

Rapid PCR Detection of *Salmonella* in Animal Feces Samples

Zhiming Pan, Yanqing Zhou, Beibei Liu, Xinan Jiao*

Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Email: pzmsmq@yahoo.com.cn

Abstract: The study intended to establish a rapid, sensitive and accurate detection technique for *Salmonella* in animal feces. A set of primers was devised according to *stn* gene in *Salmonella* to detect *Salmonella* of various serovars by PCR amplification. The sensitivity and accuracy of this method and the detection limit in the artificial feces samples were studied. While we used this method to detect *Salmonella* in 100 feces samples, conventional culture technique was used to demonstrate the validity of this method. The primers used in this experiment were specific to *Salmonella* and the band of 260 bp was obtained. The 43.85 pg DNA of *Salmonella* could be detected by PCR. The detection sensitivity was 1 cfu/ml in pure culture. The detection limit of artificially contaminated feces samples was 10^3 cfu/ml without using enrichment procedure while the detection limit was 1 cfu/ml using enrichment procedure. The PCR method detected *Salmonella* in 18 out of the 250 samples, and conventional culture technique supported the result. Thus the *stn* primers are specific for *Salmonella* species and the PCR method presented may be suitable for the detection of *Salmonella* in feces.

Keywords: *Salmonella*; *stn*; PCR; feces

动物粪便沙门菌 PCR 检测技术的研究

潘志明, 周延庆, 刘蓓蓓, 焦新安*

扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州 225009

Email: pzmsmq@yahoo.com.cn

摘要: 建立一种动物粪便样品中快速、特异、敏感的沙门菌检测方法。根据沙门菌肠毒素 *stn* 基因设计一对引物, 对不同血清型的沙门菌和非沙门菌进行 PCR 检测, 并对该 PCR 方法进行反应的灵敏度、模拟粪便样品的最低检出限测定及粪便样品的检测。运用该方法对 250 份粪便样品进行检测, 同时用传统方法进行验证。结果显示, 设计的引物特异性好, 能专一性扩增出约 260 bp 条带; 该引物灵敏度高, 能进行有效检测的核酸最低起始量为 43.85 pg, 纯菌检测灵敏度达 1 cfu/ml。接种沙门菌到粪便样品中, 当粪便样本中菌量达 10^3 cfu/ml 以上时, 不需要增菌, 沙门菌可立即检出, 增菌后检出限可以达到 1 cfu/ml。PCR 检测 250 份样品共检出 18 份阳性, 同时传统细菌培养方法证明结果正确。本研究所建立的方法可用于粪便样品沙门菌的检测, 为环境生物污染控制和保证人类健康提供了有用工具。

关键词: 沙门菌; *stn*; PCR; 粪便

1 引言

自 1885 年 salmon 发现沙门菌以来, 沙门菌一直是动物和人类的一种主要的食源性致病菌^[1]。它不仅导致鸡白痢、鸡副伤寒、仔猪副伤寒、流产等动物疾病, 还能使人类发生伤寒、副伤寒、败血症、胃肠炎和食物中毒。有资料表明, 我国细菌性食物中毒中 70%~80% 是由沙门菌引起的^[2]。因此, 建立一种可靠、快速并且在国际上通用的检测方法来检测这种致

病菌就至关重要。

目前对沙门菌的快速检测主要集中在免疫酶试验、免疫扩散法、乳胶凝集试验和免疫荧光法及酶联免疫吸附试验 (ELISA)、聚合酶链式反应 (PCR) 技术等方法上^[3-4]。自从美国科学家 Kary Mullis 首创了体外酶促扩增 DNA 技术以来, 国内外一些学者对应用 PCR 技术检测沙门菌取得了显著成果。本实验以沙门菌肠毒素 *stn* 基因作为靶基因, 对沙门菌属 A-F 群 17 株沙门菌和 17 株非沙门菌进行了特异性检测, 并进行了敏感性试验; 同时进行了模拟污染试验及粪便样品的检测, 均取得了满意的结果。

1 材料和方法

收稿日期:

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30871860), “十一五”国家科技支撑计划 (2007BAD40B01), 江苏省高校“青蓝工程”资助项目。

