

奶粉中沙门氏菌检测能力验证分析

游元丁^{1,2}, 赵阳^{1,2}, 徐孟怀^{1,2}, 冉茂乾^{1,2}, 李志^{1,2}, 焦彦朝^{2,3*} (1. 六盘水市山地特色生态产品研究中心, 贵州六盘水 553000; 2. 国家果蔬检测重点实验室(六盘水), 贵州六盘水 553000; 3. 贵阳海关出入境检验检疫综合技术中心, 贵州贵阳 550081)

摘要 [目的]通过参加能力验证,验证实验室沙门氏菌检测能力,通过对沙门氏菌检测能力验证进行分析,提高检测人员的技术水平,确保检测数据达到检测质量的标准。[方法]根据参试指导书和标准 GB 4789.4—2016 的方法对 2 份奶粉样品进行分离、生化鉴定和血清学鉴定。增菌后用全自动酶联免疫分析仪(VIDAS)进行初筛,初步判断样品情况,生化鉴定时同时用生化试剂盒和全自动微生物鉴定仪(VITEK 2 COMPACT)进行确认,确保生化结果一致。[结果]此次能力验证收到的 2 个盲样:18-Q018 和 18-W430,其中 18-Q018 25 mL 样品未检出沙门氏菌,18-W430 25 mL 样品检出沙门氏菌。其结果与指定值一致,能力评价为满意。[结论]实验室通过参加沙门氏菌能力验证并对能力验证进行分析,提高检测人员沙门氏菌检测能力;在参加能力验证时,应根据自身实际情况,在实验过程中运用多种方法进行验证,确保能力验证获满意结果。

关键词 奶粉;沙门氏菌;能力验证;技术水平

中图分类号 TS 207.4 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)05-0193-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.05.054



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Verification Analysis of Detection Ability of *Salmonella* in Milk Powder

YOU Yuan-ding^{1,2}, ZHAO Yang^{1,2}, XU Meng-huai^{1,2} et al (1. Mountain-featured Ecological Product Research Center of Liupanshui, Liupanshui, Guizhou 553001; 2. State Key Inspection Laboratory of Fruit and Vegetable Products(Liupanshui), Liupanshui, Guizhou 553000)

Abstract [Objective] Through participating in proficiency testing confirms the detection ability to *Salmonella* of the laboratory. By the analysis of the proficiency testing of *Salmonella* detection, improves the inspectors' technical level, and ensures that the test data reach the quality of inspection. [Method] The laboratory according to the test instruction and the standard of GB 4789.4—2016, did the separating, biochemical identification and serological identification to the 2 milk powder samples. After the enrichment, initial screening was carried by automated enzyme-linked immunosorbent instrument (VIDAS), and judged the samples' pollution preliminary. The biochemical identification was confirmed by the biochemical kit and the automatic microbial identification instrument (VITEK 2 COMPACT) to ensure that the biochemical results were consistent. [Result] The two blind samples received by this proficiency testing: 18-Q018 and 18-W430, of which 18-Q018 25 mL samples did not detect *Salmonella*, and 18-W430 25 mL samples detected *Salmonella*. The results were consistent with the specified values and the ability evaluation was satisfactory. [Conclusion] The laboratory through the proficiency testing of *Salmonella* detection, and by the analysis of proficiency testing, improve the detection ability of *Salmonella*. When participating in the proficiency testing, it should be according to the actual situation of the laboratory, using various methods do the experimental process to ensure satisfactory results.

Key words Milk powder; *Salmonella*; Proficiency testing; Technical level

实验室一般通过内部质量控制、能力验证或使用实验室间比对等方式来评估检测人员的能力,对检测人员的资格进行确认。能力验证活动是利用实验室间的比对,按照预先制定的准则评价参加者的能力^[1-2]。中国合格评定国家认可委员会(CNAS)2018年发布实施的 CNAS-RL02:《能力验证规则》^[2]中明确规定了实验室参加能力验证的最低要求,其中食品领域中微生物的最低参加频次为 1 次/年,可见能力验证活动已成为我国实验室认可机构采用的主要技术手段之一。微生物实验室质量控制的关键环节也是能力验证活动,能力验证结果直接影响到检验报告的准确性和质量^[3]。而沙门氏菌作为常见致病菌,是很多食品安全的必检项目,也是实验室微生物检测的常规致病菌,其与人的生活环境以及人体饮食健康息息相关^[4],因此沙门氏菌的检测能力和技术水平至关重要,实验室通过参加沙门氏菌能力验证,验证实验室是否具备检测沙门氏菌的技术能力,确保检测活动的有效性^[5]。

