# 食品中金黄色葡萄球菌定量检测能力验证 结果与分析

钟 玮,张 宁,刘玉萍,范一灵,杨美成\* (上海市食品药品检验所,上海 201203)

摘 要:目的 提升实验室对食品中金黄色葡萄球菌的检测能力。方法 按照能力验证作业指导书规定的方法 要求进行检测,并采用全自动微生物基因指纹鉴定系统(RiboPrinter®)对盲样中添加的菌株进行鉴定与分型。结果 编号为 CODE  $1\sim9$  的样品均检出金黄色葡萄球菌,编号为 CODE 10 的样品未检出金黄色葡萄球菌。阳性样品的 Z 值结果均 < 2; 阴性样品的结果为 < 10 CFU/g,10 个样品测试均取得满意结果。结论 通过开展能力验证工作可以较好地提高实验室检测能力。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 定量; 能力验证; 鉴定; 分型

# Proficiency testing results and analysis of quantitative detection of Staphylococcus aureus in food

ZHONG Wei, ZHANG Ning, LIU Yu-Ping, FAN Yi-Ling, YANG Mei-Cheng\*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: Objective** To improve the detection capacity of *Staphylococcus aureus* in food. **Methods** Detection was followed the instruction of the proficiency testing, and RiboPrinter® was used for identification and ribotyping of the bacteria added into the blind sample. **Results** *Staphylococcus aureus* was detected in CODE 1~9 and there was no *Staphylococcus aureus* in CODE 10. The *Z* scores of the positive samples were all less than 2 and the result of the negative sample was less than 10 CFU/g. The test results of 10 samples were satisfied. **Conclusion** The laboratory detection capability has been improved by implementing proficiency testing.

KEY WORDS: Staphylococcus aureus; quantitative; proficiency testing; identification; ribotyping

#### 1 引言

金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aurues, 简称 S. aurues), 是引起细菌性食物中毒的重要病原菌之一。无论在发达国家还是在发展中国家,由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒在细菌性食物中毒中占有较大比例。该菌在自然界中分布广泛,在人体中主要存在于皮肤、粘膜,特别是鼻咽部位,30%~80%的人群为该病原菌的携带者,因此金黄

色葡萄球菌污染食品的几率较大<sup>[1]</sup>。目前在食品卫生标准中已将金黄色葡萄球菌的检验作为常规检验项目。

能力验证是一类通过外部质量控制手段来测试一个实验室准确度的途径,是一种对实验室工作能力进行评估的客观方法<sup>[2]</sup>,可以提示实验室内部质控难以发现的偏差或系统误差,促进实验室改进工作质量,是判断和监控实验能力的有效手段<sup>[3]</sup>。为提高对食品中金黄色葡萄球菌的检测能力和水平,本实验室参加了 2015 年由国家食品药品监督管理

<sup>\*</sup>通讯作者:杨美成,博士,主任药师,主要研究方向为实验室质量管理、药物分析与微生物学检验。E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

<sup>\*</sup>Corresponding author: ANG Mei-Cheng, Ph.D., Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China. E-mail: yangmeicheng@ vip.sina.com

总局组织的食品安全抽检监测承检机构"金黄色葡萄球菌"能力验证。希望通过能力验证评估检测人员的能力和确认相关资格<sup>[4]</sup>,从而保证实验室维持较高的检测工作水平。

### 2 材料与方法

#### 2.1 材料、试剂和仪器

本次能力验证样品由中国食品药品检定研究院发放,每个实验室收到 10 份金黄色葡萄球菌样品,编码为 CODE  $1\sim10$ ,样品为白色球状西林瓶装;10 袋奶粉样品,每袋质量为 25 g,编码为 CODE  $1\sim10$ 。每个相同编码的金黄色葡萄球菌样品和奶粉样品作为 1 件样品进行检测。

