的 BHI 菌液进行鉴定, 并重复以上步骤, 共鉴定 2 次。

2.3.6 VITEK 2 COMPACT、MALDI-TOF MS、LAMP、real-time PCR 法鉴定比较

将获得的生化鉴定数据、MALDI-TOF MS、环介导等温扩增法、PCR-荧光探针法鉴定数据进行对比, 比较 4 类

实验对菌株种属鉴定的结果。

3 结果与分析

3.1 VITEK 2 COMPACT 生化鉴定结果

在生化鉴定试验中, 13 株沙门氏菌株均可鉴定为沙门氏菌, 其中 1 株特殊血清型(肠沙门菌双相亚利桑那亚种)的菌株可以达到种的水平。其余 12 株菌株, 只能鉴定到沙门菌属(*Salmonella* group)水平, 2 次测定结果一致, 见表 2。

3.2 MALDI-TOF MS 鉴定结果

在此项鉴定试验中, 13 株沙门氏菌菌株均可鉴定沙门氏菌, 并且是鉴定到了种的水平, 其中 1 株鉴定结果显示为肠沙门菌双相亚利桑那亚种, 其余各株, 均为肠炎沙门氏菌肠亚种, 2 次测定结果一致, 见表 2。

表 1 沙门氏菌来源信息
Table 1 Information of *Salmonella*

编号	来源	血清型	所属沙门氏菌亚种
1	食品	乙型副伤寒沙门氏菌	肠炎沙门氏菌肠亚种
2	食品	德邵沙门氏菌	肠炎沙门氏菌肠亚种
3	食品	III a 沙门氏菌	亚利桑那沙门氏菌亚种
4	食品	奥雷宁堡沙门氏菌	肠炎沙门氏菌肠亚种
5	食品	蒙得维的亚沙门氏菌	肠炎沙门氏菌肠亚种
6	食品	肠炎沙门氏菌	肠炎沙门氏菌肠亚种
7	食品	III a 沙门氏菌	亚利桑那沙门氏菌亚种
8	食品	鼠伤寒沙门氏菌	肠炎沙门氏菌肠亚种
9	食品	利瓦利斯沙门氏菌	肠炎沙门氏菌肠亚种
10	食品	卡劳沙门氏菌	肠炎沙门氏菌肠亚种
11	食品	火鸡沙门氏菌	肠炎沙门氏菌肠亚种
12	食品	双相亚利桑那沙门氏菌	双亚利桑那沙门氏菌亚种
13	ATCC 菌种号	鼠伤寒沙门氏菌	肠炎沙门氏菌肠亚种

表 2 4 种方法鉴定沙门氏菌结果比较
Table 2 Comparative analysis of 4 kinds experimental identification results

编号	Real-time PCR		LAMP	VITEK 2 COMPACT		MALDI-TOF MS	
	结果	Ct 值	结果	结果	可信度/%	结果	可信度/%
1	+	15.274	+	沙门氏菌群	99	肠炎沙门氏菌肠亚种	99.9
2	+	15.288	+	沙门氏菌群	98	肠炎沙门氏菌肠亚种	99.9
3	+	16.576	+	沙门氏菌群	94	肠炎沙门氏菌肠亚种	99.9
4	+	15.972	+/-*	沙门氏菌群	94	肠炎沙门氏菌肠亚种	99.9
5	+	16.321	+	沙门氏菌群	96	肠炎沙门氏菌肠亚种	99.9
6	+	13.755	+	沙门氏菌群	99	肠炎沙门氏菌肠亚种	99.9
7	+	14.072	+	沙门氏菌群	98	肠炎沙门氏菌肠亚种	99.7
8	+	14.401	+	沙门氏菌群	99	肠炎沙门氏菌肠亚种	99.9
9	+	15.558	+	沙门氏菌群	99	肠炎沙门氏菌肠亚种	99.9
10	+	15.534	+	沙门氏菌群	96	肠炎沙门氏菌肠亚种	99.9
11	+	13.183	+	沙门氏菌群	99	肠炎沙门氏菌肠亚种	99.9
12	+	13.791	+	双亚利桑那亚种	95	双亚利桑那/亚利桑那亚种	50/50
13	+	15.11	+	沙门氏菌群	99	肠炎沙门氏菌肠亚种	99.9

