

# 食品中微生物检测能力验证结果与分析

陈婉娃\*, 智 丽, 林贵鸿

(海南省食品药品检验所五指山分所, 五指山 572200)

**摘 要:** **目的** 提高实验室检验人员微生物检测能力和水平, 增强实验室竞争力。**方法** 实验室参加中国检验检疫科学研究院测试评价中心组织的食品中单核细胞增生李斯特氏菌、副溶血性弧菌 2 项检验能力验证。按照盲样作业指导书的要求对样品进行前处理后, 依据 GB 4789.30-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》和 GB 4789.7-2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》进行定性检测。**结果** 样品 17-P842 鉴定出单核细胞增生李斯特氏菌, 样品 18-E886 鉴定出副溶血性弧菌。**结论** 本次能力验证结果满意, 为今后实验室检测实际样品提供参考经验。

**关键词:** 能力验证; 单核细胞增生李斯特氏菌; 副溶血性弧菌

## Validation results and analysis of microbial testing capability in food

CHEN Wan-Wa\*, ZHI Li, LIN Gui-Hong

(Hainan Institute For Food and Drug Control Wuzhishan Branch, Wuzhishan 572200, China)

**ABSTRACT: Objective** To improve the ability and level of microbiological testing and enhance the competitiveness of laboratory. **Methods** The laboratory participated in the ability verification of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* in foods organized by the testing and evaluation center of Chinese Academy of Inspection and Quarantine. The samples were pre-treated according to the requirements of the blind sample operating instructions, and the qualitative test was conducted according to GB 4789.30-2016 National food safety standard- Food microbiology test-*Listeria monocytogenes* test and GB 4789.7-2013 National food safety standard-Food microbiology test-*Vibrio parahaemolyticus* test. **Results** *Listeria monocytogenes* was identified in sample 17-P842, and *Vibrio parahaemolyticus* was identified in sample 18-E886. **Conclusion** The results of this capability verification is satisfactory, which provides reference experience for future laboratory testing of actual samples.

**KEY WORDS:** ability verification; *Listeria monocytogenes*; *Vibrio parahaemolyticus*

## 1 引 言

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)是食物中最常见的食源性病原菌之一, 它能引起人畜共患的李氏菌病症, 严重可致死<sup>[1]</sup>。近几年来, 因食品污染单核细胞增生李斯特氏菌而导致的食物中毒事件日渐增多, 已引起

不少国家的广泛关注, 并已被列为 20 世纪 90 年代四大食品致病菌之一<sup>[2,3]</sup>, 该菌在环境中无处不在, 在绝大多数食品中都能找到, 是唯一能够引起人类疾病的腐生菌, 它也是某些食物中的一种污染物, 能引起严重食物中毒。副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)为革兰氏阴性菌, 是一种嗜盐性菌。含有该菌的食物可导致食物中毒<sup>[4]</sup>。常见于鱼、虾、蟹、

\*通讯作者: 陈婉娃, 助理工程师, 主要研究方向为食品药品微生物检验。E-mail: 411211247@qq.com

\*Corresponding author: CHEN Wan-Wa, Assistant Engineer, Hainan Institute For Food and Drug Control Wuzhishan Branch, Wuzhishan 572200, China. E-mail: 411211247@qq.com

贝类和海藻等海产品及以及含盐分较高的腌制食品,如咸菜、腌菜等<sup>[5]</sup>。此菌的存活能力强,临床上以急性起病、腹痛、呕吐、腹泻及水样便为主要症状<sup>[6]</sup>。副溶血性弧菌引起食中毒及急性肠胃炎已成为全球重要公共卫生问题之一<sup>[7]</sup>。因此,我国食品安全标准将这2种菌列为不得检出的病原菌。

近年来,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术已广泛地应用于病原菌的检验研究,但由于不能准确定量,且易产生假阳性等原因,使其应用受到限制。而传统细菌培养检测主要靠分离培养和免疫荧光等方法,由于方法学本身的原因,检测周期长,但准确率更高,随着显色培养基的普遍应用和生化鉴定仪的联合使用,大大简化了鉴定步骤,也缩短了检测周期,使得细菌培养法成为实验室最常用的方法<sup>[8]</sup>。

