

## 实验技术与方法

## 消毒餐(饮)具中大肠菌群检测能力验证样品研制及其应用

石嵩,马师良,吕雨莎,张惠媛,李秋阳,姚瑶  
(中国海关科学技术研究中心,北京 100026)

**摘要:**目的 研制一种模拟消毒餐具采样涂抹过程的含菌棉拭子,应用于消毒餐饮具中大肠菌群检测能力验证。方法 阳性样品中含有目标菌和干扰菌,阴性样品仅含有干扰菌。随机抽取阴性、阳性样本各 10 瓶,按照 GB 14934—2016 附录 B(发酵法)进行均匀性检验,将样品分别置于-20 ℃、4 ℃下贮藏 120 d,在 25 ℃、36 ℃和 42 ℃下贮藏 20~60 d 监测其稳定性,检测结果应与指定值一致。发放 3 份样品,实验室最少收到 1 份阳性样品,其余随机发放。为防止数据串通,样本随机编号并缩短结果上报时间。结果 样品在均匀性、贮存稳定性和运输稳定性均能满足能力验证要求。通过考核,50 家实验室评价满意,占 91%;5 家实验室评价不满意,占 9%。结论 消毒餐饮具中大肠菌群检测能力验证样品可以满足能力验证要求,本次能力验证可真实反映参试单位的检测环境及检测水平。

**关键词:**大肠菌群;能力验证;消毒餐(饮)具

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2022)06-1233-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.06.016

### Development and application of coliform detection sample for proficiency testing on sterilized tableware

SHI Song, MA Shiliang, LYU Yusha, ZHANG Huiyuan, LI Qiuyang, YAO Yao  
(Science and Technology Research Center of China Customs, Beijing 100026, China)

**Abstract: Objective** To develop a bacteria-containing cotton swab which is applied to the proficiency testing for coliform detection on sterilized tableware. **Methods** The positive sample contained both target bacteria and interfering bacteria, and the negative sample only contained interference bacteria. 10 bottles of negative and positive samples were selected randomly. The homogeneity tests were carried out in accordance with GB 14934—2016 Appendix B (Fermentation method). The samples were also stored for 120 d at -20 ℃ and 4 ℃, and 20-60 d at 25 ℃, 36 ℃ and 42 ℃ respectively to monitor samples' storage and transportation stability. Uniformity and stability testing results should be consistent with specific values. Three samples were delivered to each laboratory, and minimum of 1 positive sample was issued, the rest were randomly issued. In order to prevent data fabrication, sample numbers were randomly generated, and proficiency tests periods were shortened. **Results** The samples can meet the requirements of proficiency testing in terms of uniformity, storage stability and transportation stability. Fifty (91%) laboratories were qualified. Five (9%) laboratories were unqualified. **Conclusion** The proficiency test samples for the coliform detection on sterilized tableware can meet the requirements of proficiency testing. This proficiency test can truly reflect the testing environment and testing capability of the participating laboratory.

**Key words:** Coliforms; proficiency testing; sterilized tableware

随着生活水平的提高和消费模式的改变,越来越多的人选择在外就餐或外卖餐饮。同时,我国大型活动的举办也愈发频繁,在活动中都会使用大量的消毒餐(饮)具。对餐(饮)具进行消毒是预防肠

道传染病传播、切断食源性疾病传播途径、保障食品安全的重要措施<sup>[1-2]</sup>。因此,消毒餐(饮)具的安全性越来越受到人们的重视。大肠菌群是一类能够发酵乳糖、产酸产气的需氧或兼性厌氧革兰氏阴性无芽孢杆菌,是判断食物或餐(饮)具是否被粪便污染的重要指标<sup>[3]</sup>。通常将大肠菌群作为餐(饮)具卫生状况的重要评价指标<sup>[4]</sup>。当前我国对消毒餐(饮)具中大肠菌群检验的标准方法为 GB 14934—2016《食品安全国家标准消毒餐(饮)具》<sup>[5]</sup>。利用此标准,在日常监督过程中发现消毒餐(饮)具中大肠菌

