

食源性致病菌二重 PCR 法快速检测研究综述

赵丹丹, 谢 峻, 陈旭文, 王 滢, 朱雨欣

马鞍山师范高等专科学校 安徽马鞍山

【摘要】随着 society 对食品安全问题关注度的不断提升,快速检测食源性致病菌成为预防和控制食源性疾病的重要手段。PCR 检测法作为分子生物学和医学诊断中常用的检测手段,在食源性致病菌检测中同样具有重要作用。本文即在此背景下展开综述研究,通过分析相关概念内容,分别对食源性病原菌检测技术、食源性致病菌 PCR 检测技术、食源性致病菌 PCR 检测标准以及食源性致病菌二重 PCR 法快速检测等相关文献进行总结分析,以此为广大食品安全检测人员提供一定的技术参考。

【关键词】二重 PCR 法;食源性;致病菌;快速检测;研究综述

【基金项目】省级科研项目(2022AH052834);校级重点科研项目(2024xjzdky19);校级质量工程项目(2023xjjxtd02);省级质量工程项目(2022sfjk058)

【收稿日期】2024 年 10 月 23 日

【出刊日期】2024 年 12 月 13 日

【DOI】10.12208/j.sdr.20240013

A review of research on the rapid detection of foodborne pathogenic bacteria by duplex PCR

Dandan Zhao, Jun Xie, Xuwen Chen, Ying Wang, Yuxin Zhu

Maanshan Teacher's College, Maanshan, Anhui

【Abstract】With the escalating public focus on food safety, the expedited detection of foodborne pathogenic bacteria has emerged as a pivotal strategy for the prevention and management of foodborne diseases. The PCR detection method, extensively utilized in molecular biology and medical diagnostics, is also critically important for the identification of foodborne pathogens. This scholarly article presents a comprehensive overview within this context, analyzing pertinent concepts and synthesizing research on foodborne pathogen detection technologies, PCR detection methodologies, PCR detection standards, and the rapid identification of foodborne pathogens via duplex PCR. It is intended to serve as a technical reference for professionals engaged in food safety testing.

【Keywords】Duplex Polymerase Chain Reaction (PCR) methodology; Foodborne pathogens; Expedited detection protocols; Scholarly review

1 研究背景

食源性致病菌是引发人类食源性疾病的关键因素,对人类健康有着重要影响,同时也是食品安全防控的首要内容。从发达国家实际调研来看,其中 30%的人口每年至少患得一次食源性疾病,而发展中国家的情况只会更加严峻,预计每年至少有 2.7 亿腹泻等病例,甚至危及 240 万低龄儿童的生命安全。

在我国食品生产、加工、运输与销售环节中,企业与政府的安全部门对其进行监管,主要采取大批量食品抽样检测的方法。但是由于致病菌检测样本过多,时间紧迫,使得快速检测技术成为相关人员亟待解决的核心问题。在传统食源性致病菌检测中,

工作人员需要采用细菌学培养法,需要通过富集培养、形态观察、生理生化鉴定等环节,确定其食源性致病菌是否超标。该方法不仅操作复杂,而且需要耗费大量时间,无法满足当前社会的实际需求。在此背景下 PCR 法快速检测应运而生,成为解决该问题的重要手段。

2 概念界定

2.1 食源性致病菌

食源性致病菌是食品安全领域的重要概念,特指以食物为载体的、对人类具有一定致病性特征的细菌类群。该类细菌可以在食物中长期生存并繁衍,通过直接或间接地方式危害人体安全,并导致人类

患病。常见的食源性致病菌主要有沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、阪崎肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、肉毒梭菌、大肠杆菌、假单胞菌属、微球菌属、芽孢杆菌属与梭状芽孢杆菌属、沙雷菌属、志贺氏菌属等。其中沙门氏菌广泛存在于肉、蛋、奶等动物性食品中,其能够通过生成肠毒素,进而引发人体中毒。金黄色葡萄球菌在含盐含糖的食品中繁殖生长,通过生成耐热肠毒素造成人体中毒。副溶血性弧菌则主要来自海产品与盐腌制食品,具有极强的存活能力。食源性致病菌对人体健康安全具有严重威胁,其危害甚至远超农药残留和添加剂滥用,是食品安全的核心隐患。

