

食品微生物 CNAS 检测能力验证结果与分析

唐爱明^{1*}, 王 辉¹, 夏延斌², 郑姣妹¹, 刘增再¹, 陈 智¹

(1. 长沙市畜禽水产品质量检测中心, 长沙 410013;

2. 湖南农业大学食品科学技术学院, 长沙 410128)

摘 要: **目的** 提高食品安全检测能力, 增强实验室竞争力。 **方法** 2011 年, 本中心参加 CNAS 认可能力验证合格提供者山东出入境检验检疫局(CNAS PT0011)组织的食品微生物能力验证。依据国家标准 GB4789.2-2010 和 GB4789.4-2010, 采用多稀释度、多平行样法, 对代码为 PTA 菌落总数、PTB-1 沙门氏菌、PTB-2 沙门氏菌样品进行检测鉴定。 **结果** 样品 PTA 中菌落总数为 590 cfu/mL; 样品 PTB-1 沙门氏菌: 未检出/10 mL; 样品 PTB-2 沙门氏菌: 检出/10 mL。 **结论** 3 个样品测试均取得满意结果, 且 Z(比分值)小于 1(Z 值绝对值小于等于 2 为满意结果)。本中心实验室 2 个项目均取得满意结果。

关键词: 食品安全; 微生物检验; 能力验证; 菌落总数; 沙门氏菌

Proficiency testing results and analysis in food microbiological CNAS examination

TANG Ai-Ming^{1*}, WANG Hui¹, XIA Yan-Bin², ZHENG Jiao-Mei¹, LIU Zeng-Zai¹, CHEN Zhi¹

(1. Changsha Stock, Poultry and Fisheries Production Quality Detection Center, Changsha 410013, China;

2. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

ABSTRACT: Objective To improve microbiological examination capability and increase laboratory competition. **Methods** According to national standard GB4789.2-2010 and GB4789.4-2010, based on the multi dilution, multi samples and multi methods, the bacterial count in sample PTA, *Salmonella* in sample PTB-1 and PTB-2 were detected. **Results** The results showed that the bacterial count in sample PTA was 590 cfu/mL, *Salmonella* in the sample of PTB-1 was negative, *Salmonella* in the sample of PTB-2 was positive. **Conclusion** All tests have achieved satisfactory results, and Z (score values) were less than 1 (the absolute value of Z equal or less than 2 is satisfied results).

KEY WORDS: food security; microbiological examination; proficiency testing; aerobic bacterial count; *Salmonella*

实验室能力验证, 是指利用实验室间指定检测数据的比对, 确定实验室从事特定测试活动的技术能力。能力验证是实验室质量控制的一种重要方式, 也是质量保证体系的重要组成部分^[1]。通过比对, 可以综合判断其检测水平和检测能力。为提高微生物检验能力, 2011 年本中心参加中国合格认可委员会(简称 CNAS)能力验证合格提供者山东出入境检验检疫局(认可编号为 CNAS PT0011)组织的食品中微

生物菌落总数、沙门氏菌的能力验证, 均取得了优异成绩。

1 材料与方法^{[2][3]}

1.1 待测样品

3 瓶冷冻干燥样品(均由山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心提供), 代码分别为: PTA 菌落总数; PTB-1 沙门氏菌, PTB-2 沙门氏菌。

*通讯作者: 唐爱明, 食品科学硕士, 兽医师, 主要从事微生物检验和研究工作。Email: 935219104@qq.com

1.2 培养基

平板计数琼脂(PCA),购自北京陆桥和杭州天和两试剂公司;缓冲蛋白胨水(BPW)、四硫磺酸钠磺绿(TTB)增菌液、营养琼脂(NA)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)、亚硫酸铋琼脂(BS)、HE琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂、沙门氏菌属显色培养基、三糖铁琼脂(TSI)、胰酪胨大豆琼脂平皿(TSA),均购自北京陆桥微生物制剂有限公司。

1.3 细菌微量鉴定管

赖氨酸生化管,批号为20110720;氰化钾对照管,批号为20110622;蛋白胨水(色氨酸肉汤,供做靛基质试验),批号为20110602,均购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.4 肠炎沙门氏菌阳性标准菌株

购自中国工业微生物菌种保藏管理中心,编号为CICC21482。

1.5 革兰氏阴性细菌鉴定卡(GN卡)

购自法国梅里埃公司,编码为241164440,批号为20110815。

1.6 沙门氏菌O和H诊断血清:

