

实验室间比对混合菌种鉴定结果分析

张先菊*

(江苏省徐州市贾汪区疾病预防控制中心, 徐州 221011)

摘要:目的 通过参加实验室间能力比对盲样考核工作, 不断提升检测人员操作技能与质量控制管理水平。**方法** 每年参加不同机构组织的实验室间比对微生物混合菌种鉴定工作, 按照现行有效的食品安全国家标准食品微生物学检验 GB 4789 系列标准及本次比对作业指导书进行检测。**结果** 实验室鉴定结果与目标菌株进行比较, 结果一致, 质控盲样检测结果均符合考核要求。**结论** 参加实验室间比对、加强实验室质量管理控制能够有效提升基层微生物检测人员能力水平, 掌握专业理论知识和实验操作技能, 提高检测结果准确率。

关键词: 实验室间能力比对; 盲样考核; 质量控制

0 引言

实验室间能力比对盲样考核能锻炼检测人员操作技能、加强实验室质量控制和管理水平。实验室专业技术人员必须考虑实验室的设备、培养基、试剂、诊断血清等因素, 从接种、培养、分离鉴定等环节进行严格的质量控制, 减少主观因素对检验结果的影响, 进而保证检验结果的准确性^[1]。加强质量控制是提升检测能力的重要手段^[2]。微生物实验室间比对试验常采用混合菌种的盲样鉴定^[3]。为了提高本实验的微生物检测能力技术水平, 本实验室每年参加实验室间比对微生物混合菌种鉴定质控考核。现对2020年参加五市(扬州、南通、徐州、镇江、泰州)疾控系统实验室间比对盲样考核结果进行回顾性数据分析。本文旨在探讨通过分析本次混合菌种数目较多的情况下如何进行鉴定, 积累经验, 为基层检测单位做好微生物实验室间比对工作提供参考, 不断提升实验室检测能力。

1 材料与方法

1.1 质控盲样

2020年实验室间比对试验样品为西林瓶装冻干粉, 有A、B共2瓶。每瓶含有待测菌株1~2种, 样品包装上均注明样品编号。危害程度均为第三类《人间传染病的病原微生物名录》。领取样品后, 立即放在2~8℃冰箱中暂时保存, 尽快检测。每组A和B瓶中至少各报告1种致病菌为符合, 如检出其他菌种也一同上报。沙门氏菌的检测应报告血清学分型, 每份样品报告2种致病菌。

1.2 检测试剂及主要仪器

所使用的液体培养基应清澈无污染, 根据使用要求加入不同的添加剂, 固体培养基表面湿润无气泡。随机抽取一定数量做无菌试验, 应无菌生长。实验中使用的培养基和细菌生

化鉴定管均在有效期内, 生产单位分别为杭州天和微生物试剂有限公司、广东环凯微生物科技有限公司、上海科马嘉微生物技术有限公司等。实验所用主要仪器设备为电热恒温培养箱(DHP-9162)、生化培养箱(LRH-150F), 上海慧泰仪器制造有限公司; 显微镜(BX41), 奥林巴斯; 微生物鉴定仪(ARIS 2X)并配套革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌生化鉴定板, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 厌氧培养罐, 以上所有仪器设备检定均在有效期内。

1.3 实验室检测方法

按照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》(GB 4789.4—2016)^[4]《食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验》(GB 4789.5—2012)^[5]《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》(GB 4789.7—2013)^[6]《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》(GB 4789.14—2014)^[7]等相关国家标准及实验室间比对作业指导书进行检测。

1.4 增菌培养

按照作业指导书取出A、B两瓶样品平衡至室温, 分别无菌开启后立即加入少量无菌稀释液进行水化溶解, 回收至无菌瓶中。用适量的稀释液清洗内壁及胶塞, 一并放入无菌瓶中, 按照相应国家标准方法进行增菌培养。将A、B比对试验样品分别接种到不同的增菌液中, 根据不同国家标准检验方法的要求放置于相应的培养条件中。

1.5 划线分离

用接种环从上述增菌液中分别挑取1环直接划线接种到不同选择性琼脂平板上, 根据不同国家标准检验方法的要求放置相应的培养条件中, 观察菌落特征。

A瓶比对试验样品在BS琼脂平板、XLD琼脂平板、沙门氏菌属显色琼脂平板、血琼脂平板和MYP琼脂平板中观察有2种

* 通信作者: 张先菊, 副主任技师, 研究方向为微生物检验。E-mail: 158455373@qq.com

可疑菌落生长，编号为 A1 号菌和 A2 号菌。B 瓶比对应试验样品在 XLD 琼脂平板、志贺氏菌属显色琼脂平板、弧菌显色琼脂平板中观察有 3 种可疑菌落生长，编号为 B1 号菌、B2 号菌和 B3 号菌。

