

# 食品微生物实验室 质量管理手册

Handbook of quality management of  
food microbiology laboratory

雷质文 主编



 中国标准出版社

# 食品微生物实验室 质量管理手册

Handbook of quality management of  
food microbiology laboratory

雷质文 主编

中国标准出版社

**图书在版编目(CIP)数据**

食品微生物实验室质量管理手册/雷质文主编. —北京:中国标准出版社,2006

ISBN 7-5066-4065-1

I. 食… II. 雷… III. 食品微生物-实验室-质量管理-手册 IV. TS201.3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 081861 号

中国标准出版社出版发行  
北京复兴门外三里河北街 16 号

邮政编码:100045

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

\*

开本 787×1092 1/16 印张 22.5 字数 515 千字

2006 年 8 月第一版 2006 年 8 月第一次印刷

\*

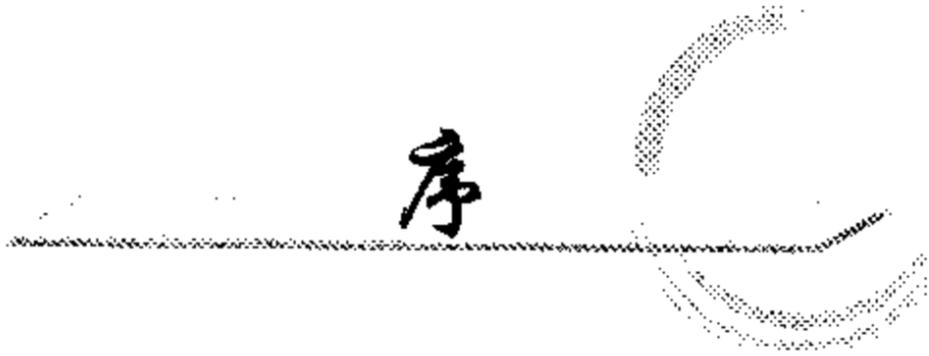
定价 50.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533

# 序



食品污染与食源性疾病是全球性普遍存在的公共卫生问题,而生物性污染(如微生物及其毒素)导致疾病的爆发对食品工业、食品贸易和人群健康的影响更是举世瞩目。根据世界卫生组织的估计,全球每年发生食源性疾病数十亿例,而被报告的食源性疾病病例低于实际发生真实病例的10%,甚至可能低于1%。

世界贸易的不断全球化使国际食品贸易每年的总交易值超过4 000亿美元,极大地推动了食品科技的发展。新的生产工艺或环境变化使得食物链变得更长、更复杂,食品安全的危险性正面临着一种超国界的挑战,如饮食的社会化消费,个体或群体饮食习惯的改变,预包装方便食品、街头食品和食品餐饮连锁服务的增加等。发达国家食品工业化程度的提高并不能降低食源性疾病爆发的危险性,工业化程度越发达,食物链的安全性越难控制,一旦发生问题,其社会影响和经济损失都将是不可估量的,如:美国由沙门氏菌、空肠弯曲菌、志贺氏菌、大肠杆菌 O157:H7、李斯特氏菌和副溶血性弧菌等生物病原体导致的食源性疾病病例每年约330万~1 230万例,造成的经济损失高达65亿~349亿美元。

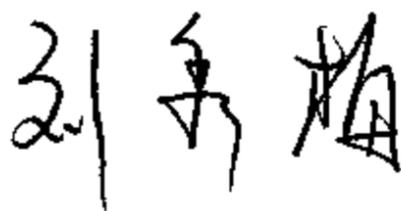
近年来,国内外食品微生物的检验与控制技术发展迅猛,高灵敏度、高特异性的微生物快速检验方法和商业化产品越来越多地走进食品微生物实验室。危害分析与关键控制点(HACCP)和微生物危险性评估(microbiological risk assessment, MRA)等食品安全控制

技术对食品微生物检验方法的科学性提出了更高的要求,对微生物实验室质量管理的规范化提出了严峻的挑战。

一批年轻的食品微生物检验技术人员,以神圣的责任感、饱满的激情,编写了《食品微生物实验室质量管理手册》一书。该书融入了他们亲身的工作实践经验,紧密结合食品微生物的专业要求,借鉴了国内外先进的法规、标准和实验室质量管理理念,认真解读了 ISO/IEC 17025:2005 的 25 个要素。特别是对实验室的生物安全管理、微生物检验内部质量控制和外部质量评估、微生物测量不确定度的评定,以及移动微生物实验室的质量控制等方面提出一些新的质控理念和措施,具有较好的前瞻性、适用性和可读性。

衷心地希望本书的面世能为推动我国食品微生物检验实验室建设和保障食品安全作出积极贡献,并催生一批严谨、务实、走向国际舞台的食品微生物检验与管理人才。

中国疾病预防控制中心食品安全首席专家



2006年6月

# 前 言

食品是人类赖以生存和发展的物质基础,食品安全问题是关系到人体健康和经济社会发展的重大问题。根据世界卫生组织的估计,全球每年发生食源性疾病数十亿例。尽管全球的工业化程度进一步增加,但是并不能保证食源性疾病爆发危险性的降低,反而由于工业化程度越发达,食物供应链越难控制,一旦发生食品安全问题,其影响面和波及面会更大。食品安全问题在严重危害人类身体健康的同时,也会给民众造成很大的心理恐惧与心理障碍。问题严重时,还会影响到消费者对政府的信任。所以保证食品安全是各国政府非常关注的问题。

在食品安全监管体系当中,检测工作至关重要。工欲善其事,必先利其器。近年来,我国在食品微生物检验实验室建设方面取得了很大进步,数量众多、规模不一的各级生物安全食品微生物实验室,为我国食品安全质量保证作出了积极贡献。但是,我国的食品微生物实验室由于缺乏统一的质量控制标准,质量管理水平也参差不齐,有些实验室,特别是某些基层实验室的质量管理还不够规范,检测结果的准确性和可靠性难以得到基本的保证。随着食品微生物的检测在食品安全体系中的地位和作用日益增大,对食品微生物实验室质量管理方面的要求也越来越严格和规范化。因此,很有必要编写一本系统介绍食品微生物实验室质量管理方面的参考书籍。

为统一我国食品微生物检验质量控制规范,制定食品微生物检验实验室质量控制规范,把实验室管理纳入科学化和规范化管理轨道,从而提高我国食品微生物检验实验室的整体质量管理水平和检验技术能力,并为我国民众提供食品安全检验的技术保证,为我国政府应对国内外食品安全的突发事件提供技术支持,科技部特设立国家“十五”重大科技攻关计划专项“食品安全关键技术研究”之子课题“食品安全检测实验室质量控制规范研究”(项目号:2001BA804A33),国家质量监督检验检疫总局则设立课题“食

品安全类实验室质量管理、技术运作和评审认可体系的研究”(项目号:2003IK037)。

本书主要编写人员参加并完成了“食品安全检验实验室质量控制规范研究”的分课题“食品安全 微生物检测实验室质量控制规范研究”,并主持完成了国家质量监督检验检疫总局课题“食品安全类实验室质量管理、技术运作和评审认可体系的研究”,取得了优异的科研成果,并且决定将其整理成书。

在刘秀梅、陈彦长、赵贵明、李寿崧、蒋原、薄清如、陈广全、张萍、曹忠雷等领导 and 专家的关心、支持和鼓励下,工作在检验检疫一线的技术人员特编写了《食品微生物实验室质量管理手册》一书。本书以ISO/IEC 17025:2005《检测和校准实验室能力认可准则》的25个要素为主线,紧密结合食品微生物的专业要求,融入国内外先进的规章、标准、实验室质量管理理念和管理模式,从质量管理体系、实验室设施和环境条件、人员和组织、分包和客户服务、文件、记录的管理和控制、实验室的生物安全管理、样品、实验室设备、实验器具和材料、微生物检验方法、内部质量控制和外部质量评估、微生物测量不确定度的评定、结果的处理和报告、移动微生物实验室的质量控制等方面提出相应的质量管理措施,力求所编写内容具有系统性、前瞻性、兼容性、先进性、适用性、可读性和启发性。

本书面向农业部门、质检部门、卫生部门、高等院校、食品生产企业及相关领域从事食品微生物检验和管理的业务人员(包括管理层、检验人员和后勤保障人员等),可作为学习培训及日常工作参考指导书,对食品微生物实验室进行认可的机构亦有一定的参考价值。

中国疾病预防控制中心首席专家刘秀梅研究员对全书进行了审阅并为本书作序,中国检验检疫科学研究院陈彦长、赵贵明等专家对本书的编写工作给予了大力支持和指导,程苏云、李寿崧、蒋原、薄清如、陈广全、曹际娟、朱金国等专家对全书进行了审阅,并提出了宝贵的修改意见和建议,在此谨向以上各位同行和专家表示崇高的敬意和衷心的感谢。

由于时间仓促和编者水平有限,纰漏和欠缺在所难免,敬请同行和广大读者批评指正。

编者  
2006年6月

# 目 录

<b>第一章 绪论</b> .....	1
<b>第一节 食品安全与微生物危害控制</b> .....	1
一、控制食品微生物污染,保障食品安全 .....	1
二、食品微生物实验室的重要作用 .....	2
<b>第二节 编写本书的背景及依据</b> .....	2
一、编写本书的背景 .....	2
二、编写本书的思路和依据 .....	3
<b>第二章 质量管理体系</b> .....	5
<b>第一节 质量管理体系和质量体系文件</b> .....	5
一、质量管理体系 .....	5
二、质量体系文件 .....	5
<b>第二节 纠正措施和预防措施</b> .....	7
一、不符合项 .....	7
二、纠正措施 .....	8
三、预防措施 .....	10
<b>第三节 内部审核、管理评审和持续改进</b> .....	12
一、内部审核 .....	12
二、管理评审 .....	15
三、质量持续改进 .....	17
参考文献 .....	18
<b>第三章 实验室设施和环境条件</b> .....	19
<b>第一节 实验室的设计和建设</b> .....	19
一、实验室建设的立项 .....	19

二、实验室的选址 .....	20
三、实验室的设计 .....	20
四、实验室橱柜 .....	25
五、实验室的施工与验收 .....	25
第二节 实验室的环境监测和内务管理 .....	26
一、实验室的环境监测 .....	26
二、实验室的内务管理 .....	27
参考文献 .....	29
<b>第四章 人员和组织</b> .....	<b>30</b>
第一节 人员 .....	30
一、人员的组成、相应职责及应具备的能力 .....	30
二、人员的培训 .....	31
第二节 组织与管理 .....	32
一、实验室的法律地位及责任 .....	32
二、实验室的组织和管理要求 .....	33
<b>第五章 分包和客户服务</b> .....	<b>35</b>
第一节 分包 .....	35
一、分包的范围 .....	35
二、分包的控制 .....	35
三、分包的实施 .....	35
四、分包的责任 .....	36
五、相关的记录 .....	36
第二节 客户服务项目 .....	36
一、对客户服务的內容 .....	36
二、对客户服务的要求 .....	36
三、与客户的沟通 .....	36
四、服务效果的反馈 .....	37
五、相关的记录 .....	37
<b>第六章 文件、记录的管理和控制</b> .....	<b>38</b>
第一节 文件的管理和控制 .....	38
一、文件的编写 .....	39
二、文件的审核与批准 .....	42

三、文件的发放 .....	42
四、文件的修改 .....	43
五、文件的作废和销毁 .....	43
六、文件的保管 .....	43
七、文件的查阅 .....	44
八、实验室信息系统(LIS)保护的建	44
<b>第二节 记录的管理和控制 .....</b>	<b>45</b>
一、记录的分类 .....	45
二、记录的作用 .....	46
三、记录的编制要求 .....	46
四、记录的填写 .....	49
五、记录的归档保管 .....	49
六、记录的查阅和保密 .....	50
七、记录的销毁 .....	50
<b>第七章 实验室的生物安全管理 .....</b>	<b>51</b>
<b>第一节 实验室生物安全及生物安全实验室 .....</b>	<b>51</b>
一、有关实验室生物安全的概念 .....	51
二、微生物危害程度的评估及微生物危害等级 .....	51
三、生物安全实验室的分级 .....	52
四、食品微生物实验室操作对象危害等级 .....	52
<b>第二节 生物安全实验室安全设备 .....</b>	<b>53</b>
一、生物安全柜 .....	53
二、移液器 .....	55
三、均质器、摇床和超声处理器 .....	55
四、离心机 .....	56
五、一次性接种环(针) .....	56
六、电热式接种环灭菌器 .....	57
七、组织研磨器 .....	57
八、冰箱与冰柜 .....	57
九、个人防护物品 .....	57
<b>第三节 微生物实验室安全措施 .....</b>	<b>57</b>
一、工作人员的资格和培训 .....	57
二、感染性物质的安全操作要点 .....	58
<b>第四节 微生物实验室安全应急程序 .....</b>	<b>61</b>
一、刺伤、切割伤或擦伤 .....	61

二、潜在感染性物质的食入 .....	61
三、潜在危害性气溶胶的释放(在生物安全柜以外) .....	61
四、容器破碎及感染性物质的溢出 .....	62
五、离心机内盛有潜在感染性物质的离心管发生破裂 .....	62
参考文献 .....	62
<b>第八章 样品 .....</b>	<b>64</b>
<b>第一节 取样 .....</b>	<b>64</b>
一、取样准备工作 .....	64
二、取样的方法 .....	71
<b>第二节 包装密封和标志 .....</b>	<b>75</b>
一、包装密封 .....	75
二、样品的标志 .....	75
<b>第三节 样品的运输、接收和保存 .....</b>	<b>75</b>
一、样品的运输 .....	75
二、样品的接收 .....	76
三、样品的保存 .....	76
<b>第四节 样品的制备 .....</b>	<b>81</b>
一、样品制备的一般要求 .....	81
二、乳及乳制品的制备要求 .....	82
三、肉及肉制品的制备要求 .....	83
四、水产品及水产制品的制备要求 .....	84
五、乳及乳制品、肉及肉制品、水产品及水产制品之外的食品的制备要求 .....	86
六、PCR 检测用样品的制备要求 .....	88
七、主要微生物检验样品的制备要求 .....	88
<b>第五节 样品的处置 .....</b>	<b>89</b>
参考文献 .....	89
<b>第九章 实验室设备 .....</b>	<b>90</b>
<b>第一节 实验室设备的配置和采购 .....</b>	<b>90</b>
一、食品微生物检验实验室设备的配置 .....	90
二、仪器、设备和材料的采购及其质量管理 .....	91
<b>第二节 实验室设备的质量管理和使用原则 .....</b>	<b>93</b>
一、实验室设备的质量管理体系 .....	93
二、实验室设备的管理、使用原则 .....	94

<b>第三节 设备的使用、维护、校准和期间核查</b> .....	98
一、温度计和温度测量设备 .....	99
二、灭菌设备 .....	99
三、培养箱 .....	103
四、水浴锅 .....	104
五、冰箱和冰柜 .....	105
六、天平 .....	105
七、pH计 .....	106
八、显微镜 .....	107
九、生物安全柜和超净工作台 .....	107
十、均质器 .....	109
<b>第四节 主要微生物检验用仪器及其验证</b> .....	109
一、主要的自动化微生物鉴定系统 .....	109
二、微生物检验用仪器的验证 .....	116
<b>参考文献</b> .....	122
<b>第十章 实验器具和材料</b> .....	123
<b>第一节 实验器具和材料的准备、使用及其验证</b> .....	123
一、常用的器具和材料 .....	123
二、常用的器具和材料的采购和管理 .....	124
三、常用的器具和材料的使用及其验证方法 .....	124
四、商业试剂盒的使用、管理及其验证 .....	135
<b>第二节 培养基及其他诊断试剂的使用、管理及其性能测试</b> .....	142
一、培养基的定义及分类 .....	142
二、培养基的质量控制 .....	145
三、培养基的性能测试 .....	149
四、测试结果文件化 .....	152
五、国内外关于培养基使用、管理及其性能测试的标准 .....	168
六、食品微生物检验用诊断试剂 .....	168
<b>第三节 标准物质的保藏、使用及管理</b> .....	169
一、概述 .....	169
二、菌种保藏管理要求 .....	169
三、菌种接收和登记 .....	170
四、冻干菌种的复活 .....	170
五、质控菌株的保藏和使用 .....	172
六、菌种的保藏 .....	174

七、复核 .....	176
八、常见食源性细菌的保藏方法 .....	177
九、废弃物的处置 .....	183
<b>第四节 消毒剂的使用及其验证</b> .....	183
一、定义和术语 .....	184
二、消毒剂的种类和应用 .....	184
三、消毒剂的使用 .....	184
四、消毒剂的使用验证方法 .....	191
五、常用消毒剂的中毒及处理 .....	195
六、消毒剂的管理 .....	196
参考文献 .....	197
<b>第十一章 食品微生物检验方法</b> .....	198
<b>第一节 国内外的食品微生物标准检验体系</b> .....	198
一、标准方法 .....	198
二、非标准方法(non-standard method) .....	199
<b>第二节 微生物检验快速检测系统</b> .....	200
一、主要微生物检验快速检测系统 .....	200
二、微生物快速检测系统的局限性 .....	227
三、微生物快速检测系统的认可 .....	227
<b>第三节 微生物检验方法的选择</b> .....	229
<b>第四节 微生物检验方法的编写</b> .....	229
一、标准方法的编写 .....	230
二、非标准方法的编写 .....	231
三、标准操作程序的编写 .....	232
<b>第五节 食品微生物检验方法的验证和确认</b> .....	234
一、食品微生物检验方法的验证和确认导则 .....	235
二、食品微生物检验方法的验证 .....	236
三、食品微生物检验方法的确认 .....	241
参考文献 .....	244
<b>第十二章 内部质量控制和外部质量评估</b> .....	245
<b>第一节 内部质量控制</b> .....	245
一、概述 .....	245
二、实验室内部质量控制 .....	245

第二节 外部质量评估 .....	249
一、外部质量评估的概念 .....	249
二、外部质量评估的措施 .....	249
第三节 统计技术在实验室质量保证中的应用 .....	260
一、统计技术的作用 .....	260
二、稳健统计技术基本概念 .....	260
三、稳健统计技术的数据处理 .....	261
参考文献 .....	264
<b>第十三章 微生物测量不确定度的评定 .....</b>	<b>266</b>
第一节 概述 .....	266
一、测量不确定度评定的意义 .....	266
二、测量不确定度的定义 .....	266
第二节 与微生物测量不确定度有关的政策 .....	267
一、CNAL 测量不确定度的政策(参照 CNAL/AR11;2003) .....	267
二、APLAC 在测试领域有关测量不确定度的政策 .....	268
三、EURACHEM/EA 有关测量不确定度的政策 .....	269
第三节 微生物测量不确定度的评定 .....	269
一、微生物测量不确定度的评定原理 .....	269
二、微生物测量不确定度的评定实例 .....	270
第四节 国内外对微生物不确定度评定的状况 .....	273
参考文献 .....	274
<b>第十四章 结果的处理和报告 .....</b>	<b>275</b>
第一节 结果的处理 .....	275
一、目标微生物的读取 .....	275
二、菌落计数的基本方法 .....	276
三、MPN(最近似数)法 .....	281
四、微生物鉴定结果的判定 .....	283
第二节 结果的报告 .....	284
一、报告的文本要求 .....	284
二、检测结果的表示 .....	284
三、检测结果的评定 .....	285
四、报告的管理和控制 .....	285
参考文献 .....	286

<b>第十五章 移动微生物实验室的质量控制</b> .....	287
一、移动微生物实验室的介绍 .....	287
二、移动微生物实验室的组织和职责 .....	287
三、样品的保管 .....	287
四、校准过程和校准频次 .....	288
五、内部质量控制和检查 .....	288
六、测试数据的取得、确认和报告 .....	288
七、运转情况及审核 .....	289
八、评估数据质量和决定报告限值的常规程序 .....	289
九、预防措施和纠偏措施 .....	289
十、管理评审质量保证报告 .....	290
十一、文件保存 .....	290
十二、移动微生物实验室的安全措施 .....	290
附录 1 分包协议书 .....	291
附录 2 食品及食品加工环境样品大肠杆菌和大肠菌群 COLI ID 计数法 ...	293
附录 3 标准操作程序 沙门氏菌的检测方法 .....	298
附录 4 食品微生物非标准方法确认指南 .....	319
附录 5 菌落总数测试不确定度评估报告 .....	330
附录 6 互联网上的食品微生物资源 .....	334
附录 7 MPN 表 .....	340

# 第一章 绪 论

民以食为天,食以洁为贵。食品安全问题是关系国民健康的重大问题,也是国际贸易中的重大瓶颈问题。食品安全与质量控制是每个国家发展的重要组成部分,各国政府都在不遗余力地加强食品安全控制。对食品安全进行监控是国家意志的体现。

## 第一节 食品安全与微生物危害控制

### 一、控制食品微生物污染,保障食品安全

随着经济的发展和水平的提高,公众的注意力已从食品供应保障转向食品安全营养。致病性微生物是影响食品安全各要素中危害最大的一类。食品微生物污染是涉及面最广、影响最大、问题最多的一类污染。

据统计,大多数国家病例报告记录中微生物所致的食源性疾病发生率在增加,其中致病菌包括沙门氏菌、空肠弯曲菌和肠出血性大肠杆菌。即使在工业化国家,每年3个人中就有1人受到食源性疾病的困扰。美国每年大约有760万病例,32.5万人住院和0.5万人死亡,而在发展中国家由微生物引起腹泻的儿童死亡数达210万。由于大多数食源性疾病的病例没有报告,所得到的食物中毒数据仅仅是“冰山一角”,所以在食品安全领域,一个最重要的问题是缺乏数据。如此高的漏报率,除管理上的问题外,致病性微生物的检测和溯源手段的限制也是一个重要因素。

微生物危害引起食源性疾病发生率增加的原因很多。不同地区有不同的感染性疾病谱,如果食物中微生物病原发生变异或病原种类发生改变,未接触过这些致病原的易感人群就会增加。农场耕作方式发生改变、食品流通变得更加广泛、发展中国家肉禽消费量增加,都可能使食源性疾病发生改变。食物流通范围扩大使得食品污染传播得更快、更远;新的食品生产方式给我们带来了新型食品,也可能带来新的或罕见病原。集约化的动物饲养技术,减低了生产成本,但出现的新的人畜共患疾病更容易传播和影响人类健康。因为畜禽肥料(排泄物)含有病原,大规模饲养时畜禽肥料的安全排放也日益成为公共卫生问题。饮食方式的改变,如嗜好生食(或尽量少加工程度的食品)、延长货架期(从食品加工到消费的间隔时间)、增加在外就餐机会等,均可增加与微生物相关的食源性疾病。而且新的致病菌以及以前与食物关系不大的致病菌引起的食源性疾病已经开始涌现。如1979年,大肠杆菌O157:H7在牛肉、未消毒的苹果汁、牛奶、莴苣和饮水等中被鉴定出来,大肠杆菌O157:H7还引起几个国家发生食物中毒与死亡(特别是儿童)事件。沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* DT104)已对5种常见抗生素产生遗传抗药性,并已广泛地传播,引起了人们的关注。这些事实表明食品中的微生物危害在很长一段时间内仍然是一个重要的更难控制的公共卫生问题。

第22次CAC大会和第45届国际食品法典执行委员会要求联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)成立类似于食品添加剂联合专家委员会(JECFA)和农药残留专家联席会议(JMPR)的专家咨询机构——微生物危险性评估专家联席会议(JEMRA),开展微生物危险性评估以保证微生物方面的食品安全。这些危险性评估结果将为减低食品中微生物性危害所采取的措施提供科学基础。微生物危害的有效控制需要通过定量微生物危险性评估(MRA)和危害分析与关键控制点(HACCP)体系的建立得以实现。

认识微生物危害本质进而采取干预措施时,MRA是优先采用的工具,而HACCP则通过关键控制点来控制整个生产过程。

## 二、食品微生物实验室的重要作用

要有效控制食源致病性微生物危害,一方面应实现从“农田到餐桌”的全过程管理,建立从源头治理到最终消费的监控体系,另一方面应加强从“农田到餐桌”过程中对致病性微生物的检测。不论定量微生物危险性评估(MRA)还是危害分析与关键控制点(HACCP)体系,对食源致病性微生物进行检测是其重要组成部分。

由于微生物的特殊生物学特性,对致病性微生物的检测必须在特定的食品微生物实验室内进行。食品微生物实验室是进行食品、食品添加剂、饮品以及食品加工环境中卫生指标菌和致病性微生物检验的实验室。

食品微生物实验室的规划建设和配套环境设施的科学性和合理性、检验人员的素质、检验器具和耗材的质量、检验方法的合适性、仪器、设备的状态、内部质量控制和外部质量评估等,不仅关系到食品微生物的检测质量,而且关系到食品安全,甚至关系到个人安全、社区安全和经济贸易,因此必须通过适当的监控手段和科学合理的验证试验来对其进行管理,没有管理就谈不上质量。

## 第二节 编写本书的背景及依据

### 一、编写本书的背景

1991年联合国粮农组织(FAO)出台了《食品质量控制手册 12. 食品微生物控制实验室的质量保证》、1994年北欧食品分析委员会(NMKL)出台了《微生物学实验室质量保证准则》(NMKL NO5:1994)、1995年美国食品药品监督管理局(FDA)出台了《实验室质量保证手册》(Laboratory quality assurance manual)、1996年国际标准化组织(ISO)发布了ISO 7217:1996《食品和动物饲料微生物学——微生物检测通则》、1998年美国农业部食品安全局(USDA FSIS)发布了《微生物实验室指南》(第3版)(Microbiological Laboratory Guideline)、1999年国际标准化组织(ISO)发布了ISO/IEC 17025:1999《检测和校准实验室能力的基本要求》、2002年欧洲认可合作组织(European co-operation for accreditation, EA)发布了EA-04/10:2002(Accreditation for microbiological laboratories)等,以上微生物检验实验室的质量保证规范均要求食品微生物检验实验室在对食品微生物进行检验时必须遵循良好实验室规范(GLP),以此来有效保证检验结果的正确性和可靠性。

国内已在食品生产中普遍推广“良好农业规范(GAP)”、“良好兽医规范(GVP)”、“良好生产规范(GMP)”、“良好卫生规范(GHP)”和“危害分析与关键控制点(HACCP)”等先进的食品安全控制技术,同时食品生产单位加强了食品微生物检验工作,建立食品微生物检验实验室,在食品微生物检验方面也有了很大进步。

为了提高实验室的质量管理水平,减少可能出现的质量风险和实验室的责任,提高社会对认可实验室的认知度和信任度,达到法律、政府和市场的认可,实现检测数据的双边和多边互认,目前我国很多食品微生物检验实验室通过中国实验室国家认可委员会(China National Accreditation Board for Laboratories, CNAL)的认可,这些食品微生物检验实验室一般都是依据 CNAL/AC01:2005《检测和校准实验室能力认可准则》(等同采用 ISO/IEC 17025:2005)、按照 CNAL/AC05:2003《实验室认可准则在微生物检测实验室的应用说明》等建立了质量管理体系,但由于全国从事食品微生物检验的实验室数量多、规模小,各级实验室的信息没有交流渠道,在食品微生物检验过程中没有统一的质量控制规范和标准,也没有食品微生物检验技术能力验证程序,一些实验室的检验结果还存在许多问题,缺乏准确性、可靠性、可追溯性和权威性。当国外一些国家对我国实行技术壁垒,我国的食品出口立即受阻,对出口企业和我国经济造成巨大的打击,并造成严重的社会问题和经济问题,另外当出现食品安全方面的突发事件时,不能立即为政府有关部门提供强有力的技术支持。

## 二、编写本书的思路和依据

本书将上述部分科研成果分散到 ISO/IEC 17025:2005 的框架内,同时要求各参编人员在此基础上,综合、归纳、吸收、引用和参考了国际分析家协会国际方法委员会关于食品微生物定性和定量检验方法的确认指南(2002)(AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis)、ISO 15189:2003《医学实验室——对质量和能力的特殊要求》(Medical laboratories—Particular requirements for quality and competence)、ISO 7218:1996《动物和食品饲料的微生物学——微生物检验通则》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—General rules for microbiological examinations)、ISO 11133-1:2000《食品和动物饲料的微生物学——培养基制备和生产导则——第1部分:实验室培养基制备的质量保证指南》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Guidelines on preparation and production of culture media—Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory)、ISO 11133-2:2003《食品和动物饲料的微生物学——培养基制备和生产导则——第2部分:培养基性能试验实用指南》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Guidelines on preparation and production of culture media—Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media)、联合国粮农组织(FAO)《食品和营养丛书—1991 食品质量控制手册-12 食品微生物控制实验室的质量保证》(Food and nutrition papers-1991 Manuals of food quality control-12. Quality assurance in the food control microbiological laboratory)、美国农业部(USDA FSIS)《微生物实验室指南——第36章》(1998

年,第3版)(Microbiological Laboratory Guideline—Capter36(3rd,1998))、ISO 16140:2003《食品和动物饲料的微生物学——可替代方法的确认规范》(Microbiology of food animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods)、ISO/TC 34/SC 9N 593:2002《内部方法确认》(In-house method validation)、ISO 707:1997《乳和乳制品——取样指南》(Milk and milk products—Guidance on sampling)、ISO 6497:2002《动物饲料——取样》(Animal feeding stuffs—Sampling)、ISO 17604:2003《食品和动物饲料的微生物学——微生物分析用胴体取样方法》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Carcass sampling for microbiological analysis)、ISO 18593:2004《食品与动物饲料的微生物学——用接触板和拭子对表面取样的水平方法》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs)、ISO 5667.5:1991《水质——取样——第5部分:饮用水以及食品和饮料加工用水的取样指南》(Water quality—Sampling—Part 5:Guidance on sampling of drinking water and water used for food and beverage processing)、ISO 7002:1986《农产食品——大批食品的标准取样方法》(Agricultural food products—Layout for a standard method of sampling from a lot)、欧盟委员会(EC)第2073/2005章食品微生物标准(Commission regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs)、美国农业部食品安全局(FSIS)指令10204.2《即食产品的微生物取样方法》(FSIS DIRECTIVE 10240.2 Microbial sampling of ready-to-eat (RTE) products)、国际食品微生物标准委员会(ICMSF)《食品中的微生物 2-1986 微生物检验的取样方法:原理和特殊应用》(Microorganisms in foods 2-1986 Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications)、美国食品药品监督管理局(USA/FDA)细菌分析手册网络版(2003)第一章食品取样和均匀样品的制备(Bacteriological Analytical Manual online:2003 Chapter 1 Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate)、GB 19489—2004《实验室 生物安全通用要求》等国际和国内权威标准文本中关于实验室质量管理的理念,重点规范食品微生物检验过程中的关键质量管理环节以及日常管理工作中的较易忽略的部分,强化结果质量保证(内部质量控制方法、外部质量评估方法),充分保证所编写内容具有系统性、前瞻性、适用性、兼容性和先进性。

## 第二章 质量管理体系

食品微生物实验室应建立、实施和维持与其活动范围相适应的质量管理体系；应将其政策、制度、计划、程序和指导书制定成文件，并达到确保实验室检测结果质量所需的程度。体系文件应传达至有关人员，并被其理解、获取和执行。

质量管理体系要科学合理，有效运行，并且要不断地完善。

### 第一节 质量管理体系和质量体系文件

#### 一、质量管理体系

质量管理体系是实施质量管理所必需的组织结构、程序、过程和资源。

实施质量管理体系必须首先得到实验室主管的承诺，形成指导原则和实施宗旨，即质量方针；需要相应的一套程序来支持质量方针、目标和指标的实现，并制定质量管理方案。为保证体系的适用和有效，应设立监测和控制机制，配置一定的人财物，并通过审核与评审促进体系的进一步完善和改进提高。

#### 二、质量体系文件

##### 1. 质量体系文件的概念

质量体系文件(quality system documentation)是质量管理体系的书面文字表达，是介绍一个实验室的质量方针、目标和公正性承诺以及质量管理体系要素所涉及的各项活动的目的、范围、控制要点、控制方法与执行记录等的一整套文件。

##### 2. 质量体系文件的构成

典型的质量体系文件包括三个层次：质量手册(quality manual)、程序文件(procedure document)、标准操作程序(standard operating procedure, SOP)和质量记录(quality record)。质量体系文件层次的示意图见图 2-1。

质量手册是描述质量体系的纲领性文件，提出对过程和管理的要求。其内容包括：说明实验室总的质量方针以及质量体系中全部活动的政策；规定和描述质量体系；规定对质量体系有影响的管理人员的职责和权限；明确质量体系中各种活动的行动准则及具体程序、质量目标和质量方针。

程序文件是针对质量手册所提出的管理与控制要求，规定如何达到这些要求的具体实施办法。程序文件为完成质量体系中所有主要活动提供了方法和指导，分配具体的职责和权限，包括管理、执行、验证活动。程序文件规定质量活动的目的和范围，明确做什么，谁来做，何时、何地以及如何做，即按通常所说的“5W1H”(what、who、why、where、when、how)进行展开。

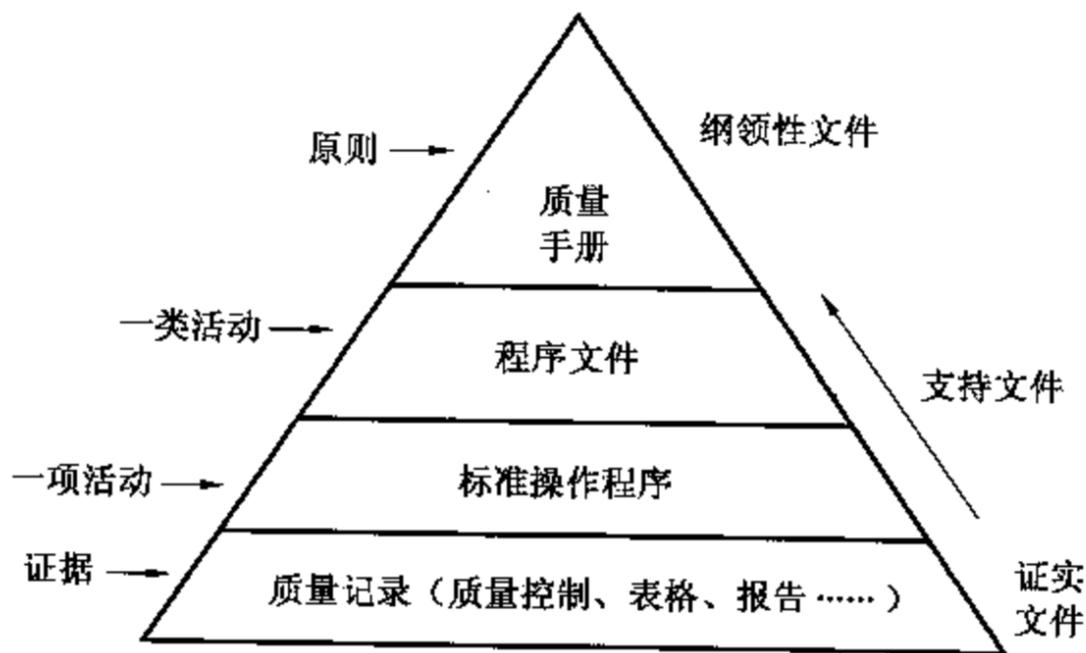


图 2-1 质量体系文件示意图

标准操作程序是表述程序文件中每一步更详细的操作方法,指导员工执行具体的工作任务。标准操作程序和程序文件的区别在于,标准操作程序仅仅涉及到一项独立的具体任务,而程序文件涉及到质量管理体系中某个过程的整个活动。

为了确保质量体系有效运行,需要设计一些实用的表格和给出活动结果的报告,这些表格在使用之后连同报告,就形成质量记录,作为质量体系运行的证据。

### 3. 质量体系文件的特性

(1) 法规性:质量体系文件一旦批准实施,就必须认真执行;文件修改只能按规定的程序进行;文件作为评价实际运作的依据。

(2) 唯一性:一个体系只能有唯一的质量体系文件系统,一项工作只能规定唯一的程序,一项规定只能有唯一的理解。因此,不能使用无效的版本。

(3) 适用性:实验室应根据各自的性质、任务和特点,制定适合自身质量方针以及检测工作特点和需要的、具有可操作性的质量体系文件。

(4) 见证性:为社会提供公正数据的机构,其数据必须有法律辩护依据。同时,质量管理体系的建立、运行和效果依赖于有效的监督机制。因此,各项质量活动应具有可溯性和见证性,以便通过各项记录及时发现偏离规定的未受控环节以及质量管理体系的缺陷和漏洞,对质量管理体系进行自我监督、自我完善、自我提高。

### 4. 质量体系文件的作用

质量体系文件是实验室开展质量活动的依据。通过认真执行质量体系文件,可实现实验室的质量方针,达到预期的质量目标。

质量体系文件也是实验室质量管理体系存在的证据和质量保证能力的文字表达,可以使客户或第三方确信实验室的管理水平和技术能力,能够达到认可准则和相关标准的要求,起到外部质量保证的作用。

质量体系文件还是实验室内部审核依据和质量持续改进的保障。依据质量体系文件检查质量体系运行的有效性,通过实施纠正和预防措施,达到质量持续改进的目的。

质量体系文件又是实验室全体员工培训的教材。通过培训使员工尤其是新员工了解实验室的质量体系,熟悉本部门和本岗位的职责,清楚自己工作所依据的文件,掌握本岗位的工作技能并做好有关活动的记录,使质量体系有效地运行。

### 5. 质量体系文件的编写原则

(1) 科学合理的原则:质量体系文件的科学性主要体现在与 ISO/IEC 17025 的一致性,合理性则要求符合检测和管理工作的规律和特点,有利于质量方针的实施和质量目标的实现。一项工作只能规定唯一的程序,一项规定只能有唯一的理解,因此不能使用无效的版本。

(2) 可操作实施的原则:编写质量体系文件时始终要考虑到可操作性,以便于实施、检查、记录和追溯。

(3) 系统协调的原则:质量体系各要素之间具有一定的相互依赖、相互配合、相互促进和相互制约的关系,形成了具有一定活动规律的有机整体。在编写质量体系文件时必须树立系统的观念,应从检测机构的整体出发进行设计、编排。对影响检测质量的全部因素进行有效的控制,接口要严密、相互协调、构成一个有机的整体。质量体系文件一旦批准实施,就必须认真执行,文件修改只能按规定的程序进行,文件应作为评价实际运作的依据。

## 第二节 纠正措施和预防措施

实验室按照要求建立质量管理体系,并形成体系文件,通过定期的内部审核和日常的质量监督等活动,识别不符合项或潜在的不符合项,采取纠正、预防等措施,确保质量管理体系有效地运行。

### 一、不符合项

不符合项(nonconformity)是指检测工作的任何方面,或该工作的结果不能满足其程序或客户满意的要求。不符合项的控制,是指对实验室的不符合项进行识别,并评价其严重性,立即进行纠正,同时决定不符合项能否接受,必要时通知客户并取消工作。

不符合项的控制应注意以下几个方面:

1. 要明确规定实验室进行不符合项识别、评价、处置的人员职责和具体措施。

2. 不符合项可能在质量体系和技术运作的各个环节中发生,如客户抱怨、质量控制、仪器校准、消耗性材料的核查、对员工的考察或监督、检测报告的核查、管理评审和内部或外部审核等。

3. 不符合项按其严重程度可分为:严重不符合项、一般不符合项。

(1) 严重不符合项:指已影响质量体系的正常运行或对客户造成重大损失和影响的不符合项。如:质量文件存在重大缺陷、某一要素出现系统性失效、关键工作失控、实际运作严重偏离质量体系文件要求、同样的问题在多次审校中均发现等;试验方法理解不准确、运用的试验方法错误、资源不满足或不符合项要求等直接影响检测工作质量、客户投诉(事实成立)、质量事故、样品损坏无法测试等造成严重损失和客户严重不良影响的不符合项以及检测工作、报告编制等过程中发生的严重影响检测结果和检测报告质量的不符合项等。

(2) 一般不符合项:指对质量体系运行有轻微的影响或对检测结果的影响较轻微的不符合项,但未影响质量体系的正常运行、未对客户造成损失和影响。如:在某些程序环节上存在不符合项要求,某些不符合项只限在个别场所偶然发生,某些人员的偶然过错造成重复检测、样品损失但未出具结果的不符合项以及检测工作、报告编制等过程中发生的轻微影响检测结果和检测报告质量的不符合项等。

4. 不符合项的处置。实验室各级管理及监督人员应加强对各项质量活动的监控,实验室工作人员在检测活动过程中一旦发现不符合项,均有权向上一级及管理层报告。发现并确认不符合项时,应及时采取如下措施:

(1) 必要时,暂停不符合项,以及扣发检测报告等。

(2) 对不符合项的严重性进行评价:由实验室部门主管人员对各自部门的不符合项进行评审。有疑义的不符合项以及客户投诉、质量事故等其他严重不符合项应由实验室质量负责人组织进行评价。

(3) 对于一般的不符合项,弄清不符合项原因后,应会同该工作具体责任者,立即予以纠正。采取的措施应记录在《不符合项报告/纠正措施报告》(见表 2-1)中。

(4) 对于严重的不符合项,评审人应立即责成责任者采取纠正措施、填写记录,并查找可能引起的其他影响,还应将评价结果报告向实验室最高主管通报。

(5) 当不符合项结果涉及已发出的报告时,质量负责人应联络客户,告知原因和决定。在获得同意的情况下,可采取收回报告、换发报告以及补充报告的方式进行处置。

(6) 根据不符合项的严重程度,决定何时恢复工作。对于一般不符合项,纠正后由实验室技术负责人批准恢复工作;对于严重不符合项,要视所采取的纠正措施是否有效,由实验室最高主管批准恢复工作。必要时可以采取中止试验、由其他人接替检测工作或通知客户并取消试验的方式解决问题。

5. 实验室质量负责人应针对不符合项,组织相关人员讨论和分析原因,如果表明不符合项重复发生的可能性存在,或对实验室的运作是否符合政策和程序的要求产生怀疑时,应执行纠正措施控制程序和预防措施控制程序。

## 二、纠正措施

纠正措施(corrective action)是指为消除实验室已经出现的不符合项或其他不期望情况的原因所采取的措施。

纠正措施的控制应注意以下几个方面:

1. 要明确规定实验室采取纠正措施相关人员职责和具体程序。

2. 纠正和纠正措施是有区别的。纠正(correction)是为消除已发现的不符合项所采取的措施,纠正可以是更改、返修、返工、降级;而纠正措施是为消除已发现的不符合项或其他不期望情况的原因所采取的措施,采取纠正措施是为了防止再发生。对不符合项予以纠正,纠正后必须再次验证(检验),以证实其符合性。同时,应当分析发生不符合项的原因,落实其责任,针对原因采取纠正措施,以防止类似不符合项再发生。这是控制不符合项关键的一环。纠正可以与纠正措施一同采取,也可以分开采取。

表 2-1 不符合项报告/纠正措施报告

编号:

受审核部门		审核人员	
向导		审核日期	
<p>不符合项事实:</p>  <p>不符合项的文件: <input type="checkbox"/> 文件名称: _____ 条款号: _____</p> <p>不符合项的严重程度: <input type="checkbox"/> 严重不符合项 <input type="checkbox"/> 一般不符合项</p> <p>说明: <input type="checkbox"/> 已在审核期间采取了纠正;</p>  <p><input type="checkbox"/> 未在审核期间采取纠正</p> <p style="text-align: right;">审核员: _____ 受审部门负责人确认: _____</p>			
<p>原因分析及纠正措施:</p>   <p style="text-align: right;">责任部门负责人: _____ 日期: _____</p> <p style="text-align: right;">审核组长/质量负责人: _____ 日期: _____</p>			
<p>纠正措施实施情况:</p>   <p style="text-align: right;">责任部门负责人: _____ 日期: _____</p>			
<p>纠正措施验证:</p>   <p style="text-align: right;">审核员: _____ 日期: _____</p>			
<p>不符合项关闭: <input type="checkbox"/> 同意 <input type="checkbox"/> 不同意</p>  <p style="text-align: right;">质量负责人: _____ 日期: _____</p>			

3. 实验室对不符合项进行调查,应根据不符合项对检测工作的影响程度、可能造成后果的严重性进行评价,而决定是否采取纠正措施。

4. 对于可能影响检验结果正确性和有效性的不符合项的纠正措施,应包括立即书面通知受影响客户。

5. 责任部门应立即组织相关人员仔细分析产生不符合项的所有潜在原因。进行原因分析是纠正措施与纠正的主要区别。一个不符合项可以有若干个原因,可从客户要求、样品、样品规定、方法和程序、员工培训、消耗品、设备及其校准等方面进行原因分析。

6. 责任部门根据分析的原因和针对不符合项的严重程度和风险大小制定相应的纠正措施,明确完成日期,并报质量负责人批准。

7. 纠正措施应落实到责任人,由相关责任人负责具体实施,责任部门负责人监督责任人在规定日期内完成纠正措施。

8. 质量负责人、内部审核员或质量监督员负责对纠正措施进行跟踪、验证,填写《不符合项报告/纠正措施报告》(见表 2-1)中的“纠正措施验证”一栏,以确保其有效性。对在规定时间内未能完成的纠正措施,负责跟踪验证人员应查明未能按期完成的原因并上报质量负责人,由质量负责人处理。

9. 因纠正措施的实施而需修订相关的质量体系文件时,按文件资料控制程序中有关更改的规定进行。

10. 如果发现不符合项导致对实验室的方针、目标、程序文件或 ISO/IEC 17025 的符合性产生怀疑时,特别是发现存在严重问题或业务风险时,必须依据内部审核控制程序对相关的责任部门进行附加审核。

### 三、预防措施

预防措施(preventive action)是对潜在的不符合项原因进行分析,制定相应的措施并加以执行和监控,以减少类似不符合项情况发生的可能性并借机改进。

为了确保预防措施的有效性,预防措施的控制程序一般包括两个阶段:

#### 1. 启动阶段

做好策划、调查研究、分析信息、培训教育员工,使员工认识采取预防措施的必要性,并在此基础上制定好计划。

#### 2. 控制阶段

主动分析潜在的不符合项的可能原因;评价采取预防措施的必要性和可行性;研究确定需采取的预防措施,如数据分析,特别是趋势分析和风险分析、质量控制图、能力验证结果、系统的早期报警过程等。预防措施报告见表 2-2。

预防措施与纠正措施有所不同,其区别见表 2-3。

表 2-2 预防措施报告

编号:

申 请 栏	发现部门: _____ 发现时间: _____
	发现方式: <input type="checkbox"/> 管理评审 <input type="checkbox"/> 内部审计 <input type="checkbox"/> 外部审核 <input type="checkbox"/> 过程/产品监视测量 <input type="checkbox"/> 顾客投诉 <input type="checkbox"/> 顾客满意测量 <input type="checkbox"/> 数据分析 <input type="checkbox"/> 其他
	潜在不符合项描述:    审核人员/日期: _____ 部门负责人/日期: _____
原 因 及 措 施	原因分析:    部门负责人: _____ 日期: _____
	预防措施:    承诺完成时限: _____ 部门负责人: _____ 日期: _____
实 施 记 录	实施情况记录:    部门负责人: _____ 日期: _____
验 证	验证描述: 1. 方案尚未实施                      重新验证日期 [            ] 2. 方案正在实施尚未完成              重新验证日期 [            ] 3. 方案已完成但无效                      重新发出报告 [            ] 4. 方案已完成且有效  验证人员: _____ 日期: _____

表 2-3 预防措施与纠正措施的区别

不同点	预防措施	纠正措施
概念	为消除潜在不符合项或其他潜在不期望情况的原因所采取的措施	为消除已发现的不符合项或其他不期望情况的原因所采取的措施
阶段	不符合项产生前	不符合项产生后
产生的原因	有不符合项倾向	已经产生不符合项

### 第三节 内部审核、管理评审和持续改进

#### 一、内部审核

内部审核(internal audit)是为确保实验室质量活动受控和质量体系的持续有效运行,纠正和预防不符合项工作。

内部审核程序包括以下几方面:

##### 1. 内部审核计划

###### (1) 内部审核的频次

定期审核:每年至少一次对所有部门和质量体系所有要素进行内部审核。

不定期审核:当质量体系发生重大变更时或根据客户投诉情况,由质量负责人决定是否对相应部门或要素进行不定期审核。

内部审核策划:质量负责人负责制定年度内部审核计划,以保证在适当的时间间隔对质量体系各要素进行审核,并委派审核组。

###### (2) 内部审核小组

质量负责人应确保内部审核保持独立、公正和客观。组织内部审核工作时,应确保内部审核员既独立于被审核部门,又具有相应的技术知识和审核资格。内部审核小组通常由两人以上组成,其中一人指定为组长,负责实施审核。

##### 2. 审核实施

(1) 内部审核方案由内部审核小组组长负责编制,报质量负责人批准并至少于实施日期前 5 日通知受审核部门,内部审核方案的编制应覆盖本次审核所有部门和要素。

(2) 内部审核方案的内容应包括:审核依据、审核时间、内部审核小组成员及其职责、审核的日程安排等。

(3) 审核首次会议:本次会议是在审核前,由质量负责人和审核组长召集审核人员与受审核部门相关人员召开,由审核组长介绍审核组成员、审核范围及审核安排等事项。

###### (4) 现场审核:

1) 内部审核组与被审核部门负责人在审核方式上应达成共识,保证相关要素都能覆盖。

2) 审核过程中,内部审核员依审核方案对被审核部门进行审核,并根据发现的实际情况填写内部审核现场记录,审核的重点包括:仪器、设备性能与检定、标准菌株的验证及复壮记录、培养基的验收记录、样品管理、检测报告(原始记录)、环境监控记录、检测废弃物处理

记录、参加能力验证/比对试验情况,等等。

内部审核的方法有多种,重点发散方法是其中之一,图 2-2、图 2-3、图 2-4 和图 2-5 分别列出了设备、标准物质(标准菌株)核查、检测记录和样品管理的重点发散评审法。

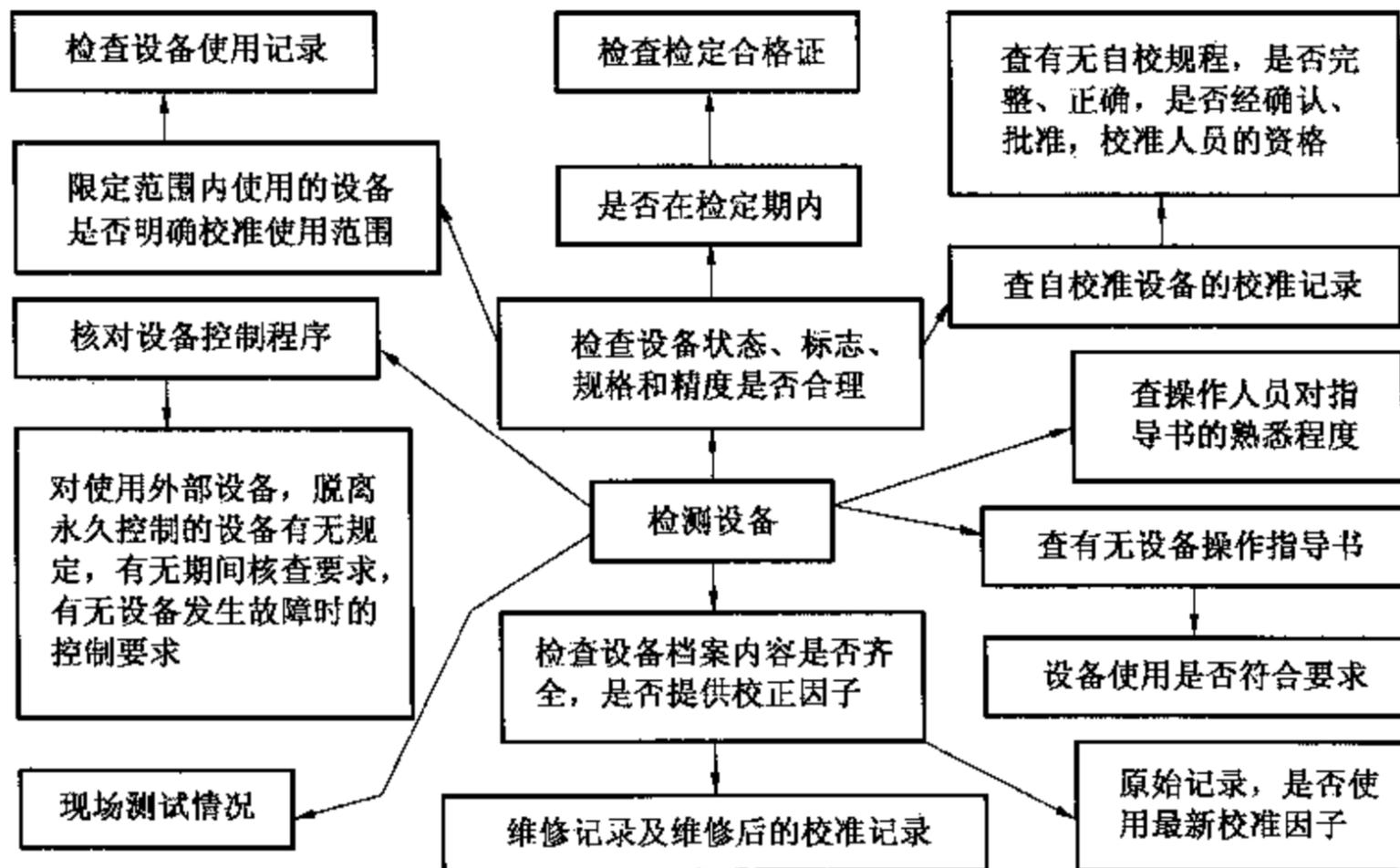


图 2-2 试验设备的内部审核法

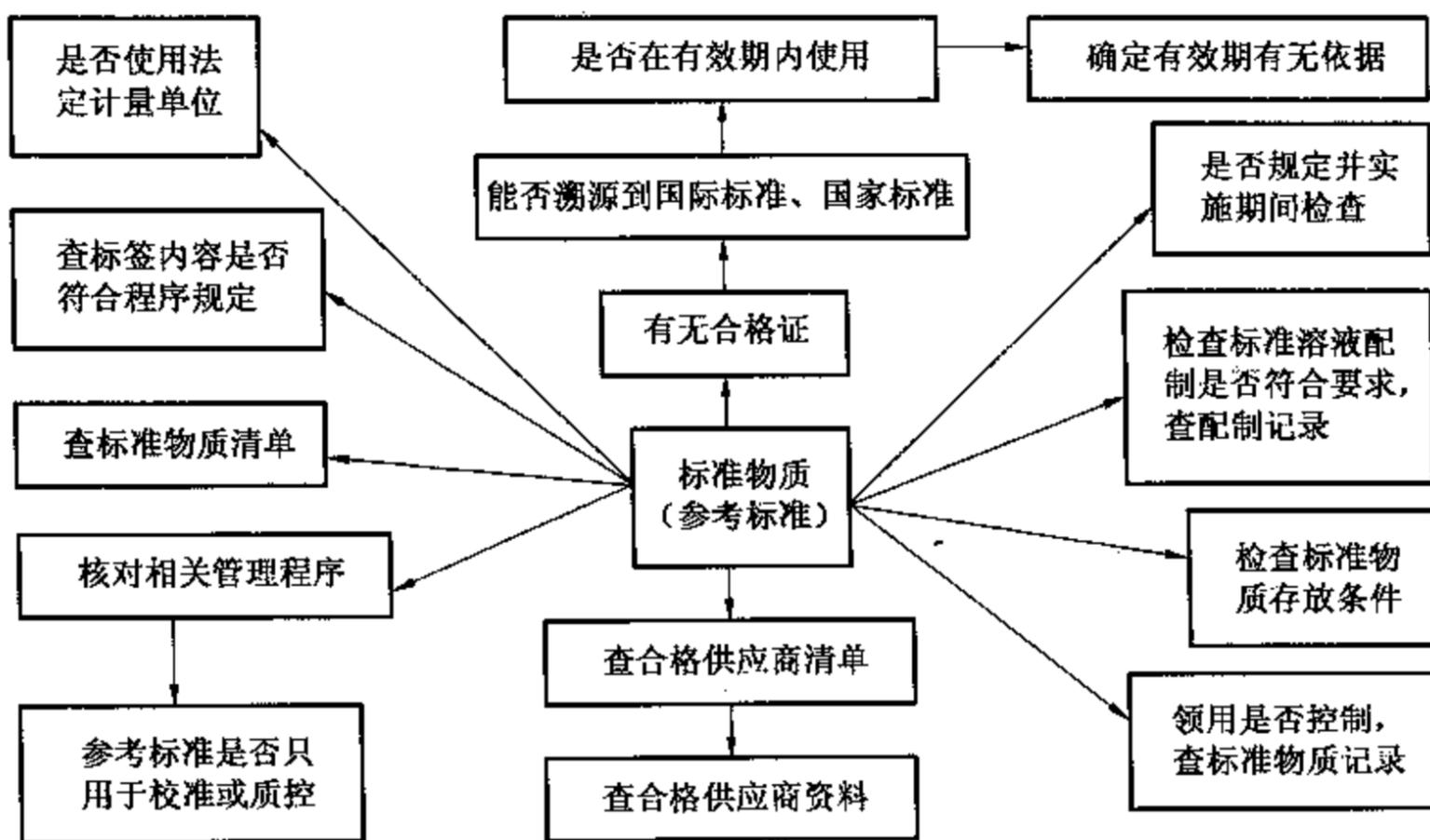


图 2-3 标准物质(参考标准)的内部审核法

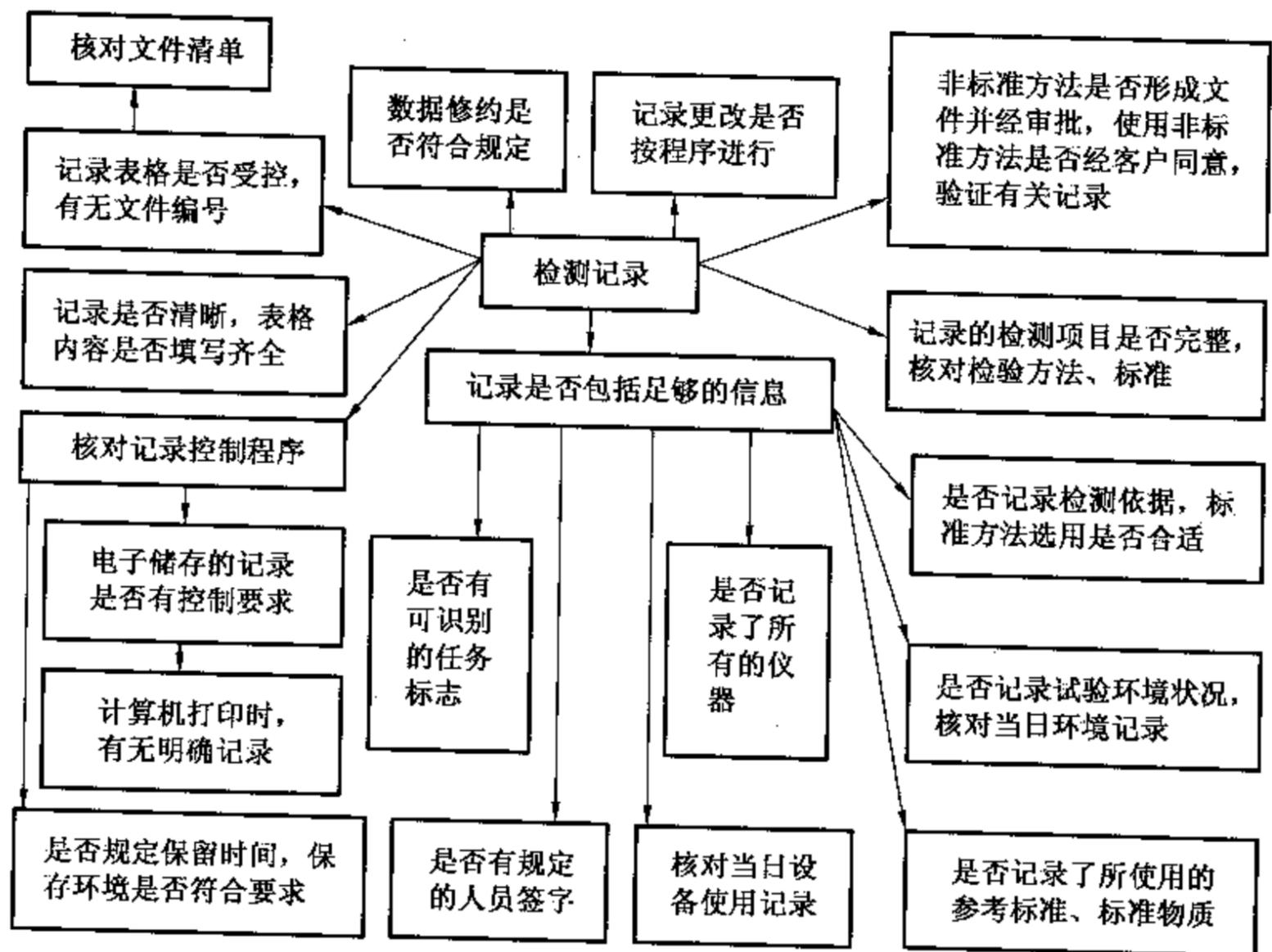


图 2-4 检测记录的内部审核法

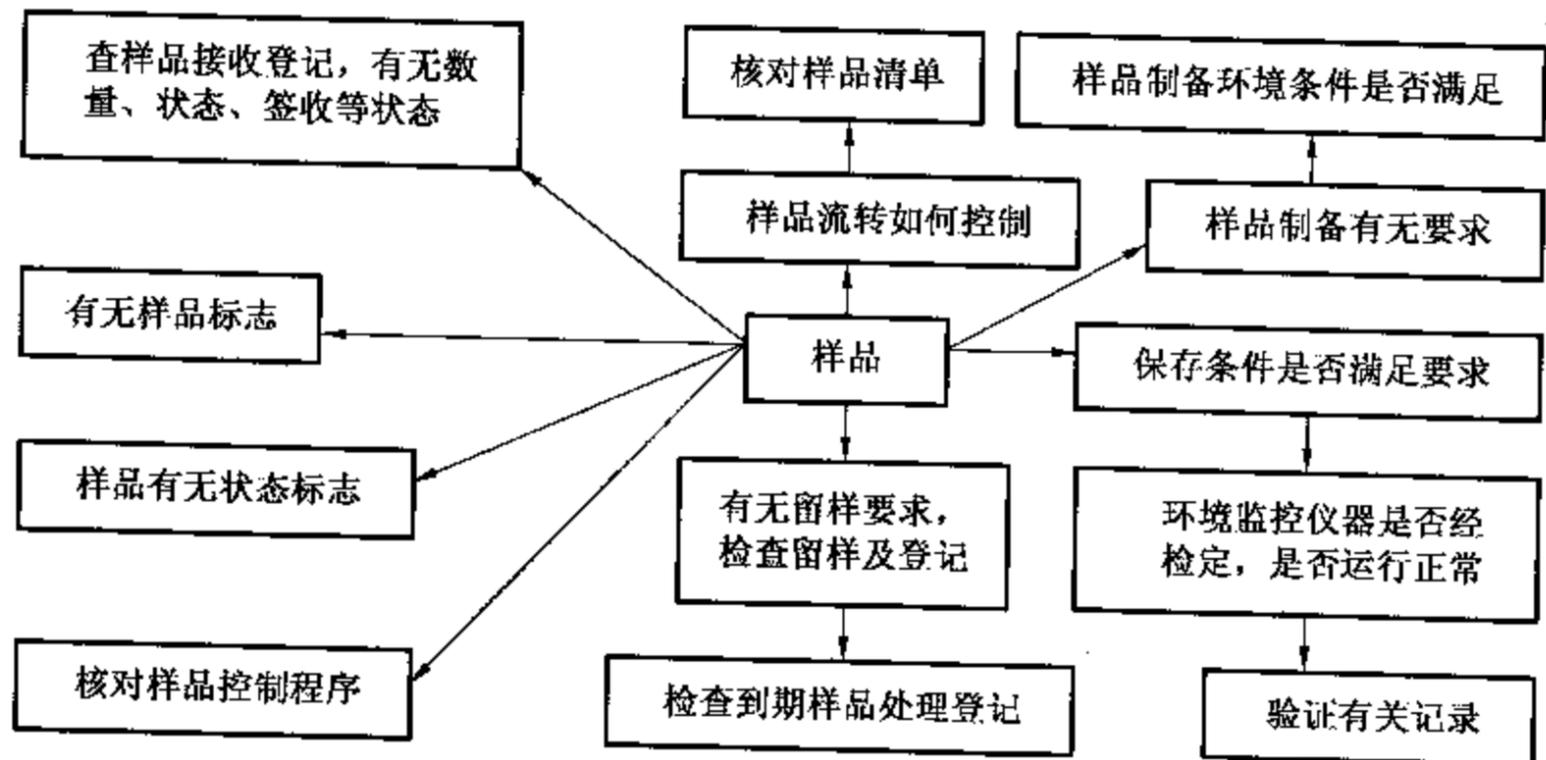


图 2-5 样品的内部审核法

3) 内部审核员通过被审核部门提供支持性文件,例如:程序文件、技术标准、标准操作程序、相关质量/技术记录等,或提问、观察等有关活动,收集证据。

4) 所有的证据均应是客观的和可以验证的,所有的审核结果应与标准和质量文件条款

相对应,确定不符合项或观察项。

5) 不符合项报告、内部审核报告撰写及审核:内部审核小组于审核完毕后应召开内部讨论会,内部审核员如发现不符合项及观察事项时应填写《不符合项报告/纠正措施报告》(见表 2-1),描述不符合项事项的情况,再由内部审核组长汇总并将内部审核报告和不符合项分布表提交质量负责人审核。

6) 内部审核末次会议:质量负责人召集各部门相关人员参加会议,由内部审核组长在会议中说明内部审核结果与所有内部审核中发现的不符合项事项,确定受审核部门人员对内部审核发现的缺失皆已确切了解,并将《不符合项报告/纠正措施报告》让受审核部门负责人签署后,影印一份留给受审核部门。

7) 当内部审核过程中发现检测结果的正确性和有效性可疑时,综合协调部门会同责任部门,立即采取纠正措施并书面通知可能已受到影响的委托方。

### 3. 纠正和预防措施的跟踪验证

(1) 发现不符合项的责任部门提出纠正和预防措施于《不符合项报告/纠正措施报告》中,并在规定的时间内完成纠正。

(2) 不符合项责任部门的纠正工作完成后,通知内部审核组长,由内部审核组长指定内部审核员跟踪验证纠正和预防措施的有效性,质量负责人决定不符合项的关闭。

(3) 若该纠正和预防措施被内部审核组判为无效,其责任部门就应重新制定纠正和预防措施,并重复上述程序。

## 二、管理评审

管理评审(management review)是实验室的执行管理层根据预定的日程表和程序,定期地对实验室的质量体系和质量活动进行评审,以确保其持续适用和有效,并进行必要的改动或改进。

进行管理评审应注意以下要点:

### 1. 制定评审计划

(1) 一般每 12 个月进行一次管理评审。当发生重大质量事故,组织机构、人员发生重大变化或发现工作中质量体系不能有效运行时,应增加评审,增加评审时间由实验室最高主管指定。

(2) 实验室应于每年年初制定年度管理评审计划,由质量负责人审核,实验室最高主管批准。评审计划包括:管理评审参加人员、时间、地点;管理评审的范围、依据及程序。

### 2. 评审准备

(1) 评审前应准备:目标统计、客户反馈、内部审核结果;纠正和预防措施及其跟踪报告;外部审核报告;质量体系运行情况报告;质量监督报告;机构、人员变动情况及下一年度的质量活动计划和资源的需求等材料。

(2) 质量负责人事先向评审参加者发出通知,要求做好准备。

### 3. 评审实施

(1) 实验室最高主管主持管理评审,质量负责人做质量体系运行情况报告,并就质量体

系与 ISO/IEC 17025 的符合性,质量体系与质量方针、目标的适合性和质量体系运行的有效性作详细介绍。

(2) 评审须考虑的因素包括:政策和程序的适用性;管理和监督人员的报告;近期内部审核的结果;纠正和预防措施;由外部机构进行的评审;实验室间比对或能力验证的结果;工作量和类型的变化;客户反馈;改进的建议;其他有关因素,如质量控制活动、资源及人员培训等。

#### 4. 评审报告

(1) 管理评审结果应由质量负责人编写管理评审报告及相关附件,经实验室最高主管批准,分送给最高管理层和各部门负责人。

(2) 评审报告的内容包括:评审目的、范围、依据、评审参加人、评审日期、质量体系符合性、适用性与运行有效性评价结论。

(3) 管理评审报告应明确实验室下一年度的目标、管理体系过程有效性和持续性的改进计划、资源的需求等内容。

#### 5. 评审决策的实施

(1) 管理评审的决策事项由质量负责人组织并督促有关责任部门采取措施,认真贯彻评审中提出的质量体系改进要求。

(2) 质量负责人或其指定人员跟踪改进效果,确保这些措施在商定的时间内实施。应注意内部审核与管理评审不同,其区别见表 2-4。

表 2-4 内部审核与管理评审的比较

项 目	内 部 审 核	管 理 评 审
定义	确定质量活动和有关结果是否符合计划的安排,以及这些安排是否有效地实施,并适合于达到预定目标的有系统的独立检查	由实验室主管就质量方针和目标,对质量体系的现状与适应性进行的正式评价
主持者	质量负责人	实验室主管
目的	通过审查,为“①质量体系对评审准则的符合性,②质量体系运行的有效性,③质量体系不断改进”举证,为完善质量体系提出建议	确保质量管理体系的适宜性、充分性、有效性和效率,以达到规定的质量目标
顺序	内部审核先于管理评审进行	内部审核报告是管理评审的输入之一
频次	通常一年不少于两次全面内部审核,当发生组织机构、法人代表等重大变更,质量偏离和抱怨时,重大或新的监测项目结束后,对有关部门进行局部内部审核或全面内部审核	通常管理评审的周期为每 12 个月一次,当发生组织机构、法人代表等重大变更或重大事故时,可增加管理评审
形式	全面或局部内部审核	全面
时间	全面内部审核在质量管理评审前进行	一般年底进行
承办人员	(独立于被审核活动以外的)内部审核员	中层领导及相关管理人员

### 三、质量持续改进

实验室应通过实施质量方针和目标、应用审核结果、数据分析、纠正措施和预防措施以及管理评审来持续改进质量管理体系的有效性。

质量持续改进(continuous quality improvement, CQI)是一个识别和表述质量体系中的改进和潜在的不符合项来源的程序。在实验室层面,可用质量持续改进报告(见表 2-5)协助执行此过程。应鼓励员工识别质量体系 and 测试程序中存在可改进之处,在任何时候尤其是在内部审核过程中可得到改进建议。这些建议可在内部审核报告、持续改进报告、不符合项中提出,也可在分析客户投诉和内部质量保证结果之后得到。

表 2-5 质量持续改进报告

编号:

质量改进建议(包括适用的领域、相关的测试方法等):	
建议人:	日期:
建议评估人:	日期:
采取的改进措施(包括 SOP 的修订及其影响):	
签名:	日期:
改进措施的关闭 <input type="checkbox"/>	质量负责人: 日期:

任何改进建议都应记录在持续改进报告中,相关人员要对这些建议进行评估。如果认定建议不合适,要在相应的表格中说明,并注明原因;如果认定要采纳建议,要记录所有的细节,包括哪些作了改变,改变达到了哪些效果,标准操作程序(SOP)所作任何修订细节,以及这些修订对其他方面的影响。

在管理层面,高级管理者在深入评估质量体系运行有效性的管理评审时,会提出改进建议。

质量持续改进的过程可用一个持续改进环(见图 2-6)来表示,持续改进环是从策划(plan)→实施(do)→检查(check)→处置(action)的一个闭合的环状结构。

策划(plan)是指根据客户的要求和实验室的质量方针,提出改进建议,进行原因分析,制定解决方案,确定方案的执行时间。因此策划的内容包括:问题或改进建议的界定、原因分析、制定解决方案、方案的执行时间。实施(do)是指实施最佳解决方案的过程。检查(check)是指对解决方案的实施过程进行监视和测量,并报告结果。处置(action)则是指采取必要的纠正措施,对操作程序进行标准化,对经验教训的总结以持续改进的过程。

质量持续改进包括下述活动:

- 1) 分析和评价现状,以识别改进区域;
- 2) 确定改进目标;
- 3) 寻找可能的解决办法,以实现这些目标;
- 4) 评价这些解决方法并作出选择;
- 5) 实施选定的解决办法;
- 6) 测量、验证、分析和评价实施的结果,以确定这些目标已经实现;
- 7) 正式采纳更改。

必要时,对结果进行评审,以确定进一步改进的机会。从这种意义上说,改进是一种持续的活动。客户和其他相关方的反馈以及质量管理体系的审核和评价均能用于识别改进的机会。

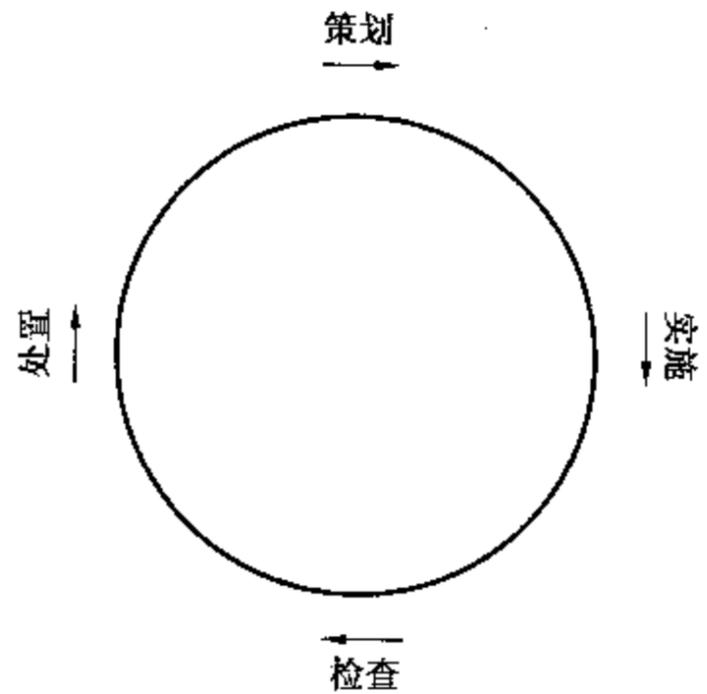


图 2-6 质量持续改进环

## 参 考 文 献

- [1] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2004.
- [2] 申子瑜. 医院管理学 临床实验室管理分册[M]. 北京:人民卫生出版社,2003.
- [3] 杨振华. 临床实验室质量管理[M]. 北京:人民卫生出版社,2003.
- [4] ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

# 第三章 实验室设施和环境条件

## 第一节 实验室的设计和建设

实验室的建设是进行食品微生物学检验的前提条件,实验室的设计和建设的的主要目标是为微生物学试验提供一个安全、规范、方便、适宜的场所。

随着经济水平的不断提升和国民对食品安全问题的日益关注,这些年我国的食品微生物学实验室建设得到了较快的发展。特别是 GB 19489—2004《实验室生物安全通用要求》、GB 50346—2004《生物安全实验室建筑技术规范》等有关实验室管理法规和技术规范的颁布实施,从多个方面规范了我国生物安全实验室的设计、建造、检测、验收的整个过程,把涉及生物安全的实验室包括微生物实验室的建设和管理纳入了法制化、规范化的轨道。

### 一、实验室建设的立项

#### 1. 编制实验室建设项目计划任务书

为了达到实验室建设的既定目标,需要在广泛收集文献、信息、统计等资料的基础上,根据资金、环境条件、工作任务等情况,通过广泛论证,编制实验室建设项目任务书。实验室建设项目任务书一般包括如下内容:

- 1) 项目名称:根据建设实验室的实意填写;
- 2) 项目概况:说明立项的依据,包括其作用、项目建设的重要性和必要性、现有人员、设备、实验用房情况,以及经费来源、效益分析等;
- 3) 项目任务:列出项目建设将承担的任务种类和要求;
- 4) 项目设计:提出项目设计的要求,包括原理、技术关键以及设备配置的明细表;
- 5) 环境保护:说明在项目建成以后的实验过程中可能产生的“三废”,以及射线、噪声、粉尘等环境污染情况,提出防范处理措施;
- 6) 技术力量配备:根据项目性质、任务、技术要求,明确各类技术人员的配备数量、知识结构、专业结构;
- 7) 投资估算和效益分析:投资效益包括社会效益和经济效益,根据项目完成后将承担的任务进行分析测算;
- 8) 实施进度时间表:包括设计、建造、验收、设备安装等各个环节的进度时间表。

#### 2. 编制实验室建设项目可行性报告

可行性报告的制定是实验室建设全过程的前期工作。在制定可行性报告时,需要实验人员、设计人员、基建人员密切配合。可行性报告起草的前提是通过合适的方式对项目设计计划任务书进行充分的可行性论证。

可行性报告的内容主要有以下几个方面:

- 1) 建设项目名称;

- 2) 建设目的及依据;
- 3) 建设性质是新建、扩建还是迁建;
- 4) 工艺设计及平面布置设计方案,结构、层数、管网工程布置方案;
- 5) 工艺设备简明清单;
- 6) 人员编制;
- 7) 建设地点及用地;
- 8) 环境保护及治理措施;
- 9) 生物安全等级;
- 10) 建设规模;
- 11) 环境及配套水、电、暖、道路等外线工程投资;
- 12) 工程总投资额、资金筹措;
- 13) 项目实施进度计划建议。

制定可行性报告时,要根据预计的实验室工作量和实验对象情况,实事求是地确定建设规模和生物安全等级,不要盲目地追求大规模和高等级,但也要适当超前,为日后发展留有一定的余量。

## 二、实验室的选址

依据实验室所处理感染性食品致病性微生物的生物危险程度,可把食品微生物实验室分为与致病性微生物的生物危险程度相对应的四个级别,其中一级对生物安全隔离的要求最低,四级最高。不同级别食品微生物实验室的规划建设和配套环境设施不同。食品微生物实验室所检测微生物的生物危害等级大部分为生物安全二级,少数为生物安全三级和四级。有关生物安全实验室分级的内容请参见第七章第一节中的相关内容。

食品微生物实验室的选址应考虑和周围环境的关系。一级和二级生物安全食品微生物实验室无需特殊选址,可共用普通建筑物,但必须为实验室安全运行、清洁和维护提供足够的空间。宜设在建筑物的一端或一侧,与建筑物其他部分可相通,但应有控制进出的门和防止昆虫和啮齿动物入内的设置。三级生物安全食品微生物实验室可共用普通建筑物,但应自成一区,宜设在建筑物的一端或一侧,与建筑物其他部分以密封门分开。新建的三级生物安全食品微生物实验室宜远离公共场所和居住建筑,主实验室离外部建筑物距离应不小于外部建筑物高度的1.2倍。四级生物安全食品微生物实验室应建造在独立的建筑物内,也可以和其他较低级别的食物微生物实验室共用建筑物。该实验室应远离公共场所和居住建筑,其间应设植物隔离带;主实验室离外部建筑物距离应不小于外部建筑物高度的1.5倍。对有些实验室特别是使用独立建筑物的实验室选址,需要建筑规划部门和环境部门的审批。

## 三、实验室的设计

可行性报告批准和实验室选址确定后,就有了建设项目编制设计文件的依据,可以进行设计了。设计任务应委托给那些曾经设计或建造过高级别生物安全实验室并且具有相当资质的单位。

实验室的设计应以获得可靠的微生物检验结果为重要依据,应保证对技术区域中生物、化学、辐射和物理危害的防护水平控制在经过评估的相应风险程度,为关联的办公区和邻近的公共空间提供安全的工作环境,防止风险进入周围社区。对初步设计和施工图设计必须严格执行国家已出台的有关规范和标准,并按规定对施工图和竣工图进行归档保存。需要报规划部门或环保部门审批的,要履行审批手续。

实验室的工作人员应多参与设计中的一些决策,他们的意见会最终影响到他们的工作环境和条件。实验室人员可以先草拟一个平面布局图,注明各区域的名称、功能和所需面积以及对结构、层高、通风、给排水、供电、网络、门窗、墙面、地面、顶棚等方面的特殊要求。对有洁净度要求的区域要注明洁净级别。对每区域(实验室)都大概算出最大用水量和最大用电量以及水池、电插座位置。如有高耗电设备,应标出设备的位置和用电量。

关于移动微生物实验室的设计和质量管理参见第十五章。

### 1. 实验室的布局

充足的实验室面积和良好的实验室布局设计是为食品微生物学检验提供安全、规范、适宜、方便的设施和环境条件的重要前提。由于实验室规模和生物安全等级的不同,布局设计也各有不同。实验室总体布局和各区域的安排应符合实验流程,尽量减少往返或迂回,降低潜在的对样本污染和对人员与环境的危害,采取措施将实验区域和非实验区域隔离开来。

进行实验室布局设计时,要对关键操作区域和设备的位置及其与周围区域的关系予以确定。布局设计是电、气、水、风、环境控制措施等设计的前提。有些特殊设备可能需要特殊的环境条件。生物安全柜的位置应远离门、能打开的窗、行走区和其他可能引起风压混乱的设备,以保证生物安全柜的气流参数在有效范围内。

食品微生物实验室的房屋一般是位于建筑物的一端或一侧,由多套房间组成。根据不同用途,可分为储藏室、培养基制备室、动物房(如果有动物的话)、无菌室、仪器室、培养室、微生物鉴定室、洗刷室、消毒灭菌室、样品室(存放收到的待检验样品以及保存已检验的样品),房间之间相互隔离。在实验室禁止吃东西、喝饮料、吸烟,所以需要为这些活动另外提供适当的区域。此外,要考虑设计办公室、洗手间、接待室、档案室、实验数据处理室等。

