

食品能力验证中沙门氏菌的分离鉴定与血清分型

陈雨欣^{1,2*}, 苏粉良^{1,2}, 鞠慧萍^{1,2}, 周雯^{1,2}, 臧海竹^{1,2}, 周斐^{1,2}, 石建华¹

(1. 苏州出入境检验检疫局检验检疫综合技术中心, 苏州 215104; 2. 苏州世标检测技术有限公司, 苏州 215104)

摘要: **目的** 参加沙门氏菌分离鉴定与血清分型的能力验证, 以加强实验室整体水平与能力。**方法** 参照 GB4789.4-2010《食品安全国家标准 食品微生物学 沙门氏菌检验》进行沙门氏菌检测, 将生化试验与 VITEK2 鉴定结果符合沙门氏菌编号的样品进行血清学试验。**结果** 编号 CODE 1 样品检出巴尔多沙门氏菌, CODE 3 样品检出鼠伤寒沙门氏菌, 其余 8 个样品均未检出沙门氏菌。本实验室顺利完成能力验证实验, 与组织方结果一致, 结果为满意。**结论** 参加能力验证是提高检验机构内部质量控制最有效的手段之一, 可有效提高检验机构出具检验数据的可靠性和有效性, 确保实验室持续维持较高的检验水平。

关键词: 能力验证; 沙门氏菌; 菌株分离; 菌株鉴定

Isolation and identification of *Salmonella* and serotype in food ability verification

CHEN Yu-Xin^{1,2*}, SU Fen-Liang^{1,2}, JU Hui-Ping^{1,2}, ZHOU Wen^{1,2}, ZANG Hai-Zhu^{1,2},
ZHOU Fei^{1,2}, SHI Jian-Hua¹

(1. Comprehensive Technology Center, Suzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Suzhou 215104, China;
2. Suzhou Word Standard Testing Technology Co., Ltd., Suzhou 215104, China)

ABSTRACT: Objective To participate food ability verification of isolation and identification of *Salmonella* and serotype so as to enhance the overall level and capacity of laboratories. **Methods** According to GB 4789.4-2010 National food safety standard-Food microbiological examination: *Salmonella*, ten blind samples were detected. When the biochemical test and VITEK2 identification results of samples accorded with the serial number of *Salmonella*, serological tests were proceeded afterwards. **Result** *Salmonella bardo* was detected in sample CODE 1 and *Salmonella typhimurium* was detected in sample CODE 3. The remaining 8 samples were not detected *Salmonella* spp. The satisfactory results were obtained, which were consistent with the results of the organizers. **Conclusion** Food ability verification is one of the most effective means to improve the internal quality control inspection agency, can effectively improve reliability and validity of detection data of the inspection agencies, and also can ensure the laboratories maintain a high level of inspections.

KEY WORDS: proficiency testing; *Salmonella* spp; strain isolation; strain identification

1 引言

沙门氏菌(*Salmonella* spp.)是一种食源性致病菌, 在

自然界中广泛存在, 为革兰氏阴性杆菌, 无荚膜及芽孢, 属于肠杆菌科^[1]; 菌体溶解时, 其细胞壁释放出脂多糖, 形成内毒素^[2]。在我国, 每年发生的细菌性食物中毒事件

*通讯作者: 陈雨欣, 学士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: chen-yuxin126@163.com

*Corresponding author: CHEN Yu-Xin, Bachelor, Engineer, Comprehensive Technology Center, Suzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.98, Suhui Road, Suzhou 215104, China. E-mail: chen-yuxin126@163.com

中,由沙门氏菌引起的食物中毒屡居首位,约占40%^[3],主要能引起动物典型的神经症状以及肝、肾和心脏病变,严重时会导致动物死亡^[4]。自然条件下,鸡、鸭、鹅等都可感染该病原体^[5]。

本实验室参加了2015国家食品药品监督管理总局食品安全抽检监测承检机构盲样考核—沙门氏菌检出能力验证活动。本研究结合多年从事微生物工作的相关经验,总结并提出参加能力验证过程中的注意点,以期为相关检测提供参考。

2 材料与方法

2.1 样品

样品序号:TF0014-0262。共收到10份沙门氏菌样品,编码为CODE 1~10,样品为白色球状西林瓶装,包含阴性样本和阳性样本;10袋奶粉样品,每袋质量25 g,编码为CODE 1~10。每个相同编码的沙门氏菌样品和奶粉样品作为1件样品进行检测,本次盲样考核共10件样品。

