

乳制品中沙门氏菌分子检测方法的验证研究

陶文靖¹, 曲连海¹, 董彬², 赵婷婷³, 周琦¹, 张君超¹, 刘磊^{1*}

(1. 北京美正生物科技有限公司, 北京 102200; 2. 天津光明梦得乳品有限公司, 天津 300400;
3. 光明乳业股份有限公司华东中心工厂, 上海 201111)

摘要: **目的** 验证沙门氏菌、非沙门菌及阳性核酸模板对 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)的特异性和稳定性, 同时比对试剂盒法与 GB 4789.4—2016 培养法定性检测结果的一致性。**方法** 用实验室保存的 30 株沙门氏菌和 15 株非沙门氏菌菌株验证 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)的特异性。通过人工添加不同浓度沙门氏菌对 30 个乳制品样本, 采用国家标准法和试剂盒法同时检验, 探究方法的一致性。选择制备好的 5 份阳性核酸模板, 每个模板分别使用 3 个批次的试剂盒进行检测, 对实验结果进行重复性和显著性分析, 确定不同试剂盒批次间是否存在显著性差异。**结果** 30 株沙门氏菌菌株和 15 株非沙门氏菌菌株的特异性检测结果表明, MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)对沙门氏菌的特异性符合预期。人工添加的阳性样本检测结果表明, 在乳制品样本范围内, 试剂盒的假阳性率与假阴性率为 0。3 个批次的试剂盒对 5 份阳性模板检测结果之间没有显著性差异, 变异系数 CV 均小于 1%。**结论** 该试剂盒方法与国家标准法相比, 具有操作简单、快速等优势, 适合乳制品加工过程微生物快速检测。

关键词: 沙门氏菌; PCR-探针法; 分子检测; 培养法

Validation of molecular detection methods for *Salmonella* in dairy

TAO Wen-Jing¹, QU Lian-Hai¹, DONG Bin², ZHAO Ting-Ting³, ZHOU Qi¹,
ZHANG Jun-Chao¹, LIU Lei^{1*}

(1. Beijing Meizheng Bio-Tech Co., Ltd, Beijing 102200, China; 2. Tianjin Bright & Mengde Dairy Co., LTD, Tianjin 300400, China; 3. Bright Dairy&Food Co., Ltd, Shanghai 201111, China)

ABSTRACT: Objective To verify the specificity and stability of *Salmonella*, non-*Salmonella* and positive nucleic acid template for MICROFAST[®] *Salmonella* nucleic acid detection kit (PCR-probe method), and compare the consistency between the PCR kit method and GB 4789.4—2016 culture method. **Methods** The specificity of the MICROFAST[®] *Salmonella* real-time PCR kit was verified by laboratory preservation of 30 *Salmonella* strains and 15 non-*Salmonella* strains. Thirty samples were artificially contaminated with different concentrations of *Salmonella*, and tested by national standard method and PCR kit to study the consistency of the methods. Five positive nucleic acid templates were selected, and each sample was tested using three batches kits. The experimental results were analyzed for repeatability and significance to determine whether there were significant differences between different kits. **Results** The results of 30 *Salmonella* positive strains and 15 non-*Salmonella* strains showed that the specificity of MICROFAST[®] *Salmonella* real-time PCR kit was as expected. The results of the positive samples showed that both the false positive rate and false negative rate of the kit were 0. There were no significant differences between the test

*通信作者: 刘磊, 主要研究方向为食品微生物检测技术。E-mail: liulei@meizhenggroup.com

*Corresponding author: LIU Lei, Beijing Meizheng Bio-Tech Co., Ltd, No.2 Building, No.8 Courtyard, Fenggusilu Road, Yanqing District, (Zhongguancun Yanqing Science Park), Beijing 102200, China. E-mail: liulei@meizhenggroup.com

results of the five positive samples among the three batches of kits, and the coefficients of variation (CV) were less than 1%. **Conclusion** Compared with the national standard method, this kit method has the advantages of simple operation and rapid, and is suitable for the rapid detection of microorganism in dairy products processing.

