

沙门氏菌快速测试片在食品检测中的初步应用研究

袁辰刚, 韩伟, 谢小珏, 顾鸣*

(上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要: **目的** 应用 3M 沙门氏菌 SALX 测试片法检测食品中的沙门氏菌。**方法** 对 67 批自然样品, 以及使用 3 个沙门氏菌标准菌株进行人工污染的 20 批样品, 同时采用 3M 沙门氏菌 SALX 测试片法与国家标准方法 GB 4789.4-2010 进行检测并比较, 评价 3M SALX 沙门氏菌测试片法检测沙门氏菌的检测性能。**结果** 3M 沙门氏菌 SALX 测试片法与国标法符合率达 95.5%, 各有 1 例假阳性和假阴性。**结论** 3M 沙门氏菌 SALX 测试片法操作相对简便, 稳定性好, 与国标法有较高的符合率, 作为一种新的沙门氏菌检测方法, 仍需进一步积累检测数据。

关键词: 沙门氏菌; 快速检测; 3M 沙门氏菌 SALX 测试片

The preliminary application study of a rapid detection method of *Salmonella* in foods

YUAN Chen-Gang, HAN Wei, XIE Xiao-Jue, GU Ming*

(Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

ABSTRACT: Objective Using 3M Petrifilm™ SALX detect *Salmonella* in food. **Method** Totally 67 natural samples and the 20 simulated samples with 3 different *Salmonella* standard strains respectively were detected for *Salmonella* with 3M Petrifilm™ SALX detection method and GB 4789.4-2010 simultaneously, the results were compared and analyzed. **Results** The coincidence rate of the 3M Petrifilm™ SALX detection method and GB methods is 95.5%, with 1 false positive and 1 false negative result. **Conclusion** 3M SALX method is easy to operate and has a good stability and quite good coincidence rate while comparing to the GB method. But as a new detection method, further data collection and applied researches are necessary.

KEY WORDS: *Salmonella*; rapid detection; 3M SALX Petrifilm™ detection method

1 引言

沙门氏菌属(*Salmonella*)分类属肠杆菌科, 是一种重要的肠道致病菌, 可引起人类的伤寒、副伤寒、感染性腹泻、食物中毒和医院内感染, 并引起动物发生沙门氏菌病, 是常见的人畜共患型致病菌^[1,2]。蛋、

家禽和肉类产品是沙门氏菌病的主要传播媒介^[3-5]。据相关数据表明, 我国每年因沙门氏菌而导致的食物中毒事件占有所有食物中毒事件的 70%~80%^[6], 占细菌性食物中毒的首位^[7], 而世界卫生组织(WHO)则将沙门氏菌列入具有严重危害和中等危害的食物传播性病原菌。由于沙门氏菌的血清型过于繁多, 食

*通讯作者: 顾鸣, 研究员, 主要研究方向为食品安全分析和风险。E-mail: gum@shciq.gov.cn

*Corresponding author: GU Ming, Researcher, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China. E-mail: gum@shciq.gov.cn

品安全国家标准方法 GB 4789.4-2010 需要经过预增菌、选择性增菌、分离培养、生化鉴定及血清学分型鉴定等 5 个步骤, 工作量大, 检测周期长, 且受到检测人员的专业、经验等多种因素限制, 容易出现误判^[8,9]。因此, 需要一种快速、有效、准确、简便的检测技术^[10-12]。

目前, 沙门氏菌的快速检测方法大致可分为三类: 1、免疫学检测方法: 酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫磁珠分离技术(IMS); 2、分子生物学技术检测: 聚合酶链式反应技术(PCR 技术)、荧光定量 PCR、环介导等温扩增(LAMP)、基因芯片(DNA chip); 3、其他方法: 生物传感器(Biosensor)、热裂解气相色谱-质谱技术(Py-GC-MS)、电阻抗法(BIA)^[13,14]。虽然拥有比传统的检验方法更省时、操作简单、灵敏度高、特异性强的特点, 但都没有分离步骤, 其最终检测结果虽然可以与国标法进行比对, 但并不与目标菌一一对应, 通常仅用作筛选试验, 阳性结果需经经典方法确证。3M 沙门氏菌 SALX 测试快速检测系统, 是一种以沙门氏菌测试片为核心的新方法, 其原理与国标法相似, 无需特殊仪器, 检验周期为 4 天。本文通过对 3M 公司 Petrifilm™ SALX 沙门氏菌测试片用于食品中沙门氏菌检测进行了检测试验, 初步评估其在食品检测中的准确性和适用性。

