

铜绿假单胞菌能力验证样品的研制及应用研究

余文, 安琳, 陈怡文, 任秀, 骆海朋, 刘娜, 崔生辉* (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 研制符合能力验证要求的铜绿假单胞菌质控样品, 并将该质控样品用于铜绿假单胞菌的能力验证。方法: 通过对冻干工艺和冻干保护剂的研究, 研制出均一性、储藏稳定性和运输稳定性均符合要求的能力验证样品。本次能力验证样品为2瓶以粉底膏为基质的铜绿假单胞菌样品, 通过产生随机数字的方式对样品进行编码, 然后随机分配给参试实验室。结果: 铜绿假单胞菌的质控样品的均一性、储藏和运输稳定性均符合能力验证中质控样品的要求; 全国65家实验室中62家结果评定为满意, 满意率为95.38%。3家不满意的实验室中2家为省级检验机构, 1家为地市级检验机构。省级检验机构的满意率为94.28%, 地市级检验机构的满意率为95.65%。结论: 研制的铜绿假单胞菌质控考核样品可以满足能力验证的需求, 本次能力验证真实地反映了参试单位的检测水平。

关键词: 化妆品; 能力验证; 铜绿假单胞菌

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)07-0806-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.07.012

Research on Preparation and Application of *Pseudomonas Aeruginosa* Capability Verification Samples

Yu Wen, An Lin, Chen Yiwen, Ren Xiu, Luo Haipeng, Liu Na, Cui Shenghui* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To develop the quality control samples of *Pseudomonas aeruginosa* that conform to proficiency tests and to apply the quality control samples to the proficiency test of *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods:** By studying the lyophilization process and the lyophilization protectant, the samples which meet the requirements of homogeneity, storage and transportation stability have been developed. The proficiency test samples consisted of 2 bottles of *Pseudomonas aeruginosa* based on foundation paste, which were randomly assigned to the participating laboratories. **Results:** The homogeneity, storage and transportation stability of the quality control samples of *Pseudomonas aeruginosa* met the requirements of proficiency tests. 62 out of the 65 laboratories rated the result as satisfaction. The satisfactory rate is 95.38%. 2 of 3 unsatisfactory laboratories are provincial-level, and one is municipal-level. The satisfactory rate of provincial-level and municipal-level laboratories was 94.28% and 95.65% respectively. **Conclusion:** The quality control test samples of *Pseudomonas aeruginosa* can meet the requirements of proficiency tests. This proficiency test truly reflects the testing level of the participating laboratories.

Keywords: cosmetics; proficiency tests; *Pseudomonas aeruginosa*

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 是一种常见的条件致病菌, 属不发酵糖革兰阴性杆菌, 普遍存在于自然界及人体的皮肤、呼吸道和胃肠道等部位^[1]。铜绿假单胞菌可以产生多种外毒素、内毒素等致病因子, 是导致皮肤炎症的完全致病菌^[2], 常引起人体皮肤化脓感染, 特别是皮肤有外伤及眼部疾病患者感染绿脓杆菌后, 常使病情恶化, 严重者可引发败血症^[3]。

在化妆品微生物检测中, 铜绿假单胞菌检测是非常重要的卫生指标之一。《化妆品安全技术规范》(2015年版)^[4]规定在化妆品中不得检出铜绿假单胞菌。关于铜绿假单胞菌的检验方法可以参考《化妆品安全技术规范》, 但是, 目前缺乏考核全国各个微生物实验室化妆品中铜绿假单胞菌检测能力的质控样品, 因此急需研制出一套符合要求的铜绿假单胞菌能力验证样品。为了解全国各微生物实验室对化妆品中铜绿假单胞菌的检测能力, 依据CNAS-CL032010《能力验证提供者认可准则》、CNAS-CL57《能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明》^[5-6]的要求组织了本次能力验证。

能力验证 (Proficiency Testing) 是利用实验室间的比对确定实验室的校准 / 检测能力或检查机构的检测能力^[7]。具体实施方式为能力验证计划的实施机构向参加实验室发送样品, 要求实验室在规定的时间内进行实际检测并报出测试结果, 再将所有参加实验室的结果进行统计分析, 依据每个实验室与其他实验室结果的一致性来判定实验室对于指定项目的检测能力^[8]。能力验证本质上是一种自我评价手段, 通过参加能力验证考核, 可使每个参与实验室的工作质量获得整体提高^[9]。

