

mini-MPN-STE-qPCR 法快速定量检测食品中沙门氏菌

章小洪¹, 陈卫平¹, 王伟影¹, 陈梦¹, 邹小龙¹, 饶琛¹, 郑连宝^{2*}

(1. 丽水市质量检验检测研究院, 丽水 323000; 2. 德清县食品药品检测中心, 湖州 313200)

摘要: **目的** 建立一种快速、简易、可定量检测食源性沙门氏菌定量 PCR (quantitative PCR, qPCR)方法。**方法** 依据沙门菌属 *invA* 基因序列设计染料法 qPCR 引物, 建立沙门氏菌 qPCR 检测方法, 并通过短时间增菌(short time enrichment, STE)的 5 管微型多管发酵计数法(mini-most probable number, mini-MPN)进行定量检测, 构建 mini-MPN-STE-qPCR 法。使用人工污染的鸡肉混合液进行定量检测, 检测结果与传统 MPN 计数法和平板计数法进行比较分析。**结果** 建立的 qPCR 法特异性良好, 方法灵敏度为 50 CFU/mL, 结合 48 孔板 mini-MPN 和 4 h 短时间增菌, 建立的 mini-MPN-STE-qPCR 法可将整个检测流程缩短至 7 h。人工添加沙门氏菌的鸡肉混合液检测结果表明方法检出限为 $-0.347 \log$ MPN/mL, Bland-Altman 分析结果显示, 此法与传统 MPN 计数法相关系数 $r^2=0.994$, 与平板计数法相关系数 $r^2=0.992$ 。**结论** 该方法准确、简单易行、成本低、灵敏度高, 可用于食品中沙门菌的快速定量检测。

关键词: 沙门氏菌; *invA* 基因; 荧光定量 PCR; mini-MPN; 短时间增菌; 定量检测

Quantitative detection of *Salmonella* in food by mini-MPN-STE-qPCR

ZHANG Xiao-Hong¹, CHEN Wei-Ping¹, WANG Wei-Ying¹, CHEN Meng¹, ZHOU Xiao-Long¹,
RAO Chen¹, ZHENG Lian-Bao^{2*}

(1. Lishui Institute for Quality Inspection and Testing, Lishui 323000, China;
2. Deqing Food and Drug Inspection and Testing Center, Huzhou 313200, China)

ABSTRACT: Objective To establish a fast, easy and quantitative detection method of *Salmonella* in food. **Methods** Primers based on the *invA* gene sequence of *Salmonella* published on Genbank were designed to establish a quantitative PCR (qPCR) method for the detection of *Salmonella*, 5 tubes mini-MPN method with short time enrichment (STE) was joined to establish a mini-MPN-STE-qPCR method. The artificially contaminated chicken breast mixture was used for quantitative detection, and the detection results were compared with the traditional MPN method and plate counting method. **Results** The qPCR method established had good specificity with the sensitivity of 50 CFU/mL. With mini-MPN in 48-well plate and 4 h short time enrichment in buffered peptone water, the entire experiment process of mini-MPN-STE-qPCR was shortened to 7 h. The quantitative detection limit was $-0.347 \log$ MPN/mL in the artificial contaminated chicken breast mixture. The Bland-Altman analysis showed that the

基金项目: 浙江省市场监督管理局科研计划项目(20190360、20210177)

Fund: Supported by the Science and Technology Planning Project of Zhejiang Market Supervision Administration (20190360, 20210177)

*通信作者: 郑连宝, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物学检测。E-mail: 214680949@qq.com

*Corresponding author: ZHENG Lian-Bao, Master, Engineer, Deqing Food and Drug Inspection and Testing Center, No.1088, Zhongxing North Road, Deqing 313200, China. E-mail: 214680949@qq.com

correlation coefficient r^2 between this method and the traditional MPN counting method was 0.994, and the correlation coefficient r^2 with the plate counting method was 0.992. **Conclusion** This method is accurate, reliable and low-cost, and can be used for rapid quantitative detection of *Salmonella* in food.

KEY WORDS: *Salmonella*; *invA* gene; fluorescence quantitative PCR; mini-most probable number; short time enrichment; quantitative detection

0 引言

沙门氏菌是一种常见的食源性致病菌, 对人畜都有致病作用, 是诱发食物中毒的主因之一^[1], 70%~80%食源性致病菌感染事件都是由沙门氏菌引起的^[2], 因此食品中沙门氏菌的检测尤为重要。沙门氏菌在肉与肉制品、蛋与蛋制品、乳与乳制品等动物源性食品中检出率较高^[3-4], 其中饲养禽肉中污染尤为严重, 而且大部分分离的菌株都有多种抗生素抗性^[5-6]。随着现代抗生素的过度使用, 家禽肠道中的微生物菌群(包括沙门氏菌)^[7]对抗生素逐渐产生抗性, 这无疑会威胁人类健康, 因此禽肉中沙门氏菌的检测一直是国内外研究的主要方向^[2-3,6]。

