

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240626002

鱼肉中金黄色葡萄球菌标准样品的研制

郑效梅¹, 李雨晴¹, 余丽波¹, 贾景建¹, 张苗¹, 孙孟娇¹, 蒋劲谦¹, 陈冬东^{2*}

[1. 中检科(北京)测试认证有限公司, 北京 100176; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176]

摘要: **目的** 研制鱼肉中金黄色葡萄球菌标准样品。**方法** 将一定浓度的金黄色葡萄球菌的菌悬液与10%的海藻糖溶液混合均匀, 和经辐照灭菌的鱼肉按照1:2 (*V:m*)的比例分别分装到西林瓶中, 采用真空冷冻干燥技术制备鱼肉中金黄色葡萄球菌的标准样品, 采用单因素方差分析法, 通过*F*检验和*t*检验对样品的均匀性和稳定性进行评估。**结果** 经分析, $S_{bb}(\text{均匀性})=0.023<0.3\sigma$, $S_{bb}(\text{短期稳定性})=0.019<0.3\sigma$, $S_{bb}(\text{长期稳定性})=0.021<0.3\sigma$ (σ 采用国际通用的标准差0.25), 同时, $|\beta_1|$ 均小于*t*检验值, 不确定度为 $0.186 \log_{10}\text{CFU/mL}$ ($k=2$)。**结论** 实验数据表明, 此次采用10%的海藻糖浓度以及真空冷冻干燥的方式研制出的鱼肉中金黄色葡萄球菌标准样品的均匀性和稳定性良好, 满足预期用途, 能够进行下一步研制。

关键词: 鱼肉; 金黄色葡萄球菌; 标准样品

Development of reference material of *Staphylococcus aureus* in fish

ZHENG Xiao-Mei¹, LI Yu-Qing¹, YU Li-Bo¹, JIA Jing-Jian¹, ZHANG Miao¹,
SUN Meng-Jiao¹, JIANG Shao-Qian¹, CHEN Dong-Dong^{2*}

[1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine (Beijing) Testing and Certification Co., Ltd, Beijing 100176, China;
2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China]

ABSTRACT: Objective To develop reference material of *Staphylococcus aureus* in fish. **Methods** A certain concentration of *Staphylococcus aureus* bacterial suspension was mixed with 10% trehalose solution, and the irradiated fish meat was divided into vials at a ratio of 1:2, and the reference material of *Staphylococcus aureus* in fish meat were prepared by vacuum freeze-drying technology, the one-way analysis of variance method was used to evaluate the homogeneity and stability of the samples by *F*-test and *t*-test. **Results** After analysis, $S_{bb}(\text{uniformity})=0.023<0.3\sigma$ and $S_{bb}(\text{short-term stability})=0.016<0.3\sigma$, $S_{bb}(\text{long-term stability})=0.021<0.3\sigma$ (σ using the international standard deviation of 0.25), and $|\beta_1|$ is less than *t*-test, and the uncertainty is $0.186 \log_{10}\text{CFU/mL}$ ($k=2$). **Conclusion** The experimental data show that the reference material of *Staphylococcus aureus* in fish meat developed by 10% trehalose concentration and vacuum freeze-drying has good uniformity and stability, which meets the intended use and can be developed in the next step.

KEY WORDS: fish; *Staphylococcus aureus*; reference material

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100805)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1100805)

*通信作者: 陈冬东, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: chendd@acas.com.cn

*Corresponding author: CHEN Dong-Dong, Master, Professor, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China. E-mail: chendd@acas.com.cn

0 引言

近几年与食品相关的安全事件频出,其中食源性疾病常引起突发性公共卫生事件,受到社会广泛关注^[1]。由于食品企业的诚信问题以及社会责任意识的淡薄,导致食品安全问题较多,所以加大监管部门的监管力度以及提高检测机构的质量控制至关重要,而微生物标准样品的使用是检测准确的重要保证措施。

食品微生物检测是食品安全管理的一个主要手段,而金黄色葡萄球菌检验是其中一项重要指标^[2]。金黄色葡萄球菌是引起细菌性食物中毒的主要病原菌之一,其产生的肠毒素具有极强的耐热性,在 100 °C 加热条件下仍能存活 30 min,且其活性不减。因此,被金黄色葡萄球菌污染的食物即使经过烹煮也依然存在致病风险,故其检测数据的准确性是食品生产原料和成品安全的保障^[3]。

