

食源性沙门氏菌鉴定和血清分型能力验证

史晓娟*, 马建敏, 孙丽莉, 魏红霞, 王伟丽, 贺海花

(新乡市疾病预防控制中心, 新乡 453700)

摘要: **目的** 验证本实验室在国家食品安全风险监测项目中微生物检验能力和实验室质量控制水平。**方法** 实验样品按照考核方作业指导书要求进行样品前处理后, 参照 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学 沙门氏菌检验》进行沙门氏菌检验, 同时取增菌液与预增菌液使用全自动病原微生物检测系统进行鉴定。将全自动病原微生物检测系统鉴定结果与生化试验相结合进行对比, 结果均符合沙门氏菌属的样品再进行血清学鉴定。**结果** 编号 2017S-16(3)-1 样品检出鼠伤寒沙门氏菌, 2017S-16(3)-2 样品检出阿贡纳沙门氏菌, 2017S-16(3)-3 样品未检出沙门氏菌。本实验室顺利完成考核, 结果与考核方一致。**结论** 本实验室通过参加能力验证和质控考核, 提升食品检验机构检验能力和实验室质控水平。

关键词: 能力验证; 沙门氏菌; 菌株分离; 血清型

Ability verification of identification and serotyping of foodborne *Salmonella*

SHI Xiao-Juan*, MA Jian-Min, SUN Li-Li, WEI Hong-Xia, WANG Wei-Li, HE Hai-Hua

(Center for Disease Prevention and Control of Xinxiang City, Xinxiang 453700, China)

ABSTRACT: Objective To verify the laboratory ability and laboratory quality control in food safety risk monitoring project of China. **Methods** The experimental samples were processed in accordance with the requirements of operation instruction. According to GB 4789.4-2016 *National food safety standard-Microbiological examination of food hygiene-Examination of Salmonella*, three blind samples were detected. At the same time, enrichment broth and pre enrichment broth were identified by the automatic pathogenic microorganism detection system. When the biochemical results and the identification results of automatic pathogenic microorganism detection system of samples were consistent, the results were all conformed to the samples of *Salmonella* to be identified by serological identification. **Results** *Salmonella typhimurium* was detected in sample 2017S-16(3)-1 and *Salmonella agona* was detected in sample 2017S-16(3)-2. 2017S-16(3)-3 sample was not detected *Salmonella*. The laboratory successfully completed the examination, and the results were consistent with the assessment party. **Conclusion** The laboratory improves the inspection ability of the food inspection institutions and the level of quality control of the laboratory by participating in the verification of ability and quality control assessment.

KEY WORDS: ability verification; *Salmonella*; strain isolation; serotype

*通讯作者: 史晓娟, 检验技师, 主要研究方向食品微生物检验。E-mail: shixiaojuan163@163.com

*Corresponding author: SHI Xiao-Juan, Technician, Center for Disease Prevention and Control of Xinxiang City, Xinxiang 453700, China. E-mail: shixiaojuan163@163.com

1 引言

沙门氏菌食物中毒是细菌性食物中毒中比较常见的一类, 由于沙门氏菌分布极广, 沙门氏菌的传播媒介众多, 大多数存在于家禽(鸡、鸭、鹅)、飞鸟、家畜(猪、牛、羊等)、鼠类及某些野生动物的肠腔和内脏中, 当禽、畜发病时, 细菌就可以从肠道淋巴侵入血流而遍布全身组织^[1,2]。如果食用时没有彻底加热或生熟制品交叉污染就可以引起食物中毒。尤其是食用病死的畜肉, 中毒机会更大。除了家禽、家畜广泛存在沙门氏菌外, 鱼、蛋和蛋制品也经常带有沙门氏菌^[3], 鱼、蛋和蛋制品从加工到出售的过程中都很容易发生污染, 因此对沙门氏菌的检验事关重大。

本实验室参加了 2017 年国家认监委能力验证计划食源性沙门氏菌检验分型项目, 通过能力验证是实验室申请认可的必要条件之一, 也是控制实验室检验水平的有效措施。分析能力验证结果数据, 不仅能够了解实验室的技术能力和管理水平, 了解实验室是否满足认可和认证机构的要求, 还能够提高实验室的检测技术水平, 增强实验室自身及委托方的信心^[4]。

2 材料与方法

2.1 实验样品

实验室编号为 2017S-16(3), 样品编号为 2017S-16(3)-1、2017S-16(3)-2、2017S-16(3)-3, 每份考核样品包含西林瓶 1 个, 基质样品袋 1 份(25 g/包), 西林瓶中装有白色冻干菌球。本次考核共计 3 份样品, 包含阴性样本和阳性样本。

