

研究报告

食品沙门氏菌现行国内外标准中选择性增菌和分离的
等效性评估刘玥^{1,2}, 刘夏³, 崔琳⁴, 陈敏¹, 刘弘¹, 顾其芳¹, 胡屹^{2,5}, 许学斌¹

(1. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336; 2. 复旦大学公共卫生学院, 上海 200032; 3. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 201708; 4. 上海市临床检验中心, 上海 200126; 5. 复旦大学公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032)

摘要:目的 评估5种现行国内与国际食品沙门氏菌标准中选择性增菌步骤的等效性。方法 按照GB4789.28—2013的方法使用沙门氏菌参比菌株验证5种沙门氏菌选择性增菌液亚硫酸盐胱氨酸增菌液(SC)、四硫磺酸钠煌绿增菌液(TTB)、罗伯特增菌液(RV)、穆勒-考夫曼四硫酸盐新生霉素增菌液(MKTTn)、亚硫酸盐煌绿增菌液(SBG)和5种选择性琼脂平板沙门氏菌显色琼脂平板(CAS)、木糖-赖氨酸-脱氧胆酸盐琼脂平板(XLD)、木糖赖氨酸十四烷基硫酸钠琼脂平板(XLT4)、亚硫酸铋琼脂平板(BS)和赫氏肠道菌琼脂平板(HE)的生长率(P_R)和特征性生长;按照ISO 16140—2:2016和传统统计学方法设计路径,经高污染样品检测比较5种选择性增菌液和2种选择性琼脂平板的组合方法的敏感性、相对真值和可接受限值,评估10种增菌分离组合的分离敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值。结果 SC对猪霍乱和猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种存在无效增殖;CAS和XLD识别伤寒和非伤寒、硫化氢差异表达沙门氏菌能力明显优于XLT4、HE、BS;84件样品(畜肉22件、禽肉32件和水产品30件)经5种增菌组合确认25件阳性(29.76%)、鉴定分型42株沙门氏菌。5种组合方法的敏感性分别为:84.00%、100.00%、88.00%、88.00%和92.00%,没有统计学差异($P>0.05$)。按照ISO 16140—2:2016释义组合1(SC+TTB)因SC存在漏检导致可接受限值超限;10种增菌组合中以RV-CAS综合效益最好,敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值分别为:68.00%、95.00%、85.00%、88.00%。结论 SC因窄谱增菌效果,影响方法敏感性、导致负偏差结果偏倚,使可接受限值超限;增菌组合推优RV-CAS,平板组合推荐CAS+XLD;建议GB4789.4能完善沙门氏菌血清鉴定,加强应对流通样品混合菌型污染及接轨国际食品微生物标准。

关键词:沙门氏菌检验标准;微生物的确认方法;等效性;可接受限值;混合菌型污染食品

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)03-0474-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.03.013

The equivalence trials of *Salmonella* selective enrichment and isolation procedures in standard methods worldwide

LIU Yue^{1,2}, LIU Xia³, CUI Lin⁴, CHEN Min¹, LIU Hong¹, GU Qifang¹, HU Yi^{2,5}, XU Xuebin¹

(1. Shanghai Multiple Center for Disease Prevention and Control, Shanghai 200336, China; 2. School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032 China; 3. Technology Center of Animal Plant and Food Inspection and Quarantine of Shanghai Customs, Shanghai 201708, China; 4. Shanghai Center for Clinical Laboratory, Shanghai 200126, China; 5. China and Key Laboratory of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Objective To evaluate the equivalence of 5 *Salmonella* selective enrichment procedures in standard methods worldwide. **Methods** The growth rates (P_R) and the colony characteristics of 5 selective enrichment broths (SC, TTB, RV, MKTTn, SBG) and 5 selective mediums (CAS, XLD, XLT4, HE, BS) were validated according to the

收稿日期:2021-09-17

基金项目:国家重点研发计划(2017YFC1600104);国家科技重大专项(2018ZX10714002-003-009);上海市健康委青年课题(20174Y0141)

