

TEMPO/STA 法在水产品金黄色葡萄球菌 计数检测中的应用

崔妍* 田卓 沈葆真 崔晗 陈溪 曹文军 黄大亮

(庄河出入境检验检疫局 辽宁 庄河 116400)

摘要: 金黄色葡萄球菌能够引起细菌性食物中毒, 其对水产品的污染将严重影响到食品安全和水产品加工出口贸易。本研究使用 TEMPO/STA 法和 Petrifilm™ 测试片法对 535 个出口水产品样品进行检测, 并将检测结果进行比较。结果表明, TEMPO/STA 法与 Petrifilm™ 测试片法一致性较好(符合率 96.6%, 准确度无差异), 并具有操作简单、快速、准确和人为误差小的特点。

关键词: TEMPO/STA 法, MPN 法, 金黄色葡萄球菌

Application of TEMPO/STA Method for Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Aquatic Products

CUI Yan* TIAN Zhuo SHEN Bao-Zhen CUI Han CHEN Xi CAO Wen-Jun
HUANG Da-Liang

(Zhuanghe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuanghe, Liaoning 116400, China)

Abstract: *Staphylococcus aureus* can cause alimentary toxicosis, contamination of which could exert a great influence on food safety and export processing of aquatic products. In this study, TEMPO/STA method was used for enumeration of *Staphylococcus aureus* in 535 aquatic samples, and compared with Petrifilm™ Staph Express Count Plate method. TEMPO/STA method was demonstrated to be a rapid and accurate method, with a good agreement (96.6% compliance rate, no difference in accuracy) with the other one.

Keywords: TEMPO/STA method, MPN method, *Staphylococcus aureus*

金黄色葡萄球菌在自然界中无处不在, 空气、水、灰尘及人和动物的排泄物中都可发现, 并可引起多种疾病。金黄色葡萄球菌对水产品的污染情况已严重影响到食品安全卫生, 目前世界各国已将其列入食品卫生法定检测项目。我国对食品中金黄色葡萄球菌计数检测主要采用 3 种方法: (1) Baird-Parker 平板计数法 (2) MPN 计数法 (3) Petrifilm™

测试片法。3 种方法中以 Petrifilm™ 测试片法最为快速简便。TEMPO/STA 法是使用 TEMPO®全自动微生物定量检测仪对食品进行金黄色葡萄球菌计数的一种快速检测方法。

本研究同时使用 TEMPO/STA 法和 Petrifilm™ 测试片法对水产品中金黄色葡萄球菌进行快速检测和计数, 并将检测结果进行比较, 以确定 TEMPO/

* 通讯作者: Tel: 86-411-89715978; ✉: yanyan19661@163.com
收稿日期: 2010-01-20; 接受日期: 2010-04-06

STA 法的有效性。

1 材料与方法

1.1 培养基和试剂

Petrifilm™ 金黄色葡萄球菌快速测试片, 3M® Microbiology; Petrifilm™ 金黄色葡萄球菌确认反应片, 3M® Microbiology Products; TEMPO®金黄色葡萄球菌计数卡, biomerieux® SA; TEMPO®金黄色葡萄球菌培养基瓶, biomerieux® SA; TEMPO®无菌过滤袋, biomerieux® SA; 磷酸二氢钾, 沈阳新兴试剂厂, Tryptic soy agar (TSA 琼脂), 美国 BD。

1.2 菌株

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 49444 和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 购于上海汉尼, 能力验证样品(PTC-T013-1D1)由能力验证计划实施者提供。

1.3 设备

高压蒸汽灭菌锅, 日本 SANYO; 恒温培养箱 (36°C ± 1°C), 上海一恒; 微量移液器(0.01–1 mL), 3M® Microbiology Products; 拍击式均质器, 法国 Interscience; 涡旋混合器, 金坛富华仪器; 定量分液器(1–5 mL), biomerieux® SA; 天平(精确度 0.01 g), 梅特勒中国; TEMPO®充填器、TEMPO®读数器, biomerieux® SA。

1.4 TEMPO/STA 法原理概述^[1–2]

TEMPO/STA 测试包括专门用于检测金黄色葡萄球菌的培养基和卡片。培养基接种待测样本, 再通过 TEMPO®充填器传输到有 3 种不同容量的 48 孔的卡片中。TEMPO®充填器同时也会将卡片封口以避免任何在随后的处理过程中可能会造成污染的风险。培养基含 pH 荧光指示剂, 当 pH 值中性时可产生被 TEMPO®读数器检测到的荧光信号。培养期间, 卡片中有金黄色葡萄球菌存在就会分解培养基, pH 值下降, 荧光信号减弱。按照 MPN^[3]方法的原理, TEMPO®系统根据阳性孔的数目和大小来推算出原始样本中金黄色葡萄球菌数。

