

预防性健康检查中沙门菌分离方法的优化与评估

赵文良¹, 杨兰萍², 胡雪明¹, 许学斌^{3*}

摘要: [目的] 沙门菌检测方法在预防性健康检查中的优化与效果评估。[方法] 用实验室保存菌株测试 CHROMagarTM 沙门菌显色琼脂平板(CAS)、木糖赖氨酸胆酸盐琼脂平板(XLD)和武汉 SS 琼脂平板(WS)的敏感性、特异性; 使用单盲法比较经亚硒酸盐增菌液(SF)增菌后用 CAS 与 WS、亚硒酸煌绿增菌液(SBG)与 SF 增菌后, 用 XLD 与 WS 分别在 1717 件和 1000 件食品从业者体检肛拭中分离沙门菌的效果; 评价优化检测方法在上海市静安区预防性健康检查中的应用。[结果] CAS 和 XLD 菌株测试和现场检测的敏感性和特异性均明显优于 WS, SBG-XLD/CAS 组合的优化方法的检测效果明显优于传统的 SF-WS 的结果。2008 年静安区职业体检的年度阳性率分别是 2006 年的 8 倍和 2007 年的 10 倍, 月度阳性率也是历史同期水平的 2~10 倍, 7、8 月份的阳性率高达 1%。[结论] CAS 能兼备伤寒、副伤寒在内的所有沙门菌的分离能力; SBG-XLD/CAS 组合的沙门菌优化检测流程具有易于掌握和高敏感性的优点, 适于预防性职业体检中沙门菌常规分离。

关键词: 沙门菌; 食品从业者; 敏感性; 特异性; 优化方法

Optimization and Evaluation of the Methods for Isolating *Salmonella* in Preventive Occupational Physical Examination ZHAO Wen-liang¹, YANG Lan-ping², HU Xue-ming¹, XU Xue-bin^{3*}(1. Department of Microbiology, Jing'an District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200041, China; 2. Department of Microbiology, Luwan District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025, China; 3. Department of Microbiology, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China). *Address correspondence to XU Xue-bin; E-mail: xb@scdc.sh.cn

Abstract: [Objective] To optimize and evaluate the effectiveness of detection methods for *Salmonella* in preventive occupational physical examination. [Methods] Using the stock of *Salmonella* strains we tested the susceptibility and specificity among CHROMagarTM *Salmonella* (CAS), Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD) and Wuhan *Salmonella-Shigella* agar (WS). Using single blind method, we detected 1717 anal swabs from food-handlers during their occupational physical examination to compare the effectiveness of isolating *Salmonella* in CAS and WS after selenite F broth (SF) enrichment, and also detected 1000 anal swabs of them to compare the effectiveness of isolating *Salmonella* in CAS and WS after selenite brilliant green enrichment broth (SBG) and SF, respectively. Finally, we evaluated the application of isolating *Salmonella* by optimized process of SBG-XLD/CAS from anal swabs in the course of preventive occupational physical examination in Jing'an District. [Results] The susceptibility and specificity of CAS and XLD from the stock *Salmonella* strains and on site detection were significantly higher than that of WS. The results from optimum method of SBG-XLD combining process were significantly superior to that of the SF-WS. In Jing'an District, the positive rate of *Salmonella* in occupational physical examination in 2008 increased by eight times than in 2006 and ten times than in 2007. Monthly positive rate of *Salmonella* increased by 2~10 times than before. The peak value of positive rate was over 1% in July and Augest. [Conclusion] CAS may be applied to isolate all *Salmonellae* including *Salmonella typhi* and *Salmonella paratyphi*. The SBG-XLD/CAS combining process has high susceptibility and easy to grasp. This optimum method is suitable for routine isolating *Salmonella* in preventive occupational physical examination.