作者简介:刘玥 女 主管技师 研究方向为食品微生物检测和监测 E-mail: liuyue@scdc.sh.cn

通信作者:许学斌 男 副主任技师 研究方向为病原微生物检测和监测 E-mail: xxb72@sina.com

胡屹 男 副教授 研究方向为传染病分子流行病学研究 E-mail: yhu@fudan.edu.cn

GB4789.28—2013. The sensitivity (SE), the relative trueness (RT) and the acceptable limit (AL) were estimated on highly contaminated foods through the use of 5 protocols combined with 5 selective enrichment broths and 2 selective mediums according to the method of ISO 16140—2: 2016. The sensitivity (Se), the specificity (Sp), the positive predictive value (PPV) and the negative predictive value (NPV) were simultaneously determined through the use of 10 compound modes combined with selective enrichment broths and selective mediums according to the classical statistical methods. **Results** The results showed that SC broth had no efficacy in enriching *Salmonella enterica* serotype Cholerae and *Salmonella enterica* serotype Cholerae var. Kunzendorf. The CAS and XLD were significantly better than XLT4, HE and BS in identifying typhoidal *Salmonella* and nontyphoidal *Salmonella* as well as the phenotype of hydrogen sulfide. Totally 84 samples (22 pieces of meat, 32 pieces of poultry and 30 pieces of aquatic products) were tested. 25 out of the 84 (29.76%) were confirmed positive by 5 protocols, and 16 serotypes from 42 isolates were identified. The SE of 5 protocols were 84.00%, 100.00%, 88.00%, 88.00% and 92.00%, respectively, but showed no statistically significant difference between each other. The AL of one protocol (SC+TTB) went beyond the limitation of the ISO 16140—2: 2016 due to the ineffectiveness of SC broth. The compound mode of RV-CAS had the best comprehensive benefits, while the Se, the Sp, the PPV and the NPV of which were 68.00%, 95.00%, 85.00% and 88.00%, respectively. **Conclusion** The ineffectiveness of SC broth reduces the sensitivity of the detection protocol for *Salmonella*, which could cause a negative deviation, resulting in the threshold exceeding of the Acceptability Limit (AL). The combinational selective enrichment broth of RV-CAS is recommended to be the optimal mode, with CAS+XLD being recommended to be the optimal selective medium combination. The process of *Salmonella* serotyping is suggested to be improved in the standard of GB4789.4 to cope with the multi-serotype *Salmonella* contamination in food chain and be consistent with the international standardization for food microbiology.

Key words: *Salmonella* detection method; microbiological verification methods; equivalence trials; acceptable limit; multi-serotype contaminated foods

沙门氏菌是重要的人畜共患和食源性致病菌,其致病性按病症类型分为肠内感染型和肠外侵袭型,侵袭型病例致死率可达 30%^[1]。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 估测每年全球感染性腹泻约 5.5 亿人,5 岁以下儿童达 2.2 亿,沙门氏菌是其中最常见病因之一^[2]。人类通过摄入污染沙门氏菌的食品 (尤其是加工动物类食品) 引发感染或持留。食品安全标准是国家监管食品和饲料产业供应的法理基础,伴随食品贸易全球化,国内外对食品沙门氏菌检验方法的验证、比对和等效性评估带动了我国食品标准的升级、与国际规则的对接^[3]。食品原料复杂性影响食品检测结果,故不同行业和领域的方法需进行等效性评估,强化技术互认^[4]。国际标准化组织 (International Organization for Standardization, ISO) 针对食物链微生物的最新确认方法 (ISO16140—2: 2016)^[5] 调整了食品微生物检测方法等效性评估的核心统计学参数。本研究遵循食品微生物检验国家标准培养基和试剂质量要求 (GB4789.28—2013)^[6] 与 ISO16140—2: 2016 规则^[5], 集成现行国内外食品沙门氏菌检验标准方法中选择性增菌与分离组合, 计算标准参数 (方法敏感性、相对真值、可接受限值、组合分离敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值), 据此评估不同标准的等效性, 为国家沙门氏菌检验标准 (GB4789.4-

2016) 修订与优化提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 参比菌株

目标菌: 伤寒沙门氏菌 (CMCC50071)、甲型副伤寒沙门氏菌 (硫化氢阴性, CMCC50093)、猪霍乱沙门氏菌 (硫化氢阴性, ATCC7001)、鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC14028)、猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种 (ATCC12011); 非目标菌: 大肠埃希氏菌 (ATCC25922)、铜绿假单胞菌 (ATCC27853)。鼠伤寒沙门氏菌为人源和食源优势菌型, 具典型生化特征; 猪霍乱沙门氏菌属于硫化氢阴性的侵袭性菌型; 猪霍乱孔成道夫为相对苛氧的、产硫化氢的小菌落; 伤寒和副伤寒为侵袭性菌型, 其中甲型副伤寒为硫化氢阴性。综上, 本研究选择 5 株参比菌株, 涵盖优势与罕见、人源和食源、侵袭性和非侵袭性、伤寒和非伤寒、硫化氢阳性和阴性。

1.1.2 主要仪器与试剂

菌液浊度仪和细菌鉴定质谱仪 VITEK MS (法国生物梅里埃公司)。

沙门氏菌显色琼脂平板 (CHORMagar *Salmonella*, CAS, 批号 2783228)、木糖-赖氨酸-脱氧胆酸盐琼脂平板 (Xylose Lysine Deoxycholate, XLD, 批号 9227456)、

木糖赖氨酸十四烷基硫酸钠琼脂平板(Xylose Lysine Tergitol 4 agar, XLT4, 批号3282217)、亚硫酸铋琼脂平板(Bismuth sulphite agar, BS, 批号2618354)和赫氏肠道菌琼脂平板(Hektoen Enteric agar, HE, 批号1892334), 以上材料均购自 Becton, Dickinson and Company (BD) 公司, 按说明书配制、按 GB4789. 28—2013 验收后置 2 °C~8 °C 避光保存, 2 周内使用。

哥伦比亚血琼脂平板、胰酪大豆胨蛋白胨琼脂平板(Tryptone soy agar, TSA)(广州迪景微生物技术有限公司); 哥伦比亚琼脂斜面、营养肉汤、沙门氏菌诱导软琼脂、肠道菌筛选双糖管及配套试纸、生理盐水(上海卓冀生物技术有限公司); 生化鉴定条 API20E 和氧化酶试剂等配套试剂(法国生物梅里埃); 沙门氏菌分型血清 130 种(丹麦 SSI 诊断公司)。所有商业即用型平板和试剂、诊断血清等避光置 2 °C~8 °C 保存, 均按说明书使用。

