

TaqMan 实时荧光 PCR 对沙门氏菌能力验证样品的快速检测与鉴定

王凤军, 叶素丹

(浙江经贸职业技术学院应用工程系, 浙江杭州 310018)

摘要: 本研究依据 GB 4789.4-2016 标准对沙门氏菌 ACAS-PT526 能力验证样品进行常规培养法检测, 同时使用 TaqMan 实时荧光聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术对预增菌培养物进行快速检测和鉴定。本研究首先以沙门氏菌特异性基因 hut 基因为靶基因, 设计合成特异性引物和探针, 提取各类食源性菌种的核酸 DNA 进行实时荧光 PCR 反应, 仅沙门氏菌属出现阳性扩增, 非沙门氏菌属、阴性对照和空白对照均无扩增信号, 验证设计合成的引物探针具有较高的特异性。其次将能力验证样品和加标样品经预增菌、增菌、分离、纯化、生化试验和血清学鉴定, 同时将预增菌培养物经实时荧光 PCR 测定后, 18-D319 和加标样品有显著的 S 型扩增曲线, Ct 值分别为 24.34 和 26.21, 为沙门氏菌阳性, 18-M906 无显著荧光信号, Ct 值 > 40.00, 为沙门氏菌阴性。经 API20E 试剂条鉴定, 18-D319 为猪霍乱沙门菌亚利桑那亚种, 鉴定百分率为 99.90%, T 值为 0.97, 18-M906 为大肠埃希氏菌, 鉴定百分率为 99.80%, T 值为 0.94。实时荧光 PCR 检测结果与常规培养法检测结果一致, 且更为简单快速, 从预增菌到结果判定仅需 12 h, 结果准确度高, 一批次可检测多个样品, 可用于大量样品中沙门氏菌的快速筛查和对能力验证样品的检测验证。

关键词: 沙门氏菌; 能力验证; 实时荧光 PCR; 快速检测; 鉴定

文章篇号: 1673-9078(2020)12-300-306

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0094

Rapid Detection and Identification of *Salmonella* in Proficiency Testing Samples by TaqMan Real-Time Fluorescent PCR

WANG Feng-jun, YE Su-dan

(Department of Applied Engineering, Zhejiang Institute of Economic and Trade, Hangzhou 310018, China)

Abstract: According to GB 4789.4-2016 standard, the conventional culture method was used to test the ACAS-PT526 proficiency test sample for *Salmonella*, and TaqMan real-time fluorescence PCR was used to detect and identify rapidly the pre-enriched culture. In this study, specific primers and probes were designed and synthesized through using the *Salmonella* specific gene hut gene as the target gene. The nucleic acid DNA of various foodborne strains was extracted for real-time fluorescent PCR reaction. Only *Salmonella* showed positive amplification, while non *Salmonella* species, negative control and blank control had no amplification signal, confirming the relatively high specificity of the designed and synthesized primer probes. Secondly, after pre-enrichment, enrichment, isolation, purification, biochemical tests and serological identification of the proficiency test samples and spiked samples, as well as real-time fluorescent PCR detection of pre-enriched culture, the 18-D319 and spiked samples exhibited significant S-type amplification with the Ct value being 24.34 and 26.21, respectively (which were positive for *Salmonella*), whilst 18-M906 had no significant fluorescence signal with the Ct value higher than 40 (which was negative for *Salmonella*). Based on the determination using API20E reagent strips, 18-D319 was a subspecies of *Salmonella cholerae* in Arizona, with the percentage of identification as 99.90% and T value as 0.97. 18-m906 was *Escherichia coli*, with the percentage of identification as 99.80% and

引文格式:

王凤军,叶素丹.TaqMan 实时荧光 PCR 对沙门氏菌能力验证样品的快速检测与鉴定[J].现代食品科技,2020,36(12):300-306

WANG Feng-jun, YE Su-dan. Rapid detection and identification of *Salmonella* in proficiency testing samples by TaqMan real-time fluorescent PCR [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 300-306

收稿日期: 2020-02-02

基金项目: 浙江省教育厅一般科研项目 (Y201840745); 浙江省基础公益研究计划项目 (LGC19C200007); 浙江经贸职业技术学院省属高校基本科研业务费专项 (20SBYB03)

作者简介: 王凤军(1984-), 女, 高级实验师, 研究方向: 微生物检测方面

T value as 0.94. The results of real-time fluorescence PCR were consistent with those obtained by the conventional culture method, and the PCR method was simpler and more rapid, requiring only 12 hours from pre-enrichment to result determination, and leading to results with high accuracy and ability to detect multiple samples in one batch. This method allows rapid screening of *Salmonella* in a large number of samples and detection and verification of proficiency testing samples.