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

干热灭菌设备或湿热灭菌设备(日本); 培养箱 36 °C±1 °C, 42 °C±1 °C, 41.5 °C±1 °C; 移液管(0.1 mL 或 1 mL, 准确度±5%); 培养皿(直径 90 mm); 天平(感量为 0.01 g)。

BPW 缓冲蛋白胨水(BD 公司); SC 增菌液(北京陆桥); TTB 增菌液(北京陆桥); BS 亚硫酸铋琼脂平板(北京陆桥); 科玛嘉显色培养基; 三糖铁斜面琼脂(北京陆桥); 尿素酶琼脂(北京陆桥); A-F 多价血清。

3M 沙门氏菌 SALX 测试片(货号: 6537); 3M 沙门氏菌 SALX 确认片(货号: 6539); 3M 沙门氏菌肉汤基础(货号: SEB500); 3M 沙门氏菌肉汤补充物(货号: SESUP001); 3M R10(R-VR10) 肉汤 (货号: BP0288500), 均购自美国 3M 公司。

2.2 标准菌株

试验用标准菌株共 3 株, 来源为自美国标准生物

品保藏中心(ATCC), 菌株及其编号详见表 1。制成 10⁴ CFU/mL 浓度的肉汤管备用。

表 1 添加菌株
Table 1 Add standard strains

菌株名称	菌株编号
猪霍乱沙门氏菌 <i>S.choleraesuis</i>	ATCC 7001
鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>	ATCC 14028
肠炎沙门氏菌 <i>S.enteritidis</i>	ATCC 13076

2.3 国家标准方法(GB 4789.4-2010)^[15]

以无菌操作称取 25 g(或 25 mL)样品, 置于 225 mL 的缓冲蛋白胨水中, 进行培养, 于 36 °C±1 °C 培养 8 h ~ 18 h。轻轻摇动培养过的样品混合物, 移取 1 mL, 转种于 10 mL TTB 内, 于 42 °C±1 °C 培养 18 h ~ 24 h。同时, 另取 1 mL, 转种于 10 mL SC 内, 于 36 °C±1 °C 培养 18 h ~ 24 h。

分别用接种环取增菌液 1 环, 划线接种于一个 BS 琼脂平板和一个 XLD 琼脂平板(或 HE 琼脂平板或沙门氏菌属显色培养基平板)。于 36 °C±1 °C 分别培养 18 h ~ 24 h(XLD 琼脂平板、HE 琼脂平板、沙门氏菌属显色培养基平板)或 40 h ~ 48 h (BS 琼脂平板), 观察各个平板上生长的菌落。

2.4 3M 沙门氏菌 SALX 快速测试片法

2.4.1 富集 在无菌条件下把 3M 沙门氏菌增菌补充物添加到已灭菌 3M 沙门氏菌增菌基础培养基中。准备稀释液, 把食品样品称取或者吸取到无菌的容器中, 比如均质袋或者其他容器(以 1:10 稀释)。将适当数量的已添加 3M 增菌补充物的增菌培养基加入到采样袋或容器中。

2.4.2 培养 对于预期为低菌量(10⁴ CFU/g)的样品, 于 41.5 °C±1 °C 培养 18 h ~ 24 h。对于预期可能高菌量的样品(10⁴ CFU/g), 经过增菌培养后, 将 0.1 mL 转移到 R-V R10 溶液中, 将 R-V R10 溶液在 41.5 °C±1 °C 培养 8 h ~ 24 h。

