



引入微生物简易检测法的优点

本文是龟甲万百欧凯米发株式会社主办的第1回“微生物检测菌落研讨会”中，一般財団法人日本食品検査の澤田千尋先生进行演讲的内容总结。

该机构在接受微生物委托检测等的服务时，不仅会使用官方检测法和标准检测法，还会根据检测目的选用简单快速的替代法。本次演讲介绍了在微生物检测中引入简易快速检测法的优点、引入此检测法前需要考虑的问题，以及该机构在引入微生物检测用测试片培养基“Easy Plate”前所进行的验证工作的概况等。

Presenter

一般財団法人日本食品検査
业务总部 业务开发部门
高级技术专员
澤田 千尋先生



Introduction

一般財団法人日本食品検査(JFIC)是根据客户的需求,提供细菌检测、理化学检测、调查和指导等各种类型的服务的专业检测公司。其中的微生物检测和卫生检测包括了以下3项服务。

①进口食品检测

在基于日本《食品卫生法》进行的进口食品检测中,检测对象是根据食品的不同各自规定的卫生指示菌和致病菌。由于该项检测为法律规定的检测,所以必须使用官方检测法。

②委托检测

食品经营者出于自主卫生管理或质量管理等目的,会进行委托检测。检测项目和检测方法多种多样,基本上会根据委托方的要求进行指定的检测。

③门店商品的抽查检测,店铺卫生调查等

检测从门店购买的商品,以及到访超市或饮食店等进行涂抹采样检测。该项服务也会按照委托方指定的方法进行检测。

Contents

- 微生物检测意识的变化 02
- 微生物检测在HACCP中的作用 02
- 引入简易快速检测法的优点 03
- Easy Plate的原理和特点 04
- 引入Easy Plate前进行验证的事例 06

1. 微生物检测意识的变化

关于委托方指定的检测法，以前是官方检测法和标准检测法占绝大多数，但最近关于检测方法的要求发生了一些变化。

(1) 以前的主流： 官方检测法和标准检测法

出于“想要进行和政府卫生管理机构等一样的取样检测”和“总想选择一些官方承认的检测方法”的心理，食品行业的经营者在委托检测时，大部分会指定官方检测法和标准检测法。

接下来将简单说明一下官方检测法和标准检测法的定位。

①何谓官方检测法

官方检测法是指基于日本《食品卫生法》中《食品、添加物等の规格基準》(食品、添加剂等的规格标准)的检测法，以及基于奶等条例中有关饮用乳和乳制品的检测法。

但是，由于官方检测法指定的对象食品有限，因此大部分的食品都不存在官方检测法。另外，官方检测法大部分都为需要花费大量时间进行的检测法，如推定试验、证实试验和血清试验等。

②何谓标准检测法

标准检测法多指收录于《食品卫生检查指针 微生物編》的检测法。但是自该指南发布2015年版以来，官方检测法、ISO法、FDA(美国食品药品监督管理局)的BAM法和AOAC法等国际标准法成为了主流，指南中独有的检测方法正逐渐退出舞台。

(2) 最近的主流： 从产品检测到工序管理的验证检测

2018年修订的《食品卫生法》颁布，2020年HACCP制度化开始实行。通过这些制度的改革，微生物检测的目的也被认为在逐渐发生变化。

HACCP制度化以前，微生物检测的主要目的是判断出货时产品是否合格。从每批次中抽查样品，由其结果推断该批次的卫生状态。但是，抽检也存在“抽样的产品并不一定能代表整个批次的卫生状态”的可能。

另一方面，自HACCP制度化以来，微生物检测逐渐被定位为“有效运用HACCP系统的手段”。由于检测目的变成了“验证HACCP是否合理运用”，所以检测意识也从以前的“想要使用和保健所相同的测试法”变成了“根据目的选用合适的检测方法”。

2. 微生物检测在HACCP中的作用

HACCP计划建立在基本卫生管理计划这种全面卫生管理的基础上(图1)。微生物检测可有效运用于这两项计划。



图1 HACCP和基本卫生管理计划的关系

(1) 在HACCP中有效运用微生物检测

在HACCP计划中，例如在将加热步骤指定为CCP进行管理时，需验证CCP管理标准(加热时间和温度等)是否可对有害微生物进行有效的杀菌。进行此类验证时会使用微生物检测。

