

接触皿法表面微生物采样效果的评价

张倍宁¹, 卢勉飞¹, 蔡芷荷¹, 吴清平², 李斌¹, 李艳嫦¹

1. 广东环凯微生物科技有限公司, 广东 广州 510663; 2. 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070

摘要: 目的 评价接触皿作为表面微生物取样和检验方法的适用性。方法 采用 316L 不锈钢板作载体, 以金黄色葡萄球菌 ATCC6538、大肠埃希菌 ATCC25922、枯草芽胞杆菌 ATCC6633、铜绿假单胞菌 ATCC9027 作为细菌的代表菌, 白色念珠菌 ATCC10231、黑曲霉 ATCC16404 作为真菌的代表菌, 在不同含菌量的表面上进行采样, 与淋洗采样法和拭子采样法进行比较, 评价 TSA、NA、SDA 3 种接触皿的采样效果。结果 低含菌量和高含菌量的载体上 TSA 接触皿、NA 接触皿、SDA 接触皿采样, 与淋洗采样和拭子采样比较, 回收率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。接触皿采样、淋洗采样、拭子采样在低含菌量 ($1 \text{ cfu}/25 \text{ cm}^2 \sim 10 \text{ cfu}/25 \text{ cm}^2$) 的物体表面的采样回收率高于在高含菌量 ($50 \text{ cfu}/25 \text{ cm}^2 \sim 100 \text{ cfu}/25 \text{ cm}^2$) 的物体表面的采样回收率, 但均能达到 70% 以上。结论 接触皿采样法与淋洗采样和拭子采样法的采样法效果相当。

关键词: 接触皿; 表面微生物; 回收率

中图分类号: R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-8685(2016)17-2473-04

Validation of the contact plate methods in surface hygiene control

ZHANG Bei-ning*, LU Mian-fei, CAI Zhi-he, WU Qing-ping, LI Bin, LI Yan-e

* Guangdong Huankai Microbial Science and Technology Corporation Limited, Guangzhou, Guangdong 510663, China

Abstract: Objective To evaluate the applicability of contact plate for surface microbial sampling and testing methods. **Methods** 316L stainless steel plates were used as the carrier, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* were used as representative of bacteria, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were used as representative of fungal. To sample in the surface with different bacteria amount, compared to leaching sampling method and swab sampling method, so as to evaluate the sampling efficiency of TSA, NA and SDA. **Results** To sample from TSA contact plate, NA contact plate and SNA contact plate at low level and high level, compared with the leaching method and the swabbing method, and the differences in the recovery rates were statistically significant ($P > 0.05$). The recovery rates of the microorganisms was higher at the low level ($1 \text{ cfu}/25 \text{ cm}^2 \sim 10 \text{ cfu}/25 \text{ cm}^2$) than that at the high level ($50 \text{ cfu}/25 \text{ cm}^2 \sim 100 \text{ cfu}/25 \text{ cm}^2$), but the recovery rates were all above 70%. **Conclusion** The effect was equivalent among the contact plate, drip washing and swabbing methods.

Key Words: Contact plate; Surface microorganisms; Recovery rate

在微生物控制中, 表面微生物总数可以作为评估生产过程中微生物污染风险的级别^[1-3]。表面微生物取样相对比较困难, 微生物附着在物体表面上, 如果采样方法不适合, 很难检测到实际微生物数量^[4]。在实际采样过程中物体表面的材质和粗糙度都有所不同, 不同的污染媒介和微生物都会影响采样结果。拭子采样法于 1997 年被作为定量和半定量表面微生物采样的标准方法, 新版 GMP 和药典中均提及接触皿采样法可作为表面微生物采样方法, 因为接触皿采样法的采样效果在国内还未被有效评估^[5], 因此本研究对接触皿采样法进行评估。

微生物采样涉及医疗、食品卫生、制药工业、航空航天等各个领域, 而物体表面微生物采样更是其中极重要的一个方面^[6]。然而现有的表面微生物采样主要是借助消毒拭子擦拭待检测表面, 再转移到培养皿中进行培养。该方法较为繁琐, 且拭子采样、转移过程可能会导致较大的微生物计数误差。因此, 如何利用更简单、易行、准确的装置来提高表面微生物采样效率成为关键。接触皿采样法的采样流程简单使用方便, 是洁净室进行表面取样的理想选择, 可应用于卫生防疫站、药品检验所、制药厂、食品厂、医院等各单位的实验室设备、车间、人员、包装材料的表面微生物检测。为探讨接触皿采样法的实用价值, 本研究与拭子采样法、淋洗采样法进行比较, 评估了接触皿采样法的采样效果, 为接触皿采样法的推广应用提供借鉴。

