

食品中金黄色葡萄球菌和沙门氏菌检出能力验证 结果与分析

孙晶*, 王歆睿, 魏静元, 姜薇

(辽宁省分析科学研究院, 沈阳 110015)

摘要: **目的** 提升食品中金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的检测能力, 增强实验室竞争力。**方法** 依据能力验证作业指导书、国家标准 GB 4789.10-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》和 GB 4789.4-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》的要求, 分别对 1[#]~5[#]金黄色葡萄球菌待检样品和 6[#]~10[#]沙门氏菌待检样品进行增菌、分离和生化反应鉴定。**结果** 10 个待测样品中, 2[#]、4[#]检出金黄色葡萄球菌, 6[#]、7[#]检出沙门氏菌, 10 个样品均取得满意的结果。**结论** 通过参加能力验证工作, 可以较好地提高实验室的检测能力。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 沙门氏菌; 定性检测; 食品; 能力验证

Proficiency testing results and analysis of detection ability of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* in food

SUN Jing*, WANG Xin-Rui, WEI Jing-Yuan, JIANG Wei

(Liaoning Province Academy of Analytic Sciences, Shenyang 110015, China)

ABSTRACT: Objective To strengthen the detection capability of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* in food and improve the competition ability of laboratory. **Methods** According to working instruction, GB 4789.10-2010 National food safety standard Food microbiological examination: *Staphylococcus aureus* and GB 4789.4-2010 National food safety standard Food microbiological examination: *Salmonella*, 1[#]~5[#] *staphylococcus aureus* inspected samples and 6[#]~10[#] *Salmonella* inspected samples were enriched, isolated and biochemically identified. **Results** The results showed that in 10 samples, *Staphylococcus aureus* was detected in 2[#] and 4[#], and *Salmonella* was detected in 6[#] and 7[#]. The test results of 10 samples were satisfied. **Conclusion** By participating in the proficiency testing, the laboratory's detection ability can be improved.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*; *Salmonella*; qualitative detection; food; proficiency testing

1 引言

能力验证是利用实验室间比对, 按照预先制定的准则评价参加者的能力^[1]。实验室和检测机构可通过能力验证这种外部质量保证工具, 确认实验室的管理能力, 补充其内部

质量控制技术, 评估检测人员的能力并确认其资格, 提高实验室的竞争力, 增加人员、管理者和实验室外部服务客户的自信心^[2,3]。CNAS-AL07《能力验证领域和频次表》规定, 食品微生物领域的能力验证最低参加频次为 1 次/年^[4]。金黄色葡萄球菌和沙门氏菌是引起细菌性食物中毒的重要病原菌,

*通讯作者: 孙晶, 博士, 副研究员, 研究方向为食品质量安全及致病菌检测。E-mail: jingjing85678567@163.com

*Corresponding author: SUN Jing, Ph.D, Associate Researcher, Liaoning Province Academy of Analytic Sciences, No.103, Wanliutang Road, Shenhe District, Shenyang 110015, China. E-mail: jingjing85678567@163.com

在自然界中分布广泛,极易污染食物、水源等,对人类健康造成极大威胁^[5-7]。因此,沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的检测在食品安全检验中具有重要意义^[8-10]。在我国食品卫生标准中,已将沙门氏菌和金黄色葡萄球菌作为常规检验项目^[11]。为提高对食品中金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的检测能力和水平,本实验室参加了2016年由辽宁省质量技术监督局组织的食品中沙门氏菌和金黄色葡萄球菌能力验证。

2 材料与方法

2.1 待检样品

共10管待测样品,其中编号1[#]~5[#]为金黄色葡萄球菌待检样品,6[#]~10[#]为沙门氏菌待检样品,均为接种在半固体培养基中的活菌,2 mL冻存管装,由辽宁省疾病预防控制中心提供。

2.2 培养基及试剂

7.5%氯化钠肉汤、Baird-Parke(BP)平板、血平板、冻干血浆、缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、四硫磺酸钠煌绿(tetrathionate broth base, TTB)增菌液、亚硒酸盐胱氨酸(selenite cystine, SC)增菌液、沙门氏菌显色培养基、金黄色葡萄球菌显色培养基、亚硫酸铋(bismuth sulfite, BS)琼脂、革兰氏染液、沙门氏菌生化鉴定盒、沙门氏菌诊断血清均购自广东环凯微生物科技有限公司。

