

PCR 技术在快速检测食源性致病菌中的应用

何维凤

(广西南宁市邕宁区疾病预防控制中心, 广西南宁 530299 E-mail: 524417747@qq.com)

摘要: 食品污染引起的疾病是目前世界上公共卫生问题之一, 食源性致病菌是食物中毒和食源性疾病暴发的重要因素, 是食品安全的重要风险隐患。如何快速准确检测食源性致病菌是控制食物中毒和食源性疾病暴发的关键环节。笔者介绍并分析 PCR 技术在食源性致病菌快速检测中的应用。

关键词: 聚合酶链反应; 致病菌; 食品微生物学

中图分类号: R446.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2014)01-0102-03
doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2014.01.060

随着生活水平的提高, 食品安全问题受到人们越来越多的重视, 已经成为社会关注的热点之一。据世界卫生组织(WHO)统计, 2005 年世界范围内有 150 万人死于腹泻等疾病, 其中有 70% 为食源性因素造成^[1]。在我国食源性疾病暴发事件中, 微生物性食物中毒的暴发事件数和患者数最多, 占总数的 40.09% 和 61.92%^[2], 食源性微生物是导致食源性疾病的主要原因。传统的检测方法繁琐复杂、周期较长, 不能实现有效的监测、预防作用, 因此快速而准确地检测与鉴定食品中的病原菌是及时有效控制和预防病原菌传播、预防食物中毒的重要前提。

PCR 技术即聚合酶链反应 (polymerase chain reaction) 是 1985 年创立的一种体外酶促扩增特异性片段的方法。该技术自问世以来, 就以惊人的速度广泛应用于生命科学的众多领域。目前在食品领域中致病微生物、转基因食品的检测等方面的应用也越来越受关注。笔者对 PCR 技术在食源性致病菌快速检测中的应用综述如下。

1 单核细胞增生李斯特菌的检测

李斯特菌广泛存在于自然界中。目前国际上公认的李斯特菌属共有 6 个种, 即单核细胞增多性李斯特菌、伊万诺夫李斯特菌 (又称为绵羊李斯特菌)、英诺克李斯特菌、威尔斯李斯特菌、西尔李斯特菌和格氏李斯特菌。其中在李斯特菌属的分类种中, 单核细胞增生李斯特菌 (简称单增李氏菌) 对人类致病性最强, 是一种重要的食源性致病菌, 它能引起人、畜的李斯特菌病, 感染后主要表现为败血症、脑膜炎和单核细胞增多等, 因此, 李斯特菌的检测也受到越来越多的关注。谭炳乾等^[3] 采用 PCR 扩增单核细胞增生李斯特菌的溶血素 LLO 编码基因 (hly) 片段的方法, 检测 81 份冷冻食品中的单核细胞增生李斯特菌, 结果与传统的细菌分离方法一致; 冯家望等^[4] 通过建立多重巢式 PCR 联合检测体系快速检测食品中单增李斯特菌, 结果多重 PCR 的灵敏度达到 1×10^2 cfu/ml, 巢式 PCR 的灵敏度达到 1×10 cfu/ml, 对 6 类冷冻冷藏食品 3 439 份样品中的单增李斯特菌进行检测, 结果准确, 同时有效缩短了检验周期。王耀等^[5] 应用复合 PCR 结合变性高效液相色谱 (DHPLC) 技术建立食品中单核细胞增生李斯特菌、绵羊李斯特菌和英诺克李斯特菌的快速高通量检测方法, 为预防李斯特菌食源性疾病的暴发和流行起到了积极的作用。