比对样品的一致性对能力验证至关重要, 能力验证样品必须进行均匀性检验和 (或) 稳定性检验。对于性质较不稳定的检测样品如生物制品, 以及在校准能力验证计划中传递周期较长的测量物品, 稳定性检验是必不可少的^[10]。本研究对铜绿假单胞菌能力验证样品的制备、储藏条件及运输条件进行摸索研究, 以期制备出一套均匀性和稳定性均满足铜绿假单胞菌检测能力验证需求的质控样品, 用于铜绿假单胞菌能力验证考核。31个省 (市)、自治区共65家实验室参加了本次能力验证活动, 通过统计分析回收结果, 对参加能力验证的实验室进

行评价, 以帮助实验室发现在铜绿假单胞菌检测过程中可能存在的问题。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

PL2002电子天平 (梅特勒-托利多公司), 高压灭菌器 (日本三洋公司), 生物安全柜 (美国THERMO公司), 生化培养箱 (美国THERMO公司), 冷冻干燥机 (HETO POWER DRY LL1500), MH培养基 (美国BD公司), SCDLP (Soya Casein Digest Lecithin Polysorbate) 液体培养基 (北京陆桥生物技术有限责任公司)。

菌株: 铜绿假单胞菌 (CMCC10104), 弗氏柠檬酸杆菌 (ATCC43864), 大肠杆菌 (ATCC25922), 表皮葡萄球菌 (CMCC26069)。

1.2 试验方法

1.2.1 铜绿假单胞菌能力验证样品的制备

将新鲜培养的二代铜绿假单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌、大肠杆菌、表皮葡萄球菌在5%蔗糖-5%脱脂乳粉保护剂中调成浓菌悬液, 使用10 μ m的无菌滤膜进行过滤。使用5%蔗糖-5%脱脂乳粉保护液梯度稀释, 使得最终在5%蔗糖-5%脱脂乳粉冻干保护剂中铜绿假单胞菌含量为 10^3 CFU、背景菌的含量为每种 10^3 CFU。将上述混合的冻干菌悬液以20 μ L/球的量滴入小瓶中, 然后置于冷冻干燥机中进行冻干, 冻干时间约16 h, 铜绿假单胞菌冻干后浓度约为 10^3 CFU/样品。

阴性样品包含: 大肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、表皮葡萄球菌。阳性样品: 在阴性背景菌的基础上添加铜绿假单胞菌。

1.2.2 铜绿假单胞菌能力验证样品测试方法

根据《化妆品安全技术规范》(2015年版)^[4]中铜绿假单胞菌的检测方法对能力验证样品进行检测。

1.2.3 样品均匀性检验

随机抽取23组能力验证样品 (包括23个阳性样品和23个阴性样品), 根据《化妆品安全技术规范》(2015年版)^[4]中铜绿假单胞菌的检测方法对样品进行检验, 其中20组样品进行定性检测, 另3组样品用稀释培养计数 (MPN) 方法^[11]进行定量检验。

1.2.4 铜绿假单胞菌能力验证样品运输稳定性检验

运输条件模拟试验的温度监测: 模拟运输条件, 向泡沫箱加入7.5 kg干冰和3个大冰袋 (约

1.5 kg), 用胶带将泡沫箱密封好。分别放置于25℃、37℃条件, 应用DataTrace系统, 实时监测泡沫箱内温度变化。

能力验证样品运输稳定性检验: 将样品放入泡沫箱, 然后加入7.5 kg干冰和3个大冰袋, 用胶带将泡沫箱密封好, 分别放置于25℃、37℃条件, 分别于1、3、5、7天取出3个样品, 进行稀释培养计数(MPN)检验, 对能力验证样品的运输稳定性进行测定。

