

# 巧克力中沙门氏菌检验能力验证研究

白雯静, 王月玲, 田妮娜\*, 周斌, 王艳炜, 刘荔

(兰州市食品药品检验所, 兰州 730050)

**摘要:** **目的** 对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进行分析。**方法** 在参照 GB 4789.4-2016《食品国家安全标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》和能力验证作业指导书传统方法鉴定的基础上, 借助 miniVIDAS 和 VITEK2 2 种仪器进行检验分析。**结果** CODE0002 未检出沙门氏菌、CODE0485 检出肠沙门菌双相亚利桑那亚种, CODE0633 检出鼠伤寒沙门氏菌。**结论** 本次能力验证实验结果为满意。实验室在进行沙门氏菌检验时可以使用仪器与传统分析方法相结合的检验方法, 但是要注意一些细节问题, 防止漏检和误检。

**关键词:** 能力验证; 沙门氏菌; 血清分型

## Research on proficiency testing for the detection of *Salmonella* in chocolate

BAI Wen-Jing, WANG Yue-Ling, TIAN Ni-Na\*, ZHOU Bin, WANG Yan-Wei, LIU Li

(Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730050, China)

**ABSTRACT: Objective** To analyze the verification of inspection capability of *Salmonella* in NIFDC-PT-135 chocolate organized by National Institutes for Food and Drug Control. **Methods** On the basis of referring to GB 4789.4-2016 *National food safety standard food microbiology test salmonella test* and the traditional method identification of ability verification operating instructions, isolation and identification of *Salmonella* were conducted by using miniVIDAS and VITEK2. **Results** *Salmonella* was not detected in CODE0002, *Salmonella enterum* biphasic Arizona subspecies was detected in CODE0485, and *Salmonella typhimurium* was detected in CODE0633. **Conclusion** The results of this capability verification experiment are satisfactory. The laboratory can use the test method combined with the traditional analysis method when conducting the *Salmonella* test, but there are some details that should be taken into account to prevent missed or false checks.

**KEY WORDS:** proficiency testing; *Salmonella*; serotypes

## 1 引言

沙门氏菌属是一群能寄生在人和动物肠道内的革兰氏阴性菌, 主要分为肠炎沙门氏菌和邦戈尔沙门氏菌 2 种类型<sup>[1]</sup>, 其中肠炎沙门氏菌又分为肠炎亚种型、萨拉姆亚种型、亚利桑那亚种型、第亚利桑那亚种型、豪顿亚种型、因迪卡亚种型 6 个亚种。沙门氏菌的各个菌种又包含着数目众多的血清类型: 根据 2007 年 1 月出版的第 9 版怀特-

考夫曼-勒密诺表解(White-Kauffmann-Le Minor scheme), 可以将沙门氏菌分为 2579 个沙门氏菌血清型。而在我国, 已经报道的沙门氏菌血清型已经有 290 多个<sup>[2]</sup>。

沙门氏菌分型较多, 而且还具有较高的致病性, 为致病菌的一种<sup>[3-8]</sup>。沙门氏菌还可能会引起食物中毒事件, 使患者产生诸如恶心、呕吐、腹痛、头痛、畏寒和腹泻等症状, 甚至严重者还会威胁到患者生命。李光辉等<sup>[9]</sup>对 1996~2015 年间食物中毒事件进行整理和统计后得出:

\*通讯作者: 田妮娜, 高级工程师, 主要研究方向为食品、药品致病菌研究。E-mail: 36991067@qq.com

\*Corresponding author: TIAN Ni-Na, Senior Engineer, Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730050, China  
E-mail: 36991067@qq.com

20年内有相关报道的由沙门氏菌引起的食物中毒事件共有133起,其中肠炎沙门氏菌和伤寒沙门氏菌占比最高。

能力验证是评价实验室技术能力的有效手段,是实验室通过外部措施对其内部质量控制方法的一种重要补充手段,是确保实验室质量管理体系持续改进的有效措施之一<sup>[10]</sup>。实验室通过参与国内外不同的能力验证计划,可以增强对实验室的管理和提升,同时提高检验人员的技术和技能。由于沙门氏菌在日常常规检验中检出率较低,本实验室申请参加了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,为提升实验人员对沙门氏菌检验能力以及日后的监管和研究提供有力的技术支持。

## 2 材料与方 法

### 2.1 样 品

实验室于2018年6月初共收到中国食品药品检定研究院邮寄的3份巧克力的样品,编号分别为:CODE0002、CODE0485和CODE0633。每份样品均包含有1块巧克力和1包白色的干燥剂,样品均采用玻璃瓶进行包装。

