

- [8] LAOHAPRERTTHISAN V, CHOWDHURY A, KONGMUANG U, et al. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand [J]. Epidemiol Infect, 2003, 130 (3): 395-406.
- [9] VUDDHAKUL V, CHOWDHURY A, LAOHAPRERTTHISAN V et al. Isolation of a pandemic O3: K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (6):2685-2689.
- [10] CHOWDHURY N R, CHAKRABORTY S, RAMAMURTHY T, et al. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains[J]. Emerg Infect Dis,2000,6(6):631-636.
- [11] VUDDHAKUL V, SOBOON S, SUNGHIRAN W, et al. Distribution of virulent and pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* in three molluscan shellfish species (Meretrix meretrix, Perna viridis, and Anadara granosa) and their association with food-borne disease in southern Thailand [J]. J Food Prot,2006,69(11):2615-2620.
- [12] BHOOPONG P, PALITTAPONGARNPIM P, POMWISED R, et al. Variability of properties of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from individual patients[J]. J Clin Microbiol,2007,45 (5):1544-1550.

论著

两种选择性培养基 HE、CAS 检测沙门菌效果的比较

闫琳,王晓英,郭云昌,裴晓燕,余东敏

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 比较两种沙门菌选择性培养基 HE 和 CAS 在食物样本检测中的敏感性、准确性和时效性。方法 观察典型沙门菌和非沙门菌在两种选择培养基上的生长状况和菌落形态。通过人工染菌实验,比较两种选择性培养基分离沙门菌的检测效果。采集 16 份市售整鸡样本,进一步比较两种培养基沙门菌的阳性检出率。**结果** 沙门菌在 HE 平板上为绿色菌落,大多有黑心;在 CAS 平板上为紫色菌落。含菌量为 10 CFU/25 g 鸡肉样本,经 SC 增菌液增菌 8 h,可用 CAS 检出沙门菌;而采用 HE 则需增菌 18 h 才可检出。16 份整鸡样本,增菌 8、12 和 18 h,采用 CAS 的阳性检出率分别为 43.75%、31.25% 和 37.5%,相应时间下采用 HE 的阳性检出率分别为 18.75%、25% 和 18.75%。8 份新鲜整鸡样本,检出 4 份阳性;8 份冷冻整鸡样本,检出 3 份阳性。**结论** CAS 选择性平板可抑制大多杂菌生长,沙门菌在其上菌落形态较易鉴别。CAS 分离沙门菌的检出时限和检测灵敏度都明显优于 HE,建议在食物样本检测沙门菌时应首选 CAS。

关键词:HE 培养基;CAS 培养基;沙门菌;比较

中图分类号:R155.5 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)02-0118-05

Comparing the effectiveness of two selective media HE and CAS for the detection of *Salmonella* in foods

Yan Lin, Wang Xiaoying, Guo Yunchang, Pei Xiaoyan, Yu Dongmin

(National Institute for Nutrition and Food Safety , China CDC , Beijing 100021 , China)

Abstract: Objective To compare the effectiveness of two kinds of selective media HE (hektoen enteric agar) and CAS (CHROM agar *Salmonella* medium) on the detection of *Salmonella* in food samples. **Methods** The growth status and the morphology of *Salmonella* and non-*Salmonella* colonies on HE and CAS were observed. Twenty five grams of chicken meat were distributed in 225 ml of SC (Selenite Cystine Broth) and *Salmonella* standard strain CMCC 50041 was used to perform artificially-contaminated experiments. The final concentration of *Salmonella* for each sample was 0, 1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 CFU per 25g poultry respectively. All samples were incubated at 37 °C for 0, 4, 8, 12 and 18 h. One loop from each culture medium taken at different incubation time was streaked on HE or CAS plates. The suspected *Salmonella*

收稿日期:2010-09-20

基金项目:国家自然科学基金(30571575);科技部科研院所技术开发研究专项(2009EG150293)