本次能力验证采用细菌培养法,通过实验室能力验证比对,可以识别实验室存在的问题并启动改进措施,以达到不断提高实验室检测技术和质量控制水平的目的。同时也为相关实验室的检测工作提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 待测样品

乳粉中单核细胞增生李斯特氏菌能力认证样品编号为:17-P842、17-V351;食品中副溶血性弧菌能力认证样品编号为:18-E886、18-K825。由中国检验检疫科学研究院提供。

### 2.2 试剂及仪器

李氏增菌肉汤培养基(*Listeria* broth medium, LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub>)、PALCAM 琼脂培养基、TSA-YE 琼脂培养基、李斯特氏菌显色培养基、单核细胞增生李斯特氏菌生化鉴定盒、3%氯化钠碱性蛋白胨水、硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂弧菌显色培养基(thiosulfate-citrate-biliary-sucrose agaric chromogenic medium, TCBS)、弧菌显色培养基、3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂、3%氯化钠三糖铁琼脂、副溶血性弧菌生化鉴定试剂盒(广东环凯微生物科技有限公司);弧菌显色培养基(郑州博赛生物技术股份有限公司);单核细胞增生李斯特氏菌(A0247B)、副溶血性弧菌(A0250B)(阳性对照菌,广东环凯微生物科技有限公司)。

Mini VIDAS 全自动酶联荧光免疫系统、VITEK 2 COMPACT 全自动细菌鉴定及药敏分析系统(法国生物梅里埃公司)。

### 2.3 实验方法

按照《ACAS-PT355(2017)乳粉中单核细胞增生李斯特氏菌检测能力验证》参试指导书<sup>[9]</sup>和国家标准 GB 4789.30-2016《食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》<sup>[10]</sup>的要求进行增菌、分离和鉴定;按照

《ACAS-PT531(2018)食品中副溶血性弧菌(定性)检测能力验证参试指导书》<sup>[11]</sup>和 GB 4789.7-2013《食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》<sup>[12]</sup>的要求进行增菌、分离和鉴定。同时以阳性对照菌进行阳性对照试验。

#### 2.3.1 单核细胞增生李斯特氏菌能力验证

##### (1) 样品前处理

样品需要用 40.0 mL 无菌水再水化;样品开启后,立即加入 4 mL 无菌水进行再水化,待溶解后,吸出放入无菌瓶,再反复用余下的无菌水清洗西林瓶内壁,回收清洗液放入上述无菌瓶中,此溶液即是待测样品原液(操作各环节确保无菌和充分混匀)。

##### (2) 增菌

以无菌操作吸取待测样品原液 25 mL 加入到含有 225 mL LB<sub>1</sub>增菌液的无菌均质袋中,充分混匀,于 30 °C 培养 24 h;然后移取 0.1 mL 转种于 10mL LB<sub>2</sub>增菌液中,于 30 °C 培养 24 h。

##### (3) 初步分析

取 LB<sub>2</sub>二次增菌液用 Mini VIDAS 全自动酶联荧光免疫系统进行初步分析 1。

##### (4) 选择性分离

取 LB<sub>2</sub>二次增菌液划线接种于李斯特氏菌显色平板和 PALCAM 琼脂平板,于 36 °C 培养 24 h 后开始观察菌落特征形态。

##### (5) 初筛

挑选可疑典型菌落,接种到木糖、鼠李糖发酵管中,于 36 °C 培养 24 h,观察菌落特征形态如表 2。同时在 TSA-YE 平板上划线,于 36 °C 纯培养 24 h,作为后面鉴定的纯培养物。

##### (6) 鉴定

取纯培养菌落用 VITEK 2 COMPACT 全自动细菌鉴定及药敏分析系统进行鉴定,同时进行镜检试验、动力试验、生化试验、溶血试验,协同溶血试验。

#### 2.3.2 副溶血性弧菌能力验证

##### (1) 样品处理

样品开启后,立即加入 4 mL 的 3%氯化钠碱性蛋白胨水进行再水化,待溶解后,吸出放入无菌瓶,再反复用余下的 3%氯化钠碱性蛋白胨水清洗西林瓶内壁,回收清洗液放入上述无菌瓶中,此溶液即是待测样品原液(操作各环节确保无菌和充分混匀)。

