

能力验证样品中沙门氏菌的分离与鉴定

王志伟,徐琼,陈欣钦,曲勤凤

(上海市质量监督检验技术研究院,上海 200233)

摘要: 通过参加能力验证,提高检测技能,验证实验室的检测能力。依据 GB4789.4-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》方法对代码为 A414 的样品进行沙门氏菌的检测鉴定。按照标准操作,使用 TTB 和 SC 两种增菌液,BS、XLD 和沙门显色平板结合使用,通过 API20E、VITEK 并结合血清学试验综合判定,从能力验证样品中准确鉴定出肠道沙门氏菌亚种 III a,即亚利桑那亚种,同时从样品中还检测出阴沟肠杆菌和奇异变形杆菌两种干扰菌。

关键词: 能力验证;沙门氏菌;分离;鉴定

Isolation and Identification of *Salmonella* in the Proficiency Testing Sample

WANG Zhi-wei, XU Qiong, CHEN Xin-qin, QU qin-feng

(Shanghai Institute Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

Abstract: To strengthen laboratory detection capability and validate the capability of microorganism detection by ability testing. Testing *Salmonella* to sample A414 according to national standard. Identification of *Salmonella* isolates must be operated according to standard, using TTB and SC two kinds of enrichment broth, BS, XLD and the chromogenic medium three kinds of selective tablets. Comprehensive determination of the API20E, VITEK identification and serological testing. *Salmonella* III a was accurately identified from the sample. At the same time, *Enterobacter cloacae* and *Proteus mirabilis* were identified from the same sample.

Key words: proficiency testing; *Salmonellae*; isolation; identification

沙门氏菌是重要的食源性致病菌,广泛分布于自然界,能使人 and 动物致病,污染食品。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]。沙门菌病是公共卫生学上具有重要意义的人畜共患病之一,我国每年约有 3 亿人因沙门菌病感染而患病,占病原菌食源性疾病总数的 70%~80%。引起沙门氏菌食物中毒最常见的是鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌,同时也可见于其他血清型的沙门氏菌^[2]。沙门氏菌属被分为两个种,即肠道沙门氏菌和邦戈尔沙门氏菌。肠道沙门氏菌中又包含 6 个亚种,分别是肠道亚种、萨拉姆亚种、亚利桑那亚种、双相亚利桑那亚种、浩敦亚种和因迪卡亚种,依次分别简称为亚种 I、II、III a、III b、IV 和 VI^[3]。目前沙门氏菌检测的快速方法有很多,但在临床治疗和流行病学调查中,传统分离方法依然是主要方法^[4]。传统的检

测方法包括前增菌和选择性增菌培养、选择和鉴别性平板的分离培养、生化试验及血清学鉴定等步骤,虽然过程较为繁琐,但结果更为准确可靠。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

编号为 PT Sample A(A414)的样品:由辽宁出入境检验检疫局检验检疫技术中心提供,采用西林瓶真空密闭包装;沙门氏菌标准菌株 ATCC14028:由上海市质量监督检验技术研究院食化所生物安全实验室提供;缓冲蛋白胨水、亚硒酸盐胱氨酸增菌液 SC、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 XLD、四硫磺酸钠煌绿增菌液 TTB:美国 OXOID 公司;沙门显色琼脂:法国科马嘉公司;亚硫酸铋 BS、三糖铁琼脂、尿素酶琼脂、赖氨酸脱羧酶琼脂、蛋白胨水培养基、营养肉汤:北京陆桥技术有限公司;API 20E 试剂条、VITEK 试验卡:法国梅里埃生物技术有限公司;沙门氏菌诊断血清:丹麦 SSI 公司。

作者简介:王志伟(1980—),男(汉),工程师,硕士研究生,研究方向:食品中致病菌检测。

1.2 仪器与设备

生物安全柜:美国 LABCONCO 公司;GI-6 恒温培养箱:美国 SHELLAB 公司;VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统:法国梅里埃生物技术有限公司。

1.3 检测方法

1.3.1 增菌与分离培养

试验前将样品用 25 mL 灭菌的缓冲蛋白胨水进行再水化,并振摇充分混匀,此混悬液即为检测样品。全部的样品混悬液作为一个整体样品,按照 GB 4789.4-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》对样品进行检测^[9]。