2 结果与分析

2.1 菌落特征及菌体形态

沙门氏菌属显色琼脂平板上呈圆形、较小、光滑的紫色菌落。血平板上有两种可疑菌落，一种菌落较大、灰白色、边缘不整齐、有透明溶血环，革兰氏染色镜检为革兰氏阴性球杆菌、无芽胞；另一种菌落较小、边缘整齐、圆形湿润、无溶血环。MYP 琼脂平板上呈粉红色菌落、周围有白色沉淀圈。沙门氏菌属显色琼脂平板上、血平板上较小菌落(A1 号菌)革兰氏染色镜检为革兰氏阴性球杆菌、无芽胞。MYP 琼脂平板上、血平板上较大菌落(A2 号菌)革兰氏染色镜检为革兰氏阳性杆菌、有芽胞呈椭圆形，位于菌体中央或偏端，不膨大于菌体。

志贺氏菌显色培养基上有两种菌落，一种菌落较大、淡粉色、光滑、边缘不整齐；另一种菌落较小、蓝色、圆形的菌落。弧菌显色培养基上呈圆形、湿润、光滑的粉紫色菌落。志

贺氏菌显色培养基上较大菌落(B1 号菌)革兰氏染色镜检为革兰氏阴性小杆菌、无芽胞。志贺氏菌显色培养基上较小菌落(B2 号菌)革兰氏染色镜检为革兰氏阳性球菌、多呈短链或长链状排列。弧菌显色培养基上菌落(B3 号菌)革兰氏染色镜检为革兰氏阴性、无芽胞、杆状或弧状。

2.2 纯培养

将 MYP 琼脂平板上、血平板上较大菌落(A2 号菌)分别划线接种于营养琼脂平板，置 30℃ 培养 24 h。将弧菌显色培养基上菌落(B3 号菌)划线接种 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板，置 36℃ 培养 24 h。

2.3 生化试验

分别挑取上述平板中的典型菌落接种到三糖铁琼脂斜面上，弧菌显色琼脂平板中可疑菌落接种到 3.5% 氯化钠三糖铁琼脂斜面上。取培养物分别接种不同生化鉴定管，观察生化特征，A1 号菌、A2 号菌、B1 号菌、B2 号菌、B3 号菌生化结果分别见表 1~5。

同时分别挑取可疑菌落制备菌悬液，于全自动微生物鉴定系统进行自动化分析，结果分别显示 A1 号菌为沙门氏菌、A2 号菌为蜡样芽胞杆菌、B1 号菌为宋内志贺氏、B2 号菌为粪肠球菌、B3 号菌为副溶血性弧菌。

表 1 A1 号菌生化结果

生化试验	结果	生化试验	结果	生化试验	结果
氧化酶	-	触酶	+	苯丙氨酸	-
靛基质	-	赖氨酸	+	ONPG	-
尿素	-	丙二酸盐	-	卫矛醇	+
氰化钾	-	甘露醇	+	水杨苷	-
硫化氢	+	山梨醇	+	葡萄糖	+

表 2 A2 号菌生化结果

生化试验	结果	生化试验	结果	生化试验	结果
氧化酶	-	触酶	+	动力	+
硝酸盐还原	+	酪蛋白分解	+	溶菌酶耐性	+
卵黄反应	+	溶血	+	柠檬酸盐	-
淀粉	-	VP	-	明胶	+
甘露醇	-	山梨醇	+	葡萄糖(厌氧)	+

表 3 B1 号菌生化结果

生化试验	结果	生化试验	结果	生化试验	结果
氧化酶	-	动力	-	尿素	-
鸟氨酸	+	赖氨酸	-	ONPG	+
葡萄糖铵	-	七叶苷	+	水杨苷	-
硫化氢	-	柠檬酸盐	-	葡萄糖	+

表 4 B2 号菌生化结果

生化试验	结果	生化试验	结果	生化试验	结果
触酶	-	甘露醇	+	精氨酸	+
山梨醇	+	七叶苷	+	阿拉伯糖	-
硫化氢	-	尿素	-	葡萄糖	+

2.4 血清学鉴定

A1 号菌能与沙门氏菌 A~F 多价 O 血清发生凝集，能与 O9

因子血清；H 多价 2；Hg，Hm 单因子血清发生凝集，与其它诊断血清均不发生凝集。本菌在生理盐水中无自凝现象。

B1 号菌能与宋内氏志贺氏菌多价血清、Ⅱ相血清发生凝集, 与其它诊断血清均不发生凝集。本菌在生理盐水中无自凝现象。

表5 B3号菌生化结果

生化试验	结果	生化试验	结果	生化试验	结果
氧化酶	+	动力	+	脲酶	+
鸟氨酸	+	赖氨酸	+	ONPG	-
VP	-	明胶	+	乳糖	-
硫化氢	-	蔗糖	-	葡萄糖	+
嗜盐性试验 0%	-	嗜盐性试验 3%	+	嗜盐性试验 6%	+
嗜盐性试验 8%	+	嗜盐性试验 10%	-	乳糖	-

