

单测试片法定性快速检测乳中金黄色葡萄球菌的研究

李雪晶, 富莉静*, 薛志清, 韩立杰, 刘萍萍, 孙 明, 石利凤, 喻东威, 宋晓东

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司中心实验室, 呼和浩特 011500)

摘 要: **目的** 建立单测试片定性快速检测乳中金黄色葡萄球菌的方法。**方法** 选择 7.5%氯化钠肉汤增菌液, 使用拍打式均质器, 匀浆时间 1~1.5 min 进行样品处置。采集不同基质样品, 设计多种方案对研究单测试片方法、国标方法与测试片方法同时进行验证。**结果** 该方法检测金黄色葡萄球菌特异性高, 特异性达到 96.7%。最小检出量 0.5 CFU/mL。阳性检出率高。**结论** 该方法准确性可靠, 特异性、灵敏度都高, 检出限低, 适用于乳中的金黄色葡萄球菌快速定性检测。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 单测试片法; 定性; 快检

Rapid qualitative detection of *Staphylococcus aureus* in milk by single test method

LI Xue-Jing, FU Li-Jing*, XUE Zhi-Qing, HAN Li-Jie, LIU Ping-Ping, SUN Ming, Shi Li-Feng, YU Dong-Wei, SONG Xiao-Dong

(Central Laboratory of Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co., Ltd., Hohhot 011500, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method of rapid qualitative detection of *Staphylococcus aureus* in milk by single test method. **Methods** 7.5% sodium chloride broth enrichment solution was selected, a tapping homogenizer was used, and the sample was homogenized for 1–1.5 min. Different matrix samples were collected and various schemes were designed to verify the single test method, national standard method and test piece method at the same time. **Results** *Staphylococcus aureus* was highly specific and had a specificity of 96.7%. The minimum detectable amount was 0.5 CFU/mL. The positive detection rate was high. **Conclusion** The method has high accuracy, specificity, sensitivity, and low detection limit, it is suitable for the rapid qualitative detection of *Staphylococcus aureus* in milk.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*; single test piece method; qualitative; fast check

1 引 言

金黄色葡萄球菌对于人类来讲是一种重要的病原菌, 可以引起伪膜性肠炎、肺炎等病症, 更有甚者能够引起脓毒症、败血症等全身感染。最容易感染金黄色葡萄

球菌的食品包括肉类、禽类、蛋类、水产类、奶及其制品等, 因此大多数食品及食品原料, 特别预制食品和原料入厂时, 均须按国家规定要求进行金黄色葡萄球菌的检测^[1]。我国牛生乳中的金黄色葡萄球菌的检出率在 15%~38%^[2-4]。Wilson^[5]报道, 金葡菌是引起乳腺炎的重

*通讯作者: 富莉静, 工程师, 主要研究实验室检测体系管理。E-mail: fulijing@mengniu.cn

*Corresponding author: FU Li-Jing, Engineer, Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co., Ltd, R & D Building #6, Mengniu Dairy (Group) Co., Ltd, Shengle Economic Zone, Helinge'er, Huhhot 011517, China. E-mail: fulijing@mengniu.cn

要病原菌,世界上约有 1%~2 %的奶牛患有各种类型乳腺炎。

金黄色葡萄球菌在 1884 年被正式发现。1930 年,研究人员指出它引发食物中毒与其肠毒素有关^[6]。一般认为产生凝固酶是葡萄球菌致病力的良好指标,而表皮葡萄球菌虽具有致病力,但凝固酶阴性^[7]。目前金黄色葡萄球菌的检测方法主要两类:一类是传统的微生物培养分离鉴定检测方法(国家标准 GB4789.10-2016^[8]),另一类是基于分子生物学的方法检测特定基因存在与否,来确定样品中是否存在金黄色葡萄球菌(免疫学方法、分子生物学方法、基因探针技术、测试片快速检测法^[9-14]等)。所有的快速检测方法都是基于缩短检测时间建立的,但有些方法(如基因探针技术)对人员操作要求较高,而测试片快速检测法是一种预先制备好的快速检验系统,它操作简单、菌落易于辨别,以 3M 测试片为例,该方法经过多个国家认证^[15,16]。