此外，当食品的生产过程中出现不合格品时，一般会进行返工(重新加工或作为原材料再利用等)。在设定“何种情况下进行何种返工”等规则时，也会使用微生物检测。

最后，为了确认HACCP有正常发挥作用，也会定期对最终成品进行微生物检测。

(2) 在基本卫生管理计划中有效运用微生物检测

在基本卫生管理程序中,会通过ATP荧光检测确认设施的清扫方法、仪器和器具的清洗方法等是否有效地去除了微生物等等。

(3) 选择检测方法时的判断标准

最近,作为检测方法的选择标准,检测的委托方和受托方双方都需对检测方法进行“稳妥性确认(validation)”和“性能验证(verification)”,“通过了稳妥性确认和性能验证的检测方法,其结果值得信赖”的共识十分重要。

以下会说明稳妥性确认和性能验证的意义。

①稳妥性确认

稳妥性确认(validation)是为证实试验方法是否满足所要求的性能标准而进行的确认实验。简易快速检测法的稳妥性确认是为了评估“与已建立的国际标准相比,其是否拥有同等的性能”。

但是,这样的评估难以在各个食品企业的检测室中进行。因此,一般会选择已经由第三方机构进行了稳妥性确认的检测方法,如AOAC或MicroVal等。

②性能验证

性能验证(verification)是指将检测方法实际应用于自身所在机构的检测室时,对其是否能获得适当的结果而进行的评估。

本机构在引入微生物测试片培养基“Easy Plate”时进行了性能验证,下文也会对其进行概述。

3. 引入简易快速检测法的优点

(1) 选择简易快速检测法时需注意的点

简易快速检测法是指与传统的微生物检测法相比,需要的步骤更少或是在短时间内即可得到检测结果的方法。

在选择检测方法时,本机构十分注重以下四点:①稳妥性确认(validation)的结果;②与传统培养基检测法的一致性;③能适用于多种食品;④无需专用仪器和器具。

关于上述的第④点,还考虑到了如果需要专用的仪器和器具时,在维护上发生的计划外成本,以及当厂家保修期结束后更换其他仪器和器具的成本。

综合以上的要素,考虑到“引入的简易性”,讲者认为简易快速检测法的第一候选是“干式培养基(测试片培养基)”。

(2) 测试片培养基的优点

使用测试片培养基替换传统的琼脂培养基和液体培养基的优点有3个,①无需制备培养基和证实试验,缩短检测时间;②可缩短作业时间,降低成本;③可简化检测相关的记录,减少记录作业。

①无需花费时间制备培养基和准备仪器

图2为使用测试片培养基可降低成本的示意图。在使用传统检测方法时,制备培养基需要玻璃器皿,灭菌需要高压灭菌锅,在灭菌后需要使用恒温水浴锅对琼脂培养基进行保温。但测试片培养基不需要使用这些设备、器具。此外,由于上述设备还需要定期进行维护和校准,因此产生的人工和成本也需要纳入考量。

使用传统检测法制备的培养基和试剂相比之下较为便宜。传统培养法使用培养皿和干粉培养基,所需成本只有测试片培养基的一半左右,用后即弃的测试片培养基作为消耗品来说价格相对较高。但是测试片培养基的优势为“可通过缩减时间降低人工成本”。相对于传统培养法,测试片培养基可以大大缩短制备培养基、维护仪器和对检测进行记录所需的时间。而引入测试片培养基所节省出来的时间,可用于改善和加强生产现场的卫生管理。

但是,只要有部分检测项目还在使用传统检测法,就仍然需要高压灭菌锅和恒温水浴锅等设备。所以在引入测试片培养基前,需充分考虑“是否存在无法更换为测试片培养基的检测项目”以及“在同时使用传统检测法和测试片培养基的情况下,引入测试片培养基所带来的成本效果如何”。

