

# 3种微量试剂对沙门氏菌及近源菌的生化鉴定结果比较

杨绪伟<sup>1</sup>, 卢勉飞<sup>1</sup>, 孟宇<sup>2</sup>, 蔡芷荷<sup>1,3,4</sup>, 吴清平<sup>3\*</sup>, 李泽康<sup>1</sup>

(1. 广东环凯微生物科技有限公司, 广东广州 510663) (2. 佛山市食品药品检验检测中心, 广东佛山 528031)

(3. 广东省微生物研究所, 广东广州 510070) (4. 广东环凯生物科技有限公司, 广东肇庆 526238)

**摘要:** 评价本实验室研制的沙门氏菌微量生化鉴定试剂盒(简称 EasyID)的使用性能。用 49 株菌(包括沙门氏菌 12 株标准株, 16 株分离株; 志贺氏菌 8 株标准株; 柠檬酸杆菌 1 株标准菌和 8 株分离株; 变形杆菌 1 株标准株和 2 株分离株; 产气肠杆菌 1 株标准株), 测试 EasyID, 传统液态生化管(简称 HKM)以及国内其他品牌(简称 GSA 和 GSB)的四种鉴定试剂盒。结果表明: 49 株测试菌株的鉴定结果, EasyID、GSA 和 GSB 三种试剂与 HKM 传统液态鉴定试剂盒鉴定结果相比总体符合率分别为 100%、94.46%、95.10%, EasyID 相比 GSA 和 GSB, 与 HKM 的符合率更高; EasyID、HKM、GSA 和 GSB 四种鉴定试剂盒与伯杰氏手册相比总体符合率分别为 97.96%、97.96%、93.00%、94.70%, EasyID 和 HKM 符合率最高, 其次为 GSB, GSA 稍低。结论: EasyID 沙门氏菌微量生化鉴定试剂盒在可靠性上与传统生化管完全一致, 在使用方便性上, 采用一步加样技术的 EasyID 优于 HKM、GSA 和 GSB。

**关键词:** 沙门氏菌; 生化鉴定; 微量化

文章编号: 1673-9078(2023)03-87-92

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0468

## Comparison of Biochemical Identification Results of Three Identification

### Kits for *Salmonella* and Related Bacteria

YANG Xuwei<sup>1</sup>, LU Mianfei<sup>1</sup>, MENG Yu<sup>2</sup>, CAI Zhihe<sup>1,3,4</sup>, WU Qingping<sup>3\*</sup>, LI Zekang<sup>1</sup>

(1. Guangdong Huankai Microbial Sci & Tech. Co. Ltd., Guangzhou 510663, China) (2. Foshan Center for Food and Drug

Control, Foshan 528031, China) (3. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

(4. Guangdong Huankai Biologic Sci & Tech. Co. Ltd., Zhaoqing 526238, China)

**Abstract:** The biochemical identification kit for *Salmonella* (EasyID) developed in the laboratory was evaluated. A total of 49 bacterial strains (including 12 standard strains and 16 isolates of *Salmonella*, 8 standard strains of *Shigella*, 1 standard strain and 8 isolates of *Citrobacter*, 1 standard strain and 2 isolates of *Proteus*, and 1 standard strain of *Enterobacter aerogenes*) were used to test four *Salmonella* identification kits: EasyID, traditional liquid biochemical tube (HKM), and other domestic brands (GSA and GSB). For the 49 tested strains, the identification results of three kits (EasyID, GSA and GSB) were compared with those of the HKM traditional liquid identification kit, and the overall coincidence rates were 100%, 94.46%, and 95.10% respectively. Compared with GSA and GSB, EasyID had a higher coincidence rate with HKM. Compared with the Bergey's manual, the four identification kits EasyID, HKM, GSA, and GSB yielded overall coincidence rates of 97.96%, 97.96%, 93.00%, and 94.70%, respectively. EasyID and HKM had the highest coincidence rate, followed by GSB, whereas the coincidence rate of GSA was slightly lower. Conclusion: The reliability of the EasyID *Salmonella* identification kit was consistent with that of traditional biochemical tubes. Furthermore, EasyID, which uses a one-step sampling technology, was easier to use than HKM, GSA, and GSB.