基金项目: 广州市发改委生物产业示范工程发展专项(穗发改[2012]243号)

作者简介: 张倍宁(1986-)男, 硕士, 初级工程师, 主要从事微生物检测产品研发工作。

通讯作者: 吴清平 E-mail: wuqp203@163.com

1 材料与方法

1.1 材料 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)

ATCC6538、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) ATCC25922、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC6633、铜绿假单胞菌 ATCC9027(*Pseudomonas aeruginosa*)、白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC10231、黑曲霉(*Aspergillus niger*) ATCC16404。

1.2 仪器与试剂 DNP9162型培养箱(广东环凯微生物科技有限公司); Smartcounter500型菌落计数仪(广东环凯微生物科技有限公司); 316L型不锈钢板(广东环凯微生物科技有限公司); 接触皿(江苏康健医疗用品有限公司)。胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)接触皿(批号: E0589Y); 沙氏葡萄糖琼脂(SDA)接触皿(批号: E0589Y); 营养琼脂(NA)接触皿(批号: E05-95Y); pH=7.0氯化钠蛋白胨缓冲液(批号: 3104420)。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液配制 接种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、枯草芽胞杆菌至胰酪 TSA 斜面中,于30℃~35℃培养18h~24h; 接种黑曲霉、白色念珠菌至SDA斜面中,于23℃~28℃培养48h~72h,上述培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制成每0.1ml含菌数分别为1cfu~10cfu的低浓度菌悬液和50cfu~100cfu的高浓度菌悬液,并在24h内使用。

1.3.2 菌种载体的制备 取面积为25cm²的316L不锈钢板作为载体。载体于染菌前,应进行脱脂和灭菌处理。采用湿热灭菌法(121℃,30min)对经过脱脂处理后的载体进行灭菌处理。将经灭菌的载体平铺于无菌平皿内,逐片滴加菌液,菌液滴加量每片为0.1ml,将菌液均匀擦拭整个载体表面,滴染菌液后于层流台下吹干。

1.3.3 评价法 将制备后的菌种载体分为2组,每组3片~5片,分为取样检测组和实际活菌检测组,同时另取3片未染菌的载体做为阴性对照组。

$$\text{取样回收率} = \frac{\text{待测取样方法检测活菌数} - \text{阴性对照活菌数}}{\text{菌种载体实际活菌数}} \times 100\%$$

取样检测组: 使用待评估的微生物取样方法对菌种载体微生物进行采样,制备供试液后检测各菌种载体上活菌数。

实际活菌检测组: 将菌种载体放入装有100ml生理盐水的烧杯中,使用漩涡振荡器振荡3min后,取出烧杯中的生理盐水作为供试液,采用薄膜过滤法在TSA(细菌)或SDA(霉菌)90cm平板上培养,检测菌种载体上菌落数;分别对3个菌种载体进行检测,以3次检测结果的平均值作为菌种载体的实际活菌数。

阴性对照组: 将未染菌的载体放入装有100ml生理盐水的烧杯中,使用漩涡振荡器振荡3min后,取出烧杯中的生理盐水作为供试液,采用薄膜过滤法分别在TSA及SDA90cm平板上培养,进行活菌计数,以3片未染菌的载体计数结果的平均值作为阴性对照结果。

1.3.3.1 接触皿采样法 TSA、NA和SDA接触皿(φ55mm,面积为25cm²)取下皿盖将培养基凸起面按压到采样物体表面5s~10s后,将皿拿起盖好皿盖,细菌置于30℃~35℃培养48h,真菌于23℃~28℃培养72h观察计数。TSA接触皿测试菌种为金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、枯草芽胞杆菌、黑曲霉、白色念珠菌;NA接触皿测试菌种为金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、枯草芽胞杆菌;SDA接触皿测试菌种为黑曲霉、白色念珠菌。

1.3.3.2 淋洗采样法 将20ml生理盐水缓缓倾注到装有菌种载体的平皿中,倾注时注意液体倾注点处于菌种载体中心位置,全部倾注后,将无菌平皿轻轻向上下左右各晃动5次,晃动幅度大概在2cm~3cm,之后使用移液枪将平皿中的生理盐水全部取出,作为供试液,取10ml进行活菌计数,采用薄膜过滤法,滤干后取出滤膜,细菌滤面朝上贴于TSA90cm平板和NA90cm平板上,真菌滤面朝上贴于SDA90cm平板上,细菌置于30℃~35℃培养48h,真菌于23℃~28℃培养72h观察计数。计数结果的2倍为淋洗取样活菌计数结果。

