

# 一次性使用卫生用品中绿脓杆菌的 鉴定分析与质量控制

耿昱琨<sup>1</sup> 张敏爱<sup>1</sup> 巩红霞<sup>1</sup> 刘 燕<sup>1</sup> 王丽梅<sup>1</sup> 巩政坤<sup>1</sup>

**摘要** 为满足新冠肺炎疫情下一次性使用卫生用品卫生状况的检测需求,参加一次性使用卫生用品中绿脓杆菌的检测能力验证,提升绿脓杆菌的检测能力。依据 GB 15979-2002《一次性使用卫生用品卫生标准》中附录 B4,采用手工生化试验、全自动微生物生化鉴定系统和 PCR-荧光探针法对能力验证样品分离菌株和 4 株绿脓杆菌分离菌株进行鉴定。结果显示,样品 20DP-2112 未检出绿脓杆菌,样品 20DP-1630 检出绿脓杆菌,分离菌株 A、B、C、D 鉴定为绿脓杆菌;20DP-1630 分离菌株和分离菌株 A、B 在 3 种方法中都呈现出典型的阳性结果,分离菌株 C、D 在手工生化鉴定中未呈现出典型的阳性特征,但全自动微生物生化鉴定系统和荧光 PCR 仪都显示为阳性结果,综合分析判定为绿脓杆菌。因此,绿脓杆菌的检验不能仅以手工生化试验为判定依据,还需结合多种方法才能实现对检测结果的质量控制。

**关键词** 一次性使用卫生用品;绿脓杆菌;质量控制

## Identification, Analysis and Quality Control of *Pseudomonas aeruginosa* in Disposable Sanitary Products

GENG Yu-Kun<sup>1</sup> ZHANG Min-Ai<sup>1</sup> GONG Hong-Xia<sup>1</sup>  
LIU Yan<sup>1</sup> WANG Li-Mei<sup>1</sup> GONG Zheng-Kun<sup>1</sup>

**Abstract** In order to meet the demand for testing the sanitary conditions of disposable sanitary products during the COVID-19 pandemic and improve the detection capacity of *Pseudomonas aeruginosa*, we participated in "Verification of detection ability of *Pseudomonas aeruginosa* in disposable sanitary products". According to *Hygienic standard for disposable sanitary products* (GB 15979-2002 Appendix B4), the strains isolated from the proficiency testing samples and four isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were identified by manual biochemical tests, automatic microbial biochemical identification system and PCR-fluorescence probe method. The results showed that no *Pseudomonas aeruginosa* was detected in sample 20DP-2112, *Pseudomonas aeruginosa* strains were isolated from sample 20DP-1630 and four strains A/B/C/D. Strains isolated from 20DP-1630 and two strains A/B showed excellent positive results by all the methods. The other two strains C/D showed weak positive characteristics by manual biochemical

第一作者:耿昱琨(1991—),女,汉族,山西太原人,本科,助理工程师,主要从事进出口微生物检验,E-mail:124008043@qq.com

1.太原海关技术中心 太原 030024

1. Taiyuan Customs Technical Centre, Taiyuan 030024

identification, but both automatic microbial biochemical identification system and fluorescence PCR instrument showed high positive coincidence rate, and comprehensive analysis can also be determined as *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, the detection of *Pseudomonas aeruginosa* should not only rely on the result of manual biochemical tests, but also need to combine with a variety of methods to achieve the quality control of the test results.

**Keywords** disposable sanitary products; *Pseudomonas aeruginosa*; quality control

新型冠状病毒肺炎疫情暴发后, 口罩等一次性使用卫生用品成为市面上的畅销产品, 其卫生状况备受关注, 其中微生物指标是卫生质量合格与否的重要影响因素<sup>[1-2]</sup>。为适应疫情下市场的检测需求, 提升检测能力水平, 本中心实验室参加了一次性使用卫生用品中绿脓杆菌的检测能力验证。GB 15979-2002《一次性使用卫生用品卫生标准》<sup>[3]</sup>是一次性使用卫生用品检测的国家强制标准, 其中明确规定了口罩(普通级/消毒级)中不得检出致病性化脓菌<sup>[3-4]</sup>, 绿脓杆菌就是其中一项重要指标, 同时在附录 B4 中详细描述了产品的微生物学检测方法<sup>[3]</sup>。