研究发现,肉制品中金黄色葡萄球菌的检出率较高,且在鱼、虾类制品,污染尤其严重^[4-9],由于当前国内外食品检测领域关于微生物肉类标准样品的种类不全,所以加强肉类微生物标准样品的研发与制备,对于解决检测过程中质量控制的难题,提升检测机构的检测能力,规范标准样品管理,减少漏检和误判,确保检测结果的准确性和有效实施,具有十分重要的意义^[10-13]。鉴于此,本研究拟研制一款用西林瓶包装的、以鱼肉为基质的金黄色葡萄球菌的标准样品,以期在一定程度上解决该领域标准样品不足的问题,并为其他食品微生物标准样品的开发研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金黄色葡萄球菌 ATCC 25923(美国菌种保藏中心);冻干保护剂:海藻糖、基质:巴沙鱼(长江渔业股份公司);Peterifilm™ 金黄色葡萄球菌测试片(美国 Minnesota Mining and Manufacturing 公司);VITEK 2 革兰氏阳性鉴定卡(GP 卡,法国梅里埃公司)。

1.2 仪器与设备

2-10D plus 冷冻干燥机(德国 CHRIST 公司);NAURE~NU437-600E 生物安全柜(美国 NUAURE 公司);DHP-9032 恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);Vitek 2 compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统(法国梅里埃公司);GR 85 DF 自立式高压灭菌器[致微(厦门)仪器有限公司];MS-H-S 磁力搅拌器(美国赛洛捷克公司);R3 自动判读仪(美国 Minnesota Mining and Manufacturing 公司);DH43L 电热恒温培养箱(天津泰斯特公司)。

1.3 金黄色葡萄球菌标准菌株的鉴定

将金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 划线接种于 TSA 平板和血平板,36 °C 培养 18 h,使用革兰氏染色镜检,同时使用全自动微生物鉴定及药敏分析系统进行生化鉴定。

1.4 标准样品的制备

1.4.1 巴沙鱼前处理

为了方便样品的分装,并与实际样品保持一致,以消除基体效应,故本次标准样品研制选用巴沙鱼作为样品基质,从而保证检测的准确有效。首先将所用到的工具都用 75%酒精擦拭干净,然后把鱼肉切成小块,用搅拌机搅拌 5 min 成肉糜状态,将肉糜按 50 g 分装置铝箔袋中抽真空,为了保证所用的基质不会影响后续的检测,将分装好的鱼肉按照 25 kGy 辐照剂量的电子束进行辐照灭菌,灭菌后按照 GB 4789.2—2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定方法测定其菌落总数》进行检测。

1.4.2 样品制备过程

首先把标准菌株复苏增菌后,将配制好的菌液与冻干保护剂 10% 的海藻糖充分混匀制备成菌悬液;为了此次标准样品能够均匀,先将灭完菌的鱼肉进行稀释搅拌,依次定量分装 2 mL 肉糜到每个西林瓶中,再将混合均匀的菌悬液和鱼肉按照 1:2 (*V:m*) 的比例分装到每个西林瓶中;盖好橡胶塞进行冷冻干燥;冻干结束加铝箔盖,并贴袋冷冻保存于 -18 °C。

由于微生物自身的特性不同,冷冻干燥的条件可能会对微生物的冻干存活率造成一定的影响^[14-15],经过不断的实验摸索,最终确定此次研制的样品中微生物冻干存活率及稳定性较好的技术参数。具体工艺参数如表 1。

表 1 工艺参数
Table 1 Technological parameter

干燥程序	最终温度/°C	所需时间/h
冷冻阶段	-56	15
主干燥	0	40
终末干燥	25	15

1.5 样品的均匀性检验

采用 GB 4789.10—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》和 SN/T 4546—2017《商品化试剂盒检测方法 金黄色葡萄球菌 方法一》两种方法进行检测对比。采用单因素方差分析法,通过 *F* 检验对样品的均匀性进行评估。在 95% 置信概率下,与其他因素对测试结果的影响相比,样品的不均匀性是可以接受的。若 $F < (f_1, f_2)$ 及给定显著性水平 α (σ 采用国

际通用的标准差 0.25)的临界值 $F\alpha(f1, f2)$, 则表明样品内和样品间无显著性差异, 样品是均匀的^[12-14]。此外, 还可采用 $Sbb < 0.3\sigma$ 进行均匀性检验, 若 $Sbb < 0.3\sigma$ (σ 采用国际通用的标准差 0.25), 则表明样品间无显著性差异, 样品是均匀的^[16-18]。

1.6 样品的稳定性检验

按照 GB/T 15000.3—2023《标准样品工作导则 第 3 部分: 标准样品 定值和均匀性与稳定性评估》的要

求, 对所制备的样品进行了短期稳定性(包括运输稳定性和短期贮存稳定性)检验和长期稳定性(储存稳定性)检验。结果通过 F 检验和 t 检验法对样品的稳定性进行评估^[19]。