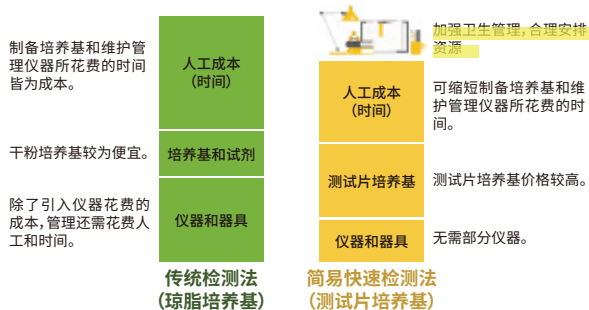


图 2 引入测试片培养基时的成本削减示意图

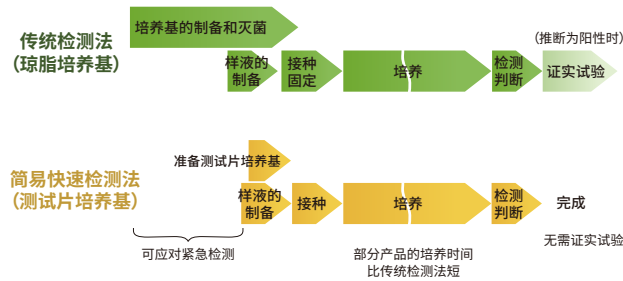


图 3 引入测试片培养基时所缩减的时间示意图

②缩短检测时间、缩短检测开始的时间

测试片培养基缩短的时间主要有以下两点, ①进行检测的准备时间; ②推断为阳性结果时进行证实试验的时间 (图3)。

例如在传统检测法中, 当傍晚的例行检测结束, 处理残留培养基后接着进行投诉品检测时, 需从琼脂培养基的制备开始着手。但如果使用测试片培养基, 就可以马上开始检测, 无需再制备培养基。

此外, 当测试片培养基上出现菌落时, 基本无需证实试验, 因此能够大幅节省检测时间。而官方检测法的证实试验最短也需要1~3天。

测试片培养基的另一大优点就是可立即应对紧急检测, 以及不会延长检测完成的时间 (可轻松预测检测所需的天数)。

③简化记录相关的作业

最近, 获得ISO/IEC 17025认证的检测实验室在不断增加。在ISO/IEC 17025中, 记录检测工序是非常重要的环节。此外, 为了事后能够验证检测结果的准确性, 大部分没有获得认证的实验检测室也会和客户约定提供详细的检测记录。

检测记录所需的要素是“可追溯性”和“可重复性”。“可追溯性”是指记录之间的相互联系, 例如从检测结果追溯, 能够得知孵育箱的温度和使用时间、使用的培养基和稀释用水的批次等。“可重复性”是指为了能够重复进行相同检测, 可根据记录在尽可能接近的条件下进行检测。

在做记录时需满足以上两个要素, 而传统检测法中“检测工序多”、“使用的仪器和器具多”等原因会导致需要花费很多工夫。但如果使用测试片培养基, 就可以简化这些工序。此外, 由于测试片培养基中只需记录较少的项目 (例如使用的试剂盒批次等), 因此还能简化检测记录。

4. Easy Plate的原理和特点

这部分内容主要介绍了本机构使用的微生物检测用测试片培养基“Easy Plate”的特点和验证工作的事例。

(1) 菌落总数: Easy Plate AC

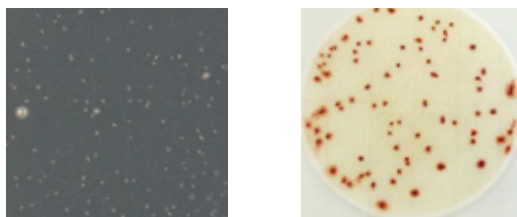
①何谓菌落总数

菌落总数是泛指所有细菌的术语, 但准确来说它是指好氧或兼性厌氧的嗜温菌。

在使用标准琼脂时, 琼脂培养基中的细菌无法移动, 只能 在同一个地方中不断地增殖, 大约24~48h就会形成菌落。菌落 大部分呈白色~乳白色或黄色 (照片1)。由于菌落的颜色和食 物的颜色相近, 所以如果样液中混有食物残渣, 则需使用放大 镜等工具来区分菌落和残渣。

②Easy Plate AC的菌落

而对于Easy Plate AC, 菌落在Easy Plate AC中的颜色 呈红色, 可轻松区别菌落和食物残渣 (照片1)。



照片 1 菌落总数的菌落 (左: 标准琼脂培养基, 右: Easy Plate AC)