引文格式:

杨绪伟, 卢勉飞, 孟宇, 等. 3种微量试剂对沙门氏菌及近源菌的生化鉴定结果比较[J]. 现代食品科技, 2023, 39(3): 87-92.

YANG Xuwei, LU Mianfei, MENG Yu, et al. Comparison of biochemical identification results of three identification kits for *Salmonella* and related bacteria [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 87-92.

收稿日期: 2022-04-17

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1604201); 肇庆市引进西江创新团队项目(肇人才领 2018-8)

作者简介: 杨绪伟(1987-), 男, 本科, 助理工程师, 研究方向: 食品微生物检测产品研究, E-mail: 1372646149@qq.com

通讯作者: 吴清平(1962-), 男, 博士, 研究员, 中国工程院院士, 研究方向: 食品安全监测与控制, E-mail: wuqp203@163.com

**Key words:** *Salmonella*; biochemical identification; microquantization

沙门氏菌 (*Salmonella*.) 广泛存在于自然界中, 能很容易从各种来源中分离到。一个多世纪以来, 沙门氏菌引发了人类食源性疾病并造成了高昂的医疗和经济成本<sup>[1]</sup>。沙门氏菌已被公认为人类和动物的主要和重要的食源性病原体<sup>[2]</sup>。近年来的研究表明即使摄入非常低剂量的沙门氏菌也会造成很严重的食物中毒, 因此对于消费者来说不存在所谓的安全水平<sup>[2]</sup>。我国 GB 29921-2021《食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量》<sup>[3]</sup>要求沙门氏菌不得检出。沙门氏菌属和大肠埃希氏菌、柠檬酸杆菌、克罗诺杆菌、阴沟肠杆菌、哈夫尼亚菌、克雷伯氏菌、摩根氏菌、泛菌、变形杆菌、耶尔森氏菌同属肠杆菌科。沙门氏菌是革兰氏阴性棒状杆菌, 在有氧和无氧条件下都能生长, 有动力, 可以在液体中移动, 食品中的沙门氏菌大多为肠亚种, 在这个亚种中约有 2 500 多个血清型。鉴于沙门氏菌的特性, 其检测流程较长, 所以一些研究通过运用分子生物学的检测方法, 如 PCR 法、LAMP 法、免疫法和实时荧光 RPA 法等, 快速筛选和传统培养分离相结合来进行检测该菌。国标 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>[4]</sup>中规定了食品中沙门氏菌培养、分离、鉴定方法, 目前沙门氏菌的检测还是以常规分离鉴定技术为主, 生化鉴定是沙门氏菌检测的金标准。基于传统生化鉴定原理开发的沙门氏菌商品化检验产品, 还有 API 20E 和 VITEK 鉴定系统等, 集成了更全面的生化反应, 较传统生化试剂应用更为便捷, 但各种方法都存在一定的利弊。

由于目前传统的生化鉴定管均为液体状态, 存在运输不方便、稳定性差导致保质期短的问题, 且西林瓶铝盖难开, 特别是当实验非常多的情况下, 给检验人员带来了很大的工作量。为了更好地对沙门氏菌进行鉴定, 减轻检验人员的工作量, 本实验室依据 GB 4789.4-2016<sup>[4]</sup>, 以传统生化鉴定为基准, 将传统液体鉴定试剂进行微量化和干燥化处理, 研制出干燥态的、方便使用的沙门氏菌生化鉴定试剂盒。为评价本研究成果干燥态的鉴定试剂盒的鉴定效果, 特与传统液态生化鉴定试剂盒和国内同类产品进行了比对。按照 GB 4789.4-2016<sup>[4]</sup>方法, 对在选择性平板上分离的可疑菌落进行三糖铁初筛后, 剩下的可疑菌主要包含沙门氏菌、志贺氏菌、变形杆菌、柠檬酸杆菌、肠杆菌等类群, 本文故选取了这几类菌进行实验。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

本实验室研制的沙门氏菌生化鉴定条 (以下简称 EasyID), 批号为 A0012T; 国内 A 公司沙门氏菌生化鉴定条 (以下简称 GSA), 批号为 180727; 国内 B 公司沙门氏菌生化鉴定条 (以下简称 GSB), 批号为 20180910; 广东环凯微生物科技有限公司生产的传统生化管 (以下简称 HKM), 批号为 5107481; 胰酪胨大豆琼脂培养基 (TSA), 批号为 1084731。