Key words: *Salmonella*; proficiency testing; real-time fluorescent PCR; rapid detection; identification

沙门氏菌 (*Salmonella* spp.) 是一种最常见的造成食物中毒的食源性无荚膜和芽孢的革兰氏阴性肠道致病杆菌, 易引起诸如伤寒、急性肠胃炎、菌血症和败血症等疾病, 严重危害人体健康^[1-3]。沙门氏菌的检验主要使用国标常规培养法为主, 检测程序主要有前增菌、增菌、平板分离、生化试验、血清学鉴定^[4,5], 整个过程通常需时 4~7 d, 且操作繁琐, 难以应对食物中毒快速诊断以及食品企业和管理部门对食品安全的实时监控和源头快速把控。

目前沙门氏菌的快速检测方法主要有免疫学方法和聚合酶链式反应 (PCR) 等方法。使用 VIDAS 酶联免疫设备的免疫学方法难以区分假阳性现象, 需依靠常规生化进行确认鉴定, PCR 方法检测迅速, 特异性高, 使用越来越广泛, 但常规 PCR 缺乏探针, 扩增特异性不高, 依赖电泳进行产物分析, 耗时长, 还会带来 PCR 产物和 DNA 染料的污染。实时荧光 PCR 技术通过在 PCR 扩增反应中引入一种荧光化学物质, 随着 PCR 反应的进行, PCR 反应产物不断累计, 荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环, 收集一个荧光强度信号, 可对循环产物荧光信号进行实时检测和定量及定性的分析^[6-9]。由于其灵敏性高、特异性强, 且操作简单, 已广泛应用于基因表达研究、转基因研究, 药物疗效考核和病原体检测等领域^[10-13]。

随着各项快速检测技术逐渐向微生物领域渗透, 缩短了微生物检测的时限, 但微生物检验结果的准确性和可靠性也需有较好的保障, 尤其是沙门氏菌类型繁多, 生化反应复杂多样, 各项判定试验主观性较强, 需通过肉眼进行观察和判读, 极易发生漏检和误检的现象。微生物检测能力验证是实验室确保微生物检测有效性的关键环节, 其结果直接关系到检测报告的准确性和可靠性^[14]。通过参加能力验证检验技术人员对技术的掌握程度和检测准确性十分必要。本文依据《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》对沙门氏菌能力验证样品进行检测, 对预增菌获得的培养物进行实时荧光 PCR 快速检测, 得到的结果与国标法结果进行比对, 以验证实时荧光 PCR 在沙门氏菌快速检测中的作用。

1 材料与与方法

1.1 材料与仪器

由中国检验检疫科学研究院组织的食品中沙门氏菌检验能力验证试验, 计划编号为 ACAS-PT526, 发放样品共 2 瓶, 规格为西林瓶, 白色粉末, 样品编号分别为 18-D319 和 18-M906。

对照样品: 鼠伤寒沙门氏菌 CMCC(B)50115, 伤寒沙门氏菌 CMCC(B)50071, 甲型副伤寒沙门氏菌 CMCC 50093, 乙型副伤寒沙门氏菌 CMCC 50094, 猪霍乱沙门氏菌猪霍乱亚种 DSM4224, 肠炎沙门氏菌肠炎亚种 ATCC14028, 单增李斯特菌 ATCC19115, 福氏志贺氏菌 ATCC12022、金黄色葡萄球菌 ATCC6538 和副溶血性弧菌 ATCC17802。

试验用到的试剂和设备主要有: DBI-05 沙门氏菌属干制生化鉴定试剂盒, 北京陆桥公司; API20E 肠道菌试剂鉴定条, 法国梅里埃公司; A-F 沙门氏菌属诊断血清, 宁波天润公司; Koning®通用型基因组 DNA 小量制备试剂盒, 杭州百迈生物股份有限公司; AceTaq®DNA 聚合酶 (Vazyme)、dNTP mix (10 mM each)、10×PCR Buffer (AceTaq) (Mg²⁺ plus)、PBS, 南京诺唯赞生物科技公司; 探针与引物, 委托美国 Invitrogen 公司合成; ABIQuantStudio Q5 实时荧光 PCR 仪, 美国 ABI 公司; NanoDrop 核酸蛋白分析仪, 美国 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 冻干粉的水化