1.7 数据处理

按照 GB/T 15000.3—2023, 通过单因素方差分析(F 检验法)和 t 检验法对样品的均匀性和稳定进行统计分析, 见表 2~3。

表 2 单因素方差分析表
Table 2 One-way ANOVA table

变异来源	SS	ν	MS	F	Sbb
组间	$\sum_{i=1}^m n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$m-1$	$SS_{\text{组间}}/\nu_{\text{组间}}$	$MS_{\text{组间}}/MS_{\text{组内}}$	$\sqrt{\frac{(MS_{\text{组间}} - MS_{\text{组内}})}{2}}$
内	$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x})^2$	$N-m$	$SS_{\text{组内}}/\nu_{\text{组内}}$		

注: 随机抽取 i 个样品 ($i=1,2,\dots,m$), 每个样品重复条件下测试 j 次 ($j=1,2,\dots,n$), \bar{x}_i 为每个样品的平均值, \bar{x} 为总样品的平均值, x_{ij} 为单次测量结果, N 为测量总次数。SS 为离均差平方和, ν 为自由度, MS 为均方, Sbb 为样品间标准差。

表 3 t 检验法分析表
Table 3 t -test analysis table

斜率 $ \beta_1 $	截距 β_0	斜率标准差 S_{β_1}	截距标准差 S_{β_0}	t 检验
$\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})(x_i - \bar{x})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$	$\bar{y} - \beta_1 \bar{x}$	$\frac{\sum_{i=1}^n [(y_i - (\beta_0 + \beta_1 x_i))]^2}{(n-2) \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$	$S_{ \beta_1 } \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i ^2}{n}}$	$\frac{ \beta_1 }{S_{ \beta_1 }}$

注: y_i 和 x_i 分别为第 i 个时间点的特性值和观测值, \bar{y} 和 \bar{x} 分别为特性值和时间观测值的均值。

2 结果与分析

2.1 标准菌株的鉴定及冻干存活率

将制备好的样品活化, 随机挑取在 Baird-Park 培养基上的典型菌落, 进行鉴定, 结果表明标准样品目标菌株为金黄色葡萄球菌, 纯度为 99%。同时检测标准样品冻干前后的活菌数, 冷冻干燥前菌悬液中金黄色葡萄球菌菌含量为 10400 CFU/mL, 冷冻干燥后, 样品复原检测含有的金黄色葡萄球菌菌含量为 5428 CFU/mL, 样品冻干后金黄色葡萄球菌存活率为 52.2%。

2.2 标准样品的失水率

采用称重法对冷冻干燥前后标准样品进行称重, 测定结果表明冻干后金黄色葡萄球菌标准样品的失水率平均值为 86.78%, 标准偏差为 2.3%。结果如表 4 所示。

2.3 标准样品均匀性和稳定性结果

2.3.1 标准样品的均匀性检验

此次实验共制备 500 份样品, 样品为西林瓶真空包装, 每个西林瓶是一个样品单元, 是不可分割的整体。样品均匀

表 4 金黄色葡萄球菌冻干前后重量变化
Table 4 Weight changes of *Staphylococcus aureus* before and after lyophilization

序号	冻干前空瓶重量/g	冻干前总重量/g	冻干后总重量/g	失水率/%
1	19.0	23.9	19.8	83.67
2	19.3	24.2	19.8	89.80
3	19.5	24.2	20.1	87.23
4	19.2	24.1	20.0	83.67
5	19.4	24.3	19.9	89.80
6	19.1	23.9	19.7	87.50
7	19.3	24.2	20.1	83.67
8	19.2	23.9	19.8	87.23
9	19.4	24.3	20.0	87.76
10	19.2	24	19.8	87.50
平均值	19.26	24.1	19.9	86.78

性按照 GB/T 15000.3—2023 的要求进行。随机抽取 10 个样品, 样品在检测前需进行再水化处理, 需要总计 60 mL 无菌水再水化, 首先无菌开启西林瓶, 样品开启后, 立即加入 10 mL 无菌水进行再水化, 待溶解后, 吸出放入无菌瓶中, 再反复用余下的无菌水清洗西林瓶内壁, 回收清洗液放入上述无菌瓶中, 依据 GB 4789.10—2016 和 SN/T 4546—2017, 取样量为 25 mL, 由固定一人实验, 一人协助监督完成, 在重复条件测试 2×10 份样品的金黄色葡萄球菌计数, 测试结果分析如下表 5~8。

通过均匀性结果方差分析表可看出, $S_{bb}=0.022 < 0.3\sigma$ 和 $S_{bb}=0.023 < 0.3\sigma$ (通常 $\sigma=0.25$), 证明标准样品是均匀的, 样品间没有显著性差异, 说明该样品的均匀性满足标准样品的要求。同时通过两种检测方法结果对比, 检测数据无明显差异, 3M Peterifilm™ 金黄色葡萄球菌测试片产品性能稳定, 检测结果准确, 能够满足绝大多数食品样品对金黄色葡萄球菌的卫生检测要求^[20]。故为了后续减少工作量, 都用 SN/T 4546—2017 进行测试^[20-21]。

