

沙门氏菌比对试验的检验分析

陈冬娥, 陈冠武, 许如苏, 苏建晖, 林宁静

(汕头出入境检验检疫局 技术中心, 广东 汕头 515041)

摘要: 选择鼠伤寒沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌分别与检验中常见的 5 种其它肠杆菌属细菌组合成染菌虾仁模拟样品 10 组, 按照现行的检验标准 GB 4789.4-2010 进行沙门氏菌检验^[1]。10 组样品均能检出沙门氏菌和干扰菌, 检验结果准确。在检验过程中发现 BS 平板需要经过培养 48 h 才能观察到明显的菌落特征; 增菌液培养时间越长, 沙门氏菌的生长越好; 甲型副伤寒沙门氏菌有微弱产 H₂S 现象; 粘质沙雷氏菌对鼠伤寒沙门氏菌的硫化氢反应有抑制作用; 奇异变形杆菌和柠檬酸杆菌与沙门氏菌属 A-F 多价 O 诊断血清发生交叉凝集反应现象。培养过程中发现的检测技术问题, 在水产品、动物及动物产品的沙门氏菌等肠杆菌属的检验中, 都有很好的借鉴意义。

关键词: 沙门氏菌; 肠杆菌属细菌; 平板; H₂S; 血清学

中图分类号: TS 207 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)05—0556—04

Analysis of the Determination of Salmonella of Contrast Experiment Among Laboratories

CHEN Donge, CHEN Guanwu, XU Rusu, SU Jianhui, LIN Ningjing

(Center of Technology, Shantou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shantou 515041, China)

Abstract: Combining the standard bacteria of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella paratyphi* respectively with five other Enterobacter bacterium which are common in the usual determination to form into 10 groups of modal Bacteria-bearing Peeled Prawms, isolating and identifying them under the following present standards: GB 4789.4-2010, National food safety standard Food microbiological examination: *Staphylococcus aureus*. All the standard bacteria of Salmonella and the Enterobacter bacterium can be exactly detected from the 10 groups of test samples. The experiment shows that the characteristics of the colony on the BS would be more evident after culturing for 48h. And the longer the enriched culture cultures, the better the Salmonella grows. *Salmonella paratyphi* produces a little of H₂S. *Serratia marcescens* inhibits the H₂S-reaction of *Salmonella paratyphi*. Anti-O polyvalent serum of A-F of Salmonella can agglutinates *Proteus mirabilis* and *Citrobacter* spp. The determination techniques found in the test would be applied well in the determination of Salmonella for the aquatic products, animals and animal products.

Keywords: salmonella, *Enterobacter bacterium*, plate, H₂S, serology

收稿日期: 2014-09-17

作者简介: 陈冬娥(1984—), 女, 助理工程师, 主要从事出入境食品微生物检验及动物疫病检疫方面的研究。

E-mail: 819522338@qq.com

沙门氏菌是肠杆菌科中一类很重要的肠道致病菌,能引起人类患病,如伤寒、败血症、急性肠胃炎、骨髓炎、胆囊炎、关节炎等疾患,且大多数菌同时是动物、禽类的病原菌,可引起鼠伤寒、鸡白痢、马、羊流产等急性传染病,对人、畜危害极大^[2]。在世界各地的食物中毒中,沙门氏菌食物中毒占首位或第二位^[3]。国内外的各类食品卫生标准中均要求沙门氏菌不得检出^[4]。沙门氏菌的检测在食品安全检测中具有重要的意义。

沙门氏菌属菌型繁多,抗原复杂,目前从世界各地检出的沙门氏菌菌型近两千个(包括亚利桑那菌在内)^[2]。在水产品、动物及动物产品沙门氏菌的检验中,肠杆菌科的其它菌属细菌也常被检出,如奇异变形杆菌、粘质沙雷氏菌等,这些干扰菌的存在,影响了检验人员的判断。作者所在实验室近期在粤东地区组织实施了“水产品中沙门氏菌的检验”的实验室间比对试验活动。在活动组织的试验阶段,作者通过选用不同的沙门氏菌菌株和具有典型干扰性的其它肠杆菌属菌株分别进行组合培养,通过研究总结出在沙门氏菌实际检测中应注意的问题,对于提高日常检测技术尤其是水产品、动物及动物产品中沙门氏菌的检验有很好的借鉴意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标准菌株或阳性菌株 甲型副伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌:购自中国微生物菌种保藏管理中心;奇异变形杆菌、杨氏柠檬酸杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、粘质沙雷氏菌、温和气单胞菌:来自水产品沙门氏菌检验实验中分离保留的菌种。

