

德尔卑沙门氏菌分子等温活菌检测体系的建立

翟立公, 黄菊, 李港回, 王俊颖*

安徽科技学院, 安徽 滁州 233100

翟立公, 黄菊, 李港回, 王俊颖. 德尔卑沙门氏菌分子等温活菌检测体系的建立[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1214-1223
Zhai Ligong, Huang Ju, Li Ganghui, Wang Junying. Establishment of an isothermal amplification method for detection of viable *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1214-1223

摘要:【背景】德尔卑沙门氏菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby)是危害人类生命安全的主要致病性血清型。【目的】建立一种准确、快速检测德尔卑沙门氏菌的方法。【方法】通过建立叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)-重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)的方法准确有效地检测样品中的活德尔卑沙门氏菌。【结果】使用基因 *RU61_00441* 作为检测靶点, 设计引物 SD1 正确地鉴定了所有被测菌株。实验结果表明, PMA 处理能有效区分活细胞和死细胞。基因组 DNA 检测限为 761.2 fg/μL, 活菌检测限为 45 CFU/mL。此方法检测德尔卑沙门氏菌的血清型不受自然背景(猪肉、鸡肉和牛肉)菌群基因组 DNA 的影响。此外, 该方法还可以检测出动物性食品中富集 6 h 后浓度低至 3.9 CFU/mL 的德尔卑沙门氏菌。【结论】这种 PMA-RPA 检测方法耗时短并具有更好的灵敏度和特异性, 能为沙门氏菌的检测提供更有效的指导。

关键词: 德尔卑沙门氏菌; 重组酶聚合酶扩增; 叠氮溴化丙锭; 特异性基因

Establishment of an isothermal amplification method for detection of viable *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby

ZHAI Ligong, HUANG Ju, LI Ganghui, WANG Junying*

Anhui Science and Technology University, Chuzhou 233100, Anhui, China

Abstract: [Background] *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby as a major pathogenic serotype is harmful to the public health. [Objective] To build a rapid and accurate approach for the detection of this serotype. [Methods] An accurate and effective method was built with propidium monoazide (PMA)-recombinase polymerase amplification (RPA) for the detection of active *S. Derby*. [Results] The

基金项目: 2020 年度安徽高校自然科学研究项目(KJ2020A0070); 2020 年安徽省自然科学基金项目(2008085MC89)

Supported by: Natural Science Research Project of Anhui University in 2020 (KJ2020A0070); Natural Science Foundation of Anhui Province in 2020 (2008085MC89)

*Corresponding author: E-mail: gavin340@126.com

Received: 2021-08-20; Accepted: 2021-10-14; Published online: 2021-12-22

assay used *RU61_00441* gene as target and designed the primer SD1F/R which correctly identified all the tested strains. The PMA treatment effectively distinguished between viable and dead cells. The limit of detection was calculated to be 761.2 fg/ μ L for genomic DNA and 45 CFU/mL for bacterial culture. For the detection of the serotype Derby, this assay was not affected by the genomic DNA of background flora (pork, chicken, and beef). Importantly, *S. Derby* in animal-derived food could be detected at a concentration as low as 3.9 CFU/mL after enrichment for 6 h. **[Conclusion]** This PMA-RPA method is time-saving and has good sensitivity and specificity, which can provide reference for the future detection of *Salmonella*.

Keywords: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby; RPA; PMA; serotype-specific genes

德尔卑沙门氏菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby)目前是最常见的食源性致病菌沙门氏菌属的一种, 由其引起的食物中毒可导致患者急性发热、腹泻、呕吐等^[1]。目前已经发现的沙门氏菌血清型超过 2 500 多种, 但研究发现仅有部分血清型能引起人类感染, 德尔卑沙门氏菌便是其中之一^[2]。据报道, 2013–2014 年德国 145 名老年人感染了德尔卑沙门氏菌^[3]。在中国多地的肉产品中也经常能检测出沙门氏菌。不论是在欧盟还是在中国, 德尔卑沙门氏菌都高度流行, 可污染猪肉、鸡肉和牛肉等动物源性食品^[4-5]。因此, 建立一种准确、快速的检测方法对防止食源性疾病的暴发十分重要。

目前沙门氏菌血清型的鉴定多采用传统的国标法, 也称为“金标准”^[6]。然而, 国标法检测沙门氏菌操作复杂、耗时长、成本昂贵^[7]。为了解决上述问题, 许多分子检测方法被广泛采用, 如聚合酶链式反应(PCR)、实时 PCR 和环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术等^[8-9]。然而它们都有各自的局限性。PCR 检测需要昂贵的仪器设备、专业的操作人员以及较长的反应时间; LAMP 技术则需要 6 个复杂引物且提高反应温度至 60–65 °C^[10]。在此方面, 重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)检测是一种新的等温基因扩增方法, 与其他检测技术相比具有更多的优点, 如较低的反应温度(37–42 °C)、较

短的运行时间并且对错配的耐受性和敏感性高^[11-12]。在 RPA 检测中, 首先重组酶(UvsX)与引物结合, 在 DNA 模板上找到完全互补的区域; 其次, 单链 DNA 结合蛋白(single-strand DNA binding protein, SSB)与单链 DNA 结合作为模板, 通过聚合酶 Bsu 形成新的完整 DNA, 靶标扩增时间不超过 30 min^[13]。目前 RPA 已用于多种食源性致病菌的检测^[14]。