Key Words: *Salmonella*; food-handler; susceptibility; specificity; optimum method

[基金项目] 中美新发和再发传染病合作项目 [编号: 美国疾病预防控制中心 (CDC) 5U2GGH000018-02]

[作者简介] 赵文良 (1961-), 男, 主管技师; 研究方向: 卫生检验方法应用; E-mail: wlzhao0212@163.com

[*通信作者] 许学斌副主任技师; E-mail: xb@scdc.sh.cn

[作者单位] 1. 上海市静安区疾病预防控制中心微生物实验室, 上海 200041; 2. 上海市卢湾区疾病预防控制中心微生物实验室, 上海 200025; 3. 上海市疾病预防控制中心微生物实验室, 上海 200336

有证据表明, 食品加工人员或操作者能够成为众多非伤寒沙门菌暴发病例中直接或间接污染食品的传染源^[1]。而公共场所或食品行业的健康职业者因职业暴露并感染沙门菌后有可能未产生腹泻等典型的临床症状, 我国将其定义为健康带菌者, 国外称之为隐性感染者。长期以来, 疾病预防控制部门在预防性健康检查中仍沿用 20 世纪 70 年代建立的沙门菌常规检测方法对公共场所与食品从业人员进行预防性职业健康检查。本项目拟在新型沙门菌显色平板和选择性增菌液的实验室评

价基础上,用优化方法对上海市静安区2008年公共场所和食品从业人员的预防性健康检查样品进行沙门菌检测,并进行现场应用评估,本文报道该项检测结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 敏感性测试菌株包括26株非伤寒沙门菌和16株伤寒、副伤寒沙门菌;特异性测试菌株包括肠杆菌科和非肠杆菌科共86株(其中志贺菌属8株、肠杆菌属10株、枸橼酸杆菌属6株、致泻性大肠埃希菌15株、致病性弧菌20株、假单胞菌属8株、假丝酵母菌属4株、李斯特菌属6株、葡萄球菌属6株、肠球菌3株),均来自上海市疾病预防控制中心菌种保藏中心。

1.1.2 试剂和仪器 亚硒酸煌绿增菌液(SBG,配方:酵母浸出物5.0g;蛋白胨5.0g;D-甘露醇5.0g;牛磺酸钠1.0g;磺胺抑制剂0.5g;亚硒酸钠4.0g;KH₂PO₄2.65g;K₂HPO₄41.02g;煌绿5mg);木糖赖氨酸胆酸盐琼脂平板(XLD,英国Oxoid公司);CHROMagarTM沙门菌显色琼脂平板(CAS,上海科玛嘉微生物技术有限公司);沙门菌分型诊断血清118种(泰国S&A公司);API-GIN+生化鉴定试剂条(法国生物梅里埃公司)。亚硒酸盐增菌液(SF)、武汉SS琼脂平板(WS)、肠道双支糖综合鉴别管和其他辅助生化鉴定试剂(上海市疾病预防控制中心试剂供应中心)由上海市静安区疾病预防控制中心微生物实验室配制。以上试剂均避光10℃以下保存,均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 平板的敏感性与特异性 测试菌株经血平板纯化后挑取单个菌落转种营养肉汤,36℃过夜培养后调至0.5麦氏比浊管浓度,吸取10μL分别种于CAS、WS、XLD划线分离,36℃培养24h记录平板菌落生长情况。沙门菌典型菌落特征分别为: CAS为酒红色圆而湿润菌落; WS为中心黑色淡绿色湿润菌落; XLD为中心黑色淡红色湿润菌落。根据指标菌在平板上实际生长的菌落特征判断阳性与阴性,敏感性=阳性/真阳性;特异性=阴性/真阴性^[2]。

1.2.2 使用单盲法比较WS与CAS直接分离样本 使用单盲法比较WS与CAS直接分离标本 在2001年11月与2002年6~7

月,于卢湾区疾病预防控制中心(卢湾区CDC)使用单盲法比较WS和CAS在检测食品从业人员体检肛拭标本中的敏感性与特异性,当平板上有典型菌落生长时,挑取≤3个菌落接种肠道双支糖综合鉴别管,36℃培养24h后生化符合者(甘露醇+、葡萄糖+、尿素-、蔗糖-、动力+、靛基质-、硫化氢+),结合血清分型结果报告沙门菌(血清型)。所有平板上菌落特征符合、生化初筛符合但最终排除的疑似菌株及菌落特征符合、生化初筛排除者均用氧化酶试验及API试剂鉴定到种。

