

2.10 试样分析和加标回收率

随机采样抽取超市中的各类食品进行分析,同时试样加标做回收率试验,结果见表4。每种试样重复测定4次,相对标准偏差(RSD)为0.5%~3.2%。

表4 试样分析和回收率 mg/kg

样品	加标量	A 值	B 值	A - B 值	回收率 %
啤酒	0	7.8	0.1	7.7	
	5.0,20.0	13.0,29.8	0.1	12.9,29.7	102.0,110.0
绵白糖	0	7.0	0.2	6.8	
	5.0,10.0	12.2,17.3	0.1	12.1,17.2	106.0,104.0
淀粉	0	100.7	0.0	100.7	
	20.0,80.0	121.8,182.0	0.0	121.8,182.0	105.5,101.6
辣椒粉	0	16.0	15.8	0.2	
	8.0,20.0	25.0,38.1	16.1	8.9,22.0	108.8,110.0
粉丝	0	303.0	0.0	303.0	
	200.0,800.0	501.5,1090.0	0.0	501.5,1090.0	99.3,98.3
腐竹	0	0.5	0.5	0	
	4.0,10.0	4.3,10.0	0.6	3.7,9.4	92.5,94.0
黄花菜	0	14.4	14.6	0	
	5.0,20.0	19.6,33.0	15.0	4.6,18.0	92.0,90.0
竹笋罐头	0	1.7	0.0	1.7	
	2.0,8.0	3.8,10.3	0.0	3.8,10.3	105.0,107.5
甜杏脯	0	1027.5	0.0	1027.5	
	100.0,400.0	1123.3,1426.0	0.0	1123.3,1426.0	95.8,99.6
鱿鱼片	0	1.2	0.0	1.2	
	2.0,8.0	3.1,9.0	0.0	3.1,9.0	95.0,97.5

2.11 与国标法比较

本法与国标法(GB/T 5009.34)比较结果见表5。由表5可见,对于颜色较浅的食品(银耳、粉丝、淀粉、白糖等),本法测定值与国标法相一致。枸杞虽然颜色较深,但由于SO₂含量很高,测定时经过若干

倍的稀释,背景的干扰很小,因此,测定值与国标法也较一致。相反,其它样品因颜色较深或SO₂含量较低,干扰相应较大,与本法比较,国标法测定值明显偏高,甚至有些样品(啤酒、酸梅、黄花菜、枸杞、糖果等)本来不含SO₂也测出较高的值。而本法由于采用了A - B值,测定结果较为可靠。

表5 与国标法比较结果 mg/kg

样品	本法	国标法
枸杞	2940.0	2980.0
银耳	690.3	690.1
粉丝	303.0	304.6
淀粉	100.7	100.6
绵白糖	6.8	7.1
红葡萄酒	53.7	56.1
干红葡萄酒	9.0	11.4
啤酒1	0.6	0.8
啤酒2	<0.2	0.3
酸梅	<0.2	3.2
黄花菜	<0.2	3.2
枸杞	<0.2	9.0
糖果(红)	30.0	31.8
糖果(绿)	<0.2	1.7

参考文献:

- [1] Hillery B, Elkins E, Warner C, et al. Optimized Monier-Williams method for determination of sulfites in foods: Collaborative study[J]. J AOAC, 1989, 72(3): 470—475.
- [2] 日本药学会. 卫生试验法·注解[M]. 北京: 华文出版社, 1995, 66—67.
- [3] 中国光学会光谱专业委员会. AOAC分析方法手册(上册)[M]. 1984, 708—709.
- [4] GB/T 5009.34—2003. 食品卫生检验方法 理化部分[S].

[收稿日期: 2004 - 08 - 21]

中图分类号: R15; R155.15; O612.6 文献标识码: B 文章编号: 1004 - 8456(2004)06 - 0504 - 05

实验室菌落计数精密度控制研究 - 方法研究

程苏云 梅玲玲 任锦玉

(浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310009)

摘要:为使室间及室内检测数据的准确度及精密度控制在一定的范围,保证相关的卫生微生物实验室出具准确的检测数据,选用明胶菌片作为菌落计数室间及室内质控比对品。随机抽取明胶菌片和滤纸菌片各10片进行计数检测;取同一批号的明胶菌片发放给不同实验室进行室间比对;明胶菌片分别经1个月、3个月及6个月保存后进行稳定性计数测定。结果显示同一批次明胶菌片和滤纸菌片的相对标准偏差(RSD)分别为11%和22.3%,表明明胶菌片的精密度高于滤纸菌片;75个实验室室间明胶菌片计数结果95%的可信区间为 $5.51 \times 10^7 \sim 8.03 \times 10^7$ CFU/片,有96.83%的单位在此范围中;明胶菌片4 冰箱保存1、3、6个月的检测结果的均数误差差异无显著

性。采用明胶菌片作为菌落计数质控比对品,在精密度、准确度及可操作性方面都能达到相应的要求。

关键词:集落计数;微生物;质量控制;实验室

Study of accuracy of aerobic colony counting in laboratory - methodology

Cheng Suyun, Mei Lingling, Ren Jinyu

(Zhejiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, Zhejiang Hangzhou 310009, China)

Abstract: To control the accuracy of examination data in certain scope and ensure the related hygienic microbiological laboratory issues the accurate data, gelatin piece of bacteria was adopted as the contrast for quality control. The colony count of such gelatin pieces and filter paper pieces selected randomly were tested and their mean values of relative standard deviation (*RSD*) indicated that gelatin piece of bacteria provided more accurate result than the latter. Meanwhile, such wafers in one room and in different rooms and kept for different days were counted respectively, the results revealed that there were no remarkable difference among them. The results show that the gelatin piece of bacteria is appropriate for colony counting as contrast.