作者简介:闫琳 女 硕士生 研究方向为食品微生物学 Email:yanlin1224@sina.com

通信作者:王晓英 女 研究员 硕士生导师 研究方向为食品微生物学

colonies were confirmed by API 20E. The sensitivity of two media on the isolation of *Salmonella* was compared. Sixteen retail whole chicken samples collected from markets in Beijing were examined by HE and CAS plates after enriched at 37 °C for 8, 12 and 18 h in SC, and the positive rates by HE and CAS plates were compared. **Results** The colony of *Salmonella* spp. on HE is green, most are black in the center, but that on CAS is mauve. *Salmonella* could be isolated by CAS from poultry samples containing at least 10 CFU per 25 g samples after being enriched for 8h in SC; but 18h of enrichment was needed for achieving the same result with HE. The positive rates of *Salmonella* for 16 whole chicken samples were 43.75%, 31.25% and 37.5% by CAS after enrichment for 8, 12 and 18h respectively; and the positive rate were 18.75%, 25% and 18.75% by HE, correspondingly. *Salmonella* in 4 of 8 fresh whole chicken samples were positive, whereas in 3 of 8 frozen whole chicken samples were positive. **Conclusion** The growth of most non-*Salmonella* could be restrained by the selective medium CAS. The morphology of *Salmonella* colonies could be distinguished easily from other bacteria. The time limit and sensitivity of detection for *Salmonella* with CAS are significantly better than that with HE. It is suggested that CAS is the first choice on screening *Salmonella* in food samples.

Key words: HE; CAS; selective medium; *Salmonella* isolation; comparison of effectiveness

沙门菌是一种重要的食源性致病菌,是引起许多国家食源性细菌肠炎的主要原因之一^[1-3]。目前国内沙门菌的检测仍以常规分离培养结合生化鉴定为主,而生化鉴定的前提就是在选择性平板上挑取可疑的单菌落。HE 琼脂(hektoen enteric agar)和科马嘉沙门菌显色培养基(CHROMagar *Salmonella* medium,CAS)是目前国内实验室检测中常用的两种选择性培养基。本研究通过比较沙门菌和非沙门菌株在两种选择培养基上的生长状况,观察不同菌的菌落形态;根据对禽肉样本人工染菌实验,比较这两种选择性培养基沙门菌分离效果和检出敏感性;通过对 16 份市售整鸡样本进行检测,比较并确证两种选择性培养基沙门菌的分离效果及阳性检出率。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

恒温培养箱(德国 MMM),BagMixer 均质器(法国 Interscience),高压灭菌锅(日本 Sanyo 公司)。

营养肉汤、营养琼脂、SC 增菌液(selenite cystine broth, 亚硒酸盐胱氨酸)和 HE 琼脂为北京陆桥产品,CAS 为法国科马嘉产品,均购自北京陆桥技术有限公司,按照说明书制备;API 20E 试剂条为法国梅里埃产品,购自北京威泰科公司;沙门菌血清为丹麦 Statens Serum Institute 产品。

1.2 菌株

15 株沙门菌标准株,15 株沙门菌分离株及 18 株非沙门菌,详见表 1。

1.3 样本

人工染菌样本为超市购买的带包装的冷冻整鸡,16 份待检样本购自当地超市及农贸市场,其中新鲜整鸡和冷冻整鸡各 8 份。

1.4 菌株的培养

将本实验所用的冻存菌株分别接种营养肉汤,37 °C 培养 18 ~ 24 h 复苏菌株,再划线接种于营养琼脂平板,37 °C 培养 18 ~ 24 h。挑取单个菌落分别接种 HE 平板和 CAS 平板,37 °C 培养 18 ~ 24 h,观察菌落生长情况及其形态。

1.5 菌落计数

取 18 ~ 24 h 纯培养的沙门菌 CMCC 50041,用生理盐水制菌悬液,采用系列稀释法进行稀释,选取 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} 稀释度的菌悬液各取 0.1 ml 涂布营养琼脂板,每个稀释度 2 个平板,37 °C 培养 18 ~ 24 h,将制备好的各稀释度的菌液于 4 °C 冰箱保存备用。