1.2.3 选择性增菌液与分离平板组合的敏感性和特异性 在2003年11月与2004年6~7月在卢湾区CDC使用单盲法比较食品从业人员体检肛拭标本经SF和SBG增菌液增菌后,用WS和CAS分离沙门菌的敏感性与特异性,方法同前。

1.2.4 沙门菌优化方法与常规方法的比较 2006年、2007年使用传统方法(SF-WS),2008年使用优化方法(SBG-XLD/CAS)检测静安区公共场所和食品从业人员预防性体检肛拭标本中沙门菌,方法同前,根据标本量统计月度阳性分离率。

2 结果

2.1 菌株测试

42株沙门菌包括26株非伤寒沙门菌和16株伤寒副伤寒沙门菌在CAS、WS、XLD上的敏感性分别为100.0%、57.1%(24/42)、85.7%(36/42)。86株非沙门菌在CAS、WS、XLD上的特异性分别为94.2%(81/86)、90.7%(78/86)、95.3%(82/86)。所有沙门菌在CAS上均呈典型的酒红色菌落,而2株大肠埃希菌、1株铜绿假单胞菌、1株溶血不动杆菌、1株近平滑酵母菌在CAS上呈粉红或深红色菌落(假阳性);WS上有5株沙门菌(圣保罗、德比、鼠伤寒、猪霍乱、伦敦)、所有的伤寒、甲型副伤寒沙门菌的菌落未见硫化氢产生,而1株迟缓爱德华肠杆菌、5株弗劳地枸橼酸杆菌、1株溶血不动杆菌、1株腐败假单胞菌在WS上呈中心黑色(产生硫化氢)乳糖不发酵菌落(假阳性);XLD上有1株猪霍乱沙门菌和5株伤寒沙门菌的菌落未见硫化氢产生,3株弗劳地枸橼酸杆菌、1株溶血不动杆菌的菌落呈假阳性(见表1)。比较沙门菌在3种平板上的菌落数、单个菌落生长大小和对非沙门菌落的抑制能力,CAS最佳,XLD稍逊,WS较差。

表1 3种沙门菌分离平板对保存菌株的敏感性与特异性

平板	沙门菌(n=42)		敏感性 (%)	非沙门菌(n=86)						特异性 (%)
	非伤寒副伤寒(n=26)	伤寒副伤寒(n=16)		肠杆菌属(n=10)	枸橼酸杆菌(n=6)	埃希菌(n=15)	非发酵菌(n=8)	酵母菌(n=4)	其他*(n=43)	
CAS	26	16	100.0	0	0	2	2	1	0	94.2
WS	21	3	57.1	1	5	0	2	0	0	90.7
XLD	25	11	85.7	0	3	0	1	0	0	95.3

[注]*:包括痢疾杆菌(8株)、致病性弧菌(20株)、李斯特菌属(6株)、葡萄球菌属(6株)、肠球菌属(3株)。

2.2 平板现场分离比较

应用CAS和WS对非流行季节的917份和流行季节的800份公共场所和食品从业人员体检肛拭标本进行单盲法现场检测。CAS检出4株沙门菌(其中1株伤寒沙门菌)和15株沙门菌,总检出率1.1%(19/1717),以16株沙门菌为合计阳性数,CAS敏感性为100.0%、特异性为99.4%;而WS只检出1株和5株沙门菌,总检出率0.4%(6/1717),敏感性为31.6%、特异性

为96.6%。在非流行季节CAS与WS的分离检出结果差异无统计学意义($\chi^2=0.8, P>0.05$);但是在流行季节CAS与WS的分离检出结果差异有统计学意义($\chi^2=5.1, P<0.05$);CAS能够反映出在不同流行季节中从业人员沙门菌带菌率的差异,而WS却没有。WS琼脂平板漏检的13株沙门菌分布除1株伤寒沙门菌外,主要是B群德比沙门菌(7株),另有1株阿贡纳、2株肠炎、1株伦敦、1株阿伯丁沙门菌(见表2)。

表 2 CAS 与 WS 单盲法现场分离效果比较

平板种类	非流行季节 (n=917)			流行季节 (n=800)			合计 (n=1717)			敏感性 (%)	特异性 (%)
	疑似阳性数	确认阳性数	阳性率 (%)	疑似阳性数	确认阳性数	阳性率 (%)	疑似阳性数	确认阳性数	阳性率 (%)		
CAS	12	4*	0.4 ^a	17	15	1.9 ^c	29 ^e	19	1.1	100.0	99.4
WS	52	1	0.1 ^b	24	5	0.6 ^d	76 ^f	6	0.4	31.6	96.6