购自宁波天润生物药业有限公司,批号为20110802。

1.7 仪器

生物安全柜(新加坡ESCO公司);生化培养箱(广东医疗器械厂);细菌鉴定仪,法国梅里埃全自动微生物鉴定/药敏分析系统,型号为VITEK2 COMPACT15,定期用金黄色葡萄球菌阳性标准菌株做质量控制,菌株编号为CICC21600,质控结果完全符合。

1.8 检验依据

GB4789.2-2010 菌落总数检验;GB4789.4-2010 沙门氏菌检验。

1.9 样品水化

分别将3瓶冻干样品按操作要求用10 mL生理盐水进行水化,充分混合均匀,此10 mL复溶液即为待测样品原液。

1.10 PTA菌落总数

从1.9中制备的PTA菌落总数测试样品原液(10^0)中取出1 mL加入9 mL灭菌生理盐水中,反复吹打使其混合均匀,制成 1×10^{-1} 的稀释液,同方法进行梯度稀释,共制成 1×10^0 (原液)~ 10^{-6} 的7个10倍

系列稀释样品匀液。每递增稀释一次,换用1次1 mL无菌吸管。再从每个稀释度的稀释液中分别取出1 mL加入到四个无菌平皿中,并吸1 mL空白稀释液做对照,做两个平皿。每皿倾注15~20 mL冷却至46℃的平板计数琼脂(PCA),并转动平皿使其混合均匀,在凝固后的琼脂表面再覆盖一薄层PCA(约4 mL),以防弥漫菌落生长,影响菌落计数。待琼脂凝固后,将平板翻转,36℃±1℃培养48±2 h,取出进行计数。

1.11 PTB-1沙门氏菌和PTB-2沙门氏菌^[4]

1.11.1 前增菌和增菌

按参试指导书要求,无菌操作将10 mL样品原液转至225 mL BPW增菌液,同时做阳性对照。36℃±1℃培养18~24 h。取1 mL前增菌培养物,转种于10 mL四硫磺酸钠磺绿(TTB)内,42℃±1℃培养18~24 h;另取1 mL转种于10 mL亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)内,36℃±1℃培养18~24 h。

1.11.2 选择性分离

分别用接种环取TTB、SC增菌液各一环,划线接种于亚硫酸铋琼脂(BS)、HE琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂、沙门氏菌属显色培养基平板,36℃±1℃培养18~24 h后观察结果。

1.11.3 生化试验

自沙门氏菌显色培养基平板挑取3个以上典型可疑菌落,接种三糖铁琼脂(TSI)斜面,转种时先穿刺底层再划线斜面,同时接种营养琼脂(NA),36℃±1℃培养18~24 h。

1.11.4 生化鉴定

从营养琼脂平板(NA)上取菌,按操作说明书要求,上全自动微生物生化鉴定/药敏分析系统进行生化鉴定。

1.11.5 血清学鉴定

取少量纯培养被检菌苔,用沙门氏菌O和H诊断血清做血清学鉴定。

2 结果与分析

2.1 PTA菌落总数

平板计数琼脂经培养后,记录稀释倍数和相应的菌落总数,结果如表1。

选取菌落数在30~300 CFU之间的 10^{-1} 稀释度四个平板平均值计数菌落总数,样品PTA细菌总数报告结果为590 cfu/mL。此次样品检验中有蔓延菌落产生,培养后计数应取平均值,减少误差。该次实验采用两个不同生产厂家的平板计数琼脂,并且多稀释度多平行样,每个稀释度做4个平板,标准中规定

表 1 菌落总数检验结果
Table 1 Aerobic bacterial count results

处理	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	空白
北京陆桥	>300	66	12	1	0	0	0	0
平板计数琼脂	>300	62	11	0	0	0	0	0
杭州天和	>300	52	16	1	0	0	0	0
平板计数琼脂	>300	56	片状菌	1	0	0	0	0

每个稀释度做两个平板,因为在样品中菌体浓度未知的情况下选用多稀释度可防止漏检,确保有适宜稀释度的菌落数在可计算范围之内,使检测结果更加精确。结果表明,取两种培养基的平均值,即 590 cfu/mL,最终 Z=0.70,为满意结果。证明这种试验方法是可行且误差相对较小的。

2.2 PTB-1 沙门氏菌和 PTB-2 沙门氏菌^[5]

2.2.1 培养结果^[6]