氯化钠(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司); Baird-Parker 琼脂(美国BD公司);金黄色葡萄球菌显色琼脂培养基(法国科玛嘉公司);金黄色葡萄球菌显色琼脂培养基(广东环凯微生物科技有限公司);脑-心浸出液肉汤(BHI)(广东环凯微生物科技有限公司);冻干兔血浆(广东环凯微生物科技有限公司);营养琼脂(北京路桥技术股份有限公司);RiboPrinter®细菌鉴定试剂盒(美国杜邦 Qualicon 公司)。

RiboPrinter<sup>®</sup>全自动微生物基因指纹鉴定系统(美国杜邦 Qualicon 公司)。

#### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 金黄色葡萄球菌定量检验

按作业指导书要求,在生物安全柜内将金黄色葡萄球菌样品的西林瓶打开,取 225 mL 灭菌稀释液加入到无菌均质袋中,并将西林瓶内小球加入到稀释液中,充分溶解。然后再将与西林瓶相同编码的奶粉样品加入到上述稀释液中,充分均质混匀。依此方法分别对 10 件样品进行处理。

依据 GB4789.10-2010《金黄色葡萄球菌检验》中第二法 Baird-Parker 平板计数 $^{[5]}$ ,对样品进行检测。根据对样品污染状况的估计,选择适宜稀释度的样品匀液进行 10 倍递增稀释,每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液以 0.3、0.3 和 0.4 mL 的接种量分别加入 Baird-Parker 平板表面和金葡显色平板表面,用 L 棒涂布均匀。等样品匀液被吸收后翻转平皿,倒置于培养箱, $(36\pm1)$  °C培养  $45\sim48$  h。为保证实验的准确性,同时比较不同培养基对金黄色葡萄球菌检测的灵敏度,本实验除按 GB 4789.10-2010 中第二法提到的Baird-Parker 平板计数外,还采用了 2 个不同品牌的金黄色葡萄球菌显色平板培养基进行平行检测。

参照 GB 4789.10-2010 和商品说明书, 对 Baird-Parker 平板和金黄色葡萄球菌显色平板上的典型菌落进行计数, 选择符合典型金黄色葡萄球菌菌落特征, 且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 20~200 CFU 之间的平板进行计数, 然后通过血浆凝固酶试验阳性的比例确定最终的计数结果<sup>[5]</sup>。

# 2.2.2 盲样中添加菌的鉴定及分型

#### (1)鉴定方法[6]

选择 EcoR I 内切酶试剂盒,用 RiboPrinter®全自动微

生物鉴定系统进行测定。按仪器操作手册挑取单克隆新鲜菌落,悬浮于  $40~\mu L$  缓冲液中,混匀后吸取  $30\mu L$  于测试孔中,热灭活后各加入  $5~\mu L$  裂解液 A 和裂解液 B,放置于RiboPrinter<sup>®</sup>上样孔中并运行程序,按照仪器显示及有关试剂标识进行加样和填充有关试剂,杂交图谱选择与DuPontID 数据库进行比对,得出待测菌株信息。

#### (2)数据分析和处理

将 RiboPrinter<sup>®</sup>中的数据结果导入 BioNumerice (Version 6.6)软件进行处理分析,相似度系数采用 Pearson相关系数,聚类图使用非加权配对算数平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)构建,进行聚类分析。

# 3 结果与讨论

#### 3.1 金黄色葡萄球菌定量检测

本次能力验证的 10 份样品, 各稀释度 3 块平板上典型菌落数结果见表 1。

值得注意的是,金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上菌落形态应为圆形、光滑凸起、湿润、颜色呈灰色到黑色,周围有一混浊带,在其外层有一透明圈<sup>[5]</sup>。但盲样将金黄色葡萄球菌制备在小球中,未进行实验时于-20 ℃冷冻保存,在此条件下可能对菌株造成了损伤,因此Baird-Parker 平板上的菌落形态与平常所见的光滑圆形不同,外观比较粗糙且呈不规则形状。并且 10 份盲样中均添加了干扰菌,而部分干扰菌如沃氏葡萄球菌,也能形成混浊带或透明圈,因此增加了金黄色葡萄球菌的计数难度。相比之下,金黄色葡萄球菌在显色平板上呈"紫色--红色",而其他细菌则呈现不同的颜色或被抑制,因此对于金黄色葡萄球菌的初筛分离更加容易。

