

沙门氏菌的检测技术与方法

王鑫¹, 闫磊¹, 曾庆祝²

(1. 大连水产学院食品工程系, 辽宁 大连 116023) (2. 广州大学食品工程系, 广东 广州 510006)

摘要: 本文从食品安全的角度出发, 系统回顾各种检测沙门氏菌的方法, 综述其在食品检测中的应用及进展。分子生物学技术与免疫学技术近年来以其敏感、快速、特异性等特点在沙门氏菌检测中得到广泛应用, 尤其是PCR与ELISA技术已应用于实际检测中。此外, 本文还展望了今后沙门氏菌检测方法的发展方向及实际应用前景。

关键字: 沙门氏菌; 食品微生物; 检测技术

中图分类号: S855; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)05-0082-05

Detection Technologies and Methods of Salmonella

WANG Cui¹, YAN Lei¹, ZENG Qing-zhu²

(1. Department of Food Engineering, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

(2. Department of Food Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The application and development of the methods for detection of salmonella in food were reviewed here. Emphasis was laid on the molecular biological and immunology techniques, such as PCR and ELISA, which developed rapidly in the detection of salmonella in recent years due to their sensitivity and specificity. The directions of those detection methods and their application prospects were also viewed.

Key words: Salmonella; food microorganism; detection technology

沙门氏菌是引起食物中毒的重要病原菌。在世界各国的各类细菌性食物中毒中, 沙门氏菌引起的食物中毒常居榜首。在英国, 就以沙门氏菌为首位, 美国则为第二位。我国内陆地区以沙门氏菌为首位。世界上最大的一起沙门氏菌食物中毒是1953年于瑞典由于猪肉引起的鼠伤寒沙门氏菌中毒, 7717人中毒, 90人死亡^[1]。

沙门氏菌菌型繁多, 已确认的沙门氏菌有 2500 个以上的血清型。繁杂的各类生化反应型, 使常规检验程序复杂繁琐、耗时费力, 不仅给检验部门带来沉重的负担, 而且还使生产部门产品运转和仓储的时间延长, 费用增加。因此, 多年来, 建立快速而准确的检测方法一直是沙门氏菌检验研究的核心问题。目前, 主要采用传统标准检测方法、分子生物学方法、免疫学方法、电阻抗法、沙门氏菌显色培养基法等。

1 传统标准检测方法

用于检测沙门氏菌的传统方法是将食物样品分步增菌, 以增加病原菌的检出率。这种培养方法总体可

收稿日期: 2007-03-12

基金项目: 大连市青年基金(2005J22JH049)

作者简介: 王鑫(1982-), 女, 硕士, 研究方向为食品质量安全与管理

通讯作者: 曾庆祝, 博士, 研究方向为食品质量安全与管理

分为三个不同阶段, 预增菌、选择性增菌及分离步骤。传统沙门氏菌检测法全过程需时至少4~7 d, 才能得出明确的诊断结果。

GB4789.4-94是目前我国规定的对畜产品中沙门氏菌的标准检测方法, 主要是根据沙门氏菌的生化特性, 进行前增菌、选择性增菌、分离培养、生化鉴定和血清分型五个步骤^[2]。在检测畜产品过程中, 应注意根据不同的样品采取不同的检测步骤。

2 分子生物学方法

近年来, 分子生物学技术逐步应用于食品微生物检测中, 分子生物学检测方法是针对病原微生物的核酸分子特征进行鉴定, 表现出较大的优越性。

2.1 扩增片段长度多态性技术

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, 简称AFLP) 技术方便快捷, 实验结果既稳定又可靠。因此, 在微生物研究领域有着极为广泛的应用, 但以沙门氏菌为研究对象的报道还很有限。Aarts等人在对62个血清型的78株Salmonella菌株进行AFLP指纹分析时, 发现所有的血清型都具有独特AFLP指纹图, 并且AFLP指纹具有较高的分辨率, 可以区分其他方法无法区分的不同菌株^[3]。

