

沙门氏菌快速检测板在食品检测中的应用研究

肖剑^{1*}, 陈娟丽², 张彬彬¹, 陈楷¹, 孙霞², 蒋佳希¹

(1. 广州市食品检验所, 广州 510410; 2. 广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司, 广州 510663)

摘要: **目的** 研究沙门氏菌快速检测板在食品检测中的应用。**方法** 以标准菌株为测试样本, 参照 GB 4789.4-2010 验证沙门氏菌快速检测板的灵敏度、特异性、假阳性率、假阴性率、准确度, 同时利用卡方检验分析阳性率显著性差异。**结果** 沙门氏菌快速检测板最低检测限能达到 10^0 CFU/mL, 灵敏度为 100%, 不存在假阴性, 特异性为 92%, 假阳性率为 8%, 准确度为 95%, 显著性差异卡方值卡 X^2 为 0.5, 均达到定性方法验证的相关指标。**结论** 沙门氏菌检测板技术方法具有快速准确、灵敏度高、操作简单的特点, 可以作为一种快速筛查方法广泛运用在食品安全微生物检测领域。

关键词: 沙门氏菌; 快速检测板; 食品检测

Application of rapid petri-dish in the detection of *Salmonella* spp. in food

XIAO Jian^{1*}, CHEN Juan-Li², ZHANG Bin-Bin¹, CHEN Kai¹, SUN Xia², JIANG Jia-Xi¹

(1. Guangzhou Institute of Food Inspection, Guangzhou 510410, China; 2. Guangdong Da Yuan Lv Zhou Food Safety Technology Co., Ltd., Guangzhou 510663, China)

ABSTRACT: Objective To research the application value of rapid petri-dish in the detection of *Salmonella* spp. in food. **Methods** The sensitivity, specificity, anti-interference, false positive rate, false negative rate and accuracy of *Salmonella* spp. petri-dish were studied by using standard strains as specimen and comparison with GB 4789.4-2010. Meanwhile, the significant difference of positive rate was analyzed by the chi-square. **Results** The minimum detection limit of *Salmonella* spp. rapid petri-dish could reach 10^0 CFU/mL. The sensitivity of *Salmonella* spp. petri-dish was 100%, and the false negative rate was 0. The specificity was 92%, and the false positive rate was 8%. The accuracy rate was 95%, and the chi-square (X^2) was 0.5. The results showed that all parameters conformed to the requirements of the test. **Conclusion** It is feasible to detect the *Salmonella* spp. with the rapid plate as a rapid screening method in the field of food safety, which is sensitivity, specificity, accuracy and simplicity.

KEY WORDS: *Salmonella* spp.; rapid petri-dish; food detection

1 引言

沙门氏菌(*Salmonella*)是肠杆菌科的一种重要的致病细菌, 为革兰氏阴性、两端钝圆的短杆菌^[1], 作为一种常见食源性致病菌, 主要存在于畜禽肉制品、蛋类制品等各类食品中, 近年来我国风险监测、监督检查发现食品中阳性

率很高^[2-4], 在国内外由该菌引起的细菌性食物中毒也居于食源性疾病的前列^[5,6]。在 GB 29921-2013《食品安全国家标准食品中致病菌限量》^[7]标准中, 所有食品均要求对沙门氏菌进行检测。因此, 建立有效快速的检验方法对于食品中沙门氏菌病的控制和预防十分重要。

目前传统培养方法鉴定沙门氏菌耗时较长, 操作繁

*通讯作者: 肖剑, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测技术。E-mail: xjq521@163.com

*Corresponding author: XIAO Jian, Master, Senior Engineer, Guangzhou Institute of Food Inspection, Guangzhou 510410, China. E-mail: xjq521@163.com

琐,沙门氏菌属已发现有2000多个血清型,检验难度较大,容易漏检和误检,且检验方法时效性差(致病菌5~7 d,甚至更多),检验程序复杂,不能满足餐饮安全保障工作要求,而快速检测技术已经成为发展的必然趋势^[8,9]。目前已经开发使用的病原微生物快速检测方法包括免疫学技术、分子生物学技术、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight, MALDI-TOF)质谱技术和电化学方法等^[10-15],这些快速检测方法大大改变了沙门氏菌检验的时间和效率,但高昂的成本及特殊专业技术人员的要求限制了方法的使用及普及。