2.4.3 测试片水化 把 3M 沙门氏菌 SALX 测试片放在平坦的表面。用移液器吸取 2 mL 无菌水垂直滴加在测试片的中心。将上层膜轻轻的放下, 避免有气泡产生。将 3M 压板放在测试片中心, 轻轻地压压板的中心, 使无菌水能均匀分布在 3M SALX 沙门氏菌测试片表面, 不要在膜上来回滑动压板。将测试片室温

(20 °C ~ 25 °C)避光放在水平表面, 至少 1 h。水化好的测试片能在室温 20 °C ~ 25 °C 下储存, 避光, 尽量 8 h 之内使用, 若不能, 可在 2 °C ~ 10 °C 储存, 24 h 内使用。

2.4.4 接种 对于低菌量的样品, 使用已灭菌的 10 μ L 接种环蘸取一滴环增菌液, 对于高菌量的样品, 使用 10 μ L 接种环蘸取一滴 R-V R10 增菌液。从上至下进行划线, 以获得分离菌落, 过程中应防止胶的表面断裂。轻轻的将膜放下, 轻轻压除接种区域的空气。将 3M 沙门氏菌 SALX 测试片着色面朝上水平放置, 41.5 °C \pm 1 °C 培养 24 h \pm 2 h, 叠放片数不要超过 20 片。

2.4.5 初步判读 有黄色晕圈、有气泡或没有气泡的红色菌落, 以及仅有气泡的红色菌落为可推测性的阳性菌落。在 3M 测试片的表面, 将推测的阳性结果用记号笔标记出来。用 3M 确认反应片来确认所有的推测性的阳性结果。

2.4.6 确认判读 取一片 3M Petrifilm™ SALX 确认片, 掀起 3M 沙门氏菌测试片最上层的膜(在该薄膜上已经事先标记好推测性沙门氏菌菌落), 插入确认片, 使之与凝胶层贴合, 防止引入气泡, 闭合测试片。轻压顶层的塑料薄膜, 移除培养区域内的气泡, 确认薄膜、确认片和凝胶层接触良好。在 41.5 °C \pm 1 °C 条件下培养 4 h ~ 5 h 后, 原推测阳性菌落若呈现有蓝色沉淀的黑色菌落或中心为深红色和蓝色沉淀的黑色菌落, 则判读为阳性。

2.5 自然样品的检测

选取多个种类共计 67 批食品样品, 其中包括 39 批进境小食品、冰鲜水产品及冷冻禽肉, 28 批购自超

市或菜市的生鲜肉类(猪肉、牛肉、禽肉)及动物内脏、蛋类(表 2)。分别使用国家标准方法和 3M 沙门氏菌 SALX 测试片法进行检测。

2.6 人工污染样品的检测

在经 2.5 步骤检测沙门氏菌为阴性的食品样品中, 选择 20 个, 每种样品类型至少 3 个, 在其增菌液中分别添加 3 种沙门氏菌标准菌株, 浓度为 10² CFU/mL。添加计划参见表 5。分别用国家标准方法(GB 4789.4-2010)、3M 沙门氏菌 SALX 测试片法进行检测。

3 结果与分析

3.1 自然样品的检测分析

对 67 批食品样品进行沙门氏菌检测, 以国家标准方法作为参考方法, 将 3M 沙门氏菌 SALX 测试片法与国家标准方法进行显著性差异分析, 分析结果见表 3。

试验结果显示, 在进口食品、冰鲜水产品及冷冻肉盒蛋类的检测中, 3M 沙门氏菌 SALX 测试片法检测结果与国家标准方法检测结果符合率为 100%; 而在 28 批市售生鲜肉制品的检测中, 有 3 个检测结果不相符, 具体检测结果见表 4。两种方法的总体符合率为 95.3%。

样品猪肠经 3M 沙门氏菌 SALX 测试片法检测为阳性, 挑取测试片上判读为阳性的菌落进行进一步的生化试验, 结果为尿素酶阳性, 经 VITEK 全自动生化鉴定仪鉴定为奇异变形杆菌, 该样品经国家标准方法检测为沙门氏菌阴性, 因此 3M 沙门氏菌 SALX 测试片法结果为假阳性。

