

食品中肠杆菌科计数能力验证结果的不确定度评定



常秀亭, 杨穗珊, 罗小菊, 朱梦, 寇力丹, 谢作蓉*

海南省食品检验检测中心(海南省实验动物中心), 国家市场监管重点实验室(热带果蔬质量与安全), 海南海口 570314

摘要: 目的: 分析肠杆菌科计数(ACAS-PT 1083 (2021))能力验证的结果, 并评定检测结果的不确定度。方法: 根据能力验证指导书并参照 GB 4789.41-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验肠杆菌科检验》对待测样品进行定量检测, 按照 JJF1059.1-2012《测量不确定度的评定与表示》、GB/T 27418-2017《测量不确定度评定和标示》对检测结果进行不确定度的评定, 同时结合使用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统对可疑菌落进行辅助鉴定。结果: 样品 21-Q997 检测结果为 4.2×10^3 CFU/mL。经评价, 本次能力验证 Z 值 -0.8 (小于 2.0), 结果评价为“满意”。在 95% 的置信区间下, 肠杆菌科检测结果的扩展不确定度为 0.0288。VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统对可疑菌落鉴定结果为大肠杆菌, 99% 置信度。结论: 本实验室具备肠杆菌科检验的能力, VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统对可疑菌落进行辅助鉴定的准确性也得到了验证。本研究中建立的评定方法可以应用于食品中肠杆菌科定量检测的不确定度评定。

关键词: 肠杆菌科; 能力验证; 不确定度评定

DOI: [10.57237/j.wjfse.2023.02.001](https://doi.org/10.57237/j.wjfse.2023.02.001)

Uncertainty Evaluation and Analysis of Enterobacteriaceae Count in Proficiency Testing

Chang Xiu-ting, Yang Sui-shan, Luo Xiao-ju, Zhu Meng, Kou Li-dan, Xie Zuo-rong*

Hainan Institute for Food Control (Hainan Experimental Animal Center), Key Laboratory of Tropical Fruits and Vegetables Quality and Safety for State Market Regulation, Haikou 570314, China

Abstract: Objective: To analyze and evaluate the uncertainty the results of the proficiency testing (ACAS-PT 1083 (2021)) of enterobacteriaceae count. Methods: According to the operational instructions of capability verification and GB 4789.41-2016 National food safety standard-Food microbiology test- Enterobacteriaceae count, the enterobacteriaceae of the capability verification sample were tested quantitatively. The suspected colonies were identified by VITEK2. The uncertainty of test results was assessed in accordance with JJF 1059.1-2012 and GB/T 27418-2017 Evaluation and expression of measurement uncertainty. Results: The test result of sample 21-Q997 was 4.2×10^3 CFU/mL. The test results were satisfactory as the Z values of the proficiency test was -0.8 ($|Z|$ was less than 2.0). The extended uncertainty of enterobacteriaceae test results was 0.0288 at 95% confidence interval. The VITEK 2 identification system identified suspicious colonies as E. coli with 99% confidence. Conclusion: The evaluation results demonstrated that the laboratory

基金项目: 海南省自然科学基金项目资助 (321QN0971); 国家市场监管重点实验室(热带果蔬质量与安全)自主课题 (ZZ-2022010).

*通信作者: 谢作蓉, 15208940836@163.com

收稿日期: 2023-04-26; 接受日期: 2023-05-25; 在线出版日期: 2023-06-15

<http://www.wjfse.com>

had the ability to detect the count of enterobacteriaceae in food and the accuracy of VITEK2's auxiliary identification of suspicious colonies has been verified. The evaluation method established in this study can evaluate the uncertainty of the quantitative detection of enterobacteriaceae count with ability verification, and is suitable for the evaluation of the relevant uncertainty in laboratories with similar testing conditions.