KEY WORDS: *Salmonella*; PCR-probe method; molecular detection; culture method

0 引言

沙门氏菌(*Salmonella*)是属于肠杆菌科的革兰氏阴性兼性厌氧细菌^[1],是引起人类食源性肠胃炎的重要病因之一^[2]。根据 WHO 的报告,沙门氏菌是全球腹泻病的4个主要病因之一,在食源性致病菌中排名第一^[3]。在美国,沙门氏菌每年造成约120万种疾病,23000例住院治疗 and 450例死亡^[3]。在中国,沙门氏菌每年导致超过300万人次的食物中毒^[4-5]。其中,鼠伤寒沙门氏菌(*S.typhimurium*)和肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*)最流行^[6-8]。

沙门氏菌感染最常见于动物源食物,通过摄入鸡蛋、家禽、猪肉和牛肉等受污染的食品而造成的食物中毒占人类沙门氏菌病例的75%^[9]。我国 GB 29921—2013《食品安全国家标准食品中致病菌限量》^[10]标准中规定了不同食品中沙门氏菌的限量是0CFU/25g(mL)。目前,国际上以培养法为基础检测沙门氏菌;我国以 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》为平板分离及生化鉴定方法的依据^[11]。通过对食品样品预增菌、选择性增菌、分离培养、生化鉴定、血清分型等手段,实现食品中致病微生物定性和定量、微生物常规培养、生化特征鉴定、血清型溯源的分析等,检验流程通常为3~7d。此标准在食品安全领域和保障人们健康中做出突出贡献。但是,此类方法操作较为烦琐,耗时长,不能满足快速检测需求且在培养基制备和接种等步骤的操作过程中对人员的技术要求较高^[12]。近几年,随着国际交流合作的开展,技术的进步,科研水平的提高,相继出现了许多快速检测及鉴定技术和产品,如测试片法、胶体金免疫层析法、酶联免疫法、PCR分子检测法(荧光定量PCR、数字PCR、等温PCR、基因芯片等)^[13-16]。沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法),采用实时荧光PCR技术,针对沙门氏菌特异性基因设计引物和探针。PCR扩增过程中,与模板结合的探针被Taq酶分解产生荧光信号,荧光定量PCR仪根据检测到的荧光信号绘制出实时扩增曲线,从而实现沙门氏菌在核酸水平上的定性检测。适用于食品原料、食品、水样、环境样品中沙门氏菌的定性检测。

本研究验证 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)的特异性及稳定性,同时通过人工添加沙门氏菌的乳制品样本评估试剂盒的假阳性率和假阴性率,对比试剂盒法与 GB 4789.4—2016^[11]对乳制品检测结果的一致性,以期对乳制品中沙门氏菌检测提供更多的检测方案

选择。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与设备

ABI7500PCR仪(美国热电公司); BagMixer400 蠕动式拍击器(法国 INTERSCIENCE 公司); MS 3 basic 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); DensiCHEK plus 比浊仪(生物梅里埃中国有限公司); LRH 70 恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); THZ-C-1 恒温摇床(太仓市实验设备厂); centrifuge 5830R 离心机(德国 Eppendorf 公司); OSE-DB-01 金属浴(中国天根生化科技有限公司)。

1.2 样品、试剂与菌株

1.2.1 样品

纯牛奶、保鲜乳、巴氏杀菌乳、发酵乳、婴幼儿配方奶粉(市售不同品牌、包装)。

1.2.2 试剂

MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)(批号: LR70601M-96T/20200702、LR70601M-96T/20200707、LR70601M-96T/20200710,北京美正生物科技有限公司); 裂解液(批号: 1343CFDAA,北京美正生物科技有限公司); 缓冲蛋白胍水(buffered peptone water)(批号: 20200411)、四硫磺酸钠黄煌绿增菌液(批号: 180601)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(批号: 180321)(北京陆桥技术股份有限公司); 亚硫酸铋(BS)琼脂(批号: 190904,北京陆桥技术股份有限公司); 木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂(批号: 180719,北京陆桥技术股份有限公司); 脑心浸出液(brain heart infusion broth, BHI)(批号: 2849646,英国 Oxiod 公司)。

