

探究稀释液温度对金黄色葡萄球菌定量检测的影响

朱文斌, 周浩*, 朱虹霖, 李俊霞, 张洪伟, 王同智, 杨红, 蔡炯, 沈亮
(成都市食品药品检验研究院, 成都 610000)

摘要: **目的** 通过单因子变量实验分析探究稀释液温度对金黄色葡萄球菌热损伤的影响。**方法** 根据 GB 4789.10-2016《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 第二法 金黄色葡萄球菌平板计数法》, 对不同温度稀释液下的金黄色葡萄球菌进行计数。**结果** 使用 50 °C 的稀释液的金黄色葡萄球菌计数实验结果偏低。**结论** 50 °C 的稀释液会对金黄色葡萄球菌造成热损伤, 影响实验结果。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 稀释液; 热损伤

Exploration the effect of dilution temperature on quantitative detection of *Staphylococcus aureus*

ZHU Wen-Bin, ZHOU Hao*, ZHU Hong-Lin, LI Jun-Xia, ZHANG Hong-Wei,
WANG Tong-Zhi, YANG Hong, CAI Jiong, SHEN Liang
(Chengdu Institutes for Food and Drug Control, Chengdu 610000, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the thermal damage of *Staphylococcus aureus* caused by diluent temperature by single factor variable experiment. **Methods** According to GB 4789.10-2016 *Food safety national standard-Food microbiology inspection Staphylococcus aureus second method-Staphylococcus aureus plate counting method*, *Staphylococcus aureus* was counted in different temperature diluents. **Results** The results of counting *Staphylococcus aureus* with dilution at 50 °C were lower. **Conclusion** The dilution at 50 °C can cause thermal damage to *Staphylococcus aureus* and affect the experimental results.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*; diluent; thermal damage

1 引言

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种重要病原菌, 隶属于葡萄球菌属 (*Staphylococcus*), 是革兰氏阳性菌的代表, 有“嗜肉菌”的别称, 是人类化脓感染中最常见的病原菌, 可引起局部化脓感染、伪膜性肠炎、肺炎、心包炎等, 甚至败血症、脓毒症等全身感染。金黄色葡萄球菌在空气、水、灰尘和动物排泄物中都可能存在, 对各种理化因素都有较高的抵抗力^[1]。因此, 金黄色葡萄球菌

的食物中毒事件时有发生。在美国, 金黄色葡萄球菌是引起食源性疾病发生率较高的 5 种病原菌之一。欧盟食品安全局报道, 2009 年在欧洲由金黄色葡萄球菌及其毒素引起的食源性疾病共 293 起, 在各类食源性疾病爆发中列为第四位。在中国, 金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件也时有发生^[2]。

GB 4789.10-2016《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》^[3]代替了 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

*通讯作者: 周浩, 主要研究方向为食品微生物检验。E-mail: 402241344@qq.com

*Corresponding author: ZHOU Hao, Chengdu Institutes for Food and Drug Control, Chengdu 610000, China. E-mail: 402241344@qq.com

验》^[4]、SN/T 2154-2008《进出口食品中凝固酶阳性葡萄球菌检测方法 兔血浆纤维蛋白原琼脂培养基技术》^[5]、SN/T 0172-2010《进出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法》^[6]。GB 19644-2010《食品安全国家标准 乳粉》^[7]中明确指出金黄色葡萄球菌检验按照 GB 4789.10 平板计数法进行检测。

在 GB 4789.18-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳与乳制品检验》5.3.2中指出:称取检样 25 g,加入预热到 45 °C盛有 225 mL 灭菌生理盐水等稀释液或增菌液的锥形瓶内(可使用玻璃珠助溶),振荡使充分溶解和混匀。然而实验操作过程中,很多时候是通过人体皮肤判定增菌液的温度。这种操作对温度的判定会有一定的误差。