Keywords: Proficiency Testing; Enterobacteriaceae; Uncertainty Evaluation

1 前言

肠杆菌科细菌(Enterobacteriaceae)是广泛存在于自然界中,无芽孢、周身有鞭毛或无鞭毛的革兰氏染色阴性杆菌[1],包含沙门氏菌、志贺氏菌和致病性大肠埃希氏菌等食源性致病菌,也包含欧文氏菌和果胶杆菌等食品腐败菌[2-4]。肠杆菌科细菌大多是食源性致病菌或食品腐败菌,它会引起食品的腐败变质并引发感染,对人体健康具有潜在危害[5],其作为食品卫生指标菌在欧洲已有多年历史,在(EC) NO. 2073/2005 食品微生物标准中正式采用在分类学上准确描述命名的肠杆菌科来代替分类学不明确的大肠菌群、粪大肠菌群作为食品卫生指示菌常用来评价加工过程和终产品的卫生状况[6, 7]。

肠杆菌科的定量指标不仅为严格监控食品生产加工的各环节中的肠杆菌污染情况提供了直观依据,同时也便于加工企业确认自身卫生控制措施是否可控有效[8]。2009 年由国际食品法典委员会(CODEX)修订颁布的《婴幼儿配方粉卫生操作规范(Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children)》(CAC/RCP 66) [9]明确规定了婴儿配方粉的生产操作过程中肠杆菌科指标限量。而中国 2010 年发布的 GB 23790-2010《食品安全国家标准粉状婴幼儿配方食品良好生产规范》也明确提出肠杆菌可作为粉状婴幼儿配方食品生产过程及环境卫生状况的指标菌[10],但未对具体限量进行规定。近年来,随着对外贸易的发展,欧洲一些国家已对中国出口的部分食物提出了检测和限量要求,且将其作为国际间食品微生物学实验质量控制、水平测试的必测项目之一。为应对外贸发展的需要,中国也出台了肠杆菌科检验的相关标准,即 2017 年 3 月 1 日实施了 GB 4789.41-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验肠杆菌科检验》,表明肠杆菌科的地位越来越受到重视。但由于中国的食品安全标准限量缺少对肠杆菌科的限值要求,食品中肠杆菌科的检验实际上也较少开展,检验检测能力也相对较为薄弱。

为评价对食品中肠杆菌科的定量检测能力,本实

验室通过参加此次能力验证,检验本实验室肠杆菌科定量检测的技术能力。同时对检测数据的不确定度评定验证检测量结果的准确、可靠性,分析检验过程中各因素对检验结果不确定度的影响程度[11-13]。因此,本文对肠杆菌科计数结果进行不确定度评定,以期为开展肠杆菌科计数的实验室提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

2.1.1 材料与试剂

实验样品由中国检验检疫科学研究院测试评价中心提供的食品中肠杆菌科计数能力验证检测样品,编号为 21-Q997。

缓冲蛋白胨水(Buffered Peptone Water, BPW)、结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(Violet Red Bile Glucose Agar, VRBGA)、葡萄糖琼脂:广东环凯生物科技有限公司。

2.1.2 主要仪器设备

BSC-1600 II A2 生物安全柜:苏净安泰; VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统:法国梅里埃公司; LRH-250F 生化培养箱:上海一横科学仪器有限公司; BX53 光学显微镜:日本 OLYMPUS 公司; HVA-85 高压灭菌器:日本 HIRAYAMA 公司。

2.2 方法

2.2.1 样品处理

依据 ACAS-PT 1083 (2021)的参试指导书处理样品,恢复室温后加入 5mL 稀释液 BPW 进行水化,待溶解后转移至无菌瓶中,反复用余下的 BPW 清洗西林

