

## 3种方法鉴定鸡肉粉中沙门氏菌的比对研究

李诗瑶<sup>1\*</sup>, 王鸣秋<sup>1</sup>, 林津<sup>1</sup>, 邵翠翠<sup>1</sup>, 朱必婷<sup>1</sup>, 刘艳<sup>1</sup>, 陈丹<sup>2</sup>

(1. 湖北省食品质量安全监督检验研究院, 武汉 430075; 2. 咸宁市公共检验检测中心, 咸宁 437000)

**摘要:** **目的** 采用3种方法对鸡肉粉中沙门氏菌进行检测。**方法** 3份样品的前处理依据组织方提供的《作业指导书》进行, 每瓶样品直接加入4.5 mL灭菌去离子水复溶, 作为初始样本, 后续实验依据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》操作。鉴定分离出疑似菌后, 加入了实时荧光定量PCR法、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法2种方法作为辅助检测, 并用全自动微生物鉴定系统进行生化鉴定, 再结合生化鉴定与血清学实验综合评判检测结果。**结果** 使用3种鉴定方法在JS015、JS110、JS140样本中均检出沙门氏菌。**结论** 本研究采用的实时荧光定量PCR法、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法2种方法均能快速准确鉴定出沙门氏菌, 特别是基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法和血清学分型配合使用, 对沙门氏菌的快速鉴定有重要意义。

**关键词:** 沙门氏菌; 实时荧光定量PCR法; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法; 血清分型; 鉴定

### Comparative study on the identification of *Salmonella* in chicken powder by 3 methods

LI Shi-Yao<sup>1\*</sup>, WANG Ming-Qiu<sup>1</sup>, LIN Jin<sup>1</sup>, SHAO Cui-Cui<sup>1</sup>, ZHU Bi-Ting<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, CHEN Dan<sup>2</sup>

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430075, China;  
2. Xianning Public Inspection and Testing, Xianning 437000, China)

**ABSTRACT: Objective** To compare the identification of *Salmonella* in chicken powder by 3 methods. **Methods** The pretreatment of the 3 samples was conducted according to the *Work instruction provided by the organizer*. Each bottle of samples was directly added into 4.5 mL sterilized deionized water for re-dissolution as the initial samples, and the subsequent experiments were conducted in accordance with GB 4789.4—2016 *National food safety standard-Food microbiological examination-Salmonella*. After identification of the suspected bacteria, quantitative real-time PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) were added as the auxiliary detection methods. Biochemical identification was carried out with the automatic microbial identification system, and the detection results were comprehensively evaluated with the combination of biochemical identification and serological experiment. **Results** *Salmonella* was detected in samples JS015, JS110 and JS140 by 3 identification methods. **Conclusion** The quantitative real-time PCR method and MALDI-TOF-MS method are able to identify *Salmonella* quickly and accurately. In particular, MALDI-TOF-MS method and serum credit type are used in combination, which is of great significance for the rapid identification of *Salmonella*.

基金项目: 湖北省食品质量安全监督检验研究院自主立项科研项目(ZZLX2017007)、湖北省重点研发计划项目(2020BCA091)

Fund: Supported by the Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test Independent Research Project (ZZLX2017007), and HuBei Key Research and Development Project (2020BCA091)

\*通信作者: 李诗瑶, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: 927312490@qq.com

\*Corresponding author: LI Shi-Yao, Master, Engineer, Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test Wuhan 430075, China. E-mail: 927312490@qq.com

**KEY WORDS:** *Salmonella*; quantitative real-time PCR; matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; serotyping; identification

## 0 引言

沙门氏菌是食物中引起肠胃炎最常见的病原体,它可导致多种感染,有些血清型如伤寒沙门氏菌等,还可引起菌血症<sup>[1]</sup>。据2010年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)估计,全球每年有数十亿人患食源性疾病,42万人死亡,其中每年仅沙门氏菌就导致23万人死亡<sup>[2]</sup>。据统计,美国疾病控制和预防中心每年收到超140万人感染沙门氏菌的报告<sup>[3]</sup>;在欧洲,每年有超16万人感染沙门氏菌,发生率为0.035%<sup>[4]</sup>;在中国,近2年出现了多起由沙门氏菌感染引起的中毒事件<sup>[5]</sup>。细菌性食物中毒中70%~80%是由沙门氏菌引起,严重危害人民身体健康和生命安全,已成为目前最受关注的公共卫生问题之一<sup>[6]</sup>。

