食源性致病菌快速检测技术

目录

第一部分　食源性疾病简介

第二部分　常见食源性致病菌

第三部分　快速检测技术

第一部分　食源性疾病简介

食源性疾病（foodborne disease）的概念

WHO在1984年规定：指由摄食进入人体内的各种致病因子引起的、通常具有感染或中毒性质的一类疾病

食源性疾病的危害

- 食物污染造成的疾病已经成为当今世界上最广泛的卫生问题
- 全球每年发生食源性疾病的病例达到数十亿例，即使在发达国家也至少有1/3的人患食源性疾病。在食源性疾病上的花费达数十亿美元，因食源性微生物污染引起的腹泻而死亡的0－15岁儿童约170万
- 英国的疯牛病、日本出血性大肠埃希氏菌0157：H7和葡萄球菌肠毒素中毒的雪印牛奶事件
- 我国目前尚无统一的食源性疾患报告的数据

食源性疾病的分类

1、细菌性食源性疾病

2、食源性病毒感染：甲型肝炎，诺如病毒

3、食源性寄生虫感染 ：旋毛虫病、绦虫病、阿米巴病

4、食源性化学性中毒 ：化学毒物

5、食源性真菌毒素中毒 ：霉菌毒素，节菱孢霉毒素，镰刀菌毒素

6、动物性毒素中毒 ：河豚毒素，麻痹性贝类毒素

7、植物性毒素中毒：皂素（四季豆），秋水仙碱（鲜金针菜）

第二部分　常见食源性致病菌

常见的食源性致病菌

1、金黄色葡萄球菌

2、沙门氏菌

3、单增李斯特菌

4、出血性大肠杆菌0157：H7

5、副溶血性弧菌

6、空肠弯曲菌

金黄色葡萄球菌

- 金黄色葡萄球菌无芽胞、鞭毛，大多数无荚膜，革兰氏染色阳性。
- 金黄色葡萄球菌在自然界中无处不在，食品受其污染的机会很多。金黄色葡萄球菌污染多见于春夏季，易受污染食品种类多
- 生化特性
- 致病性

沙门氏菌

- 沙门氏菌属肠杆菌科，革兰氏阴性肠道杆菌
- 沙门氏菌具有复杂的抗原结构,一般可分为菌体(O)抗原、鞭毛(H)抗原和表面(Vi)抗原3种。
- 带菌率较高的食品：_蛋、家禽和肉类产品
- 生化特性
- 致病性

单增李斯特菌

- 李斯特菌属（ listeria)现在有2个群7个种单增李斯特菌是唯一能引起人类疾病的。
- 短小的革兰阳性无芽孢杆菌,它广泛存在于自然界中， 4℃的环境中仍可生长繁殖，是冷藏食品威胁人类健康的主要病原菌之一。
- 带菌率较高的食品：牛奶和乳制品；肉类(特别是牛肉)；蔬菜；沙拉；海产品；冰淇凌等
- 生化特性
- 致病性

出血性大肠杆菌0157:H7

- 革兰氏染色阴性，无芽胞，有鞭毛，动力试验呈阳性。
- 农场动物，尤其是反刍动物，构成EHEC 0157:H7在世界范围内的主要贮存宿主。
- 带菌率较高的食品：牛肉、生奶、鸡肉及其制品，蔬菜、水果及其制品
- 生化特性：不发酵三梨醇，MUG阴性
- 致病性

副溶血性弧菌

- 一种嗜盐性细菌，革兰染色阴性，兼性厌氧菌，为多形态杆菌或稍弯曲弧菌。
- 带菌率较高的食品：主要来自海产品，以及含盐分较高的腌制食品，如咸菜、腌肉等。
- 多在夏秋季发生于沿海地区，常造成集体发病。近年来由于海鲜空运，内地城市病例也渐增多。
- 致病的主要原因是烹调时未烧熟煮透或熟制品被污染。

空肠弯曲菌

- 菌体轻度弯曲似逗点状，菌体一端或两端有鞭毛，运动活泼，有荚膜，不形成芽胞。
- 微需氧菌，在含2.5～5%氧和10%CO2的环境中生长最好。最适温度为37～42℃。
- 空肠弯曲菌是多种动物如牛、羊、狗及禽类的正常寄居菌。通过分娩或排泄物污染食物和饮水。
- 生化特性
- 致病性

第三部分　快速检测技术

传统的检测技术

增菌 → 分离培养 → 生化鉴定 → 血清鉴定

- 检测周期长
- 步骤繁琐
- 灵敏度低

微生物检测技术的发展趋势

- 快速检测技术的需求日益迫切
- 检测技术的灵敏度要求越来越高
- 检测技术的特异性要求越来越高生化特性
- 多指标的同时分析
- 操作简便、容易掌握
- 无试剂化，仪器微型化和便携化

快速检测技术

传统方法为基础

- 显色培养基
- 快速检测纸片
- 全自动分析仪

免疫学反应为基础

- 酶联免疫法
- 酶联荧光免疫法
- 免疫磁珠分离
- 免疫胶体金法

分子生物学为基础

- PCR
- 多重PCR
- 实时荧光定量PCR
- 基因芯片

生物传感器

显色培养基技术

原理

- 微生物胞内酶的种类及反应条件作为微生物分类鉴定的主要依据，通过在分离培养基中加入微生物特异性酶的底物，该底物由发色基团和微生物可代谢物质组成，通常无色，但在特异性酶作用下游离出发色基团并显示一定颜色，直接观察菌落颜色就可对菌种做出鉴定。