2 金黄色葡萄球菌的检测

金黄色葡萄球菌是引起细菌性食物中毒的主要病原菌, 也是化脓感染最常见的病原菌之, 由金黄色葡萄球菌产生的肠毒素可引起食物中毒、肺炎、心包炎和脑膜炎甚至败血症等相关疾病^[6]。从临床分离金黄色葡萄球菌, 约 1/3 产生肠毒素, 而且该肠毒素在 100 °C 条件下经过 30 min 热处理仍能保持致病性。万婧等^[7] 选用金葡萄的肠毒素 A 基因与金葡萄的种特异性基因 nuc 作为靶标设计特异性引物, 建立水产品中金色葡萄球菌的双重 PCR-DHPLC 方法, 检测 240 份样品, 结果与国标法无显著性差异, 同时通过对肠毒素基因的分析, 判断出该菌株致病性的强弱; 苏明权等^[8] 根据金黄色葡萄球菌 femB 基因

序列设计引物和探针建立实时荧光定量 PCR 检测金黄色葡萄球菌的方法, 检测 20 份模拟样品, 结果与分离培养符合率为 100%; 杨玉军等^[9] 利用多重 PCR 扩增金黄色葡萄球菌 SEA、SEB、SEC 和 SED 基因片段的方法, 同时检测金黄色葡萄球菌四型肠毒素基因, 比传统 PCR 方法省时省力, 可以弥补传统 PCR 法的不足, 为快速检测产肠毒素金黄色葡萄球菌及追踪金黄色葡萄球菌食物中毒的源头提供一种检测手段。

3 蜡样芽孢杆菌的检测

蜡样芽孢杆菌是一种革兰阳性杆菌, 能形成芽孢, 在周围环境中广为存在, 为条件致病菌, 极易污染食物而引起食物中毒, 因此需要发展一种快速的检测方法, 把危险菌株从非致病性的菌株中区别开来, 如果是传统的培养方法, 整个过程可能要 5~7 d 的时间, 对于食物中毒可疑因子的判断及患者的及时治疗影响很大, 因此及时快速准确的检测方法应运而生。王振国等^[10] 以 cereolysin AB 基因为目的基因设计引物建立 SBYR Green 1 的实时 PCR 方法, 其最低检出限可达 8 CFU/ml, 且无需电泳可直接对样品进行检测; 王红等^[11] 以溶血素 (HBL) 基因和非溶血素 (NHE) 基因为目的基因进行荧光 PCR 检测, 检测 34 株蜡样芽孢杆菌溶血素基因, 符合率 97.1%, 从样品的处理到结果的报告耗时仅为 2~3 h, 较传统方法大大缩短了检测周期, 为及时处理食物中毒赢取宝贵的时间。

4 沙门氏菌的检测

沙门氏菌是感染人和动物的重要病原菌之一, 常污染肉、乳和禽等动物性食品, 人体会因为直接接触沙门氏菌或食用被其污染的食物而感染, 引起腹泻、呕吐等急性肠胃炎症状, 严重的可引起死亡。在世界各国的各类细菌性食物中毒事件中, 由沙门氏菌引起的食物中毒常居榜首^[12], 目前传统的检测方法费时繁琐, 需 4~7 d 才能完成, 因此 PCR 技术成为沙门氏菌检测研究的热点。钟伟军等^[13] 根据编码鼠伤寒沙门氏菌肠毒素 stn 基因的核苷酸序列设计 1 对引物和荧光探针, 建立了荧光定量 PCR 快速检测食品中沙门氏菌的方法, 具有较高的特异性和敏感性; 周晓清等^[14] 选取沙门氏菌的 invA 基因为目的基因设计引物建立一步法逆转录荧光定量 PCR 检测食源性沙门氏菌, 该方法具有特异性强、灵敏度高、操作简便等优点, 检测人工污染猪肉中的沙门氏菌与微生物传统计数结果的符合率为 100%, 并可在 5 h 内完成所有操作, 非常适用于食源性沙门氏菌的快速检测。

5 志贺氏菌的检测

志贺氏菌属是人类细菌性痢疾最为常见的病原菌, 俗称痢疾杆菌, 可通过水和食物传播腹泻和痢疾等疾病, 严重危害人们的身体健康, 建立志贺氏菌快速准确、实用的检测方法尤为重要。邱杨等^[15] 根据志贺氏菌 ipaH 基因序列设计了特异引物和探针进行荧光 PCR, 检测样品 437 份, 检测结果与国标法一致; 赵丽华等^[16] 根据 ipaH 基因序列, 设计引物和分子信标探针, 建立志贺氏菌的实时 PCR 快速检测技术, 检测 20 份标本, 准确率和特异性均为 100%, 时间约 2 h, 大大缩短了检测周期, 可用于志贺氏菌食物中毒快速诊断和食品微生物检测, 为食源