[注]*: 其中 1 株伤寒沙门菌; a 与 b 相比: $\chi^2=0.8, P>0.05$; c 与 d 相比: $\chi^2=5.1, P<0.05$; a 与 e 相比: $\chi^2=6.4, P<0.01$; b 与 f 相比: $\chi^2=1.9, P>0.05$; e: 多为铜绿假单胞菌等非发酵菌; f: 多数为弗劳地枸橼酸杆菌, 部分为摩根肠杆菌和大肠埃希菌。

2.3 增菌液的现场应用比较

SBG 与 SF 增菌液分别和 WS、XLD 进行配伍使用单盲法同步检测流行季节与非流行季节公共场所和食品从业人员体检肛拭标本。在非流行季节的 1 000 件标本中: SF 配伍 WS 和 XLD 没有分离到沙门菌, SBG 配伍 WS 和 XLD 分别分离到 6 株和 9 株沙门菌 ($\chi^2=0, P>0.05$); 在流行季节的 1 000 件样品中: SBG 配伍 WS 和 XLD 分别分离到 22 株和 30 株沙门菌 ($\chi^2=0, P>0.05$), 而 SF 配伍 WS 和 XLD 步骤则被技术人员拒做而未检测。平板分离结果的阳性预测值 XLD (9/11、30/32) 优于 WS (6/9、22/27) (见表 3)。

表 3 现场测试单盲法比较选择性增菌液与平板组合

项目	非流行季节				流行季节			
	SBG		SF		SBG		SF	
	WS	XLD	WS	XLD	WS	XLD	WS	XLD
样品数	1000	1000	1000	1000	1000	1000	ND	ND
初筛疑似阳性数	9	11	21	10	27	32	—	—
确认阳性数	6	9	0	0	22	30	—	—
阳性率 (%)	0.6	0.9	0.0	0.0	2.2	3.0	—	—

[注] ND: 未检测。

2.4 沙门菌优化方法的应用

使用 SBG-XLD/CAS 检测 2008 年静安区公共场所和食品从业人员肠道体检肛拭标本。年度共分离沙门菌 129 株 (0.4%, 129/29 687), 阳性菌株数分别是 2006 年 22 株 (0.08%, 22/29 005) 的 8 倍和 2007 年 12 株 (0.04%, 12/30 577) 的 10 倍。根据沙门菌月度分离率制图与 2006 年、2007 年使用传统分离方法的分离率进行比较(见图 1): 在同期(6~10 月)沙门菌流行季节, 2008 年月度阳性分离率是 2006 年、2007 年的 2~10 倍; 其他非流行季节, 2008 年也均明显高于 2006 年和 2007 年同期的月度阳性分离率。

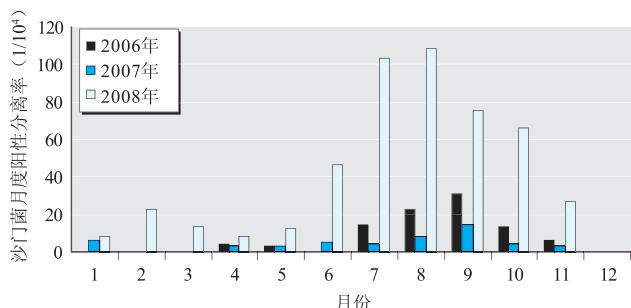


图 1 沙门菌传统方法与优化方法检测体检肛拭样品月度阳性率 (2006~2008 年)