鸡肉和鸡蛋是人致病沙门氏菌的主要传播媒介。根据各国的研究,零售生鸡肉中沙门氏菌的污染一般为10%~80%<sup>[7]</sup>。国家食品安全风险评估中心2011—2013年对市售生鸡肉中沙门氏菌污染水平的调查结果显示,我国零售生鸡肉中大约40%存在沙门氏菌污染<sup>[8]</sup>。美国农业部食品安全检验局进行的一项调查表明,45%的鸡肉样本(25 g)可能被浓度约100.1 MPN/g的沙门氏菌感染<sup>[9]</sup>。

本次实验室间能力比对主要参照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>[10]</sup>,并将基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)和荧光定量PCR技术病原微生物快速检测系统同时进行平行鉴定<sup>[11]</sup>,总结能力验证沙门氏菌的分离鉴定的经验,为全面了解总局本级食品安全承检机构检测能力,保证检测结果准确可靠、为日常检验提供参考数据及方法<sup>[12-13]</sup>。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品

编号分别为JS015、JS110、JS140的沙门氏菌鸡肉粉样品3瓶,棕色西林瓶包装,每瓶样品0.5 g作为独立检测单元,无需再称量取样。鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica serovar Typhimurium*)标准菌株ATCC 14028,使用该标准菌株作为阳性对照组,由美国Microbiologics公司提供。

### 1.2 主要培养基及试剂耗材

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、四硫磺酸钠煌绿增菌液(tetrathionate broth, TTB)、亚硒酸盐胱氨酸

增菌液(selenite cystine broth, SC)、罗伯特增菌液(rappaport vassiliadis broth, RV)、沙门菌显色平板(chormagar *Salmonella*, CAS)、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐平板(xylose lysine deoxycholate, XLD)、亚硫酸铋平板(bismuth sulphite agar, BS)和赫氏肠道菌平板(hektoen enteric agar, HE)、三糖铁琼脂(triple sugar iron agar, TSI)、营养琼脂(nutrient agar, NA)、半固体琼脂(voges-proskauer semisolid agar, VSA)、革兰氏染色液试剂盒(青岛海博生物技术有限公司);革兰氏阴性杆菌鉴定卡(GN卡,法国生物梅里埃公司);沙门氏菌属诊断血清60种(宁波天润生物药业有限公司);沙门氏菌属诊断血清60种(泰国S&A reagents Lab公司);细菌质谱检测标准品BTS、MALDI质谱专用基质HCCA(德国Bruker科技有限公司);沙门氏菌检测试剂盒(荧光型)(卡尤迪生物科技有限公司)。

### 1.3 主要仪器

BSC-1600IIA2 二级生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司); Heratherm IGS 400 生化培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific Inc); SX-700 压力蒸汽灭菌器(日本 TOMY 公司); VITEK®2 COMPACT 全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃公司); ViiA7 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Life Technologies 公司); Autoflex speed 飞行时间质谱微生物鉴定系统(德国 Bruker 科技有限公司)。

### 1.4 样品处理与检测方法

#### 1.4.1 样品处理及预增菌

每瓶样品直接加入4.5 mL灭菌去离子水复溶,复溶后的5 g样品匀液转移至45 mL的BPW中进行预增菌,然后进行沙门氏菌定性检测。(国标规定25 g样品加入225 mL的BPW进行预增菌,本次盲样考核将样品取样量和BPW体积均降低至国标规定的五分之一,即5 g样品匀液加45 mL的BPW。此外,沙门氏菌检测为定性检测,预增菌过程中BPW的体积对沙门氏菌检测结果没有影响)<sup>[9]</sup>。

#### 1.4.2 二次增菌

将经过增菌的增菌液BPW,分别取1 mL转接于10 mL的TTB、10 mL的SC和10 mL的RV中,TTB于42℃培养24 h,SC于36℃培养24 h,RV于42℃培养24 h。