### 1.2 仪器与设备

BSC-1360-L II B2 生物安全柜, 北京东联哈尔仪器; HVE50 灭菌锅, 日本 HIRAYAMA; DNP-9162 电热恒温培养箱, 广东环凯微生物科技有限公司。

### 1.3 菌株

表 1 试验菌株类群统计

主要类群	标准株	分离株	小计
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	12	16	28
志贺氏菌 <i>Shigella</i>	8	0	8
柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter</i>	1	8	9
变形杆菌 <i>Proteus</i>	2	1	3
产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	1

菌株共使用 49 株试验株, 其中标准株 24 株, 分离株 25 株, 分离株来源于各类食品, 所有菌株均来源于广东省微生物研究所 (种群统计见表 1), 试验菌株具体编号如下:

沙门氏菌: 24 株标准株: 伤寒沙门氏菌 CMCC(B) 50071、CMCC(B) 50098, 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028、CMCC(B) 50115, 甲型副伤寒沙门氏菌 CMCC(B) 50093, 乙型副伤寒沙门氏菌 CMCC(B) 50004、CMCC(B) 50094, 肠炎沙门氏菌 CMCC(B) 50335、ATCC 13076, 汤卜逊沙门氏菌 CMCC(B) 50023, 猪霍乱沙门氏菌 CMCC(B) 50018, 亚利桑那沙门氏菌 CMCC(B) 47001, 痢疾志贺氏菌 CMCC(B) 51252、CMCC(B) 51137、CMCC(B) 51105、CMCC(B) 51056, 福氏志贺氏菌 CMCC(B) 51572, 宋内氏志贺氏菌 CMCC(B) 51592, 鲍氏志贺氏菌 ATCC 9207, 普通变形杆菌 CMCC(B) 49027, 奇异变形杆菌 CMCC(B)

49005, 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC 43864, 产气肠杆菌 ATCC 13048; 25 株分离株: 沙门氏菌 FSCC(I)215026、FSCC(I)215031、FSCC(I)215035、FSCC(I)215037、FSCC(I)215046、FSCC(I)215062、FSCC(I)215067、FSCC(I)215090、FSCC(I)215258、FSCC(I)215294、FSCC(I)215303、FSCC(I)215309、FSCC(I)215321、FSCC(I)215326、FSCC(I)215339、FSCC(I)215347, 布氏柠檬酸杆菌 FSCC(I) 215676、FSCC(I)21501164, 弗氏柠檬酸杆菌 FSCC(I)21501185, 无丙二酸柠檬酸杆菌 FSCC(I)215134、FSCC(I)215135、FSCC(I)215708、FSCC(I)215709、FSCC(I)215779, 普通变形杆菌 FSCC(I)215624。

## 1.4 方法

EasyID 使用定方法: 取鉴定条及悬浮培养基, 使用前平衡至室温; 从新鲜培养的 TSA 平板上挑取可疑单菌落接种于悬浮培养基中, 制成 0.5 麦氏浊度的均一菌悬液; 从底座上取下鉴定条, 并从鉴定条右侧向左掀开贴膜, 用微量移液器小心注入 2 mL 菌悬液于分液槽中, 贴回贴膜, 并依次抬起左右两侧数次, 使菌液液面达同一高度, 然后水平托起分液槽端, 确保菌液流入各反应孔中, 贴紧薄膜并放回底座。再次从右侧掀开贴膜, 向第 8、9、10 号孔中各滴加 3~4 滴无菌液体石蜡, 贴紧薄膜。吸取 50  $\mu$ L 菌悬液于氰化钾培养基及对照管中, 盖紧胶塞。将已接种的鉴定条放置 36  $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h; 培养完毕后, 按附件 1 记录 1~10 孔和氰化钾培养基及对照反应管生长情况结果; 向第 11 孔滴加 2 滴靛基质试剂, 立即观察并记录第 11 孔结果。