缓冲蛋白冻水(Buffered Peptone Water, BPW 批号 2732118)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(Selenite cystine broth, SC, 批号 7363732)、四硫磺酸钠煌绿增菌液(Tetrathionate broth, TTB, 批号 8281593)、罗伯特增菌液(Rappaport Vassiliadis broth, RV, 批号 9266117)、穆勒-考夫曼四硫酸盐新生霉素增菌液(Muller Kauffmann tetrathionate novobiocin, MKTTn, 批号 1026705)、亚硒酸盐煌绿增菌液(Selenite brilliant green enrichment broth, SBG, 批号 8230128), 以上试剂均购自 Becton, Dickinson and Company (BD) 公司, 按说明书配制、按 GB4789. 28-2013 验收后置 2 °C~8 °C 避光保存, 2 周内使用。

1.2 方法

1.2.1 沙门氏菌选择性增菌液的验证

生长率半定量测试: 依据 GB4789. 28—2013, 制备目标菌和非目标菌的新鲜肉汤培养物和 10 倍梯度菌悬液, 分别吸取不同稀释度菌悬液 1 mL 接种 TTB、SC、RV、MKTTn、SBG 混匀, SC、MKTTn、SBG 置于 36 °C、RV 置于 42 °C、TTB 置于 43 °C, 培养 18 h 后分别划线接种 XLD, 36 °C 培养 24 h 后进行菌落计数。每一稀释度涂布平板 2 个。评价标准: 目标菌在 XLD 的菌落应 >10 CFU; 符合沙门氏菌在 XLD 的典型菌落特征。

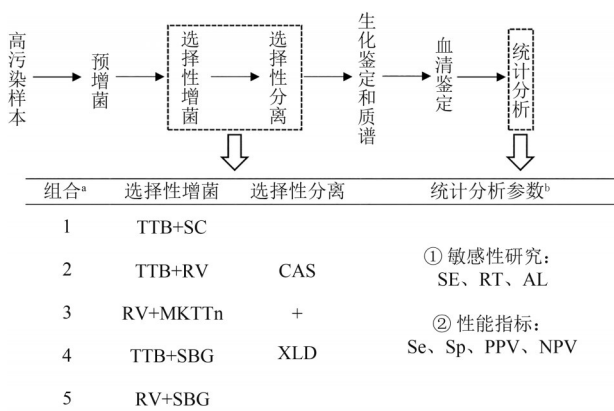
1.2.2 沙门氏菌选择性琼脂平板的验证

生长率定量测试: 分别取 1.2.1 中目标菌的梯度菌悬液 100 μ L 涂布于 TSA 和 XLD, 每一稀释度涂布平板 2 个, 36 °C 培养 24 h 进行菌落计数, 计算生长率(P_R)并确认预期的典型菌落生长。典型菌落特征: BS: 中等偏小、产硫化氢、有金属光泽暗绿色菌落; HE: 中等偏小、产硫化氢、蓝绿色菌落; XLD

和 XLT4: 中等大小、产硫化氢菌落、边缘半透明淡红色或原色菌落; CAS: 中等大小、边缘光滑湿润酒红色菌落。

1.2.3 多方法的选择性增菌与分离组合等效性评估

2019 年 7 月至 9 月, 选择上海地区的定点超市, 采集市售流通肉制品和水产品 84 件(每月 28 件): 畜肉 22 件、禽肉 32 件和水产品 30 件。样品单独包装、每份样品称取 25 g, 均质混匀 225 mL BPW, 36 °C 培养 8 h, 取 1 mL BPW 加入 TTB、SC、SBG、MKTTn、另吸取 0.1 mL BPW 加入 RV 中。SC、SBG、MKTTn 置于 36 °C、RV 置于 42 °C、TTB 置于 43 °C 培养 18 h, 从 5 种选择性增菌液各取 10 μ L 接种 XLD 和 CAS, 36 °C 培养 24 h, 观察菌落特征。挑取选择性平板挑取 2 个及以上的疑似典型菌落, 完成肠道菌筛选双糖管初筛试验, 初筛符合者进行系统生化和质谱鉴定, 符合沙门氏菌属者鉴定血清型, 分析统计参数(图 1)。



^a: 组合 1 参考食品安全国家标准沙门氏菌检验^[7], 组合 2 参考美国 FDA 细菌检测手册第八版^[8], 组合 3 参考 ISO 食品和动物饲料微生物学沙门氏菌检测^[9], 组合 4 参考日本厚生劳动省食品卫生检查指针微生物篇^[10], 组合 5 参考上海市沙门氏菌病监测方案^[11]; ^b: SE 表示方法敏感性; RT 表示相对真值; AL 表示可接受限值; Se 表示分离敏感性; Sp 表示特异性; PPV 表示阳性预测值; NPV 表示阴性预测值; 参数计算公式详见 1.2.4

图 1 基于沙门氏菌高污染样本的统计学参数评估不同组合方法等效性的技术路线

Figure 1 The technical route for evaluating the equivalence of different methods with statistical parameters on highly contaminated foods

