

食源性人兽共患病病原活菌 检测技术研究进展

凌 南, 范缪钰, 任建鸾, 曾德新, 薛 峰, 戴建君
(南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

摘 要: 食源性人兽共患病已成为威胁人类健康、食品安全和畜牧业发展的重要因素, 因此发展快速、准确、高效的人兽共患病病原活菌检测技术非常必要。目前已有多种针对活菌的检测方法。本文比较分析了目前正在使用或开发的人兽共患病病原活菌检测技术。同时, 利用 PMA-qPCR 检测技术, 进行了副溶血性弧菌检测效果验证, 认为该检测技术兼具检测速度快、灵敏度高、特异性强、成本低等优点, 作为一种新型的活菌快速检测技术, 具有广阔的应用前景。另外, 一种新型的铂化合物检测技术也被证明可用于活菌检测。

关键词: 食源性人兽共患病; 病原; 活菌; 检测技术

中图分类号: S855.1; R155.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X (2018) 10-0068-06

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.10.019

Research Progress on Detection Technologies of Food-borne Zoonotic Diseases

Ling Nan, Fan Liaoyu, Ren Jianluan, Zeng Dexin, Xue Feng, Dai Jianjun
(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: At present, food-borne zoonotic diseases have become an important factor threatening human health, food safety and animal husbandry development. Therefore, it is necessary to develop rapid, accurate and efficient detection methods for zoonotic pathogens. There are a variety of methods in live bacteria detection. In this paper, the detection technologies currently used or being in development were compared and analyzed, then PMA-qPCR method was used to detect vibrio parahaemolyticus, and results showed the method had advantages of rapid detection, high sensitivity, strong specificity and it had low cost. As a new kind of detection technology, PMA-qPCR method has broad application prospects. Besides, it was proved that a new kind of platinum compound detection technology could be used in detection of live bacteria.

Key words: food-borne zoonoses; pathogen; live bacteria; detection technology

世界动物卫生组织 (OIE) 定义的食源性人兽共患病是指通过食物在动物与人之间传播的感染和疾病。2016 年世界卫生组织 (WHO) 发布的一份报告称, 每年至少有 6 亿人, 即全球 1/10 人口, 因污染食物而患病, 其中 42 万人死亡, 多为儿童、青少年; 尽管 5 岁以下儿童仅占全球人口的 9%, 但他们却占食源性疾病死亡人数的 30% 左右^[1-2]。

基金项目: 江苏省大学生创新训练计划项目 (201810307061X); 江苏省农业自主创新资金资助项目 (CX (18) 2011)

同等贡献作者: 凌南, 范缪钰

通信作者: 薛峰

食源性细菌是食源性人兽共患病的主要病原, 主要宿主是动物, 其引发的重大动物传染病严重影响了动物源性食品安全与兽医公共卫生, 因此如何快速检测病原对保障畜牧业发展和人类健康具有十分重要的意义。活细菌拥有毒力及致病性, 可对机体造成伤害, 所以检测病原菌的关键是区分活死菌以及致病和非致病菌^[3]。对活菌的判定指标主要为: 是否可培养, 是否能新陈代谢从而形成产物, 是否有完整的细胞膜。以下针对食源性人兽共患病的活菌检测技术进行概括, 并选择实用性较强的 PMA-

qPCR 检测方法进行验证。

1 活菌培养检测技术

培养法是指在人为控制条件下,为特定微生物创造适宜的生长繁殖条件,从而达到特异性分离某种微生物的方法,被广泛应用于食品中的病原菌检测,是目前使用最广泛,也是最经典的一种检测手段。现行食品安全国家标准中的细菌检测大多采用培养法,如沙门氏菌(GB 4789.4)、单增李斯特氏杆菌(GB 4789.30)、溶血性链球菌(GB 4789.11)、副溶血性弧菌(GB 4789.7)等的检测。培养法主要包括增菌、选择性培养分离、生化鉴定等步骤,具有检测灵敏度高、特异性强等优点。培养法以得到活菌样本为判定依据,具有极高的可信度,这也是其被广泛应用于食源性人兽共患病病原检测的重要原因。