在食品微生物的检测中, 平板计数法和多管发酵法(most probable number, MPN)是通用的定量方法。MPN 法是一种基于概率计算的计数方法, 比平板计数法更灵活, 对培养基的选择性要求低, 检出限可根据加样量进行调整。因此 MPN 计数法广泛用于食品中大肠菌群、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌等微生物的定量检验。虽然 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》中未制定沙门氏菌的定量检测方法, 但美国分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)、美国环保局(Environmental Protection Agency, EPA)等机构制定的国际标准中均有沙门氏菌 MPN 计数法的使用, 可见 MPN 计数法在定量检测沙门氏菌中具有重要地位。

常规的 MPN 计数法需要进行定性检验, 操作烦琐复杂, 检测时间需要 4~6 d, 严重限制了 MPN 法的使用, 因此, 探求快速、简单、易行的定量方法越来越受到国内外研究者的关注^[8]。近年来, 沙门氏菌的分子生物学检测技术发展迅速, 定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)^[9]、多重 PCR (multiplex PCR, mPCR)^[10]、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[11]、重组聚合酶反应(recombinase polymerase amplification, RPA)^[12]等技术都是对普通 PCR 法的改进和补充, 可以将沙门氏菌的后续鉴定工作从数天缩短至数小时。本研究采用基于 48 孔板的 mini-MPN 计数法, 通过短时间增菌(short time enrichment, STE)^[13]的形式, 结合 qPCR 法, 建立 mini-MPN-STE-qPCR 法快速定量检测食品中沙门氏菌, 以期实现沙门氏菌的快速定量检测。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器和设备

QuantStudio5 荧光定量 PCR 仪、LEGEND MICRO21 高速离心机(美国赛默飞世尔科技公司); QIAXPERT 核酸含量分析仪(德国凯杰生物技术有限公司); IN260 生化培养箱(德国美墨尔特公司); HF-Safe-1200JE 生物安全柜(力康生物医疗科技控股有限公司)。

1.1.2 材料与试剂

胰酪胨大豆肉汤培养基(trypticase soy broth, TSB)、缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、血平板、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(xylose lysine deoxycholate, XLD)(广东环凯微生物试剂有限公司); 乙型副伤寒沙门氏菌定量质控菌株 CMCC(B)50094(广东环凯微生物科技有限公司); TBGreen Premix ex taq 预混液、参比荧光 ROX(宝日生物技术有限公司)

1.1.3 菌种和引物

菌种使用情况见表 1。依据沙门氏菌属稳定表达的 *invA* 基因 mRNA 序列, 使用 Beacon Designer 软件设计特异性引物, 经 BLAST 确认其保守性, 由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列为:

F: 5'-CACCGAAATACCGCCAATAAAG-3'

R: 5'-AGCGTACTGGAAAGGGAAAG-3'。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种制备

将超低温冷冻保存的菌种接种于血平板中, 36 °C 培养 24 h 进行活化, 再接种于 TSB 培养基中, 36 °C 培养 16 h 得到新鲜菌液。

1.2.2 细菌 DNA 快速提取

参考文献^[14], 并有改动, 采用煮沸法提取细菌 DNA, 吸取 1 mL 样液置于 1.5 mL 离心管, 12000 r/min 离心 5 min, 小心移去上清液 950 μ L, 再加入 1 mL 无菌 PBS 混匀后 12000 r/min 离心 5 min, 小心移去上清液 950 μ L。离心管置于 100 °C 电热板煮沸 10 min, 得到的细菌 DNA 粗提液 12000 r/min 离心 1 min, 上清液直接用于 qPCR 实验。

1.2.3 qPCR 法的建立

qPCR 反应体系: TBGreen Premix 10 μ L, 正反引物各 0.8 μ L, 参比荧光 ROX 0.4 μ L, 细菌 DNA 粗提液 5 μ L, 加无菌水至 20 μ L。反应条件: 预变性 95 °C 30 s, 40 个循环(95 °C 5 s, 60 °C 34 s), 测定溶解曲线。

反应灵敏度测定: 取新鲜制备的菌液进行 10 倍系列稀释, 每个浓度移取 1 mL 稀释液进行细菌 DNA 提取和 qPCR 实验, 确定反应灵敏度, 进行溶解曲线分析。

特异性实验: 将冷冻保存的不同菌种接种于血平板中, 36 °C 培养 24 h 进行活化, 再接种于 TSB 培养基中, 36 °C 培养 24 h 得到新鲜菌液, 移取 1 mL 菌液进行 DNA 快速提取, 进行 qPCR 实验, 绘制溶解曲线, 测定方法的特异性。

1.2.4 平板计数法定量检测沙门氏菌

使用无菌 PBS 对样液进行 10 倍系列稀释, 每个浓度取 100 μ L 至 XLD 平板涂布, 36 °C 培养 24 h。计数典型的黑色菌落, 并参照 GB 4789.4—2016 进行后续鉴定工作。

1.2.5 增菌液和增菌时间的选择

依据 1.2.4 平板计数法检测菌液浓度, 分别使用 TSB 和 BPW 稀释得到 100 CFU/mL 菌液, 分别于 0、2、3、4、5 h 取适宜浓度的样液 100 μ L 涂布至 XLD 平板, 36 °C 培养 24 h 计数典型菌落。