1.1.2 样品 虾仁

1.1.3 主要培养基及试剂 缓冲蛋白胨水(BPW)、四硫磺酸钠煌绿增菌液(TTB)、亚硫酸盐胱氨酸增菌液(SC)、亚硫酸铋(BS)、HE琼脂(HE)、XLD琼脂(XLD)、三糖铁琼脂(TSI)、营养琼脂(NA):北京陆桥技术有限责任公司;沙门氏菌显色培养基(CAS):法国科马嘉公司;API20E生化试剂鉴定盒:梅里埃诊断产品(上海)有限公司;沙门氏菌属A-F多价O诊断血清:宁波天润生物药业有限公司。所有培养基和试剂均在有效期内使用并通过有效性验证。

1.2 方法

1.2.1 模拟样品制备 虾仁经 1×10^5 Pa灭菌30

min处理,60℃、30 min烘干备用。将甲型副伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、奇异变形杆菌、杨氏柠檬酸杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、粘质沙雷氏菌、温和气单胞菌等7种菌株划NA平板36℃培养24 h,挑取菌苔制成0.5麦氏单位菌液,取1 mL进行1万倍稀释,制成含菌量约为1 000 CFU/mL的菌液,分别均匀滴加到虾仁上,混合制成染菌样品,虾仁染菌量为10 CFU/g。将两种沙门氏菌阳性菌染菌样品各取20 g,奇异变形杆菌等5种干扰菌染菌样品各取5 g,分别组合,混合均匀,制成10种组合模拟样品。模拟样品经-18℃冷冻成干冻虾仁。

1.2.2 模拟样品的检验 按GB 4789.4-2010《食品微生物学检验 沙门氏菌检验》对10组样品进行增菌培养,将分离出来的沙门氏菌及干扰菌进行分离纯化、生化试验及血清学检验等。在增菌液培养的不同阶段对沙门氏菌及干扰菌分别划线接种HE、XLD、BS、CAS平板,以观察增菌液培养时间长短对沙门氏菌等菌株生长情况的影响。

2 结果与讨论

2.1 模拟样品检验结果

10组样品均能检出沙门氏菌和干扰菌,检验结果准确。沙门氏菌及干扰菌的菌落特征、TSI培养情况及血清学鉴定结果见表1。

2.2 沙门氏菌和干扰菌平板生长情况

沙门氏菌在HE、XLD、CAS等3种平板培养24 h后生长旺盛,菌落特征明显,而在BS平板上生长较慢,菌落较小,在48 h后才能观察到明显的菌落特征,但生长的菌量没有其他选择性平板多,使用效果较差。

甲型副伤寒沙门氏菌培养48 h后,有产 H_2S 现象。鼠伤寒沙门氏菌在粘质沙雷氏菌的影响下在XLD平板上无产 H_2S 现象,挑取该菌继续划XLD平板培养,生长的菌落为粉红色中心带黑色,产 H_2S 。说明粘质沙雷氏菌对鼠伤寒沙门氏菌的硫化氢反应有抑制作用。

2.3 增菌液培养时间对沙门氏菌的影响

BPW增菌液培养后直接划选择性平板,发现粘质沙雷氏菌、杨氏柠檬酸杆菌在平板上生长旺盛,抑制了沙门氏菌的生长。根据检验标准^[1],BPW增菌液培养时间为8~18 h,在BPW增菌液培养8 h后发现,沙门氏菌与温和气单胞菌、杨氏柠檬酸杆菌

