

海产品致病菌检测考核样品的制备研究

周勇^{1*}, 罗建波², 陈文胜², 谭慧嘉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** 结合我国现行食品卫生标准, 探索优化海产品致病菌检测考核样品的制备方法, 并检验样品的均匀性与稳定性。**方法** 以海虾酱为主要基质, 添加目标菌后制成人工污染样品, 通过样品的均匀性与稳定性研究, 优化样品中各基质的组分来配制出合格的质控考核样品。**结果** 海虾酱中加入枸橼酸钠、吐温-80、氟康唑等介质, 在一定的 pH 值条件下, 目标菌在样品中可以均匀分布, 将样品密封储存 5~22 °C 环境中下, 14 d 后样品外观无明显变化, 目标菌可以正常检出且无其他致病菌的生长, 样品均匀性、稳定性均满足考核样的使用要求。**结论** 建立的海产品致病菌检测质控考核样品的制备方法与程序有效, 适用于考核与评估实验室的检测能力, 可以为构建复杂的微生物能力验证样品奠定基础、搭建平台。

关键词: 海产品; 致病菌; 质控考核样品

Preparation of comparison samples for detection of pathogenic bacteria in seafood

ZHOU Yong^{1*}, LUO Jian-Bo², CHEN Weng-Sheng², TAN Hui-Jia²

(1. Guangzhou Cadre Sanatorium, Guangzhou 510530, China;

2. Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, China)

ABSTRACT: Objective To combine the current food hygiene standards in China, explore and optimize the preparation method of the detection samples for the detection of pathogenic bacteria in seafood, and test the uniformity and stability of the samples. **Methods** Using shrimp paste as the main substrate, artificial contaminated samples were prepared by adding target bacteria. Through the study of uniformity and stability of samples, the components of each substrate in the samples were optimized to prepare qualified quality control samples. **Results** Sodium citrate, tween-80, fluconazole and other media were added into shrimp paste. Under certain pH value, the target bacteria could be evenly distributed in the samples. The samples were sealed and stored at 5–22 °C, and the appearance of the samples did not change significantly after 14 d, the target bacteria could be detected normally without the growth of other pathogenic bacteria, and the uniformity and stability of the samples met the application requirements of the tested samples. **Conclusion** The established preparation method and procedure of the quality control sample for the detection of pathogenic bacteria of seafood are effective, and are suitable for the testing ability of the assessment and evaluation laboratory, and can lay a foundation and build a platform for constructing complex microbial ability verification samples.

KEY WORDS: seafood; pathogen; quality control examination sample

*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

1 引言

海产品受致病菌污染现象很普遍,而致病菌污染是引发食源性疾病的常见原因。2015 年中国食品技术学会发布了《2014 年国内外食品安全热点问题解读报告》,报告阐述微生物污染是 2014 年食品安全首要问题^[1],因此对海产品致病菌污染进行监测和控制是十分必要的。关于食源性致病菌污染食品的情况多有报道,如湛江市统计 2004~2007 年间统计 5 类食品中,含致病菌比例最高的是水产品(41.1%带致病菌)^[2],对于海产品致病菌的种类问题也有较多报道,海产品致病菌检出率最高,其中副溶血弧菌占 21.0%,其次为单核细胞增生李斯特菌^[3,4],此外金葡菌、沙门菌及致泻大肠菌也有检出^[5]。

实验室间比对活动是对检测机构进行外部质量评审的主要形式,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^[6],实施室间比对活动的技术核心就在于比对样品的选择,不能因为样品的不均匀、不稳定等一些因素而导致参加实验室的结果产生差异。微生物能力验证是指在微生物检测方面开展的能力验证活动,技术难点就是能力验证样品制备,理想的样品基质是最接近实际检测时的样本,但是目前由于微生物学检验领域的特殊性,微生物学能力验证尚未有无可信度、有规模的微生物能力验证样品^[7]。

本文详细叙述了海产品致病菌质控考核样品的制备过程及关键点控制,包括配方的优化,菌浓度的控制与选择,稳定性与均匀性的评估,干扰因素等方面的研究,研制出模拟常规检样的实物标样,可以大范围地应用于室间比对活动,为可靠评价检测机构检测能力水平,提供技术支持。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 实验菌株

