

沙门氏菌能力验证样品制备

曹文博¹, 倪长鹏², 董伟峰², 王璇³, 张公亮¹, 郑秋月², 曹际娟^{2*}

(1. 大连工业大学, 大连, 116034; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 大连, 116001; 3. 塔城出入境检验检疫局, 塔城 834700)

摘要: **目的** 研究制备适用于沙门氏菌(*Salmonella*)能力验证(PT)检测项目的冷冻干燥样品, 通过能力验证确定实验室或检查机构的校准、检测能力。**方法** 对目标菌与干扰菌进行10倍梯度稀释, 对不同稀释度的菌液进行菌落计数并计算菌浓度, 确定沙门氏菌与干扰菌的添加量, 以冻干的绿豆粉为基质, 脱脂奶粉为冻干保护剂, 将细菌混合物与冻干保护剂混合均匀, 采用真空冷冻干燥方式分别制备沙门氏菌能力验证阳性样品与阴性样品, 采用西林瓶真空包装、4℃冷藏贮存; 通过随机抽样和鉴定以评估样品的均匀性, 通过观察样品在90 d内不同温度下目标菌的测试结果以评估样品的稳定性。**结果** 每个样品最终添加10~100 CFU目标菌, 添加10⁴ CFU干扰菌; 抽检的样品均能有效鉴定, 显示PT样品具有较好的均匀性; 通过保存温度和时间的稳定性检验显示测试结果符合预期效果, PT样品具有较好的稳定性。**结论** 建立了有效的沙门氏菌能力验证样品制备的方法与评价程序。

关键词: 沙门氏菌; 能力验证; 分离; 鉴定

Preparation of *Salmonella* samples for proficiency testing

CAO Wen-Bo¹, NI Chang-Peng², DONG Wei-Feng², WANG Xuan³, ZHANG Gong-Liang¹,
ZHENG Qiu-Yue², CAO Ji-Juan^{2*}

(1. Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China; 3. Tacheng Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tacheng 834700, China)

ABSTRACT: Objective The preparation of lyophilization samples were applied in *Salmonella* proficiency testing, to assess the calibration and testing capability of participating laboratories. **Methods** A suitable proportion and concentration of *Salmonella* and interference were selected through 10 times dilution and colony counts, selecting freeze-dried mung bean powder as matrix and skimmed milk powder as lyoprotectant, and mixing them well. *Salmonella* proficiency testing positive samples and negative samples were made by vacuum freeze drying method, by schering bottles vacuum packaging, 4℃ refrigerated storage. The uniformity of the PT samples was evaluated through random sampling, and evaluates the stability of PT samples kept for 90 d. **Results** Adding 10~100 CFU *salmonella* and 10⁴ CFU interference to every PT sample. The batch of samples could be identified and in a preferable accordance ratio, and could keep stable for at least 90 d while storing at different temperatures. **Conclusion** Suitable *Salmonella* PT samples and effective sample preparation and evaluation process were established.

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201210043)

Fund: Supported by the Public Welfare Industry Scientific Research Projects of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (201210043)

*通讯作者: 曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物安全检验检疫。E-mail: caojijuanlnciq@163.com

*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Doctor, Researcher, Technical Center of Liaoning Entry-Exit Inspection & Quarantine, No.60, Changjiang Road, Zhongshan District, Dalian 116001, China. E-mail: caojijuanlnciq@163.com

KEY WORDS: *Salmonella*; proficiency test; isolation; identification

1 引言

能力验证(Proficiency Testing, PT)是为实现确定实验室的校准、检测能力或检查机构的检测能力的目的而进行的实验室间比对,是评估检测实验室水平的重要途径^[1]。微生物能力验证项目可有效评估参与实验室进行相关微生物检验的技术能力^[2-3]。开展项目的主要流程包括:目标菌选择、PT 样品制备、样品发放、验证结果分析等步骤^[4]。真空冷冻干燥法适用范围广;保藏期长、存活率高且在保藏期可避免其它杂菌污染;便于携带运输。有些微生物在真空冷冻干燥后成活率较低,微生物 PT 样品的质量因冻干条件的影响存在较大不确定性^[5-7],因此需对流程进行评估以保证项目的有效实施。

