

PCR 技术检测食源性致病菌的研究进展*

徐晓可^{1,2} 吴清平^{1**} 张菊梅¹ 周艳红¹

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070) (广东环凯微生物科技有限公司 广州 510070)

摘要 :食源性致病菌的检测技术是食源性疾病预防与控制的关键环节。PCR 是近年来广泛应用于食源性致病菌快速检测的方法之一。在食源性致病菌中,用于 PCR 检测的靶基因包括各种毒力基因、酶基因及特异性鉴别基因。这些靶基因的发现推动了食源性致病菌 PCR 快速检测的发展。

关键词 :食源性致病菌,PCR,靶基因,检测试剂盒

中图分类号 :Q93 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)05-0970-03

Review of Foodborne Pathogenic Bacteria Detected by PCR*

XU Xiao-Ke^{1,2} WU Qing-Ping^{1**} ZHANG Ju-Mei¹ ZHOU Yan-Hong¹

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

(Guangdong Huankai Microbial Science and Technology Limited Company, Guangzhou 510070)

Abstract :The detections of foodborne bacterial pathogens are the key technological link for the foodborne disease prevention and control. The PCR technology has been introduced for the pathogenic bacteria detections recent years and the many target genes have been found including the genes of various virulence, enzymes and some specific species. These genes are frequently used in the PCR detection and the application of diagnostic kits.

Key words :Foodborne bacterial pathogens,PCR,Target gene,Diagnostic kit

“民以食为天,食以安为本”。食品安全是各国都关注的重大问题,食源性致病菌是影响食品安全的主要原因之一,检测食源性致病菌是食源性疾病预防与控制的关键环节。

传统的检测方法(如分离培养、生化鉴定等)无法对难培养或不可培养的致病菌进行检测,而且存在特异性不高、灵敏度低、操作烦琐耗时,不能实现及时有效的监测。因此,发展新的快速检测与鉴定食源性致病菌的方法为及时有效地控制和预防致病菌传播所必需。近年来,随着 PCR 技术措施的广泛应用,国内外已经将这一技术引入食源性致病菌检测领域。本文就 PCR 在几种常见食源性致病菌检测的应用作一概述。

1 食源性致病菌的 PCR 检测

1.1 沙门氏菌

沙门氏菌属(*Salmonella*)是肠杆菌科中最重要的

的病原菌属,是细菌性食物中毒中发病率最高的一种。据报道,我国细菌性食物中毒中 70%~80% 是由沙门氏菌引起的。目前,用于沙门氏菌 PCR 检测的靶基因包括:*invA*、*invB*、*invC*、*invD*、*invE*、*hilA*、*fimA*、*rfb*、*agfA*、*viaB* 以及与质粒毒力相关的 SPV 基因等。其中 *invA* 基因是毒力岛 SP11 基因之一,是产生致病性的关键因子,它常用来作为 PCR 检测沙门氏菌的靶基因。例如, T Zahraei 等利用 *invA* 基因检测从烤鸡分离的沙门氏菌^[1]。也有一些学者利用 *invA* 基因与其它基因组合对沙门氏菌进行多重 PCR 检测。如 Chiu 等利用基因 *invA* 和 SPVC 建立了一种多重 PCR 体系用于粪便中沙门氏菌的检测^[2]。又如 Karami 等利用 *invA*、*rfbE* 和 *rfbS* 3 个基因建立了一种多重 PCR 体系用于快速检测鼠伤寒沙门氏菌^[3]。

1.2 单核细胞增生李斯特氏菌

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria*

* 广东省科技计划项目(No. 2004A20507004)