2.2 PCR 法快速检测

PCR 即聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction), PCR 法快速检测主要在分子生物学和医学诊断领域广泛应用,主要通过对特定 DNA 片段的体外快速扩增,检测目标的 DNA 或 RNA 序列。该方法以 DNA 双链复制为基础,以特定引物和 DNA 聚合酶为助力,将单链 DNA 模板结合特定核苷酸,以此通过指数级复制检验其 DNA 或 RNA 序列。该方法主要包括退火、延伸和变性三个环节,通过不断循环即可达到快速检测的目的与效果。目前对于 PCR 法快速检测的应用主要在病原体检测、基因突变检测、基因表达分析、法医学鉴定等方面。其中病原体检测可以直接检测到病毒、细菌等不同病原体,因此成为食源性致病菌检测的重要技术之一。PCR 法快速检测具有高灵敏度、高特异性与快速性等特征,符合食源性致病菌检测的基本需求,因此具有更高的推广价值。

2.3 二重 PCR 法快速检测

二重 PCR 法快速检测是基于常规 PCR 法快速检测之上,实施两个反应循环的检测方法,即将退火、延伸和变性三个环节重复两次,以此提高检测的特异性和敏感性。在稀有 DNA 序列或低拷贝数目标序列检测中具有更好的应用价值,而食源性致病菌检测恰恰符合该检测需求,通过两轮扩增循环,可以提高检测的速度和准确度。

3 食源性致病菌二重 PCR 法快速检测研究

3.1 食源性病原菌检测技术研究

食源性病原菌检测技术主要包括微生物鉴定、免疫学检验、分子生物学检测、生物传感器检测等

相关技术与方法。王福成(2024)对相关技术进行了总结研究,首先在传统微生物鉴定方法研究中,预增菌、选择性增菌、生化筛选鉴定时期基本检测步骤。2016 年我国发布了相关检验的国家标准,以此规范了微生物检验的流程与标准。该检验方法通常需要 2~3 天时间,其中 RAPID 琼脂 (Bio-Rad) 等显色培养基是当前最常用的改进方法。其次,对于免疫学检测方法来说,其主要通过特定抗体与其特异性抗原结合的方式进行检测,目前在食源性致病菌检测领域广泛使用的方法有酶联免疫吸附测定、免疫磁分离、侧向层析免疫测定等几种技术。Kumar (2014) 等人在副溶血性弧菌检测研究中提出了一种以 TDH 相关溶血素单克隆抗体为基础检测方法。其三,分子生物学检测技术则以核酸为基础,拥有速度、灵敏度与准确度优势。在食源性病原体检测中使用最多的是聚合酶链式反应 (PCR)、实时荧光定量 (qPCR) 等技术。其四,生物传感器检测技术是基于特定分析物或标记物的生化信号进行检测的方法,其主要依靠光学、电化学、质量等层面的生物信号,检测相应的病原体物质。Morlay 等人提出了一种检验单增李斯特菌的免疫芯片 SPR 成像系统检测方案,其采用了电化学生物传感器检测 SPR 信号,从而拥有更高的灵敏度、特异性与信噪比,同时还拥有成本低廉、响应时间较快的优势。

3.2 食源性致病菌 PCR 检测技术研究

PCR 检测技术即属于分子生物学检测方法,也是目前在食源性致病菌检测领域应用最广泛的方法。早在 2001 年, Ferretti 等人便提出了运用多重聚合酶链反应技术检测沙门氏菌的方案。随着 PCR 检测技术传入我国,我国相关科研人员也陆续提出了不同的检测方法与研究成果。许龙岩(2003)则针对志贺氏菌的检测提出了相应的检测方法与流程。杨洋(2006)等人则针对牛奶乳品中金黄色葡萄球菌的检测,提出了对应的 PCR 方法。荣策(2012)等人则针对鼠伤寒沙门氏菌提出了荧光 PCR 检测方法。此外,国外相关人员也有重要的研究成果。Cui 等人提出了一种可以同时检测活性副溶血弧菌、溶藻弧菌和创伤弧菌的方法,他们将该方法命名为多重实时荧光定量 PCR 技术。2000 年, Notomi 等人率先开发出了环介导等温扩增技术 (LAMP),并由此为 PCR 检测技术升级优化提供了重要助力。在 LAMP