显色培养基技术

优点

- 减少了对菌株进行纯培养和进一步生化鉴定的步骤将微生物的分离与鉴定合二为一。
- 省时省力、操作方便、敏感性和特异性较高
- 能与常规检测方法较好地接轨

显色培养基技术

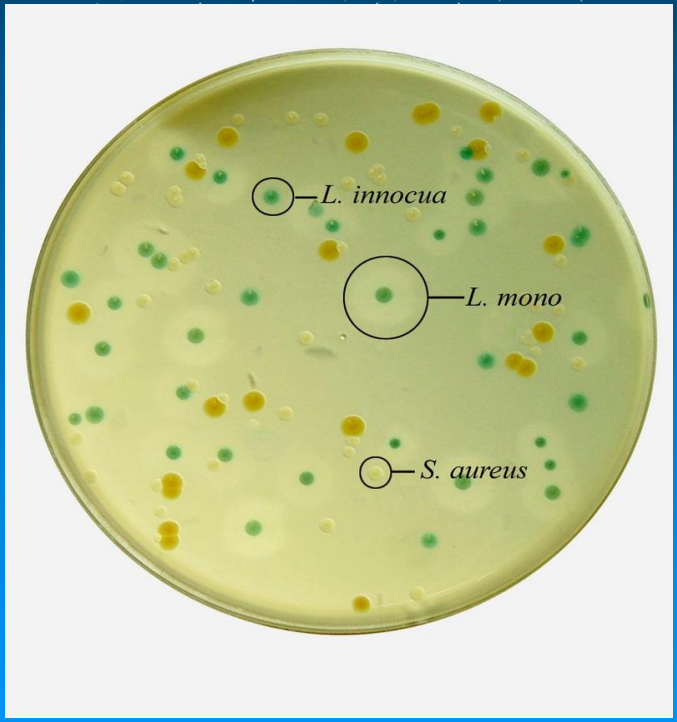
不足

- 检测混合感染的微生物时，会出现一定比例的假阳性或假阴性省时省力、操作方便、敏感性和特异性较高
- 某些显色培养基上可能出现不同菌种呈现相似的颜色，或同一微生物呈现不同颜色

显色培养基技术

商品化的显色培养基

- 金黄色葡萄球菌
- 单增李斯特菌
- 大肠杆菌0157：H7
- 沙门氏菌
- 阪崎肠肝菌
- 弧菌

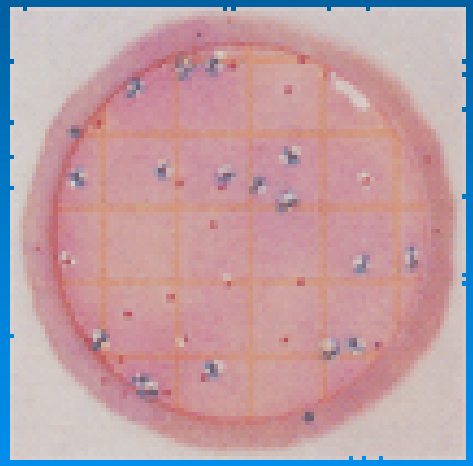


快速检测纸片

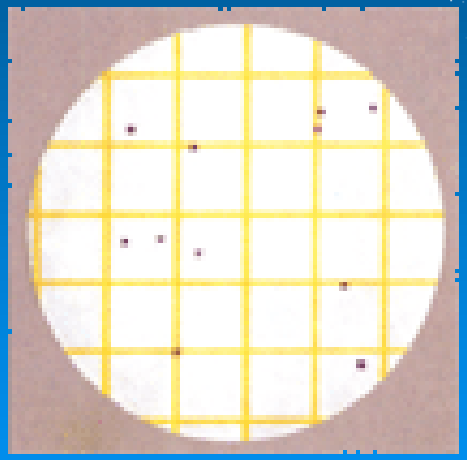
为预先制备好的培养基系统和一种冷水可溶性的凝胶剂，以及由于检测项目不同而不同的指示剂。它由上下2层薄膜组成，下层的聚乙烯薄膜上印有网格并且覆盖有细菌生长的培养基，上层是聚丙烯薄膜。使用时接种1 mL待测样品的稀释液在下层的培养基上，盖上上层聚丙烯薄膜即可完成，通常只需24～48 h即可得出结果。

快速检测纸片

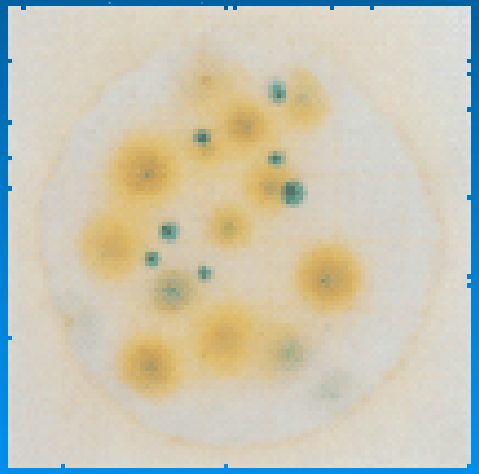
已成功用于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、李斯特菌以及霉菌和酵母菌的检测