1.6 人工染菌

根据菌落计数结果,确定菌悬液的菌浓度。无菌操作分别称取同一只鸡的 25 g 鸡肉样本于 225 ml 的 SC 选择性增菌液中,共 8 份。分别取 1 ml 不同浓度的菌液,接种鸡肉样本。接种菌的终浓度大致分别为每 25 g 样本 1 、 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 CFU,1 份样本不染菌为背景值对照,用均质器拍击混匀(60 次/min 拍击 1 min),于 37 °C 培养,分别在 0、4、8、12 和 18 h 取一环菌液划线接种 HE 和 CAS,37 °C 培养 18 ~ 24 h,挑取两个平板上的可疑菌落用 API 20E 试剂条进行鉴定。

1.7 市售样本的检测

16 份整鸡样本,1 ~ 8 号为新鲜整鸡,9 ~ 16 号为冷冻整鸡。每份样本无菌操作称取 25 g,分别加入到 225 ml 的 SC 增菌液中,37 °C 培养。在培养 8、12 和 18 h,各取一环培养液划线接种 HE 和 CAS 平板,37 °C 培养 18 ~ 24 h,挑取可疑菌落划线接种营养琼脂板,用 API 20E 试剂条进行鉴定。

1.8 分离菌株的血清分型

经 API 20E 确证为沙门菌的菌株,进行血清分型实验。

表1 实验所用菌株

Table 1 Strains used in the study

菌株类型	菌株名称	菌株编号	菌株来源
沙门标准株	鼠伤寒沙门菌	CMCC 50013	中国生物药品制品检定所
	肠炎沙门菌	CMCC 50041	中国生物药品制品检定所
	阿伯丁沙门菌	CMCC 50107	中国生物药品制品检定所
	山夫登堡沙门菌	CMCC 50200	中国生物药品制品检定所
	伤寒沙门菌	CMCC 50205	中国生物药品制品检定所
	乙型副伤寒沙门菌	CMCC 50221	中国生物药品制品检定所
	甲型副伤寒沙门菌	CMCC 50670	中国生物药品制品检定所
	丙型副伤寒沙门菌	CMCC 50729	中国生物药品制品检定所
	猪霍乱沙门菌	CMCC 50730	中国生物药品制品检定所
	汤卜逊沙门菌	CMCC 50735	中国生物药品制品检定所
	科特布斯沙门菌	CMCC 50748	中国生物药品制品检定所
	都伯林沙门菌	CMCC 50761	中国生物药品制品检定所
	鸭沙门菌	CMCC 50774	中国生物药品制品检定所
	纽波特沙门菌	CMCC 50854	中国生物药品制品检定所
	基桑加它沙门菌	CMCC 50860	中国生物药品制品检定所
	鼠伤寒沙门菌	07S99,07S125	本实验室保存
沙门分离株	肠炎沙门菌	07S182,07S197	本实验室保存
	猪霍乱沙门菌	07S66	本实验室保存
	汤卜逊沙门菌	07S127	本实验室保存
	都伯林沙门菌	07S121	本实验室保存
	鸭沙门菌	07S65,07S117	本实验室保存
	纽波特沙门菌	07S360	本实验室保存
	贝塔沙门菌	07S60	本实验室保存
	阿贡纳沙门菌	07S116	本实验室保存
	德尔卑沙门菌	07S131	本实验室保存
	布利丹沙门菌	07S140	本实验室保存
	肯塔基沙门菌	07S254	本实验室保存
	阪崎肠杆菌	25,36	本实验室保存
	阴沟肠杆菌	SD11,Z36-2	本实验室保存
	大肠埃希菌	ATCC 25922	中国生物药品制品检定所
	肠出血性大肠埃 0157:H7	edl 933	本实验室保存
	产酸克雷伯菌	HE 3	本实验室保存
非沙门菌	肺炎克雷伯菌肺炎亚种	SX13-11,X5	本实验室保存
	普通变形杆菌	H17	本实验室保存
	奇异变形杆菌	48	本实验室保存
	成团泛菌	1205333	本实验室保存
	泛菌属某些种	Z36-3	本实验室保存
	蜂房哈夫尼菌	C23	本实验室保存
	杨氏枸橼酸杆菌	31	本实验室保存
	浅金黄单孢菌	FJ19-19	本实验室保存
	单核细胞增生李斯特菌	CMCC 54004	中国生物药品制品检定所
	金黄色葡萄球菌	ATCC 26071	中国生物药品制品检定所