需要用总计 40mL 灭菌生理盐水再水化; 首先无菌操作开启西林瓶, 样品开启后, 立即加入 4 mL 稀释液进行再水化, 待溶解后, 吸出放入无菌瓶中, 再反复用余下的稀释液清洗西林瓶内壁 (包括胶塞), 回收清洗液放入上述无菌瓶中, 此溶液即为待测样品, 合计为 40 mL。本次冻干的样品等同于 40 mL 的食品样品。

1.2.2 增菌和分离培养

由于冻干粉样品为人工污染的样品, 需在生物安全二级实验室内, 从已水化的 40 mL 的样品中吸取 25 mL 转移至 225 mL 灭菌的缓冲蛋白胨水 (BPW) 中, 36 °C 预增菌培养 10 h。然后分别吸取 1 mL 预增菌培

养物转种至四硫磺酸钠亮绿培养基 (TTB) 增菌液和亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC) 增菌液, 分别于 42 °C 和 36 °C 培养 24 h。取培养后的增菌液各一环, 划线于沙门氏菌属显色、亚硫酸铋 (BS) 琼脂和木糖赖氨酸脱氧胆盐 (XLD) 琼脂培养基平板上, 36 °C 培养 24~48 h, 观察菌落特征。

1.2.3 生化鉴定

挑取沙门氏菌属显色平板、BS 和 XLD 平板上的可疑菌接种至营养琼脂平板, 36 °C 培养 24 h, 挑取单菌落制成 0.5 麦氏菌悬液, 接种至沙门氏菌属干制生化鉴定试剂盒和 API20E 肠道菌试剂鉴定条, 对能力验证盲样 18-D319 和 18-M906 进行生化鉴定, 操作严格按照产品说明书进行, 及时观察现象并记录。

1.2.4 血清学试验

将生化鉴定为可疑沙门氏菌的阳性单菌落接种至半固体动力培养基中, 36 °C 培养 24 h 后, 按照 A-F 沙门氏菌属诊断血清说明书进行 O 型和 H 型血清学分析。

1.2.5 样品基因组 DNA 的提取

按照 1.2.1 进行水化, 再按照 1.2.2 进行预增菌, 取预增菌培养物 1 mL 置于 1.5 mL 离心管中, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 沉淀用灭菌蒸馏水 (ddH₂O) 洗涤 2 次, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清液后加入 100 μL ddH₂O, 漩涡混匀, 封口膜封口, 水浴煮沸 10 min, 置于 -20 °C 条件下 10 min, 取出溶解, 漩涡混合器振荡破碎细菌释放核酸^[6], 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为检测模板, -20 °C 保存, 备用。

1.2.6 引物和探针

表 1 沙门氏菌引物和探针序列

Table 1 The primers and probes of *Salmonella*

引物序列	探针序列
5'-GGCGTCTGGTCTCTAACC-3'	5'-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTAGGC-3'
5'-GTATCGCATTTCGCTACGTTCTT-3'	

本实验以沙门氏菌特异性基因 *hut* 基因为靶基因, 在 Genebank 进行中查找多条 *hut* 基因序列, 并利用 DNAssist 软件进行同源性分析, 选取相对保守区段, 用 PRIMER 5.0 软件和 Primer Express 3.0 软件进行引物和 TaqMan 探针设计, 报告基团用 FAM 标记, 淬灭基团用 TRAMA 标记, 并经特异性验证筛选出具有较高特异性的引物和探针, 序列见表 1。

1.2.7 实时荧光 PCR 反应体系

在 0.2 mL 光学 PCR 反应管中依次加入: ddH₂O 14.75 μL、10×PCR Buffer 2.50 μL、dNTP (400 μmol/L) 0.50 μL、引物 (10 μmol/L) 0.40 μL、探针 (10 μmol/L) 0.20 μL、500 U Taq DNA 聚合酶 0.25 μL 和 DNA 模板 1.00 μL, 反应混合液在实时定量 PCR 仪中进行扩增^[8]。反应条件设置为 95 °C 预处理 5 min, 再以 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火延伸 1 min, 进行 40 个循环。在退火延伸步骤收集荧光信号。