*通讯作者

1.1 实验用菌株

沙门菌属 A-F 群各标准菌株：维尔肖沙门菌 (*S.virchow*)、习志野沙门菌 (*S.narashino*)、浦那沙门菌 (*S.poona*)、阿柏丁沙门菌 (*S.aberdeen*)、甲型副伤寒沙门菌 (*S.paratyphi A*)、加明那拉沙门菌 (*S.gaminara*)、吉韦沙门菌 (*S.give*)、鸡白痢沙门菌 (*S.pullorum*)、赛罗沙门菌 (*S.cerro*)、鸭沙门菌 (*S.anatum*)、绵羊流产沙门菌 (*S.abortusovis*)、山夫登堡沙门菌 (*S.senftenberg*)、海德堡沙门菌 (*S.heidelberg*)、鼠伤寒沙门菌 (*S.typhimurium*)、纽波特沙门菌 (*S.newport*) 和肠炎沙门菌 (*S.enteritidis*) 由扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室保存。伤寒沙门菌 (*S.typhi*) 由扬州大学畜禽传染病学农业部重点开放实验室保存。大肠杆菌等非沙门菌株由扬州市疾病预防控制中心巢国祥老师惠赠。

1.2 试剂

dNTPs、Buffer、Taq 酶和 DNA 2000marker 购自宝生物工程(大连)有限公司；缓冲蛋白胨水 (BPW)、氯化镁孔雀绿肉汤 (MM, RV Medium)、木糖赖氨酸脱氧胆酸琼脂 (XLD 琼脂) 及亚硫酸铋琼脂 (BS 琼脂) 均购自青岛海博生物技术有限公司；尿素、氧化钾、蛋白胨水 (靛基质)、赖氨酸脱羧酶等微量生化反应管购自杭州微生物试剂有限公司；三糖铁琼脂购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.3 引物设计合成

参照 Makino 等^[5]的报道，选取沙门菌肠毒素 *stn* 基因设计引物，长度为 260 bp。引物 I：5'-CTTTGGTTCGTAATAAAGCG-3'，引物 II：5'-TGCCCAAAGCAGAGATTC-3'。由金思特科技(南京)有限公司合成。

1.4 PCR 扩增及电泳鉴定

DNA 提取：取 1 ml 细菌培养液至 1.5 ml 的离心管中，10000 rpm 离心 5 min 弃上清，用 200 μ l SW 重复洗 2 次，10000 rpm 离心 5 min 弃上清，加 200 μ l SW 悬浮，隔水煮沸 20 min，取出立即置于冰上，10000 rpm 离心 5 min，取上清进行 PCR 扩增，或置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

PCR 反应体系：10 \times Buffer 5 μ l，10 mM dNTPs 1 μ l，10 mM *stn1* 和 *stn2* 分别为 2 μ l，模版 DNA 为

7 μ l，Taq 酶 (5U/ μ l) 0.5 μ l，用 SW 补足至 50 μ l。

PCR 反应条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min，94 $^{\circ}$ C 变性 1 min，55 $^{\circ}$ C 退火 1 min，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，25 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 产物电泳鉴定：PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离，取 8 μ l PCR 产物进行点样，80V 电泳 40 min 后，取出凝胶，在凝胶成像仪上观察，260 bp 处出现特异性扩增条带者为阳性，否则为阴性。

1.5 PCR 特异性试验

将沙门菌属 A-F 群中的 17 株标准株和非沙门菌的 17 株细菌分别接种至 LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 培养 8-12 h，取 1 ml 菌液按照 1.4 方法进行 PCR 扩增及电泳鉴定，观察结果。

1.6 PCR 敏感性试验

挑取鼠伤寒沙门菌单菌落接种至 LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 培养 8-12 h，取 1 ml 菌液按照 1.4 方法提取模版，用分光光度计测定 DNA 含量，然后作 10 倍梯度稀释 (10^0 - 10^{-7})，每个稀释度各取 7 μ l 按照 1.4 方法分别进行 PCR 扩增，并对扩增产物进行电泳鉴定。

取新鲜培养的鼠伤寒沙门菌菌液 5000 rpm 离心 5 min，用 PBS 重悬后作 10 倍梯度稀释 (10^0 - 10^{-9})，每个稀释度各取 1 ml 接种 9 ml BPW 中，37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 各取 100 μ l 至 10 ml RV 肉汤中，42 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后，取 1 ml 菌液按照 1.4 方法进行 PCR 扩增及电泳鉴定。同时每个稀释度各取 100 μ l 用 2 块 LB 平板进行菌落计数，观察 PCR 检测的最低检测度。

1.7 模拟样品中沙门菌检出限的检测

取健康鸡粪便样品，并立即运用传统细菌培养方法确定有无沙门菌，同时取 1 g 粪便于 9 ml BPW 中进行震荡稀释混匀，做成稀便样本，10 倍梯度稀释 (10^0 - 10^{-8}) 鼠伤寒沙门菌过夜培养物，做每个稀释度沙门菌计数，将各浓度沙门菌稀释液加到稀释的粪便样本中做成模拟粪便样本。对加入菌液各浓度的模拟粪便样本直接各取 1 ml 菌液按照 1.4 方法进行 PCR 扩增及电泳鉴定。同时，模拟粪便样本 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h，然后各取 100 μ l 至 10 ml RV 肉汤中，42 $^{\circ}$ C 培养 24 h，取 1 ml 菌液按照 1.4 方法进行 PCR 扩增及电泳鉴定。

