

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240719004

致病菌测试片质量评价方法研究

杨 睿, 蔡 琳, 卢灿鑫, 李乐诗, 张洁吟, 刘晓晗, 王伟达*

(深圳市计量质量检测研究院, 深圳 518131)

摘 要: 目的 建立一种相对简单、实用性强的致病菌测试片质量评价方法, 用于评估其可靠性和适用性, 并探讨致病菌测试片的发展现状与不足。**方法** 使用纯化后的非目标菌株及人工污染样品, 对市售致病菌测试片的特异性、最低检出水平、重现性等参数进行技术性评价。**结果** 特异性测试中, 测试片非目标菌假阳性结果占测试比例的 10.3%, 副溶血性弧菌测试片及蜡样芽胞杆菌测试片非目标菌交叉反应严重。最低检测水平测试, 有 3 个产品所有检测水平未检出阳性结果, 部分产品最低检出限可达 1 CFU/mL。重现性测试中, 部分产品回收率小于 53%, 其余产品重现性良好。**结论** 本研究的质量评价方法可以对致病菌测试片进行科学客观的质量评价。指标设置科学合理, 实验验证操作简单, 针对性强, 能够快速、简便筛选出稳定可靠的产品, 为测试片提供了科学合理的评价方法。

关键词: 致病菌; 测试片; 产品评价

Study on quality evaluation methods of pathogenic bacteria rapid test strips

YANG Rui, CAI Lin, LU Can-Xin, LI Le-Shi, ZHANG Jie-Yin,
LIU Xiao-Han, WANG Wei-Da*

(Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection, Shenzhen 518131, China)

ABSTRACT: Objective To establish a relatively simple and practical method for evaluating the quality of pathogenic bacteria rapid test strips, aiming to assess their reliability and applicability, and to explore the current status and shortcomings of pathogenic bacteria rapid test strips. **Methods** The purified non-target strains and artificial pollution samples were used to evaluate the specificity, the minimum detection level, reproducibility of test strips on market. **Results** In the specific test, the false positive results of non-target bacteria accounted for 10.3% of the test tablets, and the cross-reaction of non-target bacteria between *Vibrio parahaemolyticus* test tablets and *Bacillus cereus* test tablets was serious. In the test of the lowest detection level, no positive results were detected in all the test levels of 3 products, and the minimum limit of detection of some products could reach 1 CFU/mL. In the reproducibility test, the reproducibility of some products was less than 53%, and the reproducibility of other products was good. **Conclusion** The quality evaluation method in this study can evaluate the quality of pathogenic bacteria rapid test strips scientifically and objectively. The index setting is scientific and reasonable, the experimental verification operation is simple and targeted, and the stable and reliable products can be selected quickly and easily, which provides a scientific and reasonable evaluation method for the test film.

KEY WORDS: pathogenic bacteria; rapid test strips; product evaluation

*通信作者: 王伟达, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与质量分析。E-mail: wangweida@smq.com.cn

*Corresponding author: WANG Wei-Da, Master, Senior Engineer, Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection, No.114, Minkang Road, Longhua District, Shenzhen 518131, China. E-mail: wangweida@smq.com.cn

0 引言

食源性致病菌是常见的导致食物中毒的病原体^[1]。致病菌(如沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157、金黄色葡萄球菌等)能引发严重的食物中毒,甚至危及生命^[2-3]。据香港食品安全中心数据统计,2023 年香港地区所有食物中毒个案中,由细菌性致病菌引起的仍然占大多数(占总数的 72.2%)^[4]。我国食品监督抽查及食源性疾病监测数据显示,近年来食源性疾病报告率也大体呈上升趋势^[5-6]。食源性致病菌已成为导致食品安全隐患的主要问题之一^[7]。因此,开展食品中致病菌检测显得尤为重要,是确保食品安全、保护公众健康的重要举措^[8]。

食源性致病菌检测常采用传统培养法,此类方法操作烦琐、耗时长,急需一种简单、快捷、低成本的检验方法进行初筛^[9-10]。近年来致病菌快速检测技术主要有免疫分析法^[11]、聚合酶链式反应法(polymerase chain reaction, PCR)^[12]、DNA 探针法^[13]、生物芯片法^[14-15]、显色培养基法等^[16]。测试片是在显色培养基上发展而来,操作简单,检测时间短,目前已得到广泛运用^[17-18]。但市售的致病菌测试片仍存在诸多问题,如厂家准入门槛低、测试片质量参差不齐等^[19]。

我国食品微生物检测方法确认标准主要有 SN/T 3266—2012《食品微生物检测方法确认技术规范》、RB/T 033—2020《微生物检测方法确认与验证指南》及 GB 4789.45—2023《微生物检验方法验证通则》。以上标准主要侧重于确认方法与参考方法的比较,或单个方法的实验室验证,单个产品验证已面临耗时长、成本高的问题,无法大规模同时对市售产品进行快速评价^[20]。本研究在参考国内及美国分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)^[21]和国际标准化组织(International Standardization Organization, ISO)相关微生物定性指标后,结合美国药典(United States Pharmacopoeia, USP)评价指南^[22],以期构建致病菌测试片质量评价方法,对市售致病菌测试片的特异性、最低检出水平、重现性进行分析,评估该类测试片的可靠性和适用性,促进行业正常发展,并为基层监管部门在食品中致病菌快速检测方面提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

所用食品样品(卤牛肉、奶粉、牛奶、饼干、馒头、小鱼仔、肉丸)均为预包装,购自深圳市本地超市。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC6538)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*, ATCC14579)(美国典型菌种保藏中心);单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, CICC21635)、大肠埃希氏菌 O157:H7

(*Escherichia coli* O157:H7, CICC10907)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, CICC21617)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, CICC10436)、假中间葡萄球菌(*Staphylococcus pseudintermedius*, CICC10499)、斯氏李斯特氏菌(*Listeria seeligeri*, CICC21671)、伊氏李斯特氏菌(*Listeria ivanovii*, CICC21663)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, CICC10305)、英诺克李斯特氏菌(*Listeria innocua*, CICC10417)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*, CICC21539)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*, CICC21516)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter*, CICC10404)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*, CICC21519)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*, CICC10889)、拟态弧菌(*Vibrio mimicus*, CICC21613)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*, CICC23794)、苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, CICC21519)、蕈状芽胞杆菌(*Bacillus mycoides*, CICC21473)、巨大芽胞杆菌(*Gemmobacter megaterium*, CICC23035)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*, CICC10275)(中国工业微生物菌种保藏管理中心);鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella*, GIM1.345)(广东省微生物菌种保藏中心);创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*, CGMCC1.1758)(中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心);溶血性葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*, 2020014)、人葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*, 2020016)、山羊葡萄球菌(*Staphylococcus caprae*, 2020027),实验室从食物中分离的菌株均经过分离纯化,并经 VITEK MS 全自动快速微生物质谱检测系统(英国生物梅里埃)鉴定。

