DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250811002
引用格式: 辛乐, 史朝烨, 王小贺, 等. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌质控样品的制备[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 115–121.
XIN L, SHI ZY, WANG XH, *et al*. Preparation of quality control samples for *Listeria monocytogenes* in food [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 115–121. (in Chinese with English abstract).

食品中单核细胞增生李斯特氏菌质控样品的制备

辛　乐[1,2], 史朝烨[1,3], 王小贺[1,3], 林　芳[1,3*], 束慧丽[1]

(1. 陕西省食品药品检验研究院, 西安　710000; 2. 国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 西安　710000; 3. 陕西省食品药品安全监测重点实验室, 西安　710000)

摘　要: 目的　制备单核细胞增生李斯特氏菌质控样品。**方法**　根据生长曲线选择进入稳定期的单核细胞增生李斯特氏菌, 进行单因素实验和响应面实验, 优化冻干保护剂配方; 通过均匀性、稳定性等指标对制备出的质控样品进行评价。**结果**　选择培养 12 h 进入稳定期的单核细胞增生李斯特氏菌进行冻干保存, 优化后的冻干保护剂配方为脱脂乳粉 13%、海藻糖 8%, 谷氨酸钠 3%, 菌株存活率可达 82.27%; 在均匀性实验中样品 *F* 为 2.747, 小于 *F* 临界值[$F_{0.05}$(9,10)=3.02]; 模拟稳定性实验中, 运输条件 25 ℃和 37 ℃保存 7 d, 保存条件 4 ℃和–20 ℃保存 28 d, 质控样品稳定性良好。**结论**　制备的单核细胞增生李斯特氏菌质控菌株可以作为实验室质控样品使用。

关键词: 单核细胞增生李斯特氏菌; 质控样品; 冷冻干燥

Preparation of quality control samples for *Listeria monocytogenes* in food

XIN Le[1,2], SHI Zhao-Ye[1,3], WANG Xiao-He[1,3], LIN Fang[1,3*], SHU Hui-Li[1]

(1. *Shaanxi Institute for Food and Drug*, *Xi'an* 710000, *China*; 2. *National Medical Products Administration Key Laboratory for Testing Technology of Pharmaceutical Microbiology*, *Xi'an* 710000, *China*; 3. *Shaanxi Key Laboratory of Food and Drug Safety Monitoring*, *Xi'an* 710000, *China*)

ABSTRACT: Objective　To prepare quality control samples of *Listeria monocytogenes*. **Methods**　*Listeria monocytogenes* in the stationary phase was selected based on the growth curve. Then single-factor experiments and response surface methodology were used to optimize the lyoprotectant formulation. The prepared quality control samples were evaluated by homogeneity and stability. **Results**　*Listeria monocytogenes* cultured for 12 hours (stationary phase) was selected for freeze-drying. The optimized lyoprotectant formulation consisted of 13% skim milk powder, 8% trehalose and 3% sodium glutamate, achieving a bacterial survival rate of 82.27%. In the homogeneity test, the *F*-value was 2.747, which was lower than the critical *F*-value [$F_{0.05}$(9,10)=3.02]. In simulated stability tests, the quality control samples remained stable under transportation conditions which was 25 ℃ and 37 ℃ for 7 days and storage conditions which was 4 ℃ and –20 ℃ for 28 days. The stability of the quality control samples

收稿日期: 2025-08-11
基金项目: 陕西省科技厅科技计划项目(2025SF-YBXM-150)
第一作者: 辛乐(1993—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 569379945@qq.com
***通信作者:** 林芳(1982—), 女, 硕士, 主任药师, 主要研究方向为食品、保健食品检验及安全性检测。E-mail: fanqiehuayuan@126.com

was good. **Conclusion** The prepared *Listeria monocytogenes* control strain can be used as a quality control sample in laboratories.

KEY WORDS: *Listeria monocytogenes*; quality control samples; freeze drying

0 引 言

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*), 以下简称单增李斯特菌, 是李斯特氏菌属中唯一的一种食源性致病菌, 可致人畜共患, 该菌在低温、高渗等极端环境下均可生存[1], 易感染人群主要为免疫抑制个体、孕妇、新生儿及老年人, 感染后可引发侵袭性李斯特菌病, 临床表现包括脑膜炎、败血症、心肌炎、孕妇流产及产褥感染等[2]。张智芳等[3]统计了我国 2010—2023 年间, 27 个省报告的李斯特菌病病例 693 例, 平均病死率达到 17.2% (119/693)。欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)[4]2020 年共报告了李斯特菌病确诊病例 2770 例, 其中 301 人死亡, 病死率高达 18.8%; 2023 年报道确诊病例数 2952 例, 比 2022 年上升了 5.8%[5]。单增李斯特菌被世界卫生组织列为 20 世纪 90 年代四大食品致病菌之一[6]。