2.3 标准菌株

金黄色葡萄球菌 10384、肠炎沙门氏菌 21482 购自中国工业微生物种保藏管理中心。

2.4 仪器

生化培养箱(上海一恒科技有限公司);全自动高压蒸汽灭菌器 SX-500(日本 TOMY 公司);电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司);生物安全柜(美国 Nuair 公司)。

2.5 方法

参照能力验证作业指导书、GB 4789.10-2010 和 GB 4789.4-2010^[12,13]进行实验。

2.5.1 样品前处理

无菌操作,将冻存管中全部半固体培养基样品取出当做 25 g 食品样品进行检测。

2.5.2 增菌

1[#]~5[#]待检样品分别移至盛有 225 mL 7.5%氯化钠肉汤中,振荡混匀,36 ℃培养 24 h。6[#]~10[#]待检样品分别移至盛有 225 mL BPW 培养液中,振荡混匀,36 ℃培养 18 h。移取 1 mL 转接于 10 mL TTB 内,42 ℃培养 24 h。同时另取 1 mL 转接于 10 mL SC 内,36 ℃培养 24 h。

2.5.3 分离和鉴定

将 1[#]~5[#]待检样品培养物分别划线接种到 BP 平板、血平板和金黄色葡萄球菌显色培养基平板,36 ℃培养 24 h,挑取可疑菌落进行染色镜检和血浆凝固酶实验。将 6[#]~10[#]

待检样品培养物分别划线接种到 BS 平板和沙门氏菌显色培养基平板,36 ℃培养 24 h,挑取可疑菌落进行生化反应及血清学鉴定。

3 结果与分析

3.1 1[#]~5[#]待检样品鉴定结果

分离平板上的菌落特征见表1。从表1可以看出,1[#]~5[#]样品接种 7.5%氯化钠肉汤后均混浊,说明 1[#]~5[#]样品含有能在该培养基生长的微生物,通过划线接种选择性培养基进行进一步分离,发现 2[#]和 4[#]样品呈现明显的金黄色葡萄球菌可疑菌落特征,1[#]、3[#]和 5[#]样品在 BP 平板上无混浊带,血琼脂平板上无溶血圈,是金黄色葡萄球菌的可能性比较低。进一步选用金黄色葡萄球菌显色培养基进行补充实验。金黄色葡萄球菌在显色培养基上呈明显的紫-红色,其他菌呈现不同的颜色或被抑制,其特点是反应灵敏度高,假阳性概率比传统的培养基低,因而能使筛选效率大大增加。经验证发现 2[#]、4[#]样品在显色培养基上呈明显的粉红色菌落,边缘整齐,初步判断为可疑金黄色葡萄球菌。1[#]、3[#]和 5[#]样品呈蓝绿色或无色,初步判断为非可疑金黄色葡萄球菌。进一步进行生化鉴定(表2)。发现 2[#]和 4[#]样品中分离出的革兰氏阳性球菌血浆凝固酶实验为阳性,血浆凝固酶是金黄色葡萄球菌重要的细菌生化指标。2[#]和 4[#]样品产生凝固酶从而使冻干血浆发生凝固,1[#]、3[#]和 5[#]样品不产生凝固酶,因而冻干血浆不凝固。综合上述结果可判断 2[#]和 4[#]样品检出金黄色葡萄球菌,1[#]、3[#]和 5[#]样品未检出金黄色葡萄球菌。

3.2 6[#]~10[#]待检样品鉴定结果

分离平板上的菌落特征见表3。从表3可以看出,6[#]~10[#]样品前增菌液接种至 TTB 和 SC 中均混浊,说明样品中均含有能在该培养基生长的微生物。划线接种 BS 平板和沙门氏菌显色培养基平板,发现所有样品在 BS 平板上均呈现黑色菌落,6[#]、7[#]样品菌落周围的培养基呈现淡淡的黑色,与 GB 4789.4-2010^[13]的描述基本一致,6[#]~10[#]均为可疑沙门氏菌。但从沙门氏菌显色培养基平板上发现,6[#]、7[#]样品均呈紫红色菌落,与显色培养基说明书菌落特征一致,为可疑沙门氏菌;8[#]~10[#]样品呈蓝绿色菌落,与说明书可疑菌落特征不一致,为非可疑沙门氏菌。5个样品在 BS 和显色培养基上出现了不同的结果,需进一步进行生化鉴定(表4)。发现 8[#]~10[#]样品接种三糖铁琼脂斜面产酸,底层产酸,赖氨酸脱羧酶试验阴性,沙门氏菌诊断血清玻片不凝集,可鉴定为非沙门氏菌属。而 6[#]、7[#]样品接种三糖铁琼脂斜面不产酸,底层产酸,产气产硫化氢,赖氨酸脱羧酶试验阳性,靛基质、尿素、氰化钾均为阴性,均为沙门氏菌典型生化反应,且沙门氏菌诊断血清玻片凝集。综合上述结果,可鉴定 6[#]、7[#]检出沙门氏菌,8[#]~10[#]未检出沙门氏菌。