** 通讯作者 Tel: 020-87688132, E-mail: wuqp@gdms.ac.cn

收稿日期:2006-12-04,修回日期:2007-01-22

monocytogenes)是食品卫生中的重要病原菌,其主要通过奶及奶制品、蔬菜、水产品、肉制品等食物传播。用于单核细胞增生李斯特氏菌 PCR 检测的特异引物包括两种。一种是依据其特异毒力基因序列设计,另一种是以其 16S rDNA 或 16S/23S rDNA 中间保守区域为靶序列设计。目前用于检测的靶基因主要有 *hlyA*、*iap*、*inlA*、*inlB*、*prfA*、*plcA*、*plcB*、*mpl* 等。在单核细胞增生李斯特氏菌的快速检测中,不少学者开发了多重 PCR 技术。如 Bubert 等根据李斯特氏菌 *iap* 基因属的共性和种的特异性设计引物,利用多重 PCR 来鉴别各种李斯特氏菌^[4]; Bansal 等利用多重 PCR 检测 350 多份食品样品的单核细胞增生李斯特氏菌,检测结果显示没有一例假阳性^[5]。

1.3 金黄色葡萄球菌

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是引发多种类型感染和食物中毒的病原菌,由此菌引起的食物中毒发生频率很高。目前,金黄色葡萄球菌常用的目标基因包括毒素相关基因和特异性鉴别基因^[6]。毒素相关基因包括传统的 *SEA*、*SEB*、*SEC*、*SED* 基因及新发现的肠毒素基因 *SEI*、*SEJ* 等。特异性鉴别基因主要包括 *nuc*、*clfA*、*scpA*、*sspB* 等。鉴于多重 PCR 技术的诸多优点,Sharma 等建立了一种多重 PCR 检测肠毒素 A~E,可在 3h~4h 内检测出毒素基因 A~E,且与标准的免疫检测有近 99% 的对应性^[7]。Mehrotra 等通过两个 PCR 反应体系同时检测了包括肠毒素 SE、TSST-1、Ets、*mecA* 在内的 10 种毒素基因,且效果很好,有很好的应用前景^[8]。

1.4 肠出血性大肠埃希氏菌

肠出血性大肠埃希氏菌(entero-hemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)因引起出血性肠炎而得名,其血清型有 O157:H7、O157:NM、O26:H11、O111:H8 等。EHEC 感染基本上是一种食源性疾病,牛肉、牛奶、奶制品、鸡肉、蔬菜、水果、饮料、水均可成为传播媒介,人与人之间密切接触也可传播 EHEC。EHEC 的致病性与其毒力因子溶血素(hemolysin, hly)、志贺样毒素(Shiga-like toxin, slt)和 eae 因子有关^[9]。目前 PCR 技术检测主要是毒力因子的检测,但这些方法不能综合反应菌株毒力因子的存在。利用两对以上引物扩增两个以上特异性基因序列的多重 PCR 方法,已成为当今分子生物学研究的重要范畴。Fratamico 等根据 *hly*、*slt*、*eae* 基因序列,

设计了 3 对引物,采用多重 PCR 方法检测 EHEC,收到满意效果^[10]。王静等建立了一种快速检测食品中 EHEC 的多重 PCR 方法,除常见的 O157:H7 血清型外,也可检出其它血清型大肠杆菌如 O26:H11、O111:H8 中的 EHEC 菌株。此外,该法还可检测产志贺样毒素的大肠杆菌(VTEC)和粘附性大肠杆菌(EAEC),并能与 EHEC 区分^[11]。

1.5 志贺氏菌

志贺氏菌属(*Shigella*)的细菌(通称痢疾杆菌),是细菌性痢疾的病原菌,志贺氏菌既可通过水,也可通过食物传播腹泻及痢疾等疾病。用于 PCR 检测的相关基因有侵袭相关的 *ial* 基因、*virA* 基因,或者是 *ipaH* 基因。*ial* 和 *virA* 基因都位于大的毒性质粒上,而 *ipaH* 基因同时多拷贝存在于染色体和侵袭性大质粒上,不随传代而丢失,因而从 *ipaH* 设计引物建立的 PCR 方法应该有较高的敏感性,并且可避免因基因突变、质粒丢失而导致的假阴性^[12]。鉴于此,国内外对于此菌的检测主要是利用 *ipaH* 基因。Gaudio 等利用此基因作为靶基因,从而对志贺氏菌进行快速检测^[13]。许龙岩等根据 *ipaH* 基因片段中的开放阅读框部分序列设计一对引物,建立了一种快速检测志贺氏菌的 PCR 检测方法^[14]。

