

微生物能力验证实验结果分析

甄 珍

(齐齐哈尔出入境检验检疫局,黑龙江 齐齐哈尔 161005)

摘要:为提高微生物实验室检测能力和检验人员技术水平,增强实验室竞争力,依据国家标准 GB 4789.2、3、4、10-2010,采用多稀释度、多平行样和多方法,同时结合 3M 纸片法对代码为 T0504-A 样品中的菌落总数、T0504-B 中的大肠菌群、T0504-C 中的金黄色葡萄球菌、T0504-D 中的沙门氏菌进行检测鉴定。结果表明: T0504-A 样品中菌落总数 $100\ 000\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$; T0504-B 样品中大肠菌群 $4\ 600\text{ MPN}\cdot\text{mL}^{-1}$; T0504-C 样品中金黄色葡萄球菌 $4\ 200\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$; T0504-D 样品中沙门氏菌结果为阴性。4 项测试均取得满意结果,且 Z(比值)均小于 1(Z 值绝对值小于等于 2 为满意结果)。

关键词:能力验证;菌落总数;大肠菌群;沙门氏菌;金黄色葡萄球菌

中图分类号:R446.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)06-0086-04

实验室能力验证,是指利用实验室间指定检测数据的比对,确定实验室从事特定测试活动的技术能力。

能力验证实验是多家实验室分析同一样本并由质控管理机构(上级检测机构或参考实验室)收集和反馈实验室上报结果并评价实验室能力的过程,可作为一个外部监控指标提示室内质控难以发现的偏差或系统误差,促进实验室进一步改进工作,提高质量,是判断和监控实验室能力的有效手段。通过能力验证,出现异常结果的实验室说明在检测结果评价等方面还存在问题,需要进一步改进。就像是实验室的一面镜子一样,实验室既能够发现自身的不足,也能对照和相同实验室之间的差距。能力验证是评价实验室检验能力的重要方法,参加能力验证的实验室应严谨、科学地对待能力验证工作。

能力验证是提高检验水平的重要途径,是对细菌实验室检测质量评价的方法。该实验室 2010 年第一次参加国家认可委(CNAS)组织的微生物检测能力验证计划,均取得了较好的效果。

1 材料与方法

1.1 待测样品

4 瓶冻干制品样品代码分别为 T0504-A、T0504-B、T0504-C 和 T0504-D。

1.2 仪器与试剂

生物安全柜,恒温培养箱。3M 测试片(菌落

总数、大肠菌群、金黄色葡萄球菌),平板计数琼脂、营养琼脂、月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)、煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB)、缓冲蛋白胨水、四硫磺酸盐钠煌绿增菌液(TTB)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)、亚硫酸铋琼脂(BS)、HE 琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(XLD)、三糖铁琼脂(TSI)、赖氨酸脱羧酶肉汤、沙门菌诊断血清、7.5%氯化钠肉汤、Baied-Parker 琼脂、脑心浸出液肉汤(BHI)、冻干血浆及沙门氏菌所有生化鉴定管均购自北京陆桥有限公司。

1.3 检测依据

GB 4789.2-2010 菌落总数检验;GB 4789.3-2010 大肠菌群检验(MPN 法);GB 4789.10-2010 金黄色葡萄球菌(平板计数法);GB 4789.4-2010 沙门氏菌检验。

1.4 操作步骤

1.4.1 样品水化 分别将 4 瓶冻干制品样品按测试要求用 40 mL 灭菌生理盐水进行再水化,震荡充分混匀成待测试样品。

1.4.2 T0504-A 菌落总数 从 1.4.1 中制备的测试样品原液中取出 1 mL 加入到 9 mL 生理盐水中制成 1×10^{-1} 的稀释液,同方法进行下一步稀释,共制成 1×10^0 (原液)~ 1×10^{-6} 的 7 个稀释度的稀释液,再从每个稀释度的稀释液中分别取出 1 mL 加入到 4 个平板和 2 个 3M 纸片中。分别用平板计数琼脂、用营养琼脂作为培养基倒入平板中,凝固后再倒入约 4 mL 培养基使成双层培养基,防止有蔓延菌落的生长。待培养基凝固后放入 36℃ 培养箱中进行倒置培养。培养 48 h 后取出进行计数^[1-2]。

收稿日期:2011-03-10

作者简介:甄珍(1983-),女,黑龙江省齐齐哈尔市人,学士,助理工程师,从事微生物检验研究。E-mail: zhenyxl@163.com。

1.4.3 T0504-B 大肠菌群 同 1.4.2 中方法制成 1×10^0 (原液)~ 1×10^{-6} 的 7 个稀释度的稀释液,再从每个稀释度的稀释液中分别取出 1 mL 加入到 3 个 LST 管和 2 个 3M 纸片中,然后放入 36℃ 培养箱中培养。48 h 时取出进行观察,将所有产气管接 BGLB,再进行 36℃、48 h 的培养。48 h 后取出观察,计下每个稀释度的 BGLB 管产气管的数量并查表计算。