按照 GB4789.10-2010 典型菌落计数和确认要求确定 计数结果。从结果来看、每个编号的样品在3种平板上的 金黄色葡萄球菌菌落数差别不大, Baird-Parker 平板是金 黄色葡萄球菌检验的传统培养基, 成本较低, 但培养时 间较长、需要 48 h、而且特异性不高、因此必须进行补充 试验来区分菌落形态相似的干扰菌才能最后报告结果[7]。 显色培养基与传统培养基相比具有较高的灵敏度,在培 养之前不需要增菌; 而且由于其特异性较高, 假阳性机 率比传统的培养基低, 因而能大大减少确认试验的量, 而且操作快速、简便、节省时间, 分离培养仅需 18~24 h, 即可根据菌落的颜色对目标均做出初步的筛选:检验者 不需要太多的专业知识, 只要有基本的微生物操作技术 和辨色能力就可以进行检测<sup>[8]</sup>。无论使用 Baird-Parker 平 板还是显色平板, 均需根据血浆凝固酶试验来修正计数 结果。因此、务必要控制好试验条件[9,10]、以保证血浆凝 固酶试验结果的准确性、防止出现假阴性、对于可疑结 果更要进行重复试验[11]。

表 1 金黄色葡萄球菌定量检测平板计数结果 Table 1 The counting results of S. aureus

样品编号	Table 1  计数平板	The counting results of <i>S. aureus</i> 稀释度				
		10 <sup>-1</sup>	10-2	10 <sup>-3</sup>	10-4	(CFU/g)
CODE-1	Baird-Parker 平板	> 300	34	0	0	3.4×10 <sup>3</sup>
	科玛嘉金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	28	0	0	$2.8 \times 10^{3}$
	环凯金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	34	5	1	$3.4 \times 10^{3}$
CODE-2	Baird-Parker 平板	272	22	0	0	$2.2 \times 10^{3}$
	科玛嘉金黄色葡萄球菌显色平板	185	18	0	0	$1.9 \times 10^{3}$
	环凯金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	36	4	0	$3.6 \times 10^{3}$
CODE-3	Baird-Parker 平板	> 300	47	0	0	$4.7 \times 10^{3}$
	科玛嘉金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	45	0	0	$4.5 \times 10^{3}$
	环凯金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	54	5	0	$5.4 \times 10^{3}$
CODE-4	Baird-Parker 平板	> 300	41	4	0	$4.1 \times 10^{3}$
	科玛嘉金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	38	0	0	$3.8 \times 10^{3}$
	环凯金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	49	5	0	$4.9 \times 10^{3}$
CODE-5	Baird-Parker 平板	289	22	8	0	$2.2 \times 10^{3}$
	科玛嘉金黄色葡萄球菌显色平板	207	23	0	0	$2.3 \times 10^{3}$
	环凯金黄色葡萄球菌显色平板	289	29	0	0	$2.9 \times 10^{3}$
CODE-6	Baird-Parker 平板	> 300	50	2	0	$5.0 \times 10^{3}$
	科玛嘉金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	53	0	0	$5.3 \times 10^{3}$
	环凯金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	52	1	0	$5.2 \times 10^{3}$
CODE-7	Baird-Parker 平板	> 300	43	7	0	$4.3 \times 10^{3}$
	科玛嘉金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	47	0	0	$4.7 \times 10^{3}$
	环凯金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	53	7	0	$5.3 \times 10^{3}$
CODE-8	Baird-Parker 平板	170	16	0	0	$1.7 \times 10^{3}$
	科玛嘉金黄色葡萄球菌显色平板	202	20	0	0	$2.0 \times 10^{3}$
	环凯金黄色葡萄球菌显色平板	180	16	1	0	$1.8 \times 10^{3}$
	Baird-Parker 平板	> 300	41	9	0	$4.1 \times 10^{3}$
CODE-9	科玛嘉金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	43	0	0	$4.3 \times 10^{3}$
	环凯金黄色葡萄球菌显色平板	> 300	42	5	0	$4.2 \times 10^{3}$
CODE-10	Baird-Parker 平板	0	0	0	0	< 10
	科玛嘉金黄色葡萄球菌显色平板	0	0	0	0	< 10
	环凯金黄色葡萄球菌显色平板	0	0	0	0	< 10