2.3.2 标准样品的稳定性检验

由于所制备的样品为微生物样品, 是含有活的微生物, 而活的微生物极易发生变化(繁殖和死亡等), 样品基

表 5 金黄色葡萄球菌测定标准样品均匀性检验结果表
(GB 4789.10—2016)

样品序号	结果 1	结果 2	结果对数变换/(log ₁₀ CFU/mL)	
	/(CFU/mL)	/(CFU/mL)	结果 1	结果 2
1	5500	6200	3.740	3.792
2	5600	5200	3.748	3.716
3	5400	4400	3.732	3.643
4	5500	5200	3.740	3.716
5	6300	5700	3.799	3.756
6	5200	5600	3.716	3.748
7	6300	5800	3.799	3.763
8	5800	5000	3.763	3.699
9	5500	4800	3.740	3.681
10	4900	4900	3.690	3.690

表 6 金黄色葡萄球菌测定标准样品均匀性检验方差分析结果
(GB 4789.10—2016)

SS	自由度	MS	F 值	F 临界值	置信概率	S _{bb}
组间 0.019647	9	0.002183	1.81	3.02	0.95	0.022
组内 0.012056	10	0.001206				

表 7 金黄色葡萄球菌测定标准样品均匀性检验结果表
(SN/T 4546—2017)

样品序号	结果 1	结果 2	结果对数变换/(log ₁₀ CFU/mL)	
	/(CFU/mL)	/(CFU/mL)	结果 1	结果 2
1	5600	6000	3.748	3.778
2	5500	5060	3.740	3.704
3	5400	4200	3.732	3.623
4	5600	5000	3.748	3.699
5	6200	5500	3.792	3.740
6	5500	6200	3.740	3.792
7	6400	5900	3.806	3.771
8	5800	4700	3.763	3.672
9	5400	4900	3.732	3.690
10	4800	4900	3.681	3.690

表 8 金黄色葡萄球菌测定标准样品均匀性检验方差分析结果
(GB 4789.10—2016)

	SS	自由度	MS	F 值	F 临界值	置信概率	S _{bb}
组间	0.024806	9	0.002756	1.65	3.02	0.95	0.023
组内	0.016704	10	0.001670				

体中的水分、营养物质、包装形式及温度对其都有十分重要的影响。冷冻干燥方式制备的样品中水分含量较低; 且样品采用西林瓶真空包装, 水分和营养物质没有太大变化, 故本标准样品稳定性检验主要评估随着时间的推移以及不同温度条件下对标准样品的影响。按照 GB/T 15000.3—2023 的要求, 对所制备的样品进行了短期稳定性(包括运输稳定性和短期贮存稳定性)检验和长期稳定性(储存稳定性)检验。稳定性检验的样品前处理及检测方法与均匀性检验方法相同。

(1) 短期稳定性检验

此次实验对标准样品进行两种类型的短期稳定性检验: 一种是置于在 4 °C 条件下, 随机取样品 9 份, 分别在第 1、30、60 d 时每天检测 3 份; 运输的稳定性是置于室温和较高温度(模拟样品的运输条件)下的稳定性检验, 选用 3 个温度, 分别为 20、36 和 45 °C。在 20 °C 条件下随机取样品 9 份, 分别在第 1、7、15 d 时每天检测 3 份, 36 °C 条件下随机取样品 9 份, 分别在第 1、5、7 d 时每天检测 3 份, 45 °C 条件下随机取样品 9 份, 分别在第 1、3、5 d 时每天检测 3 份。稳定性检测结果分析见下表 9~11。

表 9 金黄色葡萄球菌测定标准样品短期稳定性检验结果汇总表
 Table 9 Summary of short-term stability test results of reference material for the determination of *Staphylococcus aureus*