表 1 沙门氏菌及干扰菌培养 24 h 后的菌落特征、TSI 培养情况及血清学鉴定结果

Table 1 Characteristics of the colony of Salmonella and interferential strains after culturing for 24 h, the findings of culturing TSI and the results of identifying Salmonella

菌种	HE	XLD	BS	CAS	TSI				O 多价血清凝集
					斜面	底层	产气	H ₂ S	
甲型副伤寒沙门氏菌	绿色, 中心深绿色	粉红色, 平板色变深	灰绿色	紫红色	K	A	+	-	凝集
鼠伤寒沙门氏菌	绿色带有黑色中心	粉红色带黑色中心	黑色有金属光泽, 菌落周围培养基变黑	紫红色	K	A	+	+	凝集
奇异变杆菌	绿色带黑色中心, 菌落边缘颜色较浅	粉红色, 菌落边缘颜色较浅	灰色	白色	K	A	+	+	凝集
杨氏柠檬酸杆菌	绿色带有黑色中心	黄色, 板变黄	白色	米白色半透明	K	A	+	+	凝集
弗氏柠檬酸杆菌	橙黄色, 板变黄	黄色, 板变黄	深灰色	蓝色	A	A	+	+	不凝集
粘质沙雷氏菌	橙红色, 板变黄	橙红色, 板变黄	白色	红色	A	A	+	-	不凝集
温和气单胞菌	橙色, 板变黄	黄色, 板变黄	浅绿色	紫红色	K	A	+	-	不凝集

注: K: 产碱, A: 产酸, +: 阳性, -: 阴性

在 42 ℃ 生长良好, 而在 36 ℃ 均不生长; 而在 BPW 增菌液培养 18 h 后, 沙门氏菌和这两种干扰菌在不同温度均生长良好。说明在日常检验中, 增菌液培养时间越长, 沙门氏菌的生长越好。

2.4 血清学鉴定结果

2 种沙门氏菌和 5 种干扰菌的血清学鉴定结果见表 1。本次试验中, 甲型副伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、奇异变杆菌和杨氏柠檬酸杆菌均与沙门氏菌属 A-F 多价 O 诊断血清发生凝集, 弗氏柠檬酸杆菌、粘质沙雷氏菌、温和气单胞菌不发生凝集, 生理盐水对照均不自凝。

3 结 语

第一, 在用选择性平板进行分离培养时, 应同时采用两种以上平板, 建议采用沙门显色平板。在观察到可疑菌落时, 应选取多种形态的可疑菌落再次划选择性平板(最好是沙门显色平板), 初筛可疑菌的同时又分纯菌株, 一举多得。如杨氏柠檬酸杆菌、奇异变形杆菌在 HE 平板、XLD 平板上的菌落特征与沙门氏菌一致, 但在其他平板上的菌落特征与沙门氏菌有明显区别。显色平板使用准确率高, 但不能完全依赖显色平板, 如温和气单胞菌在显色平板上显紫色菌落, 与沙门氏菌一致。因此, 在检验沙门氏菌时不能以单个平板的菌落特征来判定沙门氏菌, 应结合多个平板的菌落特征来判定, 可以累积经验, 减少误判, 提高检出率。

第二, 在增菌液、平板等培养过程中, 应注意持续观察, 必要时可延长培养时间, 减少误判。通过对增菌液培养的不同阶段划平板, 发现增菌液培养时间越长, 沙门氏菌的生长越好; 而培养时间越短, 干扰菌的生长比沙门氏菌旺盛, 沙门氏菌的生长受到抑制。BS 平板需要经过培养 48 h 才能观察到明显的菌落特征。甲型副伤寒沙门氏菌在培养 24 h 后观察不到产 H₂S 现象, 而在培养 48 h 后, 能观察到明显的产 H₂S 现象。这与相关文献的介绍一致, 大多数培养物对所列培养基在培育 1 d 或 2 d 后, 通常在 24 h 内得到阳性反应。有极少例外, 迟缓反应在 3~7 d 内出现。甲型副伤寒沙门氏菌产生 H₂S 是微弱的^[5]。粘质沙雷氏菌在 TSI 斜面上培养 48 h 后, TSI 斜面会由黄色变回红色, 这是因为粘质沙雷氏菌会产生红色素^[9]。因此及时观察掌握细菌的培养特征是特别重要的。