1.2.3 菌株

(1)沙门氏菌阳性菌株

沙门氏菌(ATCC 14028、CMCC 50333、CMCC 50335、CMCC 50071、CMCC 50093、CMCC 50094、CICC 10420、CICC10437、CICC21480、CICC21482、CICC21485、CICC21486、CICC21489、CICC21491、CICC21492、CICC21494、CICC21497、CICC21498、CICC21499、CICC21500、CICC21502、CICC21506、CICC21511、CICC21512、CICC21586、CICC21651)(中国食品发酵工业研究院有限公司); 沙门氏菌分离株: A00402、A00406、A00407、A00408(北京美正生物科技有限公司)。

(2)非沙门氏菌菌株

阴沟肠杆菌(CMCC 45301)、奇异变形杆菌(CMCC 49005)、普通变形杆菌(CMCC 49027)、大肠埃希氏菌(ATCC 15597)、志贺氏菌(CMCC 51571)、肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种(ATCC 46117)、产气肠杆菌(ATCC13048)、粘质沙雷氏菌(CICC 10898)、弗氏柠檬酸杆菌(ATCC43864)、阪崎肠杆菌(ATCC 29544)、单核细胞增生李斯特氏菌(ATCC 19115)、创伤弧菌(CICC 21615)、副溶血性弧菌(ATCC 17802)、乙型溶血性链球菌(ATCC 21059)(中国食品发酵工业研究院有限公司);小肠结肠炎耶尔森氏菌(H00110)(北京美正生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)操作方法

(1)取 40 μL 增菌液于裂解液管中, 98 $^{\circ}\text{C}$ 或沸水浴 10 min。冷却至室温, 吸取上清备用或者置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(2)从试剂盒中取出沙丁胺醇(salbutamol, SAL)预混液, 充分融化, 短暂离心, 后将阴性对照、样品的DNA提取液、阳性对照各取 5 μL 分别加入 PCR 管中, 盖好管盖, 短暂离心, 立即进行 PCR 扩增反应。PCR 管置于 PCR 仪上, 推荐反应程序设定如下: 反应体系为 25 μL , 在第二步每个循环 60 $^{\circ}\text{C}$ 时检测荧光信号, 检测通道选择 FAM。详细操作见说明书。

1.3.2 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)特异性验证

从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出保存的沙门氏菌阳性菌株 30 株和非沙门氏菌 15 株, 融化后用无菌接种环将各菌株划线接种于 BHI 琼脂平板中, (37 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h。用无菌接种环挑取单菌落, 置于 50 μL 无菌 PBS 中混匀, 制备成菌悬液备用。

按照 1.3.1 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)说明书设定进行核酸提取及 PCR 反应和结果判读。

1.3.3 假阳性率和假阴性率验证

从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出保存的沙门氏菌标准菌株(CMCC 50333), 用无菌接种环将各菌株划线接种于 BHI 琼脂平板中, (37 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h。用无菌接种环挑取单菌落, 接种于 BHI 液体培养基, 恒温摇床(37 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 160 r/min, 振荡培养 18 h。平板计数琼脂计数混合菌液的菌浓度 3.1 \times 10⁸ CFU/mL。无菌吸管吸取菌液 1 mL, 缓慢注入 9 mL 无菌 PBS 中, 充分混匀, 依次制备 10 倍梯度稀释菌液。

取纯牛奶、保鲜乳、巴氏杀菌乳、发酵乳、婴幼儿配方奶粉共 30 个, 每种 6 个样品, 每个样品称取 3 份 25 g(mL), 分别加入 225 mL 缓冲蛋白胍水 BPW(发酵乳样品使用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0 \pm 0.5)。1 份样品不添加沙门氏菌标准菌株, 1 份样品添加稀释至 10⁻⁷ 的沙门

氏菌标准菌株(CMCC 50333)稀释菌液, 制备添加浓度为 1~5 CFU/25 g 添加样品, 1 份添加稀释至 10⁻⁶ 沙门氏菌标准菌株(CMCC 50333)稀释菌液, 制备添加浓度为 10~50 CFU/25 g 添加样品, 于蠕动式拍击器中拍击 1 min, 充分混匀。(36 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h。

按照 1.3.1 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)说明书设定进行核酸提取及 PCR 反应和结果判读。剩余部分按照 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》进行检测和结果判定, 记录 2 个方法的比对结果并计算假阳性率和假阴性率。