1.2.5 样品的储藏稳定性检验

能力验证样品于-20℃条件下冷冻保存, 于0天、发样前、发样后分别取出3个阳性样品和3个阴性样品进行MPN计数, 对样品的稳定性进行检验。

能力验证样品于4℃条件下冷藏保存, 于0、7、14天, 分别取出3个阳性样品和3个阴性样品进行MPN计数, 对样品的稳定性进行评价。

1.3 能力验证样品考核方案

1.3.1 考核样品的发放

本次能力验证样品是以2瓶粉底膏为基质的阳性和(或)阴性样品, 通过产生随机数字的方式对样品进行编码, 然后随机分配给参试实验室。因此, 实验室收到的2件样品可能有3种组合情况: 1件阴性和1件阳性; 2件阴性; 2件阳性样品。通过此方法, 使实验室分配样品的方式没有规律, 可以有效地防止实验室间数据串通。对全国65家实验室进行样品发放, 将样品放入保温泡沫盒中, 并加入7.5 kg干冰和3个大冰袋(约1.5 kg), 用胶带将泡沫箱密封好, 快递运输。

1.3.2 参加者的范围

31个省(市)、自治区共65家实验室参加本次能力验证, 地域和行业分布见表1。其中食品药品检验系统58家、企业6家, 其它系统1家。其中省级检验机构35家、地市级检验机构23家、其它类别检验机构实验室7家。

1.3.3 被考核实验室测定方法

样品的前处理: 在生物安全柜内开启西林瓶, 以无菌操作向每个西林瓶样品中加入6 mL SCDLP液体培养基, 待样品完全溶解并混匀后, 转移到灭菌的试管中, 再用SCDLP液体培养基润洗西林瓶4次, 每次1 mL, 最终试管中SCDLP液体培养基的体积为10 mL。

检测方法: 上述稀释液作为增菌液, 于

(36±1)℃静置培养(24±2)h。依据《化妆品安全技术规范》(2015年版)^[4], 进行铜绿假单胞菌的后续检测。

表1 参加能力验证计划实验室地域和行业分布

省(市)自治区	食药	企业	其它	总数
安徽	2	/	/	2
北京	2	/	/	2
福建	2	/	/	2
甘肃	5	/	/	5
广东	4	3	1	8
广西	2	/	/	2
贵州	1	/	/	1
海南	1	/	/	1
河北	1	/	/	1
河南	1	/	/	1
黑龙江	1	/	/	1
湖北	1	1		2
湖南	1	/	/	1
吉林	3	/	/	3
江苏	4	2	/	/
江西	3	/	/	3
辽宁	1	/	/	1
内蒙古	2	/	/	2
宁夏	1	/	/	1
青海	1	/	/	1
山东	5	/	/	5
山西	1	/	/	1
陕西	1	/	/	1
上海	1	/	/	1
四川	4	/	/	4
天津	1	/	/	1
西藏	1	/	/	1
新疆	1	/	/	1
云南	3	/	/	3
浙江	1	/	/	1
重庆	1	/	/	1
总数	58	6	1	65