GSA、GSB 和 HKM 按照相关产品说明书进行操作。

## 2 结果与讨论

### 2.1 三种鉴定试剂盒与传统生化管的比较

用 EasyID、GSA 和 GSB 三种试剂盒与 HKM 对 36 株测试菌株进行鉴定, 鉴定结果见表 2, 代表性鉴定结果见图 1~图 3。EasyID 与传统生化管鉴定 28 株沙门氏菌, 其中 26 株硫化氢阳性、靛基质阴性、尿素阴性、氰化钾阴性、赖氨酸阳性符合沙门氏菌属的典型反应; 甲型副伤寒沙门氏菌 (CMCC(B) 50093) ONPG 阴性, 与上面沙门氏菌典型反应不同的是硫化氢阴性、赖氨酸阴性; 猪霍乱沙门氏菌 CMCC(B) 50018 ONPG 阴性, 与上面沙门氏菌典型反应不同的是

是硫化氢阴性、赖氨酸阳性, 符合 A3 沙门氏菌特征。8 株志贺氏菌: 硫化氢阴性, 靛基质多数为阴性 (除了痢疾志贺氏菌 CMCC(B) 51137), 尿素阴性, 氰化钾阴性, 赖氨酸阴性, ONPG 阳性或阴性, 在三糖铁试验和 A-F 多价血清验证下, 符合志贺氏菌特征; 9 株柠檬酸杆菌: 硫化氢阴性 (ATCC 43864 阳性)、靛基质阳性或阴性、尿素阴性、氰化钾阳性、赖氨酸阴性, 均判定为非沙门氏菌; 3 株变形杆菌: 尿素阳性、氰化钾阳性、赖氨酸阴性, 靛基质不定, 判为非沙门氏菌; 1 株肠杆菌硫化氢阴性、靛基质阴性、尿素阴性、氰化钾阳性、赖氨酸阳性、丙二酸盐阳性, 判为非沙门氏菌。EasyID 11 个反应与传统生化管的符合率为 100%; GSA、GSB 试剂中氰化钾反应与生化管的符合率很低 (71.43%), 故两种试剂中该反应的参考意义不大。三种试剂甘露醇、丙二酸盐、靛基质三个反应异常率均为 0, 且除氰化钾外的 10 个反应的符合率均  $\geq 90\%$ , 因此甘露醇等 10 个反应的数据较为可靠。因而 EasyID 整体可靠性最高。

本次试验选用传统生化管为参考标准, 一方面是基于所用三种条状试剂均是生化管升级到微量化和集约化的产品, 使比对结果更有针对性, 另一方面是参考同类文献<sup>[5,6]</sup>的一致选择。传统生化管是通用型鉴别培养基, 在各类系统鉴定的程序中, 需要补充开展的试验均使用生化管进行。

表 2 三种鉴定条试剂与传统生化管的一致性结果

Table 2 Consistency results of three identification reagents and traditional biochemical tubes

反应名或底物名	一致率/% <sup>a</sup>		
	EasyID	GSA	GSB
甘露醇	100	100	100
山梨醇	100	95.92	97.96
卫矛醇	100	-	93.88
水杨苷	100	-	97.96
ONPG	100	97.96	100
丙二酸盐	100	-	100
尿素	100	100	89.80
赖氨酸	100	95.92	100
硫化氢	100	-	-
靛基质	100	100	100
氰化钾	100	71.43	71.43
平均符合率	100	94.46	95.10

