

菌落总数质控样的制备及其在能力验证中的应用

陈怡文¹, 张晓东¹, 宋佳兴², 刘雅丹¹, 赵 萌¹, 余 文¹, 任 秀¹, 崔生辉^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 北京三药科技开发公司, 北京 100176)

摘 要: **目的** 制备均匀性和稳定性符合能力验证要求的质控样品, 并将质控样品用于菌落总数的能力验证。**方法** 本次考核样品由高浓度(3×10^4 CFU)、低浓度(1×10^4 CFU)2 个样品组成, 随机抽取质控样品进行稳定性及均匀性的检验, 对其进行评价。本设计通过对实验室进行随机分组来发放样品, 防止能力验证活动中各实验室进行串通。**结果** 65 家实验室参加本次考核活动, 整体满意率为 80%, 本次能力验证可以真实地反映参试单位的检测水平。**结论** 本次菌落总数能力验证样品可用于质控样品使用。

关键词: 菌落总数; 能力验证; 质控样品

Preparation of the quality control samples for aerobic plate count and the application in the proficiency test

CHEN Yi-Wen¹, ZHANG Xiao-Dong¹, SONG Jia-Xing², LIU Ya-Dan¹, ZHAO Meng¹, YU Wen¹,
REN Xiu¹, CUI Sheng-Hui^{*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Beijing SanYao Science & Technology Development Co., Beijing 100176, China)

ABSTRACT: Objective To prepare quality control samples with uniformity and stability those meet the requirements for proficiency testing, and verify the ability of the quality control samples for the total number of colonies. **Methods** The test samples were composed of 2 samples with high concentration (3×10^4 CFU) and low concentration (1×10^4 CFU). Randomly selected samples were tested the stability and uniformity. This design distributed samples by randomly grouping laboratories to prevent collusion in laboratories in proficiency testing activities. **Results** Totally 65 laboratories participated in this proficiency test, 80% of the laboratories with excellent results. This proficiency test could truly reflect the detection level of the participating units. **Conclusion** This verification samples of total number of colony can be used for quality control samples.

KEY WORDS: aerobic plate count; proficiency test; quality control samples

1 引 言

菌落总数是指食品经过处理, 在一定条件下(如培养基、培养温度和培养时间等)培养后, 所得每 g(mL)食品中形成的微生物菌落总数^[1]。菌落总数测定是用来判定食品

样品被微生物污染的程度及卫生质量, 尤其某些对环境因素(如干燥、加热等)抵抗力强的微生物(如芽孢类)可在食品样品中长期存活, 此检测结果常常是食品样品生产加工过程中卫生状况的客观记录, 检测结果可用于评价被检样品的卫生学状况, 菌落总数的多少在一定程度上标志着食品

基金项目: 科技部“食品安全关键技术研发”重点专项项目(2017YFC1601400)

Fund: Supported by the Special Program for Key Technology in Food Safety of the Ministry of Science and Technology of China(2017YFC1601400)

*通讯作者: 崔生辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物与食品安全。E-mail: cuishenghui@aliyun.com

*Corresponding author: CUI Sheng-Hui, Ph.D, Professor, State Key Laboratory of Food Science and Technology, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: cuishenghui@aliyun.com

样品在生产、运输、储存等环节卫生质量的优劣^[2,3]。食品中的菌落总数严重超标, 可以反映出其产品的卫生状况不能达到基本的卫生要求, 食品失去了食用价值, 同时会导致消费者在使用时, 引发各种肠道疾病, 可能出现呕吐、发烧、腹泻等症状, 严重危害消费者身体健康^[4,5]。对菌落总数进行检测, 具有卫生学意义。

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^[6]。实验室比对通过 2 个或以上的实验室对相同或相似的样品进行检测, 对参试结果进行评价, 是国际通行的实验室质量控制和认可机构确认实验室能力的有效技术手段。ISO/IEC17025:2005 规定实验室需对其检验能力进行证明^[7]。而实验室间比对作为一个独立的手段可以证明实验室检验结果的可靠性^[8]。参加比对实验室可根据结果中反映出的问题, 及时采取纠正措施, 进一步提高在食品领域的检测水平, 纠正自身存在的问题^[9]。