沙门氏菌显色平板、单核细胞增生李斯特显色平板、大肠埃希氏菌 O157 显色平板、弧菌显色平板(法国 CHROMagar 公司);血琼脂平板(郑州安图生物工程);Baird-Parker 琼脂平板、蜡样芽胞杆菌显色平板、无菌磷酸盐缓冲液(北京陆桥公司);6 种致病菌的 18 个测试片产品,致病菌主要为:单核细胞增生李斯特氏菌、副溶血性弧菌、大肠埃希氏菌 O157、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌购买至 5 个不同的厂家(A、B、C、D、E)。

1.2 仪器与设备

DNP-9272 电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);HFsafe-1200LC 生物安全柜(上海力新医疗器械有限公司);MS 3 basic 漩涡振荡器(广州艾卡仪器设备有限公司);VITEK MS(附件)浊度计(英国生物梅里埃);Dilumat START 电子稀释器(上海生物梅里埃股份有限公司);BAGMIXER 400W 拍击式均质器(法国 Nterscience 公司);SQL1010C 立式压力蒸汽灭菌器(重庆雅马拓科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准菌悬液制备

将标准菌株复壮纯化后,使用接种环挑取菌落接种到血平板上分区划线培养。使用一次性无菌接种棉签挑

取低生长指数区的单个菌落,随后棉签置于试管中上下涂抹洗脱。使用浊度仪测量并用缓冲液调整菌浓度,制成约 10^8 CFU/mL 标准菌悬液,逐步 10 倍稀释至适宜稀释度。

1.3.2 样品处理

称取 25 g 阴性样品置于盛有 225 mL 无菌磷酸盐缓冲液的侧边过滤均质袋中,用拍击式均质器拍打 1~2 min,制成质量比 1:10 的样品匀液。设置阴性对照组、人工污染组,阴性对照组中阴性样品匀液不添加标准菌悬液,人工污染组使用移液枪吸取 1 mL 不同浓度的标准菌悬液,加入 1:10 的阴性样品匀液均质袋中,均质器继续拍打 1~2 min。

实际样品检测的样品匀液制备与阴性样品匀液制备过程一致。

1.3.3 参比方法计数测定

吸取 1 mL 处理好的质量比 1:10 样品匀液(1.3.2)以 0.3、0.3 和 0.4 mL 接种量分别加入 3 块显色平板中,涂布后,将平板正放在培养箱(36 ± 1) °C 培养 1 h,样品匀液吸收后翻转平板,倒置培养 24~48 h 后,计数 3 块显色平板典型菌落总和。

1.3.4 测试片方法计数测定

将测试片置于平坦实验台面,翻开测试片上层盖膜,按照说明书要求,使用移液枪吸取 1 mL(部分测试片吸取 2 mL)处理好的质量比 1:10 样品匀液(1.3.2),均匀地滴加到纸片上,等待液体完全分散和被吸收,慢慢下放上方盖膜,将测试片正放在培养箱(36 ± 1) °C 培养 24~48 h 后,计数典型菌落。

1.3.5 快速检测产品的技术指标

(1)特异性

挑选目标致病菌的同属菌株及其他常见的致病菌作为非目标测试菌,进行交叉反应测试,评价其特异性。优先选择评价者所在地食品抽检活动中分离而来的同属菌株。本研究使用的同属菌株部分由深圳市抽检的食品中分离纯化而来,与目标致病菌形态及生长偏好相似,并经 VITEK MS 全自动快速微生物质谱检测系统鉴定。每个产品挑选至少 8 种非目标菌进行测试。实验由 2 位评价人同时分别重复进行,排除人员污染及操作差异。同时,每种菌株均测试 2 个浓度梯度,高浓度(约 100 CFU/mL)和低浓度(约 10 CFU/mL)。评价中,规定每个产品的交叉反应非目标菌株不超过 2 种。

(2)最低检出水平

根据检测需求,设置高、中、低、极低 4 个接种水平的人工污染盲样及阴性对照盲样进行最低检出水平测试。高浓度水平、中浓度水平、低浓度水平、极低浓度水平菌浓度范围分别为 50~500 CFU/mL、5~50 CFU/mL、小于 5 CFU/mL、小于 0.5 CFU/mL。评价中,选取检测项目对应的代表性基质,由 2 个评价人同时分别进行测试,每个检测水平重复检测 4 次,同时采用显色平板作为参考

回收方法重复检测 2 次。评价中,应考察致病菌测试片最低检出水平是否满足说明书检出限或自身的检测要求。

(3)重现性

选取典型基质,对测试片进行重现性实验。每个产品使用 2 个不同批号。根据检测需求,设置低、高浓度水平的人工污染盲样及阴性对照盲样进行测试。根据最低检出水平测试结果,设置低、高浓度水平菌浓度范围分为 5~50 CFU/mL、50~500 CFU/mL。实验中 2 位评价人同时分别对同一样品进行反复测试,每个产品共测试 60 张测试片。使用显色培养基作为参比回收方法。

评价中,规定假阳性率为阴性样品的阳性结果比例,假阳性率($\text{pf}+$)/% = 假阳性结果数/阴性样品总数;假阴性率为阳性样品的阴性结果比例,假阴性率($\text{pf}-$)/% = 假阴性结果数/阳性样品总数。对于可计数的半定量类测试片,回收率/% = 测试片计数平均值/参比回收方法计数。评价中,假阳性率应小于 15%,假阴性率应小于 5%,回收率大于 50% 为优异,回收率大于 25% 且小于 50% 为良好。

1.4 数据处理

采用 WPS Office Excel 2007 进行实验数据统计分析,数据以平均值 $\pm$ 标准偏差的形式进行表示,图表使用 Origin 2018 绘图软件进行绘制。

此外,广东省 DBS 44/006—2016《非预包装即食食品微生物限量》规定副溶血性弧菌的限量值不超过 10^3 MPN/g(mL),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》附录 B 中,未有为 10^3 MPN/g(mL)时的 95% 可信限进行单位转换。因此,为保持单位统一,本研究数据分析时,引用香港食品微生物含量指引(一般即食食品及指定食品)^[23]中副溶血性弧菌限量值[小于 10^3 CFU/g(mL)]。