日期	温度/°C	时间/d	测试结果 1 /(CFU/mL)	测试结果 2 /(CFU/mL)	测试结果 1 对数 /(log ₁₀ CFU/mL)	测试结果 2 对数 /(log ₁₀ CFU/mL)
2023.3.7	4	1	6400	5100	3.806	3.708
			6700	5400	3.826	3.732
			5600	4900	3.748	3.690
2023.4.6	4	30	4600	5600	3.663	3.748
			5900	6000	3.771	3.778
			6800	5500	3.833	3.740
2023.5.6	4	60	4500	5300	3.653	3.724
			5000	6100	3.699	3.785
			5200	4600	3.716	3.663
2023.3.7	20	1	5800	6200	3.763	3.792
			6200	4800	3.792	3.681
			6200	5200	3.792	3.716
2023.3.14	20	7	5800	6300	3.763	3.799
			5600	5700	3.748	3.756
			5800	5200	3.763	3.716
2023.3.22	20	15	5400	6300	3.732	3.799
			5900	5800	3.771	3.763
			6000	5400	3.778	3.732
2023.3.7	36	1	4900	5200	3.690	3.716
			5300	5000	3.724	3.699
			4600	5500	3.663	3.740
2023.3.12	36	5	4800	5400	3.681	3.732
			4700	5100	3.672	3.708
			4900	5300	3.690	3.724
2023.3.14	36	7	4600	5900	3.663	3.771
			5300	4800	3.724	3.681
			5000	4400	3.699	3.643
2023.3.7	45	1	5100	5300	3.708	3.724
			4900	5100	3.690	3.708
			4800	5200	3.681	3.716
2023.3.10	45	3	4900	5300	3.690	3.724
			5700	4900	3.756	3.690
			4500	4800	3.653	3.681
2023.3.12	45	5	4600	5000	3.663	3.699
			4800	4900	3.681	3.690
			5000	4800	3.699	3.681

表 10 金黄色葡萄球菌测定标准样品短期稳定性检验方差分析结果
 Table 10 Analysis of variance results for short-term stability test of reference material for *Staphylococcus aureus* assay

	SS	自由度	MS	F 值	F 临界值	置信概率	S _{bb}
组间	0.084120	35	0.002403	1.43	1.75	0.95	0.019
组内	0.060523	36	0.001681				

表 11 金黄色葡萄球菌测定标准样品短期稳定性 t 检验分析结果
Table 11 *Staphylococcus aureus* assay reference material short-term stability t -test analysis results

温度/°C	时间平均值	结果平均值	斜率 $ \beta_1 $	斜距 β_0	标准差	斜率估计值标准偏差	t 检验
4	30.33	3.738	0.000767	3.715	0.0674	0.0011	0.00485
20	7.67	3.759	0.000470	3.755	0.0011	0.0001	0.00048
36	4.33	3.701	0.001362	3.695	0.0118	0.0118	0.00679
45	3.00	3.696	0.004728	3.682	0.0269	0.0053	0.02277

通过上述检测结果分析表可看出, F 值 $<F$ 临界值, $S_{bb}=0.019<0.3\sigma$, 同时, $|\beta_1|$ 均小于 t 检验, 证明标准样品是稳定的^[22]。

在短期贮存条件即 4 °C条件下 60 d, 在模拟运输 20 °C条件下 15 d, 36 °C条件下 7 d 和 45 °C条件下 5 d, 样品中的金黄色葡萄球菌计数的结果无明显变化, 样品可以在常温条件下运输。样品的短期稳定性符合要求。

(2)长期稳定性检验

此次实验制备的标准样品的保存条件为-18 °C以下冷冻保存。在预先设定的时间点从冷冻保存的样品中随机抽取 3 份样品进行检测, 抽样的时间点按照先密后疏的原

则, 依次在 1、2、4、7、12 个月共 5 个时间点取样, 对样品进行金黄色葡萄球菌的定量检测, 检测方法与均匀性检测方法相同。金黄色葡萄球菌样品长期稳定性的检测结果分析如下表 12~13。

通过 t 检验法计算得 \bar{x} 为 5.20, \bar{y} 为 3.724, $|\beta_1|$ 为 0.00542, β_0 为 3.696, $S_{|\beta_0|}$ 为 0.0431, S_{β_1} 为 0.00358, t 检验值为 0.00921, $|\beta_1|<t$ 检验值; 通过 F 检验法得, F 值 $<F$ 临界值, $S_{bb}=0.021<0.3\sigma$, 证明标准样品是稳定的。该标准样品在-18 °C条件下保存经过 1 年的稳定性检验数据证明标准样品的稳定较好, 故该样品有效期暂定为 1 年, 后续将继续监测。

表 12 金黄色葡萄球菌测定标准样品长期稳定性检验结果汇总表
Table 12 Summary of long-term stability test results of reference material for *Staphylococcus aureus* determination

日期	温度/°C	时间/月	测试结果 1 /(CFU/mL)	测试结果 2 /(CFU/mL)	测试结果 1 对数 /(log ₁₀ CFU/mL)	测试结果 2 对数 /(log ₁₀ CFU/mL)
2023.4.6	-18	1	5200	5000	3.716	3.699
			5800	4800	3.763	3.681
			5500	4900	3.740	3.690
2023.5.6	-18	2	5300	5800	3.724	3.763
			5900	6100	3.771	3.785
			5500	5700	3.740	3.756
2023.8.6	-18	4	6100	5500	3.785	3.740
			5700	5800	3.756	3.763
			6200	5100	3.792	3.708
2023.11.6	-18	7	5100	5500	3.708	3.740
			4700	5000	3.672	3.699
			4900	5300	3.690	3.724
2024.4.6	-18	12	4600	5000	3.663	3.699
			5300	4800	3.724	3.681
			5000	4900	3.699	3.690