质控样品的均匀性和稳定性是能力验证项目实施的关键, 本研究通过控制菌落总数样品的均匀性和储藏、运输稳定性来确保质控样品能够满足能力验证的要求。本次能力验证样品, 设置了高、低浓度样品进行检测。低浓度接近 GB 10765-2010 最高检出限的浓度, 根据 ISO/TS 22117:2010 的结果评价准则对考核的结果进行评价^[10], 可以为其他实验室提供能力验证样品。

2 材料与方法

2.1 仪器与设备

HETO POWER DRY LL1500 冷冻干燥机、Thermo1389 生物安全柜、Thermo Scientific 恒温培养箱、FORMA INCUBATED BENCHTOP 恒温摇床(美国 Thermo 公司); METTLER TOLEDO PL2002 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); HYC-940 全自动微生物螺旋加样系统(西班牙 IUL 公司)。

2.2 培养基与菌种

PCA 培养基(批号: 24794, 美国 BD 公司); TSA 培养基(批号: 236950, 美国 BD 公司)。能力验证所用菌株为地衣芽孢杆菌 BL63516 和蜡样芽孢杆菌 CMCC63511, 本实验室储存。

2.3 实验方法

2.3.1 质控样品的生产制备

将地衣芽孢杆菌 BL63516 和蜡样芽孢杆菌 CMCC63511 分别划线接种于 TSA 平板, 36 °C 培养过夜。用无菌棉签从平板上刮取菌苔, 按 1:1000 比例加入 5% 蔗糖-5%脱脂乳粉中, 混匀, 经过 10 μm 滤膜过滤后, 进行冷冻干燥后, 真空密封于西林瓶中^[11]。依此方法制备 3×10^4 CFU 的高浓度样品和 1×10^4 CFU 的低浓度样品。

2.3.2 样品的均匀性验证

将 25 g 奶粉混入 225 mL 生理盐水中, 充分拍击混匀。随机抽取高、低浓度的质控样品各 20 瓶, 每瓶加入 1 mL 生理盐水, 将质控样品充分溶解, 混匀后, 加入 225 mL 混合样中, 拍击混匀。进行 10 倍系列梯度稀释, 取原液, 10^{-1} 、 10^{-2} CFU 菌悬液 1 mL 加入空白平板中, 用 PCA 培养基倾注平板, 混匀, 静置 10 min 后, 置于 36 ± 1 °C 培养 18~24 h。进行菌落计数。

2.3.3 对模拟运输条件的温度监测

菌落总数质控样品运输包装采用加冰袋的厚泡沫箱, 放置室温环境模拟运输环境。泡沫箱厚度为 6 cm, 冰袋重量为 1.5 kg, 用胶带对泡沫箱进行密封, 放置于室温环境, 应用 DataTrace 系统对泡沫箱内温度变化进行实时监控。

2.3.4 运输条件稳定性模拟实验

质控样品一般 3 d 内发送至全国各地, 考虑到实际可能发生的各种情况, 模拟实验周期设为 1 周。高、低浓度样品分别保存在 37、25 和 4 °C 环境下, 每次随机挑选 3 个样品进行实验。以验证运输时菌落总数质控样品的稳定性能否满足考核要求。

2.3.5 储藏稳定性的模拟实验

收到考核样后, 推荐保存温度为 -25 °C。将制备的高、低浓度质控样品保存于 -25 °C, 于发样前和收到结果后, 随机挑选 3 个样品进行实验。

2.4 考核方案的设计

2.4.1 考核样品

考核样品包括 2 瓶菌落总数样品, 2 袋 25 g 奶粉样品。考核样品设置 2 个浓度水平, 奶粉于 60 °C 烘烤 3 d 进行处理。

2.4.2 样品的发放

对全国 65 家实验室进行样品发放。将发放的样品西林瓶固定在有海绵缓冲的小方盒中, 再置于塑封袋中, 放入泡沫箱, 在箱中加入 1.5 kg 的冰袋和干冰, 用胶带密封好, 放入运输箱中。

2.4.3 测定方法

参照 GB 4789.2-2016 对质控样品进行检测, 实验室根据日常检测的要求选择培养基进行检测。

2.4.4 防止数据串通的措施

对实验室进行随机编码, 并将打乱的编码随机分为 3 组, 各实验室需报告 2 个样品菌落总数及其对应的样本编号。每组可能收到样品组合可能为高、高浓度, 低、低浓度和高、低浓度。因为分组采样随机分组, 则各实验室之间的结果不能互相作为参考, 可以有效的防止实验室间的数据串通。