沙门氏菌(*Salmonella*)属于革兰氏阴性杆菌,广泛分布于自然界,很容易在动物与动物、动物与人、人与人之间传播,能引起人和动物伤寒、副伤寒和食物中毒,临床表现为急性肠胃炎症,有突发性剧烈头痛、腹泻、呕吐、感觉不适和体温升高等^[9]。世界上,每年由沙门氏菌引起的食物中毒病例多达几千万;在我国,由沙门氏菌引起的食物中毒占首位。沙门氏菌是能力验证项目较常选用的目标菌,制备 PT 样品一般选择真空冷冻干燥法(冻干)及真空封装保存。以往食品微生物能力验证采用基质多为肉制品或乳制品,很少有采用植物源性产品作为基质。本次能力验证在汲取以往经验基础上,开展绿豆中致病菌检测能力验证。为增加能力验证考核难度,在制备样品时通常会目标菌与一定浓度的干扰菌按比例混合制成混合菌 PT 样品。由于不同菌种的生长与复苏效率存在差异,若混合浓度配比不当,将会增加考核样品出现质量不稳定的风险^[7]。样品的制备应充分考虑均匀性、抽样、稳定性、在传运中可能的损坏及周围环境条件的影响,保证在抽取、运送、识别、储存和处置检测物品时样品特性的均匀和稳定。点出稳定性、均匀性的重要性。

本文阐述了沙门氏菌能力验证中样品制备的方法,能够获得目标菌与背景干扰菌的添加量、最佳的冻干保护剂,稳定性、均匀性得以保证,满足能力验证更好体验各实验室真实检测水平的要求。

2 材料与设备

2.1 材料

2.1.1 菌种

沙门氏菌(*Salmonella*, ATCC 21506); 干扰菌: 弗氏枸橼酸杆菌(*Citrobacter freundii*, ATCC 43864)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*, CMCC(B) 49005)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*, ATCC 63301)

2.1.2 试剂和培养基

新西兰脱脂乳粉与绿豆粉; NB 营养肉汤; TSB 胰蛋白胨大豆肉汤; 沙门氏菌属诊断血清(多价 A-S+Vi); 丹麦国家血清研究公司产; HE 琼脂; 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(XLD); 沙门氏菌显色培养基(科玛嘉); 普通营养琼脂; TSI 三糖铁琼脂; 3M Petrifilm™ 菌落总数纸片。

2.2 仪器设备

恒温培养箱: 德国 Binder; VIDAS 全自动免疫荧光分析仪: 法国生物梅里埃公司; 真空冷冻干燥机; 全自动细菌鉴定系统 BD Phoenix-100。

2.3 实验方法

2.3.1 菌株的复苏、传代与鉴定

无菌条件下打开冻干管,用灭菌枪头吸取 TSB 液体培养基,加入冻干菌种中,混合均匀,吸出菌悬液接种至普通肉汤和 TSB 肉汤内,于 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 18~24 h,然后在沙门菌显色平板、HE、XLD 平板上划线, $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 18~24 h,挑选特征菌落接种普通营养琼脂,培养后进行血清学鉴定和全自动细菌鉴定 BD Phoenix-100^[8]。

2.3.2 PT 样品的制备

2.3.2.1 目标菌和干扰菌的条件确定

目标菌与背景干扰菌经肉汤培养基复苏、鉴定后分别进行 10 倍梯度稀释,取不同稀释度菌液 0.1 μL 于 3M Petrifilm™ 菌落总数纸片上, $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 18~24 h 后进行菌落计数并计算菌浓度,确定菌液的最适稀释度。

2.3.2.2 PT 样品的制备

根据能力验证项目要求,本文制备沙门氏菌阳性 PT 样品和阴性 PT 样品。制备样品以冻干的绿豆

粉为基质,进行粉碎、干燥和过筛;选取脱脂奶粉为冻干保护剂;在基体中将目标菌与干扰菌液混合,每个样品最终添加 10~100 CFU 目标菌,添加 10^4 CFU 干扰菌。用于沙门氏菌检测的阳性样品:添加沙门氏菌及背景干扰菌;用于沙门氏菌检测的阴性样品:添加生化性质与沙门氏菌极为相似的细菌。样品采用真空冷冻干燥方式制备,采用西林瓶真空包装。