然而,培养法周期长,一般要4~5 d,有的甚者达到7 d;而且过程繁琐,对检测人员要求较高,检测结果受人为因素影响大,在挑选可疑菌落环节易造成检测结果不一致,甚者造成假阴性。周期长、过程繁琐的检测技术已经不适用于当前的社会发展形势,不仅阻滞了食品流通,也会影响食品品质,从而造成巨大经济损失。此外,培养法的检测范围有限,在低浓度水平下,对许多微生物的分离和鉴定都很困难^[3]。某些细菌,如大肠杆菌、李斯特菌、绿脓杆菌等,可能会进入到一个“活的但不可培养”(VBNC)状态,这种情况下更无法进行细菌培养。

2 活菌新陈代谢产物检测技术

2.1 免疫学活菌检测技术

免疫学活菌检测技术是根据抗原抗体反应设计的活菌检测方法。该方法是检测机体产生的抗原、抗体、免疫细胞、细胞因子等。林赛君^[4]利用酶联免疫 MINI-VIDAS 法,检测单核增生李斯特菌的准确度为99.6%,高于国标法的99.2%。免疫学技术具有敏感性高、准确性高、检测速度快等优点。但其假阳性率高,不能准确进行活菌定量检测;单克隆抗体的制备较困难,容易产生交叉反应,存在抗体与非抗原物质之间的非特异性反应;灵敏度较低,需要经过必需的富集步骤。因此,在实际操作

中,免疫学活菌检测技术常常和其他技术联合使用。

2.2 mRNA 法

该方法利用逆转录酶对提取的RNA进行逆转录PCR,其原理是利用细菌转录物对胞内和胞外RNase降解敏感。mRNA水平在细胞死亡后快速下降,所以mRNA只存在于活细胞内,如大肠杆菌O157:H7的RT-PCR测定^[5]。但该方法存在一定缺陷:首先在逆转录PCR过程中,由于mRNA残留的存在,会污染大量死亡细菌($10^4\sim 10^7$ 个/mL),从而产生假阳性结果;其次细胞中的RNA丰度和稳定性不均一,并且存在一些RNA分子,其在丧失活力后也可以在细胞中持续存在较长时间;最后RNA容易降解,处理RNA需要的技术含量偏高。因此,该方法不太符合快速、简便检测的要求,仅适合于科研领域。

2.3 ATP 生物发光法

ATP是活细胞中含量相对稳定的一种代谢物,其生物半衰期较短,当细菌生长抑制或死亡后,菌体细胞内的ATP含量会明显下降或消失,因此ATP依赖性的萤火虫发光素酶(Firefly luciferase)催化萤火虫发光素(Firefly luciferin)氧化发光反应可作为活菌的检测标志。利用反应发光强度和ATP呈正比的特性,可以得出样品中的细菌数目。虽然该方法需要的试剂和实验器材简单并且检测快速,但灵敏度较低,测定极限为 1×10^{-13} mol,约 1×10^4 CFU活菌数^[6]。同时,ATP生物发光法不能区分微生物ATP与非微生物ATP,并且样品本身、ATP提取剂等含有离子。这些离子又会对ATP的测定造成干扰,抑制发光。因此,生物发光法只局限于总细菌数量的检测,不能用于区分致病菌与非致病菌,这在很大程度上限制了生物发光法的普及应用。

2.4 指示剂法

细菌在代谢过程中产生的一些代谢产物能够还原一些指示剂并使之变色,因而可通过颜色变化来判定待检样品中的细菌活性。该方法常用的指示剂主要有CTC、INT和刃天青盐。无菌时指示剂颜色为母液颜色,而当有菌落时,指示液会被还原成红色或者粉红。Schaule等^[7]将CTC偶联荧

光显微镜技术应用于饮水和生物膜中活菌的检测，证明该偶联技术可对活菌进行定量检测。但是该方法使用的指示剂无法对细菌进行特异性染色，而且 CTC 存在一定的毒性，从而影响细菌的生长代谢。