一般大型微生物实验室,玻璃器皿的洗涤都是在实验室外集中进行的,而小型实验室中玻璃器皿的洗涤是由实验室人员自己完成,在这种情况下,大多数微生物实验室配备了高压灭菌器和干热灭菌器。建议使用不同的高压灭菌器分别进行培养基灭菌和废弃物灭菌,最大限度减少交叉污染。理想情况下,两个高压灭菌器应该分别置于不同的房间之内,如果必须放在同一房间内,它们之间也应分开适当的距离。洗涤区应适当远离实验操作区。

实验室的墙壁、天花板应光滑、耐腐蚀、防水、防霉漆粉刷,使墙面平滑、不透水、易于清洗,所有缝隙应可靠密封,防震、防火。实验室地面应舒适,防渗漏、无缝、光洁、防滑。

在许多微生物实验室墙面空间也被利用起来,即在一面墙空间加上搁架,并封装起来形成橱柜,提供一个防尘环境,用来存放培养基、化学药品和其他材料,安装玻璃门。除了在拿放东西时,这些门都应一直保持关闭状态。培养基、化学药品和试剂等应该保存在干燥、避光的地方,否则它们的性能可能会发生改变。同样地,检验员也不要直接在阳光下工作,否则的话可能会影响到化验结果。此外,应有储藏室用于储存样品、设备、化学药品和玻璃器

且等。样品储存室必须在建造时考虑到防虫问题。

为防止火灾或其他紧急事件应提供安全出口,有在黑暗中可明确辨认的标识,并且通向出口的走廊和通道应无障碍。如果有可能,应为每个房间提供两个入口或出口,在设计入口时应考虑使行人流量最小化,并有生物危险标志、火险标志、放射性标志及其他有关规定的标记。所有出入口处应采用防止节肢动物和啮齿动物进入的设计。

## 2. 实验室的开间、进深和层高

实验室的开间主要取决于实验人员活动空间以及工程管网布置的必需尺寸。实验室的进深关系到实验台的长度、实验室的面积、采光通风、结构布置等方面的问题,一般为5000 mm~7000 mm。实验室开间和层高的确定可能会受到实验室建筑结构的制约,在可能的情况下,要尽量使得实验室在摆放了实验台和仪器、设备后,还为实验人员的正常工作留有充足的活动空间。一般情况下,实验台与实验台之间的距离要达到1500 mm~1800 mm,至少也要达到1250 mm,这样两边的实验台都可以有人工作。中央实验台与墙壁的距离要达900 mm以上。

实验室的层高一般为3600 mm~3800 mm,净高2600 mm~3000 mm。洁净室的净高由于结构原因要比一般实验室低一些。

## 3. 实验室的楼面荷载

荷载根据其性质分为恒载、活荷载和偶然荷载三类。由于实验室各区域的功能不同,放置的设备也各不相同。设计时应考虑预备放置沉重设备或设备相对集中的区域的荷载能力予以考虑和加强。人员和工作量的增加在设计新实验室时都应考虑进去,大多数实验室在人员搬进实验室以后和在开始工作后,人员的增加会大于设施的荷载,因此管理者应对未来人员编制、样品数目和类型、所需设备、检测对象等做到心中有数。

## 4. 实验室的供电

每个实验室的功能不同,用电量也不一样。一般在供电设计时应考虑以下几个方面:

1) 每个房间内要有三相交流电和单相交流电,最好设置一个总电源开关箱,嵌装在室内靠近走廊一面的墙内。这样做,不仅从走廊引线方便,控制检修也方便;

2) 计算每个房间的最大用电量,对高耗电设备的供电予以特殊考虑。设计用电量时应为以后的发展留有余量;

3) 每一实验台都要设置一定数量的电源插座。这些插座应有开关控制和保险设备,以防万一发生短路时不致影响整个实验室的正常供电。插座设置应远离水盆和煤气;

4) 保证实验室内所有活动的充足照明,避免不必要的反光和闪光。为实验室配备应急照明,以保证人员安全离开实验室;

5) 因实验室可能会有腐蚀性气体,所以宜选择铜芯电线;

6) 生物安全级别较高的实验室应设计双路独立供电,或设计备用发电机组。条件不具备时可以另设不间断电源,不间断电源的供电能力要求不少于45 min。备用发电机对于保证主要设备(如培养箱、生物安全柜、冰箱)的正常运转都是必要的。

## 5. 实验室的给水和排水

实验室必须保证充足供水,以满足实验用水、消防用水的需要。每个实验室房间都应设

置洗手池。对实验室的日最大用水量 and 小时最大用水量都应有一个计算,设计时据此确定水管规格。

实验室用水的水质除一般要求外,还需要软化水或蒸馏水,应设置专门装置解决。出于安全的考虑,实验室应设置紧急淋浴器和冲眼设备。

实验室的排水设计应保证排水的通畅。对于酸性水和碱性水应予以中和后排放,对于微生物性污水应妥善处理达到排放标准后再排放。

## 6. 实验室的通风

在处理危险程度Ⅰ级和Ⅱ级的微生物时,实验室可以使用自然通风,不需特殊的通风设备。但是在设计新的设施时,应当考虑要设置机械通风系统,以使空气向内单向流动。如果没有机械通风系统,那么实验室窗户应当能够打开,同时要安装防虫的纱窗。

如果有可能,建议微生物实验室安装独立的中央空调。中央空调有几方面的优点:第一,进来的空气是经过过滤的,可以减少实验室环境污染的风险;第二,关闭的窗户可以减少由通风或气流所带来的交叉污染;第三,关闭的窗户可以降低由苍蝇和飞虫对实验室样品和实验室表面的污染;第四,中央空调可以控制湿度,这样可以减少对易受潮培养基和化学药品所带来的麻烦;第五,如果过分潮湿天气持续一段比较长的时间,可能会促使霉菌滋生,并使实验室墙壁的表面发霉,孢子最终可以通过空气传播,从而影响分析结果,而中央空调可以稳定室内温度,使细菌培养箱运行得更为有效。但即使是使用中央空调,烟尘或其他细微颗粒也能通过通风系统的排气口进入。因此,要在这些排气口处安装符合要求的过滤器。这些过滤器至少每年更换一次,如果需要,可能换的次数更多。实验室工作人员应当保留书面记录,说明什么时候过滤器需要更换。食品微生物实验室主要工作区域的温度应为 $18^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度应为 $30\%\sim 60\%$ 。

在为微生物实验室提供设计建议时,微生物工作者应提出需要安装通风橱或排气橱。强酸或各种溶液和类似材料应该在这种通风橱内使用。根据通风橱所需的排风量和风压值,确定与其相配套的引风机和风管的规格,如多台通风橱共用一台引风机,则宜采用变频技术。为最大发挥通风橱的作用,通风橱的窗扇应降至生产厂商标出的位置。通风效果应由厂方代表或楼房维护人员每年检查一次,实验室应保存好维修记录。不要在通风橱内长期保存各种原料。任何药品放在通风橱内不能超过3 d。

合理的、适当的实验室通风系统,对于防止实验室微生物气溶胶扩散到整个工作区,甚至扩散到工作区以外是必要的。设计和安装通风系统的原则是对实验室以外区域形成一个相对密闭的系统,对实验室内部则是一个气流定向流动的系统。实验室内部气流定向流动是指实验室内的气流由清洁区流向污染严重的区域。根据污染程度的不同,可以把污染区分成不同的等级,一般分为缓冲区、低污染区、严重污染区,每个区域之间要保持一定的压差(一般约为 $-60\text{ Pa}\sim -10\text{ Pa}$ ),防止室内空气回流或涡流。负压最低区是污染最严重的区域,一般包括正压服工作区和实验动物感染区。室内要安装气压监测报警器,一旦压差失衡,报警器即刻报警。另外,在通向污染区的出口处要设有气锁,缓冲间内要安装紫外灯或臭氧对污染空气进行消毒。

实验室通风平时可保持在每小时换气10次~15次的流量。当空气流量相当于每小时

换气 13.3 次,可以在 15 min 内,将爆发性产生的大量气溶胶清除到无害程度,但要清除少量经常性的气溶胶,则需要大的换气量。近年发展的层流通风,对防止微生物气溶胶扩散有良好的效果。实验室送风口和排风口的位置应避免死角过大,使室内气流停滞的空间降低到最小,并且室内排风口应设置在最危险区域,单侧布置,不得有障碍。设计实验室送排风的风量时,应将室内排风设备特别是生物安全柜的补风和排风情况一并考虑,避免导致生物安全柜和实验室排风系统的压力失衡。

一级和二级生物安全食品微生物实验室可以设计回风系统,回风和补加的新风一起经过供风系统的高效空气过滤器(high-efficiency particulate air filters, HEPA)过滤后,再重新被送进实验室。但三级和四级生物安全实验室不得采用回风系统,应安装独立的送排风系统以控制实验室气流方向和压力梯度,送风口和排风口的布置必须是单侧分开布局,上送下排,使污染区和半污染区内的气流死角和涡流降至最小程度,实验室空气通过 HEPA 过滤后,经专用排风管道排至建筑物外。外部排风口应远离送风口并设置在主导风口的下风向,应至少高出所在建筑物 2 m 以上,应设有防雨、防鼠、防虫装置,但不应影响气体直接向高空排放。

通风系统、高效空气过滤器的安装应牢固,符合气密性要求。高效过滤器在更换前应消毒,或采用专用气密袋中进行更换的过滤器,更换后应立即进行消毒或焚烧。每台高效过滤器安装、更换、维护后,应按照确认的方法进行检测,以确保无腐蚀,运行后每年至少进行一次检测以确保其性能。在送风和排风总管处,应安装气密型单向密闭阀,防止停机时气流倒灌,必要时可完全关闭以进行室内化学熏蒸消毒。在污染区和半污染区不应另外安装分体空调、暖气和电风扇等。

## 7. 洁净室

传统的食品微生物检验无菌室由于室内空气不流通,工作环境差,不但对实验人员的身体有不良影响,而且也影响实验检测结果。近些年出现的一些室内直接安装空调的无菌室,由于没有过滤除菌设施及室内气流因空调出风风向的扰乱,反而增加了污染的机会,不符合控制污染的要求。因此,设计建造适用于食品微生物检验的净化实验室(洁净室)是发展的必然趋势。

洁净室的平面布局应按照清污分流的原则,人、物分开,避免交叉污染。一般人流通道为一缓、二缓(更衣)和三缓(风淋)三个缓冲间。物流通道为传递窗口。传递窗口的两道门要有连锁装置。洁净室的隔断和吊顶可采用彩钢夹芯板,地面采用环氧树脂自流平或其他无缝、耐酸碱材料。洁净室内的所有夹角都设计成圆弧形,以便于清洁。洁净室的净化采用层流净化系统,保证室内的温度、湿度、新风补充和洁净度要求。一般食品微生物实验室的洁净室面积都不太大,如果没有中央空调,也可采用柜式空调控制室内温度,但不能将柜机直接安装在实验室内,因柜机吹出的风会改变洁净室的气流流向、扰乱气流组织,影响洁净度。可以将柜机安装在机房内,将空调风与其他新风,一起由送风机通过空气过滤器输送到洁净室。常规的洁净实验室可以循环使用部分回风,这样可以降低空调负荷并节约能源。具有生物安全要求的洁净实验室不重复使用回风,应是全新风,排风经过滤后由风机排放至室外。

洁净室和外部应有适当的通讯系统(如传声器、网络、电话)。

#### 四、实验室橱柜

实验台(工作台)、通风橱和试剂架等是实验室必不可少的橱柜。

实验台是实验室活动的中心。一般的实验台高度是 850 mm,边台宽度 750 mm,中央台宽度 1500 mm。实验台本身应使用易清洁、耐腐蚀、密实无孔的材料制作,不应有裂缝,不应有暴露的接头缝隙或其他缺陷,因为在这些地方微生物可能会得以滋生。实验台应坚固,能承受预期的质量并符合使用要求。实验台表面应能防水、耐热、耐有机溶剂、耐酸碱和耐用于工作台面及设施消毒的其他化学物质。常用的台面材料有酚醛树脂板、耐酸碱实心理化板、不锈钢、贴面高密度板、木板等。实验台的下面可用于安放小橱柜和抽屉,但应留有便于地面卫生清洁的空间,每个实验台下面宜留有一两个伸膝凹口,凹口宽度 600 mm~1100 mm,这样检验员坐下的时候能够很容易靠近工作台。实验台上应配备有足够的气源、真空吸引器、压缩空气、电、蒸馏水、冷热自来水等。有些实验室设备(比如水浴锅、振荡器等),严禁与显微镜和分析天平等精密设备放在同一工作台上的。天平台应设计有防震装置。

试剂架应设计有平开门或推拉门,搁板的边缘设有突缘,防止试剂不慎跌落。设置在实验台上的试剂架不宜过宽,以能够并列放置两个中型试剂瓶(500 mL)为宜,通常为 300 mm 左右。

微生物实验室宜用净化通风橱。通风橱的台面和内部挡板以及风机和风管均应由耐腐蚀材料制成。每个通风橱都应有自己独立的供气、供水、压缩空气和供电系统。

#### 五、实验室的施工与验收

选择具有施工资质证的单位按设计方案进行预算,在保证质量的基础上,根据预算结果和综合评价选择与投资经费许可范围的信誉好的单位。选用的设备和材料必须有合格证明、检测单位的检测报告或鉴定证明等,应严格按照设计要求和有关施工规范施工。施工过程中,应成立施工监理小组,及时发现问题和解决问题,以减少不必要的返工和浪费。施工中需要修改设计时应由设计单位的变更通知。

实验室竣工后应进行竣工验收。竣工验收时施工(安装)方需提供下列文件:

- 1) 设计文件或设计变更的证明文件以及有关协议和竣工图;
- 2) 主要材料、设备和调解仪表的出厂合格证书或检验文件;
- 3) 单位工程、分项工程质量自检评价表;
- 4) 开工、竣工报告,土建隐蔽工程系统和管线隐蔽工程系统封闭记录,设备开箱检查记录,管道压力试验记录,风管漏风检查记录,中间验收单和竣工验收单;
- 5) 各单机试运转、系统联合试运转记录,通风机风量及转数检测记录,风量平衡测定和调整记录,室内静压检测调整记录,高效过滤器检漏记录,室内洁净度检测记录。

竣工验收时的工程外观检查和综合性能检测评价,应在建设、设计、施工三方的协调配合下由国家认可的第三方检测机构严格按照生物安全实验室的检测程序独立地、公正地进

行,检查的内容包括实验室围护结构的严密性、温度和湿度、噪音、照度、生物安全柜、各房间之间的压力梯度值、空气的气流流向、高效过滤器检漏、洁净度级别、自动控制、电气控制系统等多个方面,并形成书面报告;应邀请医学、建筑、空气净化、电气控制、结构防震、给水排水、污物处理、环境保护、气体供应等领域的专家,对实验室进行综合验收。只有这样,才能确保实验室的各项技术指标达到设计使用要求。

## 第二节 实验室的环境监测和内务管理

良好的实验室内务管理是实验室安全和实验结果可靠的质量保证条件之一,在一定程度上也反映了一个实验室质量管理水平的高低。同时微生物实验室内务管理的许多方面都是和实验室生物安全管理相关的,这方面的内容请参见第七章。

### 一、实验室的环境监测

实验室应制定一套科学合理的环境监测计划,对样品、样品提取物、操作人员和设备所处环境都必须进行检查,以确保分析结果的质量不受这些环境因素的影响。

#### 1. 实验室环境监测的要求和方法

一般来讲,对环境微生物的监测包括对实验室表面和空气中微生物的分析。对实验室的表面进行检测,就可以确定在同一工作区内,经过一段时间以后是否还保持干净,或不同工作区在一定时间内需要打扫的次数;消毒剂作用于工作台上的效果如何,间隔多长时间需要对工作台消毒一次,以及层流净化台的使用效果情况;对空气进行监测,可以确定高效过滤器的使用效果以及需要更换的次数,并能确定出可能的环境污染源。

对实验室工作台和设备表面作微生物检查可以采用三种方法。第一种方法叫作擦拭法(棉拭子法),用于检测设备的任一部分,应在多个区域进行擦拭,对难以评估清洁程度的区域取样应格外小心。需氧嗜温菌 $<5$  cfu/cm<sup>2</sup>时,说明合格;需氧嗜温菌 $5$  cfu/cm<sup>2</sup>~ $25$  cfu/cm<sup>2</sup>时,说明需进一步调查;需氧嗜温菌 $>25$  cfu/cm<sup>2</sup>时,说明不合格,须立即处理。第二种方法是淋洗法,适用于较小的设备或器具(如桶)。第三种方法叫影印盘(琼脂直接接触微生物复制盘,RODAC)法,此法特别适用于平滑密实的表面进行采样,在不规则、破裂或有裂纹物体表面不要使用这种方法。最好对平滑表面进行打扫、清洁并消毒以后使用此方法。严重污染的表面会导致 RODAC 平板上细菌过度滋生。

对空气中的微生物状况要至少每两周进行一次监测,以确定实验室环境是否构成重要的污染源,保证微生物实验结果的准确可靠。一种简单而有效的空气质量监测的方法是一种被称为“沉降程序”的方法,或称沉降平板技术,即用非选择性培养基平板(比如:琼脂计数平板),暴露放置在实验室内的各个位置。实际选择的位置应基于以下因素:人员流量情况和做化验次数频繁程度。暴露 15 min 以后,盖上平板盖,并将其置入 36℃ 环境下培养 48 h±1 h。计数平板菌落总数,做好记录。如果平板菌落总数 $>15$  cfu/板,说明实验室的空气质量不适于进行微生物分析。在这种情况下,实验室的工作应该暂停,对实验室所有表面进行彻底消毒。对实验室的空气微生物学质量进行再次评估并合格之后,才能恢复实验

室正常工作。有更多成熟的方法,有各种类型环境空气采样装置(例如:过滤采样器、分离采样器、离心采样器),可以满足实验室的监测需要。

对于生物安全柜、洁净室的无菌操作区域,应制定文件化程序定期进行沉降菌的监测,定期监测是必需的。沉降菌监测时,培养皿应放置在有代表性的地点或位置,暴露 15 min,或暴露至正式实验结束,盖上平板盖并倒置平板,于 36℃ 培养 48 h。细菌数应 < 1 cfu/皿。如果使用尘埃粒子计数器检测,则  $\geq 0.5 \mu\text{m}$  尘埃粒子的数量应 < 3.5 个/L。

## 2. 无菌室的管理要求

食品微生物实验室的无菌间应制定质量管理标准,并设专人负责无菌间的定期环境监测工作。对无菌室的管理可遵循以下的原则:

- 1) 操作人员进入无菌室应先关掉紫外灯。
- 2) 人员进入无菌间要着无菌衣、帽、口罩和专用鞋,非工作人员不得随意进入。
- 3) 无菌室内配备空气净化消毒器或紫外灯进行空气消毒。应定期用适宜的消毒液灭菌清洁,以保证无菌室的洁净度符合要求。
- 4) 无菌室应保持清洁,严禁堆放杂物,以防污染。每日进行湿式小扫除,每周进行大扫除,每月进行空气和实验台表面的细菌学监测,各项指标控制在最低标准,符合无菌室的技术要求。
- 5) 需要带入无菌室使用的仪器、器械、平皿等一切物品,均应包扎严密,并应用适宜的方法灭菌。
- 6) 操作完毕,应及时清理无菌室,再用紫外灯辐照灭菌 20 min。
- 7) 无菌室应每月检查菌落数。在灭菌结束后,取内径 90 mm 的无菌培养皿若干,无菌操作分别注入融化并冷却至约 45℃ 的营养琼脂培养基约 15 mL,放至凝固后,取平板 3 个~5 个,分别放置工作位置的左中右等处,开盖暴露 15 min 后,倒置于 36℃ 培养箱培养 48 h,取出检查。100 级洁净区平板杂菌数平均不得超过 1 个菌落,10000 级洁净室平均不得超过 3 个菌落。如超过限度,应对无菌室进行彻底消毒,直至重复检查符合要求为止。

## 二、实验室的内务管理

食品微生物实验室应自成一体,工作区域特别是需要在无菌条件下工作的区域应有控制出入的门,在出入口设置明显的禁止或限制无关人员进入的标志,并对该区域进行有效的控制、检测和记录。进入工作区域必须穿戴工作服,禁止将与实验无关的物品(如植物、动物、食物、日用品等)带入工作区域。工作服应定期清洗,怀疑受到污染的工作服,应及时于高压灭菌后清洗。

在实验室中必须配备个人防护设施、急救设施和灭火器。严禁在工作区域进食、饮水、吸烟、化妆和清洗隐形眼镜。在吸取液体时,应使用移液器、吸耳球等机械装置移液,严禁用嘴移液。进行传染性较强的致病菌实验时,使用一次性外科手术手套,使用后高压灭菌。使用黏性标签时,禁止用舌头舔标签。工作中禁止将笔尖放入嘴中。

实验室应保持清洁整齐,严禁摆放和实验无关的物品。应备有工作浓度的消毒液,如 70% 的酒精、0.1% 的新洁尔灭、5% 的来苏儿溶液、0.1% 的过氧乙酸等。所有的操作过程应

尽量细心,避免微生物培养物和液体溅出。如果不慎将细菌培养物溅洒在工作台面上或地面上,应立即用有效消毒液浸泡在被污染处至少 30 min,再做清洁。实验完毕后应将实验台面清理干净,并用消毒剂擦拭实验台面。用过的物品和培养基等不要放在操作台上,而要放在特制的手推车上准备灭菌。离开实验室时要脱下工作服,将手认真消毒清洗。在分子生物学实验室和生物安全二级及其以上等级实验室,每个区域都需要穿着专用工作服,不能混穿,以免造成交叉污染。

实验室内的地面应定期用湿式拖扫方法清洁,对工作台和其他表面及时进行消毒和清洁。还必须对通风橱、仪器、设备和玻璃器皿进行清扫、洗涤和消毒。冷冻设备和冰箱必须经常清洁除霜,使里面装的东西不至于受到损坏。部分没有受过训练的清洁人员可能担心会损坏仪器、设备,出于同样理由检验员们对清洁人员的清洁工作也不满意,在这种情况下,管理人员必须为检验员和清洁人员共同制定清洁计划。即当清洁人员对环境进行清洁时,检验员必须对其负责仪器、设备进行清洁。

所有表面都应该经常用湿抹布清洁。内务管理优秀的标志是架子上尘土越少越好。地板应该定期用湿拖把清扫并消毒,以防污物聚集和细菌滋生繁衍。

应坚持清洁记录并对其评估,以确保清洁工作是按时间安排进行的。应经常对实验室进行检查以确定清洁程度是否达到要求。

应制定害虫防治计划以使苍蝇、蟑螂和其他害虫的数量在控制范围之内。大量散装存储的食品对这些害虫有特别的吸引力。虽然不建议长期储存散装食品,但是对一个正规的实验室有时又是不可避免的,比如一些样品涉及到了法律诉讼,这样的样品就不得不保留一段比较长的时间。虫害控制可以由实验室的工作人员来做,也可以交给商业公司完成。除害工作完成后应保留书面记录,并标明完成的日期。

实验室废弃物的处理要遵守有关法律法规,在设计和执行关于生物危害性废弃物处理、运输和废弃的规划之前,必须参考最新版的相关文件。废弃物处理之前应首先消除污染,高压蒸汽灭菌(121℃至少 30 min)是清除污染时的首选方法,也可以直接焚烧。焚烧炉应经过特殊设计,同时配备补燃和消烟设置。注射针头等污染性锐器应放在盛放锐器的一次性容器内焚烧,如需要可先高压灭菌。盛放锐器的一次性容器必须是不易刺破的,而且不能将容器装得过满。

其他污染材料在丢弃前应放置在防渗漏容器(如有颜色标记的可高压灭菌塑料袋)中高压灭菌。高压灭菌后,物品可以放在运输容器中运至焚烧炉。如果实验室中配有焚烧炉,则可以免去高压灭菌,将污染材料放在指定的容器(如有颜色标记的袋子)内直接运送到焚烧炉中。可重复使用的运输容器应防渗漏,并有密闭的盖子。这些容器在送回实验室再次使用前,应进行消毒清洁。

重复使用的污染性材料,要在高压灭菌或消毒后再进行清洗。应在每个工作台上放置盛放废弃物的容器、盘子或广口瓶,最好是不易破碎的容器(如塑料制品)。当使用消毒剂时,应使废弃物充分接触消毒剂(即不能有气泡阻隔),并根据所使用消毒剂的不同保持适当接触时间。

回收非污染的有机废液和无机废液,应倒入相应的废液回收瓶中,废液回收瓶要有明显

的标志,严禁直接倒入水池中。含有毒、有害物质的废液应按其化学性质进行处理后,再回收到废液回收瓶中。含有六价铬的废液先将六价铬还原成三价铬,含氰化物废液则用氢氧化钠调至强碱性( $\text{pH}>12$ )后加入硫酸亚铁溶液(1+1)或加入次氯酸钠使之分解后,再回收存放。有机回收废液和酸碱回收废液要分别回收,倒入不同的废液回收瓶中。定期将有机废液用锯末或硅藻土等吸附剂吸附后再处理;无机酸碱废液于中和后处理。

### 参 考 文 献

- [1] GB 50346—2004 生物安全实验室建筑技术规范
- [2] JGJ 91—1993 科学实验建筑设计规范
- [3] WS 233—2002 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则
- [4] JGJ 71—1990 洁净室施工及验收规范
- [5] CNAL/AC 01:2005 检测和校准实验室能力认可准则
- [6] 赵贵明. 食品微生物实验室工作指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [7] 覃先锋. 病原微生物实验室生物安全管理条例实施手册[M]. 北京: 中国科技文化出版社, 2004.
- [8] 杨更发, 陈杭, 张峰, 等. 微生物检验洁净室的设计[J]. 浙江预防医学, 2001, 13(3): 61~62.
- [9] 孟建彤, 黄剑屏, 徐东, 等. 卫生微生物无菌操作实验室设计建造探讨[J]. 预防医学情报杂志, 2002, 18(3): 261~262.
- [10] 王清勤, 许钟麟, 张益昭. 关于我国生物安全实验室建设的思考和建议[J]. 建筑科学, 2003, 19(4): 61~63.
- [11] 许钟麟, 王清勤, 张益昭. 生物安全实验室设计要点[J]. 暖通空调, 2004, 34(1): 45~51.
- [12] ISO 7218:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs - general rules for microbiological examinations

# 第四章 人员和组织

## 第一节 人 员

由于微生物所具有的生物学特性,在食品生产的原料收获、处理加工、保藏运输、销售及食用等多个环节都可能对食品造成污染,因此食品安全中的微生物危害是最难以控制的。这就对从事食品中微生物检验的实验室的能力提出了更高的要求,不仅包括实验室的设施及仪器等硬件方面的要求,而且更重要的是对从事微生物检验的工作人员的能力及素质等软件方面提出了更高的要求。因此人员成为了食品微生物检验实验室中众多要素中的关键一环,本节将从人员的组成、相应职责、应具备的技能以及如何培训方面进行探讨。

### 一、人员的组成、相应职责及应具备的能力

#### 1. 人员的组成

实验室主管负责实验室工作人员的授权,并且进行适当的监督与审核。只有确保实验室各方面人员的能力符合要求,对所有的实验室工作人员采取有效的管理、培训与监督,才能最大限度地减少人员因素的影响,确保实验室检测结果的正确性和可靠性。

食品微生物检验实验室的人员组成通常包括实验室管理人员、实验室检验人员(实验室科研人员和实验室技术人员)和检验辅助人员。目前,我国的许多微生物实验室已经或正在准备申请通过实验室认可,因此在讨论实验室人员的职责时也包含一些实验室认可中所规定的要素。

#### 2. 人员的相应职责及应具备的能力

##### (1) 实验室管理人员

全面负责实验室的工作,通常还兼任质量负责人的角色。其职责主要包括负责实验室检测岗位与人员的配置与协调;组织制定与检测有关的规章制度,审查工作质量;负责处理客户提出的申诉,处理重大检测质量问题;制定本实验室的年度工作计划,完成年度的工作总结与质量分析;组织制定实验室的质量方针与质量目标;负责分包实验室的审批及检测样品的分包工作;负责质量管理体系的管理评审。如果作为质量体系中的质量负责人,其职责还将包括组织编写本实验室的质量手册;制定人员管理培训计划并且组织实施;负责不合格测试的控制;负责检验工作质量的差错统计与分析;负责预防措施计划的制定与实施;负责纠正措施计划的制定和实施结果的监控;负责分包工作的确认、分包方的选择以及分包方技术能力的跟踪评价等。

作为食品微生物检验实验室管理人员,应具备的能力还包括具有良好的品德修养,对所提供的微生物检验项目有足够的背景知识与经验,熟悉实验室的认可与管理,具有良好的实验室管理和综合协调能力。

### (2) 实验室检验人员

主要承担着实验室检验与新检测技术的研发工作,包括负责实验室样品的微生物检验;负责解决工作中遇到的技术难题,并且协助质量负责人解决检测工作中的有关问题,参与实验室检验方法或程序的制定与验证工作。通常有的实验室检测人员还是质量体系中的技术负责人,其职责还将包括负责制定实验室检测人员的技术培训计划并组织实施;负责实验室设施与环境条件的控制;负责实验室水平测试计划的制定与执行;组织制定实验室的检测程序及其验证;组织制定与质量体系技术体系要求相关的文件;负责实验室年度技术工作的总结;负责制定实验室的科研计划并且组织落实,收集并跟踪国内外检验方法与标准;组织对新开检测项目进行调研、研发与审定。

作为食品微生物实验室的检验人员,还应当具备认真负责的工作态度,具有扎实系统的微生物检验的专业知识,熟悉实验室所用检测方法与检测程序,能够对工作中遇到的问题进行分析与解决。

### (3) 实验室检测辅助人员

应当遵守实验室的管理规定,协助实验室技术人员开展的工作包括:参与检测样品的登记与编号;参与样品的制样、存放及处理;培养基和试剂的配制;废弃物处理;参与实验室检测消耗品的申购、验收、管理工作;负责实验室及工作环境的清洁卫生工作;按照规定程序进行检测器皿的清洗及准备工作等。其应具备的能力还包括具有认真负责的工作态度,熟悉实验室的质量手册和相应的工作程序。

## 二、人员的培训

实验室工作人员虽然具有了相关的专业知识,但对于从事实验室检测工作,也必须接受相应的管理或技术方面的培训,提高自身的综合能力,符合实验室岗位的要求。因此,人员培训成为保证实验室能力的重要环节,与实验室质量水平的高低密切相关。只有通过定期地、有针对性地对实验室工作人员进行教育与培训,才能保证实验室人员具备工作岗位所需的专业知识、能力与经验,满足实验室当前和预期检测任务的需求。

质量负责人与技术负责人根据实验室工作人员的状况(包括工作岗位、专业知识等)、现有检测项目需求、将来的检测发展趋势、结合实验室各种审核中出现的问题,有针对性制定年度的培训计划(包括培训人员、培训内容、培训方式以及培训效果评价等),使实验室的培训真正做到“有的放矢,有章可循”。

培训的内容包括技术培训与质量管理体系培训。技术培训主要是实验室检测技术方面的培训,如实验室检测方法、仪器、设备的操作维护、生物安全防护与管理、样品的采集与制备、不确定度的评估等。质量管理体系培训包括 ISO/IEC 17025:2005《检测和校准实验室能力认可准则》和 CNAL/AC05:2003《实验室认可准则在微生物检验实验室的应用说明》,组织人员参加相关质量管理体系审核技术培训、学习实验室制定并运行的质量管理体系文件等。

培训方式分为内部培训与外部培训,内部培训是由实验室组织的内部培训(如各种检测技术培训、质量管理体系文件的培训等);外部培训可以是实验室有关人员到相关机构、仪器

厂商、学术团体参加检测技术或管理知识的培训,也可以是这些机构派人员来实验室进行相关培训。培训结束后,必须通过适当的方式进行结果评价,这些方式包括获得资格证书或培训鉴定证书、测试考核、观察检测操作、培训小结评价等。

技术培训的效果由技术负责人作出评价,管理知识与质量管理体系的评价由质量负责人进行评价。外部的培训如果没有取得资格证书或鉴定证书,那么技术负责人和质量负责人将对接受培训的人员进行考核;对于没有培训效果证明的技术交流与研讨会等,参加人员应当提交书面总结报告以供审核。内部技术培训的考核可以采用盲样检测、比对实验、观察实际操作等方式;内部管理知识和质量管理体系的培训可以采用书面考核、培训老师对接受培训人员进行评价等方式。岗前培训合格者由实验室主管授权从事检测工作,不合格者继续接受培训;关键工作岗位(如内部审核、检测报告签发、操作特定设备、设备校准、特殊检验岗位)人员,在培训合格的基础上,实验室主管还需结合接受培训人员的实际经验与操作技能,授权上岗。每年的培训计划完成后,技术负责人和质量负责人要根据计划完成情况进行总结,对实验室工作人员的能力进行科学评估,提出下一步的培训及其工作建议。

## 第二节 组织与管理

### 一、实验室的法律地位及责任

微生物检验实验室提供测试服务,就要承担相应的法律责任,因此明确实验室的法律地位(即法律责任)是为了确保实验室有能力承担法律责任。我国的检验实验室主要有两种形式:一种形式是实验室是一个独立的依法登记注册的单位,获得政府部门的批准,具有明确的法律身份,具备了独立的法人单位资格,能够独立地承担相应的法律责任;另一种形式是实验室本身不是一个独立法人单位,而是所在母体组织中可以区分的一部分,实验室的母体组织是一个独立法人单位。因此,实验室母体组织独立法人单位的代表,必须正式书面授权实验室进行与检测有关的活动,并承担相应的法律责任。

如果实验室所在的母体组织还从事检测工作以外的活动,那么必须鉴别从事其他活动的部门或人员对于实验室从事检测活动是否存在着潜在的利益冲突,而且必须明确规定母体组织中的其他关键部门或人员的责任,确保实验室工作的公正性与独立性,确保其他关键部门或人员不会对实验室的检测活动产生不良影响。如果检测实验室计划作为第三方实验室获得认可,实验室必须能够提供足够的证据来证明它的公正性,并且确保实验室及其成员能够抵御任何可能影响实验室检测的影响,实验室还要保证不参与任何可能危及其判断独立性和检测工作诚实性的活动。

实验室所承担的责任包括满足客户的需求,满足官方管理机构的需求,满足提供承认的组织的需求,检测活动要满足实验室认可准则的要求。

在实验室所承担的以上责任中,其最基本也是最重要的责任是满足客户的需求。因此,满足客户的需求对实验室提出了更高的要求,不仅要满足客户在合同上标明的要求,而且还要正确识别客户潜在的需求。这就要求实验室管理层应当采用一种系统的、透明的方式对实验室进行管理,针对所有相关方(包括客户、员工、所有者、官方管理机构、实验室认可机构

等)的要求,进行有效地管理,以保证不断提高实验室的经营业绩。实验室应当分析、识别相关方的需求,并将它们转化成相关的文件,在整个组织内沟通这些要求,特别是识别适用于其检测活动的要求。实验室不仅要加强与官方管理机构和实验室认可机构的沟通与联系,还要建立一种不断获得这些机构的法律法规或文件,并将它们制定成相应的文件,纳入实验室的质量管理体系要求中。

## 二、实验室的组织和管理要求

实验室所配备的管理技术人员数量与资格条件,应该满足实验室工作类型、工作范围和工作量的需要,实验室各类人员的岗位职责应明确,确保他们履行职责的各种条件,发现与质量管理体系的偏离和对检测工作程序的偏离,并且采取相应的措施预防或减小这种偏离。

实验室在进行检测活动时,应当有程序文件来规范实验室人员自己的行为,避免涉及任何可能会降低其能力、判断力、公正性或诚实性的活动;同时也要确保实验室人员不受到任何来自实验室外部或内部的不正当压力与影响,避免对实验室的检测工作产生不良影响。非独立法人的实验室,要有措施确保其母体组织不干预实验室的公正性、独立性和诚实性;实验室也要保证所有人员的工作不受到任何来自商业、财务与其他方面的压力的影响,以及内部或外部各级行政领导的不恰当干预。

实验室应明确规定质量管理、技术工作和支持服务工作的关系。实验室的检测工作是一项技术性很强的工作,它是实验室工作的主要内容,在检测服务的过程中,需要有足够专业技术水平的技术人员,要控制检测工作的环境条件,要选择利用适合的检测仪器、设备,要有一套适宜的检测方法,得出准确的检测结果,通过记录和数据处理后,向客户报告检测结果。

实验室的管理工作包括技术管理和服务管理工作,是领导和控制实验室进行检测工作质量有关的协调活动,是在各级管理层所进行的活动,起着策划、组织、协调、控制及持续改进的作用,目的是为检测工作提供指引与保证。实验室的支持服务工作,包括消耗性材料的采购、设备的维修保养、样品的储存保管与运输、文件资料的清理与保管、仪器、设备的周期送校等,这些都是为技术工作服务的,是为技术工作做好资源准备与供应,起到后勤与保障作用。

实验室中对检测工作有影响的人员包括管理人员、操作人员与核查人员,应当对这些人员的职责、权力与相互关系作出相应的规定。为了更好地确保实验室的检测质量,实验室应当建立一个由不同专业背景的技术负责人组成的技术管理层,全面负责技术工作和检测所需的资源(如人力资源、信息资源、物质资源等)的供应,以使其更加科学合理并且符合实际情况。还要对实验室的检测人员(包括正在培训的人员)进行充分的监督,实验室应当委任熟悉各项检测方法或程序、了解检测工作目的、知道如何评价检测结果的人员担任监督员,确保实验室具有所从事工作的初始能力和持续能力。另外实验室应指定一名质量技术负责人,其能够与最高管理层直接进行接触与沟通,具有明确的责任与权力以保证质量管理体系的有效运行。

实验室的管理体系应当覆盖实验室进行检测的所有场所,不仅包括在实验室的固定设施内,还包括离开实验室固定设施的场所(如远离实验室的实验基地)、相关的移动设施(如移动的食品安全检测车)、相关的临时设施(如检测结束后就被拆除的设施)。一个组织的质量管理体系还可以包括许多个不同的管理(子)体系,如质量管理(子)体系、环境管理(子)体系、财务管理(子)体系等。

# 第五章 分包和客户服务

## 第一节 分 包

### 一、分包的范围

食品微生物实验室由于资源、能力、工作量等原因,导致将部分检测工作分包给有能力的实验室。实验室技术负责人负责对分包工作的确认,最终分包工作需得到实验室主管的批准。一般来说,食品微生物检验分包工作主要包括以下几个方面:

- 1) 由于食品微生物检验任务的突然增加,实验室现有的人员、试剂、仪器、设备等资源情况已处于超负荷状态,无法保证及时出具结果报告的检测项目;
- 2) 食品微生物实验室检出可疑菌株又无法进一步确认的检测项目;
- 3) 仪器、设备等出现故障一时又难以修复的检测项目;
- 4) 个别需要另外特殊或专业检测技术的检测项目;
- 5) 标准规定但目前实验室尚不具备检测能力的检测项目。

### 二、分包的控制

除上级机关强制性规定的分包外,食品微生物实验室需要分包的测试项目首选应符合ISO/IEC 17025:2005《检测和校准实验室能力认可准则》技术要求的分包方实验室,建立分包方档案,并组织相关技术人员就分包项目对分包方的检测能力、资源和测试工作质量进行现场考核,合格后方可形成分包实验室情况调查报告,报实验室主管审批,最后双方需签署分包协议书,并将该分包方列入本食品微生物实验室的《分包实验室一览表》内。

在分包协议中,分包方应向本食品微生物实验室至少承诺以下几个方面的内容:

- 1) 应及时、准确、完整地提供检测结果报告(需要时,可包括相关的原始记录等);
- 2) 不得以任何借口将接受的分包测试工作再转包给其他实验室;
- 3) 分包方实验室的人员、仪器、设备等资源变化影响到分包的检测工作时,应及时通知实验室。

食品微生物实验室技术负责人应定期对分包方实验室的技术能力和检测结果质量进行跟踪评价,完成评价报告;一旦发现其检测能力和结果保证无法满足分包协议书要求,则报实验室主管批准后,立即中止分包项目,必要时可取消分包方资格。

### 三、分包的实施

食品微生物实验室在确认需要分包检测项目后,在实施分包工作之前,需将分包内容转达给客户,在获得客户确认后(最好是书面确认)再实施分包。实验室技术负责人依据需分包检测项目,从《分包实验室一览表》所列的分包方中指定合格的分包实验室,进行分包检测工作。

## 四、分包的责任

由客户或上级机关指定的分包方检测的项目,食品微生物实验室不承担工作责任。除此之外,实验室就分包检测项目向客户负责。

## 五、相关的记录

涉及到分包的相关记录,如《分包协议书》(见附录1)、分包方能力的考核记录、跟踪评价报告、《分包实验室一览表》、客户对分包检测项目的确认记录等,均由资料管理员保存。

## 第二节 客户服务项目

为确保食品微生物实验室与客户或其代表保持良好的协作关系,应明确客户要求,保持客户对实验室的信心。

### 一、对客户服务的內容

食品微生物实验室应指定人员负责与客户或其代表的沟通,负责安排接待客户对实验室的参观,负责组织定期征求客户意见,负责安排测试人员制备客户需要的验证样品等;实验室技术负责人负责解释客户提出的技术性问题;授权签字人负责对检测结果的评价和说明;资料管理员负责收集客户或其代表的电话、传真、地址、邮编、客户名称、电子信箱等信息,建立客户的档案;质量负责人负责对客户提出的有关质量及体系运行等方面的问题的解答。

### 二、对客户服务的要求

将努力依据客户自身的需要和要求,结合食品微生物实验室自身具备的专业技术力量和人力、物力、财力、时间和信息等资源,为客户提供优质的服务。

在检测工作开始之前,实验室工作人员与客户通过合同评审或其他方式,互相沟通,确保对客户的需求理解一致。在检验过程中如果出现偏离或特殊情况(如检测周期的延误等)时,要及时通知客户,以获取客户的理解和同意。在确保不损害其他客户机密的前提下,为客户提供适当的机会,使其了解与其委托工作有关的实验内容。实验室在提供服务的过程中,所有工作人员要严格执行保密规定、所有权保护规定和公正性地位的要求,为客户提供一个科学、快速、公正、准确的服务环境。

### 三、与客户的沟通

作为一个服务机构,食品微生物实验室应经常与客户进行友好沟通,充分明确客户的要求,在公正保密、不侵犯其他客户相关利益的情况下,与客户间相互沟通,具体如下:

1) 为客户提供适当的机会,在保证其他客户机密的前提下,允许客户或其代表进入实验室的相关区域直接观察与他自己所委托的检测工作有关的操作;

- 2) 为客户提供技术方面的建议和服务;
- 3) 必要时对检测结果进行评价与说明;
- 4) 积极与客户保持联系与沟通,收集客户反馈及其他意见;
- 5) 在检验过程中任何延误与主要偏离,均应及时通知(最好是书面的)客户;
- 6) 需要时,为客户制备、包装和分发所需的验证样品。

#### 四、服务效果的反馈

食品微生物实验室对提供服务的固定客户每年至少走访一次,也可通过发放征求意见表的形式对非固定客户进行服务效果的调查,要重视客户对实验室提供服务状况的反馈,无论是正面的还是反面的反馈意见,对改进质量管理体系、检测工作质量以及改善对客户的服务都大有帮助。根据反馈结果要及时采取纠正措施和(或)预防措施,并以此来指导实验室不断改进和完善实验室的质量管理体系,提高测试水平和对客户的服务质量与信誉。

#### 五、相关的记录

涉及到对客户服务的记录,如客户信息、征求意见表、投诉反馈记录等均由档案管理员保存。

# 第六章 文件、记录的管理和控制

## 第一节 文件的管理和控制

文件(document)是表示一个组织的图文化程序、政策或指令,它可以是方针声明、程序、规范、标准表格、图表、教科书、张贴纸、通知、备忘录、软件、图纸、计划等。这些文件可以承载在各种载体上(载体可以是纸张、计算机磁盘、光盘或其他电子媒体,照片或标准样品,或它们的组合),因此可以是数字的、模拟的、摄影的或书面的形式。文件解释一个组织计划做什么和怎么完成它,还指明员工们如何去实施。文件是实验室运作信息这一更大组织架构的一个组成部分,文件与记录不同,它是先于事实而存在的,它提供的是有关如何运作的指南、解释和指令。

文件控制(document control)是指对文件的编制、编码、审批、发布、分发、登记、更改乃至回收、作废整个过程实施控制。其目的在于确保受控的文件在其使用的各个有关场所始终保持现时有效性。

实验室应建立并保持有关程序,对构成质量文件的所有文件和信息[包括政策声明、教科书、程序、说明、校准表及其来源、图表、海报、公告、备忘录、软件、图片、计划书和外源性文件(如法规、标准或检验程序等)]进行控制;应遵循国家、地区和当地有关文件保留的规定,将每一份受控的文件用适当的纸张或非纸张媒介备份存档以备日后参考。

文件资料按其管理方式可分为受控文件和非受控文件两类。受控文件包括质量管理体系文件、正式出版的或上级下发的技术标准(国家标准、行业标准等)、技术规范、非标方法、技术资料等。非受控文件包括食品微生物实验室的其他管理性文件、与检测工作无关的外来文件以及实验室提供给外单位非受控的质量管理体系文件。文件资料按其存在形式可以分为以文字、图纸形式构成的纸质文件和由电子文本等构成的电子文件两类。

发给实验室人员的质量管理体系文件,在发布之前均需要由授权人员审核并批准使用,还须建立根目录或相应的文件控制程序,以标明现行修改状态和质量管理体系内的文件发布情况。采取的程序须确保:

- 1) 向实验室人员发布的作为质量管理体系组成部分的所有文件,在发布前得到授权人的审核和批准。
- 2) 维持一个对现行版本的有效性及其发行情况进行确认的清单,也称作文件控制记录。
- 3) 在相应场所,只使用现行的,经过授权的文件版本。
- 4) 必要时,定期对文件进行评审、修订,并经授权人员批准。
- 5) 无效或归档的已废止文件应及时从所有使用地点撤掉,或确保不被误用。
- 6) 存留或归档的已废止文件,应进行适当标注,以防止误用。
- 7) 如果实验室的文件控制制度允许在文件再版之前对文件进行手写修改,则应确定修

改的程序和权限。修改之处应有清晰的标注、签名并注明日期。修订的文件应尽快正式重新发布。

8) 应制定程序描述如何更改和控制保存在计算机系统文件。

所有与质量管理体系有关的文件均应能唯一识别,包括:

- 1) 标题;
- 2) 版本或当前版本的修订日期或修订号,或以上全部内容;
- 3) 页码和总页面(如适用);
- 4) 发行机构;
- 5) 来源的标志。

根据 ISO/IEC 17025 对实验室文件管理和控制的要求,文件控制可以归纳为七个阶段,即“编、审、发、改、废、存、查”。

## 一、文件的编写

首先,食品微生物实验室应组织人员深入学习 ISO/IEC 17025,了解其对本实验室质量管理体系建立的各项要求。各实验室一定要结合本实验室的实际情况进行文件编写工作。个别实验室由于对建立质量管理体系从无到有的过程缺乏信心和经验,把别的检测机构的质量管理体系文件拿来抄抄改改,甚至是全盘套用的做法是绝对不可取的,因为每个检测单位都有自己的特色,检测项目、机构设置和运行水平都不相同,不结合实验室自身的工作实际情况而生搬硬套,只会抑长扬短,难以建立适合本机构良好运作,有利长期发展的运行模式。

其次,由于文件编写人员的专业水平和语言文字表达能力对文件的质量起着关键的作用,因此,不同类型的文件应由有相应资历的专业人员负责编写,质量手册、程序文件等质量管理体系文件,由实验室质量负责人安排熟悉整个管理体系运作的质量管理部门(如办公室等科室)牵头组织人员编写;作业指导书、仪器操作规程、检测原始记录等涉及专业技术性的文件,则应由负责该检测技术的技术部门安排人员进行编写。

### 1. 质量手册的编写

#### (1) 质量手册编写概述

质量手册是阐明一个组织的质量方针并描述其质量管理体系的文件。对内是该组织纲领性管理文件,对外是该组织质量保证能力的文字表达,使委托方或第三方确信本组织的技术和管理能力能达到 ISO/IEC 17025:2005 的要求。

质量手册通常应包括:质量方针;影响质量的管理人员、执行人员、验证人员或监督人员的职责、权限和相互关系;质量管理体系程序及说明;关于手册的评审、修改和控制的规定。

#### (2) 质量手册的结构和内容

- 1) 封面:质量手册的封面应包括:实验室名称;手册标题;手册版本号;受控状态。
- 2) 审批页:质量手册的审批页应包括:手册编号;手册版本号;生效日期;拟制人签名及

日期;审核人签名及日期;批准人签名及日期。

3) 修订页:用表格的形式说明手册各部分的修改状态,包括:修订的章、节、条号、修订次序,修订内容,批准人和批准日期。

4) 手册目录:列出手册中所含章节号及题目、所在页码。

5) 前言:质量手册的前言应包括:实验室概况(性质、背景、发展史、规模、业务情况简介);实验室名称、地址、通信方式;手册的编制依据、主题内容和目的;手册的适用范围(适用于哪些检测种类和范围,规定适用的质量管理体系要素)。

6) 定义及缩略语(必要时采用):对手册中出现的术语及缩写给出定义或说明,并指出手册中使用的其他术语符号的标准。

7) 质量手册管理:对手册的编制、修改、再版、分发、保管及宣传等作出规定。

8) 质量方针、目标和公正性承诺:包括实验室的质量方针;实验室的质量目标;实验室公正性承诺;实验室主管签名及日期。

9) 质量管理体系要素描述:除“组织和管理”要素以外,其他质量管理体系要素主要内容包括:概述;负责部门和参加部门及其职责;达到要素要求所规定的程序;开展活动的时机、地点及资源保证;支持文件。“组织和管理”要素是手册的重点,其应包括:实验室的法律地位;描述组织机构设置(给出机构框图);实验室主要负责人(技术负责人、质量负责人)的任职条件和岗位职责、权限;与检测质量有关的部门和人员(包括管理人员、执行人员和质量监督人员)的任职条件、职责、权限和相互关系;权利委派;保护委托方的机密信息和所有权规定;参加实验室比对和能力验证计划的措施;实验室授权签字人。

10) 支持性文件:包括机构职能表;程序文件目录;主要仪器、设备一览表;实验室人员一览表;实验室授权签字人情况表;实验室平面布置图;现用标准检测方法一览表;申请认可项目表等。

## 2. 程序文件的编写

程序文件,又称为书面程序或文件化程序,属于文件化质量管理体系的二级文件,是程序的书面文字表达。通常质量管理体系所涉及到的各项质量活动都应该建立程序,编制程序文件。程序文件应按照“5W1H”的要求进行展开,必要时可用流程图表辅助说明。程序文件一般不涉及纯技术性的细节。

程序文件的结构和内容如下:

(1) 封面:在每一份程序文件前加封面,以便进行文件识别和控制,程序文件的封面包括:实验室名称;文件编号、文件名称、版本号;受控状态、受控编号;当需要把修改记录放在封面中时,应增加:修改条款号、修改内容、修改人和批准人签名及日期;当不另设刊尾时,还应增加:编写人、审核人和批准人签名及签名日期和生效日期。

(2) 刊头(页眉):在每页文件的上部加上刊头,以便文件识别。程序文件的刊头应包括:实验室名称;文件编号、文件名称;修改状态、版本号;页码。

(3) 刊尾(选用):在每页或每份文件的末页底部加刊尾,说明文件编写、审核、批准情况。也可以不用刊尾,将文件编写、审核、批准情况设计在封面中。

(4) 修改控制页(选用):包括:修改条款号、修改内容;修改人和批准人签名及日期。修改控制页可单独设置,说明文件修改情况,也可将修改情况放在封面中,不另设修改控制页。

(5) 正文:程序文件的正文应包括以下八个方面内容。

① 目的:说明为什么要开展这项活动,叙述该程序所控制的质量活动要达到的目的。

② 范围:说明程序的适用对象(活动、部门、岗位或人员),必要时也可以明确指出该程序的不适用范围。

③ 职责:规定实施该程序的负责部门或人员的责任和权限,同时规定实施程序的相关部门或人员的责任和权限及相互关系。

④ 定义(必要时采用):给出于文件内容相关的主要术语的定义及其来源。

⑤ 工作程序:按该质量活动的逻辑顺序逐步列出开展此活动的细节,必要时可用流程图进行辅助说明。按“5W1H”的要求,其中 why(为什么要做)已经在第一章中说明,在工作程序中要回答其余“4W1H”的问题:

明确由谁来做(who),即活动的实施者和协同者;

说明在何时做(when),即活动实施的时间或周期;

说明在何处做(where),即活动实施的地点或部门;

规定要做的事(what),即活动实施需要做的具体操作;

规定如何做(how),包括活动依据的文件(或技术标准),采用的仪器、设备、工具材料,需要控制的环境条件,如何做,做到什么程度,达到什么要求,如何进行控制,形成什么记录或报告及相应的签署手续等。

⑥ 质量记录:列出需要保留的质量记录名称。

⑦ 支持性文件:列出程序中直接引用或配合使用的文件名称和编号。

⑧ 附录:给出执行程序文件所需要的记录表格的格式和编号。

### 3. 作业指导书的编写

作业指导书也属于程序文件的范畴,但两者又相互区别。程序文件通常覆盖组织的几个部门(或岗位),甚至所有部门,其职责所涉及的部门往往不止一个,而是多个;程序文件需要由本实验室的实验室主管或其授权人员批准;程序文件一般也不涉及具体的技术细节。而作业指导书通常仅就某一特定岗位或特定产品的特殊要求,作出详细的技术或管理规定,仅适用于一个部门或一个岗位或同类型的岗位,可以由部门主管批准。作业指导书是程序文件的细化,其层次较低,内容更具体,但并非每份程序文件都要再细化成一个或多个作业指导书,当程序文件规定足够明确、具体,可进行操作时,也可以不再编制同类型的作业指导书。例如,标准检验方法已经足够仔细、明确,可满足检验操作要求时,就不必再编制检验细则。

作业指导书(即标准操作程序)的结构和内容,参照第十一章第四节的相关内容。

### 4. 质量记录的编写

质量记录作为质量手册文件、程序文件、作业指导书引用的质量活动的记录格式文件,也是一项活动的规范性文件。质量记录的编写参见第六章第二节记录的管理和控制。

## 二、文件的审核与批准

文件编写完成以后,实验室应组织相关人员对编写完成的文件进行审核,经审核的文件,根据其不同类型,交由不同人员进行审批。

### 1. 文件审核

#### (1) 文件审核的内容

文件审核通常包括以下内容:审核文件是否符合所选定的质量管理体系标准的要求;审核文件的规定是否符合本实验室的实际情况,具有切实可行性;审核文件是否用词准确,条理清楚,表述正确,是否可实现“唯一理解”;审核文件是否结构合理,便于管理,充分考虑了文件控制的要求;审核各种文件之间是否具有系统协调性;审核文件中各项活动的接口是否处理适当、明确;审核文件是否符合规定格式,是否具有唯一编号,以便于识别、区分和查找。

#### (2) 文件审核的时机

- 1) 在文件编写初稿完成后可进行初审;
- 2) 在投入正式运行前进行全面审核;
- 3) 在运行过程中可适当安排审核;
- 4) 在体系进行重大修改或采取较大范围的纠正措施后也应安排全面审核。

#### (3) 文件审核的方式

- 1) 可采用集体讨论审核的方式进行;
- 2) 也可由选定的审核人员进行传阅;
- 3) 文件所涉及的责任部门的管理者必须认真审核;
- 4) 由管理者代表或授权的相当职位的人员进行文件的最终审核。

### 2. 文件批准

通过审核的文件根据其不同类型,交由不同人员进行审批。如质量手册、程序文件等质量管理体系文件应由本实验室的实验室主管或其授权人员签字审批,并注明批准日期;而作业指导书等涉及专业技术性的文件则应由有关负责该检测技术的技术部门负责人签字审批,并注明批准日期。

## 三、文件的发放

经审核、批准后的文件由文档管理员统一发放,质量手册、程序文件的发放范围及份数由本实验室的实验室主管确认,作业指导书及质量记录发放范围及份数由质量负责人和技术负责人确认。

文档管理员编制《受控文件一览表》,并将所有受控文件名称以及受控文件的发放范围和发放份数列入《受控文件一览表》中。文档管理员及时将《受控文件一览表》发放到各部门,以便使用人员可查阅最新有效的受控文件状态。经颁布发行的文件,按照文件发放范围影印适当份数,加盖红色“受控文件”章及受控编号后由文档管理员统一发放。每份文件应有不同的编号,以便追溯。所有受控文件的正本均由文档管理员保存。受控文件使用部门或使用人员应在收到文件以后签名确认。

## 四、文件的修改

当因各种原因(如实施新的质量管理体系或原文件规定和实际工作不适应时)应及时对文件进行修改,以保证质量管理体系能正常运行。

文件需要更改时,由原文件的拟订部门或个人提出文件修改申请。质量手册和程序文件修改经质量负责人审核,报最高管理者批准后执行;技术类作业指导书修改经部门负责人审核,报技术负责人批准后执行;管理类作业指导书修改经部门负责人审核,报质量负责人批准后执行。文件更改后的审批由原文件审批人审批,当原审批人不在职时,由接替其岗位的人员或授权人员审批。

文件变更内容应在文件修订记录中简述,并注明修改人和批准人。文档管理员应在文件修改完成后更新《受控文件一览表》,并标明其最新修订日期。文档管理员应及时将旧版文件收回,重新发放新版文件。旧版文件的收回和新版文件的发放均需文件使用部门和使用个人签名确认。

## 五、文件的作废和销毁

各部门文件若因有新版、过期、损坏等现象,需要作废原文件时必须向质量负责人提出作废文件申请,经质量负责人批准后,作废文件加盖“作废”印章,将原件及复印件交文档管理员统一处理。回收的旧版文件的复印件由文档管理员统一销毁,并记录文件资料作废或销毁信息。旧版文件的原件盖“作废”印章后,由文档管理员负责存档,保存时间根据各实验室具体情况确定。

## 六、文件的保管

### 1. 内部文件保管

经颁布发行的质量管理体系文件正本由文档管理员保管,副本由持有人自行保管。文件正本不外借,副本可供本实验室人员使用或借阅,由文档管理员登记在《文件档案借阅登记表》中,借阅者应在规定日期内归还。使用部门不得自行影印质量管理体系受控文件,不得向外单位提供。文件如需要向外单位提供,必须经实验室主管批准,并且仅可以提供非受控的副本。现场使用的文件须置于作业场所,非现场使用的文件须由各使用部门指派专人自行集中管理。文档管理员根据文件修订情况及时更新《受控文件一览表》,供各部门使用核对。文件如发现有缺页、破损、字迹模糊或丢失,办理相关手续申请补发,不得以影印方式自行处理。任何人均不得在正式文件上加以标记或书写任何文字、符号。

### 2. 外来文件的管理

所有外来技术文件、资料和法规性文件由文档管理员统一接收并登记,由使用部门确认是否受控(见图 6-1)。经确认属于受控的文件、资料,由文档管理员按照受控文件的要求负责发放和保管,并登录在《受控文件一览表》中。使用部门负责跟踪外来文件的有效性,定期核查外来文件是否有新的版本,及时更新过期文件。

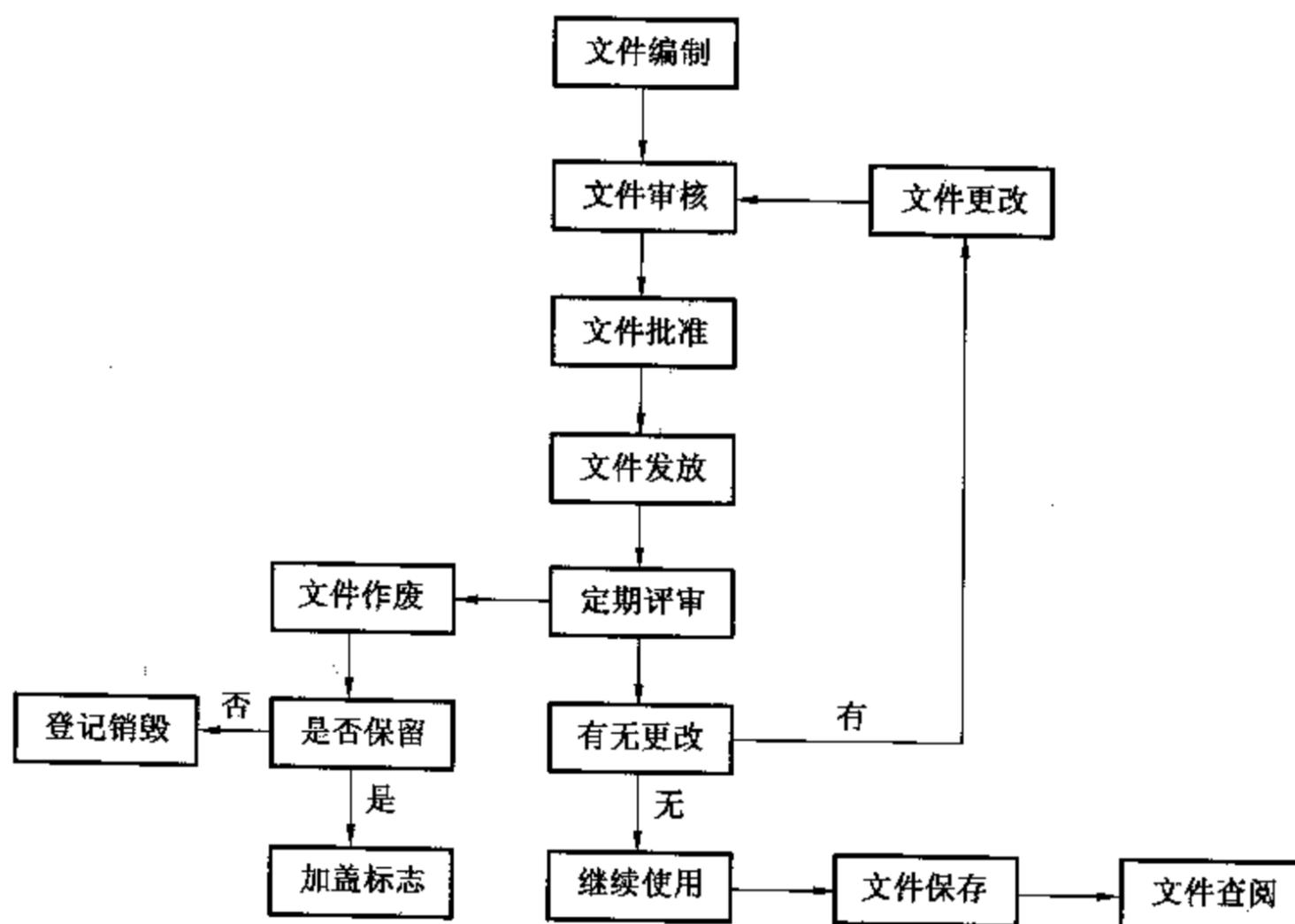


图 6-1 文件控制流程图示意图

### 3. 电子文件的管理

电子文件包括：质量手册、程序文件、作业指导书及质量记录的电子版本，技术文件、技术标准、技术规范、技术资料等的电子版本。电子文件由于具有“非唯一性”的特点，即电子文件和文本文件往往同时存在，所以必须对两者同时控制，防止由于修订状态不同而形成不同的版本后发生混淆。文件经批准发布后，最新文件的电子文档应及时保存到文档管理员的专用电脑里。旧版本应从最新文件夹里删除。电子文件具有“不易签章”的特点，因此作为控制审批权利的签字盖章方法不适用于电子文件，必须用密码控制专用电脑软件或任命专人操作管理所批准的电脑软件。只有文档管理员或实验室主管有权更新电脑里的目录，有权增加、删除、更新包含在该目录里的任何信息。电子文件还有容易被病毒攻击破坏的特点。如果电子计算机染上病毒，将会出现文件丢失和数据严重失控的现象。为了控制和预防病毒造成的损害，必须采取防止病毒的隔离措施和定期保存和备份文件等措施。

## 七、文件的查阅

为了便于文件查阅，文档管理员应按照文件的内容进行分类编目后再进行归档。由于涉及到为客户保密和保护所有权的问题，文档管理员必须明确归档文件的可查阅范围，做好查阅登记工作，由经授权的负责人签字同意后才允许查阅。

## 八、实验室信息系统(LIS)保护的建议

检验结果和信息是实验室的产品，因计算机系统可以遭到各种方式的损坏或毁坏，因此

有必要制定政策以保护客户免受因资料丢失或改变而导致的伤害。

### 1. 程序手册

应有一套完整的计算机程序手册(可以是电子形式),以备所有授权的计算机用户使用。实验室主管或被指定的专门负责此项工作的人员对实验室的计算机程序手册定期进行复核、批准。有书面程序对火灾或硬件(软件)出现故障时,为保护数据和(或)计算机设备而需采取的措施进行规定。

### 2. 系统安全性

应对计算机程序进行充分保护,以防止有关的或非授权的用户对其进行更改或破坏。就计算机系统的授权使用制定严格的政策,该政策应明确授权哪些人可以接触客户资料,哪些人可以输入客户结果、更改结果、更改账单或计算机程序。如果通过 LIS 可以接触到其他计算机系统的数据库,应制定适当的计算机安全措施,防止未经授权的人员通过 LIS 接触这些数据。LIS 不应危害其他系统内数据的安全。

### 3. 系统维护

应对停机维护的时间进行合理安排以尽量减小对客户的影响。应有文件程序对全部或部分系统关机或再启动的操作进行规定,以保证数据的完整性和实验室服务的连续性,以及再次启动后系统能正常运行。应有书面程序对其他系统的停运进行规定,以确保客户资料完整性。应有程序可以验证其他系统是否恢复进行,并对数据文件进行升级更新。应对计算机的所有非程序性停机、系统的降级以及其他的计算机问题进行记录,包括故障原因和所采取的纠正措施。应制定书面的突发事件处理方案,以解决在计算机系统发生故障时引起的服务问题,保证及时有效地报告客户结果。应保留常规维护记录,以备操作人员追踪在计算机系统进行的任何工作。

## 第二节 记录的管理和控制

记录(record)是阐明所取得的结果或提供所完成活动的证据文件。记录控制程序是指实验室建立的用于识别、收集、索引、存取、存档、存放、维护和清理质量记录和技术记录的程序。其目的在于保证记录完整、真实、安全,并具有良好的可追溯性,确保对本实验室质量管理体系运行提供客观证据。

### 一、记录的分类

记录可分为质量记录和技术记录两类。质量记录包括:内部审核记录、管理评审记录、客户投诉处理记录、合同评审记录、纠正和预防措施记录、上岗考核记录、合格供应商评审记录、采购验收记录、分包方评审记录等。技术记录主要包括:检测申请单、检验记录和检测报告、采样单、仪器、设备和校准记录、样品交接保存记录、水平测试和比对实验记录、检测结果有效性控制的记录等。

实验室应制定相关的政策,明确规定与质量管理体系相关的各种记录和保存时间,应该

保存检验结果。保存期限应根据检验的性质或每个记录的特殊情况而定。

这些记录包括,但不局限于:

- 1) 检验申请表;
- 2) 检验结果和报告;
- 3) 仪器的打印结果;
- 4) 检验程序;
- 5) 实验室工作记录簿(记录单);
- 6) 查阅记录;
- 7) 校准函数和换算因子;
- 8) 质量控制记录;
- 9) 投诉及所采取的措施;
- 10) 内部及外部审核记录;
- 11) 外部质量评审记录(实验室间的比对);
- 12) 质量改进记录;
- 13) 仪器维护记录,包括内部及外部的校准记录。

## 二、记录的作用

记录是检测结果满足质量要求和质量管理体系有效运行的证据,记录也是质量活动可追溯的依据,它还能纠正和预防措施及质量改进提供重要信息。

## 三、记录的编制要求

### 1. 记录要与程序文件、作业指导书和标准、规范要求相适应

在编制程序文件或作业指导书时,应对所需要的记录作出具体要求,明确记录的编号、内容和形式,设计相应的表格。这些记录表格可以作为程序文件或作业指导书的附件,随同文件实施。有关检测方法标准或技术规范实施所用的记录表格,则由使用人员设计,经检测部门负责人审批后使用。

### 2. 记录内容完整而不重复

记录要以足够的信息证实质量活动已经按照有关文件的要求完成,证实质量管理体系运行有效。每份记录要做到时间、地点、参与人员、发生的事件(活动事实:样品、项目、方法标准、仪器、设备、材料、工具、环境条件、数据、计算结果等)完整。但记录也不是多多益善,在信息足够的前提下,记录应尽量简化,做到不遗漏,不重复。

### 3. 记录的形式要表格化,格式要分类统一

原始记录应尽可能表格化(实例见表 6-1、表 6-2 和表 6-3)。将需要记录的信息编制成表格,供记录人员填写或选择勾画,既可避免遗漏,又方便记录人员填写。记录表格要分类统一,便于分类整理归档。每一类记录都应该有其唯一编号,文档管理员对所有的记录应编制一份标明有:名称、编号、生效日期、使用者、版本号、保存期限等内容的《质量记录一览表》,用于查询最新质量记录,确保相关部门使用的质量记录是最新版本。

表 6-1 微生物定性检测原始记录

委托编号		委托单位		报检号	
样品名称		样品状态		送样日期	
检测项目	检测依据	样品编号及检测结果			
	培养基、血清等				
前增菌		<input type="checkbox"/> G <input type="checkbox"/> NG			
二次增菌		<input type="checkbox"/> G <input type="checkbox"/> NG			
平板分离					
鉴定和确认					
结 论		<input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> ND			
备 注					
注：G：生长；NG：不生长；D：检出；ND：未检出。					

检测人：

审核人：

日期：

表 6-2 微生物定量检测原始记录

委托编号		委托单位		报检号														
样品名称		样品状态		送样日期														
项目	方法	样品 编号	特 征 分 析						结果									
<input type="checkbox"/> 细菌总数			$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	空白									
<input type="checkbox"/> 大肠菌群 A	样品 编号		◇LST ◇3M <sup>TM</sup>			◇BGLB <sup>A</sup> ◇EC <sup>B</sup>			EMB			i	MR	VP	C	镜检	结果	
			$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$							
<input type="checkbox"/> 大肠杆菌 B	样品 编号		◇TSB ◇3M <sup>TM</sup>			B-Parker			镜 检			血浆凝固酶试验			结果			
			$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$				$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$				
<input type="checkbox"/>	样品 编号		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$									结果	
<input type="checkbox"/>	样品 编号		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$									结果	

检测人:

审核人:

日期:

表 6-3 食品微生物检验质控记录

质控对象		检测依据 (标准)	质控方式					
			阳性对照		阳性对照		阴性对照	其他方式
时 间	程序	项目						
	前增菌							
	二次增菌							
	筛选、 分离 鉴定 和确 认							
结 论								
备 注								

质控人：

审核人：

日期：

#### 四、记录的填写

记录的填写应使用黑色墨水笔,要求字迹清晰,内容真实完整、表述准确、签署齐全、标志清楚,便于识别和追溯。观察结果、数据和计算应在工作同时予以记录,并有明确标志,使其可以识别为属于某项具体的检测任务,不得提前填写数据,也不能事后补记。每项检测记录和校准记录应包含足够的信息,以便在识别不确定度的影响因素,并使检测工作在尽可能最接近原来条件的情况下能够复现。记录内容填写有误时,不得涂改或覆盖,只能在错误处划一杠,并将正确值写在其旁边,在修改处签上修改人的姓名或盖章。

#### 五、记录的归档保管

记录应分类、整理、归档,建立目录台帐,在文件夹内使用标签等形式区分,使之易于检

重。记录保管场所应环境适宜、防潮、防火、防虫蛀鼠害、防遗失等,应使用容易进行检索查阅的文件柜、书架、文件夹。若使用有劣化可能的感热纸,应复印后再保管。当记录采用电子媒体形式记录时,要有适当的备份,以防损坏或丢失。

## 六、记录的查阅和保密

文档管理员应建立书面的记录借阅登记记录,内部人员需要借阅记录档案时,需向文档管理员提出借阅申请,借阅需确保记录档案完整、整洁并按时归还。外部人员借阅时,须经实验室主管批准,且仅可就地阅览,不得带离现场。

所有工作人员应保护检测记录、程序文件执行记录中的客户信息,为满足客户查询需要调用记录时,须经实验室主管批准,在保证其他客户机密的前提下进行。

## 七、记录的销毁

所有的记录根据其不同情况,由质量负责人规定其保存期限。已超过保存期限的记录,由文档管理员向质量负责人提出销毁记录申请,经质量负责人审批后统一销毁。

## 第七章 实验室的生物安全管理

自从发生“非典”事件以后,实验室的生物安全越来越受到重视。我国政府部门颁布并实施了相关法规、管理条例和标准,如 GB 50346—2004《生物安全实验室建筑技术规范》、GB 19489—2004《实验室 生物安全通用要求》、WS 233—2002《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和国务院 2004 年第 424 号令《病原微生物实验室生物安全管理条例》等,这些标准和条例成为微生物实验室生物安全管理工作的有力保障和依据。

### 第一节 实验室生物安全及生物安全实验室

#### 一、有关实验室生物安全的概念

实验室生物安全(laboratory biosafety)是指用以防止发生病原体或毒素无意中暴露及意外释放的防护原则、技术以及实践。

实验室生物安全防护(biosafety protection for laboratories)是指当实验室工作人员所处理的实验对象含有致病性微生物及其毒素时,通过在实验室设计建造、使用个体防护设置、严格遵守标准化工作及操作程序等方面采取综合措施,以确保实验室工作人员不受实验对象侵染,确保周围环境不受其污染。

实验室生物安全保障(laboratory biosecurity)是指单位和个人为防止病原体或毒素丢失、被窃、滥用、转移或有意释放而采取的安全措施。

生物安全实验室(biosafety laboratory)则是指通过规范的实验室设计建造、实验室设备的配置、个人防护装备的使用,通过严格遵守标准化的工作操作程序和管理规程等综合措施,确保操作生物危险因子的工作人员不受实验对象的伤害,确保周围环境不受其污染的实验室。

#### 二、微生物危害程度的评估及微生物危害等级

微生物危害度评估(hazard assessment for microbes)是指对实验微生物及其毒素(生物因子)可能给人或环境带来的危害所进行的评估,它是实验室生物安全工作的核心,实验室所采取的所有生物安全措施及管理工作都要依据其所要处理的微生物危害度来确定。当实验室活动涉及传染或潜在传染性生物因子时,应先进行危害程度评估。根据评估获得的信息,确定拟开展工作所需的生物安全级别,确定实验室是否达到所需的生物安全级别,并选择合适的个体防护装备,采取相应的安全措施及标准操作程序(standard operating procedure, SOP),以确保在安全的水平下开展工作。

目前国际上流行把各类微生物实验室所处理的生物因子(微生物和毒素)根据其危害程度分为四级。我国国家标准 GB 19489—2004《实验室 生物安全通用要求》中也将其分为

：级见表 7-1),即危害等级 I、II、III、IV。其中 I 级危害程度最小,IV 级危害程度最大。

表 7-1 感染性微生物的危害程度等级分类

危害等级	特 征
危害等级 I (低个体危害,低群体危害)	不会导致健康工作者和动物致病的细菌、真菌、病毒和寄生虫等生物因子。
危害等级 II (中等个体危害,有限群体危害)	能引起人或动物发病,但一般情况下对健康工作者、群体、家畜或环境不会引起严重危害的病原体。实验室感染不导致严重疾病,具备有效治疗和预防措施,并且传播风险有限。
危害等级 III (高个体危害,低群体危害)	能引起人类或动物严重疾病,或造成严重经济损失,但通常不能因偶然接触而在个体间传播,或能用抗生素、抗寄生虫药治疗的病原体。
危害等级 IV (高个体危害,高群体危害)	能引起人类或动物非常严重的疾病,一般不能治愈,容易直接、间接或因偶然接触在人与人,或动物与人,或人与动物,或动物与动物间传播的病原体。

为了规范病原微生物实验活动,减少实验室对所操作微生物进行的危害度评估工作,许多国家都制定了各自的病原微生物名录。我国卫生部根据《病原微生物实验室生物安全管理条例》的规定,于 2006 年 1 月 11 日制定和发布了我国《人间传染的病原微生物名录》,把 160 种病毒、6 种朊病毒、155 种细菌、放线菌、衣原体、支原体、立克次氏体、螺旋体和 59 种真菌根据其个体和群体的危害程度分为四类,第一类危害程度最高,第四类危害程度最低,并规定了相应病原微生物实验活动所需的生物安全实验室级别。我国农业部根据《病原微生物实验室生物安全管理条例》的规定,于 2005 年 5 月 13 日制定和发布了我国《动物病原微生物分类名录》,也是把动物病原微生物按危害程度分为四类。

### 三、生物安全实验室的分级

操作不同危害等级的微生物,需要具备相应的实验室设施、设备及实验操作与技术。这些不同水平的实验室设施、安全设备以及实验操作和技术就构成了实验室不同等级的生物安全水平(biosafety level,BSL)。GB 19489--2004《实验室 生物安全通用要求》将实验室生物安全水平分为 4 个级别,1 级防护水平最低,4 级防护水平最高,分别以 BSL-1、BSL-2、BSL-3、BSL-4 表示。

WS 233—2002《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》规定,在二级以上的生物安全防护实验室的入口明显位置处必须贴有生物危险标志,并标明级别。同时所有盛装传染性物质的容器表面明显位置处也必须贴有生物危险标志,并按所在生物安全防护实验室的级别标明相同的级别。国际上通用的生物危险标志的颜色为黑色,背景为黄色。

### 四、食品微生物实验室操作对象危害等级

在食品微生物实验室主要进行以下致病菌的检测:蜡样芽胞杆菌、空肠弯曲菌、唾液弯曲菌、胎儿弯曲菌、大肠弯曲菌、肉毒梭菌、产气荚膜梭菌、肠杆菌属、致病性大肠埃希菌(包

括大肠杆菌 O157)、绵羊李斯特氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、亚利桑那沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、火鸡沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、志贺菌氏属、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、链球菌属,猪链球菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、副溶血性弧菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、黄曲霉、烟曲霉、赭曲霉、串珠镰刀菌、雪腐镰刀菌、黄绿青霉、桔青霉、岛青霉等。这些细菌和真菌在《人间传染的病原微生物名录》中,均被列为第三类病原微生物。按照《人间传染的病原微生物名录》规定,对这些菌的大量活菌操作(指病原菌制剂的体积或浓度,大大超过了常规检测所需要的量,如在大规模发酵、抗原和疫苗生产、病原菌进一步鉴定以及科研活动中,病原菌增殖和浓缩所需要处理的剂量)、易产生气溶胶的实验操作(如病原菌离心、冻干等)以及样本检测(包括样本的病原菌分离纯化、药物敏感性实验、生化鉴定、免疫学实验、PCR 核酸提取、涂片、显微观察等初步检测活动),均应在 BSL-2 实验室进行。

此外,在食品微生物实验室的检测工作中,有时也涉及到《人间传染的病原微生物名录》规定的第二类病原微生物的检测,如炭疽芽孢杆菌、布鲁氏菌属、牛型分枝杆菌、结核分枝杆菌、霍乱弧菌、鼠疫耶尔森氏菌等检测,对这些微生物的检测操作,需要在 BSL-3 实验室中进行。

## 第二节 生物安全实验室安全设备

过去,在微生物检验工作中往往只强调了无菌及净化级别的环境要求,却忽略了实验室生物安全方面的需要,如很多实验室不具备 BSL-2 实验室的防护条件,很多致病菌的检验操作都是在净化室和(或)无菌室和(或)超净台内进行的,如此作业难以保证实验室工作人员不受实验对象的感染和周围环境不受其污染。对照 GB/T 19489—2004《实验室 生物安全通用要求》的规定,食品微生物实验室(BSL-2)必须配备足量的生物安全柜、辅助安全设备、个人防护装备等一级防护物品。

另外,实验室一些常规设备的使用是否正确也直接关系到实验室的生物安全,所以在此也将这些设备一并叙述。

### 一、生物安全柜

生物安全柜(biological safety cabinet, BSC)是为操作原代培养物、菌毒株及诊断性标本等具有感染性的实验材料时,用来保护操作者本人、实验室环境以及实验材料,使其避免暴露于上述操作过程中可能产生的感染性气溶胶和溅出物而设计的。当操作液体或半流体,例如摇动、倾注、搅拌,或将液体滴加到固体表面上或另一种液体中时,均有可能产生气溶胶。在对琼脂平板划线接种、用移液管接种细胞培养瓶、采用多道加样器将感染性试剂的混悬液转移到微量培养板中、对感染性物质进行匀浆及涡旋振荡、对感染性液体进行离心以及进行动物操作时,这些操作都可能产生感染性气溶胶。由于肉眼无法看到直径小于  $5\ \mu\text{m}$  的气溶胶以及直径为  $5\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$  的微小液滴,因此实验室工作人员通常意识不到有这样大小的颗粒在生成,并可能吸入或交叉污染工作台面的其他材料。正确使用生物安全柜可

