

从能力验证样品来探讨沙门氏菌的各种检测方法

洪亮(台州市药品检验研究院, 浙江 台州 318000)

摘要: 目的 通过对能力验证样品沙门氏菌的检验, 探讨各种检测方法的特性, 为食品、药品中沙门氏菌快速检测及鉴定提供参考。方法 按照中国食品药品检定研究院下发的《能力验证作业指导书》, 结合食品安全国家标准 GB4789.4-2016 和本实验室沙门氏菌常用检测方法进行平行检测, 对样品进行分离、鉴定。结果 2 份样品分别鉴定为鼠伤寒沙门氏菌和沙门氏菌 IIIb(肠沙门氏菌双相亚利桑那亚种)。结论 以国标、中国药典收载的传统方法为基础检测方法, 加入简便快捷的其他检测方法作为辅助, 可以确保结果的快速获得和准确性。

关键词: 能力验证; 沙门氏菌; 检测方法

中图分类号: R927.12

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)02-0207-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.02.014

引用本文: 洪亮. 从能力验证样品来探讨沙门氏菌的各种检测方法[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(2): 207-211.

Discussion on Various Detection Methods of *Salmonella* from Proficiency Testing Samples

HONG Liang(Taizhou Institute for Drug Control, Taizhou 318000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the characteristics of various detection methods through the test of *Salmonella* in proficiency testing samples, so as to provide reference for the rapid detection and identification of *Salmonella* in food and medicine. **METHODS** According to the operation instruction for proficiency testing issued by National Institutes for Food and Drug Control, combined with the national food safety standard GB4789.4-2016 and the common detection methods of *Salmonella* in authors' laboratory, the samples were isolated and identified. **RESULTS** The two samples were identified as *Salmonella typhimurium* and *Salmonella* IIIb(*Salmonella enterica* ssp. *diarizonae*). **CONCLUSION** Based on the traditional methods of GB and ChP, other simple and rapid detection methods are added to ensure the rapid acquisition and accuracy of the results.

KEYWORDS: proficiency testing; *Salmonellae*; detection methods

沙门氏菌是重要的致病菌, 广泛分布于自然界, 能使人 and 动物致病, 发生食物中毒。据统计, 在世界各国的细菌性食物中毒中, 沙门氏菌引起的食物中毒常列榜首。沙门氏菌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, 严重危害人民身体健康^[1]。沙门氏菌也是药品(尤其是含生药原粉的中药制剂)微生物限度中需严控的致病菌。沙门氏菌目前国际上共有 2 659 个血清型, 分 2 个种, 肠道沙门氏菌(2 637 个血清型)和邦戈尔沙门氏菌(22 个血清型)。肠道沙门氏菌包含 6 个亚种, 分别是肠道亚种(1 586 个血清型)、萨拉姆亚种(522 个血清型)、亚利桑那亚种(102 个血清型)、双相亚利桑那亚种(338 个血清型)、浩敦亚种(76 个血清型)和因迪卡亚种(13 个血清型), 依次分别简称为亚种 I、II、IIIa、IIIb、IV 和 VI。目前沙门氏菌检测的方法有很多, 包括荧光定量 PCR 进行沙门氏菌定性及血清分型、基因芯片法、ELISA 法(如 VIDAS 仪器)、基质辅助激光解析电离飞行时间质

谱(MALDI-TOF-MS)、API 及 VITEK 生化鉴定等方法, 但在食药检验和流行病学调查中, 传统方法依然是主流。传统的检测方法包括前增菌和选择性增菌、选择性平板的分离和 NA 平板的纯培养、生化试验及血清学鉴定等步骤, 虽然过程较为繁琐, 但结果更准确可靠。传统方法和其他快速鉴定方法, 各有特点, 本研究就本实验室参加 1 次沙门氏菌检验能力验证实验(NIFDC-PT-135)来探讨沙门氏菌的各种检测方法。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

样品编号为 182, 391, 由中国食品药品检定研究院提供, 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。

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW, 批号: H1006Y)、四硫磺酸钠煌绿(tetrathionate broth, TTB, 批号: 1072221)增菌液、亚硒酸盐胱氨酸(selenite cystine, SC, 批号: H1692Y)增菌液、BS 琼脂(批号: 1070601)、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼

基金项目: 台州市科技计划项目(1901ky84)

