

细菌常量生化鉴定法联合荧光定量 PCR 检测 对多种食源性致病菌的鉴别检测价值

徐光¹, 晏三妹², 徐锐³

(1. 上高县疾病预防控制中心检验科, 江西 上高 336400;

2. 上高县人民医院检验科, 江西 上高 336400;

3. 辽宁中医药大学杏林学院中医系, 辽宁 沈阳 110000)

摘要:目的 探讨细菌常量生化鉴定法联合荧光定量普通聚合酶链式反应(PCR)检测对多种食源性致病菌的鉴别检测价值。方法 选取 2022 年 1 月-2024 年 12 月于上高县疾病预防控制中心采集的 100 份食品样本,均进行细菌常量生化鉴定法与荧光定量 PCR 检测,以金标准(微生物培养鉴定法)结果为对照,比较两种方法对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、志贺氏菌、李斯特菌的检测准确率、灵敏度、特异度及检测时间。结果 细菌常量生化鉴定法联合荧光定量 PCR 检测对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、志贺氏菌、李斯特菌的检测准确率、灵敏度、特异度均高于单一检测方法,且检测时间短于细菌常量生化鉴定法,与金标准符合率也高于单一检测方法($P<0.05$)。结论 细菌常量生化鉴定法联合荧光定量 PCR 检测可显著提高多种食源性致病菌的检出率,缩短检测时间,在食源性致病菌检测中具有重要的应用价值。

关键词:细菌常量生化鉴定法;荧光定量 PCR 检测;食源性致病菌

中图分类号:R155.5

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2026.10.024

文章编号:1006-1959(2026)10-0135-05

Value of Routine Bacterial Biochemical Identification Method Combined with Fluorescent Quantitative PCR for the Identification and Detection of Multiple Foodborne Pathogens

XU Guang¹, YAN Sanmei², XU Rui³

(1. Department of Clinical Laboratory, Shanggao County Center for Disease Control and Prevention, Shanggao 336400, Jiangxi, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Shanggao County People's Hospital, Shanggao 336400, Jiangxi, China;

3. Department of Traditional Chinese Medicine, Xinglin College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110000, Liaoning, China)

Abstract: Objective To investigate the value of routine bacterial biochemical identification method combined with fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) in the differential detection of multiple foodborne pathogens. Methods A total of 100 food samples collected at the Shanggao County Center for Disease Control and Prevention from January 2022 to December 2024 were selected. All samples were tested by routine bacterial biochemical identification method and fluorescent quantitative PCR. Using the results of the gold standard (microbial culture identification method) as the reference, the two methods were compared in terms of detection accuracy, sensitivity, specificity, and detection time for *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Listeria*. Results The detection accuracy, sensitivity, and specificity of routine bacterial biochemical identification method combined with fluorescent quantitative PCR for *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Listeria* were all higher than those of either single detection method. Moreover, the combined method had a shorter detection time than routine bacterial biochemical identification method alone, and its agreement rate with the gold standard was also higher than that of either single method alone ($P<0.05$). Conclusion Routine bacterial biochemical identification method combined with fluorescent quantitative PCR can significantly improve the detection rate of multiple foodborne pathogens and shorten the detection time, demonstrating important application value in the detection of foodborne pathogens.

Key words: Routine bacterial biochemical identification method; Fluorescence quantitative PCR detection; Foodborne pathogen

食源性致病菌是导致食品安全问题的关键因素,对公众健康构成严重威胁。准确、快速地鉴别和检测这些致病菌对于保障食品安全、及时采取防控

措施以及降低食源性疾病负担至关重要^[1]。目前,荧光定量 PCR 凭借其高灵敏度、特异性和快速性,在食源性致病菌检测领域得到了广泛应用^[2]。然而,单一的荧光定量 PCR 检测在某些情况下可能存在局限性^[3]。例如,当样品中存在多种致病菌或背景微生物复杂时,可能出现假阳性或假阴性结果,且难以对细菌进行准确的种属鉴定和特征分析^[4]。细菌常量

