

## 一例志贺氏菌测量审核分析

赵阳<sup>1,2</sup>, 游元丁<sup>1,2</sup>, 冉茂乾<sup>1,2</sup>, 焦彦朝<sup>3\*</sup> (1. 六盘水市山地特色生态产品研究中心, 贵州六盘水 553000; 2. 贵阳海关综合技术中心果蔬实验室(六盘水), 贵州六盘水 553000; 3. 贵阳海关综合技术中心, 贵州贵阳 550081)

**摘要** [目的]通过样品的分离鉴定,提升检测能力,确保检测结果的真实性和可靠性,增加检测经验。[方法]根据样品指导书和标准 GB 4789.5—2012,分离编号分别为 19-A766 和 19-A835 的 2 个测量审核样品,并进行生化鉴定和血清学鉴定,同时使用全自动微生物鉴定仪(VETEK 2 COMPACT)进行确认。[结果]19-A835 25 mL 样品中未检出志贺氏菌,19-A766 25 mL 样品中检出志贺氏菌;测量审核结果为满意结果。[结论]此次测量审核结果丰富了检测人员的检测经验,提高了检测能力,为进一步完善食品检测工作打下坚实基础。

**关键词** 志贺氏菌;测量审核;检测能力;分离;鉴定

中图分类号 TS207.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)08-0201-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.08.050

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



### A Case Analysis of *Shigella* Measurement

ZHAO Yang<sup>1,2</sup>, YOU Yuan-ding<sup>1,2</sup>, RAN Mao-qian<sup>1,2</sup> et al (1. Liupanshui Mountain-featured Ecological Product Research Center, Liupanshui, Guizhou 553000; 2. Laboratory of Fruit and Vegetable Products of Guiyang Customs District Comprehensive Technology Center, Liupanshui, Guizhou 553000)

**Abstract** [Objective] Through the separation and identification of samples, improve the detection ability, ensure the authenticity and reliability of the test results, and increase the testing experience. [Method] The separated samples (named as 19-A766 and 19-A835) were identified using biochemistry and serology methods, and validated using a fully automated microbiome (VETEK 2 COMPACT) according to the sample instructions and standard GB 4789.5-2012. [Result] The *Shigella* was detected in 19-A766 (25 ml) samples, but not in 19-A835 (25 mL) samples. The measurement audit results were regarded as satisfaction. [Conclusion] Our analysis enriches the experience and increases the ability of inspectors, which may provide a solid foundation for further food testing.

**Key words** *Shigella*; Measurement review; Test ability; Isolation; Identification

《能力验证规则》(CNAS-RL02:2018)<sup>[1]</sup>定义能力验证是利用实验室间比对,按照预先制定的准则评价参加者的能力。测量审核(measurement audit)是能力验证计划的一种,有时也称为“一对一”的能力验证计划,是实验室对被测物品(材料或制品)进行实际测试,将测量结果与参考值进行比较的活动。测量结果的满意度是判定实验室开展或校准该项目能力的标准,是能力验证计划的有效补充,也是中国合格评定国家认可委员会(China national accreditation service for conformity assessment, CNAS)判定实验室能力的重要技术依据<sup>[1-2]</sup>。

志贺氏菌属(*Shigella*)是一类具有高度传染性和严重危害性的革兰氏阴性肠道致病菌,是细菌性痢疾的病原菌,临床感染可导致痢疾,其症状以发热、脱水和便血为特征,其在自然界中分布较为广泛,对人类和动物健康造成严重的影响。志贺杆菌属分为 4 群:痢疾志贺氏菌、福氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、宋内氏志贺氏菌<sup>[3-4]</sup>。据世界卫生组织报道,由志贺氏菌引起的肠道感染病例全球每年约有 1.2 亿,造成死亡的有 60 多万<sup>[5]</sup>。在我国食源性致病菌中,志贺氏菌感染导致的痢疾病例占细菌性痢疾病例的 8.5%<sup>[6]</sup>。引起志贺氏菌感染的食品主要有奶和奶制品、生的蔬菜、水果、沙拉、土豆、禽肉(鱼肉、鸡肉、虾)、面包制品等,几乎涵盖了人们日常对食品的基本需求。因此,提高检测人员对志贺氏菌检测能