### 2.2 试剂与仪器

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、四硫磺酸钠煌绿增菌液(tetrathiosulfonate chlorogenic solution, TTB)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(selenite cystine broth, SC)、亚硫酸铋琼脂(bismuth sulfite agar, BS)、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(xylose lysinedeoxycholate, XLD)、三糖铁琼脂(trisaccharide iron, TSI)、丙二酸盐、卫矛醇、DBI-05沙门氏菌干制生化鉴定试剂盒(北京陆桥技术有限公司);沙门氏菌属显色培养基(color medium plate, CAS, 法国科玛嘉公司);沙门氏菌属诊断血清(丹麦国家血清研究公司);VIDAS沙门氏菌检测试剂条、VITEK2革兰氏阴性、阳性细菌鉴定卡(法国生物梅里埃公司)。

miniVIDAS全自动荧光酶联免疫检测仪(法国生物梅里埃公司);VITEK2 compact全自动微生物生化鉴定仪(法国生物梅里埃公司);AC2-6S1二级生物安全柜(艺斯高(上海)商贸有限公司)。

### 2.3 检测方法

#### 2.3.1 样品的前处理方法

参照NIFDC-PT-135《巧克力中沙门氏菌检验作业指导书》<sup>[11]</sup>分别对3份样品进行前处理:首先取20 mL灭菌并预热至45℃的BPW加入检样瓶内,待巧克力样品融化后加入无菌均质袋内,取20 mL灭菌BPW重复清洗1次,最后向均质袋内加入30 mL灭菌BPW,充分均质混匀,制成1:10(*m*:*V*)的稀释液,作为前增菌液,于(36±1)℃分别静置培养8 h和18 h。

#### 2.3.2 增 菌

轻轻摇动培养过的样品混合物,首先参照miniVIDAS的操作规程对BPW的培养物进行试验。分别

于静置培养8 h、18 h后各移取1 mL,转种于10 mL TTB内,于(42±1)℃培养24 h。同时,另取1 mL,转种于10 mL SC内,于(36±1)℃培养24 h。

#### 2.3.3 分 离

8 h、18 h后TTB中的培养物分别参照miniVIDAS的操作规程进行试验。分别用接种环取增菌液1环,划线接种于1个BS琼脂平板、1个XLD琼脂平板和1个沙门氏菌属显色培养基平板(CAS),于(36±1)℃分别培养48 h(BS琼脂平板)或24 h(XLD琼脂平板、沙门氏菌属显色培养基平板),观察各个平板上生长的菌落。

#### 2.3.4 生化试验

自CODE0485、CODE0633选择性琼脂平板上按照菌落形态、大小的不同,分别挑取2个以上典型或可疑菌落,接种三糖铁琼脂,先在斜面划线,再于底层穿刺;同时接种营养琼脂平板,于(36±1)℃培养24 h。参照DBI-05沙门氏菌干制生化鉴定试剂盒使用说明书,分别进行生化试验。经纯化培养的可疑菌落分别参照VITEK2仪器操作规程进行上机操作。

#### 2.3.5 血清学鉴定

综合生化鉴定试剂盒、miniVIDAS和VITEK2 compact的结果,对确定的沙门氏菌进行血清学鉴定。在血清型鉴定时一定要采用生理盐水作为对照从而排除自凝性的可能。

## 3 结果与分析

### 3.1 miniVIDAS 检验结果

CODE0002、CODE0485、CODE0633分别在BPW当中培养18 h后,进行miniVIDAS上机实验,结果如表1;在BPW中培养8 h即开始增菌,对TTB增菌24 h后的培养物通过miniVIDAS进行检验,检验结果如表2所示;在BPW中培养18 h开始增菌,对TTB增菌24 h后的培养物通过miniVIDAS进行检验,检验结果如表3所示。BPW是非选择性增菌培养基,因而BPW 18 h的培养物当中可能杂菌以及干扰菌生长较为旺盛,导致沙门氏菌浓度较低,因而CODE0485与CODE0633中的沙门氏菌均未被检出。然而,TTB是选择性增菌培养基,它的成分当中的硫代硫酸钠和四硫磺酸钠(碘和碘化钾发生反应形成)相结合可以抑制肠道共生菌的生长和繁殖,成分当中的胆盐和煌绿还可以抑制大肠菌群和其他革兰阳性菌的生长和繁殖,从而有利于沙门氏菌的增殖,便于检出。