表 1 1[#]~5[#]待检样品选择性平板菌落特征
Table 1 Bacterial colony characteristics of 1[#]~5[#] samples

待检样品	7.5%氯化钠肉汤	BP 平板	血平板
1 [#]	混浊	菌落黑色圆形	菌落灰白, 大且凸起
2 [#]	混浊	菌落黑色圆形, 边缘淡色, 周围有混浊带	菌落圆形光滑, 金黄色, 大且凸起, 周围有溶血圈
3 [#]	混浊	菌落黑色圆形	菌落灰白, 圆形, 略有蔓延
4 [#]	混浊	菌落黑色圆形, 边缘淡色, 周围有混浊带	菌落圆形光滑, 金黄色, 大且凸起, 周围有溶血圈
5 [#]	混浊	菌落黑色圆形	菌落灰白
CICC 10384	混浊	菌落黑色圆形, 边缘淡色, 周围有混浊带	菌落圆形光滑, 金黄色, 大且凸起, 周围有溶血圈

表 2 1[#]~5[#]待检样品生化鉴定
Table 2 Biochemical identification of 1[#]~5[#] samples

待检样品	革兰氏染色	血浆凝固酶实验	是否检出金黄色葡萄球菌
1 [#]	革兰氏阴性	阴性	否
2 [#]	革兰氏阳性球菌, 排列成葡萄状, 无芽孢	阳性	是
3 [#]	革兰氏阴性	阴性	否
4 [#]	革兰氏阳性球菌, 排列成葡萄状, 无芽孢	阳性	是
5 [#]	革兰氏阴性	阴性	否
CICC 10384	革兰氏阳性球菌, 排列成葡萄状, 无芽孢	阳性	是

表 3 6[#]~10[#]待检样品选择性平板菌落特征
Table 3 Bacterial colony characteristics of 6[#]~10[#] samples

待检样品	TTB	SC	BS 平板	沙门氏菌显色培养基平板
6 [#]	混浊	混浊	菌落黑色有光泽, 周围培养基呈黑色	品红色菌落
7 [#]	混浊	混浊	菌落黑色有光泽, 周围培养基呈黑色	品红色菌落
8 [#]	混浊	混浊	菌落黑色	蓝绿色菌落
9 [#]	混浊	混浊	菌落黑色	蓝绿色菌落
10 [#]	混浊	混浊	菌落黑色	蓝绿色菌落
CICC 21482	混浊	混浊	菌落黑色有光泽, 周围培养基呈黑色	品红色菌落

表 4 6[#]~10[#]待检样品生化鉴定
Table 4 Biochemical identification of 6[#]~10[#] samples

待检样品	三糖铁				胨基质	尿素	氰化钾	赖氨酸脱羧酶	是否检出沙门氏菌
	斜面	底层	产气	硫化氢					
6 [#]	—	+	+	+	—	—	—	+	是
7 [#]	—	+	+	+	—	—	—	+	是
8 [#]	+	+	+	+	+	+	+	—	否
9 [#]	+	+	+	+	+	+	+	—	否
10 [#]	+	+	+	+	+	+	+	—	否
CICC 21482	—	+	+	+	—	—	—	+	是