1.8 样品的检测

取 1g 粪便样品加入 9 ml BPW 中, 37°C 培养 12 h 取 100 μl 至 10 ml RV 肉汤中, 42°C 培养 24 h 后, 取 1ml 菌液按照 1.4 方法进行 PCR 扩增及电泳鉴定。

参照 GB/T 4789.4-2008^[6]分离沙门菌的程序, 用铂耳环取 PCR 阳性增菌液, 三区划线接种于一个 XLD 琼脂及一个 BS 琼脂, 于 37°C 培养 18 h-24 h (XLD 琼脂) 或 40 h-48 h (BS 琼脂), 观察生长的菌落。自选择性平板上直接挑取数个可疑菌落, 用灭菌铂丝分别接种三糖铁 (TSI) 琼脂, 同时接种蛋白胨水 (供做靛基质试验)、尿素琼脂 (pH7.2)、氰化钾(KCN)培养基和赖氨酸脱羧酶培养基及对照培养基各一管, 于 36°C ± 1°C 培养 18-24 h, 必要时可延长至 48 h, 判定结果。

2 结果与分析

2.1 特异性试验结果

沙门菌属 A-F 群中的 17 株标准株经 PCR 扩增, 分别出现 260 bp 大小的特异性条带, 如图 2-1 所示。

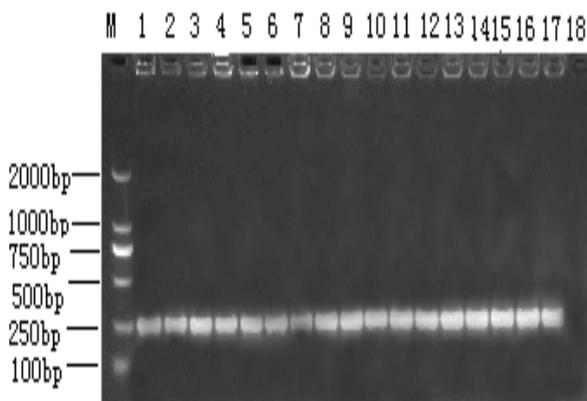


Figure 2-1. Specificity test of PCR

图2-1 特异性试验

M. Marker 1. *S. enteritidis* 2. *S. typhimurium* 3. *S. newport*
 4. *S. virchow* 5. *S. narashino* 6. *S. poona* 7. *S. aberdeen*
 8. *S. paratyphi A* 9. *S. gaminara* 10. *S. give* 11. *S. pullorum*
 12. *S. cerro* 13. *S. anatum* 14. *S. abortusovis*
 15. *S. senftenberg* 16. *S. heidelberg* 17. *S. typhi*
 18. Negative control

鼠伤寒沙门菌经 PCR 扩增, 在 260 bp 处出现特异性条带; 而非沙门菌的 17 株细菌经 PCR 扩增均无特异性条带出现, 如图 2-2 所示。



Figure 2-2. Specificity test of PCR

图2-2 PCR特异性试验结果

M.marker 1.*S.typhimurium* 2.*enteroinvasive Escherichia coli*
 3.*enteropathogenic Escherichia coli* 4.*enterohemorrhagic Escherichia coli*
 5.*Escherichia coli ATCC25922* 6.*Streptococcus faecalis*
 7.*Staphylococci* 8.*Bacillus cereus* 9.*Lactic acid bacillus*
 10.*Pseudomonas aeruginosa* 11.*Klebsiella pneumoniae*
 12.*Proteus vulgaris* 13.*Proteus mirabilis* 14.*Enterobacter cloacae*
 15.*Citrobacter freundii* 16.*Shigella dysenteriae* 17.*Shigella flexneri 2a*
 18.*Providencia* 19.Negative control

2.2 敏感性试验结果

将鼠伤寒沙门菌新鲜培养菌液制备模板后, 用分光光度计法测得 *S.typhimurium* 模板浓度为 438.5 μg/ml。模板进行 10 倍稀释, 取不同稀释度的模板进行 PCR 扩增。如图 2-3 所示, 细菌在 10⁻⁴ 仍可检测到目的条带, 由此可得 PCR 方法可检测到 43.85 pg 沙门菌 DNA。