本次能力验证中,编号为 CODE  $1\sim9$  的样品均检出了金黄色葡萄球菌,编号为 CODE 10 的样品未检出金黄色葡萄球菌,金黄色葡萄球菌的计数结果按照 Baird-Parker 平板上的计数数值进行上报。结果阳性样品的 Z 值均 <2; 阴性样品为 <10 CFU/g,均为满意。

#### 3.2 盲样中添加菌株的鉴定及分型

为了进一步弄清本次能力验证中添加的菌株类型,我们对编号为 CODE 1~10 的金黄色葡萄球菌显色平板进行了比较,从中挑选出 4 种相同颜色不同的菌落(每种 2 株),对其进行分类纯化,编号为 CODE 1 样品的  $10^{-2}$  稀释度平板上挑选出 4 种颜色不同的菌落,然后利用 RiboPrinter<sup>®</sup>全自动微生物基因指纹鉴定系统对其进行鉴定及分型,结果如图 1 所示。

通过鉴定, 8 株菌株均为葡萄球菌, 包括 4 个"种"。其中, #2 和#8 同为沃氏葡萄球菌(*S. warneri*)、#6 和#7 同为表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、#4 和#5 同为金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、#1 和#3 同为模仿葡萄球菌(*S. simulans*)。

本实验选用 EcoR I 限制性内切酶对随机挑取并进行分离纯化的菌株进行酶切,均能获得清晰的 rDNA 图谱,表明 EcoR I 限制性内切酶对这 8 株菌具有良好的分型能力,结果得到 1.1~48 kb 的 rDNA 指纹图谱。根据电泳条带的位置和相关条带的强度不同, 8 株葡萄球菌被分为 4 个核糖体型,相似度在 3.0%~91.8%。鉴定为相同"种"的葡萄球菌归类于同一核糖体型下,但除 2 株目标菌 S. aureus(#4 和#5)的相似性系数为 91.8%,同源性较高外,其余 3 种葡萄球菌即使为相同"种",但条带差异明显,菌株之间同源性可能较小。其中,2 株模仿葡萄球菌(#1 和#3)的相似性系数为 70.7%; 2 株 S. epidermidis (#6 和#7)的相似性系数为 70.7%; 2 株 S. warneri (#2 和#8)的相似性系数为 62.5%。由此可见,本

次能力验证中添加的干扰菌即使为相同"种",来源应该不同,而细微的区别均可导致细菌在培养基上的生长特性的改变,从而增加了实验人员对目标菌的辨识难度。

# 4 结 论

此次能力验证结果中、金黄色葡萄球菌定量的平板 计数结果 Z 值均 < 2, 为满意结果。平板计数法中使用了 Baird-Parker 平板和金黄色葡萄球菌显色平板, 其中, 金黄 色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上、菌落颜色呈深灰色到 黑色, 周围为一浑浊带和透明圈; 在显色培养基上均为紫 红色菌落, 显色十分明显。检测时发现, 由于样品中添加了 同样能分解卵黄、产生与金黄色葡萄球菌相似沉淀环及透 明圈的干扰菌,使其周围一圈的培养基完全变透明,因此 无论是在含有较多干扰菌的低稀释度 Baird-Parker 平板上 还是在含有较少干扰菌的高稀释度 Baird-Parker 平板上都 会有大面积的透明圈出现,从而影响对典型菌落的辨识。 因此建议在进行计数时尽量选择菌落之间没有相互干扰的 平板、并且在进行血浆凝固酶的确认试验时多挑一些可疑 菌落,以增加计数的准确性。相比之下,显色培养基则不存 在这一问题,由于目标菌显色与干扰菌不同,对于金黄色 葡萄球菌疑似菌落的辨识相对较容易,对实验人员的经验 要求相对较低。

