

铜绿假单胞菌检测能力验证结果与分析

张洪伟, 周浩*, 朱文斌, 杨红, 李俊霞, 王同智, 朱虹霖

(成都市食品药品检验研究院, 成都 610000)

摘要: **目的** 分析实验室对饮用水中铜绿假单胞菌检测能力验证结果。**方法** 依据能力验证作业指导书并参照 GB 4789.2-2016 对样品进行稀释, 根据 GB 8538-2016 进行检测, 同时对可疑菌落使用 API 20NE 与 VITEK2 进行辅助鉴定。**结果** 样品 18-N361、18-U838 能力验证结果为满意。**结论** 通过此次能力验证, 解决了饮用水样品的稀释问题, 验证了 API 20NE 与 VITEK2 对可疑菌落进行辅助鉴定的准确性。VITEK2 能缩短检验时间。

关键词: 铜绿假单胞菌; 能力验证; 准确性

Validation and analysis of detection capability of *Pseudomonas aeruginosa*

ZHANG Hong-Wei, ZHOU Hao*, ZHU Wen-Bin, YANG Hong, LI Jun-Xia,
WANG Tong-Zhi, ZHU Hong-Lin

(Chengdu Institutes for Food and Drug Control, Chengdu 610000, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the detection capability verification results of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water in laboratory. **Methods** The samples were tested according to GB 8538-2016, which were diluted according to the competency verification instruction and GB 4789.2-2016. The suspected colonies were identified by API 20NE and VITEK2. **Results** The capability verification results of 18-N361 and 18-U838 were satisfactory. **Conclusion** Through this capability verification, the dilution problem of drinking water samples is solved, and the accuracy of API 20NE and VITEK2 in assistant identification of suspected colonies is verified. VITEK2 can shorten the inspection time.

KEY WORDS: *Pseudomonas aeruginosa*; capability verification; accuracy

1 引言

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种常见的条件致病菌,它是一种重要的水源性致病菌,广泛存在于各类型水中,传播途径广泛,对消毒剂、干燥、紫外等理化因素及不良环境具有极强的抵抗力^[1],铜绿假单胞菌能产生多种致病因子^[2],是导致人类急性肠道疾病和皮肤炎症的致病菌^[3]。文献表明饮用水中铜绿假单胞菌的污染情况相当严重^[4-9],所以准确并及时地检测水中是否含有铜绿假单胞菌非常重要。

能力验证是利用实验室间比对来确定实验检测能力的活动,是实验室质量控制的重要方式^[10],它是确保实验室检测结果准确性和提高检测水平的重要手段。为提高微生物实验室检测能力和检验人员技术水平,增强实验室竞争力,2018年我们参加由中国检验检疫科学研究院测试评价中心组织的 ACAS-PT551(2018)矿泉水中铜绿假单胞菌的检测能力验证,本实验室采用 GB 8538-2016^[11]进行检测同时借助非肠道革兰氏阴性杆菌鉴定系统(API 20NE)和全自动微生物生化鉴定系统(VITEK2)对可疑菌落进行辅助鉴定,并参照 GB 4789.2-2016^[12]的稀释方式对样品进行相

*通讯作者: 周浩, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 402241344@qq.com

*Corresponding author: ZHOU Hao, Master, Senior Engineer, Chengdu Institute of Food and Drug Inspection, No.16, Xingmao Street, Jingkai District, Longquanyi District, Chengdu 610000, China. E-mail: 402241344@qq.com

应的稀释,检验结果为满意。通过日常检测发现很多时候250 mL 饮用水过滤后的滤膜上无法形成分散的单个菌落,对计数和挑取可疑菌落都造成了很大的干扰。

通过本次能力验证来验证 API 20NE 和 VITEK2 对铜绿假单胞菌鉴定的准确性和时效性;寻找饮用水样品的稀释方式,为准确地计数铜绿假单胞菌提供技术支撑。

2 材料与方法

2.1 样品来源

样品由中国检验检疫科学研究院测试评价中心提供(编号为 18-N361、18-U838);铜绿假单胞菌(ATCC 27853)和荧光假单胞菌(ATCC 13525)均购自美国菌种保藏中心。