1.2.4 释义相关统计学参数

参考 ISO16140—2:2016 和传统统计学方法^[12], 计算实样检测结果的统计学参数: 共阳结果(Positive agreement, PA)为基于各组合方法确认的结果与单个组合方法确认的结果经确认一致为阳性; 共阴结果(Negative agreement, NA)为基于各组合方法确认的结果与单个组合方法结果一致为阴

性;正偏差结果(Positive deviation, PD)为基于各组合方法确认的结果为阴性,单个组合方法结果经确认为阳性;负偏差结果(Negative deviation, ND)为基于各组合方法确认结果为阳性,单个组合方法结果为阴性;可接受限值(Acceptability limit, AL)为基于各组合方法确认的结果与单个组合方法结果之间的最大正负偏差的和与(或)差;相对真值(Relative trueness, RT)为相同样品使用不同方法得到的结果与基于各组合方法确认的结果的对应程度, $RT = (PA+NA)/\text{样品数} \times 100\%$;使用相同预增菌液(BPW)的做法可视为配对研究(Paired study);方法敏感性(Sensitivity, SE)反映方法检出沙门氏菌的客观能力, $SE = (PA+PD)/(PA+ND+PD) \times 100\%$;真阳性(True positive, TP)为典型菌落经鉴定为沙门氏菌的样品(数);假阳性(False positive, FP)为典型菌落经鉴定为非沙门氏菌的样品(数);真阴性(True negative, TN)为非典型菌落经鉴定为非沙门氏菌的样品(数);假阴性(False negative, FN)为非典型菌落经鉴定为沙门氏菌的样品(数);分别统计各选择性增菌液和分离平板组合的分离敏感性(Sensitivity, Se) ($Se = TP/(TP+FN)$)、特异性(Specificity, Sp) ($Sp = TN/(TN+FP)$)、阳性预测值(Positive predictive value, PPV) ($PPV = TP/(TP+FP)$)和阴性预测值(Negative predictive value, NPV) ($NPV = TN/(TN+FN)$)。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计学分析,运用 Pearson χ^2 检验对 SE、RT 进行多组间比较,当 $P < 0.05$ 时被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 验证沙门氏菌选择性增菌液

目标菌和非目标菌悬液浓度(CFU/mL)计算结果表明,鼠伤寒沙门氏菌为 2.0×10^8 CFU/mL;猪霍乱沙门氏菌为 1.7×10^8 CFU/mL;猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种为 1.8×10^8 CFU/mL;伤寒沙门氏菌为 1.6×10^8 CFU/mL;甲型副伤寒沙门氏菌为 1.7×10^8 CFU/mL;大肠埃希氏菌为 2.3×10^8 CFU/mL;铜绿假单胞菌为 2.1×10^8 CFU/mL。

半定量生长率测试结果表明,根据平板计数结果确认目标菌的 10^{-7} 稀释度(10~100 CFU)和非目标菌的 10^{-5} 稀释度(1 000~5 000 CFU)为预期接种量。计算对应稀释菌液在 XLD 的回收菌落数并取平均值:除猪霍乱及猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种在 SC(XLD)计数 < 10 CFU,其他选择性增菌液选择性良好(表 1)。提示 SC 在非目标菌干扰环境下对猪霍乱及猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种的增菌倍

数小于 1,增殖或促生长作用有限。

表 1 目标菌测试 5 种选择性增菌液半定量生长率
Table 1 The test of growth rates of *Salmonella* reference strain for 5 selective enrichment broths through the use of semi-quantitative method

目标菌(XLD/CFU)	RV	TTB	SC	MKTTn	SBG
鼠伤寒沙门氏菌	+	+	+	+	+
猪霍乱沙门氏菌	+	+	-	+	+
猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种	+	+	-	+	+
伤寒沙门氏菌	+	+	+	+	+
甲型副伤寒沙门氏菌	+	+	+	+	+

注:+:>10 CFU;-:≤10 CFU

2.2 验证沙门氏菌选择性琼脂平板

2.2.1 目标菌在 5 种选择性琼脂平板的特征性反应

CAS 验证 5 株目标菌符合预期典型菌落(5/5);因猪霍乱沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌为硫化氢阴性株,故 XLD 未观察到预期典型菌落(3/5);BS 较 XLD 未观察到猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种的预期典型菌落(2/5);HE 和 XLT4 较 BS 未观察到伤寒沙门氏菌的预期典型菌落(1/5)。以上结果见表 2。本次验证 5 种选择性琼脂平板预期典型菌落的生长效果依次为 CAS、XLD、BS、HE、XLT4。

表 2 目标菌验证 5 种选择性琼脂平板特征性反应

Table 2 The colony characteristics of *Salmonella* reference strains for 5 selective mediums

目标菌	CAS	XLD	BS	HE	XLT4
鼠伤寒沙门氏菌	+	+	+	+	+
猪霍乱沙门氏菌	+	-	-	-	-
猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种	+	+	-	-	-
伤寒沙门氏菌	+	+	+	-	-
甲型副伤寒沙门氏菌	+	-	-	-	-
统计典型菌落敏感性	5/5	3/5	2/5	1/5	1/5