作者简介:徐光(1971.2-),男,江西上高县人,本科,副主任技师,主要从事微生物检验检测工作

生化鉴定法作为一种经典的鉴定方法,基于细菌代谢产物的差异,能够提供丰富的细菌表型信息,从而实现了对细菌的准确鉴定,尤其在菌种鉴定的全面性和特异性方面具有独特优势,可对细菌的代谢特性等进行深入分析,为致病菌的鉴定与分类提供重要依据^[5,6]。因此,为了充分发挥两种检测方法的优势,克服各自的不足,本研究将细菌常量生化鉴定法与荧光定量 PCR 检测技术联合应用于多种食源性致病菌的鉴别检测,选取 2022 年 1 月-2024 年 12 月上高县疾病预防控制中心采集的 100 份食品样本,旨在探讨细菌常量生化鉴定法联合荧光定量 PCR 检测对多种食源性致病菌的鉴别检测价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2022 年 1 月-2024 年 12 月于上高县疾病预防控制中心采集的 100 份食品样本,包括肉类制品 30 份、水产品 25 份、奶制品 20 份、蔬菜水果 15 份、谷物制品 10 份。

1.2 纳入及排除标准 纳入标准:①按照规范采集的食品样本;②样本完整无污染;③经金标准(微生物培养鉴定法)检测可得到明确结果。排除标准:①样本出现溶血、凝固等现象;②因运输或保存不当导致样本变质。

1.3 方法

1.3.1 细菌常量生化鉴定法 样本均按照无菌操作程序采集,采集后立即置于 4℃ 冷藏箱中,于 4 h 内送至实验室进行检测。将食品样本接种于适宜的增菌培养基中,如沙门氏菌-志贺氏菌增菌肉汤用于沙门氏菌和志贺氏菌的增菌,金黄色葡萄球菌增菌肉汤用于金黄色葡萄球菌的增菌等,(37±1)℃ 培养 18-24 h。将增菌后的培养物接种于相应的选择性平板培养基上,如沙门氏菌接种于 XLD 琼脂平板,金黄色葡萄球菌接种于 Baird-Parker 平板等,(37±1)℃ 培养 18-24 h,观察菌落形态。挑取典型菌落进行生化试验,如沙门氏菌的三糖铁琼脂试验、赖氨酸脱羧酶试验等;金黄色葡萄球菌的甘露醇发酵试验、血浆凝固酶试验等;大肠杆菌的乙酰甲酰胺试验、山梨醇发酵试验等;志贺氏菌的硫代硫酸盐-枸橼酸盐-胆盐-琥珀酸钠琼脂试验等;李斯特菌的鸟氨酸脱羧酶试验、尿素酶试验等。根据生化反应结果进行鉴定。

1.3.2 荧光定量 PCR 检测 采用商业化的 DNA 提取

试剂盒,按照试剂盒说明书操作,从食品样本中提取细菌基因组 DNA。根据沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、志贺氏菌、李斯特菌的特异性基因序列设计引物,如沙门氏菌的 *invA* 基因、金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因、大肠杆菌的 *uidA* 基因、志贺氏菌的 *i-paH* 基因、李斯特菌的 *hlyA* 基因。由专业生物技术公司合成引物。PCR 反应体系与条件:20 μL 的 PCR 反应体系包含 10 μL 的 2×TaqManMasterMix、0.5 μL 的上游引物(10 μmol/L)、0.5 μL 的下游引物(10 μmol/L)、0.5 μL 的探针(10 μmol/L)、1 μL 的模板 DNA 和 7.5 μL 的无菌水。反应条件为:50℃ 2 min,95℃ 10 min,然后进行 40 个循环的 95℃ 15 s、60℃ 1 min。

1.3.3 微生物培养鉴定法 将采集的食品样本按照无菌操作程序,接种于适宜的增菌培养基中。例如,检测沙门氏菌和志贺氏菌可使用沙门氏菌-志贺氏菌增菌肉汤;检测金黄色葡萄球菌可使用金黄色葡萄球菌增菌肉汤。然后将增菌培养基置于(37±1)℃ 的恒温培养箱中培养 18-24 h。用接种环蘸取增菌培养后的培养物,在相应的选择性平板培养基上进行分区划线或涂布,如沙门氏菌接种于 XLD 琼脂平板,金黄色葡萄球菌接种于 Baird-Parker 平板等,将平板置于(37±1)℃ 的恒温培养箱中培养 18-24 h,观察菌落形态。挑取典型菌落,在显微镜下观察其形态。然后进行革兰氏染色,先用结晶紫初染,再用碘液媒染,随后用酒精脱色,最后用番红复染。染色后在显微镜下观察细菌的染色性质,即革兰氏阳性菌呈蓝紫色,革兰氏阴性菌呈红色。挑取纯培养物,按照相应的方法进行生化试验。例如,检测沙门氏菌可进行三糖铁琼脂试验、赖氨酸脱羧酶试验等;检测金黄色葡萄球菌可进行甘露醇发酵试验、血浆凝固酶试验等;检测大肠杆菌可进行乙酰甲酰胺试验、山梨醇发酵试验等;检测志贺氏菌可进行硫代硫酸盐-枸橼酸盐-胆盐-琥珀酸钠琼脂试验等;检测李斯特菌可进行鸟氨酸脱羧酶试验、尿素酶试验等。根据生化反应结果,结合专业的生化鉴定系统,如 API 生化鉴定系统等,进行鉴定。根据形态观察、染色镜检、生化试验等结果,结合专业微生物鉴定图谱和数据库,对致病菌进行准确的鉴定和分析。