1.2.6 传统 MPN 计数法定量检测沙门氏菌

使用增菌液对样液进行 10 倍系列稀释, 每个浓度取 1 mL 至 48 孔板, 每个浓度加 5 孔, 置于 36 °C 培养 16 h, 对每个孔的培养液参照 GB 4789.4—2016 进行划线分离鉴定。MPN 计数参照美国食品和药物管理局(Food And Drug Administration, FDA)细菌分析手册(Bacteriological Analytical Manual, BAM)附录 2^[15]。

1.2.7 qPCR 定量检测沙门氏菌

使用增菌液对样液进行 10 倍系列稀释, 每个浓度分别取 1 mL 至 5 个 1.5 mL 离心管中, 进行 DNA 提取和 qPCR 鉴定实验。MPN 计算参照 1.2.6。

1.2.8 mini-MPN-STE-qPCR 法定量检测沙门氏菌

使用增菌液对样液进行 10 倍系列稀释, 每个浓度梯度取 1 mL 至 48 孔板, 每个浓度加 5 孔, 置于 36 °C 短时间增菌后, 分别取增菌液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 进行 DNA 提取和 qPCR 鉴定实验。MPN 计算参照 1.2.6。

1.2.9 鸡胸肉混合液样品的定量检测

从超市购置新鲜鸡胸肉置于无菌均质袋中送入实验室, 适度均质后置于冰箱中冷冻保存。参照 GB 4789.4—2016 进行检验确认无沙门氏菌后, 将剩余样品解冻后每份称取 25 g, 添加不同浓度沙门氏菌的 BPW 50 mL (10^0 ~ 10^5 CFU/mL), 使用拍击式均质器均质 3 min, 得到的样品即为鸡胸肉混合液, 分别使用平板计数法、传统 MPN 计数法、qPCR 法和 mini-MPN-STE-qPCR 法定量检测。

1.2.10 数据统计分析

使用 SigmaPlot 进行数据统计, 采用 Bland-Altman 进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 qPCR 灵敏度和特异性实验

实验选取 5×10^8 CFU/mL 的新鲜菌液进行 10 倍系列

稀释, 得到 5×10^7 、 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 和 5 CFU/mL 的稀释液, 每个浓度分别取 2 个平行进行快速 DNA 提取和 qPCR 实验, 以 Ct 值为纵坐标, 以各个菌液浓度的对数为横坐标绘制标准曲线(如图 1a 所示)。实验获得的标准曲线为 $Y = -3.345 + 39.265X$, $r^2 = 0.997$, 线性良好, 扩增效率为 99.05%, 这说明菌液浓度对数值与 Ct 值之间具有良好的线性关系, 设计的引物和探针具有较高的扩增效率, 所建立的 qPCR 结果准确可靠。同时从图 1a 中可知, 当沙门氏菌浓度稀释至 5 CFU/mL 时无 Ct 值, qPCR 法的检出灵敏度为 50 CFU/mL。由图 1b 可知, 溶解曲线的溶解温度为 (81.8 ± 0.5) °C, 溶解温度稳定, 能特异性识别 *invA* 基因的扩增产物。因此, 实验所建立的 qPCR 法在灵敏度上具有明显优势。

为了验证所建立的 qPCR 法的特异性, 实验使用多种菌株进行 qPCR 实验, 结果见表 1。由表 1 可知, qPCR 法对多株沙门氏菌均表现出良好的特异性, 对于 GB 4789.4—2016 中培养法较难鉴定的沙门氏菌属亚利桑那亚种等菌株鉴别能力良好。结合溶解曲线分析, 本研究建立的 qPCR 法对于其他食源性致病菌均无法检出, 符合实验对于沙门氏菌特异性鉴定的要求。综上, 本研究所建立的 qPCR 法的特异性良好。

2.2 增菌液和最佳增菌时间的确定

为使实验时间最短并且增菌效果最佳, 本研究选取非选择性营养良好的 TSB 和 BPW 作为增菌液, 比较 2 种增菌液的短时间增菌效果, 实验结果如图 2 所示。结果表明, TSB 和 BPW 都能有效促进沙门氏菌增殖。初始浓度下, 增菌液营养丰富, 增菌初期的 5 h 内, TSB 和 BPW 的增菌数量均无显著性差异($P > 0.05$), 考虑到成本最低原则和 GB 4789.4—2016 标准的对应性, 选择 BPW 作为初始增菌液。多次试验结果表明, 低浓度下经 4 h 增菌后可达到 qPCR 法的灵敏度, 因此本研究使用 BPW 短时间增菌 4 h 作为 qPCR 法的增菌过程。