收稿日期:2021-11-18

基金项目:国家重点研发计划(2019YFC1605100)

作者简介:石嵩 男 助理兽医师 研究方向为微生物检验及微生物领域能力验证样品研制 E-mail:glisters@163.com

通信作者:张惠媛 女 研究员 研究方向为微生物检验及相关科研和管理工作 E-mail:hyzhang2001@163.com

群的检出率为5%~10%<sup>[6]</sup>,而一些地区的检出率高达35%<sup>[7]</sup>。可见消毒餐(饮)具存在大肠菌群污染的风险,对消毒餐(饮)具进行大肠菌群检测是必要的。而检测机构的检测能力是保障结果准确性的重要因素。因此有必要对检测机构使用有效的质控手段,对其检测能力进行评估。

能力验证是一种重要的外部质量控制措施,是按照预先制定的准则评价参加者的能力<sup>[8-9]</sup>,能够进一步提高检测水平<sup>[10]</sup>。目前国内外微生物领域能力验证主要集中在食品、饲料和化妆品等领域,发放的样品也以冻干粉为主。针对食品接触材料相关实物样品如餐(饮)具的能力验证活动,尚无人开展。

本研究基于GB 14934—2016附录B中常用的发酵法,针对现场采样以外的全部实验室检测过程,设计能力验证实验。涂抹棉拭子是发酵法中现场采样后获得的检测样品,是实验室检测活动的开端,通过对带菌涂抹棉拭子的制备及其贮存条件摸索,研制出满足该能力验证要求的实物样品,并应用研究成果组织相关能力验证活动,通过反馈的结果及记录,对参试实验室进行评价,从而了解国内实验室对餐(饮)具大肠菌群项目的检测水平,寻找实验室间存在的差距,帮助实验室发现问题。通过该研究和相应的能力验证活动,不仅填补了国内相关领域的空白,而且对提高国内实验室消毒餐(饮)具检测能力具有促进作用,同时为消毒餐(饮)具的安全监管提供了有利的技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* ATCC25922)、蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides* ATCC10206)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis* ATCC29212)、头状葡萄球菌(*Staphylococcus capitissubsp* ATCC 35661)均购于美国菌种保藏中心。

### 1.2 主要仪器与试剂

PiloFD8 冷冻干燥机(金西盟),生物安全柜(LABCONCO),恒温培养箱 ICP600(Memmert),VITEK compact 2 微生物鉴定系统(梅里埃)。

胰蛋白胨大豆琼脂、脱脂乳粉,月桂基硫酸盐胰蛋白胨(Lauryl sulfate tryptose Broth, LST)肉汤、煌绿乳糖胆盐肉汤培养基(Brilliant green lactose bile broth, BGLB)、氯化钠(北京陆桥),蔗糖(国药)。

### 1.3 样品设计与制备

#### 1.3.1 能力验证样品设计

##### 1.3.1.1 样品性状

西林瓶内装含菌棉拭子1支。该棉拭子可直接

用于检测,无需再次水化。

#### 1.3.1.2 菌株设置

目标菌为大肠埃希氏菌;干扰菌为粪肠球菌、蕈状芽孢杆菌及头状葡萄球菌。

#### 1.3.1.3 样品设置

阳性样本中包含目标菌和干扰菌;阴性样本中仅有干扰菌。

### 1.3.2 能力验证样品制备

#### 1.3.2.1 菌株的准备

将目标菌与干扰菌分别接种至TSA培养基过夜培养,使用VITEK compact 2微生物鉴定系统对菌株进行鉴定,确保所用菌株鉴定准确,未发生生化变异现象,随后用无菌生理盐水洗脱,菌悬液调节至0.5个麦氏浊度值,并逐级稀释后备用。

#### 1.3.2.2 冻干保护剂准备

取脱脂乳粉(3%)及蔗糖(2%)等在无菌水中溶解后备用。

#### 1.3.2.3 样品制备

分别取上述菌株悬液进行混合,将混合好的菌悬液与保护剂充分混合制成预冻菌液。吸取定量的预冻菌液滴加在每支无菌棉拭子中,待棉拭子将液体完全吸收后,转移至冻干机内,冷冻干燥24 h,冻干后每支棉拭子所含的活菌浓度约为500 CFU/支。