大肠杆菌



金黄色葡萄球菌



霉菌和酵母菌

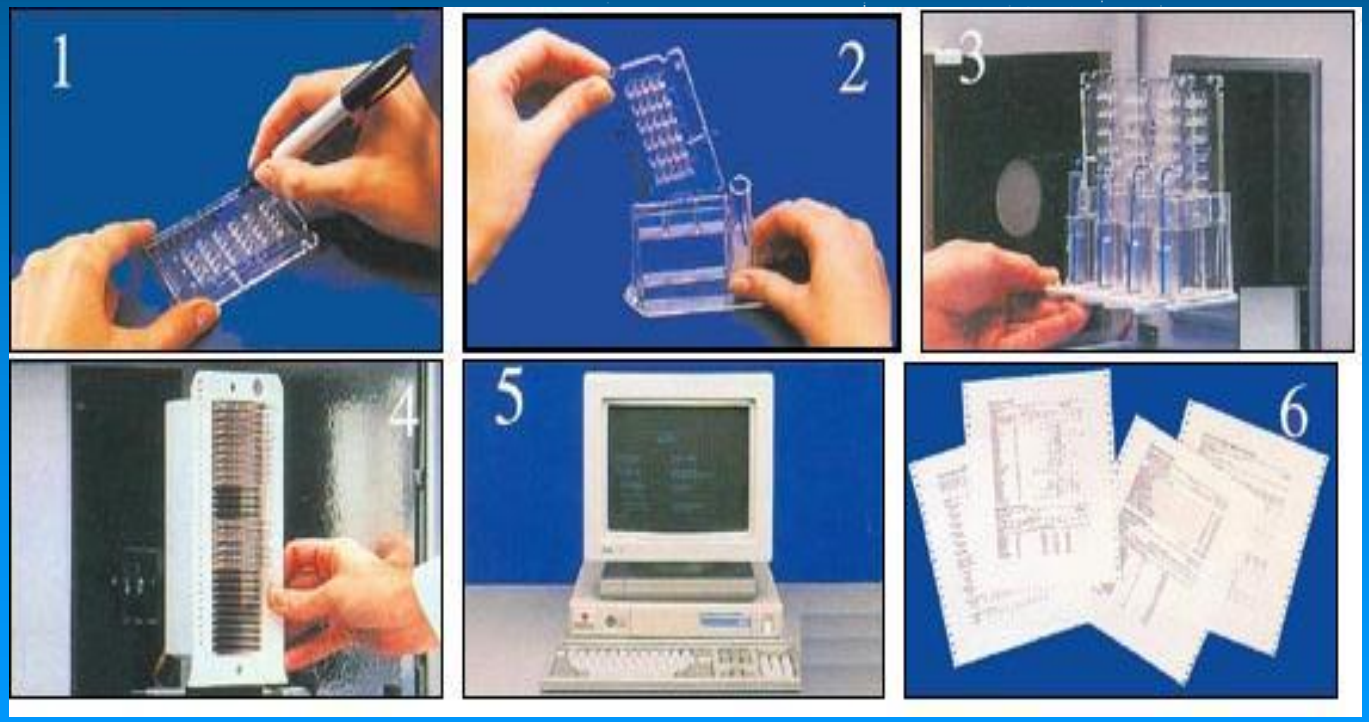
自动化微生物分析仪

由传统生化反应及微生物检测技术与现代计算机技术相结合，运用概率最大近似值模型法进行自动微生物检测的技术，可鉴定多种常见致病菌。

法国生物梅里埃集团公司出品的Vitek 自动微生物检测系统对细菌的鉴定是以每种细菌的微量生化反应为基础.