近年来,酶触反应技术大量应用于微生物的检测,本研究应用的沙门氏菌检测板是根据新型配方的酶触反应技术、液体凝胶技术及模板制备技术相结合的综合技术体系研制,该方法是对目前使用的传统培养方法进行改进,使操作更加简单从而缩短检验时间,解决了常规的纸片存在的一些容易污染、样液溢出、需要压板操作等问题。本研究主要通过标准菌株测试和样品测试,参照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》^[16],以沙门氏菌快速检测板使用的灵敏度、特异性及准确度等技术指标考察该项目技术产品在食品中应用的可行性,以便能够较快地将该方法推广应用于我国的食品安全检测领域。

2 材料与方 法

2.1 标准菌株

试验使用的标准菌株见表1。

表1 试验使用的标准菌株
Table 1 The Standard strains in test

| 序号 | 名称 | 编号 |
|----|--------|--------------|
| 1 | 伤寒沙门氏菌 | CMCC(B)50071 |
| 2 | 大肠埃希氏菌 | ATCC25922 |
| 3 | 奇异变形杆菌 | CMCC(B)49005 |
| 4 | 粪肠球菌 | ATCC29212 |

表2 标准菌株测试方案
Table 2 Test plan of standard strains

| 试验类别 | 试验1 | 试验2 | 试验3 | 试验4 | 试验5 | 试验6 |
|---------|------|--------|--------|------|-------------------------|--------------------|
| 使用的标准菌株 | 沙门氏菌 | 大肠埃希氏菌 | 奇异变形杆菌 | 粪肠球菌 | 沙门氏菌、大肠埃希氏菌、奇异变形杆菌、粪肠球菌 | 大肠埃希氏菌、奇异变形杆菌、粪肠球菌 |

2.2 样 品

糕点、熟肉、乳制品、调味品、凉拌菜等样品,购自超市和市场。

2.3 主要培养基及试剂

沙门氏菌检测板(自制);缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW, 广东环凯生物科技有限公司);沙门氏菌显色培养基(法国科马嘉公司);平板计数琼脂(plate count agar, PCA, 广东环凯生物科技有限公司);VITEK2 阴性鉴定卡(法国梅里埃公司);0.85%无菌生理盐水(自制)。

2.4 主要仪器

SP250 生化培养箱(广东环凯生物科技有限公司);VITEK2 全自动生化鉴定仪(法国梅里埃公司);Thermo 1379 生物安全柜(美国赛默飞公司),其他为微生物室常规设备。

2.5 试验方法

2.5.1 标准菌株测试

使用标准菌株测试检测板的灵敏度和特异性,具体的测试方案见表2。试验1~4为灵敏度及特异性的测试,精确测试菌悬液的浓度为1个麦氏浊度(相当于 10^8),再进行10倍稀释至 10^0 ,检测浓度为 $10^0\sim 10^3$ (同时接种平板计数琼脂);试验5~6为干扰性试验,取各单个菌株 10^3 溶液进行混合,再进行稀释至 10^2 、 10^1 和 10^0 ,将以上稀释菌液接种检测板。

2.5.2 典型样品测试

样品测试采用人工污染样品的方式进行,对不同类型的样品选取部分进行污染,使用沙门氏菌检测板进行检测,并采用食品安全国家标准GB 4789.4-2010^[16]进行对照检验。

检测板操作:取样品25 mL(g)放入含有225 mL灭菌磷酸缓冲液(或生理盐水)的均质杯或均质袋内,制成1:10的样品匀液,根据样品污染程度及检验需要,可进一步制成10倍递增的样品稀释液;将沙门氏菌检测板置于平坦实验台面,揭开上层盖膜,用无菌吸管或移液枪吸取1 mL样品匀液滴加到检测板内,迅速贴好上层膜并水平晃动检测板,待样品匀液均匀吸附在滤纸上,静置10 s左右,倒置放入培养箱内,(36 ± 1) °C,培养15~24 h;培养后,对检测板部进行观察,呈紫红色的菌落为沙门氏菌,呈蓝色的菌落为其他菌群。