#### 1.4.3 分离

分别用10 μL接种环取一环二次增菌液,划线接种于CAS、XLD、BS、HE上,在36℃培养48 h观察各平板上的菌落形态。

#### 1.4.4 PCR 筛选

取BPW、TTB、SC、RV增菌液各1 mL,加入1.5 mL离心管中12000 r/min离心2 min,取上清液2 μL作为PCR

模板。采用卡尤迪沙门氏菌 PCR 检测试剂盒,按照说明书进行体系配制、程序设置。上机分析结果。

#### 1.4.5 生化鉴定

于选择性琼脂平板上分别挑取 2 个以上典型或可疑菌落,接种三糖铁琼脂斜面划线后底层穿刺;接种针不要灭菌,直接接种赖氨酸脱羧酶实验培养基和营养琼脂平板,于 36 °C 培养 24 h。棉拭子挑取营养琼脂上纯化后菌落加入 3 mL、0.45% 的 NaCl 中制成菌悬液,菌液浓度 0.5~0.63 M<sub>C</sub>F 之间,用 GN 卡上机,进行生化鉴定。

#### 1.4.6 血清型鉴定

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(必要时用放大镜观察),判断是否有盐水自凝现象。若无盐水自凝,进行多价菌体抗原(O)和多价鞭毛抗原(H)的鉴定。

#### 1.4.7 MALDI-TOF-MS 鉴定

挑取适量待试培养物,加入 300 μL 无菌水混匀,再加入 900 μL 无水乙醇混匀。灭活菌液 12000 r/min 离心 2 min,弃去上清。加入 50 μL 70% 甲酸,仔细混匀,再加入 50 μL 乙腈,仔细混匀,12000 r/min 离心 2 min 吸取上清 1 μL 置

于样品靶上,室温放干后再取 1 μL 基质覆盖,室温自然挥干后上机检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 选择性平板分离结果

预期生长典型菌落: XLD 为中心黑色的淡红色湿润菌落, CAS 为紫红色光滑湿润菌落, BS 为金属光泽棕黑色菌落, HE 为中心黑色淡绿色湿润菌落。样品 JS015、JS140、JS110 在 TTB、SC、RV 中均呈现浑浊,分别划线接种分离平板,结果由表 1 可知,样品 JS015、JS140 的各二次增菌液在 CAS、BS、XLD、HE 上均有典型菌落生长,并且无杂菌生长,但是样品 JS110 的二次增菌液在上划线接种后各分离平板均有大量非典型菌落生长,仅在 RV 增菌液划线分离的 HE 平板上发现少量疑似目标菌,初步推断存在人为添加高浓度干扰菌。

### 2.2 生化鉴定结果

将不同选择性琼脂平板上分离得到的典型或可疑菌落分别接种至营养琼脂平板上进行纯培养,分别接种于 TSI 斜面和 VITEK®2 COMPACT 鉴定系统鉴定。具体结果见表 2、3。

表 1 选择性平板上分离形态  
Table 1 Selective plate separation of morphology

平板	JS015			JS140			JS110		
	TTB	SC	RV	TTB	SC	RV	TTB	SC	RV
CAS	紫色菌落	紫色菌落	紫色菌落	紫色菌落	紫色菌落	紫色菌落	蓝色菌落*	蓝色菌落*	蓝色菌落*
BS	黑色带金属光泽菌落	黑色带金属光泽菌落	黑色带金属光泽菌落	黑色带金属光泽菌落	黑色带金属光泽菌落	黑色带金属光泽菌落	无菌落生长	少数灰黑色菌落*	黑色菌落,无金属光泽*
XLD	粉色带黑心菌落	粉色带黑心菌落	粉色带黑心菌落	粉色带黑心菌落	粉色带黑心菌落	粉色带黑心菌落	黄色圆形菌落*	黄色圆形菌落*	黄色圆形菌落*
HE	绿色黑心菌落	绿色黑心菌落	绿色黑心菌落	绿色黑心菌落	绿色黑心菌落	绿色黑心菌落	黄色菌落*	黄色菌落*	黄色菌落,少量绿色黑心菌落