瓶内壁回收, 60mL 稀释液水化复原后等同于 60mL 的食品样品即为待测样品原液[14]。

2.2.2 样品稀释

参照 GB 4789.41-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 肠杆菌科检验》对样品进行相应稀释[15]: 以无菌吸管吸取 25mL 样品放入 225 mL BPW 中, 充分混匀后制成 1:10 的样品匀液。吸取 1:10 样品的匀液 1mL 加入到 9mL BPW 的无菌试管中, 旋涡混匀后制成 1:100 的样品匀液。同法操作, 制备 10 倍递增系列稀释样品匀液至 10^{-4} 。每个稀释度做 2 个平行, 从制备样品匀液至样品接种完毕操作时间不得超过 15min。VRBGA 倾注平皿冷却后再覆盖一层, $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h, 观察并记录培养的结果, 记录稀释倍数并计数。[15]

在同一相对恒定实验条件下即同一时间和检测环境、同一人、同一培养基、试剂和设备, 对能力比对样品 21-Q997 制成的 1:10 的样品匀液重复测 20 次, 重复检测的结果用于后续的不确定度评定。

2.2.3 典型菌落计数与生化鉴定

肠杆菌科典型菌落为有或无沉淀环的粉红色至红色或紫色菌落, 选取典型菌落数在 15CFU~150CFU 之间的平板计数。[12]对可疑菌落进行生化鉴定, 同时借助 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统对可疑菌落进行进一步的确认。

2.2.4 数学模型的建立

依据 GB 4789.41-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 肠杆菌科》第一法, 单次检测肠杆菌科菌落数 N 值为式(1)。

$$x = \frac{\sum a}{(n_1 + 0.1n_2)d} \quad (1)$$

式中, N 表示样品中肠杆菌科菌落数;
 $\sum a$ 表示确证的肠杆菌科菌落数之和;
 n_1 表示第一稀释度(低稀释倍数)平板个数;
 n_2 表示第二稀释度(高稀释倍数)平板个数;

d 表示稀释因子(第一稀释度)。

3 结果与分析

3.1 典型菌落计数

样品 21-Q997 在 10^{-2} 稀释度时菌落数在 15CFU~150CFU 之间, 重复检测数据及计算见表 1.

表 1 样品检测数据

Table 1 Detection results of sample

序号	检测结果 ($X_i/\text{CFU/mL}$)	$\lg X_i$	残根平方 ($\lg X_i - \bar{\lg X}_i$) ²
1	3.8×10^3	3.5798	0.000799
2	4.5×10^3	3.6532	0.002039
3	5.3×10^3	3.7243	0.013508
4	3.1×10^3	3.4914	0.013617
5	4.9×10^3	3.6902	0.006748
6	3.0×10^3	3.4771	0.017143
7	4.6×10^3	3.6628	0.002993
8	3.8×10^3	3.5798	0.000799
9	6.0×10^3	3.7782	0.028934
10	4.1×10^3	3.6128	0.000022
11	3.5×10^3	3.5441	0.004094
12	3.1×10^3	3.4914	0.013617
13	4.0×10^3	3.6021	0.000036
14	5.1×10^3	3.7076	0.009904
15	3.9×10^3	3.5911	0.000289
16	4.6×10^3	3.6628	0.002993
17	2.7×10^3	3.4314	0.031219
18	3.2×10^3	3.5052	0.010589
19	4.1×10^3	3.6128	0.000022
20	5.8×10^3	3.7634	0.024142
	$\bar{\lg X}_i$	3.6080	$\Sigma=0.183505$

3.2 可疑菌落的确证性试验

从 10^{-2} 稀释度的两个平板上挑取 5 个典型菌落通过革兰氏染色镜检、氧化酶试验以及葡萄糖发酵试验进行鉴定。同时 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统进行辅助鉴定, 鉴定结果为 10 个菌落均为符合生化特征, VITEK 2 鉴定结果为大肠杆菌, 99% 置信度, 生化结果见表 2.