由于能力验证一般情况下只发放 1 份样品, 结果以 1 次实验为准。为保证本次试验结果的准确性, 除按国标GB4789.10-2010 规定的 Baird-Parker 平板外还选择了 2 个不同品牌的显色培养基对样品进行计数。结果显示每个编号样品所含的金黄色葡萄球菌在 3 种平板上的计数值十分接近, 同样验证了对于 Baird-Parker 平板上金黄色葡萄球菌的计数结果的可靠性。

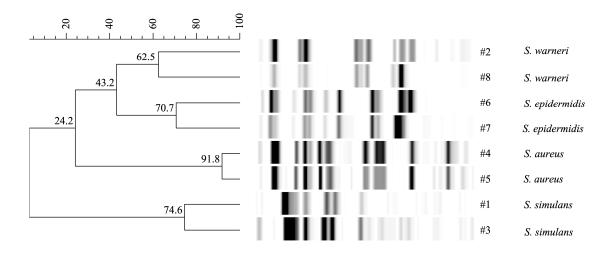


图 1 盲样中添加菌株的 RiboPrinter®聚类分析图

Fig. 1 Dendrogram of RiboPrinter® clusters and relationships of adding bacteria in the sample

本次能力验证取得满意结果与提前进行预实验、使 实验人员先能直观了解目标菌在相应培养基上的菌落形态、 从而对后续的辨识发挥重要作用是分不开的。除此之外, 建议实验中用到的培养基一定要通过质控[12], 正如本次试 验前第一时间对所用培养基进行了质控,以保证结果的可 靠性。设置阴、阳性对照同样十分必要, 可以方便出现问 题时查找原因[13]。此外还考虑到样品中可能添加了对结果 造成影响的干扰菌, 因此采取了一些方法提高检验的准确 性, 比如: 同时尽可能多的使用其他先进的辅助检测方法, 如 RiboPrinter®全自动微生物基因指纹鉴定系统、以防止 漏检或错检[14]。样品处理时、要全部溶解于检测、样品稀 释过程中要充分混匀[15]; 样品要稀释到足够的倍数, 一定 要从原液开始做起、最高稀释度要超过作业指导书提供的 范围; 实验中, 在前期培养过程中加强观察能够有助于计 数[16]; 在不确定的情况下可采用多种鉴定手段去佐证。因 此、要做好能力验证、必须控制好检测过程的每个关键环 节,这样才能保证检验结果准确有效。通过本次食品微生 物能力验证,丰富了实验室检测人员对食品中金黄色葡萄 球菌的检测经验,也对实验室内部质控方法的有效性进行 了确认, 促使实验室的检测水平不断提高。

