

巧克力中沙门氏菌检验能力验证的分析

牛会敏*, 王静怡, 陈万胜

(河南省口岸食品检验检测所, 郑州 450001)

摘要: 目的 分析参加中国食品药品检定研究院组织的 NIFDC-PT-135 巧克力中沙门氏菌检验能力验证实验结果。**方法** 巧克力样品的前处理按照作业指导书要求进行, 沙门氏菌的分离及鉴定按照 GB 4789.4-2016 《食品安全国家标准 食品微生物检验沙门氏菌检验》进行, 传统生化试验结合 VITEK 2 鉴定结果进行综合判定。**结果** CODE0559 样品中检出沙门氏菌属, CODE0205 样品中检出肠沙门氏菌双相亚利桑那亚种, CODE0863 样品中未检出沙门氏菌, 3 个样品能力验证结果均与组织方一致。**结论** 基于国标法检测沙门氏菌时, 应综合使用几种分离平板, 传统生化试验并结合 VITEK2 作为辅助检测, 以确保检测结果的准确性。

关键词: 沙门氏菌; 能力验证; 分离鉴定

Analysis of verification of *Salmonella* test ability in chocolate

NIU Hui-Min*, WANG Jing-Yi, CHEN Wan-Sheng

(Food Inspection and Testing Institute of Henan Province, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the results of ability verification of *Salmonella* testing of NIFDC-PT-135 chocolate organized by National Institutes for Food and Drug Control. **Methods** The pre-treatment of chocolate samples was implemented accordance with the operation instructions. The isolation and identification of *Salmonella* were conducted in accordance with GB 4789.4-2016 *National food safety standard-Food microbiological examination-Salmonella*, and the results of traditional biochemical test and VITEK 2 identification were combined for comprehensive determination. **Results** *Salmonella* was detected in sample CODE0559 and *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* was detected in sample CODE0205. There was no *Salmonella* ssp. detected in the sample CODE0863. The capability verification results of the 3 samples were consistent with the organizer. **Conclusion** In the detection of *Salmonella* based on the national standard method, several separation plates should be used in combination with the traditional biochemical test and VITEK2 as an auxiliary test to ensure the accuracy of the detection results.

KEY WORDS: *Salmonella* ssp; proficiency testing; separation identification

1 引言

沙门氏菌被认为是目前世界范围内最重要的食源性致病菌之一, 为革兰氏阴性杆菌, 属肠杆菌科^[1], 菌体溶解时, 其细胞壁释放出脂多糖, 形成内毒素^[2], 主要在动物肠道生长繁殖, 可通过肠道上皮细胞进入体内, 通过血

液循环, 导致全身感染和菌血症, 严重危害人类身体健康^[3]。食物传播是人类感染沙门氏菌的主要途径, 肉类(尤其是禽肉)、蛋类及蛋制品、未经巴氏消毒的牛奶及奶制品、海产品等很多食品都与沙门氏菌病有关。人类沙门氏菌病的特征是恶心、呕吐、腹泻、腹痛或痉挛、发烧及头痛。在欧洲, 每年有超过 16 万人被沙门氏菌感染, 发生率约

*通讯作者: 牛会敏, 硕士, 工程师, 主要研究方向食品微生物检测。E-mail: 530796065@qq.com

*Corresponding author: NIU Hui-Min, Master, Engineer, Food Inspection and Testing Institute of Henan Province, No.8, Jinger Road, Zhengzhou, Henan 450001, China. E-mail: 530796065@qq.com

0.035%^[4],我国内陆地区食物中毒事件中也以沙门氏菌为首位^[5],每年由沙门氏菌引起的食物中毒事件占全部食物中毒事件的70%~80%,因此,沙门氏菌的检测在食品安全检验中具有重要的意义^[6]。

能力验证是国际通行的评价检测机构技术能力的重要手段。微生物检测能力验证是控制实验室微生物检测的关键环节,能否通过能力验证直接关系到检验报告的准确性和可靠性^[7]。近几年,我实验室积极参加食品微生物检测领域的各项能力验证实验,以提高实验室检测能力,提升检测人员业务水平,提高市场竞争力。本次沙门氏菌能力验证采用传统培养方法,辅助使用VITEK全自动微生物鉴定系统以提高检测准确性,结合多年食品微生物检验的工作经验,总结并提出沙门氏菌能力验证过程中的关键注意点,以期对相关检测提供参考。