注: +/-表示 2 次实验的测定结果; 无标注, 则表示 2 次实验结果一致。

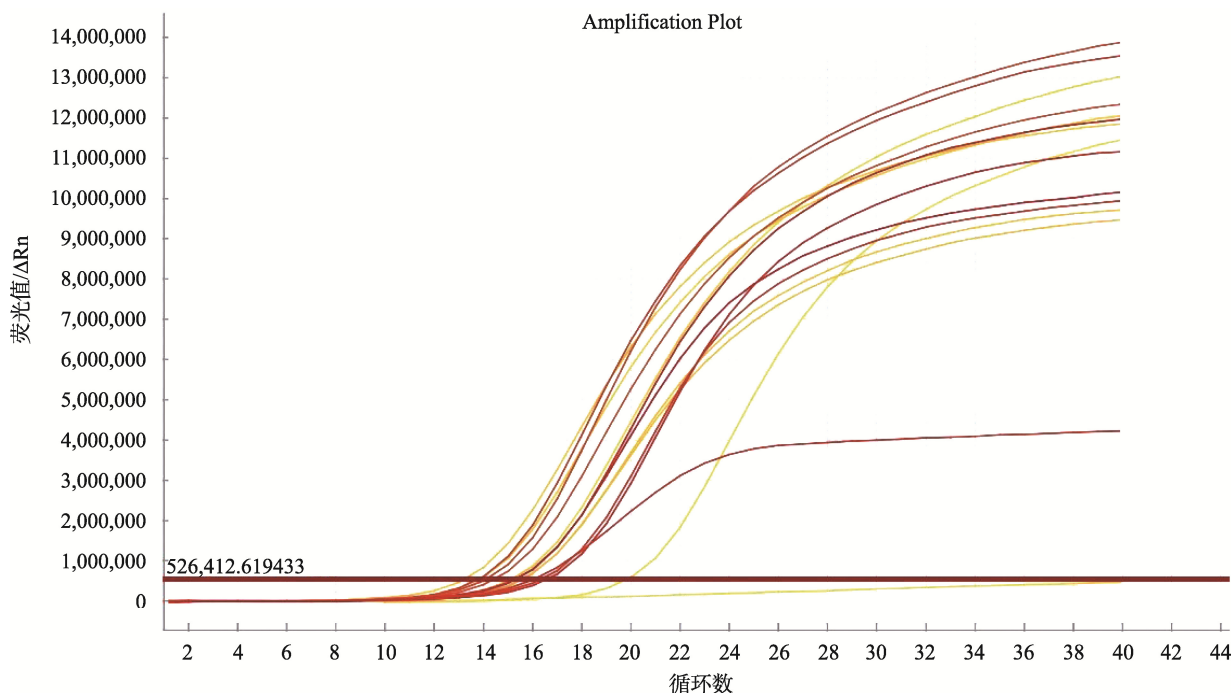


图 2 13 株沙门氏菌实时荧光定量 PCR 法结果谱图

Fig.2 Fluorescence spectrogram of 13 strains of *Salmonella* using real-time PCR

3.3 LAMP 鉴定结果

在此项鉴定实验中, 13 株沙门氏菌菌株均以沙门阳性体现, LAMP 引物均只能扩增其目的基因, 其中 2 次测定结果中有一株野生型沙门氏菌菌株出现了假阴性情况, 见表 2。

3.4 Real-time PCR 鉴定结果。

在此项鉴定试验中, 13 株沙门氏菌菌株均以沙门阳性体现, 其阳性对照的 Ct 值是 19.841, 其余 13 株沙门氏菌菌株 Ct 值在 13.183~16.576 之间, 2 次测定结果一致, 见表 2 和图 2(仅附 1 次实验 Ct 值和图谱做为参考)。