#### 参考文献

- [1] Atanassova V, Meindla R. Prevalence of Staphylococcus aureus and Staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR [J]. Int J Food Microbiol, 2001, 68(1-2): 105-113.
- [2] 黄启红, 张志军, 蔡大川, 等. 一项微生物能力验证的多种方法检测结果分析[J]. 广东化工, 2014, 41(12): 189-190.
  - Huang Q H, Zhang Z J, Chai D C, *et al.* Analysis of results from several detection methods in a microbiological proficiency testing [J].Guangdong Chem Ind, 2014, 41(12): 189-190.
- [3] 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): 86-89
  - Zhen Z. The analysis of microbiological proficiency testing results [J]. Heilongjang Agric Sci, 2011, (6): 86-89.
- [4] CNAS-CL09: 2013 检测和校准实验室能力认可准则在微生物领域的应用说明[Z].
  - CNAS-CL09:2013 Guidance on the application of testing and calibration laboratory competence accreditation criteria in the field of microbiological testing [Z].
- [5] GB4789-2010 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S].
  - GB4789-2010 Food microbiological examination Staphylococcus aureus [S].
- [6] 江志杰, 高春. 化妆品中金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌检出能力验证结果与分析[J]. 香料香精化妆品, 2015, 12(6): 29-36.
  - Jiang ZJ, Gao C. Proficiency testing results and analysis of detection ability of *S. aureus* and *P. aeruginosa* in cosmetics [J]. Flav Frag Cosmet, 2015, 12(6): 29-36.
- [7] 黄汝添,吴清平,张菊梅,等.金黄色葡萄球菌显色培养基研究进展[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(6):1148-1150.
  - Huang RT, Wu QP, Zhang JM, et al. Advance in Staphylococcus arueus chromogenic media research [J]. Chin J Health Lab Tech, 2007, 17 (6):

1148-1150

- [8] Silva BO, Caraviello DZ, Rodrigues AC, et al. Evaluation of petrifilm for the isolation of Staphylococcus aureus from milk samples [J]. J Dairy Sci, 2005, 88(8): 3000-3008.
- [9] 李铭新. 血浆凝固酶试验质量控制的体会[J]. 口岸卫生控制, 2012, 17(3): 63-63
  - Li MX. The experience of plasma coagulase test quality control [J]. Port Health Control. 2012, 17(3): 63-63.
- [10] 刘真真, 林涛, 李光伟, 等. 金黄色葡萄球菌不同培养基与反应条件对 其血浆凝固酶的影响[J]. 检验检疫科学, 2005, 15(5): 34-35.
  - Liu ZZ, Lin T, Li GW, et al. The influence of different culture medium and reaction conditions on plasma coagulase test of *Staphylococcus aureus* [J]. Inspect Quarant Sci, 2005, 15(5): 34-35.
- [11] 吉彦莉, 郭勇峰, 王敬辉, 等. CNCA-12-A01 食品微生物学能力验证结果分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2013, 23(4): 100-101.
  - Ji YL, Guo YF, Wang JH, *et al.* Analysis on results of food microbiological proficiency Test [J]. J Pub Health Prev Med, 2013, 23(4): 100-101.
- [12] 王志立. 实验室间比对/能力验证工作中应注意问题的探讨[J]. 职业卫生与病伤, 2007, 22(4): 297-298.
  - Wang LZ. Discussion on questions concering experimental comparative and capability verification tests in different laboratories [J]. J Occup Health Damag, 2007, 22(4): 297-298.
- [13] 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, (2): 44-47.
  - Lu Y, Wang F, Jin X, *et al.* Analysis on results of food microbiological proficiency test (CNAS T0504) [J]. J Inspect Ouarant, 2013, (2): 44-47.
- [14] 陈欢. 谈谈参加食品微生物学能力验证的体会[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, (2): 441-442.
  - Chen H. Talk about the experience of attending proficiency testing in food microbiological examination [J]. Chin J Health Lab Technol, 2009, (2): 441-442.
- [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): 154-157.
  - Shu JJ, Zhang WC, Yuan F, *et al*. Proficiency testing in food microbiological examination [J]. Shanghai J Prev Med, 2014, 26(3): 154–157.
- [16] 肖剑,李慧琴,陈楷,等. 食品微生物能力验证样品菌落总数检验方法 [J]. 食品安全质量检测学报、2014、5(10): 3343-3348.
  - Xiao J, Li HQ, Chen K, *et al.* Detection methods of aerobic plate count on food microbiological proficiency testing [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(10): 3343-3348.

(责任编辑:姚 菲)

#### 作者简介



钟 玮,硕士,药师,主要研究方向 为微生物学检验。

E-mail: zhongwei96@126.com



杨美成,博士,主任药师,主要研究 方向为实验室质量管理、药物分析与微生 物学检验。

E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com