##### (2) 增菌

将上述样品原液于 36 °C 培养 18 h。

##### (3) 选择性分离

用接种环沾取 3%氯化钠碱性蛋白胨水培养物一环,于 TCBS 琼脂平板和弧菌显色平板上划线分离,于 36 °C 培养 18 h。

##### (4) 纯培养

挑取 5 个可疑菌落,划线接种于 3%氯化钠胰蛋白胨

大豆琼脂平板, 于 36 °C 培养 18 h。

#### (5) 初步鉴定

取纯培养物进行氧化酶试验、涂片镜检及转种 3% 氯化钠三糖铁琼脂斜面并穿刺底层。

#### (6) 确定鉴定

取纯培养物用 VITEK 2 COMPACT 全自动细菌鉴定及药敏分析系统进行鉴定, 同时进行生化鉴定及神奈川实验。

### 3 结果与分析

#### 3.1 单核细胞增生李斯特氏菌检验结果

按照国家标准 GB 4789.30-2016《食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》<sup>[10]</sup>进行鉴定后, 根据表 1 和表 2 结果, 样品 17-P842 和阳性对照菌鉴定结果一致, 为检出单核细胞增生李斯特氏菌。样品 17-V351 在表 1

李斯特显色平板未见单核细胞增生李斯特氏菌可疑菌落, 经进一步鉴定, 用 VITEK 2 COMPACT 全自动细菌鉴定及药敏分析系统进行鉴定, 与其数据库中的英诺克李斯特氏菌相似度高达 99%, 用英诺克李斯特氏菌同步进行鉴定, 发现所有反应与英诺克李斯特氏菌阳性对照菌反应均一致, 即样品 17-V351 未检出单核细胞增生李斯特氏菌。

#### 3.2 副溶血性弧菌检验结果

按照 GB 4789.7-2013《食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》<sup>[12]</sup>进行鉴定后, 根据表 3 和表 4, 样品 18-E886 和阳性对照菌反应结果均一致, 为检出副溶血性弧菌。样品 18-K825 从第一步增菌培养 18 h, 增菌液澄清, 取增菌液划 TCBS 平板, 弧菌显色培养基平板, 平板上也无菌落生长, 即判定未检出副溶血性弧菌。

表 1 初步分析、增菌和选择性分离结果  
Table 1 Results of preliminary analysis, bacteria-proliferating and selective separation

样品编号	LB <sub>1</sub>	LB <sub>2</sub>	PALCAM 平板	李斯特显色平板	MINI VIDAS
17-P842	浑浊	浑浊	圆形灰绿色菌落, 周围有棕黑色水解圈	蓝绿色光滑规则小菌落, 有乳白色	+
17-V351	浑浊	浑浊	圆形灰绿色菌落, 周围有棕黑色水解圈	蓝绿色光滑规则小菌落, 无乳白色	-
阳性对照	浑浊	浑浊	圆形灰绿色菌落, 周围有棕黑色水解圈	蓝绿色光滑规则小菌落, 有乳白色	+

注: -阴性; +阳性。

表 2 初筛、镜检和鉴定结果  
Table 2 Results of primary screen, microscopy and identification

样品编号	17-P842(李显-蓝绿)	17-P842(PALCAM-灰绿)	17-V351(PALCAM-灰绿)	阳性对照
木糖	-	-	-	-
鼠李糖	+	+	+	+
镜检	G+	G+	G+	G+
动力	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+
甘露醇	-	-	-	-
七叶甘	+	+	+	+
MR-VP	+/+	+/+	+/+	+/+
过氧化氢酶	+	+	+	+
溶血试验	+	+	-	+
协同溶血试验	+	+	-	+
VITEK2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>