注: 上述表格中“+”表示阳性;“-”表示阴性。

2.5 结果报告

综合以上分析鉴定结果, 报告 A 瓶样品中检出 2 种菌, 即肠炎沙门氏菌(O9: Hg, Hm: -)和蜡样芽胞杆菌; B 瓶样品中检出 3 种菌, 即宋内氏志贺氏菌、副溶血性弧菌和粪肠球菌。根据本实验室两组鉴定结果与已知目标菌株进行比较, 完全一致, 符合本次实验室间比对的判定要求, 取得了比较满意的结果。

3 讨论与结论

本次实验对混合的 5 种目标菌株均已检出, 鉴定结果符合质控考核的要求。实验室在收到样品后, 仔细观察样品的包装是否完好、有无泄露或污染等异常情况。准备检测前仔细阅读《作业指导书》, 严格按照规定的标准检测方法进行操作。本实验室根据自己能开展的致病菌株项目选择了多种增菌液进行增菌, 在检测过程中应尽可能地考虑全面选择多种分离培养基, 用显色培养基和一般选择性培养基同时进行分离培养, 有助于结果观察。本次比对实验 A 瓶混合了 2 种菌株、B 瓶混合了 3 种菌株, 在不同显色培养基上生长比较典型容易鉴别, 为下一步的鉴定指明了方向。对菌株的生长情况细心观察, 挑取不同的优势菌落, 也不能疏漏生长不良的菌落。对未生长或生长不良的培养基先不丢弃, 放置室温后每天观察是否有变化, 防止遗漏可疑菌株。把握好增菌液及培养基种类、培养时间、温度及需氧/厌氧生长特性等, 使样品中非优势目标菌一定不要被优势目标菌掩盖^[8]。混合菌种鉴定试验可以在增菌的同时进行直接分离培养, 以避免漏检。为做好混合菌种质控的鉴定分析工作, 可采用常规生化试验与全自动微生物生化鉴定仪相结合的方式^[9], 进而保证对菌种的结果判定更为准确、快捷。既往手工生化试验种类少, 而自动化生化鉴定系统涵盖生化试验种类多, 且数据库中包括的细菌种属多, 更适宜现阶段的细菌鉴定^[10]。

混合菌种鉴定对于没有配备全自动化鉴定仪器设备的基层检测人员来说具有一定的挑战性, 尤其是最近几年基层疾控机构新进部分技术人员, 充分的知识储备、工作经验和熟练操作技能是完成试验的基础。尤其是一管样本中混合 2 种以上菌株时更加是一种锻炼与考验, 做试验前应充分考虑本实验室能开展哪些致病菌检测、需要提前准备哪些试剂、参照哪些国家标准、菌种之间是否会有相互抑制作用等。稍微有些方面考虑不全、试剂准备不充分或劣势菌株观察不仔细就很有可能造成

漏检现象。检测过程中严格遵守无菌操作, 防止混入杂菌影响检测结果判定。培养基、生化试剂等是做好试验的关键因素之一, 实验室应加强关键试剂培养基等试验材料的质量控制。为更好的开展混合菌种鉴定工作, 实验室可以积极引进科学先进的检验试剂和检验设施设备, 尽量使用智能检验手段代替人工操作, 提升微生物检验工作智能化和自动化水平, 避免由于人工操作不当产生的失误^[11]。通过定期参加质控盲样考核可以有效提升检测人员的操作能力、及时发现检验过程中存在的问题并不断完善, 保证检测结果的准确性。

参考文献

- [1] 陈建琳, 顾永洋. 混合菌种盲样鉴定分析[J]. 应用预防医学, 2012, 10(05): 312-313.
- [2] 陈红艳, 戴桂华, 刘婷. 食源性致病菌盲样考核分析[J]. 铁路节能环保与安全卫生, 2020, 10(06): 26-28.
- [3] 顾雪影, 宋金卿, 梅志锋. 浅谈混合菌种盲样考核鉴定分析[J]. 疾病监测与控制杂志, 2012, 6(11): 686-688.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验: GB 4789.4—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-20.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验: GB 4789.5—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012: 1-13.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验: GB 4789.7—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 1-13.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验: GB 4789.14—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 1-16.
- [8] 王艳玲. 2012—2019 年微生物实验室盲样考核结果分析[J]. 中国城乡企业卫生, 2020, 8(08): 12-15.
- [9] 卢艳玲, 靳会娟, 任艳平, 等. 实验室间混合菌种质控的鉴定分析[J]. 中国社区医师, 2013, 15(05): 261-262.
- [10] 石继春, 龙新星, 陈驰, 等. 一株支气管鲍特杆菌国家标准菌种的再鉴定[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(03): 69-79.
- [11] 吴杰华. 浅谈食品微生物检验技术质量控制[J]. 食品安全导刊, 2022, 06(下): 63-65.