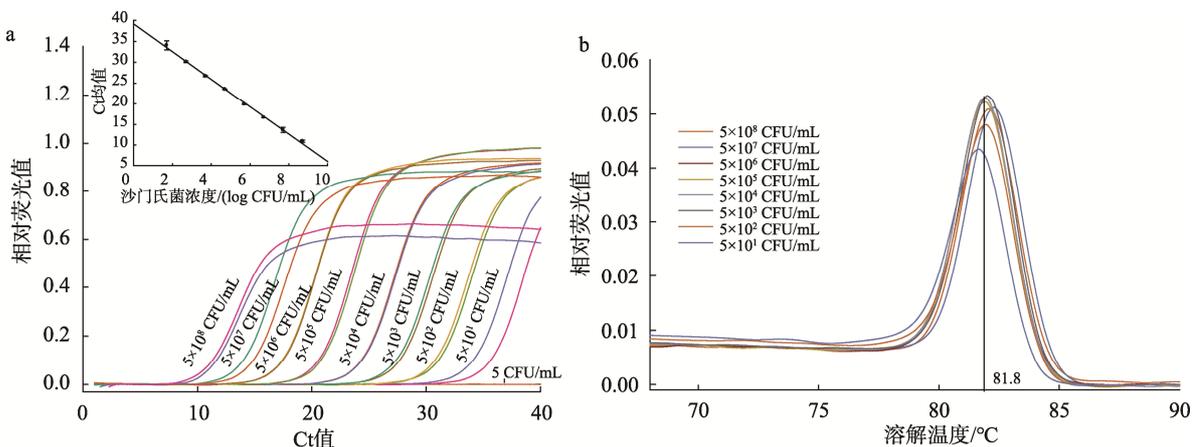
2.3 人工污染鸡胸肉混合液定量检测方法比较

本研究分别使用 mini-MPN-STE-qPCR 法、传统 MPN 计数法、qPCR 法和平板计数法对鸡胸肉混合液中沙门氏菌进行定量检测, 计数结果如表 2 所示。mini-MPN-STE-qPCR 和传统 MPN 方法得到的数据一致性较好, 方法的平均差异为 0.07 log MPN/mL, 最大差异为 0.352 log MPN/mL。与平板计数法相比, mini-MPN-STE-qPCR 法的平均差异为 0.023 log MPN/mL, 最大差异为 0.282 log MPN/mL。计数结果都在 mini-MPN-STE-qPCR 的 95% 置信区间内。

根据 MPN 计算表格, 传统 MPN 计数法的理论检出限为 0.2 MPN/mL, 平板计数法的理论定量浓度为 10 CFU/mL, qPCR 法的灵敏度则为 50 CFU/mL。而在本研究中平板计数

法的最低的定量浓度为 1.301 log CFU/mL, qPCR 法的最低定量浓度是 2.061 log MPN/mL, 说明 qPCR 定量受到方法灵敏度的限制, 检出率偏低。qPCR 法和平板计数法无法定量低浓度的沙门氏菌。在 10 个样本中, mini-MPN-STE-qPCR 法比 qPCR 法和平板计数法具有更低的检出限, 与传统 MPN 计数

法相一致, 其最低检出浓度为-0.347 log MPN/mL, 低于多数已建立的方法^[16], 此浓度下 qPCR 法和平板计数法均无法检出。因此, 本研究所建立的 mini-MPN-STE-qPCR 法相较 qPCR 和平板计数方法具有更低的检出限, 与传统 MPN 计数法检出限一致, 且节约大量时间成本, 具有明显优势。



注: a 为 qPCR 相对标准曲线; b 为标准曲线对应的溶解曲线。

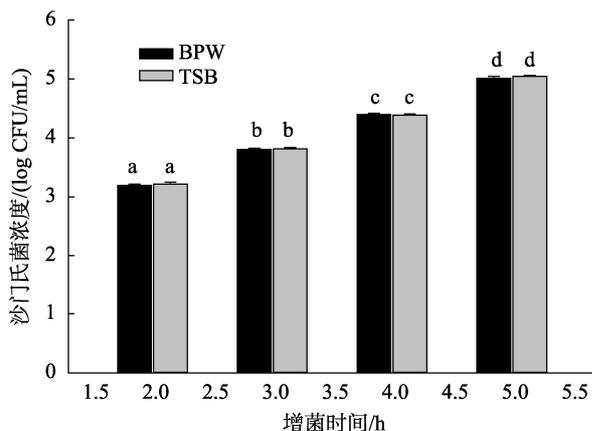
图 1 qPCR 法灵敏度测定和溶解曲线

Fig.1 Sensitivity determination and melting curves of qPCR

表 1 qPCR 的特异性实验结果
Table 1 Specificity test results of qPCR

菌种名称	来源	特异性	菌种名称	来源	特异性
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	环凯微生物	+	蜡样芽孢杆菌 CMCC(B)63303	环凯微生物	-
乙型副伤寒沙门氏菌 CMCC(B)50094	环凯微生物	+	副溶血性弧菌 ATCC10782	环凯微生物	-
肠炎沙门氏菌	本室分离	+	产气荚膜梭菌 ATCC13124	环凯微生物	-
德尔卑沙门氏菌	本室分离	+	铜绿假单胞菌 ATCC27853	环凯微生物	-
沙门氏菌属亚利桑那种	本室分离	+	阪崎肠杆菌 ATCC 29544	环凯微生物	-
沙门氏菌属	本室分离	+	大肠埃希氏菌 O157:H7NCTC12900	环凯微生物	-
金黄色葡萄球菌 ATCC25923	环凯微生物	-	大肠埃希氏菌 EPEC CICC24189	CICC	-
单核增生李斯特菌 ATCC19115	环凯微生物	-	大肠埃希氏菌 EAEC CICC24186	CICC	-