(2) 大肠菌群: Easy Plate CC/ Easy Plate EC

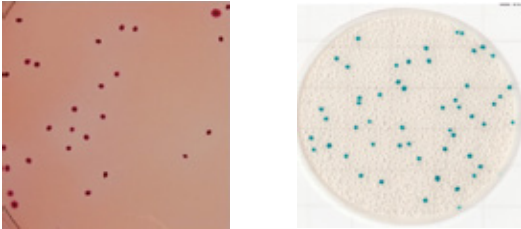
①何谓大肠菌群

大肠菌群是广泛分布于人和动物的粪便,以及土壤、水和灰尘等物质中的细菌。因此,大肠菌群作为污染指示菌被用于推断以手指等为介质的粪便污染,以及环境整体污染情况。

②Easy Plate CC的检测原理

Easy Plate CC采用酶底物法,通过大肠菌群的乳糖分解酶分解培养基中含有的显色底物,使分解物显色呈**蓝色**(照片2)。

酶底物法是一种可靠性高的检测法,当培养基中出现**蓝色**的菌落时,无需进行证实试验即可判断为阳性。



照片2 大肠菌群的菌落
(左: 去氧胆酸盐琼脂培养基, 右: Easy Plate CC)

③为何无需证实试验

使用去氧胆酸盐琼脂培养基时,大肠菌群会通过细胞膜中的乳糖转运蛋白吸收培养基中含有的乳糖,然后被名为 β -半乳糖苷酶的酶分解为半乳糖和葡萄糖。由此生成的葡萄糖经过复杂的化学反应分解为丙酮酸和乳酸,而这些酸会使培养基呈酸性,导致pH指示剂呈**红色**(照片2)。因此在推断为阳性时,需要再进行证实试验。

而使用Easy Plate EC时,培养基中含有的显色底物(Magenta-Gal)吸收至细胞内后,会和乳糖一样被酶分解成半乳糖和氯溴靛蓝这种呈**红紫色**的色素(图4)。由此看出,Easy Plate EC可更直接地反映大肠菌群含有 β -半乳糖苷酶的这一特性。

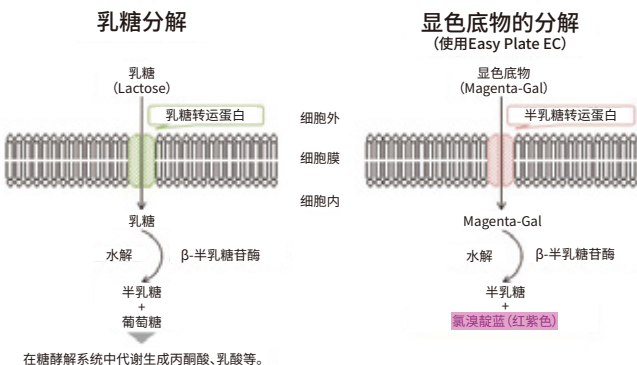


图4 大肠菌群引起的乳糖以及显色底物的分解

如上所述,Easy Plate从检测开始到显色的步骤很少,并且由细菌以外的因素导致菌落变色的可能性低,因此无需进行证实试验。

(3) 大肠杆菌 Easy Plate EC

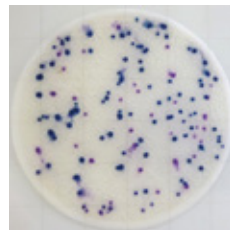
①使用传统检测法进行的大肠杆菌检测

在传统检测法中,通常使用称为EC发酵管培养基的液体培养基进行大肠杆菌的检测。但是,传统检测法会根据能否在44.5°C下生长这一条件来区别大肠菌群和大肠杆菌(包括粪大肠菌群),因此培养时的温度管理非常重要(官方检测法中要求温度严格控制在44.5 \pm 0.2°C)。

②Easy Plate EC的检测原理

Easy Plate EC不是通过能否在指定温度生长来判断,而是根据是否存在特定的酶来区别大肠杆菌和大肠菌群,所以无需传统检测法所需的严格温度管理。此外,大肠菌群和大肠杆菌在同一片测试片培养基上就能区分,无需像传统检测法那样分别使用2种类型的培养基。

吸收进细菌细胞内的显色底物,会被大肠杆菌特有的酶,即 β -葡萄糖醛酸酶分解,生成**蓝色**的氯溴靛蓝(照片3,图5)。约95%的大肠杆菌含有这种 β -葡萄糖醛酸酶。