表 13 金黄色葡萄球菌测定标准样品长期稳定性方差分析表
Table 13 Analysis of variance for long-term stability of reference material for *Staphylococcus aureus* determination

	SS	自由度	MS	F 值	F 临界值	置信概率	S_{bb}
组间	0.025224	14	0.001802	2.00	2.42	0.95	0.021
组内	0.013509	15	0.000901				

2.4 标准样品定值

2.4.1 定 值

参照 GB/T 15000.3—2023 导则的要求, 选择在单个实验室中采用单一参考测量值程序定值。

2.4.2 测试方法

此次标准样品定值的测试方法均采用 SN/T 4546—2017, 即稀释、培养、计数等过程。该样品是采用鱼肉作为基质, 能够较好地模拟实际样品基质效应对检测过程的影响; 样品采用人工添加细菌混合冷冻干燥而成, 溶解性特别好, 前处理过程无需使用特殊的仪器和设备, 易于操作。

2.4.3 定值数据统计

此次标准样品定值结果选用 12 支样品, 分成 3 组, 每组 4 支样品, 由 3 个不同人员完成, 每支样品重复检测 3 次, 计算结果平均值作为标准样品的定值结果。

(1) 特性值及不确定度

按照 GB/T 15000.3—2023 的要求对数据进行统计计算, 得到样品的特性值及其不确定度^[23]。

(2) 特性值计算

采用上述的方式计算中位值作为标准样品的定值结果, 金黄色葡萄球菌的定值结果的特性值为 3.728 log₁₀CFU/mL, 相对标准偏差为 7.84%, 定值结果如下表 14。

表 14 金黄色葡萄球菌标准样品定值结果
Table 14 Determination results of reference material of *Staphylococcus aureus*

序号	活菌数/(CFU/mL)			平均值
	重复 1	重复 2	重复 3	
1	4500	5000	4800	4800
2	5200	5300	5100	5200
3	5600	5500	5500	5500
4	6100	5900	5800	5900
5	4900	5200	5000	5000
6	5300	5000	5100	5100
7	5300	5500	5200	5300
8	6300	6200	6000	6200
9	5800	5500	5800	5700
10	5100	5300	5000	5100
11	5900	5700	6000	5900
12	5500	5300	5400	5400
特性值 (log ₁₀ CFU/mL)	3.728			
相对标准偏差 /%	7.84			

(3) 不确定度评估

按照 RB/T 151—2016《食品微生物定量检测的测量不确定度评估指南》, 通过整体法评估测量不确定度。本方法计算扩展不确定度、合成标准不确定度、再现性标准偏差。

此次研制的鱼肉中金黄色葡萄球菌标准样品不确定度包括 A 类不确定度, B 类不确定度, 标准样品间的不确定度以及不稳定性带来的不确定度, 由这些合成标准样品的合成不确定度(u)为 0.093 log₁₀CFU/mL, 故扩展不确定度 $U=ku$ ($k=2$, 置信概率为 95%), 扩展不确定度为 0.186 log₁₀CFU/mL。

3 讨论与结论

针对金黄色葡萄球菌的准确测量一直备受有关专家和学者的关注, 有关金黄色葡萄球菌的定量标准样品的研究还不多, 参考标准样品在有效测量系统中的地位和作用日益被人们认识和肯定, 目前标准样品作为控制分析测试质量最有力的工具^[24], 尤其现在水质受到的污染越来越严重, 水产品的品质也更加被关注, 故研制一款以鱼肉为基质的金黄色葡萄球菌标准样品是很有必要的^[25]。

此次研制的金黄色葡萄球菌标准样品保护剂采用的是 10% 的海藻糖浓度, 在冻干过程中起到很好的保护效果, 同时也能更好的维持微生物的稳定性^[26-31]; 基质采用的是鱼肉, 相较于猪肉牛肉来说流动性好, 易于分装。通过多次实验证明本次研制的鱼肉中的金黄色葡萄球菌标准样品具有良好的均匀性和稳定性, 多次测试结果无明显差异。后期将持续对该样品进行稳定性监测, 并进行多批制样确定样品符合标准样品的要求, 保证检测数据的可靠有效, 提高菌株的冻干存活率, 能够满足预期用途。

本次研制的标准样品用新的包装方式使样品状态更稳定, 样品检测更均匀, 减少之前一起冻干再分装造成的污染和其他不确定因素^[32]。以鱼肉为基质, 拓宽肉类产品在标准样品上的市场, 提高检测的质量控制, 为我国的国民经济建设和社会发展发挥了重要作用。