以有效减少由于气溶胶暴露所造成的实验室感染以及培养物交叉污染。生物安全柜同时也能保护环境。

目前国际上通常将生物安全柜分成Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ个不同等级。Ⅰ级生物安全柜能够保护操作人员和周围环境,但不能切实保护操作对象(样本),因此Ⅰ级生物安全柜不能用于食品微生物检验的无菌操作。Ⅱ级生物安全柜在设计上不但能提供个体防护,而且能保护工作台面的物品不受房间空气的污染,其有四种不同的类型(A1型、A2型、B1型和B2型),可用来操作危险度Ⅱ级和Ⅲ级的感染性物质。Ⅲ级生物安全柜则可提供更高级别的生物安全保护。

生物安全柜的使用要点是:

- 1) 生物安全柜使用者应熟知生物安全柜的使用方法和局限性。
- 2) 生物安全柜运行正常时才能使用。
- 3) 生物安全柜在使用中不能打开玻璃观察挡板。在使用生物安全柜时应穿着个体防护服。
- 4) 生物安全柜内应尽量少放置器材或标本,不能影响后部压力排风系统的气流循环。Ⅱ级生物安全柜前面的进气格栅不能被纸、仪器、设备或其他物品阻挡。所有物品应尽可能地放在工作台后部靠近工作台后缘的位置,并使其在操作中不会阻挡后部格栅。可产生气溶胶的设备(例如混匀器、离心机等)应靠近生物安全柜的后部放置。像装有生物危害性的废弃物袋、盛放废弃移液管的盘子以及吸滤瓶等体积较大的物品,应该放在生物安全柜内的某一侧。
- 5) 放入生物安全柜内的物品应采用70%酒精来清除表面污染。可以在消毒剂浸湿的毛巾上进行实验,以吸收可能溅出的液滴。
- 6) 耐高压灭菌的生物危害性废弃物袋以及移液管盛放盘不应放在生物安全柜的外面,否则在使用这些物品时双臂就必须频繁进出生物安全柜,这样会干扰生物安全柜空气屏障的完整性,从而影响对人员和物品的防护。
- 7) 在工作台面上的实验操作应该按照从清洁区到污染区的方向进行。
- 8) 在生物安全柜内所形成的几乎没有微生物的环境中,应避免使用煤气、酒精灯等明火,使用明火会对气流产生影响,并且在处理挥发性物品和易燃物品时,也易造成危险。允许使用电热式接种环灭菌器,但最好使用一次性无菌接种环。
- 9) 所有工作必须在工作台面的中后部进行,并能够通过玻璃观察挡板看到。
- 10) 尽量减少操作者身后的人员活动。
- 11) 操作者在移动双臂进出生物安全柜时,需要小心维持前面开口处气流的完整性,双臂应该垂直地缓慢进出前面的开口。手和双臂伸入到生物安全柜中等待大约1 min,以使生物安全柜调整完毕并且让里面的空气“扫过”手和双臂的表面以后,才可以开始对物品进行处理。要在开始实验之前将所有必需的物品置于生物安全柜内,以尽可能减少双臂进出前面开口的次数。
- 12) 在实验结束时,包括仪器、设备、剩余培养基在内的生物安全柜里内所有物品都应清除表面污染,并移出生物安全柜。在每次使用前后,工作台面和内壁要用消毒剂擦拭消

毒。可用漂白剂溶液或 70% 酒精进行消毒,在使用如漂白剂等腐蚀性消毒剂后,还必须用无菌水再次进行擦拭。

13) 在生物安全柜内的工作开始前和结束后,生物安全柜的风机应至少运行 5 min 来完成“净化”的过程。如果使用频率很高时,推荐将生物安全柜一直维持运行状态。

14) 在生物安全柜内操作时,不能进行文字工作。

15) 一旦在生物安全柜中发生有生物学危害的物品溢出时,应在生物安全柜处于工作状态下立即进行清理。要使用有效的消毒剂,并在处理过程中尽可能减少气溶胶的生成。所有接触溢出物品的材料都要进行消毒和(或)高压灭菌。

16) 生物安全柜的所有维修工作应该由有资质的专业人员进行。在生物安全柜操作中出现的任何故障都应该报告,并应在再次使用之前进行维修。在生物安全柜安装时以及使用后,每年应由有资质的专业人员对生物安全柜防护效果(包括对生物安全柜的完整性、HEPA 过滤器的泄漏、向下气流的速度、正面气流的速度、负压(换气次数)、气流的烟雾模式以及警报和互锁系统)进行测试。

17) 生物安全柜在移动以及更换过滤器之前,必须清除污染。最常用的方法是采用甲醛蒸气熏蒸。

## 二、移液器

在检验工作中,吸取操作应使用移液器,严禁用口吸取液体。最常见的移液操作危害都是用口吸取液体造成的。当液体从移液管掉落到工作台面上,或交替地吸或吹培养物,以及从移液管中将最后一滴液体吹出来的时候,能够产生气溶胶。感染性物质不能使用移液管反复吹吸混合,不能向含有感染性物质的溶液中吹入气体。在生物安全柜中进行上述操作可以防止吸入在吸液时不可避免产生的气溶胶。刻度对应(mark-to-mark)移液管不需要排出最后一滴液体,因此最好使用这种移液管。

选择的移液器应易于灭菌和清洁。在操作微生物和细胞培养物时,应使用塞紧(防气溶胶)的吸头。末端破碎或有裂口的移液管会影响与移液辅助器底座的密封并因此产生危害,故不应使用这样的移液管。

污染的移液管应该完全浸泡在盛有适当消毒液的防碎容器中。移液管应当在消毒剂中浸泡适当时间后再进行处理。盛放废弃移液管的容器不能放在外面,应当放在生物安全柜内。有固定皮下注射针头的注射器不能用于移液。为了避免感染性物质从移液管中滴出而扩散,应当在工作台面放置一块浸有消毒液的布或吸有消毒液的纸,使用后将其按感染性废弃物处理。

## 三、均质器、摇床和超声处理器

有些均质器的密封不严,可释放气溶胶,因此应选择使用专为实验室设计的、结构上可以最大限度地减少或避免气溶胶释放的设备,不能使用家用(厨房)匀浆器。盖子、杯子或瓶子应当保持正常状态,没有裂缝或变形。盖子应能封盖严密,衬垫也应处于正常状态。另外,可使用不同规格的拍击式均质器。

当用均质器处理危险度Ⅲ级的微生物时,通常应该在生物安全柜中进行装样及重新开启。超声处理器可能释放气溶胶,因此应该在生物安全柜中进行操作,或者在使用期间用护罩盖住,在使用后应该清除护罩和超声处理器的外部污染。

在使用均质器、摇床和超声处理器时,容器内会产生压力,含有感染性物质的气溶胶就可能从盖子和容器间隙逸出,应该用一个结实透明的塑料箱覆盖设备,并在用完后消毒。可能的话,这些仪器可在生物安全柜内覆盖塑料罩后进行操作。由于玻璃可能破碎而释放感染性物质并伤害操作者,建议使用塑料容器。操作结束后,应在生物安全柜内打开容器。

#### 四、离心机

离心机良好的机械性能是保障生物安全的前提条件。当使用离心机离心感染性材料时,应按下述方法进行操作:

- 1) 按照操作手册来操作离心机。
- 2) 离心机放置的高度应当使矮个子工作人员也能够看到离心机内部,以正确放置十字轴和离心桶。
- 3) 离心管和盛放离心标本的容器应当由厚壁玻璃制成,或最好为塑料制品,并且在使用前应检查是否破损。
- 4) 用于离心的试管和标本容器应当始终牢固盖紧(最好使用螺旋盖)。
- 5) 离心桶的装载、平衡、密封和打开必须在生物安全柜内进行。
- 6) 离心桶和十字轴应按质量配对,并在装载离心管后正确平衡。
- 7) 操作手册中应给出液面距离心管管口需要留出的空间大小。
- 8) 空离心桶应用蒸馏水或70%乙醇来平衡。
- 9) 对于危险度Ⅲ级和Ⅳ级的微生物,必须使用可封口的离心桶(安全杯)。
- 10) 当使用固定角离心转子时,必须小心,不能将离心管装得过满,否则会导致漏液。
- 11) 每次使用后应检查离心机内转子部位的腔壁是否被污染或弄脏。如发现其被污染,应重新评估离心操作规范。
- 12) 每次使用后应检查离心转子和离心桶是否有腐蚀或细微裂痕。
- 13) 每次使用后要清除离心桶、转子和离心机腔的污染。
- 14) 使用后应当将离心桶倒置存放以使平衡液流干。
- 15) 离心感染性实验材料时,可能飘溢出可在空气中传播的感染性颗粒。如果将离心机放置在传统的前开式Ⅰ级或Ⅱ级生物安全柜内,这些粒子由于运动过快而不能被生物安全柜内的气流截留。而在Ⅲ级生物安全柜内封闭离心时,可以防止生成的气溶胶广泛扩散。但是,良好的离心操作技术和牢固加盖的离心管可以提供足够的保护,以防止感染性气溶胶粒子的产生和扩散。

#### 五、一次性接种环(针)

一次性接种环(针)的优点是无须灭菌,因此可以在生物安全柜中使用。一次性接种环(针)使用后应置于消毒剂中,并按污染性废弃物进行处理。

## 六、电热式接种环灭菌器

电热式接种环灭菌器配有硼硅酸玻璃或陶瓷保护罩,可以减少接种环灭菌时感染性物质的飞溅和散布,但电热式接种环灭菌器会扰乱气流,应置于生物安全柜中靠近工作表面后缘的地方。

## 七、组织研磨器

拿玻璃研磨器时应戴手套并用吸收性材料(如脱脂纱布)包住。塑料研磨器更加安全。操作和打开组织研磨器时应当在生物安全柜内进行。

## 八、冰箱与冰柜

冰箱、低温冰箱和干冰柜应当定期除霜和清洁,应清理出所有在储存过程中破碎的安瓿和试管等物品。清理时应戴厚橡胶手套并进行面部防护,清理后要对内表面进行消毒。

储存在冰箱内的所有容器应当清楚地标明内装物品名称、储存日期和储存者的姓名。未标明的或废旧物品应当高压灭菌后丢弃。应当保存一份冻存物品的清单。

## 九、个人防护物品

个人防护物品是减少操作人员暴露于气溶胶、喷溅物以及意外接种等危险的一个屏障。

### 1. 实验服、隔离衣、连体衣

在实验室中工作时,必须穿着实验服,在离开实验室前,要脱下实验服并洗手。长袖、背面开口的隔离衣和连体衣的防护效果较好,更适用于微生物检验实验室。

污染的防护服应置于适当标记的防漏袋中。衣物洗烫工作应在实验室机构内或就近进行。实验服、隔离衣、连体衣或围裙不得被穿离实验室区域。

### 2. 护目镜、安全眼镜

为避免因实验物品飞溅对眼睛和面部造成的危害,应根据所进行的操作来选择相应的护目装备。护目镜应该用在常规视力矫正眼镜或隐形眼镜的外面来对飞溅和撞击提供保护。护目镜、安全眼镜或面罩均不得带离实验室区域。

### 3. 手套

当进行实验室操作时,手可能被污染,也容易受到“锐器”伤害。在进行实验室一般性工作或在处理细菌培养物、血液和体液时,应使用一次性乳胶、乙烯树脂或聚脲类材料的手套。如果要重复使用手套,必须经过正确冲洗、去污、清洁并消毒。如果手套撕破、损坏或怀疑其内部受到污染,应更换。手套不得被带离实验室区域。

## 第三节 微生物实验室安全措施

### 一、工作人员的资格和培训

1. 实验室的工作人员必须是受过专业教育的技术人员。在独立进行工作前,还需在中

高级实验技术人员的指导下进行上岗培训,达到合格标准后,方可开始工作。

2. 实验室的工作人员必须被告知实验室工作的潜在危险并接受实验室安全教育。
3. 实验室的工作人员必须遵守实验室的所有制度、规定和操作规程。
4. 三级和四级生物安全实验室的工作人员,在开始工作前必须留本底血清进行有关检测,以后定期复检。如有疫苗必须进行免疫注射。

## 二、感染性物质的安全操作要点

### 1. 避免感染性物质的扩散

(1) 为了避免被接种物洒落,微生物接种环的直径应为 3 mm,并完全封闭,柄的长度应小于 6 cm,以减小抖动。

(2) 使用电热式接种环灭菌器消毒接种环,能够避免在煤气灯或酒精灯的明火上加热所引起的感染性物质爆溅。最好使用不需要再进行消毒的一次性接种环(针)。

(3) 准备高压灭菌和(或)将被处理的废弃标本、培养物应当放置在防漏的容器内(如实验室废弃物袋)。

(4) 在每一阶段工作结束后,必须采用适当的消毒剂清除工作区的污染。

### 2. 避免感染性物质的食入以及与皮肤和眼睛的接触

(1) 微生物操作中释放的较大粒子和液滴(直径大于 5  $\mu\text{m}$ )会迅速沉降到工作台面和操作者的手上。实验室人员在操作时应戴一次性手套,并避免触摸口、眼及面部。

(2) 不能在实验室内饮食和抽烟。

(3) 不应在实验室化妆。

(4) 在所有可能产生潜在感染性物质喷溅的操作过程中,操作人员应将面部、口和眼遮住或采取其他防护措施。

### 3. 避免感染性物质的感染

(1) 通过认真练习和仔细操作,可以避免破损玻璃器皿的刺伤所引起的感染。应尽可能用塑料制品代替玻璃制品。

(2) 锐器损伤(如通过皮下注射针头、巴斯德玻璃移液管以及破碎的玻璃)可能引起意外注入感染性物质。

(3) 减少使用注射器和针头,以减少针刺损伤(可用一些简单的工具来打开瓶塞,然后使用移液管取样而不用注射器和针头),在必须使用注射器和针头时,采用锐器安全装置。

(4) 不要重新给用过的注射器针头戴护套。一次性物品应丢弃在防(耐)穿透的带盖容器中。

(5) 可用一次性塑料移液管代替玻璃移液管。

### 4. 血清的分离

(1) 只有经过严格培训的人员才能进行这项工作。

(2) 操作时应戴手套以及眼睛和黏膜的保护装置。

(3) 规范的实验操作技术可以避免或尽量减少喷溅和气溶胶的产生。应当小心吸取血液和血清,而不能倾倒。严禁用口吸液。

(4) 移液管使用后应完全浸入适当的消毒液中。移液管应在消毒液中浸泡适当的时间,经高压灭菌后再丢弃或灭菌后重复使用。

(5) 带有血凝块等的废弃标本管,在加盖后应当放在适当的防漏容器内高压灭菌和(或)焚烧。

(6) 应备有适当的消毒剂来清洗喷溅和溢出的标本。

### 5. 装有冻干感染性物质安瓿的开启

应该小心打开装有冻干物的安瓿,因为其内部可能处于负压,突然冲入的空气可能使一些物质扩散进入空气。应该在生物安全柜内打开安瓿,建议按下列步骤打开安瓿:

(1) 首先清除安瓿外表面的污染。

(2) 如果管内有棉花或纤维塞,可以在管上靠近棉花或纤维塞的中部锉一痕迹。

(3) 用一团酒精浸泡的棉花将安瓿包起来以保护双手,然后手持安瓿从标记的锉痕处打开。

(4) 将顶部小心移去并按污染材料处理。

(5) 如果塞子仍然在安瓿上,用消毒镊子除去。

(6) 缓慢向安瓿中加入液体来重新悬浮冻干物,避免出现泡沫。

### 6. 装有感染性物质安瓿的储存

装有感染性物质的安瓿不能浸入液氮中,因为这样会造成有裂痕或密封不严的安瓿在取出时破碎或爆炸。如果需要低温保存,安瓿应当储存在液氮上面的气相中。此外,感染性物质应储存在低温冰箱或干冰中。当从冷藏处取出安瓿时,实验室工作人员应当进行眼睛和手的防护。以这种方式储存的安瓿在取出时应对外表面进行消毒。

### 7. 特定条件下清除污染的操作规程

#### (1) 清除局部环境的污染

需要联合应用液体和气体消毒剂来清除实验室空间、用具和设备的污染。

清除表面污染时可以使用次氯酸钠(NaOCl)溶液。含有1%有效氯的溶液适于普通的环境卫生及设备消毒,但是当处理高危环境时,建议使用高浓度次氯酸钠溶液(5 g/L)。用于清除环境污染时,含有3%过氧化氢的溶液也可以作为次氯酸钠的代用品。

可以通过加热多聚甲醛或煮沸福尔马林所产生的甲醛蒸气熏蒸来清除房间和仪器的污染。这是一项需要由专门培训的专业人员来进行的、非常危险的操作。产生甲醛蒸气前,房间的所有开口(如门窗等)都应用密封带或类似物加以密封。熏蒸应当在室温不低于21℃且相对湿度70%的条件下进行。清除污染时气体需要与物体表面至少接触8 h。熏蒸后,该区域必须彻底通风后才能允许人员进入。在通风之前需要进入房间时,必须戴适当的防毒面具。可以采用气态的碳酸氢铵来中和甲醛。

采用过氧化氢溶液对小空间进行气雾熏蒸同样有效,但需要专门的蒸气发生设备。

#### (2) 生物安全柜甲醛熏蒸消毒推荐操作规程

在对生物安全柜进行维护、更换过滤器以及性能测试时,如果需要接触生物安全柜的污染部分,必须使用适当的消毒剂清除所有内部工作表面和暴露内表面的污染。此外,当生物

安全柜已经操作过指定为二级生物安全水平的危害因子时,在进行验证测试以前可能需要对整个生物安全柜进行气体消毒,而当生物安全柜已经操作过指定为三级生物安全水平的危害因子时,则推荐对整个生物安全柜进行气体消毒。在大多数必须进行气体消毒的情况下,可以按下面的描述利用多聚甲醛进行消毒。此外,也可按照生产商的操作说明,采用自动甲醛气体消毒(中和)来代替下面的方法。

1) 将长、宽、高相乘来计算生物安全柜的体积。将生物安全柜的总体积乘以  $11 \text{ g/m}^3$  来确定所需多聚甲醛的质量。计算以氨气的形式来中和甲醛气体所需的碳酸氢铵 ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 或其他代替品的理论当量。按计算量的 110% 称取碳酸氢铵,确保中和全部的甲醛。

2) 如果生物安全柜安装了排风管道,必须确保管道的密闭性。这可以通过位于管道末端或生物安全柜附近的风阀(如果安装的话)来实现。如果排风管道超过 3 m 长,可能需要额外的多聚甲醛来补偿增加的体积。如果生物安全柜气流外排到循环的建筑排风系统,则必须切断生物安全柜与建筑系统的连接,并且密封(可以使用塑料膜或塑料带)。

3) 如果生物安全柜的气流排到房间内,应用塑料盖将排风口盖住并完全封闭;如果能够紧急排出甲醛,以及在清除污染和中和后除去甲醛,可以在生物安全柜旁预先放置一根软管。软管必须与化学通风橱或其他适于排放有毒气体的排风装置相连。

4) 将多聚甲醛加热设备置于工作台面上,多聚甲醛均匀分布在加热设备的加热表面上;在工作台面上还应另外放置两个加热装置、一烧杯水以及温度计和湿度计,其中一个加热装置用于盛放中和试剂。中和试剂(碳酸氢铵或相当的代替品)在作用前应与生物安全柜中的空气隔绝,具体可以采用下述方法:用带有与塑料袋连成一体的手套的塑料将生物安全柜密封。碳酸氢铵或相当的代替品置于生物安全柜内的密闭容器中。在中和阶段,清除污染的工作人员通过手套不用破坏密封膜就可以把手伸入生物安全柜内。从密封容器中移出碳酸氢铵或相当的代替品,均匀分布在加热设备的加热表面。启动加热设备,碳酸氢铵或相当的代替品受热后释放氨气。

5) 用适当塑料膜和塑料带封住工作区开口。关闭所有可能泄漏的地方(如电线出口、观察敞口周围、塑料膜与生物安全柜连接处等)。

6) 测定生物安全柜内的温度和湿度。应使温度不低于  $21^\circ\text{C}$ ,湿度介于 60%~85%。没有达到上述条件时,用加热板加热烧杯中的水,直达到所要求的温度和湿度;将加热装置的电线插到生物安全柜外面的插座上。

7) 在 25% 多聚甲醛解聚后,打开生物安全柜风扇 10 s~15 s。在 50%、75%、100% 的多聚甲醛解聚后,重复上述操作。如果生物安全柜风机不能运行,则需要运行另外的风机或风扇来使生物安全柜内的空气循环。

8) 切断电源插座上用于加热多聚甲醛的加热板和加热装置;让生物安全柜静置至少 6 h。

9) 启动装有碳酸氢铵的加热装置和生物安全柜风机,直到碳酸氢铵全部消失。在此过程中,同蒸发多聚甲醛一样,每当 25% 碳酸氢铵分解以后,即启动生物安全柜风机 10 s~15 s。如果生物安全柜风机不能运行,则需要用另外的风机或风扇来使生物安全柜内的空气循环,或者将中和时间至少延长 6 h。

10) 在打开生物安全柜的密封设施前,至少静止 1 h。如果准备有用于排出中和甲醛气体的软管,则把盖住生物安全柜排风口的塑料切开,并把软管密封连接到排风口上。如果软管能正常工作,则盖住生物安全柜前开口的塑料会被吸得凹进去。再在盖住生物安全柜前开口的塑料上开 1 个~2 个小孔(约 15 cm×15 cm),以便在排出甲醛气体的同时,新鲜空气可以从这些小孔进入生物安全柜。

### (3) 洗手(清除手部污染)

处理生物危害性材料时,只要可能必须戴合适的手套。但是这并不能代替实验室人员需要经常和彻底地洗手。处理完生物危害性材料和动物后以及离开实验室前均必须洗手。

大多数情况下,用普通的肥皂和水彻底地冲洗手就足以清除手部污染。但在高度危险的情况下,建议使用杀菌肥皂。手要完全抹上肥皂,搓洗至少 10 s,用干净水冲洗后再用干净的纸巾或毛巾擦干(如果有条件,可以使用暖风干手器)。推荐使用脚控或肘控的水龙头。

如果没有条件彻底洗手或洗手不方便,应该用 70%酒精擦手来清除双手的轻度污染。

## 8. 实验室废弃物的处理

见第三章的实验室内务管理中的相关内容。

## 第四节 微生物实验室安全应急程序

食品微生物实验室经常从事致病性微生物的检测,像这样从事具有感染性微生物工作的实验室,都应当制定针对所操作微生物危害的安全防护措施。同时实验室应有应急装备的供应,如防护服、消毒剂、化学和生物学的溢出处理盒,清除污染的器材物品。

### 一、刺伤、切割伤或擦伤

实验过程中被刺伤、切割伤或擦伤的工作人员应脱下防护服,立即用肥皂和大量流水冲洗双手和受伤部位,尽可能挤出损伤处的血液,用 70%乙醇或其他消毒剂消毒伤口,必要时进行医学处理。要记录受伤原因和相关的微生物,并应保留完整适当的医疗记录。

如果仅是发生皮肤污染,则可用水和肥皂冲洗污染部位,并用适当的消毒剂(如 70%乙醇或其他皮肤消毒剂)浸泡。如果发生粘膜污染,应用大量流水或生理盐水彻底冲洗污染部位。

### 二、潜在感染性物质的食入

对于食入潜在感染性物质的工作人员,应脱下其防护服并进行医学处理。要报告食入材料的鉴定和事故发生的细节,并保留完整适当的医疗记录。

### 三、潜在危害性气溶胶的释放(在生物安全柜以外)

所有人员必须立即撤离相关区域,任何暴露人员都应接受医学咨询。应当立即通知相关负责人。为了使气溶胶排出和使较大的粒子沉降,在一定时间内(例如 1 h 内)严禁人员入内。如果实验室没有中央通风系统,则应推迟进入实验室(例如 24 h)。应张贴“禁止进

人”的标志。过了相应时间后,在生物安全专家的指导下来清除污染。应穿戴适当的防护服和呼吸保护装备。

#### 四、容器破碎及感染性物质的溢出

应当立即用布或纸巾覆盖受感染性物质污染或受感染性物质溢洒的破碎物品。随后在上面倒上消毒剂,并使其作用 30 min,然后将布、纸巾以及破碎物品清理掉,玻璃碎片应用镊子清理。最后再用消毒剂擦拭污染区域。如果用簸箕清理破碎物,应当对它们进行高压灭菌或放在有效的消毒液内浸泡。用于清理的布、纸巾和抹布等应当放在盛放污染性废弃物的容器内。在所有这些操作过程中都应戴手套。

如果实验表格或其他打印或手写材料被污染,应将这些信息复制,并将原件置于盛放污染性废弃物的容器内。

#### 五、离心机内盛有潜在感染性物质的离心管发生破裂

##### 1. 未装可封闭离心桶

如果机器正在运行时发生破裂或怀疑发生破裂,应关闭机器电源,让机器密闭(例如 30 min)使气溶胶沉积。如果机器停止后发现破裂,应立即将盖子盖上,并密闭(例如 30 min)。发生这两种情况时都应通知生物安全负责人。

随后的所有操作都应戴结实的手套(如厚橡胶手套),必要时可在外面戴适当的一次性手套。当清理玻璃碎片时应当使用镊子,或用镊子夹着的棉花来进行。所有破碎的离心管、玻璃碎片、离心桶、十字轴和转子都应放在无腐蚀性的、已知对相关微生物具有杀灭活性的消毒剂内。未破损的带盖离心管应放在另一个有消毒剂的容器中,然后回收。离心机内腔应用适当浓度的消毒剂擦拭,并再次擦拭,然后用水冲洗并干燥。清理时所使用的全部材料都应按感染性废弃物处理。

##### 2. 装有可封闭的离心桶

所有密封离心桶的装卸都应在生物安全柜内进行。如果离心桶被怀疑在安全杯内发生破损,应该松开安全杯盖子并将离心桶高压灭菌。另一种方法是,安全杯可以采用化学消毒。

### 参 考 文 献

- [1] CNAL/AR13:2004 实验室生物安全认可程序规则(试行)
- [2] CNAL/AC30:2005 实验室生物安全认可准则
- [3] WS 233—2002 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则
- [4] 中华人民共和国国务院 2004 年第 424 号令 病原微生物实验室生物安全管理条例
- [5] GB 19489—2004 实验室 生物安全通用要求

- [6] GB 50346—2004 生物安全实验室建筑技术规范
- [7] 卫科教发[2006]15号 人间传染的病原微生物名录
- [8] 中华人民共和国农业部令第53号令 动物病原微生物分类名录
- [9] 魏昊,吕京,郑涛. 实验室生物安全基础知识[M]. 北京:中国计量出版社,2004.
- [10] 李劲松. 病原微生物实验室相关感染的原因及预防措施[J]. 中国预防医学杂志,2003,4(3):232-234.
- [11] RICHMOND JY, MCKINNEY RW. Primary containment for biohazards: selection, installation and use of biological safety cabinets[M]. 2nd ed. Washington, DC, United States Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 2000.
- [12] ROBERTSON JS. Laboratory biosafety manual. 3rd ed. WHO, 2004.

# 第八章 样 品

样品的采集和制备是食品微生物检验的重要组成部分。

用于检验的样品数量和状况具有重要意义,因为对整批食品的判定是以这批样品的检验结果为依据的。如果样品的采取、运送、保存或制备过程中操作不当,或者样品不具有代表性,就会使实验室的微生物检验结果毫无意义。这就对取样人员和制样人员提出了很高的专业要求,既要保证样品的代表性和一致性,又要保证整个微生物检验过程在无菌操作的条件下完成。

## 第一节 取 样

取样是指在一定质量或数量的产品中,取一个或多个代表性样品,用于微生物检验的过程。样品必须对取样的整个产品或批量具有代表性。样品的大小应能满足在需要进行重复分析的需要。样品到达实验室时的状况应能反映出取样时产品的真实情况。

### 一、取样准备工作

#### 1. 取样工具

取样工具要达到无菌的要求。对取样工具和一些试剂材料应提前准备、灭菌。如果使用不合适的采集工具,可能会破坏样品的完整性,甚至使样品毫无意义。

##### (1) 开启容器的工具

剪刀、刀子、开罐器、钳子及其他所需工具。这些工具用双层纸包裹灭菌(121℃, 15 min)后,通常可在干燥洁净的环境中保存2个月。超过2个月后要重新灭菌。

##### (2) 样品采集工具

灭菌的铲子、勺子、取样器、镊子、刀子、剪子、锯子、压舌板、木钻(电钻)、打孔器、金属试管和拭子等。

##### (3) 取样容器

取样容器可包括灭菌的广口瓶或细口瓶,预先灭菌的聚乙烯袋(瓶)、金属试管或其他类似的密封金属容器。取样时,最好不要使用玻璃容器,因为其在运输途中易破碎而造成取样失败。

##### (4) 温度计

通常使用-20℃~100℃,温度间隔为1℃即可满足要求。为避免取样时破碎,最好使用金属或电子温度计。取样前在70%~75%乙醇溶液或次氯酸钠(浓度不小于100 mg/L)中浸泡(不小于30 s)消毒,然后再插入食品中检测温度。

##### (5) 消毒剂

70%~75%乙醇溶液、中等浓度(100 mg/L)的次氯酸钠溶液或其他有类似效果的消毒剂。

### (6) 标记工具

能够记录足够信息的标签纸(不干胶标签纸)、油性或不可擦拭记号笔。

### (7) 样品运输工具

便携式冰箱或保温箱。运输工具的容量应足以放下所取的样品。使用保温箱或替代容器(如泡沫塑料箱)时,应将足够量的预先冷冻的冰袋放在容器的四周,以保证运输过程中容器内的温度符合要求。

### (8) 天平

最大量程为 2 000 g,感量为 0.1 g。

### (9) 搅拌器和混合器

配备带有灭菌罐的搅拌器或混合器,必要时使用。

### (10) 稀释液

灭菌的磷酸盐缓冲液、灭菌的 0.1% 蛋白胍水、灭菌的生理盐水、灭菌的 Ringer 氏溶液以及其他适当的稀释液(如 M 肉汤、LB 肉汤、D/E 中和肉汤、脑心浸液肉汤等)。

### (11) 防护用品

对于食品微生物的检测样品,取样时防护用品主要是用于对样品的防护,即保护生产环境、原料和成品等不会在取样过程中被污染,同样也保护样品不被污染。主要的防护用品有工作服(连体或分体)、工作帽、口罩、雨鞋、手套等。这些防护用品应事先消毒灭菌(或使用无菌的一次性物品)。

应根据不同的样品特征和取样环境,对取样物品和试剂进行事先准备和灭菌等工作。实验室的工作人员进入车间取样时,必须更换工作服,以避免将实验室的菌体带入加工环境,造成产品加工过程的污染。

## 2. 取样计划

要保证样品能够代表整批产品,其检测结果应具有统计学有效性,于是便提出了“取样计划”的概念。通过“取样计划”能够保证每个样品被抽取的几率相等。取样计划通常指以数理统计为基础的取样方法,也叫统计取样。

取样计划通常要根据生产者过去的工作情况来选择。反映生产者工作情况的取样水平(即加严、正常或放宽)要体现在计划当中,还应包括被测产品被接受或被拒绝的标准。

目前微生物检验工作中使用较多的取样计划包括计数取样计划(二级、三级)、低污染水平的取样计划以及随机取样等。

### (1) 取样的术语

批量货物(batch goods):数量确定的货物,品质必须均匀一致(同一品种或种类、产地相同、包装一致等)。属于合同货物中的某一批,通过它们可以综合评价合同货物的质量。

抽检货物(sampling goods):从批量货中的一个位置取出的少量货物。多个抽检货物应从批量货物中的不同位置取样。

混合货样(mixing sample):条件允许,从某一特定批量取样、混合,即为混合货样,亦即大样。

样品单位(unit of sample):从监督总体中抽取用于检验的样品中的单位产品。

**样品量**(sample size):样品中所包含的样品单位数。

**合格判定数**(acceptance number):在计数取样检查中,对接收批的样品允许出现的缺陷数或不合格品数的上限值,合格判定数又称可接受数。

**批**(lot):一批产品中或特定阶段或时间内代表相同质量样品的单元数。

**随机取样**(random sample):在一批产品中,每个样品或单元都有同样被选择的机会。这种取样方法被称为随机取样。取样时常需要查阅随机数字表。

**代表性样品**(representative sample):广义上讲是指能够代表一个批的样品,而不是仅代表其中的一部分。要获得代表性样品需要以下四个条件:确定整批产品的取样点;建立能够代表整个产品特征的取样方法;选择样品大小;规定取样的频率。

### (2) 取样计划的制定原则

微生物检验的特点是以一小份样品的检验结果来评判一大批食品卫生质量,因此,样品的代表性至关重要。要保证样品的代表性,首先要有一套科学的取样方案,其次使用正确的取样技术,并在样品的保存和运输过程中保持样品的原有状态。

取样计划制定原则,包括(但不限于):

- 1) 食品类型;
- 2) 取样产品批量大小(生产单位、罐头食品和包装等);
- 3) 损害性质:细菌污染、化学毒素或残留和热处理不足等;
- 4) 对人类健康危害程度;
- 5) 可能的欺诈行为;
- 6) 接受和拒收的标准:病原体、掺假、耐受限量等;
- 7) 所要求的可信度,以确保测试结果的有效性。

一般说来,进出口贸易合同对食品取样量有明确规定的,按合同规定取样;进出口贸易合同没有具体取样规定的,根据以上原则确定取样方案。

### (3) 取样计划的类型

#### 1) 非随机取样计划

工作人员通常希望通过随机取样获得样品。例如可使用随机取样表抽取一条生产线或仓库中的样品,用表中的数字确定不同的取样时间和地点。但生产中会出现很多特殊情况,如在加工熟食品时,细菌数会随生产程序而增多;分装食品的管道系统不清洁或开始生产前未充分洗净,最开始生产的产品细菌数就很高;传送食品的管道温度适于细菌生长,则在传送过程中细菌数会渐渐增加。

另外,当整批食品贮存条件相同,采用随机取样比较合理。但对于一堆食品,其贮存温度和其他条件往往都是变化的。在这种情况下,从不同部位取样,获取的信息就不同。如果对环境条件进行同步检测(如用多功能记录仪和几个温度计检测整批食品贮存温度的变化),环境变化对微生物的影响就能被检测出来。

#### 2) 随机取样

##### ① 随机取样表(SN 0330—1994《出口食品中微生物检验通则》)

在现场取样时,可利用随机取样表进行随机取样。随机取样表系用计算机随机编制而

成,包括一万个数字,其使用方法如下:

A1 先将一批产品的各单位产品(如箱、包、盒等)按顺序编号。如将一批 600 包的产品编为 1、2、……、600。

A2 随意在表上点出一个数。查看该数字所在的行和列。如点在第 48 行、第 10 列的数字上。

A3 根据单位产品编号的最大位数(如 A1,最大为三位数),查出所在行的连续列数字(如 A2 所点数为第 48 行,第 10、11 和 12 列,其数字为 245),则编号与该数相同的那一份单位产品,即为一件应抽取的样品。

A4 继续查下一行的相同连续列数字(如按 A3,即第 49 行的第 10、11 和 12 列的数字,为 608)。该数字所代表的单位产品为另一件应抽取的样品。

A5 依次按 A4 所述方法查下去。当遇到所查数超过最大编号数量(如第 50 行的第 10、11 和 12 列的数字为 931,大于 600)则舍去此数,继续查下一行相同列数,直到完成应取样品件数为止。

## ② 随机取样类型

### a) 简单随机取样

要求样品集中的每一个样品都有相同的被抽选概率,首先需要定义样品集,然后再进行抽选。当样品简单,样品比较大时,基于这种方法的评估存有一定的不确定性。虽然这种方法易于操作,是简化的数据分析方式,但是被抽选的样品可能不能完全代表样品集。

### b) 分层随机取样

样品集首先被分为不重叠的子集,称为层。如果从层中的取样是随机的,则整个过程称为分层随机取样。这种方法通过分层降低了错误的概率,但当层与层之间很难清楚地定义时,可能需要复杂的数据分析。

### c) 整群取样

在简单随机取样和分层随机取样中,都是从样品集中选择单个样品。而整群取样则从样品中集中一次抽选一组或一群样品。这种方法在样品集处于大量分散状态时,可以降低时间和成本的消耗。这种方法不同于分层随机取样,它的缺点是有可能不代表整个样品集。

### d) 系统取样

首先在一个时间段内选取一个开始点,然后按有规律的间隔抽选样品。例如,从生产开始时取样,然后样品按一定间隔采集一次,如每 10 个采集一次。由于取样点更均匀地分布,这种方法比简单随机取样更精确,但是如果样品有一定的周期性变化,则容易引起误导。

### e) 混合取样

这种方法是从各个散包中抽取样品,然后将两个或更多的样品组合在一起,以减少样品间的差异。

## ③ ICMSF 取样方案简介

国际食品微生物标准委员会(ICMSF)所建议的随机取样方案是目前世界各国最为流行的取样方案,为 ICMSF 推荐的取样方案。ICMSF 提出的基本取样原则是根据:

a) 各种微生物本身对人的危害程度各有不同;

b) 食品经不同条件处理后,其危害度变化情况分为三种情况,即降低危害度、危害度未变或危害度增加,根据食品危害度的变化情况来确定取样方案,并规定其不同取样数。依照 ICMSF 的规定,其中  $n$ :系指一批产品取样个数; $c$ :系指该批产品的样品菌落数中,超过限量的样品数; $m$ :系指合格菌落数限量,将可接受与不可接受的数量区别开; $M$ :系指附加条件,判定为合格的菌落数限量,表示边缘的可接受数与边缘的不可接受数之间的界限。

ICMSF 取样方案是从统计学角度来考虑,是依据对一批产品检查多少个检样才能够有代表性、才能客观地反映该批产品质量的设想采样的。ICMSF 取样方案包括二级取样方案及三级取样方案两种。二级取样方案只设有  $n$ 、 $c$  及  $m$  值,三级取样方案则有  $n$ 、 $c$ 、 $m$  及  $M$  值。

二级取样方案:只设定合格判定标准  $m$  值,超过  $m$  值的为不合格品。通过检查在检样中是否有超过  $m$  值的,来判定该批产品是否合格。例如:生食海产品鱼的副溶血弧菌标准为  $n=5$ 、 $c=0$ 、 $m=10^2$ ,其中  $n=5$  即取样 5 个, $c=0$  即意味着在该批检样中,未见到有菌落数超过  $m$  值的检样,此批货物为合格品。

三级取样方案:没有微生物标准值  $m$  及  $M$  值,如同二级法,菌落数超过  $m$  值的检样,即算为该检样不合格。所有检样均小于  $m$  值,即为合格;在  $m$  值到  $M$  值范围内的检验数,在  $c$  值范围内,即为附加条件合格,否则为不合格;有检样超过  $M$  值者,则为不合格。例如:冷冻生虾的细菌总数标准  $n=5$ 、 $c=3$ 、 $m=10^1$ 、 $M=10^2$ ,其意义是从一批产品中,取 5 个检样,检样结果允许  $\leq 3$  个检样的菌落数是在  $m$  和  $M$  值之间。如果有 3 个以上检样的菌落数是在  $m$  和  $M$  值之间或一个检样菌落数超过  $M$  值者,则判定该批产品为不合格品。

为了强调取样与检样之间的关系,ICMSF 已经阐述了把严格的取样计划与食品危害程度相联系的概念(ICMSF,1986)。在中等或严重危害的情况下使用二级取样方案,对健康危害低的则建议使用三级取样方案。

ICMSF 将微生物的危害度、食品的特性及处理条件三者综合在一起进行食品中微生物危害度分类的。这个设想是很科学的,符合实际情况的,对生产厂及消费者来说都是比较合理的。下面结合表 8-1 加以说明。

表 8-1 ICMSF 按微生物的危害度及食品处理进行分类的情况

级别	危害程度	对象微生物	食品经不同处理后的危害度		
			减少 (加热)	无变化(冷冻 品立刻进食)	增加危害度(未加热 吃到吃前的一段时间)
三级 方案	1) 食品的保藏	菌落总数	例 1 $n=5$ $c=3$	例 2 $n=5$ $c=2$	例 3 $n=5$ $c=1$
	2) 轻度间接指 标菌	大肠菌群、大肠杆 菌、金黄色葡萄球 菌(指标菌)	例 4 $n=5$ $c=3$	例 5 $n=5$ $c=2$	例 6 $n=5$ $c=1$
	3) 中度程度局 部传播	金黄色葡萄球菌、 蜡样芽孢杆菌、产 气荚膜梭菌	例 7 $n=7$ $c=2$	例 8 $n=5$ $c=1$	例 9 $n=10$ $c=1$

续表 8-1

级别	危害程度	对象微生物	食品经不同处理后的危害度		
			减少 (加热)	无变化(冷冻 品立刻进食)	增加危害度(未加热 吃到吃前的一段时间)
二级 方案	4) 中度程度广 泛传播	沙门氏菌、副溶血 性弧菌、致病性大 肠杆菌	例 10 $n=5$ $c=0$	例 11 $n=10$ $c=0$	例 12 $n=20$ $c=3$
	5) 严重程度	肉毒梭菌、霍乱弧 菌、伤寒沙门氏 菌、副伤寒沙门 氏菌	例 13 $n=15$ $c=0$	例 14 $n=30$ $c=10$	例 15 $n=60$ $c=0$
注：“减少”系指食品经加热杀死污染的细菌；“无变化”系指微生物数不增减例如冷冻食品或干燥食品；“增加”系指将食品保存在不良环境中使微生物易于繁殖和产毒。 $n$ 系指一批产品取样个数； $c$ 系指该批产品的样品菌落数中，超过限量的样品数。					

根据表 8-1 中的 5 种危害程度, 1)~3) 可用三级法, 4)~5) 可用二级法来判定是否合格。

根据表 8-1 中的 15 种示例, 分别设定不同的取样数及检样污染数, 在例 1~例 9 中检样需采 5 个 ( $n=5$ ), 而污染检样数分别设定为  $c=3, 2, 1$ 。在例 10~例 15 用二级法则不得检出该致病菌, 即  $c=0$ 。例如冷冻食品, 细菌数按例 2、大肠菌按例 5、金黄色葡萄球菌按例 8、沙门氏菌按例 11 的二级法判定。

对食品处理应酌情考虑, 例如生肉火腿中的金黄色葡萄球菌, 被腐败菌所抑制, 不易发生食物中毒, 适用例 7 和例 8。烹调加工后的熟肉, 对腐败菌没有抵抗力, 则易发生食物中毒, 适用例 9。加热盐腌的火腿, 水分活性为 0.86 以下, 金黄色葡萄球菌有增殖的可能性, 因此适用例 9。沙门氏菌水活性在 0.94 以下不能繁殖, 适用例 11, 如上所述, 应根据各种食品的危害程度进行设定。

目前采用二级取样方案进行食品微生物检验采样的国家及组织有中国、以色列、日本、美国、南非、古巴等; 而智利、新西兰、国际食品微生物标准委员会、欧洲委员会、加拿大、芬兰、丹麦、法国、澳大利亚等国家及组织则采用三级法进行食品微生物检验采样。

从标准的严格程度看, 二级取样方案比三级取样方案要求更严格。二级取样方案的合格判定标准只有“是”和“否”, 没有中间带, 而三级取样方案则有中间带, 相对宽松, 这也表明三级取样方案更注重各种微生物本身对人的危害程度, 从风险评估的角度看, 也更科学一些。从标准的制定来看, 三级取样方案判定合格标准的制定更需建立在科学评估的基础上, 手续更加繁琐, 而且在实际应用中操作较复杂; 而二级取样方案在实际操作中则相对简单。

#### (4) 取样标准

取样标准通常是标准化了的取样计划。目前国内外关于取样的标准很多, 但无论哪种标准都只有一个目标: 即获得具有代表性的样品, 并通过对样品的检测得到能够代表整批产品的检验结果。取样时应根据不同的产品类型、产品状态等选择不同的取样方法和标准。

读者可根据实际工作参考和执行以下部分取样标准:

GB/T 2828.1—2003《计数抽样检验程序 第1部分:按接收质量限(AQL)检索的逐批检验抽样计划》;

GB/T 4789.17—2003《食品卫生微生物学检验 肉及肉制品检验》;

GB/T 4789.18—2003《食品卫生微生物学检验 乳及乳制品检验》;

GB/T 4789.19—2003《食品卫生微生物学检验 蛋及蛋制品检验》;

GB/T 4789.21—2003《食品卫生微生物学检验 冷冻饮品、饮料检验》;

GB/T 4789.22—2003《食品卫生微生物学检验 调味品检验》;

GB/T 4789.23—2003《食品卫生微生物学检验 冷食菜、豆制品检验》;

GB/T 4789.24—2003《食品卫生微生物学检验 糖果、糕点、蜜饯检验》;

GB/T 4789.25—2003《食品卫生微生物学检验 酒类检验》;

GB/T 4789.26—2003《食品卫生微生物学检验 罐头食品商业无菌检验》;

GB/T 5750—1985《生活饮用水标准检验方法》;

GB/T 14437—1997《产品质量监督计数一次抽样检验程序及抽样方案》;

GB/T 15239—1994《孤立批计数抽样检验程序及抽样表》;

GB/T 18088—2000《出入境动物检疫取样》;

SC/T 3016—2004《水产品取样方法》;

SN 0330—1994《出口食品中微生物学检验通则》;

欧盟委员会(EC)第2073/2005章食品微生物标准(COMMISSION REGULATION (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs);

美国农业部食品安全局(FSIS)指令10204.2《即食的微生物取样方法》(FSIS DIRECTIVE 10240.2 Microbial sampling of ready-to-eat (RTE) products);

ISO 707:1997《乳和乳制品——取样指南》(Milk and milk products—Guidance on sampling);

ISO 6497:2002《动物饲料——取样》(Animal feeding stuffs—Sampling);

ISO 17604:2003《食品和动物饲料的微生物学——微生物分析用胴体取样方法》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Carcass sampling for microbiological analysis);

ISO 18593:2004《食品与动物饲料的微生物学——用接触板和拭子对表面取样的水平方法》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs);

ISO 5667.5:1991《水质——取样——第5部分:饮用水以及食品和饮料加工用水的取样指南》(Water quality—Sampling—Part 5: Guidance on sampling of drinking water and water used for food and beverage processing);

ISO 7002:1986《农产食品——大批食品的标准取样方法》(Agricultural food products—Layout for a standard method of sampling from a lot);

国际食品微生物标准委员会(ICMSF)《食品中的微生物 2—1986 微生物检验的取样方

法:原理和特殊应用》(Microorganisms in foods 2-1986 Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications);

美国食品药品监督管理局(USA/FDA)细菌分析手册网络版(2003)第一章食品取样和均匀样品的制备(Bacteriological Analytical Manual Online; 2003 Chapter 1 Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate);

英国食品标准组织的食品标准和饲料的实用取样指南(2004)——第1部分:取样的目的;第2部分:食品标准取样;第3部分:饲料取样(UK Food Standards Agency Practical sampling guidance for food standards and feeding stuffs; 2004. Part 1: Overall Objectives of Sampling; Part 2: Food Standards Sampling; Part 3: Feeding Stuff Sampling)。

## 二、取样的方法

### 1. 取样要求

(1) 在取样之前应确认货、证是否相符。

(2) 取样过程中应避免雨水等环境的不良因素影响,防止样品被污染。

(3) 取样用具(如注射器、采血管、试管、探子、铲子、匙、取样器、剪子、样品袋等)必须是经过灭菌的。

(4) 对采集的样品一般要求随机取样。若怀疑最有可能受病原体污染或者带有病原体的样品,可以进行选择取样。

(5) 根据样品种类(如盒装、袋装、瓶装和罐装),应取完整密封的样品。如果样品很大,则需用无菌取样器取样;若样品是粉末,应边取边混合;若样品是液体的,通过振摇即可混匀;若样品是冷冻的,应保持冷冻状态(可放在冰内、冰箱的冷盒内或低温冰箱内保存),而非冷冻动物产品须保持在 $0^{\circ}\text{C}\sim 5^{\circ}\text{C}$ 中保存。

(6) 取样前或取样后应在盛装样品的容器或样品袋上立即贴上标签,每件样品必须标记清楚(包括品名、来源、数量、取样地点、取样人及取样日期)。

(7) 获取有关取样产品的信息:如样品名称、批量大小、包装类型、包装容器体积、生产线、产品编号或控制号、批量号、标签内容、包装破损状况、产品存放地点或建筑物的基本情况等。

(8) 当客户对所规定的取样程序有偏离、添加或删除的要求时,应详细记录这些要求和相关的取样资料,并记入包含检测结果的所有文件中,同时告知相关人员。

(9) 当取样作为检测一部分时,实验室应有程序记录与取样有关的资料和操作。这些记录应包括所用的取样程序、取样人的识别、环境条件(如果相关)、必要时有抽样地点的图示或其他等效方法,如果合适,还应包括取样程序所依据的统计方法。

### 2. 食品微生物学的取样点

食品微生物的取样计划中常包括以下取样点:原料、生产线(半成品、环境)、成品、库存样品、零售商店或批发市场、进口或出口口岸。

原料的取样包括食品生产所用的原始材料、添加剂、辅助材料及生产用水等。

生产线样品是指食品生产过程中不同加工环节所取的样品,包括半成品、加工台面、与被加工食品接触的仪器面以及操作器具等。对生产线样品的采集能够确定细菌污染的来

源,可用于食品加工企业对产品加工过程卫生状况的了解和控制,同时能够用于特定产品生产环节中关键控制点的确定和 HACCP 的验证工作。另外还可以配合生产加工,在生产前后或生产过程中对环境样品(如地面、墙壁、天花板以及空气等)取样进行检验,以检测加工环境的卫生状况。

库存样品的取样检验可以测定产品在保质期内微生物的变化情况,同时也可以间接对产品的保质期是否合理进行验证。

零售商店或批发市场的样品的检测结果,能够反映产品在流通过程中微生物的变化情况,能够对改进产品的加工工艺起到反馈作用。

进口或出口样品通常是按照进出口商所签订的合同进行取样和检测的。但要特别注意的是,进出口食品的微生物指标除满足进出口合同或信用证条款的要求外,还必须符合进口国的相关法律规定,如世界上很多国家禁止含有致病菌的食品进口。

### 3. 取样方法

#### (1) 包装食品

对于直接食用的小包装食品,尽可能取原包装,直到检验前不要开封,以防污染。

对于桶装或大容器包装的液体食品,取样前应摇动或用灭菌棒搅拌液体,尽量使其达到均质;取样时应先将取样用具浸入液体内略加漂洗,然后再取所需量的样品,装入灭菌容器的量不应超过其容量的四分之三,以便于检验前将样品摇匀;取完样品后,应用消毒的温度计插入液体内测量食品的温度,并作记录。尽可能不用水银温度计测量,以防温度计破碎后水银污染食品;如为非冷藏易腐食品,应迅速将所取样品冷却至  $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 。

对于桶装或大容器包装的固体食品,每份样品应用灭菌取样器从几个不同部位采取,一起放入一个灭菌容器内;注意不要使样品过度潮湿,以防食品中固有的细菌增殖。

对于桶装或大容器包装的冷冻食品,对于大块冷冻食品,应从几个不同部位用灭菌工具取样,使样品具有充分的代表性;在将样品送达实验室前,要始终保持样品处于冷冻状态。样品一旦融化,不可使其再冻,保持冷却即可。

#### (2) 生产过程中的取样

划分检验批次,应注意同批产品质量的均一性;如用固定在贮液桶或流水作业线上的取样龙头取样时,应事先将龙头消毒;当用自动取样器取不需要冷却的粉状或固定食品时,必须履行相应的管理办法,保证产品的代表性不被人为地破坏。

#### (3) 液体样品

通常情况下,液态食品较容易获得代表性样品。液态食品(如牛奶、奶昔、糖浆)一般盛放在大罐中,取样时,可连续或间歇搅拌(可使用灭菌的长柄勺搅拌),对于较小的容器,可在取样前将液体上下颠倒,使其完全混匀。较大的样品( $100\text{ mL}\sim 500\text{ mL}$ )要放在已灭菌的容器中送往实验室。实验室在取样检测之前应将液体再彻底混匀一次。

对于牛奶、葡萄酒、植物油等,常采用虹吸法(或用长形吸管)按不同深度分层取样,并混匀。如样品粘稠或含有固体悬浮物或不均匀液体应充分搅匀后,方可取样。

#### (4) 固体样品

依所取样品材料的不同,所使用的工具也不同。固态样品常用的取样工具有灭菌的解

剖刀、勺子、软木钻、锯子和钳子等。面粉或奶粉等易于混匀的食品,其成品质量均匀、稳定,可以抽取小样品(如 100 g)检测。但散装样品就必须从多个点取大样,且每个样品都要单独处理,在检测前要彻底混匀,并从中取一份样品进行检测。

肉类、鱼类或类似的食品既要在表皮取样又要在深层取样。深层取样时要小心不要被表面污染。有些食品,如鲜肉或熟肉可用灭菌的解剖刀和钳子取样;冷冻食品可在未解冻的状态下可用铜子、木钻或电钻(一般斜角钻入)等获取深层样品;全蛋粉等粉末状样品取样时,可用灭菌的取样器斜角插入箱底,样品填满取样器后提出箱外,再用灭菌小勺从上、中、下部位取样。

#### (5) 表面取样

通过惰性载体可以将表面样品上的微生物转移到合适的培养基中进行微生物检验,这种惰性载体既不能引起微生物死亡,也不应使其增殖。这样的载体包括清水、拭子、胶带等。取样后,要使微生物长期保存在载体上,既不死亡又不增殖十分困难,所以应尽早地将微生物转接到适当的培养基中。转移前耽误的时间越长,品质评价的可靠性就越差。

表面取样技术只能直接转移菌体,不能做系列稀释,只有在菌体数量较少时才适用。其最大优点是检测时不破坏食品样品。

以下介绍几种较常见的表面取样技术。

##### 1) 拭子法

进行定量检测时,必须先用灭菌取样框(塑料或不锈钢等)确定被测试的区域。

① 棉花-羊毛拭子:用干燥的棉花-羊毛缠在长 4 cm,直径 1 cm~1.5 cm 的木棒或不锈钢丝上做成棉花-羊毛拭子。然后将拭子放在试管中,盖上盖子后灭菌。取样时先将拭子在稀释液中浸湿,然后在待测样品的表面缓慢旋转拭子平行用力涂抹两次。涂抹的过程中应保证拭子在取样框内。取样后拭子重新放回装有 10 mL 取样溶液的试管中。

② 藻酸盐棉拭子:由海藻酸盐羊毛制成。将海藻酸盐羊毛缠在直径为 1.5 mm 的木棒上做成长 1 cm~1.5 cm、直径 7 mm 的拭子头,灭菌后放入试管中。取样步骤同①。取样后放入装有 10 mL 的 1+4 Ringer 氏溶液(含 1% 偏磷酸六钠)的试管中。

关于拭子取样方法,详见附录 2。

##### 2) 淋洗法

用 10 倍于样品的灭菌稀释液(质量比)对样品进行淋洗,得到  $10^{-1}$  的样品原液,这种取样方法可适用于全禽、干果、蔬菜等食品。报告结果时,应注明该结果仅代表样品表面的细菌总数。

关于全禽淋洗取样方法,详见附录 2。

##### 3) 胶带法

这种取样方法要用到不干胶胶带或不干胶标签。不干胶标签的优点是能把取样的详细情况写在标签的背面,取样后贴在粘贴架上。不干胶胶带取样后同样需转接到一个无菌粘贴架上。这种方法可用于检测食品表面和仪器、设备表面的微生物。胶带和标签制成后,可用易挥发溶液进行短时间的灭菌。必须确保灭菌后的胶带无菌或残留的微生物失去活性。

胶带或标签的一端要向内弯回大约 1 cm 左右以方便使用。取样时,把胶带从粘贴架上

取下压在待测物质表面,迅速取样后,重新粘回到模板上。送到实验室后,将胶带(或标签)从粘贴架上取下,压在所需培养基表面。

#### 4) 琼脂肠法

琼脂肠由无菌圆塑料袋(或塑料筒)和加入其中的无菌琼脂培养基制成。可在实验室制作,一些国家也有成品出售。使用时,在琼脂的末端无菌切开,将暴露的琼脂面压在样品表面,用无菌解剖刀切下一薄片,放在培养皿上培养。

#### 5) 影印盘

影印盘是一种无菌的塑料盘,也可称为“触盘”或“RODAC 盘”,可以从许多生产厂商处买到。制作时按要求在容器中央填满足够的琼脂培养基,并形成凸状面,需要时,将琼脂表面压在待测物表面。取样后再放入适当的温度培养。

#### 6) 触片法

用一个无菌玻片触压食品表面,带回实验室。固定染色(如革兰氏法)后在显微镜下检测,也可以将取样的玻片压在倒有培养基的平板上,将细菌转接到琼脂表面,(用无菌镊子)移去玻片后,培养平板。这种方法不能用于菌体计数,但能快速判断优势菌落的类型,这对生肉、禽肉和软奶酪等食品更为适用。

#### 7) 表层切片法

用灭菌解剖刀或镊子切取一薄层表层样品。这种方法最适用于家禽皮肤的取样。将样品放入装有适当稀释液和适当稀释度的容器中,均质后得到初始浓度为  $10^{-1}$  的样品原液。

#### (6) 厌氧微生物检验用样品的采取

取样检测厌氧微生物时,很重要的一点是食品样品中不能含有游离氧。例如在肉的深层取少量样品后,要避免使之暴露在空气当中。如只能抽取小样品,或需使用棉拭子取样时,就要用一种合适的转接培养基(如 Stuart 转接培养基)来降低氧的浓度。例如,如使用藻酸盐羊毛拭子取样后,就不能再放入原来的试管,而应放在盛有 Stuart 转接培养基的瓶中。棉拭子使用前要先用强化的梭菌培养基浸湿。

#### (7) 水样的采取

采集水样应注意无菌操作,以防止杂菌混入。取水样时,最好选用带有防尘磨口瓶塞的广口瓶。对于用氯气处理过的水,取样前在每 500 mL 的水样中加入 2 mL 的 1.5% 的硫代硫酸钠溶液。

在取自来水时,水龙头嘴的里外都应擦干净。再用酒精灯灼烧水龙头灭菌,然后把水龙头完全打开,放水 5 min~10 min 后再将水龙头关小,采集水样。这样的取样方法能确保供水系统的细菌学分析的质量,但是如果检测的目的是用于追踪微生物的污染源,建议还应在龙头灭菌之前取水样或在龙头的里边和外边用棉拭子涂抹取样,以检测龙头自身污染的可能性。

从水库、池塘、井、河流等处取水样时,用无菌的器械或工具拿取瓶子和打开瓶塞。应先将无菌取样器浸入水下 1 cm~15 cm 处(井水则在水下 50 cm 深处采样),然后掀起瓶塞采集水样。流动水区应分别采取靠岸边及水流中心的水。如果不具备适当的取样仪器或临时取样工具,只能用手操作,但取样时应特别小心,防止用手接触水样或取样瓶内部。

### (8) 空气样品的采取

空气的取样方法,有直接沉降法和过滤法。

在检验空气中细菌含量的各种沉降法中,平皿法是最早的方法之一,到目前为止,这种方法在判断空气中浮游微生物分次自沉现象方面仍具有一定的意义。平皿法就是将琼脂平板或血液琼脂平板放在空气中暴露一定时间,然后 37℃ 培养 48 h,计算所生长的菌落数。

过滤法是使定量的空气通过吸收剂,然后将吸收剂培养,计算出菌落数。此方法是使空气通过盛有定量无菌生理盐水及玻璃珠的三角瓶。液体能阻挡空气中的尘粒通过,并吸附着其上的细菌,通过空气时需振荡玻璃杯数次,使得细菌充分分散于液体内,然后将此生理盐水 1 mL 接种至琼脂培养基,在 37℃ 下培养 48 h,计算菌落数。

## 第二节 包装密封和标志

### 一、包装密封

为保证样品的完整性,装有样品的包装物应进行封口,以证实其可靠性,即从取样地点至到达实验室这段时间不发生任何变化。可采用自黏胶、特制的纸黏着剂封口,封口处应留出填写日期、检验人员和货主签字的地方。还可使用其他的粘结剂,如石蜡等,然后盖上专门的印章。

### 二、样品的标志

取样过程中应对所取样品进行及时、准确的标记。取样结束后,应由取样人写出完整的取样报告。样品应尽可能在原有状态下迅速运送或发送到实验室。

保存的样品应进行必要和清晰的标记,内容包括:样品名称,样品描述,样品批号,企业名称、地址,取样人,取样时间,取样地点,取样温度(必要时),测试目的等,标记应牢固并具防水性,确保字迹不会被擦掉或脱色。

所有盛样容器必须有和样品一致的标记。在标记上应记明产品标志与号码和样品序号以及其他需要说明的情况。标记应牢固并具防水性,确保字迹不会被擦掉或脱色。

当样品需要托运或由非专职取样人员运送时,必须封识样品容器。

## 第三节 样品的运输、接收和保存

### 一、样品的运输

1. 取样结束后应尽快将样品送往实验室检验。如不能及时运送,冷冻样品应存放在 -15℃ 以下冰箱或冷库内;冷藏和易腐食品存放在 0℃~4℃ 冰箱或冷藏库内;其他食品可放在常温冷暗处。

2. 样品的运输过程必须有适当的保护措施(如密封、冷藏等),以保证样品的微生物指

标不发生变化。运送冷冻和易腐食品应在包装容器内加适量的冷却剂或冷冻剂,但样品不可与冷却剂或冷冻剂直接接触,保证途中样品不升温或不融化,必要时可于途中补加冷却剂或冷冻剂。

3. 如不能由专人携带送样时,也可托运。托运前必须将样品包装好,应能防破损,防冻结或防易腐和冷冻样品升温或融化。在包装上应注明“防碎”、“易腐”、“冷藏”等字样。

4. 做好样品运送记录,写明运送条件、日期、到达地点及其他需要说明的情况,并由运送人签字。

5. 运送水样时应避免玻璃瓶摇动,水样溢出后又回流瓶中,从而增加污染。

## 二、样品的接收

在接收样品时,实验室应与送样人共同相互确认样品与委托单上的内容是否一致。确认内容一般包括:

- 1) 品名(进出口商品应加进出国名称);
- 2) 检验目的;
- 3) 检验项目;
- 4) 形状和包装状况(固体、液体、粉状、冷冻、冷藏、零售、批发、无菌包装等都不同);
- 5) 抽样数量(个数和质量);
- 6) 抽样日期及送达日期;
- 7) 抽样地点;
- 8) 随货样附带的许可申请单编号;
- 9) 生产国或者生产厂家名称(进口商品);
- 10) 抽样者的单位、姓名及有无封印;
- 11) 其他搬运、储存、检验时的注意事项。

## 三、样品的保存

### 1. 保存原则

(1) 防止交叉污染:凡接触样品的器皿、工具、手必须清洁,不应带入新的污染物,并加盖密封。

(2) 防止腐败变质:动物性食品极易腐败变质,可采取低温冷藏,以降低酶活性及抑制微生物生长繁殖。

### 2. 保存方法

实验室接到样品后应在 36h 内进行检测(贝类样品通常要在 6h 内检测),对不能立即进行检测的样品,要采取适当的方式保存,使样品在检测之前维持取样时的状态,即样品的检测结果能够代表整个产品。实验室应有足够和适当的样品保存设施(如冰箱或冰柜等)。联合国粮农组织(FAO)推荐了部分食品的保存方式(见表 8-2),由于我国的食物种类和饮食习惯与国外不一致,此保存方法仅供参考。

表 8-2 FAO 推荐的样品保存方式

	食 品	储存方式
烘烤类食品	即食面包、馅料面包卷、甜的奶油小圆面包	冷冻
	冷冻未熟面包、面包卷、小圆面包	冷冻
	冷冻的甜食	冷冻
	即食馅饼	冷冻
	冷藏或冷冻面团	冷冻
	饼干	冷冻
	其他面包及面包产品	冷冻
	奶油蛋羹及奶油甜食	冷冻
饮料及饮料原材料	水	冷藏
	软饮料	冷藏
	速溶咖啡	冷藏
	咖啡果	冷藏
	速溶茶饮料	冷藏
糖果	巧克力及可可制品	室温
	糖果及糖果制品	室温
	口香糖	室温
	糖浆和糖蜜	冷藏
	蜂蜜	冷藏
	液体糖	冷冻
	干燥糖	冷冻
乳制品	黄油	冷藏
	黄油制品(油)	冷藏
	奶油	冷藏
	干酪	冷冻
	奶酪产品	冷冻
	流质全脂奶	冷藏
	流质乳产品	冷藏
	浓缩流质乳产品	冷藏
	人造乳制品	冷藏
	干制全奶	室温
脱脂干奶	室温	

续表 8-2

食 品		储存方式
乳制品	酪蛋白	室温
	冰淇淋	冷冻
	冰奶	冷冻
	冰冻果子露	冷冻
	冰淇淋配料	冷冻
	冰牛奶配料	冷冻
蛋及蛋制品	流质和冷冻蛋及蛋制品	冷冻
	干燥蛋及蛋制品	室温
	去壳蛋	冷藏
鱼类、贝类以及海鲜	冻鱼	冷冻
	鲜鱼	冷冻
	罐装鱼	冷藏
	干鱼	冷冻
	其他鱼(鱼酱、鱼子)	冷冻
	冻贝	冷冻
	鲜贝	冷冻
	罐装贝	冷藏
	干贝	冷冻
	海产品(螃蟹饼,开胃品)	冷冻
	青蛙腿	冷冻
	熏鱼	冷冻
	熏贝	冷冻
	熏甲壳类	冷冻
面粉及面粉制品	通心粉制品	室温
	面条制品	室温
	油炸马铃薯片及其特制品	室温
	面粉	室温
	玉米粉	室温
	精制干奶粉鸡和蛋粉混合物	室温
水果、水果汁及水果制品	鲜水果	冷藏
	冷冻水果	冷冻

续表 8-2

食 品		储存方式
水果、水果汁及水果制品	罐装水果	冷藏
	干果	冷藏
	水果汁	冷藏
	冻果汁	冷冻
	果酱、果冻、果脯及水果泥	冷藏
	无花果酱	冷藏
	橄榄	冷藏
谷类及谷类产品	早餐谷类食品	室温
	整谷粒及豆类	冷藏
	大米	室温
	燕麦面	室温
婴儿食品	婴幼儿谷类食品	冷藏
	以牛奶为原料的脱水婴儿食品	冷藏
	以牛奶为原料的液体食品	冷藏
	罐装婴儿食品	冷藏
肉类及禽类	肉及肉类食品	冷冻
	禽及禽类食品	冷冻
各种副产品	油籽(棉籽粗粉)副产品	冷藏
	屠宰动物副产品(骨粉)	冷藏
	鱼及海产品副产品(鱼粉)	冷藏
	家禽及家禽副产品	冷藏
	水果及蔬菜副产品	冷藏
	乳制品副产品	冷藏
	谷类副产品	冷藏
坚果及坚果制品	坚果	冷藏
	坚果产品	冷藏
宠物食品和动物饲料	干动物饲料	冷藏
	湿动物饲料	冷冻
	罐装动物饲料	冷藏
	干宠物食品	冷藏

续表 8-2

食 品		储存方式
宠物食品和动物饲料	湿宠物食品	冷冻
	罐装宠物食品	冷藏
加工和精制食品	干配料	室温
	干布丁粉	室温
	冷冻午餐食品	冷冻
	罐装午餐食品	冷藏
	精制色拉	冷冻
	罐装汤	冷藏
	脱水午餐食品	冷藏
	凝胶(干)	室温
	酵母(干)	室温
佐料、食用香精及辛辣调味品	全佐料	室温
	五味粉	室温
	混合佐料	室温
	调味酱和食品香精	冷藏
	精油	冷藏
	提取物原料	冷藏
	色拉佐料	冷藏
	干色拉佐料混合物	冷藏
	其他调味品	冷藏
蔬菜及蔬菜制品	新鲜蔬菜	冷冻
	冷冻蔬菜	冷冻
	罐装蔬菜	冷藏
	干蔬菜	室温
	腌菜	冷藏
	植物油	冷藏

保存的样品应进行必要和清晰的标记,内容包括:样品名称,样品描述,样品批号,企业名称、地址,取样人,取样时间,取样地点,取样温度(必要时),测试目的等;样品在保存过程中应保持密封性,防止引起样品 pH 的变化。

#### (1) 易腐食品

易腐食品要用保温箱或采取必要的措施使样品处于低温状态( $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ ),应在取样后

尽快送至实验室,并保证样品送至实验室时不变质。易腐的非冷冻食品检测前不应冷冻保存(除非不能及时检测)。如需要短时间保存,应在 $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存,但应尽快检验(一般不应超过36 h),因为保存时间过长会造成食品中嗜冷细菌的生长和嗜中温细菌的死亡。

#### (2) 冷冻食品

冷冻食品要用保温箱或采取必要的措施使样品处于冷冻状态,送至实验室前样品不能融解、变质。冰冻食品要密闭后置于冷冻冰箱(通常为 $-18^{\circ}\text{C}$ ),检测前要始终保持冷冻状态,防止食品暴露在二氧化碳气体中。

#### (3) 干制食品

干制食品应用塑料袋或类似的材料密封保存,注意不能使其吸潮或水分散失,并要保证从取样到实验室进行检验的过程中其品质不变。

#### (4) 其他食品

其他食品也应用塑料袋或类似的材料密封保存,注意不能使其吸潮或水分散失,并要保证从取样到实验室进行检验的过程中其品质不变。必要时可使用冷藏设备。

## 第四节 样品的制备

实验室样品的制备是微生物检验的重要环节,是获得较高准确性和良好检验结果的基础。

在我国,GB/T 4789.17—2003、GB/T 4789.18—2003、GB/T 4789.19—2003、GB/T 4789.21—2003、GB/T 4789.22—2003、GB/T 4789.23—2003、GB/T 4789.24—2003、GB/T 4789.25—2003中分别规定了肉与肉制品、乳与乳制品、蛋与蛋制品、水产食品、清凉饮料、调味品、冷食菜和豆制品、糖果和糕点及果脯、酒类的样品制备方法,但以上标准规定使用的稀释剂均为无菌蒸馏水或生理盐水,我国的很多产品标准亦主要使用以上两种稀释剂,而且对待检样品的制备方式相当单一。很显然,以上方法过于“武断”,从另一个侧面反映出我国相关标准比较滞后,缺乏先进性,关于微生物样品制备的方法在实际应用中针对性差,操作性不强。

这里主要结合相关国际惯例,介绍微生物样品制备的要求。

### 一、样品制备的一般要求

由于食品种类繁多,在实际微生物检验中尽可能采用统一的样品制备方法,但是,对于许多特殊产品来说,由于产品本身的物理状态(如干品、粘稠度高的产品等)、样品中抑制物质的存在(如大蒜制品、洋葱制品、咸鱼等)或酸性等原因,则需要采用特殊的样品制备方法。这些特殊的样品制备方法,包括(但不限于):

1) 调整食品稀释样液的pH至中性;

2) 对于含高抑制物质(成分)的产品(如大蒜制品、洋葱制品等)或所含微生物受损的产品(如酸性食品、盐渍食品、干制食品等),使用缓冲蛋白胨水或其他稀释液(如D/E中和肉汤、胰心浸液肉汤等);

3) 为使渗透压休克最小化,对于低水分活度的食物,需要采取特殊复水程序;

- 4) 调整适当温度和静置时间,以利于可可粉、明胶、奶粉等样品的悬浮;
- 5) 对于来自食品加工或贮存过程中的受损微生物,需要采取特殊复苏程序;
- 6) 某些产品(如谷类)和(或)目标菌(如酵母菌和霉菌)的特殊均质程序及均质时间;
- 7) 对于高脂肪食品,使用表面活性剂。

常用稀释液包括:0.85%生理盐水、缓冲蛋白胨水(BPW)、0.1%的蛋白胨水、磷酸盐缓冲溶液等。特殊稀释液包括:D/E中和肉汤、LB肉汤、M肉汤等。

样品制备常用器具包括:均质器及均质杯、拍打器及拍打袋、试管、刻度吸管、微量移液器、玻璃珠、检测天平、水浴锅、玻璃棒、酒精灯、镊子、刀子、电锯、托盘等。

## 二、乳及乳制品的制备要求

乳及乳制品营养丰富,最有利于微生物繁殖,因此在整个过程中,初始稀释样液和梯度稀释液的温度不应超过20℃(除非特别需要)。为了使受损微生物在选择培养基上达到最佳培养效果,应使用初级稀释液来完全复苏这些受损微生物,即在进一步梯度稀释或培养前,让初始稀释样液在20℃~25℃的环境温度下放置45 min。

为了避免由于急剧的温度变化对微生物造成的损伤,在操作过程中,稀释液的温度应该尽量与样品的温度接近。

### 1. 乳及液体乳制品

快速翻转容器25次,充分混匀样品,使其中的微生物均匀分布,应避免产生泡沫或溢出泡沫。从混匀到移取样品的时间间隔不应超过3 min。

用无菌的吸管吸取1 mL样品加到9 mL稀释液中(或者10 mL样品加到90 mL稀释液中,或者11 mL样品加到99 mL稀释液中),振荡初始稀释样液得到 $10^{-1}$ 的稀释液,然后进行梯度稀释。

### 2. 奶粉、甜乳清粉、酸乳清粉、脱脂奶粉和乳糖

反复摇动和颠倒密封容器,充分混合其内的样品。如果待检样品在未打开的容器中太满而无法充分混匀,应将样品转移到一个较大的无菌容器中,充分混匀。将装有90 mL稀释液的瓶子置于45℃水浴锅中预热。

在大小合适的玻璃器皿中称取10 g样品,然后将样品加到装有适宜稀释液的瓶子中,或在装有稀释液的瓶子中称取10 g样品。对于酸乳清粉,使用pH8.4±0.2的特殊稀释液。对于干奶粉用pH7.5±0.2的稀释液。

为溶解样品,以300 mm的幅度缓慢摇动25次(约7 s)后,将瓶子置于45℃水浴锅中5 min,偶尔摇动,然后进行梯度稀释。

### 3. 干酪及加工干酪

称取10 g待检样品,加到容器中,然后直接加入90 mL预热至45℃的稀释液,充分涡旋或搅拌混匀直到完全溶解(1 min~3 min)。在整个过程中确保温度不能超过40℃,任何情况下不得超过45℃,然后进行梯度稀释。

### 4. 酸酪蛋白、乳酪蛋白、凝乳酪蛋白和酪蛋白酸盐

反复摇动和颠倒密封容器,充分混合其内的样品。称取10 g样品到无菌的塑料袋中,

室温下加入 90 mL 的合适稀释液。对于酸酪蛋白,加入 pH $8.4 \pm 0.2$  的含有三聚磷酸钠( $\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{P}_3$ )的磷酸氢二钾( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )稀释液;对于乳酪蛋白,在室温下混匀,并静置 15 min;如果是颗粒产品,则应将其置于双层无菌塑料袋中,用拍打器中混匀 2 min,必要的话,静置 5 min;对于酪蛋白酸盐,加入 pH $7.5 \pm 0.2$  的磷酸氢二钾稀释液;对于凝乳酪蛋白加入 pH $7.5 \pm 0.2$  的含有三聚磷酸钠( $\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{P}_3$ )的磷酸氢二钾稀释液。

### 5. 黄油

称取 10 g 待检样品到样品容器中,然后将其置于 45℃ 水浴锅中,直到整个样品完全溶化,加入 90 mL 预热至 45℃ 的林格氏溶液,然后进行梯度稀释。

### 6. 冻牛奶制品(包括可食用的冰)

称取 10g 待检样品到样品容器中,将容器放在 30℃ 水浴锅中直到整个样品完全溶化,然后混合。

### 7. 奶油冻、甜食、甜奶油

称取 10 g 待检样品到装有玻璃珠的容器中,加入 90 mL 稀释液,室温摇动,使样品分散均匀,然后进行梯度稀释。

### 8. 发酵酸奶和酸奶油

称取 10 g 待检样品到含有玻璃珠的瓶子中,加入 90 mL pH 为  $7.5 \pm 0.2$  的稀释液,室温下用手摇匀,也可以用混匀器混匀,此时不必加玻璃珠。

### 9. 以牛奶为基料的婴儿食品

反复摇动和颠倒密封容器,充分混合其内的样品。如果待检样品在未打开的容器中太满而无法充分混匀,应将样品转移到一个较大的无菌容器中,充分混匀。称取 10 g 待检样品,加到 90 mL 预热至 45℃ 的稀释液中。为溶解样品,以 300 mm 的幅度缓慢摇动 25 次(约 7 s)后,将瓶子置于 45℃ 水浴锅中 5 min。对于淀粉含量高的样品,可用 2 倍体积的稀释液进行稀释。

## 三、肉及肉制品的制备要求

### 1. 一般要求

所有样品的制备和处理均应以无菌操作,所有器具都应灭菌。

检验肉及肉制品中微生物的目的是检测或计数深层微生物菌群、表面微生物菌群或深度及表面的微生物总数。

在制备待检样品时应考虑微生物检验目的及样品性质。

对于酸性样品,重要的是在酸性样品的制备过程中要调整 pH 至中性。对于高脂类食品(脂肪含量在 20% 以上),应根据脂肪水平,在稀释液中加入 1 g/L 到 10 g/L 聚山梨醇酯 80(吐温 80),从而促进悬浮过程中的乳化作用。

### 2. 特殊步骤

#### (1) 全禽淋洗样品的制备

以无菌的方式,从胴体上除去多余的水分并将胴体转移到无菌蠕动袋中。向已放入蠕

将袋的禽胴体腔中倒入 400 mL(或检测程序要求的其他体积)的无菌缓冲蛋白胨水。从袋子外边,用一只手握住禽胴体,同时用另一只手握紧袋子的顶部。摇振装有禽肉胴体的袋子,频率每分钟大约 35 次,幅度为 45 cm~60 cm 的弧度,确保胴体内外表面充分淋洗。

从放有禽肉胴体的袋子中无菌转移样品淋洗液至无菌容器,进行梯度稀释,然后进行特定微生物检验。

#### (2) 表面涂布样品的制备

将棉拭子稀释样液(样品浸于初始体积为 10 mL 或 15 mL 的稀释剂中)转移至 90 mL 缓冲蛋白胨水中,确保每个瓶子有 4 个~9 个无菌玻璃珠或塑料珠。盖紧瓶子,连续用力摇动 2 min,或者结合使用涡流混合器,以使棉拭子松散,进行梯度稀释,然后进行特定微生物检验。

拭子稀释样液(样品浸于初始体积为 10 mL 或 15 mL 的稀释剂中)是未稀释的样品,即为“0 稀释物”。拭子稀释样液按  $10^0$  倍稀释物计算。

### 四、水产品及水产制品的制备要求

#### 1. 一般要求

对于冷冻产品,置于实验室  $18^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$  的温度下最多 3 h,而在  $2^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  的温度下,不得超过 24 h。在接收样品后,实验室应尽快地进行检验。

对于干的或硬的产品,在均质器中均质不超过 2.5 min,而对于某些干硬或者异质产品(包含不同食品成分的产品),为避免温度过高,在均质前,需将样品切碎或磨碎,但均质时间不超过 1 min。

对于液态或者非粘稠的产品,检验前,为使样品中的微生物均匀分布,用手或机械摇动样品。

对于异质产品,取样时应取到每种组分中有代表性的部分,也可以将整个样品均质。如果需要把样品切碎或者碾碎,为避免温度的升高,这个过程不得超过 1 min。

对于酸性样品,重要的是在酸性样品的制备过程中要调整 pH 至中性。

对于高脂类食品(脂肪含量在 20% 以上),应根据脂肪水平,在稀释液中加入 1 g/L 到 10 g/L 聚山梨醇酯 80(吐温 80),从而促进悬浮过程中的乳化作用。

#### 2. 特殊步骤

##### (1) 生鱼、生甲壳动物、生软体动物及其他水生动物

##### 1) 整条新鲜鱼

取一块立方形的背部肌肉样品,切碎并在稀释液中均质。

##### 2) 整只头足动物或者其切片

用镊子和小刀去掉表皮和吸盘,从触手处剪取立方形的背部肌肉,制备 1→9 稀释样液,由于样品相对来说比较坚硬,用均质器进行均质或切成碎片。

##### 3) 整只甲壳动物(螃蟹)

用无菌锤子、钳子或镊子将甲壳动物的壳和爪打破后,取适量的待验肉样,加入稀释液,均质。

4) 去壳甲壳动物肉

称取一定量的肉样,制备 1→9 稀释样液,均质。

5) 整只甲壳动物或其尾部(如对虾、小龙虾、龙虾)

在进行检验前,去掉头部和尾鳍(非常小的动物除外),去皮将其切成小段,然后均质,制备 1→9 稀释样液。

6) 鲜活双壳类、腹足动物及其他水生动物

样品送至实验室前,4℃±2℃下储存样品,扔掉开口的或外壳受损个体。代表性的样品应该至少有 6 只个体,质量为 75 g~100 g。

对于双壳类,将贝壳用流水冲洗干净,将冲洗完的贝壳放在盘子上,盖上吸水纸。当贝壳被打开后,收集贝肉和贝液到一个适合搅拌的无菌的容器中,加入两倍的稀释液,搅拌 30 s~2 min 后,加入相同稀释液,得到 1→9 稀释样液。

对于腹足动物(如海螺),将贝壳洗刷干净,然后用 70% 的酒精擦洗,然后放在无菌的碟子里。用锤子敲碎贝壳,取出其动物体,切碎,先制备 1→2 稀释样液,接着加入相同稀释液,得到 1→9 稀释样液。

7) 海胆

流水冲洗至少 6 个海胆,置于无菌盘子上,用剪刀将其剪开,收集肉体 and 体液,先制备 1→2 稀释样液,接着加入相同稀释液,得到 1→9 稀释样液。

8) 海参和被囊动物

用剪刀将其剪碎成合适大小,放到均质器中均质,先制备 1→2 稀释样液,接着加入相同稀释液,得到 1→9 稀释样液。

(2) 鱼类、甲壳动物、贝类和其他水生动物的加工品

1) 咸的或盐渍产品

取待检样品的肌肉均质,制备 1→9 稀释样液;对于特咸产品,稀释比例需要高于 1→9。

2) 干鱼

用刀切成条(包括皮),均质,先制备 1→2 稀释样液,接着加入相同稀释液,得到 1→9 稀释样液。

3) 咸干鱼

按照 1) 和 2) 的方法制备稀释样液。必要时,复水时间长达 60 min(18℃~27℃)。

4) 整条烟熏鱼

如果鱼皮是用来食用的,应该包括皮;如果鱼皮不是用来食用的,应该去掉皮。从背部取肌肉切碎,均质。

5) 烟熏带皮或不带皮的鱼片

取鱼肉片均质,无须去掉鱼皮。

6) 浸泡腌制产品

按照酸性产品的方法进行处理。

7) 涂面包屑后烹制的鱼类和鱼糜,以及鱼类、甲壳动物和贝类熟制产品将整个样品均质化。

## 8) 煮熟的腹足动物

用解剖刀将鳃去掉,用镊子将动物体取出。

## (3) 冷冻的鱼类,甲壳动物、双壳类及其他水生动物产品

## 1) 块状冷冻脱壳对虾

缓慢解冻,打开包装,用镊子将对虾取出。

## 2) 块状冷冻全虾

在  $18^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$  的温度下解冻 1 h,用镊子将虾取出,无菌操作去皮,然后均质。

## 3) 块状冷冻薄片蟹肉

用锥子直接取样或者在  $18^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$  的温度下解冻 1 h,用钳子或者镊子取样。

## 4) 块状冷冻整只头足类

在  $18^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$  的温度下解冻 1 h,用剪刀或者锋利的小刀将样品切成块。

## 5) 块状冷冻鱼片

用锥子直接取样或者在  $18^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$  的温度下解冻 1 h,可以适当延长缓慢融化时间,但不得超过 3 h,用钳子或者镊子取样。

## 6) 块状冷冻大型鱼片(如金枪鱼片)

在  $18^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$  的温度下解冻 1 h,可以适当延长缓慢融化时间,但不得超过 3 h,用锋利的刀子从中央切一块。

## 7) 冷冻小块或者单一组分

在  $18^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$  的温度下解冻 1 h,可以适当延长缓慢融化时间,但不得超过 3 h,按照新鲜的产品进行取样。

## 8) 冷冻整条鱼类(鲑鱼、金枪鱼等)或者大块

## ① 冷冻整条金枪鱼

如果金枪鱼已解冻,用刀子从鱼皮下去肌肉。如果金枪鱼未解冻,用锥子取样。

## ② 冷冻鱼及鱼片

对于大块的冷冻鱼,在  $18^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$  的温度下解冻,不得超过 3 h,若在  $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$  的冰箱里解冻不得超过 48 h,或者用锥子直接取样。

## 五、乳及乳制品、肉及肉制品、水产品及水产制品之外的食品的制备要求

## 1. 一般要求

对于冻品,应在  $18^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$  的温度下解冻,不得超过 3h,或者  $2^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  条件下缓慢融化,不得超过 24 h。在此之后,样品要尽快的处理。如果样品只是部分解冻,可以用室温下的稀释液促进其解冻。

对于硬质或干质样品,在旋转式均质器中均质不能超过 2.5 min。必要时,为避免温度过高,在均质前,需将样品切碎或磨碎,但均质时间不超过 1 min。

对于液态或非粘稠产品,在检测前,应手动振荡或者机械混匀样品。

对于异质产品的样品,应该分别对各组分进行制备。必要时,为避免温度过高,在均质前,需将样品切碎或磨碎,但均质时间不超过 1 min。

## 2. 特殊步骤

### (1) 面粉、粮谷、谷物副产品、动物饲料和饲料油饼

对于干性粉末样品,混匀后,称取样品,按 1→9 加入蛋白胨盐溶液,混合。在均质前,应在 18℃~27℃ 的实验室温度下静置 20 min~30 min。

如果稀释样液太浓或太粘而无法混合或者吸取,可加入等体积蛋白胨盐溶液,使初始稀释样液达到 1→20。将样品混悬液用拍打器均质 1 min。

对谷物或者其他异质产品进行检测时,检验用样品量为 50 g。在这种情况下,先制备 1→5 的稀释样液,均质后,1→2 稀释。

注意:坚硬样品在均质时可能会划破均质袋,可以使用双层袋。

### (2) 非常坚硬的样品

取量大的待检样品放入无菌的硬质塑料袋中,用锤子打碎。取 1 份样品至 9 份蛋白胨盐溶液中混合,在均质前,应在 18℃~27℃ 的实验室温度下静置 20 min~30 min。

### (3) 明胶

无菌称取 20 g 样品,加到 500 mL 的无菌瓶中,添加 180 mL 磷酸盐缓冲液,混合,在室温下让明胶吸收缓冲液 60 min。将瓶子置于 45℃ 水浴中,不超过 30 min,频繁混合溶解。

### (4) 人造黄油和涂抹制品

在无菌的玻璃瓶中,放入 40 g 试验样品,再加入与黄油或涂抹制品样品预期脂肪量相等的稀释液,例如向 40 g 含有 82% 脂肪的黄油加入  $40 \times 0.82 = 33$  mL 的稀释液。将容器放入 45℃ 水浴锅中直到样品完全溶解,时间不能超过 20 min。

用适当的器具混匀样品,混匀时间依据黄油(涂抹制品)的类型而异,一般为 2 min~5 min。将容器置于室温下,使脂肪层与水层分离。对水层进行进一步的分析。

### (5) 脱水产品

脱水产品包括脱水肉、脱水蔬菜(脱水菠菜、脱水韭菜等)、脱水汤菜、肉酱粉、茶、可可、巧克力制品、咖啡、脱水粉状果汁、原纤维素、可溶性纤维素、糊精、山梨糖醇、糖、葡萄糖、谷氨酸、香草、调味品(脱水大蒜、脱水洋葱、辣椒粉、八角、陈皮等)、色素、多聚糖、口香糖、椰子、酵母浸膏、巧克力糖果、干制全蛋、干制蛋清等,但不包括乳品、蛋品以及活的微生物(如面包酵母)。

需用带有过滤管子的均质袋以去除稀释样液中的不溶性物质。

对于非粉末状样品,需用均质器或混匀器制成稀释样液。

对于在水中膨胀的样品(如多聚糖、口香糖凝胶剂等),需进行更大倍数的稀释(1→20、1→50 或 1→100),以获得可用的稀释样液。制备某些产品可能需要往缓冲蛋白胨水中加入某种特定的酶(作用于羧甲基纤维素的纤维素酶)。

对于某些含有抗菌成分的食品添加剂(如洋葱粉、大蒜、胡椒粉等),为降低其抗菌活性,应进行稀释,或者向缓冲蛋白胨水中添加硫酸钾( $K_2SO_4$ , 终浓度为 0.5%),或者使用 D/E 中和肉汤制备初级稀释样液。

对于巧克力和巧克力糖果,将待检样品加到预热至 40℃ 的稀释液中,用手混合,室温下放置 20 min~30 min,使之液化,然后用拍打器混匀。

### ： 鸡蛋产品

对于待验新鲜全蛋,不能有可见的裂缝。可以根据用途单个或者成批检验鸡蛋。检验时,用薄纸和水擦掉蛋壳表面的灰尘和粪便。戴上无菌手套,使用70%的工业酒精或异丙醇擦拭鸡蛋表面,也可以用碘溶液,在没有污染的情况下,完全晾干。无菌操作,将鸡蛋打开。如果需要分别检测蛋清和蛋黄,加入蛋白胨盐溶液将蛋黄进行1→9的稀释,将蛋清进行1→40的稀释以消除溶菌酶的抑制;如果需要检测整只鸡蛋,可将鸡蛋内容物直接加到装有180 mL缓冲蛋白胨水的容器中,或其他合适的增菌液无菌的容器中。

对于散装液体全蛋,按1→9进行稀释(缓冲蛋白胨水);对于散装液体蛋清,推荐按1→40进行稀释以消除溶菌酶的抑制。

#### (7) 发酵产品(含有活的微生物的产品)

目的是检测被微生物污染的产品,而不是用于发酵的微生物(如益生菌)。当蛋白胨盐稀释样液中溴甲酚紫的颜色发生变化时,使用40 g/L的氢氧化钠(NaOH)调节pH至中性。应在报告中注明该发酵产品中所含有的抗生素及其浓度。

## 六、PCR 检测用样品的制备要求

### 1. 增菌液模板 DNA 的制备

对于传统方法培养的增菌液,可直接取该增菌液1 mL加到1.5 mL无菌离心管中,8000 r/min离心5 min,尽量吸弃上清;加入50  $\mu$ L水或加入50  $\mu$ L DNA提取液,混匀后沸水浴5 min,12000 r/min离心5 min,取上清保存于-20℃备用以待检测,-70℃可长期保存。

### 2. 可疑菌落模板 DNA 的制备

对于所分离到的可疑菌落,可直接挑取可疑菌落,加入50  $\mu$ L DNA提取液,再制备模板DNA以待检测。也可使用等效的商业化的DNA提取试剂盒,并按其说明提取和制备模板DNA。

## 七、主要微生物检验样品的制备要求

ISO 8261:2001《乳和乳制品——微生物检验用测试样品、初始稀释液和十倍稀释液的通用要求》(Milk and milk products—General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination);

ISO 6887.1:1999《食品和动物饲料的微生物学——微生物检验用测试样品、初始稀释液和十倍稀释液的制备——第1部分:初始稀释液和十倍稀释液制备的通用要求》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination—Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions);

ISO 6887.2:2003《食品和动物饲料的微生物学——微生物检验用测试样品、初始稀释液和十倍稀释液的制备——第2部分:肉及肉制品制备的特殊要求》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination—Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products);

ISO 6887. 3; 2003《食品和动物饲料的微生物学——微生物检验用测试样品、初始稀释液和十倍稀释液的制备——第3部分:水产品及其制品制备的特殊要求》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination—Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products);

ISO 6887. 4; 2003《食品和动物饲料的微生物学——微生物检验用测试样品、初始稀释液和十倍稀释液的制备——第4部分:乳及乳制品、肉及肉制品、水产品及其制品之外的食品的制备要求》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination—Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products);

ISO 20837; 2006《食品和动物饲料的微生物学——食源性病原菌的聚合酶链式反应(PCR)检验方法——定性检验样品的制备要求》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens—Requirements for sample preparation for qualitative detection)。

## 第五节 样品的处置

食品中微生物的分布是不均匀的,并受环境变化的影响较大,一旦进行了样品制备和目标微生物检验,食品中微生物的本底便发生了一些变化,国际社会一直认为对于食品微生物检验不能复验,那么是否有必要保留样品?