2.6 统计分析方法

2.6.1 标准菌株测试

根据检测板上菌落的生长情况及特征, 结合平板计数琼脂菌落数量, 分析检测板灵敏度及特异性。

2.6.2 样品测试

(1) 定性方法的性能指标

灵敏度、特异性、准确度、假阴性率和假阳性率的统计分析方法见表 3。

表 3 统计分析表
Table 3 Statistical analysis table

| | 国标阳性 | 国标阴性 | 合计 |
|-------|------|------|-----------|
| 检测板阳性 | A | B | A+B |
| 检测板阴性 | C | D | C+D |
| 合计 | A+C | B+D | N=A+B+C+D |

1) 灵敏度(p+)=A/(A+C)×100%

2) 特异性(p-)=D/(B+D)×100%

3) 准确度(relative accuracy)=(A+D)/N×100%

4) 假阴性率(pf-)=(1-灵敏度)×100%

5) 假阳性率(pf+)=(1-特异性)×100%

(2) 方法的显著性差异检验

方法的显著性差异检验适用于实验室内确认试验, 用于判断待确认方法和参考方法阳性比例的差异显著性, 采用 McNemar's 检验(χ^2 检验)来比较两种方法, 计算方法^[17]见下式:

$$\chi^2 = \frac{(|a-b|-1)^2}{a+b}$$

式中:

a—待确认方法证实为阳性而参考方法检验为阴性的数目;

b—待确认方法证实为阴性而参考方法检验为阳性的数目。

3 结果与分析

3.1 标准菌株测试

3.1.1 灵敏度试验

采用伤寒沙门氏菌 CMCC(B)50071 制备的菌悬液进行测试, 结果详见表 4, 由表 4 可知, 同一浓度菌液在 PCA 计数琼脂上有生长, 且数量低于 10 CFU, 检测板上均有菌落生长。因此, 以 PCA 计数琼脂为对照, 对菌液浓度进行定量, 可测出检测板能检出样品中含量低于 10 CFU/mL 浓度的沙门氏菌。

表 4 菌悬液测试检测板和 PCA 平板结果

Table 4 Results of bacteria suspension test plate and PCA board

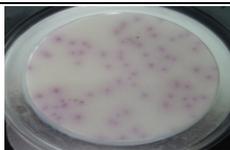
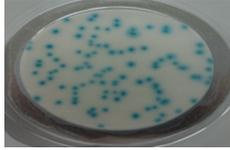
| 序号 | 检测板结果 | PCA 平板结果(CFU) |
|----|-------|---------------|
| 1 | 检出 | 5 |
| 2 | 检出 | 6 |
| 3 | 检出 | 3 |
| 4 | 检出 | 5 |
| 5 | 检出 | 2 |
| 6 | 检出 | 4 |

3.1.2 特异性和干扰性试验

根据试验方案, 选取几种有代表性的标准菌株进行测试, 结果详见表 5。沙门氏菌菌落为紫红色, 且经过滤纸扩散后, 菌落色泽和大小特征明显, 大肠埃希氏菌为蓝色, 容易辨别, 奇异变形杆菌为黄色, 粪肠球菌生长受到抑制, 无菌落生长; 阳性干扰试验结果表明, 沙门氏菌能够较好的培养出来, 且数量上占据一定优势; 阴性干扰试验表明, 在无沙门氏菌竞争情况下, 奇异变形杆菌也能够正常生长。

表 5 特异性和干扰性试验结果

Table 5 Results of specificity and anti-interference

| 序号 | 试验 | 结果 | 描述 |
|----|---------------------------------------|---|------------|
| 1 | 伤寒沙门氏菌 |  | 紫红色菌落 |
| 2 | 大肠埃希氏菌 |  | 蓝色菌落 |
| 3 | 奇异变形杆菌 |  | 黄色菌落 |
| 4 | 粪肠球菌 |  | 不生长 |
| 5 | 伤寒沙门氏菌、 大肠埃希氏菌、 奇异变形杆菌、 粪肠球菌 |  | 紫红色菌落、黄色菌落 |
| 6 | 大肠埃希氏菌、 奇异变形杆菌、 粪肠球菌 |  | 黄色菌落 |