参考文献

- [1] 龚玲玉, 罗青梅, 冯莉, 等. 金黄色葡萄球菌引发食源性疾病的溯源分析[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2024, 47(2): 167-170.
GONG LY, LUO QM, FENG L, et al. Traceability analysis of foodborne diseases caused by *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Frontier Health Quarant, 2024, 47(2): 167-170.
- [2] 杨海丽. 金黄色葡萄球菌定量标准样品加工关键技术研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2019.
YANG HL. Research on key technologies for processing quantitative standard samples of *Staphylococcus aureus* [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019.
- [3] 匡燕云, 马淑棉, 牛娜, 等. GB 29921—2021《食品安全国家标准预包装

- 装食品中致病菌限量》浅析[J]. 中国标准化, 2023(20): 130-135.
- KUANG YY, MA SM, NIU N, *et al.* Analysis of GB 29921-2021 *Limits of Pathogenic Bacteria in Prepackaged Foods of National Food Safety Standards* [J]. China Stand, 2023(20): 130-135.
- [4] 石琳, 李学兴, 梁伟, 等. 100份食品样品中金黄色葡萄球菌的检测情况[J]. 食品安全导刊, 2017(3): 139-140
- SHI L, LI XX, LIANG W, *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus* in 100 food samples [J]. China Food Saf Magaz, 2017(3): 139-140.
- [5] BOTARO BG, CORTINHAS CS, MARÇO LV. Detection and enumeration of *Staphylococcus aureus* from bovine milk samples by real-time polymerase chain reaction [J]. J Dairy Sci, 2013, 96(11): 6955-6964.
- [6] 陈培超, 程芳粥, 黄强, 等. 2021—2023年上海市嘉定区市售食品中金黄色葡萄球菌污染情况[J]. 上海预防医学, 2024, 36(7): 644-649.
- CHEN PC, CHENG FZ, HUANG Q, *et al.* Contamination of *Staphylococcus aureus* in commercial food in Jiading District, Shanghai, 2021—2023 [J]. Shanghai J Pre Med, 2024, 36(7): 644-649.
- [7] 刘卿妍. 三文鱼贮存过程中金黄色葡萄球菌生长预测模型的构建及光动力杀菌技术研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2023.
- LIU QY. Construction of prediction model for growth of *Staphylococcus aureus* during salmon storage and research on photodynamic sterilization technology [D]. Jilin: Jilin University, 2023.
- [8] STRATEV D, STOYANCHEV T, BANGIEVA D. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus* in seafood [J]. Italian J Food Saf, 2021, 10(4): 10027.
- [9] IYEKHOETIN MO, HELEN IA. Prevalence of *Shigella* spp and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in select commercially processed meat products [J]. Asian Food Sci J, 2021, 1: 50-66.
- [10] 薛蕾, 隋志伟, 张玲, 等. 金黄色葡萄球菌标准物质的研制[J]. 食品科学, 2015, 36(8): 44-48.
- XUE L, SUI ZW, ZHANG L, *et al.* Development of *Staphylococcus aureus* reference material [J]. Food Sci, 2015, 36(8): 44-48
- [11] WANG L, RAO CM, GAO K. Development of a reference standard of *Escherichia coli* DNA for residual DNA determination in China [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74166.
- [12] 国家标准样品技术委员会. 标准样品-见证新中国工业化发展之路[J]. 中国标准化, 2021(11): 16-17.
- National Standard Sample Technical Committee. Reference material: Witnessing the road to industrialization in new China [J]. China Stand, 2021(11): 16-17.
- [13] NIKOLAEV AG, ANDREEVA IW, KULEV DH. Development of a lactic acid standard sample [J]. Stand Obrazcy, 2015, 1: 34-38.
- [14] LEO L, BORIS R. Diffusion coefficients in scaffolds made with temperature controlled cryoprinting and an ink made of sodium alginate and agar [J]. Bioprinting, 2024, 41: e00348.
- [15] 侯演林, 陈胜惠子, 蒲云峰, 等. 真空冷冻干燥及预处理方法应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(23): 203-208.
- HOU YL, CHEN SHZ, PU YF, *et al.* Research progress on application of vacuum freeze drying and pretreatment methods [J]. Food Res Dev, 2023, 44(23): 203-208.
- [16] 于忠萧. 论标准样品均匀性检验方法之适用条件[J]. 中国标准化, 2023(4): 144-146.
- YU ZX. On the application conditions of the uniformity test method for reference material [J]. China Stand, 2023(4): 144-146.
- [17] CHRISTINA EC, JENNIFER C, ANTONIO P. Value assignment and uncertainty evaluation for certified reference gas mixtures [J]. J Accred Qual Assur, 2024, 1: 1-20.
- [18] KURNIAWATI E, IBRAHIM B, DESNIA R. Homogeneity and stability of a secondary microbiological reference material candidate for Salmonella in fish matrix [J]. J Conf Series: Earth Environ Sci, 2019, 404: 12036.
- [19] 雷承泽, 刘一鹏, 申屠旭萍, 等. 四烯菌素 B 标准样品的研制[D]. 杭州: 中国计量大学学报, 2024.
- LEI CZ, LIU YP, SHENTU XP, *et al.* Development of tetraenomycin B standard sample [D]. Hangzhou: Journal of China Jiliang University, 2024.
- [20] 董健, 郑晶, 林杰, 等. 3M PetrifilmTM 金黄色葡萄球菌检验测试片的评价[J]. 食品与发酵科技, 2014, 50(4): 56-60.
- DONG J, ZHENG J, LIN J, *et al.* Evaluation of 3M PetrifilmTM *Staphylococcus aureus* test strips [J]. Food Ferment Sci Technol, 2014, 50(4): 56-60.
- [21] 苏妙贞, 曾晓琮, 韩志杰, 等. 金黄色葡萄球菌定量检测中四种培养基的比较[J]. 食品安全导刊, 2017(21): 139-140.
- SU MZ, ZENG XC, HAN ZJ, *et al.* Comparison of four culture media for quantitative detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Food Saf Magaz, 2017(21): 139-140.
- [22] 霍思宇, 耿旭浩, 余丽波. 山药粉中甲萘威残留分析基体标准物质研制[J]. 食品与机械, 2023, 39(10): 49-55.
- HUO SY, GENG XH, YU LB. Development of matrix reference materials for the analysis of menacarb residues in yam powder [J]. Food Mach, 2023, 39(10): 49-55.
- [23] 许瑞清, 武瑞杰, 甘雨鑫. 测量不确定度在食品检测符合性判定中的应用[J]. 食品安全导刊, 2023(7): 77-79.
- XU RQ, WU RJ, GAN YX. Application of measurement uncertainty in compliance determination of food testing [J]. Food Saf Magaz, 2023(7): 77-79.
- [24] 方太松, 王军, 王焱茹, 等. 我国熟肉制品中金黄色葡萄球菌污染状况 Meta 分析[J]. 生物加工过程, 2020, 18(3): 386-391.
- FANG TS, WANG J, WANG YR, *et al.* Meta-analysis of *Staphylococcus aureus* contamination in cooked meat products in China [J]. Chin J Bioprocess Eng, 2020, 18(3): 386-391.
- [25] 林永健, 李雨哲, 徐敦明, 等. 食品安全检测主要用标准样品研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(10): 3164-3171.
- LIN YJ, LI YZ, XU DM, *et al.* Research progress on the main reference material for food safety detection [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(10): 3164-3171.
- [26] KLINGER VA, VANESSA CZ, CALLEBE CS, *et al.* Powdered water kefir: Effect of spray drying and lyophilization on physical, physicochemical, and microbiological properties [J]. Food Chem Adv,