2.2 试剂及仪器

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、四硫磺酸钠煌绿(tatrathionate broth, 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、沙门氏菌属显色培养基、三糖铁(triple sugar iron, TSI)琼脂、沙门氏菌属生化鉴定试剂盒、半固体琼脂营养琼脂、Swarm 琼脂均采用北京路桥技术有限公司产品; 丹麦 SSI 沙门氏菌属诊断血清套装、沙门氏菌属诊断血清套装(浙江宁波天润公司); BagMixer 400 拍打式均质器(法国 Interscience 公司); ThermoIGS180 恒温培养箱(美国 Thermo 公司); 杜邦 BAX System Q7 全自动病原微生物检测系统(美国杜邦公司); 无菌双蒸水。

在整个试验过程中所用到的试剂均应依据 GB 4789.28-2013《食品微生物学检验培养基和试剂的质量要求》^[5]进行验收。

2.3 实验方法

按照考核方作业指导书要求, 样品前处理按照作业

指导书进行。样品前处理后, 按照 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学 沙门氏菌检验》^[6]开始检测程序。

2.3.1 样品前处理与预增菌

待质控样品恢复至室温, 无菌开启瓶盖, 将西林瓶中的白色菌球完全溶解于 1 mL BPW 中复溶。以无菌操作将上述溶液移至装有 220 mL BPW 的无菌袋中, 再用灭菌 BPW 充分洗涤西林瓶 4 次, 每次 1 mL, 洗液合并到样品均质袋中。向样品均质袋中加入相应编号的基质, 振荡混匀。将 BPW 增菌液放置于 36 °C 培养 18 h。

2.3.2 增菌培养

取 1 mL 混匀培养物接种于 10 mL TTB 内, 于 42 °C 培养 24 h。另取 1 mL 接种于 10 mL SC 内, 36 °C 培养 24 h。同时取 5 μL 增菌液用于全自动病原微生物检测系统鉴定。

2.3.3 分离

将增菌液无菌操作分别划线接种 BS 琼脂平板和沙门氏菌属显色培养基上, 于 36 °C 培养箱中分别培养 48 h 和 24 h, 观察菌落特征, 判定有无可疑菌落生长。同时取 5 μL 增菌液用于全自动病原微生物检测系统鉴定。

2.3.4 生化鉴定

选取平板上 3 个可疑菌落, 分别接种 TSI 斜面。同时将这些培养物接种于营养琼脂平板纯化, 于 36 °C 培养 24 h, 用于后续生化试验。

2.3.5 血清学鉴定

将生化试验与全自动病原微生物检测系统鉴定结果一致且符合沙门氏菌属特性的样品进行血清学试验。首先检查培养物有无自凝性, 若出现可见的菌体凝集, 即认为有自凝性, 对无自凝的培养物继续进行血清学鉴定。

多价菌体抗原(O)鉴定: 菌体抗原有抗原性、耐热性, 与相应抗体呈颗粒状凝集。在玻片上划出 2 个形状相同区域。挑取一环待测菌, 各放一半于 2 个区域, 其中一个区域滴加 1 滴多价血清, 另一区域滴加生理盐水, 将混合液前后倾斜移动 1 min, 并在良好照明下对着黑暗背景观察, 任何程度的凝集都视为阳性反应。按照 SSI 沙门血清套盒说明书要求依次凝集多价血清 OMA、OMB、OMC、OMD, 被多价血清凝集后, 按照上述方法依次凝集其多价对应的单因子血清, 来判定 O 群。将判定为 O 群的样本继续做鞭毛 H 抗原鉴定。鞭毛 H 抗原与相应的抗体呈絮状凝集, 大部分沙门氏菌属 H 抗原有两相, 任意一相发育不良时, H 抗原对应相不凝集。可先恢复其动力后再做凝集试验, 若仍不凝集, 再采用诱导方法做凝集试验。该实验依次凝集 HMA、H:E、H:G、HMC、H:L、HMD。

动力恢复试验: 挑取目标菌, 接种于含有 0.55%~0.65%的半固体琼脂上, 选取菌落最远端边缘部分进行血清凝集试验。

简易平板诱导: 滴加 2 滴(约 10 μL 左右)已凝集项的诱导血清于平皿中, 倾注 5 mL 左右 Swarm 培养基混合均匀, 待其凝固后将菌株点种至平板中央, 36 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h。平皿中的抗血清会抑制细菌已鉴定项的表达, 待测抗原相可以表达。取菌落最远端边缘的部分进行 H 另一相鉴定。