Key Words: Colony Count, Microbial; Quality Control; Laboratories

菌落计数是微生物检验的一个重要的定量常规检测项目,对该项目进行质量控制,可有效地保证检验结果准确、可靠。而采用相对稳定、均衡性好的比对品,又是菌落计数精密度控制的一个重要内容。为选择适合菌落总数室内室间质量控制的比对品,进行了以下工作。

1 材料与方法

1.1 材料 ZXZ-0.5型旋片式真空泵 浙江黄岩医疗器械厂,10%明胶等试剂 本实验室配制,滤纸菌片由本中心消杀实验室提供。

枯草芽孢杆菌(ATCC 9372)芽孢液^[1] 由本实验室自制,芽孢浓度为 7.0×10^9 CFU/ml。

明胶菌片的制备^[2] 将含10%明胶的生理盐水分装于小试管内,每管2 ml,经高压灭菌冷却至40~50℃,充分混匀接种枯草芽孢杆菌芽孢液(0.2 ml)后,滴加于置平皿中的石蜡滤纸片上,每滴100 μ l。将平皿移至干燥皿中,室温下抽真空,经干燥后取出,置无菌试管内密封4℃冰箱保存。

1.2 方法

菌落计数 取明胶菌片1片,置10 ml灭菌生理盐水中,37℃ 10 min,充分溶解后,作为 10^{-1} 稀释液。然后依次按1:100稀释,直至 10^{-7} 。分别取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 稀释液进行菌落总数测定,方法按GB 4789.2—1994^[3]进行。滤纸菌片菌落计数方法同明胶菌片。

室间质控方法 由本室组织统一发放明胶菌

片,按规定的保存方法及操作方法进行菌片计数。

2 结果

2.1 2种菌片相对标准偏差比较 由同一人分别随机抽取10片明胶菌片、10片滤纸菌片进行菌落计数,结果如表1、2所示。

表1 10片明胶菌片菌落计数结果

CFU/片

编号	计数结果	均数偏差值	RSD %
1	5.3×10^7	1.30×10^7	19.00
2	5.4×10^7	1.20×10^7	18.00
3	6.2×10^7	0.42×10^7	6.00
4	6.6×10^7	0.00	0.00
5	6.6×10^7	0.00	0.00
6	6.7×10^7	0.08×10^7	1.00
7	6.7×10^7	0.08×10^7	1.00
8	7.1×10^7	0.48×10^7	7.00
9	7.3×10^7	0.68×10^7	9.00
10	7.8×10^7	1.20×10^7	18.00

表2 10片滤纸菌片菌落计数结果

CFU/片

编号	计数结果	均数偏差值	RSD %
1	1.9×10^6	0.30×10^6	18.25
2	1.9×10^6	0.30×10^6	18.12
3	1.5×10^6	0.10×10^6	6.00
4	1.5×10^6	0.10×10^6	6.00
5	1.6×10^6	0.00	0.00
6	1.1×10^6	0.50×10^6	31.00
7	1.6×10^6	0.00	0.00
8	9.5×10^5	0.65×10^6	40.00
9	1.8×10^6	0.20×10^6	12.00
10	2.2×10^6	0.60×10^6	37.00

由表1可见,10片明胶菌片菌落总数最少为 5.3×10^7 CFU/片,最多为 7.8×10^7 CFU/片,RSD最大为19.00%。从表2显示10片滤纸菌片菌落总数

作者简介:程苏云 女 副主任技师

最少为 9.5×10^5 CFU/片,最多为 2.2×10^6 CFU/片。
RSD 最大为 40.00 %。

滤纸菌片与明胶菌片两者比较 从表 3 可以看出,明胶菌片平均 6.62×10^7 CFU/片,95 %可信区间为 $5.90 \times 10^7 \sim 7.34 \times 10^7$ CFU/片, RSD = 11.82 %。滤纸菌片平均为 1.6×10^6 CFU/片,95 %可信区间为 $1.24 \times 10^6 \sim 1.96 \times 10^6$ CFU/片, RSD = 22.3 %。

表 3 明胶菌片与滤纸菌片菌落计数比较

统计指数	明胶菌片	滤纸菌片
平均值 \bar{x}	6.62×10^7	1.60×10^6
平均偏差 \bar{d}	0.55×10^7	0.27×10^6
标准差 s	0.72×10^7	0.36×10^6
相对标准偏差 RSD	11.82 %	22.3 %
95 %可信区间	$5.90 \times 10^7 \sim 7.34 \times 10^7$ CFU/片	$1.24 \times 10^6 \sim 1.96 \times 10^6$ CFU/片

