

3种沙门氏菌检测方法能力验证

高晗*, 何娟, 严礼

(湖南省食品质量监督检测研究院, 长沙 410000)

摘要: **目的** 比较国标法、VETIK和荧光定量PCR法3种沙门氏菌检测方法的检测效果。**方法** 10份盲样经GB4789.4-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》、实时荧光定量PCR方法和VIDAS仪器检测,生化部分用VITEK2 compact执行。**结果** 国标法在10个盲样中检出3种血清型沙门氏菌,分别为5号样品检出阿贡纳沙门氏菌、7号样品检出蒙得维的亚沙门氏菌和肯塔基沙门氏菌。VETIK和荧光定量PCR法检出5号和7号呈沙门氏菌阳性,其他为阴性。**结论** VIDAS和实时荧光PCR检测方法快速、可靠、灵敏度高,可作为传统检测方法有效补充。

关键词: 沙门氏菌; PCR; 能力验证

Capability verification of three detection methods of *Salmonella*

GAO Han*, HE Juan, YAN Li

(Hunan Province Food Quality Supervision and Testing Institute, Changsha 41000, China)

ABSTRACT: Objective To compare the detection effects of *Salmonella* by the national standard method, VETIK and the fluorescence quantitative PCR method. **Methods** Ten blind samples were detected by GB4789.4-2010 National food safety standard Food microbiological examination: *Salmonella*, real-time quantitative PCR and VIDAS instrument, and biochemical part was executed by VITEK2 compact. **Results** Using the national standard, three serotypes of *Salmonella serotypes* were detected in 10 blind samples. *Salmonella agona* was detected in sample 5, *Salmonella Montevi* and *Salmonella kentucky* were detected in sample 7. VETIK and fluorescence quantitative PCR detection results exhibited that sample 5 and sample 7 were *Salmonella* positive, the others were negative. **Conclusion** VIDAS and real-time fluorescence quantitative PCR methods are rapid, reliable and sensitive, and can be used as an effective complement to traditional detection methods.

KEY WORDS: *Salmonella*; PCR; proficiency test

1 引言

沙门氏菌(*Salmonella*)是一种常见的食源性致病菌,主要通过动物的消化道传染致病,可引起伤寒与副伤寒、食物中毒、败血症、慢性肠炎等疾病^[1,2]。据统计,在世界各国的细菌性食物中毒种类中,沙门氏菌引起的食物中毒常列榜首^[3,4]。

微生物检测能力验证是实验室微生物检测质量控制的关键环节,其结果直接关系到检验报告的准确性和可靠性。沙门氏菌检出能力验证活动是由中国食品药品检定研究院负责实施的实验室比对验证计划。按照GB 4789.4-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》中的酶联免疫技术及微生物筛选系统(video digital analysis system, VIDAS)^[5-8]、实时荧光PCR方法^[8,9]对盲样样品进行检测。

*通讯作者: 高晗, 工程师, 主要研究方向为食品微生物, E-mail: dove0931@163.com

*Corresponding author: GAO Han, Engineer, Hunan Province Food Quality Supervision and Testing Institute, Changsha 41000, China. E-mail: dove0931@163.com

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

VITEK2 compact、GN 试剂卡、VIDAS(法国生物梅里埃公司)、30702VIDAS SALMONELLA 60 TESTS VIDAS 沙门氏菌属筛检试剂盒(法国生物梅里埃公司); Applied Biosystems 7500Fast(美国 ABI 公司); TaqMan *Salmonella enterica* Detection Kit 和 AM1836-MAGMAX-96 Viral RNA isolation kit 配套试剂(美国 ABI 公司); 5804R 离心机(德国 Eppendorf 公司)。

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)(青岛海博生物技术有限 公司); 四硫磺酸钠煌绿(TTB)增菌液、亚硒酸盐胱氨酸(selenite cystine, SC)增菌液、亚硫酸铋(bismuth sulfite, BS)琼脂、HE 琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐(xylose lysine deoxidization, XLD)琼脂、沙门氏菌显色培养基(北京陆桥技术有限 责任公司); 沙门氏菌诊断血清(泰国 S&A 公司)。所有试剂均经过验证并在有效期内使用。实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2 试验方法