2.2 试剂

假单胞菌琼脂基础培养基(CN)琼脂(以下简称 CN)、营养琼脂、氧化酶试纸、乙酰胺肉汤、钠氏试剂(北京陆桥技术股份有限公司);0.45 μm 滤膜、滤杯(美国 Millipore 公司)、API20NE、VITEK2、革兰氏阴性细菌鉴定卡(GN)(法国生物梅里埃公司)。

2.3 仪器

生化培养箱[日本松下电器研究开发(中国)有限公司];Millipore 多联过滤系统(美国 Millipore 公司);手提式紫外检测灯(上海嘉鹏科技有限公司);VITEK2 (法国生物梅里埃公司)。

2.4 实验方法

2.4.1 样品处理

依据 ASAC-PT551(2018)矿泉水中铜绿假单胞菌的检测能力验证参试指导书^[13]处理样品,在百级环境中打开西

林瓶,加入 10 mL 无菌水进行水化,待溶解后倒入已灭菌并干燥的装有玻璃珠的 1000 mL 三角瓶中,用移液枪吸取西林瓶瓶口残留的菌液,再加入 10 mL 无菌水清洗西林瓶,最后用 100 mL 大肚吸管移取无菌水到三角瓶中,每次移取时都加入一部分到西林瓶中进行清洗,直至三角瓶中菌液为 520 mL 为止。三角瓶中的 520 mL 菌液即为待测液。同时参照 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[11]对样品进行相应的稀释:吸取 25 mL 待测液+225 mL 无菌水混匀即为 1:10 待测液;吸取 25 mL 1:10 待测液+225 mL 无菌水混匀即为 1:100 待测液。

2.4.2 样品过滤与培养

取 250 mL 待测液(原液)加入到 250 mL 的滤杯中经过滤真空隔膜泵(在过滤泵头放置 0.45 μm 的滤膜)过滤,待测液过滤完后用无菌水冲洗杯壁,将过滤后的滤膜贴在 CN 琼脂平皿上(注意琼脂与滤膜接触部分不能有气泡),将贴好滤膜的 CN 琼脂平皿倒置放入到 36 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 48 h。

2.4.3 生化鉴定

按照 GB 8538-2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》^[12]对可疑菌落进行鉴定,同时借助 API 20NE 与 VITEK2 对菌落进行进一步的确认。

3 结果与分析

3.1 菌落特征和计数

样品 18-N361 和 18-u838 在 CN 琼脂平板上的菌落特征及菌落计数见表 1。样品在 1:100 的稀释度平皿上形成了分散的单一菌落,可疑菌落的数目可计,而在其他稀释比例时,菌落较多无法计数。

表 1 可疑菌落计数结果
Table 1 Suspicious colony count results

| 样品号 | 稀释比例 | 培养时间/h | 蓝色/绿色菌落 | | 产荧光(非蓝/绿) | | 红褐色 | |
|---------|-------|--------|---------|------|-----------|------|------|------|
| | | | 平板 1 | 平板 2 | 平板 1 | 平板 2 | 平板 1 | 平板 2 |
| 18-N361 | 原液 | 24 | 0 | / | 多不可计 | / | 0 | / |
| | | 48 | 0 | / | 多不可计 | / | 0 | / |
| | 1:10 | 24 | 0 | 0 | 多不可计 | 多不可计 | 0 | 0 |
| | | 48 | 0 | 0 | 多不可计 | 多不可计 | 0 | 0 |
| | 1:100 | 24 | 0 | 0 | 22 | 25 | 0 | 0 |
| | | 48 | 0 | 0 | 22 | 25 | 0 | 0 |
| 18-U838 | 原液 | 24 | 0 | / | 多不可计 | / | 0 | / |
| | | 48 | 0 | / | 多不可计 | / | 0 | / |
| | 1:10 | 24 | 0 | 0 | 多不可计 | 多不可计 | 0 | 0 |
| | | 48 | 0 | 0 | 多不可计 | 多不可计 | 0 | 0 |
| | 1:100 | 24 | 0 | 0 | 28 | 25 | 0 | 0 |
| | | 48 | 0 | 0 | 28 | 25 | 0 | 0 |