作者简介: 洪亮, 男, 副主任药师

Tel: 13857660015

E-mail: letgohl@163.com

脂(xylose lysine desoxycholate, XLD, 批号: H0350Y)、科马嘉沙门氏菌显色培养基(批号: P001104)、沙门氏菌生化鉴定试剂盒(批号: 5107105)及其他生化试剂均购自广东环凯;沙门氏菌核酸检测试剂盒(PCR-探针法, 批号: HR180520)、沙门氏菌血清型分子鉴定试剂盒(PCR-探针法, 批号: LR706F2)均购自北京良润生物科技有限公司;沙门氏菌属多价诊断血清(A-F群, 宁波天润生物药业有限公司, 批号: 20170101);SSI 血清(丹麦国家血清研究院, 批号: 60V-45);VITEK2 革兰氏阴性鉴定卡(批号: 2410429403)和VIDAS 沙门氏菌鉴定卡(批号: 1006267980)为法国生物梅里埃公司产品。

1.2 仪器

高压灭菌锅(松下公司);生化培养箱(美墨尔特公司);生物安全柜(力康公司);生物显微镜(奥林巴斯公司);VITEK2 COMPACT 全自动微生物鉴定仪、VIDAS30 全自动荧光免疫分析仪和VITEK MS 全自动微生物质谱快速检测系统均来自法国梅里埃公司;ABI V7 荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞)等。

1.3 传统检测方法

1.3.1 样品的处理 按照中国食品药品检定研究院提供的《能力验证作业指导书》进行样品处理,再按 GB4789.4-2016 或其他常用方法进行后续实验及鉴定。

1.3.2 增菌 ①前增菌:在生物安全柜内开启玻璃瓶。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 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 稀释液。将上述 90 mL 的 BPW 稀释液(1:10)直接作为前增菌液,于 36 °C 静置培养 16 h。

②选择性增菌:取培养后的前增菌液,分别吸取 1 mL 接种到 10 mL TTB 和 10 mL SC 中,然后将接种后的 TTB 42 °C 培养 24 h,将接种后的 SC 36 °C 培养 24 h。增菌结束后轻轻摇匀,观察溶液均为浑浊。

1.3.3 分离培养 将 TTB、SC 增菌液,各取一接种环分区划线于 BS、XLD、沙门氏菌显色琼脂上,按照需要的温度和时间培养。培养结束后观察菌落生长情况。各平板上的可疑菌落特征见表 1。

表 1 选择性平皿上可疑菌落特征

Tab. 1 Characteristics of suspicious colonies on selective plates

编号	BS	XLD	显色平皿
182	灰绿色带黑色中心菌落;灰绿色菌落	淡粉色带黑色中心菌落;黄色菌落	淡粉色带蓝色中心菌落
391	黑色有金属光泽的菌落;灰绿色菌落	粉红色带黑色中心菌落;黄色菌落	紫红色菌落

1.3.4 生化鉴定 上述每种培养基平皿上各挑 3 个可疑菌落转接到 NA 平皿上,36 °C 培养 24 h。再从 NA 挑取纯培养的菌落进行手工及 VITEK2 生化鉴定。手工结果见表 2(2 个均为疑似沙门氏菌)。VITEK2 结果见表 3(1 为 182:95% Probability *Salmonella enterica* ssp. *diarizonae*; 2 为 391:99% Probability *Salmonella* group)。

表 2 手工生化鉴定结果

Tab. 2 Results of manual biochemical identification

编号	TSI	赖氨酸脱羧酶	脲酶	氰化钾	甘露醇	山梨醇	ONP
	斜面 底层	产气 硫化氢	羧酶 胍素	钾	醇	醇	G
182	产碱 产酸	+	-	+	-	-	+
391	产碱 产酸	+	+	+	-	-	+