将样品复原液加入装有 225 mL BPW 的无菌瓶中,充分振荡混匀,放入(36±1)℃培养箱中培养 18 h。轻轻摇动培养过的样品混合物,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。用接种环取 TTB 和 SC 增菌液各 1 环,分别划线接种于 BS、XLD 琼脂平板和沙门显色平板,其中 BS 琼脂平板于(36±1)℃培养 48 h,XLD 琼脂平板和沙门显色平板于(36±1)℃培养 24 h。培养结束后观察各平板上有无典型或可疑沙门氏菌属的菌落。

1.3.2 生化试验

自选择性琼脂平板上挑取不同形态特征的典型和可疑菌落,分别接种三糖铁琼脂、尿素琼脂、赖氨酸脱羧酶试验培养基和营养琼脂平板,于(36±1)℃培养 24 h。利用 API 20E 生化试验鉴定盒和 VITEK 2 Compact 全自动微生物生化鉴定系统对纯化后的菌落进行鉴定。

1.3.3 血清学鉴定

将生化试验结果符合沙门氏菌属特性的菌株做血清学凝集试验。取单个可疑沙门氏菌纯培养菌落接种于营养琼脂培养基和诱导琼脂培养基上,于(36±1)℃培养 24 h,取培养物作为玻片凝集用的抗原,分别进行 O 抗原和 H 抗原凝集试验。

1.4 结果与分析

1.4.1 分离培养

菌落形态描述见表 1。将 BS 平板上分离出的黑色有金属光泽的菌落标记为 1-1;在 XLD 平板上分离出的粉红色带黑色中心菌落标记为 1-2,黄色菌落标记为 1-3,淡粉色带黑色中心菌落标记为 1-4;在科马嘉显色平板上的蓝色菌落标记为 1-5。

1.4.2 生化试验

初步生化结果见表 2。

表 1 分离株菌落形态

Table 1 Isolates colony form

选择性平板	能力验证样品 A414	标准菌株
BS 平板	黑色有金属光泽的菌落,周围培养基变黑;黄绿色菌落;棕褐色菌落	黑色有金属光泽的菌落,周围培养基变黑
XLD 平板	粉红色带黑色中心的菌落;淡粉色带黑色中心菌落;黄色菌落	粉红色带黑色中心的菌落
显色平板	蓝色菌落	紫红色菌落

表 2 分离株初步生化反应结果

Table 2 Separation plant biochemical reaction results

菌株编号	三糖铁				尿素	赖氨酸
	斜面	底层	产气	硫化氢		
1-1	红	黑	+	+	黄	紫
1-2	红	黑	+	+	黄	紫
1-3	红	黄	+	-	黄	黄
1-4	红	黑	+	+	红	黄
1-5	红	黑	+	+	黄	紫

注: +表示阳性; -表示阴性。

同时将不同平板上分离得到的可疑菌落接种至营养琼脂平板进行纯培养,做 API 20E 生化试验和 VITEK 2 鉴定,结果见表 3。

表 3 分离株 API 20E 和 VITEK 生化试验结果

Table 3 Separation plant API20E and VITEK2 reaction results

菌株编号	ID/%	T 值	菌株名称
1-1	99.9	0.91	亚利桑那沙门氏菌
1-2	99.9	0.91	亚利桑那沙门氏菌
1-3	99.5	0.86	阴沟肠杆菌
1-4	99.9	0.89	奇异变形杆菌
1-5	99.9	0.91	亚利桑那沙门氏菌

根据 API20E 生化试验和 VITEK 2 鉴定结果可以看出:1-1、1-2、1-5 为同一株菌,API LAB 软件分析结果均为亚利桑那沙门氏菌 (*Salmonella arizonae*);1-3 为阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*);1-4 为奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)。

1.4.3 血清学试验

取可疑菌株和阳性对照纯培养物、生理盐水溶液(阴性对照),用沙门氏菌诊断血清做玻片凝集试验。菌株 1-1、1-2、1-5 均凝集,血清型为 *Salmonella* III a 51:Z₄,Z₂₃:-,即肠道沙门氏菌亚种 III a,亚利桑那亚种。