绿脓杆菌又称铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 属于假单胞菌属, 在自然界中广泛分布, 对外界环境的抵抗力较强, 是一种重要的条件致病菌, 可引起人的眼、耳、鼻、咽喉和皮肤等处感染, 特别是烧伤、烫伤后的感染尤为严重, 常使病情恶化, 并可引发败血症。该菌为革兰阴性杆菌, 氧化酶阳性, 能产生绿脓菌素, 还能液化明胶, 还原硝酸盐为亚硝酸盐, 在 42°C 条件下能生长, 可与类似菌区别<sup>[5-8]</sup>。

参加能力验证过程中, 按照能力验证作业指导书<sup>[9]</sup>和 GB 15979-2002 中附录 B4 的要求进行增菌、分离和鉴定。菌种鉴定还参考了绿脓杆菌检测的其他标准<sup>[10-11]</sup>。这些标准的菌种鉴定都以手工生化试验为主要鉴定方法, 但以往检测绿脓杆菌的经验表明, 绿脓杆菌的菌型多, 不同菌型在相同的选择性平板上呈现出不同形态, 也会表现出不同的手工生化鉴定结果。为确保鉴定结果的准确性, 增加了全自动微生物生化鉴定系统<sup>[9]</sup>和 PCR-荧光探针<sup>[12-14]</sup> 2 种鉴定方法。此外, 选择 4 株绿脓杆菌分离菌株对 3 种鉴定方法<sup>[15]</sup> 进行验证, 分析整个检测过程的关键环节, 探讨影响鉴定结果的可能因素, 实现对一次性使用卫生用品中绿脓

杆菌检测结果的质量控制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 待测样品

样品 2 份, 编号分别为 20DP-2112、20DP-1630, 由中国海关科学技术研究中心提供。

#### 1.1.2 菌株

标准菌株: 阳性对照选用绿脓杆菌 ATCC27853; 阴性对照选用荧光假单胞菌 ATCC13525。菌株购自美国菌种保藏中心, 由本实验室保存。

分离菌株: 4 株绿脓杆菌, 由本实验室从污染饮用水样品中分离, 分别为 A ~ D, 其中, A、B 株于 2018 年 4 月纯化保藏至 -20°C 冰箱中, C、D 株于 2020 年 9 月纯化保藏至 -20°C 冰箱中。

#### 1.1.3 培养基和试剂

营养肉汤、SCDLP 液体培养基、十六烷三甲基溴化铵琼脂、乙酰胺琼脂、CN 琼脂、假单胞显色培养基、革兰氏染液试剂盒、氧化酶试剂、绿脓菌素测定培养基、硝酸盐胨水培养基、明胶培养基、营养琼脂培养基, 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 GN 卡购自法国生物梅里埃公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 绿脓杆菌核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)购自广州达安基因股份有限公司。

#### 1.1.4 仪器设备

生物安全柜、恒温培养箱、显微镜、全自动微生物生化鉴定系统(VITEK2-Compact)、荧光 PCR 仪。

### 1.2 检验方法

按照“一次性使用卫生用品中致病菌的检测”

(CNCA-20-12) 参试指导书和 GB 15979-2002 的要求进行增菌、分离和手工生化鉴定。除此之外,增加了全自动微生物生化鉴定系统(VITEK2-Compact)和荧光 PCR 仪对可疑菌落进行鉴定,综合以上 3 种试验的检测结果出具报告,检验流程如图 1 所示<sup>[9]</sup>。其中,以绿脓杆菌 ATCC27853 作为阳性对照菌株,以荧光假单胞菌 ATCC13525 作为阴性对照菌株。