2.2 聚合酶链反应技术

PCR 技术因具有简便、快速、敏感性高和特异性强的优点, 现已广泛应用于微生物检测、遗传病诊断等领域。Rahn 等首先设计出一对引物, 用 PCR 检测沙门氏菌, 检出率为 97%, 但许多肠道杆菌能同时扩增出来, 特异性较差。此后, 国内外许多学者进行了利用 PCR 技术检测沙门氏菌的研究^[4]。Nguyen 等根据肠炎沙门氏菌 C7 克隆株具有的属特异性序列设计出一对引物, 能快速地检出肉食品标本中的沙门氏菌, 检测的敏感性和特异性均为 100%, 保证了检测的准确性^[5]。此外, 我国卢强等将自己建立的 PCR 扩增 *invA* 基因特异性检测沙门氏菌的方法用于食品样品中沙门氏菌的检测, 并结合辣根过氧化物酶直接标记基因探针技术和增强化学发光反应(ECL)技术对扩增产物进行 Slot-blot 杂交, 新建立了 PCR-ECL 沙门氏菌检测方法, 检测限可达 10 cfu/g, 是一种有前途的快速检测食品中沙门氏菌的方法^[6]。章新生等根据寡核苷酸序列合成一对引物用于沙门氏菌诊断, 并对其特异性和扩增产物进行了验证^[7]。黄金林等根据沙门氏菌组氨酸转运操纵子基因序列设计引物序列, 成功扩增出 495 bp 沙门氏菌特异条带, 而阴性对照则无此条带, 从而建立了应用 PCR 进行沙门氏菌快速检测的方法^[8]。汪琦等利用 PCR 方法快速检测食品中的沙门氏菌。以全脂奶粉、生牛肉和加工过的鸡肉为实验对象, 人为添加沙门氏菌, 检测结果与传统培养方法系统检测结果一致。检出限为 100 cfu/25 g, 准确性达 100%^[9]。

2.3 核酸探针

目前, 检测沙门氏菌属特异性沙门氏菌探针已从鼠伤寒沙门氏菌菌株染色体 DNA 克隆成功, 并用于检测食品中沙门氏菌的存在。Fitts 等人在食品沙门氏菌检测中引入 DNA-RNA 杂交技术, 此法应用的探针含有用放射性同位素标记的伤寒沙门氏菌 DNA 片断, 其敏感性高, 经大约 48 h 增菌步骤后, 检测极限可达每毫升 108 个细菌, 但由于要使用放射性同位素, 只能在专门的实验室中进行, 因此阻碍了该方法的推广应用^[10]。为此, 以核酸杂交为基础的比色计技术目前已发展起来^[11]。这种方法依赖于沙门氏菌核糖体 RNA(rRNA)及核糖体发育过程中储存的核酸成分进行检测。这种天然富含 rRNA 靶序列的情况使得无辐射检测成为可能, 同时又保持了与放射性同位素方法相当或更高的敏感性。

2.4 基因芯片技术

Chizhikov 等采用寡核苷酸芯片研究沙门氏菌抗原和毒力因子与其致病性的关系, 发现细菌毒力因子

可用于肠道致病菌的分析检测^[12]。靳连群等利用基因芯片技术检测肠道中沙门氏菌等致病菌。结果显示制备的基因芯片能够检测出致病菌, 对于未知菌落利用基因芯片能够在 3 h 完成对未知菌属的鉴定^[13]。

2.5 噬菌体裂解试验

噬菌体对细菌有特殊的裂解作用。Thal-Kalings 对 1181 株沙门氏菌和 323 株其它菌株进行沙门氏菌噬菌体 O-I 裂解试验, 结果表明沙门氏菌裂解率为 99.5%, 而非沙门氏菌裂解率为 0.3%。截至到 1973 年, Keils 及 Seeliger 等人通过大量观察证实, 沙门氏菌属内裂解率在 95.0% - 99.6% 之间, 属外误差为 0% - 2.33% 之间。何晓青等发现一种肠杆菌科分属诊断噬菌体, 其鉴定沙门氏菌只要 6 分钟, 加上培养菌落时间只需 2 天^[14]。张碧波等应用噬菌体快速检测沙门氏菌, 对 100 个肠杆菌菌株进行噬菌体 O-I 裂解试验, 30 株沙门氏菌全部为阳性, 而其余非沙门氏菌株全部为阴性, 与前人研究结果一致^[15]。由此可见, 应用沙门氏菌噬菌体 O-I 对沙门氏菌进行检测方便可靠。