第三, 在沙门氏菌检验中不能以产 H₂S 作为判定沙门氏菌的惟一依据。在碱性条件下, 硫代硫酸钠及柠檬酸铁铵与沙门氏菌产生的 H₂S 反应使得菌落的颜色呈黑色, 但在酸性条件下这种反应被抑制^[6]。而粘质沙雷氏菌能利用蔗糖大量产酸, 使 HE、XLD 平板变黄, 因此, 鼠伤寒沙门氏菌与粘质沙雷氏菌在 XLD 上共同培养, 会因为粘质沙雷氏菌大量产酸而使培养基呈酸性条件, H₂S 反应被抑制。同理, H₂S 反应也可因其它干扰菌产酸而被抑制。粘质沙雷氏菌在水产品、动物及动物产品的沙门氏菌检

验中经常被检出,更应提高警惕。

第四,诊断血清主要用于分型,准确的沙门氏菌鉴定应以生化试验辅以血清学试验。奇异变形杆菌、柠檬酸杆菌的 A-F 沙门氏菌属诊断 O 多价血清试验结果均为阳性,为交叉凝集,其生化鉴定结果与沙门氏菌属不符合,结合平板菌落特征及 TSI 的培养情况,判定这两种菌均非沙门氏菌。肠杆菌科细菌是常见的微生物,其属、种较多,该科有 30 个

属 115 个种,抗原构造复杂,其不同属、种间细菌抗原有部分相同,甚至少数种完全相同,因此细菌与诊断血清间交叉凝集反应现象甚为普遍^[7]。曾有文献报道过沙门菌诊断血清与奇异变形杆菌、柠檬酸杆菌呈交叉凝集反应^[8-9]。柠檬酸杆菌与沙门氏菌诊断血清的交叉反应表明,它一方面与柠檬酸细菌属有关,另一方面与沙门氏菌属、亚利桑那菌属和埃希氏菌属有关^[10]。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部. 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[S]. 北京:中国标准出版社, 2010:1-4.
- [2] 杨正时,房海. 人及动物病原细菌学[M]. 石家庄:河北科学技术出版社,2003:497-502.
- [3] 苏世彦. 食品微生物检验手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998:107.
- [4] 吕志平. 国内外技术法规和标准中食品微生物限量[M]. 北京:中国标准出版社,2002:1-371.
- [5] 刘云国. 食品卫生微生物学标准鉴定图谱[M]. 北京:科学出版社,2008:26.
- [6] 王岚,贾华云,张林清,等. 能与沙门菌及 O157 诊断血清交叉凝集的细菌分离与鉴定[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(8): 1966-1968.
WANG Lan, JIA Huayun, ZHANG Linqing, et al. Isolation and identification of the bacteria interacted agglutination with Salmonella and *Escherichia coli* O157 [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2011, 21 (8): 1966-1968. (in Chinese)
- [7] 张元玲,钟小东,王顺东,等. 三株与沙门菌有共同抗原的奇异变形杆菌的检出与分析[J]. 中国卫生检验杂志,2003,13(6): 788-789.
ZHANG Yuanling, ZHONG Xiaodong, WANG Shundong, et al. Detection and analysis of three strains of *Proteus mirabilis* has the common antigen with Salmonella [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2003, 13 (6): 788-789. (in Chinese)
- [8] 周旭,吴晓励,娄美秀,等. 两株与沙门 B 群及 F 群诊断血清交叉凝集的弗劳地枸橼酸杆菌[J]. 中国卫生检验杂志,2001,11 (2):207.
ZHOU Xu, WU Xiaoli, LOU Meixiu, et al. Two strains of *Citrobacter freundii* Cross-agglutination with Salmonella group B and Salmonella group F[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2001, 11(2): 207. (in Chinese)
- [9] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯,等. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第八版,北京:科学出版社,1984:391.