力极为重要。笔者通过国家检测标准中传统的检测方法<sup>[7]</sup>,对中国检验检疫科学研究院测试评价中心提供的测量审核样进行检测,以达到提升检测人员检测素质和能力的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品信息。**样品购自中国检验检疫科学研究院测试评价中心,编号分别为 19-A766 和 19-A835。

**1.1.2 培养基及试剂。**志贺氏菌增菌肉汤、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂、麦康凯琼脂(MAC)、志贺氏菌显色培养基、营养琼脂(NA)、志贺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;VITEK2 革兰氏阴性细菌鉴定卡购自生物梅里埃公司;志贺氏菌全套诊断血清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在有效期内。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 样品处理。**样品性状为白色冻干块状,包装于真空西林瓶内,按样品说明准备待测样品原液。

**1.2.2 增菌。**在生物安全柜内以无菌操作取检样 25 mL 加入装有灭菌的 225 mL 志贺氏菌增菌肉汤的培养瓶中,将培养瓶放置于密封盒(已放入厌氧产气袋和氧气指示剂)内,于(41.5±1.0)℃,厌氧培养 16~20 h。增菌结果如表 1 所示。

**1.2.3 分离。**取增菌后的志贺氏菌液分别划线接种于 XLD 琼脂、MAC 琼脂和志贺氏菌显色培养基上,于(36±1)℃培养 20~24 h,观察各个平板上生长的菌落形态并记录。若出现的菌落不典型或菌落较小不易观察,则继续培养至 48 h 再进行观察。

**基金项目** 海关总署科研项目(2018IK053)。

**作者简介** 赵阳(1992—),女,贵州六盘水人,助理工程师,硕士,从事食品分析检测研究。\*通信作者,研究员,硕士,从事食品分析检测研究。

**收稿日期** 2019-08-27

表1 增菌结果  
Table 1 Enrichment results

编号 No.	培养温度 Culture temperature//℃	培养时间 Culture time h	生长情况 Growth situation
19-A835	41.5±1.0	20	浑浊生长
19-A766	41.5±1.0	20	浑浊生长

**1.2.4 生化试验。**选取“1.2.3”中选择性琼脂平板上符合志贺氏菌菌落特征的平板,从平板上挑取菌落转移至营养琼脂平板,于(36±1)℃培养24 h。同时采用志贺氏菌干制生化鉴定试剂盒和全自动微生物鉴定仪(VITEK 2 COMPACT)进行鉴定。根据志贺氏菌生化试剂盒使用说明书,挑取新鲜培养的单个菌落接种三塘铁与半固体琼脂生化管,同时用接种环挑取同一菌落至适量0.85%无菌生理盐水中,制成0.5麦氏浊度的均一菌悬液;将菌悬液按每孔0.2 mL接种量加入试剂盒的圆孔中,按照说明书相应添加无菌液体石蜡,盖上盖盒,与三塘铁和半固体琼脂生化管一同于(36±1)℃培养,绵子糖

试验若24 h仍为阴性,可延长培养至48 h再观察结果<sup>[8]</sup>。全自动微生物鉴定仪鉴定方法:在麦氏比浊管内加入3 mL 0.45%的无菌生理盐水,挑取营养琼脂纯培养的单菌落制成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。

**1.2.5 血清学鉴定。**将洁净载玻片分为2个区域,标记为血清试验组和对照组,挑取一环纯培养待测单菌落,各放1/2环于玻片上的每一区域的上部,在血清试验组滴加1滴抗血清,对照组滴加1滴生理盐水。再用无菌接种环分别将2个区域内的菌落研磨成乳状液,将玻片倾斜摇动混合1 min,观察结果。