2 结果

2.1 各菌株的菌落形态

各沙门菌在 HE 上为绿色圆形菌落, 表面湿润, 除甲型副伤寒沙门菌 CMCC 50670 和猪霍乱沙门菌 CMCC 50730 没有黑心外, 其余沙门菌都有黑心; 在 CAS 上, 沙门菌都为紫色圆形菌落。18 株非沙门菌在 HE 上大部分呈现黄绿色、橘黄色菌落; 蜂房哈夫尼菌和泛菌属某些种等个别菌株呈现绿色菌落但无黑心; 奇异变形杆菌和杨氏枸橼酸杆菌出现绿色有黑心菌落。18 株非沙门菌在 CAS 上不生长或呈现其他

颜色, 没有出现假阳性菌落。其中单核细胞增生李斯特菌和金黄色葡萄球菌在 CAS 上不生长; 阪崎肠杆菌、阴沟肠杆菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、杨氏枸橼酸杆菌和泛菌属呈铁蓝色或蓝色菌落; 变形杆菌为白色半透明菌落, 蜂房哈夫尼菌为浅灰色菌落。

由此可以看出 CAS 抑制其他菌生长的能力较 HE 强, 在该培养基上沙门菌的菌落形态更容易和其他菌落相区别。

2.2 菌落计数结果

3 个稀释度的平板计数结果依次呈 10 倍关系, 说明稀释准确, 涂布均匀, 结果可信。其中 10^{-7} 的

平板上生长的菌落数平均为 10 个,经计算确定原菌液的细菌浓度为 1×10^9 CFU/ml。

2.3 人工染菌实验结果

根据菌落计数结果,每 25 g 样本含菌量分别为

1、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 CFU,还有 1 份不含菌的背景值对照。不同浓度、不同增菌时间的染菌样本经 HE 和 CAS 分离并经 API 20E 鉴定为沙门菌的检测结果见表 2。

表 2 HE、CAS 对不同浓度、不同增菌时间的染菌样本分离鉴定结果

Table 2 Identification of salmonella in artificially-contaminated samples with HE and CAS under different concentrations of

Salmonella and various enrichment time

增菌时间 (h)	选择性平板	染菌量(CFU/25 g 样本)						
		0	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
0	HE	—	—	—	—	—	+	+
	CAS	—	—	—	—	—	+	+
4	HE	—	—	—	—	—	+	+
	CAS	—	—	—	—	—	+	+
8	HE	—	—	—	+	+	+	+
	CAS	—	—	+	+	+	+	+
12	HE	—	—	—	+	+	+	+
	CAS	—	—	+	+	+	+	+
18	HE	—	—	+	+	+	+	+
	CAS	—	—	+	+	+	+	+

注: + 检出, - 未检出。

样本背景值为阴性,人工染菌样本经过增菌培养,两种平板检测的灵敏度得到很大的提高。从分离效果看,CAS 上沙门菌的菌落形态明显,易与其他杂菌区别,干扰小。在相同增菌时间下,CAS 的检测敏感性好于或等于 HE。10 CFU/25 g 的染菌样本,采用 CAS 平板分离检出阳性,需 SC 增菌 8 h;而采用 HE 分离检出阳性,需 SC 增菌 18 h。对沙门