沙门氏菌是一种常见的人畜共患病原菌,属肠杆菌科、革

兰氏阴性杆菌,其能引起人类的伤寒、副伤寒、败血症及场外灶性感染等多种症候群,严重危害人类健康^[6-7]。国家果蔬检测重点实验室(六盘水)2018年参加由中国认证认可监督管理委员会(CNCA)组织的、中国检验检疫科学研究院测试评价中心负责实施的 A 类项目“奶粉中沙门氏菌、克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)的检测(CNCA-18-A07)”中沙门氏菌的检测,实验室编号为 CNCA-18-A07-214。根据国标法^[8]对 2 个奶粉样品进行检测,检测过程中用 VIDAS 进行初筛,生化试剂盒和全自动微生物鉴定仪(VITEK 2 COMPACT)进行生化鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源。2 份奶粉样品由中国检验检疫科学研究院测试评价中心提供,编号分别为 18-Q018 和 18-W430。

1.1.2 培养基及试剂。缓冲蛋白胨水预增菌液(BPW)、亚硫酸盐胱氨酸增菌液(SC)、四硫磺酸钠煌绿增菌液(TTB)、亚硫酸铋(BS)、沙门氏菌显色培养基、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂、营养琼脂(NA)、HE 分离培养基、沙门氏菌干制生化鉴定试剂盒等均购自北京陆桥技术股份有限公司;SLM 沙门氏菌检测试剂盒(VIDAS)、VITEK 2 革兰氏阴性细菌鉴定卡购自生物梅里埃公司;沙门氏菌诊断血清套装购自天津生物芯片技术有限公司。所有培养基和试剂均验证合格且

基金项目 海关总署科研计划项目(2018IK053)。

作者简介 游元丁(1989—),女,贵州六盘水人,助理工程师,硕士,从事食品检验检测研究。*通信作者,研究员,硕士,从事动植物食品检验检疫研究。

收稿日期 2019-01-16

在有效期内。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理。收到的样品为西林瓶包装,需用 100 mL 稀释液再水化,具体操作如下:先用 4 mL 稀释液进行再水化,待冻干粉充分溶解后,用无菌吸管转移至无菌瓶中,再反复用余下的稀释液清洗西林瓶内壁,并将清洗液全部回收至上述无菌瓶中,此溶液即是待测样品原液,等同于 100 mL 的待测乳品样品。

1.2.2 沙门氏菌预增菌和增菌。在生物安全柜中转移 25 mL 待测样品至 225 mL 灭菌的缓冲蛋白胨水 (BPW) 中, $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 于恒温培养箱中培养 8~18 h;分别吸取 1 mL 预增菌液转接到 10 mL 的亚硫酸盐胱氨酸增菌液 (SC) 中和四硫磺酸钠煌绿增菌液 (TTB) 中, SC 混合增菌液于 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中恒温培养 18~24 h, TTB 混合增菌液于 $(42\pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中恒温培养 18~24 h。

1.2.3 VIDAS 全自动酶联免疫分析仪进行沙门氏菌快速筛选。从 SC 增菌液和 TTB 增菌液管中分别移取 1 mL 增菌液到无菌试管中,将试管于沸水中加热 15 min 灭活。分别取 500 mL 增菌液于恢复室温的酶联免疫试剂条测试孔中,经 VIDAS 30 酶联免疫分析仪检测,45 min 后查看报告结果。

1.2.4 选择性分离。用 3 mm 的接种环从“1.2.3”中的 SC 和 TTB 增菌液中取菌液 1 环,划线接种于 BS 琼脂平板、XLD 琼脂平板、HE 琼脂平板、沙门氏菌属显色培养基平板;BS 琼脂平板于 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养 40~48 h, XLD 琼脂平板、HE 琼脂平板、沙门氏菌属显色培养基平板于 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养 18~24 h,随时观察平板菌落生长情况,记录菌落形态。