目标菌:金黄色葡萄球菌(CICC21600)简称金葡、副溶血弧菌(CICC21617)简称副溶、福氏志贺氏菌(CICC21534)简称福氏、肠道致病性大肠埃希氏菌(CICC24189, EPEC O86: K61, enteropathogenic *Escherichia coli*)简称 EPEC、单核细胞增生李斯特氏菌(CICC21633)简称单增, CICC 菌株购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

干扰菌及质控菌:表皮葡萄球菌(CICC10294)、大肠埃希氏菌(ATCC25922)、拟态弧菌(*Vibrio mimicus*, VM)与金黄色葡萄球菌均来自于广东省疾控中心微生物实验室保藏。

2.1.2 主要仪器设备

MIR253 恒温培养箱(日本三洋公司); DensiCHEK 麦氏比浊仪(法国梅里埃公司); Reference 2 移液器(德国

Eppendorf 公司); AKJ-20 均质袋(上海安科生物公司); CX31 显微镜(日本奥林巴斯); VITEK2 全自动细菌鉴定仪(法国梅里埃公司); BCD-233 普通冰箱(青岛海尔); HR2088 料理机(珠海飞利浦公司)。

2.1.3 主要培养基及试剂

PCA 培养基、硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium, TCBS)(北京路桥公司); 胰蛋白胍大豆琼脂培养基(tryptose soya agar, TSA)、3%NaCl TSA 琼脂、李氏增菌肉汤、PALCAM 琼脂(法国科马嘉公司); 麦康凯琼脂、弧菌显色培养基与 Baird-Parker 琼脂、氧化酶试剂及血浆凝固酶试剂(广东环凯公司); 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)。上述培养基及试剂均在有效期内使用,在实验过程中实施了有效的质量控制。

2.2 方法

2.2.1 虾酱的制备

购买新鲜海麻虾煮熟后取虾仁,经料理机切碎后高压蒸汽灭菌,用无菌 pH 8.5 磷酸盐缓冲液进行稀释,然后用盐酸调节虾酱的 pH 值,分别制成 pH 值 7.2 和 pH 值 7.4 的 2 类虾酱,1 L 海虾酱消耗新鲜海麻虾约 1 kg。2 种虾酱配方如表 1。

表 1 2 种 PH 值虾酱的基质配方

Table 1 Matrix formulation of two pH values of shrimp pastes

| 组分 | pH 7.2 虾酱 | pH 7.4 虾酱 |
|--|---------------------|-----------|
| KCl | 0.20 g | 0.20 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.20 g | 0.20 g |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 2.88 g | 2.88 g |
| NaCl | 8.00 g | 8.00 g |
| 枸橼酸钠 | 1.00 g | 1.00 g |
| 海麻虾 | 1 L 虾酱溶液消耗 1 kg 新鲜虾 | |

注:以上为虾酱溶液的基础配方,最终用盐酸调至所需要的 pH 值。

2.2.2 虾酱 PH 值的选择

细菌的生长存活与外界 pH 值有关,而且某些细菌对于 pH 值变化较为敏感,取 pH 值为 7.2 与 7.4 的 2 种虾酱各 5 份,各自加入所研究的 5 种目标细菌均质,浓度控制在 10^3 ~ 10^4 CFU/mL 之间,室温放置 0、12、24 h 后分别以 PCA 平板评估菌落总数(副溶应用 TCBS 平板计数),每次接种量均为 0.1 mL,每次接种 2 个平板,观察 3 次计数的变化情况。

2.2.3 含副溶样品中 NaCl 添加量的确定

取 pH 值 7.4 虾酱溶液按每升分别加入 NaCl 10、20、

30 g, 加入目标菌副溶后均质, 置于室温, 用 TCBS 平板计数菌落总数(分别在 0、12、24、30、48 h)5 次。以 0 h 平板上菌落数记做“++”, 观察 48 h 内细菌菌落的变化情况。

