

巧克力中沙门氏菌检验能力验证的结果与分析

邓宁妍*, 周 姬, 邹思贤, 蒋春义, 王 清

(永州市食品质量安全监督检验中心, 永州 425000)

摘要: **目的** 参加由中国食品药品检定研究院负责实施的 NIFDC-PT-135 巧克力中沙门氏菌检验能力验证活动, 提高微生物实验室沙门氏菌的检验检测能力, 对实验室进行质量控制。**方法** 按照 NIFDC-PT-135《巧克力中沙门氏菌检验作业指导书》和 GB 4789.10-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》条目要求对 3 件样品进行检验, 利用沙门氏菌生化鉴定盒和 API20E 生化鉴定试剂条进行鉴定。**结果** 样品编号为 CODE: 0024 的样品未检出沙门氏菌, 编号为 CODE: 0754 的样品检出沙门氏菌, 编号为 CODE: 0883 的样品未检出沙门氏菌。**结论** 本次实验室的能力验证试验结果为“满意”, 通过参加沙门氏菌的能力验证, 促进检测技术水平的提升, 为以后的工作开展提供技术储备。

关键词: 沙门氏菌; 能力验证; 生化鉴定

Validation and analysis of *Salmonella* detection ability in chocolate

DENG Ning-Yan*, ZHOU Ji, ZOU Si-Xian, JIANG Chun-Yi, WANG Qing

(Yongzhou Food Quality and Safety Supervision and Inspection Center, Yongzhou 425000, China)

ABSTRACT: Objective To participate in the verification of *Salmonella* in NIFDC-PT-135 chocolate by the National Institutes for Food and Drug Control, improve the testing and testing capabilities of *Salmonella* in the microbiology laboratory, and control the quality of the laboratory. **Methods** According to the requirements of NIFDC-PT-135 *Salmonella* inspection in chocolate and GB 4789.10-2016 *Salmonella* inspection in food microbiology of national food safety standard, three samples were examined, and the identification was carried out by using *Salmonella* biochemical identification box and API20E biochemical identification reagent bar. **Results** Sample with sample number CODE:0024 was not detect *Salmonella*, sample with CODE:0754 was detected *Salmonella*, and sample with CODE:0883 was not detect *Salmonella*. **Conclusion** The results of the competency verification test of the laboratory are 'satisfactory'. By participating in the competency verification of *Salmonella*, the level of detection technology will be improved to provide technical reserves for future work.

KEY WORDS: *Salmonella*; ability verification; biochemical identification

1 引言

沙门氏菌属(*Salmonella*)是一大群寄生在人类与动物肠道内、生化反应与抗原结构相似的革兰氏阴性、需氧或兼性厌氧无芽孢杆菌, 其种类繁多, 广泛分布于自然界。

根据 DNA 同源性, 沙门氏菌属分为 2 个种, 即肠道沙门氏菌和邦戈尔沙门氏菌^[1]。沙门氏菌主要通过沙门氏菌患者或健康带菌的人和动物的排泄物污染食品和环境。当菌体溶解时, 其细胞壁释放出的脂多糖, 形成内毒素, 能引起人和动物伤寒、副伤寒、败血症以及急性肠胃炎等疾病^[2]。沙

*通讯作者: 邓宁妍, 助理工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: 498707787@qq.com

*Corresponding author: DENG Ning-Yan, Assistant Engineer, Yongzhou Food Quality and Safety Supervision and Inspection Center, Xiangjiang West Road, Lengshuitan, Yongzhou 425000, China. E-mail: 498707787@qq.com

门氏菌是引起细菌性食物中毒的主要病原菌之一^[3], 在我国由沙门氏菌属引发的细菌性中毒事件约占食物中毒事件总数的 70%~80%, 因此沙门氏菌的检验能力在保障人体饮食健康中起到关键的作用^[4]。

能力验证活动是利用实验室间的比对, 按照预先制定的准则评价参加者的能力^[5]。微生物的检验能力验证是控制实验室微生物检验的关键环节, 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^[6]。参加能力验证项目, 可以反映一个实验室的检验检测技术能力^[7], 也是实验室保证结果质量的重要手段^[8]。

为了提高微生物实验室沙门氏菌的检验检测能力, 本实验室参加由中国食品药品检定研究院负责实施的 NIFDC-PT-135 巧克力中沙门氏菌检验能力验证活动, 通过对此次沙门氏菌检验能力验证的实验结果进行分析和总结, 为日常的微生物检验工作提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 试验样品和标准菌株