2 结果与分析

2.1 国标法检测阴性样品结果分析

购买的预包装食品样品(卤牛肉、奶粉、牛奶、饼干、馒头、小鱼仔、肉丸),经 GB 4789.4—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》、GB 4789.7—2013、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》、GB 4789.14—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌》、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》、GB 4789.36—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验》检测,检测结果为未含金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157、单核细胞增生李斯特氏菌、副溶血性弧菌、蜡样芽孢杆菌,可用作阴性对照样品。

2.2 技术指标评价分析

本研究旨在通过关键性的技术性指标,对市售的致病菌测试片可靠性和适用性进行评估,而非研究测试片能够完全替代旧方法。因此,主要围绕特异性、最低检出水平、重现性等参数,对市售 5 大厂家 6 种致病菌的快速测试片进行技术评价,整体技术评价路线如图 1 所示。

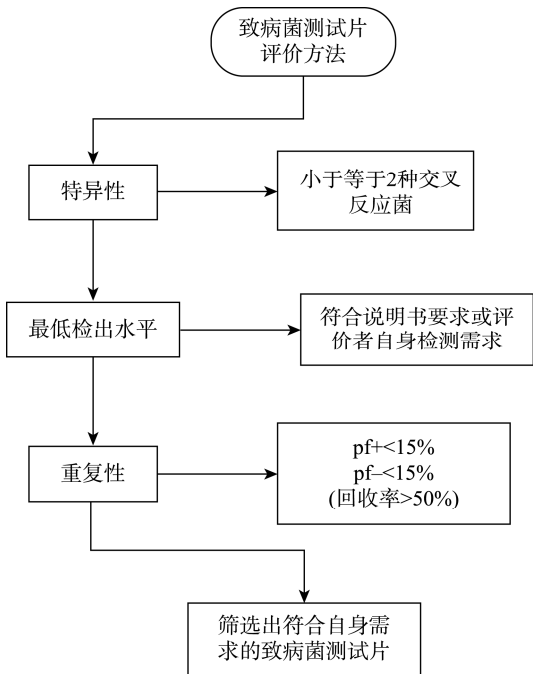


图 1 本研究致病菌测试片评价方法
Fig.1 Evaluation method of pathogenic bacteria rapid test strips in this study

2.2.1 特异性分析

微生物学的快速检测方法具有很大的可变性,因此,

在 AOAC 国际方法委员会食品和环境表面微生物方法验证指南^[21]、SN/T 3266—2012 及 RB/T 033—2020 中,都有考察替代方法的包容性和排他性,其中包容性需要测试至少 50 个目标菌株,排他性需要检测 30 个非目标菌株。本研究特异性分析旨在排除非目标菌的干扰(即排他性),而非包容性,主要基于以下考虑。(1)不同的血清型致病菌种在各区域的分布有所不同,甚至地理位置相近的地级市间,检出率和菌株分离率都有一定差异^[24-25]。根据调研的企业验证报告结果,许多企业为保障产品使用的稳定性,在产品研发阶段已尽可能的去测试并提升测试片产品的包容性;(2)对于单个评价机构及实验室来讲,通过抽检活动分离出当地的 50 种不同血清型的同种致病菌种有一定的困难性,致病菌的检出率较低,如《2017 年广州市餐饮食品中金色葡萄球菌的调查分析》^[26]中,5 类 500 批次餐饮食品抽检仅分离得到 8 种菌落,其中仅有 2 株通过溶血实验及血浆凝固酶实验鉴定为金色葡萄球菌;(3)本研究旨在通过关键性的技术性指标快速评价测试片能否达到预期使用效果,测试片由显色培养基改进而来,存在一定方法局限性,交叉反应非目标菌的出现不可避免,因此建议评价时,评价者应选取本地区抽检活动中常见的致病菌及难以与目标菌株区分的非目标菌株进行特异性测试,但测试结果超过 2 种交叉反应非目标菌时,则考虑该测试片已不适用于样品快速检测初筛。

如本研究特异性测试中,根据深圳市食品中微生物监督抽检数据咨询结果,选取了如表 1 中所述菌株作为非目标菌进行测试。在测试的 17 个测试片产品中,有 3 个厂家的 9 个测试片产品出现了不同程度的假阳,主要集中在金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌及蜡样芽胞杆菌检测项目上。测试结果如表 1 所示,厂家 A 金黄色葡萄球菌测试片、蜡样芽胞杆菌测试片交叉反应非目标菌株超过 2 种,特异性较差。

表 1 测试片特异性测试结果
Table 1 Specific test results of rapid test strips

项目	测试菌株	厂家	非目标菌生长*	交叉反应假阳性菌	评价结果
金黄色葡萄球菌	鼠伤寒沙门氏菌	A	溶血性葡萄球菌、表皮葡萄球菌、人葡萄球菌、大肠埃希氏菌 O157	鼠伤寒沙门氏菌、山羊葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌	×
	溶血性葡萄球菌	B	人葡萄球菌	-	√
	表皮葡萄球菌	C	溶血性葡萄球菌、人葡萄球菌、山羊葡萄球菌	-	√
	人葡萄球菌	D	蜡样芽胞杆菌	-	√
	山羊葡萄球菌				
沙门氏菌	大肠埃希氏菌 O157:H7	E	蜡样芽胞杆菌	山羊葡萄球菌	√
	副溶血性弧菌	A	阴沟肠杆菌、奇异变形杆菌、大肠埃希氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7	-	√
	蜡样芽胞杆菌	B	阴沟肠杆菌、大肠埃希氏菌、弗氏柠檬酸杆菌、大肠埃希氏菌 O157:H7	-	√
	阴沟肠杆菌	C	阴沟肠杆菌、大肠埃希氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7	-	√
	奇异变形杆菌	D	阴沟肠杆菌、大肠埃希氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7	-	√
金黄色葡萄球菌	大肠埃希氏菌				
	弗氏柠檬酸杆菌				
	金黄色葡萄球菌				
	大肠埃希氏菌 O157:H7				
	副溶血性弧菌				
蜡样芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌				
	阴沟肠杆菌				
	大肠埃希氏菌				
	大肠埃希氏菌 O157:H7				
	副溶血性弧菌				