3.2 样品测试

3.2.1 样品测试结果

选取部分样品,通过自然样品及人工污染样品的形式进行试验,检验结果见表6。

参照2.6.2统计分析方法,对表6中检验数据进行整理统计,以国标法结果为参照,得出沙门氏菌检测板快速方法的统计结果,详见表7。

3.2.2 方法性能指标及显著性差异分析

通过表7统计结果,按照2.6.2中的计算方法,得出沙门氏菌检测板快速方法的性能指标,详见表8。根据方法确认性能指标要求^[17]:灵敏度 $\geq 98\%$,特异性 $\geq 90.4\%$,假阴性率 $< 2\%$,假阳性率 $< 9.6\%$,准确度 $\geq 94\%$,显著性差异卡方值 < 3.84 进行判定。沙门氏菌检测板灵敏度、特异性、假阳性率、准确度、显著性差异卡方值均超过了指标要求。

4 讨论与结论

病原微生物快速检测技术已经成为食品安全检测使用的必然趋势,本研究中使用的沙门氏菌检测板,主要针对国外产品价格高昂、国内产品准确度达不到较高水平的

问题,在酶触反应技术研究的基础上,克服纸片法在使用过程中遇到的一些技术难题,并优化产品配方,是利用创新技术开发出的一系列病原微生物快速检验技术产品之一。该技术产品比较贴近国家标准方法,不需要专业昂贵设备,对操作人员技术能力要求较低,并且能够较快给出结果。

沙门氏菌检测板快速方法操作简单,产品的灵敏度和特异性达到90%以上,最低检测限能达到 10^0 CFU/mL,性能指标优于国内的纸片产品,达到国外的同等技术水平,但通过本试验也发现存在一些技术问题,在一些含有复杂菌群或者微生物受污染程度比较高的食品中应用,比如凉拌菜、肉制品等食品,检验结果受干扰的程度比较大,可能存在假阳性的情况;对于一些长期冷冻的食品,因为微生物细胞处于休眠或受到损伤,在含量较低的情况下,未经过增菌,可能会降低食品的阳性检出率,建议该类食品增菌后进行检测。另外,该技术方法同国标定性的方法不同,未经过增菌,直接进行检测,也能反映出样品受沙门氏菌污染的程度,但是否能够报告定量结果,需进行定量指标的验证和确认。

表6 样品中沙门氏菌阳性结果数量
Table 6 Positive numbers of *Salmonella* in samples

| 序号 | 食品类别 | 检测板阳性数量 | 国标阳性数量 | 样品数量 | 人工污染样品 |
|----|--------|---------|--------|------|--------|
| 1 | 糕点、饼干 | 5 | 5 | 10 | 5份样品污染 |
| 2 | 熟肉、生肉 | 3 | 2 | 10 | |
| 3 | 乳制品 | 2 | 2 | 5 | 2份样品污染 |
| 4 | 即食调味品 | 2 | 2 | 5 | |
| 5 | 盒饭、凉拌菜 | 3 | 2 | 5 | |
| 6 | 果汁饮料 | 2 | 2 | 5 | |
| | 总计 | 17 | 15 | 40 | |

表7 统计分析表
Table 7 Statistical analysis table

| | 国标阳性 | 国标阴性 | 合计 |
|-------|------|------|------|
| 检测板阳性 | 15 | 2 | 17 |
| 检测板阴性 | 0 | 23 | 23 |
| 合计 | 12 | 25 | N=40 |

表8 沙门氏菌检测板快速检测法与国标法比较性能指标及显著性差异结果
Table 8 Comparison of the performance indexes between rapid petri-dish with *Salmonella* and national standard and the significant differences

| 检测项目 | 灵敏度(%) | 特异性(%) | 假阴性率(%) | 假阳性率(%) | 准确度(%) | χ^2 |
|------|--------|--------|---------|---------|--------|----------|
| 沙门氏菌 | 100 | 92 | 0 | 8 | 95 | 0.5 |

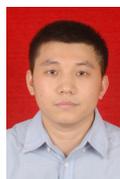
综上所述, 沙门氏菌检测板技术方法具有快速、准确、灵敏度高、操作简单的特点, 可以作为食品中沙门氏菌检测的一种快速筛查方法广泛运用在食品安全微生物检测领域。