注: + 为典型生长; - 为不典型生长

2.2.2 沙门氏菌选择性琼脂平板的生长率定量测试

选择合适稀释度计算 TSA 和 XLD 菌落数,计算 5 株沙门氏菌在不同选择性琼脂平板的生长率 P_r (表 3)。按照 GB4789.28—2013,5 种选择性琼脂平板对指定质控菌株(鼠伤寒和/或伤寒沙门氏菌)的 P_r 均 > 0.5,均符合质控评定标准(图 2);5 株目标菌在 5 种选择性琼脂平板上的 P_r 结果判断:BS 除鼠伤寒沙门氏菌和伤寒沙门氏菌外,其他目标菌的 P_r 均未达 0.5;猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种在 HE 的 P_r 未达 0.5;XLD、XLT4 和 CAS 的 5 株目标菌 P_r 均超 0.5。综合特征性反应和生长率测试(表 2 和表 3),选择 CAS 和 XLD 作为本次组合方法等效性评估的选择性琼脂平板。

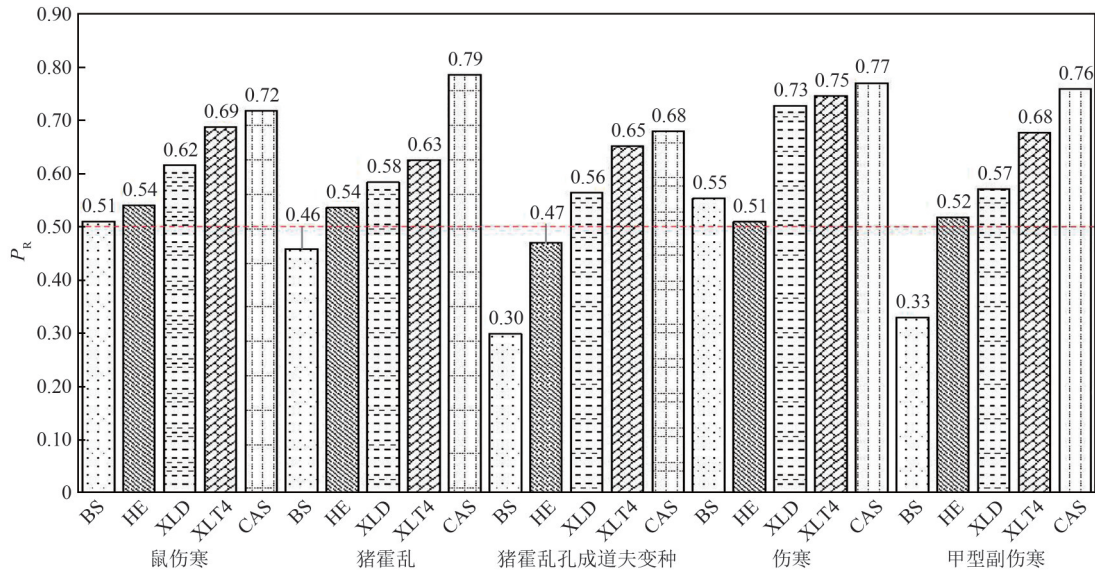


图2 目标菌测试5种选择性琼脂平板的生长率

Figure 2 The test of growth rates of *Salmonella* reference strains for 5 selective mediums

表3 目标菌测试5种选择性琼脂平板的生长率

Table 3 The test of growth rates of *Salmonella* reference strains for 5 selective mediums

目标菌	BS		HE		XLD		XLT4		CAS	
	N _s	P _R	N _s	P _R	N _s	P _R	N _s	P _R	N _s	P _R
鼠伤寒沙门氏菌	101	0.51	107	0.54	122	0.62	136	0.69	142	0.72
猪霍乱沙门氏菌	77	0.46	90	0.54	98	0.58	105	0.63	132	0.79
猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种	54	0.30	85	0.47	102	0.56	118	0.65	123	0.68
伤寒沙门氏菌	89	0.55	82	0.51	117	0.73	120	0.75	124	0.77
甲型副伤寒沙门氏菌	56	0.33	88	0.52	97	0.57	115	0.68	129	0.76

注:生长率 $P_R = N_s/N_0$, N_s 为琼脂平板上获得的菌落数(CFU), N_0 为 TSA 上获得的菌落数(CFU);鼠伤寒沙门氏菌 $N_0=198$, 猪霍乱沙门氏菌 $N_0=168$, 猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种 $N_0=181$, 伤寒沙门氏菌 $N_0=161$, 甲型副伤寒沙门氏菌 $N_0=170$

2.3 高污染实样检测结果

84 件样品包括畜肉 22 件、禽肉 32 件和水产品 30 件。经系列增菌、分离和鉴定流程,共确认阳性样品 25 件(总敏感性 100%),分离率为 29.76%(25/84),共分离沙门氏菌 42 株,均经系统生化、质谱和血清学鉴定。阳性样品中 11 件(11/25, 44.00%)混合 2 种以上血清型。42 株沙门氏菌型:鼠伤寒(7 株)、罗森(5 株)、伦敦(5 株)、肠炎(4 株)、德比(4 株)、鸭(4 株)、黄金海岸(3 株)、科瓦利斯(2 株)、明斯特(1 株)、火鸡(1 株)、哈达尔(1 株)、科特布斯(1 株)、肯塔基(1 株)、汤卜逊(1 株)、利文斯通(1 株)和胥戈成格隆(1 株)。