2 结果

2.1 样品均匀性的检测结果

20组定性检测结果：20个阳性样品均检出铜绿假单胞菌，20个阴性样品均未检出铜绿假单胞菌。

3组定量检测结果见表2。以上23组样品均匀性的检测结果能够满足此次能力验证的要求。

2.2 运输条件模拟试验的温度监测结果

运输条件模拟试验的温度监测结果见图1、图2。

表 2 阳性样品和阴性样品的均匀性（MPN）检测结果

序号	阳性样品 (MPN/ 样品)	阴性样品 (MPN/ 样品)
1	2400	未检出
2	2400	未检出
3	2100	未检出

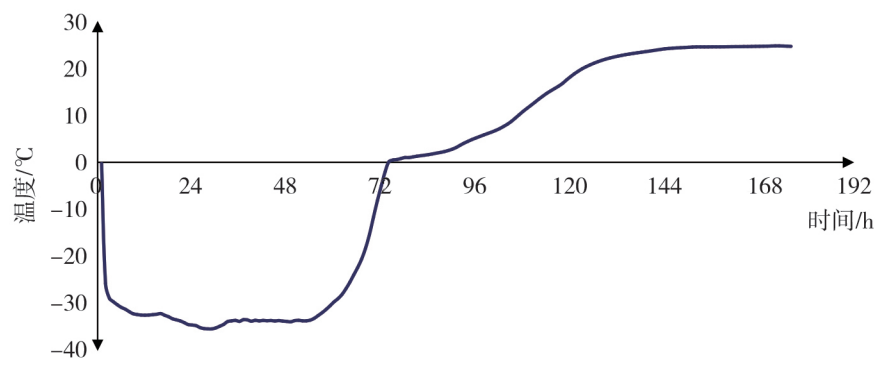


图 1 25 放置 7 天用 DataTrace 监测的温度变化趋势图

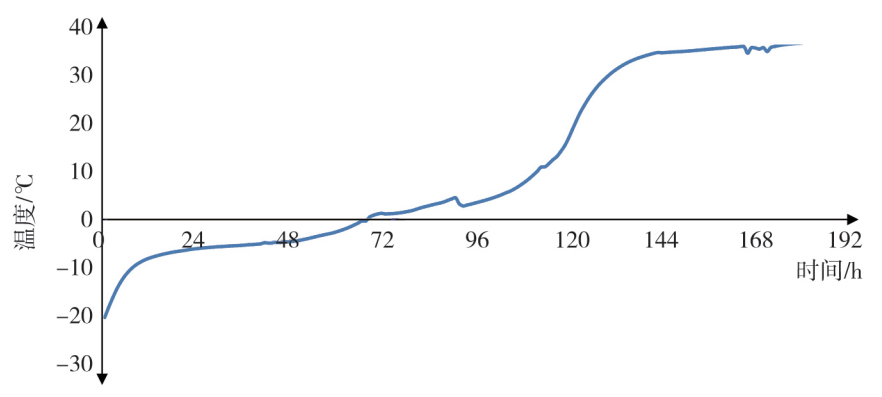


图 2 37 放置 7 天用 DataTrace 监测的温度变化趋势图

在 25℃、37℃条件下放置 7 天内，泡沫箱内的温度变化趋势如图 1、2 所示，在 4 天内，箱体内的温度可以保持在 4℃左右，5 天内可以保持在 20℃以下。根据过去的运输经验，样品运送到广州需要 3 天，实验室反馈，干冰还没有完全挥发掉。

监测数据表明在 5 天内泡沫箱内能维持较低的温度，可以满足本次能力验证的要求。

2.3 能力验证样品稳定性验证结果

2.3.1 运输稳定性验证

能力验证样品运输稳定性验证结果见图3。

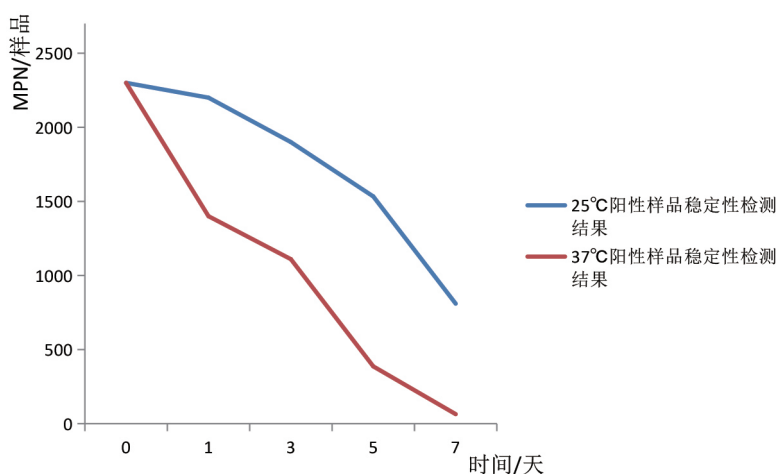


图3 阳性样品运输稳定性结果

在25℃及37℃模拟运输条件下,7天内所有阳性样品均能够检出铜绿假单胞菌,而阴性样品均未检出。目前,样品寄送时间大约2~3天,向偏远地区寄送样品,时间会长一些,预计5天内基本上都可以到达。结合能力验证样品的运输稳定性试验结果,能力验证样品均可满足要求。

2.3.2 能力验证样品存储稳定性验证结果

1) -20℃条件下能力验证样品的储藏稳定性:阳性样品检测结果见表3,阴性样品均未检出铜绿假单胞菌。表3结果显示,能力验证样品在发样前后浓度均为 10^3 CFU/样品,该样品在-20℃条件下稳定。