注: <sup>a</sup>基于 49 株菌株的生化反应结果; “-”表示无此反应。

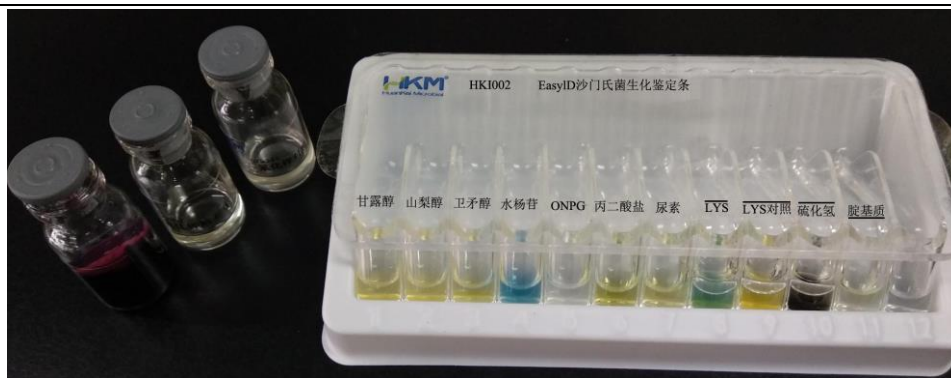


图 1 肠炎沙门氏菌 ATCC 13076

Fig.1 *S. enteritidis* ATCC 13076



图 2 伤寒沙门氏菌 CMCC(B) 50071

Fig.2 *S. typhi* CMCC(B) 50071



图 3 痢疾志贺氏菌 CMCC(B) 51056

Fig.3 *S. dysenteriae* CMCC(B) 51056

## 2.2 四种鉴定试剂盒和典型特征的比较

以伯杰氏手册的典型生化特征为标准<sup>[5]</sup>,对四种鉴定试剂盒各反应的结果进行判定,统计出49株测试菌株的符合率,结果如下表3。与典型特征相比,甘露醇、丙二酸盐、硫化氢和靛基质4项反应符合率均为100%,参与比对的试剂盒这4项反应效果相当;EasyID和HKM的山梨醇符合率均为100%,优于GSB(97.96%),GSA(95.92%)最差;EasyID和HKM的卫矛醇符合率均为95.92%,优于GSB(89.80%);EasyID和HKM的水杨苷符合率均为100%,优于GSB(95.92%);GSA的ONPG符合率为97.96%,优于HKM、EasyID和GSB,三者均为95.92%;GSB的尿素符合率为100%,优于HKM、EasyID和GSA,三者均为93.88%;HKM、EasyID和GSB三者的赖氨酸符合率均为100%,优于GSA(95.92%);EasyID和HKM的氰化钾符合率均为91.84%,优于GSA和GSB(67.35%)。EasyID、HKM、GSA和GSB四种鉴定试剂盒与标准要求相比总体符合率分别为97.96%、97.96%、93.00%和94.70%,EasyID和HKM总体平均符合率略高于GSB,其中GSA最差。

表3 四种鉴定试剂盒与典型特征的符合率

Table 3 Coincidence rate of four identification kits with typical characteristics

反应名或底物名	一致率/%			
	HKM	EasyID	GSA	GSB
甘露醇	100	100	100	100
山梨醇	100	100	95.92	97.96
卫矛醇	95.92	95.92	-	89.80
水杨苷	100	100	-	95.92
ONPG	95.92	95.92	97.96	95.92
丙二酸盐	100	100	-	100
尿素	93.88	93.88	93.88	100.00
赖氨酸	100	100	95.92	100
硫化氢	100	100	-	-
靛基质	100	100	100	100
氰化钾	91.84	91.84	67.35	67.35
平均符合率	97.96	97.96	93.00	94.70

总体来看,对于沙门氏菌来说,赖氨酸、硫化氢、氰化钾、靛基质、尿素等重要鉴别反应<sup>[6-9]</sup>,EasyID和GSA均与生化管完全一致,而GSB尿素有少数异常,这将直接影响到鉴别方向。三种鉴定条试剂对目标菌-沙门氏菌的鉴定准确率均接近100%,而对于非目标菌-志贺氏菌、变形杆菌、柠檬酸杆菌<sup>[10,11]</sup>来说,除氰化钾外,有少量反应个别菌株有异常数据。

本次鉴定试验中,对于非沙门氏菌,GSA和GSB两种氰化钾反应均得出大量假阴性结果,如果直接判定,则极有可能与主要呈氰化钾阴性反应的沙门氏菌相混淆,从而增加鉴别难度。氰化钾培养基含有特殊成分氰化钾,是Møller等<sup>[12]</sup>研制并改进的用于区别沙门氏菌和柠檬酸杆菌的关键培养基<sup>[13-15]</sup>。该培养基中氰化钾不稳定,极易分解,因而保质期短。GSA、GSB氰化钾培养基的抑菌谱与氰化钾仅有部分重叠,导致与伯杰氏手册等文献中非沙门类群的记录<sup>[5,16-19]</sup>难以对应。