表 2 可疑菌落鉴定结果

Table 2 Suspect colony routine biochemical results

可疑菌落形态	革兰氏染色镜检	氧化酶试验	葡萄糖发酵试验	VITEK2 鉴定结果
红色	阴性, 无芽孢, 杆菌	阴性	阳性	99% Probability Escherichia coli

3.3 不确定度评定

因本实验过程采用了同一时间和检测环境、同一个人、同一培养基、试剂和设备，因此不考虑人员、环境、培养基和试剂设备带来的不确定度，主要考虑了样品的制备过程、样品的稀释过程、加样过程和重复检测引入的不确定度[16, 17]。本试验测定不确定度来源主要有：样液制备过程中引入的不确定度 $u_{Brel}(V)$ ，稀释操作引入的不确定度 $u_{Brel}(C)$ ，加样体积引入的不确定度 $u_{Brel}(X)$ ；而重复检测引入的不确定度 $u_{Arel}(R)$ [18]；

(1) 样液制备过程中引起的相对不确定度 $u_B(V)$

样液制备过程中量取 60 mL BPW 使用了 100 mL 量筒，根据 JJG-196-2006《常用玻璃量器检定规程》[19]，100 mL 量筒的容量允许误差为 ± 1.0 mL，属于 B 类评定[20]，由于玻璃容器允许误差属于矩形分布[21]，标准不确定度为

$$u_B(\text{制备}) = 1.0 / \sqrt{3} = 0.57737;$$

相对标准不确定度为：

$$u_{Brel}(V) = u_B(V) / 60 = 0.009623;$$

(2) 样品 10 倍系列稀释引起的相对不确定度 $u_B(C)$

样品的稀释过程使用的是 1mL 刻度吸管吸取不同稀释级样液至 9ml 的 BPW 中，此过程使用到 1mL 和 10mL 的刻度吸管，根据 JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》，1mL 和 10 mL 刻度吸管的允许误差分别为 ± 0.008 mL、 ± 0.05 mL，属于 B 类评定[22]。同时，本实验最终检测结果计数取第 2 个稀释度(10^{-2})的平板，即过程中进行了 2 次稀释，所以稀释倍数的标准不确定度为：

$$u_B(C) = \sqrt{2 \times ((\frac{0.008}{\sqrt{3}})^2 + (\frac{0.05}{\sqrt{3}})^2)} = 0.041344;$$

相对标准不确定度为

$$u_{Brel}(C) = \frac{1}{(1+9)} \times u_B(C) = 0.004134;$$

(3) 加样体积引起的不确定度 $u_B(X)$

实验检测的结果以 10^{-2} 的平板上的菌落数进行计数，而每个平板使用了 1mL 刻度吸管 2 次做平行，属于 B 类评定，因此加样体积引起的不确定度为：

$$u_B(X) = \sqrt{(\frac{0.008}{\sqrt{3}})^2 + (\frac{0.008}{\sqrt{3}})^2} = 0.006532;$$

相对标准不确定度为

$$u_{Brel}(X) = \sqrt{\frac{(\frac{0.008}{1 \times \sqrt{3}})^2 + (\frac{0.008}{1 \times \sqrt{3}})^2}{1 \times 1}} = 0.006532;$$

(4) 重复性检测引起的不确定度 $u_A(R)$

因肠杆菌科的生长繁殖是以几何级数递增的，所得检测结果的发散性较大，所以按 A 类评定，对计算结果取对数后根据贝塞尔公式进行不确定度的评价[23]：

检测结果对数值的样本标准偏差：

$$s(\lg X) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\lg X_i - \lg \bar{X})^2}{(n-1)}} = 0.098276;$$

标准不确定度：

$$u_A(R) = \frac{s(\lg X)}{\sqrt{n}} = 0.02198;$$

相对标准不确定度：

$$u_{Arel}(R) = \frac{u_A(R)}{\lg X} = 0.006090;$$

(5) 合成标准不确定度、扩展不确定度

1) 合成相对标准不确定度为

$$u_{CreI} = \sqrt{u_{Brel}(V)^2 + u_{Brel}(C)^2 + u_{Brel}(X)^2 + u_{Arel}(R)^2} = 0.01376;$$