注: \*为非典型菌落形态。

表 2 三糖铁及赖氨酸脱羧酶实验  
Table 2 The decarboxylase test of TSI and lysine

样品编号	TSI				赖氨酸脱羧酶实验
	斜面	底层	产气	产硫化氢	
JS015 典型菌落	K	A	+	+	+
JS140 典型菌落	K	A	+	+	+
JS110 可疑菌落 1	A	A	+	-	+
JS110 可疑菌落 2	K	A	-	+	+

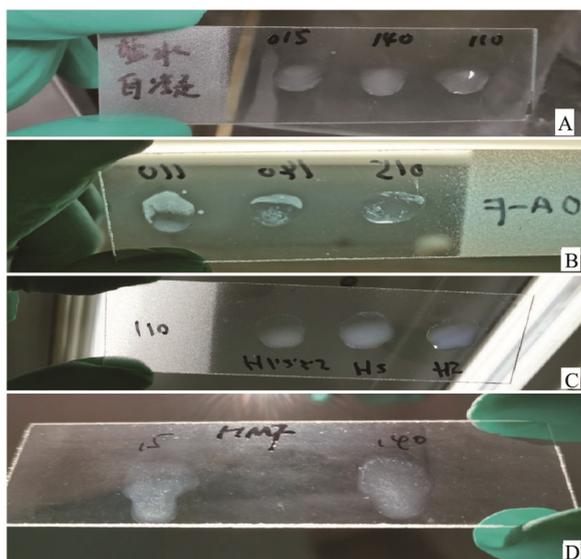
注: K 代表产碱; A 代表产酸; + 代表阳性; - 代表阴性。

表 3 纯化后各菌落 VITEK®2 COMPACT 结果  
Table 3 VITEK®2 COMPACT results after purification

样品编号	鉴定结果
JS015 典型菌落	<i>Salmonella</i> group(需血清学验证)
JS140 典型菌落	<i>Salmonella</i> group(需血清学验证)
JS110 可疑菌落 1	<i>Klebsiella aerogenes</i>
JS110 可疑菌落 2	<i>Salmonella</i> group(需血清学验证)

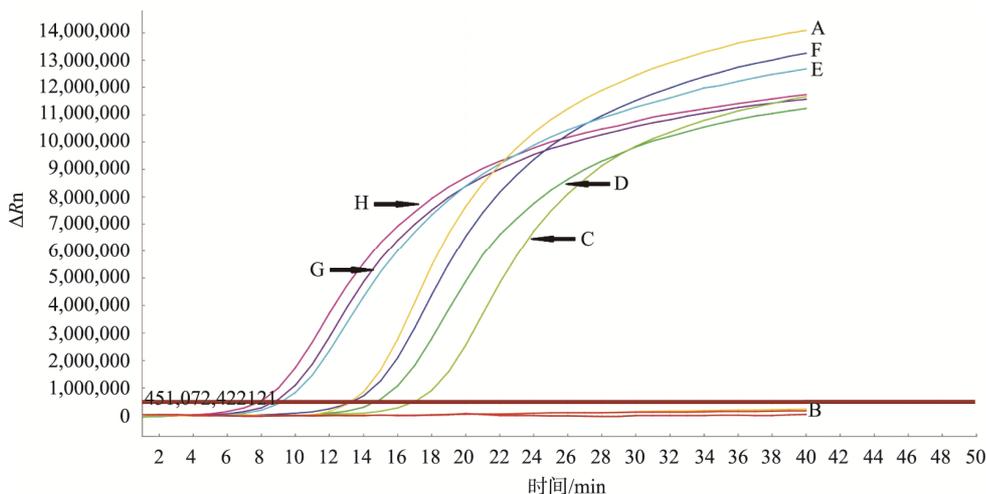
### 2.3 血清学实验结果

选取进口、国产 2 品牌血清进行血清学实验, 结果一致, 4 株分离菌均为沙门氏菌: O 多价 A-I 凝集。Hi、H1 血清凝集; H 多价 HMF 凝集; 生理盐水(阴性对照)不凝集。具体见图 1。