1.2.8 数据处理

实时荧光 PCR 实验中设置阴性对照、阳性对照和空白对照。其中阳性对照以沙门氏菌为 DNA 模板, 阴性对照以非沙门氏菌属为 DNA 模板, 空白对照不加模板 DNA, 而以 ddH₂O 代替, 用于检验是否存在 PCR 污染和较高的引物二聚体污染。适用性分析的市场抽样样本、能力验证样本和日常检测等被检样本以及阴性对照、阳性对照和空白对照等参考样本均进行三个复孔的重复实验。每个反应的 Ct 值是实时监测扩增过程的荧光信号达到指数扩增时的循环周期数。主

要的计算方式是以扩增过程前 3 到 15 个循环的荧光值的 10 倍标准差为阈值, 当荧光值超过阈值时的循环数则为 Ct 值, 由仪器自动确定^[15]。

对预增菌的培养物经平板计数法测试, 菌液浓度为 4.5×10⁵ cfu/mL, 以 1×10⁵ cfu/mL 为起始浓度进行 10 倍系列梯度稀释, 共 5 个梯度, 提取各稀释度的基因组 DNA 进行实时荧光 PCR 检测, 已验证方法的灵敏度, 同时使用该实时荧光 PCR 方法对人工污染的牛奶样品和客户委托的样品进行检测, 已验证方法的适用性。

2 结果与讨论

2.1 选择性分离结果

样品 18-D319 在沙门氏菌属显色平板上分离出淡紫色菌落, 在 BS 平板上分离出灰绿色菌落, 在 XLD 平板上分离出不透明黄色, 且中心呈黑色的菌落。而样品 18-M906 在沙门氏菌属显色平板上分离出淡黄色至蓝绿色菌落, 在 BS 平板上不生长, 在 XLD 平板上分离出不透明黄色菌落。沙门氏菌属菌种复杂, 在分离培养基上的菌落形态不唯一, 凡是符合标准中描述的典型菌落和可疑菌落都需进行进一步的鉴定, 故样品 18-D319 和 18-M906 均为可疑沙门氏菌属, 需经进一步的生化实验和血清学鉴定确认。

此外甲型副伤寒、伤寒等不产或弱产 H₂S 的沙门氏菌在传统培养基上易漏检; 奇异变形杆菌等产 H₂S

的非沙门氏菌在传统培养基上假阳性率很高,会增加后期生化鉴定的工作量。在显色培养基上沙门氏菌和伤寒沙门氏菌均为紫色,大肠杆菌为蓝色,变形杆菌为无色,较易辨认。本实验 18-D319 在沙门氏菌属显

色平板上是典型的淡紫色,但 18-M906 在培养初期为淡黄色,随着培养时间延长逐渐变蓝。

2.2 干制生化试剂鉴定盒

表 2 可疑沙门氏菌的生化反应鉴定结果

Table 2 Identification of suspicious *Salmonella* by biochemical reaction

编号	TSI 试验				生化试验					
	斜面	底层	H ₂ S	产气	赖氨酸脱羧酶	pH7.2 尿素	氰化钾	靛基质	山梨醇	ONPG
18-D319	K	A	+	+	+	-	-	-	+	-
18-M906	A	A	-	+	+	-	-	+	+	+

注:“A”为产酸,“K”为产碱,“-”为阴性,“+”为阳性。

表 3 样品 18-D319 和 18-M906 API 20E APLAB PLUS 分析的结果

Table 3 Results of samples 18-D319 and 18-M906 with API 20E APLAB PLUS

样品	项目内容	结果
样品 18-D319	试剂条	API 20E V4.1
	生化谱	6704752
	评语	极好的鉴定
	有意义的分类单位	<i>Salmonella</i> spp
	鉴定结果	鉴定% 99.90 T 值 0.97
	试剂条	API 20E V4.1
样品 18-M906	生化谱	5044552
	评语	极好的鉴定
	有意义的分类单位	<i>Escherichia coli</i> 1
	鉴定结果	鉴定% 99.80 T 值 0.94
	试剂条	API 20E V4.1
	生化谱	5044552

取分离平板上的可疑菌落接种至营养琼脂平板进行纯化,取营养琼脂上的单菌落按照沙门氏菌属干制生化试剂盒进行操作。样品 18-D319 的五项典型生化反应(赖氨酸、氰化钾、靛基质、尿素、硫化氢)与沙门氏菌阳性菌 ATCC14028 结果一致,为判定为可疑沙门氏菌属。样品 18-M906 的五项典型生化反应(赖氨酸、氰化钾、靛基质、尿素、硫化氢)与沙门氏菌阳性菌 ATCC14028 结果不一致,其中靛基质为阳性,可判定为非沙门氏菌属,见表 2。