3 免疫学方法

免疫学技术是以抗原和抗体的特异性结合反应为基础, 再辅以免疫放大技术来鉴别细菌, 通过病原体刺激机体产生免疫球蛋白(抗体)的方法。由于免疫法有较高灵敏度, 样品经增菌后可在较短的时间内检出, 抗原和抗体的结合反应可在很短时间内完成。因此免疫学法在食品微生物检测中应用广泛。

3.1 酶联免疫吸附

1977 年, Kryinski 与 Heimsch 首次将酶联免疫吸附测定法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, 简称 ELISA)用于食品沙门氏菌的检测^[16]。相继许多学者都利用 ELISA 进行食品沙门氏菌的检测, 但他们使用的多价抗血清不同程度地存在交叉反应, 使 ELISA 产生假阳性, 在实践中有一定困难。上世纪 80 年代, 单克隆抗体技术问世并日趋成熟, 建立了抗沙门氏菌各种 O 抗原、H 抗原单抗, 取代常规因子血清进行血清学鉴定、伤寒诊断、鸡白痢检疫, 并显示出单抗卓越的性能。我国焦新安等应用淋巴细胞杂交瘤技术获得了 4 株具有沙门氏菌广谱结合特性的单克隆抗体, 其中两株的反应互补, 对已检菌株覆盖率达 99%, 而对其它受试肠杆菌均无交叉反应^[17]。文其乙等在前人基础上应用沙门氏菌属特异性单克隆抗体 CB8 和 de7 建立了检测沙门氏菌的直接 ELISA 方法, 并形成了快速检测试剂盒^[18], 此外, 还应用直接 ELISA 方法对 500 份蛋品检测, 结果表明该方法可靠, 且阳性率比国标方法高

[19]。黎兆滚等使用ELISA技术,对94份鱼粉样品增菌培养液检测沙门氏菌,结果表明阳性符合率为92%,阴性符合率为100%,总符合率98%以上^[20]。

3.2 斑点酶联免疫吸附

斑点酶联免疫吸附(Dot-ELISA)试验是一项免疫学检测技术,具有简单、快速、敏感、特异性强等特点,并具有较高的可重复性。

目前,应用该法检测食品中沙门氏菌的报道很多。张红见等应用Dot-ELISA法对85份猪胴体进行了沙门氏菌的检测。结果表明,在85份肉样中,Dot-ELISA检出沙门氏菌阳性65份,阳性率为76.47%,检测结果与常规方法一致^[21]。雷风应用Dot-ELISA法检测鱼粉85份,对沙门氏菌最低检出量为每毫升400个,沙门氏菌阳性检出率75.29%,常规分离培养法阳性检出率为62.35%,两者差异不显著^[22]。康明等应用Dot-ELISA检测鱼粉85份,结果表明,64份为阳性,常规分离培养法53份为阳性,两种方法差异不显著。由此可见,该方法简便、特异、快速、结果直观,便于在基层推广使用^[23]。

3.3 免疫磁性分离技术

由于食品检样常为固液多相混合物,采用常规方法难以将少量致病微生物分离出来。借助免疫磁性分离技术,可以很快地在含有大量杂菌的悬液中有选择性地分离出目的微生物,节省时间。目前,应用该法分离检验食品中致病菌也有一些相关报道。Skjerve等报道了用免疫磁性分离技术从乳及乳制品、肉类和蔬菜中分离出沙门氏菌,其检测限为每克100个细菌^[24]。Mansfield等比较免疫磁性分离技术和常规方法从食品中分离沙门氏菌。他们用120种食物样品,其中一半样品中加入低浓度的沙门氏菌。结果证实,就选择性而言,抗沙门氏菌磁珠和增菌方法中最有效的亚硒酸盐选择性培养基一样有效^[25]。值得强调的是,免疫磁性分离技术能捕获受损伤的靶细菌,而目前所用的几种常规方法则不具备这样的能力。

3.4 免疫荧光标记

Munron应用自动荧光抗体检测系统检测食品中的沙门氏菌,每小时能检测到120个玻片样品,与常规试验比较,准确率达96%^[11]。Kyrinr和Heimarch用荧光抗体检测系统检测食品中的沙门氏菌,该系统可同时检测14个样品,并且结果可靠,操作简单^[11]。Cloak等利用表面吸附将检测样品吸附于载于玻璃表面的一种薄膜上,然后用免疫荧光显微镜进行结果判定。该方法检测限为每毫升 10^{3-5} 个沙门氏菌,且不呈现假阴性与假阳性反应^[26]。