注: -阴性; +阳性。

表 3 增菌和选择性分离结果

Table 3 Results of bacteria-proliferating and selective separation

样品编号	3%氯化钠碱性蛋白胨水	弧菌显色培养基(环凯)	弧菌显色培养基(科玛嘉)	TCBS 琼脂
18-E886	浑浊	扁平半透明品红色菌落	淡紫色菌落	圆形半透明绿色菌落
18-K825	澄清	-	-	-
阳性对照	浑浊	扁平半透明品红色菌落	淡紫色菌落	圆形半透明绿色菌落

注: -代表无菌落生长。

表 4 初步鉴定和确定鉴定结果

Table 4 Identification results of preliminary identification and determination

样品编号	18-E886	阳性对照
氧化酶	+	+
革兰氏染色	G-	G-
	斜面	K
3%氯化钠三糖硫化氢	底层	A
	产气	-
	0%	-
嗜性实验	6%	+
	8%	+
	10%	-
3%氯化钠甘露醇	+	+
3%氯化钠蔗糖	-	-
3%氯化钠葡萄糖	+	+
3%氯化钠赖氨酸脱羧酶	+	+
V-P 实验	-	-
ONPG	-	-
神奈川试验	+	+
VITEK2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

注: K 代表产碱; A 代表产酸; +代表阳性或有动力; -代表阴性或无。

#### 4 结论与讨论

在单核细胞增生李斯特氏菌检测中, PALCAM 培养基不能有效区分单核细胞增生李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌。因为 PALCAM 培养基中含有 1 种叫做七叶甙的成分, 上述 2 种李斯特氏菌均能水解七叶甙并与铁离子产生颜色反应而使菌落为棕褐色, 并带褐色晕圈, 从而导致无法被有效区分<sup>[13]</sup>。所以李斯特显色培养基对于李斯特菌属的分离鉴定更适合, 而且可以将可疑菌落在李斯特显色培养基上进行多次反复分离纯化, 以提高后续鉴定的准确率<sup>[14]</sup>。

在副溶血性弧菌检测中, 平板分离培养的时候, 该目

标菌在弧菌显色培养基明显比 TCBS 琼脂长得快, 菌落特征更明显, 因此, 我们实验室更偏向于在弧菌显色培养基上挑取可疑菌落进行下一步鉴定, 以提高检验效率及准确率。

实验室要做好能力验证, 必须控制好检测过程的每一个步骤, 这样才能保证检验结果准确有效。首先要对实验室日常使用检测工作中所使用的培养基、试剂、阳性对照、对照培养基和生化试剂进行监控, 尽量采用选择性培养基, 仪器也要定期进行质量监控, 实验无菌操作过程, 避免操作人员和环境中带来的微生物污染, 以及样品相互间的交叉污染<sup>[15]</sup>。在检验中目标菌在不同平板上的菌落特征, 也需要检测者有丰富的检测经验, 多挑菌落进行鉴定,

防止漏检现象的发生, 才能有效地鉴定目标菌。

本次实验室能力验证均取得满意结果。实验室能力验证是评价实验室技术能力的有效手段, 通过参加实验室能力验证, 可证实实验室的检测质量, 监控其运行状态, 提高实验室的检测能力和水平, 确保检测结果的可靠性<sup>[16,17]</sup>, 同时也有助于提升实验室的市场竞争力。