注: A: 盐水自凝实验; B: 多价菌体抗原 O 鉴定; C: JS110 多价鞭毛抗原 H 鉴定; D: JS015、JS140 多价鞭毛抗原 H 鉴定。

图 1 血清凝集实验结果  
Fig.1 Results of serum agglutination test



A: 阴性对照; B: JS110-SC; C: JS110-BPW; D: JS015-SC; E: JS140-SC; F: JS110-TTB; G: JS140-SC; H: 阳性对照。

图 2 PCR 扩增曲线图  
Fig.2 PCR amplification curve

### 2.4 MALDI-TOF-MS 鉴定结果

鉴定结果给出数据库中与鉴定菌种最为匹配的菌株种属, 并给出相应的分数。匹配分数 2.300~3.000, 表示菌株鉴定可信度很高, 2.000~2.299 表示保守的菌属鉴定或可能的菌种鉴定, 1.700~1.999 表示可能的菌属鉴定, 0.000~1.699 表示不可信鉴定。具体结果见表 4。

表 4 纯化后各菌株鉴定分值  
Table 4 The identification scores of each strain after purification

样品编号	鉴定结果	分值
JS015	<i>Salmonella</i> group	2.416
JS140	<i>Salmonella</i> group	2.375
JS110 可疑菌落 1	<i>Klebsiella aerogenes</i>	2.113
JS110 可疑菌落 2	<i>Salmonella</i> group	2.361

### 2.5 实时荧光定量 PCR 检测结果

使用沙门氏菌免核酸提取试剂盒进行 PCR 循环, 结果见图 2。结果显示, JS015、JS110、JS140、阳性对照检出沙门氏菌, 与国标方法一致。

## 3 结 论

通过与组织方的结果比对, 编号 JS110 中添加了较高浓度的产气克雷伯氏菌作为干扰菌, 其在沙门显色和 BS 上均有生长, 存在与目标菌之间的竞争作用, 在实际工作中要正确选择选择性培养基。国标检测中通过在沙门显色平板, BS 平板中分离疑似菌落, 在 RV 增菌后的 HE 平板上分离出疑似菌落, 纯化后成功找到目标菌。由于阳性样本背景菌浓度较高, 竞争生长, 所以前增菌的时间要严格把控。

本次实验增加了基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法以及荧光定量 PCR 技术, 检查结果与国标方法一致。目前部分实验室已经采用 MALDI-TOF-MS 均能对沙门菌做出菌属鉴定, 与血清型比较, 符合率为 70.0%(28/40), 主要集中在鼠伤寒沙门菌和肠炎沙门菌, 但 MALDI-TOF-MS 方法不能完全等同于血清学分型<sup>[13]</sup>, 不同的细菌经 MALDI-TOF-MS 检测可以形成特异性的指纹图谱, 通过建立这些细菌的图谱库, 将待测细菌的质谱图与其进行比较, 即可确定细菌种属。但是由于现有数据库信息不足或有误差, 往往造成漏检或假阳性的出现, 需要对数据库进行不断地补充和完善<sup>[14]</sup>。目前对沙门氏菌的检验及鉴定的最新方法免疫学分析检验方法、分子生物学分析检验方法、生物传感器等, 每一种检测技术都有一定的优缺点, 应对检测方法进行交叉使用<sup>[15]</sup>。随着生物学、化学、物理等学科快速发展, 应将传统的微生物检测技术与新兴的分子生物学手段相结合, 取长补短, 使准确、快速、灵敏检测食品中沙门氏菌成为现实<sup>[16]</sup>。