1.4 稳定性实验

分别使用 2020 年 7 月 2 日、2020 年 7 月 7 日、2020 年 7 月 10 日生产的不同批次的 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法), 选择制备好的 5 份阳性核酸模板, 每个模板分别使用 3 个批次的产品检测, 对实验结果进行重复性和显著性分析, 确定不同试剂盒批次间是否存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 特异性检测

MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)对 30 株沙门氏菌阳性菌株的检测 Ct 值均小于 35, 结果均判定为“沙门氏菌核酸阳性”; 而对 15 株非沙门氏菌菌株均没有出现特异性扩增, 检测 Ct 值均大于 40, 结果均判定为“沙门氏菌核酸阴性”。结果见表 1、表 2。

表 1 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)30 株沙门氏菌的检测结果

Table 1 Results of 30 Salmonella detected by MICROFAST [®] Salmonellareal-time PCR kit				
编号	菌株名称	菌株号*	来源	PCR 结果#
1	沙门氏菌	ATCC 14028	ATCC Δ	+(15.88)
2	沙门氏菌	CMCC 50333	CMCC \star	+(19.20)
3	沙门氏菌	CMCC 50335	CMCC	+(16.57)
4	沙门氏菌	CMCC 50071	CMCC	+(17.23)
5	沙门氏菌	CMCC 50093	CMCC	+(16.46)
6	沙门氏菌	CMCC 50094	CMCC	+(18.88)
7	沙门氏菌	CICC 10420	CICC \blacktriangle	+(16.63)
8	沙门氏菌	CICC 10437	CICC	+(15.89)
9	沙门氏菌	CICC 21480	CICC	+(17.23)
10	沙门氏菌	CICC 21482	CICC	+(17.35)
11	沙门氏菌	CICC 21485	CICC	+(17.62)

表 1(续)

编号	菌株名称	菌株号*	来源	PCR 结果#
12	沙门氏菌	CICC 21486	CICC	+(16.58)
13	沙门氏菌	CICC21489	CICC	+(18.96)
14	沙门氏菌	CICC 21491	CICC	+(17.58)
15	沙门氏菌	CICC 21492	CICC	+(17.80)
16	沙门氏菌	CICC 21494	CICC	+(17.96)
17	沙门氏菌	CICC 21497	CICC	+(17.58)
18	沙门氏菌	CICC 21498	CICC	+(16.89)
19	沙门氏菌	CICC 21499	CICC	+(19.49)
20	沙门氏菌	CICC 21500	CICC	+(16.43)
21	沙门氏菌	CICC 21502	CICC	+(17.52)
22	沙门氏菌	CICC 21506	CICC	+(16.23)
23	沙门氏菌	CICC 21511	CICC	+(18.57)
24	沙门氏菌	CICC 21512	CICC	+(17.41)
25	沙门氏菌	CICC21586	CICC	+(19.08)
26	沙门氏菌	CICC 21651	CICC	+(16.49)
27	沙门氏菌	A00402	食品分离株	+(17.62)
28	沙门氏菌	A00406	食品分离株	+(16.53)
29	沙门氏菌	A00407	食品分离株	+(17.22)
30	沙门氏菌	A00408	食品分离株	+(18.09)

注: *以 A/H 开头的品系号均为北京美正生物科技有限公司分离菌株, 均通过分子生物学和生化鉴定。

#“+”表示根据 MICROFAST®沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)说明书结果判定为沙门氏菌核酸阳性; “-”表示根据 MICROFAST®沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)说明书结果判定为沙门氏菌核酸阴性; 括号中数值为 C_t 值。

△ 美国模式培养菌集存库(American type culture collection, ATCC);
☆ 中国医学微生物菌种保藏管理中心(China medical culture collection, CMCC); ▲ 中国工业微生物菌种保藏管理中心(China center of industrial culture collection, CICC)。

表 2 MICROFAST®沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)15 株非沙门氏菌的检测结果

Table 2 Results of 15 non-Salmonella detected by MICROFAST® Salmonella real-time PCR kit

