

谢 鹏,唐梦君,卜 柱. 病原性细菌检测方法的研究进展[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):253-255.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.084

病原性细菌检测方法的研究进展

谢 鹏¹, 唐梦君^{1,2}, 卜 柱¹

(1. 中国农业科学院家禽研究所,江苏扬州 225125;2. 农业部家禽品质质量监督检验测试中心,江苏扬州 225125)

摘要:细菌检测对于监控食品卫生安全具有举足轻重的作用。随着技术的发展,传统生化方法和分子生物学技术在细菌检测上都经历了重大的革新,二者都朝着更加精确、高效的方向上发展,如全自动微生物生化检测系统、PCR 技术等都在研究检测机构得到了广泛应用。本文介绍了病原性细菌检测的传统生化和分子生物学方法,分析了各种方法的优缺点,为具备不同基础条件的各级检测部门和研究机构开展病原性细菌检测提供一定的参考。

关键词:病原性细菌;检测方法;生化方法;分子生物学方法;优缺点

中图分类号: Q5-3;S852.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0253-03

随着我国社会经济的发展和人民生活水平的提高,人们对肉、蛋、奶等畜禽以及果蔬类产品的需求量越来越大,与此同时,对食品的质量要求也日益提高。然而,由于我国农业生产大部分仍以中小散户为主,农产品来源广泛,生产过程中存在原料控制不严、用水污染、设施落后等因素,极易在生产前端染菌;此外,在农产品的后期加工与流通中,也同样容易造成食品的细菌污染。根据温州、长沙、南通等多地区研究机构和疾病预防控制中心报道,当地生猪、鸡、牛、羊肉、水产品、熟肉制品以及水果蔬菜中均能检测出致病性较强的病原菌,如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌等^[1-3]。由此可见,我国农产品细菌污染较为严重,检测病原性细菌是食源性疾病预防和控制的关键环节,对维护消费者的健康具有重要意义。本文综述了对细菌检测方法的研究进展情况,为具备不同基础条件的各级检测部门和研究机构提供一定的参考。

1 常规生化方法在细菌检测上的应用

1.1 培养基法

为监控食品卫生安全,我国进出口商检局和卫生部经过多次修订并制定了针对农产品中致病性细菌检测的一系列标准,如检测肠杆菌科细菌(*Enterobacteriaceae*)的行业标准 SN/T 0738—1997《出口食品中肠杆菌科检验方法》以及检测金黄色葡萄球(*Staphylococcus aureus*)的国家标准 GB/T4789.10—2010《食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》。几乎所有的标准均以传统的细菌培养方法为基础,包括前增菌、分离培养、结合生化及血清学试验进行判定,其优点在于设备要求不高,检测成本低,以生长菌落数作为判定结果可准确定量,重复性强;但其步骤繁琐,工作量大,报告结果通常需要 5~7 d,因此过长的检验时间易使得生产部门延误时间,无法应对紧急情况。

1.2 快速检测试纸片法

目前商品化的细菌试纸片多将特定培养基和显色物质附着在纸片、凝胶或胶片等载体物质上,通过微生物的生长与显色达到快速检测微生物的目的^[4]。由于与常规培养法相比省却了复杂的准备工作,操作简便,节省时间,因而已开始被广泛应用。其中以美国 3M 公司生产的 Peterifilm 系列纸片最具代表性,李宁采用该公司生产的试纸片测定食品、空气中沉降菌以及硬表面菌落总数,结果发现使用纸片法在培养 24 h 即可观察计数,且在硬表面菌落总数测试中,试纸片法表现出较高的灵敏度,优于国标检测法^[5]。而陈春田等认为与传统培养方法相比,试纸片法并不能节约培养时间,且灵敏度较低,虽能简化操作步骤,但易出现假阴性结果^[6]。笔者认为试纸片产品质量可能是影响检测结果的重要因素之一。此外,由于胶体金试纸具有方便快捷、特异性强、敏感度高等特点,通过制备目的细菌的单克隆或多克隆抗体,将其标记胶体金,制成的免疫层析试纸对于检测某些特定病原菌如金黄色葡萄球菌、李斯特菌等在近年来也得到了广泛应用^[7-8]。