2.5 生物传感器

生物传感器是对生物物质敏感并能将其浓度转换为电信号的检测仪器。Nanduri 等^[8]应用生物传感器检测单核细胞增生李斯菌，检测限为 2×10^6 CFU/mL。生物传感器具有稳定性好、选择性强、灵敏度高、成本低等优点，能在复杂体系中进行快速连续检测。不同类型的生物传感器具有各自独特的优点，但又存在各自的局限性。生物传感器本身不能鉴定菌种，常常需要和其他的检测方法联合使用，为此基于免疫原理的生物传感器成为当前的研究热点。

2.6 噬菌体识别检测技术

噬菌体是一种能够侵入细菌并在宿主细菌体内进行增殖的病毒，具有拮抗细菌、裂解细菌的特性。噬菌体检测技术的原理是利用噬菌体表达外源基因，将待选的基因片段定向插入噬菌体衣壳蛋白基因，通过亲和富集法，筛选特异的蛋白质或多肽的噬菌体，从而识别生物毒素、细菌、孢子和病毒的抗体等。基于噬菌体开发的检测技术具有能区分活死菌的优点。Favrin 等^[9]将该免疫磁性分离噬菌体扩增法用于肉汤中肠道沙门氏菌的检测，发现检出限达 10^4 CFU/mL。但由于噬菌体的一般宿主谱较窄，往往只对细菌某种血清型或分离株有特异性。

3 细胞膜完整性检测技术

3.1 流式细胞术

流式细胞术 (Flow cytometry, FCM) 是在流式细胞仪基础上，对处于快速直线流动状态，且逐个通过光束的单个细胞或其他生物粒子进行定量分析和分选的检测手段。该技术能高速分析上万个细胞，并能同时测量细胞的物理或化学性质。李影等^[10]将流式细胞仪和荧光染色相联合，对大肠杆菌的不可培养状态进行试验，发现当可培养菌数降为零时，与正常状态细菌相比，诱导后菌株多数仍为呈现绿色荧光的活菌，活菌数远远超过死菌

数，并且菌体形态多样，每份样品中至少存在两种不同“颗粒”，结合荧光图像可以确知杆状、球状或球杆状菌体。由此表明，试验菌株在可培养数为零时就已进入了 VBNC 状态。流式细胞术和荧光染色的联合运用可客观评价细菌的活性状态，能较准确分析出活死菌的数量或两者数量的比例关系，但也存在一定缺陷。该方法虽能如实反映某一微生物区系中的细菌总数、存活状态，以及活死细胞数量关系等，但却无法鉴定和识别某一具体的微生物，尤其是处于 VBNC 状态的细菌。此外，流式细胞仪分析样品所需的荧光染料较多，剂量较大，价格昂贵，不适于大批量样品检测。

3.2 PMA/EMP-qPCR

该方法利用 qPCR 和生物染料 PMA/EMA 的结合，实现了检测活死菌的目的。PMA/EMA 与 DNA 结合的作用机制尚未完全阐明，可能是以下因素综合作用的结果：(1) PMA/EMA 不能通透细胞膜，只能选择性地修饰死细胞“暴露”的 DNA (细胞壁和细胞膜已破损的细胞)；(2) 一旦进入细胞内，染料插入核酸中，在暴露于强可见光下，染料上的叠氮基团生成高反应性的 Nitrene 基，很容易在结合部位与碳氢化合物结合生成稳定牢固的共价氮碳键，从而形成稳定的 DNA 修饰；(3) 该修饰强烈抑制 PCR 中的连续 DNA 扩增。因此，通过这种机制，EMA 或 PMA 可以将死细胞优选地嵌入 DNA 并防止死细胞随后的 DNA 通过 PCR 扩增 (图 1)^[11]。而当 PMA/EMA 等核酸染料在强光作用下，同 DNA 偶联结合，强光也会促使多余的核酸染料同水分子结合。剩余的羟胺

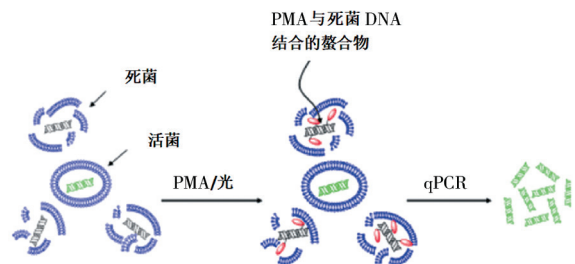


图 1 利用 PMA 染料选择性检测活菌的原理
(源自 <https://biotium.com/product/pmatm-dye-20mm-in-h2o/>)