表 3 VITEK2 生化鉴定结果

Tab. 3 Biochemical identification results of VITEK2

成分	1	2	成分	1	2	成分	1	2
APPA	-	-	ADO	-	-	PyrA	-	-
H ₂ S	-	+	BNAG	-	-	AGLTp	-	-
BGLU	-	-	dMAL	-	+	DMAN	+	+
ProA	-	-	LIP	-	-	PLE	-	-
SAC	-	-	dTAG	-	-	DTRE	+	+
ILATk	+	+	AGLU	-	-	SUCT	+	+
GlyA	-	-	ODC	-	+	LDC	+	+
O129R	+	+	GGAA	-	-	IMLTa	-	-
IARL	-	-	dCEL	-	-	BGAL	+	-
dGLU	+	+	GGT	-	+	OFF	+	+
dMNE	+	+	BXYL	-	-	BAlap	-	-
TyrA	+	+	URE	-	-	DSOR	+	+
CIT	+	+	MNT	+	-	5KG	-	-
NAGA	-	-	AGAL	+	+	PHOS	-	+
IHISa	-	-	CMT	+	+	BGUR	+	-
ELLM	-	-	ILATa	-	-			

1.3.5 血清学鉴定试验 将生化结果符合沙门氏菌的菌株做血清学凝集试验。取纯培养的菌落进行 O 抗原、H 抗原、Vi 抗原的鉴定,采用玻片凝集法。先选用多价血清进行凝集,确定后再选用相应的单价血清进行凝集,从而确定血清分型。如果不凝或者第二相未检出,可用诱导或位相变异试验培养 2~3 代后再进行凝集试验。分别用宁波天润和丹麦 SSI 血清相互验证。血清凝集结果:182 为双相亚利桑那沙门氏菌 O:60;H:r,e,n,

x, z₁₅; 391 为鼠伤寒沙门氏菌 O: 4, 5, 12: H: I, 1, 2。

1.4 PCR 定性检测及血清型分子鉴定试验

每份样品各取 1 mL TTB 或 SC 的增菌液于 1.5 mL 离心管中, 按试剂盒步骤提取核酸, 再按预定的反应条件进行扩增、荧光信号收集和结果判定。检测有效性判定: 阳性对照出现典型的扩增曲线, 并且 CT 值<30; 阴性对照无扩增曲线, CT 值显示 UND.或>40。结果判定: CT≤35, 沙门氏菌阳性; 35<CT<40, 样本重做, 如重做结果 CT≥40, 沙门氏菌阴性, 否则为沙门氏菌阳性; CT≥40, 沙门氏菌阴性。2 份样品的荧光定量 PCR 实验结果均为沙门氏菌阳性。具体 CT 值见图 1。

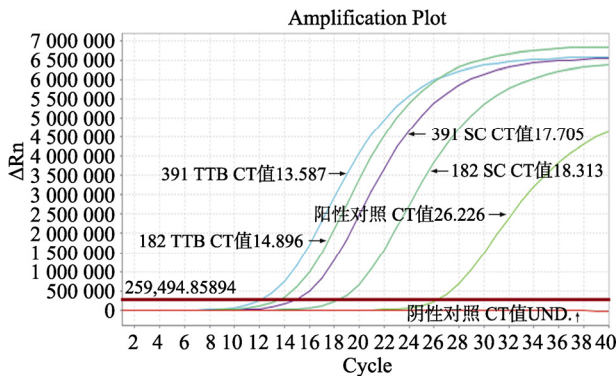


图 1 实时荧光 PCR 试验结果
Fig. 1 Results of real-time PCR

沙门氏菌血清型分子鉴定试剂盒采用 Realtime PCR 技术, 对 12 段特异基因进行检测, 收集荧光信号, 获得 CT 值, 同数据库比对, 确定沙门氏菌的血清型。每份样品从纯培养的 NA 平皿上挑选至少 10 个菌落, 按照试剂盒步骤提取核酸, 再按照预定的反应条件进行扩增和荧光信号收集, 最后进行结果判定。具体图谱和 CT 值见图 2。