1.3 全自动微生物生化鉴定系统

全自动微生物生化鉴定系统是一种集生化反应、计算机和自动化技术于一体,运用概率最大近似值模型法进行微生物检测的技术。各种微生物对不同底物生化反应的不同是该系统鉴定的基础,其鉴定结果的精确度取决于鉴定系统配套培养基的种类、配制方法、浓度、孵育条件和结果判定标准等。如法国生物梅里埃公司的 VITEK 系统和美国 BD 公司的 PHOENIX 系统,该自动化系统可进行多达几十种的微量生化反应和药敏生长试验,根据各生化反应孔中的生长变化及呈色反应情况,由计算机通过数值编码技术与数据库进行比较分析,得到鉴定结果^[9]。范义等应用 VITEK-2 系统检测食源性病原菌沙门氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌和副溶血性弧菌,并与国标 GB/T 4789—2003《食品卫生微生物学检验》中的方法比较,结果显示符合率为 100%,且应用该系统可缩短检测时间 6~36 h^[10]。王原等认为应用 BD PHOENIX-100 系统可基本上满足临床上检测金黄色葡萄球的需要,但在进行凝固酶阴性葡萄球菌鉴定时存在一定的局限性^[11]。由于全自动微生物生化鉴定系统能同时对多个样品进行分析,鉴定时间短、速度快、易

收稿日期:2014-11-14

基金项目:江苏省大型科学仪器设备共享服务平台分析测试技术及方法研究(编号:BZ201303)。

作者简介:谢 鹏(1986—),男,博士,助理研究员,从事畜禽健康养殖的研究。E-mail:pengxiejqs@126.com。

操作,且检测菌种范围广,因而具有很高的应用价值。

2 分子生物学技术在细菌检测上的应用

近 30 年来,分子生物学技术发展迅猛,人们对微生物的研究也逐渐从外部表型转向内部基因结构特征,基于物种遗传物质多样性和保守型并存的理论前提,在核酸水平上进行微生物的分类鉴定及定量检测已成为一个重要的发展方向,传统的以培养为基础的诊断技术将逐步被更先进的分子诊断方法取代^[12]。

2.1 核酸扩增法

2.1.1 聚合酶链式反应(PCR)法 由于 PCR 扩增特异性好、操作简单、耗时短,因而在实验室和临床快速检测病原菌中得到了广泛应用。Wang 等将 PCR 技术应用于食品中单核细胞增生李斯特菌的检测,结果发现 PCR 法对 13 株单核细胞增生李斯特菌呈阳性,而对其他 23 种细菌皆呈阴性,说明该方法具有较高的特异性^[13]。Rahn 于 1992 年建立了沙门氏菌检测的 PCR 方法,该方法基于扩增毒力岛 SP11 关键因子之一的 *invA* 基因,特异性良好^[14]。Matsuki 等设计了针对肠道脆弱拟杆菌、双歧杆菌等 4 种菌株的特异性引物,对 300 株菌株进行 PCR 扩增,结果发现 74% 的菌株能够特异性扩增出来,而未被扩增出来的菌株为其他种类细菌^[15]。但是,另一方面,由于 PCR 得到的扩增产物并不能反映样本中细菌的真实含量,因而无法形成统一的标准进行衡量,且在核酸抽提和扩增过程中存在一定偏差和效率的不同,可能会降低信息的精确度;但 PCR 法检测细菌从样本采集到结果判定仅需 6~8 h,与传统的培养基法相比,大大缩短了检测时间^[16],因而在某些基因序列并不保守的细菌检测上,具有无可比拟的优势。

2.1.2 环介导等温扩增(LAMP)法 LAMP 法是日本学者 Notomi 等于 2000 年建立的,属于核酸扩增技术的一种,它通过针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异性引物,利用链置换 DNA 聚合酶在等温条件下短时间内可扩增出大量拷贝^[17]。该方法在操作上无需变性步骤,因而对设备的要求不高,简化后的 LAMP 法扩增出的产物甚至不需要借助仪器即可即时观察,这对于分子生物学技术在基层以及取样现场的使用具有重要意义。唐梦君等建立了金黄色葡萄球菌的 LAMP 快速检测法,65℃ 等温条件下仅 45 min 即可扩增出梯形条带,检测结果与国标方法符合^[18]。姜侃等设计了针对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌高保守基因序列的 LAMP 引物,建立了三重 LAMP 检测方法,在 90 min 内一次性检出上述 3 种细菌,且特异性高,检测灵敏度是 PCR 方法的 1 000 倍^[19]。LAMP 方法成为食品卫生领域致病菌检测的潜在有效手段之一,但是也正因其高灵敏性、产物量巨大的特点而导致开盖检测易形成气溶胶污染,从而造成假阳性结果的出现,因此在实际操作中应严格避免交叉污染,同时 LAMP 的不开盖检测应是未来进一步简化步骤并保证结果重复性高的研究重点^[20]。