PTB-2 在 BS 琼脂平板上分离出边缘透明、中心呈黑色的单个菌落,成片生长的菌落几乎全呈黑色; HE 平板菌落呈黑色; XLD 平板菌落全部呈黑色。PTB-1 在 HE 上为粉红色菌落,在 XLD 平板上为黄白色菌落,在 BS 平板上为灰黑色菌落。沙门氏菌属显色培养基平板上 PTB-2 有紫色菌落(为沙门氏菌属典型菌落颜色)和蓝色菌落(干扰菌),PTB-1 均为蓝色菌落。挑取 5 个 PTB-2 可疑紫色单个菌落接种普通营养琼脂 NA 平板,进一步分离纯化后接种营养肉汤;再接种 TSI 琼脂斜面,转种时先穿刺底层再涂布斜面,于 37℃培养 24 h。结果分离出一株细菌,该菌株在肉汤表面形成菌膜,肉汤均匀混浊,管底有灰白色沉淀物;普通营养琼脂上的菌落,无色透明,表面光滑,圆形较为扁平、粘稠;TSI 琼脂斜面变红,底层产酸产气, H₂S 阳性。取 NA 平板单菌落接种 TSA 平板, 37℃培养 18 h, 上全自动微生物鉴定/药敏分析系统进行鉴定。

2.2.2 细菌形态特征观察^{[7][8]}

将 24 h 营养琼脂培养的纯菌落,加生理盐水均匀涂片,火焰固定,革兰氏染色后观察。结果为革兰氏阴性无芽孢短杆菌,大小均匀,单个存在、两端钝圆。

2.2.3 生化试验

按食品安全国家标准“食品微生物检验 沙门氏菌检验 GB4789. 4—2010”方法进行生化试验。分离菌株的生化反应试验结果见表 2。

表 2 沙门氏菌属生化反应初步鉴别表
Table 2 *Salmonella* biochemical reaction to preliminary distinguish

反应序号	硫化氢 (H ₂ S)	靛基质	PH7.2 尿素	氰化钾 (KCN)	赖氨酸 脱羧酶
PTB-1	—	—	—	—	—
PTB-2	+	—	—	+	+
阳性对照	+	—	—	+	+

注: +阳性; —阴性。

根据表 2 结果,对照 GB4789.4-2010 沙门氏菌属生化反应初步鉴别方法,PTB-2、阳性对照初步判定为沙门氏菌属细菌;PTB-1 为非沙门氏菌。

2.2.4 生化鉴定

取 PTB-1、PTB-2、阳性对照菌株在 TSA 平板上 37℃培养 18 h 的分纯细菌,用 0.45%生理盐水制备成浊度适当的菌悬液,用比浊仪测定菌液浓度,选用 GN 革兰氏阴性细菌鉴定卡,按细菌鉴定仪操作要求,上全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。PTB-2、阳性对照生化鉴定结果见表 3。

鉴定卡按正常程序放入 VITEK 2 COMPACT 孵育箱后,仪器经过 4~8 h 的孵育和判读,由工作电脑给出相应鉴定结果。全自动细菌鉴定仪报告最终鉴定结果,PTB-2 为沙门氏菌属,可能性为 96%,置信度为极度一致,为相当好的鉴定。阳性标准菌株鉴定结果为沙门氏菌属,可能性为 97%,为相当好的鉴定。PTB-1 为产气肠杆菌,可能性 99%,为相当好的鉴定。

2.2.5 血清学鉴定

取 PTB-2 和阳性对照纯培养物、生理盐水溶液(阴性对照),用沙门氏菌 O 和沙门氏菌 H 诊断血清做玻片凝集试验,结果完全符合。

2.2.6 结果与报告

综合以上生化试验和血清学鉴定的结果,可以得出结论:样品 PTB-1 沙门氏菌:未检出/10 mL;样品 PTB-2 沙门氏菌:检出/10mL。与这次 CNAS 能力比对指定值完全符合,为满意结果。