3.5 VITEK 2 COMPACT、MALDI-TOF MS、LAMP、real-time PCR 鉴定结果比较

如表 2 和表 3 所示, 在 4 类方法中, 都能鉴定为沙门氏菌, 在沙门氏菌属层面上, 准确率是 100%, 检出率较高, 可见这 4 种方法都可作为沙门氏菌的快速检测手段。在检测用时上 MALDI-TOF MS 占明显优势, 另外在检测过程中发现 LAMP 存在一定的假阴性率, 从表 1 和表 2 的对比信息也可知, VITEK 2 COMPACT 与 MALDI-TOF MS 都未能对菌种编号为 3 和 7 的亚利桑那沙门氏菌亚种进行准确识别, MALDI-TOF MS 在鉴定 12 号菌株时, 出现模棱两可的结果, 导致这 2 种方法在鉴定沙门氏菌种水平上的准确率不高, VITEK 2 COMPACT 的准确率为 84.6%, MALDI-TOF MS 的准确率为 76.9%。

表 3 4 种方法鉴定沙门氏菌检测时间与准确率比较
Table 3 Comparison of detection time and accuracy of 4 methods for identifying *Salmonella*

方法	检测时间	准确率
Real-time PCR	1 h	100%(属水平)
LAMP	45 min	96.15%(属水平)
VITEK 2COMPACT	6~10 h	84.6%(种水平)
MALDI-TOF MS	15~30 min	76.9(种水平)

3.6 VITEK 2 COMPACT、MALDI-TOF MS、LAMP、real-time PCR 鉴定结果分析讨论

本研究中, 荧光定量 PCR 法运用单对通用引物鉴定沙门氏菌准确率高, 检测量大, 而且能识别食物中较低含量的致病菌, 灵敏度极高, 由于是单对通用引物, 故检测无法检测到属的水平上, 但用于实验室快速初筛帮助很大。如需鉴定到种, 需用多重 PCR 方法, 笔者未做深入研究。另外, 此方法虽方便准确, 但容易受到交叉污染, 操作对结果影响较大^[11]。

环介导等温扩增法准确率高, 方便快捷, 结果易于判定, 但存在一定的假阴性率。其相比于 Real-time PCR, 两者都基于核酸层面, 步骤相似, 特异性良好, 但 LAMP 对温度循环无要求, 且也不需特殊设备, 耗时少于 1 h^[12]。便携式的环介导等温扩增技术, 做好该方法试剂盒的相关评价, 更能帮助基层以及监督抽检现场检验人员摆脱费用与仪器设备的困扰, 以最经济的方式对标准方法进行有效补

充,为基层、国门以及现场快速检测保驾护航。

MALDI-TOF MS 具有高特异性、高灵敏度、高通量、速度快等优点^[13]。但本研究中此方法在沙门氏菌种水平层面上的准确率不高,可能主要是受诸多影响因素,例如基质的选择、食源性病原微生物的培养条件、菌株的处理方法与菌体量控制以及数据库的建立和补充等^[14]。虽然检测所需费用会比 VITEK 有所缩减,但仪器设备比较昂贵,此外,在使用此方法时,对环境和技术人员都有较高的要求,综上所述,此方法可以用于较大批量的食源性致病菌的初筛,但是在基层推广有赖于诸多问题的改进和完善^[15]。

VITEK 2 COMPACT 生化鉴定系统,虽然准确率高,但是大部门食源性致病菌的检测仍然停留在沙门菌属水平的测定,检测费用高,在本研究 4 类方法中用时最长,不利于大量样品的快速检测工作。

4 结 论

在我国,食源性疾病,尤其是沙门氏菌引起的食源性疾病依然高发,此外沙门氏菌血清分型分类繁多,某些个体差异甚至微乎其微,如只用国标方法进行检测,无法适应当今快节奏生活所需。因此,各地监管部门以及其附属检验机构可根据当地实际检测情况和经济情况选择 1 种或者多种沙门氏菌快速检测方法作为国标方法以外的补充检验方法,以便更高效地完成食品安全监管和推动快速检验方法的逐步完善。

综前文所述,基于沙门氏菌属水平上,4 类方法都能快速准确鉴定沙门氏菌,其中 real-time PCR、VITEK 2 COMPACT 生化鉴定系统、MALDI-TOF MS 可用于国家食品监督抽检以及地方监督抽检的辅助检验,做好 LAMP 方法试剂盒的相关评价,可推广应用于基层单位和海关对于沙门氏菌的初筛。但在使用快速检测技术时均应考量该方法的优点对实际工作的帮助以及缺点对检验结果的影响。