表 2 试验用样品及分类
Table 2 Test samples and classification

样品类型	样品编号	样品名称
进口小食品	1 ~ 19	香酥椰子、拿铁奇诺速溶咖啡、什锦饼干、 β -胡萝卜素、西梅干、咖啡味马卡龙蛋糕、多种水果混合型燕麦粥、冷冻椰奶榴莲糯米饭、软薄面包、百香果柳橙雪泥冰淇淋、速冻乌冬面、威化卷、松露形代可可脂巧克力、手工苹果味糖、黑巧克力秦子曲奇饼干、红椒细薯条、蔓越莓鲜果干、奶精球、胶原蛋白液
进口冰鲜水产品	20 ~ 29	金枪鱼、烤鳗、黑蟹、生蚝、活青蟹、小蜜蜂龙虾、活珍宝蟹、枪鱿鱼、虾仁、白鲑鱼
进口冷冻肉制品	30 ~ 36	猪股骨、带骨鸡全腿、牛臀肉、冻鸡爪、鸡翼尖、牛肉、猪股骨
市售生鲜肉制品	37 ~ 64	鸡杂、鸡肫、鸡翅、鱼内脏、猪肠、猪肉糜、猪皮、小排、猪肉、猪爪、猪肉末、五丰上食精肉丝、五花肉、爱森带皮夹心肉、牛肉糜、恒都牛肋条等
市售蛋类	65 ~ 67	鸭蛋、洋鸡蛋、土鸡蛋

表3 自然样品的检测分析
Table 3 Test results of natural samples

样品类型	结果有差异的样品数	结果无差异的样品数	符合率/%
进口小食品	0	19	100
进口冰鲜水产品	0	10	100
进口冷冻肉制品	0	7	100
市售生鲜肉制品	3	25	89.3
市售蛋类蛋类	0	3	100
总计	3	64	95.3

表4 差异样品的具体检测结果
Table 4 Specific test results of different samples

样品	检测结果		3M SALX 阳性菌确认		比对评价
	3M SALX 测试片法	国家标准方法	生化鉴定	A~F 多价血清凝集	
猪肠 chitling	(+)	(-)	奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i>	(-)	假阳性
鸡翅 chicken wing	(-)	(+)	/	/	假阴性
猪肉 Pork	(+)	(-)	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	(+)	阳性

样品鸡翅在3M SALX 测试片上未分离到典型阳性菌落,可疑菌落经进一步的生化鉴定均为非沙门氏菌,而在国家标准方法检测过程中,其中1个分离平板上出现了1个可疑菌落,经鉴定为沙门氏菌,因此,3M 沙门氏菌 SALX 测试片法结果为假阴性。经分析,造成2种方法结果不符的可能是由于样品中沙门氏菌较少,检测取样存在偶然性,以及3M 沙门氏菌 SALX 测试片上划线效果不佳,目标菌被杂菌干扰,未能有效分离。

样品猪肉经3M 沙门氏菌 SALX 测试片法检测为阳性,进一步生化及血清鉴定为沙门氏菌,而国标法检测未分离到沙门氏菌,因此与国家标准方法相比,3M 沙门氏菌 SALX 测试片法结果看似假阳性。经分析,造成2种方法结果不符的可能是由于3M 沙门氏菌 SALX 沙门氏菌增菌液的增菌效率优于国标法规定的 SC 和 TTB,因此严格意义上为真实的阳性结果。

