

实验技术与方法

实时荧光 PCR 在食源性致病菌监测中的应用研究

唐振柱 孙贵娟 黄彦 李秀桂 王红 吕素玲 黄兆勇
(广西壮族自治区疾病预防控制中心,广西 南宁 530028)

摘要:目的 建立沙门菌、志贺菌、单核细胞增生李斯特菌、大肠埃希菌 O157: H7、金黄色葡萄球菌 5 种致病菌的实时荧光 PCR 检测方法,并在食源性致病菌监测工作中推广应用。**方法** 将菌株及样品经培养基增菌后,用热裂解法提取 DNA,使用荧光定量 PCR 反应试剂盒,对该检测方法进行特异性验证,并在 2006-2007 年间,同时应用实时荧光 PCR 和传统方法对 890 份各类实际工作监测标本进行比较分析。**结果** 实时荧光 PCR 方法对 19 株不同种类标准菌株符合率为 100%;对用传统方法检测分离到的 5 种食源性致病菌的符合率分别为:沙门菌 96.61%,单核细胞增生李斯特菌 92.30%,大肠埃希菌 O157: H7、志贺菌、金黄色葡萄球菌均为 100%;对 890 份监测标本检测结果表明,实时荧光 PCR 法对食品及临床标本中食源性致病菌的检出率略高于传统培养法,差异无统计学意义,而实时荧光 PCR 法可在 3~36 h 内对目标样品作出结果判断。**结论** 实时荧光 PCR 方法成功应用于食源性致病菌的检测,具有快速、特异和灵敏的特点,可作为食物中毒等突发公共卫生事件处置和重大活动食品安全保障工作的有效技术支持。

关键词:实时荧光 PCR;食源性致病菌;分子信标探针;食品安全;监测

中图分类号:TS207.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2010)04-0332-04

Exploratory Development of Real-Time Fluorescence PCR Assay in Monitoring Foodborne Pathogens

TANG Zhen-zhu, SUN Gui-juan, HUANG Yan, LI Xiu-gui, WANG Hong, LÜ Su-ling, HUANG Zhao-yong

(Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Prevention and Control, Guangxi Nanning 530028, China)

Abstract: Objective To develop real-time fluorescence PCR assay for detecting *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *EHEC* O157: H7, *Staphylococcus Aureus* in monitoring foodborne pathogens. **Method** DNAs of strains and sample were extracted on boiling lyses method after cultivation over night. The specificity of the real-time PCR assay was identified by using PCR kit to amplify DNA. The detection rate of the real-time PCR assay and the traditional culture method were compared for 890 food samples tested during 2006-2007. **Results** In the detection of 19 standard strains, the coincidence rate of real-time PCR assay was 100%. In the detection of five pathogens isolated from food monitoring by traditional method, the coincidence rate of real-time PCR assay was 96.61% in *Salmonella*, 92.30% in *Listeria monocytogenes*, and 100% in *Shigella*, *EHEC* O157: H7, *Staphylococcus aureus*. The detection rate of real-time PCR assay for 890 food samples was slightly higher than traditional methods, though the difference was nonsignificant. The testing results could be obtained in 3-36 h by real-time PCR assay. **Conclusion** Real-time PCR assay is rapid, sensitive and specific for rapid diagnosis of pathogens in monitoring food poisoning. It could provide new feasible technical support for the surveillance and safeguard food safety at public health emergencies and major assembly events.

Key words: Real-Time PCR; Foodborne Pathogens; Molecular Beacon Probes; Food Safety; Monitoring

食品安全问题是一个世界公共卫生问题,由食

品安全导致的食源性疾病日益引起全社会的关注,由微生物所致的食源性疾病发病人数约占每年发病总人数的 80%^[1],因此,2000 年卫生部建立了全国食品污染物及食源性疾病监测网。然而对于食品样品或腹泻病人呕吐物、粪便样品等样本的食源性致病菌的检测,该监测网检验方法主要还是沿用传统

收稿日期:2009-08-12

基金项目:广西科学研究与技术开发计划(桂科攻 0592007-4)

作者简介:唐振柱 男 主任医师 研究方向为公共卫生和食品安全风险监控 E-mail:tangzhzh@163.com

通信作者:孙贵娟 女 副主任技师

的培养、生化及血清学鉴定。这些传统方法的检测周期一般长达 4~6 d,且灵敏度低,不能适应突发公共卫生事件处置和重大活动食品安全保障的工作需要。随着分子生物学实验技术的不断完善,常规 PCR、16s rDNA 等基于核酸的检测鉴定技术得以迅速发展,而实时荧光 PCR 以其快速、灵敏、特异、有效防止后污染的优点被广泛应用到各种病毒和致病菌的检测中^[2-4]。实时荧光 PCR 技术已成为微生物学诊断最强有力的工具^[5]。