2.4.5 结果的评价原则

对实验室报送的结果, 经过对数转换后按下列公式计算 $|\bar{z}|$ 值:

$$z=(x-X)/\sigma$$

式中: x -实验室测试结果;

X -指定值;

σ -变动性度量值;

“满意”结果应符合: 2 个浓度样品结果 $|z|\leq 2$; 或 1 个结果 $2<|z|<3$; “不满意”结果为任意浓度样品结果 $|z|\geq 3$; 或 2 组浓度样品结果 $2<|z|<3$;

3 结果与分析

3.1 样品均匀性的检验结果

对 20 瓶高浓度样品和 20 瓶低浓度样品均匀性检测, 样品中菌落总数的平均值分别为 3.34×10^4 CFU 和 1.05×10^4 CFU。根据 SPSS 软件计算, 高浓度样品和低浓度样品的 F 值分别为 1.193 和 1.027, 均小于 $FINV(0.05, 19, 20)$ 临界值 2.137009, 表明该样品符合均匀性的要求^[11]。

3.2 运输条件模拟实验的温度监测结果

模拟运输条件, 泡沫箱内的温度变化如图 1 所示, 在室温为 25 °C 时, 根据图 1 的温度变化曲线可以发现, 在 3 d 内保证样品处于 4 °C 以下。发送样品的时间为 10 月中旬, 实际的运输条件下, 温度一般不会达到 25 °C。结合运输稳定性数据, 本次样品能够满足能力验证对运输稳定性的要求。

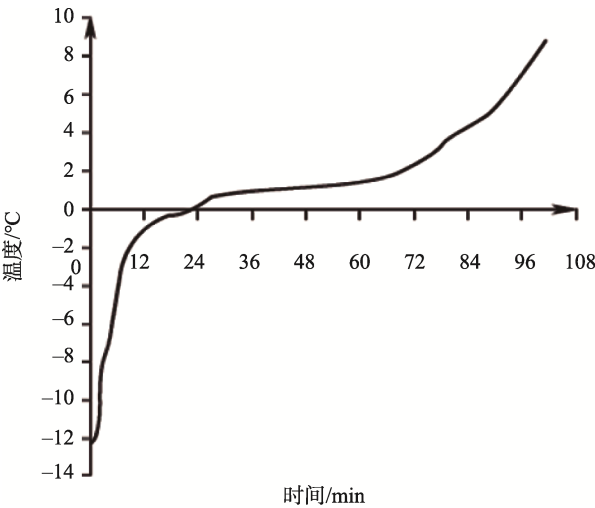


图1 6 cm 泡沫箱放置 1.5 kg 冰袋于 25 °C 环境中箱内的温度变化
Fig.1 Temperature change in the box at 25 °C in a 6 cm foam box with a 1.5 kg ice pack

3.3 质控样品运输稳定检验

根据 CNAS-GL03 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南 $|\bar{x}-\bar{y}|\leq 0.3\sigma$ 准则进行判定($\bar{x}$ 为均匀性检验的总平均值; $\bar{y}$ 为稳定性检验时, 对随机抽取的样品测量平均值; σ 为该能力验证计划的能力评价标准偏差目标

值, 根据以往的能力验证经验, 根据本次样品中的菌的含量将 σ 确定为 0.25)。高浓度和低浓度样品的 $|\bar{x}-\bar{y}|$ 见表 1。结果显示: 在 25 °C 条件下, 高浓度样品 3 d 内考核样的稳定性情况良好, 而第 5 d 稳定性降低, 出现不稳定现象; 低浓度样品 14 d 内稳定情况均良好。在 37 °C 条件下, 高浓度样品第 7 d 出现一次不稳定情况, 低浓度样品 14 d 内稳定情况均良好。在 4 °C 条件下, 高浓度和低浓度样品, 14 d 内数值均保持稳定。

表 1 高、低浓度样品运输稳定性
Table 1 Stability of sample with high and low concentrations

监测时间/d	高浓度结果($ \bar{x}-\bar{y} $)			低浓度结果($ \bar{x}-\bar{y} $)		
	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C
1	0.02	0.03	0.00	0.01	0.01	0.02
3	0.04	0.06	0.05	0.02	0.00	0.04
5	0.03	0.09	0.02	0.02	0.04	0.02
7	0.00	0.07	0.08	0.04	0.03	0.02
14	0.01	0.03	0.06	0.03	0.01	0.05