2.3.3 PT 样品的分离及鉴定

随机抽取阳性、阴性冻干品各 10 个,无菌操作下开启西林瓶,取 2~4 mL TSB 肉汤加入瓶中,待冻干粉溶解后混匀再接种于普通肉汤中(36 ± 1) °C 培养 18~24 h,取 2 mL 增菌液 100 °C 15 min 灭活,冷却后取 500 μ L 进行 VIDAS 的沙门氏菌测定对其进行初筛;同时将增菌液分别划线接种沙门氏菌显色平板、HE、XLD 平板于(36 ± 1) °C 下过夜培养,挑取可疑特征菌落接种普通营养琼脂、三糖铁琼脂 TSI,培养后进行沙门氏菌血清鉴定和 BD 鉴定,记录可信度^[8-11]。

2.3.4 PT 样品的均匀性检验

均匀性是指对于物质的一种或多种指定特性具有相同特性量值或相同结构或相同组份的一种物质状态。如果物质的一部分(子样)特性值与另一部分(另一子样)特性值之间的差异很小,甚至不能被实验检测所区分,则该物质就该特性而言,可以认为是均匀的。随机选取 12 瓶阳性和 12 瓶阴性样品用于均匀性验证,所有样品以随机次序在重复性条件下,即在同一实验室中由相同的人员采用相同的测试方法和仪器进行测试,分别对样品中的沙门氏菌进行检测,结果与指定值相比较。

2.3.5 PT 样品的稳定性检验

样品稳定性检验方法:采用两种类型的稳定性试验,一种是在贮存温度(4 °C)下的稳定性试验,随机取每个样品 30 份,每 9 d 检测 3 份,共计 90 d;另一种是在较高温度下(模拟样品运输条件和实际运输

条件)下的稳定性试验。模拟运输条件的温度分别为 20 °C、30 °C、37 °C 和 42 °C,分别随机取每个样品 30 份,在不同温度条件下进行稳定性测试;实际运输条件是分别邮寄样品到温度偏高或温差大的异地后,再返给组织者测试的方式。样品贮存温度为 4 °C,使用 EMS 运输能力验证样品。正常情况下,样品在 2~5 d 左右能够到达大部分实验室^[12-15]。

3 结果

3.1 标准菌株的鉴定结果

菌株复苏在 TSB 和普通营养肉汤混浊生长;且肉汤在 HE 琼脂平板上分离出蓝绿色中间有黑心的单菌落,在 XLD 上分离出浅粉色中间有黑心的单菌落,沙门氏菌显色培养基上分离出蓝紫色单菌落;血清试验凝集效果较好,BD 鉴定结果为猪霍乱沙门氏菌亚利桑那亚种(*Salmonella.choleraesuis ssp arizonae*),可信度 99%。

3.2 PT 样品的制备

采用在基体中添加目标菌和干扰菌形成大样,然后充分混匀并分装成测试样品的方法制备 500 份阳性样品。阴性样品则是添加生化性质与沙门氏菌极为相似的细菌。根据以往的研究结果,在充分混匀的大样中目标菌服从泊松分布,大样中目标菌添加量为 2.0×10^4 CFU,平均每份样品中含有 40 CFU 目标菌, 10^4 CFU 干扰菌。

3.2.1 阳性 PT 样品的鉴定结果

10 个样品接种的肉汤均混浊生长;HE 琼脂平板上分离出黑色单菌落,周围为黄色;在 XLD 上分离出浅粉色半透明带有黑心的单菌落,沙门氏菌显色培养基上分离出个别蓝紫色单菌落;VIDAS 鉴定结果均为 Positive;沙门氏菌 A-E+Vi 血清凝集明显;BD 鉴定结果为可信度 99%的猪霍乱沙门氏菌亚利桑那亚种,结果见表 1。

表 1 PT 样品鉴定结果
Table 1 PT samples identification results

样品	普通肉汤	TSI				血清 PolyA-E+Vi
		斜面	底层	产气	H ₂ S	
1	混浊生长	K	A	+	+	+
2	混浊生长	K	A	+	+	+
3	混浊生长	K	A	+	+	+