(Hydroxylamine) 不具有活性, 因此完整细胞内的 DNA 在提取过程中不会受到核酸染料影响。经过核酸染料的鉴别, 后续的 PCR 能特异性扩增, 实现有效鉴别活菌的目的。

PMA/EMA -PCR 检测已被用于检测食源性人兽共患病病原^[12-14]。Andreas 等^[15]利用 EMA 对细菌进行预处理后, 分别用微阵列技术和 qPCR 技术检测活菌数, 并对二者结果进行比较, 发现两种方法都可以有效检测出样本中的活菌含量, 结果高度一致。

4 PMA-qPCR 活菌检测技术验证

4.1 生物染料选择

PMA 为荧光染料 PI 的结构类似物, 用于活菌检测时与 EMA 的作用原理相似, 但是二者穿透细胞的能力有较大区别。尽管 EMA/PMA 作用机制相同, 但相对来说, EMA 在信号抑制方面比 PMA 效果好, 而 PMA 在判断活死菌的准确性上比 EMA 效果好。研究表明, EMA 可穿透具有完整膜的细胞^[16-17]。完整细胞摄取 EMA 的程度主要取决于细菌种类。这个问题对 EMA 的使用造成了严重限制。因此, 对 EMA 的替代物 PMA 进行了研究^[16]。研究表明, 与 EMA 相反, PMA 被有效地从具有完整细胞膜的细胞排除, 这可能是由于正电荷的增加。它适用于广泛的革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌, 因此选择 PMA 作为生物染料, 构建 PMA-qPCR 检测方法。

4.2 PMA-qPCR 在副溶血性弧菌检测中的应用

根据实验室的研究基础, 建立针对副溶血弧菌 PMA-qPCR 活菌检测技术, 选择 *toxR* 作为目的基因, 设计引物及探针 (表 1)。

表 1 以 *toxR* 为靶基因的 PMA-qPCR 探针引物

基因	引物序列 (5'-3')
AB029915.1 <i>toxR</i>	-F 5'-CTTGCTCAAAGGTTTACC -3'
	-R 5'-GCCAACATCAGGAGTATA -3'
	-P 5'-FAM-TAGTAATTCGCTCGCTGACC
	AACA-TAMRA -3'

为了验证 PMA 的效果, 设计了 4 组试验, 分别是活菌 (PMA)、活菌 (W/O PMA)、死菌 (PMA)、死菌 (W/O PMA), 细菌浓度为

5×10^6 CFU/mL, 死菌用 80 °C 处理。DNA 用试剂盒 (TIANamp Bacteria DNA Kit, DP302, TIANGEN) 提取。W/O PMA 组提取 DNA 后直接进行 qPCR, PMA 组用 PMA 处理, 终浓度为 10 μ g/mL, 充分混匀后在黑暗中处理 3 min, 再将菌液放置 BLU-V system (QIAGEN) 中在 60 光照强度下处理 2 min, 使 PMA 和 DNA 充分结合, 再进行 qPCR。可以看到浓度为 5.0×10^6 CFU/mL 时, PMA 能够充分抑制死菌的扩增, 从而区分活菌和死菌 (图 2)。

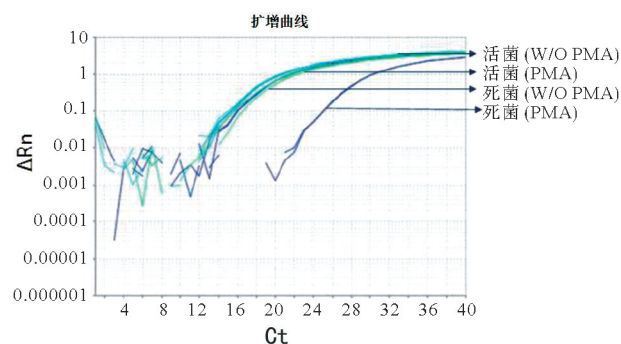


图 2 活菌和死菌的 qPCR 扩增

试验数据表明, 将 PMA-qPCR 结合, 实现副溶血性弧菌活菌的快速检测是可行的。在实际样品检测中可减少假阳率, 所以将 PMA 应用于副溶血性弧菌的快速检测具有很好的应用前景, 针对不同食品基质中副溶血性弧菌的检测也有待于学者的进一步研究。近年来新型的 LAMP 环介导等温扩增技术与 PMA 结合降低了对试验器材的要求, 虽然灵敏度略低于 PMA-qPCR, 但更简单、经济, 特别适合资源有限的机构对病原体检测的需要, 商品化潜力更大。