2.2.1 样品处理

在生物安全柜内将沙门氏菌样品的西林瓶打开。将西林瓶中白色小球加入无菌均质袋中(蓝色小球为干燥剂, 勿入), 然后再将与西林瓶同孔号的奶粉样品加入到上述均质袋, 取 225 mL 灭菌 BPW 增菌液加入均质袋中, 用拍击式均质器均质。依此方法分别对 10 件样品进行处理。

2.2.2 检验方法

(1)国标法: 依据 GB4789.4-2010^[1]改进, 在银色小丸稀释后取一环在显示平板上划线分离, 后部分按国标执行, 生化部分用 VITEK2 compact 执行。

(2)VIDAS 方法: 取在 36 °C 培养 18 h 的样品液上机。

(3)实时荧光 PCR 方法:

A. 提取样品的基因组 RNA:

①取 1.5 mL 离心管, 加入 130 μ L Lysis/Binding Solution。然后加入 50 μ L 样品, 低速涡旋震荡混匀。

②中速涡旋磁珠, 使其混匀。然后在离心管中加入 20 μ L 磁珠混合液。涡旋 3~5 min。

③将离心管垂直放入磁力架中 3 min 后吸弃管中液体。

④从磁力架取出离心管, 加入 150 μ L Wash Solution 1, 涡旋混匀 1 min。然后将离心管垂直放入磁力架中至液体变得清澈, 然后吸弃管中液体, 留沉淀。

⑤从磁力架取出离心管, 加入 150 μ L Wash Solution 2, 涡旋混匀 1 min。然后将离心管垂直放入磁力架中至液体变得清澈, 然后吸弃管中液体, 留沉淀。

⑥将离心管从磁力架取出, 打开盖子, 干燥约 10 min, 使得洗涤液中的酒精充分挥发。然后加入 20 μ L, 涡旋 3 min, 溶解核酸。然后将离心管垂直置于磁力架上约>3 min, 直到液体变清澈, 然后转移液体至新的离心管, 即获得样品核酸。

B. PCR 反应

参照试剂盒说明配制如下体系 PCR 反应液如表 1。

PCR 反应条件 95 °C 10 min; 然后 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 此步骤为 45 个循环^[10-13]。

血清学实验: 位相变异试验采用简易平板法, 选用 0.35% 半固体琼脂平板试验^[1]。

3 结果与分析

3.1 国标检测

根据增菌后划线分离结果显示, 编号 CODE 5、CODE 7 平板均出现可疑沙门氏菌的菌落特征, 而其余编号平板均为非可疑沙门氏菌。菌落特征详见表 2, VITEK2 compact 结果如下(表 3~5)。

3.2 VIDAS 方法检测

VIDAS 方法检测结果为 1 号、2 号、3 号、4 号、6 号、8 号、9 号、10 号检测为沙门氏菌阴性。5 号、7 号为沙门氏菌阳性(见表 6)。

3.3 实时荧光 PCR 方法检测

同时将 CODE 1~10 样品分别用实时荧光 PCR 检测沙门氏菌, 结果显示只有 CODE 5 和 CODE 7 的 $C_t < 35$ (见表 7), 其他样品的 C_t 值为未检出或 $C_t > 35$, 均记为阴性, 与国标法和 VIDAS 法完全吻合(如图 1)。

表 1 体系 PCR 反应液配制
Table 1 System PCR reaction solution preparation

试剂	加入量(μ L, 每 30 μ L 反应体系)	加入量(μ L, 4 组 30 μ L 反应体系总量)
2×Environmental Master Mix (EMM)	15	66
10×Target Assay Mix(TAM)	3	13.2
总体积	18	79.2

表2 沙门氏菌样品在不同培养基上的菌落特征
Table 2 Colony characteristics of *Salmonella* samples in different culture mediums