对于是否有必要保留样品,欧洲认可协作组织(European co-operation for Accreditation, EA)在其认证文件 EA-4/10(Rev. 02)《微生物实验室认证》中规定,微生物实验室应制定样品的保留和处理程序。要求样品储存至出具检验结果时,必要时应保留更长时间。而其他国内外权威组织(ISO、AOAC、NMKL等)和政府机构(USDA FDA、USDA等)均没有明确规定。因此,如果客户没有特殊要求,可以不留样。

对于部分实验室样品是严重污染的,在弃置之前,对其进行去污染处理(见 GB 19489—2004)。

## 参 考 文 献

- [1] 赵贵明. 食品微生物实验室工作指南[M]. 北京:中国标准出版社,2005.
- [2] GB 19489—2004 实验室 生物安全通用要求
- [3] EA-04/10-2002 European co-operation for Accreditation. Accreditation for microbiological laboratories
- [4] 房子敬,邵长磊译. FAO 食物与营养丛书——食物质量控制手册 12. 食品微生物控制实验室中的质量保证. 北京:中国农业科学技术出版社,2002.

# 第九章 实验室设备

## 第一节 实验室设备的配置和采购

ISO/IEC 17025:2005 中 5.5.1 明确规定:实验室应配备正确进行检测和(或)校准(包括抽样、物品制备、数据处理与分析)所要求的所有抽样、测量和检测设备。微生物检验实验室的设备是开展微生物检验的物质基础和保证。如果没有合适的设备,或者设备使用功能不正常,即使是最优秀的工作人员也不可能得到准确的结果。细菌学上的结果不仅依赖于实验室人员的能力和使用方法,同时也和特定设备的性能配置和使用有关。

### 一、食品微生物检验实验室设备的配置

开展微生物检验工作,离不开实验室的设备。具有适合于食品微生物检验功能且状态良好的设备,是获得高质量实验室结果的要求之一。微生物检验实验室的设备主要包括:

#### 1. 保证检测无菌环境的设备

除了无菌间可以提供操作使用的无菌环境以外,在日常检测工作中还需配备生物安全柜和超净工作台。生物安全柜和超净工作台是用于实验室中的主要隔离设备,可有效防止有害悬浮微粒的扩散,为操作者、样品以及环境提供安全保护。超净工作台是在操作台的空间局部形成无菌状态的装置,它是基于层流设计原理,通过高效过滤器以获得洁净区域;它对操作者没有保护作用,但所形成的局部净化环境可避免操作过程污染杂菌的可能。因此,超净工作台只能被应用于非危险性微生物的操作,例如用于药品、微生物制剂、组织细胞等的无菌操作。和生物安全柜相比,超净工作台具有结构简单、成本低廉、运用广泛的特点。

生物安全柜能够为实验室人员、公众和环境提供最大程度的保护,其具体内容参见第七章第二节。

#### 2. 保证检测用实验用品与用具无菌(灭菌)的设备

在食品微生物实验室中,用于灭菌的设备通常为高压蒸汽灭菌器或用于干热灭菌的干燥箱。高压蒸汽灭菌器是应用最广,效果最好的灭菌器,广泛用于培养基、稀释剂、废弃培养物等的灭菌。其种类有手提式、立式、卧式等,目前部分高压灭菌器具有自动过程控制。干燥箱主要用于金属、玻璃器皿等的灭菌。

#### 3. 满足微生物恒温生长的培养设备

主要分为恒温培养箱、恒温恒湿培养箱、水浴锅、低温培养箱、微需氧培养箱、厌氧培养箱等。培养箱是微生物培养的主要设备,实验室可根据使用需要,设定不同温度(如 37℃、30℃或 25℃等)。

#### 4. 提供样品、试剂保存的设备

主要为冰箱和冰柜。冰箱分为冷藏和冷冻两部分,利用冰箱冷藏温度 2℃~8℃,保存培

培养基、血清、菌种、某些试剂、药品等；冰箱冷冻温度和冰柜冷冻温度一般在 $-18^{\circ}\text{C}$ 以下，可以用于样品的保存。此外，超低温冰箱的温度可以达到 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下，可用于菌种的保存。

## 5. 其他常用的仪器、设备

### (1) 显微镜

主要有普通光学显微镜、荧光显微镜、相差显微镜等。一般在观察细菌、酵母菌、霉菌和放线菌等较大微生物时，可应用普通光学显微镜，其最常用的放大倍数在1000倍~1500倍之间，主要用于细菌形态和运动性观察。荧光显微镜主要用于观察带有荧光物质的微小物体或经荧光染料染色后的微小物体。相差显微镜主要用于观察活的微生物细胞结构、鞭毛运动等。

### (2) 天平

常用天平有托盘天平和电子天平，托盘天平常用在对称量要求不严格的情况下，电子天平常用于培养基的称量，以及对称量要求精确的场合。

### (3) 水浴锅

水浴锅用于培养，快速预加热培养基后转移到选择温度的培养箱中，以及用来融化和（或）保持培养基处于融化的状态。

### (4) 均质器

主要用于样品的前处理，对样品进行均质化。其类型主要为拍打式均质器和旋转式均质器。

### (5) 温湿度计

主要用于温控设备温湿度的测量和校准。

### (6) pH计

主要用于培养基和诊断试剂的酸碱度测量。

### (7) 蒸馏器

主要用于制备试验用水。

### (8) 菌落计数器

主要用于细菌菌落的计数。

## 6. 细菌筛选、鉴定系统设备

20世纪70年代以来，化学分析检测自动化的发展使得自动化微生物鉴定系统的开发成为可能，自动化微生物鉴定系统开始出现并逐渐被广泛应用到食品微生物检验方面。食品微生物实验室检验的微生物主要属于肠道菌、非发酵菌、厌氧菌、芽孢杆菌和真菌等。各种自动微生物鉴定系统多是针对它们开发不同的数据库。细菌筛选、鉴定系统设备介绍详见本章第四节。

此外，有条件的实验室可以配备高速离心机、酶标仪、PCR仪等。

## 二、仪器、设备和材料的采购及其质量管理

实验室必须具有进行食品微生物检验所需的仪器、设备和材料，分析结果的可靠性在很大程度上受所使用仪器、设备、试剂和材料标准的影响。为了确保采购服务和供给有质量保

证,确保所采购的物品符合测试工作要求,实验室应对所需购买的仪器、设备和材料制定文件化的内容,规范采购和购买程序。一般可遵循以下的步骤和原则:

### 1. 明确采购目的,编制采购文件

实验室在采购仪器、设备和材料时,必须明确需要采购的目的,确定采购物品的功能与系统的需要。这就需要事先制定采购文件或填写采购申请表,在采购文件或申请表中,对所采购物品的提出足够的要求,并对其技术要求进行详细地描述,包括对该仪器进行系统评估,能否满足用户的需要,价格是否适当,是否有研究与发展的空间,是否有质量保证,数据质量能否提高,是否符合健康、安全、法规的要求。考察仪器与附件的大小、环境温度、湿度、仪器的质量、供电系统(电压、电流、特殊插座)、水、气、下水道、通讯系统、网络连接系统,健康与安全方面是否需要特许证,上述资料可向销售商索取。

### 2. 评价采购文件

对编制的采购文件或申请表进行评价。评价的内容包括:采购物品的技术指标对测试方法要求的满足性;供应商将提供的产品质量对测试方法要求的满足性等,以证明其满足测试工作的要求。对申请购置的新设备的评价,实验室相关负责人应组织收集有关仪器、设备的信息资料,核实采购文件中申请购置的仪器、设备的生产厂家、型号、规格及性能指标等是否满足测试方法的需要。大型仪器、设备需要设备管理部门请有关专家进行论证和评价。

### 3. 采购

采购时,要根据已审批的采购文件,优先选择获得质量认证的供应商提供的产品。没有通过管理体系认证的供应商要提供产品的合格证书或符合国家标准的证明,同时须符合采购文件对仪器、设备生产厂家、型号、规格及性能的要求。

### 4. 接收和确认

对测试质量有影响的仪器、设备、试剂和材料在使用之前,必须根据采购文件进行符合性检查并记录。对经常使用、质量稳定的试剂和材料根据采购文件进行符合性查收。对新的设备仪器购买后,首先要对该设备进行安装确认,仪器必须由专业人员安装在合适操作环境的场所,其基本程序是:开箱验收、安装、运行性能确认程序。

安装确认的主要内容有:

- 1) 清点仪器的软件、硬件是否与装箱单一致,检查一下有无可见的损伤,确认软件与硬件的版本。
- 2) 登记仪器名称、型号、生产厂商名称、生产厂商的编号、生产日期、仪器、设备使用者内部的固定资产设备登记及安装地点。
- 3) 收集汇编和翻译仪器使用说明书和维护保养手册。
- 4) 检查并记录所验收的仪器是否符合厂方规定的规格标准。
- 5) 检查并确保有该仪器的使用说明书、维修保养手册和备件清单。
- 6) 检查安装是否恰当,气、电及管路连接是否符合要求,模块之间通讯是否良好,根据需要校验模块、软件(版本)、安装及硬件与软件是否相容,是否有电磁干扰等。
- 7) 制定使用规程和维修保养制度,建立使用登记本。

8) 制定清洗规程。

9) 明确仪器、设备技术资料(图、手册、备件清单、各种指南及该设备有关的其他文件)的专管人及存放地点。

10) 最后对确认的结果经过进行评估,有效地制定出设备的校验、维修保养、验证计划以及相关的标准操作规程。校验的目的是为了确保计量仪表在其量程范围内运行良好,并且测量结果符合既定标准。根据生产商建议要求和该仪器的用途来确定校验或维修频率。

## 第二节 实验室设备的质量管理和使用原则

在开展实验室认可工作时,应建立符合标准要求的设备质量管理体系,实行全面质量管理,使仪器、设备保持良好的工作状态,满足检测要求。

### 一、实验室设备的质量管理体系

#### 1. 树立设备质量管理理念

对实验室仪器、设备的管理应强化质量意识,树立设备质量管理理念。

在设备配置上,应重视设备硬件建设,正确配备检测用的所有设备,既要结合实际工作情况,优化资源配置,做到物尽其用,又要做好设备配置的长远规划,促进技术水平和服务能力的同步发展,同步提升。

在管理范围上,应使影响设备的所有因素全部受控,内容包括计划、选型、购置、运输、存储、使用、维护、工作环境、技术规程、方法、辅助设施、档案、人员、供应、记录、检查和监督等。

在管理机制上,应构建设备质量管理体系,制定管理程序,建立健全相应的管理制度,对设备实行全面质量管理,使设备管理的各个环节、各个步骤、各项内容都有章有序,协调运行。

#### 2. 构建设备质量管理体系

##### (1) 建立设备管理组织

根据 ISO/IEC 17025 的要求和设备管理工作的特点、范围和工作量,确定管理人员、核查人员、操作人员和服务人员的职责、权力与相互关系,使各项管理职能分解落实到相关部门、相关岗位,尽量做到职责清晰,分工明确。设备管理组织可以是非常设机构,但关键岗位如设备管理员、质量监督员、特殊设备操作人员等,应按准则要求予以确定。

##### (2) 制定设备管理程序

通过建立相应的程序文件,明确设备管理活动的过程、步骤、内容和所有环节,使各项工作都有章可循。程序文件的结构包括目的、适用范围、职责、工作程序和引用文件,内容包括如何做、做什么、谁来做、何时做和何处做。

##### (3) 编写设备作业指导书

设备作业指导书是指导检测人员操作设备的规范性文件。一般设备可按照说明书操作,大型、复杂的仪器或操作人员流动性大、性能不稳定的设备需编写作业指导书或操作规程。设备作业指导书的结构和内容包括检测方法、适用范围和对象、引用的相关标准、技术数据、文献和资料、环境条件、干扰问题的处理方法、注意事项、记录的格式和内容等。操作

人员应能及时、方便地获取最新版本的设备作业指导书。

### 3. 健全设备质量管理体系

#### (1) 评审制度

评审是添置或处置设备的一项前期工作,主要从设备的适应性、可靠性、经济性、安全性、维护性等方面综合分析,目的是为了合理配置设备资源,发挥设备的最佳效益。

#### (2) 验收制度

验收是保证添置或维修的设备正常运行的一个重要手段。仪器、设备的开箱拆封应在设备管理员、操作人员、供应人员等有关人员都在场时进行,验收过程中,应对照设备评审要求、订货合同和装箱清单,逐一清点,并做好记录。对于大型、精密的仪器、设备,安装调试后,还应通过一定时期(在合同期内)的试运行,根据实际运行效果和各项指标测试结论,确认无质量问题方可验收。若发现质量问题,应及时与供应商联系,进口仪器要在索赔期内及时处理。仪器、设备经验收鉴定合格后方可办理移交手续,交付使用。

#### (3) 使用制度

为充分发挥仪器的作用,必须建立设备使用制度,对人员、工作环境、设施条件、维修、保养等提出明确要求并作出规定。操作人员必须熟悉设备的功能、工作条件、使用方法和注意事项,特殊设备操作人员需持证并经授权后上岗;工作环境和设施条件应满足设备的工作要求,电、水、气、油等管路正常,工作环境和辅助设施配套;设备的一般性维修和保养由专业技术人员负责,做到定期检查和保养。

#### (4) 记录制度

记录是建立完整的设备档案,保证设备正常运行的一项基础工作。每台设备从计划选购到淘汰都应保持完整的记录,内容除一般性设备档案外,还包括设备购置、检定、维护的计划,论证意见或报告,调试验收报告,设备使用和校准记录,仪器故障和维修记录,运行状况,性能变化,异常现象及整改情况等。

#### (5) 核查制度

核查是证实设备符合技术规范,避免影响检测结果的一项重要举措。操作人员在使用仪器前后,应按照技术规程和说明书,采取自校、比对等方法,校准主要性能参数,保证仪器的准确度和量程范围符合要求。应定期检查设备的使用、记录等情况,对新购置或租借的设备、现场监测使用的设备、使用频繁或漂移较大的设备,应制定核查程序,使设备保持良好的工作状态。

## 二、实验室设备的管理、使用原则

### 1. 仪器、设备档案的建立和管理

实验室应设专人负责仪器、设备档案的建立,负责仪器、设备的校准、维修和状态控制。大型仪器、设备应设有仪器设备主管人,并根据文件要求,负责仪器、设备的日常维护和保养。

所有对测试结果有影响的设备应建立设备档案,对设备统一编号、管理。档案内容一般包括:

1) 设备名称、生产厂家、型号、设备编号、价格、存放位置、设备的到货日期和启用日期及主管人等;收到时的状态(新、旧、重新调试);

- 2) 仪器、设备操作手册、使用维护说明书及操作规程(可单独存放于使用区域);
- 3) 仪器、设备验收及调试报告;
- 4) 仪器、设备的计量(校准)记录;
- 5) 仪器、设备维修记录;
- 6) 设备维护要求;
- 7) 仪器、设备使用、维护保养记录(可单独存放于使用区域);
- 8) 如果设备已不在实验室,则应在清单上注明其最后一次的使用时间和原因。

为了保证仪器、设备的原始状态和唯一性,在每一台设备附近应设置仪器、设备标牌,内容可包括设备名称(中/英)、型号、设备编号、价格、生产厂家、启用日期、主管人等信息。

## 2. 仪器、设备的校准和使用中的检查验证

对测试结果有直接影响的仪器、设备,实验室必须建立设备的计量(校准)和使用中的检查验证程序。建立仪器、设备的计量(校准)计划和记录,需要强制性定期计量(校准)的仪器和设备,经符合资质的计量部门校准合格后方可使用,并加贴绿(合格)、黄(准用)、红(停用)三色标志,以表明仪器设备所处的校准状态。设备经校准合格贴上绿色合格证,并标明校准日期和下次校准日期或校准有效期。对测量无检定规程,按校正规范为合格状态,则贴黄色标志。凡校验不合格、过期、需报修的仪器、设备应贴有红色停用证,并标明停用日期。

为了保持对仪器、设备在使用期的有效使用状态的充分信心,在使用期间需要时,设备主管人及使用人员应以设备本身的检查或验证规程,对仪器、设备的使用状态进行检查或验证,并填写记录。根据设备的使用要求、种类和以前的性能为基础,确定校准和使用验证的频率,并形成文件。

检查和验证通常在下述情况下进行:

- 1) 仪器、设备导出数据异常;
- 2) 仪器、设备故障维修或改装后;
- 3) 长期脱离实验室控制的仪器、设备在恢复使用前(如外借);
- 4) 仪器、设备经过运输或搬迁;
- 5) 使用实验室控制范围以外的仪器、设备。

表 9-1 和表 9-2 归纳和总结了实验室不同的仪器、设备校准间隔和典型性能检查。经检查验证发现问题时,实验室应对测试结果进行追踪和评定,出现重大偏离时应及时通知有关客户,并采取相应的纠正措施。

表 9-1 部分仪器、设备的校准和校准检查

设备类型	要 求	推荐频率
参考温度计(玻璃)	完全可追溯重新校准	每 5 年
	单点(例如冰点)检测	每年
参考热电偶	完全可追溯重新校准	每 3 年
	使用参考温度计检查	每年

续表 9-1

设备类型	要 求	推荐频率
工作温度计或工作热电偶	使用参考温度计在冰点和(或)工作温度范围	每年
天平	完全的可追溯校准	每年
校准质量	完全的可追溯校准	5年一次
检测质量	用校准重量检查或可追溯校准后检测	每年
量取体积玻璃器皿	质量分析校准到需要的容限	每年
显微镜	台式测微计的可追溯校准	初次使用
湿度计	可追溯校准	每年
离心机	用独立的转速计可追溯校准或检查	每年

注：校准的频率是根据设备的需求、类型和以前的使用所提供的。

表 9-2 设备的确认和性能验证指南

设备类型	要 求	推荐频率
温度控制设备(培养箱、水浴锅、 冰箱、冰柜) *	a) 确定温度的稳定性和一致性 b) 监测温度	a) 初次使用,此后每两年一次和 维修/修改后 b) 每天/每次使用
高压灭菌锅	确定温度的稳定性和一致性 监测温度	a) 初次使用,此后每两年一次和 维修/修改后 b) 每次使用
生物安全柜	a) 确定性能 b) 微生物学监测 c) 空气流动监测	a) 初次使用,此后每年一次和维 修/修改后 b) 每周 c) 每次使用
层流柜	a) 确定性能 b) 用无菌平板进行检查	a) 初次使用和维修/修改后 b) 每周
显微镜	检查调整	每天/每次使用
pH 计	使用至少两种缓冲液进行调节	每天/每次使用
天平	检查零点,去皮	每天/每次使用
去离子、反渗透装置	a) 检查电导率 b) 检查细菌污染	a) 每周 b) 每月
质量稀释器	a) 检查分配体积的质量 b) 检查稀释率	a) 每天 b) 每天
移液器/移液管	检查分配体积的准确性和精 密度	定期(考虑使用频率和性质)

续表 9-2

设备类型	要 求	推荐频率
菌落计数器	和人工检查菌落数目比较	每年
离心机	与校准的和独立的转子的转速进行比较	每年
厌氧罐/培养箱	用厌氧指示剂进行检查	每次使用

注：设备的确认和性能验证的频率是根据设备的需求、类型和以前的使用所提供的。

### 3. 仪器、设备的使用、维护

所有仪器、设备要建立标准操作程序,以保证使用人员可以正确使用。仪器、设备应配备相应的设施与环境,确保仪器、设备正常运转,避免仪器、设备损坏或污染。

所有仪器、设备的使用人员应经过专门的技术培训,获得相应的技术资格后经授权批准方可上机操作。使用人员在操作时,应严格按设备操作规程开机测试,使用后认真填写使用日志或仪器使用记录,标明目前设备的运行状态。仪器、设备的使用和维护说明书及操作维护规程等文件,可放在使用人员的工作区域内,使使用人员可及时方便地获取和使用。

使用人员在使用过程中发现设备出现异常情况时,应立即检查并报告设备主管人,如有破坏性异常情况要立即关机,并在仪器、设备使用记录中登记异常情况。仪器、设备有过载或错误操作、显示结果可疑时,确认仪器处于非正常状态的,应单独存放或加贴停用标志。对测试结果可能造成影响时,应按照文件要求,采取措施及时处理。

使用人员违反仪器、设备操作规程操作,有可能对测试结果造成影响的,应采取措施及时处理。如果仪器、设备长期停用或脱离监控,在恢复使用前,应对其功能和状态进行检查或验证。

设备主管人根据设备维护规程,对设备进行维护和保养。重要设备的维护应该根据使用频率等因素,在特定的间隔时间内进行。设备主管人按照仪器、设备维护检修规程,采取相应的措施及时地对有关部件进行清洗、处理、更新。详细记录仪器、设备的维护保养记录。

需要加以注意的是避免来自设备的交叉污染,例如:当设备需要丢弃时,应该对其进行清洗和灭菌。理想条件下,实验室应具有用于不同灭菌目的的独立的高压灭菌器。

表 9-3 总结和归纳了设备的维护和频率。

处于停用期间的仪器、设备,经维修、验证、校准恢复正常后,应及时撤除停用标志,恢复正常使用。

表 9-3 设备维护指南

设备类型	要 求	建议频率
a) 培养箱 b) 冰箱 c) 制冰机,干燥箱	清洁和消毒内部表面	a) 每月 b) 需要时(例如 3 个月) c) 需要时(例如每年)
水浴锅	放水,清洁,消毒和注水	每月或半年一次(如果使用杀菌剂)

续表 9-3

设备类型	要 求	建议频率
离心机	a) 保养, 维护 b) 清洁和消毒	a) 每年 b) 每次使用
高压灭菌器	a) 检查垫圈, 清洁和排水 b) 全面保养维护 c) 压力阀的安全检查	a) 定期, 制造商推荐 b) 每年或制造商推荐 c) 每年
生物安全柜、层流柜	全面保养维护以及技术性检查	每年或制造商推荐
显微镜	全面维修保养	每年
pH 计	清洁电极	每次使用
天平、质量稀释器	a) 清洁 b) 保养维护	a) 每次使用 b) 每年
蒸馏器	清洁和去垢	根据需要(例如, 每 3 个月)
去离子、反渗透装置	更换滤芯(膜)	制造商推荐
厌氧罐	清洁(消毒)	每次使用后
培养基分配器、测量体积装置、移液管和一般维护设备	洗刷、清洁和灭菌	每次使用

#### 4. 仪器、设备的维修

仪器、设备出现故障或异常,应立即停止使用。一般故障可由仪器、设备主管人及时排除,无法排除的应联系生产厂家或专业维修部门进行维修。在维修期间应加贴停用标志,避免使用人员误用。仪器、设备维修后,应经校准或验证,确认正常后方可投入使用。

#### 5. 设备软件的保护

目前越来越多的仪器、设备使用软件,并生成数据和数字化结果。计算机操作系统和应用程序由于操作或使用不定以及感染病毒等原因,很容易造成软件无法使用或数据丢失。因此要对设备的软件进行保护,如可能应备份软件。如校准产生一系列校正因子,应在设备软件上更新并备份。

#### 6. 仪器、设备的报废

仪器、设备经维修已无法满足测试工作要求时,应及时申请降级或报废处理。报废的仪器、设备应及时撤出使用场所。

### 第三节 设备的使用、维护、校准和期间核查

根据 CNAL/AC01:2005《检测和校准实验室能力认可准则》在“5.6 测量溯源性”这一要素中规定:用于检测和(或)校准的所有设备,包括对检测、校准和抽样结果的准确性和有效性有显著影响的辅助测量设备(例如用于测量环境条件的设备),在投入使用前应进行校

准,实验室应制定设备校准的计划和程序。作为质量管理体系的一部分,实验室需要制定文件化的程序用于设备的维护、校准和性能确认。

## 一、温度计和温度测量设备

在微生物学中,温度计和热电偶用于温度测量和记录。实验室必须要有工作温度计和(或)参照温度计。工作温度计用于日常温度检查,例如培养箱用工作温度计应有 $0.2^{\circ}\text{C}$ 或更小的刻度。参照温度计仅可用于校正工作温度计。

如果温度直接影响分析的结果或者对设备的正确运行十分重要,那么测量温度装置(包括玻璃液体温度计、热电偶和铂阻温度计)应具有良好的质量来满足准确性的要求。玻璃液体温度计具有较高的精确性,即刻度为 $0.02^{\circ}\text{C}$ 。带有证书的参考温度计价格较高。作为选择,具有最小刻度值(例如 $1^{\circ}\text{C}$ 、 $0.1^{\circ}\text{C}$ 或 $0.02^{\circ}\text{C}$ )的温度计可以通过计量机构进行校准或在实验室和参考温度计进行仔细比较后进行校准。

水银式玻璃液体工作温度计必须每年校准两次,电子型检查频率更高,校准必须以文件加以记录。设备的校准将追溯到国家或国际的温度标准。在准确性允许的情况下,能够证明所使用的设备满足正确的和国家或国际所接受的制造要求,这些设备是可以使用的(例如ISO 1770对玻璃液体温度计的要求)。温度计可用于监测冰箱和冰柜,以及培养箱和水浴锅。对温度测量设备的性能确认是必需的。

## 二、灭菌设备

在食品微生物实验室中,用于灭菌的设备通常为高压蒸汽灭菌器或用于干热灭菌的干燥箱。蒸汽比干燥空气更为有效,因此所需要的时间更短。对于两种灭菌器,为了获得有效的灭菌效果应遵循以下原则:

1) 微生物应直接和热接触,如果包裹有机塑料层或堆放拥挤,应增加热传递到达的时间;

2) 微生物不会立即失活,它们在特定的温度下要暴露一定时间。用于灭菌的时间等于材料在灭菌温度下的持续时间,不包括热传递时间或到达灭菌温度所消耗的时间。

### 1. 高压蒸汽灭菌器

湿热灭菌主要采用蒸汽灭菌器或高压蒸汽灭菌器进行。高压蒸汽灭菌器的种类很多,从简单的压力锅到复杂的微处理器控制的高压灭菌器,能够获得适用于不同类型的负载和不同的灭菌周期。尽管使用的高压蒸汽灭菌器的种类不同,它们的性能主要依赖于设定时间周期内的温度和压力的测量和控制。

#### (1) 温度校准和验证

定期进行校准和检定。所有的高压灭菌器在安装后进行校准,此后每年使用已检定的或可追溯的温度计进行校准以确保其温度的稳定性。

每次进行灭菌时,应对灭菌效果进行监测和验证,有以下三种方法:

#### 1) 物理监测法

① 留点温度计法:将留点温度计包裹或夹带在被灭菌的物体中,然后进行高压灭菌。

灭菌后取出查看读数。留点温度计可以显示测试灭菌过程中所能够达到的最高温度,如果读数达到要求灭菌温度(如 121℃),可以证明灭菌温度符合要求。

② 热电偶法:将热电偶的电极放入蒸汽的下排口或插入物品包装内,将电极导线引出到灭菌器外,进行灭菌。通过外部的温度记录仪观察温度变化及所需要温度的持续时间。

### 2) 化学指示剂法

用于间接指示灭菌效果或灭菌过程的监测方法。由于在灭菌后可立即报告结果,常用于日常压力蒸汽灭菌效果的监测。

① 化学指示胶带:此胶带上印有斜形的黄色指示条纹,可牢固的贴在待灭菌物品上。在 121℃,灭菌 20 min 后,胶带上的黄色条纹变为黑色,能够证明达到要求的灭菌温度,但不能指示灭菌效果。

② 指示卡、指示管:可以指示灭菌温度和持续作用时间,间接指示灭菌效果。监测时应放于测试包或待灭菌包内。每次灭菌都要使用,每包必用。灭菌后指示色块达到标准颜色为合格,一次灭菌如果有一个包内指示卡不合格,则认为该次灭菌不合格,应找出原因,重新灭菌处理。用化学指示卡监测时,应注意选用与灭菌温度相适应的指示卡,否则不能混用。

### 3) 生物指示剂法

利用非致病菌的芽孢作为指示菌,直接检测灭菌的效果。最常用的生物指示剂为嗜热脂肪芽孢杆菌芽孢(spores of *Bacillus stearothermophilus*, 如 NCTC10007、NCIMB 8157、ATCC 7953)。目前常用的生物指示物,其形式有芽孢悬液、芽孢纸条或芽孢纸片。GB 15981—1995《消毒与灭菌效果的评价方法与标准》规定,采用嗜热脂肪芽孢(ATCC 7953 或 SSI K31)菌片,含菌量为  $5 \times 10^5$  cfu/片~ $5 \times 10^6$  cfu/片,121℃下,杀灭 90% 微生物所需时间  $D_{121}$  为 1.3 min~1.9 min,杀灭时间(KT 值)为  $\leq 19$  min,存活时间(ST 值)为  $\geq 3.9$  min。

生物指示剂法的验证方法为:

① 将嗜热脂肪杆菌芽孢菌片两个分别放入灭菌小纸袋内,置于标准试验包中心部位。

② 灭菌柜室内,上、中层中央和排气口处各放置一个标准试验包(包括 3 件平纹长袖手术衣,4 块小手术巾,2 块中手术巾,1 块大手术巾,30 块 10 cm×10 cm、8 层纱布敷料包裹成 25 cm×30 cm×30 cm 大小)。手提压力蒸汽灭菌器用通气贮物盒(22 cm×13 cm×6 cm)代替标准试验包,盒内盛满中试管,指示菌片放于中心部位两只灭菌试管内(试管口用灭菌牛皮纸包封),将盒平放于手提压力蒸汽灭菌器底部。

③ 经过一个灭菌周期后,在无菌条件下,取出标准试验包或通气贮物盒中的指示菌片,投入溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基中,56℃ 培养 48 h,观察培养基颜色变化。

④ 结果判定及评价:同次检测中,标准试验包或通气贮物盒内,每个指示菌片接种的溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基全部不变色,判定为灭菌合格。指示菌之一接种的溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基由紫色变为黄色时,判定为灭菌不合格。

验证的程序也可以在灭菌程序结束后,将生物指示剂取出并清点数量无误后,按照制造商的说明书,在适当的条件下进行培养,结果判定。

在初始验证阶段,分别用生物指示剂在相同的灭菌条件下至少连续运行 3 次,以确定高

压灭菌器性能和灭菌条件的稳定性。此后的定期试验中,每次检测一批即可。

### (2) 使用

1) 操作手册的复印件,每种加工物质的操作规范和设备记录本放在每个高压灭菌器的附近。

2) 温度敏感的高压灭菌带或其他相应的指示物品,放置到灭菌器内以证实操作有效。

3) 排除灭菌器内和负载物中所有的空气。应考虑到空气比蒸汽重,空气和水蒸气不容易混合。这将影响到高压灭菌器的负载以及温度测量的部位。

4) 灭菌锅内应保留用于灭菌足够体积的水。

5) 高压灭菌器装载的三角瓶最好具有相同的体积,或者不超过 2 种不同体积。如果高压灭菌器用于培养后物品的灭菌,可以允许更大的差异。

6) 高压灭菌器不允许同时用于培养基灭菌和细菌培养废弃物的灭菌。

7) 灭菌完毕后,不得立即开盖取物。应待压力自然降至零时,方可开盖。不得突然开大气门排气或减压,以防容器内的液体冲出瓶外。

8) 隔热手套或相应物品,随时放在高压灭菌器的附近。负载应冷却后,使用隔热手套等将负载从灭菌锅中取出。

### (3) 记录

每一个灭菌过程必须加以手写记录。必须做到以下几点:

1) 记录时间和序列号(如果有)。

2) 过程的图表记录,包括温度、压力和整个灭菌过程和实际的灭菌周期。

3) 操作员在灭菌后审核并签字,确保灭菌的温度和时间符合产品和材料的灭菌要求。任何灭菌记录中注明的问题要有相应的整改措施。

### (4) 维护

1) 每台高压灭菌器每半年由专业人员进行维护。每年用检定的温度计对温度进行确认以及进行温度一致性检查。

2) 每周检查清洗高压灭菌器的排气滤网、密封阀等,检查是否存在泄漏和不正常的噪音等情况。

3) 保持高压灭菌器的清洁无残留物,获得最大的热传递效率。

4) 清洗内部去除水的沉淀物或培养基,推荐使用去离子水或蒸馏水。

5) 保留每台灭菌器的所有操作和温度确认的文件记录。

6) 负责人每周检查记录并签名,以确保记录的正确和完整。

### (5) 安全性

必须具有和显示正确和安全操作详细的指导书。

为了防止高温灭菌产生的水蒸气以及灭菌细菌培养废弃物产生的气溶胶在实验室的扩散,应在高压灭菌器的排气管安装冷凝器。如果没有安装冷凝器,蒸汽直接通过排气装置排出。在这种情况下,排气装置应为耐热材料制成,并且保证实验室具有良好的通风排气系统。

## 2. 干燥箱

干燥箱是干热灭菌的常用仪器。适用于耐高温的玻璃制品、金属制品及保藏菌种用的

沙土、石蜡油、碳酸钙等物品的灭菌。干热灭菌需要高温(170℃~180℃)持续1 h~2 h。热空气在密闭的空间内通过对流、传导和辐射作用进行循环。为了使负载物获得175℃的高温,可能需要灭菌器的温度设定更高一些,例如180℃。

#### (1) 校准和验证

所有的干燥箱在安装时首先对温度的稳定性和一致性进行校准。为了验证设备的性能,分析者应每天或在使用设备时使用已鉴定的或可追溯的温度计测量并记录设备温度。

每次进行灭菌时,应对灭菌效果进行监测和验证,有以下三种方法:

1) 物理监测法:热电偶法。监测时,将多点温度检测仪的多个探头分别放入灭菌器各层内、中、外各点,关好柜门,将导线引出,由记录仪观察温度上升与持续时间。

2) 生物指示剂法:直接检测干热灭菌器灭菌效果的方法。最常用的生物指示剂为枯草芽孢杆菌芽孢(spores of *Bacillus subtilis*,如 NCIMB 8058、ATCC 9372)。D值大于1.5 min,每片活芽孢数 $5 \times 10^5$ 个~ $5 \times 10^6$ 个。检测时将枯草杆菌芽孢菌片分别装入灭菌中试管内。放于灭菌器内较难达到灭菌位置。处理完毕后,将菌片取出加入普通营养肉汤中,37℃培养7 d后观察结果。

结果判定:若指示菌接种的肉汤管澄清、无菌生长,判定为灭菌合格;若指示菌片之一接种的肉汤管浑浊,判为灭菌不合格,需重新灭菌处理。对难以判定的肉汤管,取0.1 mL接种于营养琼脂平板,用灭菌L形棒涂匀,37℃培养48 h,观察是否有菌落生长。若有指示菌生长,判定灭菌不合格;若无指示菌生长,判定灭菌合格。

3) 化学指示物法:用该化学指示管或化学指示卡监测,既能指示灭菌温度又能指示该温度持续时间,可间接了解灭菌情况。检测时,将其放在待灭菌物品中,置灭菌器最难达到灭菌的部位进行处理。灭菌后指示管或指示卡达到合格标准,则可认为达到灭菌要求,否则认为没有达到灭菌要求。

#### (2) 使用

- 1) 将待灭菌物品包裹好,放入干燥箱内,不要紧靠四壁。
- 2) 放入干燥箱内的物品要分散好允许热量穿透。
- 3) 停止加热后,箱内温度下降到60℃以下时,方可打开箱门,取出灭菌物品。
- 4) 至少有1副隔热手套或相应物品,随时放在高压灭菌器的附近。确保在取出灭菌物时灭菌器已冷却或使用隔热手套。

#### (3) 记录

如果安装记录仪,使用图表记录来记录灭菌的过程,或者使用热电偶探针记录温度和时间。灭菌的物品贴上记录日期和批次号的标签。记录应签名。

#### (4) 维护

- 1) 每年至少清洁和灭菌干燥箱一次。
- 2) 每年检查干燥箱的垫圈、插销、加热丝等部件。在干燥箱的日常记录本中记录所有的维护、性能偏离和采取的纠正措施。

#### (5) 安全性

所有的使用者应注意以下的安全预防措施:

- 1) 灭菌器温度很高时,打开门要小心。
- 2) 为了从灭菌器中取出灭菌物品,可以让材料冷却或使用耐热手套。应贴上相应的警示标志。
- 3) 不允许在干热灭菌器内放置完全密封的三角瓶,以防爆炸。
- 4) 橡胶、塑料、培养基等不能采用此法灭菌。

### 三、培养箱

培养箱是带有加热和(或)冷却装置设备,目的是保持培养箱所需要的温度。温度的变化意味着培养箱内任何时间两个点之间存在差异。温度的波动意味着操作过程中,培养箱内任意一点短时间内温度的改变。

#### 1. 校准和验证

- (1) 每台培养箱在安装时,对温度的稳定性和一致性进行校准。
- (2) 为了验证设备的性能,每天/每次使用已检定的或可追溯的设备(温度计、热电偶等)测量并记录培养箱的温度。
- (3) 将校准温度计放入培养箱内进行温度检查,校准温度计需要插入含有 25 mL 甘油的 50 mL 玻璃烧瓶中。对于小体积培养箱,需要测量 3 个不同位点(即中间、上部和底部),对于大体积培养箱(例如大于 300 L),用插入甘油中的温度传感器测量 6 个位点。
- (4) 必须定期进行验证,尤其是维修后,移动培养箱到其他位置,或者实验室温度大幅度改变,都必须重新进行验证。
- (5) 对于普通的培养箱在温度 22℃~42℃ 范围内,温度的变化和波动不超过±1.0℃。培养箱温度在 44℃ 时,整个温度波动不超过±0.5℃。
- (6) 如果温度不一致,在记录中注明并说明原因以及采取的整改措施。
- (7) 厌氧培养厌氧环境的验证方法是:
  - 1) 培养严格厌氧菌,例如产黑色拟杆菌(*Bacteroides melaninogenicus*)或生孢梭菌在厌氧条件下生长,而严格好氧菌[例如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)],在厌氧条件下不生长。每次培养时,都应使用这些菌对厌氧环境进行控制。
  - 2) 化学法,使用亚甲基蓝指示条进行控制。亚甲基蓝指示剂在厌氧条件下为无色,有氧条件下为蓝色。
- (8) CO<sub>2</sub> 培养箱内 CO<sub>2</sub> 含量的验证。CO<sub>2</sub> 含量一般需要控制在 5%~10% 之间,验证方法:
  - 1) 仪器法,采用 CO<sub>2</sub> 测量仪或血气分析仪进行监测。
  - 2) 生物学法,采用脑膜炎奈瑟菌为指示菌,35℃ 培养 48 h,同时在普通培养箱中进行对照培养。若指示菌在 CO<sub>2</sub> 培养箱中生长,而在普通环境下不生长,则说明箱内 CO<sub>2</sub> 浓度符合要求。

#### 2. 使用

- (1) 培养箱应放置在环境温度变化小的地方。
- (2) 培养箱中适当的负载是十分重要的。例如,每垛不应超过 6 个培养皿。

(3) 箱内不应放入过热或过冷的物品,取放物品时应随手关闭箱门,以维持恒温。如培养物不慎泼洒到箱内,马上清洁,需消毒的马上消毒。

(4) 培养物不宜与培养箱最底层直接接触。必要时,可放入装水容器以维持箱内的湿度。

(5) 细菌和霉菌不能够在同一培养箱内培养。

(6) 厌氧培养箱在培养过程中不可打开培养罐门,以免破坏厌氧环境。

### 3. 记录

记录每一次的温度验证记录,包括时间、位点和温度,并签名。

### 4. 维护

(1) 培养箱的清洁和灭菌一年两次,防止霉菌和其他微生物的生长。

(2) 每年检查培养箱的垫圈、风扇等部件的整体情况。所有维护、维修等记录都保留在仪器记录本中。

(3) 如果培养箱内要放置水箱以保持湿度,可以加入非挥发性微生物抑制剂阻止微生物的繁殖。每月清洁和灭菌水箱。

(4) 隔水式培养箱要注意注满水,并根据水位指示必要时及时添加。

## 四、水浴锅

水浴锅用于培养,快速预加热培养基后转移到选择温度的培养箱中,以及用来熔化和(或)保持培养基处于熔化的状态。水浴锅能够在很窄的范围内控制温度的波动。温度控制依赖于温度调节装置的灵敏度和微分值、加热单元的功率和水循环系统的效率。

### 1. 校准和验证

(1) 所有的水浴锅在安装时,对温度的稳定性和一致性进行校准。

(2) 为了验证设备的性能,将已检定的或可追溯的温度计放置到水浴锅中,并记录使用时的温度,同一水浴锅中的不同点的温度变化必须进行控制。

(3) 用于培养目的的水浴锅,应具有内循环系统和盖子。在 $22^{\circ}\text{C}\sim 42^{\circ}\text{C}$ 时,温度变化不超过 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ;在 $44^{\circ}\text{C}$ 时温度变化为 $\pm 0.25^{\circ}\text{C}$ 。每次使用时检查温度。用于熔化培养基的水浴锅温度波动范围 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 是可以接受的。

(4) 维修后或移动到其他位置或环境改变,必须重新进行验证。

### 2. 使用

(1) 按照制造商的说明书使用水浴锅。

(2) 精确控温时,确保温度计不与设备边缘接触。

### 3. 记录

每一个水浴锅都应保留温度记录。

### 4. 维护

(1) 每个月至少一次对所有的水浴锅进行清空、清洁和灭菌维护。

(2) 通过把水浴锅加热到  $80^{\circ}\text{C}$ , 维持 1 h 对其进行清洁, 冷却后排空水。采用 0.3% 的柠檬酸或山梨酸清洁水槽, 除去残留物。最后重新注入蒸馏水。

(3) 保留所有的维护、性能偏离和纠正措施的记录。

## 五、冰箱和冰柜

冰箱或冰柜主要用于储藏样品和化学物质, 以及储存制备的培养基或易腐成分。每种储存设备的使用规范依赖于需要储存物质的种类。

### 1. 校准和验证

(1) 所有的冰箱和冰柜在安装时对温度的稳定性和一致性进行校准。

(2) 为了验证设备的性能, 分析者每天使用已检定的或可追溯的温度计检查和记录设备温度。

### 2. 使用

(1) 冰柜温度保持在  $-15^{\circ}\text{C}$  以下。

(2) 超低温冰柜温度保持在  $-70^{\circ}\text{C}$  或  $-90^{\circ}\text{C}$  以下。

(3) 冰箱温度保持在  $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$  的范围。

(4) 培养基、试剂、测试样品和微生物材料, 必须单独存储在所分配冷冻或冷藏的存放空间。

### 3. 维护

(1) 每年检查一次冰柜和冰箱的垫圈、风扇等部件的整体情况。保留每台冰柜和冰箱的日常记录。记录包含所有计划的维护、遇到的问题 and 采取的任何纠正措施。

(2) 每年至少一次对冰箱和冰柜进行除霜、清洁和消毒。

(3) 下面程序适用于实验室所有的超低温冰柜, 但不排除针对个别冰柜加入其他的清洁维护措施:

1) 及时清理门垫圈及封条上的冰。如果封条上的冰积累超过 30 d, 则要更换封条;

2) 机体内部的清洁和除霜工作仅在仪器需要维修时进行。

## 六、天平

### 1. 校准和验证

(1) 所有的天平每年使用已检定的或可追溯砝码进行校准。

(2) 为了验证设备的性能, 每天使用指定范围的单个砝码记录质量测量, 检查电子天平的精确性。

(3) 通过重复测量砝码 10 次, 检查天平重复性, 在测量范围内至少使用 4 个不同砝码, 即四分之一、二分之一、四分之三和满量程。砝码可以在有资质的实验室或机构进行校准。

(4) 对于两盘天平, 零点的调整和使用校准砝码也很重要。精确度应为 1% 或更好。

### 2. 使用

(1) 天平放置到坚固的表面, 避免倾斜和震动。

(2) 天平和任何与称量有关的设备和附件放置到干净和干燥的地方。对于分析天平这些标准尤为重要。

(3) 称量盘或称量纸可以用来称量,避免溅出和形成气溶胶。

(4) 实验室所有的天平,对于称量范围具有适当的灵敏度。

(5) 如果天平配有水平仪,使用前确保其平衡。

(6) 在称量之前和称量之后,检查天平调零和去皮情况。

### 3. 维护

(1) 所有的天平每年由专业人员进行清洁,并使用已检定的或可追溯的砝码进行校准。

(2) 每次使用后对天平进行清洁。

(3) 砝码应定期进行清洁,注意防尘和防潮。

(4) 每台天平应建立使用登记本,记录每天的使用、清洁、维护、性能偏离和采取的纠正措施。

## 七、pH 计

培养基的性能经常受到 pH 的影响。pH 的测定是培养基质量和质量控制的重要方面。利用 pH 计,可以测定液体培养基或试剂和(或)固体琼脂基础的 pH。

### 1. 校准和验证

(1) 为了验证 pH 计的性能,在每次使用前使用标准缓冲液校准并记录。

(2) 使用包括测试材料两种 pH 的标准缓冲液进行校准,例如 pH4.0 和 7.0 或 pH7.0 和 10.0。

### 2. 使用

(1) 用于校准的缓冲液使用后丢弃。

(2) 校准温度应该接近测试温度。最理想的用于测试的温度范围是 20℃~30℃。最好使用温度补偿电极,否则需要根据说明书进行温度校准。

(3) 参考缓冲液要标记标志(编号)、收到日期和终止日期。

(4) 如果校准时电极信号反应迟缓,表明电极出现老化现象。最后的 pH 反应信号应在 1 min 之内,灵敏度大于 95%。电极的灵敏度通过测量 pH4.0 和 pH7.0 间的电压的差异获得,其差别应在 172 mV~176 mV。如果差别小于 172 mV,但是高于 150 mV,电极应进行再生。如果差异小于 150 mV,应更换电极。

### 3. 维护

(1) 每年对所有的 pH 计进行专业的维护。需要校准和维护证书。

(2) 每次使用后清洁电极。电极按照制造商推荐的方式存放。电极切勿干燥。

(3) 每台 pH 计建立使用登记本,记录每次使用 pH 计的日期、缓冲液、电极的更换和设备的保养,注明性能的偏离和采取的纠正措施。

### 4. 电极再生的方法

(1) 将电极在 20%二氟氢铵中浸泡 20 s。

- (2) 用蒸馏水淋洗电极。
- (3) 置于 6 mol/L 盐酸中约 5 min。
- (4) 置于 pH7 的缓冲液中 12 h~24 h。

## 八、显微镜

### 1. 校准和验证

所有的显微镜在安装时对镜台测微尺进行校准。

显微镜校准方法:在显微镜的一个目镜内装上目镜测微尺,其 1 mm 的宽度被间隔为 10  $\mu\text{m}$  的栅线分割开。在显微镜的载物台上放上载物台测微尺,其宽度为 2 mm,被每 10  $\mu\text{m}$  间隔的栅线分割开。用最低倍数的物镜,将目镜测微尺调焦对准载物台上的测微尺。调整两组网格,使两组网格的最左边线重叠在一起。计算目镜测微尺 100 线内物镜测微尺格线数。

如果放大倍数为 10,目镜测微尺上 100 线覆盖了 60 格(600  $\mu\text{m}$ )载物台测微尺格线,目镜测微尺上的每格间的距离就是 6  $\mu\text{m}$ 。如果放大倍数为 40,目镜测微尺上 100 线覆盖了 15 格(150  $\mu\text{m}$ )载物台测微尺格线,目镜测微尺上的每格间的距离就是 1.5  $\mu\text{m}$ 。如果放大倍数为 100,目镜测微尺上 100 线覆盖了 6.5 格(65  $\mu\text{m}$ )载物台测微尺格线,目镜测微尺上的每格间的距离就是 0.65  $\mu\text{m}$ 。如果微生物样品是放在放大倍数为 100 的显微镜下观测,长度跨越了 4 格目镜测微尺线,宽度覆盖了 2.5 格目镜测微尺线,这个样品的长度和宽度分别是 2.6  $\mu\text{m}$  和 1.63  $\mu\text{m}$ 。

### 2. 使用

- (1) 当使用和调整任何一台显微镜时,要按照制造商的说明书进行。
- (2) 如果显微镜出现图像模糊,这是由于物镜安装不正确或是镜头沾上尘土或浸上油污所致。这时应对物镜的安装进行检查,并用镜头纸沾上镜头清洁液进行清洗。
- (3) 使用油镜后先用擦镜纸擦去镜头上的油,再用沾上二甲苯的擦镜纸擦拭,最后用干净擦镜纸擦干。

- (4) 注意防尘,保持清洁。

### 3. 维护

- (1) 每台显微镜每年进行专业的维护保养一次。
- (2) 每次使用后清洁目镜和物镜。
- (3) 在设备使用本上记录维护并签名。

## 九、生物安全柜和超净工作台

### 1. 验证的内容和方法

#### (1) 安装确认

生物安全柜和超净工作台都由底座支架、柜体、辅助设施三个单元连接而成。安装确认主要检查安装情况及与公用介质等的连接。生物安全柜要注意密封性检测。

## (2) 运行确认

完成安装确认后,需对设备进行运行确认,测试结果应符合合同以及供货商提供的文件中规定的技术指标或国家标准,运行确认主要包括:

### 1) 用烟雾法测试气体流向

① 生物安全柜:分别在视窗开口处和柜内各点喷放烟雾,烟雾应被开口处风帘内向下吸入生物安全柜回风口,柜内烟雾应垂直向下,形成层流。

② 超净工作台:在柜内各点喷放烟雾,柜内烟雾应水平由里向外,形成层流。

### 2) 用 DOP(邻苯二甲酸二辛酯)法检测高效过滤器

在高效过滤器上端喷放 DOP 烟雾,在其下端 2 cm 处用检测仪扫描测试,巡检速度约在 5 cm/s 以下,仪器读数不得超过 0.03%。

### 3) 检测气流速度分布

① 生物安全柜:在窗口底面的水平工作台上,自左后角以 15 cm×15 cm 的方格布点,测量每点的风速,平均风速应在 0.38 m/s~0.44 m/s。

② 超净工作台:在离过滤器表面 15 cm 处,自左上角起以 30 cm×30 cm 的方格布点,测量每点的风速,平均风速应在 0.41 m/s~0.51 m/s。

### 4) 检测工作面的照度

平均照度应 $\geq$ 300 lx。

## (3) 性能确认

在完成运行确认后,需对设备进行性能确认。

1) 悬浮粒子检测:将粒子计数器放在工作面上均匀取五点检测,每个检测点记录 3 次。测试标准:每立方米中直径大于 0.5  $\mu\text{m}$  的粒子数不大于 3500 个。每立方米中直径大于 5  $\mu\text{m}$  的粒子数为 0 个。

2) 沉降菌检测:按卫生部颁发的《中国生物制品规程》,配置普通肉汤琼脂培养基。在工作面上均匀取 5 点采样,每个采样点设置 3 个培养皿,将培养皿按要求放置后,打开平皿盖,使培养基表面暴露 30 min 后,将平皿盖盖上,在 35℃ 的条件下培养 48 h 以上,计数。

合格标准: $\leq$ 1 cfu/皿为合格。另取 3 个阴性对照,均不许长菌。

## 2. 使用和维护

### (1) 生物安全柜的使用和要求

参见第七章第二节内容。

### (2) 超净工作台的使用和要求

在开始实验前,至少让风机运行 5 min。

工作台工作区的表面用 75% 酒精或类似无腐蚀作用的杀菌剂擦拭消毒。切记不要使用任何氯化物或卤素材料!

尽可能减少他人在柜前的活动,因为这会影响层流的风速和平衡。

对高效过滤器应根据使用频率定期检测,一般每年不少于两次。

超净工作台对操作者人身没有保护作用时,不能进行致病菌和可能对人体造成危害的微生物制剂的操作。操作者必须牢记气流走向,以防不安全因素。

## 十、均质器

均质的过程是将原始样品与稀释液混合,最终得到微生物分布均匀的混合液。

### 1. 使用

将待均质的物质和稀释剂放入均质袋中(由聚乙烯或其他的塑料制成),并将之密封。用均质器的锤击板锤击均质袋,产生的压力将袋中的物质击碎混匀。

### 2. 维护

- (1) 每次使用时注意保持均质袋的密封。
- (2) 使用后,注意及时清洁均质器。
- (3) 确保使用无菌的均质袋,可定期或对每一批次的无菌袋进行无菌检查。

## 第四节 主要微生物检验用仪器及其验证

微生物检验是费时费力的工作,一直以来,人们都在努力研究方便、快速、准确的检验方法。微生物检验用仪器主要功能有筛选、鉴定和计数。本节详细介绍常见的自动微生物鉴定系统和微生物检验用仪器的验证方法。

所有商品化的微生物鉴定系统中的各种检验项目,按原理大体上可以分为7类:

- 1) pH改变:培养时间需要15 h~24 h;
- 2) 酶反应:需要2 h~4 h;
- 3) 药敏试验;
- 4) 观察是否生长;
- 5) 碳源利用;
- 6) 气相色谱检测脂肪酸;
- 7) 分子诊断。仪器生产商可能会利用其中的一类或几类来开发自己的自动化微生物鉴定系统。

各种鉴定系统的数据库覆盖范围差异较大,自产品开发成功以来都经历过数次更新,发展水平很不一致。另一方面,微生物分类是不断变化的,随着人们研究的不断深入、新技术的不断应用、新的分类手段的出现,细菌种类增加非常迅速,原先的某种菌被并入另一种已知菌或者菌种名称发生改变。鉴定系统的生产必须跟得上分类学的发展。但并不是说产品数据库更新越快越好,如果不根据增加的新种类改进生化鉴定项目,那么单纯增加数据库中的分类条目,并不能提高鉴定系统的准确度。但是改进生化项目同时增加数据库条目的成本又非常高。所以鉴定系统的生产商都很慎重地在产品更新和成本之间作出权衡。以上这些情况使得在这些产品之间进行精确的比较和优劣的评判很难,食品微生物实验室只需根据自己实验室检测微生物项目的情况,选择适于自身的鉴定系统。

### 一、主要的自动化微生物鉴定系统

#### 1. VITEK 自动鉴定和药敏系统

VITEK 是目前世界上最先进、自动化程度最高的细菌鉴定和药敏系统之一。最初的

VITEK 系统可以直接从尿样中鉴定 9 种尿道致病菌,1988 年 bioMérieux 收购了 VITEK,并在 1989 年开发了革兰氏阴性菌鉴定卡 GNI,VITEK 使用新的鉴定卡并要求接种纯培养物。后来,改进成 GNI+,使数据库中种类增多,鉴定准确性提高并使检测时间缩短到 4.1 h~5.7 h,GNI+有 30 个孔,孔内有脱水干燥培养基,接种培养后,通过自动读卡器按光学扫描原理定时测定各生长介质中指示剂的显色或浊度反应,形成各自特有的“代谢指纹图谱”,并通过计算机分析处理,从而获得鉴定结果。GNI+用来鉴定肠杆菌科、弧菌科和一部分葡萄糖非发酵革兰氏阴性菌,目前数据库版本为 7.01,包含 48 属 112 种。VITEK 还开发了其他多种鉴定卡:GPI(革兰氏阳性菌)、YBC(酵母菌)、ANI(厌氧菌)、BAC(芽孢杆菌)、NHI(奈瑟氏球菌/嗜血菌)、NFC(非发酵)、GNS(革兰氏阴性菌药敏试验)、GPS(葡萄球菌/链球菌药敏试验)、EPS(肠道致病菌筛选)和 UID(尿道菌细菌计数及鉴定)。这些鉴定卡有的可以自动判读,有的要求在仪器外培养,然后人工输入结果到仪器中进行判读。除了鉴定卡,还有含有各种不同抗生素组合的药敏卡,其中革兰氏阴性杆菌的药敏卡有 20 多种,革兰氏阳性菌药敏卡有 3 种。

1997 年 bioMérieux 开发了新一代 VITEK,称为 VITEK 2(见图 9-1),原先的 VITEK 可以一次性分析 32 张或 120 张卡,最多 4 台仪器可以联机使用。VITEK 2 可以一次性分析 60 张或 120 张卡,并设计了针对 VITEK 2 的 ID-GNB,此卡有 64 个孔,用来鉴定临床上常见的发酵菌和非发酵革兰氏阴性杆菌。目前数据库版本是 2004 年更新的 R04.00,包括 48 属 99 种。

2005 年上半年 bioMérieux 推出了其目前最新的 VITEK 2 COMPACT(见图 9-1)。此系统集合 bioMérieux 多年的微生物鉴定方面的经验,操作更加方便,仪器体积缩小的同时,优化和扩大了微生物数据库。

## 2. Phoenix 自动微生物系统

BD Phoenix 100(见图 9-2)是 Becton Dickinson 公司于 2003 年推出的快速全自动细菌鉴定/药敏系统,用来快速鉴定革兰氏阳性和阴性的各种菌。它能同时检测 99 块反应板。当反应板被接种上待检菌并装入仪器后,一切工作都会自动完成并打印出结果。Phoenix 配套有各式针对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的鉴定板(NID 和 PID)和药敏板(NMIC 和 PMIC)以及鉴定/药敏板(NMIC/ID 和 PMIC/ID)。NID 鉴定板用来鉴定革兰氏阴性菌,包括 45 个反应孔和两个对照孔,其中 16 个酶底物反应孔、23 个碳源底物反应孔。

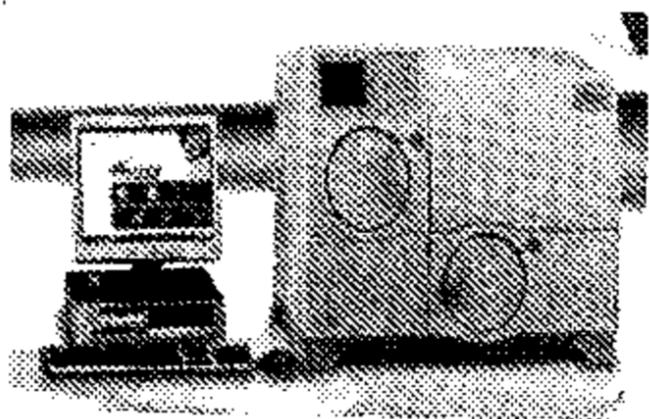


图 9-1 VITEK 2 COMPACT 系统

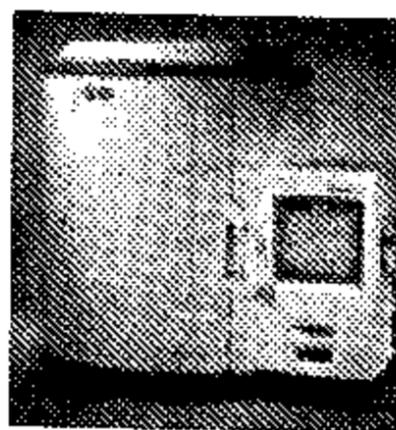


图 9-2 BD Phoenix 100

### 3. Biolog 系统

1989 年美国 Biolog 公司使用碳源、利用图谱开发了鉴定肠道菌、非发酵菌和苛养菌等革兰氏阴性杆菌的 Biolog 系统。后来,此系统扩大了鉴定范围,也可用于革兰氏阳性的球菌、杆菌和芽孢杆菌。该系统有三种版本:全自动的 OmniLog ID(见图 9-3)、半自动的 MicroLog MicroStation 和手工的 MicroLog1、MicroLog2。目前微孔板种类有:GN2(革兰氏阴性菌)、GP2(革兰氏阳性菌)、AN(厌氧菌)、FF(丝状真菌和酵母菌)、YT(酵母菌)、SF-N2 和 SF-P2(放线菌和真菌)、EcoPlate(群落分析和微生物生态研究)。依靠这些微孔板 Biolog 系统(根据数据库版本 6.01)可以鉴定 526 种(群)好氧革兰氏阴性菌、339 种(群)革兰氏阳性菌、361 种(群)厌氧菌、267 种酵母菌和 618 种丝状真菌,几乎囊括所有已知人类致病菌和环境中的常见菌。

此外,Biolog 还有未添加碳源的 MT2 微孔板,MT2 含有四唑紫和基本培养基,用户可以自由选择碳源,用来检测培养物代谢种类。MT2 没有配套的数据库,用户可以使用 Biolog 软件自己创建数据库。

### 4. MicroScan 系统

1981 年,半自动微生物鉴定仪 autoSCAN-3 面世,它使用冷冻的传统生化底物。1984 年,autoSCAN-3 改进为 autoSCAN-4(见图 9-4,现在是 Dade Behring, Inc. 产品),它使用的鉴定板的底物是干燥的形式,底物不再需要冷冻,并且数据库比上一代仪器增加了内容。autoSCAN-4 配有光比色计,可以检测反应后颜色的变化。1986 年,autoSCAN-WalkAway 进入市场,现在称为 WalkAway(见图 9-5),此仪器可全自动检测细菌鉴定板中的菌生长情况,即人工接种后既能培养又能自动判读结果。WalkAway 上不仅保留光比色计,还配有荧光计,使得它可以检测传统反应和荧光反应,通过检测荧光反应提高检测灵敏度从而大大缩短检测时间,这是国际上开发更加快速的微生物鉴定系统的流行做法。autoSCAN-4 除了要仪器外培养和不能使用带有荧光物质的快速鉴定板外,可以与 WalkAway 使用同样的鉴定板。WalkAway 快速鉴定板在 1989 年被推向市场,快速鉴定板采用荧光标记的底物或荧光计量指示剂,依靠监测荧光底物的水解、底物利用后 pH 的改变、特定代谢产物或培养 2h 后特定代谢产物产生速率来进行鉴定。荧光底物的鉴定板类型有多种:革兰氏阴性菌鉴定板、革兰氏阳性菌鉴定板、嗜血菌和瑟氏球菌等苛养菌鉴定板、厌氧菌鉴定板、酵母菌鉴定板。荧光底物的鉴定板可以在 3.5 h~7 h 内检测革兰氏阴性菌,3.5 h~15 h 内检测革兰氏阳性菌,而传统反应的鉴定板要 15h~48h 后才能获得鉴定结果。Neg ID type 2 鉴定板是 1988 年开发的鉴定好氧和兼性厌氧革兰氏阴性杆菌,既可以人工判读也可以在 WalkAway 上判读,并根据鉴定软件 LabPro(目前版本 1.51)可以自动获得结果。其采用的 96 孔板上有脱水干燥的 26 项传统底物和 6 种微生物抑制剂。Rapid Neg ID type 3 鉴定板是 1998 年开发的 Neg ID type 2 鉴定板的升级版。新版本更换了旧版本中的 10 种底物。Rapid Neg ID type 3 鉴定板上使用 36 种底物。此种

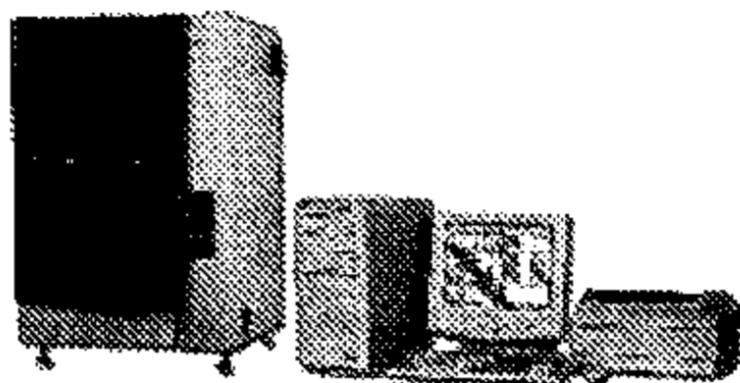


图 9-3 OmniLog ID 系统

鉴定板中荧光底物无色,无法用肉眼判读,必须在 WalkAway 上使用。数据库中包含 44 属 125 种肠杆菌科、氧化酶阳性葡萄糖发酵和非发酵革兰氏阴性杆菌。

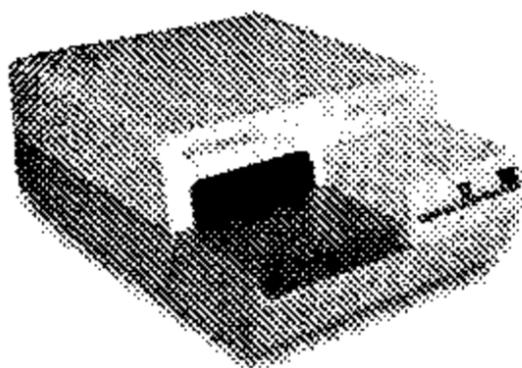


图 9-4 autoSCAN-4

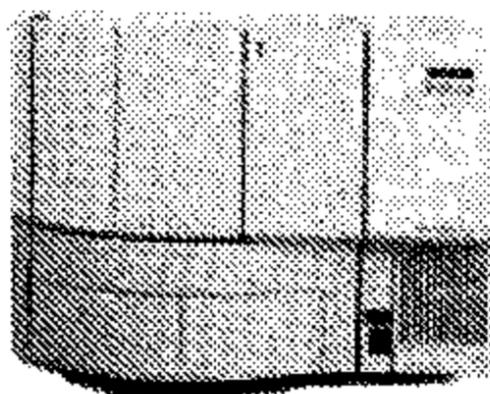


图 9-5 WalkAway

### 5. Sensititre 荧光系统

Sensititre 是英国 Trek Diagnostic Systems 公司 1999 年从 AccuMed International 公司购买的。该系统是最主要的微生物鉴定和药敏分析系统。有两种机型,一种叫 Sensititre AutoReader(见图 9-6),它是全自动的荧光计和半自动的鉴定仪(反应板需仪器外培养),可以将数据传送给数据管理系统进行处理,分析和报告;另外一种叫 Sensititre ARIS 2X(见图 9-7),它可自动进行培养和判读。Sensititre ARIS 2X 根据内部条形码来区分不同的反应板并分配适当的培养时间。这两种仪器都使用革兰氏阴性鉴定(gram-negative identification, GNID)板来鉴定革兰氏阴性菌。Sensititre GNID 板采用 96 孔板,每板包括 3 套反应,每套 32 个反应,可做一种菌的鉴定,反应底物用荧光物质标记。反应有四类:糖发酵、荧光底物、碳源利用和酶反应。目前数据库(2004 年)包括 55 属 128 种。另外,Sensititre 还配套有革兰氏阳性菌、厌氧菌、苛氧菌和真菌鉴定的鉴定板,以及多种组合的药敏板。

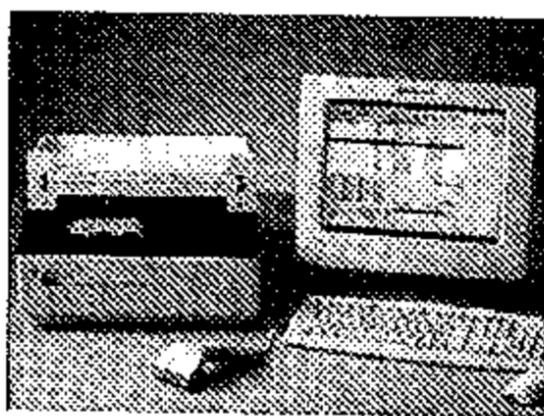


图 9-6 Sensititre AutoReader

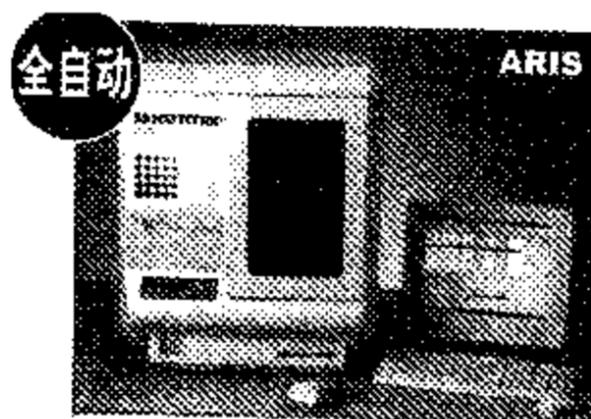


图 9-7 Sensititre ARIS

### 6. ALADIN and autoreader

自动实验室诊断系统(automated laboratory diagnostic instrument, ALADIN),由 Analytab Products 公司生产,也是集培养、鉴定于一身的自动鉴定和药敏系统,使用图像处理来判断生化和药敏试验结果。除了此全自动的机型,Analytab Products 公司也生产半自动的 UniScept,它使用与 ALADIN 相同的鉴定板,但要求仪器外培养,并且是通过光度计来判断反应结果。两套系统都可以使用的鉴定板有 UniScept 20E(革兰氏阴性菌)、UniScept 20GP(革兰氏阳性菌)、AN-Ident(厌氧菌)。UniScept 20E 包括 20 种改进的传统反应,数据库涵盖 55 种肠杆菌科细菌和 50 种或群的革兰氏阴性氧化酶阳性非发酵菌。UniScept 20GP 数

据库包括 13 种葡萄球菌、3 种肠球菌和 2 种链球菌。AN-Ident 数据库包括厌氧菌 83 种或群。此外,还有需要人工输入反应结果的其他鉴定板:Rapid-E 和 Rapid NFT (革兰氏阴性菌)、Staph-Ident(葡萄球菌)、Yeast-Ident(酵母菌)。

### 7. ATB

ATB(automatic testing bacteriology)是 bioMérieux 公司开发的半自动化的鉴定和药敏分析系统,由读数仪和计算机组成,软件包括 ATB 和 API(analytab products incorporated)的鉴定数据库、ATB 药敏数据库、数据存储和分析系统以及药敏专家系统。接种反应板需人工完成,然后仪器外培养,结果由读板仪[mini API(见图 9-8)和 ATB Express]读取并经计算机分析给出。鉴定板上有 32 项生化试验,可得出 11 位数字的编码。已有针对不同类群的微生物鉴定板 7 种,可以鉴定 600 种以上的微生物,包括:ID32 E(肠杆菌,见图 9-9)、ID 32 GN(革兰氏阴性菌)、ID32 A(厌氧菌)、ID32 STREP(链球菌)、ID 32 STAPH(葡萄球菌)和 ID 32 C(酵母菌)等。

