

2017年广东省海产品中致病菌检测能力验证 结果与分析

周勇^{1*}, 罗建波², 陈文胜², 贺红梅²

(1. 广州市干部疗养院, 广州 510530; 2. 广东省疾病预防控制中心, 广州 511430)

摘要: 目的 了解广东省食品检测实验室的致病菌检测能力和水平, 提高海产品中致病菌的检测能力, 促进实验室检测能力的提高。**方法** 参照 GB/T 4789.20-2003、GB 4789.30-2010 等相关标准方法中的要求, 分别对样品进行定性检测与鉴定。**结果** 此次考核共发放 7 类(种)样品, A 样品(福氏志贺氏菌)、B 样品(副溶血性弧菌)、C 样品(金黄色葡萄球菌与副溶血性弧菌混合菌)、D 样品(致病性大肠埃希氏菌)、E 样品(单核细胞增生李斯特氏菌)、F 样品(福氏志贺氏菌与单核细胞增生李斯特氏菌混合样)和 G 样品(无菌), 以上样品的检测满意率分别为 100%(5/5)、97.1%(34/35)、94.3%(33/35)、64.7%(11/17)、100%(35/35)、92.9%(13/14)和 97.1%(34/35)。总满意率为 71.4%(25/35), 其中疾控系统满意度为 77.4%(24/31)。**结论** 参加此次考核的单位大部分都取得了满意的结果, 特别是承担食品安全风险监测微生物检测实验室, 存在的最大问题是关于致病性大肠埃希氏菌(EPEC)的检测, 有 1/3 的实验室未能正确检出, 提示要提高全省关于海产品中食源性致病菌的整体检出水平, 相关实验室要加强质量控制管理, 尤其是 EPEC 的检测能力需要提高。

关键词: 实验室能力验证; 食源性致病菌检测; 食品安全风险监测

Analysis of pathogens proficiency testing results of seafood in Guangdong province in 2017

ZHOU Yong^{1*}, LUO Jian-Bo², CHEN Wen-Sheng², HE Hong-Mei²

(1. Guangzhou Cadre Sanatorium, Guangzhou 510530, China; 2. Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, China)

ABSTRACT: Objective To know the ability of pathogen detection in foods in Guangdong province, in order to improve the ability for detection of pathogens in seafood, and promote the improvement of laboratory testing capabilities. **Methods** According to the requirements of GB/T 4789.20-2003 and GB 4789.30-2010, the samples were qualitatively detected and identified. **Results** A total of 7 types of samples (sample A-G) were issued for this assessment, with sample A (*Shigella flexneri*), sample B (*Vibrio parahaemolyticus*), sample C (*Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus* mixed sample), sample D (pathogenic *Escherichia coli*), sample E (*Listeria monocytogenes*), sample F (*Shigella flexneri* and *Listeria monocytogenes* mixed sample) and sample G (none). The detection satisfaction rates of the above samples were 100% (5/5), 97.1% (34/35), 94.3% (33/35), 64.7% (11/17), 100% (35/35), 92.9% (13/14) and 97.1% (34/35), respectively. The overall satisfaction rate was 71.4% (25/35), which the disease control system satisfaction rate was 77.4% (24/31). **Conclusion** Most of the units participating in the assessment have achieved satisfactory results, especially the microbiological testing laboratory for food safety risk

*通讯作者: 周勇, 硕士, 主要研究方向为实验室质量管理, 临床实验室微生物及免疫学检测。E-mail: yong0307@163.com

*Corresponding author: ZHOU Yong, Master, Guangzhou Cadre Sanatorium, Guangzhou 510530, China. E-mail: yong0307@163.com

monitoring. The biggest problem is the examination of enteropathogenic *Escherichia coli*, one-third of the laboratories failed to detect it correctly, suggesting that the overall detection level of foodborne pathogens in seafood should be improved. Relevant laboratories should strengthen quality control management.

KEY WORDS: proficiency testing; detection of foodborne pathogens; food safety risk monitoring

1 引言

食品安全是一个全球性的社会问题,广东省是海洋渔业和海产品消费大省,致病菌污染海产品是一个严重的食品安全问题,因此对海产品致病菌污染进行监测和控制是十分必要的^[1]。为了提高我省海产品中食源性致病菌的检测能力与水平,我们对相关实验室开展了能力验证活动。

实验室能力验证是指利用实验室间检测结果的比对来确定实验室检测能力的一项技术活动,是对实验室管理状况与技术能力进行考核的方法之一,是保障实验室资质认定工作质量有效性的重要手段,对实验室质量控制有着非常重要的意义^[2]。本研究通过合格的海产品致病菌检测考核样品,对我省 35 家食品检测实验室开展能力验证活动,发现存在的问题,促进实验室检测能力的提高^[3]。