基于 DNA 的分子检测方法可用于克服培养的局限性, 但是 RPA 法不能区分活菌和死菌, 也不能区分环境中可能存在的细胞外 DNA^[15]。因此, 死亡细胞会导致假阳性结果, 从而导致不必要的产品召回。在本研究中, 我们使用叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)预处理对样品中食源性致病菌进行死菌与活菌的选择性检测^[16]。在光照条件下, PMA 能选择性地穿透死细胞受损的细胞膜, 插入死细胞的双螺旋 DNA。此操作可以通过强烈抑制 DNA 扩增来消除死细胞的假阳性结果^[17]。因此, 基于 DNA 的分子检测与 PMA 检测相结合可以检测活菌, 并可以确定沙门氏菌、大肠杆菌、粪肠球菌和单核增生李斯特菌等生存能力^[18]。

本研究在筛选德尔卑沙门氏菌血清型特异性检测靶点后合成特异性基因引物, 建立结合 PMA 预处理检测活细胞的 RPA 检测方法, 并通过检测食品样品确定该方法的灵敏度和特异性, 以期对沙门氏菌血清型的鉴定提供更好的指导。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所有菌株均来自中国医学细菌保藏管理中心(National Center for Medical Culture Collections, CMCC)、中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Center of Industrial Culture Collection, CICC)、中国兽医微生物菌种保藏管理中心(China Veterinary Culture Collection Center, CVCC)、美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)及本实验室保存。实验所用德尔卑沙门氏菌为 ATCC 6960, 以下简称为 SD。鸡肉、猪肉和牛肉若干购自超市。

1.2 主要试剂和仪器

叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA), Biotium 公司; 营养肉汤培养基, 上海博微生物科技有限公司; LB 培养基, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 缓冲蛋白胨(buffered peptone water, BPW), 上海盛思生化科技有限公司; DNA 提取试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司。琼脂糖凝胶电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像分析仪, 上海培清科技有限公司; PCR 仪, 杭州博日科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取及 PMA 预处理

所有菌株均接种在 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜。按照 DNA 试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA, 并在-20 °C 保存。使用分光光度计测定 DNA 样本的浓度。将 PMA 溶解于二甲基亚砜(DMSO)中, 配制成 10 mmol/L 的 PMA 处理液于-20 °C 避光保存。选用终浓度为 100 μmol/L 的 PMA 处理细胞悬液(活菌、死菌或活菌/死菌混合), 避光在室温条件下处理 5 min。混合后, 将所有样管置于冰浴中以防止过热, 在 500 W 卤素灯下 20 cm 距离内照射

5 min^[19]。同时, 对试管进行摇晃确保死细胞 DNA 完全交联。光照完成后, 12 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 使用微生物 DNA 分离试剂盒分离 DNA。

1.3.2 RPA 检测体系的建立

筛选最佳特异性基因进行引物设计, 具体引物信息见表 1。基因 *RU61_00441*、*RU61_00447*、*RU61_RS23380* 从之前的实验结果中参考选择, *invA* 基因参考 Rahn 等关于 *invA* 基因聚合酶链式反应的实验选用^[20]。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系: 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, 模板 DNA 1 μL, 缓冲液 A 12.5 μL, ddH₂O 30 μL, LB 缓冲液 2.5 μL。经 10 000 r/min 离心 30 s 后立即放入金属浴中, 反应在 38 °C 进行。用 TAE 缓冲液处理 RPA 法扩增得到的产物并进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像分析仪进行检测分析。

1.3.3 特异性和敏感性的评估

通过一组特异性食源性致病菌(包括沙门氏菌株和非沙门氏菌株)的检测评估 RPA 法的特异性(表 2)。被测菌株的模板浓度为 100 ng/μL。从 SD 参照株中提取 DNA 后用 TE 缓冲液(76.12 ng/μL-76.12 fg/μL)进行连续稀释。用不同稀释度下的基因组 DNA 作为模板, 检测 RPA 法的敏感性。以在琼脂糖凝胶电泳中能产生清晰可见条带的最低 DNA 浓度为检测限。将 SD 培养过夜后, 用 0.9% NaCl 溶液连续稀释 10 倍。同时, 采用标准平板计数法测定菌株菌悬液的浓度。采用 PMA-RPA 法检测每种稀释度下的细菌数量。

