

沙门氏菌的危害及其快速检测方法的研究进展ⁱ

摘要:沙门氏菌是一种常见的重要人兽共患病原菌,介绍了其病原学、分类、危害及原因以及目前国内外对沙门氏菌检测方法的最新进展,主要包括:以抗体为基础的快速检测方法、以核酸为基础的快速检测方法、PCR-ELISA 技术,并把它们和传统检测方法进行了比较。

关键词:沙门氏菌;检测;ELISA;PCR

中图分类号:S854.4+3;S855.1 文献标识码:B 文章编号:1007-273X(2010)01-0010-03

随着近年来世界范围内的食品安全恶性事件屡屡发生,食品污染与食源性疾病构成了一个巨大且不断扩大的世界性公共卫生问题,直接关系到人们的身体健康和社会稳定,并且正成为阻碍国际食品贸易发展的重要因素。由于传统感染源普遍存在,新感染源不断出现以及食品工业过程复杂化、人们饮食习惯的改变、人口流动性增加等因素,使感染的流行模式发生明显变化,表现为食物中毒通常迅速大面积暴发,给人类的食品安全和健康带来威胁,同时也给食源性疾病的控制和预防带来新的挑战[1]。在各种畜产品中,细菌性食物中毒最为常见,而由沙门氏菌引起的食物中毒病例在食物中毒中居于前列。动物性产品中含有多种丰富的营养成分,非常适宜于沙门氏菌的生长繁殖,人们一旦摄入了含有大量沙门氏菌的动物性产品,就会引起细菌性感染,进而在毒素的作用下发生食物中毒。沙门氏菌不仅危害人类健康还会给畜牧业带来巨大经济损失。因此加强畜产品卫生安全,防止沙门氏菌污染,不仅是发展畜牧业的需要,也是减少人类沙门氏菌食物中毒,保护人民群众身体健康的重要措施。了解沙门氏菌的概况,有助于对其检测,从而保证畜产品的质量,有利于畜牧业的发展和人的健康。

1 病原学

沙门氏菌属肠杆菌科,为革兰氏染色阴性杆菌,绝大多数有鞭毛并能运动。菌体溶解时,其细胞壁所含的脂多糖释放出来,形成内毒素[2]。已证实,一些沙门氏菌含有携带耐药因子的遗传质粒(质粒是染色体外的遗传物质,易于从一细胞向另一细胞传递)。耐药因子传递的对多种抗生素的耐药性,可在敏感的细菌中散播,给治疗沙门氏菌感染造成困难。

沙门氏菌广泛存在于自然界,在温度 7~45℃的条件下均可生长,以 35~37℃最为适宜,但对高热、直接阳光照射及常用消毒药均敏感,60℃时 15min 可将其杀灭[2]

2 分类

沙门氏菌的正式分类和命名始于 1934 年,主要有两种分类系统,即尤因的分类和考夫曼—怀特的分类。按照考夫曼—怀特的分类,已确认的沙门氏菌属有 2 000 多个血清型,根据沙门氏菌抗原结构的不同,可分为 A、B、C、D、E.....等 34 个组。引起人类疾病的绝大多数属于 A~E 组。其中主要有猪霍乱沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鸡沙门氏菌、鸭沙门氏菌等 10 多个血清型。沙门氏菌依据其对宿主的感染范围可分为宿主适应血清型和非宿主适应血清型两大类。前者除对其适应的宿主有致病性外,很少使其他宿主发病。如马流产沙门氏菌、羊流产沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、鸡沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌;后者则对多种宿主有致病性,如鸭沙门氏菌、纽波特沙门氏菌、田纳西沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌等。

3 沙门氏菌的危害

沙门氏菌不仅危害人类健康,还会给畜牧业带来巨大经济损失。由沙门氏菌引起的疾病主要分为两大类:一类是伤寒和副伤寒,另一类是急性肠胃炎。如鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌等污染动物性产品,进而引起人类沙门氏菌食物中毒的主要致病菌。沙门氏菌污染主要来源于患病的人和动物及其带菌者,主要由其粪便、尿、乳汁以及流产胎儿、胎衣和羊水排出的病菌污染水源、土壤和饲料等,其中饲料和水源的污染是导致沙门氏菌传染的主要原因。畜禽感染沙门氏菌可引起相应的传染病,如猪霍乱、鸡白痢等。一般情况下畜禽肠道带菌率比较高,当动物因患病、衰弱、营养不良、疲劳以致抵抗力降低时,肠道中的沙门氏菌即可经肠系膜淋巴结和组织进入血液引起全身感染,甚至死亡。例如,猪霍乱沙门氏菌可引起仔猪副伤寒,急性病例出现败血症变化,死亡率相当高。慢性病例产生坏死性肠炎,影响猪的生长发育。鸡白痢沙门氏菌,主要侵害雏鸡,引起败血症,可造成大批死亡。在成年母鸡则主要引起卵巢炎,可在卵黄内带菌而传给幼雏。沙门氏菌引起的食物中毒一般在 5~10 月份最易发生。人食用沙门氏菌污染的食物后,一般 8~24h 后发病,潜伏期最短 2h,长者可达 72h。主要有三种表现类型,即胃肠炎型、伤寒型、败血症型。以胃肠炎型最为常见[2]。