2.2.4 比对样品最终的设计

按照添加目标菌的不同本研究共设计了 A~G 7 种(类) 比对样品: A 样品为含福氏的样品, B 样品为含副溶的样品, C 样品为含副溶与金葡的混合样, D 样品为含 EPEC 样品, E 样品为含单增的 PT 样品, F 样品为福氏和单增李的混合菌样品, G 样品是不添加任何目标菌的空白样品。原样在广口瓶中配置好经均质袋匀质后用规格 50 mL 康宁塑料离心管封装保藏(6 °C), 每支离心管内装 35 mL 比对样品。样品制作见表 2。

表 2 样品制备表
Table 2 Sample preparation table

| 比对样品 | 备用的 虾酱液 | 稀释后备用细菌悬液 | 浓度 CFU/mL |
|------|---------|--------------------------|------------------------|
| A | 低盐的 1 L | 2 mL 福氏悬液 | $10^3 \sim 10^4$ 之间 |
| B | 高盐的 1 L | 2 mL 副溶悬液 | $10^3 \sim 10^4$ 之间 |
| C | 高盐的 1 L | 1.5 mL 副溶+ 1 mL 金葡悬液 | 总数 $10^3 \sim 10^4$ 之间 |
| D | 低盐的 1 L | 2 mL EPEC 悬液 | $10^3 \sim 10^4$ 之间 |
| E | 低盐的 1 L | 2 mL 单增李悬液 | $10^3 \sim 10^4$ 之间 |
| F | 低盐的 1 L | 1 mL 福氏志贺+ 1 mL 单增李悬液 | 总数 $10^3 \sim 10^4$ 之间 |
| G | 高盐的 1 L | 2 mL 磷酸盐缓冲液 | 总数 0 |

注: 菌悬液在配置之前均做过鉴定, 其生化性质与血清学都符合预期。其浓度为 0.2 个麦氏单位 30 倍稀释后备用。

2.2.5 样品均匀性研究

维持微生物样品的均匀性一直都是技术难点, 微生物的带电现象、荚膜形成以及疏水脂质等原因, 是造成微生物“簇团”现象的产生^[8], 本次研究用添加吐温-80 和枸橼酸钠的方法有助于减轻这一现象。从 A、B、C、D、E、F、G 样品中每类分别随机取 4 支分装好的样品, 同时做平板计数, 方法参照 GB 4789.2-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[9], 每份样品均质后分别 0.1 mL 涂布在 2 个 PCA 平板内(B 和 C 样品除外), 36 °C 培养 24~48 h, 计算 2 个平板中菌落总数的平均值。副溶采用双层平板计数法^[10], 36 °C 培养 24 h; 样品 C 分别接种在 Baird-Parker 琼脂与双层平板上并做平行试验。

2.2.6 样品稳定性研究

在热稳定性方面, 取每类样品 450 mL 分成 3 等份存储于 5、22、38 °C 环境中, 分别在 0、6、24 h、2、4、7、14、28 d 的时间点进行检测, 每次检测时从样品中取 10 mL 稀释 5 倍后再查看目标菌的检出情况及样品外观变化情况。

2.2.7 运输稳定性分析

进行模拟运输实验, 以考证样品经常规运输后不会影响样品中致病菌的检出。方法将研制的样品包装好后分别寄往粤北、粤东、粤西的 3 家实验室, 并提前交代原样寄回, 我方收到样品后立即检测样品中的目标菌检出情况。

2.2.8 数据统计处理方法

运用 SPSS 17.0 统计软件对相关数据进行统计分析。

3 结果与分析

3.1 虾酱 PH 值选择

目标菌在 pH 值 7.2 与 7.4 的虾酱溶液中的生长情况见表 3 和表 4。通过比较后本次研究虾酱溶液 pH 值控制在 7.4。

表 3 pH 值 7.2 虾酱基质样品的培养情况(22 °C)
Table 3 Analysis of bacterial culture of pH 7.2 shrimp paste matrix sample (22 °C)

| 目标细菌名称 | 涂布法细菌生长情况 | | | 现象 |
|--------|-----------|------|------|------|
| | 0 h | 12 h | 24 h | |
| 金葡 | ++ | +++ | ++++ | 增加 |
| 副溶 | ++ | + | - | 逐步死亡 |
| 福氏 | ++ | + | + | 减少趋势 |
| 单增 | ++ | ++ | + | 减少趋势 |
| EPEC | ++ | +++ | ++ | 变化不大 |