1.3.4 背景微生物菌群对德尔卑沙门氏菌检测的影响

在实际应用中, PMA-RPA 的测定可能受食品样品中自然背景菌群的影响, 因此通过此试验验证该方法的准确性。首先, 对照国际标准

表 1 实验引物序列

Table 1 Primer pairs used in this study

Target organism	Gene name	Primer name	Sequence (5'→3')	PCR product (bp)	Annotation
<i>S. Derby</i>	<i>RU61_00441</i>	SD1F	GACCAGTTCTTCTTCATGACCTACGAAATC	200	Hypothetical protein
		SD1R	TTAATCCACACCTTTGGCGGAATTAGCTTA		
	<i>RU61_00447</i>	SD3F	TATTGTAGAAGCGGAAATCTCTGGCATAAG	904	OLD family endonuclease
		SD3R	CTTTATTCGTGGATAGCATCTTGTCCCTAA		
	<i>RU61_RS23380</i>	SD8F	CCTGAGCAGCGTAACACTAAAGAA	208	Hypothetical protein
		SD8R	TAGCCCTGAAAATACCAGTAACAACA		
<i>Salmonella invA</i> spp.		139	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA	284	Invasion proteinA
		141	TCATCGCACCGTCAAAGAACC		

表 2 实验菌株的特异性验证结果

Table 2 Specificity verification results of experimental strains

菌株 Strain	PCR result			
	SD1	SD3	SD8	139_141
甲型副伤寒沙门氏菌 ^{αβ} <i>S. Paratyphi A</i> ^{αβ}	— ^b	—	+ ^a	+
乙型副伤寒沙门氏菌 ^β <i>S. Paratyphi B</i> ^β	—	—	+	+
丙型副伤寒沙门氏菌 ^β <i>S. Paratyphi C</i> ^β	—	—	+	+
德尔卑沙门氏菌 ^{αλδ} <i>S. Derby</i> ^{αλδ}	+	+	+	+
伤寒沙门氏菌 ^α <i>S. Typhi</i> ^α	—	—	+	+
鼠伤寒沙门氏菌 ^{αβφλ} <i>S. Typhimurium</i> ^{αβφλ}	—	—	+	+
肠炎沙门氏菌 ^{αβφλ} <i>S. Enteritidis</i> ^{αβφλ}	—	—	+	+
海德尔堡沙门氏菌 ^β <i>S. Heidelberg</i> ^β	—	—	+	+
猪霍乱沙门氏菌 ^δ <i>S. Choleraesuis</i> ^δ	—	—	+	+
达喀尔肠炎沙门氏菌 ^β <i>S. Dakar</i> ^β	—	—	+	+
病牛沙门氏菌 ^β <i>S. Bovismorbificans</i> ^β	—	—	+	+
布雷登尼沙门氏菌 ^λ <i>S. Bredeney</i> ^λ	—	—	+	+
蒙得维的亚沙门氏菌 ^β <i>S. Montevideo</i> ^β	—	—	+	+
耶路撒冷沙门氏菌 ^β <i>S. Jerusalem</i> ^β	—	—	+	+
波恩沙门氏菌 ^β <i>S. Bonn</i> ^β	—	—	+	+
汤卜逊沙门氏菌 ^β <i>S. Thompson</i> ^β	—	—	+	+
鸭沙门氏菌 ^β <i>S. Anatum</i> ^β	—	—	+	+
波茨坦沙门氏菌 ^β <i>S. PotSDam</i> ^β	—	—	+	+
布伦登卢普沙门氏菌 ^δ <i>S. Braenderup</i> ^δ	—	—	+	+
圣保罗沙门氏菌 ^β <i>S. Saintpaul</i> ^β	—	—	+	+
波那雷恩沙门氏菌 ^β <i>S. Bonariensis</i> ^β	—	—	+	+
肯塔基沙门氏菌 ^β <i>S. Kentucky</i> ^β	—	—	+	+
巴森海德沙门氏菌 ^β <i>S. Bazenheid</i> ^β	—	—	+	+
阿贡纳沙门氏菌 ^β <i>S. Agona</i> ^β	—	—	+	+
迈阿密沙门氏菌 ^β <i>S. Miami</i> ^β	—	—	+	+

(待续)

(续表 2)

都柏林沙门氏菌 ^{aβ} <i>S. Dublin</i> ^{aβ}	—	—	+	+
伊斯特本沙门氏菌 ^β <i>S. Eastbourne</i> ^β	—	—	+	+
火鸡沙门氏菌 ^β <i>S. Mleagridis</i> ^β	—	—	+	+
伦敦沙门氏菌 ^λ <i>S. London</i> ^λ	—	—	+	+
山夫登堡沙门氏菌 ^β <i>S. Senftenberg</i> ^β	—	—	+	+
阿柏丁沙门氏菌 ^β <i>S. Aberdeen</i> ^β	—	—	+	+
布洛克利沙门氏菌 ^β <i>S. Blockley</i> ^β	—	—	+	+
阿德莱沙门氏菌 ^β <i>S. Adelaide</i> ^β	—	—	—	+
旺兹沃思沙门氏菌 ^β <i>S. Wandsworth</i> ^β	—	—	—	+
金黄色葡萄球菌 ^δ <i>Staphylococcus aureus</i> ^δ	—	—	—	—
粪肠球菌 ^δ <i>Enterococcus faecalis</i> ^δ	—	—	—	—
鸟肠球菌 ^δ <i>Enterococcus avium</i> ^δ	—	—	—	—
大肠杆菌 ^δ <i>Escherichia coli</i> ^δ	—	—	—	—
短小芽孢杆菌 ^a <i>Bacillus pumilus</i> ^a	—	—	—	—
蜡样芽孢杆菌 ^λ <i>Bacillus cereus</i> ^λ	—	—	—	—
荧光假单胞菌 ^λ <i>Pseudomonas fluorescens</i> ^λ	—	—	—	—
肺炎克雷伯菌 ^δ <i>Klebsiella pneumoniae</i> ^δ	—	—	—	—
粘质沙雷氏菌 ^β <i>Serratia marcescens</i> ^β	—	—	—	—
单核增生李斯特菌 ^β <i>Listeria monocytogenes</i> ^β	—	—	—	—
威尔斯李斯特菌 ^β <i>Listeria welshimeri</i> ^β	—	—	—	—
斯氏李斯特菌 ^β <i>Listeria seeligeri</i> ^β	—	—	—	—
伊氏李斯特菌 ^β <i>Listeria ivanovii</i> ^β	—	—	—	—
格氏李斯特菌 ^β <i>Listeria grayi</i> ^β	—	—	—	—
无害李斯特菌 ^β <i>Listeria innocua</i> ^β	—	—	—	—