## 参考文献

- [1] 孙晓霞, 胡连霞, 王建昌, 等. 单核细胞增生李斯特氏菌能力验证样品的制备与验证[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 556-561.  
Sun XX, Hu LX, Wang JC, et al. Preparation and verification of *Listeria monocytogenes* samples for proficiency testing [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(2): 556-561.
- [2] 吴雁军, 曹亢, 郭慧媛, 等. 单增李斯特菌检测方法的最新研究进展[J]. 中国乳业, 2011, 112(4): 138-142.  
Wu YJ, Cao K, Guo HY, et al. The latest research progress of listeria monocytogenes detection method [J]. China Dairy Ind, 2011, 112(4): 138-142.
- [3] 李云霞, 陈雯雯, 顾晨荣, 等. 单增李斯特菌的检测方法研究进展[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2015, 44(6): 687-693.  
Li YX, Chen WW, Gu CR, et al. Research progress of detection methods for listeria monocytogenes [J]. J Shanghai Normal Univ (Nat Sci Ed), 2015, 44(6): 687-693.
- [4] 王立伟, 张昭寰, 赵勇, 等. 市售水产品中副溶血性弧菌污染的定量风险评估[J]. 上海预防医学, 2016, (6): 365-371.  
Wang LW, Zhang ZH, Zhao Y, et al. Quantitative risk assessment of contamination of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products [J]. Shanghai J Prev Med, 2016, (6): 365-371.
- [5] 刘秀梅, 程苏云, 陈艳, 等. 2003 年中国部分沿海地区零售海产品中副溶血性弧菌污染状况的主动监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, (2): 97-99.  
Liu XM, Cheng SY, Chen Y, et al. Active surveillance on *Vibrio parahaemolyticus* in retail seafoods from coastal areas of China in 2003 [J]. Chin J Food Hyg, 2005, (2): 97-99.
- [6] 萧松建, 周奕, 龚红英, 等. 一起副溶血性弧菌食物中毒调查[J]. 中国热带医学, 2017, 18(10): 1046-1049.  
Xiao SJ, Zhou Y, Gong HY, et al. Investigation on a poisoning of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. China Trop Med, 2017, 18(10): 1046-1049.
- [7] 何永贵. 冰鲜海产品食源性致病菌污染的调查分析[J]. 中国医药科学, 2017, (19): 180-182, 193.  
He YG. Investigation and analysis of foodborne pathogenic bacteria pollution of chilled seafood [J]. China Med Pharm, 2017, (19): 180-182, 193.
- [8] 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. The ability verification of food microorganism test [J]. Shanghai J Prev Med, 2014, 26(3): 154-157.
- [9] ACAS-PT355 (2017) 乳粉中单核细胞增生李斯特氏菌检测能力验证参试指导书[Z].  
ACAS-PT355 (2017) Milk powder monocyte proliferation *Listeria* detection capability validation-Reference guidelines [Z].
- [10] GB 4789.30-2016. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特菌检验[S].  
GB 4789.30-2016. National food safety standard-Food microbiology test for *Listeria monocytogenes* [S].
- [11] ACAS-PT531 (2018) 食品中副溶血性弧菌(定性)检测能力验证 参试指导书[Z].  
ACAS-PT531 (2018) Food *Vibrio parahaemolyticus* (qualitative) detection capability verification-Reference guidelines [Z].
- [12] GB 4789.7-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验[S].  
GB 4789.7-2013 National food safety standard-Food microbiology examination of *Vibrio parahaemolyticus* [S].
- [13] 李凤梅. 食品微生物检验(1 版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015.  
Li FM. Microbiological examination of food (1st edition) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015.
- [14] 陈学强, 刘阳, 马炳存, 等. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌检测能力验证[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(10): 5080-5084.  
Chen XQ, Liu Y, Ma BC, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in food [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(10): 5080-5084.
- [15] 张连钢, 方剑儒, 薛晓莉. 微生物试验能力验证结果与分析[J]. 香料香精化妆品研究报告, 2018, 12(6): 41-42.  
Zhang LG, Fang JR, Xue XL. Validation results and analysis of microbial test capability [J]. Res Rep Fragr Cosmet, 2018, 12(6): 41-42.
- [16] 中华人民共和国卫生部卫生监督中心. 卫生检测实验室认证认可实施指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2008.  
National Center for Health Inspection and Supervision. Health testing laboratory certification and accreditation implementation guidelines [M]. Beijing: China Standards Press, 2008.
- [17] 吉彦莉, 郭勇峰, 王敬辉, 等. 食品微生物学检测能力验证分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2015, 26(3): 110-112.  
Ji YL, Guo YF, Wang JH, et al. Ability verification analysis of food microbiology detection [J]. J Publ Health Prev Med, 2015, 26(3): 110-112.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



陈婉娃, 助理工程师, 主要研究方向为食品药品微生物检验。  
E-mail: 411211247@qq.com