					表 1(续)
项目	测试菌株	厂家	非目标菌生长*	交叉反应假阳性菌	评价结果
大肠埃希氏菌 O157	鼠伤寒沙门氏菌	A	阴沟肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、肺炎克雷伯杆菌	-	√
	阴沟肠杆菌				
	奇异变形杆菌				
	弗氏柠檬酸杆菌	D	阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌、副溶血性弧菌	鼠伤寒沙门氏菌	√
	肺炎克雷伯杆菌				
	金黄色葡萄球菌				
单核细胞增生李斯特氏菌	副溶血性弧菌				
	蜡样芽胞杆菌				
	鼠伤寒沙门氏菌				
	金黄色葡萄球菌				
	斯氏李斯特菌				
	伊式李斯特氏菌			伊式李斯特氏菌、蜡样芽胞杆菌	√
	英诺克李斯特菌				
	大肠埃希氏菌 O157:H7				
	副溶血性弧菌				
	蜡样芽胞杆菌				
副溶血性弧菌	鼠伤寒沙门氏菌	A	霍乱弧菌	溶藻弧菌	√
	金黄色葡萄球菌				
	大肠埃希氏菌 O157:H7				
	拟态弧菌	D	霍乱弧菌	溶藻弧菌	√
	霍乱弧菌				
	创伤弧菌				
蜡样芽胞杆菌	溶藻弧菌				
	蜡样芽胞杆菌	A		鼠伤寒沙门氏菌、苏云金芽胞杆菌、蕈状芽胞杆菌	×
	鼠伤寒沙门氏菌				
	金黄色葡萄球菌				
	大肠埃希氏菌 O157:H7	D		苏云金芽胞杆菌	√
	副溶血性弧菌				
	巨大芽胞杆菌	E		苏云金芽胞杆菌	√
	苏云金芽胞杆菌				
	蕈状芽胞杆菌				
	枯草芽胞杆菌				

注: -表示未检出。*代表能够在测试片上生长, 但是菌落颜色不能判定为阳性结果。√表示结果正确, ×表示结果错误。

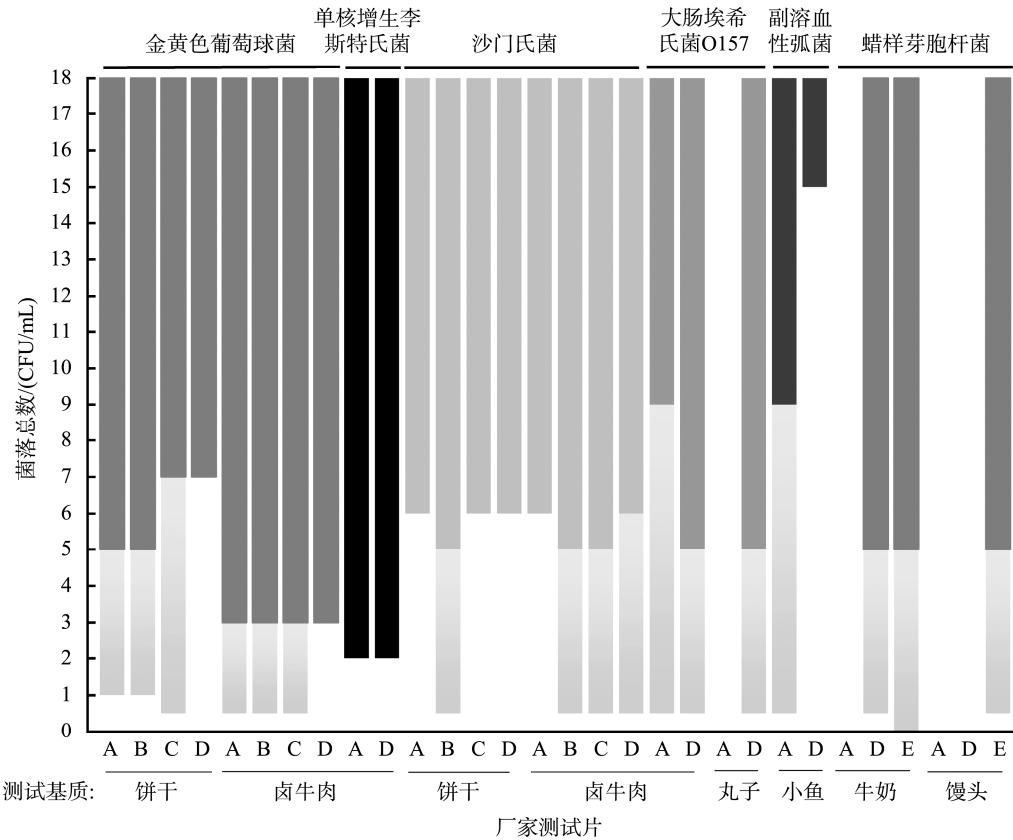
2.2.2 最低检出水平分析

化学试剂盒如兽药或农药残留快检试剂盒等, 通常能够依据“检出限”这一技术指标制定合理的评价方案^[27], 如 2023 年 1 月发布的《市场监督管理总局关于规范食品快速检使用意见》中要求考核化学试剂盒检出限的 0.5 倍、1 倍浓度水平。而微生物致病菌检测, 对于同一种致病菌, 根据食物种类、加工程度、食用方式不同, 其对应的微生物限量要求也不同, 无法完全统一^[28]。对于部分存在增菌环节的致病菌测试片来说, 评价试剂盒的检出限也不再合理。此外, 致病菌快速检测方法, 通常是追求检出致病菌浓度水平越低越好, 可以提高致病菌检出率, 降低漏检概率, 对于控制微生物污染有重要作用, 主要有以下原因。(1) 检出限越低, 需进行前增菌的产品可以相应减少预增菌时间, 进而缩短检测时间。(2) 使用测试片进行实际样品检测时, 样品中微生物目标菌和非目标菌浓度均未知, 因此检测时, 除测试 1:10 样品原液外, 还会对样品原液进行生理

盐水梯度稀释测试, 进一步排除基质和非目标菌干扰, 测试片的检出限越低, 则漏检概率越低。基于以上考虑, 本研究在参考了美国药典检出限和 RB/T 033—2020 的相对检出水平后, 规定了最低检出水平这一技术指标, 即测试片预期可以检测到目标微生物的最低含量。

对市面售卖的 17 个致病菌测试片进行了最低检出水平的测试, 结果如图 2、表 2 所示。同种测试片, 基质不同, 检出下限有轻微差异但差异较小。其中 3 种测试片的所有浓度水平均未检出阳性结果, 未通过评价。大部分测试片在样品含菌量大于等于 5 CFU/mL 时可 100% 检出阳性, 样品含菌量小于 5 CFU/mL 时处于检测临界值状态, 1 CFU/mL 时有 25%~75% 概率可检出。在市售的 17 个测试片产品中, 有 11 个未对自己的最低检出限作出说明, 其余 6 个有 3 个符合自身声称的最低检出限。