准确、快速的微生物检测是防控单核李斯特氏菌污染的关键环节, 而高质量的质控样品则是保证检测方法准确性、实验室能力验证可靠性的核心支撑[7−8]。在微生物检测领域, 质控样品的均匀性、稳定性及目标菌存活率直接影响检测结果的溯源性与可比性, 因此研发性能优异的质控样品具有重要实践意义[9]。

本研究将“菌株生长时期筛选”与“冻干保护剂复配”结合, 先结合单增李斯特氏菌生长特性, 确定稳定期菌为最佳冻干对象, 再通过单因素和响应面实验设计优化冻干保护剂配方比例, 形成“菌株-保护剂”协同体系, 其次探究目标菌、背景菌以及干扰菌的不同水平混合后, 通过冻干技术以获得单增李斯特氏菌质控样品, 最后利用 CNAS-CL03-A001: 2025《能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明》要求, 通过测定其均匀性和稳定性, 验证本研究所制定的质控样品制备方法的适用性, 以期制备出稳定性强、均匀性高的质控样品, 可以在检测实验室实际检测中使用, 并协助发现检测过程中存在的问题, 提高实验室能力。

1 材料与方法

1.1 菌 株

单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC 19115、英诺克李斯特氏菌(*Listeria innocua*) ATCC 33090、斯氏李斯特氏菌(*Listeria seeligeri*) ATCC 35967、伊氏李斯特氏菌(*Listeria ivanovii*) ATCC 19119、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922 标准菌株[来源于美国典型菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), 购买自北京陆桥技术股份有限公司]。

1.2 仪器与设备

HFsafe-1800LC(A2)生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司); Vitek 2 compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统(法国梅里埃公司); 2-4 LD plus 冷冻干燥机(德国 CHRIST 公司); LHP-250 恒温培养箱(上海精其仪器有限公司)。

1.3 材料与试剂

含 0.6%酵母膏粉的胰胨大豆琼脂、李斯特氏菌显色培养基、改良霍格兰氏(Hoagland basal salt mixture modified, PALCAM)培养基、血平板(北京陆桥技术有限责任公司); 海藻糖(纯度≥97.0%)、谷氨酸钠(纯度≥98.0%)、硫脲(纯度≥99.0%)、抗坏血酸(纯度≥99.7%)(国药集团化学试剂有限公司); 甘油(丙三醇)(分析纯, 天津市天力化学试剂有限公司); 甘露醇(分析纯, 天津市津北精细化工有限公司); 脱脂乳粉(纯度≥99.0%, 北京索莱宝科技有限公司)。

1.4 方 法

1.4.1 菌株的复苏及鉴定

无菌条件下, 目标菌、背景菌、干扰菌均取标准菌株冻干菌粉, 加入 0.5 mL 营养肉汤中, 在 36 ℃条件下培养 24 h, 再分别划线接种于 PALCAM 培养基、李斯特氏显色培养基、血平板培养基、营养琼脂(nutrient agar, NA)平板, 培养后的各标准菌株分别做生化实验鉴定, 以及使用 Vitek 2 compact 鉴定分析。

1.4.2 生长曲线的测定

将各标准菌株分别接种到 TSB 培养基中, 置于 36 ℃恒温生化培养箱中培养, 用细菌浊度仪每隔 2 h 测定其浊度, 绘制生长曲线(横坐标为细菌的培养时间, 纵坐标为测定浊度)[10]。通过标准曲线分析, 以确定各标准菌株进入生长稳定期的时间, 并收集进入稳定期的菌体用于后续实验。

1.4.3 冻干保护剂的优化

选取不同类型的冻干保护剂, 通过单因素实验筛选。脱脂乳粉、甘油经 108 ℃灭菌 10 min; 海藻糖、葡萄糖、硫脲、甘露醇、谷氨酸钠、抗坏血酸分别经 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 收集滤液, 再通过稀释制成不同浓度的单种保护剂; 取浓度约为 3×10^5 CFU/mL 的菌悬液 0.5 mL 加入至 4.5 mL 不同种类、不同浓度的单种保护剂中, 在–80 ℃条件下预冷 1 h, –80 ℃、0.05 mBar 冻干 24 h, 密封压盖。

通过 Box-Behnken 设计响应面实验数据[11], 优化出对单增李斯特氏菌的冻干保护剂配方, 按照优化配方配制成不同浓度的溶液, 108 ℃ 10 min 处理, 加入菌悬液后, 在–80 ℃条件下预冷 1 h, –80 ℃、0.05 mBar 冻干 24 h, 密封压盖。

通过菌株存活率/%=冻干后活菌数(CFU)/冻干前活菌数(CFU)×100%, 评价冻干效果。

1.4.4　质控样品的制备方案设计

质控样品应尽可能接近真实样品, 样品内部为非单一菌株, 同时要满足均匀性要求, 本研究欲采用人工染菌的方式制备质控样品。制备方案设计中充分考虑质控样品中目标菌(单增李斯特氏菌)、背景菌(金黄色葡萄球菌, 大肠埃希氏菌)和干扰菌(英诺克李斯特氏菌)及其含量[12], 即本研究共设计了 3 组样品, 使得所有质控样品在实际检验再水化以后, 样液包含的背景菌浓度为 10^4 CFU/mL, 样液包含的目标菌和干扰菌为 10^3 CFU/mL。具体信息如: 阳性样品I组: 目标菌+背景菌; 阳性样品II组: 目标菌+背景菌+干扰菌; 阴性样品III组: 背景菌+干扰菌。