3.5 自动酶标免疫检测仪

全自动荧光酶标免疫分析仪方法对沙门氏菌的检测鉴定结果比较成熟,并已先后被美国FDA、AOAC、USDA等部门认可,我国学者也有相关研究报道。寇运同等利用自动荧光酶标分析系统快速检测出口动物性食品中沙门氏菌,结果表明,其灵敏度高,操作简便,大大缩短检验周期,可用于检验出口动物性食品中沙门氏菌^[27]。陶军等利用法国生物—梅里埃公司提供的“自动酶标免疫检测仪”与常规培养法对冻肉中沙门氏菌进行检测,指出该仪器最大特点是对被检细菌不需要纯培养,只需在增菌培养基中即可检出^[28]。黄玲等利用自动酶标免疫测试仪和国标方法检测食品中沙门氏菌,结果表明,该法具有灵敏度高、无传染危险、检测速度快等特点^[29]。陈炜等运用自动荧光酶标分析仪和国家标准方法分别对同一种脱水蔬菜样品中沙门氏菌进行检测,并对检测结果进行对比,运用自动荧光酶标分析仪检测脱水蔬菜中的沙门氏菌灵敏度高、速度快,完全满足检验检疫系统快速检测需要^[30]。

3.6 葡萄球菌A蛋白协凝试验法

Staphylococcal Protein A简称SPA即葡萄球菌A蛋白。目前,国外已将SPA用于沙门氏菌的快速检验,所用的葡萄球菌菌株多为Cowan I株。国内应用该法检验食品中沙门氏菌报道很少,曹同雪等采用SPA协凝试验法检测100个肉样中的沙门氏菌,结果表明该法快速、准确、灵敏度高、检出率高、并且节省费用^[31]。

4 电阻抗法

电阻抗法是近年发展起来的一项生物学技术,已经开始应用于食品微生物检验。电阻抗法对食品中沙门氏菌检测已经通过AOAC认可,相关报道很多。Donaghy和Madden应用阻抗法对动物蛋白制品及原料肉中沙门氏菌检测,检出率等同甚至高于传统方法^[32]。Pless等分别用阻抗法和传统检测方法进行对照试验,对250种食品样品进行检测。结果表明,122种沙门氏菌阳性样品中,用阻抗法检出119种,传统培养法检出106种^[33]。Quinn等分别用传统培养技术与3种快速检测方法即阻抗法、基因探针法和沙门氏菌示踪法,对禽类饲料及环境样品中沙门氏菌进行检测,其中39.2%样品呈阳性,实验结果为阻抗法检出38.4%,传统培养法检出25.5%,基因探针法检出28.9%,沙门氏菌示踪法检出28.5%。阻抗法是几种方法中最少受到主观因素干扰的方法^[34]。我国陈广全等用电阻抗法检测食品中沙门氏菌。经与常规培养法进行比较,对加

入食品中的21种已知沙门氏菌属检测,电阻抗法19个为阳性,检出率在90%以上,检测结果与常规培养法一致,对于阴性结果能在48 h内得出。实验结果表明电阻抗法能够快速、可靠地检测食品中沙门氏菌^[35]。

5 沙门氏菌显色培养基法

以选择性培养基为基础,经过改良,使目标菌在培养基上的菌落显示出一定颜色,便于识别。其原理是利用细菌特有生理生化反应,使培养基中指示剂产生颜色变化,以将目标菌与其他菌区分^[1]。其操作简便,即将食品样品增菌后直接划平板,置 37 °C 培养 18~24 h,取出并观察培养皿上生长菌落的颜色。