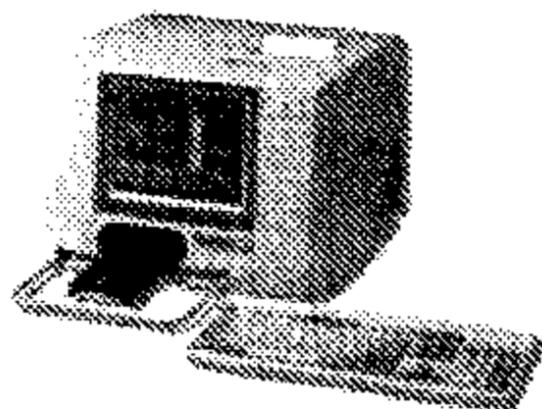


图 9-8 mini API

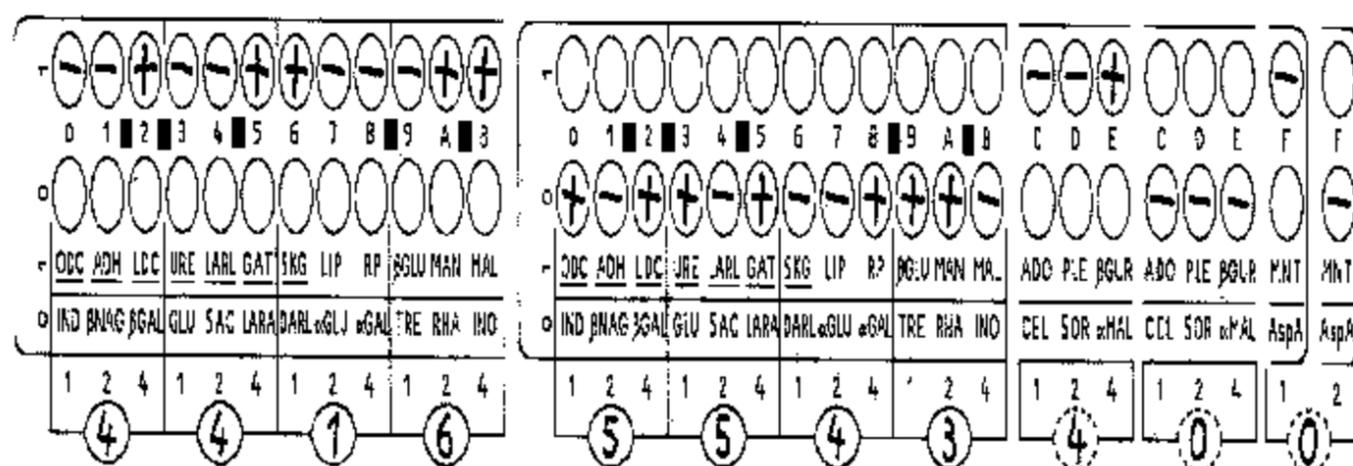


图 9-9 ATB ID32 E 鉴定结果(4416 5543 400 大肠杆菌)

### 8. PASCO 系统

PASCO MIC/ID 和 ID Tri-Panel 是 Difco Laboratories 的 PASCO Laboratories 的产品,随着 1987 年公司被 Becton Dickinson 收购,成为 BD 公司的产品。MIC/ID 鉴定板用于鉴定发酵和非发酵革兰氏阴性菌以及部分革兰氏阳性菌。ID Tri-Panel 鉴定板为其经济型,用于革兰氏阴性菌的初步检测。ID Tri-Panel 可以在一块板上同时检测

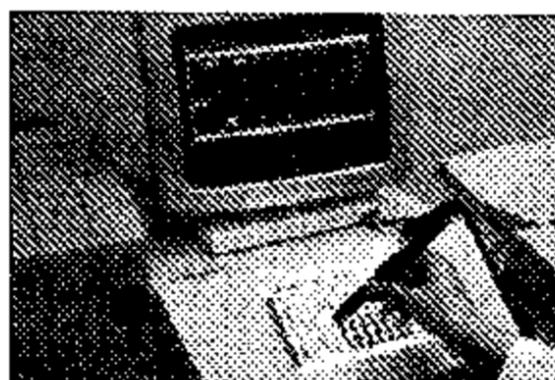


图 9-10 PASCO 药敏/鉴定数据管理系统

三株菌,它包含 30 种底物,培养后通过人工判读获得编码,通过电极计算机程序或数据管理系统[PASCO 药敏/鉴定数据管理系统(PASCO MIC/ID Data Management System),见图 9-10]获得鉴定结果。目前数据库包含 31 属和 118 种。

### 9. Crystal 鉴定系统

1993年 Becton Dickinson 创立了 BBL Crystal Enteric/Nonfermenter 鉴定板,用来鉴定肠杆菌科(Enterobacteriaceae)和其他的葡萄糖发酵和非发酵革兰氏阴性杆菌。塑料盒里包含 30 种底物。此外,还开发了多种鉴定板:RSE(快速肠道菌筛选)、N/H(奈瑟氏球菌/嗜血菌)、ANR(厌氧菌)、GP(革兰氏阳性菌)、RGP(快速革兰氏阳性菌)。将培养物接种于鉴定板并培养后,在 Crystal Viewer 或 Crystal AutoReader(见图 9-11)上判读结果。

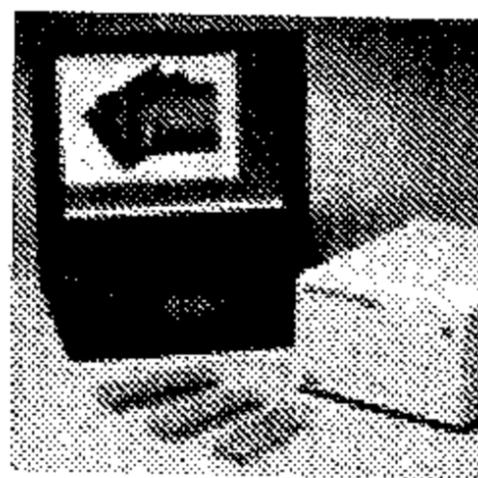


图 9-11 Crystal 鉴定系统

### 10. mini-VIDAS 全自动酶联免疫荧光仪

mini-VIDAS 全自动酶联免疫荧光仪(见图 9-12)是应用酶联免疫吸附分析技术(ELISA),被测物质抗原(细菌、病毒)的检测是应用一种夹心技术(即抗体-H 抗原-H 抗体),包被针内侧制造时已用抗体包被,实验所需生化试剂均封闭在试剂条上。每个试条有 10 个孔,第 1 孔是标本孔,第 2 孔~第 9 孔是试剂孔,其中第 6 孔含抗体-碱性磷酸酶,第 10 孔含荧光底物(4-甲基-香豆素-磷酸酯),是用于荧光测定的光学比色杯。其余孔内是洗涤液。操作时将灭活过的样品增菌液 0.5mL 加于第 1 孔,样品在包被针内自动定时循环,样品中的抗原与包被针内侧的抗体结合,未结合的样本则在第 2 孔~第 5 孔中被洗去。试剂条第 6 孔中的抗体-碱性磷酸酶复合物又与抗原结合,未被结合的碱性磷酸酶复合物在第 6 孔~第 9 孔中被洗去。酶将荧光底物分解为荧光产物(4-甲基-伞形酮),光扫描仪自动测定荧光强度,所测荧光与样品中抗原的含量成正比,样品荧光与标准荧光比值小于标准值时,结果为阴性,反之为阳性。

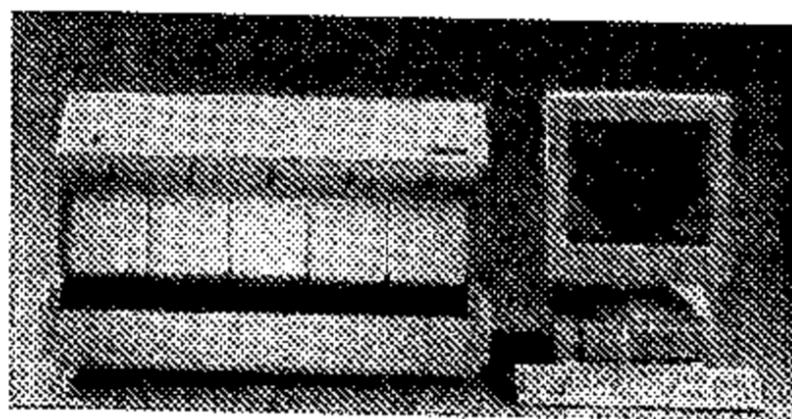


图 9-12 mini-VIDAS 全自动酶联免疫荧光仪

操作时将灭活过的样品增菌液 0.5mL 加于第 1 孔,样品在包被针内自动定时循环,样品中的抗原与包被针内侧的抗体结合,未结合的样本则在第 2 孔~第 5 孔中被洗去。试剂条第 6 孔中的抗体-碱性磷酸酶复合物又与抗原结合,未被结合的碱性磷酸酶复合物在第 6 孔~第 9 孔中被洗去。酶将荧光底物分解为荧光产物(4-甲基-伞形酮),光扫描仪自动测定荧光强度,所测荧光与样品中抗原的含量成正比,样品荧光与标准荧光比值小于标准值时,结果为阴性,反之为阳性。

mini-VIDAS 全自动酶联免疫荧光仪用于食品及环境样本中的致病菌包括:沙门氏菌、李斯特氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、葡萄球菌肠毒素、出血性大肠杆菌 O157、弯曲菌、免疫浓缩沙门氏菌、免疫浓缩大肠埃希菌 O157。

该系统全过程自动完成,将即可用试剂插入仪器中,然后由机器分担所有工作,直至打印报告,减低人手误差,避免交叉污染。mini-VIDAS 全自动酶联免疫荧光仪已被国际分析家协会(AOAC)、美国农业部(USDA)、美国食品药品监督管理局(USA FDA)、法国标准协会(AFNOR)等国内外权威机构认可。

### 11. Sherlock 微生物鉴定系统

Sherlock(由 Microbial ID Inc. 生产,见图 9-13)也称为 MIDI 微生物鉴定系统(MIS),是美国 Midi 公司 1985 年推出的产品。此全自动系统的鉴定原理与以上的几种依靠细菌生化

试验或药敏反应的鉴定系统不同,它采用高分辨率的气相色谱分析细菌脂肪酸。细菌细胞壁上的脂肪酸组成非常稳定,在种的水平上非常保守,因此脂肪酸组成分析可以快速可靠的鉴定细菌。应用高分辨率的气相色谱定量分析 300 种以上的 9 个~20 个碳的脂肪酸甲酯,每种待鉴定菌产生的脂肪酸图谱与数据库中的图谱比较,从而确定鉴定结果。该系统可以鉴定数百种好氧菌、厌氧菌、酵母菌和霉菌。

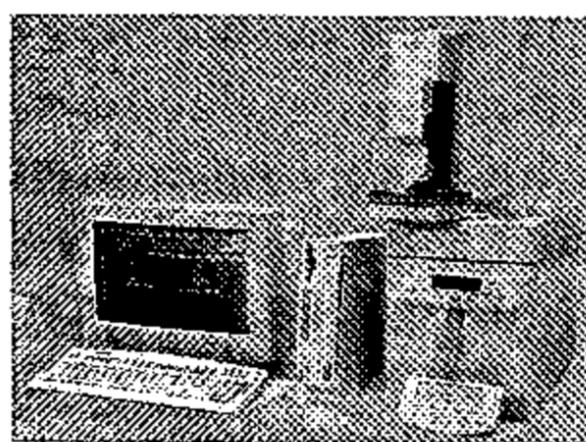


图 9-13 Sherlock 微生物鉴定系统

Sherlock 微生物鉴定系统由气相色谱(HP6890)、自动进样器、样品控制器、样品盘、火焰离子检测器(FID)和电脑组成。MIS 软件可以操作气相色谱、峰自动命名、数据存储和比较谱图。数据库中包括在标准条件下培养的菌株进行脂肪酸分析获得的 100000 种脂肪酸图谱。数据库产生软件允许用户自己创建新的数据库。软件中还包括聚类分析程序,可以产生树状图或二维主要成分分析图。

应注意到,细菌的脂肪酸组成不仅取决于其分类地位,还受培养基组成、培养温度和培养时间等条件的影响。因此必须采取标准化的培养条件,对于各大类微生物,Sherlock 微生物鉴定系统推荐的培养条件有:普通环境好氧菌在胰蛋白胨大豆琼脂(TSBA)上 28℃ 培养;营养要求高的好氧菌在更有营养的培养基上培养,如巧克力琼脂;临床好氧菌在 TSBA 上 35℃ 培养;真菌在 Middlebrook 7H10 或 7H11 琼脂琼脂上 35℃ 培养;酵母菌在沙保弱琼脂上 28℃ 培养;厌氧菌在蛋白胨酵母粉葡萄糖肉汤中 35℃ 培养。

样品注射量或色谱条件的变化会影响样品保留时间,因此,每 10 次分析后应使用校准混和物来纠正可能出现的保留时间漂移。MIS 的标准品混和物中包括 9 个~20 个碳的直链饱和脂肪酸和 5 种羟基酸。校准混和物的各个峰的保留时间对应相应长度碳链,可以用于脂肪酸鉴定。

## 12. BAX 系统

BAX 系统(见图 9-14)是 Dupont 公司推出的全自动 PCR 分析系统,用于食品和环境样品中微生物的快速筛选。该系统有筛选或确证沙门氏菌、大肠杆菌 O157、单核细胞增生李斯特氏菌和李斯特氏菌的 PCR 板。

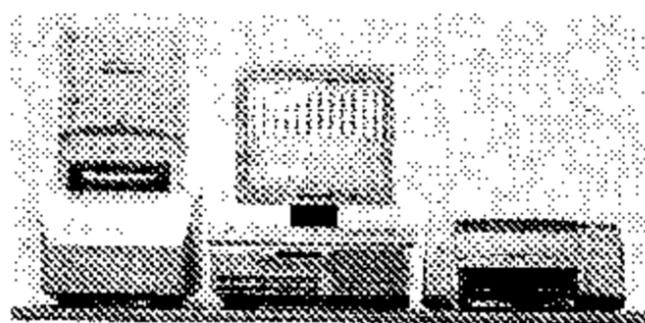


图 9-14 BAX 系统

样品经过增菌、裂解液消化处理后,细菌细胞壁破裂,释放出 DNA。消化后的样品移入 PCR 板上的反应孔(含有 PCR 需要的各种试剂和荧光染料)中,在仪器上反应数小时后,特异性片段获得扩增,并产生荧光信号,BAX 系统捕捉到信号后在屏幕上显示出阳性或阴性结果。BAX 系统在每个卡内都有对照 DNA,因此,无论样品内是否有目标 DNA,试剂内的对照 DNA 都会得到扩增,从而显示出一条扩增峰。只有出现此扩增峰才说明此次检测是可靠的。

BAX 系统需要每两周校验一次,可以很方便地根据计算机程序提示一步一步进行校验。

### 13. Ribo Printer 微生物鉴定系统

Ribo Printer(DuPont 公司产品,见图 9-15)是采用分子生物学方法的微生物鉴定系统。其原理是:从细菌中提取 DNA,用限制性内切酶将 DNA 降解,DNA 片段通过电泳分开,再转移到杂交膜上与标记有化学发光标记物的 DNA 探针杂交,发光的杂交片段被相机捕获,得到细菌的核酸图谱,再与计算机中存储的图谱进行比较,获得鉴定结果。数据库种包括 6400 多种图谱,分别对应 200 多属 1400 多种细菌或血清型。

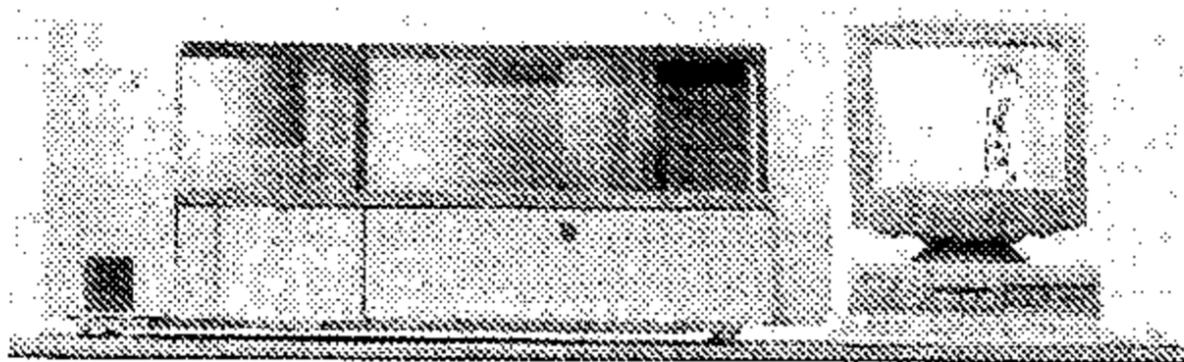


图 9-15 Ribo Printer 微生物鉴定系统

该系统的验证除了可以通过运行一批质控菌株来实现,还有两套商品化的验证包可供用户选择。主验证包内有完整的测试方案来进行安装确认、运行确认和操作确认(操作界面、数据分析和批处理),还有执行文件和检测方案。辅验证包提供有关用户要求规定和功能设计规定的完整描述。

## 二、微生物检验用仪器的验证

微生物检验用仪器必须经过验证,而且要定期验证以保证其良好、准确的工作状态。

验证此类仪器要由以下人员共同进行:仪器操作者、质量负责人、技术人员(维修人员)等。此外,需制定详细的验证方案,有的大型微生物检验系统其生产商就提供有验证方案。验证方案需包括安装确认、运行确认、性能确认以及变更控制等要素,还可以包括安全提示、注意事项、不符合项和纠正措施等。仪器供应商通常在仪器到货安装阶段就完成了安装确认和运行确认,验证人员只需进行其他步骤的验证。进行验证时要充分考虑到仪器的各部分,比如,对于大型全自动鉴定和药敏系统,就要对仪器的机械部分、培养舱、探测部分、计算机软件等各部分进行验证。当仪器配套软件更新时,一定要再进行验证。对有效期内的每个批号的鉴定板、鉴定条、鉴定卡使用标准菌株进行一次测定,核对每个反应的试验结果,确定其有效性。

验证微生物自动检测系统时,主要考察系统的准确性和再现性。通常用生产商推荐的标准菌株和实验室分离的菌株严格按照操作要求来验证系统。有时需要同时进行传统方法的检测,将仪器检测的结果与传统方法的结果比较。自动微生物计数系统验证时要用平板培养方法作比较。有关各种微生物检验系统验证的推荐质控菌株见表 9-4。

仪器经过验证之后,需按照制定的相关标准操作规程来对仪器进行使用、日常校验、维护保养、再验证等操作,应及时更新系统的操作软件,定期对仪器的探测部分进行检查,必要时请专业维护人员进行清洁,并进行校正,所有过程都应形成记录。

表 9-4 部分微生物检验系统的推荐质控菌株

鉴定卡/药敏卡	菌名	学名	ATCC 菌株号
MicroScan Dry Positive/Substrate and MIC	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
	藤黄微球菌	<i>Micrococcus luteus</i>	49732
	牛链球菌	<i>Streptococcus bovis</i>	49147
	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
MicroScan Dry Negative/Substrate and MIC	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922
	产酸克雷伯氏菌	<i>Klebsiella oxytoca</i>	49131
	普通变形杆菌	<i>Proteus vulgaris</i>	49132
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
MicroScan HNID	阴道加德纳氏菌	<i>Gardnerella vaginalis</i>	49145
	流感嗜血菌	<i>Haemophilus influenzae</i>	49144
	副嗜沫嗜血菌	<i>Haemophilus paraphrophilus</i>	49146
	卡他布兰汉氏菌	<i>Branhamella catarrhalis</i>	49143
	嗜乳糖奈瑟氏球菌	<i>Neisseria lactamica</i>	49142
MicroScan Rapid Anaerobic Panels	脆弱拟杆菌	<i>Bacteroides fragilis</i>	25285
	索氏梭菌	<i>Clostridium sordellii</i>	9714
	产气荚膜梭菌	<i>Clostridium perfringens</i>	13124
	大消化链球菌	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	29328
MicroScan Rapid Anaerobic MIC	脆弱拟杆菌	<i>Bacteroides fragilis</i>	25285
	多形拟杆菌	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	29741
	普通拟杆菌	<i>Bacteroides vulgatus</i>	29327
	不解糖消化链球菌	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	29743
MicroScan Rapid Negative Panels	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922
	产酸克雷伯氏菌	<i>Klebsiella oxytoca</i>	49131
	腐败希瓦氏菌	<i>Shewanella putrefaciens</i>	49138
	不动杆菌	<i>Acinetobacter sp.</i>	49139
MicroScan Rapid Positive Panels	表皮葡萄球菌	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	49134
	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
	耐久肠球菌	<i>Enterococcus durans</i>	49135
	牛链球菌	<i>Streptococcus bovis</i>	49133
	肺炎链球菌	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49136

续表 9-4

鉴定卡/药敏卡	菌名	学名	ATCC 菌株号
MicroScan Rapid Gram-Negative MIC	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922
	产酸克雷伯氏菌	<i>Klebsiella oxytoca</i>	49131
	不动杆菌	<i>Acinetobacter sp.</i>	49139 49137
	阴沟肠杆菌	<i>Enterobacter cloacae</i>	49141
MicroScan Rapid Gram-Negative Breakpoint	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922
	不动杆菌	<i>Acinetobacter sp.</i>	49466
MicroScan Rapid Gram-Positive MIC/Breakpoint	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
	牛链球菌	<i>Streptococcus bovis</i>	49475
	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	49476
MicroScan Rapid Yeast	白色念珠菌	<i>Candida albicans</i>	66027
	光滑念珠菌	<i>Candida glabrata</i>	66032
	乳酒念珠菌	<i>Candida kefyr</i>	66028
	热带念珠菌	<i>Candida tropicalis</i>	66029
	浅白隐球菌	<i>Cryptococcus albidus</i>	66030
	指甲隐球菌	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	66033
	新生隐球菌	<i>Cryptococcus neoformans</i>	66031
SENSITITRE Automated Gram Negative ID	产酸克雷伯氏菌	<i>Klebsiella oxytoca</i>	8724
	迟钝爱德华氏菌	<i>Edwardsiella tarda</i>	15947
	摩氏摩根氏菌	<i>Morganella morganii</i>	25830
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145
	普通变形杆菌	<i>Proteus vulgaris</i>	6896
	宋内氏志贺氏菌	<i>Shigella sonnei</i>	25931
SENSITITRE Manual Gram Negative ID	鲍氏不动杆菌	<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606
	弗氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	8090
	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	10031
	摩氏摩根氏菌	<i>Morganella morganii</i>	25830
SENSITITRE MIC Breakpoint	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922 35218

续表 9-4

鉴定卡/药敏卡	菌名	学名	ATCC 菌株号
SENSITITRE MIC Breakpoint	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
VITEK ANI	迪氏拟杆菌	<i>Bacteroides distasonis</i>	8503
	解脲拟杆菌	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	33387
	普通拟杆菌	<i>Bacteroides vulgatus</i>	8482
	微小消化链球菌	<i>Peptostreptococcus micros</i>	33270
	牙龈卟啉单胞菌	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
	痤疮丙酸杆菌	<i>Propionibacterium acnes</i>	11827
VITEK Bacillus	地衣芽孢杆菌	<i>Bacillus licheniformis</i>	12759
	球形芽孢杆菌	<i>Bacillus sphaericus</i>	4525
VITEK EPS	产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048
	奇异变形杆菌	<i>Proteus mirabilis</i>	7002
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	宋内氏志贺氏菌	<i>Shigella sonnei</i>	25931
VITEK GNI	奇异变形杆菌	<i>Proteus mirabilis</i>	7002
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	13883
	鲍氏不动杆菌	<i>Acinetobacter baumannii</i>	19696
	克氏耶尔森氏菌	<i>Yersinia kristensenii</i>	33639
	支气管炎博德特氏菌	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	10580
	气味沙雷氏菌	<i>Serratia odorifera</i>	33077
VITEK GNI Plus	支气管炎博德特氏菌	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	10580
	洋葱伯克霍尔德氏菌	<i>Burkholderia cepacia</i>	25608
	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	13883
	非脱羧勒克氏菌	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	23216
	类志贺邻单胞菌	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	51903
	产碱普罗威登斯菌	<i>Providencia alcalifaciens</i>	51902
	奇异变形杆菌	<i>Proteus mirabilis</i>	7002
	液化沙雷氏菌(变形斑沙雷氏菌食醮亚种)	<i>Serratia liquefaciens</i> ( <i>Serratia proteamaculans</i> subsp. <i>Proteamaculans</i> )	27592

续表 9-4

鉴定卡 药敏卡	菌 名	学 名	ATCC 菌株号
VITEK GNS MIC Panels	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922 35218
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
VITEK GPI	酿脓链球菌	<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615
	牛链球菌	<i>Streptococcus bovis</i>	9809
	马链球菌	<i>Streptococcus equi</i>	9528
	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
	耐久肠球菌	<i>Enterococcus durans</i>	6056
	猪红斑丹毒丝菌	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	19414
	木糖葡萄球菌	<i>Staphylococcus xylosum</i>	29971
VITEK GPS MIC Panels	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	35218
VITEK GPS MIC II Panels	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212 51299
	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	35218
	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
VITEK NFC	鲍氏不动杆菌	<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606
	豚鼠气单胞菌	<i>Aeromonas caviae</i>	15468
	支气管炎博德特氏菌	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	10580
	产气巴斯德氏菌	<i>Pasteurella aerogenes</i>	27883
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
VITEK NHI	流感嗜血菌	<i>Haemophilus influenzae</i>	9006
	副流感嗜血菌	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	7901
	卡他布兰汉氏菌	<i>Branhamella catarrhalis</i>	25238
	淋病奈瑟氏球菌	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	49981
	嗜乳糖奈瑟氏球菌	<i>Neisseria lactamica</i>	23970
	脑膜炎奈瑟氏球菌	<i>Neisseria meningitidis</i>	13102
VITEK Slidex-Staph	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923 51153
	表皮葡萄球菌	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14990

续表 9-4

鉴定卡/药敏卡	菌名	学名	ATCC 菌株号
VITEK YBC	土生隐球菌	<i>Cryptococcus humicola</i>	9949
	白色念珠菌	<i>Candida albicans</i>	14053
	浅白隐球菌	<i>Cryptococcus albidus</i>	34140
	解脂耶氏酵母	<i>Yarrowia lipolytica</i>	9773
MicroMedia Anaerobic MIC	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
	多形拟杆菌	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	29741
MicroMedia Fastidious	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922
	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
	流感嗜血菌	<i>Haemophilus influenzae</i>	49247
	肺炎链球菌	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619
MicroMedia Gram-Negative MIC/ID	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922
	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	产酸克雷伯氏菌	<i>Klebsiella oxytoca</i>	43165
	弗氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	43162
	奇异变形杆菌	<i>Proteus mirabilis</i>	29245
	奥斯陆莫拉氏菌	<i>Moraxella osloensis</i>	10973
MicroMedia Gram-Positive MIC/ID	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922
	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
	酿脓链球菌	<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615
BD Crystal ANR	迪氏拟杆菌	<i>Bacteroides distasonis</i>	8503
	脆弱拟杆菌	<i>Bacteroides fragilis</i>	25285
	可变梭杆菌	<i>Fusobacterium varium</i>	27725
	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	314
	不解糖消化链球菌	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	29743
BD Crystal E/NF	鲁氏不动杆菌	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	17925
	阴沟肠杆菌	<i>Enterobacter cloacae</i>	35030
	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922
	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	33495

续表 9-4

鉴定卡 药敏卡	菌 名	学 名	ATCC 菌株号
BD Crystal E/NF	普通变形杆菌	<i>Proteus vulgaris</i>	8427
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35032
BD Crystal R/SE	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	33605
	类志贺邻单胞菌	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	14029
	普通变形杆菌	<i>Proteus vulgaris</i>	8427
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	33495

## 参 考 文 献

- [1] N. F. Lightfoot & E. A. Maier. Microbiological Analysis of Food and Water; Guidelines for Quality Assurance[M]. Elsevier Science B. V. 1998.
- [2] 梁静频,程惠蓉,李亦德,等. 生物安全柜与超净工作台的设计要求、验证及应用[J]. 中国微生物学杂志,2001,13(3):155~156.

# 第十章 实验器具和材料

## 第一节 实验器具和材料的准备、使用及其验证

在食品微生物实验室中,要使用许多小型的器具和材料。食品微生物实验室的检验质量也依赖于大量所使用的小型器具和材料的质量控制。即使是最优秀的分析人员,如果没有高质量的材料,也无法得出准确的结果。本章主要讨论微生物实验室中常用的一些小型器具和材料,它们的性能对结果的质量保证是很重要的,缺少质量控制可能会产生错误的结果。

### 一、常用的器具和材料

微生物实验室使用的器具和材料很多,为了满足基本的检测任务,一般需要使用到的实验器具和材料如下:

#### 1. 一次性消耗品

实验室的一次性消耗品包括在测试方法中使用并在使用后抛弃的物品。这些物品包括但不局限于一次性移液管、一次性培养皿、称量纸、脂棉、均质袋、封口膜、灭菌指示带、试管帽(塞)或其他任何在测试中消耗的东西。

这些物品必须保持干净、无菌和精确。实验室要求制造商提供每一批产品的质量证书。实验室应保留这些证书。

#### 2. 可重复使用的器具和材料

实验室可重复使用的物品包括在分析中使用的,然后经清洗,灭菌后可重新使用的物品。这些物品包括但不局限于玻璃移液管、试管、玻璃器皿、塑料器皿、不锈钢设备、搅拌机、剪刀、试管刷、药品勺或其他可重新使用的材料。

##### (1) 玻璃器皿

常用的玻璃器皿包括培养皿、移液管、试管、广口瓶、三角烧瓶、量杯或量筒、载玻片和盖玻片等。

##### (2) 器具和材料

###### 1) 移液器

移液器主要有可调式和固定量程的移液器,同时又具有单道式和多通道式两种。其主要的生产商包括 Eppendorf 移液器、Transferpette 移液器、TOMOS 移液器、Nichiryo 移液器、Capp 移液器等。

###### 2) 接种针和接种环

接种针和接种环主要用于微生物的接种和转接。

### 3) 水

水是微生物试验用于培养基和试剂制备的最重要的因素。制备试剂和培养基所用的水,应为无离子水或用玻璃器皿蒸馏的蒸馏水。

### 4) 商业试剂盒

食物病原微生物是食品安全的重要内容,而对其的快速检测一直是相关研究的热点。近年来,微生物的快速检测和自动化研究进展迅速。快速检测及其自动化综合引用微生物学、化学、生物化学、生物物理学、免疫学以及血清学试验技术对微生物进行分离、检测、鉴定和计数,比传统方法更加快捷、方便和灵敏。其中,越来越多的商业试剂盒用来对食物病原微生物进行快速的检测和鉴定。

## 二、常用的器具和材料的采购和管理

### 1. 常用的器具和材料的采购

实验室常用器具和材料的采购和供给这一环节中,无论是形成的文件还是采购的方式,通常是和设备的采购相同,共同保障实验室的采购和供给的有效运行。有关内容参见第九章第一节的内容。

### 2. 常用的器具和材料的管理

新的试剂和材料在使用前,应由试剂管理员指定有关人员根据标准方法进行相应的验证,并填写相关记录。

试剂和材料接收后,试剂管理员应及时根据采购物品存放区域的划分进行储存,并根据要求定期对储存环境进行监测和控制。

试剂和材料要根据先进先出的原则进行使用,剧毒药品、贵重物品的使用应制定文件化程序,并按要求使用。

试剂管理员应经常检查采购物品的有效性,对于过期、变质及废弃、回收的试剂和易耗品要根据文件化程序及时处理。

## 三、常用的器具和材料的使用及其验证方法

### 1. 实验室的玻璃器皿

#### (1) 要求

实验室的玻璃器皿应使用低碱性硼硅酸盐制造。由于软质玻璃释放碱和改变培养基的pH,所以不应使用软玻璃制品。测量体积的玻璃器皿必须是A级,能够重复灭菌而不会引起体积的明显改变。所有的玻璃器皿都应保持清洁,无残留的培养基。每次使用之前都应该对玻璃器皿进行检查,检查内容包括边沿是否有缺口或内表面是否有被侵蚀的地方。凡是发现这种情况都应把它丢弃不再使用。特别要对移液管的顶部进行仔细检查,因为有缺口会造成不准确的计量。所有有裂缝,破碎的玻璃制品必须丢弃。此外,用于微生物学试验和化学试验的玻璃器皿不应混用。

所有玻璃器具应满足GB 17762—1999《耐热玻璃器具的安全与卫生要求》和JJG 196—1990《常用玻璃量器检定规程》的要求。倘若对毒性测试和精确度没有太高要求,一次性塑

料制品也可以使用,但要由日常工作程序来定。

## (2) 清洗和消毒步骤

### 1) 新购买玻璃制品的清洗

新购买的玻璃器皿因含有游离碱,使用前在 2% 盐酸或在蒸馏水中浸泡过夜,如果 pH 不为中性,要继续重复浸泡。新的三角瓶或试管的塑料盖或帽也都应经过处理,除去上面的有害物质。将它们浸在蒸馏水中,经过两次高压灭菌或连续两次用热去污剂洗涤,然后晾干。

### 2) 带油污的玻璃器具的清洗

凡沾有凡士林或石蜡,且未曾污染菌的玻璃器皿,洗刷前,尽可能的去除油污,可先在 50g/L 的碳酸氢钠溶液中煮两次,再用洗洁精和热水洗刷。

### 3) 污染微生物的玻璃制品的清洗

a) 带菌的移液管及滴管:可将染菌的移液管或滴管投入 3% 的来苏水或 5% 石炭酸溶液内浸泡数小时或过夜,经高压灭菌后,用自来水和蒸馏水冲洗干净。

b) 其他带菌的玻璃器皿:污染的器具在清洗前进行高温消毒。污染的试管经过灭菌后,趁热倒出其中的培养基,然后用含有清洁剂的热水洗刷,最后用清水进行淋洗和干燥。培养后的培养皿要放置到搪瓷缸中经高压蒸汽灭菌,不宜直接将平皿放入灭菌器内,防止琼脂融化后流出平皿外,堵塞排气孔。清洗后的玻璃器皿应明亮干净,无酸、碱和有毒残留。

注意:微生物试验用的玻璃器皿不能用硫铬酸浸泡处理。

## (3) 质量控制

对灭菌后待用玻璃器皿进行质量控制,包括 pH 的控制,无菌性和残留毒性。

### 1) pH 的控制

因为酸或碱有可能在玻璃器皿上残留,应进行随机批次的抽检,采用的方法是滴少量溴百里酚蓝 0.04% 溶液,观察颜色反应。显示的颜色变化从黄(酸)到蓝绿(中性)再到蓝(碱性),相应的 pH 范围从 6.5~7.3。

配制 0.04% 溴百里酚蓝溶液的方法是加 16 mL 0.01 mol/L 的氢氧化钠(NaOH)到 3.1 g 的溴百里酚蓝中,然后用蒸馏水稀释到 100 mL。

### 2) 无菌性检查

对实验室灭菌的玻璃器皿实行检查应该成为实验室的一项常规活动。对于灭菌的培养皿可用斑点检查法,其方法是将平板计数琼脂倒至随机选出的平皿中,把固化的平皿拿去培养,检查生长情况。采样用工具、稀释瓶、移液管无菌状况的检查使用磷酸盐缓冲液,用缓冲液冲洗被检查的器具,并用滤膜过滤冲洗液。然后将滤膜放在非选择性的培养基上面,并在该方法规定的条件下进行培养。要检查消毒过的试管,可在试管中加入巯基乙酸盐肉汤,并观察经培养后的细菌的生长情况。

### 3) 残留毒性检查

除 pH 的反应外,每年还要对洗过的玻璃器皿检查一次是否有杀菌或抑菌的残留物质留在表面。残留的毒性来源于玻璃器皿的洗刷过程和灭菌过程。因此结果应报告以下内容:日期、洗玻璃器皿所需要的去污剂的名称、培养皿的来源、平板计数琼脂的厂商和批号、

微生物计数的数量、签字等。

检查的方法为在液体培养基中培养产气肠杆菌。一种用煮沸的纯化的基准水配制培养基,另一种用已在测试容器中放置 24 h 的煮沸的基准水配制。如果培养 24 h 后和对照相比,测试容器培养基的菌落数的差异在 15%~20% 以上,则证明存在残留毒性。

## 2. 样品瓶和容器

样品瓶用于样品从采集点到分析点的传递。样品瓶或容器必须由无菌、无毒和合适的材料制成。

### (1) 样品瓶

#### 1) 水样

样品瓶应具有合适的体积以满足分析要求。

瓶中留有一定的空间允许处理前进行完全的混合,因此 500 mL 的瓶子完全满足分析的要求。在其他的场合,500 mL 的瓶子可能不够用,需要更大的体积。矿泉水、瓶装水、蒸馏水等将需要 1000 mL。

#### 2) 食品分析

食品分析通常采用原始的包装。对于取样非包装的食品或从大包装中取样,可以使用瓶子(用于液体)或塑料袋(用于固体)。如果需要对食品进行均匀化,塑料袋是十分适合的。

此外,标准容器(例如塑料瓶或玻璃罐)也可以使用。

### (2) 玻璃瓶或塑料瓶

广口样品瓶取样方便,可以避免外源的污染。它们由碱性较低的硼硅酸盐玻璃或其他非腐蚀性玻璃制成,也可以由不同的聚酯材料制成。

### (3) 塞子

毛玻璃或塑料塞子可以用于玻璃瓶的封口;塑料或金属螺帽,或者放在塑料瓶或罐子的塑料盖子都可以作为封口材料。玻璃塞和瓶子要分开灭菌,或者二者之间用纸分开,防止塞子粘连。金属帽尤其是铝帽,当高压灭菌时能够产生毒性,因此应该具有抗热的防泄漏保护层。当加热灭菌酚醛塑料和其他材料时,甚至干燥时以及 pH 改变时,同样能产生有毒的副产品。

### (4) 塑料袋

一些塑料袋含有硫代硫酸盐,能够中和消毒水中残留的氯。采用塑料袋采集水样需要经验,通常最好使用半刚性的瓶子。塑料袋适合于食品样品取样。

### (5) 消毒剂的中和

评价经氧化剂(氯、氯胺、溴或臭氧)消毒后的水的细菌学质量,当样品取样后需要立即终止其氧化反应。通常在需要时向样品瓶中加入还原剂(如硫代硫酸钠)。硫代硫酸盐经高压灭菌后不会受到破坏,但是可能受到其他处理的破坏。如果发生这种情况,可以向灭菌后的瓶中加入通过过滤除菌得到的无菌溶液。此外,也可以过量加入,使灭菌后残留量为 18 mg/L。硫代硫酸钠中和 1 mg 氯的理论值为 7.1 mg。因此,每 100 mL 水样应加入 1.8% (质量浓度)的硫代硫酸钠溶液 0.1 mL。螯合剂推荐用于保护重金属(如铜或锌)对细菌的作用。EDTA 或 NTA 溶液经过膜滤除菌后其浓度为 50 mg/L,需要时进行配制。

### (6) 瓶子的灭菌

瓶子的外表面在很多情况下易受到污染,例如储存空间的灰尘、工作人员的手和容器外表面的接触以及和其他三角瓶的接触等。在这种情况下,当用外表面受到污染的瓶子浸入液体取样时,可能会影响取样水的质量。因此,需要提供内部和外部同时无菌的瓶子,并用塑料袋装好避免污染。在取样前打开袋子,袋子同时作为无菌手套拿取瓶子。

瓶子的灭菌可采用高压湿热灭菌(121℃,15 min)或干热灭菌(180℃,2 h)获得。

### (7) 样品瓶的质量控制

#### 1) 无菌性

样品瓶无论是实验室自己准备的还是商品化的,无论是玻璃的还是塑料的,实验室必须确保其无菌性。对无菌性的检查必须是接受样品的前提条件。一般以1%的比例检查每一批的无菌情况。

向测试瓶中加入20 mL或50 mL熔化的营养琼脂(平板计数琼脂),旋转瓶子让瓶壁附着琼脂直到琼脂冷凝(如果需要,可以用水冷却)。20℃~22℃培养5 d后,应无任何菌落生长。

样品瓶的无菌检查也可以通过加入20 mL~50 mL的巯基乙酸发酵液,旋转瓶子润湿瓶壁,30℃培养5 d。如果瓶子的无菌性可以通过灭菌的过程控制,那么最后结果的控制不是必须的。

#### 2) 检测中和试剂的存在

硫代硫酸盐的存在可以通过碘量法测定,其原理如下:



在瓶中加入10 mL蒸馏水,用0.10 mol/L的碘溶液滴定,使用淀粉作为终点指示剂。

#### 3) 检测样品瓶中的残留毒性

样品瓶中残留的毒性来源于玻璃器皿的洗刷过程,塑料瓶中的成分或添加剂的释放以及来源于灭菌过程。如果使用实验室自己准备的玻璃瓶,需要检查是否存在残留毒性。对于一次性容器,尤其是塑料,每一批都应加以测试。

样品瓶中残留毒性的检查遵循玻璃器皿残留毒性的检查。

## 3. 培养皿

### (1) 容量

培养皿的直径通常为90 cm或120 cm,一些实验室使用更小的培养皿用来膜过滤的培养。

### (2) 灭菌和质量控制

遵循样品瓶质量控制的原则。

## 4. 移液管和移液器

### (1) 玻璃移液管和一次性塑料移液管

细菌学使用的移液管是刻度移液管,即量取的名义体积是在刻度线到移液管尖端的部分。如果尖端损坏,移液管就应丢弃。当使用吸耳球时,移液管一端应塞上棉花以避免交叉污染。

## (2) 移液器和吸头

移液器配有塑料圆锥型吸头,通过空气活塞的移动吸取液体,可以转移固定或可调体积的液体。某些移液器可同时配有多个吸头。移液器的形状也允许吸取狭长试管内的液体,因此需要选择和移液器相配的正确吸头,防止泄漏。

## (3) 校准和验证

移液器的尖端没有刻度线,量取体积的准确性依赖于固定体积移液器的类型,或可调体积活塞的调节位置。由于其精确度因敲打或吹气或由于液体吸入吸管的管筒内而易受影响,必须定期检查这些移液器的精确性。

### 1) 移液管容积的校正

在洗净的移液管(刻度管)内吸入蒸馏水使水弯月面恰好在标线处,然后把水放入预先称量好质量(应准确称至 0.01 g)的具塞小锥形瓶(不超过 50 g)中,塞好后,称取瓶及水的总质量,根据其放出水的质量,从水的温度及水相对密度计算,就可以得出移液管转移的体积。重复 2 次,使用 2 次测得的平均水重为放出的质量。

在实际操作中,移液管常和容量瓶平行使用,假如要校正 250 mL 的容量瓶,就把 5 个 50 mL 移液管(已校正过的)的水注入干燥的容量瓶内,若水面与容量瓶的标线并不符合,就在瓶颈水面处另做一记号。

### 2) 检查移液器的精确性

一年至少应该标定一次,发现异常情况应随时进行标定。每月应对加样体积进行校准。

标定方法包括有色溶液光谱分析法、称量校准法、同位素计数法以及使用配套校准盒等。标定多道移液器时,必须保证每一个加样头都能够连续、准确地加样。移液器的精密度应在厂家说明书规定的范围内。

[举例] 用蒸馏水称量法标定移液器,具体步骤如下:

- ① 将加样器调至拟校准体积,选择合适的吸头。
- ② 调节好天平(万分之一级别),在天平上放置一个小三角烧瓶。
- ③ 来回吸吹蒸馏水 3 次,使吸头湿润,用纱布拭干吸头。
- ④ 垂直握住加样器,将吸头浸入液面 2 mm~3 mm 处,缓慢(2 s~3 s)地吸取蒸馏水。
- ⑤ 将吸头离开液面,靠在管壁,去掉外部的液体。
- ⑥ 将加样器以 30°放入称量杯中,缓慢地将加样器压到第 1 档,等待 1 s~3 s,再压到第 2 档,使吸头里的液体完全排出。

⑦ 记录称量值。

⑧ 擦干吸头表面。

⑨ 按上述步骤称量 10 次,以均值作为最后加样器吸取的蒸馏水质量,按表 10-1 中的 Z 因子计算体积,然后按校准结果调节加样器。10 次标定称量均在要求的质量范围内为合格,贴上合格标签,注明标定日期,不合格移液器要请生产厂家进行校准。填写和保存校准记录。

加蒸馏水的量根据待标定移液器的规格而不同(见表 10-2)。

表 10-1 蒸馏水在不同温度和压强下的 Z 因子

温度/℃	Z 因子					
	800 hPa	853 hPa	907 hPa	960 hPa	1013 hPa	1067 hPa
20	1.002 6	1.002 7	1.002 7	1.002 8	1.002 9	1.002 9
21	1.002 8	1.002 9	1.003 0	1.003 0	1.003 1	1.003 1
22	1.003 1	1.003 1	1.003 2	1.003 1	1.003 2	1.003 2
23	1.003 3	1.003 3	1.003 4	1.003 5	1.003 5	1.003 6
24	1.003 5	1.003 6	1.003 6	1.003 7	1.003 8	1.003 8
25	1.003 8	1.003 8	1.003 9	1.003 9	1.004 0	1.004 1
26	1.004 0	1.004 1	1.004 2	1.004 2	1.004 3	1.004 3

表 10-2 称量法标定移液器方案

移液器规格/ $\mu\text{L}$	蒸馏水量/ $\mu\text{L}$	要求质量范围/mg
0.5~10	2	1.75~2.25
5~40	10	9.8~10.2
40~200	70	69.4~70.6
200~1 000	300	298.0~302.0
1~5	2 000	1 990.0~2 010.0
2~10	3 500	3 485.0~3 515.0

#### (4) 使用方法

实验室应建立移液管(移液器)的使用程序,确保执行标准操作,避免出现人为因素。如果所有的技术人员遵循同一的操作程序,分析的准确性就会增加。严禁用嘴吹吸移液管。推荐下面的步骤:

1) 检查移液管。型号是否合适,是否有残留的水珠,是否有裂缝或尖端损坏,如果有上述情况,则移液管不能使用。

2) 将移液管插入液面下约 2.5 cm。使用洗耳球缓慢地将液体吸到所需要的刻度线上约 5 cm 处。

3) 保持移液管的竖直。缓慢调整液面到所需要的刻度,定量时刻度线应和眼睛保持水平。

4) 紧紧按住移液管口。擦去吸液时沾在移液管外的液体。

5) 转移到合适的玻璃器皿中。转移时应注意:尽可能地竖直转移,让液体自然从移液管中流出,不要让移液管的尖端接触玻璃器皿的底部,避免引起流出不畅。液体流到移液管末端时,将尖端靠在器皿壁上,直到全部流出。

#### (5) 维护

1) 移液器属于精密设备,必须小心使用和保养。

2) 保持移液器的清洁,并根据制造商的说明书进行使用和储藏。

3) 选择合适的移液器和吸头,两者要相配。

4) 保留维护、保养、校准和验证方法的所有记录。

#### (6) 灭菌

塑料的一次性移液管通常购买时已经灭菌,盛放在无菌塑料袋中。拿出移液管后要及时密封塑料袋。玻璃移液管通常被放入玻璃、铝或钢容器内,通过高压灭菌或干热灭菌。在容器底部放入衬垫能够防止移液管尖端的损坏。移液器的吸头是一次性的,但是应定期地对移液器内部进行清洁,或者当液体接触移液器时,可以用75%酒精棉球进行擦拭。

#### (7) 无菌性的检查

移取适量无菌水至无菌平皿,然后倾注45℃~47℃的平板计数琼脂。冷却后,30℃培养5 d,应无菌落生长。此外,也可以接种巯基乙酸发酵液,30℃培养5 d,无菌落生长现象。

### 5. 金属器具

#### (1) 接种环,接种针

镍铬丝通常被用于制作接种环和接种针。当镍铬丝氧化时可用纱布进行清洁。铂金丝不像镍铬丝氧化快,同样能够快速冷却。也可以使用一次性的塑料接种环,接种环取出后要及时密封塑料袋。

#### (2) 镊子和压舌板

镊子和压舌板必须由不易腐蚀的金属材料制成,用于夹过滤膜的工具末端必须光滑,避免对易碎的纤维素膜的破坏。

### 6. 试管和塞子

#### (1) 稀释试管(瓶子)

污染的食品和水的微生物检查需要进行稀释,通常采用10倍稀释法,将1 mL样品液加入含9 mL蒸馏水或稀释液的试管中。有时候需要更大体积,则使用稀释瓶。

通常提前准备这些稀释试管或稀释瓶,所以分装的体积必须准确,在保存中维持稳定。稀释试管或稀释瓶必须允许剧烈混合。

除了适用于所有玻璃器皿的质量控制之外(例如无菌性、中性和无毒性),必须进行稀释体积的检查。高压灭菌后,都应随机抽取稀释剂检查每一批体积的正确性。未完全密封的试管长期保存,可导致液体明显丢失,因此使用时应定期进行检查(例如每个月),用来评价储存对体积的影响,保证试管装有正确的体积。

体积的测量可以通过称量进行。体积为100 mL的稀释剂(0.85%氯化钠+0.1%蛋白胨)质量约为101 g。高压灭菌后的体积偏差不得超过1%,体积改变2%为警戒水平,超过5%不能够使用。

也可将灭菌的液体吸取到灭菌的试管内来制备装有稀释剂的试管。这样可避免因灭菌造成的体积误差。

#### (2) 培养试管和其他小瓶、盖子和塞子

与稀释试管相比,培养试管的储存期较短,可以用棉塞、硅胶塞或塑料盖密封。盖子盖在试管的上部,若棉塞或硅胶塞没有完全盖住试管,打开时必须灼烧管口。如果棉塞被打

湿,就不能继续防止细菌的污染。

## 7. 过滤膜

### (1) 物理、化学和生物学规定

过滤膜(MFs)是微生物学分析中的重要组成部分,不同品牌以及同一品牌的不同批次之间质量存在很大的差异。

用于细菌培养的过滤膜由纤维素酯的网状组织构成。它们的孔径约为  $0.45\ \mu\text{m}$ 。没有必要使用主要用于无菌过滤液体的  $0.22\ \mu\text{m}$  过滤膜,因为  $0.22\ \mu\text{m}$  流速慢,它们虽然可以截获通过  $0.45\ \mu\text{m}$  过滤膜的微小细胞,但这些微小细胞所占的数量是可以忽略不计的。一些由聚酯砜为材料制成的可高压灭菌的过滤膜逐渐代替纤维素过滤膜的使用。

聚碳酸酯过滤膜为平的薄膜,具有精密校准的圆柱型小孔,主要用于稀释前细菌浓缩和在选择性琼脂上进行细菌培养。由于它们的流速很慢,在琼脂上进行菌落计数时,细菌通过这种滤膜利用琼脂上的营养物质不是很充分。

过滤膜法测得的菌落数量和其他的接种方法(例如倾注平板法)相比,不能存在显著差异。这就意味着过滤膜截获了所有的微生物细胞(或孢子),它们是无毒的,并且允许所有的营养物质,选择性物质和水可以被生长的菌落利用。

对过滤膜常规的质量控制应包括无菌性测试和恢复能力测试。如果后者的测试有问题,应检查滞留物和毒性。过滤膜不能重复使用。

### (2) 膜过滤无菌性的质量控制

对于每一批应对其无菌性进行检查,方法为将滤膜放在营养琼脂表面, $30^\circ\text{C}$  培养 3 周。这种控制每次分析时作为空白对照进行,如果空白有菌落生长应重复测试。

### (3) 保留能力

将体积较小的细菌( $0.2\ \mu\text{m}\sim 0.3\ \mu\text{m}$ ),如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)的稀释液( $10^3$  个细胞/100 mL),用过滤膜过滤,将滤液加入营养肉汤, $30^\circ\text{C}$  培养 48 h。做 5 个平行样,同时用蒸馏水代替粘质沙雷氏菌做 5 个平行对照。如果所有的肉汤都无菌生长,则结果合格。

### (4) 总浸出物

将 5 个过滤膜在  $70^\circ\text{C}$  条件下干燥 1 h,在干燥器中冷却至室温,用  $0.1\ \text{mg}$  精度的天平分别称重。然后在沸水浴中提取 30 min 后,重新干燥,冷却后称重。总浸出物的量每一批之间不能存在差异,应满足包装上标明的技术规范。

## 8. 去离子水和蒸馏水

培养基和试剂制备中使用的水为通过离子交换制取的去离子水或通过蒸馏获得的蒸馏水。水的质量应符合以下规格:

- 1) 单一金属含量在  $0.05\ \text{mg}/1\ 000\ \text{mL}$  以下;
- 2) 总金属含量不高于  $1.0\ \text{mg}/1\ 000\ \text{mL}$ ;
- 3) pH 在  $5.5\sim 5.7$  之间;
- 4) 残留氯含量不高于  $0.1\ \text{mg}/1\ 000\ \text{mL}$ 。

### (1) 设备

利用反相渗透柱制备的去离子水可用于培养基的制备。如果正常操作,此设备制备的水的质量要优于蒸馏水。利用木炭过滤可以保护蒸馏水不受水中氯的破坏。每天或在线连续监测电导率,如果电导率超过设定值,离子交换柱必须重新置换或再生。

### (2) 要求

配制培养基应使用蒸馏水或相同质量的水,目的是排除抑制或影响微生物生长的物质。如果蒸馏水是用氯消毒的水制备的,在蒸馏前应先对氯进行中和。

盛放蒸馏水的容器最好是由中性材料制成的(如中性玻璃、聚乙烯等),在初次使用前要检测并确保不存在抑制因子。有时需使用新制备的蒸馏水,以避免水中溶解二氧化碳。

对于通过反相渗透制备的水,如果保存不当,电导率会发生改变。制备后应立即进行电导率的测定。

### (3) 微生物培养基和试剂用水的测定

使用新的设备以及任何结果的变化都应进行此项测试。

#### 1) 原理

此方法是基于产气肠杆菌培养 24 h 所需的培养基。如果这种培养物的生长增加 20% 或减少 20%, 或比对照培养物多, 可以得出结论: 在所用的水中存在相应的促进剂或抑制剂。

#### 2) 玻璃器皿

所用的玻璃器皿只能用硼硅酸盐玻璃,而且在使用之前要用蒸馏水彻底冲洗,用干热灭菌法消毒灭菌。

#### 3) 试剂

必须用高纯度的化学药品。在配制试剂的时候,要使用新鲜的刚制备好的蒸馏水。采用下列试剂:

① 柠檬酸钠溶液:将 0.29 g 的柠檬酸钠溶解于 500 mL 水中。

② 硫酸铵溶液:将 0.60 g 硫酸铵溶解于 500 mL 水中。

③ 盐混合液:将 0.26 g 七水硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0.17 g 的二水氯化钙( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 0.23 g 的七水硫酸亚铁( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )和 2.5 g 的氯化钠( $\text{NaCl}$ )溶解于 500 mL 水中。

④ 磷酸盐缓冲液。

#### 4) 样品

收集 200 mL 质量不详的待测水和 200 mL 对照用水分别装入硼硅酸盐烧瓶中,煮沸 1 min~2 min,时间不可过长以防发生化学变化。将对照用水进行再蒸馏以满足下面的要求:在 25℃ 时,电阻大于 0.5 mΩ, pH 5.5~7.5,总有机碳 < 1.0 mg/L,单金属重(镉、铬、铜、镍、铅和锌) < 0.5 mg/L,总金属 ≤ 1.0 mg/L,铵或有机氮含量 < 0.1 mg/L,总氮残留量应检测不到,非自养菌平板计数 < 1 000/mL。

准备 5 个烧瓶,装有不同成分的溶液,具体如表 10-3 所示。

表 10-3 检测水时所用烧瓶中溶液的成分

单位为毫升

成分	对照测试		选择测试		
	对照 A	未知蒸馏水 B	食品可用水 C	氮源 D	碳源 E
柠檬酸钠溶液	2.5	2.5	—	2.5	—
硫酸铵	2.5	2.5	—	—	2.5
盐混合溶液	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
磷酸盐缓冲液	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
未知水样品	—	21.0	21.0	21.0	21.0
再蒸馏水对照物	21.0	—	5.0	2.5	2.5
每个烧瓶中的总体积	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0

准备产气肠杆菌接种物。在准备测试的前一天将产气肠杆菌划线接种在营养琼脂斜面上,35℃培养 18 h~24 h。用移液管将斜面上的产气肠杆菌培养物全部转移到 99 mL 的稀释液中,然后重复进行 100 倍的梯度稀释 2 次,最后从第 3 个瓶子里取液体制作 1+10 的稀释液到第四个瓶子里。取最后稀释过的液体 1.0 mL 加入到表 10-3 所描述的每个烧瓶中。

对最后两次稀释过的液体进行连续的平板计数,检查细菌数量。从第 3 次稀释液选择适当的体积,将这些液体用上述 5 个烧瓶中的 30 mL 液体稀释后,使每毫升含有 30 个~80 个活细胞。

计算确定生长抑制物使用式(10-1):

$$R = \frac{N_B}{N_A} \dots\dots\dots(10-1)$$

式中:

R——生长比率;

$N_B$ ——烧瓶 B 中的菌落计数, cfu/mL;

$N_A$ ——烧瓶 A 中的菌落计数, cfu/mL。

这个比率如果是 0.8~1.2 之间,说明水中不存在抑制物。比率如果少于 0.8 说明存在生长抑制物质,如果比率在 1.2 以上说明水中存在生长促进物质。

为了测定促进生长的氮和碳源,可以使用式(10-2):

$$R = \frac{N_C}{N_A} \dots\dots\dots(10-2)$$

式中:

R——生长比率;

$N_C$ ——烧瓶 C 中的菌落计数, cfu/mL;

$N_A$ ——烧瓶 A 中的菌落计数, cfu/mL。

为了测定促进生长的氮,可以使用式(10-3):

$$R = \frac{N_D}{N_A} \quad \dots\dots\dots(10-3)$$

式中:

R——生长比率;

$N_D$ ——烧瓶 D 中的菌落计数, cfu/mL;

$N_A$ ——烧瓶 A 中的菌落计数, cfu/mL。

为了测定促进生长的碳源,可以使用式(10-4):

$$R = \frac{N_E}{N_A} \quad \dots\dots\dots(10-4)$$

式中:

R——生长比率;

$N_E$ ——烧瓶 E 中的菌落计数, cfu/mL;

$N_A$ ——烧瓶 A 中的菌落计数, cfu/mL。

结果的解释:当烧瓶 B 中的菌落计数除以烧瓶 A 中的菌落计数所得的值超过 1.2,可以假定存在生长促进剂。这是很敏感的过程,并且实际上这个数字超过 3.0 时已经没有什么意义。

当烧瓶 B 中的菌落计数除以烧瓶 A 中的菌落计数所得的值在 0.8 以下时,可以假定在水中存在毒性物质。这个测试包括所用的允许量,而且当这个比率低于 0.8 时必须马上采取校正行动。

### 9. 厌氧罐和厌氧袋

厌氧罐和厌氧袋可作为厌氧培养箱的替代品,适用于小型的厌氧培养,具有使用简便、经济的特点。

#### (1) 要求

根据厌氧微生物的培养要求,可分为厌氧培养、微需氧培养、二氧化碳培养三大类。每一大类均具有配套的密封培养罐或培养袋和氧气指示剂。根据生产商的不同,其气体产生的方式和使用方式略有不同。厌氧罐和厌氧袋的举例见表 10-4。

表 10-4 厌氧罐和厌氧袋的举例说明

品 名		用途、配套及培养量
2.5L 系列	厌氧产气袋	完全厌氧菌培养;2.5 升≤12 皿,7.0 升≤42 皿
	微需氧产气袋	微需氧菌培养;2.5 升≤12 皿,7.0 升≤42 皿
	二氧化碳产气袋	嗜二氧化碳菌培养;2.5 升≤12 皿,7.0 升≤42 皿
	培养基脱氧剂	厌氧菌培养基还原;只配套用立式培养袋≤12 皿
350 mL 系列	厌氧产气袋	完全厌氧菌培养;15 cm×30 cm 培养袋,2 皿~4 皿
	微需氧产气袋	微需氧菌培养;15 cm×30 cm 培养袋,2 皿~4 皿
	二氧化碳产气袋	嗜二氧化碳菌培养;15 cm×30 cm 培养袋,2 皿~4 皿
氧气指示剂	氧气指示剂	厌氧培养监测专用

续表 10-4

品 名		用途、配套及培养量
培养容器	2.5 L 密封培养罐	配套用 2.5 L 安宁包 1 只
	7.0 L 密封培养罐	配套用 2.5 L 安宁包 3 只
	15 cm×30 cm 培养袋	配套用 350 mL 安宁包 1 只;自带密封压槽,重复使用
	立式培养袋	配套用 2.5 L 安宁包 1 只;自带密封压槽,重复使用

## (2) 质量控制

对厌氧罐和厌氧袋进行密封性能和厌氧状态的检查主要有以下方法:

**指示剂法:**在厌氧罐罐体密封后,为确认罐内的厌氧状态,可选择配套的氧气指示剂,按照商品的说明书,根据指示剂在有氧和无氧条件下的变化确定厌氧罐的密封情况和罐内氧气的状态。也可以选择硫乙醇酸盐流体培养基,作为氧化还原指示剂。该培养基中含有刃天青,在有氧情况下呈现红色,无氧情况下呈黄色,因此可以判定罐内的厌氧状态。

**生物指示剂法:**同厌氧培养箱生物指示剂方法,具体参见第九章第三节的相关内容。

## 四、商业试剂盒的使用、管理及其验证<sup>1)</sup>

### 1. 试剂盒的使用和管理

试剂盒作为实验室消耗性的材料,其购买和管理遵循实验室常用的器具和材料的采购和管理原则。

不同的试剂盒其使用要求不同,在使用时严格按照制造商的说明书进行。

试剂盒按照要求进行保存并在有效期内使用。

### 2. 基于生化和酶反应的微生物快速检测试剂盒

根据微生物生化试验结果进行编码分类鉴定是微生物鉴定的主要方式,许多微生物快速检测试剂盒就据此研制。微生物编码分类是应用大量已知微生物的相关生化试验结果出现的频率得出的数据进行分析,将反应结果数字化,得到数字编码。不同种微生物产生不同的编码,根据编码册或计算机数据库获得鉴定结果。此类鉴定试剂盒的共同特点是:1)接种上培养物后盖上盖子成为一个密闭的环境,防止污染。2)产生编码。所有反应,3个一组,一组内的3种反应如果是阳性,分别赋予1、2和4三个数值,如果是阴性记为0,将3种反应的数值相加组成一位数字,可以有以下几种可能:0、1、2、3、4、6和7,全部反应可以形成一个编码,这样一个编码就对应一种反应结果。

#### (1) API(analytic products incorporated)鉴定系统

该产品始于1970年,目前已有15种鉴定条,可鉴定600种以上的细菌。

API 20E是bioMérieux公司的产品。条形塑料上有20个反应管,内有反应底物,外有透明塑料盒。额外进行氧化酶试验,加上鉴定条上的项目共21个项目,每三个一组,每次鉴

1) 此部分涉及的商业试剂盒的商品是由供应商提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便读者,并不表示对这些产品的认可。如果有其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

定每组产生一个数字,形成 7 位数的编码(见图 10-1)。数据库从 1977 年的 87 个分类单位扩展到 2003 年的 102 个分类单位。目前最新的数据库版本是 4.0。如今,API 20E 已经成为商业鉴定系统的“金标准”,常被实验室用于与其他鉴定系统的比较。

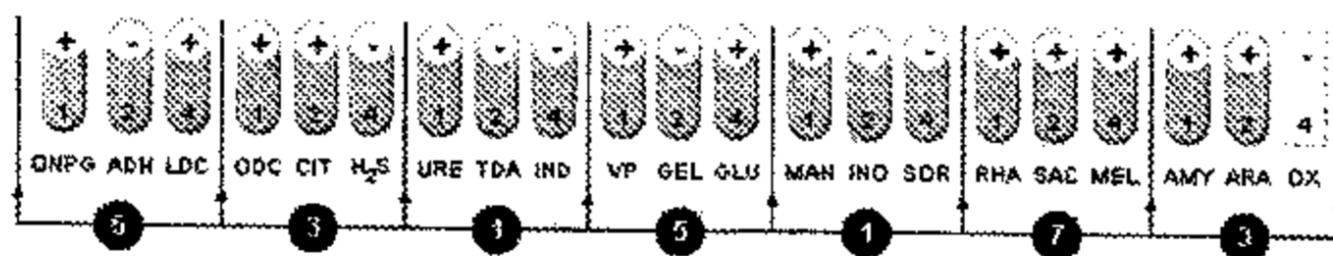


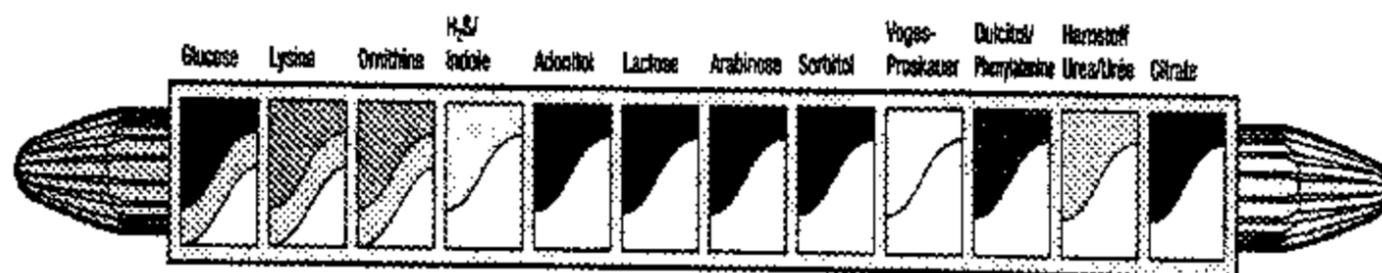
图 10-1 API 20 E 鉴定结果[5315173(57) 白沟维肠杆菌]

API 20NE 沿袭了 API 20E 的设计思路,也由 20 个反应管组成,其中 8 个含有传统反应的底物,12 个用来做同化反应。

此外,API 系统还有:API 10E(用于肠杆菌科细菌的初步筛选)、API RapiD 20E(4 h 快速鉴定肠杆菌科细菌)、API Strep(用于链球菌及相关菌的鉴定)、API Staphy(用于葡萄球菌的鉴定)、API 20A(用于厌氧菌的鉴定)、API CANDIDA(用于酵母菌的鉴定)API 20C Aux(用于酵母菌的鉴定)、API Listeria(用于李斯特氏菌的鉴定)、API Campy(用于弯曲杆菌的鉴定)、API NH(用于奈瑟氏球菌/嗜血菌的鉴定)、API Coryne(用于棒状杆菌的鉴定)、API 50CH(用于乳杆菌/芽孢杆菌/肠杆菌科细菌的鉴定)、API ZYM(快速检测 19 种酶活性)。

## (2) Enterotube II 鉴定系统

最初是 Roshe Diagnostics 于 1969 年开发的产品,后来此产品被 Becton Dickinson 公司买去,用来鉴定肠杆菌科细菌和四种氧化酶阴性非发酵菌。此产品的支撑物是一面平的硬塑料管,平的一面包有塑料膜。塑料管分成 12 个小室,每个小室内有一种预先倾注的培养基,一根接种针穿过这 12 个小室,两端有塑料帽(见图 10-2)。使用时拧开塑料帽,用此接种针挑取菌落,回拉接种针使 12 种培养基依次得到接种。根据反应结果产生 5 位数的编码。目前的数据库是 2003 年版的,包括 22 属 85 种菌和 6 个未分类的肠道菌群。



注: 12 个小室中的鉴定底物分别为葡萄糖 (glucose)、赖氨酸 (lysine)、鸟氨酸 (ornithine)、硫化氢/吲哚 (H<sub>2</sub>S/indole)、侧金盏花醇 (adonitol)、乳糖 (lactose)、阿拉伯糖 (arabinose)、山梨醇 (sorbitol)、V-P (voges-proskauer)、卫矛醇/苯丙氨酸 (Dulcitol/phenylalanine)、尿素酶 (hamstoff/Urea/Uree)、柠檬酸盐 (citrate)。

图 10-2 Enterotube II 鉴定系统

Oxi/Ferm Tube II 是 Enterotube II 的互补产品,原理与 Enterotube II 相似,用来鉴定革兰氏阴性氧化酶阳性发酵菌。

### (3) Micro-ID 鉴定系统

Micro-ID 是 Warner-Lambert Pharmaceutical 公司开发的,20 世纪 70 年代末投入市场,后来卖给 Organon Teknika 公司,现在已成为 Remel 公司的产品。它的塑料支撑物上包含 15 种试剂植入的圆片,用来检测酶和代谢情况,从而对肠杆菌科的细菌进行快速鉴定(见图 10-3)。菌悬液注入到每个孔中,培养 4 h 后,只需在 VP 测试孔中加入氢氧化钾(KOH),即可读取结果。15 项反应中每三项分为一组,产生 5 位数编码。该系列产品还有用于李斯特氏菌鉴定的 Micro-ID Listeria。

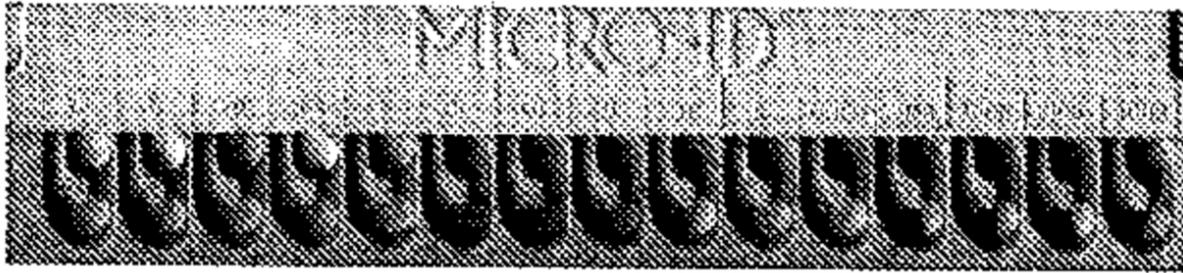


图 10-3 Micro-ID 鉴定系统

### (4) BBL Minitek System 鉴定系统

BBL Minitek System 鉴定板是带盖的长方形塑料盒,包括 12 个孔,共 32 项生化试验可供选择。鉴定时根据情况选择 12 种生化反应试剂加入鉴定板凹槽中,判读结果时与标准板对照获得鉴定结果。该系列产品有鉴定肠道菌、非发酵菌和奈瑟氏球菌的多种产品可供选择。

### (5) Microbact 鉴定系统

Microbact 是 Oxoid 公司产品,基于底物的利用和 pH 的改变(见图 10-4)。产品有三个系列:

1) 用于鉴定肠杆菌科细菌和其他革兰氏阴性杆菌的 Microbact™ 12A、12B、12E 和 24E。鉴定条 12A 和鉴定板 12E 用来鉴定普通肠道致病菌。鉴定条 12B 提供了 12 项补充试验,用于鉴定临床上不常见的一些肠杆菌科和氧化酶阳性革兰氏阴性菌。12A 和 12B 一起使用可以组成 24E,可以鉴定更多的种类。

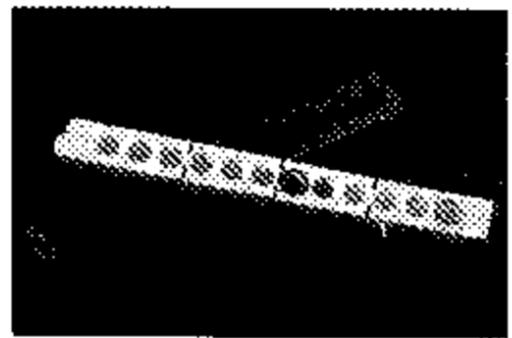


图 10-4 Microbact 鉴定条

2) Microbact™ 12L: 用于李斯特氏菌的鉴定,最快 4 h 获得检测结果。此鉴定条共 12 个反应孔,前 11 个是糖利用反应,最后一个孔检测快速溶血反应。

3) Microbact™ Staphylococcal 12S: 用于鉴定 22 种葡萄球菌,包括凝固酶阴性和阳性的种。

### (6) RapID 鉴定系统

RapID 系列鉴定板是 Innovative Diagnostic Systems(IDS)1989 年开发的产品,后来被美国的 Remel 收购。它们都使用了传统测试底物和显色底物,有针对不同类群微生物的多种鉴定板可供选择。RapID NF Plus 用来鉴定葡萄糖非发酵革兰氏阴性杆菌和特定的葡萄糖发酵非肠杆菌科细菌,鉴定板上设有 10 个反应孔,共 17 种底物,其中 7 个反应孔做两项测试(见图 10-5)。目前最新数据库版本包含 31 属 68 种。RapID onE 用来鉴定肠杆菌科细

菌和其他临床上的氧化酶阴性革兰氏阴性杆菌, 鉴定板上设有 18 个反应孔, 可进行 19 项测试, 其中一个孔添加试剂后相当于两项测试。目前数据库包含 28 属 60 种。RapID SS/u 用来鉴定尿液中分离的细菌, 鉴定板上有 10 个反应孔, 其中一个孔添加试剂后相当于两项测试。此外, 该产品还有其他种类, RapID CB Plus (用于鉴定棒状杆菌等革兰氏阳性菌)、RapID NH [用于鉴定奈瑟氏球菌 (嗜血菌)]、RapID STR (用于鉴定链球菌) 和 RapID Yeast Plus (用于鉴定酵母菌)。

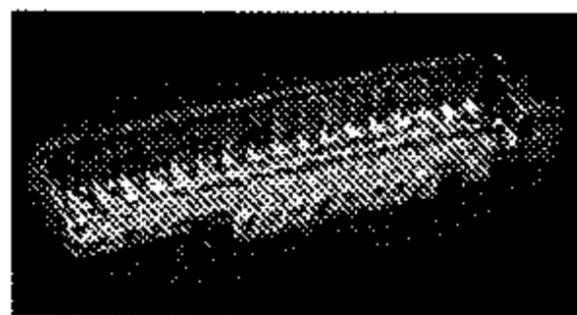


图 10-5 RapID 鉴定板

### (7) Uni N/F 鉴定系统

此系统最初由美国公司 Corning Medical Products 的子公司 Diagnostic Research 开发的, 然后卖给了 Flow Diagnostics, 现在已成为 Remel 公司的产品, 用来鉴定非肠道的非发酵革兰氏阴性杆菌。Uni N/F 系统由三部分组成: N/F Screen 42P 和 N/F Screen GNF 两种筛选管以及 Uni-N/F-Tek。Uni-N/F-Tek (见图 10-6) 是一个塑料圆盘, 中央有一个独立的孔, 周围围绕着 11 个独立的孔。每个孔含有一种传统培养基, 中央孔可做两项测试, 总共 13 个项目。氧化酶阳性的菌接种 42P 和 GNF 并培养, 据 42P 和 GNF 的结果接种 Uni-N/F-Tek。氧化酶阴性的菌先接种 r/b 肠道菌筛选系统, 如果仅生长不变色再接种 Uni-N/F-Tek。目前数据库包含 19 属 43 种细菌。该系列产品还有用于酵母菌鉴定的 Uni-Yeast-Tek (见图 10-7)。

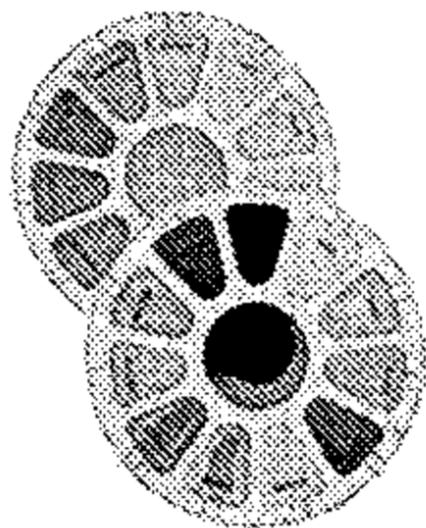


图 10-6 Uni-N/F-Tek 鉴定系统

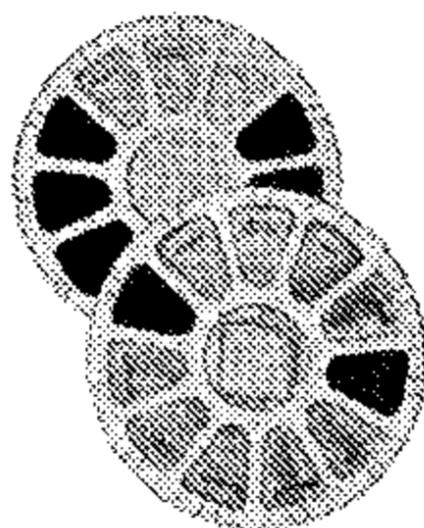


图 10-7 Uni-Yeast-Tek 鉴定系统

### (8) r/b Enteric Differential System 鉴定系统

最初由 Diagnostic Research 公司生产, 名称由来于它的设计者 William Rollender 和 Orville Beckford 的姓氏的第一个字母, 现在成为 Remel 公司产品。r/b 系统由两管培养基 r/b<sub>1</sub> 和 r/b<sub>2</sub> 组成, 另外还有一支补充管 Cit/Rham。有时还需要再添加一支 Soranase 管。由于该产品的鉴定项目少, 所以不易获得明确的鉴定结果。

### 3. 试剂盒的质量控制和验证

商业试剂盒的质量控制一般采用标准菌株进行质量控制。质控菌株为事后控制试剂盒质量的重要组成部分之一。无论开展实验室内部质量控制或实验室外部质量评价活动, 都需要质控菌株。这些菌株来源于专门的保存供应机构, 如美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 或

我国卫生部药物生物制品检定所菌种保藏中心(CMCC)。

标准菌株的制备:详见本章第三节的内容。

微生物鉴定试剂盒生产商规定以下 ATCC 菌株作为其产品的质控菌株(见表 10-5)。许多此类 ATCC 菌株可以以 Preceptrol® 培养物方式获得,它们是真正的 ATCC 菌株,且价格低廉。

多数组织包括 ATCC 建议:标准检测方法所用的培养物从最初 ATCC 菌株传代不应超过 5 次。ATCC 对第一代的定义为由 ATCC 提供的菌株经肉汤或琼脂培养后的培养物为第一代。每次转接到新的肉汤或琼脂作为一次传代。

表 10-5 部分商业试剂盒的 ATCC 质控菌株

试剂盒	菌名	学名	ATCC 菌株号
API 20 A	卵形拟杆菌	<i>Bacteroides ovatus</i>	8483
	溶组织梭菌	<i>Clostridium histolyticum</i>	19401
	产气荚膜梭菌	<i>Clostridium perfringens</i>	13124
	索氏梭菌	<i>Clostridium sordellii</i>	9714
API 20 C AUX II	劳伦隐球菌	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803
	光滑念珠菌	<i>Candida glabrata</i>	15126
	季也蒙念珠菌	<i>Candida guilliermondii</i>	6260
API 20 E II	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	35657
	阴沟肠杆菌	<i>Enterobacter cloacae</i>	13047
	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922
	奇异变形杆菌	<i>Proteus mirabilis</i>	35659
	嗜麦芽寡养单胞菌	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	51331
API 20 Strep II	浅绿气球菌	<i>Aerococcus viridans</i>	700406
	鹌鸡肠球菌	<i>Enterococcus gallinarum</i>	700425
	马链球菌兽瘟亚种	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	700400
	乳房链球菌	<i>Streptococcus uberis</i>	700407
API An-IDENT	龋齿放线菌	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929
	脆弱拟杆菌	<i>Bacteroides fragilis</i>	23745
	卵形拟杆菌	<i>Bacteroides ovatus</i>	8483
	溶组织梭菌	<i>Clostridium histolyticum</i>	19401
	产气荚膜梭菌	<i>Clostridium perfringens</i>	13124
API 20NE	嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	35654
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	粪产碱菌粪亚种	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	35655
	多食鞘氨醇杆菌	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	35656

续表 10-5

试剂盒	菌名	学名	ATCC 菌株号
API quadFERM+	淋病奈瑟氏球菌	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	31426
	嗜乳糖奈瑟氏球菌	<i>Neisseria lactamica</i>	23971
	粘液奈瑟氏球菌	<i>Neisseria mucosa</i>	19695
	卡他布兰汉氏菌(粘膜炎莫拉氏菌)	<i>Branhamella catarrhalis</i> ( <i>Moraxella catarrhalis</i> )	25240
API Staph	头葡萄球菌	<i>Staphylococcus capitis</i>	35661
	科氏葡萄球菌	<i>Staphylococcus cohnii</i>	35662
	木糖葡萄球菌	<i>Staphylococcus xylosus</i>	35663
API Coryne	化脓放线菌(化脓隐秘杆菌)	<i>Actinomyces pyogenes</i> ( <i>Arcanobacterium pyogenes</i> )	49698
	假白喉棒杆菌	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	10700
	甲型微小杆菌	<i>Exiguobacterium</i> sp. Group A	49676
	格氏李斯特氏菌	<i>Listeria grayi</i>	25401
API Rapid E	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	35657
	奇异变形杆菌	<i>Proteus mirabilis</i>	13315
	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	11775
API Staph II	微球菌	<i>Micrococcus</i> sp.	700405
	头葡萄球菌	<i>Staphylococcus capitis</i>	35661
	慢葡萄球菌	<i>Staphylococcus lentus</i>	700403
	木糖葡萄球菌	<i>Staphylococcus xylosus</i>	700404
BD Enterotube II	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922
	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	27736
	普通变形杆菌	<i>Proteus vulgaris</i>	6380
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
BD Minitex Enterobac- teriaceae ID	产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048
	阴沟肠杆菌	<i>Enterobacter cloacae</i>	13047
	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922
	普通变形菌	<i>Proteus vulgaris</i>	8427
BD Minitex Neisseria ID	淋病奈瑟氏球菌	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	19424
	脑膜炎奈瑟氏球菌	<i>Neisseria meningitidis</i>	13090
	嗜乳糖奈瑟氏球菌	<i>Neisseria lactamica</i>	23970