1.4.5　均匀性和稳定性测定

(1)均匀性检验

随机抽取质控样品 10 瓶, 分别进行菌落计数, 每个样品重复测试 2 次, 依照 CNAS-CL03-A001: 2025, 对实验结果进行单因子方差分析, 评价质控样品的均匀性[13]。若质控样品的 F 小于给定显著性水平 α(通常 α=0.05)的临界值 $F_{0.05}(9,10)$=3.02, 则表明样品内样品间无显著差异, 样品是均匀的。

(2)稳定性评估

模拟样品在实际运输过程中的稳定性检验, 将质控样品放置在 4 ℃和 25 ℃条件下保存, 分别在放置后的第 1、3、5、7 d 时进行定性实验检测; 模拟样品在实际储存过程中的稳定性检验, 将质控样品放置在–20 ℃、4 ℃条件下保存, 分别在方舟后的第 7、14、28 d 时进行定性检测。通过对比实际检测结果与 1.4.4 质控样品的制备方案设计是否一致, 评价质控样品的稳定性。

1.5　数据处理

采用 Excel 2014 对实验所得数据进行整理和分析; 采用 Design-Expert 13 软件进行响应面优化; 绘图采用 Origin 2024 完成。

2　结果与分析

2.1　菌株鉴定结果

各菌株经 VITEK2 鉴定, 可信度均达到 99%, 可认定为相应标准菌株。从不同菌株在李斯特氏菌显色培养基的形态颜色来看, 单增李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌为蓝绿色菌落, 菌落周围呈现透明白色晕圈; 斯氏李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌菌落颜色相同, 但周围无不透明白色晕圈。PALCAM 培养基上, 李斯特氏菌均为小的、圆形灰绿色菌落, 周围有棕色水解圈, PALCAM 培养基虽然可以分离出李斯特氏菌, 但不能有效区分单增李斯特氏菌和其他李斯特氏菌[14]。血平板上, 单增李斯特氏菌呈现狭窄、清晰、明亮的溶血圈; 伊氏李斯特氏菌为宽的、轮廓清晰的 β-溶血圈; 斯氏李斯特氏菌为弱的透明溶血圈; 英诺克李斯特氏菌为无溶血圈。不同菌株生化特征结果见表 1, 英诺克李斯特氏菌和单增李斯特氏菌生化结果完全一致, 与刘爱芳等[15]研究结果一致, 故后续实验选择英诺克李斯特氏菌为干扰菌株。

2.2　生长曲线的测定结果

各菌株生长曲线如图 1 所示, 单增李斯特氏菌 0~4 h 为菌株的延滞期, 生长较为缓慢, 在 4~10 h 内呈指数增长趋势, 培养 12 h 后进入生长稳定期。其他背景菌和干扰菌分别于: 大肠埃希氏菌在 6 h、伊氏李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌 10 h、金黄色葡萄球菌 12 h、斯氏李斯特氏菌 16 h 生长进入稳定期。当细菌生长至延滞期时, 细胞的形态会发生变化, 繁殖能力较弱、生物活性较差; 而进入到对数生长期的细菌, 繁殖能力强、新陈代谢快、生物活性强, 但该时期的细菌对温度变化感知敏感, 若进行冷冻处理, 存活率较低[16]。CORCORAN 等[17]收集包含延滞期、对数生长期以及稳定期等不同生长时期的鼠李糖乳杆菌, 分别进行冷冻干燥处理, 发现处于稳定期的鼠李糖乳杆菌存活率可达 50%, 而处于对数期的鼠李糖乳杆菌存活率仅为 14%, 差异显著(P<0.05)。故本研究选择培养 12 h 的单增李斯特氏菌进行后续的冷冻干燥处理。

表 1　生化结果

Table 1　Results of biochemical

菌株	木糖	鼠李糖	葡萄糖	麦芽糖	甘露醇	七叶苷	甲基红-乙酰甲基醇实验	溶血实验
单增李斯特氏菌	-	+	+	+	-	+	+/+	+
英诺克李斯特氏菌	-	+	+	+	-	+	+/+	+
斯氏李斯特氏菌	+	-	+	+	-	+	+/+	+
伊氏李斯特氏菌	+	-	+	+	-	+	+/+	+