2 材料与方 法

2.1 样 品

研究采用的 7 类样品均是在海虾酱中加入标准菌株的实物样品,样品的均匀性与稳定性满足微生物能力验证样品(定性)的要求,并通过邮递实验验证了样品运输过程稳定性。

2.2 主要仪器与试剂

MIR253 恒温培养箱(日本三洋电机株式会社); VITEK 麦氏比浊仪、API 鉴定系统、VITEK2 全自动细菌鉴定仪(法国梅里埃公司); Eppendorf 移液器(德国 Eppendorf 公司); 均质袋(上海安科科学器材有限公司); ECD-233 冰箱(中国海尔集团); CX31 显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

致病菌株购于 CICC(中国工业微生物菌种保藏管理中心),质控菌株由广东省疾病预防控制中心惠赠。

主要培养基有: PCA 培养基、麦康凯琼脂、3%氯化钠碱性蛋白胨水、弧菌显色培养基、TCBS 琼脂、Baird-Parker 琼脂(广东环凯微生物科技有限公司); 胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基、3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂(3%NaCl TSA 琼脂)、7.5%氯化钠肉汤、营养肉汤、李氏增菌肉汤(LB1, LB2)、PALCAM 琼脂(法国科马嘉生物化工)。上述培养基均在有效期内使用,并做好了质量控制。诊断试剂: 氧化酶试剂、血浆凝固酶试剂(广东环凯微生物科技有限公司); API, GP 和 GN 生化试剂条(法国梅里埃公司); 志贺氏菌诊断血清(宁波天润生物药业有限公司); 致病性大肠埃希氏菌诊断血清(兰

州生物制品研究所)。上述试剂均在试剂有效期内使用,每次使用均做了阴阳对照实验。

2.3 方 法

2.3.1 检测依据

参照《食品安全国家标准 食品微生物学检验》系列文件,如 GB/T 4789.20-2003^[4-8]标准中要求检测的致病菌(沙门菌除外)以及按 GB 4789.30-2010^[9]标准检测单核细胞增生李斯特氏菌(简称单增)。

2.3.2 样品水化

样品采用康宁无菌管进行分装,每支约 30 mL,在检测前需要用无菌生理盐水作 5 倍稀释,操作环节均需保证无菌和充分混匀,本次考核样品等同于 150 mL 食品。

2.3.3 实验方法

水化后的样品按照检测依据中的规定的检测方法,分别取 25 mL 处理后样品,检测金黄色葡萄球菌(简称金葡)、副溶血性弧菌(简称副溶)、单增、致泻性大肠埃希氏菌、志贺氏菌的存在情况,完成必要的血清学诊断实验,在规定的时间内完成检测并上报。

2.3.4 能力验证实施

本次研究有(A, B, C, D, E, F, G)7 种样品,每家实验室只发放其中的 5 种,基于防串通的考虑,每家实验室的 5 支样品均有独立的样品编号,编号为“实验室代码-1”、“实验室编号-2”,以此类推到第 5 支样品,实验室间比对的样品的种类会不完全相同,排列顺序也不完全一致。生物样品的包装采用 3 层安全包装,并置于装有冰袋的隔热泡沫箱内,用胶布密封后用纸箱找专业快递公司进行邮递。参加对比计划的 35 家实验室,有广东省疾控机构 31 家(包括 21 家地市级疾控机构和 10 家县区级疾控机构)和 4 家其他食品检验机构。

2.3.5 评价方法

需要对每一支样品做独立评价,报告“检出”或“未检出”何种致病菌,当检出致泻性大肠埃希氏菌和志贺氏菌时需要血清学分型实验,并报告血清型,报告结果与预期结果完全一致做“满意”评价,若检验结果与预期结果一致,只是血清学分型存在偏差,评价为“基本满意”,否则为“不满意”。

3 结果与分析

3.1 样品检出情况

本次设计了 7 类样品, A 样品目标菌为福氏志贺, B 样品为副溶, C 样品为金葡与副溶混合菌, D 样品的目标菌是

致病性大肠埃希氏菌(EPEC), E样品为单增, F样品为福氏志贺氏菌与单增的混合菌, G样品为无菌样品;每家单位只发放其中的5类样品, 比对样品结果统计可见表1, D样品的满意度最低, 有6家实验室未取得满意的结果, 分析原因主要是由于这些实验室平时对于致泻性大肠埃希氏菌检测没有引起足够的重视, 不少实验室用于检测的必备试剂不齐全, 如诊断学血清试剂。C样品与F样品是混合目标菌样品, 有3家实验室均只报告了其中1种目标菌, 可能是实验室操作人员工作不够细心所致, 此外还有一家实验室G样品(无目标菌)报告了单增, 明显是该实验室质量控制存在瑕疵, 操作中交叉污染所致。