2 结论

从能力验证样品中检出肠道沙门氏菌亚种 III a,即亚利桑那沙门氏菌,同时检出阴沟肠杆菌和奇异变形杆菌两种干扰菌。亚利桑那菌为沙门氏菌属(第 III

属),最早是 Caldwell 和 Ryerson 于 1939 年在冷血动物中发现的^[6],与沙门氏菌在生化和抗原上有一定相似性,但又有较大的差异。广泛存在于禽类、哺乳动物、爬虫类和环境中,并可感染人类,引起人的肠胃炎和食物中毒^[7]。由于沙门氏菌属的微生物种类繁多,现在已知的沙门氏菌属就有 2 500 多种血清型^[8]。因此沙门氏菌的检测在食品微生物检测中对检测人员的操作水平和经验有较高的要求。

在选择性增菌时,必须同时使用两种增菌液,因为沙门氏菌属菌型繁多,一种增菌液不可能适合所有的沙门氏菌生长。其中 TTB 适合大部分沙门氏菌增菌,最适增菌温度为 42℃,而 SC 更适合伤寒沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌增菌,最适增菌温度为 36℃。相比来讲,TTB 的选择性比 SC 强,而 SC 的增菌范围要比 TTB 广。两种增菌液同时使用,以达到防止漏检情况的发生。在本次能力验证过程中也发现,从 SC 增菌液中分离出的菌落形态要多于从 TTB 中所分离出的。

在接种选择性平板时,必须同时使用两种及以上分离平板。本次能力验证使用了 BS 琼脂平板、XLD 琼脂平板和科玛嘉显色平板。典型和可疑菌落的挑取和鉴定必须结合 3 种平板综合分析,不能从单一平板上的菌落形态下结论。例如虽然大部分沙门氏菌在显色平板上为紫红色形态,但是亚利桑那沙门氏菌在显色平板上却是显蓝色的。这是因为多数沙门氏菌的 β -半乳糖苷酶为阴性,而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。而且,在实际的检测工作中,样品中往往存在许多干扰菌,尤其在能力验证样品中也往往会添加与目标菌形态或生化相近的菌株。特别是奇异变形杆菌、弗氏柠檬酸杆菌等在 XLD 琼脂平板上亦能形成中心黑色、边缘光滑整齐的菌落,与沙门氏菌容易混淆^[9]。在本次实验过程中发现,除了奇异变形杆菌,样品中还掺杂了一定量的阴沟肠杆菌,分离株形态多样,使得在选择性平板上可能出现假阳性的情况。若条件允许,可以选择不同选择性平板进行筛选分离并尽可能多的挑取可疑菌落进行后续试验,结合生化试验来分析判断。

在沙门氏菌检测过程中,必须将血清学试验结果

与生化试验结果相结合来判定。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。值得注意的是由于亚利桑那沙门氏菌通常迟缓发酵乳糖、且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,应引起临床及实验室的重视^[10]。沙门菌的 O 抗原和 H 抗原种类多而复杂,且常常存在交叉凝集,因此在鉴定其血清型时极易出错。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,同时应做特殊生化反应,包括阿拉伯糖、卫茅醇、鼠李糖、肌醇、木糖、甘油品红、丙二酸盐等,同时参考《沙门菌属诊断抗原表》中各菌型生化反应特征,以确保鉴定的准确性。

参考文献:

- [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 Biology, 2009, 3(9):38
- [2] 赵月兰,秦建华.沙门氏菌对动物性食品的污染与检测[J].张家口农专学报,1995,11(4):40
- [3] Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, et al. *Salmonella* nomenclature [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(7):2465-2467
- [4] O'Leary J, Corcoran D, Lucey B. Comparison of the EntericBio Multiplex PCR System with Routine Culture for Detection of Bacterial Enteric Pathogens[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(6): 3449-3453
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB4789.4-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].北京:中国标准出版社,2010: 1-22
- [6] Mary E, Caldwell, Dwight L. Ryerson. *Salmonellosis in Certain Reptiles* [J]. The Journal of Infectious Diseases, 1939, 65(3):242-245
- [7] 彭易根,张正群.亚利桑那沙门氏菌食物中毒 72 例临床分析[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(4):571-572
- [8] Bopp C A, Brenner F W, Fields P I, et al. *Escherichia, Shigella and Salmonella in manual of clinical microbiology* [M]. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2003:654-671
- [9] 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, 2005:141-142
- [10] 杨欢,陈龙庆,曹碧兰,等.艾滋病伴亚利桑那沙门氏菌败血症 1 例[J].中国皮肤性病杂志, 2013, 27(5):494-495

收稿日期:2015-08-27