注: +表示阳性; -表示阴性。

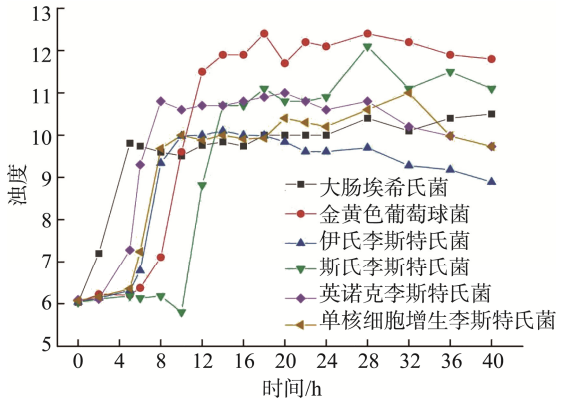

图 1 标准菌株生长曲线

Fig.1 Growth curves of standard strain

2.3 冻干保护剂的优化结果

2.3.1 单因素实验结果

选择复合物(脱脂乳粉)、糖类(海藻糖)、醇类(甘露醇/甘油)、抗氧化剂(抗坏血酸/硫脲/谷氨酸钠)进行单因素冻干保护剂筛选实验。结果见图 2, 硫脲、甘露醇、甘油和抗坏血酸作为保护剂, 目标菌株的存活率均不足 4%, 因此后续实验不再选用。脱脂乳粉、海藻糖和谷氨酸钠对单增李斯特氏菌有明显的保护作用, GIULIO 等[18]研究表明, 糖类包括海藻糖、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖和乳糖等均对细菌有一定的保护作用, 但海藻糖作为非还原性双糖, 对于保护细菌的生物活性、活力效果显著, 因为海藻糖玻璃化转变温度值较高, 在冻结细菌细胞的过程中, 可以阻止冰晶形成[19], 同时, 还可以起到稳定细胞膜蛋白结构和磷脂双分子层的作用[20]。谷氨酸钠是细菌冷冻干燥过程中常见的填充剂和抗氧化剂, 其作用主要为防止细菌内的有效成分随水蒸气的升华而逸散[21]。故后续选择脱脂乳奶粉、海藻糖和谷氨酸钠进行冻干保护剂的复配。

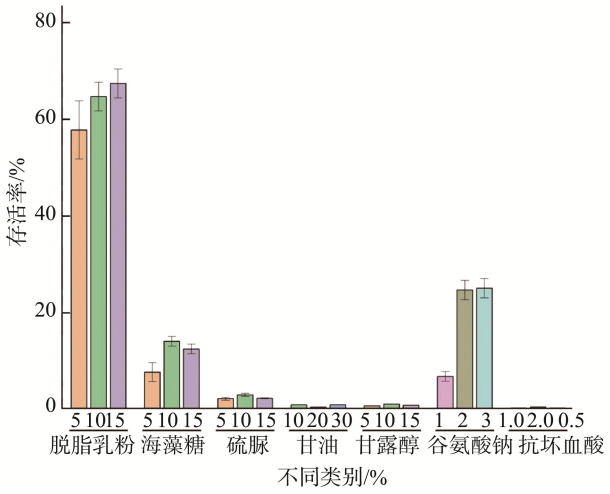

图 2 单因素实验结果

Fig.2 Results of single factor experiment

2.3.2 响应面实验结果

复合冻干保护剂较单一冻干保护剂可以明显提升目标菌株的存活率, 王志伟等[22]使用复合冻干保护剂提升沙门氏菌存活率至 78.8%, 刘俊杰等[23]提升凝结芽孢杆菌 BC30 存活率至 95.41%。本研究根据单因素实验结果, 采用 Design Expert 13 生物学软件, Box-Behnken 设计数据响应面分析设计实验, 实验结果和方差分析结果见表 2~3, 3D 曲面图见图 3。

各冻干保护剂水平之间拟合二次多项方程为 R=74.5936+7.1564A–6.35731B–1.94064C–8.71919AB–3.3105AC+1.25571BC–5.99658A^2–7.82306B^2–12.3185C^2。本模型具有统计学意义[24], 因为 F 为 16.38, P=0.0007, 失拟项 P=0.0799>0.05, 失拟项不显著, 决定系数 R^2 和调整决定系数 R_{adj}^2 均大于 0.9。

单因素结果表明, 脱脂乳粉(A)和海藻糖(B)对单增李斯特氏菌存活率影响极显著(P<0.01), 谷氨酸钠(C)不显著; 交互作用结果表明, 交互项脱脂乳粉和海藻糖对菌株的存活率交互作用显著(P<0.05), 而海藻油和谷氨酸钠, 以及脱脂乳粉和海藻酸钠的交互作用不显著(P>0.05)。从模型的 F 结果可知, 冻干保护剂对单增李斯特氏菌存活率的影响顺序为[25]: 脱脂乳粉>海藻糖>谷氨酸钠。

该模型得出 Box-Behnken Design 实验的最优结果, 冻干保护剂配方为脱脂乳粉 13%、海藻糖 8%, 谷氨酸钠 3%, 菌株存活率可达 82.27%。使用优化过的冻干保护剂配方, 通过重复实验 3 次, 数据表明单增李斯特氏菌的平均存活率为(82.01±0.57)%, 与模型的预测的理论值相近, 说明单增李斯特氏菌冻干保护剂的优化模型可用于实际使用。