1.6 副溶血性弧菌

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是引起细菌性食物中毒最常见的病原菌之一,与大多数细菌的不同之处在于它是一种嗜盐弧菌,普遍存在于海洋环境,主要来源于鱼、虾、蟹、贝类和海藻等海产品。据报道,有人利用编码副溶血性弧菌耐热的直接溶血毒素的 *tdh* 基因和相对耐热的直接溶血毒素的 *trh* 基因建立 PCR 方法检测副溶血性弧菌,但皆因这两个基因与别的细菌毒素基因有很高的同源性,至今没有一个公认的较好的副溶血性弧菌 PCR 检测方法。Hatsumi 等(1985)发现 *tdh* 基因具有种属特异性,国外学者利用 *tdh* 基因探针监测海产品的副溶血性弧菌,具有快速、灵敏性及特异性好等特点^[15-16]。国内李志峰等也采用 *tdh* 基因来检测副溶血性弧菌^[17]。

2 食源性致病菌 PCR 快速检测试剂盒的开发概况

随着 PCR 技术的广泛应用,由此衍生出了多种方法,如实时荧光定量 PCR、RT-PCR、多重 PCR

等 这些推动了 PCR 试剂盒的发展。现在经常应用的 PCR 试剂盒有常规的 PCR 检测试剂盒、荧光定量 PCR 检测试剂盒等,其基本原理是用 PCR 来快速检测食品中病原菌特异性的靶基因。常规 PCR 是通过检测最终扩增结果而判断是否有足够量靶基因的存在,其判断标准易受样品处理过程、DNA 提取操作、PCR 反应体系等多种因素影响,而荧光定量 PCR 由于其操作系统封闭、自动化程度高,因此可以更有效的即时检测出目标基因拷贝数,假阳性率低。

对于食源性致病菌 PCR 快速检测试剂盒方面,国外目前成功开发出一系列商品试剂盒,如霍乱弧菌、绿脓杆菌、沙门氏菌、弯曲杆菌、志贺氏菌、蜡样芽胞杆菌、病原性大肠埃希氏菌等 PCR 检测试剂盒,部分已经得到 AOAC 认可^[18]。国内在常规的 PCR 检测试剂盒方面,深圳职业技术学院马立农等开发了沙门氏菌 PCR 快速检测试剂盒,能迅速、准确、灵敏、简便地检测出畜产品及其制品、副食品及饮料等食品中的沙门氏菌^[19]。近年来,广东环凯微生物科技公司则针对畜禽肉、水产品和水体等样本,研制开发出食源性致病菌单重和多重 PCR 分子检测试剂盒,显著提高了检测效率。在荧光定量 PCR 检测试剂盒方面,深圳太太基因工程有限公司采用荧光 PCR 技术开发了针对沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠杆菌 O157:H7、空肠弯曲菌、金黄色葡萄球菌、霍乱弧菌等十多种病原菌的快速检测试剂盒,具有快速简单、灵敏度高、特异性强的技术优势。

3 讨论

使用 PCR 方法,可在前增菌和选择性增菌后,用特异性引物对增菌液中的致病菌进行扩增,从而检测样品中是否含有特定致病菌。这种方法的灵敏度高于经典的培养法,而且,PCR 方法可在几小时内出具检测结果,省略了固体培养基的选择性增菌和生化鉴定步骤,大大缩短了检测周期。在检测所需的试剂和人工费用上,PCR 方法也优于培养法。目前,美国 FSIS 等国际官方检测机构已将 PCR 方法作为快速检测方法编写成实验室标准操作程序(SOP)。