表1 7类比对样品分析情况
Table 1 Analysis of the 7 kinds of comparison samples

样品分类	A	B	C	D	E	F	G
数量	5	35	35	17	35	14	35
满意数	5	34	33	11	35	13	34
正确率/%	100	97.1	94.3	64.7	100	92.9	97.1

3.2 目标菌检出情况

目标菌检出正确率见表2, 有实验室对食品中EPEC的检出存在比较大的问题, 经统计软件分析, EPEC的满意度与其他目标菌相比有显著性差异, 说明全省致泻性大肠埃希氏菌检测的综合能力水平有待提高。

表2 目标菌检出情况
Table 2 Detection of the target bacteria

目标菌	金葡	单增	副溶	福氏志贺	EPEC
检测数量	35	49	70	18	17
正确数量	34	49	68	17	11
正确率/%	97.1	100	97.1	94.4	64.7

3.3 疾控系统内与系统外实验室满意率比较

此次比对试验系统内31家实验室参加, 有24家获得“完全满意”的评价, 占77.4%, 4家系统外实验室只有1家获得“完全满意”的评价, 只占25%, 其他3家至少有一支样品没有获得“满意”的评价。经卡方检验统计分析系统内外实验室在获得满意率方面有差别($\chi^2=4.77$, $P=0.029 < 0.05$), 即疾控系统内实验室的满意率高于系统外实验室。

3.4 不同行政级别疾控系统实验室满意度比较

21家地市级疾控中心, 全部满意的有17家, 占81.0%; 10家区级疾控中心实验室有7家满意, 满意率为70%。经卡方检验不同行政级别的实验室满意率没有统计学差异

($P=0.495 > 0.05$), 详见表3。

表3 不同行政级别疾控中心实验室满意率比较
Table 3 Comparison of satisfaction rate of laboratories in CDC at city and county levels

行政级别	参加计划数/家	满意数/家	满意率/%	χ^2	P
地市级	21	17	81	0.465	0.495
县区级	10	7	70		

4 结论与讨论

能力验证(proficiency testing, PT)是指利用实验室间比对来确定实验室的校准/检测能力或检查机构的检测能力^[10], 微生物检验能力验证的基本流程包括: 组织方根据能力验证需求选择目标菌, 制备合格的比对样品, 选择适宜的样品保藏形式, 确定能力验证样品的均匀性和稳定性, 通过合适的物流途径发放到受检实验室, 数据处理, 评估验证结果, 与实验室沟通, 纠正措施与确认等步骤^[11]。本研究采用检测合格的实物样品, 采取了一定的防串通技术手段, 目的是力求保证上报数据的客观真实, 通过上报结果分析得知, 广东省食源性致病菌监测网重点实验室在海产品致病菌检测中存在一些问题, 主要在致泻性大肠埃希氏菌的检测方面, 其次是考核样品中含有多种致病菌时某些实验室不能全部分离出来。之后通过了解得知, 致泻性大肠埃希氏菌的检测相关单位不太重视, 没有按照要求配备齐全的试剂, 不少实验室没有购买致泻性大肠菌诊断血清, 还有2家实验室血清试剂过期, 故无法正确区分致泻性大肠埃希氏菌的血清型, 有4家实验室甚至报告成普通大肠杆菌(无致病菌生长)。有3家实验室在检测含有2种致病菌的样品时, 只报告了其中一种致病菌。之后沟通了解到, 另一种由于含量太低而疏忽, 没有按照标准中的要求进行增菌、分离培养与鉴定, 且在参加过的以往比对活动中每份样品只含有一种致病菌, 没有特殊说明时检验者认为此次每份样品中也只含有一种致病菌。此外在获得不满意评价的实验室中, 从上报原始资料可以了解其在做检测时不做阴阳质控, 芦云等^[12]研究得出每次实验设置阴阳质控十分必要, 出现问题时有助于查找原因。督促实验室管理者注重微生物室的建设管理, 尽快配备缺少的必要试剂耗材, 同时督促责任人严格加强试剂管理, 清退不合格、过期试剂, 加强人员的相关技能培训, 是本次验证活动对相关实验室提出的技术建议, 总之耐心细致的工作态度以及做好室内质量控制都有助于提高实验室海产品致病菌的检测能力。

一般认为, 专门通过认可的食品检测机构的检测水平会比较高, 地市级相对于县区级地方实验室, 检测能力与水平应该更高^[13], 这与本次研究的结果不相符, 分析原