性疾病的早期、准确诊断提供新的检测手段。

6 致病性大肠杆菌的检测

大部分大肠杆菌是人或动物肠道里的共生菌,但其中也有部分菌株可引起腹泻等疾病^[17],致泻大肠杆菌不但可引起传染性疾病而且可引起食源性疾病的暴发,因此建立快速、简便、准确的检测方法非常重要。郑桂丽等^[18]针对大肠杆菌 O157 特异基因 rfbO157 设计引物进行 PCR,特异性强,灵敏度高,可在 3~4 h 内完成对 O157 的检测,O157 的临床早期诊断和流行病学调查提供了一种较好的手段。胡慧等^[19]针对大肠杆菌 O157:H7 的特异基因 rfbE 设计一对特异引物,建立 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法,结果显示所建立的 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法可以快速、特异地检测出大肠杆菌 O157:H7,细菌纯培养物中其灵敏度可达 2×10^4 cfu/ml,临床模拟污染肉样中能最低能检测到 1×10^2 cfu/ml 的大肠杆菌 O157:H7。临床检测肉样 500 份,检测灵敏度高于常规 PCR;徐义刚等^[20]通过 ETEC LT 基因、EPEC bfpA 基因、EHEC 抗原基因和 EIEC 侵袭性质粒基因序列,设计了 4 对特异性引物,建立了致腹泻性大肠杆菌多重 PCR-DHPLC 检测方法,达到同时检测 4 种致病菌的目的;林杰等^[21]利用多重 PCR 同时检测 5 种致泻性大肠杆菌 8 种毒力基因的方法,取得较好的效果。因此多重 PCR 的出现达到快速、高通量检测病原微生物的目的。

7 副溶血性弧菌的检测

副溶血性弧菌又称为嗜盐菌,不耐热,是一种嗜盐性革兰氏阴性致病弧菌,常存在于近海水、海产品、盐渍食品中,是沿海地区引起食物中毒的重要病原菌。人食用污染有该菌的海产品后可引起急性胃肠炎,严重时还可引起败血症,其引发的食源性疾病已成为当前全球面临的公共卫生问题之一。目前,采用 MPN 法对食品中的副溶血弧菌进行检测,此方法需要 3~7 d 的时间,且容易出现交叉污染和假阳性。近年来已有林强等^[22]以 toxR 作为靶基因设计特异性引物及 TaqMan 探针建立荧光定量 PCR 方法,检测 178 份牡蛎样品,检测到阳性样品 168 份,最低检测浓度为 10 cfu/g,最高检出浓度为 318 180 cfu/g,灵敏度高于 MPN 培养检测法;俞春松^[23]选取副溶血性弧菌不耐热溶血毒素基因作为检测的靶片段设计引物及探针,建立检测副溶血性弧菌的荧光定量 PCR,检测方法灵敏度为 10 cfu/ml,检测 20 份样本,结果符合常规培养检测结果;王小玉等^[24]根据副溶血性弧菌种特异性基因不耐热溶血毒素基因 tl 和直接耐热溶血毒素基因 tdh 建立荧光 PCR 方法,检测方法灵敏度达 10 cfu/reaction。该方法大大缩短了检测过程,只需要 1 h 左右,这是包括细菌分离、常规 PCR 在内的其它方法所无法比拟的。而且该方法选择了种特异性基因和毒力基因,能够鉴别出分离菌株是否是副溶血性弧菌并进一步判别是否潜在致病,为多重荧光 PCR 检测副溶血性弧菌的研究奠定了基础。