表1 BPW培养18 h后miniVIDAS的检验结果  
Table 1 Test results of miniVIDAS after 18 h of BPW culture

沙门氏菌检验结果	
CODE0002	未检出
CODE0485	未检出
CODE0633	未检出

表 2 BPW 培养 8 h, TTB 增菌 24 h 后 miniVIDAS 的检验结果  
Table 2 Test results of miniVIDAS after BPW culture for 8 h and TTB proliferation for 24 h

沙门氏菌检验结果	
CODE0002	未检出
CODE0485	检出
CODE0633	检出

### 3.2 选择性分离以及 VITEK2 结果

CODE0633 和 CODE0485 的培养物分别进行分离划线和 VITEK2 上机实验, 结果如表 4 所示。CODE0633 的 TTB 和 SC 增菌液培养后分别在 XLD 平板上进行划线培养, 然后根据菌落形态进行分离纯化, 最后再经过 VITEK2 进

行生化鉴定, 分别得到沙门氏菌、弗劳地柠檬酸杆菌和奇异变形杆菌。弗劳地柠檬酸杆菌和奇异变形杆菌应为干扰菌。CAS 平板上得到紫色菌落根据大小形态分别分离纯化再用 VITEK2 进行生化鉴定, 得到的结果均为沙门氏菌。CODE0485 和 CODE0633 分别在 BPW 培养 8 h 和 18 h 后进行增菌、划线, 得到的定性结果基本一致。

表 3 BPW 培养 18 h, TTB 增菌 24 h 后 miniVIDAS 的检验结果  
Table 3 Test results of miniVIDAS after BPW culture for 18 h and TTB proliferation for 24 h

沙门氏菌检验结果	
CODE0002	未检出
CODE0485	检出
CODE0633	检出

表 4 菌落形态以及 VITEK2 鉴定结果  
Table 4 Colony characteristics and identification results by VITEK2

	CODE0633	CODE0485
XLD 平板	A: 粉红色, 不带黑色中心 (VITEK2 鉴定为沙门氏菌, 概率为 99%) B: 粉红色, 带黑色中心 (VITEK2 鉴定为沙门氏菌, 概率为 99%) C: 黄色菌落 (VITEK2 鉴定为弗劳地柠檬酸杆菌, 概率为 99%) D: 粉红色, 带黑色中心 (VITEK2 鉴定为奇异变形杆菌, 概率为 99%)	粉红色, 带黑色中心 (VITEK2 鉴定为肠沙门菌双相亚利桑那亚种, 概率为 99%)
BS 平板	黑色或灰色, 有金属光泽 (VITEK2 鉴定为沙门氏菌, 概率为 98%)	黑色或灰色, 有金属光泽 (VITEK2 鉴定为肠沙门菌双相亚利桑那亚种, 概率为 99%)
CAS 平板	紫色菌落 (VITEK2 鉴定为沙门氏菌, 概率为 99%)	蓝色菌落 (VITEK2 鉴定为肠沙门菌双相亚利桑那亚种, 概率为 99%)

### 3.3 生化反应结果

CODE0485 和 CODE0633 分别进行传统生化实验, 结果如表 5、表 6 所示。在分离培养后, 根据 VITEK2 的鉴定结果, 分别对 CODE0485 和 CODE0633 相应的 XLD 平板、BS 平板和 CAS 平板按照菌落形态(包括大小)等分离出来的由 VITEK2 鉴定证实为沙门氏菌的菌落分别进行生化鉴定, CODE0485 和 CODE0633 涉及菌落的生化反应基本一致, 可能分别只含有 1 种沙门氏菌。

表 5 CODE0485、CODE0633 三糖铁反应结果  
Table 5 TSI reactions of CODE 0485 and CODE0633

三糖铁生化试验	斜面	底层	硫化氢	产气
CODE0485	A	A	+	+
CODE0633	K	A	+	+

注: “+”表示阳性; A: 产酸(变黄色), K: 产碱(变红色)。

表 6 CODE0485、CODE0633 生化反应结果  
Table 6 Biochemical reactions of CODE 0485 and CODE0633

	氨基酸对照	赖氨酸脱羧酶	氰化钾对照	氰化钾	靛基质	尿素	甘露醇	山梨醇	ONPG	卫矛醇	丙二酸盐
CODE0485	黄色	+	生长	不生长	-	-	+	+	+	-/	+
CODE0633	黄色	+	生长	不生长	-	-	+	+	-	/	/