本文利用部分标准菌株及食品与腹泻病人分离的菌株,验证改良分子信标实时荧光 PCR 方法,并将其应用到食品及腹泻病人标本食源性致病菌的筛查,建立起食源性致病菌快速检测技术,以满足食物中毒等突发公共卫生事件的快速处置和重大活动食品安全保障时效性强的需要。

1 材料与方 法

1.1 试验菌株

共 151 株,其中标准菌株 19 株(购自中国微生物菌种保藏委员会医学细菌中心和普通微生物中心),食品分离株 110 株(来自 2004-2005 年广西食源性致病菌监测,包括沙门菌、志贺菌、单核细胞增生李斯特菌、大肠埃希菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌),临床腹泻病人分离株 22 株,详见表 1。

1.2 主要培养基和主要设备

改良 EC 肉汤,GN 增菌液,7.5% 氯化钠肉汤,缓冲蛋白胨水,李斯特菌增菌肉汤,营养肉汤,均购自北京路桥。

荧光定量 PCR 仪为 API 7001,离心机为 Hettich 公司的 MIKRO 200R。

1.3 检测试剂盒

荧光定量 PCR 反应试剂盒由深圳市疾病预防控制中心提供^[6,7],包括裂解液、反应液和 rTaq 酶。其引物和改良分子信标探针主要根据 GenBank 公布的沙门菌 *invA* 和 *ssaR* 侵袭性基因,志贺菌 *ipaH* 侵袭性抗原基因序列,单核细胞增生李斯特菌 *hlyA* 基因序列,大肠杆菌 O157:H7 编码脂多糖 LPS 的 *rfbE* 基因序列设计,金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因。

1.4 方法

1.4.1 细菌的分离与鉴定 参照 GB/T 4789—2003《食品卫生微生物学检验》及《全国食源性疾病预防网工作手册》操作。

1.4.2 DNA 模板提取 5 种食源性致病菌的分离株用营养肉汤增菌过夜,然后取 1 ml 增菌液 12 000 r/min 离心 5 min 富集,弃上清,加 200 μ l 裂解液重悬菌体,煮沸 15 min,12 000 r/min 离心 5 min,上

清液即为 DNA 模板。食品样品按照 GB/T 4789—2003《食品卫生微生物学检验》方法规定的培养基增菌过夜,然后取 1 ml 增菌液(沙门菌检验取二次增菌液)离心富集,后继步骤与纯培养物 DNA 制备相同。对于呕吐物、粪便样本,由于其菌量较大,可以不经增菌,而是直接取呕吐物或粪便少许,用 500 μ l 生理盐水悬浮,静置 2 min,取上部液体,煮沸 15 min,12 000 r/min 离心 5 min,取 5 μ l 上清液用于实时荧光 PCR 实验。

1.4.3 实时荧光 PCR 反应体系及参数 总体积 25 μ l,内含 5 μ l DNA 模板,19.8 μ l 反应液(2.5 μ l 10 \times PCR 缓冲液,1.5 mmol/L MgCl₂,0.25 mmol/L dNTP,1U Taq 酶,25 pmol 引物,25 pmol 探针),1U rTaq 酶。实时 PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,按 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,52 $^{\circ}$ C 退火 25 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,进行 40 个程序,采用退火阶段检测荧光。

1.4.4 实时荧光 PCR 方法验证 对 19 株标准菌株均应用 5 种荧光定量 PCR 试剂盒进行检测,对 132 株工作分离株分 5 类对应 5 种荧光定量 PCR 试剂盒进行检测,观察该方法的特异性。

1.4.5 实时荧光 PCR 方法在食源性致病菌监测中的初步应用 将从集贸市场采集的生禽、生畜、蔬菜等样品同时采用传统培养鉴定法和实时荧光 PCR 法进行沙门菌、志贺菌、单核细胞增生李斯特菌、大肠埃希菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌的检测。

2 结果

2.1 标准菌株检测结果

19 株标准株中,3 株沙门菌、3 株志贺菌、2 株金黄色葡萄球菌、1 株大肠埃希菌 O157:H7、1 株单核细胞增生李斯特菌经用对应的荧光定量 PCR 检测试剂盒检测,结果均为阳性,Ct 值在 13~18 之间。10 株病原菌之间无交叉反应,其余 9 株非目标食源性致病菌无荧光信号,检测结果为阴性。见表 1。