注: +表示平板中菌落数在 5~20 之间, ++表示 21~50 之间, +++表示 51~100 之间, ++++表示大于 100, +/-表示 1~4 之间, -表示无菌落生长。以下同。

表 4 pH7.4 虾酱基质液样品培养情况(22 °C)
Table 4 Analysis of bacterial culture of pH 7.4 shrimp paste matrix sample (22 °C)

| 目标细菌名称 | 平板涂布法细菌生长情况 | | | 现象 |
|--------|-------------|------|------|------|
| | 0 h | 12 h | 24 h | |
| 金葡 | ++ | +++ | ++++ | 增加趋势 |
| 副溶 | ++ | + | + | 减少趋势 |
| 福氏 | ++ | ++ | ++ | 稳定 |
| 单增 | ++ | ++ | +++ | 增加趋势 |
| EPEC | ++ | +++ | +++ | 基本稳定 |

3.2 含副溶样品中 NaCl 添加量的确定

不同盐浓度下副溶菌计数情况见表 5, 通过表 5 的数据, 含有副溶的比对样品选用 2%NaCl 虾酱溶液, 本研究最终比对样品基质配方见表 6。

表 5 不同盐浓度下副溶生长情况(22°C)
Table 5 Analysis of growth of VP in different salt concentrations in samples (22 °C)

| NaCl 含量 | TCBS 平板涂布法弧菌生长结果 | | | | | 分析结果 |
|---------|------------------|------|------|------|------|------|
| | 0 h | 12 h | 24 h | 30 h | 48 h | |
| 1% | ++ | ++ | + | + | +/- | 细菌减少 |
| 2% | ++ | +++ | +++ | +++ | ++++ | 繁殖较快 |
| 3% | ++ | +++ | ++++ | ++++ | +++ | 繁殖过快 |

3.3 比对样品均匀性实验结果

ADEF 4 类非副溶样品的细菌总数结果见表 7, BC 类样品的细菌计数结果见表 8。将表 7 表 8 中数据采用 SPSS

表 6 每升样品中各基质的配方明细
Table 6 Formulation details for each matrix in 1 L sample

| 组分 | 作用 | 含量 | 说明 |
|-----------|-----------|------------|-----------------|
| 海虾酱 | 主要检测基质 | | 1 kg 鲜麻虾取虾仁打碎而成 |
| PBS 缓冲液 | 维持 PH 值 | | 定 PH 值后与海虾酱一起灭菌 |
| 氯化钠 | 调整渗透压 | 18 g(8 g*) | |
| 30%枸橼酸钠溶液 | 消除负电荷, 抑菌 | 5 mL | 灭菌后使用 |
| 吐温-80 | 乳化剂 | 2 mL | 加菌液前倒入 |
| 氟康唑注射液 | 抑制霉菌生长 | 1 mL | 加菌液前倒入 |

注: *表示不含副溶的样品。

表 7 A、D、E、F 4 种样品均匀性实验分析
Table 7 Variance homogeneity results of four samples A, D, E and F