注:K,产碱;A,产酸;+,阳性;- ,阴性

3.2.2 阴性 PT 样品的鉴定结果

10 个样品接种的肉汤均混浊生长; HE 琼脂平板上分离出部分黑色单菌落; 在 XLD 上分离出部分黑色单菌落, 沙门氏菌显色培养基上分离出蓝色单菌落; VIDAS 鉴定结果均为 Negative; TSI 斜面不产碱, 底层不产酸, 产气, 产 H₂S; 沙门氏菌 A-E+Vi 血清不凝集。

3.3 PT 样品均匀性检验结果

随机选取 12 瓶阳性和 12 瓶阴性样品用于均匀性

验证, 所有样品以随机次序在重复性条件下分别对样品中的沙门氏菌进行检测。在所有阴性样品中均未检出目标菌, 而在所有阳性样品中均检出目标菌, 表明本文制备的样品是均匀的。

3.4 PT 样品稳定性检验结果

在所有阴性样品中没有检测到沙门氏菌; 在阳性样品中全部检出沙门氏菌。本文制备的 PT 样品是稳定的。结果见表 2 与表 3。

表 2 阴性 PT 样品稳定性测试结果
Table 2 Negative PT samples stability results

样品	温度/测试天数	目标菌测试结果	测试方法
阴性样品	4 °C/90 d	未检出	GB 4789.4-2010
	20 °C/60 d	未检出	
	30 °C/20 d	未检出	
	37 °C/10 d	未检出	
	45 °C/10 d	未检出	
	海南/10 d	未检出(检出干扰菌)	
	石家庄/6 d	未检出(检出干扰菌)	
	新疆/10 d	未检出(检出干扰菌)	
	南宁/8 d	未检出(检出干扰菌)	
	广州/7 d	未检出(检出干扰菌)	
	长沙/6 d	未检出(检出干扰菌)	

表 3 阳性 PT 样品稳定性测试结果
Table 3 Positive PT samples stability results

样品	温度/测试天数	目标菌测试结果	测试方法
阳性样品	4 °C/90 d	检出	GB 4789.4-2010
	20 °C/60 d	检出	
	30 °C/20 d	17 d 之内检出	
	37 °C/10 d	检出	
	45 °C/10 d	6 d 之内检出	
	海南/10 d	8 d 之内检出	
	石家庄/6 d	检出	
	新疆/10 d	检出	
	南宁/8 d	检出	
	广州/7 d	检出	
	长沙/6 d	检出	

4 讨论

实验室通过参加各种 PT 项目,可以有效地检验和了解自身和同行的技术能力,因此成为实验室能力的重要体现。近年来,我国临床和微生物实验室组织开展了大量细菌鉴定的 PT 项目。然而,众多参与实验室反馈认为,部分项目可能在制样过程中没有进行严谨的科学研究和采用严格质量控制流程,造成样品质量的不均一性和不稳定性,影响参与实验室对鉴定结果的判断。不同实验室能力验证的技术水平和方法不同,对鉴定结果有一定影响。

本次沙门氏菌能力验证样品的制备以沙门氏菌的真空冷冻干燥技术为基础,对干扰菌的稀释度及混合比例、冻干条件、均匀性和稳定性测试及冻干品的分离鉴定过程进行探究评估。其中混合菌 PT 样品是制备研究的重点和难点。通过菌液各稀释梯度的菌落总数结果选择最适的浓度,依据真空冷冻干燥的影响因素和样品的完好性确定最适的冻干条件。最后组织方随机抽取冻干品对其进行分离和血清学鉴定、生化鉴定来验证 PT 样品制备的质量,实验验证结果符合预期效果,然后对参与实验室进行样品批量发放。能力验证结果很好评价全国检验检疫、质量监督检验、各级测试中心、各相关部委检测中心、各级疾病预防控制中心、各大院校等相关领域实验室的沙门氏菌检测能力。