2) 取置信概率 $p=95\%$ ，自由度 $v=20-1=19$ ，由 t 分布表得 $t_{95}(19)=2.093$ ，即 $k=2.093$ 。

扩展不确定度： $U_{95} = k \times u_{CreI} = 2.093 \times 0.01376 = 0.0288$ ；

$\lg X$ 的取值范围： $\lg \bar{X} = 3.6080 \pm 0.0288$ ；即 $3.5792 \leq \lg \bar{X} \leq 3.6368$ 。再取反对数，可得检验结果 \bar{X} 的取值范围为 $3795 \leq \bar{X} \leq 4333$ ，最终能力验证样品肠杆菌科菌落总数应报告 $(3.8 \sim 4.3) \times 10^3$ CFU/mL，包含因子 $k=2.093$ 。

3.4 实验结果

本实验室肠杆菌科定量检测能力验证样品21-Q997检测结果为 4.2×10^3 CFU/mL, Z值为-0.8, 结果“满意”(|Z|均小于2)。说明本实验室具备肠杆菌科定量检测的能力。

4 结论

肠杆菌科细菌作为食品卫生指标菌，相比大肠菌群在分类学上更为准确，大多数菌株在正常情况下作为肠道的正常菌群定植于人和动物体内，其主要的危害在于当宿主免疫力降低或细菌移位至肠外部位时可成为条件致病菌而引起人类和动物体疾病，如沙门氏菌、致泻大肠埃希氏菌、志贺氏菌、克雷伯菌、柠檬酸杆菌、沙雷氏菌以及耶尔森菌等，少数菌种还可以导致严重感染[24]。对外贸易的发展中，肠杆菌科的检测和限量要求不断的在发展，但在中国食品安全国家标准中仍常使用大肠菌群作为指标菌，对肠杆菌科作为卫生指标菌的重视和实践还不够。因此本文对实验室参加能力验证的肠杆菌科计数结果进行分析及不确定度评定，以期为开展肠杆菌科定量检测的实验室提供参考。

由于微生物检测过程中受到的影响因素较多，检测结果发散性较大。造成微生物检测结果发散性大的原因除微生物在样品中分布不均匀外，还应根据不同微生物的生长特征分析检验方法中影响检测结果的关键环节[25]。因此在进行肠杆菌科计数测量不确定评价过程中，合理分辨不确定度分量的来源是进行不确定度评价的重点[26-28]。从本次肠杆菌科定量检测不确定度分量结果来看，样液制备过程引入的不确定度贡献最大，其次是加样体积和重复检测引入的不确定度。因此，样液的制备过程中使用量筒是造成该过程引入不确定度贡献最大的主要原因。在之后的检测过程要从量筒的选择上等检测操作建立相应的作业指导书[22, 24]，最大限度的减小不确定度引入的分量值，从而确保定量检测结果的可靠性和准确性。

本实验通过对肠杆菌科定量检测不确定度的评定，有效的掌握了其不确定度的主要来源，规范在检测过程中的操作，以确保检测方法的准确性[11]。本研究对肠杆菌科定量检测不确定度来源分析可为之后相同类型的食品微生物检测结果不确定度评价提