| 样品 | 计数结果 (CFU/mL) | | 结果对数变换 (log ₁₀ CFU/mL) | | F | P 值 |
|----|---------------|------|-----------------------------------|------|-------|-------|
| | 结果 1 | 结果 2 | 结果 1 | 结果 2 | | |
| A1 | 2500 | 2300 | 3.40 | 3.36 | 1.209 | 0.414 |
| A2 | 3100 | 2600 | 3.49 | 3.41 | | |
| A3 | 2500 | 2700 | 3.43 | 3.40 | | |
| A4 | 2300 | 2700 | 3.40 | 3.41 | | |
| D1 | 3500 | 3100 | 3.54 | 3.49 | 1.815 | 0.284 |
| D2 | 3300 | 3000 | 3.52 | 3.48 | | |
| D3 | 3100 | 2600 | 3.49 | 3.41 | | |
| D4 | 3300 | 3700 | 3.52 | 3.57 | | |
| E1 | 2700 | 2300 | 3.45 | 3.34 | 1.776 | 0.291 |
| E2 | 2400 | 2900 | 3.36 | 3.48 | | |
| E3 | 3300 | 2900 | 3.52 | 3.46 | | |
| E4 | 2800 | 3100 | 3.43 | 3.51 | | |
| F1 | 3700 | 3600 | 3.57 | 3.56 | 3.622 | 0.123 |
| F2 | 3500 | 3600 | 3.54 | 3.56 | | |
| F3 | 3400 | 3500 | 3.53 | 3.54 | | |
| F4 | 3400 | 3500 | 3.53 | 3.54 | | |

注: 上述样品细菌计数均采用 PCA 平板计数法。

17.0 统计软件做单因素方差分析, 结果显示 P 值 > 0.05, 表示 ABCDEF 6 类样品目标菌都是均匀分布的。

3.4 比对样品热稳定性实验结果

将 A~G 7 类样品各 3 瓶分别储存在 5、22、38 °C 环境中, 在 0、8、24 h、2、4、7、14、28 d 从样品中取 10 mL 进行目标菌检测, 含目标菌样品检测结果见表 9, G 样品是未加致病菌的空白样品, 每次实验均未检出目标菌。所有样品分离培养无其他杂菌污染, 分析结果与预期一致。

3.5 运输稳定性研究结果

分别对韶关、湛江、汕头 3 家实验室邮递回来的 21 份样品进行分析, 包装完好, 样品无洒漏无溢出, 外观良好, 所有样品的检测结果与预期结果相一致。

表 8 B、C 2 种样品中目标菌均匀性分析
Table 8 Analysis of target bacteria uniformity in samples B and C

| 样品 | 计数结果 (CFU/mL) | | 结果对数变换 (log ₁₀ CFU/mL) | | F | P 值 |
|-----|---------------|------|-----------------------------------|------|-------|-------|
| | 结果 1 | 结果 2 | 结果 1 | 结果 2 | | |
| B1 | 2100 | 2000 | 3.32 | 3.30 | 0.683 | 0.607 |
| B2 | 1900 | 2100 | 3.28 | 3.32 | | |
| B3 | 2000 | 1800 | 3.30 | 3.26 | | |
| B4 | 1800 | 2000 | 3.26 | 3.30 | | |
| C1 | 1200 | 1000 | 3.08 | 3.00 | 1.654 | 0.312 |
| C2 | 1300 | 1100 | 3.11 | 3.04 | | |
| C3 | 1300 | 1400 | 3.11 | 3.15 | | |
| C4 | 1200 | 900 | 3.08 | 2.95 | | |
| C1* | 1200 | 1000 | 3.08 | 3.00 | 2.809 | 0.172 |
| C2* | 1300 | 1100 | 3.11 | 3.04 | | |
| C3* | 1200 | 1000 | 3.08 | 3.00 | | |
| C4* | 1500 | 1400 | 3.18 | 3.15 | | |

注: 带有*表示 Baird-Parker 琼脂平板进行金葡菌落计数, 其他为 TCBS 平板计数。

表 9 含目标菌样品耐热稳定性试验结果汇总
Table 9 The results of samples containing target bacteria stability test

| | 温度 | 样品 | | | | | | |
|----------------|-------|----|----|----|----|----|----|----|
| | | A | B | C | D | E | F | G |
| 阳性检出 最长时限/d | 5 °C | 28 | 14 | 14 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | 22 °C | 14 | 28 | 28 | 28 | 28 | 14 | 28 |
| | 38 °C | 4 | 14 | 7 | 14 | 7 | 4 | 28 |