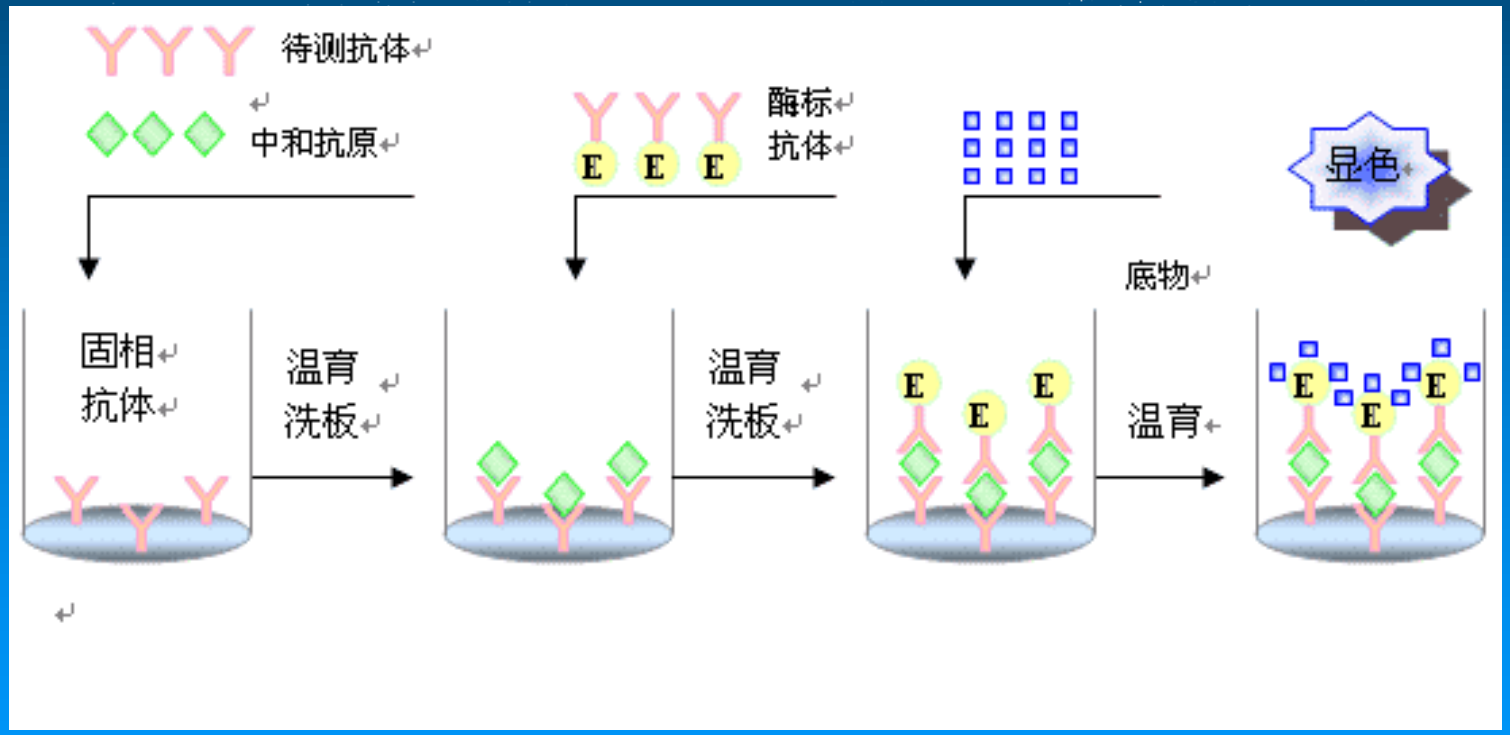
自动化微生物分析仪

Vitek试卡(检测卡)含有多种的生化反应孔，可达30种，可鉴定405种细菌



酶联免疫法（ELISA）

原理



酶联免疫法（ELISA）

应用

- 目前ELISA方法已被广泛应用于多种细菌和病毒等疾病的诊断。大多数的致病菌都有相应的商品化ELISA检测试剂盒。

改进

- 采用基因工程方法制备包被抗原
- 采用针对某一抗原表位的单克隆抗体
- 电脑化程度极高的ELISA检测仪

酶联荧光免疫分析

原理

- 将致病菌抗原与单克隆抗体结合，再将结合有碱性磷酸酶的抗体与致病菌抗原结合。当底物4-甲基伞形磷酸铜被磷酸酶转换成4-甲基伞形酮时，发出荧光。测得荧光强度与抗原量成正比

酶联荧光免疫分析

应用

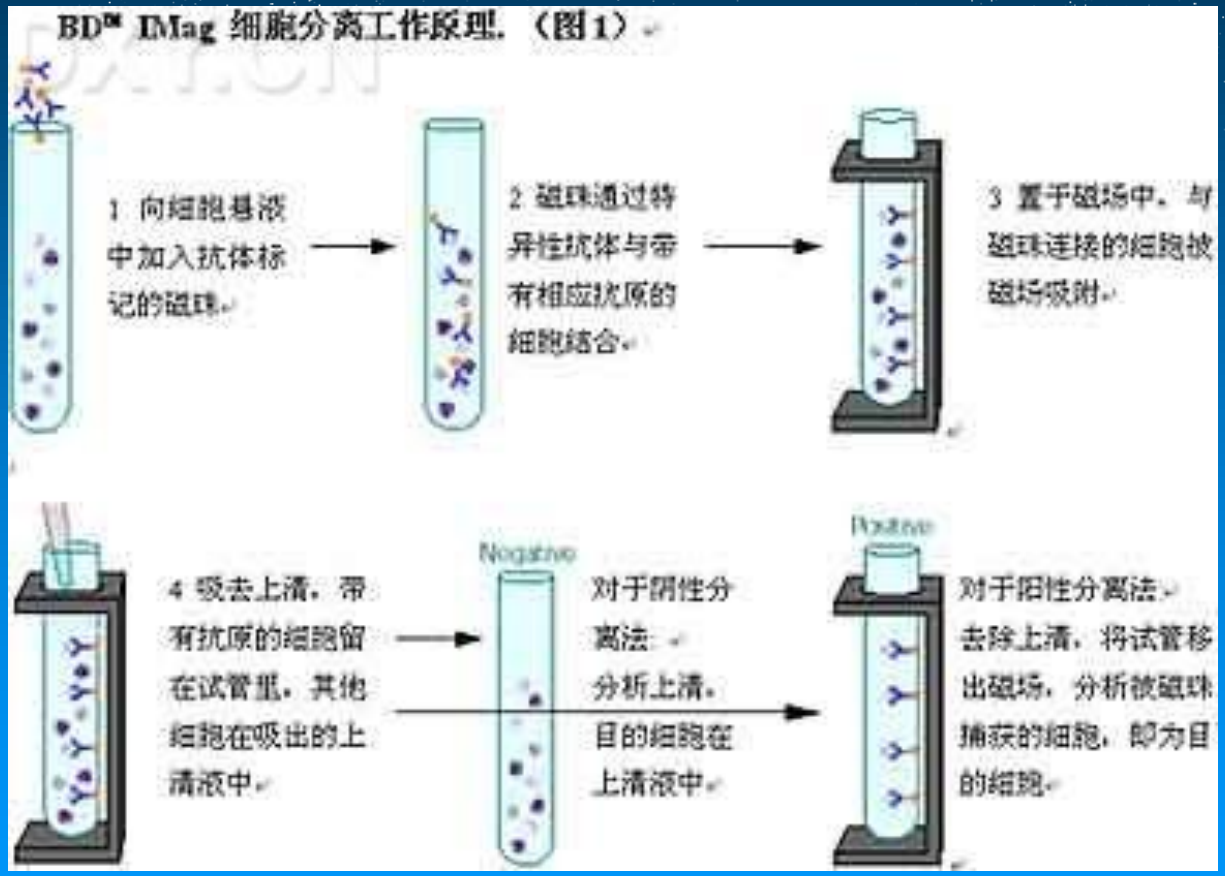
- 目前主要在酶联荧光免疫自动检测系统（VIDAS）上应用。可用于检测李斯特菌属、单增李斯特菌、沙门氏菌、空肠弯曲菌、大肠杆菌O157：H7、葡萄球菌肠毒素.
- 采用mini—VIDAS，对174份鸡蛋、580份原料牛奶、253份猪肉、248份牛肉和58份虾仁样品进行了沙门氏菌检测．与国标法对比，Mini—VIDAS的敏感性和特异性达100％和98．8％。