续表 10-5

试剂盒	菌名	学名	ATCC 菌株号
BD Minitek Neisseria ID	微黄奈瑟氏球菌	<i>Neisseria subflava</i>	14799
	卡他布兰汉氏菌	<i>Branhamella catarrhalis</i>	25238
BD Minitek NF/G-N Bacilli	支气管炎博德特氏菌	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617
	脑膜炎毒性金黄杆菌	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	13253
	普通变形杆菌	<i>Proteus vulgaris</i>	8427
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	腐败希瓦氏菌	<i>Shewanella putrefaciens</i>	8071
	嗜麦芽寡养单胞菌	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13637
BD OXI/FERM II	嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7966
	类志贺邻单胞菌	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	14029
	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145 27853
IDS Anaerobic MIC	脆弱拟杆菌	<i>Bacteroides fragilis</i>	25285
	多形拟杆菌	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	29741
	迟缓真杆菌	<i>Eubacterium lentum</i>	43055
IDS RapID ANA Panel	索氏梭菌	<i>Clostridium sordellii</i>	9714
	迪氏拟杆菌	<i>Bacteroides distasonis</i>	8503
	单形拟杆菌	<i>Bacteroides uniformis</i>	8492
IDS RapID CB Plus	化脓放线菌	<i>Actinomyces pyogenes</i>	19411
	多粘类芽孢杆菌	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	842
	假白喉棒杆菌	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	10701
IDS RapID NF Plus	鲍氏不动杆菌	<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606
	嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	35654
	脑膜炎毒性金黄杆菌	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	13253
	解脲寡源杆菌	<i>Oligella ureolytica</i>	43534
IDS RapID NH Panel	流感嗜血菌	<i>Haemophilus influenzae</i>	9006
	副流感嗜血菌	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	7901
	卡他布兰汉氏菌	<i>Branhamella catarrhalis</i>	8176
	尿道寡源杆菌	<i>Oligella urethralis</i>	17960
IDS RapID onE	产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048
	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922

续表 10-5

试剂盒	菌名	学名	ATCC 菌株号
IDS	普通变形杆菌	<i>Proteus vulgaris</i>	6380
RapID onE	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
IDS	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
RapID SS/u	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922
	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	13883
	奇异变形杆菌	<i>Proteus mirabilis</i>	25933
	褪色沙雷氏菌	<i>Serratia marcescens</i>	8100
IDS	耐久肠球菌	<i>Enterococcus durans</i>	11576
RapID Strep	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
	牛链球菌	<i>Streptococcus bovis</i>	9809
	酿脓链球菌	<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615
IDS	白色念珠菌	<i>Candida albicans</i>	14053
RapID Yeast	光滑念珠菌	<i>Candida glabrata</i>	2001
	乳酒念珠菌	<i>Candida kefyr</i>	2512
	劳伦隐球菌	<i>Cryptococcus laurentii</i>	66036
	解脂耶氏酵母	<i>Yarrowia lipolytica</i>	9773

## 第二节 培养基及其他诊断试剂的使用、 管理及其性能测试

快速方法和自动化在微生物分离、早期检测、鉴别和计数等工作中取得重要进展,但就微生物检验领域尤其是食品微生物检验,目前传统方法仍是主要方法,甚至被称为“金标准”,即应用培养法对微生物进行培养、分离和生化鉴定。这就对培养基及其他诊断试剂的质量提出很高的要求,从某种意义上说,保证培养基及其他诊断试剂的质量就是保证检验质量。

本节主要讨论培养基的使用、管理及其性能测试,关于诊断试剂的使用、管理及其验证详见第十二章第一节。

### 一、培养基的定义及分类

#### 1. 培养基的定义

培养基是指以液体、半固体或固体形式,包含天然或合成成分,用于促进微生物的繁殖或保持其活力的物质组成。

## 2. 培养基的分类

### (1) 按化学成分分类

纯化学培养基:培养基中只含有已知化学成分,如分子结构和纯度。

非纯化学培养基:培养基全部或部分由天然物质,加工过的物质或其他不纯的化学物质构成(如蛋白胨、脱脂奶粉等)。

### (2) 按状态分类

液体培养基:培养基为一种或多种成分的水溶液(如蛋白胨水、营养肉汤等)。

固体培养基和半固体培养基:含有不同浓度的固化物质(如琼脂、明胶等)的培养基(如营养琼脂、TSI、HE、DHL等)。

### (3) 按用途分类

运输培养基:在取样后和实验室样品处理前的时间,保护和维持微生物活性的培养基(如 Stuart 运输培养基或 Amies 运输培养基)。运输培养基中通常不允许包含使微生物增殖的物质,但是培养基应能保护菌株,确保它们不变质。

保存培养基:用于在一定期限内保护和维持微生物活力,以防对微生物在长期保存中产生不利影响,或使微生物在长期保存后容易复苏的培养基(如 Dorset 卵黄培养基)。

复苏培养基:能够使受损或应激的微生物修复、使微生物恢复正常生长能力,但不一定促进微生物繁殖的培养基(如营养肉汤、缓冲蛋白胨水等)。

增菌培养基:大多为液体培养基,能够给微生物的繁殖提供较适当的生长环境,包括:

1) 选择性增菌培养基:能够保证特定的微生物在其中繁殖、而部分或全部抑制其他菌体生长的培养基(如 SC、LST、RV 等);

2) 非选择性增菌培养基:能够保证大多数微生物生长的培养基(如 M 肉汤、营养肉汤)。

分离培养基:支持微生物生长的固体或半固体培养基,包括:

1) 选择性分离培养基:支持特定微生物的生长而抑制其他微生物生长的培养基(如 PALCAM 琼脂、MarConkey 琼脂、TCBS、显色培养基等);

2) 非选择性分离培养基:对微生物没有选择性抑制的分离培养基(如营养琼脂、脑心浸液琼脂等)。

注:显色培养基是在选择性培养基上加入了适量的带发色及荧光基团的酶底物(见表 10-6),发色团(荧光团)与特殊酶可识别的基团(见表 10-7)相连。目标微生物产生一些特殊的可水解发色及荧光底物的酶,使得发色和荧光基团释放出来,从而使目标微生物带上易于辨认的特殊颜色或发出荧光。

表 10-6 显色培养基常用的发色团和荧光团

英文名称	中文名称	吸收波长/颜色/荧光
5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-	5-溴-4-氯-3-吲哚	615 nm 蓝绿色至薄荷绿
5-Bromo-3-indoxyl-	5-溴-3-吲哚	610 nm 蓝色
5-Bromo-6-chloro-3-indoxyl-	5-溴-6-氯-3-吲哚	564 nm 紫色至洋红色
6-Chloro-3-indoxyl-	6-氯-3-吲哚	540 nm 玫瑰红至橙红

续表 10-6

英文名称	中文名称	吸收波长/颜色/荧光
N-Methylindoxyl-	N-甲基吲哚-	665 nm 绿色
2-Nitrophenyl-	2-硝基苯-	405 nm 黄色
4-Methylumbelliferyl-	4-甲基伞形基-	460 nm 蓝色(365 nm 紫外光照射)

表 10-7 与荧光基团相连的化合物

英文名称	中文名称	目标微生物	应用
-beta-D-glucuronide	-β-D-葡萄糖醛苷酸	大肠杆菌	水、食品、临床样品
-beta-D-galacto-pyranoside	-β-D-吡喃半乳糖苷	肠杆菌科、大肠菌群	水、食品、临床样品
-beta-D-gluco-pyranoside	-β-D-吡喃葡萄糖苷	肠球菌、克雷伯氏菌、肠杆菌	水、食品、临床样品
-N-acety-beta-D-galactosaminide	-N-乙酰-β-D-氨基半乳糖苷	白色念珠菌	临床样品
-N-acetyl-beta-D-glucosaminide	-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷	白色念珠菌	临床样品
-caprylate-nonanoate		沙门氏菌	水、食品、临床样品、环境样品
-myo-inositol-1-phosphate		致病性李斯特氏菌、蜡样芽孢杆菌、苏云金杆菌、覃状芽孢杆菌	食品、临床样品、卫生监测
-phosphate	-磷酸盐	金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌	食品、临床样品

鉴别培养基:能够进行一项或多项微生物生理学和生化特性鉴定试验的培养基(如尿素培养基、Kligler 琼脂等);能够用于分离培养的鉴别培养基被称作为分离(鉴别)培养基(如 XLD、DHL、TCBS 等)。

鉴定培养基:能够产生一个特定的鉴定反应而不需要做进一步确认实验的培养基(如 ONPG、氧化酶试剂)。用于分离的鉴定培养基被称为分离(鉴定)培养基(如显色培养基)。

多用途的培养基:同时具有多种不同用途的特定培养基。例如,血琼脂是一种复苏培养基,又是分离培养基,还可作为溶血试验的鉴别培养基。

#### (4) 按制备方法分类

即用型培养基:以即用形式置于容器中(如平皿、试管或其他容器)供应的培养基。

商品化脱水合成培养基:不立即使用的干粉形式(如粉末、小颗粒、冻干等形式)的培养基。这类培养基溶于水后能制备成一种或两种类型的培养基:1) 完全即用型培养基;2) 不完全即用型培养基,使用时加入不稳定成分。

#### (5) 实验室制备个别成分培养基

实验室按照培养基配方逐一称取个别成分,按照培养基制备程序进行。

## 二、培养基的质量控制

### 1. 必要的文件

生产企业应提供以下详细材料：培养基名称、各种成分名称和增补剂名称及产品编号；批号；培养基使用前的 pH；储藏条件和有效期；所有性能评价和所用的测试菌株；技术数据清单；质控证书；必要的安全(危害)数据。

实验室收到培养基后，应检查：培养基的名称和批号；接收日期；有效期；包装情况和完整性。

### 2. 培养基的储藏

应严格按照供应商提供的储存条件、有效期和使用方法进行培养基的保存和使用。

#### (1) 脱水培养基及其补充物

培养基通常要从供应商处购买，一般为脱水的粉状物或颗粒状，保存在密闭的容器中。用于菌株选择或鉴定的添加成分通常为冻干物或液体。培养基的购买应有计划，以利于存货的周转(即先购先用的原则)。实验室应保存有效的培养基目录清单，清单应包括以下内容：容器密闭性复查、首次开封日期、内容物的感官检查等。

对于新开封的培养基，应对其质量进行检查。可以通过粉末的流动性、均匀性、结块情况和色泽变化等判断脱水培养基的质量变化。任何受潮或物理性状发生明显改变的脱水培养基不应再使用。

#### (2) 商品化即用型培养基

应严格按照供应商提供的储存条件、有效期和使用方法进行保存和使用培养基。

#### (3) 商品化的脱水合成培养基或个别成分制备的培养基

这种类型培养基的储存期限各不相同，一般无法作统一规定，可参照不同标准中的规定执行。

培养基灭菌后分装到平皿、试管或测试瓶中，不能立即使用的培养基应避光、干燥保存。

除特殊说明和标准规定外，通常情况下基础培养基(如使用前添加成分的培养基)应放在 4℃ 冰箱中保存不超过 3 个月，或在室温下保存不超过 1 个月，以保证其成分不会改变；不稳定的选择性物质和其他添加成分应即配即用；对发生化学反应或含有不稳定成分的固体培养基也应即配即用，不可二次融化。

观察培养基颜色变化，是否有蒸发(脱水)，是否有微生物生长情况。当培养基发生这类变化时，应禁止使用。

使用和进一步加热前，应事先将培养基放置到室温。

### 3. 培养基的实验室制备

正确制备培养基是微生物检验的一个基本步骤。在处理脱水培养基和其他含有有害物质(如胆盐或其他选择剂)的培养基时，应遵守良好实验室规范(GLP)和生产厂商的注意事项。

使用商品化脱水合成培养基制备培养基时，应严格按照厂商提供的使用说明配制，如质量(体积)、pH、制备条件、灭菌条件、操作步骤等。

当使用独立成分制备培养基时,按配方准确配制,记录所有配制步骤。另外,记录所有使用成分的特性(如代号和批号等)。

#### (1) 水

水的使用要求和规范参见本章第一节的相关内容。

#### (2) 称量和复水

称量所需量的脱水培养基(注意缓慢操作,必要时佩戴口罩或在通风橱中操作,以防吸入含有有毒物质的培养基粉末),先加入少量的水,充分混合(注意避免培养基结块),然后再加水至所需的量。

#### (3) 溶解和分装

脱水培养基加水后适当加热,并不停搅拌使其快速溶解,必要时,重新溶解。含琼脂的培养基在加热前应先浸泡几分钟。由个别成分制备的培养基应将不同成分分别加入适量的水中,并充分溶解,然后再加水至所需的量。

#### (4) pH 的测定和调整

用 pH 计测 pH,必要时进行调整。在实验室用个别成分制备的培养基,除特殊说明外,培养基灭菌并冷却到 25℃ 时,培养基的 pH 变化不应超过 0.2 个 pH 单位。一般使用大约浓度为 40 g/L(约 1 mol/L)的氢氧化钠(NaOH)溶液或浓度约为 36.5 g/L(约 1 mol/L)的盐酸溶液进行培养基 pH 的调整。值得注意的是,商品化的培养基在高压灭菌前后的 pH 可能变化很大,但使用质量好的蒸馏水或去离子水配制时,灭菌前并不需要调节 pH。

#### (5) 分装

将配制好的培养基分装到适当的容器中,根据不同用途,容器的体积可为培养基体积的 1 倍、2 倍或 3 倍。

#### (6) 灭菌

培养基和试剂的灭菌通常采用湿热灭菌或过滤灭菌。但有些特殊培养基(如嗜盐琼脂培养基、MKTTn、科玛嘉弧菌显色培养基等)只能煮沸灭菌。煮沸后应迅速冷却,避光保存;明胶、血清、糖类等不耐高温的物质,应采取高压锅低温灭菌法(间歇灭菌法)灭菌;有些试剂不需灭菌,可以直接使用(参见相关国际标准或供应商使用说明)。

湿热灭菌通常在高压锅或制备培养基的容器中进行,一般高压灭菌采用 121℃ 灭菌 15 min。当培养基体积超过 1000 mL 时,要对灭菌条件进行适当的调整,但应按照国际标准或使用说明的规定进行。高压灭菌条件要通过放置测试条或热电偶进行监测,以保证灭菌的质量(参见第九章第三节的相关内容)。灭菌效果的控制是关键。加热后采用适当的方法冷却,以防加热过度,这对于肠道菌培养基(如 EC、LST、GN 等)和大容器中的培养基的灭菌十分重要。

过滤除菌可在真空负压或正压的条件下进行,使用孔径为 0.22 μm 的滤膜或过滤垫,过滤前先将滤膜或过滤垫除菌,过滤器在 121℃ 灭菌 15 min,可以整体灭菌,也可以拆卸后灭菌,必要时在生物安全柜中无菌组装。为达到过滤效果,操作者应事先将滤膜用无菌水润湿。

所有培养基湿热或过滤灭菌后,必须进行监测,尤其是要对 pH、颜色、无菌效果和均匀

性等指标进行监测。

#### (7) 添加成分的制备

制备含有有毒物质的添加成分(尤其是抗生素)时,需要特别小心(必要时在通风橱内操作),避免因粉末的扩散造成实验人员过敏或发生其他不良反应。制备溶液时要特别小心并按产品使用说明操作,不要使用过期的试剂。对于抗生素工作溶液,应当现用现配。在特定环境下,抗生素溶液应适量分装后冷冻储存,但解冻后的溶液不能再次冷冻,生产厂商应提供冷冻对抗生素活性影响的有关资料,也可由使用者自行测定。

### 4. 培养基的使用

#### (1) 琼脂培养基的融化

将培养基放到沸水浴中或使用有相同效果的方法(如高压锅中的蒸汽)使之融化。经过高压的培养基尽量减少加热时间以保证培养基的质量。避免过度加热,培养基融化后即可将其从加热器上取下,放入  $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  的恒温水浴锅中冷却,直至使用。融化后的培养基应尽快使用,放置时间一般不应超过 4 h。

#### (2) 培养基的脱气

必要时,将培养基在使用前放到沸水浴或蒸汽浴中加热 15 min,加热时松开容器的盖子;加热后盖紧盖子,迅速冷却至使用的温度。

#### (3) 添加成分的加入

对热不稳定的添加成分应在培养基冷却至  $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  时再加入。在加入灭菌的添加成分之前,先放置到室温,避免冷的液体造成琼脂凝结或形成片状物。将加入培养基的所有添加物缓慢充分混匀,然后尽快分装到要使用的容器中。

#### (4) 平板培养基的制备和储存

倾注融化的培养基到平皿中,使之在平皿中形成一个至少 2 mm 厚的琼脂层(对于直径 90 mm 的平皿,通常需要加入 15 mL 琼脂培养基)。将平皿盖好盖子后放到一个凉的水平平面使琼脂冷却凝固。在培养过程中,培养基会损失水分,当水分损失的量大于培养基总量的 15% 时,就会影响微生物的生长。

凝固后的培养基应立即使用或存放于暗处和(或)放在  $4^{\circ}\text{C} \sim 12^{\circ}\text{C}$  冰箱的密封袋中,最多存放一周或按厂商提供的标准执行。在平板底部做好标记,标记的内容包括制备日期和(或)有效期和名称,也可以使用培养基的编码系统进行标记。

将倒好的平板放在密封的袋子中冷藏保存可延长储存期限。为了避免产生冷凝水,平板应冷却后再装入袋中。储存前不要对琼脂培养基表面进行干燥处理。

对于采用表面接种形式培养的固体培养基,应先对琼脂表面进行干燥:干燥时,将平板盖揭开,将平板倒扣于烘箱(培养箱)中(温度设为  $20^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ ),或放在有对流风的无菌净化台中,直到培养基表面的水滴消失为止。注意不要过度干燥。商业化的平板琼脂培养基应遵照厂商提供的说明操作。

#### (5) 培养

培养时每垛最多堆放 6 个平板,平板间要留有空隙以进行空气流通,使培养物的温度尽快与培养箱温度达到一致。对于液体培养基,培养基温度与培养箱达到一致取决于很多因

素,如体积、内容物量、容器类型、培养类型等。在使用厌氧罐时,有时堆放的平板数可以超过6个。

#### (6) 培养基的弃置

所有污染的和未使用的培养基的弃置应采用安全的方式,而且要符合国家和地方法规的规定。

### 5. 成品的质量控制

#### (1) 物理质量的控制

实验室测试至少应包括以下内容:20℃~25℃时的pH;并需要进行观察:加入培养基的量和(或)琼脂层的厚度、颜色、透明度、是否存在肉眼可见的杂质、凝胶稳定性(粘稠度)和湿度。培养基的异常现象和可能原因见表10-8。

表 10-8 培养基的异常现象和可能原因

异常现象	可能原因	异常现象	可能原因
培养基不能凝固	制备过程中过度加热; 低 pH 造成培养基发生酸解; 称量不正确; 琼脂未完全溶解; 培养基成分未充分混匀	产生沉淀	制备过程中过度加热; 水质不佳; 脱水培养基质量差; pH 未正确控制
pH 不正确	制备过程中过度加热; 水质不佳; 外部化学物质污染; 测定 pH 时温度不正确; pH 计未正确校准; 脱水培养基质量差	培养基出现抑制 (重复性差)	制备过程中过度加热; 脱水培养基质量差; 水质不佳; 使用成分不正确(如成分称量不准,添加物浓度不正确)
颜色异常	制备过程中过度加热; 水质不佳; 脱水培养基质量差; pH 不正确; 外来污染	选择性差	制备过程中过度加热; 脱水培养基质量差; 配方使用不对; 添加成分不正确(如加入添加成分时培养基过热或添加浓度错误)

#### (2) 微生物指标控制

1) 污染检测:在每批制备好的培养基选取部分样品进行污染测试。

2) 测试菌株:测试菌株是具有代表性的稳定特征并能有效证明实验室培养基最佳性能的一套菌株。测试菌株主要购于标准菌株保藏中心,也可以是实验室自己分离的具有良好特性的菌株。最好使用从事品种分离的菌株。

培养基的测试菌株应包括:具有典型反应的强阳性菌株、微弱生长的阳性菌株(对培养基中选择剂等试剂敏感性强的菌株)、非特异性菌株(如显示不同发酵和荧光反应的菌株)和阴性菌株。

3) 即用培养基和试剂:商品化即用培养基的生产厂,如果经过 ISO 9001 体系认证或满足相应的质量要求,应向使用者提供相应的资质证明。这样,使用者就不必对培养基进行大量的培养基测试工作,但应保证其储存条件。

4) 商品化合成脱水培养基制备的培养基:对于每批制备好的培养基,除用有效菌株进行测试外,还应用实际样品进行检测,以更好地证明。不含指示剂或选择剂的培养基,只需用阳性测试菌株进行检测。含有指示剂或选择剂的培养基,应使用能证明其指示或选择作用的菌株进行试验。复合培养基(即需要加入添加成分的培养基)需要用具备有效性能的菌株逐批进行验证。对实验室制备的需加入添加成分的现成培养基同样适用。

5) 个别成分制备的培养基:建议除了按照上述方法进行培养基品质测试外,还要用改进的 Miles-Misra 技术、螺旋平板技术或菌落计数技术进行测试。实际上,如果食品中包含有受损的微生物,则应考虑培养基在受损微生物恢复方面的适用性。

### 三、培养基的性能测试

用于测试培养基性能的菌株数量取决于培养基是选择性的还是起营养作用的。

#### 1. 标准接种物的制备

对于半定量或定性试验和目标菌生长率测试,常用的接种水平为每个平板上或试管中含有 10 cfu~100 cfu 微生物。

对于培养基的选择性测试,将  $10^4$  cfu/mL~ $10^6$  cfu/mL 的非目标菌悬浮液接种到平板培养基上或试管中。

#### 2. 标准平板划线方法

必须使用标准方法在平板上划出菌落。可使用两种不同的划线方法,一种是五区平板划线法(见图 10-8),另一种是生态测量方法(见图 10-9)。

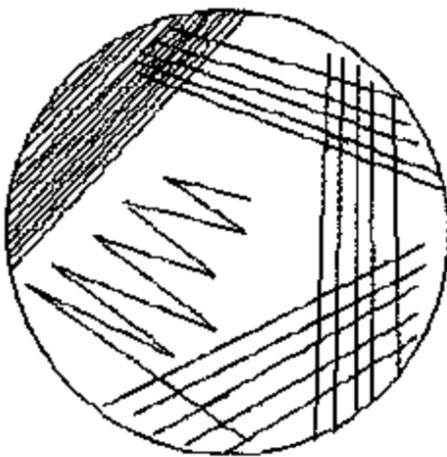


图 10-8 五区平板划线法

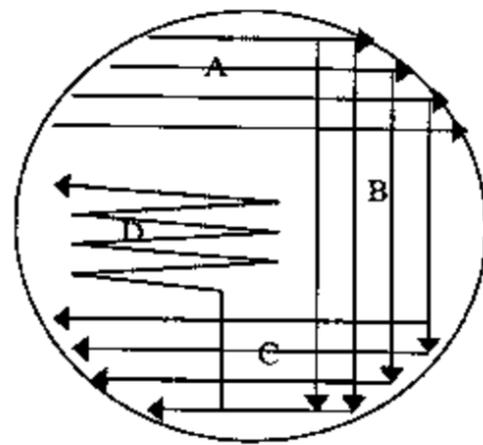


图 10-9 生态测量方法

#### 3. 性能测试参数

##### (1) 生长率

生长率应达到规定的最低限。对于定量方法,生长率  $P_R$  的计算见式(10-5):

$$P_R = \frac{N_S}{N_0} \dots\dots\dots (10-5)$$

式中:

$P_R$ ——生长率;

$N_s$ ——从一个或多个待测培养基平板上得到的菌落数;

$N_o$ ——从一个或多个规定的参考培养基平板上获得的菌落数,菌落数应 $\geq 100$  cfu。

对于半定量方法,则用生态测量方法接种平板,平板上连续区域(划线)得分的总和即为生长指标  $G_1$ ,这个值随培养基的变化而变化。所以必须与以前的指数和(或)标准培养基的  $G_1$  值相比较,并确保其变化不超过标准。每种培养基  $G_1$  的变化范围可以从已知方法获得的经验中得到。目测法可以得到定性评估结果。

#### (2) 选择性

必须证明一种培养基能抑制一种菌的生长时,必须测定其选择性。

选择因子  $S_F$  用式(10-6)计算:

$$S_F = D_o - D_s \quad \dots\dots\dots(10-6)$$

式中:

$S_F$ ——选择因子;

$D_o$ ——在参考培养基上能生长至少 10 个菌落的最高稀释度;

$D_s$ ——在测试培养基上显示相应生长的最高稀释度。

$S_F$ 、 $D_o$  和  $D_s$  用 lg 表示。例如: $D_o 10^{-4} = \lg 4.0$ ,  $D_s 10^{-3} = \lg 3.0$ , 选择因子  $S_F = 1.0$ 。

#### (3) 生理和生化特性(生长率和特异性)

通过菌落形态学、培养基的诊断特性及其选择性的测试来确定某种培养基的整体特性。

应规定和获取培养基的基本特性,应使用一组适当的测试菌株来确定目标菌在鉴别培养基上的生理生化特性及非目标菌被其抑制的强度。

#### (4) 抗菌试验特性

抗生素的抗菌作用取决于培养基中琼脂的扩散特性和其他成分的拮抗作用。测试食物样品中是否存在抗菌物质的培养基应与标准方法一致。

### 4. 固体培养基性能测试方法

#### (1) 定量平板法

该方法适用于大多数固体培养基,但不适用于一些霉菌的测试。根据平板上涂布菌液的体积和稀释倍数,计算出菌落数的平均值。在滴落法中,必须确定液滴的数量和体积。判定结果时,应计算生长率  $P_R$ ,必要时计算选择因子  $S_F$ 。

#### (2) 基于生态测量技术的半定量划线法

划线法适用于固体培养基和液体培养基的性能测试,但只能进行半定量测试。

使用该方法时,所有测试培养基应干燥到相同的程度,且整个步骤应标准化,以便比较不同批次培养基的测试结果。

用一接种环(1  $\mu$ L)按图 10-9 划线平板。在 A 区用接种环按 0.5 cm 的间隔划 4 条平行线,按同样的方法在 B 区和 C 区划线,最后在 D 区内划一条线。按标准方法所规定的培养时间和温度进行培养。

通常情况下要用同一个接种环对 A 区~D 区进行划线,在不同区域划线时不对接种环灼烧灭菌。在某些特殊情况下,当期望得到较低的生长指数  $G_1$  有明显区别时,在 A 区和 B 区接种时应更换接种环或对其进行灼烧灭菌。

培养后,评估菌落的形状、大小和密度,并计算生长指数  $G_1$ 。每条有菌落生长的划线记作 1 分,每个培养皿上最多为 16 分。如果仅一半的线有菌落生长,记作 0.5 分。如果划线上没有菌落生长或生长量少于划线一半,则记作 0。记录每个平板的得分总和便得到  $G_1$ 。如菌落在 A 区和 B 区全部生长,而在 C 区有一半线生长,则  $G_1$  为 10。

目标菌株的生长指标  $G_1$  大于 6 时,则判定培养基可接受。非选择性培养基的  $G_1$  值通常更高。目标菌应呈现典型的生长,而非目标菌的生长应部分或完全被抑制。

### (3) 定性划线法

该方法可用作固体培养基性能测试的补充。该方法只是定性测试,得分是指示性的。

取 1  $\mu\text{L}$  测试菌株培养物在测试培养基表面划平行直线,可同时在一个平板上接种多个菌株,但划线不能交叉,然后按标准方法中的培养时间和温度进行培养。

培养后按以下方法进行平板生长评估:0 表示无生长,1 表示生长,2 表示良好生长。

目标菌得分应为 2,并且有典型的外形、尺寸和菌落形态。非目标菌的生长应该部分或全部被抑制。

## 5. 液体培养基性能测试方法

为确定液体培养基的生长率,应接种适当的培养物。以下是用定量、半定量和定性方法评估生长率和选择性的方法。所推荐的这些方法都是通过将液体培养基以倾注或划线方式接种到琼脂平板上培养后计数或计算液体培养基分数而得出其生长数量的。对于液体培养基的定性测试方法,则通过肉眼观察来评估其特性反应。

### (1) 目标菌和非目标菌的定量稀释法

该方法还适用于评价新培养基、肉汤或稀释剂。

具体步骤如下:

1) 选择适当数量的试管培养基或吸取 10 mL 的液体培养基进行测试;

2) 接种目标菌:将少量测试菌株培养物(每管 10 cfu~100 cfu)接种于测试肉汤和标准肉汤,混匀;

3) 接种非目标菌:将大量菌株培养物(每管大于 1000 cfu)接种于测试肉汤和标准肉汤,混匀;

4) 接种目标菌和非目标菌的混合培养物:用少量(每管 10 cfu~100 cfu)目标菌测试肉汤和标准肉汤。同时每管接种大量非目标菌(每管大于 1000 cfu),混匀;

5) 稀释剂和运输培养基中目标菌和非目标菌的接种:接种测试菌于稀释剂中(每管 100 cfu~1000 cfu),混匀;

6) 按标准方法中的培养时间和温度进行培养。

培养后,根据混合菌株中的不同微生物类型对目标菌株和非目标菌株进行计数。

1) 按“3. 性能测试参数”得到标准肉汤和测试肉汤的  $P_R$  和  $S_F$  值进行相对结果判定:

① 目标微生物的  $P_R$  值不应小于 0.1(生长的不同不能超过 1 个数值);

② 非目标微生物的  $S_r$  值至少应达到 2；

③ 混合菌株中，目标菌的生长不应受到非目标菌的抑制，即目标菌始终应为优势菌群。

2) 在混合菌株中目标菌数量的最低值及非目标菌数量的最高值应符合以下要求：

① 目标菌的最低浓度应达到  $10^6$  cfu/mL $\sim$  $10^8$  cfu/mL；

② 在选择性肉汤培养物中非目标微生物的最高浓度不应超过  $10^4$  cfu/mL。

3) 稀释和运输培养基不应引起目标菌和非目标菌数量的减少或增加。菌株在这些培养基中培养后的数量变化应在最初计数的  $\pm 5\%$  的范围内。

(2) 目标菌、非目标菌和混合菌的半定量单管法

1) 测试步骤

① 挑选一定数量试管或在一批培养基中吸取 10 mL 样品进行试验；

② 目标菌、非目标菌以及混合菌的接种：在装有测试肉汤的试管中同时接种 10 cfu $\sim$ 100 cfu 的目标菌与更多数量 ( $>1000$  cfu/管) 的非目标菌，混匀；

③ 非目标菌的接种：在装有测试肉汤的试管中接种较高数量 ( $>1000$  cfu) 的菌，混匀培养；

④ 按标准方法中规定的培养时间和温度进行培养；

⑤ 取 10  $\mu$ L 混合菌株划线接种到特定目标菌的选择性平板上；

⑥ 从非目标微生物培养液中取一环 (约 10  $\mu$ L) 菌液在非选择性平板 (如 TSA) 上划线；

⑦ 将两个平板按标准要求适当条件下培养适当时间 (参见特定标准)。

2) 计算和结果判定

如果选择性琼脂平板上至少生长有 10 个目标微生物菌落，则表明液体测试肉汤的生长率满意。

如果非选择性琼脂平板上没有菌落生长 (或者少于 10 cfu)，则表明液体测试肉汤的选择性满意。

(3) 单管定性法

单管定性法适用于液体培养基的性能测试。该法仅用于定性，因此其得分也只是指示性的。四硫磺酸盐肉汤等浑浊的培养基不能用于这项测试。

用一环 (1  $\mu$ L) 工作菌株培养液直接接种到用于性能测试的液体培养基中。培养时间和温度参见标准方法。

通过目测获得的生长分数 (如 0 $\sim$ 2) 进行定性评估。

用试管和瓶子测试时：0 表示零浊度，1 表示很轻微的浊度，2 表示严重的浊度。目标微生物的浊度值应为 2。

#### 四、测试结果文件化

依照客户的要求，培养基的制造商或供货商应提供特定微生物的生长特性及特定批次培养基的常规信息。同时，所有常规性能测试的数据 (见表 10-9 $\sim$ 表 10-16) 应按质量体系的要求归档并在有效期内按适当方法保存。建议使用控制单进行文件归档，并对测试结果进行评估。

表 10-9 培养基质量控制和性能测试记录

培养基内部质量测试控制卡				
培养基:		制备体积:	倾注日期:	内部批号:
脱水培养基(批号):	供应商:	批:	总量:	日期/签名:
添加剂:	供应商:	批:	总量:	日期/签名:
制备详情:				
物理质量控制				
预期 pH:	测定 pH:	质量确认: 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/>	缺陷:	日期/签名:
预期质量和/或层厚:	观察:	质量确认: 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/>	缺陷:	日期/签名:
预期颜色:	观察:	质量确认: 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/>	缺陷:	日期/签名:
预期透明度/可见杂质	观察:	质量确认: 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/>	缺陷:	日期/签名:
预期凝胶稳定性/粘稠度/湿度:	观察:	质量确认: 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/>	缺陷:	日期/签名:
微生物污染				
测试平板或试管编号: 培养:	结果:	质量确认: 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/>	污染平板或试管 编号:	日期/签名:
微生物生长——生长率				
菌株: 培养: 标准培养培养基:	标准:	结果:	质量确认: 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/>	日期/签名:
微生物生长——选择性				
菌株: 培养: 标准培养培养基:	标准:	结果:	质量确认: 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/>	日期/签名:
微生物生长——特异性				
菌株: 培养: 标准培养培养基:	标准:	结果:	质量确认: 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/>	日期/签名:
本批发放:				
储存详情:	本批发放: 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/>			日期/签名:

记录人:

日期:

审核人:

日期:

表 10-10 微生物计数用选择性培养基推荐性能测试信息

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
Baird-Parker	S <sup>a</sup>	凝固酶阳性葡萄球菌	EN6888-1	生长率	24 h~48 h, 37°C	金黄色葡萄球菌 ATCC 6538; 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 <sup>b</sup>	TSA	定量	PR≥0.5	黑色(灰色)菌落带, 透明带(蛋黄明化反应)
				选择性	48 h, 37°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	定性	全部抑制	—
				特异性	24 h~48 h, 37°C	表皮葡萄球菌 ATCC 12228 <sup>b</sup>	—	定性	—	黑色(灰色)菌落带透明带, 无蛋黄明化反应
RPFA	S	凝固酶阳性葡萄球菌	EN6888-2	生长率	24 h~48 h, 37°C	金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 或 6538p; 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 <sup>b</sup>	TSA	定量	PR≥0.5	黑(灰)/色菌落带, 浑浊晕环
				选择性	48 h, 37°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	定性	全部抑制	—
				特异性	24 h~48 h, 37°C	表皮葡萄球菌 ATCC 12228 <sup>b</sup>	—	定性	—	黑(灰)/色菌落带, 浑浊晕环
OGA(OGY)	S	酵母菌(霉菌)		生长率	3 d~5 d, 37°C	白色念珠菌 ATCC 10231; 黑曲霉 ATCC 16404 <sup>b</sup> ; 圆弧青霉 ATCC 16025; 酿酒酵母 ATCC 9763	已被确认的 SDA	定量	PR≥0.5	每种菌株的典型菌落
				选择性	3 d~5 d, 37°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup> 枯草芽孢杆菌 ATCC 6633	—	定量	全部抑制	—

续表 10-10

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
MRS	S	乳酸菌	ISO 15214	生长率	72 h, 30°C	清酒乳杆菌 ATCC 15521 <sup>b</sup> ; 有害片球菌 ATCC 29538; 乳酸乳细菌 ATCC 19435 <sup>b</sup>	MRS	定量	PR ≥ 0.5	每种菌株的典型菌落
				选择性	72 h, 30°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	定量	全部抑制	—
						蜡样芽孢杆菌 ATCC 11778		定量		
MYP	S	枯草芽孢杆菌	EN ISO 7932	生长率	24 h~48 h, 30°C	蜡样芽孢杆菌 ATCC 11778 <sup>b</sup>	TSA		PR ≥ 0.7	具沉淀带的粉色菌落
				选择性	48 h, 37°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	定性	全部抑制	—
				特异性	48 h, 37°C	枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 <sup>b</sup>			—	不具沉淀的黄色菌落
Oxford	S	单核细胞增生李斯特氏菌	EN ISO 11290	生长率	48 h, 37°C	单核细胞增生李斯特氏菌 1/2a ATCC 19111	TSA	定量	PR ≥ 0.5	具黑色沉淀带, 灰黑菌落
						单核细胞增生李斯特氏菌 4b ATCC 13932 <sup>b</sup>				

续表 10-10

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
Oxford	S	单核细胞增生李斯特氏菌	EN ISO 11290	选择性	48 h, 37°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	定性	全部抑制	—
						粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433				
						白色念珠菌 ATCC 10231				
PALCAM	S	单核细胞增生李斯特氏菌	EN ISO 11290	生长率	48 h, 37°C	单核细胞增生李斯特氏菌 1/2 a ATCC 19111	TSA	定量	PR ≥ 0.5	具黑色沉淀带, 灰黑菌落
						单核细胞增生李斯特氏菌 4b ATCC 13932 <sup>b</sup>				
				选择性	72 h, 30°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	-	定性	全部抑制	—
						粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433				
TS(C)	S	空肠弯曲杆菌	EN ISO 7937	生长率	20 h, 37°C	产气荚膜梭菌 ATCC 13124	TS (C)	定量	PR ≥ 0.7	黑色菌落
						产气荚膜梭菌 ATCC 12916				
				选择性 TSC	20 h, 37°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739	—	定性	全部抑制	—
						粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433	-	定性		

续表 10-10

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应	
VRBG	S	肠杆菌科	ISO 7402 ISO 8907	生长率	24 h, 37°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	TSA	定量	PR ≥ 0.5	带有或不带沉淀带的粉色或红色菌落	
						鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028					
				选择性	20 h, 37°C	粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433 <sup>b</sup>		定性	全部抑制	—	
VRBL		大肠菌群	ISO 4832	生长率	20 h, 30°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	TSA	定量	PR ≥ 0.5	带或不带沉淀带的淡紫色菌落	
				选择性	24 h, 30°C	粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433 <sup>b</sup>	—	定性	全部抑制	—	
				特异性	24 h, 30°C	铜绿假单胞菌 ATCC 27853	—	定性		无色至浅棕色菌落	
CT-SMAC	S	大肠杆菌 O157	ISO 16654	生长率	24 h, 37°C	大肠杆菌 O157: H7 ATCC 43894 或 43895 (无毒菌株)	TSA	定量	PR ≥ 0.5	透明菌落, 表面淡黄棕色, 菌落直径约 1 mm	
				选择性	24 h, 37°C	金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 或 ATCC 25923 <sup>b</sup>		定性	全部抑制	—	
				特异性	24 h, 37°C	大肠杆菌 ATCC 11775 或 25922 <sup>b</sup>	—	定性	—	粉色菌落	
BGBLB	L <sup>c</sup>	大肠菌群	ISO 4831	生长率	24 h~48 h, 30°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>		半定量	浊度 2+ 导管 1/3 产气	产气并浑浊	
						弗氏柠檬酸杆菌 ATCC 43864					
				选择性	24 h~48 h, 30°C	粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433 <sup>b</sup>		定性	不生长	—	

续表 10-10

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
LST	L	大肠菌群	ISO 4831	生长率	24 h~48 h, 30℃	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	半定量	浊度 2+ 导管 1/3 产气	产气并浑浊
						弗氏柠檬酸杆菌 ATCC 43864				
				选择性		粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433 <sup>b</sup>	—	定性	不生长	
EC	L	大肠杆菌	ISO 7251	生长率	24 h~48 h, 44℃	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	半定量	浊度 2+ 导管 1/3 产气	产气并浑浊
				选择性	24 h~48 h, 44℃	铜绿假单胞菌 ATCC 27853 <sup>b</sup>	—	定性	不生长	
注:固体培养基也可以使用半定量平板技术。										
<sup>a</sup> S=固体培养基。										
<sup>b</sup> 实验室使用的菌株。										
<sup>c</sup> L=液体培养基。										

表 10-11 微生物计数用非选择性培养基推荐性能测试信息

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
PCA	S <sup>c</sup>	全部微生物	ISO 4833	生长率	72 h, 30℃	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	TSA	定量	PR≥0.7	
						金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 或 6538p				
						枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 <sup>b</sup>				
<sup>a</sup> S=固体培养基。										
<sup>b</sup> 实验室使用的菌株(最小)。										

表 10-12 选择性增菌培养基推荐性能测试信息

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
EE	L <sup>a</sup>	肠杆菌科	ISO 7402 ISO 8523	生长率	24 h, 37℃	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup> 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028	—	半定量	VRBG 上 >10 个菌落	粉色至红色菌落, 有或没有沉淀带
				选择性		+粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433 <sup>b</sup>			全部抑制	
Half-Fraser	L	单核细胞增生李斯特氏菌	EN ISO 11290-1	生长率	24 h, 30℃	单核细胞增生李斯特氏菌 1/2 a ATCC 19111	—	半定量	Oxford 或 PAL-CAM 上 >10	灰色至黑色菌落具有黑色带
						或单核细胞增生李斯特氏菌 4b ATCC 13932 <sup>b</sup>				
						+大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>				
						+粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433 <sup>b</sup>				
				选择性	24 h, 30℃	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	半定量	TSA 上全抑制	—
						+粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433 <sup>b</sup>			TSA 上 <100	
Fraser	L	单核细胞增生李斯特氏菌	EN ISO 11290-1	生长率	24 h~48 h, 30℃	单核细胞增生李斯特氏菌 1/2 a ATCC 19111	—	半定量	Oxford 或 PAL-CAM 上 >10	灰色至黑色菌落, 具有黑色带
						或单核细胞增生李斯特氏菌 4b ATCC 13932 <sup>b</sup>				
						+大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>				

续表 10-12

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
Fraser	L	单核细胞增生李斯特氏菌	EN ISO 11290-1	生长率	24 h~48 h, 30℃	+粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433 <sup>b</sup>				
				选择性	24 h~48 h, 37℃	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	-	半定量	TSA 上全抑制	
						+粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433 <sup>b</sup>			TSA 上 <100	
ITC	L	小肠结肠炎耶尔森氏菌	ISO 10273	生长率	48 h, 25℃	小肠结肠炎耶尔森氏菌 ATCC 23715 或 9610 <sup>b</sup>	-	半定量	CIN 或 SSDC 上 >10	每种培养基上的典型菌落(见标准)
						大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>				
						+铜绿假单胞菌 ATCC 27853 <sup>b</sup>				
				选择性	48 h, 25℃	铜绿假单胞菌 ATCC 27853 <sup>b</sup>	-	半定量	TSA 上全抑制	
					奇异变形菌 ATCC 29906					
Park 和 Sanders	L	弯曲杆菌属	ISO 10272	生长率	见标准	大肠弯曲杆菌 ATCC 43478	-	半定量	Karmal 或其他选择性培养基上 >10	每种培养基上的典型菌落(见标准)
						或空肠弯曲杆菌 ATCC 33291 或 29428 <sup>b</sup>				
						-大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>				
						+奇异变形菌 ATCC 29906				

续表 10-12

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
Park 和 Sanders	L	弯曲杆菌属	ISO 10272	选择性	见标准	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	半定量	TSA 上全抑制	
						奇异变形菌 ATCC 29906			Karmali 或其他选择性培养基上 >10	每种培养基上的典型菌落(见标准)
Preston	L	弯曲杆菌属	ISO 10272	生长率	18 h, 42°C	大肠弯曲杆菌 ATCC 43478	—	半定量		
						或空肠弯曲杆菌 ATCC 33291 或 29428 <sup>b</sup>				
						大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>				
						+ 奇异变形菌 ATCC 29906 <sup>b</sup>				
				选择性	18 h, 42°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	半定量	TSA 上全抑制	
						奇异变形菌 ATCC 29906				
PSB	L	小肠结肠炎耶尔森氏菌	ISO 10273	生长率	3 d ~ 5 d, 25°C	小肠结肠炎耶尔森氏菌 ATCC 23715 或 9610 <sup>b</sup>	—	半定量	CIN 或 SSDC 上 >10	每种培养基上的典型菌落(见标准)
						+ 大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>				
						+ 铜绿假单胞菌 ATCC 27853 <sup>b</sup>				

续表 10-12

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应	
PSB	L	小肠结肠炎耶尔森氏菌	ISO 10273	选择性	3 d ~ 5 d, 25℃	铜绿假单胞菌 ATCC 27853 <sup>b</sup>	—	半定量	TSA 上全抑制		
						奇异变形菌 ATCC 29906					
MKTTn	L	沙门氏菌	ISO 6579	生长率	24 h, 37℃	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028	—	半定量	XLD 或其他选择性培养基上 >10	每种培养基上的典型菌落(见标准)	
						或肠炎沙门氏菌 ATCC 13076 <sup>b</sup>					
						+大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>					
				+铜绿假单胞菌 ATCC 27853 <sup>b</sup>							
				选择性		24 h, 37℃	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	半定量	TSA 上全抑制	
							粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433			TSA 上 <10	
Rappaport Vassiliadis	L	沙门氏菌	EN 12824	生长率	24 h, 41.5℃	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028	—	半定量	BGA 或其他选择性培养基上 >10	每种培养基上的典型菌落(见标准)	
						+大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>					
						+铜绿假单胞菌 ATCC 27853 <sup>b</sup>					

续表 10-12

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
Rappaport Vassiliadis	L	沙门氏菌	EN 12824	选择性	24 h, 41.5°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	半定量	TSA 上全抑制	
						粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433			TSA 上 <10	
RVS	L	沙门氏菌	ISO 6579	生长率	24 h, 41.5°C	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028	—	半定量	XLD 或其他选择性培养基 >10	每种培养基上的典型菌落(见标准)
						肠炎沙门氏菌 ATCC 13076 <sup>b</sup>				
						+大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>				
						+铜绿假单胞菌 ATCC 27853 <sup>b</sup>				
				选择性	24 h, 41.5°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>		半定量	TSA 上全抑制	
						粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433			TSA 上 <10	
亚硒酸盐胱氨酸	L	沙门氏菌	EN 12824	生长率	24 h, 37°C	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028 <sup>b</sup>	—	半定量	BGA 或其他选择性培养基 >10	每种培养基上的典型菌落(见标准)
						或肠炎沙门氏菌 ATCC 13076 <sup>b</sup>				
						+大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>				
						+铜绿假单胞菌 ATCC 27853 <sup>b</sup>				

续表 10-12

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
亚硝酸盐脱氨酸	L	沙门氏菌	EN 12824	选择性	24 h, 37°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	半定量	TSA 上 <100	
						粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433				
<p><sup>a</sup> L=液体培养基。</p> <p><sup>b</sup> 实验室使用的菌株(最少)。</p>										

表 10-13 非选择性增菌培养基推荐性能测试信息

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
BHI	L <sup>a</sup>	葡萄球菌	ISO 6888	生长率	24 h, 37°C	金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 <sup>b</sup>		定性	浊度 1~2	—
Brucella	L	弯曲杆菌	ISO 10272	生长率	2 d ~ 5 d, 25°C	大肠弯曲杆菌 ATCC 43478	—	定性	浊度 1~2	—
						空肠弯曲杆菌 ATCC 33291 或 29428 <sup>b</sup>				
Peptone-salt	L	稀释液	ISO 6887	稀释	45 min, 20°C ~ 25°C	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	TSA	定量		—
						金黄色葡萄球菌 ATCC 25923				
Thioglycolate	L	产气荚膜梭菌	ISO 7937	生长率	24 h, 37°C	产气荚膜梭菌 ATCC 13124 <sup>b</sup>	—	定性	浊度 1~2	—

续表 10-13

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
TSYEB	L	单核细胞增生李斯特氏菌	ISO 11290	生长率	24 h, 25℃	单核细胞增生李斯特氏菌 1/2 aATCC 19111	—	定性	浊度 1~2	—
						单核细胞增生李斯特氏菌 4b ATCC 13932 <sup>b</sup>				
a L—液体培养基。 b 实验室使用的菌株(最少)。										

表 10-14 选择性分离培养基推荐性能测试信息

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
Modified Butzler	S <sup>a</sup>	弯曲杆菌	ISO 10272	生长率	24 h~72 h, 42℃	大肠弯曲杆菌 ATCC 43478	—	定性	良好生长(2)	每种培养基上的典型菌落(见标准)
Karmali						空肠弯曲杆菌 ATCC 33291 或 29428 <sup>b</sup>				
Skirrow				选择性	24 h~72 h, 42℃	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	定性	全部或部分抑制(0~1)	无典型菌落
						金黄色葡萄球菌 ATCC 25923			全部抑制(0)	—
CIN	S	小肠结肠炎耶尔森氏菌	ISO 10273	生长率	24 h, 30℃	小肠结肠炎耶尔森氏菌 ATCC 23715 或 9610 <sup>b</sup>		定性	良好生长(2)	每种培养基上的典型菌落(见标准)
						大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	定性	全部或部分抑制(0~1)	无典型菌落

续表 10-14

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
BGA	S	沙门氏菌	EN12824/ ISO 6579	生长率	24 h~48 h, 37℃	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028 <sup>b</sup>	—	定性	良好生长 (2)	每种培养基上的典型菌落(见标准)
						肠炎沙门氏菌 ATCC 13076				
XLD				选择性	24 h~48 h, 37℃	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>b</sup>	—	定性	全部或部分抑制 (0~1)	无典型菌落
						粪肠球菌 ATCC 29212 或 19433			全部抑制 (0)	

<sup>a</sup> S=固体培养基。  
<sup>b</sup> 实验室使用的菌株(最少)。

表 10-15 选择性分离培养基推荐性能测试信息

培养基	类型	微生物	标准	作用	培养条件	控制菌株	标准培养基	控制方法	判定标准	特性反应
Nutri	S <sup>a</sup>	肠杆菌科	ISO 7402 ISO 8523	生长率	24 h, 37℃	大肠杆菌 ATCC 25922 或 8739 <sup>c</sup>	—	定性	生长良好 (2)	—
		沙门氏菌	EN12824 ISO 6579		24 h, 37℃	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028 <sup>c</sup>				
		小肠结肠炎耶尔森氏菌	ISO 10273		24 h, 30℃	小肠结肠炎耶尔森氏菌 ATCC 23715 或 9610 <sup>c</sup>				
TSYEA 琼脂	S	单核细胞增生李斯特氏菌	ENISO 11290	生长率	24 h, 37℃	单核细胞增生李斯特氏菌 1/2a ATCC 19111 或单核细胞增生李斯特氏菌 4b ATCC 13932 <sup>b</sup>	—	定性	生长良好 (2)	—

<sup>a</sup> S=固体培养基。  
<sup>b</sup> 实验室使用的菌株(最少)。  
<sup>c</sup> 按方法使用的不具有选择性的菌株。

表 10-16 部分常用生化试验培养基及试剂推荐性能测试信息

常用试剂	阳性对照菌株	阴性对照菌株
葡酸盐培养基	肺炎克雷伯氏菌	大肠杆菌
明胶液化	嗜水气单胞菌	大肠杆菌
V-P 试验	产气肠杆菌	大肠杆菌
靛基质试验	大肠杆菌	肺炎克雷伯氏菌
甲基红试验	大肠杆菌	产气肠杆菌
西蒙柠檬酸盐	产气肠杆菌	大肠杆菌
尿素酶试验	普通变形杆菌	大肠杆菌
硫化氢(H <sub>2</sub> S)产生试验	普通变形杆菌	宋内志贺氏菌
氰化钾(KCN)抑制试验	产气肠杆菌	大肠杆菌
硝酸盐还原试验	大肠杆菌	硝酸盐阴性杆菌
亚硝酸盐还原	大肠杆菌	硝酸盐阴性杆菌
胆汁溶菌试验	肺炎链球菌	绿色链球菌
七叶灵分解试验	肠球菌	溶血性链球菌
6.5%氯化钠肉汤	肠球菌	溶血性链球菌
苯丙氨酸脱氨试验	普通变形杆菌	大肠杆菌
丙二酸盐利用试验	肺炎克雷伯氏菌	大肠杆菌
赖氨酸脱羧酶试验	鼠伤寒沙门氏菌	普通变形杆菌
鸟氨酸脱羧酶试验	鼠伤寒沙门氏菌	普通变形杆菌
精氨酸脱羧酶试验	鼠伤寒沙门氏菌	普通变形杆菌
凝固酶试验	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌
DNase	粘液沙雷氏菌	表皮葡萄球菌
ONPG	大肠杆菌	奇异变形杆菌
MR 试验	大肠杆菌	阴沟肠杆菌
乳糖	大肠杆菌	福氏志贺氏菌
鼠李糖	肺炎克雷伯氏菌	普通变形杆菌
革兰氏染色液	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
靛基质试剂	大肠杆菌	肺炎克雷伯氏菌
V-P 试剂	阴沟肠杆菌	大肠杆菌
硝酸盐还原试剂	大肠杆菌	硝酸盐阴性杆菌
触酶实验用试剂	金黄色葡萄球菌	溶血性链球菌
氧化酶试剂	铜绿假单胞菌	大肠杆菌
10%三氯化铁	奇异变形杆菌	大肠杆菌

## 五、国内外关于培养基使用、管理及其性能测试的标准

国内外关于培养基使用、管理及其性能测试的标准,包括:

(1) NCCLS M22-A2:1996《商业性微生物培养基质量保证》(第二版)(Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media—Second Edition),以上美国国家临床实验室标委员会(NCCLS)该标准已转化成我国卫生行业标准:WS/T 232—2002《商业性微生物培养基质量检验规程》;

(2) ISO 11133-1:2000《食品和动物饲料的微生物学.培养基制备和生产导则——第1部分:实验室培养基制备的质量保证指南》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Guidelines on preparation and production of culture media—Part 1:General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory),该标准已转化成我国出入境检验检疫行业标准:SN/T 1538.1—2005《培养基制备指南 第1部分:培养基实验室制备质量保证通则》;

(3) ISO 11133-2:2003《食品和动物饲料的微生物学——培养基制备和生产导则——第2部分:培养基性能试验实用指南》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Guidelines on preparation and production of culture media—Part 2:Practical guidelines on performance testing of culture media),该标准正转化成我国出入境检验检疫行业标准:SN/T 1538.2—2006《培养基制备指南 第2部分:培养基性能测试实用指南》。

## 六、食品微生物检验用诊断试剂

### 1. 检验试剂及药品

检验药品、试剂须在分析纯(AR)级以上。在利用药品、试剂配制标准溶液、染色液、缓冲液及其他试剂时应注意:按要求选取溶剂;用带塞的试剂瓶盛装;易分解的试剂宜用棕色瓶;挥发性的试剂瓶口应予密封;如发现溶液有变质现象,应停止使用;标准溶液应定时标定。

实验室内保存的试剂应定期进行清点,陈旧或损坏的试剂应弃去,注意保存试剂的使用有效期以及最佳保存方式。

### 2. 染色液

染色液配制后,必须选用适当的标准菌株作阳性及阴性对照来鉴定染色液的性能,如革兰氏染色选用枯草杆菌和卡他球菌,亦可选用葡萄球菌和大肠杆菌作为对照,鞭毛染色液采用普通变形杆菌和福氏志贺氏菌作为对照。对经验不足者,每次染色时均应作对照染色。

### 3. 诊断血清

商业血清的说明应涉及再水化血清的物理外观及其与已知培养物所发生的凝聚反应强度。再水化血清应该是从清澈的琥珀色到黄色的无沉淀的液体。有时候,再水化血清有一种特别气味,这是正常的。如果这种血清与已知培养物发生强烈反应,就可以使用。

依据被测细菌的不同,血清反应涉及鞭毛抗原或菌体(细胞壁)抗原。鞭毛血清试验通常在试管中进行,需要1 h,阳性反应者产生纤细的、微小的、如“雪”状的沉淀物;菌体血清试验一般在载玻片上进行,阳性反应者产生粗糙颗粒状沉淀物。鞭毛血清试验需要1 h,而菌

体血清试验相对而言比较快捷,只需 1 min~2 min。凝聚反应通常用以下方法表示:

++++:所有细胞凝聚,+++ :75%的细胞凝聚,++ :50%的细胞凝聚,+ :25%的细胞凝聚,± :少于 25%的细胞凝聚,- :没有细胞凝聚。

用已知对照培养物进行血清凝聚试验,如果少于++,则该试验血清不可接受。

沙门氏菌属、志贺氏菌属、致病性大肠埃希氏菌等诊断血清,使用时应注意有效期及效价。每月用相应的菌株检查其有效性,过期血清和变浑浊的血清不应继续使用。诊断血清一般放在普通冰箱内保存,使用时应以最短的时间暴露于空气中。最好备有两个生物制品研究所生产的诊断血清,以便互相对照,检查其可靠性。

### 第三节 标准物质的保藏、使用及管理

#### 一、概述

标准物质是标定仪器、验证测量方法或鉴定其他物质的具有一种或多种性能的材料物质。国际上根据使用对象和测定方法的不同将标准物质分为生物标准物质和化学标准物质,根据使用要求不同又分为国际、国家、工作用三级标准物质。微生物检验用的标准物质属于生物标准物质。生物标准物质是用于那些不能用化学或物理量表示强度、而只能用生物方法测定效价的品种。只有当被测物质纯度提高,结构清楚后用理化方法控制质量分析条件成熟后,该品种的化学测定用标准物质即应建立,相应生物标准物质则被停用。

微生物实验室常用的标准物质有:1)用于抗生素效价测定的抗生素国家标准品、工作标准品;2)用于鲎试验的细菌内毒素国家标准品、工作标准品;3)去热原工艺验证用细菌内毒素验证品;4)微生物检验用标准菌株等对照物质。对于食品微生物实验室,标准物质则一般仅指标准菌株。以下就以标准菌株为例来说明食品微生物实验室标准物质的保存、使用、管理及其确认。

标准菌株是从标准菌株保藏中心获得的真空保存的菌株,或至少定义到属或种水平的菌株,来源已知,形态、染色、生化和血清学特征典型,性能稳定,鉴定结果重复性好,极少发生变异的菌株。实验室必须保存一定量的标准菌株以用于无菌检查、抗生素微生物(效价)测定、防腐性能和抗菌效果评价、确认灭菌效果、检验方法的验证、样品检验时的阳性对照、培养基或其他生物试剂质量控制和性能测定等方面。

微生物标准菌株的保存、使用和管理是食品微生物实验室的一项重要工作。按照中国实验室国家认可委员会指定的 CNAL/AC01:2005《检测和校准实验室能力认可准则》中关于标准物质的规定,微生物标准物质应严格其保存、使用、管理及确认程序。微生物是活的生物,其使用和保藏管理方面不同于一般的标准物质。如果菌种管理不善,不仅会造成标准菌株的浪费、检验结果不准确,还会发生危害实验人员、危害社会的安全事故。

#### 二、菌种保藏管理要求

1. 菌株的生物危害程度应与保藏实验室生物防护水平相适应,实验室的装备和管理应符合《病原微生物实验室生物安全管理条例》和 GB 19489《实验室 生物安全通用要求》的

相关规定。

2. 实验室应制定菌种使用、保藏管理制度和标准化操作规程,应涵盖菌种申购、保管、领用、使用、传代、存储等诸方面,确保溯源性和稳定性。

3. 建立完善的文件记录,做好菌株的纸质信息和数字化信息档案并备份,记录好下列信息:菌名(包括学名)、编号、来源、鉴定特征、鉴定时间、鉴定者、传代情况、最适培养基和培养条件、保藏方法和保藏位置等。档案应安全存放,注意防潮、防霉、防虫、防火、防磁和防盗。

4. 所有保藏菌种的容器表面都应贴有相应的标签,保藏标签必须规范、清晰。标签上应注明:菌种名、菌种号、传代次数、接种时间等。传代成功后,上一代菌种须处理掉,处理过程应记录归档。

5. 保存菌株应制备成储备菌株和工作菌株。菌种应在规定的时间传代,每次传代中至少要对菌种进行形态学观察(如可能,尽量使用鉴别性培养基)。每传3代至少做一次鉴定,如发现污染或变异应及时处理。

6. 菌种应由专人负责保管和发放。实验室负责菌种保藏的人员应经过专业培训,具备从事菌种保藏、复核鉴定和管理维护的能力。

7. 对标准菌株的使用管理情况进行监督。

### 三、菌种接收和登记

实验室标准菌株的来源主要有:购买、交换、接受赠送等。实验室自行分离的菌株对照标准菌株经过鉴定后,可以作为参考菌株(reference cultures)在实验室内使用。标准菌株的源头是专门的菌种保藏机构的菌株,如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)的菌株或商业来源的 ATCC 演化菌株、其他国外权威菌种保藏机构或我国国家菌种库储存的各级标准菌株等,国内外微生物菌种保藏机构及其网址可见附录6。保藏中心提供的菌都有固定的编号(菌株号),如:来源于中国医学微生物菌种保藏管理中心的金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003。菌株一到实验室,一定要记录好菌株号和菌种来源,确保溯源性清楚。同时,还应尽量记下尽可能多的菌株信息,如:菌种名称和数量、生产日期、接收日期和有无破损等。如暂时不用,安瓿瓶储存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 。

### 四、冻干菌种的复活

从菌种保藏中心购买的菌种一般是安瓿瓶装的冻干粉剂,随产品通常附有菌种使用活化方法。对于商品化的保藏菌株须按照厂商的说明执行,对于有特殊营养要求或需要特殊培养条件的菌株,尤其要按照推荐的方法进行复活。具体步骤如下:

#### 1. 开启包装

对所有菌种,都应考虑到潜在的危害,应该由经过专业培训的人员按照《病原微生物实验室安全管理条例》和 GB 19489 的要求,在符合相应生物安全水平的条件下,开启包装。据 GB 19489,病原微生物分为 I 至 IV 级危害等级。食品微生物实验室一般只需储存危害等级 I、II 级的微生物,高危害等级的微生物不应在食品微生物实验室保存。

### (1) 打开外包装

从菌种保藏中心购买的菌株通常是三层包装系统。内层(如安瓿瓶)用于容纳微生物,防水、防泄漏、密闭性好。中间层要坚固、防水、防泄漏,用于保护第一层包装,可以用塑料膜、泡沫塑料等。外层可以是硬纸板箱、木箱、塑料箱等,用于保护内包装。

包装开启需按照以下步骤进行:根据菌种所需的防护水平,穿防护服、带手套等,先仔细检查菌种包装外观,观察有无渗漏、破损等现象。确定无异常后将外包装除去,仔细观察中间层包装,如无异常再打开中间层包装,检查内层包装是否完好。

如外包装和中间层包装同时有渗漏、破损等异常情况,并且安瓿等微生物容器已经破裂,要立刻通知有关部门和菌种发放单位,对包装、运输工具等微生物污染物进行消毒。

如外包装有渗漏等异常情况,但安瓿等微生物容器无破损;或安瓿等微生物容器已破裂,但外包装无破损、渗漏情况,则无需追溯破损地点,可按照生物安全操作原则,对微生物污染物进行消毒灭菌处理。

### (2) 开启安瓿瓶

经检查,安瓿瓶完好,则可以按下面方法打开内层包装,取菌种。

对于单瓶安瓿瓶(见图 10-10),先用 70%酒精棉擦拭安瓿上部,再用砂轮或锉刀在安瓿瓶上部划一小痕迹,然后将划痕处向外,用无菌纱布包住安瓿瓶,两手分别捏住安瓿瓶上下两端,稍向外用力便可打开安瓿瓶。另一种打开安瓿瓶的方法是:将安瓿管顶部烧热,滴上几滴冷水或用无菌棉签沾冷水在顶部擦一圈,顶部出现裂纹,用锉刀或镊子颈部轻叩一下,敲下已开裂的安瓿管的顶端。

对于双瓶安瓿瓶(见图 10-11),首先加热外瓶顶端,在顶端滴几滴冷水使顶端裂开,然后用锉刀等将顶端敲开,用镊子取出绝缘层和内瓶,轻轻取出棉塞。

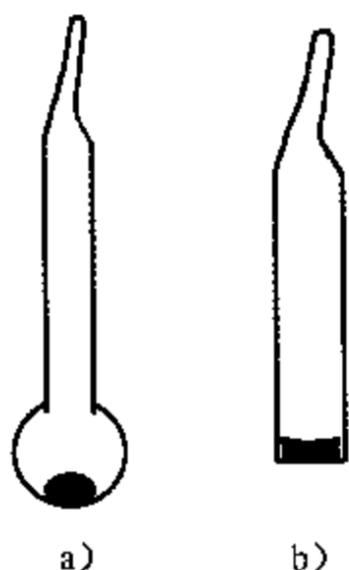


图 10-10 单瓶安瓿瓶示意图

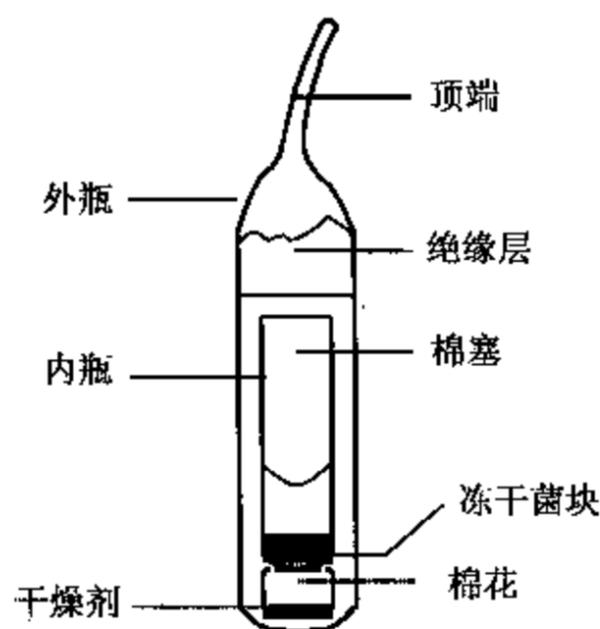


图 10-11 双瓶安瓿瓶示意图

## 2. 复活菌株

选择合适的培养基和培养条件(根据生产商说明)进行复活。冻干菌株的传代次数不得超过 5 代,从菌种保藏中心购买的冻干菌种为第 0 代。

### (1) 细菌

用无菌吸管吸 0.5 mL 液体培养基加到冻干菌块上,吹打混匀成悬液。将全部悬液移入含有 5 mL 合适的肉汤培养基中。将管中残留的几滴悬液移种到斜面上。在合适的条件下培养,细菌培养温度通常为 25℃ 或 37℃。多数冻干菌株会在几天后长出,但是少数菌会表现出延滞期延长的现象,需要将正常培养时间加倍。

### (2) 噬菌体

首先应准备 18 h~24 h 的宿主细菌培养物。往冻干噬菌体中加 1.0 mL 肉汤(视宿主细菌而定)混匀。吸 0.1 mL 悬液到 0.9 mL 肉汤中,依次系列稀释。每个稀释度的稀释液一滴接种到预先准备好的平板上,每平板采用 3 个~4 个稀释度。过夜培养后可出现噬菌斑。

### (3) 霉菌和酵母菌

用无菌吸管吸 0.5 mL~1 mL 无菌水到冻干菌块上,将全部内容物移入装有 5 mL 无菌水的试管中进行复水,2 h(或过夜)后移种到肉汤或固体琼脂上,在合适的温度下培养,真菌培养温度通常是 25℃。少数培养物会表现出延滞期延长的现象,需要将正常培养时间加倍。

如菌株在推荐的培养基、培养温度和时间等适宜的条件下培养不生长,须灭菌处理之后方可丢弃。

## 3. 菌种纯度检查和确认

### (1) 菌落形态

取复活后的培养物,在相应的鉴别平板或普通非选择性平板上划线分离,培养出单菌落,观察菌落形态是否符合,同一平板上的单菌落的大小、形状、颜色、质地、光泽等是否相似;对于出现两种或以上形态的菌株,应再分别挑取单菌落划线或稀释涂布培养,检测是否重复出现相同特征。

### (2) 细胞形态

对数生长期的培养物的革兰氏染色反应应呈现一致性;细胞形状、大小、鞭毛、荚膜等特征应相似。

### (3) 芽孢大小、位置、形状

形成芽孢的菌种,其芽孢大小、位置、形状应相似。

### (4) 生化鉴定

必要时进行生化鉴定等实验。

### (5) 污染处理

如发现菌种有污染,需要分离挑选目标菌株培养成功后将污染培养物做灭菌处理。

## 五、质控菌株的保藏和使用

### 1. 制备标准储备菌株

标准储备菌株是标准菌株在实验室经过多次传代后制备的多份相同的菌株。

将检查完纯度的复活后的培养物制备成菌悬液,液体选用 TSB、无菌脱纤维羊血、兔血或脱脂牛奶,其中包含终浓度为 10%~15% 的甘油。将菌悬液分装到无菌冻存管中。标准

储备菌株应制备多份,并采用超低温(-70℃)或冻干的形式保存。用于质量控制或性能测定的标准储备菌株在保存和使用时应注意避免交叉污染,减少菌株突变或发生典型的性能变化。对于培养基的测试菌种,应将其在每种培养基上的生长特性全部文件化。标准储备菌株最多向下传3代,就应更换质控菌种。

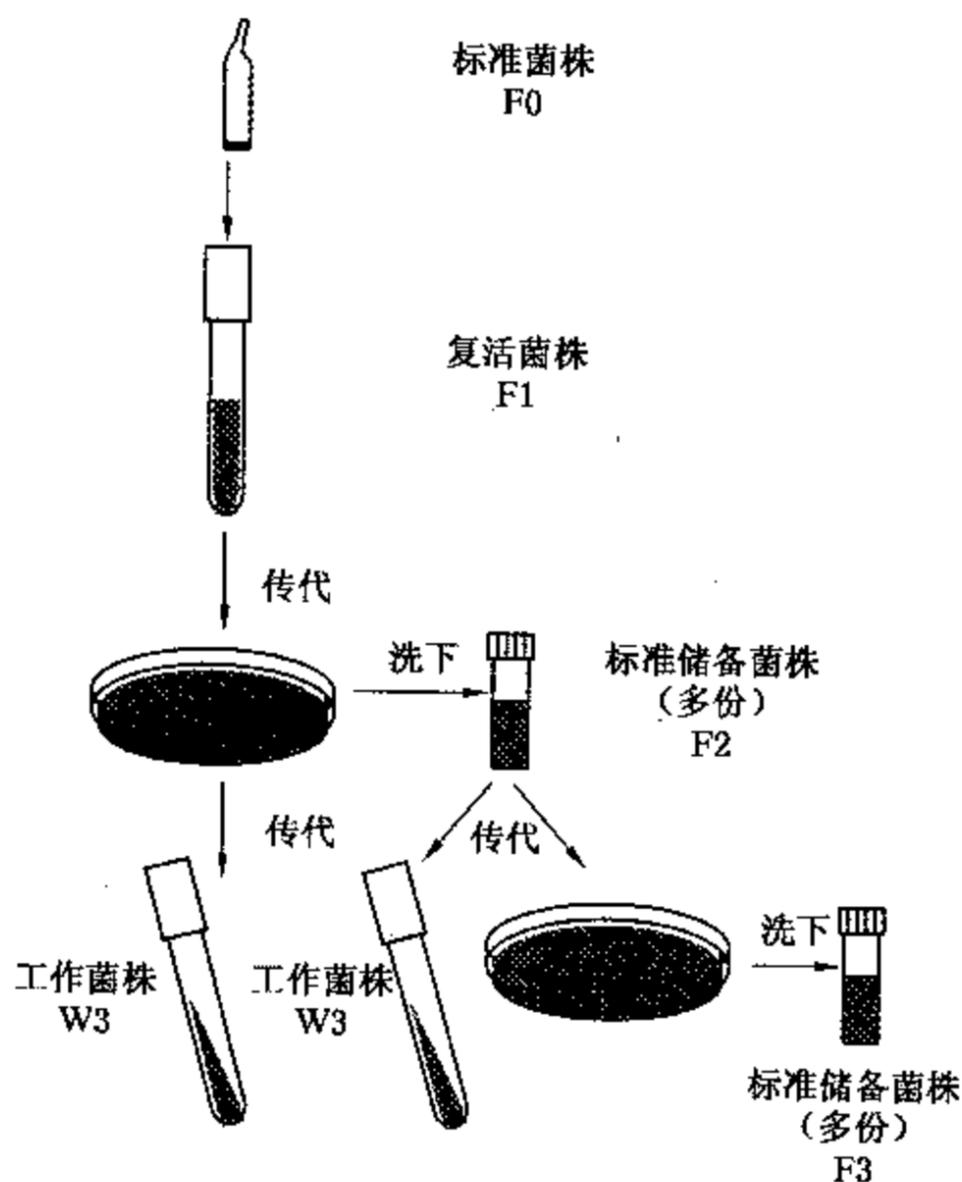
## 2. 制备工作菌株

工作菌株是由冻干或超低温保存的标准储备菌株经一次传代得到的菌株。

转接操作时要注意避免标准菌株可能发生的交叉污染和菌株的退化。制备工作菌株时,转接到多份非选择培养基中培养,得到处于稳定期的菌株。厌氧菌的工作质控菌株应在适宜的厌氧肉汤培养基中保存或冷冻保存。

工作菌株不宜再传代。但工作菌株如果处理或储存得当,即不存在交叉污染和(或)在一周内不退化,则可以多次使用。

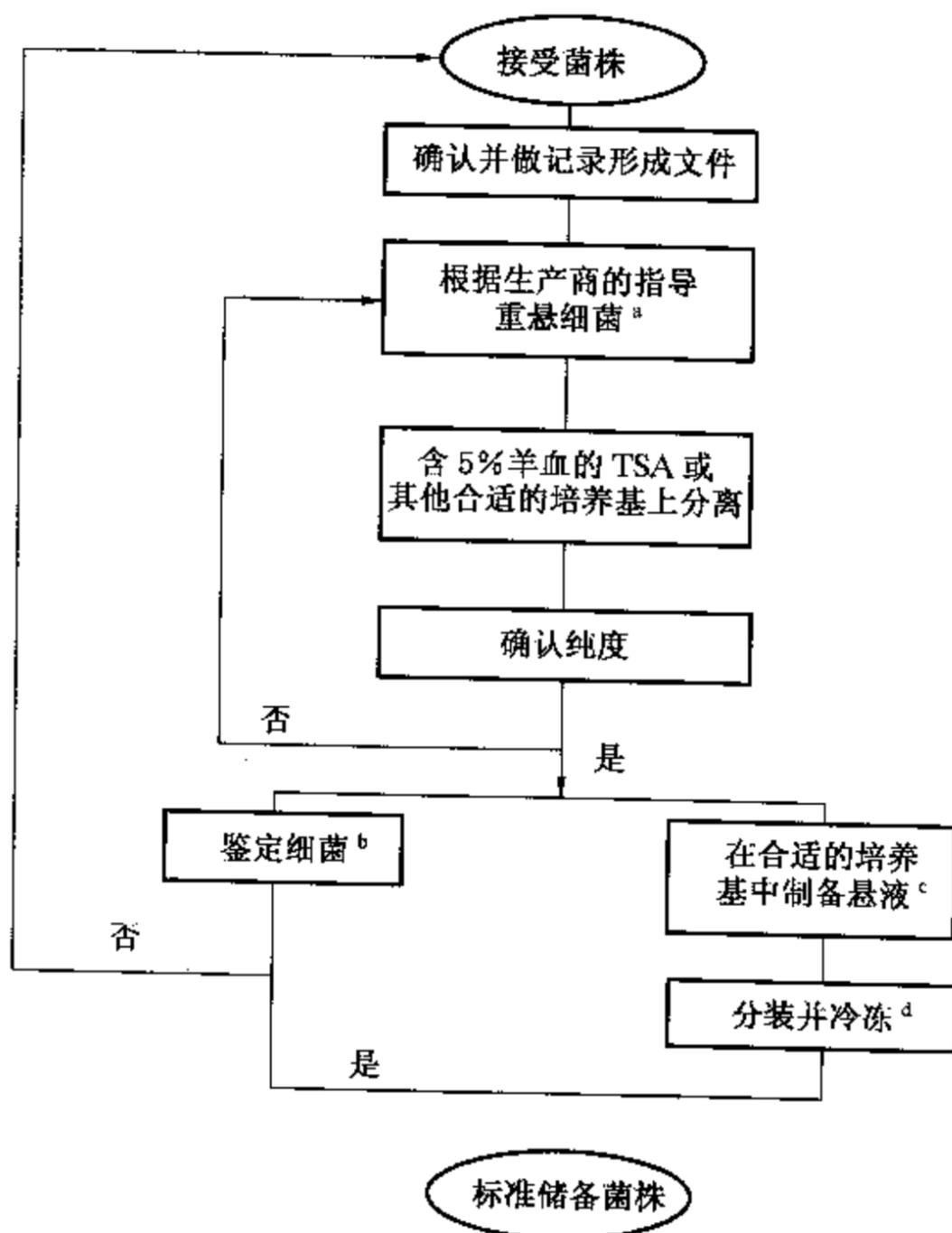
标准菌株、标准储备菌株和工作菌株的传代关系见图 10-12。



注:按上述程序继续,下一代菌种制备好后,将上一代菌种灭菌后丢弃。当传代至第5代(F5)时,需重新购买新的冻干菌株,开始新一轮。

图 10-12 标准菌株、标准储备菌株和工作菌株的传代关系

图 10-13 和图 10-14 是 ISO /CD 7218:2003(E)中的制备标准储备菌株和工作菌株的流程图。



<sup>a</sup> 通常在营养肉汤中重悬复苏。

<sup>b</sup> 菌落形态观察、革兰氏染色和生化鉴定。

<sup>c</sup> 例如，含10%~15%甘油的TSB的冷冻保护培养基。

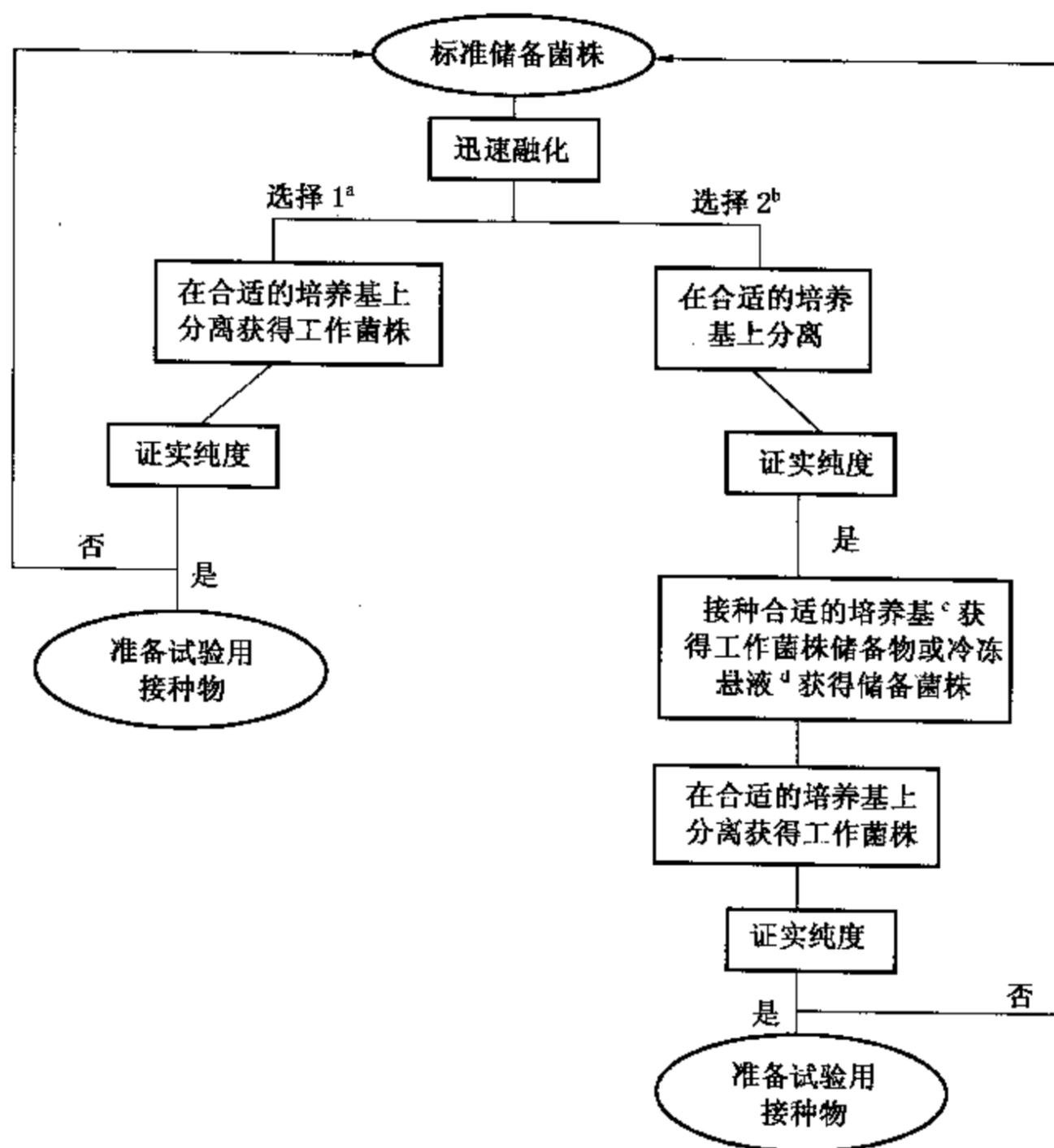
<sup>d</sup> 低于-70℃冻存可无限期保存，高于此温度储存期仅限一年。

图 10-13 由保藏菌株(collection strain)构建标准储备菌株(reference stock)的流程图

## 六、菌种的保藏

### 1. 菌种保藏要求

- (1) 应针对保藏菌株确定适宜的保藏方法。
- (2) 同一菌株应选用两种或两种以上方法进行保藏。
- (3) 只能采用一种保藏方法的菌株或细胞株应备份并存放于两个以上的保藏设备中。
- (4) 菌种保藏方法应参照相应的标准操作规程。
- (5) 菌种的入库和出库应记录入档，实行双人负责制管理。
- (6) 重要菌种应异地保存备份。



<sup>a</sup> 针对未频繁使用菌株的情况。

<sup>b</sup> 针对频繁使用菌株的情况,可能用到工作菌株储备物。

<sup>c</sup> 例如,接种 TSA 或含羊血的 TSA 或其他合适的培养基,培养 24 h 后在合适的温度(依据微生物的不同选择 18℃~25℃或 2℃~8℃)下可储存 4 周。