3 讨论

聚合酶链反应 (PCR) 和实时荧光-PCR 技术在处置应急突

发食源性事件中发挥着快速响应的技术优势, 但是由于成本和实验室硬件方面的限制尚未能常规应用, 已有案例表明由于沙门菌靶基因的天然缺失致使 PCR 的结果也存在“假阴性”^[3]。对临床腹泻病人的粪便标本应用常规细菌学分离技术仍在目前全球性非伤寒沙门菌食源性和感染性监测网络 (GFN) 中发挥着重要作用^[4]。众所周知, 除了样品含菌量少、技术人员的操作经验、分离材料的品牌和批间差异外, 分离平板和增菌液是影响分离效果的重要因素。有文献报道, 北京两家医院 7、8 月份间对食堂内从事食品加工的厨房操作人员体检发现沙门菌带菌率竟达 8%, 和我们长期预测的预防性体检阳性率(不足 0.8‰)过于悬殊^[5]。所以, 当食品沙门菌国家标准率先引进沙门菌显色培养基以后, 我们也积极探索优化方法, 提高分离敏感性。

CAS 的原理是辛酸盐和 X-Gal 两种底物与沙门菌特有的酶反应形成酒红色菌落, 本次菌株测试证实: 肠杆菌科中“假阳性”菌落少, 铜绿假单胞菌“假阳性”菌落通过氧化酶和糖管生化鉴别即可剔除; 伤寒-非伤寒沙门菌符合率 100%; XLD 的原理是细菌产生硫化氢并分解木糖产酸与赖氨酸脱羧酶反应产碱后的中和反应使菌落复原成淡红色, 菌株测试表明: 相比 WS 仅用乳糖发酵-指示剂系统, 辅助胆盐抑制杂菌的原理, XLD 虽对沙门菌和具有相似生化特征的细菌(诸如枸橼酸杆菌、普鲁菲登肠杆菌、爱德华肠杆菌、变形杆菌等)更具有甄别力, 但仍无法鉴别伤寒和甲型副伤寒沙门菌。

通过卢湾区现场样品分离证实, 在相同的 SF 增菌液中, CAS 除对非伤寒沙门菌的检测能力高于 WS 外, 还检到 1 株伤寒沙门菌, 阳性率 (1.1%) 比 WS 高 3 倍以上。但经评估 2 种选择性增菌液的检测差异后认为: 增菌液在检测体系中的作用远大于分离平板。原因在于 SBG 在 18~22 h 达到增菌曲线的最大值后波动度小, 而 SF 在 8~12 h 菌量达到高峰后呈快速下降而影响最终平板的分离效果^[6]。所以用 SBG 增菌过夜达到高峰易被平板分离, 而 SF 过夜培养划线分离的步骤, 因错过增菌高峰期而降低了分离率。综合以上结果, 使用 CAS 和 XLD 配伍 SBG 增菌液的优化方法能用于包括伤寒沙门菌在内的所有沙门菌检测, 并在 2008 年预防性健康体检的大样本分离中得到证实, 阳性曲线呈正态分布, 符合肠道病原菌的流行病学特征, 高峰时达到 1% 以上的阳性率。

做好从业人员中沙门菌的预防性体检对分析、预测非伤寒沙门菌导致的食源性疾病疫情和研究沙门菌的生态学与致病性有重要的意义^[7]。优化的检测方法具有容易掌握、敏感性高等特点, 推广应用可提高肠道门诊腹泻病人中沙门菌的检出率。

(下转第 744 页)

草胺原药染毒浓度的增加,各剂量组的RS、RSG、RTG皆呈下降趋势,最高剂量组的RS为13.57%、RSG为20.00%,RTG为20.57%,表现出较大的细胞毒性,明显抑制了TK6细胞的生长。而对其总突变频率(TMFR)观察发现:TK6细胞TK位点的总突变频率随染毒剂量的增加有升高的趋势,但最高剂量组的TMFR仅达 8.23×10^{-6} ,明显低于阳性对照组(58.20×10^{-6} , $P < 0.01$),与阴性对照组、溶剂对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示在已产生明显细胞毒性的情况下,95%乙草胺原药尚不能诱发TK6细胞的突变频率明显增加,因此,在本研究的检测剂量范围内其无诱导TK6细胞基因突变的作用。