测试片快速检测法是具有显色功能并经改良的培养基,对金黄色葡萄球菌有很强的选择性并含有冷水可溶性凝胶。测试片上的紫红色菌落为金黄色葡萄球菌。当测试片上出现除紫红色以外的其他任何颜色,则使用含有显色剂和脱氧核糖核酸的确认反应片,金黄色葡萄球菌产生脱氧核糖核酸酶会和反应片中的显色剂形成粉红色晕圈。

本研究基于企业内部实验室的特点为出发点,以乳中金黄色葡萄球菌的快速检测方法为研究对象,采取单片法检测金黄色葡萄球菌以降低检验费用,用国标法以及双片法检测结果进行对比,验证单片法检验金黄色葡萄球菌特异、最小检出量、敏感度,以期检测人员的检测工作提供技术参考。

2 材料与方法

2.1 材料

商业培养基: 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤、7.5%氯化钠肉汤、血琼脂平板、贝尔德-帕克琼脂平板、脑心浸出液肉汤、冻干血浆、营养琼脂(北京路桥公司)。

化学试剂: 氯化钠、氢氧化钠、盐酸、结晶紫、95%乙醇、草酸铵、碘、碘化钾、沙黄(分析纯,国药试剂集团)。

金黄色葡萄球菌测试片与确认片(3M 中国有限公司)。

仪器与设备: 2000237 恒温培养箱(武汉提沃克科技有限公司); 36 °C±1 °C, PL203-IC 天平(瑞士梅特勒-托利公司); Masticator 拍击式均质器(西班牙 IUL 公司); DSHZ-300A 振荡器(太仓市实验设备厂); 精密 pH 试纸(6.4~8.0, 广州金莉达生物科技有限公司); WGZ-2XJ 细菌浊度仪(上海昕瑞公司)。

菌株: CICC10294 表皮葡萄球菌、CICC10897 白色葡萄球菌、CICC10499 假中间葡萄球菌、CICC10145 木糖葡萄球菌、CICC10789 金黄色葡萄球菌(中国工业微生物菌种保藏管理中心); ACCC01319 沙门氏菌、ACCC01996 肠道沙门氏菌、ACCC10142 大肠杆菌(中国农业微生物菌种保藏管理中心); CGMCC1.2810 大肠埃希氏菌、CGMCC1.9136 单核增生李斯特氏菌、CGMCC1.1868 弗氏志贺氏菌、CGMCC1.1997 副溶血弧菌、CGMCC1.8091 蜡状芽孢杆菌、CGMCC1.1869 痢疾志贺氏菌、CGMCC1.10528 溶血葡萄球菌(中国普通微生物菌种保藏管理中心)。

2.2 样品准备

样品为内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司收购或生产的。

2.3 试验菌液制备

取经过 5 次传代半固体斜面培养,将纯菌苔接种在 5 mL 装有普通肉汤的玻璃试管内,于(36±1) °C 经 18~24 h 培养。

2.4 混合试验菌液制备

取白色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、肠道沙门氏菌、大肠埃希氏菌、大肠杆菌、单核增生李斯特氏菌、弗氏志贺氏菌、副溶血弧菌、假中间葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、痢疾志贺氏菌、木糖葡萄球菌、溶血葡萄球菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌肉汤混合,浊度仪调整菌液浓度为 3.0×10^3 CFU/mL,取 1 mL 在营养琼脂平板使用国标法^[8]进行培养,得到准确的菌落数。

2.5 样品的处理

液体样品直接吸取 25 mL 放盛有 225 mL 7.5%氯化钠肉汤的预置适当数量无菌玻璃珠的无菌锥形瓶内,振荡混匀。将处理后的样品匀液于(36±1) °C,培养 18~24 h 增菌。

2.6 实验方法

掀起测试片上层膜,使用吸管将 1 mL 培养后增菌液,垂直滴在测试片的中央。将上层膜盖下,压板压在测试片上,然后将压板拿起,静置测试片至少 1 min 使胶体凝固。将测试片的透明面朝上,水平置于培养箱内,在(36±1) °C 条件下培养(24±2) h。