## 3 结论

从反应数量角度比较,EasyID和GSB配置的反应数相对比较全面,而GSA配置的反应数量显然不足仅有9项,需要补充4项(卫矛醇、水杨苷、硫化氢和丙二酸盐)的生化管试验;从易用性角度比较,EasyID和GSA操作较简便,GSB需要在使用时无菌扎孔,孔上方的残留塑料膜会阻挡石蜡和靛基质试剂的进入,二次扎孔有污染风险;而EasyID上方覆盖有封口贴膜,可以防止在培养过程中液体过度蒸发,不需要额外加水维持湿度,接菌的时候轻轻撕开部分贴膜,把菌悬液一次加到鉴定条的分液槽里再贴回贴膜,左右抬起鉴定条的两端使液面达到同一高度,然后水平托起分液槽端,使菌悬液流入各个反应孔。这种采用一步加样的方法,减少了错加漏加的风险,同时提高了加样效率。在三种试剂易用性中EasyID体验最好。

本研究依据国家标准研制出了沙门氏菌微量干燥态生化鉴定试剂盒,使得沙门氏菌鉴定更快速化和简易化,在一个试剂条上集中了多个反应,一次性的完成了所有的生化试验,大大减轻了检验人员的工作量,以及减少了加工、储藏、运输过程中的人力物力,延长了鉴定试剂的保存期。

## 参考文献

- [1] Lee K M, Runyon M, Herrman T J, et al. Review of *Salmonella* detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety [J]. Food Control, 2015, 47: 264-276.
- [2] P R 默里, E J 巴伦, M A 法勒, 等. 临床微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 368-371.
- [3] GB 29921-2021, 食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量[S].
- [4] 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].
- [5] Brenner, Don J. Bergey's manual of systematic bacteriology:

- Volume 2: Part B, The Proteobacteria [M]. Springer Science & Business Media, 2006.
- [6] 王志伟.不同沙门氏菌及干扰菌的分离鉴定[J].食品研究与开发,2012,33(1):168-170.
- [7] 陈楷,林秀敏,尹玮璐,等.生鲜肉制品沙门氏菌分离鉴定过程中的干扰菌分析[J].食品安全质量检测学报,2017,4:1287-1292.
- [8] 王广和,张加美.必须重视赖氨酸、氰化钾等试验在鉴定沙门氏菌中的作用[J].微生物学通报,1991,18(1):54.
- [9] 朱晓庆,张小琴,谢兆阳,等.必须注意沙门氏菌鉴定中的假阳性问题[J].中国农业信息月刊,2012,4:199,284.
- [10] Poelma P L, Romero A, Andrews W H. Rapid identification of *Salmonella* and related foodborne bacteria by five biochemical multitest systems [J]. Journal of Food Science, 1977, 42(3): 677-680.
- [11] Ohara C M, Tenover F C, Miller J M. Parallel comparison of accuracy of API 20E, Vitek GNI, MicroScan Walk/Away Rapid ID, and Becton Dickinson Cobas Micro ID-E/NF for identification of members of the family Enterobacteriaceae and common gram-negative, non-glucose-fermenting bacilli [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1993, 31(12): 3165-3169.
- [12] Møller V. Diagnostic use of the Braun KCN test within the Enterobacteriaceae [J]. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 1954, 34(2): 115-126.
- [13] Kauffmann F, Møller V. On amino acid decarboxylases of *Salmonella* types and on the KCN test [J]. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 1955, 36(2): 173-178.
- [14] Edwards P, Fife M. Cyanide media in the differentiation of enteric bacteria [J]. Applied Microbiology, 1956, 4(1): 46-48.
- [15] Munson T E. Improved KCN medium [J]. Applied Microbiology, 1974, 27(1): 262-263.
- [16] 张河战,辜清吾.沙门氏菌的分类,命名及中国沙门氏菌菌型分布[J].微生物学免疫学进展,2002,30(2):74-76.
- [17] PR 爱德华,WH 爱文,郝士海.肠杆菌科的鉴定[M].乌鲁木齐:科技卫生出版社,1959.
- [18] Carpenter K, Lapage S, Steel K. Biochemical identification of Enterobacteriaceae [J]. Identification Methods for Microbiologists, 1966: 21-33.
- [19] Uh Y, Hwang G, Son J, et al. Evaluation of identification rate of Enterobacteriaceae by conventional biochemical tests [J]. Korean J Clin Pathol, 1998, 18(2): 161-167.