表 3 生化鉴定结果
Table 3 Biochemical identification results

孔号	中文名称	结果	孔号	中文名称	结果	孔号	中文名称	结果
3	侧金盏花醇	—	26	脂酶	—	43	<i>N</i> -乙酰-β-半乳糖氨酶	—
5	<i>L</i> -阿拉伯醇	—	27	古老糖	—	44	α-半乳糖苷酶	+
7	<i>D</i> -纤维二糖	—	31	尿素酶	—	45	磷酸酶	+
9	β-半乳糖苷酶	—	32	<i>D</i> -山梨醇	+	46	氨基乙酸芳胺酶	—
10	H ₂ S 产生	+	33	蔗糖	—	47	鸟氨酸脱酸酶	+
13	<i>D</i> -葡萄糖	+	34	<i>D</i> -塔格糖	—	48	赖氨酸脱酸酶	+
14	谷氨酰转移酶	—	35	<i>D</i> -海藻糖	+	53	组氨酸同化	+
15	葡萄糖发酵	+	36	柠檬酸盐	+	56	COURMARATE	+
17	β-葡萄糖苷酶	—	37	丙二酸盐	—	57	β-葡萄糖苷酸酶	—
18	<i>D</i> -麦芽糖酶	+	39	5-酮-葡萄糖苷	—	58	0/129 耐受	+
19	<i>D</i> -甘露醇	+	40	乳酸盐产碱	+	61	<i>L</i> -苹果酸盐同化	—
20	<i>D</i> -甘露糖	+	41	α-葡萄糖	—	62	ELLMAN	—
21	β-木糖苷酶	—	42	琥珀酸盐产碱	+	64	<i>L</i> -乳酸盐同化	—

3 讨论与结论^[9]

该次能力验证采用多稀释度、多平行样方法进行检验,使检测结果更加精确。结果表明:在菌落总数检验中采用两种不同生产厂家的 PCA,每个稀释度样品都应充分混匀,同时在平板计数琼脂凝固后一定要再倒一薄层琼脂,防止蔓延菌落的形成,每天对测试结果记录,结果才会比较精确。

在沙门氏菌检验中要注意不同平板上的菌落特征,多挑菌落进行鉴定,防止疏漏。本实验室还使用科玛嘉显色培养基,同时使用全自动微生物生化鉴定与药敏分析系统,更保证了检验结果的准确性。该次待检样品为 2 瓶冷冻干燥制品,含有不同种类杂菌干扰,增加了一定的难度。

该次能力验证共有 318 个参试实验室,其中报名参加菌落总数的实验室有 310 个,有 251 个“满意”结果(占 81.0%);报名沙门氏菌的实验室有 262 个,有 199 个“满意”结果(占 76.0%)。其中共有 173 个实验室取得了两个项目的满意结果,占全部参加能力验证实验室的 54%,长沙市畜禽水产品质量检测中心实验室 2 个项目均取得满意结果,且 *Z* 值为 0.7,小于 1(要求 *Z* 值的绝对值小于等于 2 为满意结果)。^[10]

CNAS 在 CNAS RL02: 2011《能力验证规则》中规定了实验室应将能力验证作为重要的外部质量评价活动,对参加了 CNAS 组织及其承认的能力验证活动且有稳定满意表现的机构,在 CNAS 的各类评审中可根据情况简化相关项目的能力确认过程。通过该次检测能力验证,可增强实验室竞争力,更提高了

实验室检验人员对食品安全微生物检验和细菌性疾病诊断的应急能力,促进实验室检验水平的不断提高。

参考文献

[1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS RL02: 2011《能力验证规则》[S]. 2011 .

[2] 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定 GB4789.2-2010.

[3] 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验 GB4789.4-2010.

[4] 广东出入境检验检疫局编译. 国内外技术法规和标准中食品微生物限量[M]. 北京: 中国标准出版社, 2002, 9.

[5] 东秀珠, 蔡妙英等编著. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 科学出版社, 2001.

[6] 王巍, 闫磊, 曾庆祝. 沙门氏菌的检测技术与方法[J]. 现代食品科技, 2007, 23(5): 82-86.

[7] James M.jay. 现代食品微生物学(第五版)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.7:59-79.

[8] 中国兽医药品监察所. 译编. 欧盟动物源性食品安全管理法规[M]. 中国农业科学技术出版社, 2003.

[9] 卫生部国家监督中心编. 食品卫生国家标准汇编(6)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004, 6.

[10] 山东出入境检验检疫局食品微生物检测能力验证计划结果报告 FATA2011-001[S]. 2011: 3-5.

(责任编辑: 孙媛媛)

作者简介



唐爱明, 湖南长沙人, 食品科学硕士, 兽医师。现长沙市畜禽水产品质量检测中心主要从事微生物检验和研究工作。
E-mail: 935219104@qq.com