2 材料与amp;方法

2.1 样品

实验室共收到中国食品药品检定研究院2017年5月组织的NIFDC-PT-135的3份巧克力样品,样品编码分别是CODE0863、CODE0559、CODE0205,每份样品为1块瓶装巧克力,装量约为10g,采用玻璃瓶包装。

2.2 试剂与amp;仪器

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(selenite cystine broth, SC)、沙门氏菌显色培养基平板(color medium plate, CAS)、沙门氏菌干制生化鉴定试剂盒(北京陆桥技术股份有限公司);四硫磺酸盐煌绿增菌液(tetrathiosulfate chlorogenic solution, TTB)、亚硫酸铋琼脂(bismuth sulfite agar, BS)显色培养基、三糖铁管(trisaccharide iron pipe, TSI)、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(xylose lysine deoxycholate, XLD)(青岛海博生物技术有限公司);VITEK 2 革兰氏阴性细菌鉴定卡(上海生物梅里埃公司)。

VITEK 2 compact 全自动微生物生化鉴定仪(法国生物梅里埃公司);A2型二级生物安全柜(艺斯高(上海)贸易有限公司)。

2.3 检测方法

根据中国食品药品检定研究院制定的作业指导书的要求,样品前处理应按照作业指导书进行,后续检测依据

GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》(以下简称国标)^[8]进行。

2.3.1 样品前处理

在生物安全柜里开启玻璃瓶。预先准备90 mL 预热至45℃的灭菌BPW,首先取20 mL 灭菌BPW加入检样瓶内,待巧克力融化后加入无菌均质袋内。取20 mL 灭菌BPW清洗检样瓶,将洗液加入均质袋内,再取20 mL 灭菌BPW重复清洗一次,最后想均质袋内加入30 mL 灭菌BPW,制成1:10 稀释液。将此稀释液直接作为前增菌液,参照GB/T 4789.24-2003《食品卫生微生物学检验 糖果、糕点、蜜饯》^[9]的要求对巧克力样品进行融化,待融化完全,充分均质混匀,于36℃±1℃静置培养12 h。

2.3.2 选择性增菌

摇匀培养物,取1 mL 接种于10 mL TTB 内,于42℃培养24 h,同时,另取1 mL 接种于10 mL SC 内,于36℃培养24 h。

2.3.3 分离

用一次性接种环沾取增菌液,分别划线接种于沙门氏菌显色培养基平板、XLD 琼脂平板上,36℃培养24 h,BS 琼脂平板上,36℃培养48 h。

2.3.4 生化试验

从CODE0205和CODE0559 2个样品的选择性琼脂平板上挑取每种不同形态的菌落,分别接种到三糖铁琼脂、尿素琼脂、赖氨酸脱羧酶试验培养基和营养琼脂平板上,36℃培养24 h。自营养琼脂平板上挑取纯培养物,按照说明书的要求接种到沙门氏菌干制生化鉴定试剂盒,同时利用VITEK 2 compact 全自动微生物生化鉴定对纯培养物进行鉴定。

3 结果与分析

3.1 选择性分离结果

观察各个平板上的菌落生长情况,菌落形态描述见表1。CODE 0863 样品在所有选择性平板上均是无菌落生长,直接判定沙门氏菌阴性;对于CAS 平板,沙门氏菌呈现淡紫色菌落,大肠杆菌呈现蓝色,某些变形杆菌呈现无色菌落;但乳糖阳性的沙门氏菌会出现金属蓝色,一些假单胞菌有时也会出现紫色菌落。XLD 平板上,沙门氏菌会出现粉红色菌落,带或不带黑心;或全部黑色的菌落;或黄色菌落,带或不带黑心。从表1的描述可推断样品CODE 0559 和 CODE 0205 均可能存在阳性沙门氏菌。

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

样品编号	沙门显色平板	XLD 平板	BS 平板
CODE 0205	A: 蓝色圆形菌落 B: 白色圆形菌落	A: 黄色圆形菌落,中间带黑心 B: 黄色圆形菌落	棕黑色圆形菌落
CODE 0559	A: 紫红色圆形菌落	A: 粉红色圆形菌落,中间带黑心 B: 黄色圆形菌落	棕黑色圆形菌落
CODE 0863	无菌落生长	无菌落生长	无菌落生长