1.5 样品制备

1.5.1 阳性样品菌悬液制备: 将标准菌株金黄色葡萄球菌 ATCC 49444 和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 分别用 TSA 琼脂复活后, 无菌操作制成 10 倍递增稀释的菌悬液。将能力验证样品(PTC-T013-1D1)按照说明无菌操作制成 10 倍递增稀释的菌悬液。

1.5.2 自然样品制备: 选取 18 个种类 535 个水产品样品, 按照 GB/T 4789.37-2008^[4]所述方法, 将自然样品无菌操作制成 3 个 10 倍递增稀释的样品匀液。

1.6 样品检测

1.6.1 Petrifilm™ 测试片法: 按照 GB/T 4789.37-2008^[4]所述方法, 将阳性样品菌悬液和自然样品匀液的每个稀释度接种两张测试片。接种后, 将测试片置于恒温培养箱内, 36°C ± 1°C 培养 24 ± 2 h。

1.6.2 TEMPO/STA 法: 将自然样品匀液制备成 1/40 的 TEMPO/STA 测试卡, 检测范围为 10–4.9 × 10⁴ CFU/g。将阳性样品菌悬液制备成复合测试卡(2 张测试卡), 检测范围为 5.4–6.9 × 10⁵ CFU/g。将制备好的测试卡置于恒温培养箱内, 36°C ± 1°C 培养 24 h。

2 结果与分析

2.1 阳性样品的添加实验

将 1.5.1 制备的阳性样品菌悬液用 TEMPO/STA 法和 Petrifilm™ 测试片法同时进行检测, 将检测结果进行差异性比较, 结果见表 1。

表 1 两种方法对阳性样品添加实验的检测结果 Table 1 Results of adding positive control samples of two methods			
标准菌株 Standard Strain	lg STA ^a	lg GB ^b	结果评价 ^c Results
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> (ATCC 49444)	6.6532	6.8062	$P > 0.05$
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	6.7782	6.9345	$P > 0.05$
能力验证样品 (PTC-T013-1D1)	5.8865	5.9420	$P > 0.05$

注: a: lg STA 指 TEMPO/STA 法读数的对数值; b: lg GB 指 Petrifilm™ 测试片法读数的对数值; c: *t*-检验^[5]。

Note: a: lg STA, the log value of TEMPO/STA method's numerical reading; b: lg GB, the log value of Petrifilm™ plate method's numerical reading; c: *t*-test^[5].

如表 1 所示, 两种方法对添加标准菌株的阳性样品的检测结果无明显差异。对能力验证样品的检测经上报确认后, 结果也较为满意。在检测准确度相同的情况下, TEMPO/STA 法检测成本较低, 仅用 2 张测试卡, 而 Petrifilm™ 测试片法需要用 12 张测试片。

2.2 自然样品的检测实验

将 1.5.2 制备的自然样品匀液用 TEMPO/STA 法和 Petrifilm™ 测试片法同时进行检测, 将检测结果进行符合率比较, 结果见表 2。

表 2 两种方法检测自然样品的符合率 Table 2 Agreement rates of two methods on detecting natural samples					
样品种类 Sample types	样品数 Number	符合 ^a Agreement ^a	其他 ^b Others ^b	不符合 ^c Disagreement ^c	符合率 Agreement rate (%)
冻鳕鱼片 Frozen pollock fillet	249	54	187	8	96.8
冻红鱼片 Frozen red snapper fillet	62	12	48	2	96.8
冻鲈鱼片 Frozen sole fillet	104	35	65	4	96.2
冻石斑鱼片 Frozen grouper fillet	3	0	3	0	100
冻真鲷鱼片 Frozen cod fillet	31	15	14	2	93.6
冻粉色鲑鱼段 Frozen salmon pink fillet	5	0	5	0	100
冻马哈鱼片 Frozen salmon fillets	29	3	25	1	96.6
冻鲈鱼籽 Frozen sole seeds	3	0	3	0	100
盐渍真鳕鱼片 Frozen salting cod fillet	6	1	5	0	100
盐渍鳕鱼片 Frozen salting pollock fillet	12	1	10	1	91.7
冻煮杂色蛤 Frozen cooked clam variegated	8	1	7	0	100
冻鲈鱼卷 Frozen flounder fish roll	4	0	4	0	100
冻煮虾夷贝肉 Frozen cooked shrimp	4	0	4	0	100
单冻扇贝柱 Frozen cooked scallop	3	0	3	0	100
冻煮虾蛄肉 Frozen cooked squillid meat	3	0	3	0	100
冻平鲉片 Frozen-ping velvetfish film	3	0	3	0	100
冻柳叶鱼 Lancet frozen fish	4	1	3	0	100
冻小虾 Frozen shrimp	2	0	2	0	100
共计 Total	535	123	394	18	96.6

注: a: TEMPO/STA 法和 PetrifilmTM 法的检出值一致; b: 两种方法的检测结果均为 < 10 CFU/g; c: TEMPO/STA 法和 PetrifilmTM 法的检测值有差异。
Note: a: Numbers of same detection values with two methods; b: Both detection values less than 10 CFU/g; c: Numbers of different detection values with two methods.