编号	菌株名称	菌株号*	来源	PCR 结果#
1	大肠埃希氏菌	ATCC 15597	ATCC	-
2	阴沟肠杆菌	CMCC 45301	CMCC	-
3	奇异变形杆菌	CMCC 49005	CMCC	-
4	普通变形杆菌	CMCC 49027	CMCC	-
5	志贺氏菌	CMCC 51571	CMCC	-
6	小肠结肠炎耶尔森氏菌	H00110	分离株	-
7	阪崎肠杆菌	ATCC 29544	ATCC	-
8	单增李斯特氏菌	ATCC 19115	ATCC	-
9	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种	ATCC 46117	ATCC	-
10	产气肠杆菌	ATCC 13048	ATCC	-
11	乙型溶血性链球菌	ATCC 21059	ATCC	-
12	副溶血性弧菌	ATCC 17802	ATCC	-
13	粘质沙雷氏菌	CICC10898	CICC	-
14	创伤弧菌	CICC 21615	CICC	-
15	弗氏柠檬酸杆菌	ATCC 43864	ATCC	-

2.2 假阳性率和假阴性率检测

取纯牛奶、保鲜乳、巴氏杀菌乳、发酵乳、婴幼儿配方奶粉共 30 个, 每种 6 个样品, 按照 1.3.3 的验证方法用试剂盒及国家标准方法进行检验, 结果见表 3、表 4。

表 3 沙门氏菌未人工添加样品检测结果

Table 3 Results of samples without Salmonella artificially

样品类别	样品名称	GB 4789.4—2016*	MICROFAST®沙门氏菌核酸检测试剂盒#
纯牛奶	伊利经典纯牛奶瓶装(250 mL)	-	-
	蒙牛纯牛奶盒装(250 mL)	-	-
	蒙牛特仑苏纯牛奶盒装(250 mL)	-	-
	完达山纯牛奶盒装(250 mL)	-	-
	三元纯牛奶盒装(250 mL)	-	-
	三元特品鲜牛奶	-	-

表3(续)

样品类别	样品名称	GB 4789.4—2016*	MICROFAST®沙门氏菌核酸检测试剂盒#
保鲜乳	三元特品鲜牛奶袋装(243 mL)	-	-
	三元极致鲜牛奶盒装(490 mL)	-	-
	蒙牛现代牧场鲜牛奶盒装(960 mL)	-	-
	三元农垦牧场鲜牛奶盒装(500 mL)	-	-
	三元脱脂鲜牛奶盒装(500 mL)	-	-
	三元鲜牛奶盒装(500 mL)	-	-
	三元优选鲜牛乳瓶装(240 mL)	-	-
巴氏杀菌乳	三元极致酪蛋白鲜牛奶瓶装(240 mL)	-	-
	三元脱脂鲜牛奶盒装(250 mL)	-	-
	三元极致有机鲜牛乳瓶装(240 mL)	-	-
	光明特品鲜牛奶袋装(243 mL)	-	-
	蒙牛高钙牛奶	-	-
发酵乳	牛奶乐园七点酸奶盒装(135 g)	-	-
	伊利草莓果粒风味发酵乳瓶装(90 g)	-	-
	伊利原味风味发酵乳	-	-
	妙沁发酵乳(草莓+树莓+紫米)	-	-
	农夫联盟希腊风味脱脂酸奶(500 g)	-	-
	农夫联盟希腊风味发酵乳瓶装(500 g)	-	-
	康维多荷兰蕊婴儿配方羊奶粉(900 g)	-	-
婴幼儿配方奶粉	康维多健儿儿童奶粉(900 g)	-	-
	可贝思婴儿配方羊奶粉(400 g)	-	-
	雀巢葛儿舒乳蛋白深度水解配方奶粉(400 g)	-	-
	康维多荷兰蕊婴儿配方奶粉(400 g)	-	-
	贝欧莱婴儿配方奶粉(360 g)	-	-

注: *"+"表示根据 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》结果判定为“25 g(mL)样品中检出沙门氏菌”;“-”根据 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》结果判定为“25 g(mL)样品中未检出沙门氏菌”。

#“+”表示根据 MICROFAST®沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)说明书结果判定为沙门氏菌核酸阳性;“-”表示根据 MICROFAST®沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)说明书结果判定为沙门氏菌核酸阴性。以下同。