8 霍乱弧菌的检测

霍乱为危害严重的夏秋季急性肠道传染病,迄今仍然是发展中国家面临的重大公共卫生问题之一。目前我国霍乱虽已得到有效控制,但发生或流行的潜在威胁依然存在。因此早发现、早诊断是及时控制霍乱疫情蔓延的关键。黄世旺等^[25]根据霍乱毒素(cholera toxin,CT)基因序列,在其保守区域设计特异性引物与 TaqMan 探针,建立特异、灵敏、快速的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法用于快速检测霍乱弧菌,检测灵敏度达 10 cfu/ml,整个操作过程仅需 2 h。用该方法检测 24 份临床腹泻样本,准确率 100%,因此该方法可用于霍乱弧菌的日常监测和暴发疫情的应急诊断。杜联峰等^[26]根据霍乱毒素 ctxA、toxR、O139 群特异性基因、O1 群特异性基因序列设计特异性引物进行多重 PCR,建立了稳定可靠的霍乱弧菌多重 PCR 检测平台;覃倚莹等^[27]分别以 rfbM 和 wbfR 基因作为 O1 和 O139 群霍乱弧菌的模板设计引物和探针,通过优化反应条件建立了能够同时检测 O1 群 O139 群霍乱弧菌的二联实时荧光定量 PCR 方

法(FQ-PCR)。用该方法对 10 份模拟食品样品和 133 份临床样品进行了检测,结果表明,该方法特异性为 100%;O1 群霍乱弧菌和 O139 群霍乱弧菌检出限分别为 92 cfu/ml 和 116 cfu/ml;另外该方法对模拟样品和临床样品检测结果与国标法的检测结果完全一致,符合率为 100%。因此该实时荧光 PCR 检测方法能够同时检测 O1 和 O139 群霍乱弧菌,而且特异性好、灵敏度高,能有效克服假阳性,适用于基层疾病控制、口岸检疫单位日常疫情监测和临床诊断。

综上所述,食源性致病菌检测在引入 PCR 技术后得以迅速发展,从最初的普通 PCR,到各种改良技术的运用,再到荧光实时定量 PCR 的出现,多种、多重 PCR 的综合应用已成为一种趋势,其高特异性、高敏感度和简便快速,为食物中毒和食源性疾病的应急处置提供了依据。今后,随着经济社会的不断发展,必然会对食源性致病菌的检测提出越来越高的要求,而随着科学技术的不断进步,相信会有更多快速、简便、特异的检测技术得到应用,必定对人类公共卫生、食品安全、营养健康与疾病控制等作出巨大贡献。

参考文献:

- [1] WHO. Food safety and foodborne illness [EB/OL]. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/, 2008. Accessed September, 22, 2008.
- [2] 庞璐,张哲,徐进. 2006—2010 年我国食源性疾病的暴发简介[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(6): 560—563.
- [3] 谭炳乾,肖军. PCR 在快速检测食品单核细胞增生李斯特菌中的应用[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(7): 1558—1560.
- [4] 冯家望,吴小,王小,等. 多重—巢式 PCR 检测食品中单增李斯特菌研[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2007, 30(1): 56—59.
- [5] 王耀,曹际,闫平平,等. 食品中 3 种致病李氏菌 MPCR—DHPLC 检测方法的建立[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 158—162.
- [6] 朱穗京,金黄色葡萄球菌感染及治疗现状研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2012, 34(2): 223—224.
- [7] 万婧,周向阳,张晓峰,等. 双重 PCR—DHPLC 技术快速检测水产品中金黄色葡萄球菌[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 199—203.
- [8] 苏明权,杨柳,马越云,等. 实时荧光定量 PCR 检测金黄色葡萄球菌方法的试验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 794—796.
- [9] 杨玉军,黄韦唯,王志云,等. 多重 PCR 快速检测金黄色葡萄球菌四型肠毒素基因的研究[J]. 现代预防医学, 2009, 36(9): 1713—1715.
- [10] 王振国,刘金华,徐宝梁,等. 应用实时荧光 PCR 检测致病性蜡样芽孢杆菌[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(1): 40—42.
- [11] 王红,唐振柱,黄彦,等. 荧光检测蜡样芽孢杆菌及溶血素基因应用研究[J]. 广西医学, 2011, 33(7): 885—887.
- [12] 世界卫生组织. 食品安全和食源性疾病[EB/OL]. (2007—03). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/zh/index.html>.
- [13] 钟伟军,赵明秋,邓中平,等. 荧光定量 PCR 快速检测食品中沙门氏菌方法的建立及初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(3): 220—224.
- [14] 周晓清,李苗云,刘杰,等. 一步法逆转录荧光定量 PCR 检测食源性沙门氏菌[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 182—188.
- [15] 邱杨,唐丽霞,赵丽,等. 志贺氏菌实时荧光 PCR 检测试剂的研制[J]. 现代食品科技, 2008, 24(11): 1151—1154.
- [16] 赵丽华,周勇,万成松. 分子信标 PCR 检测志贺菌 ipaH 基因[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(5): 499—502.