3.1 胃肠炎型

多在食用被污染的食物 8~24h 后发病,主要表现为发热、恶心、呕吐、腹胀等,随后出现腹泻。腹泻特点是 1d 为数次至 20 次不等,黄绿色稀水便、带有恶臭,便中有不消化食物、黏液,偶尔有脓血。一般中等发热,可伴有畏寒。健康的成年人,症状持续 2~5d 后可恢复,而年老体弱者则可持续较长时间。呕吐、腹泻严重者,则可发生严重脱水。极少数严重患者有呈霍乱样暴发性胃肠炎,因剧烈呕吐、腹泻而脱水,电解质紊乱,很快会出现尿少、尿闭等等。严重者,特别是儿童、老年人和体弱者常因脱水、酸中毒、无尿、心力衰竭等,急救不及时而危及生命。

3.2 伤寒型

多由猪霍乱沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌等引起,出现类似于伤寒的表现。不同于伤寒的是病情较轻,病程相对短,一般为 1~3 周;虽腹泻明显,但很少并发肠出血和肠穿孔。

3.3 败血症型

多发生于儿童或原有慢性疾病的成年人。各种沙门氏菌均可引起,但猪霍乱沙门氏菌经口进入后,早期即侵入血流,而肠道常无病变。起病通常急骤,病人有高热、畏寒、出汗、乏力等表现,持续数天、1 周或更长时间。部分患者可出现肠道外部位的局灶性感染,如关节炎、骨髓炎、脑膜炎、肾盂肾炎等。

4 检测方法概述

自 19 世纪后期沙门氏菌首次被鉴定为人类的一种病原菌以来,检测方法学都是建立在采取感染病人的粪便或血液作为临床标本的基础上。此后的 60 年间,用于从食品中分离沙门氏菌的方法实质上与那些用于临床标本的方法是相同的,此后人们建立了一种简单的微生物增殖步骤,一般都要经过五个步骤:(1)前增菌;(2)选择性增菌;(3)选择性平板分离;(4)生化鉴定;(5)血清学鉴定。需时共约 4~7d,虽然这种方法特异性较好,但费力、耗时。随着免疫学和分子生物学技术的发展,近 10~15 年间发展了很多改进方法,其中许多可在 48h 内检出沙门氏菌,即我们所说的“快速检测”[3]。现将国内外有关的沙门氏菌快速检测方法介绍如下。

4.1 以抗体为基础的快速检测方法

已建立的沙门氏菌免疫学检测方法有许多种,大致可分为酶标抗体(ELISA)、荧光抗体染色(免疫荧光法)[4]、同位素标记抗体(放射免疫)[5]为基础的方法及其他多种以抗体为基础,利用乳胶凝集、免疫传感器、免疫扩散及免疫色谱技术的方法。但最广泛应用的是以双位点 ELISA 技术即夹心 ELISA 为基础的方法。黎兆滚等人首次在国内口岸系统应用微量板 ELISA 法对进出口动物产品(鱼粉、肉骨粉等)进行沙门氏菌检测[3]。该法采用预先包被了沙门氏菌(A-E 群)单克隆抗体的微量板,加入经增菌处理的样品,反应后再加入一定的指示剂,作用完毕后用酶标仪测定 OD 值来判定结果。此法的样品制备过程需要 24h,检测本身需要 2h(30min 是操作时间,90min 是孵育时间)。国外很多已商业化的试剂盒也是以免疫学为基础的[6]。例如美国 Biocontrol 公司的 VIP 免疫扩散试剂条,即以夹心型免疫色谱反应为基础。反应固相包括一块用“沙门氏菌抗体—染料”偶合物浸透的染料衬垫和一张薄膜条。抗沙门氏菌抗体就固定在薄膜的反应区上,增菌后液体加到反应小孔内令其吸收,若样品中存在沙门氏菌抗原,即会与偶合物作用,依次迁移到膜上,与固定在膜上反应区的抗体结合,在反应窗上呈现一条色带。最后结果可在 5~7min 内读取。再如澳大利亚的 Tecra 系列也是基于夹心 ELISA 基础上的快速检测食品中沙门氏菌的试剂盒。包括前增菌和检测总需时间约 24h。而美国的 VIDAS 则是基于酶联荧光免疫分析基础上的自动化分析系统。美国 Biocontrol 公司的 I-2Test 是一种快速定性检测运动性沙