表4 沙门氏菌人工添加(5CFU)样品检测结果
Table 4 Results of samples added *Salmonella*(5CFU) artificially

样品类别	样品名称	GB 4789.4—2016*	MICROFAST®沙门氏菌核酸检测试剂盒#
纯牛奶	伊利经典纯牛奶瓶装(250 mL)	+	+
	蒙牛纯牛奶盒装(250 mL)	+	+
	蒙牛特仑苏纯牛奶盒装(250 mL)	+	+
	完达山纯牛奶盒装(250 mL)	+	+
	三元纯牛奶盒装(250 mL)	+	+
	三元特品鲜牛奶	+	+
	三元特品鲜牛奶袋装(243 mL)	+	+
保鲜乳	三元特品鲜牛奶盒装(490 mL)	+	+
	蒙牛现代牧场鲜牛奶盒装(960 mL)	+	+
	三元农垦牧场鲜牛奶盒装(500 mL)	+	+
	三元脱脂鲜牛奶盒装(500 mL)	+	+
	三元鲜牛奶盒装(500 mL)	+	+

表 4(续)

样品类别	样品名称	GB 4789.4—2016*	MICROFAST®沙门氏菌核酸检测试剂盒#
巴氏杀菌乳	三元优选鲜牛乳瓶装(240 mL)	+	+
	三元极致酪蛋白鲜牛奶瓶装(240 mL)	+	+
	三元脱脂鲜牛奶盒装(250 mL)	+	+
	三元极致有机鲜牛乳瓶装(240 mL)	+	+
	光明特品鲜牛奶袋装(243 mL)	+	+
发酵乳	蒙牛高钙牛奶	+	+
	牛奶乐园七点酸奶盒装(135 g)	-	-
	伊利草莓果粒风味发酵乳瓶装(90 g)	-	-
	伊利原味风味发酵乳	+	+
	妙沁发酵乳(草莓+树莓+紫米)	-	-
婴幼儿配方奶粉	农夫联盟希腊风味脱脂酸奶(500 g)	-	-
	农夫联盟希腊风味发酵乳瓶装(500 g)	-	-
	康维多荷莱蕊婴儿配方羊奶粉(900 g)	+	+
	康维多健儿儿童奶粉(900 g)	+	+
	可贝思婴儿配方羊奶粉(400 g)	+	+
纯牛奶	雀巢葛儿舒乳蛋白深度水解配方奶粉(400 g)	+	+
	康维多荷莱蕊婴儿配方奶粉(400 g)	+	+
	伊利经典纯牛奶瓶装(250 mL)	+	+
	高浓度添加(50 CFU/25 g)		
	伊利经典纯牛奶瓶装(250 mL)	+	+
保鲜乳	蒙牛纯牛奶盒装(250 mL)	+	+
	蒙牛特仑苏纯牛奶盒装(250 mL)	+	+
	完达山纯牛奶盒装(250 mL)	+	+
	三元纯牛奶盒装(250 mL)	+	+
	三元特品鲜牛奶	+	+
巴氏杀菌乳	三元特品鲜牛奶袋装(243 mL)	+	+
	三元极致鲜牛奶盒装(490 mL)	+	+
	蒙牛现代牧场鲜牛奶盒装(960 mL)	+	+
	三元农垦牧场鲜牛奶盒装(500 mL)	+	+
	三元脱脂鲜牛奶盒装(500 mL)	+	+
发酵乳	三元鲜牛奶盒装(500 mL)	+	+
	三元优选鲜牛乳瓶装(240 mL)	+	+
	三元极致酪蛋白鲜牛奶瓶装(240 mL)	+	+
	三元脱脂鲜牛奶盒装(250 mL)	+	+
	三元极致有机鲜牛乳瓶装(240 mL)	+	+
婴幼儿配方奶粉	光明特品鲜牛奶袋装(243 mL)	+	+
	蒙牛高钙牛奶	+	+
	牛奶乐园七点酸奶盒装(135 g)	-	-
	伊利草莓果粒风味发酵乳瓶装(90 g)	-	-
	伊利原味风味发酵乳	+	+
婴幼儿配方奶粉	妙沁发酵乳(草莓+树莓+紫米)	-	-
	农夫联盟希腊风味脱脂酸奶(500 g)	-	-
	农夫联盟希腊风味发酵乳瓶装(500 g)	-	-
	康维多荷莱蕊婴儿配方羊奶粉(900 g)	+	+
	康维多健儿儿童奶粉(900 g)	+	+
婴幼儿配方奶粉	可贝思婴儿配方羊奶粉(400 g)	+	+
	雀巢葛儿舒乳蛋白深度水解配方奶粉(400 g)	+	+
	康维多荷莱蕊婴儿配方奶粉(400 g)	+	+
	伊利经典纯牛奶瓶装(250 mL)	+	+