2.2 食品和临床病人分离菌株检测结果

59 株沙门菌应用相应实时荧光 PCR 检测试剂盒进行检测,57 株阳性,符合率达 96.61%。13 株单核细胞增生李斯特菌实时荧光 PCR 检测阳性为 12 株,符合率为 92.30%。8 株大肠埃希菌 O157:H7,15 株志贺菌,36 株金黄色葡萄球菌所对应的实时荧光 PCR 检测结果均为阳性,符合率为 100%。见表 1。

2.3 实时荧光 PCR 对食品样品及临床样品检测结果

2006-2007 年对 890 份各类标本(其中食品类 806 份,腹泻临床样品 84 份)同时应用实时荧光 PCR 方法和传统分离培养鉴定方法进行 5 种食

表1 试验用菌株及实时荧光 PCR 法检测特异性结果

菌株名称(菌号)	菌株数	来源	荧光 PCR 法检测结果(阳性标本数)				
			沙门菌	志贺菌	O157: H7	单增李斯特菌	金葡菌
鼠伤寒沙门菌(50013)	1	医学细菌中心	+	-	-	-	-
甲型副伤寒沙门菌(50001)	1	医学细菌中心	+	-	-	-	-
仙台沙门菌(50131)	1	医学细菌中心	+	-	-	-	-
福氏志贺菌(51073)	1	医学细菌中心	-	+	-	-	-
福氏志贺菌(51062)	1	医学细菌中心	-	+	-	-	-
宋内氏志贺菌(51427)	1	医学细菌中心	-	+	-	-	-
金黄色葡萄球菌(1.2646)	1	普通微生物中心	-	-	-	-	+
金黄色葡萄球菌(26112)	1	医学细菌中心	-	-	-	-	+
表皮葡萄球菌(26069)	1	医学细菌中心	-	-	-	-	-
大肠埃希菌 O157: H7	1	标准委员会赠	-	-	+	-	-
大肠埃希菌(1.3373)	1	普通微生物中心	-	-	-	-	-
大肠埃希菌(44524)	1	医学细菌中心	-	-	-	-	-
大肠埃希菌(44188)	1	医学细菌中心	-	-	-	-	-
产气肠杆菌(1.2021)	1	普通微生物中心	-	-	-	-	-
单增李斯特菌(54005)	1	医学细菌中心	-	-	-	+	-
普通变形杆菌(1.1527)	1	普通微生物中心	-	-	-	-	-
奇异变形杆菌(49005)	1	医学细菌中心	-	-	-	-	-
枯草芽孢杆菌(ASL 3343)	1	普通微生物中心	-	-	-	-	-
副溶血性弧菌(ASL 1997)	1	普通微生物中心	-	-	-	-	-
沙门菌	54	食品分离标本	52	NT	NT	NT	NT
沙门菌	5	临床分离标本	5	NT	NT	NT	NT
志贺菌	7	食品分离标本	NT	7	NT	NT	NT
志贺菌	8	临床分离标本	NT	8	NT	NT	NT
单核细胞增生李斯特菌	13	食品分离标本	NT	NT	NT	12	NT
英诺克李斯特菌	1	临床分离标本	NT	NT	NT	0	NT
大肠埃希菌 O157: H7	8	食品分离标本	NT	NT	8	NT	NT
金黄色葡萄球菌	28	食品分离标本	NT	NT	NT	NT	28
金黄色葡萄球菌	8	临床分离标本	NT	NT	NT	NT	8

注:NT表示未用荧光PCR法检测;-表示荧光PCR法检测阴性;+表示荧光PCR法检测阳性。

源性致病菌检测,荧光PCR法检测阳性的样本数为48份,阳性率为5.39%,略高于传统的检测方法的阳性率(4.72%),荧光PCR法与传统的培养方法符合率为87.5%。见表2。

3 讨论

物种DNA是最稳定的遗传物质,具有高度的保守性^[8],因此,基于DNA扩增及荧光探针发展起来的实时荧光PCR技术在物种检测等领域应用广泛。目标序列需要经过特异性引物和互补探针的双重识别,使实时荧光PCR技术较传统的扩增特异性更高,减少了假阳性的出现。本实验结果显示,实时荧光PCR法应用于食源性致病菌检测,与传统分离培养方法相比具有较高的符合率,表明实时荧光PCR法特异性和准确性与传统分离培养方法相当;对食品、腹泻病人标本同步检测的结果显示,荧光定量PCR法的敏感性高于传统分离培养法。但是,对食源性疾病的预防与控制、预测与预警,还取决于对所分离的病原菌分子特征、所携带的毒力基因等进行

分析研究。因此在今后的研究中,可以设计检测病原菌特异性菌种靶序列和毒力基因的二重荧光定量PCR,经过一次反应既可检测病原菌又可检测到毒力基因,为突发公共卫生事件的快速诊断及控制,食源性疾病流行的预测、预警,提供及时、准确的数据。