照片3
Easy Plate EC的菌落

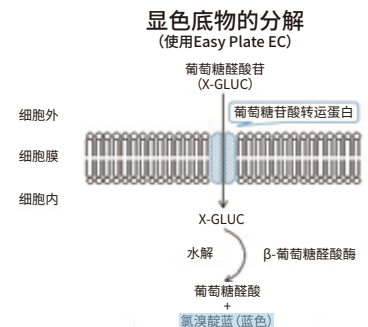


图5 Easy Plate (酶底物法) 利用了大肠杆菌特有的酶

③传统检测法和Easy Plate的大肠杆菌和大肠菌群的检测结果是否一致?

一部分大肠菌群中,并不含有乳糖转运蛋白。它们被称为“潜在的乳糖发酵菌”。潜在的乳糖发酵菌虽然含有分解乳糖的酶,但无法将乳糖吸收进细胞内,因此无法在去氧胆酸盐琼脂培养基上形成红色的菌落。另一方面,显色酶底物X-Gal会被吸收进细胞内,X-Gal在分解后会在Easy Plate CC上形成**蓝色**的菌落。

那么,该如何解释这样的结果差异呢?传统检测法和酶底物法(Easy Plate等)的大肠杆菌和大肠菌群的结果是否一致?

实际上,大部分潜在的乳糖发酵菌都是在人和动物的

粪便中被检测出的,所以与检测大肠菌群原本的目的,即“来自粪便、土壤和一般环境的污染指标”相符。也就是说,检测出潜在的乳糖发酵菌和一般情况下检测出大肠菌群时相同,都属于“食品被污染,需要采取卫生措施”的情况。

上文说明了 β -葡萄糖醛酸酶是大肠杆菌特有的酶(约95%的大肠杆菌含有 β -葡萄糖醛酸酶),换言之就是约5%的大肠杆菌不含 β -葡萄糖醛酸酶,无法使用酶底物法进行检测。那么这会对检测结果有影响吗?

由于大肠杆菌是大肠菌群的一部分,所以基本也会发酵乳糖。但是,有10%的大肠杆菌乳糖发酵的速度较慢,既

无法在传统检测法的培养时间内在去氧胆酸盐琼脂培养基上形成红色的菌落,也无法在EC发酵管培养基中生成气体。综上所述,无论是使用传统检测法还是酶底物法,都存在“无法检测出的大肠杆菌”。相较而言,例外较少的酶底物法可以更准确地检测出大肠杆菌。

此外,作为污染指标菌,“大肠菌群”和“大肠杆菌”并不是特指某一个种类的细菌(大肠杆菌也存在诸多种类)。考虑到其与从土壤和粪便中检测出的细菌具有大致相同的性质,所以即使传统检测法和酶底物法检测出的菌并不完全一致,也还是可以达到食品卫生管理的目的。

5. 引入Easy Plate前进行验证的事例

目前,包括餐饮、超市、连锁便利店等,与本机构签订年度细菌检测委托的34家企业中,有24家使用了简易快速检测法。而在这24家企业中,有12家使用了Easy Plate进行检测(首都圈事业所,2021年度)。下面将介绍这些企业在引入委托检测前进行的检测方法性能验证(verification)的概况。

Easy Plate是经AOAC进行了稳妥性确认(validation)的培养基,已获得Performance Tested Method (PTM)认证。为确认其应用于食品时是否可获得正确的结果,本机构在正式引入Easy Plate之前进行了以下两种验证。

(1) 评估基本性能

首先,本机构使用标准样品对产品的基本性能进行了验证。由于本机构可向日本国内的检测实验室提供能力验证测试服务,所以在此验证中也使用了用于能力验证测试的标准样品(包含多种菌株且均质稳定的样品)。另外,评估用样品使用牛奶作为样品基底。由于牛奶作为基底时几乎没有影响,因此适用于评估培养基和检测试剂盒的基本性能。

在评估中,分别使用传统检测法和Easy Plate检测两次评估用样品的菌数,将所得菌数对数化后计算与评估用样品参考值的比例。关于评估用样品的参考值,菌落总数参考值为 2.5×10^4 ,大肠菌群为 5.2×10^3 ,金黄色葡萄球菌为 1.3×10^4 (图6)。柱状图上的百分比为回收率(评估用样品的参考值与检测值的比例)。无论在哪一项中,传统检测法和Easy Plate的回收率都基本相同。