由于沙门氏菌对乳酸菌发酵产物的不耐受,会导致部分发酵乳样本中添加沙门氏菌的死亡,从而导致部分阳性加标发酵乳样本增菌检测结果为阴性。总结表 3、表 4 中 GB 4789.4—2016 和 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)检测结果见表 5。

表 5 2 种检测方法对人工添加样品的检测结果
Table 5 Results of two methods for samples artificially

MICROFAST [®] 沙门氏菌核酸 检测试剂盒(PCR-探针法)	GB 4789.10—2016		合计
	阳性	阴性	
阳性	50	0	50
阴性	0	40	40
合计	50	40	90(固定值)

表 6 不同批次 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)检测结果
Table 6 Results of different batches of *Salmonella* real-time PCR kit

批号	MICROFAST [®] 沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)(Ct 值)					ANOVA 检验结果
	模板 1	模板 2	模板 3	模板 4	模板 5	
20200702	17.31	20.27	17.05	18.02	16.32	F=0.002 P=0.998 批次间结果没有显著性差异
	17.29	20.16	16.97	17.93	16.52	
20200707	17.19	20.24	17.10	18.19	16.27	
	17.47	20.39	16.86	17.79	16.63	
20200710	17.16	20.46	17.07	17.97	16.62	
	17.30	20.45	16.76	17.97	16.50	
变异系数 CV	0.63 %	0.60 %	0.79 %	0.72 %	0.92 %	

3 结论与讨论

本研究选择了 30 株沙门氏菌及 15 株非沙门氏菌进行特异性检测,结果表明, MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)对沙门氏菌的特异性符合预期。本研究选择约 5 CFU/25 g 的低浓度沙门氏菌,通过人工添加阳性菌株添加到 30 个乳制品样本中,本研究选择的是市售纯牛奶、保鲜乳、巴氏杀菌乳、发酵乳、婴儿配方奶粉,共 5 类,具有一定代表性。在此条件下, MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)方法并与国家标准方法比对检验结果,研究结果表明, MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)的假阳性率与假阴性率为 0,与国家标准法检测结果一致,其中有 10 个酸奶样本出现阳性菌株添加后,国家标准法和 PCR 试剂盒法都未检出的结果,主要是由于沙门氏菌对乳酸菌发酵产物的不耐受,会导致部分发酵乳样本中添加沙门氏菌的死亡,从而导致部分阳性加标发酵乳样本增菌检测结果为阴性。本验证对

由表 5 可计算,对于阴性结果, MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)与 GB 4789.4—2016 一致,假阳性率(false positive rate, FPR)为 0;对于阳性结果, MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)检测结果的假阴性率(false negative rate, FNR)为 0。

2.3 稳定性实验

取 3 个不同生产批号的 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)进行测试,测试对象为选择先前制备的 5 份阳性核酸模板(5 μ L)。采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)方法分析各个批次检测结果间是否存在显著性差异。

由表 6 可见,不同批次的 MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)对 5 份阳性核酸模板检测结果之间没有显著性差异。

MICROFAST 沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)进行了批间差测试,测试对象为选择制备好的 5 份阳性核酸模板。采用单因素方差分析方法分析各个批次检测结果,对 5 份阳性核酸模板检测结果之间没有显著性差异,变异系数 CV 均小于 1%。

本研究结果显示, MICROFAST[®]沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法)具有良好的准确性和特异性,在乳制品样本中,与国家标准方法相比具有良好的一致性。该试剂盒具有操作简单、快速等优势,适合于乳制品加工过程微生物快速检测。