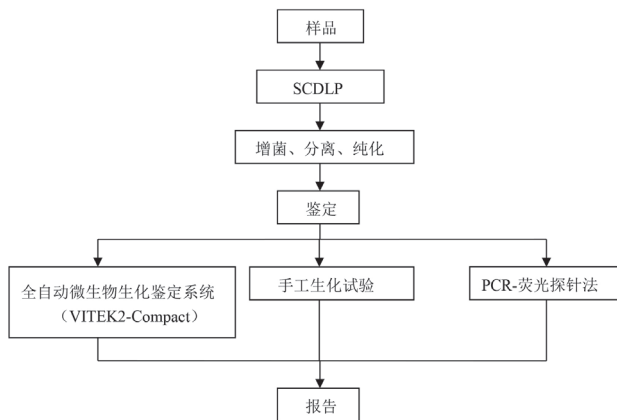


图1 绿脓杆菌检验流程

Fig.1 The inspection procedure of *Pseudomonas aeruginosa*

### 1.2.1 样品制备

无菌开启 2 个样品包装,瓶内样品为含菌口罩,直接用于检测,在生物安全柜中剪碎后,分别与 100 mL 无菌生理盐水进行充分混匀,均质 2 min。此溶液即待测样液,编号分别为 20DP-2112、20DP-1630。

### 1.2.2 增菌

取 2 个能力验证样品待测样液各 5 mL,分别加到 50 mL SCDLP 液体培养基中,充分混匀,置于  $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$  培养 18 ~ 24 h。同时,分别取阳性对照绿脓杆菌 ATCC27853、阴性对照荧光假单胞菌 ATCC13525 和 4 株分离菌株菌液 1 mL  $(50 \sim 100 \text{ CFU/mL})$  接种至 50 mL SCDLP 液体培养基中进行培养。

### 1.2.3 选择性分离

从增菌培养液中挑取培养物划线接种于十六烷三甲基溴化铵琼脂,置于  $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$  培养 18 ~ 24 h。除此之外,还增加了乙酰胺琼脂、CN 琼脂和假单胞显色培养基这些选择性平板,除 CN 琼脂培养 48 h 外,

其余都培养 24 h。同方法操作阳性对照、阴性对照和 4 株分离菌株,观察菌落特征。

### 1.2.4 生化反应试验

从选择性平板上选取典型菌落,分别分离纯化至营养琼脂平板上,于  $36^\circ\text{C}$  培养 24 h。挑取单菌落涂片进行革兰氏染色、镜检,并分别进行氧化酶试验、绿脓菌素试验、硝酸盐还原产气试验、明胶液化试验和  $42^\circ\text{C}$  生长试验。

### 1.2.5 全自动微生物生化鉴定系统(VITEK2-Compact)鉴定

挑取经革兰氏染色镜检为革兰氏阴性菌的单菌落,用 GN 鉴定卡,采用全自动微生物生化鉴定系统(VITEK2-Compact)进行鉴定。

### 1.2.6 PCR-荧光探针法试验

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取能力验证样本分离菌株、4 株实验室保存的分离菌株和绿脓杆菌 ATCC27853 的核酸。然后,进行 2 组试验:第 1 组为能力验证组,第 2 组为分离菌株组。将能力验证样本核酸、分离菌株样本核酸、处理后的核酸检测试剂盒阴性质控品、阳性质控品  $5 \mu\text{L}$  分别与绿脓 PCR 反应液 A 液  $17 \mu\text{L}$ 、B 液  $3 \mu\text{L}$  混合成  $25 \mu\text{L}$  的绿脓扩增体系。按照  $50^\circ\text{C}$  2 min、 $95^\circ\text{C}$  15 min、 $94^\circ\text{C}$  15 s、 $55^\circ\text{C}$  45 s,循环 40 次的扩增参数进行扩增。

## 2 结果与分析

### 2.1 增菌和选择性分离

增菌及选择性分离的结果描述见表 1。

用 SCDLP 液体培养基在  $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$  增菌培养 18 ~ 24 h 后,多数培养液通常出现混浊,呈菌悬液状,只有少数培养液会出现标准所说的表面呈现一层薄膜,颜色变为黄绿色或蓝绿色。在进行分离培养时,标准中描述的绿脓杆菌在十六烷三甲基溴化铵琼脂上生长时,会使菌落周围培养基略带粉红色,但实际情况中菌落周围培养基依然是琼脂本色,很少出现略带粉红色的情况。因此,不能以颜色来判定是否有绿脓杆菌,还需进行后续试验进行确证<sup>[16]</sup>。