1.3.3.3 拭子采样法 取无菌拭子,用无菌的0.9%氯化钠溶液5ml浸湿,在取样点处选择约为25cm²取样面上擦拭,完成后迅速将拭子放入无菌试管中并密封,加入10ml0.9%生理盐水,使用漩涡振荡器充分振荡后作为供试液,取5ml进行活菌计数采用薄膜过滤法过滤,滤干后取出滤膜,细菌滤面朝上贴于TSA90cm平板和NA90cm平板上,真菌滤面朝上贴于SDA90cm平板上,细菌置于30℃~35℃培养48h,真菌于23℃~28℃培养72h观察计数。计数结果的2倍为擦拭取样活菌计数结果^[7-8]。

1.4 统计学处理 回收率以3次实验测试值的平均值计,标准要求:回收率≥70%^[9]。数据分析采用SPSS11.0软件。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TSA接触皿采样评估结果 TSA接触皿采样对目标菌金黄色葡萄球菌ATCC6538、大肠埃希菌ATCC25922、枯草芽胞杆菌ATCC6633、铜绿假单胞菌ATCC9027、白色念珠菌ATCC10231、黑曲霉ATCC16404低染菌量时的采样平均回收率分别为89.3%、90.7%、86.2%、89.7%、86.8%、87.7%,高染菌量时的采样平均回收率分别为81.1%、78.4%、72.6%、78.3%、77.9%、76.3%。统计学分析表明,低含菌量和高含菌量的载体上采样TSA接触皿采样和淋洗采样与拭子采样比较,回收率差异无统计学意义(P>0.05)。TSA接触皿采样、淋洗采样、拭子采样在高含菌量的物体表面的采样回收率低于在低含菌量的物体表面的采样回收率,差异有统计学意义(P<0.05)(表1)。

表1 TSA接触皿取样平均回收率($\bar{x} \pm s, \%$)

菌种	低含菌量(1 cfu/25 cm ² ~ 10 cfu/25 cm ²)			高含菌量(50 cfu/25 cm ² ~ 100 cfu/25 cm ²)		
	接触皿采样	淋洗采样	拭子采样	接触皿采样	淋洗采样	拭子采样
大肠埃希菌 ATCC25922	89.3 ± 0.76	87.2 ± 2.76	87.3 ± 1.99	81.1 ± 0.66	78.4 ± 0.46	78.9 ± 0.84
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	90.7 ± 1.11	92.2 ± 0.60	91.1 ± 0.38	78.4 ± 1.57	78.5 ± 0.78	77.1 ± 0.60
铜绿假单胞菌 ATCC9027	86.2 ± 0.35	88.6 ± 0.56	87.0 ± 0.46	72.6 ± 0.81	72.7 ± 0.82	71.6 ± 0.96
枯草芽胞杆菌 ATCC6633	89.7 ± 0.92	90.2 ± 0.87	88.7 ± 0.98	78.3 ± 0.38	77.4 ± 2.89	76.0 ± 0.51
白色念珠菌 ATCC10231	86.8 ± 1.17	86.0 ± 1.37	87.2 ± 0.50	77.9 ± 0.45	76.0 ± 2.64	78.0 ± 1.60
黑曲霉 ATCC16404	87.7 ± 1.04	88.0 ± 1.11	85.7 ± 3.69	76.3 ± 0.75	76.2 ± 2.20	76.6 ± 4.01

2.2 NA接触皿采样评估结果 NA接触皿采样对目标菌金黄色葡萄球菌 ATCC6538、大肠埃希菌 ATCC-25922、枯草芽胞杆菌 ATCC6633、铜绿假单胞菌 ATCC-9027 低染菌量时的采样平均回收率分别为 85.7%、81.4%、81.0%、82.4% 高染菌量时的采样平均回收率分别为 79.7%、74.4%、77.6%、77.2% NA接触皿在低含菌量和高含菌量的载体上采样,回收率均能达

到70%以上。统计学分析表明,低含菌量和高含菌量的载体上采样 NA接触皿采样和淋洗采样与拭子采样比较,回收率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。NA接触皿采样、淋洗采样、拭子采样在高含菌量的物体表面的采样回收率低于在低含菌的物体表面的采样回收率,差异有统计学意义($P < 0.05$) (表2)。

表2 NA接触皿取样平均回收率($\bar{x} \pm s, \%$)