3.2 生化试验、VITEK 2 鉴定结果

CODE 0559 样品在不同选择性平板上所有菌落形态在纯化后进行生化试验, 结果见表 2, 结合 GB4789.4-2016 中沙门氏菌属生化反应鉴定表进行判断, CAS A 菌落、XLD A 菌落通过三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验的初步判断为可疑沙门氏菌属, 再结合靛基质实验、pH 7.2 尿素, 氰化钾试验可判断为国标中 A1 反应序号, 为典型沙门氏菌属反应, 此结果与 VITEK 2 鉴定结果(见表 3)一致。而 XLD B 菌落由于赖氨酸试验阴性, 结合三糖铁结果, 判断为非沙门氏菌, 此结果也与 VITEK 2 鉴定结果一致。

表 2 CODE 0559 样品不同菌落形态的生化反应结果
Table 2 Biochemical reaction results of CODE 0559 samples with different colony morphology

生化试验	沙显平板 A 菌落	XLD 平板 A 菌落	XLD 平板 B 菌落
底层	A	A	A
三糖铁			
斜面	A	A	A
H ₂ S	+	+	+
产气	+	+	+
氨基酸对照	黄色	黄色	黄色
赖氨酸	+	+	-
氰化钾对照	生长	生长	生长
氰化钾	-	-	-
靛基质	-	-	-
尿素酶	-	-	-
甘露醇	+	+	+
山梨醇	+	+	-
ONPG	-	-	+

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性; A: 产酸 (变黄色), K: 产碱(变红色)。

表 3 CODE 0559 样品不同菌落形态的 VITEK 2 鉴定结果
Table 3 VITEK 2 reaction results of CODE 0559 samples with different colony morphology

不同菌落形态	菌株鉴定结果	概率
沙显平板 A 菌落	<i>Salmonella</i> group(沙门菌群)	98%
XLD 平板 A 菌落	<i>Salmonella</i> group(沙门菌群)	98%
XLD 平板 B 菌落	<i>Proteus mirabilis</i> (奇异变形杆菌)	99%

CODE 0205 样品的生化实验结果见表 4, 参照上述方法进行判断, CAS B 菌落、XLD A 菌落、XLD B 菌落经过三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验的初筛即可判断为非沙门氏菌属, 与 VITEK 2 鉴定结果一致; 但 CAS A 菌落的生化试验结果符合国标中沙门氏菌属生化反应初步鉴定表中的 A3 反应序号, 结合 ONPG 试验为阳性, 则判为非沙门氏菌, 但 VITEK 2 鉴定结果是肠沙门菌双相亚利桑那亚种(见表 5), 2 种方法出现矛盾, 针对这种现象补充生化试验, 结果见表 6, 此结果符合国标中沙门氏菌属各生化群鉴别表中的 III 亚属。

表 4 CODE 0205 样品不同菌落形态的生化反应结果
Table 4 Biochemical reaction results of CODE 0205 samples with different colony morphology

生化试验	沙显平板 A 菌落	沙显平板 B 菌落	XLD 平板 A 菌落	XLD 平板 B 菌落
底层	A	A	K	A
三糖铁				
斜面	A	A	A	A
H ₂ S	-	+	+	+
产气	+	+	+	+
氨基酸对照	黄色	黄色	黄色	黄色
赖氨酸	+	-	-	-
氰化钾对照	生长	生长	生长	生长
氰化钾	-	-	-	-
靛基质	-	-	-	-
尿素酶	-	+	+	+
甘露醇	+	-	-	-
山梨醇	+	-	-	-
ONPG	+	+	+	+

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性; ; A: 产酸 (变黄色), K: 产碱(变红色)。

表 5 CODE 0205 样品不同菌落形态的 VITEK 2 鉴定结果
Table 5 VITEK 2 reaction results of CODE 0205 samples with different colony morphology

不同菌落形态	菌株鉴定结果	概率
沙显平板 A 菌落	<i>Salmonella enterica</i> ssp <i>diarizonae</i> (肠沙门菌双相亚利桑那亚种)	98%
沙显平板 B 菌落	<i>Proteus mirabilis</i> (奇异变形杆菌)	99%
XLD 平板 A 菌落	<i>Proteus mirabilis</i> (奇异变形杆菌)	99%
XLD 平板 B 菌落	<i>Proteus mirabilis</i> (奇异变形杆菌)	99%