#### 参考文献

- [1] VARMUZOVA K, MATULOVA ME, GERZOVA L, *et al.* Curcuma and scutellaria plant extracts protect chickens against inflammation and *Salmonella Enteritidis* infection [J]. *Poult Sci*, 2015, 94(9): 2049–2058.
- [2] SIYUAN Z, SHIOWSHUH S, GUOHUA Z, *et al.* Prediction of *Salmonella* inactivation in sliced tomato subject to high pressure processing and trans-cinnamaldehyde treatment using selective and non-selective growth media for survival evaluations [J]. *Food Control*, 2020, 118.
- [3] MAJOWICZS E, MUSTO J, SCALLAN E, *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis [J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 50(6): 882–889.
- [4] SEYS SA, SAMPEDRO F, HEDBERG CW. Assessment of meat and poultry product recalls due to *Salmonella* contamination: product recovery and illness prevention [J]. *J Food Prot*, 2017, 80(8): 1288–1292.
- [5] 陈风格, 冯冬颖, 赵伟, 等. 一起沙门氏菌引起的自助餐食物中毒案例分析[J]. *现代预防医学*, 2016, 43(19): 3609–3610, 3619. CHEN FG, FENG DY, ZHAO W, *et al.* Analysis of a case of food poisoning caused by *Salmonella* in buffet [J]. *Mod Prev Med*, 2016, 43(19): 3609–3610, 3619.
- [6] 戴邵亮. 基于适配体的沙门氏菌检测方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(14): 4589–4596. DAI SL. Research progress of aptamer-based detection methods for *Salmonella* [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(14): 4589–4596.
- [7] 段海燕. 鸡沙门氏菌病防控[J]. *畜牧兽医学(电子版)*, 2020, (11): 157–158. DUAN HY. Prevention and control of salmonella in chickens [J]. *Graziery Vet Sci (Elect Ed)*, 2020, (11): 157–158.
- [8] 国家食品安全风险评估中心. 选对鸡肉、注意卫生, 预防沙门氏菌食物中毒 [EB/OL]. [2015-02-03]. <https://cfsa.net.cn/Article/News.aspx?id=A9594FDEF732FF605913608F5E55D306E5F9E752262BE641> China National Center for Food Safety Risk Assessment(CFSA). Choose the right chicken, pay attention to hygiene, prevent salmonella food poisoning [EB/OL]. [2015-02-03]. <https://cfsa.net.cn/Article/News.aspx?id=A9594FDEF732FF605913608F5E55D306E5F9E752262BE641>
- [9] S. Department of Agriculture. Nationwide raw ground chicken microbiological survey [J]. *Food Saf Inspect Serv*, 1996, 3: 1–8.
- [10] 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].
- [11] 张艳超, 史永刚, 卫佳欢, 等. 3 种方法检测食品中沙门菌能力验证结果分析[J]. *检验检疫学刊*, 2016, 26(3): 14–17. ZHANG YC, SHI YG, WEI JH, *et al.* Analysis on the results of the proficiency testing on the three methods detecting *Salmonella* in foods [J]. *J Inspect Quar*, 2016, 26(3): 14–17.
- [12] 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): 3497–3503. 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): 3497–3503.
- [13] 鸡肉粉中沙门氏菌检测能力盲样考核测评作业指导书[Z]. Blind sample assessment and evaluation of *Salmonella* detection ability in chicken powder work instruction [Z].
- [14] 苗丽, 陈静, 徐耀辉, 等. 利用 MOLDI-TOF-MS 方法对沙门氏菌野毒株的鉴定与分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017, (15): 173–176, 293. MIAO L, CHEN J, XU YH, *et al.* Identification and analysis of *Salmonella* field strains through the method of MOLDI-TOF-MS [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2017, (15): 173–176, 293.
- [15] 汤英贤, 陈凌娟, 钟国权, 等. 沙门菌基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱与血清学分型比较及药敏结果[J]. *中国热带医学*, 2020, 20(6): 495–499. TANG YX, CHEN LJ, ZHONG GQ, *et al.* Comparison of MALDI-TOF-MS with serological classification and analysis of drug sensitivity in *Salmonella* [J]. *China Trop Med*, 2020, 20(6): 495–499.
- [16] 段星星, 曾晓琮, 周露. 沙门氏菌检验及鉴定方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(16): 5364–5370. DUAN XX, ZENG XC, ZHOU L. Research progress on the detection and identification methods of *Salmonella* [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(16): 5364–5370.

(责任编辑: 张晓寒)

#### 作者简介



李诗瑶, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。  
E-mail: 927312490@qq.com