标准中的选择性平板只有十六烷三甲基溴化铵琼

表1 增菌及选择性分离结果  
Table 1 Results of enrichment and selective isolation

| 样品编号                | SCDLP                | 十六烷三甲基溴化铵平板                      | 乙酰胺平板                          | CN平板                          | 假单胞显色培养基       |
|---------------------|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------|
| 20DP-2112           | 培养液轻微浑浊              | -                                | -                              | -                             | -              |
| 20DP-1630           | 培养液变浑浊, 无颜色变化, 有白色菌丝 | + <sup>a</sup> (培养基未呈现粉红色, 是浅绿色) | + <sup>b</sup>                 | + <sup>c</sup>                | + <sup>d</sup> |
| ATCC27853<br>(阳性对照) | 培养液变浑浊, 无颜色变化, 有白色菌丝 | + <sup>a</sup> (培养基颜色无变化)        | + <sup>b</sup>                 | + <sup>c</sup>                | + <sup>d</sup> |
| ATCC13525<br>(阴性对照) | 培养液变浑浊               | -                                | -                              | -                             | -              |
| 分离菌株A               | 培养液变浑浊, 且发绿, 有白色菌丝   | + <sup>a</sup> (培养基为蓝绿色)         | + <sup>b</sup>                 | + <sup>c</sup> (培养基中菌落边缘为淡粉色) | + <sup>d</sup> |
| 分离菌株B               | 培养液变浑浊, 且发绿, 有白色菌丝   | + <sup>a</sup> (培养基为蓝绿色)         | + <sup>b</sup>                 | + <sup>c</sup> (培养基中菌落边缘为淡粉色) | + <sup>d</sup> |
| 分离菌株C               | 培养液变浑浊, 无颜色变化, 有白色菌丝 | + <sup>a</sup>                   | + <sup>b</sup> (菌落生长不好, 多为针尖状) | + <sup>c</sup>                | + <sup>d</sup> |
| 分离菌株D               | 培养液变浑浊, 无颜色变化, 有白色菌丝 | + <sup>a</sup>                   | + <sup>b</sup>                 | + <sup>c</sup> (菌落多为橘黄色)      | + <sup>d</sup> |

注: 表中“-”为阴性, “+”为阳性, 如个别形态不同, 已在表格括号里标注。其中, a代表菌落扁平, 无定型, 向周边扩散或略有蔓延, 表面湿润, 菌落呈灰白色, 菌落周围培养基常扩散有水溶性色素; b代表菌落扁平, 生长良好, 边缘不整, 菌落周围培养基略带粉红色, 其他菌不长; c代表蓝色或绿色菌落, 生长良好, 能产荧光; d代表蓝色或绿色菌落, 圆形。

脂, 因此增加了多种绿脓杆菌选择性平板, 如乙酰胺琼脂、CN琼脂和假单胞显色培养基, 以提高绿脓杆菌的检出率。其中, 乙酰胺培养基的选择性强, 大多数杂菌在乙酰胺培养基上不生长, 据此可将乙酰胺培

养基分离菌落这个步骤作为增菌后初步判定是否有目标菌的有效方式<sup>[6]</sup>。

## 2.2 手工生化反应试验

手工生化反应试验结果见表2。

表2 手工生化反应试验结果  
Table 2 Results of manual biochemical reaction tests

| 样品编号                | 革兰氏染色    | 氧化酶试验 | 绿脓菌素试验     | 硝酸盐还原产气试验 | 明胶液化试验 | 42°C生长试验 |
|---------------------|----------|-------|------------|-----------|--------|----------|
| 20DP-1630           | 革兰氏阴性杆菌  | +     | +          | +         | -      | +        |
| ATCC27853<br>(阳性对照) | 革兰氏阴性短杆菌 | +     | +          | +         | +      | +        |
| 分离菌株A               | 革兰氏阴性短杆菌 | +     | +(颜色变化不明显) | +         | +      | +        |
| 分离菌株B               | 革兰氏阴性短杆菌 | +     | +(颜色变化不明显) | +         | +      | +        |
| 分离菌株C               | 革兰氏阴性杆菌  | +     | -          | +         | +      | -        |
| 分离菌株D               | 革兰氏阴性短杆菌 | +     | -          | +         | -      | -        |