3 结果与分析

3.1 平板分离结果及全自动病原微生物检测系统鉴定结果

经增菌划线分离后, 观察结果编号 2017S-16(3)-1、2017S-16(3)-2 平板上出现可疑菌落特征, 编号 2017S-16(3)-3 平板上未出现可疑菌落。各平板上菌落特征与全自动病原微生物检测结果见表 1。

3.2 可疑菌落生化鉴定结果

将样本编号 2017S-16(3)-1、2017S-16(3)-2 上的可疑菌落进行纯化, 纯化后进行生化试验, 结果均与沙门氏菌

属生化特性符合, 详细结果见表 2。

3.3 血清学鉴定结果

按照国标 GB 4789.4-2016 血清学鉴定要求对样本 2017S-16(3)-1、2017S-16(3)-2 进行鉴定, 具体结果见表 3。

4 结论与讨论

通过本次实验室能力验证考核, 不仅能够判定实验室检测能力, 同时也能确保实验室检验结果准确可靠, 为相关决策提供准确依据^[7]。

本次考核中有 2 个关键点, 关键点 1: 首先能够准确筛查出沙门氏菌属, 该实验通过选用杜邦 BAX System Q7 全自动病原微生物检测系统在预增菌和增菌过程中均筛选出沙门氏菌, 并和平板分离生化试验结果一致。快速检测是疾控检验人员处理突发公共事件的有利工具, 快检技术能提高实验室检测的针对性, 是对实验室常规检测的有益补充^[8]。此外本实验室通过日常工作中检测该菌总结出,

表 1 样本菌落特征及全自动病原微生物检测系统鉴定结果

Table 1 Characteristics of the sample colonies and automatic pathogenic microorganism detection system identification results

	样品编号		
	2017S-16(3)-1	2017S-16(3)-2	2017S-16(3)-3
BS 琼脂平板	菌落黑色, 有金属光泽, 基底棕色	菌落黑色, 有金属光泽, 基底棕色	浅灰绿色
沙门氏菌显色培养基	紫红色菌落	紫红色菌落	蓝绿色
预增菌 BAX System Q7 <i>Salmonella</i>	+	+	-
二次增菌 BAX System Q7 <i>Salmonella</i>	+	+	-

注: “+”表示检测出目标菌, “-”表示未检测出目标菌

表 2 样本中沙门氏菌各项生化试验结果

Table 2 Biochemical test results of *Salmonella* samples

样品编号	TSI 琼脂				赖氨酸脱羧酶	尿素酶	靛基质	甘露醇	山梨醇	ONPG	KCN
	斜面	底层	产气	H ₂ S							
2017S-16(3)-1	K	A	+	+	+	-	-	+	+	-	-
2017S-16(3)-2	K	A	+	+	+	-	-	+	+	-	-

注: “-”表示阴性及无生长。“+”表示阳性及生长。3 个可疑菌落生化结果相同。

表 3 样本沙门氏菌血清学试验结果

Table 3 Serological test results of *Salmonella* samples

样品编号	血清学鉴定			血清学分型			检验结果	
	多价抗原 (O)	多价抗原 (H)	O 抗原	H 抗原		Vi 抗原	血清群	血清型
				I 相	II 相			
2017S-16(3)-1	OMA	HMA	4, 5	i	2	-	B 群	鼠伤寒沙门氏菌
2017S-16(3)-2	OMA	H:G	4, 5	g, f, s	2	-	B 群	阿贡纳沙门氏菌
对照试验	-	-	-	-	-	-	/	/

注: “-”表示无凝集现象, “/”表示无结果。

相较于其他选择性培养基,沙门氏菌在沙门氏菌显色板上更容易与其他细菌区分开来,观察起来更直接^[9]。关键点2:血清凝集过程中,菌体抗原较容易判定,对于鞭毛抗原,若从营养琼脂上未凝集出,则需要半固体琼脂进行动力恢复。凝集鞭毛抗原时,要挑取菌落最远端边缘部分进行凝集试验。只凝集出一相,另一相可以采取简易平板法诱导。本次试验血清采用2种血清,以进口血清凝集结果为主,并使用国产血清做验证试验,进口血清凝集速度更快,效果更好。