- [17] Vidal M, Kruger E, Duran C, et al. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(10): 5362-5365.
- [18] 郑桂丽, 廖绍安, 李钊华, 等. 大肠杆菌 O157 特异基因的 PCR 检测方法[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(10): 1183-1185.
- [19] 胡慧, 陈雅君, 段志刚, 等. 大肠杆菌 O157:H7 特异基因的实时荧光定量 PCR 检测[J]. *食品科学*, 2011, 32(12): 278-282.
- [20] 徐义刚, 崔丽春, 李苏龙, 等. 多重 PCR-DHPLC 检测 4 种主要致腹泻性大肠埃希氏菌方法的建立与应用[J]. *食品科学*, 2010, 31(20): 293-297.
- [21] 林杰, 陈爱平, 杨劲松, 等. 检测致泻大肠杆菌的多重 PCR 方法的建立与应用[J]. *预防医学论坛*, 2012, 18(12): 881-884.
- [22] 林强, 李宁求, 付小哲, 等. 牡蛎中副溶血弧菌荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(1): 96-102.
- [23] 俞春松. 荧光定量 PCR 检测食品中副溶血性弧菌方法的建立[J]. *中国高等医学教育*, 2010(5): 144-145.
- [24] 王小玉, 冯家望, 吴小伦, 等. 实时荧光 PCR 方法检测副溶血性弧菌的研究[J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(6): 135-138.
- [25] 黄世旺, 卢亦愚, 徐丹戈, 等. TaqMan 荧光定量 PCR 技术快速检测霍乱弧菌方法的建立[J]. *中国卫生检验杂志*, 2006, 16(8): 923-924.
- [26] 杜联峰, 杨泽, 余妍, 等. 霍乱弧菌多重检测方法的建立及优化[J]. *现代预防医学*, 2010, 37(1): 101-102, 104.
- [27] 覃倚莹, 吴晖, 肖性龙, 等. Taq-Man 实时荧光定量 PCR 同时检测 O1 和 O139 群霍乱弧菌[J]. *卫生研究*, 2010, 39(1): 101-105.

收稿日期: 2013-10-05; 修回日期: 2014-01-07

病区老年人睡眠障碍原因及护理的研究进展

覃香蓉

(广西都安县人民医院中医科, 广西 都安 530700 E-mail: 1900548080@qq.com)

关键词: 病房; 老年人; 睡眠障碍; 护理

中图分类号: R473.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2014)01-0104-02
doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2014.01.061

睡眠是人生的生理必需, 良好的睡眠是身心健康的主要标志。睡眠障碍是老年人最常见的症状之一, 长期反复睡眠障碍会影响老年人疾病的治疗和康复, 加重或诱发某些躯体疾病, 是威胁老年人身心健康的重要因素^[1]。随着现代医学和护理学发展, 睡眠障碍的治疗及护理措施不断完善, 笔者现就老年患者睡眠障碍原因和护理措施作一综述。