2.2 明胶菌片的稳定性 分别于 1、3、6 三月份随机抽取 5 片明胶菌片进行菌落总数计算,3 次检测结果差异无显著性 ($P > 0.05$),所有明胶菌片的菌落总数均在 95 %可信区内(表 4)

表 4 明胶菌片保存时间观察结果 CFU/片

保存时间	计数最高值	计数最低值	平均
1 个月	7.5×10^7	5.9×10^7	6.5×10^7
3 个月	7.2×10^7	4.9×10^7	5.9×10^7
6 个月	6.7×10^7	6.0×10^7	6.2×10^7

2.3 现场考核验证结果

为观察明胶菌片是否适用于卫生微生物检验质控,结合年度全省卫生检验质量考核工作,将明胶菌片分发至 75 家疾病预防控制中心和卫生防疫站进行现场考核验证。从返回的 75 份检测报告结果可见(图 1),菌落计数平均为 6.92×10^7 CFU/片;标准差为 7.2×10^6 CFU/片。69 家单位检测结果在 95 %可信区间内,合格率达 96.83 %。一单位的检验结果偏离均数较远。

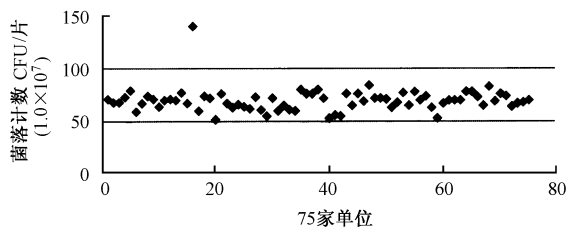


图 1 75 个实验室明胶菌片计数结果

3 讨论与分析

为保证菌落计数结果准确性,在实验室常用一定菌含量的标本进行比对试验,以控制检验质量。由于微生物含量测定不同于常规的理化含量测定,标本中细菌在一定环境下呈动态变化,且具有聚集

性。在制作微生物定量检测质控标本时,如何在一定的标本量中保证菌含量的相对均匀及稳定,目前各实验室采用的方法各不相同。一般多采用菌培养液、滤纸或无纺布制备质控标本。采用菌培养液肉汤,虽然其菌含量的均匀性较好,但是每次质控必须事先接种肉汤(一般为 18 ~ 24 h),经培养后用于质控检测,但在操作的时间上必须保证同时性。滤纸存在对细菌吸附效果不均匀,^[4]菌不易洗下,滤纸纤维在液体中难以均匀吸取等缺点,造成批内差异大,难以客观评价检测结果。本文以明胶作为基质,制备时,由于在 40 ~ 50 条件下,明胶溶液呈液体状,细菌易混合均匀,抽干的菌片在 37 水浴中,可在 10 min 内完全溶解,便于实验人员操作,同时由于操作时间的缩短,可相对控制菌含量的变化。与滤纸菌片相比有比较明显的可操作性。

随机抽取的 10 片明胶菌片的检测结果也证明了同一批号不同菌片间的 RSD 较小(11%),而滤纸菌片批内差异明显高于明胶菌片, RSD 值为 22.3 %。按菌片间误差不大于 10 %计算,本次质控明胶菌片有 7 组符合要求,滤纸菌片只有 4 组 RSD 在 10 %以内。从明胶菌片的实际应用来看,在统一检测方法的基础上,75 家单位的室间比对检测结果 96.83 %在 95 %可信范围内。表明该方法可避免由于细菌在不同载体上分布不均,^[5]导致误差较大及影响实际应用的问题。

另外,从实验结果看,明胶菌片 4 冰箱保存 6 个月,菌片的含菌量变化差异无显著性。表明明胶菌片的稳定性也较好,用明胶菌片保存及操作都简便,易于控制。

明胶菌片是一种卫生微生物定量检测、室间及室内菌落计数质量控制的良好载体,利用明胶菌片可绘制实验室卫生微生物定量检测质量控制图。

参考文献:

- [1] 坂崎利一. 试验菌株的保存法[J]. 临床检查(日本), 1974, 18(12): 83.
- [2] 沈刚建,陈振东,邵振东,等. 卫生细菌检验质量控制的初步探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 1992, 2(2): 106.
- [3] GB 4789—1994. 食品卫生检验微生物部分菌落总数测定[S].
- [4] 姜永新. 细菌检验的质量控制(译文)[J]. 中华医学检验杂志, 1978, 2: 105.
- [5] 程苏云,任锦玉,童哲,等. 实验室菌落计数精密度控制研究 - I 影响精密度因素[J]. 中国食品卫生杂志, 2001, 13(5): 11—13.

[收稿日期:2004 - 08 - 10]

中图分类号:R15;R117 文献标识码:B 文章编号:1004 - 8456(2004)06 - 0508 - 03