如表 2 所示, TEMPO/STA 法与 PetrifilmTM 测试片法对自然样品的检测在检测结果上总符合率较高(96.6%)。525 个自然样品中仅有 18 个样品的检测结果不符合, 分析原因为: pH 较低、动物内脏或样品色泽较深影响读数器的荧光判断。

在检测量较大的情况下, TEMPO/STA 法使用 TEMPO[®] 充填器进行样品的递增稀释, 节省大量的人力物力, 同时避免了样品的二次污染, 检测结果由 TEMPO[®] 读数器判读, 减少检测结果的人为误差。

2.3 不同检测方法的检测周期比较

将食品中金黄色葡萄球菌计数检测的 3 种方法的检测周期同 TEMPO/STA 法的检测周期进行比较, 见表 3。

如表 3 所示, 在检测准确度相同的前提下, TEMPO/STA 法检测周期小于其他检测方法。

表 3 不同检测方法的检测周期 Table 3 Testing cycles of different methods	
检测方法 Testing method	检测周期 Testing cycles (h)
TEMPO/STA 法 TEMPO/STA method	24
平板计数法 Standard plate count method	96
MPN 计数法 MPN count method	96
Petrifilm TM 法 Petrifilm TM method	27

3 结论

TEMPO/STA 法作为一种全新的全自动微生物定量检测法, 完全满足国标的要求。与传统检测方法相比, 具有检测准确度高、操作简便、检测周期短、人为影响因素少和相对成本低的特点, 并且每张 TEMPO/STA 测试卡都有独立的条码, 保证检测

结果的唯一性和可追溯性。

参 考 文 献

- [1] Ronald Johnson. Biomérieux kit granted PTM status. *AOAC Research Institute News*, 2007(5): 16-18.
- [2] AFAQ AFNORA Certification. BIO: 12/13-02/05 TEMPO® EC Method validated for the enumeration of *Escherichia coli* in food products. France, 2005.
- [3] 陆苏颺. MPN 法的原理与局限性分析. *中国食品工业*, 2004(7): 23-24.
- [4] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.37-2008 食品卫生微生物学检验金黄色葡萄球菌计数. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [5] 陆建身, 赖麟. 生物统计学. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2006.

2010 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	第三届生物资源与环境调控学术研讨会	中国微生物学会农业微生物专业委员会	5-6 月	120	安徽合肥	李峰 010-82109561
2	曲霉和曲霉病研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	5 月 15-16 日	150	天津	刘伟 010-83573056
3	第八届中日病毒学会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	7 月 4-7 日	100	黑龙江哈尔滨	张凤民 0451-86669576 钟照华 0451-86685122
4	第八届全国微生物学青年学者学术研讨会	中国微生物学会基础微生物专业委员会	7 月 21-24 日	150	云南昆明	李文均 0871-5033335
5	第三届全国农业微生物研究及产业化研讨会	中国微生物学会农业专业委员会	8 月	120	新疆阿拉尔	张利莉 agmicrob@mail.hzau.edu.cn
6	第二届微生物资源学术研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	8 月	150	黑龙江大庆	阮志勇 13301101231
7	第十一届全国土壤微生物学术讨论会暨第四届全国微生物肥料生产技术研讨会	中国微生物学会农业微生物专业委员会	9-10 月	150	湖南长沙	李俊 010-68975891
8	合成生物学学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	9-10 月	80	上海	朱春宝 021-62896804
9	2010 年全国微生物毒素与创伤感染学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	9 月 17-20 日	250	重庆	梁华平 023-68757404
10	第 11 届中日韩国际酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	10 月	150	四川成都	金城 64807425
11	病原进化与致病机制国际研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	10 月 22-25 日	150	江苏镇江	倪斌
12	第十三次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	10 月	500	江苏南京	蒋建东 025-84395326
13	2010 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	10 月	500	安徽	王旭 010-64807200
14	首届全国芽胞杆菌研究及产业化研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	10 月	140	湖北武汉	翁锦周 bacillus@mail.hzau.edu.cn
15	第三届全国微生物基因组学学术研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	11 月	150	福建厦门	邵宗泽 micgeno@mail.hzau.edu.cn
16	第一届中国临床微生物学大会	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	11 月	500	贵州遵义	李宣霖 13976609892