技术加持下, 比色法不再使用仪器, 通过肉眼即可完成结果判断。Scott 等人对相关色素进行了视觉检测分析, 总结了酚红、羟基萘酚蓝、孔雀石绿、无色结晶紫、钙黄绿素和荧光染料等色素特征, 由此提出酚红指示剂的应用最容易进行判断。Kim 等人在报道中提出了一种检测沙门氏菌的方法, 该方法将实时荧光 LAMP 和比色 LAMP 两种技术进行了融合, 可以实现 45 分钟内检测鸡肉样品中的沙门氏菌, 其检测精度可以达到 10CFU/g。

3.3 食源性致病菌 PCR 检测标准研究

标准化建设是实现食品安全保障的重要举措, 在食源性致病菌 PCR 检测标准方面, 我国近年来的发展速度较快, 并且逐步形成了相对完善的标准性检测方法体系。比如 2013 年建立的针对副溶血性弧菌的标准检测方法 GB 4789.7-2013, 2014 年建立的针对空肠弯曲菌的标准检测方法 GB 4789.9-2014, 还有 2016 年建立的分别针对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、致泻大肠埃希氏菌、克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)的标准检测方法 GB 4789.4-2016、GB 4789.10-2016、GB 4789.30-2016、GB 4789.6-2016、GB 4789.40-2016。同时, 我国也提出了大量食源性致病菌快速检测技术相关标准, 以沙门氏菌为例, 其相关检测方法标准有 SN/T 5439.1-2022; SN/T 1870-2016; SN/T 1870-2016; SN/T 4525.1-2016; SN/T 3872-2014; SN/T 2641-2010; SN/T 2651-2010; SN/T 2563-2010; SN/T 2349-2009; SN/T 1869-2007 等, 而涉及的技术领域主要包括 PCR 法、实时荧光 PCR 法、PCR-试纸条法、PCR-DHPLC 法、基因芯片法、分型 MLST 方法、MALDI-TOF-MS 法、MPCR-DHPLC 法等。吴鹏(2024)针对国内外食源性致病菌 PCR 检测标准进行了全面总结, 目前国内相关标准已有 48 项以上, 尤其针对 PCR 快速检测与 ELISA 方法制定了推荐性国家标准, 要求检测时间在 2—4 小时之内, 检测限度应至少达到 102CFU/mL。但是企业生产或市场抽查的食品通常致病菌浓度较低, 因此还需要通过半天到一天左右增菌处理。同时, 我国对食品进出口也提出了严格的检验检疫行业标准, 并针对荧光 PCR、PCR 试纸条、数字 PCR 技术、分型 MLST、基因芯片、环介导等技术提出了明确的要求。国外对于食源性致病菌 PCR 检测标准也有大量研究成果, 其中 IOS、俄

罗斯、印度、英国和德国等相关标准具有更高的研究价值。在 PCR 技术的检测应用标准制定中, 其主要针对定义、检测、定量分析等方面展开。俄罗斯、欧盟以及 IOS 组织制定了相对较为完善的标准体系, 比如欧盟法规(EC)No2073/2005《食品微生物标准》中, 就明确提出了安全、过程卫生、采样等方面的标准, 并提出了 PCR 技术检测的规范流程。