### 1.4 样品的检验

根据GB 14934—2016附录B(发酵法)检验方法,制定此次能力验证参试指导书,并用于后续的产品均匀性与稳定性检验。

#### 1.4.1 均匀性检验

依据CNAS-CL03-A001《能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明》<sup>[11]</sup>,随机抽取阴性、阳性样本各10瓶,按照GB 14934—2016附录B(发酵法)的方法进行检测,检测结果应与指定值一致,即阳性样品为应检出大肠菌群,阴性样品则不应检出大肠菌群。

#### 1.4.2 稳定性检验

此次能力验证样品是以棉拭子为载体的实物样品,其稳定性主要受保存条件、运输条件等因素影响。

##### 1.4.2.1 贮存稳定性检验

将阳性样品分别置于-20℃、4℃下存放,于30、60、90及120 d时进行检测,每次分别随机选取2瓶,依据均匀性检验进行检测,评估其样品在贮存过程中的稳定性。

##### 1.4.2.2 运输稳定性检验

由于样品在运输过程中可能出现高温情况,将阳性样品分别置于25℃、36℃和42℃三个温度下,

其中 25 ℃和 36 ℃模拟试验周期为 60 d,分别在 20、40 及 60 d 对样品进行检测;42 ℃温度下模拟试验周期为 20 d,分别在 10、15 及 20 d 对样品根据均匀性检验进行检测。以上测试,每次随机选取 2 瓶,评估样品在运输过程中的稳定性。

### 1.5 能力验证实施方案

#### 1.5.1 考核样品组成

考核样品包括 3 份样品,阴、阳性样品随机发放,但保证每个参试实验室至少收到 1 份指定值为阳性的样品。

#### 1.5.2 样品发放

样品发放采用 4 层包装,第 1 层为无菌西林瓶,内盛含菌棉拭子;第 2 层为塑料泡沫垫,每个泡沫垫最多包裹 3 瓶样品;第 3 层为塑料泡沫箱;第 4 层为快递专用硬质牛皮纸盒,以透明胶带黏贴并封口。包装后当日寄出。

#### 1.5.3 测定方法

推荐参试实验室使用 GB 14934—2016 附录 B(发酵法)进行检测。但本次能力验证不接受使用涉及或包含分子生物学检测的方法。

#### 1.5.4 防止串通措施

样品发放采用随机抽取的方式,阴阳性样本随机编号,编号之间无规律。缩短能力验证结果上报时间,实验室接收样品后,应在 5 个工作日内提交检测结果,并要求提交相应的检测照片作为证据,防止实验室间串通结果。

#### 1.5.5 指定值来源与结果评价原则

##### 1.5.5.1 指定值来源

本次能力验证活动中,在样品制备时使用可溯源的标准菌株作为指定值来源。指定值为阳性的样品中含有目标菌和干扰菌;指定值为阴性的样品中仅含有干扰菌。

##### 1.5.5.2 评价准则

实验室应对每份样品给出检测结果,使用“阴性”“阳性”或“检出”“未检出”上报检测结果。实验室测试结果与已知指定值进行比较,所有样品检测结果与指定值一致时为满意结果;任意一份样品,定性错误判定为不满意结果。

## 2 结果

### 2.1 菌株鉴定结果

考核所用菌株制备前经过 VITEK compact 2 鉴定后,未发生菌株变异现象,鉴定结果准确,可用于能力验证样品的制备。

### 2.2 样品的均匀性检验结果

样品制备完成后,立即抽取阴性、阳性样本各

10 瓶,按照“参试指导书”要求和 GB 14934—2016《食品安全国家标准消毒餐(饮)具》附录 B(发酵法)的方法进行检测,所有样品的检测值与预期指定值均一致,表明本次能力验证样品是均匀的,指定值可用于能力验证结果的评价。