参考文献

- [1] IBARRA JA, STEELE-MORTIMER O. *Salmonella*— the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival [J]. *Cellular Microbiol*, 2009, 11(11): 1579–1586.
- [2] DJEBBI-SIMMON SD, XU W, JANE SM, et al. Survival and inactivation of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* on food contact surfaces during log, stationary and long-term stationary phases [J]. *Food Microbiol*,

- 2019, 84: 103272.
- [3] 王琳, 赵建梅, 赵格, 等. 国内外食源性致病微生物风险预警开展现状与启示[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(4): 65–71.
Wang L, Zhao JM, Zhao G, *et al.* The status and enlightenment of foodborne pathogenic microorganism risk early warning at home and abroad [J]. *Chin J Anim Quarant*, 2020, 37(4): 65–71.
- [4] WANGL, HUOX, QIW, *et al.* Rapid and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using nickel nanowire bridge forelectro chemical impedance amplification [J]. *Talanta*, 2020, 211: 120715.
- [5] 付萍, 王连森, 陈江, 等. 2015 年中国大陆食源性疾病暴发事件监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(1): 64–69.
FU P, WANG LS, CHEN J, *et al.* Surveillance data analysis of foodborne disease outbreak events in Mainland China in 2015 [J]. *Chin J Food Hyg*, 2019, 31(1): 64–69.
- [6] HOWE K, SALEHI S, BAILEY RH, *et al.* Supplemental invasion of *Salmonella* from the perspective of *Salmonella enterica* serovars Kentucky and *Typhimurium* [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17: 88.
- [7] MARTINOVICT, ANDJELKOVICU, GAJDOSIKMS, *et al.* Foodborne pathogens and their toxins [J]. *J Proteomics*, 2016, 147: 226–235.
- [8] HUMPHREYT. Science and society–*Salmonella*, stress responses and food safety [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(6): 504–509.
- [9] MOMIN KM, MILTON AAP, GHATAK S, *et al.* Development of a novel and rapid polymerase spiral reaction (PSR) assay to detect *Salmonella* in pork and pork products [J]. *MolCell Probes*, 2020, 50: 101510.
- [10] GB 29921—2013 食品安全国家标准食品中致病菌限量[S].
GB 29921—2013 National food safety standard—Limit of pathogenic bacteria in food [S].
- [11] GB4789. 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].
GB4789. 4—2016 National food safety standard—Food microbiological examination—*Salmonella* [S].
- [12] 刘秀梅, 刘磊, 杨瑞馥, 等. 食源性致病微生物检验方法专家共识[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50(10): 850–852.
LIU XM, LIU L, YANG RF, *et al.* Expert consensus on testing methods for foodborne pathogenic microorganisms [J]. *Chin J Pre Med*, 2016, 50(10): 850–852.
- [13] 刘振宇. 食品中病原微生物快速检测技术的研究进展[J]. 广州化工, 2014, 42(16): 32–33, 53.
LIU ZY. Research progress of technologies for rapid detection of food-borne pathogens [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2014, 42(16): 32–33, 53.
- [14] 王杨. 关于食品微生物快速检测技术的研究进展[J]. 农家顾问, 2014, (11): 75.
WANG Y. Research progress on rapid detection technology of food microorganisms [J]. *Agric Consultant*, 2014, (11): 75.
- [15] 陈爱亮. 食源性病原微生物快速检测技术应用现状与发展趋势[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(1): 173–186.
CHEN AL. Application status and development trend of foodborne pathogenic microorganisms rapid detection technology [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(1): 173–186.
- [16] 朱强远, 杨文秀, 高一博, 等. 一种可绝对定量核酸的数字 PCR 微流控芯片[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(3): 545–550.
ZHU QY, YANG WX, GAO YB, *et al.* Microfluidic digital chip for absolute quantification of nucleic acid amplification [J]. *Chem J Chin Univ*, 2013, 34(3): 545–550.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



陶文靖, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测技术。

E-mail: wenjing.tao@meizhenggroup.com



刘磊, 硕士, 主要研究方向为食品微生物检测技术。

E-mail: liulei@meizhenggroup.com