对于未标明检出下限的测试片产品, 评价者可以根据自身检测需求, 界定合理的最低检出水平合格线, 从而遴选产品。



注：深实色及以上阳性检出概率为 100%，浅渐变色阳性检出概率为 25%~75%。

图 2 不同厂家测试片最低检出水平结果

Fig.2 Results of the lowest detectable levels of different rapid test strips

表 2 不同厂家测试片最低检出水平具体情况

Table 2 Specific situation of the lowest detectable levels of different rapid test strips

项目	厂家	DBS 44/006—2016 限量/[CFU/g (mL)]	产品标注最低检出限/(CFU/mL)	最低检出水平/(CFU/mL)
金黄色葡萄球菌	A	<10 ⁴	0~9	1.0~5.0
	B		-	1.0~5.0
	C		-	0.5~7.0
	D		3	3.0~7.0
沙门氏菌	A	不得检出	-	6.0
	B		-	0.5~5.0
	C		-	0.5~6.0
	D		-	0.5~6.0
大肠埃希氏菌 O157	A	不得检出	1	未检出
	D		1	0.5~5.0
单核细胞增生李斯特氏菌	A	不得检出	-	2.0
	D		-	2.0
副溶血性弧菌	A	10 ³	-	0.5~9.0
	D		8	15.0
蜡样芽胞杆菌	A	<10 ⁵	-	未检出
	D		1	未检出
	E		-	0.5~5.0

注：-表示厂家未标注检出限。

2.2.3 重现性分析

美国药典规定, 重现性是指在不同的正常测试条件下, 如不同的分析人员、仪器、试剂批次, 对同一样品进行分析得到的测试结果的精确程度, 可以定义为操作变量和环境变量对微生物方法施加影响的内在抵消力。目前, 各个厂家关于重现性/重复性的产品验证, 指标不一, 验证方式各不相同, 许多产品甚至没有进行重现性指标的验证, 或者产品验证。而部分进行了实验室间验证的致病菌快速检测产品, 验证方案受 AOAC、RB/T 044—2020 及 SN/T 3266—2012 影响较深, 侧重点往往在于基质验证上, 通常会选取多个食品种类的多个食品类型进行反复验证。此种验证方式, 虽然全面但过于复杂, 更偏向于验证产品的基质适用性, 在评价过程中, 烦杂且耗时且长, 花费巨大,

缺乏快速评价的实用性。

本研究认为厂家应在实验室研发阶段应详细罗列自己已经实验的基质范围, 而评价中, 应以不同的分析人员、仪器、试剂批次和实验室产生的变量对结果的精确度影响为准。以金黄色葡萄球菌测试片重现性分析为例: 选取 2 种典型基质(乳品、肉类), 对市售 5 家金黄色葡萄球菌测试片进行重现性实验, 使用 Baird-Parker 琼脂平板作为参比回收方法(记为 BP 组)。

在人工污染样品测试中, 5 个厂家的测试片产品定性检测均表现良好。阴性样品测试的 100 项次中, 仅有 1 个厂家的 2 项次测试片出现了假阳现象, 假阳性率较低。阳性样品的 200 项次均能检出阳性, 无假阴现象出现, 如表 3。

表 3 不同厂家金黄色葡萄球菌测试片重现性结果
Table 3 Reproducibility results of different *Staphylococcus aureus* rapid test strips

厂家	阴性				低水平				高水平				pf+ /%	pf- /%	回收率	评价 结果
	评价人 1		评价人 2		评价人 1		评价人 2		评价人 1		评价人 2					
	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2				
A	0/4	0/6	0/6	0/4	4/4	6/6	6/6	4/4	4/4	6/6	6/6	4/4	0	0	优异	√
B	0/4	0/6	0/6	0/4	4/4	6/6	6/6	4/4	4/4	6/6	6/6	4/4	0	0	优异	√
C	0/4	0/6	0/6	0/4	4/4	6/6	6/6	4/4	4/4	6/6	6/6	4/4	0	0	优异	√
D	0/4	0/6	1/6	1/4	4/4	6/6	6/6	4/4	4/4	6/6	6/6	4/4	10	0	良好	√
E	0/4	0/6	0/6	0/4	4/4	6/6	6/6	4/4	4/4	6/6	6/6	4/4	0	0	优异	√

注: 低浓度水平菌浓度范围为 5~50 CFU/mL; 高浓度水平菌浓度范围为 50~500 CFU/mL。

由于所购入的金黄色葡萄球菌测试片均可进行半定量检测, 对测试片进行计数处理, 结果如图 3、4 所示。低浓度水平时, 牛奶样品的测试片计数回收率均大于 85%, 卤牛肉样品回收率略低, 在 50%~83%之间, 这可能是因为样品的高油高盐性及食品添加剂造成的。高浓度水平时, 除厂家 D 外, 其他厂家计数回收率均能达到牛奶大于 94%、卤牛

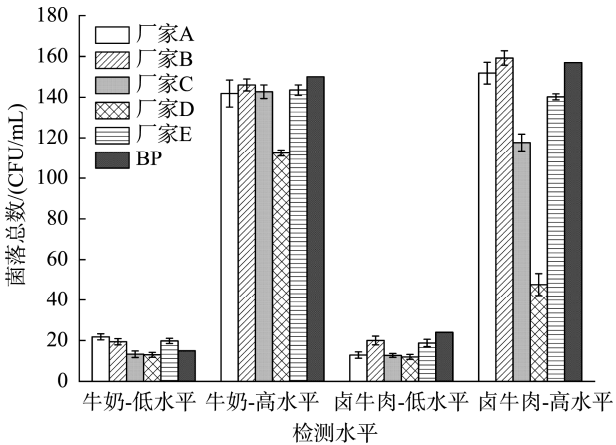


图 3 金黄色葡萄球菌测试片计数结果
Fig.3 Count results of different *Staphylococcus aureus* rapid test strips

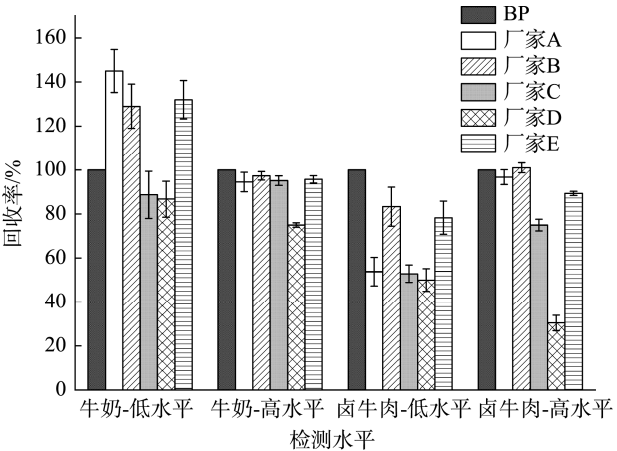


图 4 金黄色葡萄球菌测试片回收率
Fig.4 Rates of recovery of different *Staphylococcus aureus* rapid test strips