### 2.3 样品的稳定性检验结果

#### 2.3.1 样品的贮存稳定性

阳性样品分别在-20 ℃、4 ℃下贮存 120 d,于 30、60、90 及 120 d 分别随机抽取 2 瓶样品进行检测。结果显示,16 瓶阳性样品在-20 ℃和 4 ℃条件下贮存均能检出。表明该样品在实施周期内稳定性良好满足本次能力验证要求。

#### 2.3.2 样品的运输稳定性评价

在 25 ℃条件下,60 d 内阳性样品均能检出目标菌,在 36 ℃条件下 40 d 时阳性样品全部能够检出目标菌,在 42 ℃条件下 15 d 时阳性样品全部能够检出目标菌(表 1)。根据以上实验结果,本次能力验证样品发放时应选择航空运输的快递方式,在冬季发放样品,可保证样品在短时间内保持低于 42 ℃的温度下送达实验室。本次能力验证计划平均运输时长为 2 个自然日,最长 3 个自然日均到达参试单位,并要求实验室在收到样品后 10 日内完成检测并上报结果。

表 1 样品稳定性测定结论

Table 1 Conclusion of sample stability determination

稳定性	贮存温度/℃	测试时长/d	阳性样品检测结果
贮存	-20	120	目标菌(+)
	4	120	目标菌(+)
	25	60	目标菌(+)
运输	36	40	目标菌(+)
	42	15	目标菌(+)

注:+代表阳性

从稳定性试验的测试结果中可以看出,样品贮存和运输过程中稳定性较好。所有样品在能力验证计划实施周期内其指定值不会发生变化。

### 2.4 考核结果

#### 2.4.1 参试实验室能力验证

参加考核的实验室分布于全国 15 个省(市)、自治区,本次能力验证计划参试单位涉及市场局、海关、疾病预防控制中心、第三方检测机构及生产企业等 5 种类型。

本次能力验证共有 55 家实验室参加,结果见表 2。按照 1.5.5 的评价原则,共有 50 家实验室获得满意结果,满意率为 91%;5 家实验室结果为不满意,不满意率为 9%。在方法选择上,52 家实验室使用 GB 14934—2016,3 家实验室使用 GB 4789.3—2016。

表2 参试实验室能力验证结果  
Table 2 Proficiency verification results of participating laboratories

结果类型	实验室数量	占比/%
假阴性	2	3.6
假阳性	3	5.4
满意	50	91.0

#### 2.4.2 参试实验室培养基使用情况

本项目要求各个实验室在上报结果的同时,需提供包含检测关键环节及步骤的原始记录。通过对原始记录进行分析可见,在本次能力验证活动中所有实验室均使用了商业化培养基,未使用自制培养基。有50家实验室使用了干粉培养基,5家实验室使用了预制培养基(5/55,9%)。而预制培养基对比商业化干粉培养基,并未获得更高的结果满意率。对于初发酵试验中使用的培养基均为国内品牌;对于复发酵试验中使用的培养基,仅有1家实验室使用了国外品牌(1/55,2%),进口培养基的使用率明显低于国产品牌,检测结果满意率并无差异。

表3 参试实验室培养基使用情况统计  
Table 3 Statistics on the use of culture media in participating laboratories

培养基类型	总数	满意率/[n(%)]
干粉	50	48(96)
预制	5	3(60)
合计	55	—

#### 2.4.3 参试实验室质控菌株使用情况

试验过程中的质控菌株使用情况,有38家实验室在试验过程中仅使用了阳性或阴性中的一种标准菌株进行质控,15家实验室同时带有阴、阳性菌株质控,2家实验室未使用任何质控菌株。在获得假阴性结果者均是未使用阳性对照菌株的实验室,获得假阳性结果的3家实验室中有2家使用了阴性对照菌株、1家(33.3%)实验室未使用任何对照菌株。

表4 质控菌种使用及对照设立情况满意率统计  
Table 4 Statistical on the use of quality control strains and comparison