样品编码	HE	XLD	BS	沙门氏显色
CODE 1	粉红色菌落, 部分带黑色中心	黄色, 湿润, 有的菌落带黑色中心	灰白色菌落, 光滑湿润, 无金属光泽	无菌落生长
CODE 2	蓝绿色菌落带黑色中心	黄色, 湿润, 有的菌落带黑色中心	灰白色菌落, 光滑湿润, 无金属光泽	乳白色, 菌落较小并且只在第一区有生长
CODE 3	无色半透明, 有的菌落中心黑色	黄色, 湿润, 有的菌落带黑色中心	灰白色菌落, 光滑湿润, 无金属光泽	蓝色较小菌落, 只在第一区生长
CODE 4	粉红色菌落, 部分带黑色中心	灰白色菌落、圆形较小, 湿润	灰白色菌落, 光滑湿润, 无金属光泽	蓝色较小菌落, 只在第一区生长
CODE 5	蓝绿色菌落带黑色中心	粉红色菌落, 部分带黑色中心	灰黑色有金属光泽, 菌落培养基周围呈现棕黑色	紫红色菌落, 周围略显淡色, 晶莹剔透
CODE 6	粉红色菌落, 部分带黑色中心	灰白色菌落、圆形较小, 湿润	灰白色菌落, 光滑湿润, 无金属光泽	蓝色较小菌落, 只在第一区生长
CODE 7	蓝绿色菌落带黑色中心	粉红色菌落, 部分带黑色中心	灰黑色有金属光泽, 菌落培养基周围呈现棕黑色	紫红色菌落, 周围略显淡色, 晶莹剔透
CODE 8	粉红色菌落, 部分带黑色中心	黄色, 湿润, 有的菌落带黑色中心	灰白色菌落, 光滑湿润, 无金属光泽	蓝色较小菌落, 只在第一区生长
CODE 9	粉红色菌落	黄色, 湿润, 有的菌落带黑色中心	灰白色菌落, 光滑湿润, 无金属光泽	蓝色较小菌落, 只在第一区生长
CODE10	粉红色菌落	灰白色菌落、圆形较小, 湿润	灰白色菌落, 光滑湿润, 无金属光泽	蓝色较小菌落, 只在第一区生长

表3 CODE 5中可疑菌落纯化后的VITEK2鉴定结果
Table 3 VITEK2 results of the purified colony in CODE 5

孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	+	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BALap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	(+)
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

注: +为阳性; -为阴性; (+)为高于阈值的阳性反应; (-)低于阈值的阴性反应。下同。

表 4 CODE 7-1 中可疑菌落纯化后 VITEK2 鉴定结果
Table 4 VITEK2 results of the purified colony in CODE 7-1

孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	+	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BALap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	(-)
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

表 5 CODE 7-2 中可疑菌落纯化后 VITEK2 鉴定结果
Table 5 VITEK2 results of the purified colony in CODE 7-2

孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果	孔号	实验项目	结果
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	+	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BALap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	(+)
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

表 6 VIDAS 检测结果
Table 6 VIDAS results

样品	检测	结果	解释
C1	SLM	0.70	阳性
C2	SLM	0.01	阴性
CODE 1	SLM	0.00	阴性
CODE 2	SLM	0.00	阴性
CODE 3	SLM	0.00	阴性
CODE 4	SLM	0.00	阴性
CODE 5	SLM	3.04	阳性
CODE 6	SLM	0.00	阴性
CODE 7	SLM	2.77	阳性
CODE 8	SLM	0.00	阴性
CODE 9	SLM	0.00	阴性
CODE 10	SLM	0.00	阴性

注: C1 为阳性标准样品;C2 为阴性标准样品;SLM 为 *Salmonella*(沙门氏菌); 阴性 < 0.23, 阳性 > 0.23。

表 7 阳性样品荧光 PCR 的 Ct 值
Table 7 The Ct value of fluorescence PCR of positive samples

样品	阳性样品 Ct 值
CODE 5	20.19
CODE 7	24.21

3.4 血清学试验^[13]

本研究采取 3 种不同方法对能力验证样品中沙门氏菌进行了检测(见表 8), 结果表明, 传统国标鉴定法、VIDAS 法和荧光 PCR 法检测结果一致。10 份盲样中, 共有 2 份样品检测为沙门氏菌(CODE 5、CODE 7), 其余 8 份样品检测结果为阴性。