表 6 CODE 0205 样品 CAS A 菌落补充生化实验结果
Table 6 Supplement biochemical reaction results of the A colony in CAS of CODE 0205

补充项目	卫矛醇	山梨醇	水杨苷	ONPG	丙二酸盐	KCN
CAS A 菌落	-	+	-	+	+	-

4 结论与讨论

大量文献^[10-13]报道了沙门氏菌显色培养基由于具有较高的敏感性和特异性,被实验室广泛应用于沙门氏菌的快速检测中。如刘振等^[11]的研究发现 CAS 能有效检测包括伤寒、甲型副伤寒在内的沙门氏菌,灵敏度与特异性分别达到 100%和 98.8%,明显高于传统沙门氏菌分离筛选的培养基;在王志伟^[13]的研究中,CAS 与 BS、XLD 等培养基相比,在分离鉴定沙门氏菌时效果最好。该培养基利用培养基中的细菌特异性酶的显色底物与沙门氏菌特有的辛酯酶反应,从而通过观察菌落颜色就可直接对菌落进行初步判定^[14]。能力验证样品中经常会添加与目标菌形态或生化相近的干扰菌,如奇异变形杆菌、弗氏柠檬酸杆菌等,在 XLD 琼脂平板上也能形成中心黑色、边缘光滑整齐的菌落,与沙门氏菌容易混淆^[15],但在沙门氏菌显色平板上就能直观的区别开来^[16]。但值得注意的是,大部分沙门氏菌由于 β -半乳糖苷酶试验为阴性,在 CAS 平板上显紫红色形态,而亚利桑那菌的 β -半乳糖苷酶为阳性在 CAS 上却是显蓝色的;此外,荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌在沙门氏菌显色平板上也显示紫色圆形菌落,易与沙门混淆。因此在沙门氏菌能力验证中也不能单纯过分依赖沙门氏菌显色培养基,以免造成漏检或假阳性。应选择 2 种及以上的选择性分离平板进行筛选,综合判断,并尽量挑取分离平板上所有形态的菌落进行后续生化试验。

通过生化试验对可疑沙门氏菌进行判定时, H_2S 阳性反应是一个重要特征,沙门氏菌属 90%以上为 H_2S 阳性反应,亚利桑那菌属 98.7%以上为 H_2S 阳性反应,但是在实际检测工作中并不能以此为唯一判定标准,例如猪霍乱、甲型副伤寒和伤寒沙门氏菌的部分菌株就是 H_2S 反应阴性的常见菌型,而本实验中检出的奇异变形杆菌,以及弗氏柠檬酸杆菌等非沙门氏菌却也是 H_2S 阳性反应。另外, CODE 0205 样品 CAS A 菌落的 VITEK 2 鉴定结果为肠沙门菌双相亚利桑那亚种,但其 H_2S 反应为阴性,属于极少数的具有非典型生化反应的亚利桑那菌株,遇到此类菌株时,应采用传统生化试验结合 VITEK 上机鉴定或 PCR 反应试验等综合判断,不可轻易排除以防漏检。

能力验证是评价实验室技术能力的有效手段,通过开展实验室能力验证,可证实实验室的检测质量,监控其运行动态,提高实验室的检测能力和水平,确保检测结果的质量^[17,18]。实验室参加能力验证测试,对结果进行总结

分析,当出现可疑结果时,应采取相应的纠正和预防措施,消除偏差,能有效提高检验人员的检测水平,保证检测数据符合检验的质量标准^[19]。由于沙门氏菌属的微生物种类繁多,目前已知的已有 2500 多种血清型^[20],因此沙门氏菌能力验证的检测对检验人员的操作水平和经验有较高的要求。本文结合作者参加能力验证的经验,总结出能力验证中沙门氏菌在分离、纯化及鉴定过程中应注意的重点,旨在为同行能力验证沙门氏菌项目提供参考。