3.2 人工污染的检测分析

对20个经2.5步骤检测沙门氏菌为阴性的样品,按添加计划进行人工污染的检测结果见表5。

试验结果显示,5个样品类型的所有20个样品中,国家标准方法和3M 沙门氏菌 SALX 测试片法均可有效检出浓度为 10^2 CFU/mL的人工添加的猪霍乱沙

门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌。两种方法的符合率为100%。

3.3 3M 沙门氏菌 SALX 法与国家标准方法操作比较

2种检测方法在操作上,3M 沙门氏菌 SALX 测试片法相比国家标准方法简便,只需1种增菌液和1张检测纸片,而国家标准方法需1种前增菌液、2种增菌液和2种选择性分离平板。在检测时间上,3M 沙门氏菌 SALX 测试片法需用3天~4天,而国家标准方法需要6天~7天,时间缩短一半,见表6。在3M 沙门氏菌 SALX 测试片法的应用试验中发现,培养温度和培养时间对3M 沙门氏菌 SALX 测试片检测法的检测结果影响较小,培养条件并不十分苛刻。不同批号的测试片质量稳定。3M 沙门氏菌 SALX 测试片上,目标菌和干扰菌(主要是其他肠杆菌)形态、颜色较易区分,杂菌数量少于国标法中的分离培养基。

3M 沙门氏菌 SALX 测试片的划线接种较平皿划线难,容易造成凝胶膜的破裂,可能无法分离出单个菌落,造成结果的漏判。纸片的水化步骤,可能因人员的操作不同,使水合凝胶不平整,影响后期的划线。水化后的纸片保存,最多为1天,相比国家标准方法的选择性平皿,保存时间为2周,时间较短,难

表 5 人工污染的添加计划及检测结果
Table 5 Simulated samples and test results

标准菌株	样品名称	检测结果		
		国家标准方法	3M SALX 测试片法	
ATCC 7001 猪霍乱沙门氏菌	进口小食品	香酥椰子	(+)	(+)
		拿铁奇诺速溶咖啡	(+)	(+)
	进口冰鲜水产品	黑蟹	(+)	(+)
	进口冷冻肉制品	带骨鸡全腿	(+)	(+)
		牛肉	(+)	(+)
	市售生鲜肉制品	鸡胗	(+)	(+)
	市售蛋类	鸭蛋	(+)	(+)
ATCC 14028 鼠伤寒沙门氏菌	进口小食品	咖啡味马卡龙蛋糕	(+)	(+)
		多种水果混合型燕麦粥	(+)	(+)
	进口冰鲜水产品	生蚝	(+)	(+)
	进口冷冻肉制品	冻鸡爪	(+)	(+)
	市售生鲜肉制品	牛肉糜	(+)	(+)
		土鸡蛋	(+)	(+)
	市售蛋类	土鸡蛋	(+)	(+)
ATCC 13076 肠炎沙门氏菌	进口小食品	冷冻椰奶榴莲糯米饭	(+)	(+)
		软薄面包	(+)	(+)
	进口冰鲜水产品	活珍宝蟹	(+)	(+)
	进口冷冻肉制品	鸡翼尖	(+)	(+)
	市售生鲜肉制品	五丰上食精肉丝	(+)	(+)
		恒都牛肋条	(+)	(+)
	市售蛋类	洋鸡蛋	(+)	(+)

表 6 3M 沙门氏菌 SALX 测试片法与国家标准方法比较
Table 6 Comparison of 3M SALX method and GB method

	国家标准方法	3M 沙门氏菌 SALX 测试片法
增菌步骤	两次增菌, 三种增菌液	1 次 ~ 2 次增菌, 1 种 ~ 2 种增菌液
检验周期	6 d ~ 7 d	3 d ~ 4 d
平皿、测试片可疑菌落的判读	24 h ~ 48 h	24 h
可疑菌落的确证	2 d ~ 3 d	4 h ~ 5 h
人员要求	结果判读, 生化确认需具有丰富的工作经验	一般要求, 结果判读根据手册判读, 需要有一定的经验
操作步骤	繁琐	简单

以长期保存, 需现做现用, 可能影响突发事件的应用。而作为一种新的检测方法, 3M 沙门氏菌 SALX 的判读仍需检验员积累经验。

4 结 论

3M 沙门氏菌 SALX 沙门氏菌快速测试片法与国标法相比, 具有快速、简便, 检测周期短等特

点。初步的应用研究显示, 对 67 个自然样品的检测结果与国标法符合率达 95.5%, 存在 1.5%假阳性和 1.5%假阴性; 对 20 个人工污染样品的检测结果, 2 种方法符合率 100%。作为一种新的沙门氏菌富集、分离和鉴定方法, 为保证检测质量, 其操作和判读仍有待检验员积累经验, 更需进一步积累检测数据。