3 份巧克力的样品, 样品分别标识不同的样品编号, 编号分别为 CODE: 0024、CODE: 0754、CODE: 0883, 每份样品为 1 块瓶装的巧克力, 装量约为 10 g, 采用玻璃瓶包装。样品性状为棕黑色方形巧克力块。

标准菌株为鼠伤寒沙门氏菌(ATCC 14028, 广东环凯微生物科技有限公司购买并附有质量控制检测报告)作为阳性对照。

2.2 试剂与仪器

2.2.1 培养基和试剂

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、HE 琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐(xylose lysine desoxycholate, XLD)琼脂、沙门氏菌属显色培养基(法国科玛嘉公司); 三糖铁(triple sugar iron, TSI)琼脂、营养琼脂(nutrient agar, NA)、半固体琼脂、沙门氏菌生化鉴定盒(广东环凯微生物科技有限公司); API20E 生化鉴定试剂条(法国梅里埃公司); 沙门氏菌的多价菌体(O)诊断血清(泰国 S&A 公司); 多价鞭毛(H)诊断血清(宁波天润生物药业有限公司)。

2.2.2 仪器和材料

LHR-250-S 恒温恒湿培养箱(36 °C±1 °C)、LHR-250-A 生化培养箱(42 °C±1 °C)(韶关市泰宏医疗器械有限公司); GR85DA 立式自动压力蒸汽灭菌器(致微(厦门)仪器有限公司); BHC-1300IIA/B₂ 生物洁净安全柜(苏州净化设备有限公司); IUL 拍击式均质器(上海鹏博医疗器械发展有限公司); WH-2 微型漩涡混合仪(上海泸西分析仪器有限公司);

WH-B3002 电子天平(诸暨市超泽衡器设备有限公司); LG-228 东和冰箱(佛山龙越制冷设备有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品的处理

准备 90 mL 预热至 45 °C 的灭菌 BPW: 首先取 20 mL 灭菌 BPW 加入检样瓶内, 待 10 g 巧克力样品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, 最后向均质袋内加入 30 mL 灭菌 BPW, 充分均质混匀, 制成(1:9, g:mL)稀释液^[9]。依此方法, 分别对 3 件样品进行前处理。将上述 90 mL 的 BPW 稀释液(1:9, g:mL)直接作为前增菌液, 同时, 接种标准菌株 ATCC 14028 于 90 mL BPW 中作为阳性对照, 取未加入任何样品的 90 mL 灭菌 BPW 作为空白对照, 将接有 3 件样品的前增菌液、标准菌株阳性对照和空白对照一起于(36±1) °C 恒温恒湿培养箱中静置培养 18 h。

2.3.2 增菌

轻轻摇动培养后的前增菌液, 移取 1 mL, 转种于 10 mL TTB 内, 于 42 °C 生化培养箱中培养 24 h。同时另取 1 mL, 转种于 10 mL SC 内, 于 36 °C 恒温恒湿培养箱中培养 24 h。阳性对照、空白对照同时采用同样的操作。

2.3.3 分离

分别用直径 3 mm 的接种环取培养后的 TTB 和 SC 增菌液各 1 环, 划线接种于 BS 琼脂平板、XLD 琼脂平板、HE 琼脂平板、沙门氏菌属显色培养基平板, 划线后的 BS 琼脂平板于 36 °C 恒温恒湿培养箱中培养 48 h, 划线后的 XLD 琼脂平板、HE 琼脂平板、沙门氏菌属显色培养基平板于 36 °C 恒温恒湿培养箱中培养 24 h, 阳性对照和空白对照同时采用同样的方法操作, 培养结束后观察各个平板上有无可疑沙门氏菌属菌落生长。

2.3.4 纯培养

自 BS、XLD、HE、沙门氏菌属显色培养基平板上分别挑取 2 个典型和可疑菌落, 接种于营养琼脂平板, 于(36±1) °C 恒温恒湿培养箱中纯化培养 24 h。

2.3.5 生化鉴定

为确保生化鉴定结果准确, 同时采用沙门氏菌生化鉴定盒和 API20E 试剂条。挑取新鲜培养的单个纯菌落接种三糖铁琼脂, 接种时先在三糖铁琼脂斜面划线, 然后穿刺斜面底层; 于 36 °C 恒温恒湿培养箱中培养 24 h。