使用情况	总数	满意率/[n(%)]
阳性对照	29	27(93.1)
阴性对照	9	7(77.8)
阳性+阴性	15	15(100)
未使用	2	1(50.0)
空白对照	32	32(100)

### 3 结论与讨论

本研究针对消毒餐(饮)具除现场采样以外的全部实验室检测环节设计能力验证活动,以模拟实物样品的方式,考核实验室的检测能力,国内外未

见相关报道或能力验证项目,填补了该领域能力验证活动的空白,该项目已申请国家发明专利。由于微生物检测样品的特殊性,微生物能力验证样品通常以菌种冻干粉或菌球的样品形式存在<sup>[12-13]</sup>。这类样品的制备方式较为成熟,而且样品稳定性较好<sup>[14]</sup>,使用时水化后直接用于检测,或与单独的样品混合后进行检测。而对于带基质的微生物能力验证样品的研制对制备工艺提出了更高的要求,不仅要保证添加到基质中的微生物具有活性,而且需要有良好的稳定性。

本研究制备的能力验证样品,通过均匀性、贮藏稳定性及运输稳定性分析发现,该样品均匀、稳定,实际运输中不受环境等条件的限制,可用于全国各地区的能力验证使用。

为准确查找有些实验室检验结果不满意的原因,对参加本项目的所有实验室提供的相关原始记录进行分析,发现以下问题:(1)实验室应在培养基到货后,按照GB 4789.28—2013附录<sup>[15]</sup>的要求进行有效的技术性验收,同时针对预制培养基应完善相应的验收规程,定期对培养基质量进行检查<sup>[16]</sup>。(2)有些实验室在进行检测时,并未设置质控菌株对照或空白对照,是否存在环境污染或交叉污染等情况不能明确判断,同时带有阴、阳性对照的实验室满意率100%,这表明检测过程中设立质量控制是实验室检测质量的保证<sup>[17-18]</sup>。(3)个别实验室并未按照标准要求培养或直接使用复发酵培养基就报送了结果,导致不满意结果的出现,建议实验室应按标准要求对样品进行检测。

通过本研究制备的能力验证样品,不仅考察了相关实验室的检测能力,真实反映出实验室检测环境和检测技术水平,同时还发现了实验室存在的问题,为实验室水平的提高和改进检测技术奠定了良好基础。

### 参考文献

- [1] 杨洁. 胃肠道传染性疾病与食品安全管理现状[J]. 实用预防医学, 2008, 15(1): 289-291.  
YANG J. Current situation of gastrointestinal infectious diseases and food safety management[J]. Practical Preventive Medicine, 2008, 15(1): 289-291.
- [2] 曾茹萍, 戴坤富, 谈为富. 仪征市2008年餐饮业餐饮具消毒效果分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2009, 20(4): 74.  
ZENG R P, DAI K F, TAN W F. Sterilization quality of tablewares and cooking utensils in restaurants of Yizheng city (2008) [J]. Journal Of Public Health And Preventive Medicine, 2009, 20(4): 74.
- [3] 刘哲. 消毒餐(饮)具大肠菌群指标不合格的原因分析[J]. 中国食品, 2021(6): 120-123.