表 2 Box-Behnken 组合设计及结果

Table 2 Design and results of Box-Behnken combination

序号	A: 脱脂乳粉/%	B: 海藻糖/%	C: 谷氨酸钠/%	存活率/%
1	10	10	3	77.6
2	10	7	4	61.2
3	6	13	3	57.5
4	10	13	2	45.2
5	10	7	2	66.2
6	10	10	3	71.1
7	6	7	3	47.0
8	14	10	4	56.2
9	10	10	3	74.7
10	14	10	2	68.0
11	10	10	3	75.7
12	6	10	2	49.8
13	6	10	4	51.1
14	10	10	3	73.8
15	14	7	3	81.5
16	14	13	3	57.1
17	10	13	4	45.2

表 3　二次多项模型及各项的方差分析

Table 3　Quadratic multiple model and analysis of variance for each term

变异来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
模型	2273.78	9	252.64	16.38	0.0007	**
A	409.71	1	409.71	26.57	0.0013	**
B	323.32	1	323.32	20.97	0.0025	**
C	30.13	1	30.13	1.95	0.2049	
AB	304.10	1	304.10	19.72	0.0030	**
AC	43.84	1	43.84	2.84	0.1357	
BC	6.31	1	6.31	0.41	0.5428	
A^2	151.41	1	151.41	9.82	0.0165	*
B^2	257.69	1	257.69	16.71	0.0046	**
C^2	638.93	1	638.93	41.43	0.0004	**
残差	107.95	7	15.42			
失拟项	84.78	3	28.26	4.88	0.0799	不显著
误差	23.17	4	5.79			
总和	2381.73	16				