根据沙门氏菌生化鉴定盒使用说明书, 挑取菌落至适量 0.85% 无菌生理盐水中, 与 0.5 麦氏浊度的浊度管比浊, 制备成 0.5 麦氏浊度的菌悬液, 用吸管吸取 2 滴(约 0.06 mL)菌悬液加入每种微量生化管内。将已接种的西林瓶再套上胶塞, 直立于内托的凹槽内, 于 35~37 °C 恒温恒湿培养箱中培养, 氰化钾试验若培养 24 h 时仍为阴性, 延长至 48 h 后观察结果。

根据 API20E 试剂盒说明书, 经过试条的准备和接种物的准备步骤后, 进行试验条的接种试验, 用同一根吸管, 将菌悬液加入到试条的小管内。柠檬酸盐 (citrate, CIT)、VP 和明胶 (gelatin, GEL)小管, 菌液需充满管部和杯部, 其他管仅充满管部(不是杯部); 在试验精氨酸双水解酶 (arginine dihydrolase, ADH)、赖氨酸脱羧酶 (lysine decarboxylase, LDC)、尿素酶(urea enzymes, URE)、鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)和硫化氢(H₂S)小杯内加入矿物油以形成厌氧环境。盖上培养盒, 于(36±2) °C 恒温恒湿培养箱中培养 24 h^[10]。按照说明书判读试剂条。

2.3.6 血清凝集实验

(1) 自凝性检查

首先排除自凝集反应, 在洁净的玻片上滴加一滴生理盐水, 将待试培养物混合于生理盐水滴内, 使成为均一性的混浊悬液, 将玻片轻轻摇动 30~60 s, 在黑色背景下观察反应, 若出现可见的菌体凝集, 即认为有自凝性, 反之无自凝性。对无自凝的培养物参照下面方法进行血清凝集试验^[11]。

(2) 多价菌体抗原(O)鉴定及结果观察

在洁净载玻片上划出 2 个区域, 一边滴加 1~2 滴 O 多价血清, 另一边加入 1 滴生理盐水, 作为对照。从营养琼脂上挑取新鲜培养的单个纯菌落, 用无菌接种环分别将两个区域内的菌落研成乳液, 将玻片倾斜摇动混合 1 min, 并对暗背景进行观察, 于 1 min 内呈任何程度的凝集现象皆为阳性反应, O 抗原为颗粒状凝集, 呈均匀浑浊者为阴性^[12]。

(3) 多价鞭毛抗原(H)鉴定及结果观察

从营养琼脂上挑取纯化菌落, 接种于半固体琼脂中心处, (36±1) °C 培养 18~24 h。有鞭毛的菌会在琼脂上扩散生长, 从边缘处挑取菌苔进行 H 多价鉴定。鉴定方法与抗原(O)鉴定方法相似。于 1 min 内呈任何程度的凝集现象皆

为阳性反应, H 抗原为絮状或绒毛状凝集, 呈均匀浑浊者为阴性。

3 结果与分析

3.1 增菌及选择性培养基培养

编号 CODE: 0024、CODE: 0754、CODE: 0883 及阳性对照经过增菌培养后, CODE: 0024、CODE: 0754、CODE: 0883 及阳性对照 BPW 增菌液变浑浊, TTB 变浑浊、变黄, SC 变浑浊、变红, 空白对照的 BPW 增菌液、TTB、SC 均为澄清。

编号 CODE: 0024、CODE: 0754、CODE: 0883 及阳性对照经过 2 次增菌培养后, 划线到 4 种选择性培养基上进行分离培养, 结果 CODE: 0754 和阳性对照在 4 种选择性培养基上均出现可疑或典型菌落, 而 CODE: 0024 仅在 BS 琼脂平板上出现可疑菌落, CODE: 0883 在 XLD HE 沙门氏菌显色培养基上出现可疑或典型菌落, 空白对照无菌落生长, 与表 1 统一。

3.2 生化鉴定

上述选择性培养基上的可疑和典型菌落经纯化培养后, 取新鲜的纯菌落接种三糖铁琼脂, 分别用沙门氏菌生化鉴定盒和 API20E 试剂条做生化鉴定试验, 沙门氏菌生化鉴定盒的鉴定结果见表 2, API20E 试剂条的鉴定结果见表 3。