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性。

### 3.4 血清分型结果

分别对 CODE0485、CODE0633 进行血清分型实验, 结果如表 7 所示。在实验过程中, 为了防止漏检, 前期平板分离的不同菌落形态的菌落进行纯化培养后, 经过 VITEK2 鉴定结果为沙门氏菌的, 分别进行血清鉴定。得到的结果基本一致。因此, CODE0485 和 CODE0633 样品中所包含沙门氏菌均为单一血清型的沙门氏菌。

表 7 CODE0485、CODE0633 血清分型结果  
Table 7 Results of serotypes (CODE0485 and CODE0633)

	O 抗原	H 抗原	
		第一相	第二相
CODE0485	O:60	r	e, n, z15, x
CODE0633	O:4, 5, 12	r	1, 2

### 3.5 能力验证最终结果

CODE0002、CODE0485、CODE0633 最终上报结果, 如表 8 所示。

表 8 最终结果  
Table 8 Final results

	沙门氏菌检出结果
CODE0002	未检出
CODE0485	检出
CODE0633	检出

## 4 结 论

根据中国食品药品检定研究院后期反馈的结果, 结果均为满意。本次能力验证的难点首先是 CODE0485 检出的肠沙门氏菌双相亚利桑那亚种的归属问题, 这种沙门氏菌较为少见, 很容易被误读而造成漏检。其次, 本次实验当中, CODE0485 检出肠沙门氏菌双相亚利桑那亚种, 根据 VITEK2 鉴定结果报告,  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase, BGAL)为阳性; 而 CODE0633 检出的鼠伤寒沙门氏菌 BGAL 为阴性, 结合科玛嘉沙门氏菌显色培养基说明书: 乳糖阳性沙门氏菌出现金属蓝色, 这与实验过程中观察到相应划线培养的 CAS 平板上菌落为蓝色相一致。在日常检验工作中, 形成固有的沙门氏菌在 CAS 平板上为紫色菌落这一思维极易造成漏检。

弗劳地柠檬酸杆菌和奇异变形杆菌在 XLD 平板上的菌落形态与沙门氏菌相类似, 但是这一干扰在 CAS 平板上得到很好地区分和排除。

除此之外, 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》<sup>[12]</sup>当中规定样品在 BPW(缓

冲蛋白胨水)中的预增菌时间为 8~18 h, 为一个时间段, 并没有规定具体的时间, 本次实验通过对 8 h、18 h 这 2 个时间点进行试验和对比分析, 发现不同的 BPW 培养时间对于沙门氏菌的定性实验可能没有太大的影响, 在沙门氏菌定性检验当中, 这 2 个时间节点均可选择。

由于沙门氏菌存在多种分型, 因而无论是能力验证试验还是常规检验, 都应该注意传统的划线分离这一细节性的工作, 按照可疑菌落大小形态等的不同分别进行纯化培养和其他后续实验, 防止造成漏检。

在沙门氏菌的国标检验方法当中并没有提及到 miniVIDAS 这一仪器检验, 通过 miniVIDAS 检验结果与国标方法中提到的传统生化实验与 VITEK2 compact 全自动微生物生化鉴定仪的结果进行比对, miniVIDAS 结果与国标方法基本一致, 因此可以运用到沙门氏菌的定性检验当中。在日常检验当中, 全自动荧光酶联免疫检测仪 miniVIDAS 和 VITEK2 compact 全自动微生物生化鉴定仪各有利弊, 在实验过程中应与传统鉴别方法相配合, 更有利于沙门氏菌的检出。

最后, 在沙门氏菌的检验当中, 还有许多较为新颖的方法, 如多重 PCR 检测方法<sup>[13-15]</sup>、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱和 Luminex® 200TM 多功能流式点阵仪<sup>[16]</sup>、基因芯片技术<sup>[17]</sup>等等, 这些方法的引入将大幅度的提高检验效率。