2.2 主要培养基、试剂及仪器

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、四硫酸钠煌绿增菌液基础液(tetrathionate broth base, TTB)、亚硫酸盐胱氨酸增菌液(selenite cystine broth, SCB)、HE琼脂(hektoen enteric agar, HE)、亚硫酸铋琼脂(bismuth sulfite agar, BSA)、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂(xylose lysine desoxycholate medium)、三糖铁琼脂(triple sugar iron agar, TSI agar)、沙门氏菌生化试剂鉴定套装、营养琼脂(nutrient agar, NA)及Swarm琼脂均购自北京陆桥技术有限责任公司;沙门氏菌显色培养基(法国科玛嘉公司);VITE2鉴定卡(上海生物梅里埃公司);沙门氏菌属诊断血清(宁波天润公司)。

VITEK2 Compact型全自动微生物检测仪(法国生物梅里埃公司);SILVER拍击式Masticator均质器(西班牙IUL公司)。

2.3 实验方法

根据组织方作业指导书的要求,样品前处理应按照作业指导书进行,后续检测可依据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》^[6]进行。

2.3.1 样品前处理

在生物安全柜内打开沙门氏菌样品的西林瓶,取225 mL灭菌BPW增菌液加入到无菌均质袋中,并将西林瓶内小球加入到BPW增菌液中,充分溶解。然后再将与西林瓶相同编码的奶粉样品加入到上述BPW增菌液中,用拍击式均质器混匀。置于(36±1)℃生化培养箱中培养18 h。

同时,接种标准菌株鼠伤寒沙门氏菌(ATCC 14028)于225 mL的BPW中,(36±1)℃培养18 h做为阳性对照。

2.3.2 选择性增菌

将培养物混匀,取1 mL接种于10 mL TTB培养基内,

42℃培养24 h。同时,另取1 mL接种于10 mL SCB内,(36±1)℃培养24 h。

2.3.3 分离

用接种环无菌沾取环增菌液,分别接种于DHL琼脂平板、BSA琼脂平板、XLD琼脂平板、沙门氏菌显色培养基平板,于(36±1)℃培养箱,其中DHL琼脂平板、XLD琼脂平板、沙门氏菌显色培养基平板培养24 h,BS琼脂平板培养48 h。观察各个平板上生长的菌落形态,有无可疑沙门氏菌。

2.3.4 生化试验

选取2.3.3中的可疑菌落划线接种于营养琼脂上进行纯化,用于接下来的沙门氏菌生化试剂鉴定套装试验、VITEK2鉴定及血清试验。

2.3.5 血清学的鉴定及分型

将生化试验与VITEK2鉴定结果符合沙门氏菌的编号样品进行血清学试验。

首先,进行多价菌体抗原(O)鉴定。O抗原也称菌体抗原,是细胞壁的组成成分,与抗血清的反应呈颗粒状。将玻片清洁后划出2个相同大小的区域,挑取1环待测菌于玻片上的每个区域上部,在其中一个区域下部滴加1滴A-F多价O血清,在另一区域下部滴加1滴生理盐水作为对照,再用接种环将2个区域内的菌体研成乳液,将玻片轻轻摇动混匀1 min,对着黑暗的背景进行观察是否有凝集现象。将被A-F多价O血清凝集者按上述方法继续判定O群。

将属于A-F各O群的菌型进行H抗原的鉴定。H抗原也称鞭毛抗原,主要成分是蛋白质,与抗血清的反应呈絮状或绒状。大部分沙门氏菌H抗原都有两相。当H抗原的其中一相凝集,而另一项不凝集,可先恢复其动力后再次做凝集试验,若仍不凝集,再采用诱导方法做凝集试验。

检测H抗原I相,具体方法为:将0.65%的Swarm琼脂培养基倾注于无菌平皿中,待其凝固后,将菌株点种于平板中央,37℃培养18~24 h。若扩散生长证明其存在动力,取菌落边缘毛躁部位进行凝集试验。

Swarm培养基简易平板法诱导H抗原II相。具体操作为:滴加2滴(10 μL左右)已凝集项的诱导血清于平皿中,倾注5 mL左右Swarm培养基(45℃)混合均匀,待其凝固后将菌株点种至平板中央,37℃培养12 h。平皿中的抗血清会抑制细菌表达已鉴定项。若细菌表达其他的抗原相,可在平板中移动,呈扩散生长。取远端边缘的菌落进行H抗原第II相的鉴定。

3 结果与分析

3.1 选择性分离结果

根据增菌后划线分离结果显示,编号CODE 1、CODE 3平板均出现了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 1。