参考文献

- [1] 芦云,王芳,金鑫,等.食品微生物学能力验证[J].检验检疫学刊,2013,23(2):44-47.
Lu Y, Wang F, Jin X, et al. Analysis on results of food microbiological proficiency test [J]. J Inspect Quar, 2013, 23(2): 44-47.
- [2] 马聪,谭海玲,刘礼平,等.副溶血性弧菌鉴定能力验证样品的制备[J].中国食品卫生杂志,2011,23(6):515-519.
Ma C, Tan HL, Liu LP, et al. Preparation of *Vibrio parahaemolyticus* lyophilization materials for proficient test on bacteria identification [J]. Chin J Food Hyg, 2011, 23(6): 515-519.
- [3] GB 15483.1-1999 利用实验室间比对的能力验证 第一部分:能力验证计划的建立和运作[S].
GB 15483.1-1999 The Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons Part1: The Establishment and Operation of Proficiency Testing [S].
- [4] Howerton D, Krolak JM, Manasterski A, et al. Proficiency testing performance in US laboratories: results reported to the Centers for Medicare & Medicaid Services, 1994 through 2006[J]. Arch Pathol Lab Med, 2010, 134(5): 751-758.
- [5] 常金梅,蔡芷荷,吴清平,等.菌种冷冻干燥保藏的影响因素[J].微生物学通报,2008,35(6):959-962.
Chang JM, Cai ZH, Wu QP, et al. Influencing factors to freeze-drying preservation of culture [J]. Inst Microbiol, 2008, 35(6): 959-962.
- [6] 苏丽春,何天文,陈佐威,等.浅谈微生物菌种真空冷冻干燥的影响因素及其保藏形式[J].中国卫生检验杂志,2009,19(9):2193-2195.
Su LC, He TW, Chen ZW, et al. Influencing factors and preservation forms to vacuum freeze-drying preservation of culture [J]. Chin J Health Lab Technol, 2009, 19(9): 2193-2195.
- [7] 李华,骆艳娥,刘延琳.真空冷冻干燥微生物的研究进展[J].微生物学通报,2002,29(3):78-82.
Li H, Luo YE, Liu YL. Study on vacuum freeze-drying preservation of microorganisms [J]. Microbiology, 2002, 29(3): 78-82.
- [8] GB 4789.4-2010 食品卫生微生物学检验:沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2010 Food Microbiological Examination: *Salmonella* [S].
- [9] 游勇来,赵琼,陈志耿.能力验证样品中沙门氏菌的分离与鉴定[J].检验检疫学刊,2013,23(1):45-47.
You YL, Zhao Q, Chen ZG. Isolation and identification of *Salmonella* sp. during the proficiency testing [J]. J Inspect Quar, 2013, 23(1): 45-47.
- [10] 俞慕华,鞠长燕,陈辉,等.能力验证试验中沙门菌分离与鉴定[J].中国卫生工程学,2012,11(5):424-426.
Yu MH, Ju CY, Chen H, et al. Isolation and identification of *Salmonella* in CNAS proficiency testing [J]. Chin J Public Health Engineer, 2012, 11(5): 424-426.
- [11] 林彩华,蔡颖,曾梅锦,等.能力验证试验中大肠杆菌 O157:H7 的分离与鉴定[J].中国卫生检验杂志,2008,18(11):2412-2425.
Lin CH, Cai Y, Zeng MJ, et al. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 during the proficiency testing [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(11): 2412-2425.
- [12] 王娜,钱和.阪崎肠杆菌能力验证样品均匀性和稳定性的研究[J].中国微生态学杂志,2010,22(7):606-608.
Wang N, Qian H. The homogeneity and stability of samples used for *E. sakazakii* proficiency testing [J]. Chin J Microecol, 2010, 22(7): 606-608.
- [13] 芦云,薛晓晶,王芳,等.多靶标微生物力验证样品的均匀性研究[J].检验检疫学刊,2013,23(4):46-49.
Lu Y, Xue XJ, Wang F, et al. Homogeneity of proficiency testing samples of multi-target microbiology [J]. J Inspect Quar, 2013,

23(4): 46–49.

- [14] 陈文胜, 谭慧嘉, 罗建波, 等. 化妆品中金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌检测能力验证实施研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(2): 366–369.

Chen WS, Tan HJ, Luo JB, *et al.* Proficiency testing of staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa detection in cosmetics [J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, 23(2): 366–369.

- [15] 舒鹃娟, 张伟冲, 袁峰, 等. 食品微生物的检测能力验证[J]. 上海预防医学, 2014, 26(3): 154–156.

Shu JJ, Zhang WC, Yuan F, *et al.* Proficiency testing of food microbiology [J]. Shanghai J Prevent Med, 2014, 26(3): 154–156.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



曹文博, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全与食品分析检测。

E-mail: 153185468@qq.com



曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向-生物安全检验检疫。

E-mail: caojijuanlnciq@163.com