- LIU Z. Analysis on the causes of unqualified coliform index in sterilized tableware (drinks) [J]. Chinese Food Journal, 2021 (6): 120-123.
- [ 4 ] 周军波, 朱焰, 江元山, 等. 武汉市2008年—2010年餐饮具卫生状况分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(12): 2952-2953.
- ZHOU J B, ZHU Y, JIANG Y S, et al. Analysis on hygienic status of catering utensils in Wuhan from 2008 to 2010 [J]. Chinese Journal Of Health Laboratory Technology, 2011, 21 (12): 2952-2953.
- [ 5 ] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准消毒餐: GB 14934—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission. National Food Safety Standard Disinfection Meal: GB 14934—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [ 6 ] 周萌, 丁越江, 赵振. 北京市海淀区2013—2017年餐饮业餐(饮)具卫生状况监测与分析[J]. 医学动物防制, 2019, 35(6): 598-600.
- ZHOU M, DING Y J, ZHAO Z. Monitoring and analysis of sanitary status of catering equipment in Haidian District of Beijing from 2013 to 2017 [J]. Journal of Medical Pest Control | J Med Pest Control, 2019, 35(6): 598-600.
- [ 7 ] 祖琴琴, 麻小娟. 守护舌尖上的“安全”: 论消毒餐(饮)具的卫生状况[J]. 食品安全导刊, 2020(36): 110-111.
- ZU Q Q, MA X J. Guarding the “Safety” on the tongue tip: on the hygienic condition of disinfected meals (drinks) [J]. China Food Safety Magazine, 2020(36): 110-111.
- [ 8 ] ISO/IEC. Conformity assessment-General requirements for proficiency testing: 17043: 2010 [S]. International Organization for Standardization Geneva, 2007.
- [ 9 ] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证规则: CAN-RL02 [Z]. 2011.
- China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Capability verification rules: CAN-RL02[Z]. 2011.
- [ 10 ] 雅丹, 项新华, 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: 中国药学会第二届药物检测质量管理学术研讨会, 2015: 4.
- YA D, XIANG X H, MAO X, et al. Analysis of the Food Proficiency testing (PT) ability in OFMCL from 2013 to 2014 [C]. Chinese Pharmaceutical Association: The Second Symposium on Quality Management of Drug Testing, Chinese Pharmaceutical Association, 2015: 4.
- [ 11 ] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明: CNAS-CL03-A001[Z]. 2011.
- China National Accreditation Service for Conformity Assessment Description of the application of the accreditation criteria for proficiency testing providers in the microbial field: CNAS-CL03-A001 [Z]. 2011.
- [ 12 ] 孙晓霞, 胡连霞, 王建昌, 等. 单核细胞增生李斯特氏菌能力验证样品的制备与验证[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 556-561.
- SUN X X, HU L X, WANG J C, et al. Preparation and verification of *Listeria monocytogenes* samples for proficiency testing [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(2): 556-561.
- [ 13 ] 王娜, 钱和. 阪崎肠杆菌能力验证样品均匀性和稳定性的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(7): 606-608.
- WANG N, QIAN H. The homogeneity and stability of samples used for *E. sakazakii* proficiency testing [J]. Chinese Journal of Microecology, 2010, 22(7): 606-608.
- [ 14 ] 刘芳, 杨平, 李传礼. 菌落总数能力验证样品均匀性和稳定性[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(11): 4652-4658.
- LIU F, YANG P, LI C L. Homogeneity and stability of samples used by bacterial count proficiency testing [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 6(11): 4652-4658.
- [ 15 ] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品微生物学检验培养基和试剂的质量要求: GB 4789.28—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- The State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China National Food Safety Standard Quality Requirements for Food Microbiological Test Media and Reagents: GB 4789.28—2013 [S]. Beijing: China Standards Press, 2013.
- [ 16 ] 解伟嘉. 微生物检验中不同领域培养基质量控制及管理[J]. 中国医药指南, 2019, 17(14): 297-298.
- XIE W J. Quality Control and Management of Culture Media in Different Fields of Microbiological Testing [J]. Guide of China Medicine, 2019, 17(14): 297-298.
- [ 17 ] 张艳霞, 萧慧珍, 于晓君, 等. 企业微生物实验室能力验证的质量控制[J]. 生物化工, 2021, 7(2): 120-123, 129.
- ZHANG Y X, XIAO H Z, YU X J, et al. Quality Control for Proficiency Testing of Enterprise Microbiology Laboratories [J]. Biological Chemical Engineering, 2021, 7(2): 120-123, 129.
- [ 18 ] 辛双阳, 董庆林, 何天文. 浅析食品中大肠菌群检测能力验证的质量控制[J]. 食品安全导刊, 2021(15): 72, 74.
- XIN S Y, DONG Q L, HE T W. Quality Control of Coliform Detection Ability Verification in Food [J]. China Food Safety Magazine, 2021(15): 72, 74.