注: **表示在 *P*>0.01 水平显著, *表示在 *P*>0.05 水平显著。

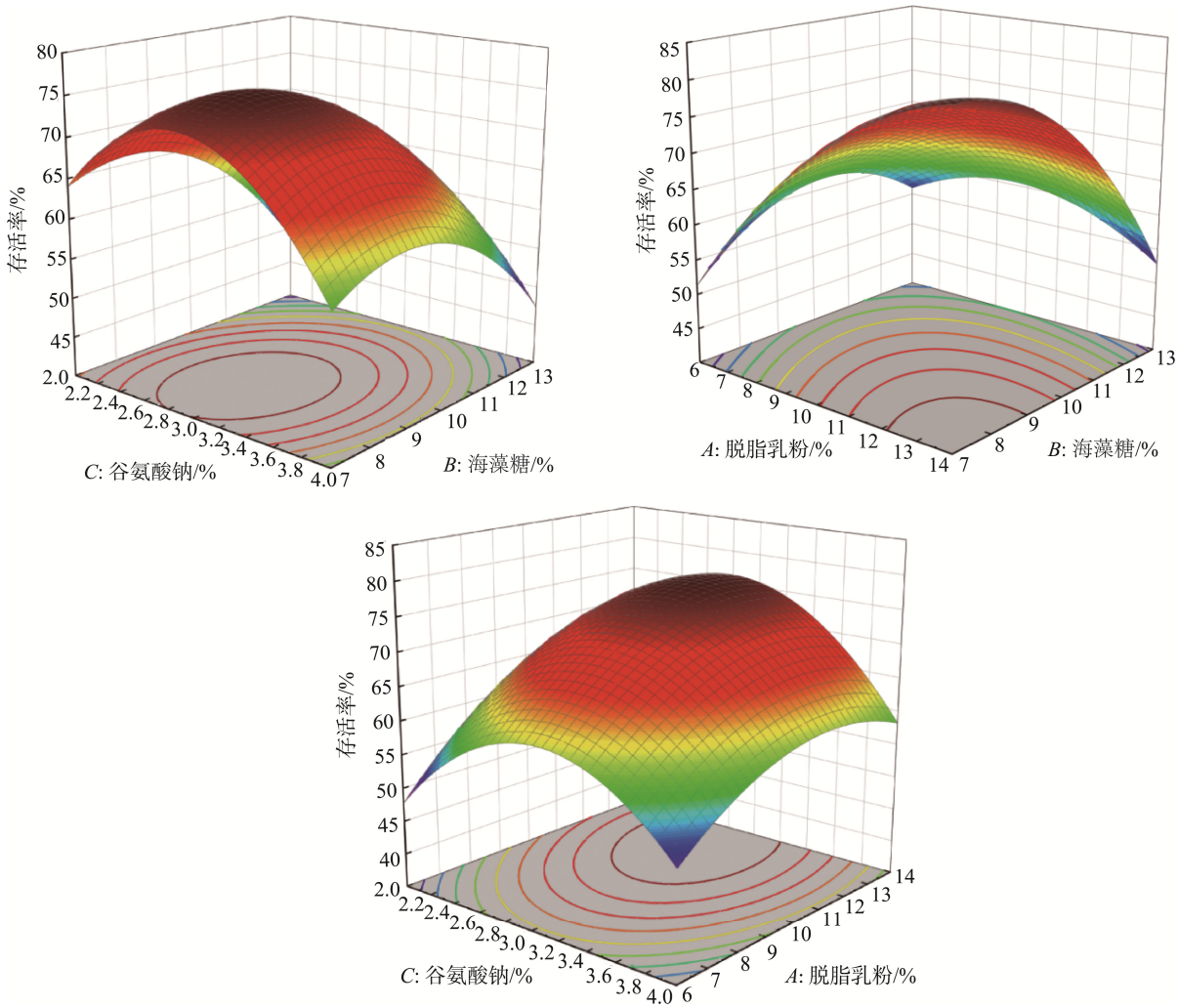

图 3　不同冻干保护剂对单增李斯特氏菌存活率影响的响应曲面图

Fig.3　Response surface plot of the effects of different combinations of freeze-drying protectants on the survival rate of *Listeria monocytogenes*

2.4 样品均匀性结果

采用 CNAS-CL03-A001: 2025 单因素方差分析的 F 检验对质控样品进行均匀性评价。结果表明(表 4), 质控样品的 F 为 2.747, 小于 F 临界值 $F_{0.05}(9,10)=3.02$, 表明制备的质控样品间和样品内无显著性差异, 符合均匀性要求。

表 4 均匀性单因素方差分析

Table 4 One-way analysis of variance for uniformity

序号	结果对数值 1	结果对数值 2	平均值
1	3.918	3.969	3.943
2	3.973	3.914	3.944
3	3.982	3.978	3.980
4	4.004	3.982	3.993
5	3.982	3.987	3.985
6	3.973	3.991	3.982
7	3.964	3.982	3.973
8	3.929	3.968	3.949
9	3.991	3.964	3.978
10	3.929	3.991	3.961
总平均值		3.99	
F		2.747	
F 临界值		$F_{0.05}(9,10)=3.02$	
结果		$F=2.747<F_{0.05}(9,10)=3.02$	

2.5 样品稳定性结果

2.5.1 短期运输稳定性结果

模拟阳性样品I组、II组、阴性样品III组在实际运输过程中的稳定性检验, 检测结果见表 5。结果表明, 在 25 ℃和 37 ℃保存 7 d 内, 阳性样品I组、II组结果均为检出; 阴性样品III组结果均为未检出, 检验结果与制备方案设计 1.4.5(1)的要求一致, 证明本研究提出的质控样品制备方法在短期运输中稳定性良好。

表 5 短期运输稳定性结果

Table 5 Stability results of short term transportation

保存时间/d	保存温度/℃	阳性样品I组	阳性样品II组	阴性样品III组
1	25、37	检出	检出	未检出
3	25、37	检出	检出	未检出
5	25、37	检出	检出	未检出
7	25、37	检出	检出	未检出

2.5.2 长期保存稳定性结果

模拟阳性样品I组、II组、阴性样品III组在长期保存过程中的稳定性检验, 检测结果见表 6。结果表明, 在 4 ℃和 –20 ℃保存 28 d 内, 阳性样品I组、II组结果均为检出; 阴性样品III组结果均为未检出, 检验结果与制备方案设计 1.4.5(2)的要求一致, 证明本研究提出的质控样品制备方法在长期保存中稳定性良好。

表 6 长期保存稳定性结果

Table 6 Stability results of long term storage

保存时间/d	保存温度/℃	阳性样品I组	阳性样品II组	阴性样品III组
7	4、–20	检出	检出	未检出
14	4、–20	检出	检出	未检出
28	4、–20	检出	检出	未检出

3 讨论与结果

质控样检测是一种简便、可靠、最接近能力验证的实验室常见质量控制有效手段, 其具有良好的均匀性和稳定性[26]。本研究为满足质控样品均匀性要求, 同时接近真实样品, 采用人工染菌的方式制备 3 种质控样品, 含 2 种背景菌浓度为 10^4 CFU/mL, 单增李斯特氏菌的选择性增菌液对大肠埃希氏菌和金黄色葡萄球菌具有一定的抑制作用, 故添加浓度过低的背景菌无法起到干扰检验的作用, 若添加浓度过高的背景菌则有可能会抑制单增李斯特氏菌的生长[27], 同时经过菌株鉴定筛选生化实验与单增李斯特氏菌完全一致的英诺克李斯特氏菌[28]作为干扰菌浓度为 10^3 CFU/mL, 在实际检测中对目标菌的检测起到较大的干扰作用, 检测具有一定难度。