注: +表示阳性, -表示阴性, 环凯微生物为广东环凯微生物科技有限公司, CICC: China Center of Industrial Culture Collection, 中国工业微生物菌种保藏中心。



注: a~d: 不同小写字母表示差异显著性, $P < 0.05$ 。

图 2 沙门氏菌的短时间增菌实验结果($n=3$)

Fig.2 Results of short time enrichment of *Salmonella* in TSB and BPW ($n=3$)

对 mini-MPN-STE-qPCR 法的计数结果与传统 MPN 计数法、平板计数法和 qPCR 法进行适用性分析, 用 Bland-Altman 法进行相关性评价。结果如图 3 所示, 图中每个点代表不同样品的独立结果和各自的相关性。其中 mini-MPN-STE-qPCR 法与传统 MPN 计数法具有高度相关性, $r^2=0.994$ (图 3a, b), 而 mini-MPN-STE-qPCR 法与平板计数法也有较高的相关性, $r^2=0.992$ (图 3c, d)。但由于平板计数法相比 mini-MPN-STE-qPCR 法缺 3 组低浓度数据, 而且相关度相对较低(图 3e, f), $r^2=0.970$ 。综上, mini-MPN-STE-qPCR 法与广泛认可应用的 MPN 计数法的相关性最好, 且与平板计数法也有较高的相关性, 定量结果准确可信。

由图 4 可知, mini-MPN-STE-qPCR 法全程检测时间可以缩减到 7 h 左右, 检测结果可靠, 适用于需要快速检测

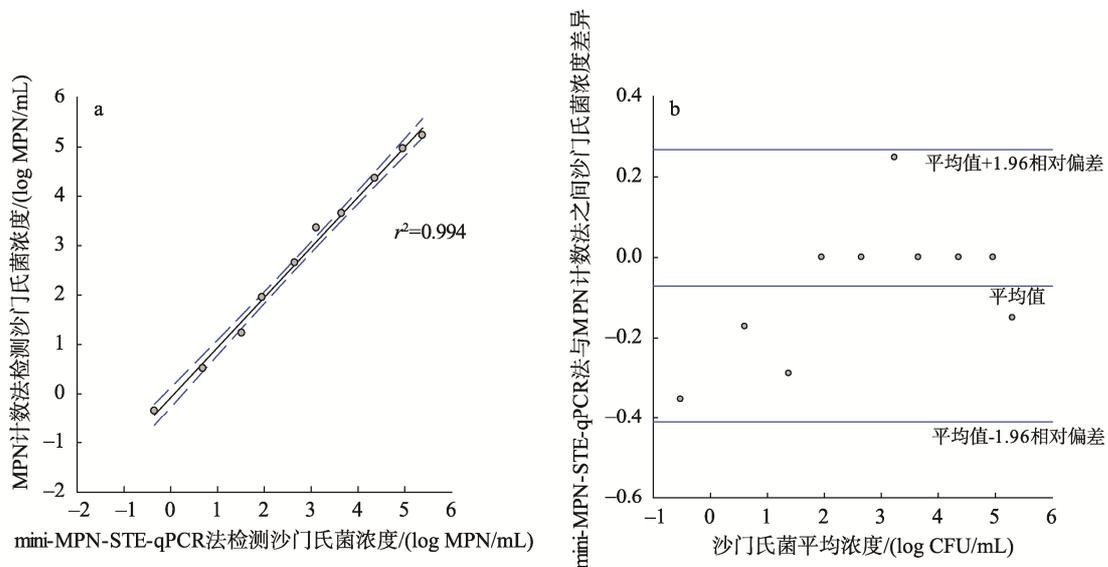
的场合,具有显著优势。而传统 MPN 法与平板计数法需要进行进一步的确认工作,该过程至少需要 3~4 d 的时间,费时费力。在实际样品中,沙门氏菌通常是微量污染^[6],张崇森等^[17]采用膜吸附-洗脱的浓缩方法定量测定水中沙门氏菌,极大提高了检出率,但仅适用于水等液体产品。而

mini-MPN-STE-qPCR 法经过了短暂的预增菌过程,能显著提高检出率,理论检出限达到 0.2 MPN/mL。同时,该方法在实际的使用过程中,可以依据实际要求进行相应优化,如加大取样量,提高检出限,增加发酵管数量提高定量结果的准确度等,以适应极微量沙门氏菌残留的定量检测。

表 2 鸡胸肉混合液的沙门氏菌定量检测结果
Table 2 Quantitative detection of *Salmonella* in chicken breast rinsate

测试	mini-MPN-SIT-qPCR 法/(log MPN/mL)			传统 MPN 计数法/(log MPN/mL)			qPCR 定量法/ (log MPN/mL)	平板计数法/ (log CFU/mL)
	MPN	95%置信下限	95%置信上限	MPN	95%置信下限	95%置信上限		
1	-0.347	-0.959	0.255	-0.347	-0.959	0.255	未检出	未检出
2	0.690	0.176	1.204	0.519	0.041	0.996	未检出	未检出
3	1.519	1.041	1.991	1.230	0.813	1.643	未检出	1.301
4	1.954	1.447	2.462	1.954	1.447	2.462	2.061	1.845
5	2.653	1.857	3.447	2.653	1.857	3.447	2.389	2.643
6	3.114	2.653	3.556	3.362	2.892	3.833	3.061	3.322
7	3.653	3.041	4.255	3.653	3.041	4.255	3.243	3.681
8	4.362	3.892	4.833	4.362	3.892	4.833	4.352	4.342
9	4.964	4.462	6.462	4.964	4.462	6.462	4.813	4.708
10	5.380	4.903	5.857	5.230	4.820	5.653	5.431	5.380