菌污染量大于 10^4 CFU/25 g 禽肉样本,按操作制成样液后,不经培养直接在两种培养基上划线分离,都可以检测得出阳性结果。

2.4 市售样本的检测结果

16 份待检整鸡样本在增菌 8、12 和 18 h 后,HE 和 CAS 分离检出的阳性结果见表 3。可见,CAS 的检测敏感性和时效性明显优于 HE。

表 3 HE、CAS 对市售样本的阳性检出结果比较

Table 3 The positive rate of retail samples detected with HE and CAS

增菌时间 (h)	HE 划线分离检测			CAS 划线分离检测		
	阳性份数	阳性样本编号	阳性率(%)	阳性份数	阳性样本编号	阳性率(%)
8	3	6、8、12	18.75	7	5、6、7、8、12、13、14	43.75
12	4	5、6、12、13	25.00	5	5、7、12、13、14	31.25
18	3	12、13、14	18.75	6	5、6、7、12、13、14	37.50

16 份样本中,沙门菌阳性样本分别为 5、6、7、8、12、13 和 14 号,对应分离的沙门菌编号为 5、6、7、8、12、13 和 14。其中 8 份新鲜整鸡样本,检出 4 份阳性,阳性率 50.00%;8 份冷冻整鸡样本检出 3 份阳性,阳性率 37.50%。

2.5 分离菌株的血清学分型

经血清学分型,确定 5、6、7、8、12 和 14 号菌株为肠炎沙门菌,13 号为汤卜逊沙门菌。

3 讨论

沙门菌是广泛存在于自然界的一种食源性致病菌,主要通过食品和水传播感染人体。目前食品样本中沙门菌的检测仍以传统的细菌培养法为主,而从选择性平板上分离可疑菌落是该方法的关键步骤之一。HE 属于中度抑制性的选择性培养基,

价格低廉,但选择性不强,容易错挑假阳性菌落造成漏检,另外把假阳性当可疑菌株检测,也浪费时间和人力物力。CAS 是一种显色培养基,自 20 世纪 90 年代问世以来,因其高敏感性和特异性受到人们的喜爱,但是价格稍高。其原理是沙门菌可以产生特异性的酯酶,和培养基中的显色物质作用,产生紫色的不溶物质,而多数细菌被抑制不生长,一些细菌生长但呈其他颜色从而得以和沙门菌区别。CAS 上可能出现的假阳性菌有:白色念珠菌、铜绿假单胞菌和嗜水气单胞菌。白色念珠菌是唯一在 CAS 上生长为紫红色的酵母生物体,但形成的菌落比沙门菌更小,菌落为突起状。铜绿假单胞菌和嗜水气单胞菌从微生物形态上无法和沙门菌区别,但可以通过氧化酶及极性鞭毛这些简单的试验区别。根据 Eigner 等^[4]的研究结果加入头孢磺啶和两性

霉素 B 可一定程度上抑制酵母菌和假单孢细菌在 CAS 上的生长, 提高检测的特异性。

目前国内外对临床样本用 HE 和 CAS 分离沙门菌的效果进行比对研究的较多, 而食物样本中两种选择性培养基的研究较少。Gaillot 等^[5]用 501 株共 38 个血清型的沙门菌在 HE 和 CAS 上分离划线, 结果 CAS 上 100% 出现目的菌落, 而 HE 上有 5 株为绿色无黑心, 其他的为绿色有黑心菌落。研究者从 508 份临床的粪便样本共检测出 20 株沙门菌。不经过增菌培养, 直接平板分离在 CAS 和 HE 上的结果是 19 株和 16 株, 而经过增菌培养后, 两种平板上都可达到 100% 的分离效果。2009 年, 张颖和潘春枝^[6]将 1 000 份腹泻便标本增菌后接种 CAS 和 HE 做比对试验, 结果 CAS 阳性检出率为 1.6%, HE 阳性检出率为 1.4%, 可见 CAS 沙门菌的检出率优于 HE, 适于腹泻标本中沙门菌的检测。