1.4 观察指标 以微生物培养鉴定法检测结果为金标准,比较细菌常量生化鉴定法、荧光定量 PCR 检测及两者联合检测对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大

肠杆菌、志贺氏菌、李斯特菌的检测准确率、灵敏度、特异度及检测时间。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用 F 检验; 计数资料以 $[n(\%)]$ 表示, 组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同检测方法对各种食源性致病菌的检测准确率比较 联合检测对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、志贺氏菌、李斯特菌的检测准确率高于单独检测($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 不同检测方法对各种食源性致病菌的检测灵敏度比较 联合检测对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、志贺氏菌、李斯特菌的检测灵敏度高于单独检测($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 不同检测方法对各种食源性致病菌的检测特异度比较 联合检测对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、志贺氏菌、李斯特菌的检测特异度高于单独检测($P < 0.05$), 见表 3。

2.4 不同检测方法对各种食源性致病菌的检测时间比较 联合检测对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、志贺氏菌、李斯特菌的检测时间短于细菌常量生化鉴定法($P < 0.05$), 见表 4。

2.5 不同检测方法对食源性致病菌检测结果与金标准符合率比较 联合检测对食源性致病菌检测结果与金标准符合率为 95.00%(95/100), 高于细菌常量生化鉴定法、荧光定量 PCR 检测的 82.00%(82/100) 和 87.00%(87/100), 差异有统计学意义($\chi^2 = 49.628$, $P < 0.05$)。

表 1 不同检测方法对各种食源性致病菌的检测准确率比较 $[n(\%)]$

检测方法	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	志贺氏菌	李斯特菌
细菌常量生化鉴定法	17(85.00)	16(80.00)	15(75.00)	16(80.00)	15(75.00)
荧光定量 PCR 检测	18(90.00)	17(85.00)	17(85.00)	17(85.00)	16(80.00)
联合检测	19(95.00)	19(95.00)	19(95.00)	19(95.00)	19(95.00)
χ^2	65.389	70.278	56.745	49.268	55.278
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 2 不同检测方法对各种食源性致病菌的检测灵敏度比较 $[n(\%)]$

检测方法	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	志贺氏菌	李斯特菌
细菌常量生化鉴定法	8(80.00)	6(75.00)	7(70.00)	6(75.00)	6(66.70)
荧光定量 PCR 检测	9(90.00)	7(87.50)	9(90.00)	7(87.50)	8(88.90)
联合检测	19(95.00)	19(95.00)	19(95.00)	19(95.00)	19(95.00)
χ^2	60.278	49.287	66.028	59.268	45.327
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 3 不同检测方法对各种食源性致病菌的检测特异度比较 $[n(\%)]$

检测方法	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	志贺氏菌	李斯特菌
细菌常量生化鉴定法	18(90.00)	17(85.00)	16(80.00)	17(85.00)	16(80.00)
荧光定量 PCR 检测	18(90.00)	17(85.00)	17(85.00)	17(85.00)	17(85.00)
联合检测	19(95.00)	19(95.00)	19(95.00)	19(95.00)	19(95.00)
χ^2	30.568	46.235	44.725	41.726	38.629
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 4 不同检测方法对各种食源性致病菌的检测时间比较 $(\bar{x} \pm s, h)$

检测方法	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	志贺氏菌	李斯特菌
细菌常量生化鉴定法	72.53±5.25	75.35±4.86	73.83±5.54	74.23±5.35	73.54±5.44
荧光定量 PCR 检测	5.24±0.36	5.34±0.48	5.45±0.33	5.44±0.38	5.33±0.46
联合检测	6.83±0.58	6.93±0.65	7.04±0.57	7.17±0.65	7.06±0.58
F	108.105	103.650	114.230	100.890	112.320
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