虽然,PCR 检测致病菌快速、灵敏、特异,在分析检测食品中污染的病原菌方面具有很大的优势,但是在检测过程中必须注意到:检测的食品是包含多种物质的复合体,必须考虑到食品中各种影响因

子的作用,防止出现假阳性或假阴性。对于假阳性问题,通常在实际食品检测工作中,PCR 检测技术可作为大通量的快速检测技术,对其中出现的极少数的阳性样品,可采用传统的方法加以印证。另一方面,样品中的致病菌含量通常较低以及存在大量的 PCR 抑制物,这些都严重影响了 PCR 扩增的效果和结果,导致出现假阴性结果。因此,寻找有效的样本前处理方法,富集样本中的致病菌,去除样本中存在的 PCR 抑制剂,建立方便、实用的食源性致病菌 PCR 分子检测试剂盒,可以极大地提高我国食源性致病菌的检测水平和食源性致病菌 PCR 检测方法的实用性。目前,分子生物学方法是食源性致病菌检测方法的主要发展方向,而将多重 PCR 或生物芯片技术与荧光探针定量技术相结合,可使致病菌的检测逐步向灵敏度高、特异性强、重复性好、简易、经济的方向不断发展。

参考文献

- [1] Zahraei Salehi I T, Mahzounieh M, Saeedzadeh A. *International Journal of Poultry Science* 2005 **4**(8): 557 ~ 559.
- [2] Chiu C H, Jonathan T O. *J Clin Microbiol*, 1996 **34**(4): 2619 ~ 2622.
- [3] Karami A, Ahmadi Z, Safiri Z, et al. *Saudi Med J* 2006 **27**(8): 1134 ~ 1138.
- [4] Hubert A, Koehler S, Goebel W. *Appl Environ Microbiol*, 1999 **65**: 4688 ~ 4692.
- [5] Bansal M, McDonell F H Y, Smith A, et al. *Int J Food Microbiol*, 1996 **33**: 293 ~ 300.
- [6] 姜延龙, 张宇, 田波, 等. *食品科学* 2006 **27**(5): 265 ~ 269.
- [7] Sharma N K, Rees C E, Dodd C E. *Appl Environ Microbiol* 2000 **66**(4): 1347 ~ 1353.
- [8] Mehrotra M, Wang G, Johnson W M. *J Clin Microbiol* 2000 **38**(3): 1032 ~ 1032.
- [9] 方玉强. *国外医学微生物学分册*, 1998 **21**(3): 28 ~ 29.
- [10] Fratamico P M, Sackitey S K, Wiedmann M, et al. *J Clin Microbiol*, 1995 **33**: 2188 ~ 2191.
- [11] 王静, 杨瑞馥, 郭兆彪, 等. *卫生研究* 2001 **30**(5): 310 ~ 312.
- [12] Venkatesan M M, Buysse J M, Kopecko D Y. *J Clin Microbiol* 1989 **27**: 2671 ~ 2691.
- [13] Gaudio P A, Sethabutr O M, Echeverria P, et al. *J Infect Dis* 1997 **176**: 1013 ~ 1018.
- [14] 许龙岩, 李志勇, 王志强, 等. *检疫科学* 2003 **13**(5): 28 ~ 29.
- [15] Ellison R K, Malnati E, Depalao A, et al. *J Food Prot* 2001 **64**(50): 682.
- [16] McCarthy S A, Depalao A, Cook D W, et al. *Lett Appl Microbiol*, 1999 **28**(1): 66.
- [17] 李志峰, 聂军, 陈义忠, 等. *解放军预防医学杂志* 2004 **22**(6): 443 ~ 444.
- [18] 李志勇, 王菊芳. *检验检疫科学* 2005 **15**: 129 ~ 132.
- [19] 马立农, 刘华伟, 张春柳, 等. *深圳职业技术学院学报* 2005 **2**: 95 ~ 96.