此外,其它沙门氏菌检测方法还有电导测定法、增菌血清学方法、微量热量测定法、生物发光法等等。

6 小结

随着社会发展与科技进步,新的微生物检验方法和手段不断涌现,这些检测方法的检测结果与传统检测方法大体一致,能够快速、可靠的检测出食品中的沙门氏菌。分子生物学检测法快速、灵敏、特异性强,但成本较高,且要求较高技术水平,大范围应用尚有一定难度。在分子生物学法中,应用最为广泛的是聚合酶链反应技术(PCR)。PCR是一种体外核酸扩增技术,目前,国内外学者应用此项技术检测食品中致病菌,取得良好效果。免疫学法不但经济实用、重现性好、灵敏度高、特异性较强,特别是近几年发展的免疫试剂盒,不仅适用于防疫及卫生监督部门,还可在企业及家庭卫生检测中使用^[36]。在免疫学法中,酶联免疫吸附(ELISA)应用较为普遍,ELISA是利用抗原—抗体的免疫学反应以及酶高效催化底物这一特点的检测技术。随着国内外学者相关研究及探索的不断深入,ELISA技术在食品微生物检测中将会发挥更为重要的作用。

沙门氏菌作为食品卫生检验一项重要目标菌,其检测方法的研究有着重要意义。提高沙门氏菌检测灵敏度,缩短检测时间、简化检测程序,使沙门氏菌检测方法向自动化、快速化方向;向灵敏度高、特异性强、重复性大、简易、经济方向不断发展。

参考文献

[1] 王晶,王林.食品安全快速检测技术[M].北京:化学工业出版社,2005
 [2] 牛天贵,张宝芹.食品微生物检验[M].北京:中国计量出版社,2003

[3] Aarts HJM, Van Lith L, Keijer J. High-resolution genotyping of Salmonella strains by AFLP-fingerprinting [J]. Letters in Applied Microbiology, 1998, 131-135
 [4] Rahn K, De Grandis SA, et al. Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella [J]. Mol Cell Probes, 1992, 6(4): 271-279
 [5] Nguyen AV, Khan MI, Lu Z. Amplification of Salmonella chromosomal DNA using the polymerase chain reaction [J]. Avian Dis, 1994, 38(1): 119-126
 [6] 卢强,陈贵连,林万明. PCR 扩增 inVA 基因特异性检测沙门氏菌[J]. 中国兽医学报, 1994, 14(3): 251-255
 [7] 章新生,臧富妍. 应用 PCR 技术检测沙门氏菌[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(2): 147-151
 [8] 黄金林. PCR 快速检测沙门氏菌试剂盒的研制与应用[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(4): 451-452
 [9] 汪琦,张昕. 利用PCR方法快速检测食品中的沙门氏菌[J]. 检验检疫科学, 2005, 15(6): 26-28
 [10] Fitts R, Diamond M, Hamilton C, Neri M. DNA-DNA hybridization assay for detection of Salmonella spp. in foods [J]. Appl Environ Microbiol, 1983, 46(5): 1146-1151.
 [11] 刘佩红,屠益平等. 沙门氏菌检测技术研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005, (6): 2-3
 [12] Chizhikov V, et al. Microarray analysis of microbial virulence factors [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(7): 3258-3263
 [13] 靳连群,李君文等. 基因芯片检测肠道中致病菌技术的建立和应用[J]. 中华传染病杂志, 2004, 22(1): 24-26
 [14] 张艳红,吴延功. 沙门氏菌快速检测方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2001, 22(2): 39-41
 [15] 张碧波,秦贞奎等. 应用噬菌体快速检测沙门氏菌[J]. 动物检疫, 1994, 11(1): 13-14
 [16] Kryszinski E P, Heimsch R C. Use of enzyme-labeled antibodies to detect Salmonella in foods [J]. Appl Environ Microbiol, 1977, 33(4): 947-954
 [17] 焦新安,王志亮. 单克隆抗体测定沙门氏菌鞭毛蛋白属共同抗原表位的分布特性[J]. 单克隆抗体通讯, 1995, 11(3): 4-10
 [18] 文其乙,焦新安. 直接ELISA检测沙门氏菌方法的建立及其应用研究[J]. 中国兽医学报, 1995, 15(2): 105-111
 [19] 文其乙,田银芳等. 应用直接ELISA快速检测蛋品中的沙门氏菌仁[J]. 中国卫生检验杂志, 1996, 6(6): 358-359
 [20] 黎兆滚,吴文翰. 用ELISA法快速检测沙门氏菌[J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(1): 61-62
 [21] 张红见,韩志辉. Dot-ELISA 检测猪胴体中沙门氏菌的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2003, (11): 8-9 (下转第 75 页)