沙门菌多污染禽肉, 故本研究采用鸡肉样本进行人工染菌实验, 比较选择性培养基 HE、CAS 对该菌的分离效果、检测时限和检出限。从增菌前后平板的分离效果看, 很明显增菌培养可提高分离平板检测的敏感性, 在一定时间内, 增菌时间越长, 敏感性越高, 这与 Forward 等^[7]和 Kelly 等^[8]的实验结论一致。实验结果表明, 对于 10 CFU/25g 的染菌样本, 若采用 CAS 平板分离检出阳性, 需增菌培养 8 h; 采用 HE 分离检出阳性, 需增菌培养 18 h。通过两种选择性培养基对市售样本阳性检出率的比较, 说明 CAS 分离检测的敏感性和时效性都优于 HE。在本实验中, 样本检测结果显示, 同一种选择性培养基在增菌时间不同的情况下, 检出阳性的样本数和样本号有所不同, 可能与下述情况有关: ① 在选择性平板划线时, 仅取一环培养液, 可能没有取上沙门菌; ② 杂菌较多, 在选择性平板上目的菌没有形成清晰可见的菌落; ③ 对选择平板上出现的可疑菌落, 只是挑取 3~4 个进行鉴定, 有可能错挑或漏挑。如用 HE 分离时, 发现容易受到奇异变形杆菌和柠檬酸杆菌的干扰, CAS 分离时容易受到嗜水气单胞菌的干扰, 造成错挑和漏挑。值得注意的是, SC 为选择性增菌液, 但并不能绝对抑制所有杂菌生长, 其含有的亚硒酸盐易氧化, 一旦氧化, 抑菌作用就减弱或消失, 杂菌就会与沙门菌竞争生长, 降低目的菌的检出效果。人工染菌实验和实际样

本的检测结果表明, 经 SC 增菌培养 8 h, 采用 CAS 平板分离检测更加敏感和特异, 并且大大缩短了检测时限, 较国标方法提前 1~2 d。从两类样本的检出结果分析, 猜测冷冻整鸡由于运输和贮存中保持冷链系统, 沙门菌污染和繁殖的几率降低, 故阳性检出率低于新鲜整鸡中的阳性检出率。

综上所述, 虽然 CAS 的成本较 HE 高一些, 但采用该平板分离沙门菌较易鉴别且直观, 该培养基可抑制大部分杂菌生长从而减少实验干扰, 且 CAS 平板的检出时限和检测灵敏度都明显优于 HE, 故建议在食物样本检测沙门菌时首选 CAS 平板, 经费有限的地区可结合自身情况另做选择。本研究所选菌株及检测食物的种类和数量有限, 所得结果和结论可能具有一定的片面性, 有待进一步验证。

参考文献

- [1] TIRADO C, SCHMIDT K. WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe [J]. *J Infect*, 2001, 43(1): 80-84.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-selected sites, United States, 2003 [J]. *MMWR*, 2004, 53(16):338-343.
- [3] 刘秀梅, 陈艳, 王晓英, 等. 1992~2001 年食源性疾病暴发资料分析: 国家食源性疾病监测网 [J]. 卫生研究, 2004, 33(6):725-727.
- [4] EIGNER U, REISSBRODT R, HAMMANN R, et al. Evaluation of a new chromogenic medium for the isolation and presumptive identification of *Salmonella* species from stool specimens [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2001, 20:558-565.
- [5] GAILLOT O, DI CAMILLO P, BERCHE P, et al. Comparison of CHROMagar *Salmonella* medium and Hektoen enteric agar for isolation of salmonellae from stool samples [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(3):762-765.
- [6] 张颖, 潘春枝. 沙门菌显色培养基 CHROMagar 与普通培养基 SS、HE 的比对实验 [J]. 当代医学, 2009, 36(15):191-192.
- [7] FORWARD K R, RAINNIE B J. Use of selenite enrichment broth for the detection of *Salmonella* from stool: a report of one year experience at a provincial public health laboratory [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1997, 29(4):215-217.
- [8] KELLY S, CORMICAN M, PARKE L, et al. Cost-effective methods for isolation of *Salmonella enterica* in the clinical laboratory [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(10):336-339.