在经过培养之后,如果测试片上没有菌落出现,则为未检出金黄色葡萄球菌。如果测试片上出现暗紫红色菌落则为检出金黄色葡萄球菌。除了暗紫红色菌落以外,若有其它颜色菌落出现,则使用确认反应片开展确认。经培养后确认反应片,观察结果,出现粉红色环,无论粉红色环是大或者小,则为金黄色葡萄球菌检出。示意图如图 1 所示。

2.7 结果报告

如有金黄色葡萄球菌检出,则报告检出/25 g(mL),

如没有金黄色葡萄球菌检出, 则报告未检出/25 g(mL)。

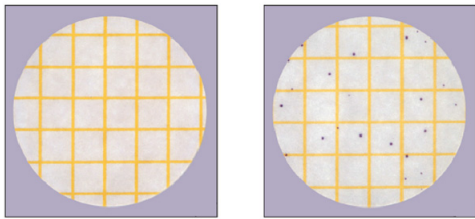


图 1 方法检出与未检出判读示意图
Fig.1 Interpretation diagram of detection and undetected

3 结果与分析

3.1 方法适用性符合率验证

依据实验方案对采集的样品, 按样品储存条件存放, 送入同一实验室使用 3 种方法同时进行检测。结果见表 1。在验证的 48 组样品中, 除生乳未进行处理, 其它样品一分为二分别模拟目标菌株培养阳性样品, 阳性检出率均为 100%。国标方法阳性样品检出 20 份, 测试片法阳性检出 21 份(1 份假阳性样品), 单片快速检测方法阳性样品检出 21 份(1 份假阳性样品)。国标法与测试片法及单片快速检测方法阳性符合率达 95.2%。

研究方法阳性符合率与国标相较达到 90%以上。研究方法检出率比国标法高。证明研究方法在乳及乳制品适用, 并且能够有效地防止漏检的情况出现。

3.2 方法敏感度验证

参照模拟目标菌株培养阳性样品制备, 具体操作过程

为: 取经过 GB 4789.10-2016 标准方法检测后, 结果为金黄色葡萄球菌阴性的不同品类样品 25 g, 用生理盐水制成 1:10(*m:l*)的匀液, 分别在每个样品中加入适当浓度的金黄色葡萄球菌标准的菌悬液, 分别让每种样品的终浓度的理论结果值分别落在 100、10、1 CFU/mL; 每个浓度每品类检测检测 5 组, 接下来用国标法、测试片法、单片快速检测方法实施检测。并记录检测结果。检测同时用 GB 4789.2-2016 菌落总数测定进行计数检测。比较检测结果见表 2。

从以上验证的数据可以看出, 当染菌量大于等于 6 CFU/mL 的时候, 测试片法与单测试片快速检测方法检出率均为 100%, 高于国标法。也符合灵敏度≥95%的要求^[8]。当染菌量小于 1 CFU/mL 的时候, 测试片法与单测试片快速检测方法的检测结果均出现波动。

通过验证污染样品中金黄色葡萄球菌的检出发现, 含有目标菌落数落在各浓度时, 单测试片灵敏度较国标方法高。单测试片检测乳及乳制品灵敏度 0.5 CFU/mL。

3.3 方法特异性验证

将 30 株目标菌株(包括: 金黄色葡萄球菌)与竞争菌株(表皮葡萄球菌、白色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、单核增生李斯特氏菌、副溶血弧菌、蜡状芽孢杆菌、痢疾志贺氏菌、溶血葡萄球菌、沙门氏菌)复壮纯化后, 按试验菌液制备与混合试验菌液制备进行制备。测试同时一并将混合试验菌液进行检测。将制备好的菌悬液, 分别滴于单测试片中, 然后依据单测试片快速检测方法进行操作并培养, 观察结果。试验结果见表 3。

表 1 研究方法符合率对比试验结果
Table 1 Comparison test results of the coincidence rate of research methods

样品	组分/份	国标方法阳性检出份数/份	测试片法阳性检出份数/份	单片快速检测方法阳性检出份数/份
牛体样	10	3	4	4
工厂奶仓	4	0	0	0
巴氏杀菌乳	10	5	5	5
灭菌乳	4	2	2	2
调制乳	4	2	2	2
发酵乳	2	1	1	1
全脂乳粉	4	2	2	2
调制乳粉	4	2	2	2
干酪和再制干酪	6	3	3	3
合计	48	20	21	21