3.2 可疑菌落的确证

分别挑取 5 个产荧光(非蓝/绿)菌落(以下简称为荧光菌落),使用营养琼脂纯化培养 24 h 后,做氧化酶实验,接种到乙酰胺肉汤中 36 °C 培养 24 h 后添加 2 滴纳氏试剂后观察鉴定管中颜色变化(颜色由深黄色到砖红色变化为阳性,其余为阴性)。同时 API 20NE、VITEK2 进行鉴定。鉴定结果见表 2~4。

由表 2~4 可知 18-N361 和 18-U838 上的荧光菌落通过常规生化实验、API 20NE 和 VITEK2 鉴定的结果均为铜绿假单胞菌,18-N361 上的红褐色菌落均鉴定出不是铜绿假单胞菌。结合 API 20NE 和 VITEK2 的结果对 18-N361 和

18-U838 两个能力验证样品的结果分别报送为 2400 CFU/250 mL 和 2700 CFU/250 mL。

表 2 可疑菌落常规生化结果

Table 2 Routine biochemical results of suspicious colonies

| 常规生化实验 | 氧化酶 | 乙酰胺肉汤 |
|--|-----|-------|
| 18-U838 上荧光菌落 1 [#] -5 [#] | + | + |
| 18-N361 上荧光菌落 1 [#] -5 [#] | + | + |
| 18-N361 上红褐色菌落 6 [#] -10 [#] | — | — |

注: +代表阳性、—代表阴性。

表 3 API 20NE 结果

Table 3 Results of API 20NE

| API 20NE | 生化谱 | 鉴定率/% | T 值 | 分类单元 |
|--|------------|-------|------|--------------------------------------|
| 18-U838 上荧光菌落 1 [#] -5 [#] | 均为 1054575 | 99.9 | 0.9 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 18-N361 上荧光菌落 1 [#] -5 [#] | 均为 1054575 | 99.9 | 0.9 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 18-N361 上红褐色菌落 6 [#] -10 [#] | 均为 1200000 | 45.0 | 0.67 | <i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i> |
| | | 43.6 | 0.74 | <i>Pasteurella pneumotopica</i> |

注: 1. *Pseudomonas aeruginosa* 为铜绿假单胞菌, *Psychrobacter phenylpyruvicus* 为苯丙酮酸嗜冷杆菌, *Pasteurella pneumotopica* 为巴斯德杆菌; 2. 18-N361 红褐色菌落 API 20NE 结果为 48 h 以内的鉴定结果不可靠/可能为布鲁菌。

表 4 VITEK2 鉴定结果

Table 4 Identification result by VITEK2

| VITEK2 | 生化谱 | 鉴定率/% | 置信区间 | 结果 |
|--|-------------------------|-------|-----------------------------|-------------------------------|
| U838 荧光菌落 1 [#] -5 [#] | 均为 00034511 03500252 | 99 | Excellent identification | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| N361 荧光菌落 1 [#] -5 [#] | 均为 00034511 03500252 | 99 | Excellent identification | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| N361 红褐色菌落 6 [#] -10 [#] | 均为 40035510 53540210 | 91 | Good identification | <i>Pseudomonas luteola</i> |

注: *Pseudomonas aeruginosa* 为铜绿假单胞菌; *Pseudomonas luteola* 为黄绿假单胞菌。

表 5 生化鉴定所需时间表

Table 5 Time schedule for biochemical identification

| 生化项目 | 鉴定所需时间范围/h |
|----------|------------|
| 常规生化 | 20~120 |
| API 20NE | 24~48 |
| VITEK2 | 5~8 |