1.4.4 T0504-C 金黄色葡萄球菌 同 1.4.2 中方法制成 1×10^0 (原液)~ 1×10^{-6} 的 7 个稀释度的稀释液,再从每个稀释度的稀释液中分别取出 0.3、0.3、0.4 mL 加入到 3 个 Baied-Parker 平板上再分别取出 1 mL 加入到 2 个 3M 纸片上,然后用无菌棒涂布整个 Baied-Parker 平板。涂布后,等样品匀液吸收后翻转平皿,倒置于培养箱,36℃ 培养 48 h。培养后观察平板上的菌落特征。从中任选 5 个典型菌落,分别做血浆凝固酶试验,同时以血浆凝固酶试验阳性和阴性葡萄球菌菌株的

肉汤培养物作为对照。

1.4.5 T0504-D 沙门氏菌 从 1.4.1 中制备的测试样品原液中取出 25 mL 加入到 225 mL 灭菌缓冲蛋白胨水中,震荡充分后进行 36℃ 培养 8~18 h,然后从中分别取出 1 mL 加入 TTB 和 SC 中,TTB 进行 42℃、24 h 培养,SC 进行 36℃、24 h 培养。培养后将 TTB 和 SC 及阳性对照菌伤寒沙门氏菌分别进行平板划线 HE、BS、XLD 平板并进行 36℃、24 h 培养。

2 结果与分析

2.1 水化过程的影响

水化过程是制备样品的关键步骤,如果水化不彻底或不均匀都会对实验结果造成影响,从而影响最终的 Z 值。现将水化后立即检验与水化后放置 6 h 后的结果进行对比(均采用平板计数琼脂作为培养基以及相同的培养温度和时间)(见表 1)。

表 1 样品水化后立即检验和水化后放置 6 h 检验结果比较

| 处理 | | 1×10^0 | 1×10^{-1} | 1×10^{-2} | 1×10^{-3} | 1×10^{-4} | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} |
|-----------|--------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 水化后立即检验 | 平均值/cfu·mL ⁻¹ | 多不可计 | 多不可计 | 多不可计 | 105 | 8.25 | 0.75 | 0 |
| | 结果 | 110000 cfu·mL ⁻¹ | | | | | | |
| 放置 6 h 检验 | 平均值/cfu·mL ⁻¹ | 多不可计 | 100 | 10.25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 结果 | 1000 cfu·mL ⁻¹ | | | | | | |

由表 1 可知,放置 6 h 后的样品结果明显少于水化后立即检验的结果,表明在放置过程中,由于环境及其它条件的影响使菌体大量死亡,从而对结果产生较大影响,所以冻干样品在水化后应立即检验。现将具体水化方法做以介绍:

水化方法要严格按照测试要求进行(此次冻干样品要求用 40 mL 稀释液进行水化)。样品开

启后应立即在 1 min 内加入少量(2~4 mL)稀释液进行水化,稀释液合计 40 mL,待溶解后,吸入无菌瓶中,然后反复用余下的稀释液清洗西林瓶,回收清洗液放入这些无菌瓶中,此溶液即是待测样品原液,全过程 20 min 内完成。

2.2 T0504-A 菌落总数

由表 2 可以看出,平板计数琼脂与营养琼脂

表 2 平板计数琼脂、营养琼脂和 3M 纸片对 T0504-A 菌落总数检验结果比较

| 处理 | | 1×10^0 | 1×10^{-1} | 1×10^{-2} | 1×10^{-3} | 1×10^{-4} | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} |
|--------|----------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 平板计数琼脂 | 4 个平板平均值 | 多不可计 | 多不可计 | 多不可计 | 105 | 8.25 | 0.75 | 0 |
| | 结果 | 110000 cfu·mL ⁻¹ | | | | | | |
| 营养琼脂 | 4 个平板平均值 | 多不可计 | 多不可计 | 多不可计 | 98.25 | 6.25 | 0.5 | 0 |
| | 结果 | 98000 cfu·mL ⁻¹ | | | | | | |
| 3M 纸片 | 2 个纸片平均值 | 多不可计 | 多不可计 | 多不可计 | 125 | 6 | 0.5 | 0 |
| | 结果 | 130000cfu·mL ⁻¹ | | | | | | |