本文将稀释液的温度设为 50 °C,以此确认温度偏高是否会对金黄色葡萄球菌造成损伤,影响实验的最终结果,以期为实验室日常检测规范提供参考。

2 材料与方法

2.1 待测样本

乳粉中金黄色葡萄球菌定量检测内部质控样品,样品编号为:CFAPA-QC154A-3,样品为2份,由大连中食国实检测技术有限公司提供。能力验证保留菌株。

2.2 培养基及试剂

氯化钠(分析纯,天津科密欧公司);Baird-Parker 琼脂基、脑心浸出液肉汤(brain heart infusion broth, BHI)、营养琼脂(nutrient agar, NA)、冻干血浆、血琼脂平板、革兰氏染色液试剂盒(北京陆桥公司)。

阳性菌株:金黄色葡萄球菌标准菌(ATCC 6538)购自美国菌种保藏中心。

阴性菌株:表皮葡萄球菌标准菌(CICC 10294)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

2.3 仪器

MIR-254-PC 低温恒温培养箱(日本 Panasonic 公司);NU-425-600E 二级生物安全柜(美国 Thermo 公司);ZEISS Axioskop40 生物显微镜(德国蔡氏公司)。

2.4 样品处理

2.4.1 内部质控样品处理

按照大连中食国实检测技术有限公司提供的《金黄色葡萄球菌定量检测内部质控样品说明书》^[8]。无菌开启西林瓶,立即(1 min内)加入4 mL稀释液,待溶解后,吸出放入无菌瓶内,反应用余下的稀释液清洗西林瓶内壁,回收清洗液放入上述无菌瓶中,合计用稀释液40 mL。此溶液即是待测样品(针对定量检测项目,该40 mL液体即为待测原液,全过程20 min内完成,平行样品操作相同)。

2.4.2 能力验证保留菌株样品处理

取能力验证保留菌株经活化、复苏各24 h后,再经

3000 r/min 离心,制成金黄色葡萄球菌标准菌株粉,作为待测样品。

2.4.3 样品的稀释

吸取25 mL样品至盛有225 mL常温无菌生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中,振荡混匀,充分混匀,制成1:10(V:V)的样品匀液,并逐级稀释。同时,吸取25 mL平行样品至盛有225 mL 50 °C无菌生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中,充分混匀,制成1:10(V:V)的样品匀液,并逐级稀释^[9]。

2.4.4 样品接种

选择1:10、1:100、1:1000(V:V)稀释度的样品匀液,在进行10倍递增稀释的同时,每个稀释度分别吸取1 mL样品匀液以0.3、0.3、0.4 mL接种量分别加入3块Baird-Parker平板,然后用无菌涂布棒涂布整个平板,注意不要触及平板边缘。同时,使用50 °C的稀释液进行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、0.4 mL接种量分别加入3块Baird-Parker平板,然后用无菌涂布棒涂布整个平板,注意不要触及平板边缘。

2.4.5 培养

涂布后,将平板静置10 min,等样品匀液吸收后翻转平板,倒置后于(36±1) °C培养48 h。

2.4.6 典型菌落计数

选择有典型的金黄色葡萄球菌菌落的平板,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,计数典型菌落数。

2.4.7 确认实验

从典型菌落中至少选5个可疑菌落进行鉴定试验。分别做染色镜检,血浆凝固酶试验;同时划线接种到血平板(36±1) °C培养18~24 h后观察菌落形态。

3 结果与分析

从表1看出,内部质控样品和能力验证保留菌株在血平板上菌落特征均为:圆形、光滑、湿润、白色、有完全透明溶血圈,染色镜检均为G⁺球菌。同时,血浆凝固酶实验结果与阳性对照结果一致。根据按照国标对可疑菌落描述判断为金黄色葡萄球菌。

从表2看出,在不同温度的稀释液下,金黄色葡萄球菌的计数结果有显著差异。使用常温稀释液的计数结果高于使用50 °C稀释液的计数结果。

在2018年9月参与中国食品药品检定研究院的乳粉中金黄色葡萄球菌测定能力验证结果为:

CODE0110和CODE0020样品在Baird-Parker琼脂上均有3种形态的菌落:A:黑色菌落(无透明圈、浑浊带)、B:黑色菌落(透明圈比浑浊带大)、C:黑色菌落(浑浊带比透明圈大)。