## 2 结果与分析

**2.1 选择性平板分离** 取增菌后志贺氏菌增菌液划线接种选择性平板,19-A766和19-A835在各平板上生长的菌落形态见表2。通过志贺氏菌显色培养基可判断,白色菌落、周围培养基紫红色为志贺氏菌,而黄色菌落可能为沙门氏菌和(或)大肠杆菌,蓝绿色菌落可能为产气肠杆菌和(或)其他菌。

表2 选择性平板上菌落形态  
Table 2 The colony morphology on the selective separation medium

平板 Plate	19-A835	19-A766
MAC 琼脂 MAC agar	菌落形态单一,紫红色菌落,中心染色较深,周围培养基紫红色,圆形、湿润、边缘不整齐	无色至浅粉色,半透明、光滑湿润、圆形、边缘整齐;紫红色菌落,周围有沉淀环
XLD 琼脂 XLD agar	黄色菌落,周围培养基黄色,圆形、湿润菌落	黄色圆形、湿润菌落,周围培养基黄色;粉红色至无色,半透明、光滑、圆形菌落
志贺氏菌显色培养基 <i>Shigella</i> chromogenic medium	黄色湿润菌落,周围培养基黄色	圆形蓝绿色菌落,周围培养基黄色;白色菌落,周围培养基紫红色

**2.2 初步生化试验** 挑取可疑菌落进行初步生化试验,典型志贺氏菌生化特征是斜面产碱、底层产酸、不产气、不产硫化氢、半固体管中无动力菌株,初步生化试验结果(表3)显示,19-A835样品生化试验结果与典型志贺氏菌生化特征不符;19-A766样品从不同选择性平板上均有符合典型志贺氏菌生化特征的菌落。

表3 初步生化试验结果  
Table 3 Preliminary biochemical test results

样品 Sample	编号 No.	三塘铁琼脂 Santang iron agar			产气 Gas production	半固体 琼脂 Semisolid agar
		斜面 Inclined plane	底层 Bottom layer	H <sub>2</sub> S		
19-A835	19-A835-1	A	A	+	-	+
	19-A835-2	A	A	+	+	+
	19-A835-3	A	A	+	-	+
19-A766	19-A766-1	A	A	+	-	+
	19-A766-2	K	A	-	-	-
	19-A766-3	K	A	-	-	-
	19-A766-4	A	A	+	-	+
	19-A766-5	K	A	-	-	-
	19-A766-6	K	A	-	-	-
	19-A766-7	K	A	-	-	-
	19-A766-8	A	A	+	-	+

注:“K”为产碱;“A”为产酸;“+”为阳性;“-”为阴性  
Note:“K” is alkali production;“A” is acid production;“+” is positive;  
“-” is negative

**2.3 生化试验** 从“2.2”中挑取19-A766样品中已培养的菌苔进行生化试验,结果显示(表4),19-A766-2、19-A766-3、19-A766-5、19-A766-6、19-A766-7均符合典型志贺氏菌生化特征。

**2.4 全自动微生物生化系统鉴定** 同时,挑取19-A835和19-A766不同选择性平板上可疑菌落的纯培养物进行全自动微生物生化系统鉴定。其中,19-A835-1鉴定为大肠杆菌,19-A835-2和19-A835-3鉴定为弗罗因德氏枸橼酸杆菌,因此,样品19-A835鉴定结果为未检出志贺氏菌,符合生化反应鉴定结果;19-A766-1、19-A766-4、19-A766-8鉴定为肺炎克雷伯菌,19-A766-2鉴定为低反应生物模型,19-A766-3、19-A766-5、19-A766-6和19-A766-7鉴定为宋内氏志贺氏菌,因此样品19-A766鉴定结果为检出志贺氏菌,与生化鉴定结果相符。

**2.5 血清学鉴定** 根据生化试验结果,将样品19-A766中生化鉴定阳性可疑菌落(19-A766-2、19-A766-3、19-A766-5、19-A766-6、19-A766-7)进一步进行血清学鉴定,抗血清中出现凝结成块的颗粒,而且生理盐水中没有发生自凝现象,血清学鉴定为阳性。通过生化鉴定结果和血清学鉴定结果确定25 mL样品中,编号19-A835样品未检出志贺氏菌,编号19-A766样品检出志贺氏菌。