2.4 基于 ISO 16140—2: 2016 敏感性研究评价组合方法

本次 84 件样品均为沙门氏菌高污染样品(生鲜食品),每一种样品数均大于 20 件,按 ISO 16140:2—2016 得到不同组合方法分离的敏感性结果。根据结果,组合 2 的 SE 和 RT 最高(100.00%, 100.00%),其次为组合 5(92.00%, 96.70%)、组合 3 和 4(88.00%, 96.40%)、组合 1(84.00%, 95.20%)。经统计分析,5 种组合的 SE 和 RT 差异均无统计学

意义($P>0.05$)。可接受限值(AL)为 ISO 16140:2—2016 新增评价指标,反应不同方法检测同一样品时,方法之间最大的可接受差异(该差异取决于研究类型和测试样品类型),同一类样品的配对研究中 AL(ND-PD)和 AL(ND+PD)应分别 ≤ 3 和 6。本次组合 1 的 AL(ND-PD)超出 ISO 标准释义的可接受限值,其他方法的 AL 均在可接受范围内。导致组合 1 超限的原因为 ND 较高,即组合 1 存在更多漏检,造成 SE 和 RT 偏低及 AL(ND-PD)超限(表 4)。

2.5 基于传统方法学统计参数评价组合方法

按传统统计学参数经数据分层和计算,TP 最高的组合是 RV-CAS 和 TTB-CAS(17/25)、最低的组合是 SC-XLD 和 SC-CAS(0/25);FP 值最高组合是 SC-CAS(8);TN 数值接近;FN 值最低组合是 RV-CAS 和 TTB-CAS(8/59)。Se 最高为 RV-CAS(68.00%)和 TTB-CAS(68.00%),其次为 TTB-XLD(60.00%)。Sp 值差异小,无法反映组合方法之间的客观差异。PPV 和 NPV 为效益评价指标,最高为 RV-CAS(85.00% 和 88.00%)。具体信息见表 5。

表4 基于ISO 16140—2:2016敏感性研究评价5种组合方法敏感性和可接受限值

Table 4 The evaluation of the sensitivity and the acceptable limits for 5 protocols based on the ISO 16140—2:2016

组合 ^a	PA	NA	ND	PD	SE/%	RT/%	AL(ND-PD)	AL(ND+PD)
1	21	59	4	0	84.00 ^[13]	95.20	4(超限 ^b)	4
2	25	59	0	0	100.00 ^[13]	100.00	0	0
3	22	59	3	0	88.00	96.40	3	3
4	22	59	3	0	88.00 ^[13]	96.40	3	3
5	23	59	2	0	92.00 ^[13]	96.70	2	3

注:总敏感性=25(100%);^a:组合1:TTB+SC,组合2:TTB+RV,组合3:RV+MKTTn,组合4:TTB+SBG,组合5:RV+SBG;^b:根据ISO 16140:2-2016释义一类样品的AL(ND-PD)和AL(ND+PD)应分别≤3和6

表5 基于传统方法学统计参数评价单一增菌与分离组合的能效

Table 5 The evaluation for efficacy of the compound modes based on the classical statistical methods

增菌-分离组合	TP	FP	TN	FN	百分率/%			
					Se	Sp	PPV	NPV
RV-XLD	12	4	55	13	48.00 ^[13]	93.00	75.00	81.00
RV-CAS	17	3	56	8	68.00 ^[13]	95.00	85.00	88.00
TTB-XLD	15	6	53	10	60.00 ^[13]	90.00	71.00	84.00
TTB-CAS	17	4	55	8	68.00 ^[13]	93.00	81.00	87.00
SC-XLD	0	3	56	25	0.00 ^[13]	95.00	0.00	69.00
SC-CAS	0	8	51	25	0.00 ^[13]	86.00	0.00	67.00
MKTTn-XLD	13	3	56	12	52.00	95.00	81.00	82.00
MKTTn-CAS	12	4	55	13	48.00	93.00	75.00	81.00
SBG-XLD	14	7	52	11	56.00 ^[13]	88.00	67.00	83.00
SBG-CAS	12	3	56	13	48.00 ^[13]	95.00	80.00	81.00

3 讨论

沙门氏菌定植于养殖动物和自然环境,在肉制品的加工生产过程中容易污染,监管部门依靠食品终端微生物检验加强产业链的安全监管。本次研究遵循培养基质控国标和国际主流确认方法,在传统微生物方法重视选择性增菌液的敏感性和分离平板表现的预期典型菌落特征的基础上,验证影响食品中沙门氏菌检测流程中选择性增菌和分离组合的统计学评价参数,客观评价不同材料和方法组合检测高污染样品增菌与分离的结果差异化。

常规分离培养作为易普及、易操作的传统基础方法仍在微生物检测领域、尤其是食品沙门氏菌常规分离流程中发挥重要作用,增菌液是影响食品沙门氏菌检验体系敏感性的关键技术控制点^[13-14]。本次选择性增菌液验证SC对伤寒、副伤寒适度有效增菌,但其对低载量(10~100 CFU)猪霍乱沙门氏菌和猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种存在无效增菌或抑制作用。猪霍乱不产生硫化氢,是猪源定殖生态型沙门氏菌,对猪致病力弱,对人有具侵袭性,国内缺少其生态污染和临床监测数据存在关联的报道^[1,13]。此外,SC依赖经验配制、效期短、批间质控差异大^[15],目前国外标准中除少数特殊食品原料外,SC皆被其他增菌液替代^[8-9]。