因编号 CODE: 0024 和 CODE: 0883 的样品的生化鉴定结果不符合反应序号 A1、A2、A3, 即不符合典型沙门氏菌生化反应特征, 可报告 10 g 样品 CODE: 0024 和 CODE: 0883 未检出沙门氏菌, 故无需进行血清凝集试验。样品 CODE: 0754 和阳性对照(鼠伤寒沙门氏菌)则继续进行血清凝集试验。

表 1 样品中沙门氏菌增菌结果和选择性培养基上的菌落特征

Table 1 Results of *Salmonella* growth in the sample and colony characteristics on selective medium

| 样品编号 | BPW | TTB | SC | BS 平板 | XLD | HE | 沙门氏菌显色培养基 |
|------------|-----|-------|-------|--------------|---------------|------------------|-----------|
| CODE: 0024 | 浑浊 | 浑浊、变黄 | 浑浊、变红 | 菌落为黑色, 有金属光泽 | 未见生长 | 未见生长 | 未见生长 |
| CODE: 0754 | 浑浊 | 浑浊、变黄 | 浑浊、变红 | 菌落为黑色, 有金属光泽 | 菌落带黑色中心 | 多数菌落中心黑色, 有些为蓝绿色 | 菌落为紫红色 |
| CODE: 0883 | 浑浊 | 浑浊、变黄 | 浑浊、变红 | 未见生长 | 菌落为黄色 | 菌落为黄色 | 菌落为蓝绿色 |
| 阳性对照 | 浑浊 | 浑浊、变黄 | 浑浊、变红 | 菌落为黑色, 有金属光泽 | 菌落为粉红色, 带黑色中心 | 菌落为蓝绿色, 带黑色中心 | 菌落为紫红色 |
| 空白对照 | 澄清 | 澄清 | 澄清 | 无菌落生长 | 无菌落生长 | 无菌落生长 | 无菌落生长 |

表 2 沙门氏菌生化鉴定盒的鉴定结果
Table 2 Identification results of *Salmonella* biochemical identification box

| 实验项目 | CODE: 0024 | CODE: 0754 | CODE: 0883 | 阳性 对照 |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|----------|
| 斜面 | A | K | A | K |
| 底层 | A | A | A | A |
| 产气 | - | + | - | + |
| 硫化氢 | + | + | - | + |
| 氨基酸对照 | 黄 | 黄 | 黄 | 黄 |
| 赖氨酸 | + | + | - | + |
| 氰化钾 | - | - | - | - |
| 靛基质 | - | - | - | - |
| 尿素 | + | - | + | - |
| 甘露醇 | - | + | - | + |
| 山梨醇 | - | + | - | + |
| ONPG(邻硝基苯- β -D-半乳糖苷) | + | - | + | - |

注: K, 产碱; A, 产酸; +, 阳性; -, 阴性。

表 3 API20E 试剂条的鉴定结果
Table 3 Identification results of API20E reagent strip

| 试验项目 | CODE: 0024 | CODE: 0754 | CODE: 0883 | 阳性 对照 |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------|
| 邻硝基苯- β -D-半乳糖苷 | + | - | + | - |
| 精氨酸双水解酶 | - | + | - | + |
| 赖氨酸脱羧酶 | - | + | - | + |
| 鸟氨酸脱羧酶 | - | + | - | + |
| 柠檬酸盐 | - | + | - | + |
| H ₂ S | - | + | - | + |
| 尿素酶 | - | - | - | - |
| 色氨酸脱氨酶 | - | - | - | - |
| 吲哚 | - | - | - | - |
| VP | + | + | + | - |
| 明胶 | + | - | + | - |
| 葡萄糖 | - | + | + | + |
| 甘露醇 | - | + | + | + |
| 肌醇 | - | + | - | + |
| 山梨醇 | - | + | - | + |
| 鼠李糖 | - | + | + | + |
| 蔗糖 | - | - | + | - |
| 密二糖 | - | + | + | + |
| 苦杏仁苷 | - | - | - | - |
| 阿拉伯糖 | - | + | + | + |

注: +, 阳性; -, 阴性。

3.3 血清凝集试验

样品在生理盐水中未发生自凝集反应, 取被检样的单个新鲜的纯菌落与多价菌体(O)血清和多价鞭毛(H)血清分别做血清凝集试验, 结果样品 CODE: 0754 和阳性对照在多价菌体(O)血清上都呈现为颗粒状凝集, 在多价鞭毛(H)血清上都呈现为絮状凝集, 则可报告 10 g 样品 CODE: 0754 检出沙门氏菌。