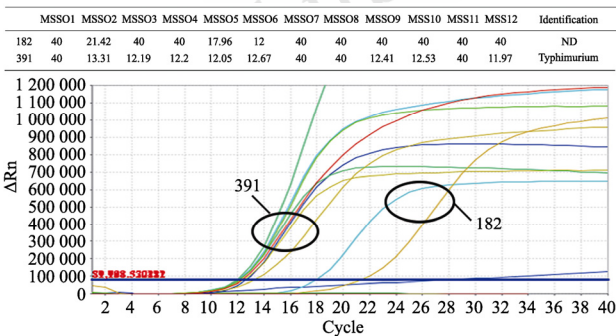


图 2 血清分型分子鉴定结果
Fig. 2 Molecular identification of serotyping

未检出荧光信号, 在相应基因片段中输入 CT 值“40”。查询数据库, 182 的结果为“ND”, 表

明数据库不含有该血清型的沙门氏菌; 391 的结果为“Typhimurium”, 表明该样品为鼠伤寒沙门氏菌。

1.5 酶联免疫法(VIDAS)沙门快速筛选

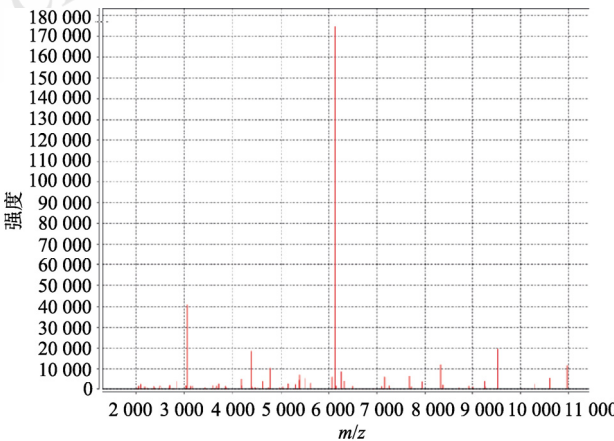
按照 GB/T 22429-2008 规定的步骤进行实验, 每个样品取增菌后的 TTB 和 SC 增菌液各 1 mL 混合到灭菌试管中, 沸水浴煮沸 15 min, 取上液 500 μL 加入到沙门氏菌酶联免疫试剂盒的测试孔中, 通过 VIDAS30 分析仪进行自动酶联免疫反应后, 测定反应强度, 与参照值比较, 得出检验结果, 见表 4。2 份样品结果值远大于阳性参照值 0.23, 均为沙门氏菌阳性。

表 4 沙门氏菌 VIDAS 筛选结果
Tab. 4 Screening results of *Salmonella* VIDAS

ID	参照	结果	结论
182	阴性<0.23	3.02	阳性
391	阳性≥0.23	3.09	阳性

1.6 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定

按照 GB/T 33682-2017 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法通则和 VITEK MS 仪器规定的 SOP 进行实验, 挑取 BS、XLD、显色平皿上的单个疑似菌落进行微生物质谱鉴定。182 质谱鉴定结果为 50%肠沙门菌亚利桑那亚种(*Salmonella enterica* ssp. *arizonae*)和 50%肠沙门菌双相亚利桑那亚种(*Salmonella enterica* ssp. *diarizonae*), 见图 3; 391 质谱鉴定结果为沙门菌群(*Salmonella* group)。



位置	分期日析	细称名菌	致病性	置信度
B218-6-12	PM3:41	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	致命病原体	50.0
B218-6-12	PM3:41	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>	致命病原体	50.0

VITEK®MS复查详情

图 3 样品 182 VITEK MS 鉴定结果
Fig. 3 Vitek MS identification results of sample 182

2 讨论

在选择性增菌时,必须选用 TTB、SC 2 种增菌液,因为沙门氏菌属太庞大了,1 种增菌液不可能适合所有沙门氏菌的生长。其中 TTB 适合大部分沙门氏菌的增菌,最适温度为 42℃,而 SC 更适合伤寒沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌的生长,最适温度为 36℃。相对来说,TTB 的选择性比 SC 强,而 SC 的增菌范围比 TTB 广。有研究表明,沙门氏菌经 TTB 增菌 15 h 后生长旺盛,检出率较高;而相同样品,SC 要增菌 18 h 以上,才能达到类似效果^[2]。2 种增菌液同时使用,相互弥补,防止漏检。在本次实验中,发现从 SC 增菌液中分离出的杂菌要比 TTB 中分离出的多;PCR 实验,SC 增菌液扩增的 CT 值比 TTB 的大,证明每 1 mL TTB 所含的沙门氏菌的数量要多一些。