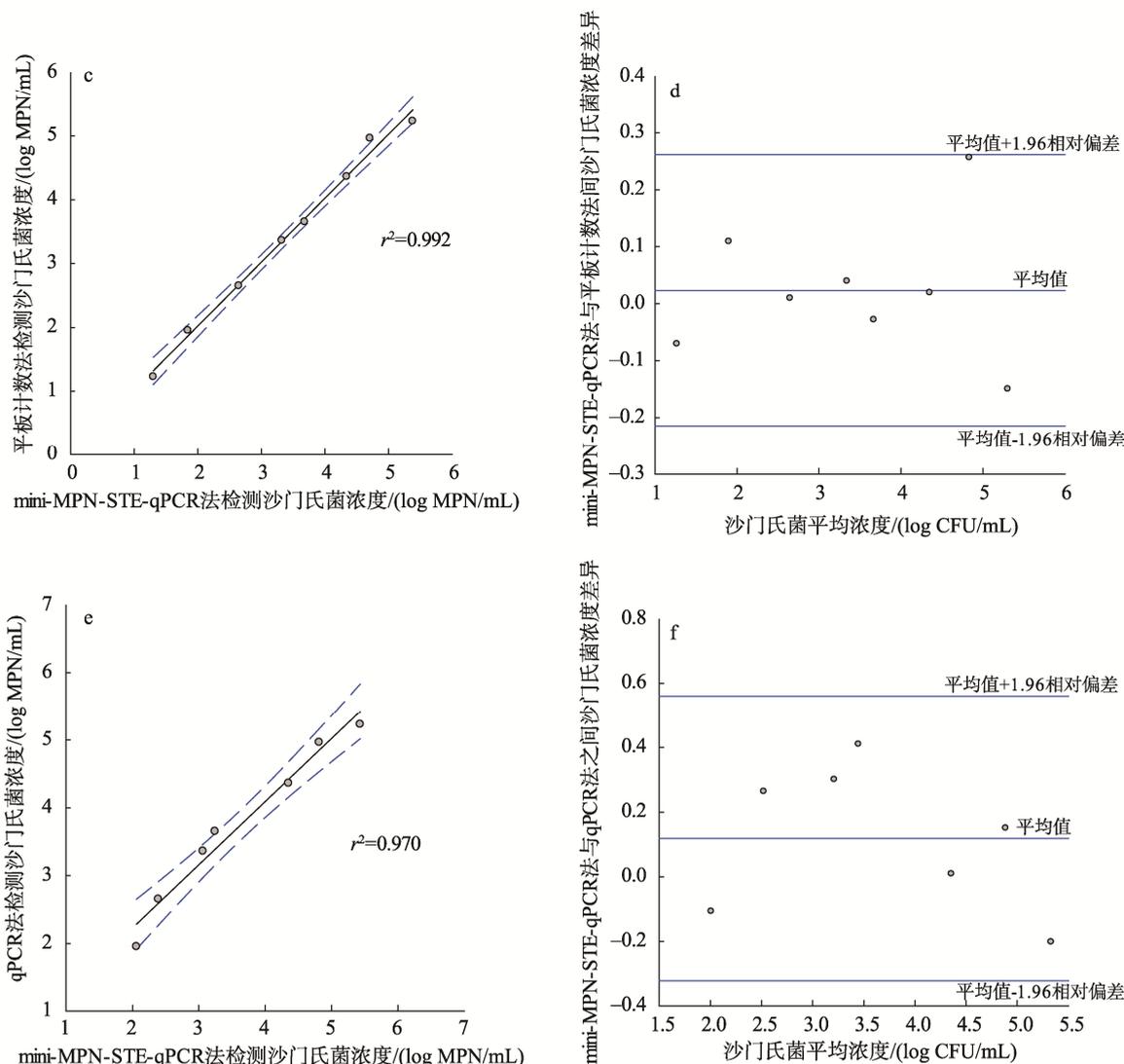
注:表中数字全部转化为 log 形式,出现负值不代表未检出



注: a, b 为 mini-MPN-STE-qPCR 与传统 MPN 计数法的相关性曲线与 Bland-Altman 分析; c, d 为 mini-MPN-STE-qPCR 与平板计数法的相关性曲线与 Bland-Altman 分析; e, f 为 mini-MPN-STE-qPCR 与 qPCR 法的相关性曲线与 Bland-Altman 分析。基于不同方法的检出限不同,所取分析浓度不一致。

图 3 mini-MPN-STE-qPCR 法与其他定量方法的 Bland-Altman 分析结果

Fig.3 Results of Bland-Altman analysis of mini-MPN-STE-qPCR and other quantification methods