表 2 样品敏感度对比试验结果
Table 2 Sample sensitivity comparison test results

样品名称及数量	检测方法	染菌量/(CFU/mL)			
		57~62	6~7	0.5~0.8	0
牛体样 5 份	国标方法	5/5	4/5	2/5	0/5
	测试片法	5/5	5/5	2/5	0/5
	单测试片快速检测方法	5/5	5/5	4/5	0/5
灭菌乳 5 份	国标方法	5/5	3/5	1/5	0/5
	测试片法	5/5	5/5	2/5	0/5
	单测试片快速检测方法	5/5	5/5	4/5	0/5
发酵乳 5 份	国标方法	5/5	2/5	1/5	0/5
	测试片法	5/5	5/5	2/5	0/5
	单测试片快速检测方法	5/5	5/5	3/5	0/5
调制乳粉 5 份	国标方法	5/5	3/5	3/5	0/5
	测试片法	5/5	5/5	3/5	0/5
	单测试片快速检测方法	5/5	5/5	5/5	0/5
干酪和再制干酪 5 份	国标方法	4/5	1/5	1/5	0/5
	测试片法	5/5	5/5	1/5	0/5
	单测试片快速检测方法	5/5	5/5	4/5	0/5

注：染菌量为平板计数琼脂培养基培养计数结果；数据中分子代表试验验证阳性样品数，分母代表试验样品数。

表 3 单测试片特异性试验结果
Table 3 Single test piece specific test result

菌名	验证总数量	验证结果	
		数量	在单测试片上的生长情况
金黄色葡萄球菌	8 株	8 株	呈现紫红色菌斑
表皮葡萄球菌	3 株	3 株	呈现蓝色菌斑
白色葡萄球菌	3 株	3 株	未见菌落生长菌片白色
大肠埃希氏菌	3 株	3 株	呈现蓝色菌斑
单核增生李斯特氏菌	3 株	3 株	呈现蓝色菌斑
副溶血弧菌	2 株	2 株	未见菌落生长菌片白色
蜡状芽孢杆菌	1 株	1 株	呈现浅褐色菌斑
痢疾志贺氏菌	1 株	1 株	呈现蓝色菌斑
溶血葡萄球菌	2 株	1 株	呈现蓝色菌斑
		1 株	呈现紫红色菌斑
沙门氏菌	3 株	3 株	呈现蓝色菌斑
混合菌落	1 株	1 株	见有紫红色菌斑和蓝色菌斑

从表 3 可以看出，共测试 30 株细菌中，全部目标菌的菌均出现特异性的紫红色菌斑，未出现假阴性。竞争干扰菌中有 1 株溶血性葡萄球菌与金黄色葡萄球菌存在交叉反应，呈现紫红色菌斑，出现假阳性反应。其它菌在单测试片上未生长出紫红色的菌落或菌斑。大多数为蓝色，个别褐色菌斑，能够明显与目标菌区分，单测试片的特异性达到 96.7%。符合特异性≥95%的要求。

单测试片快速检测方法特异性强，与 9 种竞争菌无交

叉反应。特异性达到 98%。

4 结 论

- 1) 研究方法阳性符合率与国标法相较达到 90%以上，符合要求。
- 2) 研究方法检出率比国标法和测试片法均高。
- 3) 单测试片法检测乳及乳制品最小检出量 0.5 CFU/mL。

4) 研究方法与 9 种竞争菌无交叉反应, 特异性达到 96.7%。符合 $\geq 95\%$ 要求。

5) 研究办法在原有测试片法基础上减少菌片使用, 故比原测试片法节省费用。

通过实验比对、数据分析, 证实该方法检出率、灵敏度、特异性等方面经过验证均满足要求。由于其简便的操作、快速的检测时间以及降低的检验费用, 对企业快速准确评价食品卫生质量, 产品快速流通具有很大的作用。