注: ^a: 显著结果; ^b: 不显著结果; ^a: CMCC 菌株; ^β: CICC 菌株; ^φ: CVCC 菌株; ^λ: 实验室分离菌株; ^δ: ATCC 菌株。+: 检测结果为阳性; -: 检测结果为阴性

Note: ^a: Significant result; ^b: Indistinctive result; ^a: CMCC strain; ^β: CICC strain; ^φ: CVCC strain; ^λ: Laboratory-isolation strain; ^δ: ATCC strain. +: Positive test result; -: Negative test result.

GB 4789.4—2016^[21]对猪肉、鸡肉和牛肉等食品样品进行检测, 确认无沙门氏菌。将样品接种到 LB 肉汤中, 于 37 °C 培养 24–48 h, 以 10²–10⁶ CFU/mL 不同细胞浓度连续稀释。以 1:10、1:10²、1:10³、1:10⁴ 和 1:10⁵ 的比例将 SD 菌群与自然菌群混合, 然后对这些混合物进行 PMA 处理和 DNA 提取, 以进行 RPA 扩增。

1.3.5 PMA 处理效果对比

将 SD 在 LB 肉汤中 37 °C、180 r/min 培养过夜, 调整浓度至 10⁶、10⁴、10² CFU/mL。每个浓度的样品在 90 °C 的水浴中加热 10 min,

然后分别用 PMA 和不用 PMA 处理。提取所有样本的基因组 DNA 进行 RPA 检测。

1.3.6 人工污染样品中德尔卑沙门氏菌的检测

从当地一家超市购买猪肉、鸡肉和牛肉等不同品种的肉, 使用国际标准法(GB 4789.4—2016)检验不含沙门氏菌。SD 在 37 °C 缓冲蛋白胨水(BPW)中培养 12 h 至菌落浓度为 $N \times 10^5$ CFU/mL 到 $N \times 10^7$ CFU/mL ($1 < N < 10$) 之间, 连续进行 10 倍比梯度稀释 5–7 次, 然后转移 25 g 至无菌食品样品袋中。用标准的细胞计数法测定初始浓度。将人工污染的食品样品用 225 mL LB 在 37 °C 下

富集 4、6、8 h。最后, 样品经 PMA 处理后, 通过水煮法提取基因组 DNA 进行 RPA 扩增检测。

2 结果与分析

2.1 SD 特异性引物灵敏度分析

根据 SD 血清型的待选特异性基因。采用 Primer 5.0 设计 3 个特异性基因引物进行扩增(表 1)。通过特异性验证发现 SD 的 3 对引物(SD1F/R、SD3F/R 和 SD8F/R) DNA 均扩增出了相应的片段, 而这些引物与非 SD 的 DNA 未形成任何预期的条带。结果表明, 这 3 个扩增的基因片段都可以作为血清型特异性靶点用于德尔卑沙门氏菌的检测。基因组 DNA 的起始浓度为 $7.497 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 10 倍比梯度稀释至 $74.97 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 。如图 1 所示, SD3 和 SD8 的检测限相同, 均为 $74.97 \text{ pg}/\mu\text{L}$, 而 SD1 引物的检测限约为 $74.97 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 。说明 SD1 引物对 SD 菌株具有最高的灵敏度和较好的特异性。因此选择这对引物进行进一步的使用。

2.2 德尔卑沙门氏菌血清型 PMA-RPA 检测的特异性和敏感性验证

为了评估和验证 RPA 检测的特异性, 收集了多株已确定的不同菌株, 见表 2。将 *RU61-00441* 基因扩增到的 200 bp 大小片段用于沙门菌的目标血清型检测。除 SD 外, 其他菌株均未显示阳性结果。因此, PMA-RPA 检测对德尔卑血清型具有高度特异性。

通过对不同浓度的基因组 DNA 和细菌悬液进行 RPA 扩增, 研究了 PMA-RPA 系统对 SD 的敏感性。在 RPA 反应中能产生阳性结果的最低数量 DNA 浓度为 $761.2 \text{ fg}/\mu\text{L}$ (图 2); 该系统能够获得再现性, 每次 PCR 后预期值稀释度从 $4.5 \times 10^7 \text{ CFU}/\text{mL}$ 到 $45 \text{ CFU}/\text{mL}$ (图 3), 因此确定 PMA-RPA 测定的检出限是 $45 \text{ CFU}/\text{mL}$, 对应于 $76.12 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 。