血清学鉴定是沙门氏菌检验中的重要鉴定方法,但是采用玻片凝集实验的血清型鉴定方法,耗时长,操作繁琐,且需要有经验、熟练的技术人员。尚有约5%~8%的沙门氏菌因存在荚膜或缺乏鞭毛相而只能部分甚至无法进行血清分型^[10]。现在新的分型方法例如MLST、PFGE、PCR等分子分型技术应运而生^[11-13],这些方法操作简单,耗时短,对操作人员要求不高。但是每种方法也有其缺点,例如MLST、PFGE需要通过数据库对比才能够用来预测血清型,且容易发生血清型预测错误^[14],实时荧光PCR方法可以快速直接测定血清型,但该方法也存在一些问题,如:O抗原或H抗原发育不完全,引物或探针不能与之结合,导致没有分型结果;样本受到其他抗原污染导致引物或探针结合与其结合,试验结果出现假阳性结果。有可能会存在待检测基因的突变而不表达,然而这些基因还仍存在于基因组中^[15],这也将导致PCR结果出现假阳性,血清分型错误。这些方法都不能完全取代血清凝集试验,但可以来辅助验证实验结果。具体采取哪种方法则需要检验人员根据自身实验室情况进行选择。

参考文献

- [1] 李凡,刘晶星. 医学微生物学(第七版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2012.
Li F, Liu JX. Medical microbiology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012.
- [2] 李秀秋. 沙门氏菌食物中毒临床症状及预防措施[J]. 中国医学创新, 2009, 6(35): 194-196.
Li XQ. Food poisoning treatment and preventive measures of *Salmonella* [J]. Med Innov China, 2009, 6(35): 194-196.
- [3] 周红利,张滨,刘素纯. 食品微生物学[M]. 北京:中国标准出版社, 2012.
Zhou HL, Zhang B, Liu SC. Food microbiology [M]. Beijing: Standards Press of China, 2012.
- [4] 黄翠微,席静,梁瑞婷. 浅析实验室参加能力验证活动的过程及意义[J]. 现代测量与实验室管理, 2017(6): 59-60.
Huang CW, Xi J, Liang RT. Analysis on the process and significance of laboratory participation ability verification [J]. Adv Meas Lab Manag, 2017(6): 59-60.
- [5] 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 Microbiological examination of food hygiene-Staining methods, culture mediums and reagents [S].
- [6] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2016 National food safety Standard-Microbiological examination of food hygiene-Examination of *Salmonella* [S].
- [7] 朱永敏. 2015年参加市微生物检测能力验证的心得[J]. 临床医药文献杂志, 2016, 48(3): 9590-9591.
Zhu YM. Experience of taking part in the validation of municipal microbiological test in 2015 [J]. J Clin Med, 2016, 48(3): 9590-9591.
- [8] 邓晓丽,许航,遇婷. 杜邦 BAX Q7 在食品检测中应用效果的验证[J]. 中国卫生检验杂志 2014, 7(24): 956-964.
Deng XL, Xu H, Yu T. Test of DuPont BAXQ7 application effect in food detection [J] Chin J Health Lab Technol, 2014, 7(24): 956-964.
- [9] 陈茂义,胡捷,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, 19(4): 12-14.
Chen MY, Hu J, Liu JZ, et al. Comparison of CAS and XLD, SS and HE media for isolation of *Salmonella* strains from food samples [J]. J Public Health Prev Med, 2008, 19(4): 12-14.
- [10] 方婷子,史贤明,施春雷. 沙门氏菌血清型快速 PCR 鉴定方法的建立[J]. 中国食品学报, 2017, 2(17): 212-218.
Fang TZ, Shi XM, Shi CL. Development of rapid PCR determination method of *Salmonella* serovars [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2017, 2(17): 212-218.
- [11] 赵翠,张庆,郭树源,等. 山东省动物源沙门氏菌 MLST 和血清分型与分布研究[J]. 中国人兽共患病学, 2017, 33(9): 793-794.
Zhao C, Zhang Q, Guo SY, et al. Distribution and typing of animal-derived *Salmonella* with MLST and serotype [J]. Chin J Zoonoses, 2017, 33(9): 793-794.
- [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): 3454-3461.
Liu HL, Wan ZG, Hong XL, et al. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing of *Salmonella* in import and export foods [J]. J Food Saf Qual, 2014, (11): 3454-3461.
- [13] 李杰,丁承超,翟续昭,等. 沙门氏菌检测技术研究进展[J]. 微生物学杂志 2017, 4(37): 126-128.
Li J, Ding CC, Zhai XC, et al. Advances in *Salmonella* detection techniques [J]. J Microbiol, 2017, 4(37): 126-128.
- [14] Jabbari AR, Azizian K, Esmaelizad M. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliA* and *fliB* in bovine *Clostridium chauvoei* isolates [J]. Iran J Vet Med, 2016, 10(1): 27-32.
- [15] Mcquiston JR, Parrenas R, Ortiz-Rivera M, et al. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *flpA* from *Salmonella* [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 1923-1932.

(责任编辑:姜 珊)

作者简介

史晓娟, 检验技师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: shixiaojuan163@163.com