注: “+”为阳性; “-”为阴性

手工生化鉴定时对照至关重要，是结果准确性的有效保证，同时试剂的使用和质量也是试验成立与否的关键因素。例如：氧化酶试验是绿脓杆菌手工生化试验中关键的一步，若氧化酶阴性即可认定为非绿脓杆菌。但氧化酶试剂中 1% 二甲基对苯二胺在使用过程中存在较高不稳定性，保质期短，且保存需严格避光，操作不当会存在假阳、假阴的结果。因此，必须用已知氧化酶阳性和阴性的菌株进行比对，以排除试验的不利影响因素<sup>[16]</sup>。

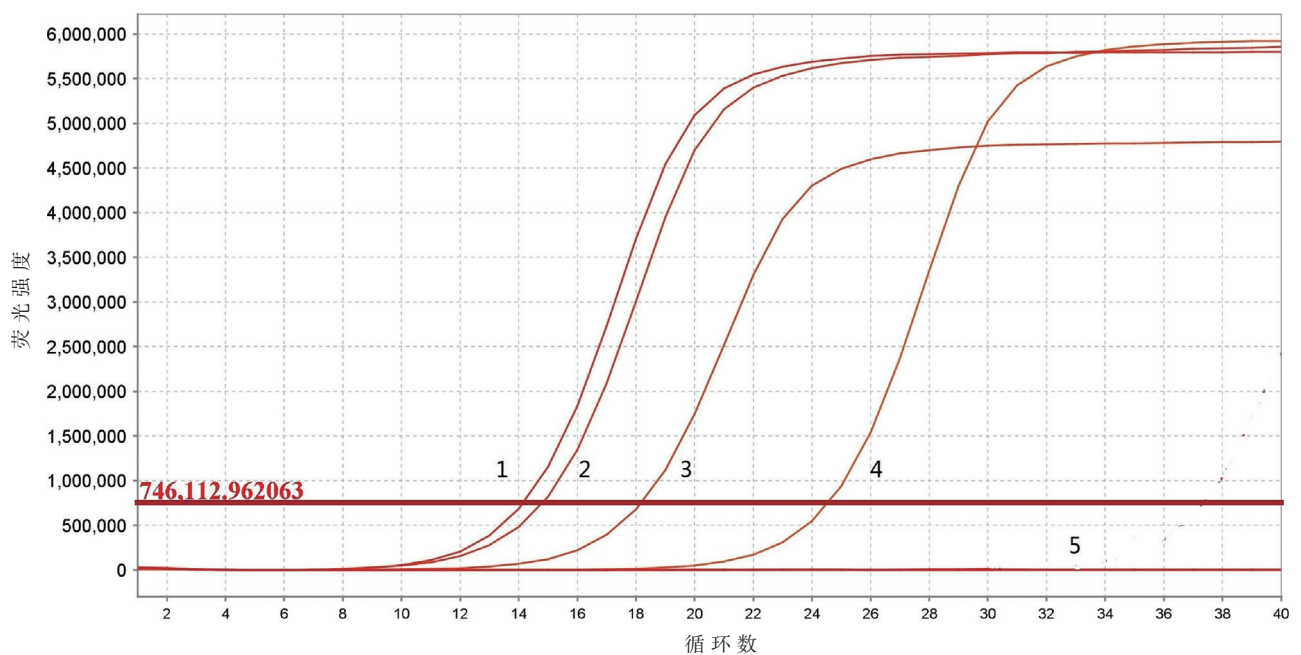
由于微生物具有容易变异的特性，实际生化试验中，会出现判定为绿脓杆菌的分离菌株试验结果不符合典型的阳性特征。例如：标准菌株的明胶液化试验呈阳性，而分离菌株 D 的明胶液化试验并没有呈现阳性特征。这是由于明胶液化的快慢与绿脓杆菌的生长所产生的明胶液化酶有关，而绿脓杆菌的生长又与多种因素有关。因此，分离菌株明胶液化不明显可能与其产生明胶液化酶不足有关。