1.2.5 生化鉴定试验。选取“1.2.4”中的典型菌落明显、分离效果好的 2 种类型的平板,从平板上挑取菌落转移至营养

琼脂平板 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 24 h。为确保生化鉴定结果,同时采用沙门氏菌干制生化鉴定试剂盒和全自动微生物鉴定仪鉴定。生化鉴定试剂盒使用根据试剂盒说明书,挑取新鲜培养的单个纯菌落接种于三塘铁生化管,同时挑取菌落至适量 0.85% 生理盐水中,制成 0.5 个麦氏浊度的均匀菌悬液,按说明书添加至每个生化反应孔内,盖上盒盖,与三塘铁生化管一起于 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养,靛酸钾试验若培养 24 h 时仍为阴性,延长至 48 h 后观察结果。全自动微生物鉴定仪 (VITEK 2 COMPACT) 用 0.45% 的盐水挑取菌落制成 0.50~0.63 个麦氏浊度的均匀菌悬液,按仪器作业指导书进行上机鉴定。

1.2.6 血清学鉴定。将“1.2.5”中符合沙门氏菌生化反应特征的样品进行血清学鉴定。

多价菌体抗原 (O) 鉴定:在洁净玻片上的 2 个分离区域滴加 2 滴生理盐水,从营养琼脂平板上挑取分纯的菌落,分别与玻片上的生理盐水混匀,滴加 1~2 滴多价菌体 (O) 抗血清于玻片上一个菌落与生理盐水的混合液中,另一个菌落与生理盐水的混合液中加入 1 滴生理盐水作为对照,用接种环分别混匀玻片上的 2 种混合液,轻轻摇动玻片 1 min,观察结果。

多价鞭毛抗原 (H) 鉴定:按多价菌体抗原 (O) 鉴定方法进行,滴加多价鞭毛抗原 (H) 抗血清,观察结果。

2 结果与分析

2.1 VIDAS 初筛结果 分别将 2 份奶粉样品的增菌液灭活后用 VIDAS 酶联免疫分析仪进行初筛分析,初筛结果显示,样品 18-Q018 为沙门氏菌阴性,样品 18-W430 为沙门氏菌阳性。

2.2 选择性平板分离 将增菌液划线于多个平板进行选择性分离培养,2 份奶粉样品 18-Q018 和 18-W430 在各平板上的菌落形态见表 1。

表 1 选择性平板上菌落形态

Table 1 The colony morphology on the selective separation medium

平板 Plate	18-Q018	18-W430
BS 平板 BS plate	黑色带金属光泽菌落,周围培养基不变	灰绿色菌落,周围培养基不变;黑色带金属光泽菌落,周围培养基不变;绿色菌落
沙门氏菌显色培养基平板 <i>Salmonella</i> chromogenic medium plate	蓝绿色菌落	紫红色菌落;蓝绿色菌落
HE 平板 HE plate	浅棕色菌落	蓝绿色菌落,不带黑色中心;蓝绿色菌落带黑色中心;橘色菌种,中心颜色较深
XLD 平板 XLD plate	黄色菌落;粉红色菌落,菌落边缘不规则	黄色菌落,不带黑色中心;粉红色菌落,不带黑色中心;粉红色菌落带大的黑色中心

2.3 生化鉴定结果 样品 18-Q018 在各平板上均没有典型菌落生长,菌落形态判断与 VIDAS 的初筛结果一致,挑取 2 个 BS 平板上黑色带金属光泽菌落,(编号分别为 18-Q018-1 和 18-Q018-2)、1 个 XLD 平板上的黄色菌落(编号 18-Q018-3)进行生化鉴定;样品 18-W430 在各平板上都有典型菌落生长,与 VIDAS 初筛结果一致,挑取 2 个沙门氏菌显色培养基平板的紫红色菌落,编号分别为 18-W430-1 和 18-W430-2,1 个 BS 平板的灰绿色菌落,编号为 18-W430-3 进行生化鉴定。生化鉴定结果见表 2。18-Q018-1 和 18-Q018-2 这 2 个菌落分别用生化试剂盒和全自动微生物鉴定仪进行生化鉴定,生化试验确认为非沙门氏菌,全自动微生物鉴定