酶联荧光免疫分析

应用

免疫磁珠分离技术

原理


BD™ IMag 细胞分离工作原理.（图1）
1 向细胞悬液中加入抗体标记的磁珠
2 磁珠通过特异性抗体与带有相应抗原的细胞结合
3 置于磁场中，与磁珠连接的细胞被磁场吸附
4 吸去上清，带有抗原的细胞留在试管里，其他细胞在吸出的上清液中
Negative
对于阴性分离法：分析上清，目的细胞在上清液中
Positive
对于阳性分离法：去除上清，将试管移出磁场，分析被磁珠捕获的细胞，即为目的细胞

免疫磁珠分离技术

应用

此法主要应用于大肠杆菌0157：的监测和食品中单核细胞增生李斯特氏菌、副溶血性弧菌、小肠结肠耶尔森氏菌等的检测

免疫胶体金技术

原理

- 以微孔滤膜为载体包被已知抗原或抗体，加人待检标本后，经滤膜的毛细管作用或渗滤作用使标本中的抗原或抗体与膜上包被的抗体或抗原结合，再用胶体金结合物标记而达到检测目的 显色程度与抗原含量成正比，因而用于定性或半定量的快速免疫检测方法中.

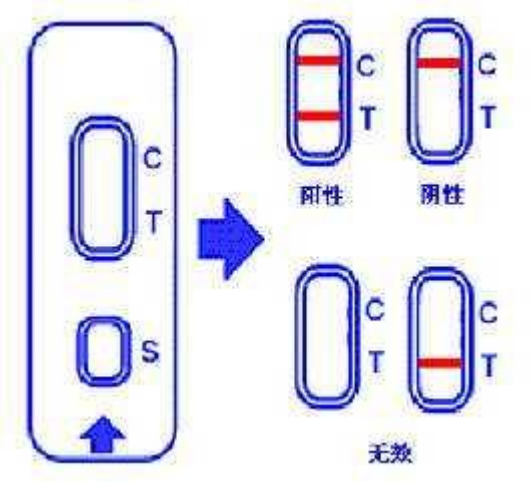
免疫胶体金技术

应用

- 目前胶体金检测条应用广泛，沙门氏菌、大肠杆菌0157、单增李斯特菌都有相应的胶体金检测条出售。

特点

操作简便、快速，结果准确，不需任何仪器设备，易于判读，几分钟就可用肉眼观察到颜色鲜明的实验结果，并可保存实验结果



PCR技术(聚合酶链式反应)

原理

- 利用DNA变性与复性原理，在体外利用DNA聚合酶活性，在引物的引导和脱氧核糖核苷酸(dNTP)等参与下将模板DNA在数小时内进行百万倍扩增。该技术利用两段寡核苷酸作为反应的引物， 以及四种脱氧核苷三磷酸dNTP、DNA聚合酶作为反应物，将提取到的DNA(称为模板DNA)片段精确扩增。