<sup>d</sup> 例如,含 10%~15%甘油的 TSB 的冷冻保护培养基。低于-70℃冻存可无限期保存,高于此温度储存期仅限一年。

图 10-14 由标准储备菌株(reference stock)构建工作菌株(working culture)的流程图

(7) 高致病性病原微生物和专利菌种应由国家指定的保藏机构保藏。

(8) 菌种保藏设施应确保正常运行,设专人负责管理,定期检修维护。

(9) 菌种保藏设施应有备用电源,防止断电事故发生。

## 2. 菌种保藏方法

菌种保藏方法多种多样,有的复杂,有的简单实用,保藏效果也不尽相同。选择何种保藏方法取决于实验室现有的设备和保藏要求。几种常用的保藏方法:

### (1) 传代培养法

保藏的菌种通过斜面、穿刺或疱肉培养基(用于厌氧细菌)培养好后,置 4℃ 冰箱中或室温下存放,定期进行传代培养。

保藏时间依微生物的种类而定。霉菌、放线菌及芽孢菌保存 2 个~4 个月移种一次,酵母菌间隔两个月,普通细菌为一个月,假单胞菌两周传代一次。

此法优点是操作简单、使用方便,缺点是保藏时间短、易被污染和发生变异。

### (2) 液体石蜡保藏法

将无菌石蜡加在已长好菌的斜面或半固体上,其用量以高出斜面顶端 1 cm 为准,使菌种与空气隔绝。将试管直立,置低温或室温下保存。

此法实用且效果较好。霉菌、放线菌、芽孢菌可保藏两年以上,酵母菌可保藏 1 年~2 年,普通细菌也可保藏一个月至一年左右。

注意:从液体石蜡下面取培养物移种后须在火焰上灼烧时,培养物容易与残留的液体石蜡一起飞溅。

### (3) 载体法

使生长合适的微生物吸附在一定的载体上进行干燥。多用于保存产芽孢的细菌、霉菌和放线菌。在抗生素工业生产中应用广泛、效果好,可保存 2 年时间,但不能用于保藏营养细胞。

常用的载体有土壤、砂土、硅胶、明胶、麸皮、磁珠和滤纸片等。

### (4) 悬液法

将细菌、酵母菌细胞悬浮在一定的溶液中保存。

溶液包括蒸馏水、糖溶液、磷酸缓冲液、食盐水等。

### (5) 冷冻法

使菌种始终存放在低温环境下的保藏方法。包括低温法(-30℃)、超低温法(-70℃)和液氮法。保存效果随保存温度越低而越好。此法关键是要克服细胞的冷冻损伤。注意控制降温速率及保护剂的使用。

### (6) 真空干燥法

不需要低温预冻样品,只是使样品维持在 10℃~20℃ 范围内进行真空干燥。

### (7) 冷冻真空干燥法

冷冻真空干燥法是将要保藏的微生物样品先经低温预冻,然后在抽真空减压下利用升华作用除去水分,使细胞的生理活动趋于停止,从而长期维持存活状态。该方法是菌种保藏最有效的方法,适合大多数微生物,保藏效果好,保藏时间可达几年,甚至 30 年。

## 3. 存活率的计算

分别将保藏前和保藏后的菌悬液按 10 倍稀释法涂布平板,培养后计算存活率。

$$\text{存活率} = \frac{\text{保藏后每毫升活菌数}}{\text{保藏前每毫升活菌数}} \times 100\%$$

## 七、复核

定期检查菌种保藏效果,有污染或退化迹象时,要及时分离、纯化、复壮。每次检查要有

详细记录。

### 1. 复核(check)的定义

复核是指对保藏的各类微生物菌种,在接收和保藏过程中,为保证菌种质量而对鉴定结果进行的核查,包括对菌种活性、纯度、稳定性等的检测,以及采用最新分类学观点对分类地位发生变化的菌种的重新鉴定。

### 2. 复核菌株的基本信息

复核菌株的基本信息为必备要素。复核记录应标明所复核菌株的以下基本信息:保藏中心名称、保藏方式、菌株保藏编号、菌株名称(原定名)、复核日期、复核内容及结果(所进行的实验项目及各项实验结果)、复核结论、复核人员姓名、中心负责人签字以及需要补充说明的有关内容。

### 3. 存活性检测

存活性检测是所有微生物菌株复核的必备要素。该项检测应将采用不同保藏方法保藏的培养物接种于适当的培养基,在合适的条件下培养,检查其保藏后的生长情况,确定适用的长期保藏技术方法。

### 4. 纯度检测

纯度检测是所有微生物菌种复核的必备要素。规定以下两种检测方法同时进行。

显微镜观察,全部的细胞个体形态相似,染色反应一致(或与原纯菌的描述一致)。

将培养物制成悬液,重新倾注平板,或平板划线培养后,所形成的全部菌落形态一致或相似。具体方法参照本节“四、(3)菌种纯度检查和确认”的内容。

### 5. 细菌的复核鉴定

针对具体类群,从以下几个方面选择有代表性、鉴别性的特征进行复核鉴定:

1) 显微形态观察:如细胞形状、鞭毛、芽孢以及放线菌的菌丝、孢子丝和孢子的观察;革兰氏染色和抗酸染色反应等。

2) 培养特性:水溶性色素和非水溶性色素的观察,其他特定培养特征的观察。

3) 细胞化学组分分析:对于放线菌和部分高(G+C)含量的革兰氏阳性细菌应对细胞壁化学组分进行必要的分析,包括细胞壁二氨基酸分析和糖型分析。序列测定为复核的非必备要素。当需要复核的菌种缺少序列测定数据时,应将16S rDNA序列测定作为复核鉴定的内容之一。

## 八、常见食源性细菌的保藏方法

### 1. 蜡样芽孢杆菌

#### (1) 短期保藏

1) 接种蜡样芽孢杆菌于营养琼脂斜面,并于30℃~35℃培养24 h±2 h。

2) 在室温条件下(21℃~23℃)继续保持1 d~2 d,以便于芽孢完全生成。

3) 在4℃条件下冷藏肉汤培养物。

#### (2) 长期保藏

1) 将蜡样芽孢杆菌接种于营养琼脂斜面,在30℃~35℃培养24 h±2 h。

2) 在室温条件下( $21^{\circ}\text{C}\sim 23^{\circ}\text{C}$ )继续保持1 d~2 d,以便于芽孢完全生成。

3) 为了延缓细菌的生长,可以用蒸馏水与20%的甘油氯化钠溶液按1+1混合以后加到琼脂斜面上。

制备甘油氯化钠溶液:溶解4.2g的氯化钠,并加入蒸馏水,使体积达到800 mL。在溶液中加入12.4 g的无水磷酸氢二钾,4.0 g无水磷酸二氢钾和200 mL甘油。调整pH至7.2,  $121^{\circ}\text{C}$ ,灭菌5 min。

4) 将3 mL 1+1的混合液迅速放入干冰中或超低温冷冻箱内进行冷冻,温度设定在 $-55^{\circ}\text{C}\sim -90^{\circ}\text{C}$ 。

5) 每两年传代一次。

## 2. 空肠弯曲杆菌

所有的培养过程必须使用微需氧的空气环境:氮气占85%,二氧化碳占10%,氧气占5%。

### (1) 短期保藏

1) 接种于装有10 mL酸水解酪素-酵母浸膏-氯化钠肉汤的试管中。

配制方法:20 g酸水解酪素(casamino acid)、6 g酵母浸膏、2.5 g氯化钠和8.71 g无水磷酸氢二钾,补足蒸馏水至1 L。 $121^{\circ}\text{C}$ ,15 min灭菌。调整pH,使其在灭菌后为 $8.5\pm 0.2$ 。

2) 将接种过的培养基在 $41^{\circ}\text{C}\sim 44^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

3) 在巧克力琼脂或血琼脂斜面上进行划线, $41^{\circ}\text{C}\sim 44^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

4) 每周进行传代。

### (2) 长期保藏

1) 接种于装有10 mL酸水解酪素-酵母浸膏-氯化钠肉汤的试管中,于 $41^{\circ}\text{C}\sim 44^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

2) 在培养物内加入甘油,使最终浓度达到10%~20%。

3) 分装2 mL~3 mL,于 $-70^{\circ}\text{C}$ 或更低温度进行冷冻。

4) 每6个月传代一次。

## 3. 肉毒梭菌

### (1) 短期保藏

1) 接种于脱气后的装有庖肉培养基或含胰蛋白酶的胰酪胨-蛋白胨-葡萄糖-酵母浸膏肉汤(trypticase-peptone-glucose-yeast extract broth, TPGYT)的试管中,根据不同菌株选择 $26^{\circ}\text{C}$ 或 $35^{\circ}\text{C}$ 培养, $26^{\circ}\text{C}$ 适于蛋白水解的A、B、F和G群,而 $35^{\circ}\text{C}$ 适于非蛋白水解的B、E和F群。

制备庖肉培养基:在12.5 g市售培养基内加入100 mL冷却的蒸馏水。混合后保持15 min,以使里面所有颗粒都能湿透。另一种办法是分装1.25 g市售培养基到20 mm×150 mm的试管内,加入10 mL凉的蒸馏水,混合均匀,使所有颗粒都浸透。 $121^{\circ}\text{C}$ ,灭菌20 min。最终的pH为 $7.2\pm 0.2$ 。

TPGYT培养基无法买到,须用各种不同的原料自己配制。配制过程是在1 L蒸馏水内

溶解以下原料:50g 胰酪胨、5 g 蛋白胨、20 g 酵母浸膏、4 g 葡萄糖和 1 g 硫乙醇酸钠。分装 15 mL 到 20 mm×150 mm 的试管内,121℃,灭菌 10 min。最终的 pH 为 7.0±0.2。冷藏灭菌后的培养基,在使用之前加入胰蛋白酶(trypsin)。

制作胰蛋白酶溶液:将 1.5 g 的胰蛋白酶(1+250,Difco)加入 100 mL 蒸馏水中。搅拌水中的胰蛋白酶使其悬起,让颗粒沉淀,用 0.45 μm 的滤膜过滤上清液。使用之前蒸煮上述基础液 10 min,排出溶解氧。在每 15 mL 基础液里加入 1 mL 胰蛋白酶溶液。

2) 根据培养细菌所要求的温度,培养 5 d 或更长时间。

3) 在 4℃ 可保存 6 个月。

(2) 长期保藏

1) 按上述方法培养细菌。

2) 用无菌的离心管盛 TPGYT 培养物离心,沉淀细菌芽孢。

3) 用 10 mL~20 mL 无菌蒸馏水冲洗细菌芽孢两次。

4) 用无菌蒸馏水重悬洗过的芽孢,将其储存于 4℃。

5) 细菌芽孢悬液能稳定保存 10 年~20 年。

#### 4. 产气荚膜梭菌

(1) 短期保藏

1) 试管内装入 10 mL 新脱气过的液体硫乙醇酸盐肉汤,接种产气荚膜梭菌,在 35℃~37℃ 厌氧条件下培养 18 h~20 h。

2) 再将细菌接种于脱气后的庖肉培养基,在 35℃~37℃ 有氧条件下培养 24 h±2 h。

3) 在室温环境(21℃~23℃)再培养 1 d~2 d,使芽孢充分形成。

4) 在 4℃ 条件下冷藏肉汤培养物。

5) 每 30 天进行传代。

(2) 长期保藏

1) 接种产气荚膜梭菌到胰酪胨-蛋白胨-葡萄糖-酵母浸膏肉汤培养基。

配制方法:将 50.0 g 胰酪胨、5.0 g 蛋白胨、20 g 酵母浸膏、4 g 葡萄糖、5 g 磷酸氢二钠和 1 g 硫乙醇酸钠溶解到 1 L 蒸馏水中。调整 pH 为 7.3±0.2,分装 15 mL 到 20 mm×150 mm 的试管内,121℃,灭菌 8 min。使用之前将灭菌后的培养基冷藏保存。

2) 将接种过的培养基于 35℃~37℃ 培养 18 h。

3) 按 1+1 的量将肉汤培养物加入到脱脂奶中,取 1 mL~2 mL 进行冻干。或者按 1+1 的量将肉汤培养物加入到 10% 甘油氯化钠溶液中。甘油氯化钠溶液的制备:溶解 4.2 g 氯化钠到 900 mL 蒸馏水中。然后加入 12.2 g 无水磷酸氢二钾、4 g 无水磷酸二氢钾和 100 mL 甘油。调整 pH 到 7.2±0.2,然后在 121℃,灭菌 15 min。

4) 取 1 mL~3 mL 1+1 的培养物混合物,放入固体干冰中和超低温冰箱中保存,温度为 -55℃~-90℃。

5) 每两年传代一次。

#### 5. 大肠杆菌

(1) 短期保藏

1) 将细菌接种到脑心浸液琼脂斜面,于 35℃ 培养 24 h±2 h。

2) 在 4℃ 冷藏斜面培养物。

3) 每月进行传代。

(2) 长期保藏

1) 将细菌接种到脑心浸液琼脂斜面,于 35℃ 培养 24 h±2 h。

2) 将上述培养物接种到 10 mL 脑心浸液中。

3) 进行培养,培养温度为 35℃,时间为 24 h±2 h。

4) 离心培养液,然后用 10 mL 巴氏磷酸盐缓冲液冲洗细胞两遍。

5) 用 10 mL 巴氏磷酸盐缓冲液重悬细胞。

6) 在一份冲洗过的细胞悬浮液里加入一份双料脱脂牛奶。脱脂牛奶是用 200g 脱脂奶粉加入 1 L 蒸馏水,然后在 121℃ 下高压 15 min 后制得。

7) 将上步所获得的混合物分装成 1 mL~2 mL,进行冻干处理。

8) 可在室温(21℃~23℃)条件下保存 4 年~5 年。

### 6. 单核细胞增生李斯特氏菌

(1) 短期保藏

1) 接种细菌于 10 mL 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪大豆肉汤或 10 mL 胰蛋白磷酸盐肉汤。

2) 于 30℃~35℃ 培养 48 h±2 h。

3) 再接种入含 0.6% 酵母浸膏的胰酪大豆琼脂或营养琼脂斜面上。

4) 于 30℃~35℃ 培养 48 h±2 h。

5) 4℃ 冷藏斜面培养物。

6) 每个月进行一次传代。

(2) 长期保藏

1) 接种细菌于 10 mL 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪大豆肉汤或 10 mL 胰蛋白磷酸盐肉汤。

2) 于 30℃~35℃ 培养 48 h±2 h。

3) 在肉汤培养物内加入甘油使最终浓度达到 10%。

4) 分装成 2 mL~3 mL,在 -70℃ 或更低温度进行冷冻。

5) 每 6 个月传代一次。

### 7. 沙门氏菌

(1) 短期保藏

1) 将细菌接种于脑心浸液琼脂斜面,于 35℃ 培养 24 h±2 h。

2) 将培养物置于室温(21℃~23℃),避光环境。

3) 每两个星期传代一次。

(2) 长期保藏

保藏沙门氏菌不建议使用冻干法,因为细菌的鞭毛和菌体抗原可能会因此遭到破坏。

1) 将菌种接种到血琼脂斜面,于 35℃ 条件下培养 24 h±2 h。

2) 用无菌接种环(1 μL)在斜面的表面收集培养物。

3) 将收集到的培养物接种到装有半固体胰酪琼脂培养基(不加酚红)的试管中。制作此培养基的方法:溶解 20 g 胰酪胨和 3.5 g 琼脂到 1 L 水中。分装 1 mL~2 mL 到

10 mm×75 mm 带金属箔片盖的试管内。将试管于 116℃~118℃ 灭菌 15 min。冷却后, 在无菌条件下用软木塞封好试管口。软木塞应该事先浸泡在煮沸的石蜡里 5 min。

- 4) 接种好的试管于 35℃ 培养 24 h±2 h。
- 5) 培养物在室温(21℃~23℃)避光处保存。
- 6) 每 3 年进行一次传代。

### 8. 志贺氏菌

与大肠杆菌相同。

### 9. 金黄色葡萄球菌

#### (1) 短期保藏

- 1) 接种细菌到装有 10 mL 胰酪胨大豆肉汤的试管中, 然后于 35℃ 培养 24 h±2 h。
- 2) 将培养物在胰酪胨大豆琼脂斜面上划线, 于 35℃ 培养 24 h±2 h。
- 3) 室温(21℃~23℃)保存。
- 4) 每周传代一次。

#### (2) 长期保藏

- 1) 接种细菌到装有 10 mL 胰酪胨大豆肉汤的试管中, 然后于 35℃ 培养 24 h±2 h。
- 2) 加入甘油使最终浓度达到 20%, 分装成 2 mL~3 mL 在 -80℃ 下冷冻。或者, 加入足够量灭菌矿物油, 将胰酪胨大豆琼脂斜面培养物覆盖。
- 3) 对于以上两种长期保存方法, 都需要每年进行一次传代。
- 4) 还有一种方法是将用胰酪胨大豆肉汤培养 6 h~12 h 的培养物, 取出 2 mL 加入灭菌的 80% 甘油 2 mL 放入冻存管, 立即在 -70℃ 进行冷冻。每隔 6 个月进行传代。

### 10. 霍乱弧菌

#### (1) 短期保藏

- 1) 将细菌深度穿刺接种到 T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 培养基。T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 培养基制备方法: 将 10 g 胰酪胨、10 g 氯化钠、20 g 琼脂溶解到 1 L 蒸馏水中。分装 4 mL 到 13 mm×100 mm 带螺旋盖的试管内。121℃, 灭菌 15 min。不需调 pH。
- 2) 拧松试管盖进行接种, 于 35℃ 培养 24 h±2 h。
- 3) 将试管盖拧紧, 在 4℃ 下保存。
- 4) 每周进行一次传代。

#### (2) 长期保藏

- 1) 接种入 10 mL T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 肉汤, 于 35℃ 培养 6 h~12 h。
- 2) 取 2 mL T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 培养物加入 2 mL 灭菌 80% 甘油, 装入冻存管, 立即冷冻到 -70℃。
- 3) 每隔 6 个月进行传代。

### 11. 副溶血性弧菌

#### (1) 短期保藏

- 1) 深度穿刺接种保存培养基。保存培养基制备方法: 3 g 的酵母浸膏、10 g 蛋白胨、30 g 氯化钠、3 g 琼脂, 溶解到 1 L 蒸馏水中。分装 4 mL 到 13 mm×100 mm 带螺旋帽的试

管内, 121℃, 灭菌 15 min。不需调 pH。

- 2) 拧松试管盖进行接种, 于 35℃ 培养 24 h ± 2 h。
- 3) 将试管帽拧紧, 室温 (21℃ ~ 23℃) 保藏, 不能冷藏。
- 4) 每周进行传代。

#### (2) 长期保藏

1) 接种细菌到含 3% 氯化钠 (最终浓度) 的 10 mL 胰酪胨大豆肉汤中, 于 35℃ 培养 6 h ~ 12 h。

2) 在 1 mL 肉汤培养物内加入 0.09 mL 灭菌的二甲基亚砷, 装入无菌冻存管, 立即在 -70℃ 进行冷冻。

- 3) 每 6 个月进行一次传代。

### 12. 创伤弧菌

与副溶血性弧菌相同。

### 13. 酵母菌和霉菌

#### (1) 短期保藏

在接种前要对培养物进行检查是否被其他酵母菌和霉菌污染。看不清楚时, 用解剖镜检查。

1) 在装有 30 mL 马铃薯葡萄糖琼脂的平板上划线, 平板中添加有酒石酸或抗生素。选择抗生素比酒石酸好, 因为储液较易制备, 而且不会引起像 pH 较低对某些酵母菌和霉菌有抑制作用的情况。

酒石酸添加方法: 用经过 0.45 μm 膜过滤除菌的 10% 酒石酸溶液调整琼脂培养基的 pH 至 3.5 ± 0.1。用滴定的方法决定调至 pH 3.5 所用的溶液量。溶液加入培养基以后允许部分培养基凝固, 使用酸度计来检查 pH。

在抗生素的选择中, 盐酸四环素是首选抗生素, 有效浓度 40 mg/L。其他抗生素, 例如: 氯霉素或链霉素也可以使用, 浓度和盐酸四环素一样。抗生素储液的制作过程是溶解 1 g 抗生素到 100 mL 无菌蒸馏水中, 然后用 0.45 μm 的膜过滤除菌。将储液存放在 4℃ ~ 8℃ 避光处。存储时间不要超过 1 个月。在使用之前要将储液提前放到室温环境 (21℃ ~ 23℃)。每配制 250 mL 培养基, 加入 1 mL 上述储液, 终浓度即为 40 mg/L。

2) 于 22℃ ~ 25℃ 培养琼脂平板, 直到菌落直径达到 3 cm ~ 5 cm (霉菌大约需要一周, 酵母大约需要两周)。

3) 挑选单菌落接种到加有酒石酸或抗生素的马铃薯葡萄糖琼脂斜面。

4) 将试管在 22℃ ~ 25℃ 培养一周 (霉菌) 或两周 (酵母)。

5) 将培养物在 4℃ 进行冷藏。

6) 每两个月进行一次传代。

#### (2) 长期保藏

1) 接种细菌到加有酒石酸或抗生素的马铃薯葡萄糖琼脂斜面。

2) 在 22℃ ~ 25℃ 培养一周 (霉菌) 或二周 (酵母)。

3) 用灭菌矿物油或甘油浸没琼脂斜面培养物。

- 4) 在 4℃ 环境储存。
- 5) 每 6 个月进行一次传代。
- 6) 另一种方法是用无菌蒸馏水淹没正在生长的琼脂斜面。涡旋混和使斜面上的孢子或细胞悬浮。
- 7) 取 1 mL 悬浮液放入装有 5g 土壤的试管(土壤要经 121℃, 灭菌 1 h)。
- 8) 在 4℃ 进行储存。
- 9) 一年进行一次传代。

#### 14. 小肠结肠炎耶尔森氏菌

培养温度如果超过 30℃, 或培养的次数太多, 有可能使致病的质粒丢失。

##### (1) 短期保藏

- 1) 接种细菌到装有 10 mL 牛肉浸出肉汤或脑心浸出肉汤的试管中, 于 26℃ 培养 48 h ± 2 h。
- 2) 在胰酪胨大豆琼脂斜面上划线, 培养温度 26℃, 时间为 48 h ± 2 h。
- 3) 在室温避光处储存。
- 4) 每月进行一次传代。

##### (2) 长期保藏

- 1) 接种细菌到装有 10 mL 牛肉浸出肉汤或脑心浸出肉汤的试管中, 于 26℃ 培养 48 h ± 2 h。
- 2) 加入甘油, 使最终浓度在 10% ~ 20%。
- 3) 分装 2 mL ~ 3 mL, 在 -70℃ 或更低温度冷冻。
- 4) 每 4 个 ~ 6 个月进行传代。

### 九、废弃物的处置

菌种保藏过程中产生废弃物的处置参照 GB 19489 的有关规定灭菌后处理。废弃物的处置应符合国家、地区和地方的相关要求。实验室管理层应确保由经过培训的人员使用适当的个人防护装备和设备处理危险废弃物。

所有不再需要的培养物和其他生物性材料应弃置于专门设计的、专用的和有标记的用于处置危险废弃物的容器内。将污染性废弃物划分为尖锐器具废弃物和一般性废弃物, 根据种类不同, 要将其放在不同的废弃物容器中, 要求容器防渗漏, 容纳尖锐器具的容器要能防穿刺, 生物废弃物容器的充满量不能超过其设计容量。

所有弃置的实验室培养物和被污染的废弃物在从实验室取走之前, 应使其达到生物学安全。根据微生物种类及废弃物种类, 选择高压、干烤、焚烧等不同的处理方法, 处理方法要符合生物安全要求和环境保护要求。

## 第四节 消毒剂的使用及其验证

消毒和灭菌是微生物检验实验室日常工作的一部分, 其重要性在于确保培养基、容器和

设备等仅允许接种的目标微生物生长,消除其他所有的微生物。可以通过加热、化学法、放射性和过滤除菌等方式获得。在食品微生物检验技术中,经常使用消毒剂杀灭环境中微生物,它对保证检测过程免受或减少微生物污染起重要的保障作用。

## 一、定义和术语

**消毒(disinfection)**:是指杀死或消除所有病原微生物的措施。

**消毒剂(disinfectant)**:所有具有消毒效果的化学试剂称为消毒剂。

**灭菌(sterilization)**:是指用物理或化学的方法清除或杀灭环境、空气、物料(体)上的一切活的微生物(包括细菌、病毒、真菌和朊病毒)的方法。

**灭菌剂(sterilant)**:是指能够杀灭一切微生物的试剂。

在日常检测和工业生产中,消毒和灭菌这两条术语常常通用,所有的灭菌剂都为优良的消毒剂。消毒灭菌的方法很多,可采用物理和化学的方法。具体采用何种方法,应根据各种微生物的特性和不同的实验要求进行选择和组合。本节主要介绍化学消毒剂的使用和效果验证。

## 二、消毒剂的种类和应用

化学消毒剂按其灭菌效力可分为三大类,具体内容见表 10-17。

表 10-17 化学消毒剂的效力等级

效力等级	作用效果	消毒剂种类
高效消毒剂(HLD)	杀灭一切微生物(包括芽孢)	过氧乙酸、甲醛、环氧乙烷和含氯消毒剂等
中效消毒剂(ILD)	杀灭抵抗力较强的结核杆菌和其他细菌、真菌和大多数病毒	乙醇、新洁尔灭、碘酊和煤酚皂液等
低效消毒剂(LLD)	杀灭除结核杆菌以外的抵抗力较弱的细菌以及抵抗力较弱的真菌(如念珠菌)和病毒(如流感病毒、艾滋病毒等)	氯己定、玉洁新(三氯散)和高锰酸钾

## 三、消毒剂的使用

### 1. 影响消毒剂效果的重要因素

消毒剂的消毒效力是多个因素作用综合的结果,有许多因素可以影响消毒剂的消毒效果。了解影响消毒剂消毒效果的因素,有助于在配制、储存和使用过程中对消毒剂加以正确处理,并确保维持其最强的杀菌效力。

#### (1) 生物学因素

##### 1) 微生物种类对消毒因子的敏感性

不同种类的微生物对消毒剂的抵抗力不同,不同的消毒剂对不同种类的微生物作用效果不同。为便于消毒工作的进行,往往将病原微生物对杀菌因子的抵抗力分为若干级以作

为选择消毒方法的依据。根据近年来对微生物抵抗力的最新研究,微生物对化学因子抵抗力的排序依次为:朊病毒(克雅氏病病原体)、细菌芽孢(枯草杆菌芽孢)、分枝杆菌(结核杆菌)、无脂病毒或小型病毒(脊髓灰质炎病毒)、真菌(发癣菌属)、细菌繁殖体(铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌)、含脂病毒或中型病毒(单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒)其中抵抗力最强的不再是细菌芽孢,而是最小的朊病毒。由此在选择消毒剂时,应根据这些排序加以考虑。表 10-18 列出了微生物的大小及对杀菌因子的抵抗力。

2) 微生物数量

一般来说,污染的微生物数量越多,消毒越困难。因而,受严重污染的物品及场地,应先进行卫生清洁工作,尽力截断微生物污染源,并适当加大消毒剂的用量和延长消毒时间。

表 10-18 微生物的大小及其抵抗力

名称		大小	对理化因素的抵抗力
病毒		直径 0.01 μm ~ 0.25 μm	可通过除菌滤器,对热的抵抗力与细菌繁殖体相似;X 射线、紫外线、强碱、强酸条件下可被灭活
细菌	繁殖体	0.1 μm ~ 10 μm	多数无芽孢细菌经 55℃ ~ 60℃、30 min ~ 60 min; 80℃、5 min ~ 10 min 可被杀死
	芽孢	可大于或小于细菌直径	对热、干燥、光、辐射、化学消毒剂的抵抗力比繁殖体强
衣原体		直径 0.25 μm ~ 0.4 μm	能通过除菌滤器,对热敏感,常用的消毒剂能迅速杀灭
支原体		直径 0.15 μm ~ 1 μm	加压下可通过除菌滤器,对热、干燥的抵抗力低,与细菌繁殖体相似,对一般化学消毒剂敏感
螺旋体		(0.1~0.6) μm × (6~20) μm	对理化因素抵抗力低,常用消毒剂可杀死
立克次体		直径 0.25 μm ~ 0.4 μm	对热、干燥、消毒剂抵抗力低,很易被杀灭,离开宿主细胞即可死亡
真菌	酵母菌	2 μm ~ 10 μm	对热敏感,对于干燥、紫外线和一些消毒剂有抵抗力,但对 2.5% 碘酒、2% 结晶紫和 10% 的甲醛敏感
	霉菌		

(2) 消毒剂自身因素

1) 消毒剂的种类

不同的消毒剂对不同种类的微生物会出现不同的作用效果。根据消毒的目的,结合不同种类消毒剂的特点,选择适当的消毒剂,才可收到理想的消毒效果,同时节约成本。一般细菌在酸、碱作用下易死亡,消毒剂对芽孢的杀菌作用比繁殖体弱,碱和氯类消毒剂对病毒和霉菌的杀灭作用强。

## 2) 消毒剂的浓度

一般来说,随着消毒剂浓度的增加,消毒作用加强,但各种消毒剂作用受浓度影响大小不同。在使用时并不是说浓度越高越好,使用浓度过高不仅增加成本,还会带来腐蚀、安全等许多问题。如碳酸浓度减少到三分之一时,杀菌力减少 34 倍~36 倍。但也不尽其然,比如 75% 的酒精杀菌力反而比 95% 的酒精强。因此,最佳的选择是按照使用说明书的浓度来使用。

## 3) 穿透作用

物品被消毒时,杀菌因子必须直接作用到微生物本身才能起杀菌作用。不同消毒因子穿透力不同。例如,干热消毒比湿热穿透力差;甲醛蒸气消毒比环氧乙烷穿透力差;紫外线消毒只能作用于物体表面和浅层液体中的微生物,一张纸即可使其杀菌力降低 95% 以上。

## (3) 环境因素

### 1) 温度

消毒速度一般随温度的升高而加快,但温度的变化对各种消毒剂的影响大小不同,温度对消毒剂的稳定性和作用有一定的影响。据报道,一般温度每提高 10℃,杀菌效力增加 1 倍。另外,多数消毒剂在低温下消毒效果较差。如冷库消毒,用一般的消毒剂难以达到满意的效果。

### 2) pH

pH 可以改变消毒剂本身的溶解度、离解度和分子结构。它可以直接影响消毒剂的作用效果、稳定性等性能,多数消毒剂在一定的 pH 下的作用效果最好。

### 3) 有机物

有机物的存在可以干扰消毒剂的效力。因为有机物可以在微生物的表面形成保护层,降低消毒剂的消毒作用,甚至使微生物逐渐产生对药物的适应性。同时有机物可中和一部分消毒剂,降低消毒剂的有效浓度。

### 4) 表面活性剂和金属离子

大分子聚合物和非离子表面活性剂可以降低季铵盐类消毒剂的作用,阴离子表面活性剂可以降低季铵盐和洗必泰的消毒效果,次氯酸盐和过氧乙酸可被硫代硫酸钠中和,金属离子的存在对消毒效果也有一定的影响,可以降低或增加消毒作用。

### 5) 消毒剂的作用时间

由于微生物个体对药物的敏感度不同以及微生物接触消毒剂的机会不完全相同,消毒剂对微生物个体的作用时间并不完全相同。随着作用时间的增加,微生物死亡的数目增加。因此,消毒时必须维持足够的时间,才能达到杀菌的目的。

### 6) 水

水的硬度、微生物和化学物质均会对消毒剂的效力产生不良影响,消毒剂的配制最好用蒸馏水或去离子水配制。

## 2. 消毒剂的选用和安全使用原则

消毒剂的种类较多,用途和用法不尽相同,其杀菌能力也有所差别,对物品的损害程度亦不同。为达到理想的消毒杀菌的目的,在消毒剂的选用和使用中应遵循以下的原则:

1) 正确选择消毒剂的种类。选择化学消毒剂必须对其某些性质予以鉴定,包括消毒效果的预期水平、作用于微生物的类型、对操作人员的毒性程度和沾染在被消毒设备上的残存量,根据消毒对象的特点和消毒的目的选择合适的消毒剂。如乳品企业中选用消毒剂时应考虑到安全性能,首选无毒、无残留、无腐蚀的消毒剂;其次是杀菌效果,最好是广谱高效类的消毒剂;再次是考虑使用成本、使用方便等问题。

2) 正确选择消毒剂的使用浓度。不同的消毒剂都有一个适用的浓度范围,在这个浓度所需的杀菌时间和杀菌效果是不同的。使用前认真阅读说明书,各消毒剂在其标签上均注明其有效成分及含量。看清标签上消毒剂的标示浓度及稀释倍数。

3) 正确的选择消毒形式。根据消毒的要求和消毒剂的特点,采用正确的消毒剂使用形式。多数消毒剂既可以浸泡、擦拭消毒,也可以喷雾处理。

4) 严格掌握使用消毒剂的有效浓度和消毒时间。既要保证消毒效果,又要避免盲目提高应用浓度,造成浪费及损坏物品。

5) 消毒剂应定期更换。至少应有两种杀菌剂(或5种~6种)轮流使用,以避免产生耐药性。长期大量使用同一种消毒剂,会使环境中的微生物对此种消毒剂产生耐药性,降低灭菌效果,更为严重的是会使人们生活、生产环境中的药物残留越来越多,从而成为新的污染源,也为新的有害生物的生存和增殖提供了有利条件。

6) 除有特殊说明外,不同种类的消毒剂不能联合和混合使用。例如,含氯类消毒剂和含酸类消毒剂不能混合使用,避免可能引起的化学反应产生的有毒化合物或可能产生的危害。

7) 消毒前应将物品清洗干净,任何的残余污垢都会影响消毒剂在化学及物理学上的效能,因此消毒应为清洁过程之最后步骤(先清洁,后消毒)。

8) 不同消毒剂的毒性、腐蚀性及刺激性均不同。消毒剂仅用于物体及外环境的消毒处理,切忌内服。

### 3. 常用消毒剂的使用和原理

#### (1) 含氯类消毒剂

作用原理:与菌体蛋白中的氨基结合,导致细菌代谢机能障碍而死亡。

包括的种类:无机氯化物,如二氧化氯、次氯酸钠、漂白粉、漂粉精(次氯酸钙为主)、氯化磷酸三钠;有机氯化物,如二氯异氰尿酸钠、三氯异氰尿酸、氯铵 T 等。

用途:常用于环境、物品表面、食具、饮用水、污水、排泄物、垃圾等消毒。

应用实例:

1) 二氧化氯。在常温下是一种黄绿色、有刺激性气味的气体,其应用形式为稳定的二氧化氯水溶液和固体二氧化氯制品。稳定性二氧化氯是无毒液体,一般制成2%~8%水溶液,作为商品出售。二氧化氯的抗菌范围比较广,包括细菌、病毒以及芽孢形成体。作为一种化学氧化剂,其残存的活性能够有效地抑制二次污染。二氧化氯消毒剂属实际无毒级产品,并无残留毒性,世界卫生组织将其列为A1级高级安全消毒剂,用于医疗卫生、食品加工中的消毒灭菌,食品的防腐保鲜,医院、实验室、医药部门的环境消毒,饮用水和工业循环水及污水处理等方面的杀菌、消毒和除臭等。二氧化氯作为氯制品消毒剂的一种最有前途和

最理想的替代品而广泛应用。

2) 漂白粉。漂白粉有澄清液、乳剂、粉剂三种类型。0.5%~1%的漂白粉水溶液于5 min内可杀死大多数细菌,可用于喷洒空气消毒和表面消毒;5%的水溶液可在1 h内杀死细菌芽孢,可以用于地面消毒和污染物的处理;余氯含量在0.2 mg/L以上,可以用于饮用水的消毒。

使用注意事项:

1) 此类消毒剂对金属制品有较大的腐蚀性,避免用金属制容器装盛;对织物有漂白作用,慎用这种材质物品,如果使用则消毒后须用水漂洗或用清水擦拭,以减轻对物品的损坏。

2) 成品消毒剂避光保存。无机氯性质不稳定,易受光、热和潮湿的影响,丧失其有效成分,有机氯则相对稳定,但是溶于水之后均不稳定,因此必须现用现配。

3) 高浓度含氯消毒剂对人呼吸道粘膜和皮肤有明显刺激作用,对物品有腐蚀和漂白作用,大量使用还会污染环境。

### (2) 过氧化物类消毒剂

作用原理:消毒剂分子含有“过氧键”,断裂时产生的新生态氧使菌体细胞中的蛋白质和酶的必需基团发生结构变化。

包括的种类:高锰酸钾、过氧化氢、过氧乙酸和臭氧等。

用途:常用于皮肤、物品表面、环境的消毒。

应用实例:

1) 过氧化氢。氧化作用强,极不稳定。3%的过氧化氢水溶液可以用于细菌污染器具的消毒,也可以进行口腔粘膜消毒。

2) 过氧乙酸。0.5%的过氧乙酸可用于一般物品的消毒,0.2%~0.4%浓度作用3 min可用于消毒皮肤。用2%过氧乙酸喷雾(按8 mL/m<sup>3</sup>计算),或加热过氧乙酸(按1 g/m<sup>3</sup>计算),可对空气进行消毒,作用1 h后开窗通风。

3) 臭氧。玻璃器皿的杀菌:臭氧浓度控制在6 mg/L~10 mg/L,温度60℃,作用3 min。无菌间的灭菌:在室内洁净的地面上,喷洒灭菌蒸馏水提高室内湿度。控制臭氧发生器气流中臭氧浓度为2.5 mg/L~5 mg/L,维持2 h左右,按标准检查细菌总数。饮用水消毒:加臭氧量为0.5 mg/L~1.5 mg/L,水中余臭氧量0.1 mg/L~0.5 mg/L维持10 min可达到消毒要求,在水质较差时,应加大臭氧加入量(3 mg/L~6 mg/L)。

使用注意事项:

1) 过氧化物类消毒剂具有很强的氧化性和腐蚀性,严禁用金属容器装盛。

2) 按照保存要求进行保存,并且须现用现配。

3) 由于此类消毒剂的刺激性较大,配制时应戴防护手套、防护镜。

4) 用于空气消毒,室内空气消毒时,室内湿度越大消毒效果越好,灭菌后要注意进行通风。

### (3) 醛类消毒剂

作用原理:此类消毒为一种活泼的烷化剂作用于微生物蛋白质中的氨基、羧基、羟基和巯基,从而破坏蛋白质分子,使微生物死亡。

包括的种类:甲醛、戊二醛。

用途:一般仅用于医院中医疗器械的消毒或灭菌。

应用实例:

1) 甲醛。35%~40%甲醛水溶液(HCHO),又名福尔马林,可用于培养室、无菌室的灭菌。但由于环境温度低时,甲醛穿透力差,消毒效果不可靠,消毒后残留的甲醛聚合物难以清除,目前应用已逐渐减少。

2) 戊二醛。戊二醛对一般的细菌繁殖体、真菌的杀灭效果好,200mg/L~1000 mg/L的戊二醛对金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌作用 10 min~15 min,即可达到消毒要求。戊二醛作为一种冷消毒灭菌剂受到广泛重视,目前国内作为怕高温、怕腐蚀的医疗器械的首选消毒剂。

3) 邻苯二甲醛(OPA)。OPA 是一种高效消毒剂,对细菌繁殖体、真菌、分枝杆菌、病毒、细菌芽孢甚至某些寄生虫都有很强的杀灭作用,尤其对戊二醛耐药结核分枝杆菌有良好的杀灭作用。与消毒剂戊二醛相比,邻苯二甲醛具有戊二醛广谱、高效、低腐蚀的优点,还具有刺激性小、使用浓度低等自身特性。目前,国外对 OPA 的消毒方面进行了许多研究,已经将其开发成为一种新型的高效消毒剂并通过了美国 FDA 认证。

使用注意事项:

1) 由于此类的消毒剂,特别是甲醛具有致癌性,一般不用于空气消毒。对培养室、无菌间的消毒后,应打开房间进行通风。

2) 消毒液体要避免直接同眼睛、皮肤、衣物接触,在配制时要戴手套、口罩甚至眼罩等防护用具。

3) 盛装戊二醛的容器必须加盖,减少挥发,既保证戊二醛的有效使用浓度,又能减少对人体的危害。

4) 保持室内空气的流通,降低室内空气中醛类消毒剂的浓度。例如,我国提出的空气中戊二醛的最高允许质量浓度为 0.1 mg/L,而国外学者在文献中提到的戊二醛的最高暴露限值为 0.2 mg/m<sup>3</sup>。

#### (4) 醇类消毒剂

作用原理:由于醇类具有脱水作用,并能使蛋白质变性和沉淀。

包括的种类:乙醇和异丙醇。

用途:皮肤、手的表面消毒,金属器具的浸泡消毒。

应用实例:醇类常作为某些消毒剂的溶剂,而且有增效作用。常用浓度为 70%~75%,据报道,80%乙醇对病毒具有良好的灭活作用。近年来,国内外有许多复合醇消毒剂,这些产品多用于手部皮肤消毒。

使用注意事项:

1) 由于醇类易挥发易燃,在实验室中应按危险品的保管要求进行保存。

2) 为使洁净区内的微生物得到有效控制,需要使用比乙醇消毒效力更强的消毒剂与乙醇交替轮换使用。

#### (5) 含碘类消毒剂

作用原理:与菌体蛋白中的氨基结合,导致细菌代谢机能障碍而死亡。

包括的种类：碘酊和碘伏。

用途：皮肤、手的表面消毒。

应用实例：含碘消毒剂可杀灭细菌繁殖体、真菌和部分病毒。一般碘酊的使用浓度为2%，碘伏使用浓度为0.3%~0.5%。碘杀菌剂对手部消毒很有效，而且它们不会刺激皮肤，因此被推荐用于食品加工厂中手的浸泡消毒过程和食品加工设备的消毒。

使用注意事项：

- 1) 含碘消毒剂在某些产品中会产生异味，大约在50℃时就发生汽化。
- 2) 在低温下不能发挥效能，高温下会造成腐蚀性。

#### (6) 酚类消毒剂

作用原理：作用于菌体，引起蛋白质沉淀、变性，形成不溶性的胨盐沉淀。

包括的种类：苯酚、甲酚、卤代苯酚及酚的衍生物。

用途：地面、无菌室消毒，试验废弃物的处理。

应用实例：

1) 苯酚：又称为石炭酸。0.5%的溶液用于防腐剂，3%~5%的溶液可用于喷雾消毒接种室(箱)或对器皿消毒。

2) 来苏儿：其是甲苯酚三种异构体的混合物，又名煤酚皂溶液。常用1%~3%的来苏儿水溶液对皮肤及各种器械消毒，用3%~5%的水溶液用于器皿、污物浸泡(约1h)消毒。也可喷雾对接种箱(室)消毒。配制时，取50%来苏儿30mL加水470mL即可得到3%的来苏儿溶液。

使用注意事项：

1) 酚类消毒剂属中等毒，皮肤接触可引起局部灼伤和皮炎，接触皮肤时可用清水洗涤。个别人对甲酚有哮喘和皮肤过敏反应。使用时注意安全防护。

2) 酚类消毒剂的pH为2左右，呈酸性，遇碱性物质，影响其消毒效力。

#### (7) 环氧乙烷

作用原理：与菌体蛋白结合，使酶代谢受阻而导致死亡；能杀灭细菌、真菌、病毒、立克次体和芽孢。

用途：适用于不耐热、耐高温物品的消毒，精密贵重仪器的消毒，纸张书籍的消毒。

应用实例：环氧乙烷，又名氧化乙烯，属于高效广谱消毒剂，可杀灭细菌营养体、芽孢和病毒等。环氧乙烷对大多数物品无损害，且穿透力强，特别适用于不耐高热和湿热的物品的消毒。由于环氧乙烷对人有毒，且其蒸气易燃烧爆炸，因此必须在一定的安全条件下使用。因此一般不用于实验室的常规灭菌，而多用于大规模、工厂化的灭菌。

使用注意事项：必须在有安全防护许可的条件下使用。

#### (8) 双胍类和季铵盐类消毒剂

作用原理：属于阳离子表面活性剂，通过改变细菌细胞膜的通透性，是细胞内的原生质外渗，达到抑菌和杀菌的目的。

用途：手的消毒。

应用实例：

1) 洗必泰(双氯苯双胍己烷):双胍类消毒剂,对于多种  $G^+$  菌及部分  $G^-$  菌均有杀灭作用,但对芽孢无作用。0.1%洗必泰水溶液可在 15 min 内杀灭葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌,但对其他  $G^-$  菌及多数病毒的效果较差。

2) 新洁尔灭(十二烷基苄基季胺溴盐):季胺盐类消毒剂,0.25%的水溶液,可用于皮肤和小型器皿的消毒。新洁尔灭化学性质稳定,常将其与其他消毒剂复配以提高其杀菌效果和杀菌速度,但只对细菌有效,对病毒几乎没有作用。

使用注意事项:

- 1) 不可与阴离子渗透剂一起使用。
- 2) 在机械式操作下会产生大量泡沫。

#### 四、消毒剂的使用验证方法

使用化学消毒剂的目的是将环境中的微生物杀灭或降低其在环境中的污染程度。因此,在长期使用化学消毒剂时,应制定清洁和灭菌的标准操作规程,并定期进行验证,以确证清洁与灭菌的有效性。由于消毒剂的杀菌结果会受到被消毒表面的类型、与被消毒物的接触时间以及相关设施中的微生物种群的影响,每个使用者都应当对消毒剂在各种不同的使用条件下的消毒效果进行评价。

##### 1. 验证前的考虑因素

- 1) 基于消毒剂本身的消毒能力进行设计及评价;
- 2) 基于生产和实验室环境真实生物负载进行设计及评价;
- 3) 验证内容应包括消毒条件、方法、所用介质、消毒剂浓度、消毒时间、消毒剂的交替使用等;
- 4) 选择合适的试验方案;
- 5) 所有的规程、方法和结果均要形成文件,以提供一个完整的验证项目的永久性书面记录。

##### 2. 制定验证方案

验证方案应阐明验证的目的、验证的内容和原因;应详尽把整个验证的每一个部分落实到具体的部门和个人;应说明取样方法(包括取样数量和取样点)以及测试方法;“合格标准”必须有限定范围,包括当结果超越限度时如何进行调查和纠正的方法。

##### 3. 实验室验证方法

实验室对消毒剂的杀菌效力测定方法包括:

AOAC Official Method 960.09《消毒剂的杀菌和去污消毒作用》(Germicidal and detergent sanitizing action of disinfectants);

AOAC Official Method 966.04《消毒剂的杀胞作用》(Sporicidal activity of disinfectants);

GB 15981—1995《消毒与灭菌效果的评价方法与标准》;

中华人民共和国卫生部发布的《消毒技术规范》(2002年版)。

参照美国 AOAC 制定的消毒剂效力测定方法的建议,使用铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌作为目标菌。也可参照 GB 15981—1995《消毒与灭菌效果的评价方法与标准》,使用细菌繁殖体:金黄色葡萄球菌(ATCC 6538),大肠杆菌(8099 或 ATCC 25922);细菌芽孢:枯草杆菌黑色变种芽孢(ATCC 9732);真菌:白色念珠菌(ATCC 10231)。有限于实验室实际试验条件,也可对标准方法作适当的修改和调整。

### (1) 载体浸泡试验法

试验步骤如下:

载体试验用的载体为经过火抛光处理过的硼硅酸盐玻璃圆柱管,长  $10\text{ mm} \pm 1\text{ mm}$ ,内径  $6\text{ mm} \pm 1\text{ mm}$ ,外径  $8\text{ mm} \pm 1\text{ mm}$ 。灭菌后待用。

制备足够数量的接种菌液的载体。首先用无菌蒸馏水或磷酸盐缓冲液制备试验用菌悬液,控制目标菌的浓度为  $1 \times 10^8\text{ cfu/mL} \sim 10^9\text{ cfu/mL}$ 。然后将载体放入菌悬液中浸泡  $15\text{ min}$ ,用无菌镊子将载体逐一移出,直立于铺在培养皿内的无菌滤纸上。盖上皿盖,并置  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  下培养  $40\text{ min}$ 。干燥后,每一载体含菌量应当在  $0.4 \times 10^6\text{ cfu} \sim 2.0 \times 10^6\text{ cfu}$  之间。接种时微生物的活性取决于目标菌的特性。

准备 60 支各装有消毒液  $10\text{ mL}$  的试管,从第一支试管开始计时,每隔  $30\text{ s}$  放入一支载体到消毒液中, $10\text{ min}$  后取出载体并置于含  $10\text{ mL}$  Lethen 液体培养基的试管中,在  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  下培养  $48\text{ h} \sim 55\text{ h}$ ,观察,培养基浑浊则表明有微生物生长。

试验结果的合格标准是 60 支试管中阳性管数不得超过 2 支。将观察到有微生物生长的试管再转种培养基,并做革兰氏染色检查,以进一步核实微生物生长状况。载体试验只能评判结果是否合格而无法反映目标菌具体下降数量这一重要信息。这时可以对原实验方法做适当修改,通常另外再准备 3 支载体,在消毒剂中处理后立即放入中和剂中作系列稀释,用平皿计数法或薄膜过滤法测定微生物的残存数量。

### (2) 定量悬浮试验法

定量悬浮试验不仅可用于常规消毒效果的测定,也可以用于消毒剂杀菌作用及其影响因素的试验。

试验步骤如下:

将消毒剂用蒸馏水稀释至待测浓度,置  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  水浴中备用。

吸取试验菌液  $0.5\text{ mL}$ ,加入含消毒液  $4.5\text{ mL}$  的试管中,迅速混匀并计时。

待试验菌液与消毒剂相互作用至预定时间,吸取  $0.5\text{ mL}$  混合液,加入  $4.5\text{ mL}$  经灭菌的中和剂中和,迅速混匀。

中和  $10\text{ min}$  后,进行 10 倍梯度稀释,并按菌落计数的方法测定存活菌数。

同时用稀释液代替消毒液,进行平行试验,作为阳性对照。

细菌营养体试验样本在  $37^\circ\text{C}$  培养  $48\text{ h}$ ,细菌芽孢试验样本在  $37^\circ\text{C}$  培养  $72\text{ h}$ ,真菌试验样本在  $30^\circ\text{C}$  培养  $48\text{ h} \sim 72\text{ h}$ ,观察最终结果。

试验重复 3 次,计算各组的活菌数,计算杀菌率,并进行消毒效力评价。

$$\text{杀菌率} = \frac{\text{对照组平均活菌数} - \text{试验组平均活菌数}}{\text{对照组平均活菌数}} \times 100\%$$

(3) 表面试验法

该方法是使用薄膜片代替被消毒的设施表面,来模拟实际的清洁(消毒)方法和设施表面而进行的消毒剂效力测试法。可避免在生产及实验室洁净区进行此类试验可能增加的污染风险。

试验步骤如下:

用无菌蒸馏水或磷酸盐缓冲液制备试验用菌悬液,控制目标菌的浓度为  $1 \times 10^7$  cfu/mL ~  $1 \times 10^8$  cfu/mL。

在试验薄片上接种菌液 0.1 mL,以使液体能在试验薄片表面充分铺散开来。

接种后的薄片置超净台内吹干,但应注意,有可能因干燥而导致试验菌丧失活性,从而对消毒剂的杀菌效力造成虚高。

将消毒剂与接种表面接触至预定时间,用接触碟或棉签擦拭或润洗等方法来测定薄片表面的残留菌数,同时需作阴性和阳性对照试验,以证明接种菌和无菌操作技术的可靠性、所用材料和培养基的无菌性,以及培养基对细菌生长的灵敏度等都是可靠的。

残留菌数的测定方法要反映出薄片表面的实际污染状况。一般说来,用接触碟取得的样品于  $30^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$  下培养 3 d ~ 5 d,用棉签拭子取得的样品先置于含有中和消毒剂的中和液(含大豆卵磷脂的肉汤)中,涡旋振荡片刻,然后用平皿计数法或薄膜过滤法计数。将薄膜取样法取得的样品取出滤膜,于琼脂平皿内培养后计数,计数用培养基和培养条件均与上述接触碟取样法相同。

结果评价:多数情况下,应至少下降 3 个~5 个对数单位才能证明消毒剂的杀菌效力(杀芽孢剂的效力应能使细菌芽孢下降 3 个~4 个对数单位)。用户必须做验证试验,以确认表面测试中用以恢复细菌生长力的方法的可靠性(细菌恢复生长的数量最少应为初始量的 50%~70%)。

表面试验法能定量测定微生物的下降程度,企业可使用其环境中的代表性菌株和与环境污染水平相当的接种量接种试验表面,以获取最佳的使用方法和浓度。

4. 空气消毒效果的微生物监测

(1) 采样时间

在消毒处理后、操作前进行。

(2) 采样方法

采样前,关好门窗,在无人走动的情况下,静止 10 min 进行采样。室内面积  $\leq 30 \text{ m}^2$ ,对角线内、中、外设 3 点,内、外点布点部位距墙壁 1 m 处;室内面积  $> 30 \text{ m}^2$ ,设 4 角及中央 5 点,4 角的布点部位距墙壁 1 m 处。

将营养琼脂平板(9 cm)放在室内各采样点处,采样高度为距地面 0.8 m ~ 1.5 m。采样时,将平板盖打开,暴露 5 min,盖好平板,将平板置于  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  恒温箱培养 48 h,计数菌落数,并分离致病菌。

(3) 检测方法

平板暴露法。

(4) 结果计算公式[见式(10-7)]

$$x = \frac{50\,000N}{AT} \dots\dots\dots(10-7)$$

式中:

$r$ ——细菌总数;

$N$ ——平均菌落数, cfu/皿;

$A$ ——平板面积,  $\text{cm}^2$ ;

$T$ ——平板暴露时间, min。

#### (5) 结果判定

参见 GB 15982—1995《医院消毒卫生标准》。

I类区域:细菌总数 $\leq 10$  cfu/ $\text{m}^3$ 、并且未检出致病菌为消毒合格;

II类区域:细菌总数 $\leq 200$  cfu/ $\text{m}^3$ 、并且未检出致病菌为消毒合格;

III类区域:细菌总数 $\leq 500$  cfu/ $\text{m}^3$ 、并且未检出致病菌为消毒合格。

### 5. 手和皮肤粘膜消毒效果的监测

#### (1) 采样时间

在消毒后立即采样。

#### (2) 采样方法

1) 手的采样:被检人五指并拢,用浸有含相应中和剂的无菌洗脱液的棉拭子在双手指屈面从指根到指端往返涂擦2次(一只手涂擦面积约 $30\text{ cm}^2$ ),并随之转动采样棉拭子,剪去操作者手接触部位,将棉拭子投入10 mL含相应中和剂的无菌洗脱液试管内,立即送检。

2) 皮肤粘膜采样:用 $5\text{ cm}\times 5\text{ cm}$ 的标准灭菌规格板,放在被检皮肤处,用浸有含相应中和剂的无菌洗脱液的棉拭子1支,在规格板内横竖往返涂擦各5次,并随之转动棉拭子,剪去操作者手接触部位,将棉拭子投入10 mL含相应中和剂的无菌洗脱液试管内,立即送检。不规则的粘膜皮肤处可用棉拭子直接涂擦采样。若表面不足 $5\text{ cm}\times 5\text{ cm}$ ,可用相应面积的规格板采样,

#### (3) 检测方法

1) 细菌菌落总数检测:将采样管在混匀器上振荡20s或用力振打80次,用无菌吸管吸取1.0 mL待检样品接种于灭菌平皿,每一样本接种2个平皿,加入已熔化的 $45^\circ\text{C}\sim 48^\circ\text{C}$ 的营养琼脂15 mL~18 mL,混匀后,于 $36^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ 培养48 h,计数菌落数。结果计算方法如下:

$$\text{手污染菌落总数} = \frac{\text{平板上菌落数} \times \text{采样液稀释倍数}}{\text{采样面积}}$$

其中手污染菌落总数的单位为cfu/ $\text{m}^2$ ,采样面积的单位为 $\text{cm}^2$ 。

2) 致病菌检测:金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和溶血性链球菌的检测按相关标准执行。

#### (4) 结果判定

菌落总数 $\leq 10$  cfu/ $\text{m}^2$ 、并未检出致病菌为消毒合格。

### 6. 物品和环境表面消毒效果的监测

#### (1) 采样时间

在消毒后4 h内进行采样。

(2) 采样面积

被采表面 $<100\text{ cm}^2$ ,取全部表面;被采表面 $\geq 100\text{ cm}^2$ ,取 $100\text{ cm}^2$ 。

(3) 采样方法

用 $10\text{ cm}\times 10\text{ cm}$ 的标准灭菌规格板,放在被检物体表面,用浸有含相应中和剂的无菌洗脱液的棉拭子1支,在规格板内横竖往返涂擦各5次,并随之转动棉拭子,剪去操作者手接触部位,将棉拭子投入 $10\text{ mL}$ 含相应中和剂的无菌洗脱液试管内,立即送检。不规则的物体表面可用棉拭子直接涂擦采样。

(4) 检测方法

- 1) 细菌菌落总数检测:按本节中“5.手和皮肤粘膜消毒效果的监测”执行。
- 2) 致病菌检测:金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和溶血性链球菌的检测按相关标准执行。

(5) 结果判定

菌落总数 $\leq 5\text{ cfu}/\text{m}^2$ 、并未检出致病菌为消毒合格。

## 五、常用消毒剂的中毒及处理

### 1. 不同种类消毒剂的使用范围和中毒表现

(1) 含氯类消毒剂

本类消毒剂属低毒,主要表现为皮肤粘膜刺激作用。皮肤接触高浓度水溶液可出现局部水疱、红肿、皮炎等。本类消毒剂遇酸后可产生氯气,吸入后出现明显呼吸道刺激症状,如咳嗽、气喘、呼吸困难等,严重者出现化学性支气管炎、肺炎,甚至肺水肿。

(2) 过氧化物类消毒剂

过氧化物类消毒剂有强氧化能力,可将所有微生物杀灭,消毒后在物品上不留残余毒性,由于化学性质不稳定须现用现配,高浓度时可刺激、损害皮肤粘膜,腐蚀物品。过氧化氢为低毒,口服大量的过氧化氢会发生呕吐、腹痛和腹泻。过氧乙酸为中等毒,低浓度(0.5%)的过氧乙酸对皮肤粘膜有刺激作用。皮肤接触高浓度溶液可出现局部水疱、红肿、皮炎、溃疡等。

臭氧为低毒,大气容许质量浓度为 $0.2\text{ mg}/\text{m}^3$ , $0.1\text{ mg}/\text{m}^3$ 下作用 $30\text{ min}$ 上使呼吸道有刺激表现。吸入臭氧后,可出现咽喉干燥、咳嗽、咯痰、胸闷等。对眼睛有刺激,出现疼痛、畏光、流泪等症状。

(3) 环氧乙烷

环氧乙烷为中等毒,低浓度时有刺激作用,高浓度则对中枢神经有抑制作用。接触大量环氧乙烷气体后感觉有特殊的甜味,迅速出现眼、鼻、咽喉、支气管刺激症状,并有剧烈头痛。环氧乙烷液体沾染皮肤时,由于蒸发可引起冻伤或灼伤,愈后可留有黑棕色色素沉着,皮肤反复接触时可有过敏反应。

(4) 醛类消毒剂

此类消毒剂包括甲醛和戊二醛,为中等毒,对皮肤粘膜有刺激腐蚀作用。短期内接触高浓度蒸气引起以呼吸系统损害为主的全身性症状,轻度中毒有头晕、头痛、乏力等症状,重度中毒时可因喉水肿、肺水肿、昏迷、休克致死。

### (5) 酚类消毒剂

此类消毒剂属中等毒,皮肤接触可引起局部灼伤和皮炎;溅入眼内引起角膜、结膜灼伤;误服引起消化道灼伤,出现呕吐、便血、胃肠穿孔症状,并可引起肺水肿和肝、肾、胰等多脏器损害;个别人对甲酚有哮喘和皮肤过敏反应。

### (6) 含碘类消毒剂

此类消毒剂属低毒,对粘膜有明显刺激作用;皮肤和眼睛接触高浓度碘伏可引起灼伤,少数人有皮肤过敏反应。

### (7) 醇类消毒剂

此类消毒剂属微毒类,但大剂量对中枢神经系统有麻醉作用,其蒸气对眼及呼吸道粘膜有刺激作用。少数人可出现接触性皮炎。

### (8) 季铵盐类和双胍类消毒剂

新洁尔灭,毒性低,刺激性小。口服大量高浓度溶液时出现胃肠道刺激症状,偶见过敏反应。

洗必泰,低毒,无刺激性,大量口服时可有胃肠道刺激症状,如恶心、呕吐、腹泻等。

## 2. 治疗

各类消毒剂中毒均无特效解毒剂,发生中毒后应将中毒患者立即移离现场,脱去污染衣物,注意休息、保暖,加强监护。

(1) 皮肤接触有较强腐蚀性的消毒剂后,立即用大量清水反复冲洗至少 15 min,如被环氧乙烷液体沾染的皮肤,可使用 3% 硼酸溶液反复冲洗;被来苏儿污染皮肤后用清水反复冲洗干净,再使用硫酸钠饱和溶液湿敷 4 h~6 h。

(2) 溅入眼睛者,立即以流动清水冲洗 15 min,眼内涂抹四环素可的松眼膏或红霉素眼药膏,如果症状持续加重,立即请眼科医师会诊。

(3) 吸入中毒后,迅速将中毒者移至通风处。

(4) 口服中毒者,立即给予口服 100 mL~200 mL 的生蛋清、氢氧化铝凝胶或牛奶。来苏儿中毒后立即口服植物油 30 mL~60 mL,然后口服牛奶或氢氧化铝凝胶;口服含碘消毒剂后应服用大量淀粉、米汤;甲醛中毒后服用 3% 碳酸铵或 15% 乙酸铵(醋酸铵)100 mL,使甲醛变为毒性较小的六亚甲基四胺。

(5) 情况严重者立即送往医院治疗。

## 六、消毒剂的管理

### 1. 采购管理

首先由专职人员对预采购产品进行查验。查验产品名称、批准文号、有效期等。

### 2. 储存管理

根据消毒剂的品种、性能、规格、有效时间等性质存放保管,需避光的消毒剂应放在阴暗处,酸性、易燃、易爆的消毒剂应放在低温通风处,易挥发、易腐蚀的消毒剂应注意包装密闭性。定期检查消毒剂的有效时间,根据近期先用、远期后用的原则发放,储藏仓库需专人管理,设置警示标志:如防火、防爆等,仓库内保持清洁,物品摆放有序,及时清除破碎残留废

物,保证产品的整洁、完好。

### 3. 使用管理

使用人员必须了解各种消毒剂的杀菌性能、有效成分及含量、适用范围、使用方法、注意事项、生产单位、日期、地址等;对复方制剂,弄清主要成分及含量,以便检测。每月或每季度对灭菌的消毒剂或使用中消毒剂进行细菌含量监测。

### 4. 做好人员培训

消毒剂使用人员必须接受消毒灭菌技术培训,掌握消毒知识,按规定严格执行消毒隔离制度。通过一系列教育培训,提高对安全使用消毒剂的认识及理论和实际操作水平,为消毒剂的安全使用与管理奠定基础。

### 5. 废弃消毒剂的管理

见第三章第二节中的实验室内务管理部分。

## 参 考 文 献

- [1] 韩文瑜,何昭阳,刘玉斌,等. 病原细菌检验技术[M]. 吉林:吉林科学技术出版社,2003.
- [2] 王志敏. 消毒与灭菌方法的选择[J]. 医药工程设计杂志,2003,24(3):39-46.
- [3] 姚楚水. 消毒与灭菌效果监测及注意事项[J]. 中国医学消毒杂志,2005,22(1):98-99.
- [4] GB 15981—1995 消毒与灭菌效果的评价与标准

# 第十一章 食品微生物检验方法

食品微生物污染是影响食品安全各要素中涉及面最广、影响最大、问题最多、危害最大的一类污染。控制致病性微生物污染是解决食品污染问题的主要内容之一,而加强从“农田到餐桌”这一过程中对致病性微生物的检验是控制食源致病性微生物污染的重要举措。

准确、可靠的检验结果是正确评价和保证食品安全性的先决条件,也是国际贸易上公平交易的有力科学依据。在食品微生物检验领域中,检验规程规范化和分析方法标准化是检验结果可信性的重要保证。

## 第一节 国内外的食品微生物标准检验体系

由于发展水平、食品种类、宗教、文化、地理、政策、职能等方面的差别,各区域、各国、各部门和各组织关于食品微生物的技术法规和检验标准不尽相同。按标准的性质分,可分为标准方法和非标准方法。

### 一、标准方法

标准方法(standard method)是指国际、区域、国家发布的经过严格确认的以及公认的方法。标准方法包括参考方法(reference method)和公定方法(regulatory method)。参考方法是指适用于特殊待验目标的经过国际或国家公认的检验方法。公定方法是指知名的技术组织或机构(如 AOAC)公布的检测方法。对于食品微生物检验而言,典型的参考方法是培养法。

很多食品微生物学检验体系中提及可替代方法(alternative method),可替代方法是指用来检验某一特定产品中某种目标微生物的、与相应参考方法等效的方法(见 ISO 16140:2003 的规定),如快速检测试剂盒和自动化系统。值得说明的是,并非所有的可替代方法都是标准方法。

#### 1. 国际食品微生物标准检验体系

制定和发布食品微生物标准检验体系的国际知名组织或权威机构包括:

- 1) 国际分析家协会(AOAC),其网址为 <http://www.aoac.org/>;
- 2) 国际食品法典委员会(CAC),其网址为 <http://www.codexalimentarius.net/>;
- 3) 联合国粮农组织(FAO),网址为 <http://www.fao.org/>;
- 4) 国际食品微生物标准委员会(ICMSF),网址为 <http://www.icmsf.iit.edu/>;
- 5) 国际乳品业联合会(IDF),网址为 <http://www.fil-idf.org/>;
- 6) 国际标准化组织(ISO),网址为 <http://www.iso.org/>;
- 7) 北欧食品分析委员会(NMKL),网址为 <http://www.nmkl.org/>;

8) 世界卫生组织(WHO),网址为 <http://www.who.org/>。

其中国际标准化组织(ISO)和国际分析家协会(AOAC)最为食品微生物检验人员所熟知。随着经济的全球化,以上知名组织或机构技术规范 and 限量要求被当作“金标准”,为世界各国所接受和采用。

## 2. 国家或行业食品微生物标准检验体系

### (1) 我国主要的食品微生物标准检验体系

我国食品微生物标准检验方法按级别可分为国家标准和行业标准。国家标准是基础标准,国家标准委批准的行业标准化委员会发布的行业标准方法原则上应与其一致。

根据《国务院关于加强新阶段“菜篮子”工作的通知》(国发[2002]15号)和《国务院关于进一步加强食品安全工作的决定》(国发[2004]23号),我国按照一个监管环节由一个部门监管的原则,采取分段监管为主、品种监管为辅的方式。农业部门负责初级农产品生产环节的监管;质检部门负责食品生产加工环节的监管,将现由卫生部门承担的食品生产加工环节的卫生监管职责划归质检部门;工商部门负责食品流通环节的监管;卫生部门负责餐饮业和食堂等消费环节的监管;食品药品主管部门负责对食品安全的综合监督、组织协调和依法组织查处重大事故。根据工作需要,以上职能部门均制定和发布了相应的食品微生物检验行业标准,即中华人民共和国农业行业标准(NY)、中华人民共和国卫生行业标准(WS)和中华人民共和国出入境检验检疫行业标准(SN)。

### (2) 国外主要的食品微生物检验体系

可以免费下载的官方食品微生物检验体系有:

1) 加拿大健康署(Canada HPB)标准“Official Methods for the Microbiological Analysis of Foods”,网址为 <http://www.hc-sc.gc.ca/>;

2) 欧盟(EN)标准,网址为 <http://europa.eu.int/>;

3) 澳新食物标准协会(FSANZ),网址为 <http://www.foodstandards.gov.au/>;

4) 英国健康保护机构(HPA),网址为 <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/>;

5) 新西兰食品安全局(NZFSANZ)标准“National Microbiology Database”,网址为 <http://www.nzfsa.govt.nz/>;

6) 美国食品药品监督管理局(USA FDA)标准“Bacteriological Analytical Manual Online”,网址为 <http://www.fda.gov/>;

7) 美国农业部(USDA)标准“Microbiology Laboratory Guidebook”,网址为 <http://www.fsda.gov/>。

此外,不能免费下载的官方食品微生物检验体系有美国公共卫生协会(APHA)标准、法国标准协会(AFNOR)标准、英国国家标准(BS)、日本国家标准(JIS)、韩国国家标准(KS)等。

互联网上具有丰富的食品微生物资源,读者可通过附录6所提供的网站进行检索。

## 二、非标准方法(non-standard method)

ISO/IEC 17025 中“5.4 检测和校准方法及方法的确认”规定:当客户未指定所用方法

时,实验室可以选用非标准方法。参考中国实验室国家认可委会(CNAL)确认的检验方法文件 CNAL-M/CF:04《非标准检验方法的确认要求》。非标准方法是指标准方法中未包含的需要确认后才能采用的方法,包括:

- 1) 有关科学书籍和期刊公布的方法;
- 2) 实验室研发的未出版的方法;
- 3) 部分由设备制造商指定的方法;
- 4) 扩充和修改过的标准方法;
- 5) 企业标准;
- 6) 部分协会标准[如美国脱水洋葱大蒜协会(The American dehydrated onion and garlic association, ADOGA)标准和方法“ADOGA Official Standards and Methods”];
- 7) 部分地方标准等。

## 第二节 微生物检验快速检测系统

### 一、主要微生物检验快速检测系统

检测食源细菌的传统方法通常需要对目标菌进行培养、分离和生化鉴定,并且有时进行血清学诊断,繁琐,耗时。因此,快速检验食品中病原体和其他微生物污染物,确保食品消费安全,是十分关键的。

随着分子生物学和电子技术的飞速发展,快速、准确、特异检验微生物的新技术、新方法不断涌现,微生物检验技术由培养水平向分子水平迈进,并向仪器化、自动化、标准化方向发展,可大大提高食品微生物检验工作的高效性、准确性和可靠性,表 11-1~表 11-22 列出了主要的食品微生物检验系统及相关信息(如认可情况,适用对象等)。

表 11-1 曲霉菌属(*Aspergillus* spp.)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
曲霉菌属	r-Biopharm GmbH	RIDASCREEN	—	食品、谷物等

表 11-2 芽孢杆菌属(不包括炭疽杆菌)[*Bacillus* spp. (not including *B. anthracis*)]快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
蜡样芽孢杆菌	Oxoid Ltd.	Oxoid BCET-RPLA	—	卵黄
	Response Biomedical Corp	RAMP Anthrax Test Cartridge	AOAC Performance Tested 070403	食品
	TECRA INTERNATIONAL	TECRA VIA		食品

表 11-3 革兰氏阳性细菌[Bacteria (Gram Positive)]快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
革兰氏 阳性细菌	bioMerieux	Vitek GPI	—	食品、化妆品和医药品
	bioMerieux	Vitek GPS-VC		食品

表 11-4 革兰氏阴性细菌[Bacteria (Gram Negative)]快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
革兰氏 阴性细菌	bioMerieux	ID 32 GN	—	纯培养物
	Stratecon Diagnostics	IsoGram Negative		食品、水

表 11-5 活细菌总数[Bacteria (total viable)]快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象	
活细菌 总数	3M Microbiology Products	Petrifilm Aerobic Count Plate	AOAC Official Method 990.12, 989.10, 986.33, AFNOR Cert. N. 3M 01/1-09/89, FDA-BAM 8th edition, HPB-CANADA MFHPB-33, MFLP-41A; NMKL 146. 1993, Australia Victorian Dairy Industry Authority, certificate No. 9503, KCFR-Korea KFDA 2004-7.8.2.2, NordVal Ref. No. 2003-20-5408-00010, USDA FSIS MLG Chapter 3, NMKL 146-1993	非乳制品食物、乳制品、牛奶和环境样品	
	Aber Instruments	Microcyte Flow Cytometer		—	
	BioControl Systems, Inc.	Lightning		—	环境棉拭子
		SimPlate for Total Plate Count		AOAC Performance Tested 970301	特定食品
		SimPlate for Total Plate Count Color Indicator (TPC-CD)		AOAC Official Method 2002.07	食品、原料、环境样品
	bioMerieux	API 20 A			纯培养物
		Bactometer			食品、无菌包装物、环境样品和医药品
		Rapid ID 32 A			食品和环境样品
		Vitek ASC			食品、化妆品和医药品
		Vitek Bio			食品、化妆品和医药品
		TEMPO TVC		AFNOR BIO 12/15-09/05	食品、宠物食品
	Biopath Inc.	Total Count Swab Kit			环境棉拭子
	Biotrace	Biotrace			环境棉拭子

续表 11-5

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
活细菌 总数	Celsis Ltd.	M Series Advance		环境棉拭子
		Spotcheck		环境棉拭子
		SystemSURE		环境棉拭子
	Chemunex	Chemflow		食品、化妆品和医药品
		ChemScan		食品、化妆品和医药品
		D Count		食品、化妆品和医药品
	Chisso Corporation	Sanita-kun Aerobic Count	AOAC Performance Tested Method 011001	食品,食用色素除外
	Don Whitley Scientific	RABIT		食品和生物样品
	Foss Electric A/S	BactoScan Automated Milk Screening System		乳及乳制品
		MicroFoss		食品和饲料
	Hughes-Whitlock	Bioprobe		
	Merck KGaA	Hy-Lite 2		
	Millipore	MicroStar Rapid Microbiology System		食品、医药品和化妆品
	Neogen	HGMF	AOAC Official Method 986. 32, HPB-CANDA MFLP-56	食品、水、环境样品
	Nissui Pharmaceutical Co. LTD.	Nissui Compact Dry Total Count	AOAC Performance Tested Method 010404	生肉
	Orion Diagnostic Finland	Hygicult TPC	NordVal Ref. No. 2003-20-5408-00014	环境样品
	Promega	Promega		食品和环境样品
RCR Scientific	Pectin Gel Method	AOAC Official Method 988. 18		
Rhone Poulenc Diagnostics	BioOrbit			
Sy Lab	BacTrac		食品和环境棉拭子	
Wescor, Inc.	Reflectance Colorimetric Method(Omnispec 4000)	AOAC Official Method 993. 11	巴氏消毒奶	

表 11-6 弯曲杆菌(*Campylobacter*) 快速检测系统一览表

生物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
弯曲杆菌	Becton Dickenson	BBL Campyslide Test Kit		纯培养物
	BioControl Systems, Inc.	Assurance Gold <i>Campylobacter</i> EIA		食品, 原料和环境样品
	bioMerieux	API Campy		食品
		VIDAS <i>Campylobacter</i> (CAM)		食品、畜体淋洗液
	Diffchamb AB	Transia Plate <i>Campylobacter</i>		乳制品、肉制品、海产品和蔬菜
	Danish Institute for Food & Veterinary Research	<i>Campylobacter</i> real-time PCR	NordVal Ref. No. 2005-30-5408-00038	
	GenProbe	AccuProbe <i>Campylobacter</i> Confirmatory Test	NordVal Ref. No. 2004-20-5408-00032	食品
	IGEN International	PATHIGEN® <i>Campylobacter</i> Test		肉、禽和其他食品, 环境样品
	Matrix MicroScience Inc.	Pathatrix <i>Campylobacter</i> spp. Test System		生鸡肉、食品和环境棉拭子
	Merck KGaA	Singlepath <i>Campylobacter</i>	AOAC Performance Tested Method 120401	食品(禽肉)
	Microgen Bioproducts Ltd.	Microscreen <i>Campylobacter</i>		纯培养物
	Molecular Circuitry Inc.	Detex <i>Campylobacter</i> Assay		生的和加工碎禽肉、鸡胴体
	Neogen Corp.	Alert for <i>Campylobacter</i>		食品
		GENE TRAK <i>Campylobacter</i> Assay		食品、禽肉
	Oxoid Ltd.	Dryspot <i>Campylobacter</i> Test Kit		蛋黄
	Sanofi Diagnostics Pasteur	PROBELIA		
TECRA INTERNATIONAL	<i>Campylobacter</i> Visual Immunoassay		食品	
弯曲杆菌属	umedik Inc.	DIA/PRO FAST-Q™ <i>Campylobacter</i> spp.		食品
嗜热弯曲杆菌	BioControl Systems, Inc.	Simplat <i>Campylobacter</i> CI (C-CD)		食品

表 11-7 梭菌(*Clostridium*)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
产气荚膜梭菌	Biotype AG	Bactotype Amplification Kit <i>Clostridium perfringens</i>		食品、牧场动物的新鲜或冷冻粪便样品

表 11-8 大肠菌群(*Coliforms*)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
大肠菌群	3M Microbiology Products	Petrifilm Coliform Count Plate	AFNOR Cert. No. 3M 01/2-09/89A, 3M 01/2-09/89B, 3M 01/2-09/89C, AOAC Official Method 991.14, 986.33, 989.10, FDA-BAM 8th ed, HPB-CANADA MFHPB-35, MFLP-41A, NMKL 147.1993, Australia Victorian Dairy Industry Authority certificate No. 9504, DIN Fachbericht 81 Petrifilm Technik 2000 edition, KC-FR-Korea KFDA 2004-7.8.5.4, NordVal Ref. No. 2005-30-5408-00045	肉、家禽、海产品和食品等
	3M Microbiology Products	Petrifilm High Sensitivity Coliform Count Plate	AFNOR Cert. No. 3M 01/7-03/99, AOAC Official Method 996.02, HPB-CANDA MFLP-85, MFLP-41B	乳制品、环境样品
		Petrifilm Rapid Coliform Count Plate	AFNOR Cert. No. 3M 01/5-03/97A, 3M 01/5-03/97B, 3M 01/5-03/97C, AOAC Official Method 2000.15	食品
		Redigel Violet Red Bile Medium for Coliform	AOAC Official Method 989.11, FDA-BAM 8th ed, Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16th ed. 1992	乳制品
	BioControl Systems, Inc.	ColiConfirm		所有食品
		Colitrak		所有食品
	bioMerieux	Bactometer		食品、无菌包装物、环境样品、医药品
		TEMPO TC	AFNOR BIO 12/17-12/05	食品、宠物食品
	Biopath Inc.	Coliform SwabCheck System		环境样品
	Bio-Rad Laboratories	RAPID <sup>®</sup> E. coli <sup>2</sup> <sup>™</sup>	AFNOR BRD 07/8-12/04	食品
BioSys, Inc. / Foss Electric A/S	BioSys/Microfoss Coliform Test	AOAC Performance Tested Method 010302	多种食品	

续表 11-8

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
大肠菌群	Don Whitley Scientific	RABIT		食品
	Foss Electric A/S	MicroFoss		食品、饲料
	Microgen Bioproducts Ltd.	Path-Chek		食品
	RCR Scientific	Pectin Gel Method	AOAC Official Method 989.11	乳制品
	Sy Lab	BacTrac 4100		食品、饮料、卫生学棉拭子
总大肠菌群、大肠杆菌、粪大肠菌群	BioControl Systems, Inc.	ColiComplete	AOAC Official Method 992.30	所有食品
		ColiTrak Plus	AOAC Official Method 988.19	食品, 冷藏和冷冻贝类除外
	Charm Sciences, Inc.	Ecolite	EPA -Total Coliform Rule	饮水、饮料
	Neogen	Hydrophobic Grid Membrane Filter	AOAC Official Method 983.25, 990.11, HPB-CANDA MFHPB-17, MF-HPB-26, MFLP-55	
大肠菌群、大肠杆菌	3M Microbiology Products	<i>E. coli</i> /Coliform Count Plate	AOAC Official Method 991.14, HPB-CANDA MFLP-41A, MFHPB-34, DIN Fachbericht 81 Petrifilm Technik 2000 edition, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan Notification No. 25, KCFR-Korea KFDA 2004-7.8.6.3, NordVal Ref. No. 2003-20-5408-00012, USDA FSIS 3 CFR Part 310.25, 9 CFR Part 381.94, MLG Chapter 3, NMKL 147-1993	家禽、肉、海产品、环境样品
	BioControl Systems, Inc.	SimPlate Coliform/ <i>E. coli</i> (CEc)		食品、环境样品
	Merck KGaA	ChromoCULT Coliform Agar ES		食品
	Nissui Pharmaceutical Co. LTD	Compact Dry CF & EC	AOAC Performance Tested Methods 110401 & 110402	水果及其制品
	vermicon AG	VIT-E. coli/Coliforms		水、食品

表 11-9 大肠杆菌(*Escherichia coli*)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
大肠杆菌	3M Microbiology Products	Petrifilm <i>E. coli</i> Count Plate	AFNOR Cert. No. 3M 01/8-06/01, AOAC Official Method 998.08, FDA-BAM 8th ed, NMKL 147, 1993, NordVal Ref. No. 2004-20-5408-00029, 2005-30-5408-00045	食品、肉类、家禽、海产品
	青岛海博生物技术有限公司	大肠杆菌显色培养基		食品、肉类、家禽、海产品
	BioControl Systems, Inc.	ColiComplete	AOAC Official Method 992.30	食品
		ColiTrak +	AOAC Official Method 988.19	食品
		SimPlate coliform/ <i>E. coli</i>	EMMAS	特定食品
	bioMerieux	Vitek GNI+	AOAC Official Method 991.13	食品
		COLI-ID	AFNOR BIO 12/5-01/99	食品
		TEMPO EC	AFNOR BIO 12/13-02/05	食品、宠物食品
	Biopath Inc.	<i>E. coli</i> Identification Swabs		环境棉拭子
	Bio-Rad Laboratories	RAPID <i>E. coli</i> 2™	AFNOR BRD 07/1-07/93, BRD 07/7-12/04	食品、生物样品
	Don Whitley Scientific	RABIT		食品、生物样品
	Foss Electric A/S	MicroFoss		食品、饲料
	Microgen Bioproducts Ltd.	RAPID Tube <i>E. coli</i> Test		纯培养物
	Organon Teknika	Biochemical Identification Kit	AOAC Official Method 989.12	食品
Scil Diagnostics	BACIdent <i>Escherichia coli</i> DNA Detection System		食品	
Sy Lab	BacTrac 4100		食品、饮料、卫生学棉拭子	
非 O157 大肠杆菌	Dynal Biotech	DYNABEADS EPEC/VTEC		食品、饲料、环境样品