2000年卫生部在全国建立了食源性疾病监测网络,到目前为止已有21个省、直辖市、自治区疾控中心加入该监测网。但迄今为止,致病菌的检测仍然主要采用细菌分离培养方法,样品需经增菌、选择性平板分离、生化和血清学鉴定等步骤,全过程需4~7天,方法较为繁琐^[9],而食品中致病菌的污染率并不高,从对包含了806份食品样品在内的890份样品的监测结果看,传统分离培养法对病原菌的检测阳性率仅为4.72%,绝大多数的食品样品5种致病菌均未检出,但依据《全国食源性疾病监测网工作手册》,阴性的样品依然要进行平板分离、初步生化鉴定等检验,方能下结论,耗费了大量的财力、人力及时间。荧光定量PCR检测技术应用于食源性致病菌检测,反应过程仅需2h多;如果是食品等需

表2 荧光 PCR 法和培养法对 890 份标本的检测结果

检测项目	培养法	荧光 PCR 法		合计
		阳性	阴性	
沙门菌	阳性	19	0	19
	阴性	0	237	237
	小计	19	237	256
志贺菌	阳性	1	0	1
	阴性	2	253	255
	小计	3	253	256
单核细胞增生李斯特菌	阳性	4	0	4
	阴性	0	78	78
	小计	4	78	82
大肠埃希菌 O157:H7	阳性	2	0	2
	阴性	4	250	254
	小计	6	250	256
金黄色葡萄球菌	阳性	16	0	16
	阴性	0	24	24
	小计	16	24	40
总计	阳性	42	0	42
	阴性	6	842	848
	合计	48	842	890

要前增菌过程的样品,也只需要 24~36 h 即可获得结果,比传统细菌分离培养法缩短了 2~4 d;对于呕吐物、粪便等食物中毒类标本,由于标本中所含目标菌数量较大,可在 2~3 h 内获得检测结果,荧光定量 PCR 方法在快速检测方面有着分离培养法无法比拟的优势。因此,应用荧光定量 PCR 技术对食物中毒样品进行检测诊断,对监测样品进行筛查,将大大提高对食物中毒等突发公共卫生事件快速诊断及控制能力,大大提高食源性致病菌监测工作效率,降低检测费用,减少人力消耗。

随着经济活动和社会活动全球化,尤其是东盟自由贸易区的建立,对食品安全监测及检验能力、预测预警能力均提出了新的要求,以控制食源性疾病及外来食源性疾病、传染病的暴发流行,保障各类活动的顺利进行。荧光定量 PCR 技术的出现为此提

供了强有力的技术平台,为保证食品安全提供了快速、准确可靠的数据。但是由于受环境和反应体系自身的影响,对低拷贝致病菌污染的样品检测难以获得阳性结果,因此对食品样品的检测,需要经过增菌步骤,不能直接对样品进行致病菌检测。国外有报道称,利用免疫磁珠和荧光定量 PCR 结合的方法,可以直接检测样品中的 O157:H7,提供了很好的思路。因此,如何通过荧光定量 PCR 和其他一切可以利用的技术有机结合,直接检测食品等样品中的致病菌,将是食品安全检测技术研究的重点。

参考文献

- [1] 刘秀梅. 食源性微生物危险性评估[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(8): 665-668.
- [2] McKEE M L, O'BRIEN A D. Investigation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern adhered by intestinal *E. coli* [J]. Infect Immun, 1995, 63(5): 2070-2074.
- [3] HIGGINS J A, EZZELL J, HINNEBUSCH B J, et al. 5' nuclease PCR assay to detect *Yersinia pestis* [J]. J Clin Microbiol, 1998(36): 2284-2288.
- [4] SAMOSORNSUK S, CHAICUMPA W, von SEIDLEIN L, et al. Using real time PCR to detect shigellosis: ipaH detection in Kaeng-Khoi District Saraburi Province, Thailand [J]. Thammasat Int J Sc Tech, 2007, 12(1): 52-57.
- [5] SACHSE K. Specificity and performance of diagnostic PCR assays [J]. Methods Mol Biol, 2003(216): 3-29.
- [6] 石晓路, 扈庆华, 张佳峰, 等. 多重实时 PCR 快速同时检测沙门菌和志贺菌[J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(12): 1053-1056.
- [7] 扈庆华, 郑薇薇, 石晓路, 等. 改良分子信标-实时 PCR 快速检测副溶血弧菌[J]. 现代预防医学, 2004, 31(3): 441-443.
- [8] HIGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, et al. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions [J]. Biotechnology, 1993(11): 1026-1030.
- [9] 许一平, 成炜, 陈福生. 多重 PCR 技术在食源性病原细菌检测中的应用[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 355-359.