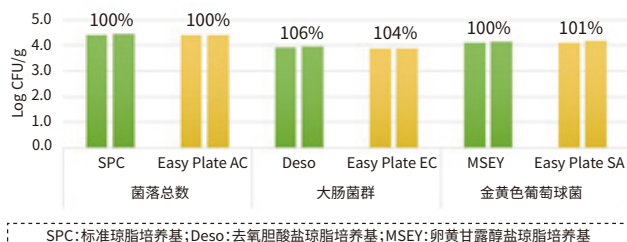


图6 基本性能的验证结果

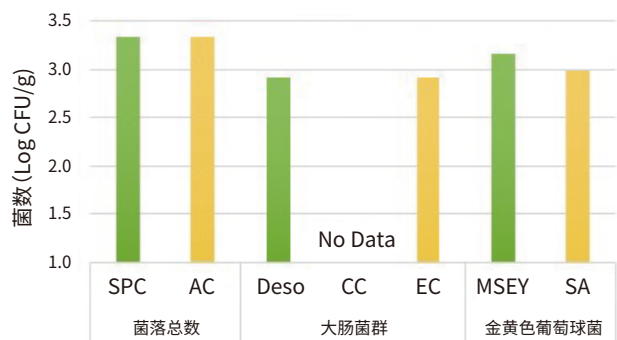
(2) 评价食品成分对结果的影响

如上文所述,Easy Plate已被验证可毫无问题地用于加工食品的检测,因此接下来本机构对其在检测生鲜食品时的效果进行了评估。具体评估方法是向各类生鲜食品中添加疑似污染样品(即上述基本性能验证中用于评估的标准样品),进行培养后计算回收率,并比较传统检测法和Easy Plate的菌数对数值。若两者间的差在 $-0.3 \sim +0.3$ 的范围内,则可判断“两者所获结果基本相同”。另外,若范围在 $-0.3 \sim +0.3$,则表示Easy Plate与传统检测法的菌数比例大致在50~200%左右。

① 可生食马肉的评估结果

图7为可生食马肉的检测结果。从图中可以看出,无论在哪一项中,传统检测法和Easy Plate的检测值都基本相同。

在酶底物法中,检测结果可能会受食品来源成分的影响。由于生鲜食品(特定动物源食品)中含有大量的酶,所以检测前已假设酶底物法Easy Plate EC的结果可能会受影响,但实际结果中菌落的显色并没有受影响。



SPC: 标准琼脂培养基; Deso: 去氧胆酸盐琼脂培养基; MSEY: 卵黄甘露醇盐琼脂培养基; AC·CC·EC·SA: Easy Plate AC·CC·EC·SA (数据均为两次检测的平均值)

图7 使用传统检测法和Easy Plate比较可生食马肉中的菌数

②其他生鲜食品的评估结果

除此以外, 本机构还对植物源性、动物源性的生鲜食品进行了验证。结果表明, Easy Plate AC·CC·SA与传统检测法的检测值基本相同, 菌落的颜色也几乎没有受影响(图8)。

但是, 在使用Easy Plate EC进行的大肠菌群检测中, 墨鱼、鲈鱼和鸡肉的对数差值均超过了0.3。尤其是鸡肉在去氧胆酸盐琼脂培养基和Easy Plate EC中的对数差值高达1.13。差值大的原因推测为墨鱼和鲈鱼受到了糖苷酶的影响。鸡肉可能是其原有的菌数高, 存在潜在的乳糖发酵菌。