4 结论与讨论

样品中的某些干扰菌如奇异变形杆菌和其它背景菌在选择性培养基上的性状与沙门氏菌相似, 不易区分。相较于其他选择性培养基, 沙门氏菌在沙门氏菌属显色板上更容易与其他细菌区分开来, 观察起来更直接^[13]。沙门氏菌属显色培养基对杂菌的抗干扰能力明显优于 BS、XLD 和 HE 琼脂平板。沙门氏菌属显色培养基是一种酶反应显色, 沙门氏菌在显色培养基上呈现出特殊的紫色, 而其他肠杆菌科的菌属呈现出蓝色或者无色, 平板特异性强、直观、便于区别^[14]。BS 培养基配制后需放置 24 h 后使用最合适, 放置时间过长或过短都会出现对沙门氏菌的抑制情况。BS 培养基是专一性针对伤寒沙门菌的分离培养基^[15], 对非伤寒沙门菌的敏感性相对比较弱^[16]。因此建议应用沙门氏菌属显色培养基平板和其他选择性平板(如 BS 平板和 XLD 平板)相结合作为分离培养基^[17], 这样可以提高效率 and 准确性。

3 件样品接种在沙门氏菌属显色培养基上, 24 h 后, 阳性菌为紫红色, 阴性菌为蓝绿色, 而沙显在培养 48 h 后, 阳性菌和阴性菌均为紫红色, 所以应严格按照说明书上要求的时间进行判读。

样品的生化鉴定结果符合典型的沙门氏菌生化反应特征时, 则需继续进行血清凝集试验, 否则就可直接判定为该样品中未检出沙门氏菌。

参考文献

- [1] 刘晶星, 李凡, 徐志凯, 等. 医学微生物学第 8 版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
Liu JX, Li F, Xu ZK, et al. Medical microbiology the eighth edition [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013.
- [2] 骆海朋, 唐颂, 陈怡文, 等. 沙门氏菌能力验证样品的研制及其应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(4): 1473-1478.
Luo HP, Tang S, Chen YW, et al. Preparation of quality control samples of *Salmonella* and their application in the proficiency test [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(4): 1473-1478.
- [3] Fleming LE, Broad K, Clement A, et al. Oceans and human health: emerging public health risks in the marine environment [J]. Mar Pollut Bull, 2006, 53(10/12): 545-560.
- [4] 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.
- [5] CNAS – RL 02:2018 能力验证规则[Z].
CNAS – RL 02: 2018 Competency verification rules [Z].
- [6] 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.
- [7] 陈秋菊, 向君毅. 巧克力中沙门氏菌能力验证结果与分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(24): 254–257.
Chen QJ, Xiang JY. Results and analysis of *Salmonella* ability verification in chocolate [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(24): 254–257.
- [8] Abdel MM, Planchon V, Polet M, *et al.* Analytical performances of food microbiology laboratories-critical analysis of 7 years of proficiency testing results [J]. *J Appl Microbiol*, 2016, 120(2): 346–354.
- [9] NIFDC-PT-135 巧克力中沙门氏菌检验作业指导书[Z].
NIFDC-PT-135 Chocolate *Salmonella* competence verification practice guide [Z].
- [10] 肠杆菌和其它非苛养革兰氏阴性杆菌鉴定试剂盒(比色法)说明书[Z].
Instructions for identification kits (colorimetric method) for enterobacter and other non-caustic gram-negative bacilli [Z].
- [11] GB 4789.10-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验[S].
GB 4789.10-2016 National food safety standards-Food microbiology test [S].
- [12] 沙门氏菌属诊断血清说明书[Z].
Description of *Salmonella* diagnostic serum [Z].
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Vlahovic K, Matica B, Bata I, *et al.* *Campylobacter*, *Salmonella* and *chlamydia* in free-living birds of croatia [J]. *Wildlife Res*, 2004, 50(3): 127–132.
- [16] Zhang J, Jin H, Hu J, *et al.* Serovars and antimicrobial resistance of non-typhoid *Salmonella* from human patients in Shanghai, China, 2006–2010 [J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142(4): 826–832.
- [17] 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): 3501–3502.
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): 3501–3502.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



邓宁妍, 助理工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。
E-mail: 498707787@qq.com