在食品安全领域,食源性致病菌的检测是保障公众健康和维护食品安全的关键环节^[7,8]。荧光定量 PCR 作为一项分子生物学技术,在食源性致病菌检测中具有显著优势,能快速、灵敏地检测目标菌的特定核酸序列,为早期预警和快速溯源提供有力支持^[9,10]。细菌常量生化鉴定法则基于细菌代谢产物的差异,通过一系列标准化的生化反应,提供细菌的表型特征信息,对于未知菌种的初步鉴定和分类具有不可替代的作用^[11]。然而,单一检测方法往往存在局限性。荧光定量 PCR 虽然灵敏度高,但在复杂样品中可能出现非特异性扩增,导致假阳性结果;而细菌常量生化鉴定法受细菌生长状态和培养条件影响较大,鉴定周期相对较长,且对于一些生化特性相似的菌种难以区分^[12,13]。因此,将两种方法联合应用,可以充分发挥各自的优势,弥补单一方法的不足,提高检测的准确性和可靠性。

本研究结果显示,细菌常量生化鉴定法联合荧光定量 PCR 检测的准确率高于单一检测方法($P<0.05$)。分析认为,两种方法在检测原理上具有互补性。荧光定量 PCR 基于致病菌的特异性基因序列进行扩增检测,具有极高的灵敏度和特异性,能够快速检测出样品中的目标致病菌,甚至在低丰度的情况下也能准确识别。细菌常量生化鉴定法则通过一系列标准化的生化反应,提供细菌的表型特征信息,能够对目标菌进行更全面的鉴定,尤其对于一些基因检测可能出现假阳性或假阴性的菌种,生化鉴定可以进一步验证其真实性^[14]。二者联合应用时,既利用了荧光定量 PCR 的快速、灵敏和高特异性,又结合了细菌常量生化鉴定法的全面性和准确性,从而显著提高了检测的准确率。相关研究也表明,联合检测方法在复杂样品中能够更准确地鉴定多种食源性致病菌,减少误判和漏检的情况^[15]。此外,细菌常量生化鉴定法联合荧光定量 PCR 检测的灵敏度高于单一检测方法($P<0.05$)。主要是因为,荧光定量 PCR 的高灵敏度特性。荧光定量 PCR 通过扩增目标菌的特异性基因序列,能够在极低浓度下检测到致病菌的存在。尤其在样品中致病菌含量较低或背景微生物复杂的情况下,荧光定量 PCR 可以快速捕获目标基因信号,从而提高检测的灵敏度^[16]。而细菌常量生化鉴定法在某种程度上可以对 PCR 检测结果进行验证和补充,进一步确保检测结果的可靠性。当荧光定量 PCR 检测到目标基因时,细菌常量生化鉴定法

可以通过对培养后的细菌进行生化反应分析,确认其是否为真正的致病菌^[17]。这种联合检测模式充分发挥了荧光定量 PCR 的高灵敏度优势,同时借助细菌常量生化鉴定法进行结果验证,有效避免了因单一方法导致的假阳性结果,从而提高了整体检测的灵敏度。同时,细菌常量生化鉴定法联合荧光定量 PCR 检测的特异度高于单一检测方法($P<0.05$)。分析其原因为,两种方法在特异性上发挥协同作用。荧光定量 PCR 通过特异性引物和探针与目标基因序列结合,实现对致病菌的精准检测,具有很高的特异性。然而,由于样品中可能存在与其他微生物基因序列相似的片段或 PCR 反应中的非特异性扩增,可能导致假阳性结果。细菌常量生化鉴定法则基于细菌的生化特性进行鉴定,通过一系列特异性的生化反应,能够区分不同种类的细菌^[18]。当联合使用这两种方法时,先利用荧光定量 PCR 快速筛选出可能含有目标致病菌的样品,再通过细菌常量生化鉴定法对阳性结果进行进一步验证,从而有效排除非特异性干扰,提高检测的特异度^[19]。此外,联合检测所用时间短于细菌常量生化鉴定法($P<0.05$)。这主要得益于荧光定量 PCR 在基因扩增过程中能够在短时间内完成对目标基因的检测,通常只需数小时即可得到结果。在联合检测中,荧光定量 PCR 可以快速对样品进行初步筛查,快速识别出可能含有致病菌的样品,从而提前锁定目标,减少后续生化鉴定的工作量和时间成本。对于荧光定量 PCR 检测结果为阴性的样品,可以快速排除,避免不必要的生化鉴定步骤,从而整体上缩短了检测周期^[20]。此外,联合检测与金标准的符合率也高于单一检测方法($P<0.05$)。分析认为,两种方法联合使用时,既发挥了荧光定量 PCR 的快速、灵敏优势,又借助细菌常量生化鉴定法对检测结果进行验证和补充,使得检测结果更加全面、准确,与金标准的符合率自然更高。这种联合检测模式在保持较高检测效率的同时,最大限度地接近金标准的检测效果,为食源性致病菌的准确检测提供了有力保障。