3.4 质控样品储存稳定检验

与上文运输稳定性评价原则一致, $|\bar{x}-\bar{y}|\leq 0.3\sigma$ 准则进行判定。表 2 中 $|\bar{x}-\bar{y}|$ 的值均小于 0.3σ , 所以样品储存在-25 °C, 稳定性可以满足此次能力验证的要求。

表 2 -25 °C 菌落总数高、低浓度样本的保藏稳定性检验结果
Table 2 Stability of sample with high and low concentrations in -25 °C

监测时间/d	高浓度结果($ \bar{x}-\bar{y} $)	低浓度结果($ \bar{x}-\bar{y} $)
发样前	0.02	0.01
回收结果后	0.01	0.03

3.5 65 家实验室考核结果

全国 25 个省(市)、自治区共 65 家实验室报名参加本次能力验证计划, 63 家实验室在规定时间内上报结果及原始记录。行业和地域分布见表 3, 其中食药系统 42 家, 第三方检测实验室 13 家, 其他检测机构 10 家, 本次能力验证主要以食药系统实验室为主。

在参加能力验证的 65 家实验室中, 按照评价的原则 52 家结果评定为满意。整体满意率为 80%, 不合格率 17%, 2 家实验室退出本次能力验证。食药系统实验室 42 家实验室中, 36 家结果为满意, 满意率 86%。

4 结论与讨论

(1) 比对样品的一致性对利用实验室间比对进行能力验证至关重要。在实施能力验证计划时, 组织方应确

保能力验证中出现的不满意结果不归咎于样品之间或样品本身的变异性, 因此样品的均一性和稳定性对能力验证结果至关重要^[12,13]。通过对菌落总数质控样高浓度、低浓度组均一性和储藏稳定性以及运输稳定性的检查, 表明其可满足定性质控样品的要求, 可用于实验室能力验证考核。

表 3 参加能力验证计划实验室地域和行业分布
Table 3 Participate in lab geography and industry distribution

省(市)自治区	食药系统	第三方检测机构	其他	总数
北京	—	—	1	1
安徽	1	—	—	1
甘肃	2	—	—	2
广东	2	1	—	3
广西	3	1	—	4
贵州	2	—	—	2
河北	1	1	—	2
海南	2	—	—	2
河南	2	—	—	2
黑龙江	2	6	1	9
湖北	1	1	—	2
湖南	1	—	—	1
吉林	1	—	—	1
江苏	2	1	—	3
辽宁	1	—	—	1
内蒙古	1	—	—	1
山东	4	1	1	6
山西	1	—	—	1
陕西	2	—	1	3
四川	2	—	—	2
天津	—	—	1	1
西藏	—	—	1	1
新疆	3	—	—	3
云南	4	—	—	4
浙江	2	1	4	7
总计	42	13	10	65

(2) 实验结果的偏差可能存在多种不同的原因^[14,15]。低浓度样品不满意率较高, 7 家不满意实验室均是由于低浓度样品数值偏差较大产生的。低浓度样品结果偏高是由于与高浓度样品间的交叉污染, 或培养时出现杂菌。低浓度样品结果偏低是由于在与奶粉进行混匀时没有

混合均匀, 使得所取的 1 mL 样品中菌落总数数值偏低。

(3) 能力验证是实验室检测质量监控的重要手段, 又是政府和社会了解实验室检测能力的重要方法^[5]。在本次能力验证报名中, 大部分报名的系统为药检系统, 第三方检验机构报名数次之。对参加实验室考核结果的评价, 从总体上看 65 家实验室中, 52 家结果评定为满意, 两家实验室退出, 11 家结果为不满意, 整体满意率为 80%, 结果不符合预期目标, 需要各实验室加大管理。7 家不满意实验室为药检系统; 在药检系统内部省级实验室的成绩优于地市级的实验室, 地方药检系统的检验能力还需加强。

参考文献

[1] 国家食品药品监督管理总局[EB/OL]. [2019-02-07]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1667/>.
China Food and Drug Administration [EB/OL]. [2019-02-07]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1667/>.

[2] GB 4789.2-2016 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
GB 4789.2-2016 Food microbiological examination-Aerobic plate count [S].