由表 5 可知 VITEK2 鉴定出铜绿假单胞菌, 所需时间最短, 常规生化鉴定的时间最长(金氏 B 产荧光实验阴性需要 120 h)。

4 讨论与结论

能力验证结果反应了各实验室检测能力和水平, 是

提高微生物实验室检测能力和检验人员技术水平, 增强实验室竞争力和确保检测质量的重要手段^[14-20]。此次能力验证通过常规检测与 API 20NE 和 VITEK2 结果相结合的方式得出报告结果, 并收到满意的结果通知单。

API 20NE 和 VITEK2 均能准确地鉴定出铜绿假单胞菌, 在日常检测中可以借助 API 20NE 和 VITEK2 对可疑菌落进行鉴定。VITEK2 所需的鉴定时间最短, 可最大限度的缩短检验时间。

在日常检测中发现很多时候 250 mL 饮用水滤膜上难以形成分散的单一菌落, 对菌落准确计数造成了极大的影响, 同时也影响生化实验的鉴定率, 而 GB 8538-2016 中却没有稀释方式。本次能力验证将饮用水样品进行相应的稀释处理, 使滤膜上能形成分散的单一菌落, 方便菌落计数

和提高生化实验的鉴定率,从而达到准确报告铜绿假单胞菌污染情况的目的。

通过此次能力验证,解决了日常检测中饮用水样品的稀释问题,验证了API 20NE与VITEK2对可疑菌落进行辅助鉴定的准确性,且VITEK2能缩短检验时间。为准确、及时地检测出铜绿假单胞菌提供了技术支撑。