参考文献

- [1] 孙霞, 陈娟丽. 用测试片法快速检测金黄色葡萄球菌[J]. 食品安全导刊, 2012, (Z1): 28–29.
Sun X, Chen JL. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by test strip method [J]. Chin Food Saf, 2012, (Z1): 28–29.
- [2] 陈倩, 骆海朋, 赵春玲, 等. 北京市食品中五种食源性致病菌污染状况调查研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, (5): 570–571.
Chen Q, Luo HP, Zhao CL, et al. Study investigation of contamination state of five foodborne pathogens in food of Beijing [J]. Chin J Health Lab Technol, 2003, (5): 570–571.
- [3] 高玉春, 巢国祥. 2005 年扬州市食源性致病菌污染状况研究[J]. 江苏预防医学, 2006, (4): 34–36.
Gao YC, Chao GX. Study on the contamination status of foodborne pathogenic bacteria in Yangzhou city in 2005 [J]. Jiangsu Prev Med, 2006, (4): 34–36.
- [4] 杨红, 刘桂华, 龚云伟, 等. 食品中金黄色葡萄球菌的污染状况及检测方法[J]. 中国卫生工程学报, 2006, (2): 107–108.
Yang H, Liu GH, Gong YW, et al. Pollution status and detection method of *Staphylococcus aureus* in food [J]. Chin J Publ Health Eng Apr, 2006, (2): 107–108.
- [5] Minor TE. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* food intoxication, A review III. *Staphylococci* in dairy foods [J]. Milk Food Technol, 1972, 35(2): 77–82.
- [6] 王小红. 金黄色葡萄球菌 B 型肠毒素的溶液构象及菌体生长环境效应[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
Wang XH. Solution conformation of *Staphylococcus aureus* type B enterotoxin and environmental effects of cell growth [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2005.
- [7] N.E 吉本期. 伯杰氏手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
N.E JBQ. Berger's Handbook [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [8] 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 microbiological examination: *Staphylococcus aureus* [S].
- [9] 徐重新, 陈蔚, 谢雅晶, 等. 食品中金黄色葡萄球菌检测及防控技术研究[J]. 农产品质量与安全, 2019, (3): 49–56.

Xu CX, Chen W, Xie YJ, et al. Study on detection and control technology of *Staphylococcus aureus* in food [J]. Qual Saf Agro-Prod, 2019, (3): 49–56.

- [10] 胡路平, 季昱. 食品中三种金黄色葡萄球菌检测方法的对比分析[J]. 食品安全导刊, 2018, (15): 1–8.
Hu LP, Li Y. Comparative analysis of three methods for detecting *Staphylococcus aureus* in food [J]. Food Saf Magz, 2018, (15): 1–8.
- [11] Lei ZW. Food microbiology laboratory quality management handbook [M]. Beijing: Standards Press of China, 2006.
- [12] 张超楠. 食品中金黄色葡萄球菌的快速检测方法研究[D]. 长春: 吉林大学, 2012.
Zhang CN. Study on rapid detection method of *Staphylococcus aureus* in food [D]. Changchun: Jilin University, 2012.
- [13] 钱志娟, 薛峰, 蒋原. Nord Val 食品微生物定性分析方法的验证程序[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, (2): 609–613.
Qian ZJ, Xue F, Jiang Y. Confirmation process of Nord Val microbial qualitative analysis method [J]. J Food Saf Qual, 2015, (2): 609–613.
- [14] SN/T 4546-2017 商品化试剂盒检测方法金黄色葡萄球菌方法一[S].
SN/T 4546-2017 Commercial kit method-*Staphylococcus aureus*-Test method [S].
- [15] 袁丹茅, 金建潮. 金黄色葡萄球菌快速检验测试片在食品检验中的应用[J]. 中国卫生工程学, 2008, (5): 301–302.
Yuan DM, Jin JC. Application of testing slip method for rapidly detecting *Staphylococcus aureus* in food [J]. Chin J Publ Health Eng, 2008, (5): 301–302.
- [16] 陈德云, 陈国雄, 巫结冰, 等. 测试片法快速检验食品中金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, (8): 1456–1457.
Chen DY, Chen GX, Wu JB, et al. Study on rapid detection of *Staphylococcus aureus* with testing slip method in food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, (8): 1456–1457.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



李雪晶, 工程师, 主要研究方向为食品实验室检测 SOP 建立。

E-mail: lixuejing@mengniu.cn



富莉静, 工程师, 主要研究方向为实验室检测体系管理。

E-mail: fulijing@mengniu.cn