本研究通过生长曲线测定, 单增李斯特氏菌 36 ℃培养 12 h 进入稳定期, 选择稳定期的菌株进行质控样的制备, 可以提高存活率。为了减小冷冻干燥过程对单增李斯特氏菌的损伤, 改善质控样品的溶解性和稳定性, 需要在冻干体系中加入冻干保护剂[29]。在没有保护剂存在的条件下进行冻干, 存活率很低, 冻干后存活率的高低取决于所使用的保护剂[30]。本研究优化后的冻干保护剂配方为脱脂乳粉 13%、海藻糖 8%, 谷氨酸钠 3%, 菌株存活率可提升至 82.27%。利用 CNAS-CL03-A001:2009《能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明》要求判定质控样品的均匀性和稳定性: 在均匀性实验中样品 F 为 2.747, 小于 F 临界值 $F_{0.05}(9,10)=3.02$, 质控样品均匀性良好; 模拟稳定性实验中, 运输条件 25 ℃和 37 ℃保存 7 d, 保存条件 4 ℃和 –20 ℃保存 28 d, 质控样品稳定性良好。因此, 本研究优化的质控样品制备方法可以作为阳性质控样品, 用于单增李斯特氏菌检测和质量控制。

参考文献

[1] 谭强来, 吴伟菁, 郑伊婷, 等. 短双歧杆菌对单核细胞增生李斯特菌及其侵染 BeWo 细胞的拮抗作用[J]. 中国微生态学杂志, 2025, 37(6): 630–637, 655.
TAN QL, WU WJ, ZHENG YT, *et al*. Antagonistic effects of Bifidobacterium breve on *Listeria monocytogenes* and its invasion in BeWo cells [J]. Chinese Journal of Microecology, 2025, 37(6): 630–637, 655.

[2] SMITH AM, TAU NP, SMOUSE SL, *et al*. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 20172018: Laboratory activities and experiences associated with whole-genome sequencing analysis of isolates [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2019, 16(7): 524–530.

[3] 张智芳, 刘雪杰, 陈伟伟, 等. 2010—2023 年中国文献报告李斯特菌病

病例流行特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2025, 41(6): 653–659.
ZHANG ZF, LIU XJ, CHEN WW, *et al*. Characteristics of listeriosis cases reported in the literature in China, 2010-2023 [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2025, 41(6): 653–659.

[4] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report [J]. EFSA Journal, 2021, 19(12): e06971.

[5] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2023 Zoonoses Report [J]. EFSA Journal, 2024, 22(12): e9106.

[6] 刘洪蕾, 王真. 食源性单核细胞增生李斯特氏菌检测方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2022, 43(10): 111–116.
LIU HL, WANG Z. Progress on detection methods of foodborne *Listeria monocytogenes* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2022, 43(10): 111–116.

[7] 胡璇, 程紫辉, 陈雄飞, 等. 医用镍钛合金化学成分标准样品研制[J]. 分析实验室, 2023, 42(8): 1050–1055.
HU X, CHENG ZH, CHEN XF, *et al*. Development of certified reference material of chemical composition for medicanickel titanium alloyU [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2023, 42(8): 1050–1055.

[8] 白晓艳, 赵艳, 谢艳艳, 等. 镍钴锰酸锂成分标准样品的研制[J]. 分析实验室, 2024, 43(12): 1771–1777.
BAI XY, ZHAO Y, XIE YY, *et al*. Preparation of certified reference material of lithium nickel cobalt manganate for chemical analysis [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2024, 43(12): 1771–1777.

[9] 周丽娜. 浅析质控品在食品微生物检测中的应用[J]. 现代食品, 2024, 30(6): 55–57.
ZHOU LN. Analysis on the application of quality control products in food microbiological detection [J]. Modern Food, 2024, 30(6): 55–57.

[10] 朱丹实, 王芳平, 赵国苍, 等. 5 种益生菌发酵寒富苹果汁特性的研究[J]. 中国食品学报, 2024, 24(10): 204–214.
ZHU DS, WANG FP, ZHAO GC, *et al*. Studies on the fermentation properties of Hanfu apple juice by five probiotics [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(10): 204–214.

[11] 霍天辰, 郭伟, 李晓强, 等. 枯草芽孢杆菌 DF-54 的产酶优化及其对烤制晒烟的提质效果研究[J/OL]. 陕西科技大学学报, 1-11. [2025-12-29]. https://doi.org/10.19481/j.cnki.issn2096-398x.20250805.003
HUO TC, GUO W, LI XQ, *et al*. Study on the optimization of enzyme production by *Bacillus subtilis* DF-54 and its effect on the quality improvement of baked sun-cured tobacco [J/OL]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 1–11. [2025-12-29]. https://doi.org/10.19481/j.cnki.issn2096-398x.20250805.003

[12] 赵红阳, 王鸣雨, 郑效梅, 等. 奶粉中沙门菌的检测能力验证研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(11): 1565–1570.
ZHAO HY, WANG MY, ZHENG XM, *et al*. Detection of *Salmonella* proficiency testing in milk powder [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(11): 1565–1570.

[13] 李宗亮. 实验室能力验证中的测试样品均匀性和稳定性检验方法探讨[J]. 电子质量, 2018(7): 87–89.
LI ZL. Test method for uniformity and stability of test samples in laboratory proficiency testing [J]. Electronics Quality, 2018(7): 87–89.