2.3 API20E 生化试剂鉴定盒

将 0.5 麦氏浓度的样品 18-D319 的菌悬液接种至 API 20E 试剂条,经 21 个生化反应实验检测,反应结果以“+”和“-”结果显示,利用 API 20E APLAB PLUS 软件进行分析,18-D319 样品得出编码为“6704752”,鉴定百分率为 99.90%,大于 90%,T 值为 0.97,大于 0.75,评语为极好的鉴定,属于沙门氏菌。18-M906 样品得出编码为“5044552”,鉴定百分率为 99.80%,大于 90%,T 值为 0.94,大于 0.75,评语为极好的鉴

定,鉴定结果为大肠埃希氏菌。

API 20E 生化鉴定试剂条是根据快速酶促反应及代谢产物的检测技术发展的一种细菌编码鉴定法,广泛应用于临床、食品中革兰氏阴性杆菌的快速鉴定。其中鉴定百分率表示生化结果组合与数据库内的典型条目作比较,经计算后得到细菌鉴定的可能性,确认未知菌是否属于某一个分类单位(科,属,种),T 值表示其生化反应结果与该菌最典型生化谱的接近程度。当鉴定百分率在 90%以上,且 T 值结果在 0.75 以上,试剂条对菌株的鉴定结果是可靠的,否则需经进一步的分纯鉴定。本实验两个盲样的鉴定结果都满足试剂条的要求,故可判定 18-D319 培养物为可疑沙门氏菌,18-M906 培养物为沙门氏菌为未检出,结果见表 3。

2.4 血清学试验结果

取可疑沙门氏菌的阳性菌落纯培养物用沙门氏菌诊断血清做玻片凝集试验。18-D319 样品出现凝集现象,而 18-M906 样品菌落培养物玻片凝集试验为阴性。由此结果可以判定 18-D319 样品为沙门氏菌检出,

18-M906 样品为沙门氏菌未检出。

2.5 样品基因组 DNA 的提取

按 1.2.5 提取的 DNA 溶液经核酸蛋白分析仪检测, OD 260/280 nm 在为 1.75~1.95 之间, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测条带清晰, 完整性好, 经测试其含量为 300~500 ng/L, 纯度良好, 可满足后续实验要求。

2.6 实时荧光 PCR 法结果

2.6.1 特异性检测结果

为验证沙门氏菌引物探针的特异性, 将实验室保存的各种菌种提取核酸 DNA 作为模板进行扩增。经实时荧光 PCR 反应, 每个反应的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数为 Ct 值。结果显示鼠伤寒沙门氏菌 CMCC(B) 50115, 伤寒沙门氏菌 CMCC(B)50071, 甲型副伤寒沙门氏菌 CMCC 50093, 乙型副伤寒沙门氏菌 CMCC 50094, 猪霍乱沙门氏菌猪霍乱亚种 DSM4224 和肠炎沙门氏菌肠炎亚种 ATCC14028 等沙门氏菌属均有 S 型的扩增曲线, Ct 值小于 30.00。而单增李斯特菌 ATCC19115, 福氏志贺氏菌 ATCC12022、金黄色葡萄球菌 ATCC6538 和副溶血性弧菌 ATCC17802 等非沙门氏菌属未出现明显的扩增曲线, 说明在沙门氏菌的引物探针下, 非沙门氏菌属无法扩增, 无荧光信号, 见图 1。