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.
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.
- [2] 陈杖榴. 兽医药理学(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
Chen ZL. Veterinary pharmacology (2nd Ed) [M]. Beijing: China Agric Press, 2001.
- [3] Raghunathan A, Reed J, Shin S, et al. Constraint-based analysis of metabolic capacity of *Salmonella typhimurium* during host-pathogen interaction [J]. BMC Systems Biol, 2009, 3(9): 38
- [4] McGuinness S. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of *Salmonella* on fresh meat [J]. Meat Sci, 2009, 83(3): 555-562.
- [5] 刘绍军. 食源性病原微生物及防控[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006.
Liu SJ. Foodborne pathogenic microorganisms and prevention and control [M]. Beijing: China Light Ind Press, 2006.
- [6] 黄金海, 孙跃辉, 陈瑞, 等. 食品中沙门氏菌 LAMP 快速检测方法的建立 [J]. 天津大学学报, 2012, 45(5): 468-472.
Huang JH, Sun YH, Chen R, et al. Development of loop-mediate isothermal amplification assay for *Salmonella* detection in food [J]. J Tianjin Univ, 2012, 45(5): 468-472.
- [7] 王志伟, 徐琼, 陈欣钦, 等. 能力验证样品中沙门氏菌的分离与鉴定 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37(7): 161-163.
Wang ZW, Xu Q, Chen XX, et al. Isolation and identification of *Salmonella* spp. during the proficiency testing [J]. Food Res Dev, 2016, 37(7): 161-163.
- [8] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-*Salmonella* [S].
- [9] GB/T 4789.24-2003 食品卫生微生物学检验 糖果、糕点、蜜饯[S].
GB/T 4789.24-2003 Microbiological examination of food hygiene-Candies, pastries, preserves [S].

- [10] Pere JM, Cavalli P, Roue C, *et al.* Comparison of four chromogenic media and hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 1130-1134.
- [11] 刘振, 于兔, 肖强, 等. 一种有效检测沙门氏菌的显色培养基的研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2007, 19(6): 520-523.
Liu Z, Yu H, Xiao Q, *et al.* Study on High-Performance chromogenic media for *Salmonella* detection [J]. *China J Food Hyg*, 2007, 19(6): 520-523.
- [12] 卢勉飞, 蔡芷荷, 吴清平, 等. 显色培养基快速检测沙门氏菌效果的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(12): 2618-2620.
Lu MF, Cai ZH, Wu QP, *et al.* Studies on evaluation of chromogenic media for rapid detection of *Salmonella* spp. [J]. *China J Health*, 2008, 18(12): 2618-2620.
- [13] 王志伟. 不同沙门氏菌及干扰菌的分离鉴定[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(1): 168-170.
Wan ZW. Isolation and identification to different *Salmonella* and interference strains [J]. *Food Res Dev*, 2012, 33(1): 168-170.
- [14] 王萍, 董贵军, 乔勇升, 等. 显色培养基上沙门氏菌及干扰菌的分离鉴定[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(12): 158-161.
Wang P, Dong GJ, Qiao YS, *et al.* Isolation and identification of *Salmonella* and interference strains in chromogenic medium [J]. *Food Res Dev*, 2017, 38(12): 158-161.
- [15] 赵贵明. 食品微生物实验室工作指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
Zhao GM. *Food microbiol lab guide* [M]. Beijing: China Stand Press, 2005.
- [16] 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.
Chen MY, Hu J, Liu JZ, *et al.* Comparison of CHROM agar *Salmonella* medium and XLD,SS agars and HE media for Isolation of *Salmonella* strains from food samples [J]. *J Public Health Prev Med*, 2008, 4: 12-14.
- [17] 中华人民共和国卫生部卫生监督中心. 卫生检测实验室认证认可实施指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
Health supervision center of the ministry of health of the People's Republic of China. *Guidelines for the accreditation of health testing laboratoriese* [M]. Beijing: China Stand Press, 2008.
- [18] 吉彦莉, 郭勇峰, 王敬辉, 等. 食品微生物学检测能力验证分析[J]. *公共卫生与预防医学*, 2015, 269(3): 110-112.
Ji YL, Guo YF, Wang JH, *et al.* Validation and analysis of food microbiology testing capability [J]. *J Public Health Prev Med*, 2015, 269(3): 110-112.
- [19] 王宏明. 微生物检验技术操作规程与质量控制及检测数据分析处理实用手册[M]. 北京: 卫生科技出版社, 2007.
Wang HM. *Microbiological inspection technical operation procedure and practical manual for quality control and test data analysis and processing* [M]. Beijing: Health Technol Press, 2007.
- [20] Mary E, Caldwell, Dwight L. Ryerson salmonellosis in certain reptiles [J]. *J Infect Dis*, 1939, 65(3): 242-245.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



牛会敏, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。
E-mail: 530796065@qq.com