参考文献

- [1] 张萍, 冯芳. 沙门氏菌的检测技术和方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1834-1841.
Zhang P, Feng F. Research progress of *Salmonella* detection techniques and methods [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(5): 1834-1841.
- [2] 陈玲, 张菊梅, 杨小鹃, 等. 南方食品中沙门氏菌污染调查及分型[J]. 微生物学报, 2013, 53(12): 1326-1333.
Chen L, Zhang JM, Yang XJ, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella* spp. from foods in south China [J]. Acta Microbiol Sin, 2013, 53(12): 1326-1333.
- [3] 尹德凤, 张莉, 张大文, 等. 食品中沙门氏菌污染研究现状[J]. 江西农业学报, 2015, 27(11): 55-60.
Yin DF, Zhang L, Zhang DW, et al. Research status of pollution of *Salmonella* in food [J]. Acta Agric Jiangxi, 2015, 27(11): 55-60.
- [4] 吴云凤, 袁宝君. 南京市零售生鲜鸡类产品中沙门氏菌的污染状况调查[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2015, 35(2): 284-287.
Wu YF, Yuan BJ. Contamination status of *Salmonella* in retail raw chicken products of Nanjing [J]. Acta Univ Med Nanjing (Nat Sci Ed), 2015, 35(2): 284-287.
- [5] 聂艳, 尹春, 唐晓纯, 等. 1985-2011 年我国食物中毒特点分析及应急对策研究[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 218-222.
Nie Y, Yin C, Tang XC, et al. Comparative analysis of food poisoning and emergency countermeasures in China from 1985 to 2011 [J]. Food Sci, 2013, 34(5): 218-222.
- [6] Centers for Disease Control and Prevention. Food Net 2007 Surveillance Report. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta [R]. CDC, 2009.
- [7] GB 29921-2013 食品安全国家标准 食品中致病菌限量[S].
GB 29921-2013 National food safety standard-Pathogenic bacteria in food [S].
- [8] 张小平, 吴忠华, 魏莹. 食品中沙门菌检测技术研究进展[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2016, 39(1): 72-75.
Zhang XP, Wu ZH, Wei Y. Research progress on detection technology of *Salmonella* in food [J]. Chin J Frontier Health Quar, 2016, 39(1): 72-75.
- [9] 杨春光, 王宏伟, 彭心婷, 等. 食品病原微生物快速检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(1): 41-46.
Yang CG, Wang HW, Peng XT, et al. Research advances for fast detection of food borne pathogenic bacteria [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(1): 41-46.
- [10] 房芳, 敬思群, 李锦丰, 等. 一种沙门氏菌化学发光酶免疫分析方法的建立[J]. 食品科技, 2014, 39(8): 281-286.
Fang F, Jing SQ, Li JF, et al. Establishment of chemiluminescent enzyme immunoassay for *Salmonella* [J]. Food Sci Technol, 2014, 39(8): 281-286.
- [11] GB/T 22429-2008 食品中沙门氏菌、肠出血性大肠埃希氏菌 O157 及单核细胞增生李斯特氏菌的快速筛选检验酶联免疫法[S].
GB/T 22429-2008 Rapid screening for *Salmonella*, *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in foods enzyme-linked immunoassay method [S].
- [12] SN/T 1059.7-2010 进出口食品中沙门氏菌检测方法实时荧光 PCR 法[S].
SN/T 1059.7-2010 Detection of *Salmonella* in food for import and export real-time PCR method [S].
- [13] 饶名祯, 顾晨荣, 李云霞, 等. MALDI-TOF MS 技术在食品微生物领域的应用研究[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2015, 44(6): 681-686.
Rao MZ, Gu CR, Li YX, et al. The application of MALDI-TOF MS in food microorganisms research [J]. J Shanghai Norm Univ (Nat Sci Ed), 2015, 44(6): 681-686.
- [14] Antony C, Guy P, Gilbert G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology [J]. Feder Eur Microbiol Societies, 2012, 36(2): 380-407.
- [15] 周永军, 牛中奇, 卢智远, 等. 基于电化学传感器的菌量实时检测系统[J]. 仪表技术与传感器, 2014, 2: 71-72.
Zhou YJ, Niu ZQ, Lu ZY, et al. Real-time detection system to amount of bacteria based on electrochemical sensors [J]. Instrum Technol Sensor, 2014, 2: 71-72.
- [16] 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].
GB 4789.4-2010 National food safety standard-Food microbiological examination: *Salmonella* [S].
- [17] 李宏, 雷质文. 食品微生物检测方法确认和证实手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
Li H, Lei ZW. Handbook of validation and confirmation of food microbiological methods [M]. Beijing: China Standard Publishing House, 2013.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



肖 剑, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测技术。
E-mail: xjhq521@163.com