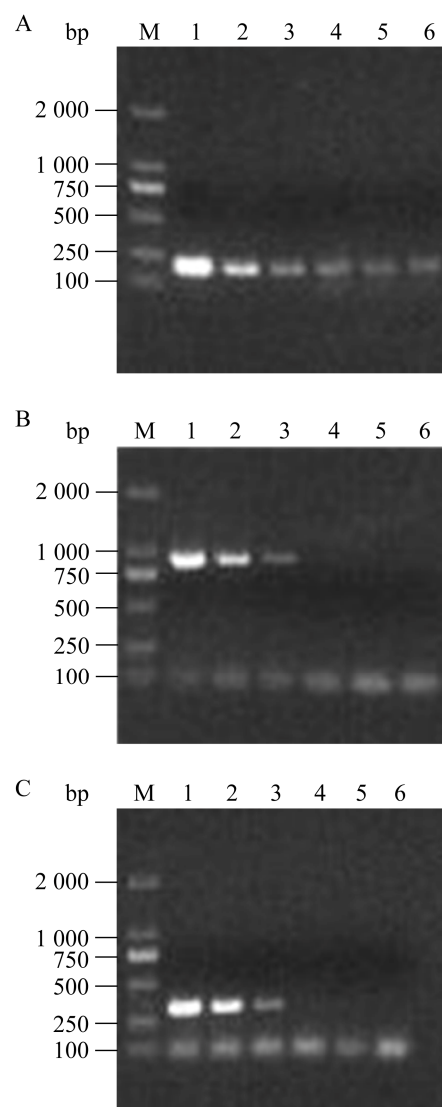


图 1 RPA 法检测德尔卑沙门氏菌(ATCC 6960)基因敏感性结果

Figure 1 RPA detection sensitivity of pure genome DNA for *S. Derby* (ATCC 6960). A: Primer SD1F/R; B: Primer SD3F/R; C: Primer SD8F/R. M: DNA Marker D (100–2 000 bp); 1–6: $7.497 \text{ ng}/\mu\text{L}$ to $74.97 \text{ fg}/\mu\text{L}$.

2.3 PMA 对德尔卑沙门氏菌活菌、死菌鉴别的影响

在 RPA 扩增前使用 PMA 区分浓度在 7.3×10^5 – $7.3 \times 10^2 \text{ CFU}/\text{mL}$ 之间可行的加热灭活德尔卑沙门氏菌菌株(图 4)。研究结果显示: 不

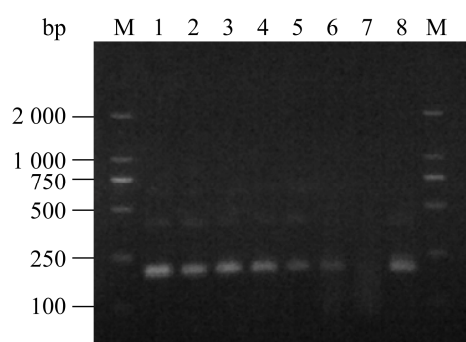


图2 RPA法检测DNA敏感性验证

Figure 2 Sensitivity of the RPA assay for detection of genomic DNA. M: DNA Marker D (100–2 000 bp); 1–7: The genomic DNA concentration of *S. Derby* per RPA assay form 76.12 ng/μL to 76.12 fg/μL; 8: Positive control.

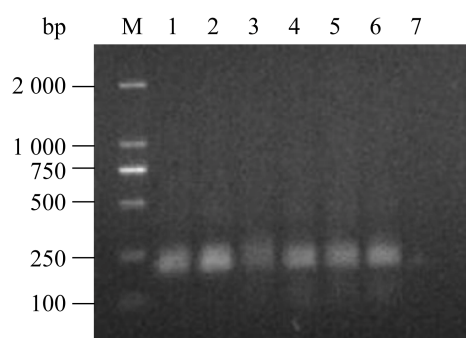


图3 RPA法测定检测德尔卑沙门氏菌(ATCC 6960)的检测限

Figure 3 Detection limit of the RPA assay for pure culture from *S. Derby* (ATCC 6960). M: DNA Marker D (100–2 000 bp); 1–7: The number of cells per RPA assay, respectively: 4.5×10^7 CFU/mL to 45 CFU/mL.