门氏菌的试剂盒,14~30h 即可看出免疫条带(阳性)。自动酶标检测仪是用酶荧光分析技术通过固相吸附器,用已知抗体来捕捉目标生物体,然后以带荧光的酶联抗体再次结合,经充分冲洗后,通过激发光源检测,即能读出发光的阳性标本。其优点是检测灵敏度高,无传染性,检测速度快[7]。自动酶标检测仪灵敏度高,特异性强,可避免人为因素造成的假阴性,且能在短时间内快速筛去大量的阴性样品。检测时间比传统方法大为缩短,但由于目前其耗材较为昂贵,在实际应用中难以大面积推广。

4.2 以核酸为基础的快速检测方法

生物中的核酸(DNA 或 RNA)是一类可以决定遗传信息的大分子。由于所有生物都含有这种分子,可以利用它作为检测的标靶。聚合酶链式反应(PCR)是一种体外酶促基因扩增技术,可在短时间内将靶 DNA(或 RNA)扩增数百万倍[8]。PCR 和 DNA 探针杂交联合使用来检测食品中沙门氏菌,具有特异性强、灵敏度高及操作简便快速等特点[9]。探针的标记方法有放射性同位素、地高辛、生物素等。美国的 Biocontrol 公司的产品 Probelia Salmonella[10]就是一种基于 PCR 扩增和 DNA 分子杂交技术的特异性检测食品中沙门氏菌的自动化装置。Gene-Trak 公司也开发有检测沙门氏菌的商业化系统,此法针对沙门氏菌核糖体 RNA 设计一段寡核苷酸探针,用于杂交检测。美国 Qualicon 公司生产的 BAX 系统也是利用 PCR 扩增目标病原菌特异 DNA 片段至可检测水平,因其他微生物没有相同特定 DNA 片段,则不被扩增,故该系统具有很高专一性,灵敏度也很高,食品中致病菌细胞数仅为 1cfu/25g 时均可被检出。1995 年,美国 PE 公司研制出荧光 PCR 技术,是在常规 PCR 基础上加入荧光标记探针来实现定量定性检测的技术。Chen 等利用该技术中的 TaqMan 方法同步同体系扩增和检测目标产物,实现荧光 PCR 快速检测沙门氏菌。OPE 公司也基于 TaqMan 原理推出沙门氏菌荧光 PCR 检测试剂盒,并被运用于食物中毒调查,由于国外的沙门氏菌荧光 PCR 检测试剂盒的价格昂贵(每个样品 100 元以上),目前国内很少推广。

4.3 PCR-ELISA 技术

该技术是将 PCR 技术与 ELISA 相结合的一种抗原检测技术,又称为免疫 PCR。本质是一种以 PCR 代替酶反应来放大显示抗原抗体结合率的改进型 ELISA。特点是利用 PCR 的指数级扩增效率带来极高的敏感度。同时又具有高特异性的抗原检测系统。原理是利用 ELISA 技术来检测 PCR 扩增的产物,用生物素标记寡核苷酸探针,以链霉亲和素包被微孔反应板,封闭后加入生物素标记的探针与之结合,标本经 PCR 扩增后,扩增产物与生物素标记探针进行液相杂交,然后加入 HRP 标记的抗地高辛抗体,加入底物(TMP)显色,进行 ELISA 检测。

鉴于我国国情,在生产中常用国标法,有条件的单位应用自动酶标检测仪、ELISA、PCR 试剂盒检测。

参考文献:

- [1]马呈珠.山东省 286 起沙门菌食物中毒分析[J].中国食品卫生杂志,2005,17(1):19-20.
- [2]陆承平.兽医微生物学[M].北京:中国农业出版社,2001.102.
- [3]AOAC 编译委员会编译. 中华人民共和国国家进出口商品检验,AOAC 公定分析方法(第十五版)[M].北京:中国科学技术出版社,1990.33-35.
- [4]MEAD P S,SLUTSKER L,DIETZ V,et al. Food-related illness and death in the United States[J]. Emerg Infect Dis,1999(5):607.
- [5]张艳红,吴延功,杜元钊,等.沙门氏菌快速检测方法研究进展 [J].动物医学进展,2001,22(2):39-41.
- [6]曹海伟,李卫.放射免疫检测管理系统的开发和利用[J].实用医学杂志,1996,12(11):778-779.
- [7]黎兆滚,陈博文,冯维占,等,用 ELISA 法快速检测沙门氏菌[J].中国进出境动植物检,1997,11(3):34.
- [8]第一届中美食品安全及其全程控制研讨会.微生物快速自动检测培训班资料汇编[C].武汉:华中农业大学,2001.12.
- [9]黄玲,孟冬丽.利用 mini-VIDAS 和 GB 法检测食品中沙门氏菌的比较试验[J].新疆师范大学学报(自然科学版),2003,22(1):50-52.
- [10]C.W.迪芬巴赫,G.S.德维克斯勒. PCR 技术实验指南(第二版) [M].北京:科学技术出版社,2004.

ⁱ 本文转自龙源期刊网 <http://www.qikan.com.cn> 《湖北畜牧兽医》2010 年第 01 期,作者:李庆德 原志伟 沈巍