板用于生化试验及 VITEK2 鉴定, 结果均符合沙门氏菌的反应特性且与阳性对照一致。具体见表 2。

3.2 生化试验、VITEK2 鉴定结果

可疑沙门氏菌的样品 CODE 1 及 CODE 3 纯化后的平

表 1 沙门氏菌样品在不同培养基上的菌落特征
Table 1 Colony characteristics of *Salmonella* samples in different culture mediums

样品编码	DHL	XLD	BS	沙门氏显色
CODE 1	无色半透明, 有的菌落中心黑色	粉红色, 湿润, 有的菌落带黑色中心	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 2	粉红色菌落, 周围亦有红色晕, 有些菌落为黄色带黑色中心	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	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	粉红色, 湿润, 有的菌落带黑色中心	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 4	粉红色菌落, 有些菌落成全黑色, 有些菌落黄色中心黑色	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	粉红色菌落, 黄色菌落, 有些中心黑色	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 6	大部分为黑色菌落, 有些粉红色菌落	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
CODE 7	无菌落生长	无菌落生长	无菌落生长	无菌落生长
CODE 8	粉红色菌落, 黄色菌落, 有些中心黑色	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 9	粉红色菌落, 黄色菌落, 有些中心黑色	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
CODE10	黄色菌落, 有些带黑色中心, 有些不带黑色中心	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

表 2 可疑菌落纯化后的生化试验及 VITEK2 鉴定结果
Table 2 Identification results of biochemical test and VITEK 2 of suspected colonies after purification

试验项目	CODE 1	CODE 3
三糖铁(TSA)	斜面 K、底层 A、产硫化氢、不产气	斜面 K、底层 A、产硫化氢、不产气
赖氨酸脱羧酶(lysine decarboxylase)	+	+
氰化钾(KCN)	-	-
靛基质(indole)	-	-
尿素(urea)	-	-
甘露醇(mannitol)	+	+
山梨醇(sorbitol)	+	+
ONPG	-	-
VITEK2	<i>Salmonella</i> group	<i>Salmonella</i> group

注: +为阳性; -为阴性

3.3 血清学试验结果

将可疑菌株纯化后参照 GB4789.4-2010 标准附录针对性地进行血清鉴定。CODE 1 的 O 抗原试验结果为 O 8⁺, 根据查标准附录 B 可知与巴尔多沙门氏菌(O:8 He,h;1,2)凝集相似; CODE 3 的 O 抗原结果为 O4,5,12 凝集, 与鼠伤寒沙门氏菌(O:4,5,12 H:i;1,2)或拉古什沙门氏菌(O:4,5,12 H:i;1,5)相似。两个样品均需进一步做 H 抗原的凝集试验。

用 Swarm 琼脂平板发育 H 抗原做第一项凝集试验, 用 Swarm 简易平板法诱导做 H 抗原第二相的诱导凝集试验。结果为 CODE 1:巴尔多沙门氏菌(O:8 He,h;1,2); CODE 3:鼠伤寒沙门氏菌(O:4,5,12 H:i;1,2)。

在实际工作中, 如果遇到 GB4789.4-2010 标准附录中没有的凝集现象, 可查找相关沙门氏菌抗原表进行检索对照, 逐步筛选, 缩小范围。在初次诱导仍不凝集时可重复诱导数次, 以达到最终分型。血清凝集是一项繁琐、工作量较大的试验, 需要检验员具有一定的耐心。

4 讨论

实验室能力验证对于判定实验室的检测能力非常重要。能力验证工作在国际上受到广泛的重视, 是认可机构加入和维持国际相互承认协议的必要条件之一^[7]。本实验室参加的此次能力验证收到了满意结果通知书。

血清凝集试验时, 一定要选取菌落边缘呈雾状生长的部分, 如果挑取中心光滑湿润部位则血清不凝集。所以在挑取菌落时一定要谨慎, 否则会直接影响试验结果。简易平板法诱导时, 培养基血清配方为: 10 mL 琼脂(半固体或 Swarm 培养基)+100 μ L 诱导血清。因此, 简易平板法诱导血清含量应为 10 μ L/mL。

沙门氏菌显色培养基在分离及结果判定方面有较高的特异性^[8], 对某些干扰菌如奇异变形杆菌、柠檬酸杆菌等在沙门氏显色培养基上能直观区分开来^[9], 建议实验室在日常工作尤其在进能力验证时可多加使用。在整个试验过程中所用到的试剂均应依据 GB4789.28-2013《食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求》^[10]进行验收, 合格后方可投入使用。在本次试验中仅使用了国产的血清, 但为了保证结果更准确, 可采用进口血清或选择 2 种以上品牌相互验证结果^[11]。也可采用如 MLST、PFGE、MLVA、PCR 等新技术来进行结果间的相互辅助^[12-14]。