2.2 核酸探针杂交法

核酸探针杂交技术是指利用核酸变性和复性的原理,使得带有标记物的已知序列的核酸片段,和与其互补的核酸序列杂交形成双链,因而能用于样品中特定基因序列的检测。

2.2.1 印迹杂交法 Southern、Northern 和斑点印迹杂交法在核酸技术发展早期应用非常广泛,Greisen 等针对能够引起

脑膜炎的脑膜炎双球菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌等设计了一系列特异性探针,采用印迹杂交技术成功检测出病患脑脊髓液样本中的目的细菌^[21]。Lin 等用 ³²P 标记了沙门氏菌的 3 种寡核苷酸探针,采用 Southern 印迹显影,比较了 3 种探针的特异性,并优化了食品中沙门氏菌的鉴定体系^[22]。AOAC990.13 GENE-TRAK 沙门氏菌检测、AOAC993.09 GENE-TRAK 李斯特氏菌检测均采用了核酸探针技术。应用印迹杂交技术的核酸探针方法灵敏性较高,特异性强,而不受非目的细菌的影响,尤其是对尚不能分离培养的细菌检测有特殊意义,具有良好的定性作用,但缺点是无法确切定量。

2.2.2 与荧光显微镜联用法 早期的放射性同位素标记由于其易造成放射性污染已逐步由非放射性标记物替代。采用不同荧光素标记的特异性核酸探针与细菌进行杂交,不同散射光和发射光波长的荧光素可使各种被标记的目的细菌在荧光显微镜下显示出不同颜色,选择一定数量的视野进行统计即可计量细菌总数。研究人员应用目标细菌的特异性核酸探针与细菌通用探针 EUB338 或 DNA 染料进行双标,从而在荧光显微镜下可以对目标细菌进行定性和定量。目前该方法尚未大量应用于食品与医学检测,Krimmer 等用 Cy3 标记的核酸探针从生物膜中成功检测出金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌,并认为其适用于临床检测^[23]。在用 16S rRNA 序列设计特异性探针分析人的粪便中特定细菌数量变化发现,双歧杆菌在正常体重儿童排泄物种的含量要高于超重儿童,而随着年龄的增长,奇异菌属的多样性提高了^[24-25]。由于通常情况下为保证统计结果的准确性,操作人员需要选择多达数十个视野进行分析,这无疑增加了工作量,降低了效率。

2.2.3 与流式细胞仪联用法 流式细胞术是一种能够在单细胞或其他生物粒子水平上进行理化、免疫及分子生物学性状及功能方面多参数分析检测的现代分析技术,它可以高速分析上万个细胞,具有速度快、精度高、准确性好等优点,成为当代最先进的细胞定量分析技术。以核酸探针进行的荧光原位杂交技术与流式细胞仪的结合(FISH-FCM)使用最初应用于分析活性淤泥和海水样品中目标细菌及菌群的数量变化,而后研究人员逐渐将该项技术引入医学研究,姜云涛等应用细菌通用探针 EUB388 和变形链球菌特异性探针 MUT590 成功检测了主要致龋菌变形链球菌^[26];Xie 等将该法用于动物营养学上的研究,发现随着摄食脂肪饱和度的降低,肠杆菌科细菌、梭菌、科里氏杆菌占鸽子肠道细菌总数的比例逐渐降低^[27]。FISH-FCM 方法特异性强,且能够真实反映自然环境下微生物数量与空间分布等方面的信息,在一个检测步骤中,可同时处理多条目标序列。我们相信 FISH-FCM 对于食品中致病性微生物的检测,应该存在较强的可行性。

2.3 基因芯片技术

基于 PCR 与核酸探针杂交技术相结合的基因芯片技术于 20 世纪 90 年代即开始用于细菌的鉴定,细菌样品 DNA 经 PCR 扩增后,通过制备的荧光标记核酸探针与芯片上的寡核苷酸点杂交,经扫描仪定量并分析荧光分布模式来确定检测样本中的特定细菌是否存在。由于基因芯片技术同时将大量探针固定于支持物上,因此可一次性对样品大量序列进行分析和检测,具有多样品并行处理能力,解决了传统核酸印迹杂交技术操作序列数量少的特点,且所需样品量少,污染小^[28],

基因芯片技术已用于临床细菌混合感染、耐药菌及毒力的检测,为医学上指导临床治疗、药物筛选带来深远影响^[29-31];但由于其制作成本高、技术复杂、检测灵敏性有待于提高等缺陷,因而目前在食品卫生领域应用较少。

3 结语

综上所述,虽然分子生物学技术在致病菌定性与定量上将会是未来发展的主要方向,但是包括传统培养法在内的生化分析检测依然在成本和可操作性上具有一定的优势,而且今后将会朝着更加快速精确的方向发展。目前各级研究机构和卫生检测部门的基础条件不同,因此在一定程度上,2 类方法的结合使用是确保检测工作准确进行的有效途径。

参考文献:

- [1] 李小春. 近 5 年来温州市食品中食源性致病菌主动监测[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(10):1843-1845.
- [2] 王 岚,刘建琪,张 红,等. 长沙市食源性致病菌污染状况调查[J]. 中国热带医学,2008,8(9):1663,1665.
- [3] 许滋宁,周雪萍. 南通市食源性致病菌污染状况调查[J]. 职业与健康,2007,23(1):24.
- [4] 池王肖. 微生物快速鉴定技术的发展和运用[J]. 医药前沿,2012(12):53-54.
- [5] 李 宁. 菌落总数检测纸片法与国标方法的比较研究[D]. 上海:上海交通大学,2009.
- [6] 陈春田,张顺合,王 林,等. 细菌快速检测与传统培养方法结果比较[J]. 检验检疫学刊,2009,19(6):12-14.
- [7] 杜玉萍,陈 清,王雅贤,等. 胶体金免疫层析法检测金黄色葡萄球菌的初步研究[J]. 热带医学杂志,2006,6(6):650-652.
- [8] 崔焕忠,张 辉,王兴龙. 胶体金试纸快速检测食品中单增李斯特菌[J]. 食品科学,2010,31(4):239-242.
- [9] 杨毓环,陈伟伟. VITEK 全自动微生物检测系统原理及其应用[J]. 海峡预防医学杂志,2000,6(3):38-39.
- [10] 范 义,刘 水. VITEK-2 全自动微生物鉴定系统在食物中毒病原菌检测中应用[J]. 健康必读杂志,2013,7(7):288.
- [11] 王 原,曹俊敏,陈益民,等. BD PHOENIX-100 全自动微生物鉴定仪对葡萄球菌鉴定能力的评价[J]. 浙江中医药大学学报,2009,33(2):205-206.
- [12] Bullman S, Lucey B, Sleator R D. Molecular diagnostics the changing culture of medical microbiology[J]. Bioengineered, 2012, 3(1):1-7.
- [13] Wang R F, Cao W W, Johnson M G. 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58:2827-2831.
- [14] Rahn K, de Grandis S A, Chrke R C. Amplification of an *invA* gene sequence of salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a sepcific method of detection of salmonella[J]. Molecular and Cellular Probes, 1992, 6:271-279.
- [15] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68:5445-5451.
- [16] Insa R, Marin M, Martin A A, et al. Systematic use of Universal 16S rRNA gene polymerase chain reaction (PCR) and sequencing for processing pleural effusions improves conventional culture techniques[J]. Medicine, 2012, 91(2):103-110.
- [17] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28:63-69.
- [18] 唐梦君,周 生,葛庆联,等. 应用 LAMP 快速检测金黄色葡萄球菌的研究[J]. 现代食品科技,2011,27(6):719-722.
- [19] 姜 侃,吕沁风,汪 新,等. 三重 LAMP 法检测食品中沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌[J]. 食品科学,2013,34(24):182-187.
- [20] 唐梦君,周 生,张小燕,等. 检测鸡蛋中沙门氏菌的 LAMP 方法的建立及初步应用[J]. 安徽农业大学学报,2011,38(1):43-47.
- [21] Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, et al. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1994, 32(2):335-351.
- [22] Lin C K, Tsen H Y. Development and evaluation of two novel oligonucleotide probes based on 16s rRNA sequence for the identification of *Salmonella* in foods[J]. The Journal of Applied Bacteriology, 1995, 78:507-520.
- [23] Krimmer V, Merkert H, von Eiff C, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed *in situ* hybridization[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37:2667-2673.
- [24] Kalliomaki M, Collado M C, Salminen S, et al. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2008, 87(3):534-538.
- [25] Harmsen H M, Wildeboer-Veloo A M, Grijpstra J, et al. Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66:4523-4527.
- [26] 姜云涛,梁景平,李超伦,等. 荧光原位杂交技术和流式细胞仪在菌斑中致毒性变形链球菌定量检测中的应用[J]. 口腔医学研究,2006,22(1):1-4.
- [27] Xie P, Wang Y M, Wang C, et al. Effect of different fat sources in parental diets on growth performance, villus morphology, digestive enzymes and colorectal microbiota in pigeon squabs[J]. Archives of Animal Nutrition, 2013, 67(2):147-160.
- [28] 吕 游,王 辉,姜可伟,等. 临床病原微生物快速诊断技术进展[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(7):827-829.
- [29] Cohen S J, Dierikx C, Al Naiemi N, et al. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65:1377-1381.
- [30] Peterson G, Bat J, Nagaraja T G, et al. Diagnostic microarray for human and animal bacterial diseases and their virulence and anti-microbial resistance genes[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 80:223-230.
- [31] McLoughlin K S. Microarrays for pathogen detection and analysis[J]. Briefings in Functional Genomics, 2011, 10(6):342-353.