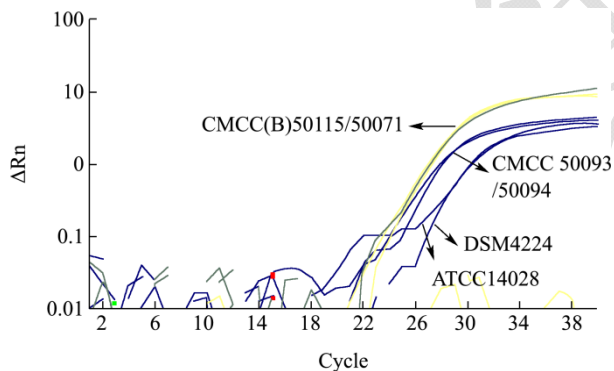


图 1 样品 18-M906 实时荧光 PCR 扩增曲线图

Fig.1 Amplification curve of sample 18-M906 by real-time fluorescent PCR

以预增菌培养物提取的核酸 DNA 为模板进行实时荧光 PCR 反应, 并设置肠炎沙门氏菌肠炎亚种 ATCC14028 为阳性对照, 非沙门氏菌属(单增李斯特菌)为阴性对照, 无模板反应孔为空白对照。实时荧光 PCR 检测结果中, 阴性对照和空白对照样品经扩增后, Ct 值>40.0, 无荧光信号; 阳性对照样品经扩增后 Ct 值为 24.34, 样品 18-D319 的 Ct 值为 26.21, 且扩增曲线呈现明显的 S 指数增长型; 样品 18-M906 的 Ct 值>40.00, 无荧光信号, 则可判定样品 18-D319 中

沙门氏菌检出, 样品 18-M906 沙门氏菌未检出见图 2 和图 3。

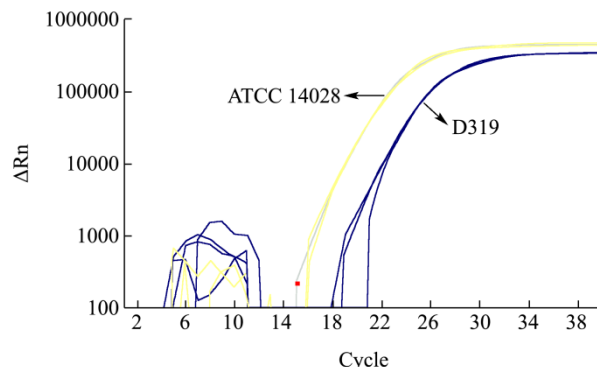


图 2 样品 18-D319 实时荧光 PCR 扩增曲线图

Fig.2 Amplification curve of sample 18-D319 by real-time fluorescent PCR

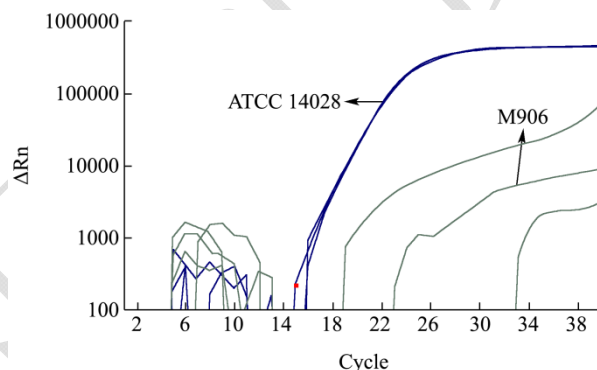


图 3 样品 18-M906 实时荧光 PCR 扩增曲线图

Fig.3 Amplification curve of sample 18-M906 by real-time fluorescent PCR

2.6.2 反应条件优化

退火温度的设置和引物与 Taqman 探针比例是影响实时荧光 PCR 检测效率的关键条件。为了确定反应体系的最佳条件, 以获得较好的灵敏度, 本文首先设置了 56 °C、58 °C、60 °C、62 °C 和 64 °C 进行退火延伸, 结果显示退火温度为 60 °C 时荧光信号最好。其次设计引物与探针浓度比例分别为 1:2、1:1、2:1 和 4:1, 结果显示当引物与探针浓度比例为 2:1 时本底最小荧光强度最大。

2.6.3 灵敏性检测结果

提取 10 倍梯度稀释的沙门氏菌标准菌株基因组 DNA, 采用实时荧光 PCR 方法进行扩增以确定检测灵敏度。当沙门氏菌污染量从 10⁵ cfu 降低至 10² cfu 时, 均可在 40 个循环内出现显著扩增。其中当污染量为 10² cfu 时, 沙门氏菌三个重复间的扩增曲线的 Ct 值分别为 35.69、35.87 和 35.74。由于提取细菌基因组 DNA 后的溶解体积为 100 μL, 取 1 μL 进行实时荧光 PCR 反应, 因此本方法的检测限为 1 cfu/PCR 反应。