肉大于 74%; 而厂家 D 的牛奶和卤牛肉样品回收率略低, 分别为 75%和 30%。

除却厂家 D 测试片外, 其他厂家的测试片半定量检测均表现优异, 高浓度水平和低浓度水平上均大于 53%的回收率。

2.3 实际应用

研究中,除使用人工污染样品进行实验外,对通过本方法筛选出的致病菌测试片,也进行了实验样品检测方法比对。依据 DBS 44/006—2016 检测项目,对抽检的餐饮成品分别采用测试片和国标法检测(GB 4789.4—2016、GB 4789.7—2013、GB 4789.10—2016、GB 4789.14—2014、GB 4789.30—2016、GB 4789.36—2016),结果如表 4 所示。

抽取的 22 批样品,国标法均未检出或小于 10 CFU/g。纸片法有 6 个样品检出金黄色葡萄球菌阳性,2 个样品检测为蜡样芽胞杆菌阳性,经后续鉴定均为假阳性。其余项目所有测试片厂家均未检出阳性,大部分测试片的检测结果与国标法的结果具有一致性。但金黄色葡萄球菌与蜡样芽胞杆菌在 DBS 44/006—2016 中限值较高,金黄色葡萄球菌大于等于 10⁴ CFU/g、蜡样芽胞杆菌大于等于 10⁵ CFU/g 的样品才判定为不合格,测试片中假阳性的数值均在合格范围内,在实际样品检测时,不会影响样品检测结果的判定,能满足日常食品中致病菌的监管初筛要求,说明建立的测试片评价方法具有实

际应用性。

2.4 致病菌测试片整体发展现状分析

本研究共测试 136 项次非目标菌与测试片的交叉反应,其中有 14 项次出现了假阳结果,占测试比例的 10.3%,共有 32 项次的测试片上生长出不能判定为阳性的非目标菌落,占测试比例的 23.5%。整体而言,测试片可以识别目标致病菌,可以用于快检初筛。

最低检出水平中,整体现状如图 5 所示,阴性样品测试中,共 3 批次出现了假阳性结果,假阳性率为 2.5%,与参比方法相符率为 97.5%。在高浓度、中浓度水平测试时,17 个测试片产品共 215 批次都能检测出阳性结果,与参比方法相符率分别为 88.3%、89.8%。极低浓度水平测试时,在参比方法为阴性的情况下,其中 108 批次检查为阴性,相符率为 90.0%;剩余 12 批次为阳性,其中有 2 批次计数值远超出极低浓度污染样本的菌落添加数,且不能与高、中、低浓度水平的计数值成线性比例,判定为假阳,其余 10 批次,认为测试片比参比方法更为灵敏。

表 4 两种检测法对实际样品检测结果
Table 4 Actual sample detection results of 2 kinds of detection methods

序号	样品名称	检测项目	测试片结果	国标法结果
1	炸鸡腿		-	-
2	鸭翅		-	-
3	烤鸡翅		-	-
4	大列巴		-	-
5	牛角包	沙门氏菌、金黄色葡萄球菌	-	-
6	草莓蛋糕		金黄色葡萄球菌: 20 CFU/g	-
7	巧克力蛋糕		-	-
8	丹麦酥		-	-
9	酱牛肉		-	-
10	火腿沙拉	沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌、大肠埃希	-	-
11	鸭边腿	氏菌 O157	-	-
12	披萨		金黄色葡萄球菌: 10 CFU/g	-
13	鳗鱼饭		金黄色葡萄球菌: 10 CFU/g 蜡样芽胞杆菌: 10 CFU/g	-
14	马拉糕	沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌	-	-
15	炒饭		-	-
16	精美快餐		-	-
17	快餐 1		蜡样芽胞杆菌: 10 CFU/g	-
18	沙拉		-	-
19	风味虾	沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌 O157	金黄色葡萄球菌: 10 CFU/g	-
20	烤鸡(冷)	沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌	金黄色葡萄球菌: 40 CFU/g	-
21	麻辣小龙虾	沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌	金黄色葡萄球菌: 10 CFU/g	-
22	叉烧	沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、 大肠埃希氏菌 O157	-	-

注: - 表示每 25 g 样品未检出目标菌(检测项目: 沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠埃希氏菌 O157、副溶血性弧菌)或样品中目标菌小于 10 CFU/g(检测项目: 金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌)。

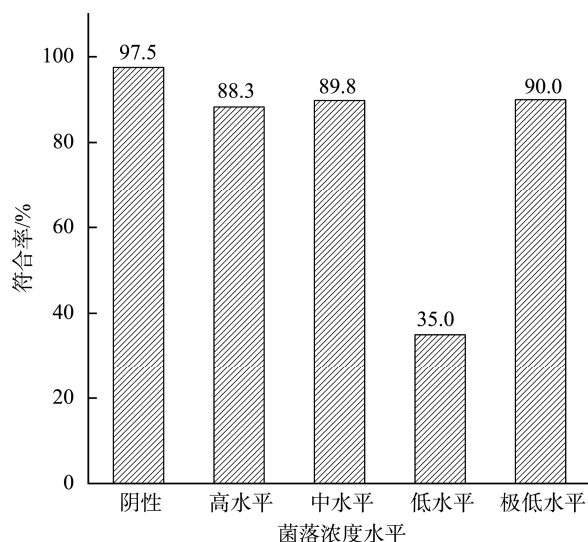


图 5 不同浓度水平与参比方法的符合率

Fig.5 Conformity rates between different concentration levels and reference methods

低浓度水平测试时,在参比方法报告为阴性或阳性的情况下,测试片与参比方法相符率为 35.0%,接近 40%。因为大多数测试片产品声称的检测下限在该范围内(小于 5 CFU/mL),处于检测临界值状态,结果接近一半报告为阳性结果,一半报告为阴性结果。ISO 16140—2:2016《食物链微生物学-方法验证-第 2 部分:对照参考方法验证替代(专有)方法的协议》中规定,参考方法验证替代(专有)方法时,参考方法至少在低水平上应具有部分回收率(低水平的部分回收率应在测试样品数量的 25%~75%之间)。低浓度水平时,测试片与显色平板相比,回收率虽没有达到 50%,仅在 35.0%,但属于正常范围,说明在低浓度范围内,测试片法可以替代传统的显色平板。此外,根据极低浓度水平测试结果,存在部分测试片比参比方法更灵敏的情况,低浓度水平不与参考方法对比时,真实回收率应该大于 35%。而其他浓度水平上,测试片的回收率均在 85%以上,说明测试片可以有效起到快速筛查,提前预警的作用。