- 2024, 5: 100759.
- [27] 毕金峰, 冯舒涵, 金鑫. 真空冷冻干燥技术与产业的发展及趋势[J]. 核农学报, 2022, 36(2): 414-421.
- BI JF, FENG SH, JIN X. Development and trend of vacuum freeze drying technology and industry [J]. Acta Agric Nucl Sin, 2022, 36(2): 414-421.
- [28] VANESSA S, JESSICA R, PEDRO T. Genetic complexity of CC5 *Staphylococcus aureus* isolates associated with sternal bursitis in chickens: Antimicrobial resistance, virulence, plasmids, and biofilm formation [J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2024, 13(6): 1.
- [29] RIMA M, CHBANI A, ROQUES C. Seaweed extracts as an effective gateway in the search for novel antibiofilm agents against *Staphylococcus aureus* [J]. Plants, 2022, 11(17): 2285.
- [30] SCHALLI M, PLATZER S, SCHMUTZ R. Dissolved carbon dioxide: The lifespan of *Staphylococcus aureus* and enterococcus faecalis in bottled carbonated mineral water [J]. Biology, 2023, 12(3): 432.
- [31] QIAN C, CASTAÑEDAGULLA K, SATTLEGGGER E. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Staphylococcus aureus* in a commercial poultry plant and poultry farm [J]. Int J Food Microbiol, 2021, 1: 109454.
- [32] 杨玮玮. 鸡肉中金黄色葡萄球菌标准物质的研制[D]. 福州: 福建农林大学, 2020.
- YANG WW. Development of *Staphylococcus aureus* reference materials in chicken [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)

作者简介



郑效梅, 实习研究员, 主要研究方向为微生物检测及质量控制。
E-mail: 1131365958@qq.com



陈冬东, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: chendd@acas.com.cn