在接种选择性平板时,要用 ≥ 2 种培养基。本试验使用了 BS、XLD、显色平板,疑似菌落的挑取必须结合 3 种平板上的菌落特征来综合考虑。像 391 是典型的沙门氏菌,菌落特征都比较典型,不会出现漏检。而 182 是双相亚利桑那沙门氏菌,特别在显色平板上生长的菌落是蓝色的,同典型的紫红色差异挺大。这是因为多数沙门氏菌的 β -半乳糖苷酶为阴性,而双相亚利桑那沙门氏菌的 β -半乳糖苷酶为阳性,如果单纯依靠显色平板来判断,就会发生漏检。在实际的工作中,样品往往存在很多杂菌,尤其在能力验证样品中经常会添加与目标菌形态或生化相近的菌株。而奇异变形杆菌、弗氏柠檬酸杆菌等在 XLD 琼脂平板上亦能形成中心黑色、边缘光滑整齐菌落,与沙门氏菌易混淆。若条件允许,可选择不同的平板进行分离并挑选尽量多的可疑菌落进行后续试验,再结合生化试验来判断。

生化试验,如选用手动生化试剂盒进行试验,对双相亚利桑那沙门氏菌来说,可能出现漏检。182 的手动生化结果按照国标规定,ONPG 实验结果应为阴性,但实际检测结果为阳性。所以手动生化结果即使完全相符,或者一两项不符均不能草率判定是否检出,还需用血清凝集来验证。推荐使用全自动生化鉴定仪,快速方便,避免了人眼的主观判读,准确度更高。

只有生化试验与血清学试验均符合的情况下,才可判定检出沙门氏菌。由于双相亚利桑那沙门氏菌通常与沙门菌属诊断血清(A-F 群)O、vi

因子血清均不凝集,在培养中易漏检,应引起重视,需配备相应的血清试剂。沙门菌的抗原种类繁多,常常存在交叉凝集,为了减少出错,特别是鉴定 H 抗原时,应选择合适的培养基和方法进行鞭毛的诱导,而且反复诱导多次,除了国标规定的 3 种位相变异实验方法外,还可使用血平板搭桥法,简单准确。实验室最好能备 2 个厂家的血清,互相验证,防止错检漏检。

沙门氏菌血清型分子鉴定法,优点是准确、快速、方便,最大不足就是数据库沙门种类少(目前只有 84 种)。期待能够扩充数据库,并进行准确的验证,将来替代常规的手动血清凝集法。

利用荧光定量 PCR 法或酶联免疫法(VIDAS)快速筛选沙门,相对传统方法较方便快捷,灵敏度高,准确性好,可作为沙门氏菌初筛的辅助首选方法。针对增菌液进行实验,可以防止漏检。两者又各有特点:PCR 法灵敏度更高,但容易被样品里的死菌干扰,出现假阳性的结果(国标、药典方法检测的是活菌),建议不要直接拿样品或前增菌液进行试验;VIDAS 法相对检测时间更快,但使用的试剂需要每 14 d 定标 1 次。这 2 种方法不能分型,只能鉴定到沙门氏菌属。

利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)进行检测,具有准确度好、分辨率高、快速、高通量、检测成本低等特点。其原理简单来说就是利用质谱技术形成微生物特有的蛋白质量指纹图谱,与数据库已知微生物的质谱峰进行比对,来实现快速鉴定。但缺陷依然明显,仪器价格昂贵,依靠菌种数据库,判读或算法带有主观性,易忽视强度较小但具有鉴别意义的质谱峰。依然不能分型,只能鉴定到沙门氏菌属。

中国药典 2015 年版四部<1106>控制菌检查法收录的沙门氏菌检查法,选择了 TSB、RV 和 XLD 进行增菌和分离。因为药品其生产的环境要求和灭菌程序均要严于食品,再加上其特殊性(水活度和营养性不如食品),沙门氏菌很难生长,综合考虑检测成本以及时间因素,故选择上述几个培养基进行试验。后续纯化及鉴别,药典没有明确规定,可选用国标方法或其他标准检测方法进行试验。

此外,查找文献资料,例举沙门氏菌的其他一些检测方法:比如介导等温扩增方法及类似的重组酶介导等温核酸扩增方法和重组聚合酶扩增方法,其原理都是通过恒温的条件下进行核酸