注: a, b 为 mini-MPN-STE-qPCR 与传统 MPN 计数法的相关性曲线与 Bland-Altman 分析; c, d 为 mini-MPN-STE-qPCR 与平板计数法的相关性曲线与 Bland-Altman 分析; e, f 为 mini-MPN-STE-qPCR 与 qPCR 法的相关性曲线与 Bland-Altman 分析。基于不同方法的检出限不同, 所取分析浓度不一致。

图 3(续) mini-MPN-STE-qPCR 法与其他定量方法的 Bland-Altman 分析结果

Fig.3 Results of Bland-Altman analysis of mini-MPN-STE-qPCR and other quantification methods

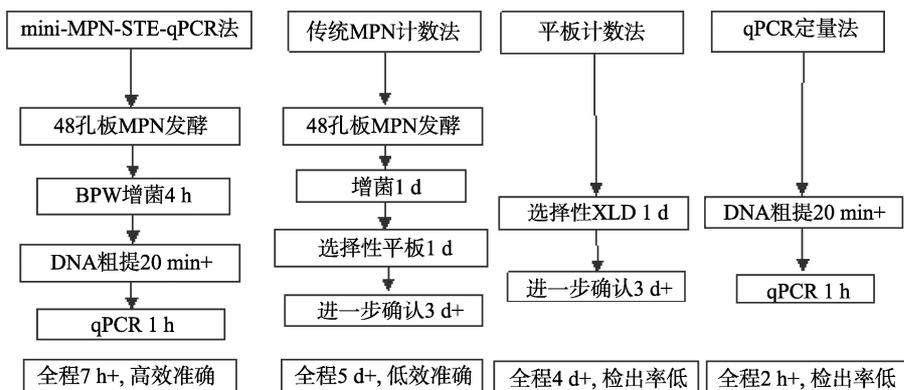


图 4 沙门氏菌定量方法的比较分析

Fig.4 Comparison of quantification methods of *Salmonella*

3 结论与讨论

本研究选择 48 孔板作为多管发酵容器, 可实现每孔加样量 1 mL, 相比 KIM 等^[13]建立的 96 孔板 mini-MPN 法加样量提高 5 倍以上, 检出限有显著提高, 理论检出限为 0.2 MPN/mL。与平板计数法相比, MPN 计数法存在一定的误差^[18], 这种误差主要源于概率计算误差, 但 MPN 法与平板计数法估算值之间存在很强的正相关关系^[19]。根据 MPN 计算公式, MPN 法采用的发酵管越多, 引入的计算误差越小。但发酵管越多, 实验成本越高, 操作越复杂。为了减少误差, 控制成本, 本研究使用基于 48 孔板的 5 孔发酵法, 通过 95%置信区间有效地减少误差问题。基于 MPN 计数法上述特性, 本研究开发出基于 mini-MPN 法的 qPCR 法。基于 48 孔板的 mini-MPN 法具有成本最小和检出率最大的特性。但 MPN 法对于沙门氏菌检测没有选择性, 且后续鉴定程序复杂, FRAVALO 等^[20-21]依据绝大多数沙门氏菌的运动特性开发了选择性 mini-MSRV-MPN 法, 显著提高了沙门氏菌的检出率, 且现已被纳入 EPA 检测标准。但上述改进方法仍然基于培养法, 检测周期长。

本研究建立的 qPCR 法对沙门氏菌选择性好, DNA 提取快速简单, 所耗费的试剂成本低廉、操作简单、稳定性良好, 能实现快速检测, 但 qPCR 法的灵敏度无法满足微量污染的检测要求, 需要进行增菌。选择性增菌液如四硫磺酸钠煌绿增菌液(tetrathionate broth, TTB)、Rappaport Vassiliadis 增菌液等具有良好的特异性, 但对于受到应激损伤(高温、冷冻、化学制剂处理等)的沙门氏菌而言, 需要更有利的恢复环境, 选择性增菌液并不能提高增菌效果^[22], 因此选择 BPW 作为增菌液, 通过 4 h 的短时间增菌快速达到 qPCR 的灵敏度。未来可以通过对仪器要求更低的 LAMP 技术实现沙门氏菌现场即时检测, 但对引物设计要求较高, 而且需要解决假阳性的问题^[23]。

综上所述, mini-MPN-STE-qPCR 是一种可信的传统 MPN 法的替代方法, 结果无显著性差异, 方法可行性较高, 适合沙门氏菌的快速定量检测, 同时为其他食源性致病菌的快速定量检测提供依据。