管是否经过 PMA 处理,活细胞可以获得预期的 RPA 反应系统。相比之下,死亡菌株经过 PMA 处理和未经过 PMA 处理的检测结果有显著差异,具体表现为:当死亡细胞悬液经过 PMA 处理时未见扩增产物;反之,未经过 PMA 处理的 RPA 扩增反应有假阳性结果产生。因此,这些结果表明 PMA 预处理是一种区分活细胞和死细胞的有效方法。

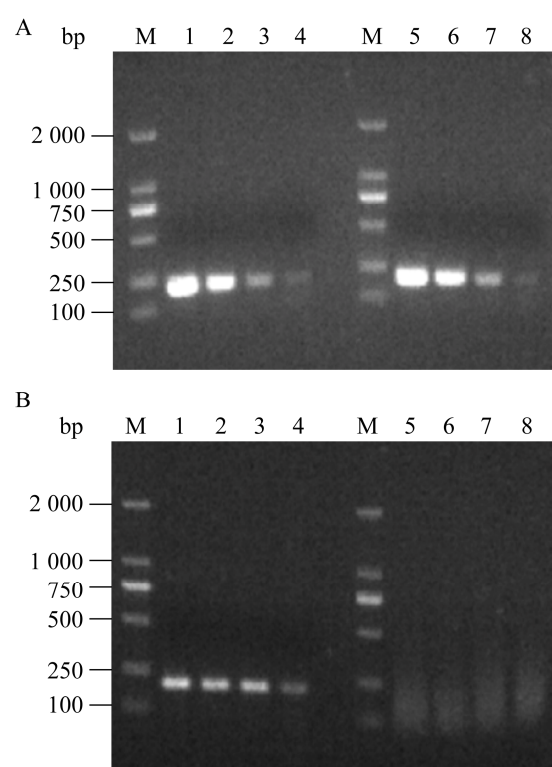


图4 PMA-RPA 检测德尔卑沙门氏菌死菌和活菌的影响

Figure 4 Effect of PMA-RPA assay for detecting live and dead *S. Derby*. A: Live cell; B: Dead cell; M: DNA Marker D (100–2 000 bp); 1–4: Bacteria without PMA treatment, 7.3×10^5 CFU/mL to 7.3×10^2 CFU/mL *S. Derby*; 5–8: Bacteria with PMA treatment, 7.3×10^5 CFU/mL to 7.3×10^2 CFU/mL *S. Derby*.

2.4 PMA-RPA 测定的干扰性评价

实验验证了 PMA-RPA 系统在样品复杂背景菌群条件下检测 SD 的准确性。结果表明,无论目的菌株与其他背景菌群混合程度如何,均能检测出 SD 血清型(图 5)。因此可以确定,在此实验条件下,自然背景微生物不影响试验的稳定性。

2.5 PMA-RPA 法检测人工污染样品中的 SD

采用 PMA-RPA 法检测人工污染样品中的 SD 评估实验方法的可行性。如表 3 所示,污染猪肉中初始浓度为 39 CFU/25 g 的 SD,孵育

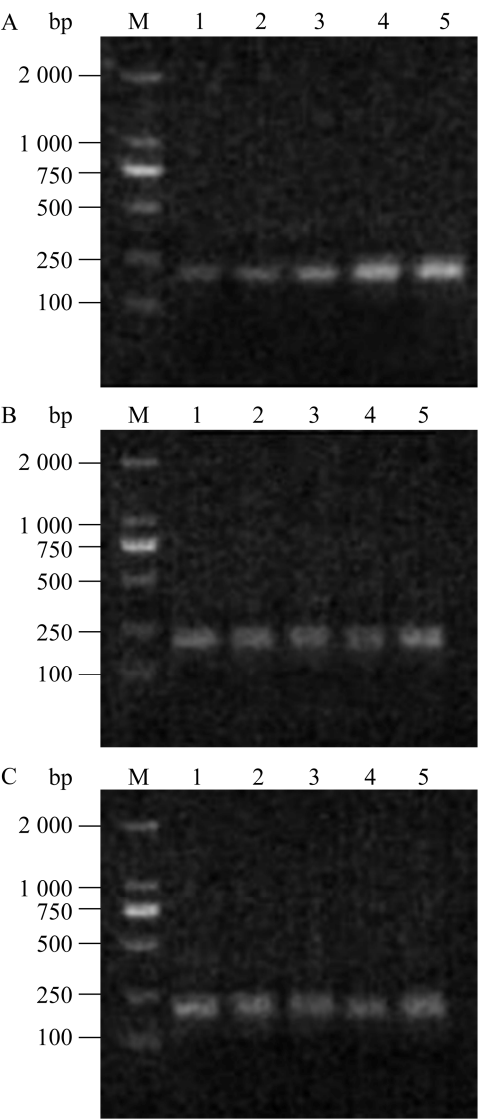


图 5 自然背景微生物菌群下德尔卑沙门氏菌检测效果

Figure 5 Detection of *S. Derby* (ATCC 6960) in the presence of background flora. M: DNA Marker D (100–2 000 bp); A: *S. Derby* with pork background flora; B: *S. Derby* with chicken background flora; C: *S. Derby* with beef background flora. 1–5: *S. Derby* with background flora was 1:10⁵, 1:10⁴, 1:10³, 1:10² and 1:10¹.