4 结果与讨论

采用人工污染品作为考核样品是常态^[11], 人工污染样品可以通过直接从第三方购买, 但是价格昂贵抑或难以找到合适的样品, 所以一般是自己制备考核样品。本次研究的核心内容就是研制出具有与自然样品类似的质控考核样品, 并做相关均匀性与稳定性试验来验证研制的样品是否合格, 并为海产品致病菌 PT 样品的制备提供一些技术参考, 同时也为食品致病菌检验考核样的制备提供方法、思路。

此次研究中运用了一些技术手段, 如通过依靠低温抑制微生物的生长, 通过调整 pH、盐度等能影响微生物生长的方法与贺群^[12]等在完善面包虾加工技术领域做的研究相类似。考核用的虾酱样品中添加了吐温-80、枸橼酸钠、磷酸盐、氯化钠以及氟康唑等成分, 最后制成人工污染考核样, 目标微生物是选择有文献报道过的水产品致病菌, 但是本次未添加沙门氏菌, 原因主要有 2 点, (1) 在本研究之前广东省疾病预防控制中心质量部对下属各微生物监测实验室做过调查, 大部分实验室没有沙门氏菌 O 和 H 诊断血清, (2) 沙门氏菌分型多且复杂, 含沙门氏菌株的样品进行多次增菌、分离培养、转种过后, 发生菌株变异而导致前后血清学诊断的结果不一致, 这种现象还比较常见, 所以这次的考核样品未加入沙门氏菌, 这也是今后需要深入研究的问题。

开展微生物学检测比对计划的难点就是比对样品的制备, 由于菌种的选用、细菌的成团性生长、制备工艺问题或其他一些原因, 要保证样品的均匀性和稳定性符合能力验证样品要求是有相当难度的^[13]。因为由于比对样品的不均匀/不稳定会造成实验结果与期望值之间的偏差, 这种偏差的存在就会使得比对试验失去意义。此次研究参照 CNAS 的相关规范要求^[14], 对于定性检测的能力验证样品, 目标菌的含量需要稍高于检测的限量, 故样品中致病菌初始浓度均控制在 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL 的范围内^[15]。原始样品经过均质混匀, 之后再分装于 50 mL 的康宁离心管中, 每类样品从 40 支中随机抽取 4 支对目标菌做均匀性分析, 菌落总数计数结果均为 10^3 CFU/mL, 方差分析后结果显示

每类样品中细菌分布无统计学差异即表示每类样品是均匀的。这种评价微生物考核样品均匀性的方法与学者卢行安等^[7]采用的方法类似, 同时参考了 CNAS-GL 003:2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》^[16], 认为这是一种有效的判断样品均匀性的方法。在热稳定性方面, 通过实验研究在 5~22 °C 之间保存的样品, 样品中目标菌可以稳定在 2 周以上, 虽然没有运用真空冷冻干燥技术制备的样品稳定时间长, 但在广东省内组织相应质评活动, 其样品稳定周期满足相关要求。随着科技的发展, 海产品中致病菌检测方法学的不断改进, 如学者张守文等^[17]提到分子生物学的方法检测微生物有着广阔的发展前景, 本次制备的考核样品只运用了传统的检测方法进行验证, 是否适于其他检测方法目前未知。此次研究成功研制出了简单、经济和有效的空间比对样品并可用于质控考核, 继续通过深化研究, 不断积累经验, 可以为构建复杂的微生物能力验证样品奠定基础、提供技术支持。