4 讨论

目前, 国标(GB4789.4-2010)是中国规定的食品中沙

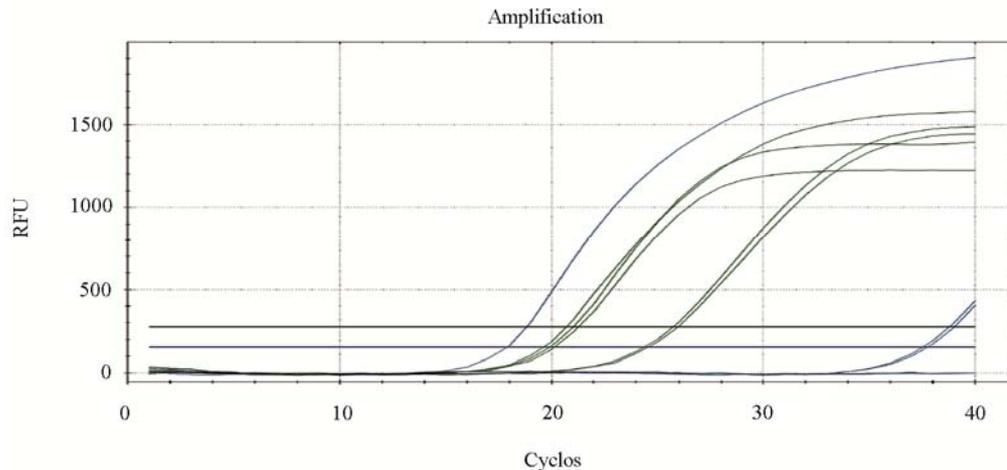


图 1 样品扩增曲线图

Fig. 1 Amplification curve of sample

表 8 3 株 *Salmonella* 血清分型确认结果Table 8 Serotyping identified results of 3 strains of *Salmonella*

样品孔号	O 抗原	H 抗原第 1 相	H 抗原第 2 相	菌名	拉丁菌名
CODE 5	6,8	Z ₄ , Z ₂₃	e, n, Z ₁₅	查理沙门氏菌	<i>S. chailey</i>
CODE 7-1	6,7	g, m, s	/	蒙得维的亚沙门氏菌	<i>S. montevideo</i>
CODE 7-2	8	i	Z ₆	肯塔基沙门氏菌	<i>S. kentucky</i>

门氏菌的标准检测方法,也是基层实验室普遍采用的检测方法,它根据沙门氏菌的生长特点和生化特性,采取前增菌、增菌、分离、生化试验和血清学鉴定 5 个步骤对沙门氏菌进行检验鉴定。其方法准确可靠,但检测方法过程复杂、周期长、所需试剂繁多,检验周期大约为 80 h(不算血清分型所用时间)^[15]。实时荧光 PCR 经历一次前增菌 18 h,再试剂盒操作 1 h 加上仪器 1~2 h,实际耗时 21 h 左右。且试剂盒操作需一定动手能力。而 VIDAS 方法只须经历 1 次前增菌 18 h 就可上机,不需要纯培养,耗时约 19 h 就出检查结果,且特异性强、敏感度高,操作简便。

VIDAS 方法比国标方法比检出率高^[16],并不说明其方法检出假阳性多,而是由于国标方法是手工操作,纯培养后进行人工挑菌,有些可疑菌落在一定的漏挑,从而造成假阴性结果;而 VIDAS 方法增菌不要进行纯培养,只要前增菌即可,人工操作造成假阴性的几率低,所以不容易漏检。因此,使用 VIDAS 方法也可以作为传统方法不足之处的补充,但 VIDAS 方法检测确实会出现假阳性,是因为 VIDAS 运用的是酶联免疫荧光技术结合抗体的荧光化合物,如果样品感染沙门氏菌灭菌后用 VIDAS 方法,而国标检测阴性。也就是不管沙门氏菌“死活”VIDAS 方法和荧光 PCR 还能检测出阳性,而国标是针对“活的”沙门氏菌。所以 VIDAS 方法检测会有假阳性样品产生。理想状态下 VIDAS 方法对样品进行初筛,阴性结果直接报告,检出阳

性结果再用国标确认。

关于血清凝集试验,建议购买泰国诊断血清,保留 2 个常用的不同批号的进行血清核对^[15],以防错漏。应注意挑取琼脂斜面上部干燥培养物与多价 O 因子血清进行凝集试验,因为干燥琼脂培养物 O 抗原发育较好,而 H 因子血清进行凝集试验则挑取琼脂平板边缘培养物。