供参考。

参考文献

- [1] 张西萌, 付溥博, 魏咏新, 等. *3M Petrifilm™肠杆菌科测试片的评价 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12 (04): 1612-1619.
- [2] 刘瑛, 俞静, 陈峰, 等. MicroflexTM MALDI-TOF MS 和 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统对肠杆菌科细菌鉴定能力的比较 [J]. 检验医学, 2015, (2): 122-127.
- [3] 马群飞. GB 4789.28—2013《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》应用现状 [J]. 中国卫生标准管理, 2019, 10 (16): 1-3.
- [4] 房海, 陈翠珍, 张晓君. 肠杆菌科病原细菌 [M]. 北京:中国农业科学技术出版社, 2011.
- [5] 李点, 董明盛, 张秋勤. 肠杆菌科细菌群体感应系统的研究进展 [J]. 生物加工过程, 2020, 18 (02): 193-199.
- [6] 揭琴丰, 李露敏, 邱伟华, 等. 江西省婴儿配方羊乳粉生产加工过程肠杆菌科和克罗诺杆菌属污染情况调查 [J]. 当代医学, 2019, 25 (25): 24-27.
- [7] 孙建云, 胡晓宁, 兰光, 等. 婴儿配方粉及生产加工环节微生物污染情况调查 [J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29 (04): 474-477.
- [8] 段锦淼, 高庆超, 李亚辉等. 我国与国际食品法典委员会和欧盟婴幼儿食品安全标准中风险因子限量差异分析与思考 [J]. 食品科学, 2022, 43 (09): 300-309.
- [9] 卢行安, 顾其芳, 袁宝君, 等. AOAC Petrifilm™菌落总数测试片法与食品中菌落总数测定国标方法的比较研究 [J]. 中国食品学报, 2011, 11 (03): 164-167.
- [10] GB 23790-2010 食品安全国家标准粉状婴幼儿配方食品良好生产规范 [S].
- [11] 韦云, 陈佩虹, 周露. 矿泉水中铜绿假单胞菌的测定能力验证结果分析 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11 (16): 5398-5402.
- [12] 刘笑笑, 蔡玉红, 于丽, 等. 多管发酵法测定生活饮用水中总大肠菌群不确定度的评定 [J]. 中国食品添加剂, 2019, (5): 123-127.
- [13] 虹涛, 李青. 不确定度评定在微生物检验中的应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30 (16): 2046-2048.
- [14] ACAS-PT 1083 食品中大肠埃希氏菌、粪大肠菌群、肠杆菌科计数的检验能力验证参试指导书 [Z].
- [15] GB 4789.41-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 肠杆菌科检验》 [S].

- [16] 秦文, 王丽媛, 王晶波, 等. 酸奶中乳酸菌计数不确定度的评定 [J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28 (15): 1844-1846.
- [17] 王爱雯, 吴学贵, 周梅秀, 等. 罗非鱼中菌落总数测量结果的不确定度评定 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 11 (5): 1492-1495.
- [18] 郭丽艳. 能力验证样品中霉菌和酵母检测结果的不确定度评定 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10 (18): 6088-6092.
- [19] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程 [S].
- [20] 彭祺, 高海峰, 竹惠燕, 等. 三重四级杆串联质谱法测定糯米(黄酒原料)中多菌灵残留量不确定度分析 [J]. 酿酒科技, 2014 (01): 93-96.
- [21] JJF 1059.1-2012 测量不确定度的评定与表示 [S].
- [22] 邓晓鸿, 强敏, 朱新生, 等. 婴幼儿配方食品中阪崎肠杆菌的计数结果不确定度评定 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11 (20): 7476-7481.
- [23] 张炜煜, 王岙, 杨修军, 等. 生活饮用水中总大肠菌群MPN法的不确定度评定 [J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29 (21): 2600-2603.
- [24] 郑瑞. 肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物耐药特性及环境影响因素研究. [D] 昆明: 昆明理工大学, 2017.
- [25] 岳苑, 贾冰凝, 马桂娟. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌的测量不确定度评定 [J]. 生物加工过程, 2018, 16 (2): 87-92.
- [26] 武利平, 张晓, 丁培, 等. 能力验证菌落总数结果测量不确定度评定分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27 (24): 3545-3547.
- [27] 游元丁, 赵阳, 林雪丹, 等. 食品中金黄色葡萄球菌测量不确定度评定 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12 (6): 2468-2473.
- [28] 赵丽, 胡宝翠, 王琳琳, 等. 糕点中菌落总数测量结果的不确定度的评定 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 11 (14): 4837-4840.

作者简介

常秀亭

1987年生, 在读博士, 工程师。主要研究方向为分子生物学检验和药理学。

E-mail: 1138444136@qq.com

谢作蓉

1984年生, 硕士, 高级工程师。主要研究方向为食品微生物和分子生物学检验。

E-mail: 15208940836@163.com