仪鉴定为大肠杆菌 (*Escherichia coli*);18-Q018-3 生化鉴定为非沙门氏菌,生化鉴定结果与 VIDAS 初筛结果一致,则样品 18-Q018 25 mL 未检出沙门氏菌。18-W430 挑取的 3 个典型菌落生化鉴定结果皆为沙门氏菌阳性,则 25 mL 18-W430 样品中检出沙门氏菌。

2.4 血清学鉴定结果 根据生化鉴定结果,样品 18-W430 的 3 个菌落生化鉴定结果皆为阳性,进一步进行血清学确认。挑取 18-W430 的琼脂纯培养物进行血清学鉴定,鉴定结果见表 3。由生化鉴定结果和血清学鉴定结果确定 25 mL 样品中,样品 18-Q018 未检出沙门氏菌,18-W430 检出沙门氏菌。

表 2 样品生化鉴定结果

Table 2 The biochemical identification result of samples

样品 Sample	编号 No.	三塘铁琼脂 Santang iron agar		产气 Gas production	H ₂ S	赖氨酸脱 羧酶试验 Lysine decarbo- xylase test	氰化钾 Potassium cyanide	靛基质 Indone	尿素 Urea	甘露醇 Mannitol	山梨醇 Sorbitol	ONPG	全自动微 生物鉴定仪 Automatic microbial identification instrument
		斜面 Inclined plane	底层 Bottom layer										
18-Q018	18-Q018-1	A	A	+	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
	18-Q018-2	A	A	+	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
	18-Q018-3	A	A	+	+	-	-	-	-	+	-	+	UD
18-W430	18-W430-1	K	A	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
	18-W430-2	K	A	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
	18-W430-3	K	A	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+

注：“K”为产碱；“A”为产酸；“+”为阳性；“-”为阴性；“UD”代表未鉴定

Note: “K” is alkali production; “A” is acid production; “+” is positive; “-” is negative; “UD” stands for unidentified

表 3 18-W430 样品血清学鉴定结果

Table 3 The serological identification results of sample 18-W430

编号 No.	多价菌体抗原(O)鉴定 Identification of multivalent bacterial antigen(O)	多价鞭毛抗原(H)鉴定 Identification of multivalent flagellar antigen(H)
18-W430-1	+	+
18-W430-2	+	+
18-W430-3	+	+

注：“+”为阳性；“-”为阴性

Note: “+” is positive; “-” is negative

3 结论与讨论

采用传统国标方法检测沙门氏菌,沙门氏菌的选择性分离培养尤其重要,其在各种类型的平板上生长情况不一致,BS 平板上生长较慢,培养时间较长。沙门氏菌显色培养基沙门氏菌菌落特征明显,容易识别。尽管国标法中只需要 2 种不同培养基即可,但是在进行选择分离时,应选择多种培养基进行分离,有机结合,相辅相成。

样品 18-Q018 进行 VIDAS 初筛的结果为阴性,挑取的菌落中分离出大肠杆菌(*Escherichia coli*)。样品 18-W430 除了分离出沙门氏菌以外,选择性平板上还有其他菌落形态,样品中应添加了其他干扰菌。在实验室有时间和条件的情况下,应继续分离,通过继续研究,既可以了解样品污染情况,同时又能提高检测人员的技术能力^[9]。

传统国标方法符合食品安全法的强制标准,方法成熟,对菌体浓度要求不高,但是耗时较长。酶联免疫法 VIDAS

初筛时间较短,但阳性样本还需传统方法确认,在传统国标方法进行的同时采用 VIDAS 进行初筛,可以提前摸清样本情况,做到心中有数。目前沙门氏菌的检测方法较多^[10],不乏很多快速检测方法,可以采用多种方法进行确认,确保检测结果正确。