参考文献

- [1] CHEN J, PARK B. Recent advancements in nanobioassays and nanobiosensors for foodborne pathogenic bacteria detection [J]. *J Food Protect*, 2016, 79(6): 1055-1069.
- [2] XIAO X, WANG W, ZHANG J, *et al.* A quantitative risk assessment model of *Salmonella* contamination for the yellow-feathered broiler chicken supply chain in China [J]. *Food Control*, 2021, 121(6): 107612.
- [3] OSCAR TP. Process risk model for *Salmonella* and ground chicken [J]. *J Appl Microbiol*, 2019, 127(4): 1236-1245.
- [4] WU YN, LIU P, CHEN JS. Food safety risk assessment in china: Past, present and future [J]. *Food Control*, 2018, 90: 212-221.
- [5] BAILEY M, TAYLOR R, BRAR J, *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* from antibiotic-free broilers during organic and conventional processing [J]. *J Food Protect*, 2020, 83(3): 491-496.
- [6] YANG X, HUANG J, ZHANG Y, *et al.* Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail raw poultry meat in China [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 713: 136385.
- [7] MARMION M, FERONE MT, WHYTE P, *et al.* The changing microbiome of poultry meat; from farm to fridge [J]. *Food Microbiol*, 2021, 99: 103823.
- [8] HU J, TANG F, JIANG YZ, *et al.* Rapid screening and quantitative detection of *Salmonella* using a quantum dot nanobead-based biosensor [J]. *Analyst*, 2020, 145(6): 2184-2190.
- [9] HYEON JY, DENG X. Rapid detection of *Salmonella* in raw chicken breast using real-time PCR combined with immunomagnetic separation and whole genome amplification [J]. *Food Microbiol*, 2017, 63: 111-116.
- [10] RUBIO M, PENHA FR, ALMEIDA AM, *et al.* Development of a multiplex qPCR in real time for quantification and differential diagnosis of *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum* [J]. *Avian Pathol*, 2017, 46(6): 644-651.
- [11] TECHATHUVANAN C, D'SOUZA DH. Propidium monoazide for viable *Salmonella enterica* detection by PCR and LAMP assays in comparison to RNA-based RT-PCR, RT-LAMP, and culture-based assays [J]. *J Food Sci*, 2020, 85(10): 3509-3516.
- [12] LI J, MA B, FANG J, *et al.* Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow immunoassay for rapid detection of *Salmonella* in food [J]. *Foods*, 2020, 9(1): 27.
- [13] KIM SA, PARK SH, LEE SI, *et al.* Development of a rapid method to quantify *Salmonella typhimurium* using a combination of MPN with qPCR and a shortened time incubation [J]. *Food Microbiol*, 2017, 65: 7-18.
- [14] BOZORGMEHR A, YAZDANPARAST R, MOLLASALEHI H, *et al.* Non-crosslinking gold nanoprobe-LAMP for simple, colorimetric, and specific detection of *Salmonella typhimurium* [J]. *J Nanopart Res*, 2016, 18: 351.
- [15] BLODGETT R. BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions [EB/OL]. [2020-10-09]. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions> [2021-05-03].
- [16] CABRERA-DIAZ E, MARTINEZ-CHAVEZ L, SANCHEZ-CAMAREN AJ, *et al.* Simultaneous and individual quantitative estimation of *Salmonella*, *Shigella* and *Listeria monocytogenes* on inoculated Roma tomatoes (*Lycopersicon esculentum* var. Piriforme) and Serrano peppers (*Capsicum annuum*) using an MPN technique [J]. *Food Microbiol*, 2018, 73: 282-287.
- [17] 张崇森, 王晓昌, 周进宏, 等. 多管发酵-菌落 PCR 法定量检测水中可培养沙门氏菌[J]. *应用与环境生物学报*, 2012, 18(6): 1004-1008.
- [18] ZHANG CM, WANG XC, ZHOU JH, *et al.* Quantitative detection of cultivable *Salmonella* in water by multi-tube fermentation combined with colony PCR [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2012, 18(6): 1004-1008.
- [19] CHO KH, HAN D, PARK Y, *et al.* Evaluation of the relationship between two different methods for enumeration fecal indicator bacteria: Colony-forming unit and most probable number [J]. *J Environ Sci*, 2010, 22(6): 846-850.

- [19] GRONWOLD AD, WOLPERT RL. Modeling the relationship between most probable number (MPN) and colony-forming unit (CFU) estimates of fecal coliform concentration [J]. *Water Res*, 2008, 42(13): 3327-3334.
- [20] FRAVALO P, HASCOT Y, FELLIC ML, *et al.* Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella enterica* contamination: The mini-MSRV MPN technique [J]. *J Rapid Meth Aut Mic*, 2010, 11(2): 81-88.
- [21] ZHANG D, LIAO XG, GUO YC, *et al.* Quantitative analysis of food borne *Salmonella*-the study of mini-modified semi solid rappaport vassilia dis most probable number method [J]. *Chin J Prev Med*, 2013, 47(5): 452-454.
- [22] 郭闯, 贺宽军, 王伟, 等. 应用 PCR 检测食品中沙门氏菌前增菌程序的优化[J]. *食品科学*, 2009, 30(4): 189-192.
GUO C, HE KJ, WANG W, *et al.* Optimization of pre-enrichment protocol of PCR-based method for detection of *Salmonella* in food [J]. *Food Sci*, 2009, 30(4): 189-192.
- [23] OSCORBIN IP, BELOUSOVA EA, ZAKABUNIN AI, *et al.* Comparison

of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP) [J]. *Biotechniques*, 2016, 61(1): 20-25.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介



章小洪, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物学和分子生物学检测。

E-mail: hong232321@163.com



郑连宝, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物学检测。

E-mail: 214680949@qq.com