菌种	低含菌量(1 cfu/25 cm ² ~ 10 cfu/25 cm ²)			高含菌量(50 cfu/25 cm ² ~ 100 cfu/25 cm ²)		
	接触皿采样	淋洗采样	拭子采样	接触皿采样	淋洗采样	拭子采样
大肠埃希菌 ATCC25922	85.7 ± 0.85	83.7 ± 2.10	87.0 ± 1.93	79.7 ± 1.01	76.6 ± 4.61	78.7 ± 1.10
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	81.4 ± 0.76	80.4 ± 2.68	79.7 ± 4.50	74.4 ± 0.86	75.7 ± 2.30	76.8 ± 14.83
铜绿假单胞菌 ATCC9027	81.0 ± 0.50	80.4 ± 3.80	81.6 ± 1.85	77.6 ± 0.70	75.0 ± 2.57	75.9 ± 2.72
枯草芽胞杆菌 ATCC6633	82.4 ± 4.85	82.9 ± 2.10	83.4 ± 5.38	77.2 ± 1.44	74.6 ± 2.08	75.2 ± 4.47

2.3 SDA接触皿采样评价结果 SDA接触皿采样对目标菌白色念珠菌 ATCC10231、黑曲霉 ATCC16404 低染菌量时的采样平均回收率分别为 78.6%、79.4% 高染菌量时的采样平均回收率分别为 72.0%、75.7% , SDA接触皿在低含菌量和高含菌量的载体上采样,回收率均能达到70%以上。统计学分析表明,低含菌量

和高含菌量的载体上采样 SDA接触皿采样和淋洗采样与拭子采样比较,回收率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。SDA接触皿采样、淋洗采样、拭子采样在高含菌量的物体表面的采样回收率低于在低含菌量的物体表面的采样回收率,差异有统计学意义($P < 0.05$) (表3)。

表3 SDA接触皿取样平均回收率($\bar{x} \pm s, \%$)

菌种	低含菌量(1 cfu/25 cm ² ~ 10 cfu/25 cm ²)			高含菌量(50 cfu/25 cm ² ~ 100 cfu/25 cm ²)		
	接触皿采样	淋洗采样	拭子采样	接触皿采样	淋洗采样	拭子采样
白色念珠菌 ATCC10231	78.6 ± 0.85	76.1 ± 2.26	75.6 ± 2.14	72.0 ± 0.45	71.9 ± 1.38	72.9 ± 1.42
黑曲霉 ATCC16404	79.4 ± 0.71	78.1 ± 2.62	80.3 ± 2.78	75.7 ± 1.65	74.4 ± 1.30	74.6 ± 3.03

3 讨论

在食品药品企业生产车间,生产工具、仪器设备表面的微生物含量直接影响产品的最终质量^[10],拭子采样法是一种较早用于表面微生物检测的方法,但是由于拭子检测法需要将拭子上的微生物转移至培养基中,不仅增加了检测步骤,而且容易在转移过程

中产生假阳性^[11]。接触皿采样法作为一种表面微生物检测方法,不仅便于使用节省人力且对使用条件要求较低,例如不需要高压灭菌锅、超净台等,因此接触皿用于表面微生物的检测更加方便快捷^[12]。

本研究评估 TSA、NA、SDA 3种接触皿的采样效果,同时与拭子采样法、淋洗采样法的采样回收率进行比较,由试验结果可知当载体为 316L 不锈钢,TSA、

NA、SDA 3 种接触皿采样方法对 4 株细菌及 2 株真菌的采样回收率均能到达 70% ,且与拭子采样法、淋洗采样法的采样回收率差异无统计学意义。但是 ,接触皿采样、淋洗采样、拭子采样在高含菌量的物体表面的采样回收率低于在低含菌量的物体表面的采样回收率 ,因此当被检测物体表面洁净度较低 ,表面微生物含量过多时(>100 cfu/25 cm²) 会影响表面微生物采样回收率。

表面微生物采样比较困难 ,附着在物体表面上的微生物如果没有有效的采样方法是检测不到的 ,因此选择一种合适的表面微生物采样方法至关重要。接触皿作为一种方便快捷的表面微生物采样方法 ,其采样回收率与传统表面微生物采样方法(拭子采样、淋洗采样) 相当 ,将在食品药品行业得到广泛应用。