注: “+”阳性; “-”阴性。

4 结论与讨论

按照能力验证作业指导书和 GB 4789.10-2010、GB 4789.4-2010 的要求对 10 个样品进行检测。结果表明, 2[#]、4[#]检出金黄色葡萄球菌, 6[#]、7[#]检出沙门氏菌, 其余样品未检出。对沙门氏菌进行分离时, 在 BS 平板上观察的菌落形态十分相似, 而沙门氏菌显色培养基平板的特异性强, 品红色和蓝绿色菌落区分明显, 结果更直观, 在可疑菌落的初筛中起到了关键作用。对金黄色葡萄球菌进行分离时, 为了避免干扰菌对结果产生影响, 除了采用国标规定的 BP 平板和血平板外, 还使用了金黄色葡萄球菌显色培养基。6[#]、7[#]样品在金黄色葡萄球菌显色培养基上呈紫红色菌落且边缘整齐, 而 8[#]~10[#]样品则为蓝绿色菌落, 目标菌与干扰菌显色明显不同, 表明金黄色葡萄球菌显色培养基对目标菌的选择性更强, 使实验人员对金黄色葡萄球菌可疑菌落的辨识变得相对容易。

参加能力验证是实验室保证结果质量的重要手段^[14,15]。本次能力验证取得满意结果与提前进行预实验了解目标菌在相应选择性培养基上的菌落形态、仔细阅读作业指导书并按技术规范操作、对培养基和试剂做好质控密切相关。通过能力验证, 提高了实验室对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的检测能力, 提升了检测人员的专业技术能力和职业素养, 促进了实验室检测水平的提高。

参考文献

- [1] CNAS-RL02: 2016 能力验证规则[S].
CNAS-RL02: 2016 Rules for proficiency testing [S].
- [2] CNAS-CL09: 2013 检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明[S].
CNAS-CL09: Guidance on the application of testing and calibration laboratory competence accreditation criteria in the field of microbiological testing [S].
- [3] 毛燕, 闫林. 实验室参加能力验证活动的意义分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(9): 2958–2961.
Wang Y, Yan L. Benefits analysis of the laboratories participation in proficiency testing programs [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(9): 2958–2961.
- [4] CNAS AL07: 2015 CNAS 能力验证领域和频次表[S].
CNAS AL07: 2015 Proficiency testing area and frequency [S].
- [5] Mcsorley SJ. Immunity to intestinal pathogens: lessons learned from *Salmonella* [J]. Immunol Rev, 2015, 260(1): 168–182.
- [6] Wang W, Liu F, Baloch Z, et al. Genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pigs and retail Foods in China [J]. Biomed Environ Sci, 2017, 30(8): 570–580.
- [7] Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, et al. Waterborne pathogens: detection methods and challenges [J]. Pathog, 2015, 4(2): 307–334.
- [8] 江志杰, 王似锦, 高春. 食品中沙门氏菌检出能力验证结果与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1929–1935.
Jiang ZJ, Wang SJ, Gao C. Proficiency testing results and analysis of *Salmonella* detection ability in food [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(5): 1929–1935.
- [9] 钟玮, 张宁, 刘玉萍, 等. 食品中金黄色葡萄球菌定量检测能力验证结果与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2758–2762.
Zhong W, Zhang N, Liu YP, et al. Proficiency testing results and analysis of quantitative detection of *Staphylococcus aureus* in food [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(7): 2758–2762.
- [10] 张红莉, 欧露真. 能力验证试验中沙门氏菌的分离与鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(12): 4996–4999.
Zhang HL, Ou LZ. Isolation and identification of *Salmonella* in proficiency testing [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(12): 4996–4999.
- [11] GB29921-2013 食品安全国家标准 食品中致病菌限量[S].
GB29921-2013 National food safety standard-Food microbiological examination: limit of pathogenic bacteria [S].
- [12] GB 4789.10-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S].
GB 4789.10-2010 National food safety standard-Food microbiological examination: *Staphylococcus aureus* [S].
- [13] GB 4789.4-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2010 National food safety standard-Food microbiological examination: *Salmonella* [S].
- [14] 颜瑛, 罗玉彬, 王文娟, 等. 能力验证试验中沙门氏菌的分离和鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(9): 3497–3503.
Yan Y, Luo YB, Wang WJ, et al. Isolation and identification of *Salmonella* spp. in food during the proficiency testing [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(9): 3497–3503.
- [15] Abdel MM, Planchon V, Polet M, et al. Analytical performances of food microbiology laboratories-critical analysis of 7 years of proficiency testing results [J]. J Appl Microbiol, 2016, 120(2): 346–354.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



孙 晶, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品安全与致病菌检测。

E-mail: jingjing85678567@163.com