综上所述,细菌常量生化鉴定法联合荧光定量 PCR 检测可显著提高多种食源性致病菌的检出率,缩短检测时间,在食源性致病菌检测中具有重要的应用价值。

参考文献:

[1]孙雪奇,尹玮璐,蒋佳希,等.三重微滴数字 PCR 定量检测即食米粉中致病菌方法研究[J].中国食品卫生杂志,2023,35(11):

1571-1578.

[2]马嘉琦,孙波,马红梅,等.产气荚膜梭菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 特异性引物设计和方法验证[J].中国食品卫生杂志,2024,36(2):147-155.

[3]董德荣,白森,白宇超,等.多重荧光定量 PCR 法检测食品中的沙门菌、副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌[J].军事医学,2023,47(4):293-296.

[4]彭延,余波,张静玲,等.xTAG 液相芯片技术检测多种食源性致病菌方法的研究[J].公共卫生与预防医学,2022,33(5):54-56.

[5]王西,胡仲皓,杜晓莉,等.建立基于 fimY 基因的 LAMP 技术检测食源性沙门菌[J].中国动物传染病学报,2022,30(5):100-106.

[6]陈丹妮,韩营营,李杰,等.利用实时荧光定量聚合酶链式反应快速检测人及动物粪便中的沙门菌[J].疾病监测,2020,35(2):151-155.

[7]徐秋琼,单桂花,彭明益,等.广州市黄埔区首例韦泰夫雷登沙门氏菌食物中毒事件的溯源检测[J].医学动物防制,2020,36(3):300-304.

[8]吕娇娇,晋玲,王艳,等.甘肃省黄芪细菌性叶斑病原的分离和鉴定[J].中国现代中药,2023,25(3):568-573.

[9]杨俐,邓阳川,苏燕燕,等.冬虫夏草产地土壤中耐砷细菌的分离、鉴定及耐砷能力测定[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(7):2563-2571.

[10]李晨晨,孙重秀,刘春甫,等.2023 年上海市金山区食源性疾病监测及致病菌耐药性分析[J].食品安全质量检测学报,2025,16(5):302-309.

[11]黎梓怡,施春雷.泛基因组学在食源性致病菌检测及其耐

药监测中的应用[J].食品安全质量检测学报,2022,13(14):4472-4478.

[12]李羽翡,芮文君,傅雷,等.兰州市餐饮食品、餐具食源性致病菌监测结果分析[J].中国食物与营养,2021,27(7):12-16,89.

[13]高庆辉,董晓枫,张瑞,等.2021-2022 年沧州市市售肉与肉制品食源性致病菌监测[J].中国国境卫生检疫杂志,2024,47(1):45-47.

[14]章乐怡,楼辉煌,林谦阁,等.2021-2022 年温州市细菌性食源性疾病暴发事件流行病学及病原学特征分析[J].中国人兽共患病学报,2023,39(10):951-956.

[15]郑金华,尹珠,宋浩,等.2018 年-2021 年泰安市抽检食品中食源性致病菌污染状况分析[J].中国卫生检验杂志,2022,32(13):1606-1610.

[16]何玲玲,刘颜,吴晓红,等.2014-2020 年绵阳市食品中食源性致病菌监测结果分析[J].医学动物防制,2022,38(8):746-749.

[17]余峰玲,许艳平,祝雯雯,等.徐州市市售生肉中 3 种食源性致病菌污染及药敏情况分析[J].中国卫生检验杂志,2022,32(19):2354-2357.

[18]金萍,江晓,叶艳华,等.南京市肠道感染性腹泻样本中食源性致病菌分离及耐药监测分析[J].中国临床研究,2021,34(8):1077-1080.

[19]王伟杰,华正昱,孙婷婷.辽宁省餐饮食品中食源性致病菌监测结果分析[J].职业与健康,2022,38(11):1482-1485,1490.

[20]杨梦婕,徐玲丽,马学军,等.肉及肉制品中 6 种致病菌的 GeXP 多重 PCR 检测[J].食品研究与开发,2021,42(13):168-173.

收稿日期:2025-5-27;修回日期:2025-6-24

编辑/肖婷婷