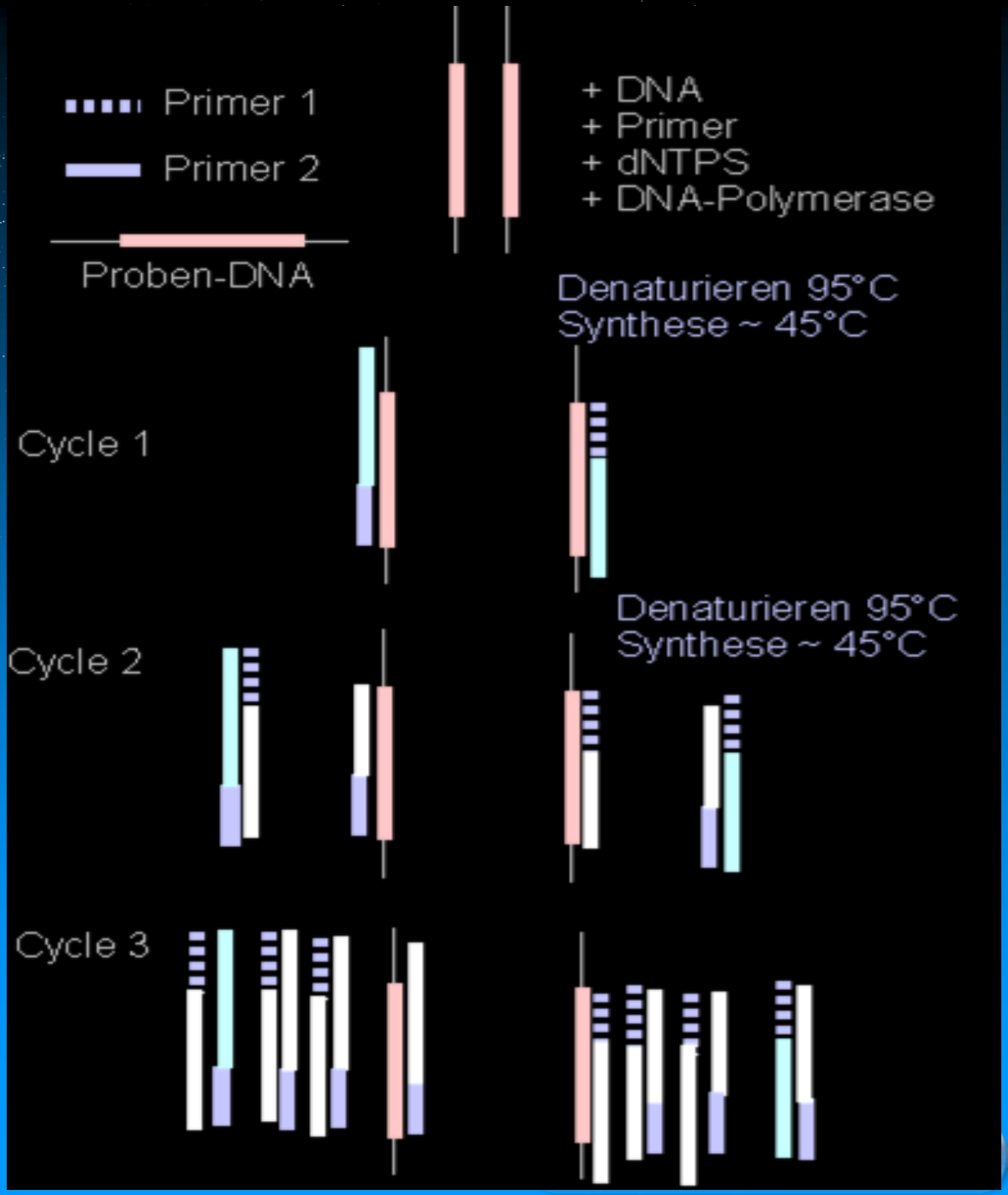
PCR技术

PCR一般过程:

1. 变性（denaturation）
加热使DNA双螺旋的氢键断裂,双链解离形成单链DNA。

2. 退火（annealling）：
温度降低时使引物和其互补的模板在局部形成杂交链。

3. 延伸（extension）：
在DNA聚合酶和4种脱氧核糖核苷酸及Mg^{2+}存在的条件下，催化DNA链延伸反应。



PCR技术（聚合酶链式反应）

- 基于PCR的食品致病菌检测方法通常在设计靶基因的时候，优先考虑把该病原菌的致病因子的编码基因作为其靶基因。这样可以增加这些检测方法的特异性和区分度。

PCR技术（聚合酶链式反应）

表 1　食品中常见的病原菌及其靶基因

细菌名称	主要致病因子	靶基因
亲水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)	细胞溶素和溶血素	*aer* 基因和 β-溶血素基因
蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)	肠毒素	*bce* 基因
弯曲菌(*Campylobacter* spp.)	菌体	16SrRNA 特异性片段
空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)	毒素	*flaA* 和 *flaB* 基因间序列
肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)	神经毒素	神经毒素基因
产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)	肠毒素	肠毒素基因
大肠杆菌(*Escherichia coli*)	热稳定毒素	热稳定毒素基因
肠道致病性大肠杆菌(Enteropathogenic *E. coli*)	菌体	黏附因子质粒上基因
肠道侵袭性大肠杆菌(Enteroinvasive *E. coli*)	菌体	侵袭质粒上基因
产肠毒素的大肠杆菌(Enterotoxin *E. coli*)	耐热肠毒素	*elt* 基因
出血性大肠杆菌(Enterohemorrhage *E. coli*)	志贺菌样毒素	志贺菌样毒素基因
李斯特菌(*Listeria* spp.)	菌体	rRNA 特异片段
单核细胞增生李斯特菌(*L. monocytogenes*)	菌体、溶血素	溶血素基因
沙门菌(*Salmonella* spp.)	菌体	染色体或 rRNA 特异序列以及 *oriC* 基因
志贺菌(*Shigella* spp.)	菌体和毒素	rRNA 特异片段和毒素基因
福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)	菌体	质粒入侵基因
金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)	肠毒素	肠毒素基因 A、B、C1、E 等
霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)	霍乱肠毒素(CT)	*extAB* 基因
副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)	耐热直接溶血素	耐热直接溶血素基因
霍利斯弧菌(*V. vulnificus*)	细胞毒素和溶血素	细胞毒素和溶血素基因
小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)	毒素和菌体	毒性质粒和溶血素基因
假结核病耶尔森菌(*Y. pseudotuberculosis*)	菌体	入侵基因

PCR技术（聚合酶链式反应）

存在的问题

- 污染问题
- 假阴性问题
- 引物设计及靶序列选择
- 其它影响因素

多重PCR技术

原理

- 多重PCR(multiplex PCR)的原理与PCR基本相同．只是在同一反应体系中加入多对引物同时扩增多条目的DNA片段采用这一技术可同时检测多种病原微生物。

多重PCR技术

特点

- 高效性：在同一PCR反应管内同时检出多种病原微生物，或对有多个型别的目的基因进行分型
- 系统性：多重PCR很适宜于成组病原体的检测，如肝炎病毒，肠道致病性细菌，性病的同时检测
- 经济简便性，多种病原体在同一反应管内同时检出，将大大的节省时间，节省试剂，节约经费开支

多重PCR技术

应用

- 食品检测中得到广泛应用，应用多重PCR技术同时检测肉制品中沙门氏菌、李斯特菌和大肠杆菌O157H7，其检测敏感度可以达到40 CFU / kg
- 根据沙门菌invA序列，设计3对特异性引物进行多重PCR，可同时检测-DNA的敏感性分别为10．2。10．2和102．0 Pg．检测时间仅需4 h
- 建立了检测19种金黄色葡萄球菌毒素基因的多重PCR方法，灵敏度为0．2 pg，并用该方法检测了143个从韩国鸡肉和猪肉中分离的金黄色葡萄球菌品种，发现有72个品种至少含有一种毒素基因