3.4 食源性致病菌二重 PCR 法快速检测研究

二重 PCR 法是 PCR 检测环节的二次循环应用, 而多次循环应用称之为多重 PCR 法。在食源性致病菌快速检测领域, 二重与多重 PCR 法的应用比较普遍, 相关研究成果也较为丰富。蔡军(2014)等人提出了二重 PCR 法快速检测三种食源性致病菌的方法, 分别针对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌属与志贺氏菌属展开实验。在材料与设备选择上, 其实验菌株从 ATCC、CGMCC、CICC 等菌种库进行购买, 主要试剂包括营养肉汤、营养琼脂、Taq 酶、dNTPs、DNA Marker、细菌 DNA 提取试剂盒、TES 缓冲液等, 使用的仪器设备包括 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、冷冻离心机等。其次, 在实验方法中, 主要设计了细菌培养与模板制备、引物设计、单重 PCR 特异性及灵敏度检测、二重 PCR 体系建立及灵敏度检测、二重 PCR 体系检测特异性与稳定性验证等环节。其中特异性引物设计最为关键, 其分别设计了六对引物, 通过每对引物之间的特异性搭配与灵敏度效应, 在组合优化中完善了二重 PCR 的反应体系。最后, 其研究结果中显示, 针对三种食源性致病菌, 该方法可以在 18 小时之内完成检测过程, 检测灵敏度达到 10pg DNA/reaction。司琦、胡文忠(2016)等人则针对单核增生李斯特菌和大肠杆菌两种食源性致病菌建立了双重荧光定量 PCR 检测技术。该实验中, 研究人员分别选择单核增生李斯特菌 Ina 基因和大肠杆菌的 Wzy 基因进行特异性引物设计, 并且规范了该 PCR 反应体系的退火温度、反应条件与引物添加量等实验指标。最终实验证明该方法在两种致病菌检测中具有良好的特异性优势, 其中大肠杆菌的检测最低限度为 1.95×10^{-4} CFU/mL, 单增李斯特菌的检测最低限度为 1.87×10^{-4} CFU/mL。张海霞、孙桂珍(2014)等人则针对食源性致病菌沙门氏菌与奇异变形杆菌提出了二重 PCR 检测方法, 该实验一方面选择了奇异变形杆菌尿素酶合成的正向调节

因子 R 基因 (ureR) 作为特异性引物设计切入点, 另一方面选择了沙门氏菌属侵袭性抗原保守基因 (invA) 设计引物, 同时对反应条件提出了优化建议。通过实验证明, 该方法对于食物中奇异变形杆菌与沙门氏菌的快速诊检和监控具有重要应用价值。

4 概念界定

综上所述, 二重 PCR 法是食源性致病菌快速检测的重要方法, 是维护社会食品安全、建立食品安全检测体系的重要因素。目前国内外相关研究较为丰富, 研究人员陆续提出了关于金黄色葡萄球菌、沙门氏菌属、志贺氏菌属、单核增生李斯特菌、大肠杆菌、奇异变形杆菌等食源性致病菌的二重 PCR 快速检测方法体系, 为食品安全检测人员提供了一定的技术参考。

参考文献

- [1] 王福成. 三种食源性致病菌多重快速检测方法的建立 [D]. 扬州大学, 2024.
- [2] 吴鹏, 孙雅和, 朱旭丽, 等. 食源性致病菌快速检测技术及其标准化应用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(05): 426-437.
- [3] 赵晓蕊, 蔡小雨, 李雪晗, 王玉青, 杨贺均, 闫梦然, 高于学, 巫小慧. 肉制品中食源性致病菌检测技术的研究综述 [J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(12): 263-270.
- [4] 费韵洁, 刘元建, 熊晓辉. 食源性致病菌检测技术的发展及研究现状 [J]. 生物加工过程, 2023, 21(03): 308-325.
- [5] 冯波, 谢文佳, 张晓光, 马爱进, 张捷. 食源性致病菌快速检测技术研究进展 [J]. 食品科技, 2022, 47(11): 290-296.
- [6] 蔡军, 欧静堃, 李慧, 胡梦龙, 傅洋, 刘冬雪. 二重 PCR 法快速检测 3 种食源性致病菌 [J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(09): 2837-2843.