[14] 彭怡, 许红玉, 黄厚强, 等. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检验能力验证结果分析[J]. 中国食品, 2024(2): 142–144.
PENG Y, XU HY, HUANG HQ, *et al*. Analysis of the results of proficiency testing for *Listeria monocytogenes* in food [J]. China Food, 2024(2): 142–144.

[15] 刘爱芳, 郑尔美, 王涵铮, 等. 生食动物性水产品中单增李斯特氏菌 TaqMan 实时荧光 PCR 检测法和国标法的比较研究[J]. 食品安全导刊, 2025(14): 75–83.
LIU AIF, ZEHNG ERM, WANG HZ, *et al*. Comparative study between TaqMan real-time fluorescence PCR assay and national standard method for the detection of *Listeria monocytogenes* in raw animal aquatic products [J]. China Food Safety Magazine, 2025(14): 75–83.

[16] TEIXEIRA P, CASTRO H, KIRBY R. Inducible thermotolerance in *Lactobacillus bulgaricus* [J]. Letters in Applied Microbiology, 1994, 18(4): 218–221.

[17] CORCORAN B, ROSS R, FITZGERALD G, *et al*. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(5): 1024–1039.

[18] GIULIO BD, ORLANDO P, BARBA G, *et al*. Use of alginate and cryoprotective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005, 21(5): 739–746.

[19] KAWAI K, SUZUKI T. Stabilizing effect of four types of disaccharide on the enzymatic activity of freeze-dried lactate dehydrogenase: Step by step evaluation from freezing to storage [J]. Pharmaceutical Research, 2007, 24(10): 1883–1890.

[20] TANG M, WARING AJ, HONG M. Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion [J]. Journal of Magnetic Resonance, 2007, 184(2): 222–227.

[21] 张光磊, 张新创, 翟雷. 活菌制剂冻干保护剂的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(4): 80–85.
ZHANG GL, ZHANG XC, ZHAI L. Advances on cryoprotectants of live bacteria preparations [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2015, 43(4): 80–85.

[22] 王志伟, 徐琼, 宋春宏, 等. 乳粉中沙门氏菌能力验证样品研制[J]. 中国乳品工业, 2025, 53(6): 40–45.
WANG ZW, XU Q, SONG CH, *et al*. Preparation of *Salmonella*. spp samples for proficiency testing in milk powder [J]. China Dairy Industry, 2025, 53(6): 40–45.

[23] 刘俊杰, 陈宁宁, 徐玉娟, 等. 凝结芽孢杆菌 BC30 冻干保护剂的筛选及其对菌粉消化耐受性的影响[J]. 食品工业科技, 2025, 46(12): 154–164.
LIU JJ, CHEN NN, XU YJ, *et al*. Screening of cryoprotectants of *Bacillus coagulans* BC30 and their effect on the digestive tolerance of bacteria powder [J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(12): 154–164.

[24] KANHA N, REGENSTEIN JM, LAOKULDILOK T. Optimization of process parameters for foam mat drying of black rice bran anthocyanin and comparison with spray- and freeze-dried powders [J]. Drying Technology, 2020, 15: 581–594.

[25] KOTTA S, MUBARAK AH, BADR-ELDIN SM, *et al*. Coconut oil-based resveratrol nanoemulsion: Optimization using response surface methodology, stability assessment and pharmacokinetic evaluation [J]. Food Chemistry, 2021, 357: 129721.

[26] 董丽荣, 刁玉华, 安宁, 等. 基于质控样测试的内部质量控制结果分析[J]. 中国标准化, 2023(21): 214–218.
DONG LR, DIAO YH, AN N, *et al*. Analysis of internal quality control results based on tes of quality control samples [J]. China Standardization, 2023(21): 214–218.

[27] 周向阳, 王淑娜, 鄢建辉, 等. 微生物能力验证样品制备工艺及水产品企业水平测试结果评价[J]. 浙江海洋学院学报, 2011, 30(4): 231–235.
ZHOU XY, WANG SN, YAN JH, *et al*. Preparation technology of microbiological proficiency testing samples and evaluation of the level test results of aquatic enterprises [J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2011, 30(4): 231–235.

[28] 邱莎, 曾博. 多方法鉴定食品中单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 农产品加工, 2025(8): 86–91.
QIU S, ZENG B. Multiple Methods Identification of *Listeria monocytogenes* in food [J]. Agricultural Products Processing, 2025(8): 86–91.

[29] HAO R, ZENTEK J, WILFRIED V. Optimization of pro-duction parameters for probiotic *Lactobacillus* strains as feed additive [J]. Molecules, 2019, 24(18): 32–86.

[30] NAVARTA LG, CALVO J, CALVENTE V, *et al*. Freezing and freeze-drying of the bacterium *Rahnella aquatilis* BNM 0523: Study of protecting agents, rehydration media and freezing temperatures [J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53(5): 565–571.

(责任编辑: 韩晓红　于梦娇)