5 小结

传统培养法作为经典方法仍是目前食源性人兽共患病病原检测的主要手段, 但因其检测周期长, 与食品的高效流通产生了矛盾。以检测新陈代谢产物为标准的活菌检测技术虽然具有检测速度快的优点, 但却存在假阳性率高、检测灵敏度低、操作技术要求高等弊端, 仅适用于小范围或某些特殊菌体的高效快速检测。

目前以细胞膜完整性检测为标准的活菌检测

技术主要有流式细胞术和 EMA/PMA-qPCR 检测技术。它们同样具有检测速度快的优点。流式细胞术虽能快速区分活死菌,但其需要大型仪器且检测费用高,不具备区分菌种的功能,显然也不适用于常规食品的病原菌检测。PMA/EMA-qPCR 检测技术是建立在 PCR 技术基础之上的,兼具检测速度快、灵敏度高、特异性强、成本低等众多优点。PMA/EMA 作为生物染料能巧妙排除死菌对 PCR 扩增的干扰,从而实现通过 PCR 技术快速检测活菌的目的。目前该技术已被众多学者应用于各种食源性人兽共患病病原活菌的快速检测研究,其实际效果也得到了多数学者的肯定^[12-16]。当然,也有学者指出 PMA/EMA 存在缺陷:PMA/EMA 处理时的强光照射会对菌体造成杀伤;当 PCR 或 qPCR 的目的片段过短时,易造成 PMA/EMA 同目的片段结合疏漏,从而导致 PMA/EMA 对死菌 DNA 抑制不完全;菌液浓度过高或特殊的成团菌体形态会影响 PMA/EMA 的穿透力,从而影响 PMA 处理效果^[17-19]。但这些缺点并非不能解决,对于强光引起高温杀伤,可以在 PMA 处理中用冰浴对菌液降温;对于小目的片段的影响,可以设计特异性强的引物或设计巢式 PCR;对于菌液浓度及特殊菌体形态的影响,可以通过稀释及滤膜过滤分解成团菌体。另外,对于浓度过低或复杂基质的情况,可以通过磁珠富集优化;对于部分革兰氏阳性菌细胞膜成分复杂的情况,可以用月桂基巯基乙酸(Sodium lauroyl sarcosinate)来增加 PMA 对死菌细胞膜的通透性^[20-23]。在众多学者的研究基础之上,本实验室以副溶血性弧菌活菌为检测对象,对 PMA-qPCR 的活菌检测效果进行了验证,试验数据表明,PMA 的处理可以有效抑制浓度高达 5.0×10^6 CFU/mL 的死菌,却不影响活菌检出。可见,PMA-qPCR 用于食源性人兽共患活菌的快速检测是可行的,其作为一种新型的活菌快检手段,具有广阔的应用前景。

此外,一种新型的铂化合物也被证明可用于活菌检测。铂化合物主要用作有机化学中的催化剂,部分用作抗癌药物,能有效穿透死菌,并与染色体 DNA 螯合。相比 PMA/EMA,对可见光不太敏感

的铂化合物不需要光激发,而且价格低廉,可以代替 EMA/PMA 使用^[16, 18, 24],在比较苛刻的试验环境下,如在典型实验室(自然或者电灯实验环境下)可以直接添加铂化合物进行区分活死菌。然而,对该化合物的研究仅有少数报道,EMA/PMA-qPCR 在食源性人兽共患病原菌活菌检测技术中的广泛应用以及铂化合物在该检测体系中的应用都有待于广大学者进一步研究。

参考文献:

- [1] 科信食品与营养信息交流中心. 全球每年有 6 亿人口遭遇食源性疾病 [N]. 中国医药报, 2016-01-07 (005).
- [2] 全华. 全球食源性疾病死亡人数: 五岁以下儿童占近三分之一 [N]. 医学参考报, 2015-12-17 (G08).
- [3] SIDHU J P, TOZE S G. Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review[J]. Environment international.2009, 35 (1): 187-201.
- [4] 林赛君. 三种食源性致病菌酶联免疫荧光法的分析研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2007.
- [5] JU W, MOYNE A L, MARCO M L. RNA-Based detection does not accurately enumerate living Escherichia coli O157:H7 cells on plants[J]. Frontiers in microbiology.2016, 7: 223.
- [6] YAMAZAHI T, SATO N, YAMASHITA K, et al. Antimicrobial susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis by the bioluminescence assay of Mycobacterial ATP using filamentous cell treatment[J]. Rinsho byori the Japanese journal of clinical pathology, 2000, 48 (2): 167-173.
- [7] 郭小玲, 黄丽, 李红, 许瑞. 活性菌检测方法研究进展 [J]. 当代畜牧, 2017 (29): 12-13.
- [8] NANDURI V, BHUNIA A K, TU SHU I, et al. SPR biosensor for the detection of L.monocytogenes using phage-displayed antibody[J]. Biosensors and bioelectronics, 2007, 23 (2): 248-252.
- [9] FAVRIN S J, JASSIM S A, GRIFFITHS M W. Development and optimization of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for detection of Salmonella enterica serovar Enteritidis in broth[J]. Applied and environmental microbiology, 2001, 67 (1): 217-224.
- [10] 李影, 王伟利, 段冶, 等. 流式细胞仪检测活的非可培养状态大肠杆菌 [J]. 中国动物检疫, 2009, 26 (12): 34-36.
- [11] ZENG D, CHEN Z, JIANG Y, et al. Advances

- and challenges in viability detection of foodborne pathogens[J]. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7 (22): 1833.
- [12] JOSEFSEN M H, LOFSTROM C, HANSEN T B, et al. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2010, 76: 5097-5104.
- [13] LI B, CHEN J Q. Real-time PCR methodology for selective detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 cells by targeting Z3276 as a genetic marker[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2012, 78: 5297-5304.
- [14] LAW J W F, ABMUTALIB N S, CHAN K G, et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations[J]. *Frontiers in microbiology*, 2015, 5: 770.
- [15] ANDREAS N, ALBERTO M, LUKE M, et al. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology[J]. *Journal of microbiological methods*, 2009, 76 (3): 253-261.
- [16] NOCKER A, CHEUNG C Y, CAMPER A K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells[J]. *Journal of microbiological methods*, 2006, 67: 310-320.
- [17] FLEKNA G, STEFANIC P, WAGNER M, et al. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/ real-time PCR[J]. *Research in microbiology*, 2007, 158 (5): 405-412.
- [18] SOEJIMA T, IIDA K, QIN T, et al. Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria[J]. *Microbiology and immunology*, 2007, 51 (8): 763-775.
- [19] SOEJIMA T, IIDA K, QIN T, et al. Method to detect only live bacteria during PCR amplification[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2008, 46 (7): 2305-2313.
- [20] SOEJIMA T, SCHLITT D F. Method and kit for detection of microorganism: 10802360.7[P/OL]. 2012-05-30[2018-08-25]. <https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=EP&NR=2458002&KC=&FT=E#>.
- [21] MINAMI J I, SOEJIMA T, YAESHIMA T, et al. Direct real-time PCR with ethidium monoazide: A method for the rapid detection of viable *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula[J]. *Journal of food protection*, 2012, 75: 1572-1579.
- [22] MINAMI J, YOSHIDA K, SOEJIMA T, et al. New approach to use ethidium bromide monoazide as an analytical tool[J]. *Journal of applied microbiology*. 2010, 109: 900-909.
- [23] 邱杨, 田聪, 余以刚, 等. 食源性致病菌活菌检测技术研究进展[J]. *中国动物检疫*, 2011, 28 (10): 63-65.
- [24] RUDI K, MOEN B, DROMTORP S M, et al. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71: 1018-1024.

(责任编辑: 侯文婷)