表 1 菌落形态及生化实验结果
Table 1 Results of colony morphology and biochemical experiment

样品	血平板	革兰氏染色	血浆凝固酶实验				
内部质控样品	圆形、光滑、湿润、白色、有完全透明溶血圈	G ⁺ 球菌	+	+	+	+	+
能力验证保留菌株	圆形、光滑、湿润、白色、有完全透明溶血圈	G ⁺ 球菌	+	+	+	+	+
阳性对照					+		
阴性对照					-		

注: +为检出, -为未检出

表 2 实验结果
Table 2 Experimental results

稀释液温度	常温	50 °C
内部质控样品	3.3×10 ⁴ CFU/g	2.8×10 ³ CFU/g
能力验证保留菌株	3.3×10 ³ CFU/g	2.2×10 ² CFU/g

表 3 菌落 A、B、C 血浆凝固酶试验结果
Table 3 Plasma coagulase test results of colony A, B and C

不同菌落形态	血浆凝固酶试验
A	-
B	+
C	-

将 3 种形态的菌落纯化后用 VITEK 2 进行鉴定, 结果如表 4。

表 4 不同形态菌落的 VITEK 2 鉴定结果
Table 4 VITEK 2 identification of different morphological colonies

不同菌落形态	菌株鉴定结果	概率
A	<i>Enterococcus faecalis</i> (粪肠球菌)	99%
B	<i>Staphylococcus aureus</i> (金黄色葡萄球菌)	99%
C	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (表皮葡萄球菌)	99%

表 5 能力验证实验结果
Table 5 Experimental results of proficiency verification

样品编号	样品类型	结果	样品 Z 值	评价结果
0110	高浓度	480 CFU/g	-3.3	不满意
0020	高浓度	4600 CFU/g	-0.2	

其中 0110 样品 Z 值超出 $-2 \leq Z \leq 2$ 范围, 而 0020 样品 Z 值趋于中值。从表 3、表 4 和表 5 所得到的干扰菌与《NIFDC-PT-145 乳粉中金黄色葡萄球菌测定能力验证

结果报告》相吻合。经研究讨论发现, 在实验开样前, 实验员将稀释液预加热至 50 °C。在开启 0110 样品时, 由于稀释液取出时间较短, 稀释液为 50 °C 左右, 手部没有感受到温度的异常。在开启 0020 样品时, 由于放置时间较长, 稀释液已经恢复至常温。所以, 在此次能力验证实验中, 稀释液的温度是造成实验结果偏差的唯一变量^[10]。

4 结论与讨论

乳粉中金黄色葡萄球菌的检验主要依据 GB 4789.10-2016《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》中的第 2 法金黄色葡萄球菌平板计数法。金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上菌落直径 2~3 mm, 灰黑色菌落, 边缘为淡色, 周围为一混浊带, 外层有一透明圈。由肉眼可明显看出, 2 组 Baird-Parker 平板上的典型的金黄色葡萄球菌数量上差异较大。2 组实验中, 在其他操作条件相同时, 稀释液温度是唯一的变量。由此可见, 50 °C 的稀释液对乳粉中金黄色葡萄球菌造成了热损伤^[11,12]。本次实验中, 金黄色葡萄球菌不是纯菌球, 当金黄色葡萄球菌溶解于 50 °C 稀释液时, 其他物质起到了一定的缓冲和保护作用。若本次实验菌球与乳粉先后溶解, 实验结果差异会更大。由此可见, 在实验前应做好实验规划, 考虑实验中的细节和关键点, 否则会造成很大的误差。

实验室内部质量和能力验证控制能够反映实验室的检测能力和检测质量是否稳定, 是实验室质控的基础与核心。实验室内部质量和能力验证控制涉及到实验室自身的各个环节, 包括人员、机器、原料、方法和环境。同时, 内控实验可以反映出实验室的薄弱环节, 如实验中的细节把握、新方法的确认、新人员的实验能力、新仪器设备的操作、非常规实验检测项目等^[13]。若能力验证结果为不合格, 在一定程度上反应出实验室检验技术上出现了问题, 实验人员的技术水平还有待提高, 还会影响实验室的日常检验工作。实验室应加强实验人员的相关检测技术培训, 更多地参加相关检测指标的能力验证活动, 以提高检测水平、防止能力验证不满意结果的再次发生。