但致病菌测试片仍存在诸多问题,主要集中在以下方面:

副溶血性弧菌测试片无法区分溶藻弧菌,蜡样芽胞杆菌测试片无法区分苏云金芽胞杆菌,测试的多家测试片结果均为阳性。GB 4789.7—2013 生化鉴定中,副溶血性弧菌与溶藻弧菌生化性状高度类似,检验时需通过大量的筛选实验和血清学实验进行区分。蜡样芽胞杆菌的国家标准检测方法同理,需通过革兰氏染色镜检才能与苏云金芽胞杆菌进行区分。测试片是基于显色培养基改进而来,保留其直观优点,但同属相似菌株鉴定能力仍然较差。3M 公司为解决该问题,搭配确认反应片进行进一步鉴别,可以筛选部分疑似菌株。厂家生产设计测试片时可参照该方法,

同时应当针对 GB 4789 系列检验方法中提及的相似菌株调整测试片配方。

最低检出水平实验中,17 个测试片产品中有 11 个测试片产品未对自己的检测下限作出说明。在 DBS 44/006—2016、GB 31607—2021《食品安全国家标准 散装即食食品中致病菌限量》、GB 29921—2021《食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量》中,沙门氏菌及单核细胞增生李斯特氏菌均为不得检出,在极低浓度水平测试时,样品依旧为人工污染样品,但由于参考方法的局限性,未能报告阳性检测结果,即使测试片结果与参比方法相符,测试片产品也应对自身检测下限做出说明。副溶血性弧菌、蜡样芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌检测限量,在不同处理方法的食品类别中,接受度不一,但该相关部分测试片产品仅能报告“检出或未检出”,对于有接受度范围的检测项目来说,没有告知检测下限的情况下,仅报告“检出或未检出”仅能判断有无致病菌,对样品是否合格判定意义不大。另外,还有 1 家测试片产品,在报告最低检测下限时,标注为稀释度水平,实际阳性样品中,原始样品中菌落数不一,使用稀释度作为检测下限,不够合理。总而言之,厂家应该对测试片的检出下限及用途做详细说明,明确其使用范围和结果报告判读,必要时增加示例图片说明。

测试片通常利用无毒的高分子材料作为培养基载体,将特定的培养基和显色物质附着其上进行检测^[29-30]。重现性实验中,其中回收率较高的 3 个厂家均使用可再生的水合物干膜,包含改良的培养基、冷凝胶和指示剂,加入检测液后由干膜转变为薄层水凝胶。而另外 2 个厂家在干膜最上层覆盖了一层无纺布或滤纸,利用其吸水性帮助样品均匀分散,但该设计使测试片厚度增加,使得测试片上下层密封性有所降低,这可能是导致重现性中回收率较低的原因之一。其中,回收率最低的厂家测试片设计为非圆形的正方形,同尺寸下正方形空间利用率较低,加样面积较小,操作难度增加,下放上层塑料片密封时,容易造成检出液溢出,这也可能导致回收率较低。对于检测液溢出问题,回收率较高的部分测试片有设计防溢圈,建议厂家生产设计时,可以考虑类似解决方案。

此外,研究中发现部分过于浑浊的样品对沙门氏菌测试片、单核细胞增生李斯特氏菌测试片、大肠埃希氏菌 O157 测试片显色影响较大,特别是奶粉、吸水性饼干等基质。测试片生产厂家在实验室验证阶段应该注意基质适用性测试,如高油高盐性、黏稠、颜色较深等样品,寻求解决方案。

3 结 论

测试片是基于显色培养基改进而来,操作简单、结果精准、设备要求低,具有方便快捷的优势。最新修订的 GB

4789.2—2022《食品微生物学检验 菌落总数测定》也允许使用测试片进行菌落总数测定,未来其他致病菌检测项目也有望获得批准。通过本评价方法,能够快速、准确筛选出特异性强、检出限低、重现性好的致病菌测试片,用于食品中致病菌风险筛查。监管部门可以参考本研究的评价方法进行产品评价,通过验证测试片的特异性、最低检出水平、重现性等技术参数,快速筛选出符合自身要求的测试片,用于食品中致病菌检测初筛。