多重PCR技术

存在的问题

- 污染问题:一旦有极少量外源性DNA污染，就有可能出现假阳性结果
- 引物问题：多对引物同时扩增，各种实验条件控制不当，很容易导致扩增失败或非特异性产物；引物的设计及靶序列的选择不当等都有可能降低其灵敏度和特异性
- 对食品样品进行检测时．增菌培养基选择不当易使有些细菌生长缓慢或被抑制，导致假阴性结果

实时荧光定量PCR

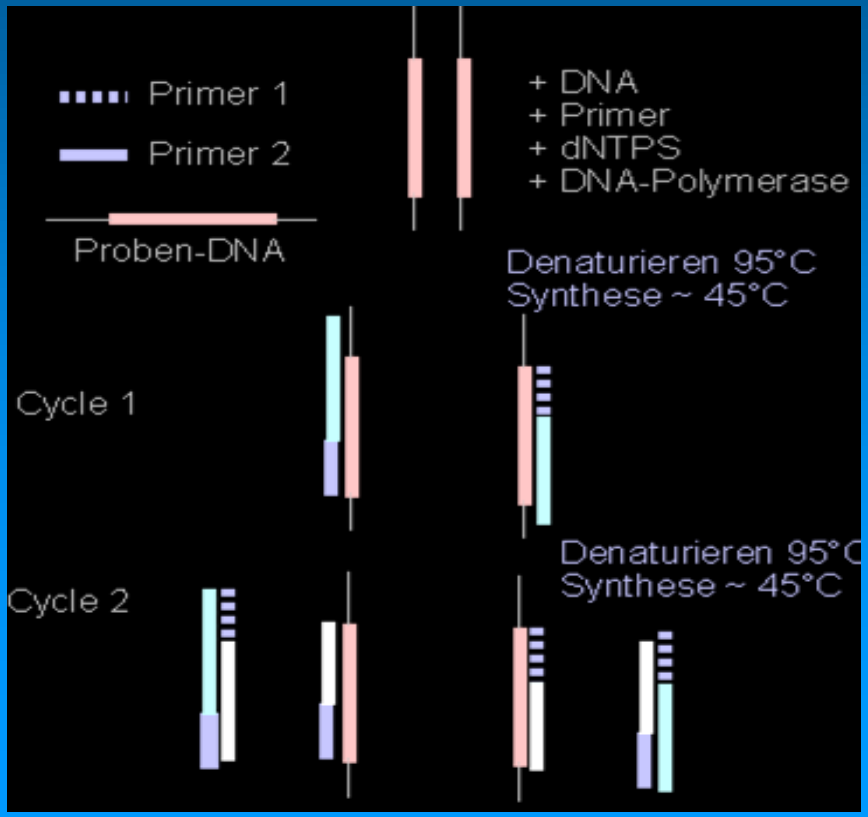
原理

- 在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。
- 荧光定量PCR所使用的荧光化学可分为两种：荧光探针和荧光染料。