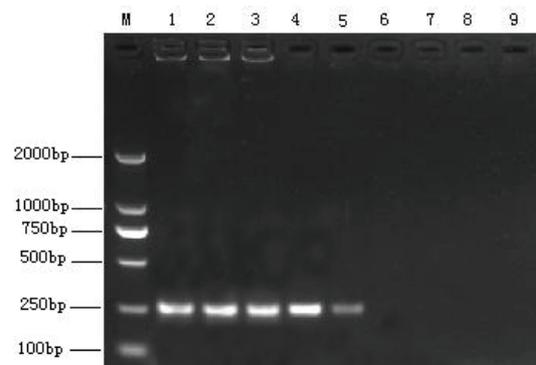


Figure 2-3. Sensitivity test results of Salmonella

图2-3 PCR方法检测沙门菌的敏感性

M.marker 1. *S.typhimurium*⁰ 2. *S.typhimurium*10⁻¹
 3. *S.typhimurium*10⁻² 4. *S.typhimurium*10⁻³
 5. *S.typhimurium*10⁻⁴ 6. *S.typhimurium*10⁻⁵
 7. *S.typhimurium*10⁻⁶ 8. *S.typhimurium*10⁻⁷
 9. Negative control

将鼠伤寒沙门菌新鲜培养菌液 10 倍稀释,不同稀释度的菌液取 100 μl 涂布平板计数,同时每个稀释度各取 1 ml 接种 9 ml BPW 中,37℃培养 12 h 各取 100 μl 至 10 ml RV 肉汤中,42℃培养 24 h 后,进行 PCR 检测,如图 2-4 所示,在 10⁻⁸ 稀释度仍有阳性条带说明本方法的检测限可达到 1 个 cfu。

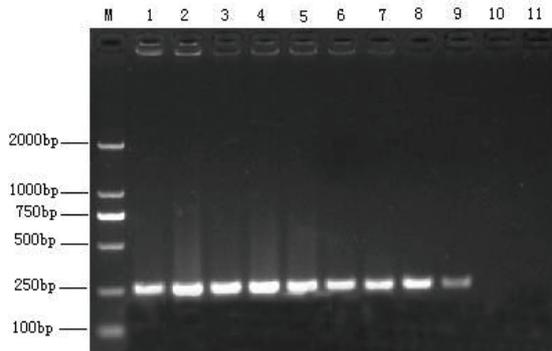


Figure 2-4. The limit of PCR detection

图2-4 PCR检测限

M.marker 1. *S.typhimurium*⁰ 2. *S.typhimurium*10⁻¹
 3. *S.typhimurium*10⁻² 4. *S.typhimurium*10⁻³
 5. *S.typhimurium*10⁻⁴ 6. *S.typhimurium*10⁻⁵
 7. *S.typhimurium*10⁻⁶ 8. *S.typhimurium*10⁻⁷
 9. *S.typhimurium*10⁻⁸ 10. *S.typhimurium*10⁻⁹
 11. Negative control

2.3 模拟样品中沙门菌检出限的检测

新鲜培养的纯菌培养液采用生理盐水 10 倍梯度稀释,不同稀释度的菌液取 100 μl 涂布平板计数,得到沙门菌起始浓度为 10⁸ cfu /ml,同时每个稀释度各取 1ml 增菌培养,进行 PCR 检测。当人工污染粪便量达到 10³ cfu /ml 以上时,不需要增菌,可直接从粪便样本中检出沙门菌,如图 2-5 所示。而增菌后检出限可以达到 1 cfu /ml。

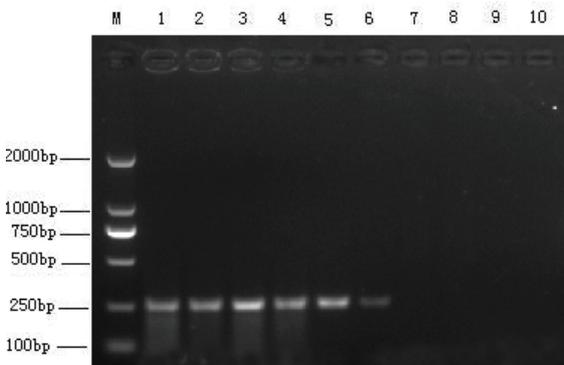


Figure 2-5. The detection results of artificial contamination samples

图2-5 模拟污染检测结果

M.marker 1. *S.typhimurium*⁰ 2. *S.typhimurium*10⁻¹
 3. *S.typhimurium*10⁻² 4. *S.typhimurium*10⁻³
 5. *S.typhimurium*10⁻⁴ 6. *S.typhimurium*10⁻⁵
 7. *S.typhimurium*10⁻⁶ 8. *S.typhimurium*10⁻⁷
 9. *S.typhimurium*10⁻⁸ 10. Negative control