### 2.3 全自动微生物生化鉴定系统 (VITEK2-Compact) 鉴定结果

对样品进行全自动微生物生化鉴定，结果见表 3。

表3 全自动微生物生化鉴定系统试验结果  
Table 3 Test results of automatic microbial biochemical identification system

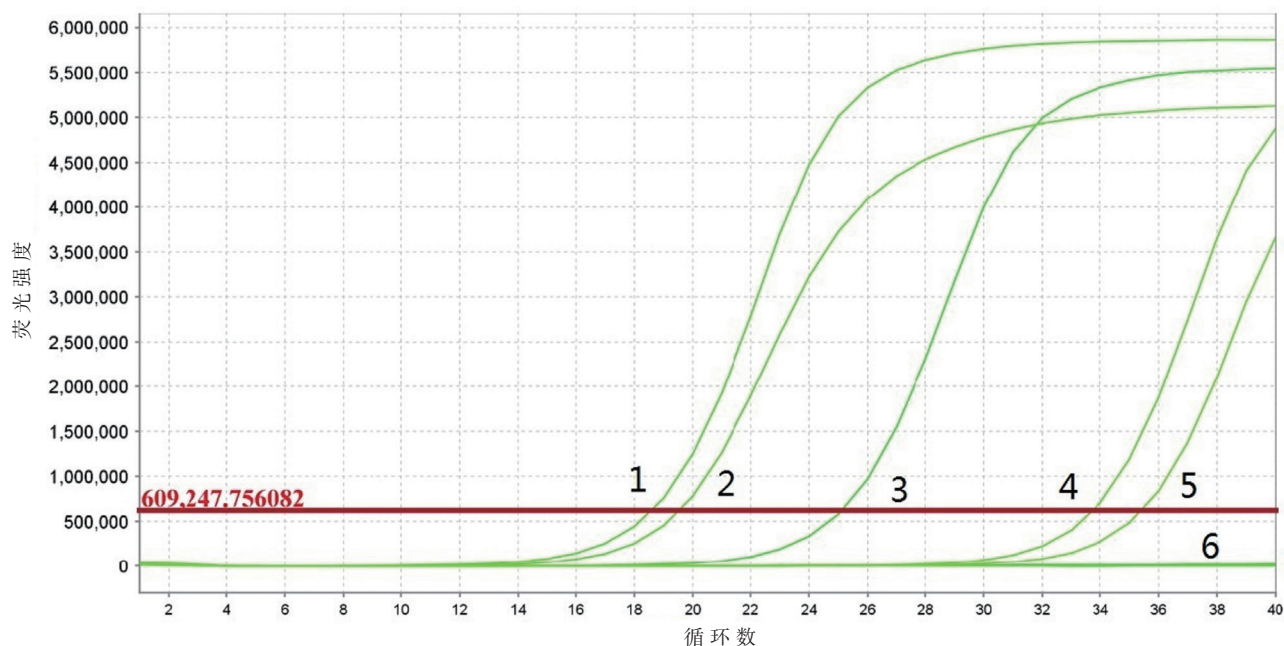
| 样品编号      | 鉴定结果   | 鉴定结果符合率 (%) |
|-----------|--------|-------------|
| 20DP-2112 | 大肠埃希氏菌 | 99          |
| 20DP-1630 | 绿脓杆菌   | 99          |
| ATCC27853 | 绿脓杆菌   | 99          |
| 分离菌株A     | 绿脓杆菌   | 96          |
| 分离菌株B     | 绿脓杆菌   | 97          |
| 分离菌株C     | 绿脓杆菌   | 97          |
| 分离菌株D     | 绿脓杆菌   | 93          |