参考文献

- [1] 佚名. 微生物污染成食品安全首要问题[J]. 化学分析计量, 2015, 24(2): 97.
Anonymity. Microbial contamination becomes the primary issue of food safety [J]. Chem Anal Meter, 2015, 24(2): 97.
- [2] 齐豫平, 陈嘉琳, 王丽荣, 等. 湛江市 2004~2007 年食源性致病菌监测结果分析[J]. 中国热带医学, 2008, (7): 1258-1259.
Qi YP, Chen JL, Wang LR, et al. Results of detection of food-borne pathogenic bacteria in Zhanjiang city in 2004~2007 [J]. Chin Trop Med, 2008, 8(7): 1258-1259.
- [3] 陈洪友, 屠丽红, 陈敏, 等. 贝类水产中副溶血性弧菌菌型分布研究[J]. 疾病监测, 2014, 29(7): 522-527.
Chen HY, Tu LH, Chen M, et al. Investigation of diversity of *Vibrio parahaemolyticus* in molluscs [J]. Dis Surveill, 2014, 29(7): 522-527.
- [4] 宫春波, 王朝霞, 董峰光. 烟台海域海产品中食源性致病菌污染状况调查及膳食风险分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(1): 103-106.
Gong CB, Wang ZX, Dong FG. Research on contamination of foodborne pathogens and risk assessment on sea foods from Yantai sea area [J]. Chin J Food Hyg, 2016, 28: 103-106.
- [5] 王忠智. 2014 年大连市金州新区食源性致病菌监测结果分析[J]. 基层医学论坛, 2016, 20(4): 436-438.
Wang ZZ. Analysis on the monitoring results of food-borne pathogens in Jinzhou new district of Dalian city in 2014 [J]. Medical Forum, 2016, 20(4): 436-438.
- [6] CNAS-CL 03-2010 能力测试提供者的认证标准[S].
CNAS-CL 03-2010 Accreditation criteria for proficiency testing providers [S].
- [7] 卢行安, 郑江, 曹志军, 等. 微生物能力验证样品均匀性实验的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2003, 1: 33-34.
Lu XA, Zheng J, Cao ZJ, et al. The study of homogeneity of microbiological proficiency testing matrix [J]. Chin J Microecol, 2003, 15(1): 33-34.
- [8] 王兰, 唐静, 赵璇. 微生物絮凝剂絮凝机理的研究方法[J]. 环境工程

- 学报, 2011, 5(3): 481-488.
Wang L, Tang J, Zhao X. Methods of researching flocculating mechanism of microbial flocculants [J]. Chin J Environ Eng, 2011, 5(3): 481-488.
- [9] GB 4789.2-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
GB 4789.2-2010 National food safety standard-Food microbiology test-Detection of aerobic bacterial count [S].
- [10] 鲍静姣, 郭远明, 丁跃平, 等. 双层平板计数法检测海产品中副溶血性弧菌的量[J]. 山东化工, 2013, 42(10): 71-72, 75.
Bao JJ, Guo YM, Ding YP, *et al.* Detection of seafood double-layer plate count method of vp in quantity [J]. Shandong Chem Ind, 2013, 42(10): 71-72, 75.
- [11] 曹文博. 食品微生物能力验证样品的研制与检测[D]. 大连: 大连工业大学, 2015.
Cao WB. Preparation and detection of food microbiology proficiency testing samples [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2015.
- [12] 贺群, 黄和, 刘亚, 等. 面包虾中副溶血性弧菌在 pH 影响下生长预测模型的建立[J]. 食品工业科技, 2014, 35(20): 107-110, 116.
He Q, Huang H, Liu Y, *et al.* Establishment of growth predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* in bread shrimp under different pH condition [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(20): 107-110, 116.
- [13] 王娜, 钱和. 阪崎肠杆菌能力验证样品均匀性和稳定性的研究[J]. 中国微生物学杂志, 2010, 22(7): 606-608.
Wang N, Qian H. The homogeneity and stability of samples used for *E. sakazakii* proficiency testing [J]. Chin J Microecol, 2010, 22(7): 606-608.
- [14] CNAS-CL 03-A 001:2018 能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明[S].
CNAS-CL 03-A001:2018 Guidance on the application of accreditation criteria for proficiency testing providers in the field of microbiology [S].
- [15] GB 29921-2013 国家食品安全标准-食品中致病菌限量[S].
GB 29921-2013 National food safety standard-Limit of pathogenic bacteria in food [S].
- [16] CNAS-GL 003:2018 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S].
CNAS-GL 003:2018 Guidance on evaluating the homogeneity and stability of samples used for proficiency testing [S].
- [17] 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 Cond, 2010, 35(2): 42-45.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



周 勇, 硕士, 主管技师, 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验。

E-mail: yong0307@163.com