参考文献

- [1] 焦新安,刘秀梵.禽沙门氏菌流行病现状与控制对策[J].中国禽业导刊,1998,(1):23-24.
Jiao XA, Liu XF. Epidemic status and control measures of the *Salmonella* in poultry [J]. Guide Chin Poultry, 1998, (1): 23-24.
- [2] 黄文宇,柳陈坚.食源性沙门氏菌检测方法的研究进展[J].生物技术,2009,19(3):96-97.
Huang WY, Liu CJ. Research progress on the detection method of foodborne *salmonella* [J]. Biotechnology, 2009, 19(3): 96-97.
- [3] 卫舒帆,刘静萍. VITEK II 全自动微生物鉴定系统在两种微生物鉴定中的运用[J].中国医药指南,2018,16(12):52-53.
Wei SF, Liu JP. VITEK II COMPACT application in the identification of two microorganisms [J]. Guide Chin Med, 2018, 16(12): 52-53.
- [4] Dieckmann R, Malomy B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. enterica serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(12): 4136-4146.

- [5] Huang CH, Huang L. Rapid species-and subspecies-specific level classification and identification of *Lactobacillus*-c-asei group members using MALDI biotyper combined with clinprotocols [J]. J Dairy Sci, 2018, 101(2): 979-991.
- [6] Lawton SJ, Weis AM, Byrne BA, et al. Comparative analysis of campylobacter isolates from wild birds and chi-ckens using MALDI-TOF MS, biochemical testing, and DNA sequencing [J]. J Veter Diagnost Invest, 2018, 30(3): 354-361.
- [7] Pranada AB, Witt E, Bienia M, et al. Accurate differentiation of mycobacterium chimaera from mycobacterium intracellulare by MALDI-TOF MS analysis [J]. J Med Microbiol, 2017, 66(5): 670-677.
- [8] Schlebusch S, Pric GR, Gallagher RL, et al. MALDI-TOF MS meets WGS in a VRE outbreak investigation [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36(3): 495-499.
- [9] Ayeni FA, Andersen C, Lauritsen NN. Comparison of growth on mannitol salt agar, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, VITEK2 with partial sequencing of 16S rRNA gene for identification of coagulase-negative staphylococci [J]. Microb Pathog, 2017, 105: 255-259.
- [10] GB 4789.4-2016 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2016 Food microbiology-Testing of *Salmonella* [S].
- [11] 郑国栋,柳洪涛,宋欣颖.食品沙门氏菌检测中 PCR 技术的应用分析[J].现代食品,2020,(3):128-129.
Zheng GD, Liu HT, Song XY. Application of PCR technology in food *Salmonella* detection [J]. Mod Food, 2020, (3):128-129.
- [12] 金海,孙跃辉,陈瑞,等.食品中沙门氏菌 LAMP 快速检测方法的建立[J].天津大学学报,2012,45(5):468-472.
Jin H, Sun YH, Chen R, et al. Establishment of rapid detection method using LAMP for the *Salmonella* in food [J]. J Tianjin Univ, 2012, 45(5): 468-472.
- [13] Li Y, Christiaens GCMLP, Gille JP, et al. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay [J]. Prenat Diagn, 2007, 27(1): 11-17.
- [14] 吕佳,卢行安,刘淑艳,等. MALDI-TOF-MS 技术鉴定食源性致病菌的影响因素[J].分析仪器,2011,12:12-17.
Lv J, Lu XA, Liu SY, et al. Influential factors in identifying food-borne pathogens by MALDI-TOF-MS [J]. Anal Instrum, 2011, 12: 12-17.
- [15] Belkum AV, Welker M, Pincus D, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: What are the current issues [J]. Ann Lab Med, 2017, 37(6): 475-483.

(责任编辑:于梦娇)

作者简介



钟卫辉,主要研究方向为食品生物安全。
E-mail: 769968923@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: zhoulu1982@sohu.com