4 h 后 RPA 检测结果为阳性，鸡肉和牛肉中的检出限分别为 2.91 Log₁₀ (CFU/25 g) 和 2.22 Log₁₀ (CFU/25 g)。当富集培养达到 8 h 时，使用 PMA-RPA 检测 SD 可测得所有样品阳性。

表 3 不同浓度下样品的检测结果

Table 3 Detection of *S. Derby* cells in spiked food samples

Food samples	Inoculum level of <i>S. Derby</i> (CFU/25 g)	RPA result of different enrichment time (h)		
		4	6	8
Pork	3.90	– ^b	+ ^a	+
	39.00	+	+	+
	390.00	+	+	+
	3 900.00	+	+	+
Chicken	8.20	–	+	+
	82.00	–	+	+
	820.00	+	+	+
	8 200.00	+	+	+
Beef	1.68	–	–	+
	16.80	–	+	+
	168.00	+	+	+
	1 680.00	+	+	+

注：^a：显著结果；^b：不显著结果。+：检测结果为阳性；–：检测结果为阴性

Note: ^a: Significant result; ^b: Indistinctive result. +: Positive test result; –: Negative test result.

因此，该方法在快速检测德尔卑沙门氏菌血清型方面具有明显的优势。

3 讨论与结论

德尔卑沙门氏菌是分布广泛的一种人畜共患病原体。在中国和欧洲多地，SD 被确认为众多非伤寒沙门氏菌血清型中主要的食源性致病性血清型^[22]。因此，建立一种特异性血清型分类的方法十分必要。然而，SD 检测常使用的传统国标检测方法耗时长、操作复杂、设备昂贵，而且由于表面或鞭毛抗原的丢失很难进行血清分型^[23]。在 Kumar 等进行的一项研究中，基于比较基因组学挖掘了用于检测 SD 的新分子靶点，这些靶点具有较高的特异性和实用性，用于沙门氏菌的分子检测十分有效^[24]。

重组酶聚合酶扩增是一种新的等温扩增技术，与其他分子检测方法(PCR、real-time PCR 和 LAMP 等)相比需要更少的时间，而且仅需要

37 °C 恒温及更简单的设备^[25]。通过扩增 SD 特异性血清型基因(*RU61_00441*), 建立的 RPA 检测方法其特异性为 100%。与其他分子检测技术相比, RPA 操作温度低、反应时间短。RPA 检测的主要局限性是不能区分死细胞和活细胞。然而活菌的检测是食源性病原体的一个重要问题, 因此, 使用 PMA 鉴别食源性病原体的生死可有效弥补 RPA 的缺点^[26]。PMA-RPA 法的检出限为 76.12 fg/μL, 与 Liu 等^[27]关于恒温扩增可视化沙门氏菌检测的结果相似。

考虑到 PMA-RPA 检测在现实环境中的复杂性, 我们评估了该系统抵御食品样品中存在的其他微生物 DNA 的干扰能力。使用这种方法的 SD 检测不受动物性食品背景菌群的影响(即使这些菌株的浓度高于目标细菌的浓度)。当食源性病原体污染水平明显较低时, 在检测过程中需要进行预富集。为了准确地展示 PMA-RPA 的灵敏度, 在动物源性食品中人工污染不同浓度的 SD 并进行不同的预富集时间, 在富集 8 h 后分子检测结果为阳性; 在同一时间段内, 用于检测 SD 的 PMA-RPA 系统比 Geng 等^[28]用于检测的灵敏度更高。等温技术不需要昂贵的变温设备, RPA 试剂不需要冷链存储。基于反应时间, RPA 更具成本效益。这些结果进一步证明 RPA 作为一种检测工具具有巨大的潜力。

综上所述, 本文采用比较基因组学方法获得了检测 *S. Derby* 的血清型特异性靶基因。基于分子检测目标, 建立了 *S. Derby* 菌株的 PMA-RPA 检测方法, 该方法具有较高的特异性、敏感性和抗动物性食品自然背景菌群干扰的能力。此外, 该方法可成为快速、高效地筛选食品样品中德尔卑沙门氏菌的有效工具。

REFERENCES

- [1] Chattopadhyay S, Kaur A, Jain S, Singh H. Sensitive detection of food-borne pathogen *Salmonella* by modified PAN fibers-immunoassay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 45: 274-280
- [2] 刘斌. 沙门氏菌血清分型分子靶点的发掘及鉴定体系的建立[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2012
- Liu B. Mining of molecular targets and development of multiplex PCR methods for serogrouping and serotyping *Salmonella* spp.[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2012 (in Chinese)
- [3] Simon S, Trost E, Bender J, Fuchs S, Malorny B, Rabsch W, Prager R, Tietze E, Flieger A. Evaluation of WGS based approaches for investigating a food-borne outbreak caused by *Salmonella enterica* serovar Derby in Germany[J]. *Food Microbiology*, 2018, 71: 46-54
- [4] Sévellec Y, Felten A, Radomski N, Granier S, Le Hello S, Petrovska L, Mistou MY, Cadel-Six S. Genetic diversity of *Salmonella* Derby from the poultry sector in Europe[J]. *Pathogens*, 2019, 8(2): 46
- [5] 韩晗, 韦晓婷, 魏晔, 姜金仲, 王冉. 沙门氏菌对食品的污染及其导致的食源性疾病[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(5): 15-20
- Han H, Wei XT, Wei Y, Jiang JZ, Wang R. *Salmonella* contamination of food and its food-borne disease[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2016, 44(5): 15-20 (in Chinese)
- [6] Nielsen LR, Dohoo I. Time-to-event analysis of predictors for recovery from *Salmonella* Dublin infection in Danish dairy herds between 2002 and 2012[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 110(3/4): 370-378
- [7] Zhai LG, Liu HX, Chen QM, Lu ZX, Zhang C, Lü FX, Bie XM. Development of a real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for the rapid detection of *Salmonella* spp. from food[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2019, 50(1): 255-261
- [8] Denis E, Bielińska K, Wiczorek K, Osek J. Multiplex real-time PCRs for detection of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and verotoxigenic *Escherichia coli* in carcasses of slaughtered animals[J]. *Journal of Veterinary Research*, 2016, 60(3): 287-292
- [9] Xiao LL, Zhang ZH, Sun XH, Pan YJ, Zhao Y. Development of a quantitative real-time PCR assay for viable *Salmonella* spp. without enrichment[J]. *Food Control*, 2015, 57: 185-189
- [10] Chen J, Wang YY, Liu XQ, Chen GP, Chen XJ, Chen JP, Liu ZD, Gong JW, Yang GW, Lan QX. Development of propidium monoazide-recombinase polymerase amplification (PMA-RPA) assay for rapid