的结果比较相近,这是因为两者的培养基成分比较相近,而且平板计数琼脂的透明度要好于营养琼脂,在菌落计数时就比较容易观察,便于计数,所以结果要稍高于营养琼脂的结果。3M 纸片法为 2008 版国标中规定的检验方法,在其培养基成分中特殊添加了 TTC 物质,在这种物质的作用

下可以使菌落产生红色,更便于观察计数,所以其结果要明显高于其它 2 种方法。

此次样品检验中有蔓延菌落产生,培养后计数时最好双人进行,取平均值,减少误差。该次试验采用平板计数琼脂,营养琼脂和 3M 纸片 3 种方法同时进行,并且多稀释度多平行样(做了 $1\times$

10^0 (原液)~ 1×10^{-6} 的 7 个稀释度的稀释液,每个稀释度做了 4 个平板,标准中规定每个稀释度做 2 个平板),因为在样品中菌体浓度未知的情况下选用多稀释度可防止漏检,确保有适宜稀释度的菌落数在可计算范围之内,使检测更加精确。结果表明,取平板计数琼脂和营养琼脂方法的平均

值,即 $100\ 000\ \text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。最终 $Z=0.70$,为满意结果。证明这种试验方法是可行且误差相对较小。

2.3 T0504-B 大肠菌群

由表 3 可以看出,MPN 法与 3M 纸片法的结果比较相近但单位不一致,这是由于两种方法选

表 3 MPN 法与 3M 纸片法 T0504-B 对大肠菌群检验结果比较

| | | 稀释度 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|---------------------------|---|---|-------------------|---|---|-------------------|---|---|-------------------|---|---|-------------------|---|---|-------------------|---|---|-------------------|---|
| MPN 法 | LST BGLB 结果 | 1×10^0 | | | 1×10^{-1} | | | 1×10^{-2} | | | 1×10^{-3} | | | 1×10^{-4} | | | 1×10^{-5} | | | 1×10^{-6} | |
| | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | 4600MPN•mL ⁻¹ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3M 纸片 | 2 个纸片平均值 | 多不可计 | | | 240 | | | 45 | | | 1.5 | | | 0 | | | 0 | | | 0 | |
| | 结果 | 4500 cfu•mL ⁻¹ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

注: + 表示阳性,即产气; - 表示阴性,即未产气。

用的培养基不同,但 2 种单位在一定程度上有近似性。检验中采用了多稀释度方法,防止漏检,确保有适宜的稀释度的菌落数在可计算范围之内,使检测更加精确。结果表明选取 MPN 法的数据,即 $4\ 600\ \text{MPN}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。最终 $Z=0.00$,为满意结果。证明 MPN 法结果是相对比较精确的,而且这种试验方法是可行且误差相对较小的。

2.4 T0504-C 金黄色葡萄球菌

由表 4 可以看出,平板计数法与 3M 纸片法结果差距比较大,相差近 2 倍多,这是由于采用的方法及培养基不同,3M 操作中每个稀释度取

1 mL 加入到纸片上而平板计数法每个稀释度取 0.3、0.3、0.4 mL 加入到 Baied-Parker 平板上,并且最后结果计算时 3M 纸片法是取平均值而平板计数法是取总和,所以造成结果的差异较大。检验中采用了多稀释度方法,防止漏检,确保有适宜的稀释度的菌落数在可计算范围之内,使检测更加精确。结果表明选取平板计数法的结果,即 $4\ 200\ \text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。最终 $Z=0.08$,为满意结果。证明平板计数法结果是相对比较精确的,而且这种实验方法是可行且误差相对较小的。

表 4 MPN 法与 3M 纸片法对 T0504-C 金黄色葡萄球菌检验结果比较

| 检验方法 | | 1×10^0 | 1×10^{-1} | 1×10^{-2} | 1×10^{-3} | 1×10^{-4} | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} |
|-------|----------|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 平板计数法 | 3 个平板和值 | 多不可计 | 685 | 42 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| 结果 | | 4200 cfu $\cdot\text{mL}^{-1}$ | | | | | | |
| 3M 纸片 | 2 个纸片平均值 | 多不可计 | 229 | 19 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 结果 | | 1900 cfu $\cdot\text{mL}^{-1}$ | | | | | | |

注:共挑取 5 个典型菌落接 BHI,且 5 个菌落都呈血浆凝固酶阳性。

2.5 T0504-D 沙门氏菌

TTB 划线的 HE、BS、XLD 平板上均没有菌落生长;SC 划线的 HE 平板上菌落特征为桔黄色菌落、BS 平板上菌落特征为黑色菌落、XLD 平板

上菌落特征为黄色菌落,挑起 4 个可疑菌落,编号分别为 1、2、3、4,阳性对照菌接种 TSI 和赖氨酸脱羧酶试验以及其它生化实验,36℃ 培养 24 h(见表 5)。