参考文献

- [1] 李世聪,梁骏华,卢玲玲,等. 2020 年广东省食源性疾病病例特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(4): 624–629.
- LI SC, LIANG JH, LU LL, *et al.* Characteristics analyzing of Guangdong Province foodborne disease in 2020 [J]. Chin J Food Hyg, 2023, 35(4): 624–629.
- [2] THOMAS B. Foodborne pathogens [J]. AIMS Microbiol, 2017, 3(3): 529–563.
- [3] ALADHADH M. A review of modern methods for the detection of foodborne pathogens [J]. Microorganisms, 2023, 11(5): 1111.
- [4] 刘凯文. 二零二三年有关食肆及食物业的食物中毒个案回顾[J]. 香港食品安全中心: 食品安全焦点, 2024, 212: 1–2.
- LUI KW. Review of food poisoning outbreaks related to food premises and food business in 2023 [J]. Cent Food Saf HK: Food Saf Focus, 2024, 212: 1–2.
- [5] CHEN L, SUN L, ZHANG R, *et al.* Surveillance for foodborne disease outbreaks in Zhejiang Province, China, 2015–2020 [J]. BMC Public Health, 2022, 22: 135.
- [6] LIU J, BAI L, LI W, *et al.* Trends of foodborne diseases in China: Lessons from laboratory-based surveillance since 2011 [J]. Front Med, 2018, 12(1): 48–57.
- [7] SARAVANAN A, KUMAR PS, HEMAVATHY RV, *et al.* Methods of detection of food-borne pathogens: A review [J]. Environ Chem Lett, 2021, 19(1): 189–207.
- [8] ANTUNES P, NOVAIS C, PEIXE L. Food-to-humans bacterial transmission [J]. Microbiol Spectr, 2020, 8(1): 1–26.
- [9] 王秋悦,孙通宝,吴晨雨,等. 动物性食品中食源性致病菌检测技术发展概况[J]. 食品科技, 2023, 48(11): 312–318.
- WANG QY, SUN TB, WU CY, *et al.* Current status on detection technology of foodborne pathogens in animal-derived foods [J]. Food Sci Technol, 2023, 48(11): 312–318.
- [10] 吴鹏,孙雅和,朱旭丽,等. 食源性致病菌快速检测技术及其标准化应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(5): 426–437.
- WU P, SUN YH, ZHU XL, *et al.* Research progress on rapid detection technology and standardized application of foodborne pathogens [J]. Sci Technol Food Ind, 2024, 45(5): 426–437.
- [11] ZHAO X, LIN CW, WANG J, *et al.* Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens [J]. J Microbiol Biotech, 2014, 24(3): 297–312.
- [12] ARAI S, YOSHINARI T, TERAJIMA J, *et al.* Detection of kudoa hexapunctata and kudoa neothunni from retail raw tuna in Japan using a novel duplex polymerase chain reaction [J]. Parasitol Int, 2020, 75: 102048.
- [13] ZHOU Y, WANG Z, ZHANG S, *et al.* An ultrasensitive fluorescence detection template of pathogenic bacteria based on dual catalytic hairpin DNA Walker@Gold nanoparticles enzyme-free amplification [J]. Spectrochim Acta A, 2022, 277: 121259.
- [14] WATANABE R, ASAI K, KURODA M, *et al.* Quick detection of causative bacteria in cases of acute cholangitis and cholecystitis using a multichannel gene autoanalyzer [J]. Surg Today, 2021, 51(12): 1938–1945.
- [15] 田卓,刘洪伟,麻丽丹. 自动微流控膜芯片法检测副溶血性弧菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2): 525–528.
- TIAN Z, LIU HW, MA LD. Detection of vibrio parahaemolyticus by auto-microfluidic thin-film chip method [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(2): 525–528.
- [16] 宋心怡,明双喜,王华伟,等. 食源性致病菌生物快速检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(21): 8582–8589.
- SONG XY, MING SX, WANG HW, *et al.* Research progress of biological rapid detection of foodborne pathogens [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(21): 8582–8589.
- [17] 张婉君,张兰. 3M Petrifilm™快速测试片用于饮料中菌落总数的测定[J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 311–319.
- ZHANG WJ, ZHANG L. Study on total plate count detection in beverage by 3M Petrifilm™ rapid aerobic count plate [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(1): 311–319.
- [18] 杜雅正,刘洪梅,安雪征,等. 快速测试片与国标方法测试脱盐乳清粉中金黄色葡萄球菌的对比[J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 224–228.
- DU YZ, LIU HM, AN XZ, *et al.* Comparison of rapid test tablet and national standard method for determination of *Staphylococcus aureus* in desalted whey powder [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(24): 224–228.
- [19] 姬莉莉,同雪. 食品中微生物限量要求及检测技术发展趋势[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2): 459–465.
- JI LL, YAN X. Requirements of microbial limit and development trend of detection technology [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(2): 459–465.
- [20] 王伟达,杨睿,郑彦婕,等. 国内外食品快速检测方法评价技术研究[J]. 食品与药品, 2024, 26(1): 96–103.
- WANG WD, YANG R, ZHENG YJ, *et al.* Research on evaluation technology of food rapid detection methods at home and abroad [J]. Food Drug, 2024, 26(1): 96–103.
- [21] AOAC Official Methods of Analysis. AOAC International Methods Committee Guidelines for validation of microbiological methods for food and environmental surfaces [Z]. 2012.
- [22] The United States Pharmacopeial Convention. <1223> Validation of alternative microbiological methods [Z]. 2011.
- [23] 食物环境卫生署食品安全中心. 食品微生物含量指引 一般即食食品及指定食品(修订本)[M]. 香港: 食物环境卫生署, 2014.
- Food and Environmental Hygiene Department's Centre for Food Safety, Guidelines for microbial content in food, general ready food and designated food (amendment) [M]. HK: FEHD, 2014.
- [24] 王志伟,张清平,曲勤凤. 2022 年上海市生禽肉和调理肉制品中主要食源性致病菌监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(1): 56–60.
- WANG ZW, ZHANG QP, QU QF. Surveillance of major foodborne pathogens in raw poultry meat and prepared meat products in Shanghai City in 2022 [J]. Chin J Food Hyg, 2024, 36(1): 56–60.
- [25] 穆慧,段然,秦帅,等. 中国小肠结肠炎耶尔森菌分布及分子流行病学特征[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(7): 571–577.
- MU H, DUAN R, QIN S, *et al.* Distribution and molecular

- epidemiological characteristics of *Yerinia enterocolitica* in China [J]. *Chin J Zoonoses*, 2021, 37(7): 571–577.
- [26] 陈丹霞, 周露, 曾晓琮, 等. 2017 年广州市餐饮食品中金黄色葡萄球菌的调查分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(12): 2958–2964.
CHEN DX, ZHOU L, ZENG XZ, *et al*. Investigation and analysis of staphylococcus aureus from catering food in Guangzhou city in 2017 [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(12): 2958–2964.
- [27] 叶秋雄, 梁俊发, 张彬彬, 等. 胶体金免疫层析产品快速检测农药残留的评价与分析[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(4): 187–193.
YE QX, LIANG JF, ZHANG BB, *et al*. Evaluation and analysis of the colloidal gold immunochromatography kits for the rapid detection of pesticide residue [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(4): 187–193.
- [28] 钟立霞, 霍胜楠, 姚现琦, 等. 国内外肉及肉制品微生物限量比较研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2023, 35(1): 107–112.
ZHONG LX, HUO SN, YAO XQ, *et al*. Comparative study on microbial limits for meat and meat products at home and abroad [J]. *Chin J Food Hyg*, 2023, 35(1): 107–112.
- [29] NATALIA PADC, VIVIAN TO, ANDERON CC, *et al*. Adequacy of Petrifilm™ aerobic count plates supplemented with deman, rogosa & sharpe broth and chlorophenol red for enumeration of lactic acid bacteria in salami [J]. *Meat Sci*, 2015(12): 253–261.
- [30] 祝朝霞. 食品中沙门氏菌快速检测测试片预制培养基的研发[D]. 哈尔滨: 黑龙江东方学院, 2019.
ZHU ZX. Development of prefabricated medium for rapid detection of salmonella testing pieces in food [D]. Harbin: East University of Heilongjiang, 2019.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)

作者简介



杨 睿, 硕士, 主要研究方向为食品检测及风险评估、微生物快速检测。
E-mail: 494026080@qq.com



王伟达, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与质量分析。
E-mail: wangweida@smq.com.cn