参考文献

- [1] 闻玉梅. 现代医学微生物学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999.
Wen YM. Modern medical microbiology [M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1999.
- [2] 魏光, 叶英, 沈继录. 2009~2012年铜绿假单胞菌耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, (24): 6115-6117.
Wei G, Ye Y, Shen JL. Resistance analysis of *Pseudomonas aeruginosa* from 2009 to 2012 [J]. Chin J Hosp Infect, 2013, (24): 6115-6117.
- [3] 王莉, 李明, 江志红, 等. 543株铜绿假单胞菌的临床分布及耐药性[J]. 解放军预防医学杂志, 2017, (4): 355-356, 365.
Wang L, Li M, Jiang ZH, et al. Clinical distribution and drug resistance of 543 strains of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Prev Med Chin People's Liber Army, 2017, (4): 355-356, 365.
- [4] 段江丽, 胡汝源, 杨红菊. 大理州市售食品细菌性污染情况分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 28(7): 890-892.
Duan JL, Hu RY, Yang HJ. Bacterial contamination analysis of food sold in Dali [J]. Chin J Health Inspect, 2017, 28(7): 890-892.
- [5] 周臣清, 张娟, 黄宝莹, 等. 广州市售瓶(桶)装水中铜绿假单胞菌假单胞菌污染现状及其耐药现象研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(12): 168-171.
Zhou CQ, Zhang J, Huang BY, et al. Study on the contamination status and drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled (barreled) water in Guangzhou [J]. Brew China, 2017, 36(12): 168-171.
- [6] 刘思超, 徐励琴, 罗泽燕, 等. 223份桶装天然矿泉水和包装饮用水中铜绿假单胞菌假单胞菌的检测结果分析[J]. 预防医学情报杂志, 2016, 32(10): 1071-1075.
Liu SC, Xu LQ, Luo ZY, et al. Analysis of the detection results of *Pseudomonas aeruginosa* in 223 barreled natural mineral water and packaged drinking water [J]. J Prev Med Inform, 2016, 32(10): 1071-1075.
- [7] 郭辽朴, 仁蕴慧, 牛世文. 2013-2014年漯河市桶装饮用水中铜绿假单胞菌假单胞菌污染状况调查[J]. 中国卫生工程学, 2017, (1): 33-35.
Guo LP, Ren YH, Niu SW. Investigation on the contamination of *Pseudomonas aeruginosa* in barreled drinking water in Luohe city from 2013 to 2014 [J]. China Health Eng, 2017, (1): 33-35.
- [8] 苗杨. 2014年-2015年沈阳市康平县桶装饮用水中铜绿假单胞菌假单胞菌的污染监测分析[J]. 航空航天医学杂志, 2016, 27(10): 1286-1288.
Miao Y. Surveillance and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* contamination in barreled drinking water in Kangping county [J]. J Aerosp Med, 2016, 27 (10): 1286-1288.
- [9] 曾晓琼, 汪廷彩, 周露, 等. 2015年广东省桶装饮用水中铜绿假单胞菌的污染调查和药敏性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, (12): 2965-2969.
Zeng XZ, Wang TC, Zhou L, et al. Investigation and drug sensitivity analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in barreled drinking water of Guangdong province in 2015 [J]. J Food Saf Qual, 2018, (12): 2965-2969.
- [10] CNAS-RL02:2018 能力验证规则[S].
CNAS-RL02:2018 Capability verification rules [S].
- [11] GB 8538-2016 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法[S].
GB 8538-2016 National food safety standard-Drinking natural mineral water inspection method [S].
- [12] GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
GB 4789.2-2016 National food safety standards-Food microbiology testing-Total number of colonies [S].
- [13] ASAC-PT551 (2018)矿泉水中铜绿假单胞菌的检测能力验证参试指导书[Z].
ASAC-PT551 (2018) Reference guidelines for verification of detection capability of *pseudomonas aeruginosa* in mineral water [Z].
- [14] 王立平, 蔡雪凤. 微生物实验室参加 FEPAS 能力验证计划的质量控制及对策[J]. 食品科技, 2011, (7): 256-260.
Wang LP, Cai XF. Quality control and countermeasure of microbiology laboratory participating in FEPAS capability verification program [J]. Food Sci Technol, 2011, (7): 256-260.
- [15] 甄珍. 微生物能力验证实验结果分析[J]. 黑龙江农业科学, 2011, (6): 202-203.
Zhen Z. Analysis of the results of microbial proficiency test [J]. Heilongjiang Agric Sci, 2011, (6): 202-203.
- [16] 吉彦莉, 郭勇峰, 王敬辉, 等. 食品微生物学检测能力验证分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2015, (3): 110-112.
Ji YL, Guo YF, Wang JH, et al. Validation and analysis of food microbiology detection ability [J]. Public Health Prev Med, 2015, (3): 110-112.
- [17] 贾东, 李宏, 王金玲, 等. 食品微生物学能力验证过程质量控制的研究[J]. 现代测量与实验室管理, 2012, (6): 49-52.
Jia D, Li H, Wang JL, et al. Quality control of food microbiology proficiency verification process [J]. Mod Meas Lab Manag, 2012, (6): 49-52.
- [18] 蔡标, 戴陈伟, 吴纳新, 等. 沙门氏菌的分离与鉴定能力验证[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, (21): 134-138.
Cai B, Dai CW, Wu NX, et al. Isolation and identification of *Salmonella* [J]. J Food Saf Qual, 2018, (21): 134-138.
- [19] 劳嘉倩. 浅谈食品检测实验室质量控制技术[J]. 广东化工, 2018, (21): 56-57.
Lao JQ. Talking about the quality control technology of food testing laboratory [J]. Guangdong Chem Ind, 2018, (21): 56-57.
- [20] 汪桃花, 代真真, 王新文, 等. 能力验证对提升实验室技术水平的影响[J]. 现代食品, 2018, (16): 19-22.
Wang TH, Dai ZZ, Wang XW, et al. The effect of proficiency testing on improving laboratory technology [J]. Mod Food, 2018, (16): 19-22.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



张洪伟, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 987624875@qq.com



周浩, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 402241344@qq.com