参考文献

- [1] 董彬, 封丽霞, 赵婷婷. 生乳中金黄色葡萄球菌的风险评估[J]. 食品安全导刊, 2018, (28): 64-65.
Dong B, Feng LX, Zhao TT. Risk assessment of *Staphylococcus aureus* in raw milk [J]. China Food Saf Magaz, 2018, (28): 64-65.
- [2] 向红, 周黎, 廖春, 等. 金黄色葡萄球菌及其引起的食物中毒的研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, (27): 196-199.
Xiang H, Zhou L, Liao C, et al. Advances in *Staphylococcus aureus* and its food poisoning [J]. Chin J Food Hyg, 2015, (27): 196-199.
- [3] GB 4789.10-2016 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 4789.10-2016 National food safety standard-Food microbiology inspection *Staphylococcus aureus* inspection [S].
- [4] 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 microbiology inspection *Staphylococcus aureus* inspection [S].
- [5] SN/T 2154-2008 进出口食品中凝固酶阳性葡萄球菌检测方法 兔血浆纤维蛋白原琼脂培养基技术[S].
SN/T 2154-2008 Detection of coagulase positive *Staphylococcus* in import and export food by rabbit plasma fibrinogen agar medium technology [S].
- [6] SN/T 0172-2010 进出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法[S].
SN/T 0172-2010 Inspection method for *Staphylococcus aureus* in import and export food [S].
- [7] GB 19644-2010 食品安全国家标准 乳粉[S].
GB 19644-2010 National food safety standard-Milk powder [S].
- [8] 金黄色葡萄球菌定量检测内部质控样品说明书[Z]. 2018.
Instructions for quantitative detection of internal quality control samples of *Staphylococcus aureus* [Z]. 2018.
- [9] 姜勇, 刘振涛, 马淑棉, 等. 不同接种方式对食品中热损伤大肠菌群检测的比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, (17): 3745-3748.
Jiang Y, Liu ZT, Ma SM, et al. Comparative study on detection of heat-damaged coliform bacteria in food by different inoculation methods [J]. J Food Saf Qual, 2018, (17): 3745-3748.
- [10] 王俊, 滕钰, 周映佑. 能力验证中金黄色葡萄球菌定量检测测量不确定度评定[J]. 食品研究与开发, 2018, (7): 165-168.
Wang J, Teng Y, Zhou YY. Evaluation of uncertainty in quantitative detection of *Staphylococcus aureus* in capability verification [J]. Food Res Dev, 2018, (7): 165-168.
- [11] 杨姗, 燕蛟, 李斌. 温度和酸碱度对金黄色葡萄球菌生长对数期的影响[J]. 山东化工, 2018, (47): 28-30.
Yang S, Yan J, Li B. Effects of temperature and acidity on logarithmic growth of *Staphylococcus aureus* [J]. Shangdong Chem Ind, 2018, (47): 28-30.
- [12] 于艳艳, 丁甜, 刘东红. 波动温度下原料乳中金黄色葡萄球菌的生长动力学模型[J]. 中国食品学报, 2016, (11): 35-41.
Yu YY, Ding T, Liu DH. Growth kinetics model of *Staphylococcus aureus* in raw milk at fluctuating temperature [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2016, (11): 35-41.
- [13] 谢作蓉, 杨穗珊, 林青, 等. 能力验证中金黄色葡萄球菌定量检测结果分析与方法比较[J]. 现代食品, 2017, (20): 111-113.
Xie ZR, Yang HS, Lin Q, et al. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus* in competency testing [J]. Mod Food, 2017, (20): 111-113.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

朱文斌, 主要研究方向为食品生微生物检验。
E-mail: 891603266@qq.com

周浩, 主要研究方向为食品生微生物检验。
E-mail: 402241344@qq.com