参考文献

- [1] GB4789.4-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S]
GB4789.4-2010 National food safety standard-Food microbiological examination: *Salmonella* [S]
- [2] Wang H, Wang J, Zhu P. Advance on pullorum disease [J]. Chin Livestock Poultry Breed, 2008, 12(6): 61-62 .
- [3] Yang BW, Qu D, Zhang XL, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China [J]. Int J Food Microbiol, 2010, 141(12): 63-72 .
- [4] Foley SL, Lynne AM, Nayak R. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates [J]. J Anim Sci, 2008,86(14): 149-162 .
- [5] 焦彦朝, 连宾. 食品中沙门氏菌酶联免疫荧光分析(VIDAS *Salmonella*[SLM] assay)筛选方法[J]. 口岸卫生控制, 2001, 6(4): 44-46.
Jao YC, Lian B. Enzyme-linked immunofluorescence assay for screening *Salmonella* in food [J]. Port Health Control, 2001, 6(4): 44-46.
- [6] 黄嫦娇, 黄晓蓉, 郑晶, 等. 全自动荧光酶联免疫方法检测食品中沙门

- 氏菌[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(10): 5320-5321.
- Huang CJ, Huang XR, Zheng J, *et al.* Detection of *Salmonella* in food samples by VIDAS method [J]. J Anhui Agric Sci, 2010, 38(10): 5320-5321.
- [7] 黄宝莹, 余之蕴, 林耀文, 等. 四种方法检测食品中沙门氏菌的比较[J]. 食品工业科技, 2014, 15(35): 185-192.
- Huang BY, She ZY, Lin YW, *et al.* Comparison of detection of *Salmonella* [J]. Sci Technol, 2014, 15(35): 185-192.
- [8] 刘玉兰. 2 种方法检测食品中沙门氏菌的实验研究[J]. 预防医学论坛, 2010, 04: 1672-1674.
- Liu YL. An experimental study on *Salmonella* in food by two methods [J] Forum Prev Med, 2010, 04: 1672-1674
- [9] 陈弟诗, 郭万柱, 徐志文, 等. 猪霍乱沙门氏菌的分离与鉴定以及 PCR 检测方法的建立[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(20): 6020-6023.
- Chen DS, Guo WZ, Xu ZW, *et al.* Isolation and identification of *Salmonella choleraesuis* and the establishment of its PCR detective method [J]. J Anhui Agric Sci, 2007, 35(20): 6020-6023.
- [10] 代娟. 快速检测肠道致病菌的 PCR 技术的研究[D]. 成都: 西华大学, 2007.
- Dai J. Study on PCR technique for rapid detection of enteric pathogens [D] Chengdu: Xihua University, 2007.
- [11] 郑秋月, 赵彤彤, 袁慕云, 等. 实时荧光 PCR 检测食品中丙型副伤寒沙门氏菌和猪霍乱沙门氏菌[J]. 食品安全与检测, 2014, 33(2): 297-301.
- Zheng QY, Zhao TT, Yuan MY, *et al.* Detection of *Salmonella paratyphi C* and *Salmonella Choleraesuis* in food by real-time PCR [J]. Food Sci Technol, 2014, 33(2): 297-301.
- [12] 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.
- Zhong WJ, Zhao MQ, Deng ZP, *et al.* Establishment and preliminary application of real-time PCR method for detection of *Salmonella* in food [J]. Chin J Prev Vet Med, 2008, 30(3): 220-224
- [13] 荣策, 孙铭英, 那晗. 建立 Taqman 探针实时荧光 PCR 检测食品中肠炎沙门氏菌的方法[J]. 中国卫生产业, 2012, 27(24): 7-11.
- Rong C, Sun MY, Na H. The detection of *Salmonella Enteritidis* with Taqman probe by realtime fluorescent PCR in food industry [J]. Chin Health Ind, 2012, 27(24): 7-11.
- [14] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- Buchanan RE, Gibbons NE. Berger's manual for the identification of bacteria [M]. Beijing: Science Press, 1984.
- [15] 许学斌, 冉陆, 朱超. 沙门菌分型血清对比研究(上海市, 1999 至 2007 年)[J]. 检验医学, 2010, 1(25): 21-25.
- Xu XB, Ran L, Zhu C. A comparative study of the serotyping of *Salmonella*(Shanghai, 1999-2007) [J]. Lab Med, 2010, 1(25): 21-25.
- [16] 陶军, 张树宏, 吴仲梁. 自动荧光酶标免疫测定仪与常规培养法对冻禽肉中沙门氏菌的检测效果的比较[J]. 现代科学仪器, 2001, 3(3): 50-52.
- Tao J, Zhang SH, Wu ZL. A comparison of VIDAS to SN standard on *Salmonella* spp. test [J]. Mod Sci Instrum, 2001, 3(3): 50-52.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



高 晗, 工程师, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: dove0931@163.com