2.4 样品的检测

在所检测的 250 份样品中,鸡、鸭、鹅、猪和人类粪便样品各 50 份,共检测到 18 份阳性,其中鸡、鸭、鹅、猪和人分别为 4 份、3 份、5 份、4 份和 2 份。参照 GB/T 4789.4-2008^[6]分离沙门菌的程序验证均为沙门菌属。

3 讨论

沙门菌感染为肠道传染病,病菌经口进入体内而致病。带有病菌的人和动物都是本病的传染源。一般病菌寄生在人及动物的肠道内,可长期存在,并随粪便排出体外,这种传染源难以发现。要发现带菌者,最好的办法就是对粪便进行培养后检测。沙门菌的检测通常采用传统的细菌培养法,从样品的采集、运送、增菌培养,分离培养、生化鉴定,到最后的血清分型,至少要用 3~5 d 的时间,周期长,同时受到培养鉴定中许多因素的影响,阳性率不高。而 PCR 技术是一种快速、简便、特异、灵敏检测沙门菌类的方法。目前国内外常选用的靶基因有 16S rDNA 基因、组氨酸转运操纵子基因、*invA* 和 *invB* 基因、*hilA* 基因、*fimA* 基因、*hns* 基因、*spv* 基因、*iroB* 基因、*stn* 基因等。2003 年, Zierner^[7]等对 16S rDNA、*hilA*、*stn*、*invA*、*iroB*、组氨酸转运操纵子等九对引物进行了特异性评价,认为只有 16S rDNA、*stn*、*hut* 基因适用于粪便样品中沙门菌的 PCR 扩增。

本试验选用 *stn* 基因作为目的基因进行方法建立及检测,具有良好的特异性。本 PCR 方法对纯菌的检测灵敏度达 1cfu /ml,当粪便样本中志贺菌数达 10³ cfu /ml 以上时,不需要进行增菌,PCR 即可检出。而增菌后检出限可以达到 1 cfu /ml,与 Makino 等^[5]的方法检测限一致。在 PCR 检测的 250 份样品中,鸡、鸭、鹅、猪和人粪便样品均能检测到沙门菌,而 PCR 与国标方法相符合说明本试验建立的 PCR 方法适用于动物粪便样品的检测。

本试验建立应用的动物粪便中沙门菌的 PCR 检测方法具有快速、灵敏度高、特异性强等优点，适合沙门菌的检测，为沙门菌的监测提供了新方法。

参考文献:

- [1] Humphrey T (2000) Public-health aspects of *Salmonella* infection. *Salmonella in Domestic Animals* (Way C & Way A, eds), pp. 245–263. CABI Publishing, Oxon, UK.
- [2] Zeng Xiao-fang, Inspection and Control of *Salmonella* Pollution in Domestic Animals Products[J]. *Sichuan Animal and Veterinary Sciences*, 2003,3 (04) :28- 29.
曾晓芳. 畜产品中沙门氏菌污染的检测与控制[J]. *四川畜牧兽医*, 2003,3 (04) :28- 29.
- [3] HUANG Jin lin, JIAO Xin an, WEN Qi yi, et al. Application of polymerase chain reaction for rapid detection of *Salmonella*[J]. *Journal of Yanzhou University (Agriculture and Life Sciences Edition)*, 2002,23 (3) :5-7.
黄金林,焦新安,文其乙,等.应用聚合酶链反应快速检测沙门氏菌[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)* 2002,23 (3) :5-7.
- [4] Wen Qiyi, Jiao Xin-an, Liu Xiufan, et al. A Direct ELISA for the Detection of *Salmonella* spp. in Different Specimens[J]. *CHINESE JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE*, 1995,15 (2) :105-111.
文其乙,焦新安,刘秀梵,等.直接 ELISA 检测沙门氏菌方法的建立及其应用研究[J]. *中国兽医学报*, 1995,15 (2) :105-111.
- [5] Makino S, Kurazono H, Chongsanguam M, et al. Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. *J Vet Med Sci*. 1999,61(11): 1245-1247.
- [6] Microbiological examination of food hygiene—Examination of *Salmonella*. [S]. GB/T 4789.4-2008.3-4.
中华人民共和国国家标准. 食品卫生微生物学检验-沙门氏菌检验. GB/T 4789.4-2008.3-4.
- [7] Ziemer CJ, Steadham SR. Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. *Lett Appl Microbiol*. 2003,37(6):463-469.