的扩增,再通过各种手段监测靶基因的扩增情况,从而鉴别沙门氏菌^[3-5]。此类方法特异性好、灵敏度高、稳定性好,缺点是需要专用仪器及试剂,依然不能进行分型。

美国 Luminex 公司开发的 xMAP 和 xTAG 检测方法,基于液相悬浮芯片系统,把流式细胞仪、数字信号处理器和激光检测装置相结合,形成了一种具有多指标同步分析功能的技术,可用于近 200 种沙门氏菌的分型。其作为一种快速分型方法,可以作为传统血清分型法的补充或替代,特别是对于使用 Luminex MAGPIX[®]系统的实验室^[6]。缺点是同样需要专用仪器及试剂,步骤相对繁琐,分型能力也基于数据库沙门的种类。

随着高通量测序及分子生物学技术的发展,16S rRNA、Axiom[®] Microbiome Array 等序列分析法对微生物的鉴定、分析及溯源展现出无可比拟的优越性,能很好的应用于沙门氏菌鉴定及分型^[7-8]。但目前该类方法也存在一定的局限性,如依赖数据库准确性、设备及实验成本高、检验人员需具备一定的生物信息学基础等,否则容易造成鉴定不准确甚至无法鉴定的现象,当出现序列分析无法鉴定或存在质疑时,需进行多种方法的交叉鉴定验证。

胶体金免疫层析技术是一种以胶体金为示踪标记物,基于抗原抗体反应的免疫标记技术^[9]。该方法用于沙门氏菌快速筛查,便捷简单,成本低,不需要特殊设备就能得到肉眼可见的结果,很适合基层、中小企业及医院的使用。缺点是假阳性率较高,灵敏度差。

还有基于表面等离子共振、傅里叶变换红外光谱、表面增强拉曼散射等几种使用光学原理进行信号检测来鉴定及分型沙门氏菌的方法也屡有报道^[10]。这种光学信号传感器检测手段多,选择性好,但构成的光学识别元件稳定性较差,未来提高传感器的使用寿命是研发的重要方向之一。

沙门氏菌快速鉴定的方法很多,这些方法在一定程度上缩短了检测时间,提高了检测效率,甚至能够检测多种血清型,但同时也存在各种不足,大部分方法还停留在科研阶段,需用到专属

仪器,希望随着科技的进步及设备的普及能尽早应用到日常检测中。

笔者认为,以国标、药典收录的传统方法为基础,加入简便快捷的其他方法作为辅助,可以确保结果的准确性和快速性。将免疫学、分子生物学、色谱-质谱-光谱学等学科和传统方法相结合,开拓致病菌检测新思路,追求更好的特异性、更高的灵敏度、更简单高效是今后微生物检测的发展方向。

REFERENCES

- [1] 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(1): 38.
- [2] 陈丽芬. 不同增菌液和不同增菌时间对食品中沙门氏菌分离生长的影响[J]. 医学动物防制, 2016, 32(8): 939-941.
- [3] ZHOU Y, WAN Q, CAI Z H, et al. Rapid detection of *Salmonella* in raw milk by visual and real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification-based methods[J/OL]. Microbiol China(微生物学通报), 2020, 47(11): 3741-3755.
- [4] GUO Y, LIU C H, BU Y Q, et al. Rapid detection of *Salmonella* in soil by recombinase aided amplification method[J/OL]. Microbiol China(微生物学通报): 1-10[2020-09-02]. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.200410>.
- [5] CHENG Y Y, LIU X L, LIU Y, et al. Application of recombinant polymerase amplification in *Salmonella* detection[J]. J Food Safe Qual(食品安全质量检测学报), 2020, 11(11): 3422-3427.
- [6] ZHENG Z B, ZHENG W, WANG H, et al. Serotype determination of *Salmonella* by xTAG assay[J]. J Microbiol Methods, 2017(141): 101-107.
- [7] ZHANG G L, SU Y K, SHEN H Y, et al. Application of 16S rRNA/ITS sequencing and analysis in the identification, classification of microbial and drug quality control[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(10): 1489-1495.
- [8] SHI Y, ZHAO H X, LIU C Z, et al. Study on microorganism rapid detection technology and risk assessment of Chinese herbal medicines[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(4): 461-465.
- [9] XIA S Q, XU C L, LIU D F, et al. Preparation and optimization of colloidal gold strip for simultaneously detecting five typical *Salmonella* in foods[J]. Food Sci(食品科学), 2014, 35(22): 154-158.
- [10] 梁德媚, 张艳芳, 曾于洋, 等. 沙门氏杆菌快速检测方法研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019(9): 48-52.

收稿日期: 2019-11-27

(本文责编: 曹粤锋)