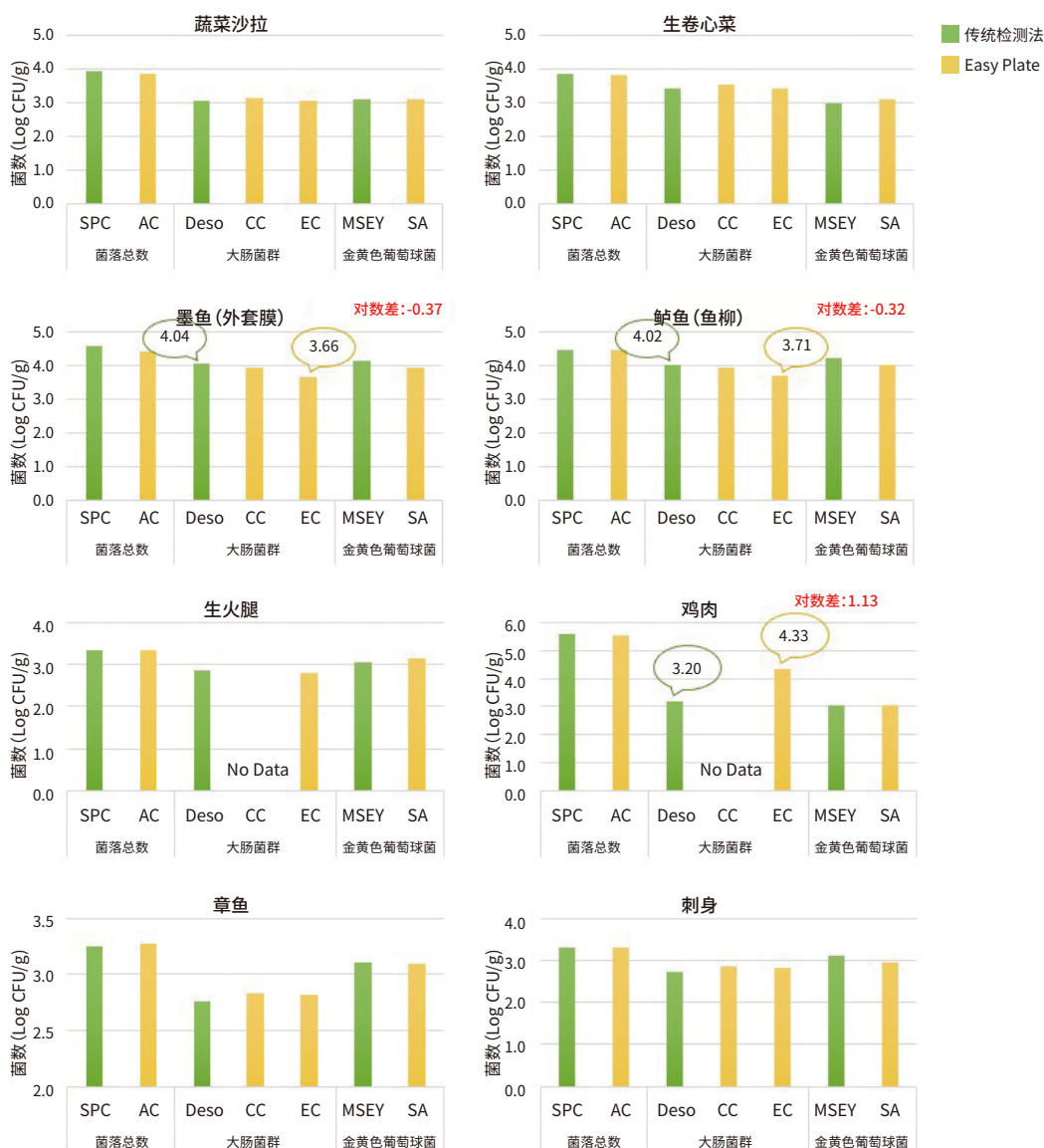


图8 使用传统检测法和Easy Plate比较蔬菜、海鲜、食用肉中的菌数

③从引入前验证中所获得的结论

基于以上结果和考察, 本机构判断Easy Plate的引用适用于所有的加工食品和生鲜蔬菜的检测。

但使用Easy Plate EC检测动物源性生鲜食品中的大肠菌群时, 其检测结果会受到轻微影响。因此, 目前本机构打算将其与传统检测法配合使用, 进一步积累使用经验。

kikkoman 

龟甲万百欧凯米发株式会社

(Kikkoman Biochemifa Company)

东 京 〒 105-0003 东京都港区西新桥2-1-1

E-mail: biochemifa@mail.kikkoman.co.jp

U R L: <https://biochemifa.kikkoman.co.jp/c/>

富士胶片 and 光 (广州) 贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼
3002-3003室

北京 Tel: 13611333218

上海 Tel: 021 62884751

广州 Tel: 020 87326381

香港 Tel: 852 27999019

询价: wkgz.info@fujifilm.com

官网: labchem.fujifilm-wako.com.cn

化学分析微信



目录价查询