实时荧光定量PCR

原理

- 在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

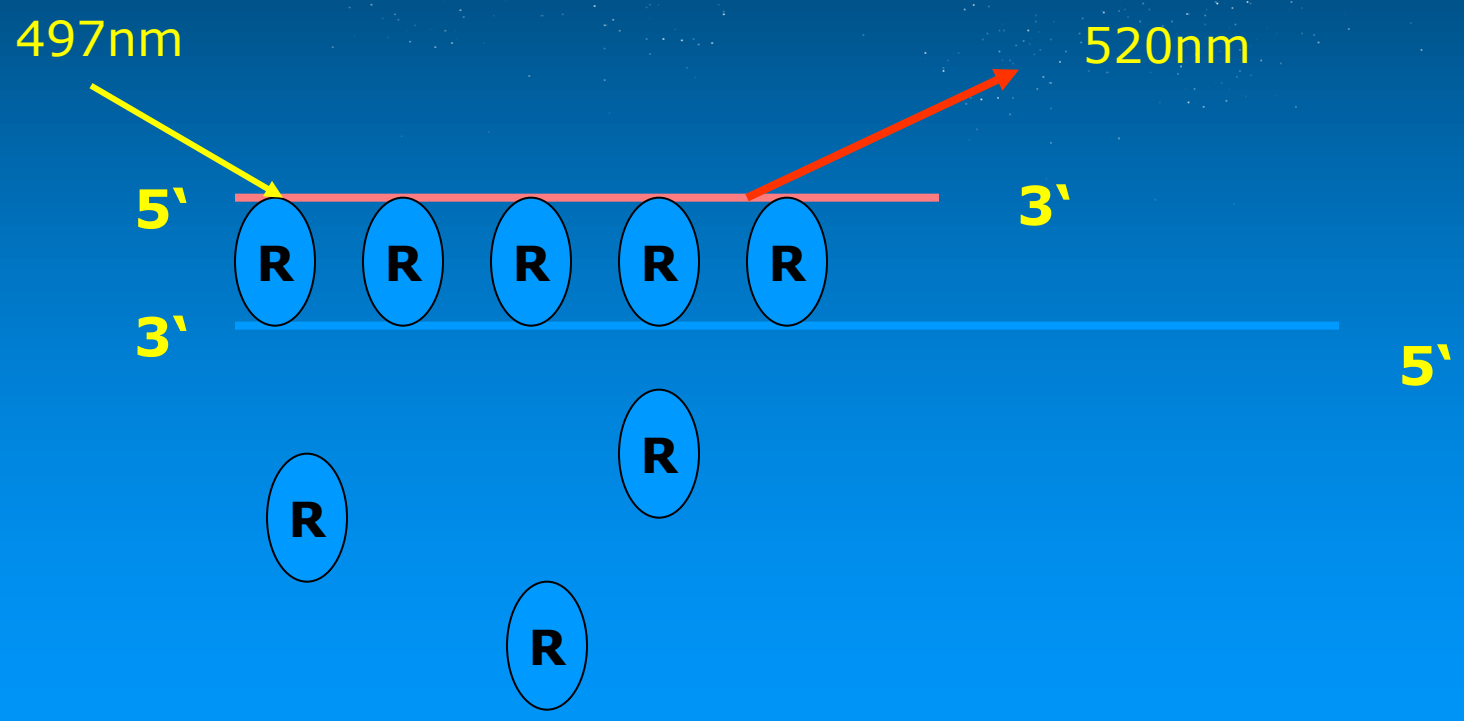


PCR +

荧光标记 + 监测系统

实时荧光定量PCR

SYBR Green I 是一种结合于小沟中的双链DNA染料,
与双链DNA结合后, 其荧光大大增强.



实时荧光定量PCR

TaqMan荧光探针:

- 杂交探针的互补区在引物间
- 5'端连有一个荧光reporter, 通常是荧光素
- 3'端连有一个Quencher,通常是TAMRA
- 荧光素被488 nm光激发，发射光为520 nm
- 520 nm 光能激发TAMRA，发射光为570 nm

荧光定量PCR在生命科学各个领域的应用都非常广泛，但仍然存在一些问题，比如采用标准曲线法进行实时定量时，没有统一标准品，实验结果缺乏可比性；其次，进行相对定量时，内源性参比基因有时

实时荧光定量PCR

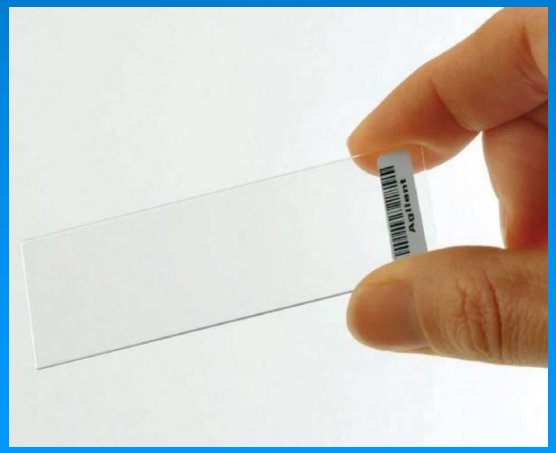
存在的问题

- 荧光定量PCR在生命科学各个领域的应用都非常广泛，但仍然存在一些问题
- 采用标准曲线法进行实时定量时，没有统一标准品，实验结果缺乏可比性；
- 进行相对定量时，内源性参比基因有时会受到实验条件的影响，从而影响实验的可靠性；
- 实时定量试剂和染料价格昂贵，限制了它的应用领域。

基因芯片

原理

- 将各种基因寡核苷酸点样于芯片表面，微生物样品DNA经PCR扩增后制备荧光标记探针，然后再与芯片上寡核苷酸点杂交，通过扫描仪定量分析荧光分布模式从而来确定检测样品是否存在某些特定微生物



基因芯片

四个技术要点

- 芯片方阵的构建
- 样品的制备
- 生物分子反应
- 信号的检测

基因芯片

应用

- 以基因芯片技术为基础的水中常见致病菌的快速检测与鉴定技术，其检测水中常见致病菌的敏感性可达516 ×105 个/mL
- 应用基因芯片建立了一种在4 h 以内的致病菌快速诊断方法，他们运用该法对158例经血培养鉴定为阳性的样品进行检测，结果符合率为7917%
- 对4 种细菌，即大肠埃希菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌和空肠弯曲菌采用了基因芯片的检测方法，其检测结果不仅敏感度高于传统方法，而且操作简单，重复性好，并且节省了大量时间，大大提高了4种细菌诊断效率
- 国内已成功研制成常见食源性致病菌基因芯片，该鉴定系统能同时并行检测10种常见致病菌

基因芯片

优点

- 简便快速、高通量、可并行检测、特异性强

不足

- 检测成本高昂；检测特异性有待提高；样品制备过程应该进一步简化以及建立标准化程序

生物传感器

原理

- 生物传感器(biosensor)对生物物质敏感并将其浓度转换为电信号进行检测的仪器。是由固定化的生物敏感材料作识别元件（包括酶、抗体、抗原、微生物、细胞、组织、核酸等生物活性物质）与适当的理化换能器（如氧电极、光敏管、场效应管、压电晶体等等）及信号放大装置构成的分析工具或系统。

生物传感器

应用

- 用光纤生物传感器在几分钟内检出食物中的病原体(如大肠杆菌0157：H7），而传统的检测方法则需要几天时间，此法快速灵敏，可以直接检测100 CFU的大肠杆菌0157：H7
- 用光纤传感器测定了食品中的肉毒杆菌毒素A，检测下限可达5 ug/L，1min内可完成测定；另外，免疫传感器还应用在食品污染的检测，如食品中金黄色葡萄球菌和鼠伤寒沙门氏菌的检测
- 用光学免疫传感器实现了鼠伤寒沙门氏菌的快速检测。 整个检测过程可以在2 h内完成

谢 谢！