参考文献

- [1] Jacobsen CS, Holben WE. Quantification of mRNA in *Salmonella* spp. seeded soil and chicken manure using magnetic capture hybridization RT-PCR [J]. J Med Microbiol, 2007, 69(2): 315–321.
- [2] Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, *et al.* Tolerance of loop mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances [J]. J Biochem Biophys Meth, 2007, 70(3): 499–501.
- [3] 张华. 动物性产品中沙门氏菌的危害及控制措施[J]. 中国动物保健, 2004, (6): 8–10.
Zhang H. The dangers of salmonella in the animal products and control measures [J]. China Anim Health, 2004, (6): 8–10.
- [4] 吴斌, 秦成, 石智, 等. 畜产品中沙门氏菌的风险评估[J]. 大连轻工业学院学报, 2004, 23(3): 226–228.
Wu B, Qin C, Shi Z, *et al.* The risk of salmonella in the animal products [J]. J Dalian Inst Light Ind, 2004, 23(3): 226–228.
- [5] 王军, 郑增忍, 王晶钰. 动物源性食品中沙门氏菌的风险评估[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(4): 23–25.
Wang J, Zheng ZR, Wang JJ. The risk of salmonella in the animal foods [J]. China Anim Quar, 2007, 24(4): 23–25.
- [6] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 6(1): 3–9.
Liu XM. Foodborne disease monitoring technology research [J]. Chin J Food Hygi, 2004, 6(1): 3–9.
- [7] 覃海元, 潘嫣丽. 奶粉中沙门氏菌的风险评估[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(10): 50–52.
Qin HY, Pan YLi. Risk assessment of *Salmonella* in dried milk [J]. China Dairy Ind, 2009, 37(10): 50–52.
- [8] 鲁玉侠, 郭祀远, 石磊, 等. PMA-LAMP 方法快速检测死/活的食源性沙门氏菌[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 324–327.
Lu YX, Guo SY, Shi L, *et al.* Rapid detection of live/dead *Salmonella* via EMA-LAMP method [J]. Food Sci, 2009, 30(22): 324–327.
- [9] Saroj SD, Shashidhar R, Karani M, *et al.* Rapid, sensitive, and validated method for detection of *Salmonella* in food by an enrichment broth culture-Nested PCR combination assay [J]. Mol Cell Probe, 2008, 22(3): 201–206.
- [10] Li X, Zhang S, Zhang H, *et al.* A loop-mediated isothermal amplification method targets the *phoP* gene for the detection of *Salmonella* in food samples [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 133(3): 252–258.
- [11] Malorny B, Bunge C, Helmuth R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella Enteritidis* in poultry meat and consumption eggs [J]. J Med Microbiol, 2007, 70(2): 245–251.
- [12] Novinscak A, Surette C, Filion M. Quantification of *Salmonella* spp. in composted biosolids using a TaqMan qPCR assay [J]. J Med Microbiol, 2007, 70(1): 119–126.
- [13] 汤旭, 阮红. 浅析食品中沙门氏菌的几种快速检验方法[J]. 疾病预防控制通报, 2013, 28(2): 88–90.
Tang X, Ruan H. Analyses several fast test method of salmonella in food [J]. Dis Contr Prev, 2013, 28(2): 88–90.
- [14] 张艳红, 吴延功, 杜元钊, 等. 沙门氏菌快速检测方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2001, 22(2): 39–41, 48.
Zhang YH, Wu YG, Du YZ, *et al.* Progress of Rapid detection of salmonella method [J]. Anim Med Prog, 2001, 22(2): 39–41, 48.
- [15] 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[S]
GB 4789.4-2010 National food safety standard Food microbiology test *Salmonella* assay[S]

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



袁辰刚, 学士, 工程师, 主要研究食品微生物检测
E-mail: yuancg@shciq.gov.cn



顾鸣, 学士, 研究员, 主要研究方向为食品安全分析和风险
E-mail: gum@shciq.gov.cn