[3] 国家食品药品监督管理总局科技和标准司. 微生物检验方法 食品安全国家标准实操指南[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017.
Department of Science, Technology and Standards of China Food and Drug Administration. Food microbiological examination, operation manual [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2017.

[4] Morton RD. Compendium of methods for the microbial examination of foods, 4th ed. [M]. Washington: American Public Health Association, 2001.

[5] Ilva ND. Microbiological examination methods of food and water: A laboratory manual [M]. Florida: CRC Press, 2013.

[6] CNAS-RL 02: 2007 能力验证规则[S].
CNAS-RL 02: 2007 Rules for proficiency testing [S].

[7] ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S].

[8] 骆海朋, 陈怡文, 权雅茹, 等. 沙门氏菌质控样的研制及其在能力验证中的应用[J]. 中国药事, 2014, 28(9): 995-1000.
Luo HP, Chen YW, Quan YR, et al. The studies of the quality control samples of Samonella and the application in the proficiency test [J]. Chin Pharm Aff, 2014, 28(9): 995-1000.

[9] 刘雅丹, 项欣华, 毛歆, 等. 2013-2014 年食药系统食品检测能力验证活动浅析[C]. 中国药学会第二届药物检测质量管理学术研讨会论文集, 2015.
Liu YD, Xiang XH, Mao X, et al. Analysis of the food proficiency testing (PT) ability in OFMCL from 2013 to 2014 [C]. Second Symposium on Quality Management of Drug Detection by the Chinese Pharmaceutical Society, 2015.

[10] ISO/TS 22117: 2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison [S].

[11] 温朗聪, 袁杰利, 卢行安, 等. 冻干微生物与保护剂[J]. 中国微生物生态学杂志, 1997, 9(1): 56.

- Wen LC, Yuan JL, Lu XA, *et al.* Freeze-dried microorganisms and protectors [J]. Chin J Microecol, 1997, 9(1): 56.
- [12] CNAS-GL 03: 2006 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S].
CNAS-RL 03: 2006 Guidelines for evaluating the homogeneity and stability of capability-verified samples [S].
- [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]. 中国微生物学杂志, 2003, 15(1): 33-34.
Lu XA, Zheng J, Cao ZJ, *et al.*, The study of homogeneity of microbiological proficiency testing matrix [J]. Chin J Microecol, 2003, 15(1): 33-34.
- [14] Augustin JC, Carlier V. Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: Analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts [J]. Food Microbiol, 2005, (23): 1-38.
- [15] 刘淑艳, 王刚, 于珂, 等. 食品微生物多轮次能力验证方案初探[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(1): 50-55.
Liu SY, Wang G, Yu K, *et al.* A preliminary study on the food

microbiological multi-round proficiency testing program [J]. Chin J Food Hyg, 2012, 24(1): 50-55.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



陈怡文, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品微生物。
E-mail: cyw5437@126.com



崔生辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物与食品安全。
E-mail: cuishenghui@aliyun.com

食品接触材料研究专题征稿函

食品与药品接触材料是指用于制造食品包装容器和构成食品包装的材料总称, 包括纸、塑料、金属、玻璃、陶瓷等原材料以及粘合剂, 涂覆材料等各种辅助材料。食品与药品包装是食品的重要组成部分, 具有保护食品与药品不受外来生物、化学和物理因素的影响, 维持食品与药品质量稳定的特点。为了满足各种食品与药品的包装要求, 接触材料必须具备适当的阻隔性、足够的机械强度、化学稳定性、耐高温及光学性能等多种性能。此外, 当接触材料直接与食品、药品接触时, 有些物质会迁移渗透到食品、药品中, 可能导致食品、药品的安全隐患。因此, 食品与药品接触材料的安全问题也显得尤为重要。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品接触材料研究”专题, 由华南农业大学 向红 教授担任专题主编, 主要围绕食品接触材料的制备、性能(机械性能、阻隔性、化学稳定性、抗菌性及其他性能)、接触材料中有害物质的检测及其向食品中的迁移行为、绿色及智能接触材料的研究与开发等方面或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 学报主编吴永宁技术总师和专题主编向红 教授特邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划在 2019 年 9 月正刊出版, 请在 2019 年 7 月 20 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。希望您能够通过各种途径宣传此专题, 并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。感谢您的参与和支持!

投稿方式: 备注“2019 专题: 食品接触材料研究”

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部