表 4 19-A766 样品生化鉴定结果

Table 4 The biochemical identification result of sample 19-A766

样品编号 Sample No.	尿素 Urea	赖氨酸 脱羧酶 Lysine decarb- oxylase	鸟氨酸 脱羧酶 Ornithine decarb- oxylase	水杨苷 Salicin	七叶苷 Esculoside	靛基质 Indone	甘露醇 Mannitol	绵子糖 Raffinose	甘油 Glycerin	葡萄糖胺 Glucos- amine	西蒙氏柠 檬酸盐 Simmons Citrate Agar	粘液酸 Mucic acid	OPNG
19-A766-2	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
19-A766-3	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
19-A766-5	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
19-A766-6	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
19-A766-7	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+

注：“+”为阳性；“-”为阴性

Note:“+” is positive;“-” is negative

### 3 结论与讨论

志贺氏菌的传统分离培养方法在疾病诊断过程中不可或缺,微生物的生存性可在分离培养过程和生化试验过程中得以体现<sup>[4]</sup>。采用常规生化鉴定方法进行志贺氏菌检验,可直接对结果进行直观性观察<sup>[7]</sup>,结合全自动微生物鉴定仪可降低可疑菌落的假阳性,提高检测结果准确性。同时,使用志贺氏菌新生霉素增菌肉汤可排除革兰氏阳性菌和部分革兰氏阴性菌的生长,提高目标菌的竞争优势<sup>[9]</sup>。此次测量审核样中检测出大肠杆菌、弗罗因德氏枸橼酸杆菌、肺炎克雷伯菌作为干扰菌株,这3种菌株均为革兰氏阴性杆菌。经生化试验、血清学试验和全自动微生物鉴定仪鉴定结果显示,样品 19A-835 为志贺氏菌阴性,样品 19A-766 为志贺氏菌阳性,测量审核结果评价为满意。

使用全自动微生物鉴定仪进行检测时,编号 19-A766-2 可疑菌落鉴定结果为低反应生物模型,可能是菌落单一、菌液浓度未达到所需麦氏比浊度,菌落生长不在对数生长期,光学读数头出现问题导致的<sup>[10]</sup>。可进一步重新进行试验,排查问题出现的原因,定期对仪器进行清洁维护,提高全

自动微生物鉴定结果的准确性。

通过此次测量审核结果,检测人员可积累判断假阳性菌落和生化试验结果的经验,增加实验室检测人员的检测能力,为进一步检测工作打下坚实基础。

### 参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证规则: CNAS-RL02:2018 [Z]. 2018.
- [2] 区伟珍. 浅谈实验室质量控制的方法 [J]. 广东化工, 2015, 42(7): 116-83.
- [3] 张继瑜, 刘红, 张笑兵, 等. 志贺氏菌福氏 2a 毒力大质粒 DNA 全序列的测定与基因分析 [J]. 中国科学 (C 辑: 生命科学), 2003, 33(1): 40-46.
- [4] 崔庆刚, 杨志远, 杜永新, 等. 志贺氏菌的生化特性及检测方法的研究进展 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2017(1): 23-25.
- [5] 李志明. 志贺氏菌传统检验方法研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(3): 571-575.
- [6] 赵怀龙, 付留杰, 唐功臣. 我国主要的食源性致病菌 [J]. 医学动物防制, 2012, 28(11): 1212-1216.
- [7] 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.
- [8] 游元丁, 赵阳, 徐孟怀, 等. 奶粉中沙门氏菌检测能力验证分析 [J]. 安徽农业科学, 2019, 47(5): 193-195.
- [9] 陈雨欣, 石建良, 苏粉良, 等. 能力验证样品中志贺氏菌的分离与鉴定 [J]. 农产品加工, 2015(9): 62-63.
- [10] 刘杰, 赵满仓, 周海峰. VITEK II 全自动微生物分析系统应用问题分析 [J]. 中国医疗设备, 2013, 28(9): 119-121.