沙门氏菌现有2个种、6个亚种和2659个血清型^[16]。本次选取肠道沙门氏菌亚种1的5株目标

菌进行材料验证,兼顾伤寒副伤寒和非伤寒副伤寒、硫化氢阳性和阴性的沙门氏菌型、侵袭型和非侵袭型等代表性,5种常用选择性分离琼脂平板的生长率和菌落特征;CAS对5种目标菌的定量验收符合质量评价标准,排除菌株不产硫化氢的特性后,XLD符合质量评价标准。而BS、HE和XLT4均存在生长率不达标或菌落特征不典型的现象。GB4789.28—2013可以满足沙门氏菌培养基质量验收,但使用者需认知沙门氏菌不同亚种存在表型差异(硫化氢、乳糖)。

2002年起,我国陆续报道硫化氢阴性沙门氏菌的食源性暴发^[17-21]。针对国内外多种标准方法等效性研判,我们认为皆有漏检硫化氢阴性沙门氏菌的可能性,所以本次研究使用的CAS+“N”双平板组合模式可满足硫化氢阴性沙门氏菌检测需求^[22-23],推荐将“CAS+XLD”优先作为食品类基质样品的沙门氏菌选择性分离组合。

食品受加工工艺与方式、内在物理与化学因素影响,较临床微生物沙门氏菌的检验,更具挑战与应用视角^[13]。为避免材料和方法对结果影响,本次研究限定预增菌和鉴定流程,将选择性增菌作为变量,以期得到客观结论。入选增菌分离组合方法参考国内外标准和上海食源感染性监测方案^[7-11]。在总计25件阳性样品中有11件分离2种以上菌型,提示沙门氏菌是食品产业链中的重要污染源,给“农场到餐桌”的食品安全溯源体系带来挑战,而GB4789.4—2016对血清分型未做强制要求,无法揭示流通食品存在的混合菌型污染和溯源食源性暴发^[16]。ISO16140:2—2016将可接受限值(AL)作为新指标纳入,其设定并非基于数据统计分析,而是基于大数据和专家共识^[5]。5种增菌分离组合的SE和RT差异均无统计学意义,但组合1的AL(ND-PD)超出推荐限值,组合1超限原因为SC无效检验导致偏差影响ND数值升高,其他增菌分离组合的差异在可接受范围之内。本次实样证实,RV预期综合效益最佳;RV-CAS的Se、Sp、PPV和NPV分别为68.00%、95.00%、85.00%和88.00%,RV自20世纪后期至2000年后逐渐被国际接纳^[24-26]。

现行 ISO 16140:2-2016 将特异性评价指标(Sp)删除,以 SC 为例,由于其 Sp 值差异小,的确无法反映组合方法间的差异,故我们认为 NPV 较 Sp 更能体现方法本身导致的无效检测,亦更直观反映检测方法固有缺陷导致人财物损失。

本次扩展具有表型代表性的目标菌,对 5 种选择性增菌液和 5 种选择性琼脂平板进行验收和评估。数据证明 GB4789.28—2013 仅适用于沙门氏菌各类增菌液和平板的质量验收,如需要系统客观评价关键性分离材料,应引入更为科学的统计学评价指标和方法学性能、效益参数(回收率、等效性、均一性)。本次所用材料控制遵循统一验收与验证标准,但无法排除关键分离材料因不同批次出现的结果偏倚。

食品作为重要的全球消费品,世界各国均加强对标准方法等效性评估,以满足贸易与消费需求^[4]。食品标准更需要服务国内市场和食品安全监管,更主要为优质合格的高附加值产品走出国门保驾护航。