由于体内实验可能更接近遗传毒性危害性鉴定的目标,因此,毒理学评价常在体外实验的基础上,同时进行体内实验。作为一种经典、稳定的体内致突变试验方法,微核不但能检测染色体完整性受损,尚能判定染色体分离异常。本试验采用95%乙草胺原药对小鼠进行染毒,发现各染毒组小鼠的微核率与阴性对照组接近,差异无统计学意义($P > 0.05$)。同时对阴性对照组和染毒组的嗜多染红细胞与成熟红细胞的比值(PCE/NCE)进行观察,发现给药后该比值未见明显降低,表明染毒剂量对小鼠骨髓细胞无明显毒性作用。因此认为,95%乙草胺原药无明显致小鼠骨髓细胞染色体完整性受损及染色体分离异常的作用。

此外,结合本实验室遗传毒性评价试验中其他试验的结果(染色体畸变试验和Ames试验均为阴性),可进一步验证95%乙草胺原药在内外均无遗传毒性。本研究结果的获得丰富了95%乙草胺原药的致突变性资料,可为其安全使用及农药管理登记提供依据。同时,鉴于目前正在修订的《农药登记毒理学试验方法》已将TK基因突变试验列为致突变性评价的必选实验,本研究可为该试验方法推广应用于农药安全性评价提供依据。

(上接第741页)

参考文献:

- [1] KIMURA A C, PALUMBO M S, MEYERS H, et al. A multi-state outbreak of *Salmonella* serotype Thompson infection from commercially distributed bread contaminated by an ill food handler[J]. *Epidemiol Infect*, 2005, 133(5): 823-828.
- [2] 许学斌,顾宝柯,杨兰萍,等.5种沙门菌分离培养基的应用和比较[J].中国卫生检验杂志,2005,15(7): 773-775.
- [3] 许学斌,袁政安,金汇明,等.上海市山夫登堡沙门菌流行特征和分子分型研究[J].中华流行病学杂志,2009,30(9): 933-937.
- [4] 顾宝柯,袁政安,金汇明.上海市沙门菌病流行特征分析[J].环境与职业医学,2008,25(3): 245-247.

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB 15193. 20—2003 食品安全性毒理学评价程序和方法: TK基因突变试验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 123-127.
- [2] 李华文, 陆丹, 吴军, 等. 乙草胺经皮毒性的研究[J]. 毒理学杂志, 2008, 22(4): 327-329.
- [3] 周启星, 孙福红, 郭观林, 等. 乙草胺对东北黑土铅形态及生物有效性的影响[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1883-1886.
- [4] OECD. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, 476. In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test [EB/OL]. [2009-05-01]. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9747601e.pdf?expires=1292550219&id=0000&accname=freeContent&checksum=1C3BDC434977A4344C0146D1B3E53CBD>.
- [5] 丁晓琴, 陈杰, 张立实. 用TK基因突变试验评价葛根素的抗诱变性[J]. 癌变·畸变·突变, 2007, 19(6): 463-465.
- [6] 帅培强, 张立实, 王怡净. L5178Y与TK6细胞的TK基因突变实验比较[J]. 四川大学学报: 医学版, 2004, 35(5): 650-653.
- [7] 国家技术监督局. GB15670—1995 农药登记毒理学试验方法: 小鼠骨髓多染红细胞微核试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995: 16-17.
- [8] 袁健, 曹佳. 小鼠淋巴瘤细胞试验用于突变检测的研究进展[J]. 毒理学杂志, 2005, 19(4): 328-330.
- [9] 赵洁, 胡燕平, 宋捷, 等. 运用小鼠淋巴瘤细胞基因突变试验测定4,4'-二甲基二苯基碘翁盐六氟磷酸盐的遗传毒性[J]. 中国药理学与毒理学, 2006, 20(6): 500-503.

(收稿日期: 2009-12-31)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 王晓宇; 校对: 徐新春)

- [5] LUO Y P, LI J Y, MA Y, et al. Isolation and characterization of nontyphoid *Salmonella* from hospital food handlers in Beijing, China [J]. *J Food Safety*, 2009, 29(3): 414-423.
- [6] FEDER I, NIETFELD J C, KELLY B, et al. Evaluation of enrichment techniques for the isolation of *Salmonella choleraesuis* from swine feces [J]. *J Microbiol Methods*, 1998, 33(2): 143-151.
- [7] 朱超, 许学斌. 沙门菌血清型诊断[M]. 上海: 同济大学出版社, 2009: 86-127.

(收稿日期: 2009-10-23)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 徐新春; 校对: 王晓宇)