表 5 各菌落生化结果

| 序号 | 斜面 | 底层 | TSI 产气 | H ₂ S | 赖 AA | 靛基质 | pH 7.2 | 尿素 | KCN | ONPG | 山梨醇 | 甘露醇 | 血清 |
|------|----|----|-----------|------------------|------|-----|--------|----|-----|------|-----|-----|----|
| 1 | A | A | + | + | - | - | - | - | - | + | - | + | |
| 2 | A | A | + | + | - | - | - | - | - | + | - | + | |
| 3 | A | A | + | + | - | - | + | - | - | + | - | + | |
| 4 | A | A | + | + | - | - | + | - | - | + | - | + | |
| 阳性对照 | K | A | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + |

注:A 为产酸,K 为产碱,+ 为阳性,- 为阴性。

在样品检验中菌落形态基本相近,TSI 反应均产硫化氢,生化现象也均比较相似且最终结果都为阴性。虽然均非沙门氏菌但在检验中也要仔细观察平板上的菌落特征,多挑取菌落进行鉴定,这样不至于疏漏,还可使用显色培养基、API 鉴定卡或全自动微生物鉴定仪,方便检验也确保结果的准确性。沙门氏菌一直是引起食物中毒的高发菌^[3-4],对沙门菌鉴定特别注意菌落形态特征。综合以上生化试验鉴定的结果,该试验最后报告结果为 25 mL 样品中未检出沙门氏菌。最终沙门氏菌指定值为阴性,为满意结果。结果证明这种实验方法是可行的。

3 结论

该次能力验证采用多稀释度、多平行样、多方法进行检验,使检测更加精确。结果表明:在菌落总数检验中采用平板计数和营养琼脂方法比较好,结果比较精确;在大肠菌群检验中 MPN 法与 3M 纸片法均可以,但 MPN 法结果相对更准确;在金黄色葡萄球菌检验中采用平板计数法更好,结果更精确;在沙门氏菌检验中要注意平板上的菌落特征,多挑菌落进行鉴定,防止疏漏,还可使用显色培养基、API 鉴定卡或全自动微生物鉴定仪,方便检验也确保结果的准确性。

该次能力验证共有 471 个参试实验室参加,其中 262 个实验室参加了菌落总数、大肠菌群、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的 4 项能力验证,其中共有 151 个实验室取得了全部 4 项的满意结果,占参加此 4 项能力验证实验室的 58%,占全部参加能力验证实验室的 32%,齐齐哈尔出入境检验检疫局实验室 4 个项目均取得满意结果,且 Z 值均小于 1(要求 Z 值的绝对值小于等于 2 为满意结果)。该次待检样品为 4 瓶冻干制品,含有不同种类杂菌干扰,增加了一定的难度。该次检测能力验证,可增强实验室竞争力,更提高了实验室检验人员对突发传染病、细菌性食物中毒的病原诊断及应急能力,促进国家认可实验室水平的不断提高。

参考文献:

- [1] 孟昭赫. 食品卫生微生物学检验方法注解[M]. 北京:人民卫生出版社,1988.
- [2] 俞树荣. 微生物学和微生物学检验[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社.
- [3] 佐藤静夫. 不容忽视的沙门菌[J]. 国外畜牧科技,1992,19(2):50-51.
- [4] 焦振泉,郭云昌,裴晓燕,等. 食源性致病菌检测方法研究进展[J]. 中国食品卫生杂志,2007,19(2):153-157.

Microbe Ability Test Results and Analysis

ZHEN Zhen

(Exit Inspection and Quarantine Bureau of Qiqihar, Qiqihar, Heilongjiang 161005)

Abstract: In order to improve microbe laboratory detection capability, laboratory technician levels and increase laboratory competition, according to National Standard GB 4789. 2, 3, 4, 10-2010, based on the multi dilution, multi samples and multi methods, the bacterial count in sample T0504-A, coliform bacteria in sample T0504-B, Staphylococcus aureus in sample T0504-C and Salmonella in sample T0504-D were detected combined with 3M paper method. The results showed that the total number of colonies was $100\ 000\ \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ in sample T0504-A, coliform bacteria in sample T0504-B was $4\ 600\ \text{MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$, Staphylococcus aureus in T0504-C was $4\ 200\ \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, Salmonella in the sample of T0504-D were negative. It conclude that all four had achieved satisfactory results, and Z(score values) were less than 1(the absolute value of Z equal or less than 2 is satisfied results).

Key words: ability test; bacterial count; coliform bacteria; salmonella; staphylococcus aureus