2.6.4 适用性检测结果

表4 人工污染和客户委托样品检测结果

Table 4 Test results of artificial pollution and customer entrusted samples

样品名称	样品编号	阳性对照		阴性对照		空白对照		样品检测		检测结果
		Ct 值	结果	Ct 值	结果	Ct 值	结果	Ct 值	结果	
牛奶(加标)	20190421	20.01	+	>40.00	-	>40.00	-	21.30	+	+
蓝莓提取物	20190423	19.52	+	>40.00	-	>40.00	-	>40.00	-	-
糕点	20190438	20.26	+	>40.00	-	>40.00	-	>40.00	-	-
面包	20190445	19.35	+	>40.00	-	>40.00	-	>40.00	-	-
沙琪玛	2019476	22.02	+	>40.00	-	>40.00	-	>40.00	-	-
月饼	2019498	21.09	+	>40.00	-	>40.00	-	>40.00	-	-
粽子	2019512	20.56	+	>40.00	-	>40.00	-	>40.00	-	-
豆干	2019523	22.01	+	>40.00	-	>40.00	-	>40.00	-	-
臭豆腐	2019538	23.24	+	>40.00	-	>40.00	-	>40.00	-	-
小麦粉馒头	2019562	21.90	+	>40.00	-	>40.00	-	>40.00	-	-

使用该实时荧光 PCR 方法对人工污染的牛奶样品和客户委托的样品进行检测,以肠炎沙门氏菌肠炎亚种 ATCC14028 为阳性对照,非单增李斯特菌 ATCC 19115 为阴性对照,无模板反应孔为空白对照,检测结果见表 4。检验样品预增菌后进行实时荧光 PCR 检测,检测结果 Ct 值小于 30.00,说明荧光信号较强,样品受沙门氏菌活菌污染,避免实时荧光 PCR 检测分不开活菌和死菌的问题。此外,在常规培养法检测时,由于沙门氏菌生化的复杂性,在分离平板上挑取可疑菌落也较困难,可采用实时荧光 PCR 对可疑单菌落进行辅助鉴定,鉴定结果可靠准确,简单快捷。

根据需要,仪器检测方法越来越多地被用于微生物检测,其中 AOAC 认可的沙门氏菌快速筛选方法主要有荧光抗体法、DNA 杂交法、酶联免疫法、免疫扩散法等。目前,应用最多的主要有蛋白水平的全自动免疫分析仪 mini-VIDAS 和核酸水平的 PCR/Real-time PCR。mini-VIDAS 检测灵敏度高,可以在 48 h 内快速鉴定沙门氏菌,但其所获得的阳性结果是推定性的(推定阳性反应),需用生化试验和血清学鉴定加以确证。Real-time PCR 鉴定仪器运作 1~2 h,预增菌 10 h,共耗时仅 12 h 左右,且具有较高的敏感性、特异性和实效性。当前实时荧光 PCR 技术的普及和发展,为食品药品的检测工作指明了新的发展方向^[16-21]。

3 结论

3.1 目前,国标《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》是国家规定的食品中沙门氏菌的标准检测方法,也是基层实验室普遍采用的检测方法,根据沙门氏菌的生长特点及生化特性进行检验鉴定。目前采用培养法的标准主要有国家标准、行业标准、AOAC、ISO 和加拿大官方食品微生物

物分析方法等,其方法准确可靠,但检测方法过程复杂、周期长、所需培养基和试剂繁多,检验周期大约为 5~7 d,且沙门氏菌血清型种类较多,生化反应复杂多变,在分离平板上菌落特征的识别依赖于较好的检测经验。

3.2 本实验利用实时荧光 PCR 方法直接对增菌液进行检测,省去了分离鉴定过程中所用的时间和精力,也避免了定性 PCR 的凝胶电泳和产物分析所带来的环境污染和时间耗费。但实时荧光 PCR 方法仅对于阴性结果可直接报告未检出相应致病菌,而对于阳性结果需再参考国际权威微生物经典检验方法做进一步的生化鉴定和报告。此外沙门氏菌种类繁多,有 I 型、II 型、IV 型、V 型、VI 型及 III 型(亚利桑那菌)6 个亚属,抗原结构复杂,已发现 2000 多个血清型和变种,故某些特殊菌株的生化特征与标准菌株不一致,易出现漏检和错检,在能力验证盲样考核试验中不通过率较高。在本次能力验证中,采用实时荧光 PCR 法和常规培养法相结合的方法,既确保准确度,又满足检验检测机构检验工作的要求。

3.3 因此,实时荧光 PCR 方法更适合于大批次检验样品的快速筛查和食品中毒事件等应急快检的需要。在实验室的日常检验检测工作中,尤其是能力验证等盲样考核工作,采用实时荧光 PCR 快速筛查和国标传统培养法相结合,更能快速、准确、高效地对样品进行检验和结果报告。

参考文献

- [1] 魏静元,孙晶,姜薇,等.一例沙门氏菌测量审核的回顾与分析[J].食品安全质量检测学报,2018,9(19):5070-5073
WEI Jing-yuan, SUN Jing, JIANG Wei, et al. Review and analysis of a case of *Salmonella* spp. measurement audit [J].

- Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(19): 5070-5073
- [2] 张贺兰,李淑泉.食品中沙门氏菌的快速检验方法[J].化工设计通讯,2018,44(9):154-155
ZHANG He-lan, LI Shu-quan. Rapid test methods for Salmonella in food [J]. Research and Development, 2018, 44(9): 154-155
- [3] 崔强,赵治国,李菁雯,等.微生物检验技术研究进展[J].食品研究与开发,2017,8(12):30-32
CUI Qiang, ZHAO Zhi-guo, LI Jing-wen, et al. Research progress of microbiological inspection technology [J]. Food Research and Development, 2017, 8(12): 30-32
- [4] 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[S]
GB 4789.4-2016, National Food Safety Standard Microbiological Examination of Food Salmonella Examination [S]
- [5] 杜春明,郭云昌,刘秀梅.API20E、PCR方法在沙门菌鉴定中的应用[J].实用预防医学,2005,12(5):1006-1007
DU Chun-ming, GUO Yun-chang, LIU Xiu-mei. Application of API20E and PCR in the identification of *Salmonella* [J]. Practical Preventive Medicine, 2005, 12(5): 1006-1007
- [6] Lee N, Kwon K Y, Oh S K, et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food [J]. Foodborne pathogens and disease, 2014, 11(7): 574-580
- [7] Pathog Dis, Wester AL, Kristiansen, et al. Molecular differentiation of *Shigella* spp. from enteroinvasive *E. coli* [J]. European Journal of Microbiology and Immunology, 2016, 6(3): 197-205
- [8] Rodriguez A, Rodriguez M, Cordoba J J, et al. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1275: 31-56
- [9] Bielaszewska M, Mellmann A, ZHANG Wen-lan, et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study [J]. Lancet Infectious Diseases, 2011, 11(9): 671-676
- [10] Yatsuyanagi J, Saito S, Ito I, et al. A case of hemolytic-uremic syndrome associated with shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces [J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2002, 55: 174-176
- [11] 安钢力.实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用[J].中国现代教育装备,2018,301(21):19-21
AN Gang-li. The principle and application of real-time fluorescence quantitative PCR technology [J]. China's Modern Educational Equipment, 2018, 301(21): 19-21
- [12] SN/T 1870-2016, 出口食品中食源性致病菌检测方法实时荧光 PCR 法[S]
SN/T 1870-2016, Method for the Detection of Pathogens in Food for Export Real-time PCR Method [S]
- [13] 程浩.食品中沙门氏菌检测方法比较[J].安徽农业科学, 2018,46(30):202-204
CHENG Hao. Comparison of detection methods of *Salmonella* in food [J]. J.Anhui Agric. Sci, 2018, 46(30): 202-204
- [14] 林立民,刘萍萍,马文丽,等.能力验证与实验室质量管理实践研究[J].食品安全质量检测学报,2013,4(4):1288-1291
LIN Li-min, LIU Ping-ping, MA Wen-li, et al. Study on proficiency testing and laboratory quality practices [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2013, 4(4): 1288-1291
- [15] 彭建明.定量 PCR 测定数据处理数学模型研究进展[J].国外医学 2005,26(7):449-451
PENG Jian-ming. Advances in mathematical models for quantitative PCR data processing [J]. Sect Clin Biochem, 2005, 26(7): 449-451
- [16] Bustin Stephen A, Benes Vladimir, Garson Jeremy A, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. Clin Chem, 2009, 55(4):611-622
- [17] WANG Feng-jun, FENG Jun-li, YE Su-dan, et al. Development of a multiplex fluorescence quantitative PCR for detection of genetically modified organisms [J]. Biologia, 2018, 73(1): 21-29
- [18] 王凤军.多重荧光聚合酶链反应对转基因能力验证样品的检测和验证[J].食品安全质量检测学报,2017,8(12):4698-4703
WANG Feng-jun. Detection and verification of proficiency testing samples of transgenic crops with multiplex fluorescence polymerase chain reaction [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(12): 4698-4703

(下转第 83 页)