1 老年人睡眠障碍的发生率

世界卫生组织提出, 发达国家或地区 65 岁以上者为老年人, 发展中国家或地区 60 岁以上者为老年人。我国为发展中国家, 60 岁以上老年人口每年以 3.2% 的速度增长, 预计到 2050 年将达 11.0 亿, 占世界总人口的 13.7%^[2], 我国人群中 56.7% 的老年人存在睡眠障碍。

2 睡眠模式变化

2.1 正常睡眠状态 睡眠是一个复杂生理变化, 它包括 2 种相互交替的睡眠状态: ①非眼球快速运动睡眠(NKEM), 又称之为慢波睡眠; ②眼球快速运动睡眠(REM), 又称之为快波睡眠。两种状态交替进行, 大约每隔 70~90 min 交替 2 次, 一夜之间交替 5~6 次^[3]。

2.2 睡眠障碍定义 睡眠障碍是指夜间入睡困难, 不能长时间连续睡眠, 夜间经常醒来或清晨早醒, 第二天醒来没有满足感和精神充沛的感觉, 主要以患者进入睡眠周期的潜伏期较正常延长, 入睡过程中自身生理性感觉增多为主^[4]。

2.3 睡眠障碍类型 ①入睡困难: 表现为入睡需要时间长达 30 min, 一旦入睡可获得较深的睡眠。②中途觉醒: 睡眠很浅, 轻微声响便易惊醒, 夜睡眠中醒来达 3 次以上。③睡眠时间缩短: 患者有充分时间, 但夜累计睡眠时间 < 5 h。④早醒: 早晨觉醒比以前提前 1 h 以上, 且醒后不能再入睡。⑤醒后疲劳: 睡眠时间达标, 但睡眠质量不高, 夜间多梦, 醒后感觉疲劳, 无精打采, 全身不适^[5]。

3 导致老年人睡眠障碍的原因

3.1 年龄 老年人由于年龄的增加, 各组织器官逐步老化, 引起大脑皮质功能减退, 新陈代谢减慢, 影响正常的睡眠过程常出现睡眠维持困难, 睡眠质量下降, 夜间觉醒次数增加, 对外界刺激的敏感度相应增高, 易发生睡眠障碍^[6]。随着年龄的增加, 诸多因素可使提高睡眠质量的功能性储备减少, 这些因素包括: 活动量少、光照不足、唤醒阈降低、交感神经活动能力改变、昼夜节律改变、老年人发生各种疾病问题的频率增加、疾病负荷增加、生活储备降低等, 故老年人睡眠不足的发生率较高^[7]。

3.2 环境因素 老年人生活比较有规律, 有着固定生活习惯, 来到陌生环境, 如噪音、温度、光照和习惯睡眠环境的改变、适应能力差异是导致睡眠障碍的重要因素, 居住在繁忙的机场或铁路附近、病房呼叫器和电话铃声、监护仪的报警声、病友的鼾声等环境噪音的不良刺激也可影响老年人的睡眠质量^[8]。

3.3 社会家庭因素 是影响老年患者睡眠质量的主要原因之一, 经济、地位、生活习惯发生变化, 容易使老年人产生失落感和忧伤感, 加之子女分居、配偶老友和同事患病和死亡, 高额的医疗费用、家人关心的缺失等引起的焦虑、紧张、恐惧、悲观、抑郁、思虑过度……均可造成心理问题而引起睡眠障碍^[9]。

3.4 不良的生活习惯 不健康的生活习惯也是造成睡眠障碍的原因之一, 如过度饮酒、吸烟、晚餐过多或过少、睡前大量饮水引起夜尿次数增多、睡前喝茶、咖啡等兴奋性物质导致夜间迟迟不能入睡, 由于这些制品的兴奋和利尿作用可引起睡眠不好, 有时表现为白天瞌睡而晚上不能入眠, 破坏睡眠规律, 如果长期持续这种不健康的睡眠习惯, 人体生物钟会受到损害, 最终导致睡眠障碍^[10]。

3.5 疾病 老年人是各种躯体疾病的易感人群, 多数躯体疾病都会不同程度地导致睡眠障碍, 如: 冠心病、肝癌及肺癌晚