1: 20DP-1630分离菌株1; 2: 20DP-1630分离菌株2;  
3: 绿脓杆菌ATCC27853; 4: 阳性质控品; 5: 阴性质控品

图2 能力验证样品的扩增动力学曲线

Fig.2 Amplification kinetics curves of the proficiency testing samples



1: 分离菌株A; 2: 分离菌株B; 3: 阳性质控品;  
4: 分离菌株C; 5: 分离菌株D; 6: 阴性质控品

图3 分离菌株扩增动力学曲线

Fig.3 Amplification kinetics curves of the isolated strains

#### 2.4 PCR-荧光探针法试验检测结果

能力验证样品 PCR- 荧光探针法检测结果如图 2 所示。

分离菌株 PCR- 荧光探针法检测结果如图 3 所示。

图2和图3的结果显示,20DP-1630分离菌株1和2、分离菌株 A、B、C、D、绿脓杆菌 ATCC27853、核酸检测试剂盒阳性质控品的  $C_t$  值  $\leq 38$ , 且呈现出明显的扩增曲线, 可判定为绿脓杆菌阳性。

### 3 结论

在手工生化试验中, 少部分菌落未呈现出典型

的生化特性, 如分离菌株 C 中绿脓菌素、42℃ 生长试验为阴性; 分离菌株 D 中绿脓菌素、明胶液化、42℃ 生长试验为阴性。如按照 GB 15979-2002 进行判定, 分离菌株 C、D 均应报告未检出绿脓杆菌, 但选择性平板增菌又显示出典型的绿脓杆菌菌落特征。为增加结果的准确性, 同时采用了全自动微生物生化鉴定系统和 PCR- 荧光探针法对分离菌株 C、D 进行鉴定, 都呈现出较明显的阳性结果。因此, 在绿脓杆菌的检测过程中不能仅仅依靠手工生化试验来判定是否检出绿脓杆菌, 还需增加全自动微生物生化鉴定和荧光 PCR 确证试验等多种方法来综合分析, 防止误检漏检。

## 参考文献

- [1] 孙凤霞. 一次性使用卫生用品微生物检测结果的探析 [J]. 中国医药指南, 2014, 12(24): 360-361.
- [2] 张慧敏, 胡晓宁, 甘连军, 等. 一次性使用卫生用品卫生质量现状调查 [J]. 中国消毒学杂志, 2013, 30(5): 492-493.
- [3] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 一次性使用卫生用品卫生标准: GB 15979-2002 [s]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [4] 沈伟. 一次性使用卫生用品卫生标准解读 [J]. 中国卫生标准管理, 2012, 3(4): 21-25.
- [5] 王文娟, 颜瑛, 罗玉彬, 等. 江西省矿泉水和包装饮用水中铜绿假单胞菌污染情况分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2017(3): 124-126.
- [6] 邓军. 包装饮用水中铜绿假单胞菌的检测方法 [J]. 粮食流通技术, 2016, 1(1): 104-105.
- [7] 臧海竹, 陈雨欣, 周雯, 等. 矿泉水中铜绿假单胞菌定量检验能力验证的结果分析 [J]. 食品与发酵科技, 2020, 56(2): 113-115.
- [8] 张洪伟, 周浩, 朱文斌, 等. 铜绿假单胞菌检测能力验证结果与分析 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(6): 1722-1725.
- [9] 江志杰, 高春. 化妆品中金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌检出能力验证结果与分析 [J]. 香料香精化妆品, 2015, 153(6): 29-32.
- [10] 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范 [Z]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 化妆品微生物标准检验方法绿脓杆菌: GB 7918.3-1987[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987.
- [12] 杨秋玲, 季婧涵, 黄小方, 等. 矿泉水中铜绿假单胞菌检测能力验证结果评价 [J]. 粮食流通技术, 2018(20): 117-119.
- [13] 宋月, 程琨, 梁秀丽, 等. 绿脓杆菌 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 华北农学报, 2014(3): 59-63.
- [14] 李闻, 张伟尉, 刘红艳, 等. 基于 PCR 技术的绿脓杆菌快速检测方法研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(9): 1065-1067.
- [15] 曾绮文, 王青柏, 朱红惠. 三种微生物鉴定技术的分析与应用 [J]. 轻工科技, 2019, 35(12): 20-21, 30.
- [16] 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, 21(2): 16-18.

(文章类别: CPST-A)