目前检测方法已出现三大体系: 传统检测方法、免疫学检测方法和分子生物学检测方法。它们都具有各自的优势和不足, 有待研究人员进一步开发出更便捷高效的检测方法^[15]。

参考文献

- [1] 颜瑛, 罗玉彬, 王文娟, 等. 食品能力验证中沙门氏菌的分离和鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(9): 6-9.
- [2] 陈杖榴. 兽医药理学(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [3] 陈玲, 张菊梅, 杨小鹏, 等. 南方食品中沙门氏菌污染调查及分型[J]. 微生物学报, 2013, 12(53): 1326-1334.
- [4] 史怀平, 杨增岐, 张淑霞, 等. 猪亚利桑那菌的初步分离与鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, (10): 11-73.
- [5] 朱会林, 王德山. 一株鸭亚利桑那菌的分离与鉴定[J]. 水禽世界, 2010, (3): 39-40.
- [6] GB 4789.4-2010 食品安全国家标准 食品微生物学 沙门氏菌检验[S]. GB 4789.4-2010 National food safety standard-Food microbiological examination: *Salmonella* [S].
- [7] 唐凌天, 符斌. 实验室能力验证的发展[J]. 中国无机分析化学, 2013, 12: 3-4.
- [8] 鞠慧萍, 孙鹏翔, 苏粉良, 等. 食品能力验证样品中沙门氏菌的分离及鉴定[J]. 农产品加工(学刊), 2014, 15: 48-49.
- [9] 陈茂义, 胡婕, 刘建昭, 等. 科玛嘉显色培养基和 XLD、SS、HE 分离食品中沙门氏菌效果比较[J]. 公共卫生与预防医学 2008, 4: 12-14.
- [10] GB 4789.28-2013 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求[S]. GB 4789.28-2013 National food safety standard Food-Microbiological examination: Mass media and reagent requirements [S].
- [11] 李志勇, 谢钧宪, 许龙岩, 等. 食品微生物检验的质量控制[J]. 检验检疫科学, 2004, 4: 5-9.
- [12] 刘慧玲, 万志刚, 洪小柳, 等. 进出口食品中不同血清型沙门氏菌 PFGE 和 MLST 分型比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 11: 3454-3561.
- [13] 刘斌. 沙门氏血清分型分子靶点的发掘及鉴定体系的建立[D]. 上海: 上海交通大学, 2012.
- [14] Liu B. Mining of molecular targets and development of multiplex PCR
- [15] Yan Y, Luo YB, Wang WJ, et al. Isolation and identification of *Salmonella* spp. in food during the proficiency testing [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(9): 6-9.

methods for serogrouping and serotyping *Salmonella* spp [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2012.

[14] Lienemann T, Kyhkynen A, Halkilähti J, et al. Characterization of *Salmonella* typhimurium isolates from domestically acquired infections in Finland by phage typing, antimicrobial susceptibility testing, PFGE and MLVA [J]. *BCM Microbiol*, 2015, 2(15): 131.

[15] 郭立明, 张雪, 厉华明. 沙门氏菌检测方法的研究进展[J]. *生物技术世界*, 2014, 09: 97.

Guo LM, Zhang X, Yan HM. Advances in detection of *Salmonella* [J]. *Biotech World*, 2014, 09: 97.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



陈雨欣, 工程师, 研究方向为食品微生物。

E-mail: chen yuxin126@163.com

“果蔬加工与质量安全控制”专题征稿函

随着我国经济的飞速发展, 我国农业发展也迎来新的机遇和挑战。近年来, 通过农业经济结构调整和农业标准化体系建设, 农产品质量有较大提高, 但也存在安全问题, 果蔬是重要的经济作物, 在保证果蔬的营养的同时, 果蔬产品的质量与安全也越来越受到重视, 控制好其质量与安全具有重要的实际意义。

鉴于此, 本刊特别策划了“**果蔬加工与质量安全控制**”专题, 专题主要围绕**果蔬加工(加工前处理、加工新方法、新工艺、新技术等)**; **果蔬生产控制(农药残留、重金属超标等)**和**采后控制(加工、包装和储运保鲜等过程中的产品质量控制)**等或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在**2016年10月**出版。

本刊主编吴永宁研究员和编辑部特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在**2016年9月10日**前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持! 也谢谢您帮忙转发, 祝好! 盼回复!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部