### 参考文献

- [1] 塞弗. 禽病学第十二版[M]. 苏敬良, 高福, 索勋, 译. 北京: 中国农业出版社, 2012.  
Saif YM. Diseases of poultry 12th edition [M]. Su JL, Gao F, Suo X, translate. Beijing: China Agricultural Press, 2012.
- [2] 黄静玮, 汪铭书, 程安春. 沙门氏菌分子生物学研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(7): 649-652.  
Huang JW, Wang MS, Cheng AC. Advances in molecular biology of *Salmonella* [S]. Chin J Zoon, 2011, 27(7): 649-652.
- [3] 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.
- [4] 甘小琳, 何晓青. 肠道沙门氏菌双相亚利桑那亚种的一个新血清型 17:z52:e,n,x,z15[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(12): 2496-2498.  
Gan XL, He XQ. A new serotype of *Salmonella enterica* subspecies diarizonae: 17:z52:e,n,x,z15 [J]. J Health Lab Technol, 2008, 18(12): 2496-2498.
- [5] 陈建辉, 欧剑鸣, 饶秋华. 福建省首次检出 14 个沙门氏菌血清型[J]. 预防医学论坛, 2011, 17(11): 973-974.  
Chen JH, Ou JM, Rao QH. First detection of 14 *Salmonella* serotypes in Fujian province [J]. J Pre Med Trib, 2011, 17(11): 973-974.
- [6] 罗丽珠, 陈婉娃, 许小妹. 能力验证中沙门氏菌的分离鉴定与血清分型[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(5): 1117-1121.  
Luo LZ, Chen WW, Xu XM. Isolation and identification of *Salmonella*

- and serotype in proficiency testing [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(5): 1117-1121.
- [7] 金佳佳, 周臣清, 庄艺协, 等. 三种方法检测乳粉中沙门氏菌的比较分析[J]. *广东化工*, 2018, 45(368): 69-70.  
Jin JJ, Zhou CQ, Zhuang YX, *et al.* Comparison of detection on *Salmonella* in milk powder by three methods [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2018, 45(368): 69-70.
- [8] 熊国强, 应艳, 余蕾, 等. 沙门菌增菌培养基增菌效果的探讨与分析研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2004, 14(2): 159-160.  
Xiong GQ, Ying Y, Yu Q, *et al.* Enriching effect of enrichment medium for *Salmonella* [J]. *J Health Lab Technol*, 2004, 14(2): 159-160.
- [9] 李光辉, 高雪丽, 郭卫芸, 等. 1996—2015 年间沙门氏菌食物中毒事件特征分析[J]. *食品工业*, 2018, 39(5): 253-255.  
Li GH, Gao XL, Guo WY, *et al.* Epidemiological analysis of *Salmonella* food poisoning events in China during 1996—2015 [J]. *Food Ind*, 2018, 39(5): 253-255.
- [10] 席静, 张思群, 刘静宇, 等. 论能力验证活动对实验室能力建设的作用和意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(6): 1576-1578.  
Xi J, Zhang SQ, Liu JY, *et al.* On the function and significance of ability verification activities to laboratory capacity building [J]. *J Health Lab Technol*, 2011, 21(6): 1576-1578.
- [11] NIFDC-PT-135 巧克力中沙门氏菌检验作业指导书[Z].  
NIFDC-PT-135 Inspection instructions for salmonella in chocolate [Z].
- [12] 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].
- [13] Kim S, Frye JG, Hu JX, *et al.* Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella enterica* subsp *enterica* [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(10): 3608-3615.
- [14] 王芳, 陈智, 伍雅婷, 等. 多重 PCR 方法检测沙门氏菌血清型适用性探讨[J]. *现代医学预防*, 2018, 45(21): 3968-3971.  
Wang F, Chen Z, Wu YT, *et al.* Applicability of multiple PCR assay for *Salmonella enteric* serotyping [J]. *Mod Med Prev*, 2018, 45(21): 3968-3971.
- [15] 胡兴娟, 徐君辉, 张静, 等. 四重荧光定量 PCR 法鉴定肠炎、鼠伤寒以及伤寒沙门氏菌[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(7): 1837-1843.  
Hu XJ, Xu JH, Zhang J, *et al.* Identification of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by quadruple fluorescence quantitative PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(7): 1837-1843.
- [16] 王艳, 沈家红, 蒋蔚, 等. 6 种人兽共患病病原核酸液相芯片检测体系的建立[J]. *中国动物检疫*, 2018, 35(12): 80-84.  
Wang Y, Sheng JH, Jinag W, *et al.* Development of a liquichip system for detection of six kinds of zoonotic pathogens [J]. *Chin J Anim Quarant*, 2018, 35(12): 80-84.
- [17] 郭耀东, 韩晓江, 张英华, 等. 沙门氏菌检测的研究进展[J]. *农产品加工*, 2019, 479: 75-78.  
Guo YD, Han XJ, Zhang YH, *et al.* Research progress of *Salmonella* detection [J]. *Farm Prod Process*, 2019, 479: 75-78.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介

白雯静, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品致病菌研究。  
E-mail: yd08joy@163.com

田妮娜, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品、药品致病菌研究。  
E-mail: 36991067@qq.com