实验室通过参加沙门氏菌检测能力验证活动,可以确保实验室沙门氏菌的检测水平和检测质量。参加完能力验证之后,实验室通过开展能力验证分析,提高检测人员检测能力和技术水平,确保检测活动的数据达到检测质量的标准。

参考文献

- [1] 胡洁. 实验室能力验证中微生物盲样检测结果分析[J]. 人人健康, 2017(24): 256.
- [2] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证规则: CNAS-RL02: 2018[Z]. 2018.
- [3] 仝伟建, 杨晓楠, 段鹏, 等. 一次沙门氏菌检测能力验证结果分析[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(30): 225-226.
- [4] 陈秋菊, 向君毅. 巧克力中沙门氏菌能力验证结果与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(24): 6590-6593.
- [5] 章海通, 邢家深, 傅晓, 等. 食品能力验证中沙门氏菌的分离鉴定和分型[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(20): 166-171.
- [6] 张红莉, 殷露真. 能力验证试验中沙门氏菌的分离与鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(12): 4996-4999.
- [7] 袁辰刚, 韩伟, 谢小珏, 等. 沙门氏菌快速测试片在食品检测中的初步应用研究[J]. 食品能力验证中沙门氏菌的分离与鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(1): 293-298.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 食品微生物学检验沙门氏菌检验: GB 4789—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [9] 肖兆爱. 沙门氏菌检验中不同培养基的检出效果研究[J]. 心血管外科杂志(电子版), 2018, 7(4): 662-663.
- [10] 黄宝莹, 余之蕴, 林耀文, 等. 四种方法检测食品中沙门氏菌的比较[J]. 食品工业科技, 2014, 35(15): 185-187, 192.

(上接第 165 页)

参考文献

- [1] 郑重, 马富裕, 戴建国, 等. 滴灌自动控制与智能化管理技术[M]. 北京: 科学出版社, 2015: 32-33.
- [2] ZARDARI N H, CORDERY I. Water productivity in a rigid irrigation delivery system[J]. Water resources management, 2009, 23(6): 1025-1040.
- [3] 张军, 李建明, 张中典, 等. 水肥对番茄产量、品质和水分利用率的影响及综合评价[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(7): 215-222.
- [4] 杨晓宏, 严程明, 张江周, 等. 中国滴灌施肥技术优缺点分析与对策[J]. 农学学报, 2014, 4(1): 76-78.
- [5] 范文波, 吴普特, 马枫梅. 膜下滴灌技术生态—经济与可持续发展分析: 以新疆玛纳斯河流域棉花为例[J]. 生态学报, 2012, 32(23): 7559-7567.
- [6] 刘国顺. 烟草栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 141-179.
- [7] 王洪云, 王德勋, 单沛祥, 等. 烟草膜下滴灌试验研究[J]. 中国烟草科学, 2011, 32(5): 42-46.
- [8] 刘毅, 申昌优, 肖先仪, 等. 水肥耦合对旱地烟生长、产量、品质及肥料利

- 用率的影响[J]. 江西农业学报, 2012, 24(6): 100-102.
- [9] 国鸿鑫, 谢艳红. 膜下滴灌条件下不同水肥设计对烟草生长和产量的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(4): 96-98.
- [10] 孔德钧. 膜下滴灌在贵州烤烟生产上的应用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [11] 杨军. 膜下滴灌对不同施肥烤烟生长及品质的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010.
- [12] 汪耀富, 高华军, 邵孝侯. 蒸渗仪控制下烤烟土壤水分的时空动态研究[J]. 水土保持学报, 2005, 19(3): 152-155.
- [13] 李志宏, 张云贵, 刘青丽, 等. 烤烟氮素养分管理[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 2-3.
- [14] 国家烟草专卖局. 烟草农艺性状调查测量方法: YC/T 142—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [15] 史宏志, 范艺宽, 刘国顺, 等. 烟草水肥耦合机理研究现状和展望[J]. 河南农业科学, 2008, 13(10): 5-10.
- [16] 李才华. 新田烤烟生产关键施肥技术研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2011.
- [17] 李春俭, 李文卿, 赵正雄, 等. 烤烟养分资源综合管理理论与实践[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2006: 75-76.