因:本次是定性考核,检测依据都是照着食品卫生微生物学检验的现有标准,方法学也很简单是传统的分离培养方法,基层实验室都能开展,不需要高精尖端的仪器设备,所以未通过认可的实验室只要严格认真按照说明操作,也能获得满意的结果;所选的县区级疾控系统实验室多数属于广州市,另 2 家的技术能力在省疾控系统内较为突出,故 10 家不能完全代表省内各县区疾控系统内的实验室;4 家专注于食品行业检测的实验室均获得了认可,但有 3 家并未获得满意的评价,这无疑拉低了获得认可实验室的满意率,如只计算疾控系统内获得认可的实验室的满意率时会达到 90%,统计分析有统计学差异;从统计学上来说只进行了一次比对活动,尚不能代表实验室的整体水平,如果多方位进行多次比对活动就能消除这种偶然误差,其实在标准 CNAS-CL03 2010 中也阐述了多轮次能力验证的定义^[14]。

广东省是海洋渔业生产与消费大省,在全省范围内开展大规模并同时针对多种海产品致病菌检测的能力验证活动尚属首次,之前省质量与技术部对下属的实验室有组织过副溶以及沙门菌的考核活动,但每次都只考核一种目标菌,所以要求管理者紧跟把握食品安全风险管理的最新发展和动态^[15]意义重大。同时通过此次研究也发现了不少问题,这对于纠正实验室的自身问题,改进实验室的检测工作,进而提高全省相关实验室对海产品致病菌的检测能力水平^[16],促进食品安全风险监测工作地发展,保障地区食品安全意义重大。

参考文献

- [1] 张守文,周玉玲,尹蕾. 海鲜食品中致病性微生物检测方法概述[J]. 中国调味品, 2010, 35(2): 42-45.
Zhang SW, Zhou YL, Yin L. Introduction on the detection technique of harmful micro-organisms in sea food [J]. China Condiment, 2010, 35(2): 42-45.
- [2] 杨宝庆,牛桓彩. 食品微生物检测能力验证结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(11): 1604-1606.
Yang BQ, Niu HC. Analysis of the capability verification results of microorganism detection on food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2016, 26(11): 1604-1606.
- [3] 罗建波, 陈文胜. 微生物检验实验室质量管理工作指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
Luo JB, Chen WS. Guidelines for quality management in microbiological laboratories [M]. Beijing: China standard Publishing Company, 2014.
- [4] GB 4789.5-2012 食品安全国家标准 食品微生物检验 志贺氏菌检验[S].
GB 4789.5-2012 National food safety standard-Food microbiological examination-*Shigella* [S].
- [5] GB/T 4789.6-2003 食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验[S].
GB/T 4789.6-2003 Microbiological examination of food hygiene-Examination of diarrheogenic *Escherichia coli* [S].
- [6] GB 4789.7-2013 食品安全国家标准 食品微生物检验 副溶血性弧菌检验[S].
GB 4789.7-2013 National food safety standard-Food microbiological examination-*Vibrio parahaemolyticus* [S].
- [7] GB/T 4789.20-2003 食品卫生微生物学检验 水产品检验[S].
GB/T 4789.20-2003 Microbiological examination of food hygiene-Examination of aquatic product foods [S].
- [8] 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].
- [9] GB 4789.30-2010 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[S].
GB 4789.30-2010 National food safety standard-Food microbiological examination-*Listeria monocytogenes* [S].
- [10] CNAS-RL 06 能力验证提供者认可准则[S].
CNAS-RL 06 Rules for the accreditation of proficiency testing provider [S].
- [11] 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.
- [12] 芦云, 王芳, 金鑫, 等. 食品微生物学能力验证[J]. 检验检疫学报, 2013, 23(2): 44-47.
Lu Y, Wang F, Jin X, et al. Analysis on results of food microbiological proficiency test [J]. J Inspect Quarant, 2013, 23(2): 44-47.
- [13] 李锦程, 陶坪, 王冬妍, 等. 对实验室能力验证的认识[J]. 现代测量与实验室管理, 2006, (6): 35-37.
Li JC, Tao P, Wang DY, et al. Understanding of laboratory capability verification [J]. Mod Meas Lab Manage, 2006, (6): 35-37.
- [14] CNAS-GL 03: 2006 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[Z].
CNAS-GL 03: 2006 Guidance on evaluating the homogeneity and stability of samples used for proficiency testing [Z].
- [15] US Centers for Disease Control and Prevention Tips: Restaurants are the main source of food-borne disease outbreaks [Z]. 2018.
- [16] 陈文胜, 谭慧嘉, 罗建波, 等. 2016 年食品中致病菌检测能力验证计划实施及结果分析[J]. 华南预防医学, 2018, 44(1): 67-70.
Chen WS, Tan HJ, Luo JB, et al. The implementation of proficiency testing for pathogenic bacteria in food and analysis of results in 2016 [J]. South China J Pre Med, 2018, 44(1): 67-70.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



周 勇, 硕士, 主要研究方向为实验室质量管理, 临床实验室微生物学及免疫学检测。

E-mail: yong0307@163.com.