表3 -20℃ 阳性样品储存稳定性检测结果

时间	阳性样品 (MPN/ 样品)
0 天	2000
发样前	2200
发样后	2000

2) 4℃条件下能力验证样品的储藏稳定性:阳性样品检测结果见表4,阴性样品均未检出铜绿假单胞菌。表4结果显示,能力验证样品在14天内浓度均为 10^3 CFU/样品,该样品在4℃条件下稳定。

表4 4℃ 阳性样品储存稳定性检测结果

时间	阳性样品 (MPN/ 样品)
0 天	2000
7 天	2400
14 天	2000

2.4 实验室考核结果

在上报结果的65家实验室中,62家实验室结果评定为满意,满意率为95.38%,3家实验室评定为不满意,3家不满意的实验室中2家为省级检验机构,1家为地市级检验机构。省级检验机构的满意率为94.28%,地市级检验机构的满意率为95.65%。

3 讨论

样品制备的难度通常表现在样品的均匀性和稳定性方面^[12],即如何保证分发给各个参加者的检测样品是相同的,保证样品测量值的不确定度不会影响对实验室返回结果的客观评价,这方面以微生物样品的制作难度最为突出^[13]。由上述结果可见,本研究制备的铜绿假单胞菌能力验证样品均匀性和稳定性均可满足本次能力验证的要求;本实验室选择的运输条件可保证样品在非极端的高温天气运输过程中的稳定性;样品的储藏温度建议保持在-20℃。

通过对铜绿假单胞菌能力验证样品均匀性、运输稳定性的验证试验结果表明,在满足上述条件的前提下,能保证铜绿假单胞菌能力验证样品的稳定性,可用于能力验证考核。

全国65家实验室中,62家结果均评定为满意,满意率为95.38%,说明全国检验机构检测化妆品中铜绿假单胞菌的能力较强,满意率高。3家不满意的实验室中2家为省级检验机构,1家为地市级检验机构。省级检验机构的满意率为94.28%,地市级检验机构的满意率为95.65%。地方药检系统检验机构的检验能力仍有提升的空间。2家实验

室错误的原因是1件样品出现假阳性,通过原始记录分析,可能是在鉴定过程中存在问题或者是样品间存在交叉污染。另外1家实验室错误的原因是阴性样品检测结果为阳性,阳性样品检测结果为阴性,可能是在检测过程中样品编号发生了混淆。能力验证对实验室质量控制至关重要,通过能力验证考核,能分析出各实验室检测中遇到的具体问题。

参考文献:

- [1] 缪柯淳,苏青青,张新月,等.铜绿假单胞菌血流感染251例临床分析[J].中国感染与化疗杂志,2018,18(6):14-19.
- [2] 李莉,朱晓露,马会会.桶装饮用水中铜绿假单胞菌的检测分析[J].中国卫生检疫杂志,2016,26(3):409-410.
- [3] 陈冠武,苏建晖,陈冬娥,等.化妆品中铜绿假单胞菌检验方法探讨[J].检验检疫学刊,2011(2):16-18.
- [4] 国家食品药品监督管理总局.化妆品安全技术规范[S].2015.
- [5] 中国合格评定国家认可委员会.CNAS-CL03:2010能力验证提供者认可准则[S].2010.
- [6] 中国合格评定国家认可委员会.CNAS-CL57:2015能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明[S].2015.
- [7] 骆海朋,唐颂,陈怡文,等.沙门氏菌能力验证样品的研制及其应用[J].食品安全质量检测学报,2016,7(4):1473-1478.
- [8] 唐凌天,符斌.实验室能力验证的发展[J].中国无机分析化学,2013,3(4):11-15.
- [9] Hoeltge G A, Duckworth J K. Review of Proficiency Testing Performance of Laboratories Accredited by the College of American Pathologists[J]. Archives of Pathology&Laboratory Medicine, 1987, 111(11):1011-1014.
- [10] 中国合格评定国家认可委员会.CNAS-CL03:2006能力验证计划提供者认可准则[S].2006.
- [11] GB 4789.3-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数[S].2016.
- [12] 宋国强,施敏芳,李可芳,等.用有证标准样品进行能力验证的方法探讨[J].环境科学与技术,2004,27(6):42-43.
- [13] 卢行安,郑江,曹志军,等.微生物能力验证样品均匀性试验的研究[J].中国微生态学杂志,2003,15(1):33-34.

(收稿日期 2019年9月3日 编辑 邹宇玲)