参考文献

[1] Salo S , Laine A , Alanko T , *et al.* Validation of the microbiological methods hygcult dipslide μ contact plate and swabbing in surface hygiene control: a nordic collaborative study [J]. *J Aoac Int* , 2000 , 83(6) : 1357 - 1366.
 [2] Scott E , Bloomfield SF , Barlow CG. A comparison of contact plate and calcium alginate swab techniques for quantitative assessment of bacteriological contamination of environmental surfaces [J]. *J Appl Bacteriol* , 1984 , 56(2) : 317 - 320.
 [3] Niskanen A , Pohja MS. Comparative studies on the sampling and

investigation of microbial contamination of surfaces by the contact plate and swab methods [J]. *J Appl Bacteriol* , 1977 , 42(1) : 53 - 63.
 [4] Rubbo SD , Dixon S. A contact plate technique for determining bacterial contamination of fabrics [J]. *Lancet* , 1960 , 2(7147) : 394 - 397.
 [5] Naoto O , Yasuhiro S , Toshio O , *et al.* Characteristics of New Contact Plate Prepared with Native Gellan Gum [J]. *Food Sci Technol Res* , 2008 , 14 (4) : 403 - 408.
 [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 年版二部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1.
 [7] 苏德模, 马续荣. 药品微生物学检验技术 [M]. 北京: 华龄出版社, 2007: 307 - 318.
 [8] 药品生物制品鉴定所. 中国药品检验标准操作规范(2005) [M]. 北京: 中国医药科技电子出版社, 2005: 8.
 [9] 刘杰. 关于制药设备清洁验证中表面微生物擦拭取样方法和检验方法的验证实验 [J]. *当代化工* , 2012 , 41(10) : 1009 - 1013.
 [10] Schrezenmeier H , Walther - Wenke G , Muller TH , *et al.* Bacterial contamination of platelet concentrates: results of a prospective multicenter study comparing pooled whole blood - derived platelets and apheresis platelets [J]. *Transfusion* , 2007 , 47: 644 - 652.
 [11] 朱立苇, 杨雪梅, 徐露勤, 等. 采用接触式培养皿和显色培养基进行采血人员手部消毒效果监测 [J]. *中华医院感染学杂志* , 2010 , 20(7) : 972 - 974.
 [12] 何红燕, 林伟青, 黄雪琴, 等. 手污染的控制与医院的预防 [J]. *中华医院感染学杂志* , 2008 , 18(10) : 1407 - 1409.
 收稿日期: 2016 - 03 - 01

(上接第 2472 页)

2.6 重复性试验 取同一批号保健品样品 6 份 ,按 1.2.2 中的方法制备供试品溶液 ,分别在 1.2.1 色谱条件下进样 ,结果以洛伐他汀内酯型和酸式峰面积之和计算 ,测定结果的 RSD 为 1.58% 。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h 条件下 ,按上述方法进行测定。结果表明 ,供试品在 6 h 内未发生明显变化。洛伐他汀内酯型和酸式峰面积之和的 RSD 为 4.48% 。

2.8 加标回收实验 取已知浓度的样品 ,分别加入高、中、低 3 种浓度的洛伐他汀(内酯) 标准溶液进行测定 ,计算回收率 ,结果平均回收率为 99.3% ,RSD 为 2.15% (表 1) 。

表 1 洛伐他汀回收率试验结果

加标量(μ g)	测定值(μ g)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
200	193	96.5	99.3	2.15
	206	103.0		
	198	99.0		
400	396	99.0		
	395	98.8		
	388	97.0		
800	806	100.8		
	784	98.0		
	814	101.8		

3 结 论

本文建立的超高效液相色谱法检测保健食品中洛伐他汀含量 ,样品处理方法简单 ,操作简便快速、结果准确 ,极大地提高了工作效率 ,节约实验成本 ,适用于保健食品中洛伐他汀的常规检测及质量监管。

参考文献

[1] Kobashigawa JA , Katznelson S , Laks H , *et al.* Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation [J]. *N Engl J Med* , 1995 , 333(10) : 621 - 627.
 [2] Rajh SJ , Kreft S , Štrukelj B , *et al.* Comparison of CE and HPLC methods for determining lovastatin and its oxidation products after exposure to an oxidative atmosphere [J]. *Croatica Chemica Acta* , 2003 , 76(3) : 263 - 268.
 [3] 中华人民共和国卫生部. 保健食品评价与检验技术规范(2003 版) [Z]. 2003 - 02 - 14.
 [4] 中华人民共和国国家发展和改革委员会. QB/T 2847—2007 功能性红曲米(粉) [S]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
 [5] 汪静. HPLC 法同时测定红曲中两种构型洛伐他汀的含量 [J]. *浙江中西医结合杂志* , 2014 , 24(3) : 273 - 274.
 [6] 李雪梅, 薛岚, 符鹏, 等. HPLC 法测定血脂康胶囊中洛伐他汀和洛伐他汀酸的含量 [J]. *中国药师* , 2012 , 15(2) : 164 - 166.
 [7] 王丽娟, 陈四喜, 杨雁冰, 等. HPLC 法测定血脂康胶囊中 Monacolin 类成分的含量 [J]. *中国疗养医学* , 2015(5) : 479 - 481.
 收稿日期: 2016 - 03 - 22