- detection of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*[J]. Molecular and Cellular Probes, 2018, 41: 32-38
- [11] Santiago-Felipe S, Tortajada-Genaro LA, Morais S, Puchades R, Maquieira Á. Isothermal DNA amplification strategies for duplex microorganism detection[J]. Food Chemistry, 2015, 174: 509-515
- [12] Yamanaka ES, Tortajada-Genaro LA, Maquieira Á. Low-cost genotyping method based on allele-specific recombinase polymerase amplification and colorimetric microarray detection[J]. Microchimica Acta, 2017, 184(5): 1453-1462
- [13] Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao XL. Homologous recombination and its regulation[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(13): 5795-5818
- [14] Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications[J]. Clinical Chemistry, 2016, 62(7): 947-958
- [15] Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M. A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable legionellae that can recover their cultivability[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4817-4824
- [16] Miotto M, Barretta C, Ossai SO, Da Silva HS, Kist A, Vieira CRW, Parveen S. Optimization of a propidium monoazide-qPCR method for *Escherichia coli* quantification in raw seafood[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 318: 108467
- [17] Pinheiro ET, Neves VD, Reis CC, Longo PL, Mayer MPA. Evaluation of the propidium monoazide-quantitative polymerase chain reaction method for the detection of viable *Enterococcus faecalis*[J]. Journal of Endodontics, 2016, 42(7): 1089-1092
- [18] Labrador M, Rota MC, Pérez C, Herrera A, Bayarri S. Evaluation of a method for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham based on impedancimetry combined with chromogenic agar[J]. Journal of Food Protection, 2018, 81(5): 705-712
- [19] 王冠蕾. PMA-LAMP 法可视化检测乳中沙门氏菌[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(4): 51-54, 64
- Wang GL. Visual detection of *Salmonella* in milk by loop-mediated isothermal amplification combining with propidium monoazide[J]. China Dairy Industry, 2020, 48(4): 51-54, 64 (in Chinese)
- [20] Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R III, Gyles CL III. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*[J]. Molecular and Cellular Probes, 1992, 6(4): 271-279
- [21] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 中华人民共和国国家标准: 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验 GB 4789.4—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- National Health and Family Planning Commission of PRC, China Food and Drug Administration. GB 4789.4—2016 Microbiological examination of food hygiene-examination of *Salmonella*[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese)
- [22] Xu ZJ, Song QF, Li CH, Zhan YF. Characterization of ciprofloxacin-resistant and ESBL-producing *Salmonella enterica* serotype Derby in Eastern China[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 61
- [23] De Freitas CG, Santana ÂP, Da Silva PHC, Gonçalves VSP, Barros MDAF, Torres FAG, Murata LS, Perecmanis S. PCR multiplex for detection of *Salmonella* Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 139(1/2): 15-22
- [24] Kumar R, Surendran PK, Thampuran N. Molecular fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby isolated from tropical seafood in South India[J]. Molecular Biotechnology, 2008, 40(1): 95-100
- [25] 覃湘婕, 孙宁与, 李春尧, 杨荣, 吴永宝. 食品中沙门氏菌检测方法研究进展[J]. 中国酿造, 2020, 39(9): 18-24
- Tan Xiangjie, Sun Ningyu, Li Chunyao, Yang Rong, Wu Yongbao. Research progress of *Salmonella* detection methods in food[J]. China Brewing, 2020, 39(9): 18-24 (in Chinese)
- [26] Pacholewicz E, Swart A, Lipman LJA, Wagenaar JA, Havelaar AH, Duim B. Propidium monoazide does not fully inhibit the detection of dead *Campylobacter* on broiler chicken carcasses by qPCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 95(1): 32-38
- [27] Liu HB, Zang YX, Du XJ, Li P, Wang S. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella* bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(9): 7016-7025
- [28] Geng YY, Liu GH, Liu LB, Deng QE, Zhao LW, Sun XX, Wang JF, Zhao BH, Wang JC. Real-time recombinase polymerase amplification assay for the rapid and sensitive detection of *Campylobacter jejuni* in food samples[J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 157: 31-36