参考文献

- [1] 罗铭,顾桂敏,景春梅,等.猪霍乱沙门菌在全球的流行和耐药特征[J].疾病监测,2018,33(8):690-699.
LUO M, GU G M, JING C M, et al. Epidemic and drug-resistance patterns of *Salmonella choleraesuis* in the world[J]. Disease Surveillance, 2018,33(8):690-699.
- [2] World Health Organization. *Salmonella* (non-typhoidal). [2020-06-28]. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)).
- [3] Jasson V, Jacxsens L, Luning P, et al. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria[J]. Food Microbiology, 2010, 27(6):710-730.
- [4] 李宏,雷质文.食品微生物检测方法确认和证实手册[M].北京:中国标准出版社,2013.
Li H, Lei Z W. Handbook of validation and confirmation of food microbiological methods [M]. Beijing: China Quality and Standards Publishing and Media Company, 2013.
- [5] UNE-EN ISO 16140-2-2016. Microbiology of the food chain - Method validation-Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method (ISO 16140-2:2016) [S]. Geneva: International Organization for Standardization.
- [6] 国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求:GB 4789.28—2013[S].北京:中国标准出版社,2014.
National health commission of the People's Republic of China. National standards for food safety, Food microbiological methods: Quality requirements for medium and reagents (GB 4789.28-2013) [S]. Beijing: China quality and standards publishing and media company, 2014.
- [7] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验:GB 4789.4—2016[S].北京:中国标准出版社,2017.
National health commission of the People's Republic of China, State Administration for market regulation. National standards for food safety, Food microbiological methods: detection of *Salmonella* (GB 4789.4-2016) [S]. Beijing: China Quality and Standards Publishing and Media Company, 2017.
- [8] ANDREW W, WANG H, JACOBSON A, et al. Bacteriological analytical manual (BAM) chapter 5: *Salmonella* [EB/OL]. (2019-12-01) [2019-12-15]. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>.
- [9] UNE-EN ISO 6579-1-2017, Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*- Part 1: Detection of *Salmonella* spp. (ISO 6579-1:2017) [S]. Switzerland: International Organization for Standardization.
- [10] 日本食品卫生协会,厚生劳动省监制.食品卫生检查指南微生物篇[M].东京:日本厚生劳动省,2004:180-188.
Japan food hygiene association, Ministry of health, labour and welfare. Guide for food hygiene inspection: Microbiology [M]. Tokyo: Ministry of Health, Labour and Welfare, 2004: 180-188.
- [11] 朱超,许学斌.沙门菌属血清型诊断[M].上海:同济大学出版社,2009.
ZHU C, XU X B. Serological diagnosis of *Salmonella*-species [M]. Shanghai: Tongji University Press, 2009.
- [12] 詹思延,叶冬青,谭红专,等.流行病学[M].北京:人民卫生出版社,2017.
ZHAN SY, YE D Q, TAN H Z, et al. Epidemiology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2017.
- [13] 刘玥,张红芝,顾其芳,等.沙门菌分离、筛检和确认流程技术关键点分析[J].检验医学,2020,35(6):524-530.
LIU Y, ZHANG H Z, GU Q F, et al. Analysis on the technical key points of *Salmonella* isolation, screening and identification based on routine detection process [J]. Laboratory Medicine, 2020,35(6):524-530.
- [14] 周永明,陈秀华,徐闻,等.沙门菌常规检测方法分段控制技术在网络实验室构建中基础作用的评估[J].中华流行病学杂志,2013,34(11):1105-1110.
ZHOU Y M, CHEN X H, XU W, et al. The fundamental role of stage control technology on the detectability for *Salmonella* networking laboratory [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2013, 34(11):1105-1110.
- [15] 熊国强,应艳,余蕾,等.沙门菌增菌培养基增菌效果的探讨与分析研究[J].中国卫生检验杂志,2004,14(2):159-161.
XIONG G Q, YING Y, YU Q, et al. Enriching effect of enrichment medium for *Salmonella* [J]. Chinese Journal of health laboratory technology, 2004,14(2):159-161.
- [16] 张婧萱,黄美恋,刘玥,等.2006—2020年美国沙门菌跨州暴发案例分析[J].疾病监测,2021,36(8):837-844.
ZHANG J X, HUANG M L, LIU Y, et al. Multistate *Salmonella* infection outbreaks in United States, 2006 to 2020 [J]. Disease Surveillance, 2021, 36(8):837-844.
- [17] LIN D C, YAN M Y, LIN S, et al. Increasing prevalence of

- hydrogen sulfide negative *Salmonella* in retail meats [J]. *Food Microbiology*, 2014, 43: 1-4.
- [18] XIE J, WU F L, XU X B, et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of the hydrogen sulfide-negative phenotype among diverse *Salmonella* serovars in China [J]. *BMC Infectious Diseases*, 2018, 18 (1): 1-9.
- [19] WU F L, XU X B, XIE J, et al. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Aberdeen negative for H₂S production in China [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (8): e0161352.
- [20] XIE J, YI S J, ZHU J G, et al. Antimicrobial resistance and molecular investigation of H₂S-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar choleraesuis isolates in China [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (10): e0139115.
- [21] HU Q H, COBURN B, DENG W Y, et al. *Salmonella enterica* serovar Senftenberg human clinical isolates lacking SPI-1 [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46 (4): 1330-1336.
- [22] 庞晓泸, 顾桂敏, 刘玥, 等. 基于方法学评估与检测基线预测广西玉林市从业人员沙门菌带菌水平 [J]. *疾病监测*, 2020, 35(3): 212-217.
- PANG X L, GU G M, LIU Y, et al. Methodological assessment and detection base line based prediction of *Salmonella* carriage level in catering and public service employees in Yulin [J]. *Disease surveillance*, 2020, 35(3):212-217.
- [23] PERRY J D. A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017, 30 (2): 449-479.
- [24] JUNE G A, SHERROD P S, HAMMACK T S, et al. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-vassiliadis medium for the recovery of *Salmonella* from raw flesh and other highly contaminated foods: Precollaborative study [J]. *Journal of AOAC International*, 1995, 78 (2): 375-380.
- [25] JUNE G A, SHERROD P S, HAMMACK T S, et al. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp. from raw flesh, highly contaminated foods, and poultry feed: collaborative study [J]. *Journal of AOAC International*, 1996, 79(6):1307-1323.
- [26] HAMMACK T S, RM AMAGUAÑA, JUNE G A, et al. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-Vassiliadis medium for the recovery of *Salmonella* spp. from foods with a low microbial load [J]. *Journal of Food Protection*, 1999, 62(1):16.