续表 11-9

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
大肠杆菌 O157:H7	Becton Dickinson and Company	BBL™ CHROMagar™ O157	AOAC Performance Tested Method 090501	生的碎牛肉、烟熏鲑鱼、莴苣、干酪
	BioControl Systems, Inc.	Assurance EIA for EHEC	AOAC Official Method 996.10, HPB-CANDA MFLP-85	部分食品、原料、环境样品
		VIP for EHEC	AOAC Official Method 996.09, HPB-CANDA MFLP-87	食品、环境样品
		EHEC-8 Hour enrichment for <i>E. coli</i> O57:H7	Extension for AOAC Official Method 996.09 and AOAC Official Method 996.10	生的和煮熟的牛肉
	DuPont Qualicon	BAX® System PCR Assay for Screening <i>E. coli</i> O157:H7	AOAC Performance Tested Method 050501	生的绞细牛肉
	Neogen Corp.	ISO-GRID + SD-39 + Serological Confirmation	AOAC Official Method 997.11	食品
大肠杆菌 O157	ANI Biotech OY	Biocard EHEC		纯培养物
	Antex Biologics	VeroTest		
	Becton Dickinson	Difco EZ Coli		
	Binax, Inc	NOW <i>E. coli</i> O157 and O157:H7		
	bioMerieux	VIDAS <i>E. coli</i> O157 (ECO)	AFNOR Bio-12/06-03/99, SN/T 0973-2000, AOAC Performance Tested Method 010502	食品、原料
		VIDAS Immunocentration System	AFNOR Bio-12/8-07/00	食品
	Celsis Ltd.	PATH-STIK		食品
	Denka Seiken	<i>E. coli</i> O157, O111, O26 IMS Seiken		
		<i>E. coli</i> O157-CD		
		VTEC-Screen "Seiken"		
Diffchamb AB	Transia Card <i>E. coli</i> O157		肉类、乳和其他食品、水、环境样品	
	Transia Plate <i>E. coli</i> O157	AOAC Performance Tested Method 040401	肉、鱼、乳和其他食品、水	

续表 11-9

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
大肠 杆菌 O157	Droege's Wholesale Food Service for Strategic Diagnostic, Inc.	RapidChek™ for <i>E. coli</i> O157 (including H7) Lateral Flow Assay	AOAC Performance Tested Method 070201	生的无骨牛肉、生的绞细牛肉、苹果酒
	Dynal Biotech	Dynal Anti- <i>E. coli</i> O157	HPB-Canada MFLP-90, AFNOR Cert. no. DYN 16/2-0696, FDA-BAM, DIN 10167, NMKL, Official Method of Japan	食品、饲料、环境样品
	Foss Electric A/S	EiaFoss <i>E. coli</i> O157		食品
	GEM Biomedical	EC Lite		食品
	IDG, Lab M Ltd.	Captivate O157		乳及乳制品、肉、果汁、屠宰场、环境样品、动物粪便
	IGEN International	PATHIGEN <i>E. coli</i> O157 Test	AOAC Performance Tested Method Certificate no. 010301	肉类、家禽和其他食品、环境样品
	Kalix	<i>E. coli</i> Rapitest		食品、碎牛肉
	Matrix Micro-Science Ltd	PATHATRIX <i>E. coli</i> O157 Test System	AOAC Performance Tested 030202	生的碎牛肉
	Merck KGaA	Single Path <i>E. coli</i> O157	AOAC Performance Tested Method 010407	
	Meridian Diagnostics	Immunocard STAT		食品
		Premier EHEC		食品
	Microgen Bioproducts Ltd.	Microscreen <i>E. coli</i> O157		纯培养物
	Molecular Circuitry	Detex System MC-18 for <i>E. coli</i> O157 including H7	AOAC Performance Tested Method 000301	生牛肉、生禽肉
	Merck KGaA	Single Path <i>E. coli</i> O157		
	Meridian Diagnostics	Immunocard STAT		食品
		Premier EHEC		食品
Microgen Bioproducts Ltd.	Microscreen <i>E. coli</i> O157		纯培养物	
Molecular Circuitry	Detex System MC-18 for <i>E. coli</i> O157 including H7	AOAC Performance Tested Method 000301	生牛肉、生禽肉	

续表 11-9

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
大肠杆菌 O157	Morningstar Diagnostics, Inc.	<i>Escherichia coli</i> O157 Antigen Detection Test		肉类、家禽
	Neogen Corp.	Alert for <i>E. coli</i> O157		碎牛肉、牛肉丁、莴苣、苹果酒和其他食品、环境棉拭子
		REVEAL for <i>E. coli</i> O157, 8 hour	AOAC Official Method 2000.13, HPB-CANDA MFLP-94	碎牛肉、牛肉丁、莴苣、苹果酒和其他食品
		REVEAL for <i>E. coli</i> O157, 24 hour	AOAC Official Method 2000.14, HPB-CANDA MFLP-95	碎牛肉、牛肉丁、莴苣、苹果酒和其他食品、环境棉拭子
	Organon Teknika	EHEC-Tek		食品
	Oxoid Ltd.	Dryspot <i>E. coli</i> O157		食品
		<i>E. coli</i> O157 Latex		食品
		VTEC-RPLA		食品
	PE Biosystems	TaqMan <i>E. coli</i> O157; H7 Detection Kit		纯培养物
		TaqMan <i>E. coli</i> STX1 and STX2 Detecton Kit		纯培养物
	Pro-Lab Diagnostics	Prolex <i>E. coli</i> O157 Kit		
	Qualicon	BAX for the Detection of <i>E. coli</i> O157; H7	AOAC <i>Performance Tested Method</i> 990701, HPB-CANDA MFLP-30, USDA FSIS MLG 5A.00	肉、环境棉拭子
	r-Biopharm GmbH	RidaScreen Verotoxin		食品
	REMEL Inc.	RIM <i>E. coli</i> O157; H7 Latex test		纯培养物
	Sanofi Diagnostics Pasteur	PROBELIA <i>E. coli</i> O157; H7		
Sun International	C QUIC Plus <i>E. coli</i> O157 Test		食品	
TECRA INTERNATIONAL	TECRA <i>E. coli</i> O157; H7 VIA & TECRA <i>E. coli</i> O157 Immunocapture	AOAC <i>Performance Tested Method</i> 001101, HPB-CANDA MFLP-91	食品及相关样品	

续表 11-9

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
大肠杆菌 O157	Umedik Inc.	DIA/PRO FAST-Q™ <i>E. coli</i> O157:H7		食品
	Warnex Diagnostics Inc.	Warnex™ Rapid Pathogen Detection <i>Escherichia coli</i> O157 & O157:H7	AOAC Performance Tested Method 010408 & 010409	食品、碎牛肉
	Xenith BioMed	BioGem		
产 Verotoxin 细胞毒素大肠杆菌	Merck KGaA	Duopath Verotoxin Test	HPB-CANDA MFLP-93, AOAC Performance Tested Method 020402	

表 11-10 肠杆菌属 (*Enterobacter*) 快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
阪崎肠杆菌	Matrix Micro-Science Inc.	Pathatrix <i>Enterobacter sakazakii</i> PSAK50		婴儿配方食品、奶粉和相关产品
	Qualicon	Qualicon Bax® System Method for the Detection of <i>Enterobacter Sakazakii</i>	HPB-CANDA MFLP-27	食品、乳制品

表 11-11 肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
肠杆菌科	3M Microbiology Products	Petrifilm <i>Enterobacteriaceae</i> Count Plate	AFNOR Cert. No. 3M 01/6-09/97, AOAC Official Method 2003.01, DIN Fachbericht 81 Petrifilm Techik 2000 edition, NordVal Ref. No. 2004-20-5408-00027	食品
	Becton, Dickinson & Co.	<i>Enterobacteriaceae</i> II set available from BBL Microbiology Systems	AOAC Official Method 978.24	食品
	BioControl Systems, Inc.	SimPlate <i>Enterobacteriaceae</i>		食品
	bioMerieux	Rapid ID 32 E		食品、环境样品
	bioMerieux	Vitek GNI+	AOAC Official Method 991.13	食品
	Don Whitley Scientific	RABIT		食品

续表 11-11

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
肠杆菌科	Foss Electric A/S	MicroFoss		食品、饲料
	Organon Teknika	Biochemical Identification Kit	AOAC Official Method 989.12	食品
	Reidel-de Haen AG	ELIZA System for <i>Enterobacteriaceae</i>	DIN 38 411	谷类、水
	Sy Lab	BacTrac 4100		食品、饮料、卫生学棉拭子

表 11-12 乳酸菌(*Lactobacillus*)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
短乳杆菌	vermicon AG	VIT-Bier plus <i>L. brevis</i>		啤酒

表 11-13 军团菌属(*Legionella*)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
军团菌属	Reidel-de Haen AG	ELIZA System for <i>Legionella</i>	Fachgruppe der GdCh	水
军团菌属、嗜肺军团菌	vermicon AG	VIT- <i>Legionella</i>		水
		ScanVIT- <i>Legionella</i>		水

表 11-14 李斯特氏菌(*Listeria*)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
单核细胞增生李斯特氏菌、绵羊李斯特氏菌	Becton Dickinson and Company	BBL™ CHROMagar™ <i>Listeria</i>	AOAC Performance Tested Method 060501	生的碎牛肉、烟熏鲑鱼、莴苣、干酪
	青岛海博生物技术有限公司	李斯特氏菌显色培养基		食品、水产品、药品等
单核细胞增生李斯特氏菌	AES Laboratoire	ALOA ONE DAY	AFNOR AES-10/3-09/00	食品、环境样品
	bioMerieux	VIDAS <i>Listeria monocytogenes</i> (LMO)	AFNOR Bio-12/9-07/02, Bio-12/11-03/04, AOAC Official Method 2004.02, HPB-CANDA MFLP-33, SN/T 0184.1-2005, NordVal Ref. No. 2003-20-5408-00009	食品、原料
	Bio-Rad Laboratories	Rapid' L. Mono	AFNOR BRD 07/4-09/98, BRD 07/5-09/01, AOAC Performance Tested Method 030406, NordVal Ref. No. 2003-20-5408-00024	食品、乳制品、肉制品、水产品
IQ-Check™ <i>L. monocytogenes</i>		AFNOR BRD 07/10-04/05	食品	

续表 11-14

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
单核细胞增生李斯特氏菌	BioteCon Diagnostics	foodproof <i>Listeria monocytogenes</i>		食品
	BioteCon Diagnostics	LightCycler <i>Listeria monocytogenes</i> Detection System in combination with the <i>Listeria</i> Short-Prep foodproof® II Kit	AOAC Performance Tested Method 070401	食品
	CHROMagar	CHROMagar™ <i>Listeria</i>	AFNOR CHR-21/1-12/01	食品、环境样品
	Diffchamb Sweden	Transia Plate <i>Listeria monocytogenes</i>	NordVal Ref. No. 2004-30-5408-00034	肉、鱼、乳制品和其他食品
	Europrobe SA/Aureon Biosystems GmbH	Lumiprobe 24 <i>Listeria</i>	AFNOR EUR-15/3-12/05	乳制品(干酪除外)
	Foss Electric A/S	EiaFoss <i>Listeria</i>	HPB-CANDA MFLP-99	食品
	GenProbe	AccuProbe <i>Listeria monocytogenes</i>	AFNOR Bio-12/4-02/95, NordVal Ref. No. 2004-20-5408-00031	纯培养物
	Neogen Corp.	GENE TRAK <i>Listeria monocytogenes</i> Assay	BAM Chapter 10, AFNOR DNA-14/2-02/95, USDA FSIS MLG	食品、环境样品
		GeneQuence <i>Listeria monocytogenes</i> Test	AOAC Performance Tested method 120501	乳制品、肉、海产品、生菜、环境样品
	Organon Teknika	<i>Listeria</i> -Tek	AOAC Official Method 994.03	乳制品、海产品、肉类、环境样品
	Qualicon	BAX for <i>Listeria monocytogenes</i>	AOAC Official Method 2003.12 HPB-CANDA MFLP-28, USDA FSIS MLG 8.03	食品、乳制品
	Roche Diagnostic GmbH	Roche/Biotecon Diagnostics <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit in combination with shortPrep foodproof II Kit	AOAC Performance Tested Method 070401	
Sanofi Diagnostics Pasteur	PROBELIA			

续表 11-14

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
单核细胞增生李斯特氏菌	Solabia/Division Biokar Diagnostics	Compass <i>L. mono</i> Agar	AFNOR BKR-23/1-09/02, BKR-23/2-11/02, BKR-23/3-11/02	
单核细胞增生李斯特氏菌、李斯特氏菌属	BioControl Systems, Inc.	Assurance <i>Listeria</i> EIA	AOAC Official Method 996.14	食品、原料、环境样品
		VIP	AOAC Official Method 997.03, HPB-CANADA MFLP-34	食品、原料、环境样品
	vermicon AG	VIT- <i>Listeria</i>		食品(肉、鱼、乳制品)
	Warnex Diagnostics, Inc.	Warnex™ Rapid Pathogen Detection System for <i>Listeria monocytogenes</i> & <i>Listeria</i> species	HPB-CANADA MFLP-31, AOAC <i>Performance Tested Method</i> 040402 & 050401	食品
李斯特氏菌属	BioControl Systems, Inc.	OPUS for <i>Listeria</i>		食品
	bioMerieux	VIDAS <i>Listeria</i> (LIS)	AFNOR Bio-12/02-06/94, Bio-12/12-03/04, AOAC Official Method 999.06, 2004.06, EM-MAS 37489, HPB-CANADA MFHPB-29, NordVal Ref. No. 2003-20-5408-00016	食品、原料、环境样品
		VITEK GPI & GNI+	AOAC Official Method 992.19, USA FDA BAM Chapter 10	食品、原料、环境样品
	Biopath Inc.	SwabCheck System		环境棉拭子
	Diffchamb Sweden	Transia Plate <i>Listeria</i>	AFNOR TRA -02/6-11/95, NordVal ref. no. 2004-30-5408-00034	肉类、禽肉、鱼、蛋、乳制品和其他食品、饲料、环境样品
	Dynal Biotech	Dynabeads Anti- <i>Listeria</i>	AFNOR	食品、饲料、环境样品
	Foss Electric A/S	EiaFoss <i>Listeria</i>	AOAC <i>Performance Tested methods</i> 000401	食品

续表 11-14

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
李斯特氏菌属	IDG, Lab M Ltd.	Key ID <i>Listeria</i>		乳、乳制品、食品
	IGEN	PATHIGEN® <i>Listeria</i> Test		肉、家禽和其他食品、环境样品
	Matrix Micro-Science Ltd	PATHATRIX <i>Listeria</i> species Test System	AOAC Performance Tested method 090201	食品
	Matrix Micro-Science, Inc.	Pathatrix <i>Listeria</i> spp Pooling System	AOAC Performance Tested method 090201B	食品
	Merck KGaA	Singlepath <i>Listeria</i>		食物产品
	Microgen	Microgen <i>Listeria</i> -ID (MID-67)	AOAC Performance Tested method 060402	纯培养物
	Micro-Tech LLC	OligoScan <i>Listeria</i> Insitu Hybridization Assay		食品、环境样品
	Neogen Corporation	GENE-TRAK <i>Listeria</i> Assay	AOAC Official Method 993.09	乳制品、海产品、肉类
		GENE TRAK <i>Listeria</i> DLP Assay	AOAC Performance Tested method 981201	乳制品、肉、海产品、环境样品
		GeneQuence <i>Listeria</i> Microwell Test	AOAC Performance Tested method 010403	乳制品、肉、海产品、生菜、环境样品
		REVEAL for <i>Listeria</i>	AOAC Performance Tested method 960701	乳制品、食品、食品添加剂、环境棉拭子
	Organon Teknika	Micro-ID <i>Listeria</i>	AOAC Official Method 992.18	食品
	Oxoid Ltd.	Oxoid <i>Listeria</i> Rapid Test	AFNOR UNI-03/2-04/95, AOAC Performance Tested method 960701, NordVal Ref. No. 2004-20-5408-00030	食品、环境样品
		OXOID CHROMOGENIC <i>Listeria</i> Agar	AFNOR UNI-03/4-04/05	食品
	Paradigm	PDX-LIB	AOAC Performance Tested method 040501	瓷砖、不锈钢、塑料、密封混凝土表面拭子
Qualicon	BAX® System-PCR Assay for Screening <i>Listeria</i> genus	AOAC Performance Tested method 030502	食品、乳制品、环境表面样品	

续表 11-14

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
李斯特氏菌属	Strategic Diagnostic Inc.	RapidCheck <i>Listeria</i> SpeciesMedia	AOAC Performance Tested method 010406	食品、环境样品
	Sy Lab	BacTrac 4100		食品、饮料、卫生学棉拭子
	TECRA INTERNATIONAL	Tecra Ultima <i>Listeria</i>	AFNOR TEC-24/4-09/04	食品及相关样品、环境样品
		TECRA <i>Listeria</i> VIA	AOAC Official Method 995.22, 2002.09	食品及相关样品、环境样品
	umedik Inc.	DIA/PRO FAST-Q™ <i>Listeria</i> spp.		食品
	VICAM	Listertest Lift Test	AOAC Performance Tested method 930701B	食品、环境样品

表 11-15 分枝杆菌(*Mycobacteria*)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
副结核分枝杆菌	Biotype AG	Bactotype Amplification Kit <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>		来自牛、羊和其他反刍动物的新鲜活冷冻粪便
		Bactotype Detection Kit <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> Stool Test		来自牛、羊和其他反刍动物的新鲜活冷冻粪便
	Matrix MicroScience Inc.	Pathatrix MAP Test System		牛奶

表 11-16 支原体(*Mycoplasma*)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
鸡毒支原体	Biotype AG	Bactotype Amplification Kit <i>Mycoplasma gallisepticum</i>		家禽气管棉拭子
鸡滑膜支原体	Biotype AG	Bactotype Amplification Kit <i>Mycoplasma synoviae</i>		家禽气管棉拭子

表 11-17 假单胞菌(*Pseudomonas*)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
假单胞菌	Scil Diagnostics	BACIdent <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DNA Detection Kit		食品
	TECRA INTERNATIONAL	<i>Pseudomonas</i> VIA		食品
铜绿假单胞菌	vermicon AG	VIT- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		药品、矿泉水、化妆品
	Neogen	HGMF	HPB-CANDA MFO-33, MFLP-61, MFLP-61B	水、冰

表 11-18 沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
沙门氏 菌属	AES Laboratoire	Simple method for <i>Salmonella</i>	AFNOR AES-0/4-05/04	食品、环境样品
	ANI Biotech OY	ANI <i>Salmonella</i> Latex Test		纯培养物
	Becton Dickinson and Company	BBL™ CHROMagar™ <i>Salmonella</i>	Performance Tested Method 020502	特定食品
	BioControl Systems, Inc.	Immunodiffusion Screening Method(1-2 Test)	AOAC Official Method 989.13, MLP-70	食品、原料、环境样品
		Assurance Gold <i>Salmonella</i> EIA	AOAC Official Method 999.08	食品、原料、环境样品
		Assurance <i>Salmonella</i> EIA	AOAC Official Method 992.11	食品、原料、环境样品
		VIP for <i>Salmonella</i>	AOAC Official Method 999.09	食品、原料、环境样品
		ISO 6579:2002 Culture Method	AOAC Official Method 2002.10	鲜干酪、冷藏和冷冻家禽肉、蛋制品
	Bioline Denmark	Bioline <i>Salmonella</i>	AFNOR BLN-26/01-03/04, BLN-26/02-03/04, NordVal ref. no. 2003-20-5408-00015, 2004-20-5408-00028	食品、动物饲料
	bioMerieux	VIDAS Immuno Concentration <i>Salmonella</i>	AFNOR Bio-12/06-03/99, AOAC Official Method 2001.07, 2001.08, 2001.09, NordVal Ref. No. 2003-20-5408-00018	所有食品
bioMerieux	Api 20E	AOAC Official Method 978.24	所有食品	

续表 11-18

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
沙门氏 菌属	bioMerieux	VIDAS <i>Salmonella</i> (SLM)	AFNOR Bio-12/16-09/05、 Bio-12/10-09/02, AOAC Official Method 996. 08、 2004. 03, DIN 10121, EM- MAS 37490, HPB-CANDA MFHPB-24, NordVal Ref. No. 2003-20-5408-00017	食品、原料
		Vitek GNI+	AOAC Official Method 991. 13、978. 24, USA FDA BAM Chapter 5	食品
	Bio-Rad Laborato- ries	RAPID <sup>1</sup> <i>Salmonella</i>	AFNOR BRD 07/11- 12/05	所有人类和动 物食物产品、 环境样品
		iQ-Check <sup>TM</sup> <i>Salmonella</i>	AFNOR BRD 07/6-07/04, NordVal Ref. No. 2004- 30-5408-00035	所有人类和动 物食物产品、 环境样品
	BioteCon Diagnos- tics	foodproof <i>Salmonella</i>	DIN	干食品、糖 果、肉
	Celsis Ltd.	PATH-STIK	AOAC <i>Performance Tested Method</i> 941001	食品
	Difco laboratories	FA <i>Salmonella</i>	AOAC Official Method 975. 54	食品
	Diffchamb AB	Transia Card <i>Salmonella</i>		肉、家禽、鱼、 蛋及其他食物 产品、饲料、环 境样品
	Diffchamb Sweden	Transia Plate <i>Salmonella</i> GOLD	AFNOR TRA-02/8-03/ 01, NordVal Ref. No. 2004-30-5408-00033	食品、饲料、环 境样品
	Don Whitley Sci- entific	RABIT		食品、生物 样品

续表 11-18

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
沙门氏 菌属	Dr. Bommeli AG	CHEKIT <i>Salmonella enteritidis</i> Kit		肉、家禽
	Dynal Biotech	Dynabeads Anti- <i>Salmonella</i>	AOAC Performance Tested Method 970401, DYN 16/1-0696	食品、饲料、环境样品
	Europrobe SA/ Aureon Biosystems GmbH	Lumiprobe 24 <i>Salmonella</i>	AFNOR EUR-15/3-12/05	食品
	Foss Electric A/S	EiaFoss <i>Salmonella</i>	AOAC Performance Tested Method 980801, HPB-CANDA MFLP-100, DordVal Ref. No. 2003-20-5408-00021	食品、肉制品
	GEM Biomedical	<i>Salmonella</i> Screen CLIA		食品
	GeneSystem	Genedics Cyler <i>Salmonella</i>	AFNOR GEN-25/01-12/03	食品、动物饲料
	IDEXX Laboratories	FlockChek <i>Salmonella enteritidis</i> Antibody Test Kit		肉、家禽
	IGEN	PATHIGEN® <i>Salmonella</i> Test	NPIP Approved	肉、家禽及其他食品样品、环境样品
	Intelligent Monitoring Systems	<i>Salmonella enteritidis</i> Pathogen Detection Kit		食品、水
	Labor Diagnostik Leipzig	Salmotype		鸡肉、猪肉
	Mast Diagnostics Ltd	Mastazyme <i>Salmonella</i>	AFNOR MAS 17/1-03/98, AOAC Performance Tested Method 960901, NordVal Ref. No. 2004-20-5408-00028	食品、饲料、水、棉拭子
	Matrix Micro-Science Ltd	PATHATRIX System for <i>Salmonella</i> species	AOAC Performance Tested 090203	食品

续表 11-18

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
沙门氏 菌属	Matrix Micro- Science, Inc.	Pathatrix <i>Salmonella</i> spp. Pooling Test System	AOAC Performance Tested	食品
	Merck KGaA.	Diasalm		
		Singlepath® <i>Salmonella</i> Lateral Flow Assay	AOAC Performance Tested Method 060401	特定食品
	Microgen Bioprod- ucts Ltd.	MicroScreen <i>Salmonella</i>		纯培养物
		Path-Chek		食品
	Matrix Micro- Science Ltd	PATHATRIX System for <i>Salmonella</i>	AOAC Performance Test- ed Method 090203	食品
	Neogen Corp.	Alert for <i>Salmonella</i>	HPB-CANDA MFLP-97	食品
		GENE TRAK <i>Salmonel- la</i> Assay	AOAC Official Method 987.10	食品
		GENE TRAK <i>Salmonel- la</i> DLP Assay	AOAC Official Method 990.13, AOAC Per form- ance Tested Method 961101	食品
		ISO-Grid + EF18 Agar		
		REVEAL <i>Salmonella</i>	AFNOR NEO-22/1-05/ 02, AOAC Performance Tested Method 960801	食品、环境 样品
	Organon Teknika	Biochemical Identification Kit	AOAC Official Method 989.12	食品
		<i>Salmonella</i> Bio-EnzaBead Screen Kit	AOAC Official Method 986.35, 987.11, 993.08, USDA-FSIS 5/94	食品
		<i>Salmonella</i> -Tek	AOAC Official Method 993.08	食品
	Oxoid Ltd.	O. B. I. S. PYR Test		食品
		O. B. I. S. <i>Salmonella</i> Test		食品
		Oxoid <i>Salmonella</i> Rapid Test	AFNOR UNI-03/1-05/ 91, AOAC Performance Tested Method 960902	食品、环境 样品

续表 11-18

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象	
沙门氏 菌属	PE Biosystems	TaqMan for <i>Salmonella</i>		纯培养物	
	Qualicon	BAX for Confirming Suspect Colonies/ <i>Salmonella</i>	AOAC Official Method 2003.09, HPB-CANDA MFLP-29, HPB-CANDA MFLP-62, USDA FSIS MLG 4C.00, AFNOR QUA 18/3-11/02, Nord-Val 2003-03-20-5408-00023	食品、禽肉	
	Roche	Enterotube II	AOAC Official Method 978.24	食品	
	Roche Diagnostics GmbH	Roche Diagnostics Light-Cycler® foodproof <i>Salmonella</i> Detection Kit for <i>Salmonella</i> spp. in combination with ShortPrep foodproof I Kit	AOAC Performance Tested Method 120301	食品	
	Rhone Poulenc Diagnostics		Locate ELISA	AOAC Official Method 997.16, AFNOR	食品
			Spectate		食品
			Pastorex		
			PROBELIA	AFNOR	纯培养物
	Scil Diagnostics		BACIdent <i>Salmonella</i> spp. DNA Detection System		食品
	Stratecon Diagnostics		RapidChek <i>Salmonella</i> Assay	AOAC Performance Tested Method 030301	食品、水
	Sun International		C QUIC PLUS <i>Salmonella</i> Test		
	Sy Lab		BacTrac 4100		食品、饮料、卫生学棉拭子
	TECRA INTERNATIONAL		TECRA <i>Salmonella</i> VIA	AOAC Official Method 998.09, HPB-CANDA MFLP-35	食品及相关样品、环境样品

续表 11-18

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
沙门氏菌属	TECRA INTERNATIONAL	TECRA <i>Salmonella</i> EIA	AOAC Official Method 989.14	食品及相关样品、环境样品
		TECRA-TARK <i>Salmonella</i> ASSAY	AOAC Official Method 989.13	食品
		TECRA Unique <i>Salmonella</i> Test	AFNOR TEC-24/3-12/03、TEC-24/2-04/03、AOAC Official Method 2000.07	食品
	umedik Inc.	DIA/PRO FAST-Q™ <i>Salmonella</i> spp.		食品
	vermicon AG	VIT- <i>Salmonella</i>		食品(奶制品、肉、鱼)、粪便
	VICAM	<i>Salmonella</i> Screen/ <i>Salmonella</i> Verify	AOAC Performance Tested Method 961002,	食品、环境样品
	Warnex Diagnostics Inc.	Warnex™ Rapid Pathogen Detection System for <i>Salmonella</i>	AOAC Performance Tested Method 070402, HPB-Canada MFLP-32	食品
沙门氏菌属和李斯特氏菌属	Matrix Micro-Science Ltd	PATHATRIX System for <i>Listeria/Salmonella</i> species	AOAC Performance Tested Method 090202	食品

表 11-19 葡萄球菌(*Staphylococcus*)

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
葡萄球菌	bioMerieux	ID 32 STAPH		纯培养物
		Rapid ID 32 STAPH		纯培养物
		Rapidec Staph		纯培养物
	Bio-Rad Laboratories	Rapid' Staph™	AFNOR BRD 07/9-02/05	食品

续表 11-19

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
金黄色葡萄球菌	3M Microbiology Products	Staph Express Count System	AFNOR Cert. No. 3M 01/9-04/03, AOAC Official Method 2003. 07, 2003. 08, 2003. 11, HPB-CANDA MFLP-21, NordVal Ref. No. 2003-20-5408-00019, 2005-30-5408-00047	所有食品、环境样品、精制食品、部分乳制品、部分家禽、肉类和海产品
		Petrifilm Rapid <i>S. aureus</i> Count Plate	AOAC Official Method 2001. 05	食品
	Becton Dickenson	BBL CHROMAGAR <i>Staph aureus</i>	AOAC Performance Tested Method 100503	纯培养物
		Difco Staph Lates Slide		纯培养物
	bioMerieux	Slidex Staph Kit		纯培养物
		Staphyslide <i>Staph. aureus</i> Confirmation		纯培养物
		VIDAS Staph. Enterotoxin		食品
	Diffchamb AB	Transia Plate <i>Staphylococcal</i> Enterotoxin		食品
	Don Whitley Scientific	RABIT		食品和生物学样品
	GenProbe	GenProbe AccuProbe <i>Staphylococcus aureus</i>		纯培养物
	Mast Diagnostics	Mastastaph <i>Staph aureus</i>		生物学样品
	Merck KGaA.	Bactident Staph		纯培养物
	Neogen Corporation	GENE TRAK <i>Staphylococcus aureus</i> Assay		食品
	Omega Diagnostics Ltd.	Avistaph		生物学样品
	Oxoid Ltd.	Dryspot Staphylect Plus		食品和生物学样品
		Oxoid Staphylococcal Enterotoxin RPLA Kit		食品和生物学样品
Staphylase <i>Staph. aureus</i> Confirmation			食品和生物学样品	
<i>Staphylococcal</i> Enterotoxin Detection Kit			食品和生物学样品	

续表 11-19

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
金黄色葡萄球菌	R-Biopharm GmbH	Ridascreen <i>Staphylococcal Enterotoxin</i> ELISA		食品
	REMEL Inc.	BACTi Staph		纯培养物
	Rhone Poulenc Diagnostics	Staphaurex <i>Staph. aureus</i> Confirmation		
	Scil Diagnostics	BACIdent <i>Staphylococcus aureus</i> DNA Detection System		食品
	Sy Lab	BacTrac 4100		食品、饮料、卫生学棉拭子
	TECRA INTERNATIONAL	TECRA <i>Staphylococcus aureus</i> VIA	New Zealand Dairy Board Evalutest, Australia	食品、化妆品、医药品
	Trisum Corp.	AUREUS TEST	AOAC Official Method 995.12	食品
	vermicon AG	VIT- <i>Staphylococcus</i>		食品、医药制品
	青岛海博生物技术有限公司	金黄色葡萄球菌显色培养基		食品、水、饮料
葡萄球菌肠毒素 A、B、C (C1、C2、C3)、D 和 E	bioMerieux, Inc.	VIDAS <i>Staphylococcus</i> Enterotoxin (SET 2)	AOAC Performance Tested Methods 070404	各种食品
	TECRA INTERNATIONAL Corp.	TECRA SET EIA	AOAC Official Method 993.06	各种食品

表 11-20 弧菌(*Vibrios*)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
O1 型霍乱弧菌	Intelligent Monitoring Systems	<i>Vibrio cholera</i> O1 Kit		食品、水
	New Horizons Diagnostics	Cholera SMART Water		水、人类粪便
副溶血性弧菌	Microgen Bioproducts Ltd.	Path-Chek		食品

表 11-21 酵母菌(*Yeast*)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
酵母菌	Aber Instruments	Microcyte Flow Cytometer		
	bioMerieux	API 20 C	FDA Approved	纯培养物
		ID 32 C		纯培养物
	Biopath Inc	Yeast and Mold Swab Kit		环境棉拭子
	Chemunex	ChemFlow		食品、水、化妆品、医药品
	Foss Electric A/S	MicroFoss		食品、饲料
	Neogen Corporation	ISO-Grid YM11 + Agar		
Sy Lab	BacTrac 4100		食品、饮料、卫生学棉拭子	

续表 11-21

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
酵母菌 和霉菌 总数	3M Microbiology Products	Petrifilm Yeast and Mold Count Plate	AOAC Official Method 997.02, HPB-CANDA MFH- PB-32、MFLP-41A, NordVal Ref. No. 2003-20-5408-00013	食品
	BioControl Sys- tems, Inc.	SimPlate Yeast and Mold Color Indicator (YM-CI)	AOAC Official Meth- od 2002.11	食品、原料、环境 样品
	Neogen Corp.	ISO-GRID	AOAC Official Meth- od 995.21	食品
	Nissui Pharmaceu- tical Co. LTD	Compact Dry YM	AOAC Performance Tested Methods 100401	水果及水果产品

表 11-22 小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)快速检测系统一览表

分析物	公司	试剂盒名称	认可情况	主要适用对象
小肠结肠炎 耶尔森氏菌	Microgen Bioprod- ucts Ltd.	Microgen <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> Latex		纯培养物

### 1. 电阻抗法

电阻抗法的原理是细菌在培养基内生长繁殖的过程中,将会使培养基中的大分子电活性物质(如碳水化合物、蛋白质和脂类等),代谢为具有电活性的小分子物质(如乳酸盐、醋酸盐等),这些离子态物质能增加培养基的导电性,使培养基的阻抗发生变化,通过检测培养基的电阻抗变化情况,判定细菌在培养基中的生长繁殖特性,即可检测出相应的细菌。如 Bactometer<sup>®</sup>全自动微生物计算及监控系统就是利用电阻抗的原理定量检测食品中的菌落总数、肠道杆菌、大肠菌群及霉菌和酵母菌等细菌,微生物分析仪(Microbiological analyzer<sup>®</sup>)亦是利用电阻抗的原理定量检测食品中的沙门氏菌(AOAC 991.38)。

### 2. 微量生化法

随着人们对细菌进行快速生化特性的需求增加,使高精密度(90%)和高重现性的商业试剂盒得以快速发展。至今,市售的微生物鉴定用试剂盒有多种,国内比较常用的是 AOAC、USA/FDA、USDA/FSIS、加拿大健康署(Health Canada)、AFNOR 等国际知名组织认可的 API<sup>®</sup>系列鉴定试剂条和 VITEK<sup>®</sup>全自动微生物鉴定系统。二者均是通过样品与微管或反应池中的风干培养基基质发生生化反应,从而根据反应的总体特征鉴定细菌。API<sup>®</sup>系列鉴定试剂条已成为全球性的细菌鉴定“金标准”,其可鉴定 550 多种细菌。VITEK<sup>®</sup>全自动微生物鉴定系统可鉴定 102 种革兰氏阴性杆菌、47 种革兰氏阳性菌、42 种

革兰氏阴性非发酵菌、85 种厌氧菌、38 种酵母菌、17 种需氧芽孢杆菌、28 种奈瑟菌嗜血杆菌等。

### 3. 根据酶触反应及代谢产物快速检测细菌

快速酶触反应是根据细菌在生长繁殖过程中可合成和释放某些特异性的酶,选用相应的底物和指示剂,反应的测定结果有助于细菌快速诊断。国内比较常用的有:被 AOAC、FDA、FSIS、NMKL、AFNOR、CCFRA、DIN 等众多国际权威机构的认证认可的定量检测食品中的细菌总数、霉菌、酵母菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠菌群、肠杆菌科、耐热大肠菌群(粪大肠菌群)、乳酸菌、环境李斯特氏菌等细菌的 3M Petrifilm™ 微生物测试片、沙门氏菌、李斯特氏菌、大肠杆菌、大肠杆菌 O157、大肠菌群、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、弧菌和念珠菌等病原菌的显色培养基,以及被 AFNOR 认可的定量检测食品中细菌总数、大肠杆菌、大肠菌群、肠杆菌科的 TEMPO® 自动微生物定量检测仪(AFNOR BIO 12/13 02/05、BIO 12/15 - 09/05 和 BIO 12/07 - 12/05)。

### 4. 分子生物学技术

#### (1) 核酸探针技术

核酸探针是指带有标记的特异 DNA 片断。根据碱基互补原则,核酸探针能特异性地与目的 DNA 杂交,最后用特定的方法测定标记物。探针标记方式分为放射性标记、非放射性标记,具有直观、准确等特点,例如 GENE-TRAK® 沙门氏菌检测试剂盒(AOAC990. 13、AOAC 991. 12)、GENE-TRAK® 李斯特氏菌检测盒(AOAC993. 09),此外,基于核酸探针杂交的基因芯片技术,虽然其灵敏度与 PCR 技术相当,但其具有高通量、多参数、高精度度和快速分析等特征,所以备受青睐,我国已将此技术引入到食品安全检测领域,并被标准化,如 SN/T 1543—2005《食源性致病菌基因芯片鉴定方法》和 GB/T 19495. 6—2004《转基因产品检测 基因芯片检验方法》。

#### (2) PCR 技术

基因探针技术虽已广泛应用,但主要问题是灵敏度不够高,使基因探针技术应用受到限制。在体外进行 DNA 扩增的简易、快速、灵敏和高特异性的聚合酶链式反应(PCR),在一定程度上解决了基因探针所存在的问题。

该技术引入到食品微生物检验领域,已被标准化,如 DIN 10135:1999《沙门氏菌聚合酶连锁反应(PCR)检测方法》(Method of detection *Salmonella* using the polymerase chain reation (PCR))、ISO/TS 20863:2005《食品和动物饲料微生物学——聚合酶链反应(PCR)检测食源病原体——热循环器的性能试验》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Polymerase chain reation (PCR) for the detertion of food-borne pathogens—Performance testing for thermal cycles)、ISO/TS 22174:2005《食品和动物饲料微生物学——聚合酶链反应(PCR)检测食源病原体——通用要求和定义》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Polymerase chain reatin (PCR) for the detetion of food-borne pathogens—General requirement and defintions)、ISO 20837:2006《食品和动物饲料微生物学——聚合酶链反应(PCR)检测食源病原体——定性检测用样品的制备》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Polymerase chain reation (PCR) for the detertion of food-borne

pathogens—Requirements for sample preparation for qualitative methods)、ISO/TS20838:2006《食品和动物饲料微生物学——聚合酶链反应(PCR)检测食源病原体——定性方法的扩增和检测条件》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens—Requirements for amplification and detection for qualitative methods)、加拿大健康署(Health Canada) MFLP-72 食品中 O1 群和非 O1 群霍乱弧菌的分离和鉴定(The isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 from food)、USA FDA BAM 第 9 章 弧菌(*Vibrio*)和 USA APHA 第 40 章弧菌(*Vibrio*)规定可用 PCR 检测食品中的致病弧菌(如霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌等)、USA FDA BAM 第 24 章用基因探针鉴定食源致病菌(Identification of foodborne bacterial pathogens by gene probes)和 USA APHA 第 35 章致病性大肠杆菌(Pathogenic *Escherichia coli*)规定可用 PCR 检测食品中产志贺氏毒素的致病大肠杆菌和霍乱弧菌、SN/T 1632.2—2005《奶粉中阪崎肠杆菌检验方法 第 2 部分:PCR 方法》、SN/T 1632.3—2005《奶粉中阪崎肠杆菌检验方法 第 3 部分:荧光 PCR 方法》,使用 PCR 检测食品中霍乱弧菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、产志贺氏毒素大肠杆菌等致病菌的出入境检验检疫行业标准(SN)均在报批中,即将发布。

不难预计,PCR 技术将成为食品微生物检验体系中广为接受的快速检测方法之一。

目前利用 PCR 技术检测病原菌的商品化仪器有被 AOAC、USDA-FSIS、Health Canada、AFNOR、NordVal、Brazil MAPA、Japanese Ministry of Health 等权威机构认可的 BAX<sup>®</sup>全自动病原菌检测系统,可检测沙门氏菌、大肠杆菌 O157、单增李斯特菌和坂崎肠杆菌等致病菌,此外还有 RiboPrinter<sup>®</sup>微生物鉴定系统,可鉴定包括沙门氏菌、大肠杆菌 O157、单核细胞增生李斯特氏菌和坂崎肠杆菌等致病菌在内的 1400 多种细菌,美中不足的是成本较高。

## 5. 免疫学细菌检测技术

### (1) 荧光抗体检测技术(IFA)

用以快速检测细菌的荧光抗体技术主要有直接法和间接法。直接荧光抗体检测法是在待检样品上直接滴加已知特异性荧光标记的抗血清,经洗涤后在荧光显微镜下观察结果;间接法是在待检样品上滴加已知细菌特异性抗血清,作用后经洗涤,再加入荧光标记的抗体并在荧光显微镜下观察结果。在食品微生物检验领域内,国内使用的比较多是 mini-VIDAS<sup>®</sup>全自动荧光酶标免疫测试系统,该系统已被 AFNOR、AOAC、DIN、EMMAS、Health Canada、NordVal 等权威机构认可,可检验李斯特氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、沙门氏菌、葡萄球菌肠毒素、空肠弯曲杆菌、大肠杆菌 O157,SN/T 0973—2000《进出口肉及肉制品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 检验方法》和 SN/T 0184.1—2005《进出口食品中单核细胞增生李斯特氏菌检测方法》中就采用了该系统。

### (2) 免疫酶技术(EIA)

抗原与抗体(尤其是单克隆抗体)间的特效结合,以及反应的简捷性和多功能性,促进人们设计和开发了多种抗体检测模式。常用酶技术分为固相免疫酶测定技术、免疫酶定位技术和免疫酶沉淀技术。固相免疫酶测定技术又可分为限量抗原底物酶法和酶联免疫吸附试

验(ELISA)。在食品微生物检验领域内,国内使用比较多的有Reveal<sup>®</sup>大肠杆菌 O157:H7 检测系统、Reveal<sup>®</sup>沙门氏菌检测系统、GeneQuence<sup>®</sup>李斯特氏菌检测试剂盒、金黄色葡萄球菌乳胶凝集试剂盒等。

### (3) 免疫磁珠分离法(IMS)

在免疫磁珠(IMS)分离技术里,用连接抗体的磁珠或磁颗粒来捕捉前增菌培养基中的病原体,然后将所捕捉到的抗原划平板或是其他方法进一步测试。ISO 166654:2001《食品和动物饲料微生物学——大肠杆菌 O157 基准检验方法》引进了此技术,目前可以购买沙门氏菌、李斯特氏菌、大肠杆菌 O157、大肠杆菌 O145、大肠杆菌 O111、大肠杆菌 O103、大肠杆菌 O26 等细菌的免疫磁珠。

## 6. 其他方法

可用来鉴定细菌的其他方法包括脂肪酸图谱(如 Sherlock<sup>®</sup>全自动细菌鉴定系统)、碳氧化图谱(Biolog<sup>®</sup>微生物鉴定仪)、生物传感器等。

## 二、微生物快速检测系统的局限性

大部分快速方法适用于检测单一微生物,适用于质量控制程序中快速筛选大量食品样品中所存在的特殊病原体或毒素。然而,快速检验方法所得阳性者,仅仅是可疑,必须用标准参考方法予以证实,虽然证实试验需要几天,但不能予以限制。

快速检验方法的评估结果表明,其对于某类食品的性能优于其他食品,很大程度上是由于食品成分干扰所致,有些食品成分对于快速方法中所应用的技术是比较麻烦的。例如,每一食品成分可能抑制 DNA 杂交或 Taq 聚合酶,但对抗原-抗体相互作用没有影响,反之亦然。既然方法的灵敏度、特异性和精确性依赖于待验食品,那么进行比较研究以确保某一特殊检验方法能有效分析此类食品是明智的。

基于 DNA 检验方法的特异性通过短的探针来显示,因此用特殊探针或引物检测毒素基因,阳性结果仅仅表明某细菌具有该基因序列,以及某细菌可能是产毒的,但不能从客观上说明该基因得以表达,并产生毒素,例如在梭菌和葡萄球菌中毒病例中,DNA 杂交和 PCR 仅能检测到基因的存在,但不能用来检测预先形成的毒素是否存在。

因此,随着某一快速方法更加频繁的使用,其好处和局限性同时变得更加明显。使用者在选择和彻底评估这些快速方法时,必须保持谨慎。

## 三、微生物快速检测系统的认可

相对于传统检验方法,微生物检验检测系统的新发展,至少在理论上使食品微生物检验和鉴定更快、更方便、更灵敏、更准确。从表 11-1~表 11-22 可以得知,当前检测食品中细菌总数的快速方法有 30 多种,检测食品中大肠杆菌 O157 的快速方法 50 多种,检测食品中沙门氏菌的快速方法 70 多种,如此多的选择可能引起使用者混淆和不知所措。

更为重要的是,由于种种原因,使用者不能对如此多的选择进行有效确认和验证,值得庆幸的是,一些知名组织或机构在开展包括食品微生物快速检验方法的认可工作,经过这些知名技术组织或机构认可的食品微生物快速检验方法,便是上文所提及的可替代方法,或者

所谓的“公定方法”(CNAL-M/CF:04)。

以下是认可微生物快速检测系统的主要知名技术组织或机构：

(1) 国际分析家协会(AOAC)，执行标准为：国际方法委员会关于食品微生物定性和定量检验方法的确认指南(2002)(AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis)；

(2) 国际标准化组织(ISO)，执行标准为：ISO 16140:2003《食品和动物饲料微生物学——可替代方法的确认规范》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods)；

(3) 北欧食品分析委员会(NMKL)，执行标准为：ISO 16140:2003《食品和动物饲料微生物学——可替代方法的确认规范》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods)；

(4) 法国标准协会(AFNOR)，执行标准为：ISO 16140:2003《食品和动物饲料微生物学——可替代方法的确认规范》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods)；

(5) 澳大利亚国家测试认证中心(NATA)，执行标准为：ISO 16140:2003《食品和动物饲料微生物学——可替代方法的确认规范》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods)；

(6) NordVal，执行标准为：NV-DOC. D—2005-01-01《可替代微生物方法的确认规范》(Protocol for the validation of alternative microbiological methods)；

(7) 欧洲认证组织(MicroVal)，执行标准为：ISO 16140:2003《食品和动物饲料微生物学——可替代方法的确认规范》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods)。

以上认可微生物快速检测系统的主要知名技术组织或机构的相互关系见图 11-1，其认可的微生物快速检测系统见表 11-1~表 11-22。

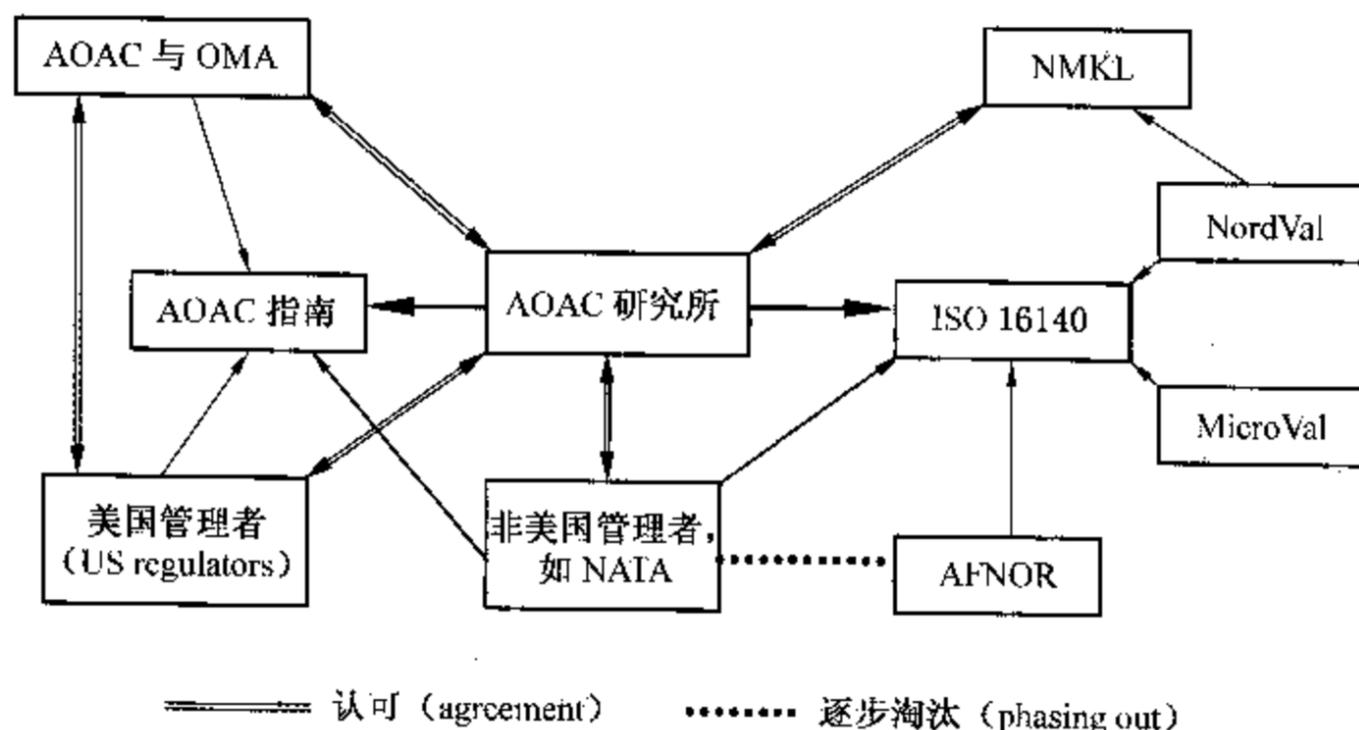


图 11-1 认可微生物快速检测系统的主要知名技术组织或机构的相互关系

在国内,某些技术组织或机构,已经开展相关业务,但其权威性、公正性、科学性和实用性尚未得到广泛认可。

如果实验室研发出了一套微生物快速检测系统,可进入以上知名技术组织或机构的网站,查询相关文件,然后按其要求申请认可。

### 第三节 微生物检验方法的选择

近年来,各国政府及国际组织纷纷对涉及微生物的方方面面提出了日趋严格的要求,依法对食品中的微生物进行监测是国家意志的体现。各国政府、部门以及非官方组织或机构纷纷出台相关技术标准。编者在标准信息服务网(<http://www.standard.org.cn/>)上进行搜索统计,单是检测食品中大肠杆菌的方法多达38种,如果加上该网站数据库以外的标准方法和非标准方法(如企业标准、地方标准等),种类和数量更多,如此多的选择可能引起使用者混淆和不知所措。选择适宜的检验方法是实验室的一个“基本功”。

选择微生物检验方法时,应考虑以下因素:

- 1) 客户要求;
- 2) 方法的准确性;
- 3) 方法的特异性;
- 4) 方法的实用性;
- 5) 方法的稳定性;
- 6) 方法的灵敏度;
- 7) 方法的检测限和测量限;
- 8) 实验室硬件条件(仪器、设备、场地设施、人员资质等);
- 9) 商业快速检测系统的供应保证、价格、认可程度和售后服务。

通常情况下,实验室应采用满足客户(注:对于企业实验室,其所在单位为其内部客户)需要并适用于所进行的检测的方法,包括抽样的方法。应优先使用以国际、区域或国家标准发布的方法。当认为客户提出的方法不合适或已过期时,实验室应通知客户。

当客户未指定所用方法时,除优先使用国际、区域、国家或知名的技术组织发布的标准方法外,还可选择非标准方法(有关科学书籍和期刊公布的方法、实验室研发的未出版的方法、部分由设备制造商指定的方法、扩充和修改过的标准方法、部分企业标准、部分协会标准、部分地方标准等),但必须对所选择的非标准方法进行严格验证、确认和审批,如能满足实验室的预期用途,并经客户同意,也可使用。

### 第四节 微生物检验方法的编写

标准是科研成果的高度概括和浓缩,是稳定和提高产品质量的基础,是进行生产和贸易的依据。而标准文本又是开展标准化活动最基本的信息载体,因此标准的编写是一项不可忽视的、至关重要的工作,标准中任何一点差错都会给标准的贯彻实施带来影响。

## 一、标准方法的编写

“没有规矩，不成方圆”。标准是一种特定形式的技术文件，为了便于编写、审查和使用，各国对标准的编写都有一套统一的编写方法，但不同类别和不同系列标准的编写方法不完全一致。

在我国，如果实验室主持或参与编写某一标准方法，必须严格遵守和执行该标准主管部门、国家或知名技术组织的规章和技术规范。有关标准制定的规章包括《中华人民共和国标准化法》、《中华人民共和国标准化法实施条例》、《国家标准管理办法》、《行业标准管理办法》、《出入境检验检疫标准化工作管理办法》、《出入境检验检疫标准制(修)订工作细则》、《采用国际标准管理办法》等；有关标准编写的技术规范包括 GB/T 1(所有部分)《标准化工作导则》、GB/T 20000(所有部分)《标准化工作指南》、GB/T 20001—2001(所有部分)《标准编写规则》、GB 18841—2002《职业安全卫生标准编写规则》，以上几项标准是基础标准，行业标准的制定原则上必须与其一致，或严于以上标准；我国出入境检验检疫系统已发布几个检验检疫行业标准编写的基本规定，即 SN/T 0001—1995《出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检验方法标准编写的基本规定》、SN/T 0002—2004《进出口机电商品检验规程编写的基本规定》、SN/T 0004—1995《进出口机电商品运输包装检验规程中标准编写的基本规定》、SN/T 0005—1996《出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素生物学检验方法标准编写的基本规定》、SN/T 1103—2002《进出口纺织品检验规程、检验方法标准编写的基本规定》、SN/T 1255—2003《出入境动物检验检疫标准编定的基本规定》、SN/T 1256—2003《国境卫生检疫标准编写基本规则》、SN/T 1345—2003《进出境植物检疫规程、检验鉴定和除害处理标准编写的基本规定》，国家环境保护总局发布了 HJ/T 168—2004《环境监测分析方法标准制订技术导则》，但是没有关于食品或动物饲料微生物学检验方法编写的行业标准。因此主持或参与某食品微生物检验标准的编写时，应严格遵守和执行国际或国家标准的相关规定。

值得注意的是，等同、修改采用国际标准或国外先进标准时其编写格式和方法原则上要求按照 GB/T 1(所有部分)的格式和方法进行。

标准方法的一般构成和编写顺序：

- 1) 资料性技术要素：封面、目次\*、前言、引言；
- 2) 规范性一般要素：名称、范围、规范性引用文件\*；
- 3) 规范性技术要素：术语和定义\*、符号和缩略语、食品微生物检验(原理\*、培养基和试剂、设备和材料、采样\*、制样、增菌培养、筛选、鉴定和确认等)、结果判定(判定方法和判定标准)、结果报告\*、规范性附录\*；
- 4) 资料性补充要素：资料性附录\*、参考文献\*、索引\*。

上述构成要素不是任何一项标准都需要全部包括的，标有\*者可根据标准化对象的特征和制定标准化的目的而取舍。

## 二、非标准方法的编写

### 1. 非标准方法的编写

关于非标准方法的编写,有章可循,有据可依。

中国实验室国家认可委员会(CNAL)确认检验方法文件 CNAL-M/CF: 08 规定了非标准化学分析方法的编写格式及要求,尚未对非标准食品微生物学检验方法的编写格式及要求进行规定。

下文所述食品微生物学检验方法的基本编写格式及要求,是在 CNAL-M/CF: 08 基础上,融入了编者所参与完成的国家“十五”重大科技攻关计划专项“食品安全关键技术研究”(项目号:2001BA804A33)之子课题“食品安全检测实验室关键技术问题的研究”以及国家质量监督检验检疫总局课题“食品安全类实验室质量管理、技术运作和评审认可体系的研究”(项目号:2003IK037)的部分科研成果而形成的。

#### (1) 非标准食品微生物学检验方法的编写原则

一般要求以接近国家标准(如 GB/T 1.1—2000)或行业标准推荐方法的格式进行编写。等同、修改采用国际标准或国外先进标准时,其编写格式和方法可与被采用的标准一致。力求标准结构严谨、层次分明、主题突出,简单易懂。

#### (2) 非标准食品微生物学检验方法的基本编写格式

##### 1) 封面

每项非标准微生物检验方法应该有封面,封面的内容有“×××(单位)×××(部门)非标准方法”字样和非标准方法的标志(注:选择性的)、中文名称、英文名称(注:选择性的)、非标准方法的唯一性编号、代替非标准编号(注:选择性的)、发布日期、实施日期、标准的审批部门等(见附录 2)。

##### 2) 正文内容

一般包含下列内容,必要时可增减相关条目:

- ① 目的、范围;
- ② 方法提要或原理:简述所用方法的主要步骤及采用的基本原理;
- ③ 设备和材料:标明规格和型号;
- ④ 培养基和试剂:必须符合 GB/T 4789. 28《食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂》和 SN/T 1538(所有部分)《培养基制备指南》的规定;
- ⑤ 检验程序:画出主要的检验程序框图;
- ⑥ 操作步骤:包括试样制备(含稀释或按特定条件的制备)、培养(含前增菌培养和增菌培养、分离培养等,可根据需要取舍和分步描述)、初步鉴定(可根据需要取舍)、确证鉴定(含进一步的生化反应和血清学分型,可根据需要确定试验内容)毒素试验(可根据需要取舍)、动物试验(可根据需要取舍);
- ⑦ 结果报告;
- ⑧ 其他(包括内部质量保证要点、生物防护要求);
- ⑨ 附录(资料性附录和规范性附录);

③ 方法来源(如参考文献、仪器设备方法等)。

(3) 非标准食品微生物学检验方法的编写实例见附录 2。

## 2. 非标准方法的审批

非标准食品微生物学检验方法编写完以后,必须对方法进行验证或确认,然后按照主管部门的审批程序,申请认可、审批和备案,只有履行相关程序并被批准后方可有效执行(见图 11-2)。

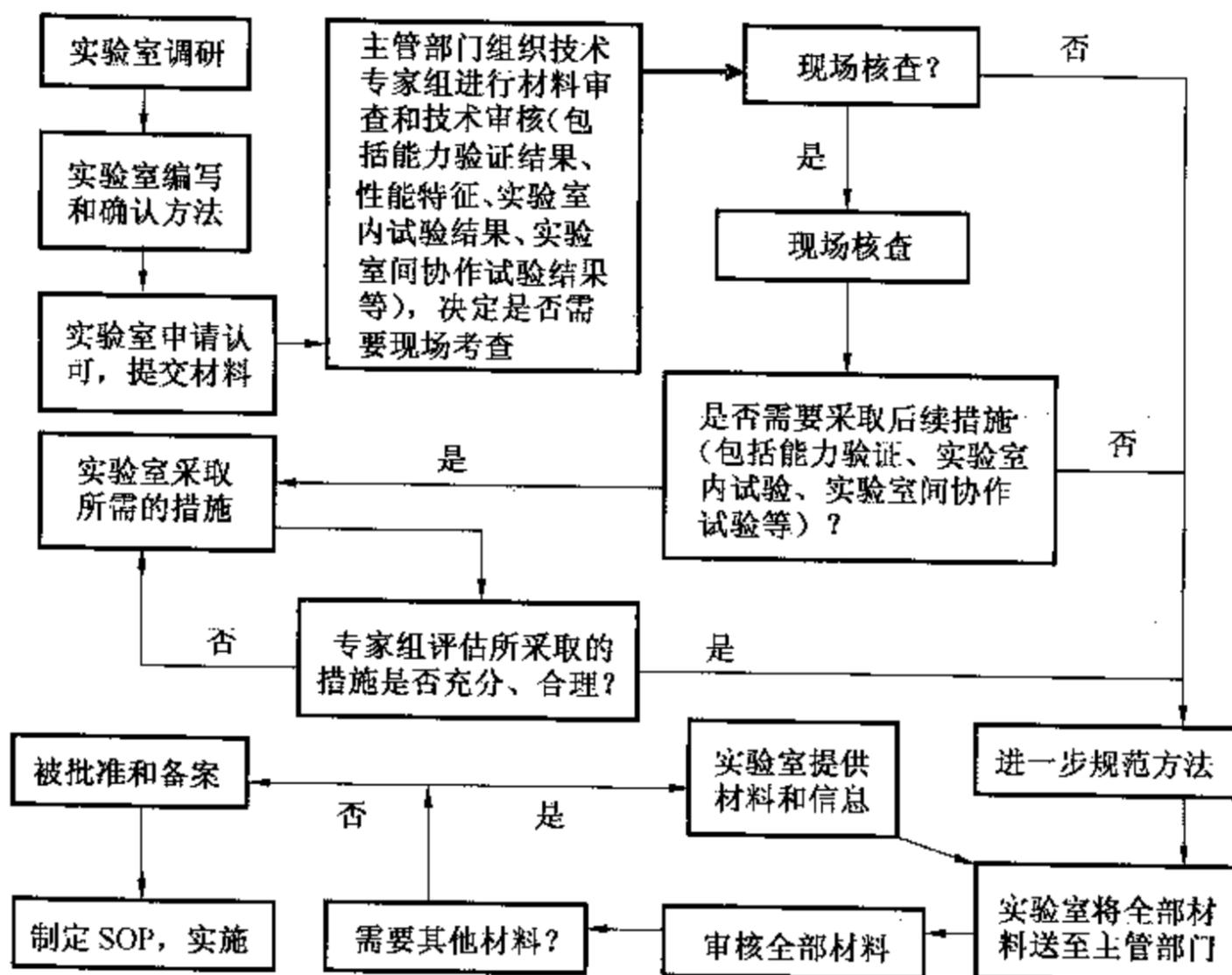


图 11-2 非标准食品微生物学检验方法的审批程序

## 三、标准操作程序的编写

标准操作程序(standard operation practice, SOP)是用来指导某个具体过程、事物所形成的技术性细节描述的可操作性文件,国内常常称之为“作业指导书”,其实标准操作程序与作业指导书没有本质区别。

SOP 的编写及使用是实验室质量管理体系中的一部分,因为它能提供正确完成一项工作的信息,从而保证不同操作人员都能在一定的不确定度范围内得到相同的微生物检验结果。实验室应关注以下四个方面的 SOP:

1) 方法类:包括食品微生物检验方法中不详细或不完善部分的补充,期间核查、方法确认及比对等;

2) 设备类:重要或复杂设备的使用、操作规范(如设备制造商提供的技术说明书不够明细等);

3) 样品类: 取样、制样和样品处置的“实施细则”等;

4) 数据类: 定量检测结果的表达、异常数据的剔除、测量结果不确定度的评定等。

SOP 是技术性的文件, 并不要求必须制定。ISO/IEC 17025:2005 中 5.4.1 明确指出“如果国际的、区域的或国家的标准, 或其他公认的规范已包含了如何进行检测和(或)校准的简明和足够信息, 并且这些标准是以可被实验室操作人员作为公开文件使用的方式书写时, 则不需再进行补充或改写为内部程序, 对方法中的可选择步骤, 可能有必要制定附加细则或补充文件。

在迎接 2003 年 6 月欧盟专家评估编者所在实验室的农(兽)药残留检测体系、2004 年 12 月 6 日美国农业部专家等效性评估编者所在实验室的微生物检验体系以及 2006 年 3 月欧盟专家考察编者所在实验室的禽流感检测体系和农(兽)药残留检测体系过程中, 编者发现欧美专家相当关注实验室所编写的 SOP。

#### (1) 食品微生物检验 SOP 的编写依据

目前, 在国内, 尚未检索到关于食品微生物检验 SOP 的编写导则及相关要求; 在国外, 美国环境保护署(EPA) (<http://www.epa.gov/quality/sops.html>) 和美国农业部销售司(USDA AMS) (<http://www.ams.usda.gov/science/mpo/>) 均发布了关于微生物检验 SOP 的编写导则及相关要求, 前者是后者的蓝本:

1) EPA QA/G-6《标准操作程序(SOP)编写指南》[Guidance for Preparing Standard Operating Procedures (SOP)];

2) EPA SOP ADM-02-02《编写和核查标准操作程序(SOP)的标准操作程序》[Standard Operating Procedure for Preparation and Review of Standard Operating Procedures (SOP)];

3) USDA MDP-ADMIN-07《标准操作程序(SOP)的编写和维持》[Preparation and Maintenance of Standard Operating Procedures (SOP)]。

以上文本均可从相应网站免费下载, 同时 EPA 和 USDA AMS 制定了一系列与微生物检验相关的 SOP, 这些 SOP 的编写结构和格式值得借鉴和参考。

#### (2) SOP 的基本编写格式

编者所在实验室在迎接 2004 年 12 月份美国农业部专家等效性评估编者所在实验室的微生物检验体系过程中, 重点参考 USDA AMS 关于编写微生物检验 SOP 的格式, 制定了一系列食品微生物检验 SOP。下面结合一个实例(见附录 3)介绍一下编写微生物检验 SOP 的基本格式和要求:

##### 1) 封面

① 编写单位: 中英文对照。

② 标题: 测定对象-测定项目-测定方法名称(中英文对照)。

测定对象: 以产品为主, 采用最常规的产品名称(可参照国际、国家或行业的产品标准);

测定项目: 应写明具体被测项目; 当被测项目为多项时, 应一一列出, 超过 8 项时, 可只写出前 3 个项目。

③ 编写人及时间: 为保证 SOP 内容的全面性和准确性, 由实验室内具有一定资质的使用者编写。

- ④ 审核人及时间。
- ⑤ 批准人及时间:批准人一般为实验室的技术负责人。
- ⑥ 文件编号:唯一编码。
- ⑦ 受控状态:是否受控。
- ⑧ 修订号:第×××次修订。
- ⑨ 发放序号。

## 2) 正文内容

一般包含下列内容,必要时可增减相关条目:

- ① 目的;
- ② 范围;
- ③ 方法提要或原理:简述所用方法的主要步骤及采用的基本原理;
- ④ 程序提纲:包括培养基和血清、设备和玻璃器皿、取样、测试样品的制备、测试样品和最初悬浮液、非选择性前增菌、选择性增菌、筛选、可疑典型菌落的分离和纯化、生化鉴定、血清学确认和血清型、确认;
- ⑤ 安全性;
- ⑥ 质量保证;
- ⑦ 参考文献;
- ⑧ 特殊程序:与④对应;
- ⑨ 结果表达和测试报告;
- ⑩ 附录(资料性附录和规范性附录)。

## (3) SOP 的审批

可参考图 11-2。

## 第五节 食品微生物检验方法的验证和确认

ISO/IEC 17025 中 5.4.5.2 明确规定:“实验室应对非标准方法、实验室设计(制定)的方法、超出其预定范围使用的标准方法、扩充和修改过的标准方法进行确认,以证实该方法适用于预期的用途。确认应尽可能全面,以满足预定用途或应用领域的需要。实验室应记录所获得的结果、使用的确认程序以及该方法是否适合预期用途的声明。”

新加坡认可委员会(SAC)(<http://www.sac-accreditation.org.sg/index.asp>)实验室认可指南 C & B and ENV 002 (Method Validation of Microbiological Methods)的总则指出:实验室应优先使用标准微生物检验方法,使用者不必对这些方法进行初级确认(primary validation)[也称完整确认(full validation)],但仅仅需要进行次级确认(secondary validation)[也称验证(verification)]。次级确认要求实验室使用者仅仅验证方法能够实现预定检验目的和要求。如果实验室不得不使用研发内部方法、修改标准(参考)方法或超出其预定使用范围的方法,实验室应对该方法进行初级确认。

由此可见,一个实验室拟用某一食品微生物检验方法前,无论是标准方法还是非标准方

法,皆应对其进行严格验证或确认。

## 一、食品微生物检验方法的验证和确认导则

### 1. 概念

在 GB/T 19000—2000《质量管理体系 基础和术语》中,“验证”被定义为“通过提供客观证据对规定要求已得到满足的认定”,“确认”被定义为“通过提供客观证据对特定的预期用途或应用要求已得到满足的认定”。在 ISO/IEC 17025 中 5.4.5.1 中,“确认”被定义为“通过核查并提供客观证据,以证实某一特定预期用途的特殊要求得到满足”。

从以上定义可以看出,验证要保证做得正确,而确认则要保证做的东西正确。验证注重“过程”,确认注重“结果”。

### 2. 食品微生物检验方法验证和确认的试验技术和要求

#### (1) 食品微生物检验方法验证和确认的依据

1) 国际分析家协会(AOAC),执行标准为:国际方法委员会关于食品微生物定性和定量检验方法的确认指南(2002)(AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis-2002);

2) 国际标准化组织(ISO),执行标准为:ISO/TR 13843:2000《水质—微生物学方法确认规范》(Water quality- Guidance on validation of microbiological methods)和 ISO 16140:2003《食品和动物饲料微生物学——可替代方法的确认规范》(Microbiology of food and animal feeding stuffs- Protocol for the validation of alternative methods);

3) NordVal:NV-DOC. D-2005-01-01《可替代微生物学方法的确认规范》(Protocol for the validation of alternative microbiological methods);

4) 新加坡认可委员会(SAC):C & B and ENV 002《微生物学方法的确认方法》(Method Validation of Microbiological Methods)。

此外,可参考 GB/T 18510—2001《煤和焦炭试验可替代方法确认准则》。

#### (2) 验证和确认食品微生物检验方法的试验技术

用于验证和确认食品微生物检验方法性能的试验技术包括:

1) 使用参考菌株进行核实;

2) 与其他方法所得的结果进行比较;

3) 实验室间比对;

4) 对影响结果的因素作系统性评审;

5) 根据对方法的理论原理和实践经验的科学理解,对所得结果不确定度进行评定。

以上验证和确认食品微生物检验方法性能的试验技术,可概略分为两大类:实验室间验证(确认)试验(协作试验)和实验室内验证(确认)试验(单一试验)。实验室间验证(确认)试验是指在若干实验室内由不同操作者进行的验证(确认)试验,而实验室内确认试验是仅在特定的实验室内进行的验证(确认)试验。

### (3) 验证和确认食品微生物检验方法的试验要求

#### 1) 对食品微生物检验方法验证和确认人员的要求

验证和确认食品微生物检验方法的人员,必须符合以下要求:

- ① 掌握方法中试样处理的原理;
- ② 掌握方法中食品成分对微生物的干扰以及微生物的增菌原理;
- ③ 掌握方法中目标微生物分离、纯化、鉴定和确认的原理;
- ④ 对仪器的构造要有基本了解;
- ⑤ 对仪器(试剂)盒的工作原理有基本了解;
- ⑥ 能熟练使用仪器(试剂)盒;
- ⑦ 熟悉仪器(试剂)盒的维护和性能确认方法;
- ⑧ 熟悉方法所使用的试剂、材料和仪器(试剂)盒;
- ⑨ 熟练掌握分析步骤的每一个步骤;
- ⑩ 了解方法的关键所在;
- ⑪ 能熟练进行分析结果的计算;
- ⑫ 掌握方法能独立进行数据处理,并判断结果的准确性。

#### 2) 对协作试验室的要求

如果进行实验室间验证(确认)试验(协作试验),协作试验室必须符合以下要求:

- ① 按 ISO/IEC 17025 认可,并且进行协作试验所需技术在实验室认可范围之内,必须提供一份实验室认可证书和认可范围;
- ② 令人满意地进行实际样品的分析;
- ③ 有操作和处理分析物或相关混合物及适用对象的经验;
- ④ 不能将试验转包给其他实验室;
- ⑤ 有独立的质量保证体系和程序文件,应能提供一份组织结构图,应能提供一份标准操作程序的提纲提要;
- ⑥ 拥有必需设备,并进行了规范的维护和校准,应能提供相关记录;
- ⑦ 有培训和资格确认记录,应能确保食品微生物检验方法的验证和确认人员符合前文要求;
- ⑧ 有内部质量控制和外部质量评估措施,必须提供这些措施的记录;
- ⑨ 有适当的令人满意地记录和保护数据的系统。

## 二、食品微生物检验方法的验证

建议实验室在以下情况下对检验方法进行严格的验证:

- 1) 拟用经过完整确认的标准方法以及经过严格确认的并被审批的非标准方法时;
- 2) 培养基供应商、人员、设备、仪器(试剂)盒等发生变动时。

在本节中“2. 食品微生物检验方法验证和确认的试验技术和要求”所列 5 种试验技术中,最常用的方法是使用参考菌株进行核实。比利时微生物保藏中心(BCCM)(<http://bccm.belspo.be/>)提供了部分标准方法的验证菌株。验证食品微生物检验方法时可以参考表 11-23。

表 11-23 BCCM 推荐的部分标准方法的验证菌株

标准和权威方法	参考菌株	特征
AFNOR 3M-01/2-09/89 Petrifilm™ 大肠菌群测试卡, AFNOR 3M-01/5-03/97 Petrifilm™ 快速大肠菌群测试卡, AFNOR 3M-01/7-03/99 Petrifilm™ 高灵敏度大肠菌群测试卡, FIR 73B; 1998《乳和乳制品—大肠菌群计数——第 1 部分未复苏 30℃ 菌落计数技术》, ISO 4832; 1991《微生物学——大肠菌群计数一般指南——菌落计数技术》, NF V 08-050; 1999《食品和动物饲料微生物学——大肠菌群 30℃ 菌落计数技术 常规方法》, NF V 08-060; 1996《食品和动物饲料微生物学——耐热大肠菌群 44℃ 菌落计数技术——常规方法》	弗氏柠檬酸杆菌 LMG21265/ATCC43864	P R
	粪肠球菌 LMG7937/ATCC19433	N R
	大肠杆菌 LMG8063/ATCC8739	P R
	大肠杆菌 LMG8223/ATCC25922	P R
	绿脓假单胞菌 LMG6395/ATCC27853	N R
	粪肠球菌 LMG7937/ATCC19433	N R
AFNOR 3M-01/6-09/97 Petrifilm™ 肠杆菌科测试卡, ISO 21528; 2004《食品和动物饲料微生物学——检测和计数肠杆菌科的基准方法——菌落计数方法和前增菌 MPN 技术》	大肠杆菌 LMG8063/ATCC8739	P R
	大肠杆菌 LMG8223/ATCC25922	P R
	猪霍乱沙门氏菌猪霍乱亚种鼠伤寒血清型 LMG14933/ATCC14028	P R
	大肠杆菌 LMG8063/ATCC8739	P R
AFNOR 3M-01/8-06/01 Petrifilm™ 选择性大肠杆菌测试卡, AFNOR BIO-12/5-01/99 大肠杆菌鉴定显色培养基 (coli-ID), AFNOR SDP-07 /1-07/93 快速大肠杆菌显色培养基-2 (E. coli-ID), ISO 11866-3: 1997《乳和乳制品——可疑大肠杆菌的计数——第 3 部分: 40℃ 滤膜菌落计数技术》	大肠杆菌 LMG8223/ATCC25922	P R
	大肠杆菌 O157; H7 血清型 LMG21756/ATCC700728	N R
	绿脓假单胞菌 LMG6395/ATCC27853	N R
	大肠杆菌 LMG8063/ATCC8739	N R
SP-VG M001; 2000《食品微生物学——可疑病原大肠杆菌 O157: H7 检验方法》	大肠杆菌 LMG8223/ATCC25922	N R
	大肠杆菌 O157; H7 血清型 LMG21756/ATCC700728	P R
	大肠杆菌 O157; H7 血清型 LMG15068	P R
	大肠杆菌 O157; H7 血清型 LMG21756/ATCC700728	P R

续表 11-23

标准和权威方法	参考菌株	特征
EN 12824:1997《食品和动物饲料微生物学——检测沙门氏菌的基准方法》, FIL 93B:1998《乳及乳制品——沙门氏菌的检测》, ISO 6340:1995《水质——沙门氏菌的检测》, ISO 6579:2002《食品和动物饲料微生物学——检测沙门氏菌的基准方法》, NF 08-052:1997《食品和动物饲料微生物学——沙门氏菌的检测——常规方法》, SP-VG M002:1998《肉和肉制品微生物学——沙门氏菌检验方法》	粪肠球菌 LMG7937/ATCC 19433	N R
	大肠杆菌 LMG8063/ATCC 8739	N R
	大肠杆菌 LMG8223/ATCC 25922	N R
	猪霍乱沙门氏菌猪霍乱亚种奥博尼血清型 LMG18222/NCTC 6017	P R
	猪霍乱沙门氏菌猪霍乱亚种肠炎血清型 LMG10395/ATCC 13076	P R
	猪霍乱沙门氏菌猪霍乱亚种鼠伤寒血清型 LMG14933/ATCC 14028	P R
FDA BAM 第 6 章 志贺氏菌 2001, ISO 21567:2004《食品和动物饲料微生物学——检测志贺氏菌的基准方法》	宋氏志贺氏菌 LMG10473	P R
	粪肠球菌 LMG7937/ATCC 19433	N R
	奇异变形菌 LMG3257/ATCC 29906	N R
FDA BAM 第 9 章 弧菌属 2004, SP-VG M006:2000《食品微生物学——霍乱弧菌或副溶血弧菌的检验方法》	大肠杆菌 LMG8063/ATCC 8739	N R
	奇异变形菌 LMG3257/ATCC 29906	N R
	绿脓假单胞菌 LMG6395/ATCC 27853	N R
	副溶血性弧菌 LMG2850/ATCC 17802	P R
FIL 138:1986《乳粉——金黄色葡萄球菌计数——37℃菌落计数技术》, FIL 145A:1997《乳粉和乳制品——凝固酶阳性葡萄球菌计数——菌落计数技术》, ISO 6888:1999《食品和动物饲料微生物学——凝固酶阳性葡萄球菌计数的基准方法》, NF V 08-057:1994《食品微生物学——凝固酶阳性葡萄球菌 37℃菌落计数技术——常规方法》	大肠杆菌 LMG8063/ATCC 8739	N R
	大肠杆菌 LMG8223/ATCC 25922	N R
	金黄色葡萄球菌金黄亚种 LMG8195/ATCC 6538P	P R
	金黄色葡萄球菌金黄亚种 LMG8224/ATCC 25923	P R
	表皮葡萄球菌 LMG10273/ATCC 12228	N R
FIL 93B:1998《乳及乳制品——单核细胞增生李斯特氏菌检测》, ISO 11290:1996-1998《食品和动物饲料微生物学——检测和计数单核细胞增生李斯特氏菌的基准方法》	粪肠球菌 LMG7937/ATCC 19433	N R
	大肠杆菌 LMG8063/ATCC 8739	N R
	英诺克李斯特氏菌 LMG11387/ATCC 33090	P R
	绵羊李斯特氏菌 LMG11388/ATCC 19119	P R
	单核细胞增生李斯特氏菌 LMG13305/ATCC 11994	P R
	单核细胞增生李斯特氏菌 LMG21263/ATCC 19111	P R

续表 11-23

标准和权威方法	参考菌株	特征
FIL 93B;1998《乳及乳制品 单核细胞增生李斯特氏菌检测》,ISO 11290;1996-1998《食品和动物饲料微生物学——检测和计数单核细胞增生李斯特氏菌的基准方法》	单核细胞增生李斯特氏菌 LMG 21264/ ATCC 13932	P R
	马红球菌 LMG 18452/ATCC 6939	R
	金黄色葡萄球菌金黄亚种 LMG 8224/ ATCC 25923	R
ISO 7899-2;2000《水质——肠球菌的检测和计数——第2部分:膜过滤法》	粪肠球菌 LMG 7937/ATCC 19433	P R
	屎肠球菌 LMG 11423/ATCC 19434	P R
	大肠杆菌 LMG 8063/ATCC 8739	N R
	大肠杆菌 LMG 8223/ATCC 25922	N R
	乳酸乳球菌乳亚种 LMG 6890/ATCC 19435	N R
ISO 7932;2004《食品和动物饲料微生物学——蜡样芽孢杆菌计数的基准方法——30℃菌落计数技术》	蜡样芽孢杆菌 LMG 8221/ATCC 11778	P R
	凝固芽孢杆菌 LMG 6326/ATCC 7050	N R
	枯草芽孢杆菌 LMG 8197/ATCC 6633	N R
	大肠杆菌 LMG 8063/ATCC 8739	N R
	大肠杆菌 LMG 8223/ATCC 25922	N R
ISO 7932;2004《食品和动物饲料微生物学 产气荚膜梭菌计数的基准方法——菌落计数技术》,NF V 08-056《食品微生物学——产气荚膜梭菌 37℃菌落计数技术——常规方法》	产气荚膜梭菌 LMG 11264/ATCC 13124	P R
	大肠杆菌 LMG 8223/ATCC 25922	N R
ISO 9308-1;2000《水质 大肠杆菌和大肠菌群的检测和计数 第2部分:膜过滤法》	弗氏柠檬酸杆菌 LMG 21265/ATCC 43864	P R
	粪肠球菌 LMG 7937/ATCC 19433	N R
	大肠杆菌 LMG 8063/ATCC 8739	P R
	大肠杆菌 LMG 8223/ATCC 25922	P R
	大肠杆菌 O157:H7 血清型 LMG 21756/ ATCC 700728	P R
ISO 10272;2006《食品和动物饲料微生物学 检测和计数弯曲杆菌的基准方法》,SP-VG M003;1998《动物源食品微生物学——耐热弯曲菌检验方法》	大肠弯曲杆菌 LMG 21266/ATCC 43478	P R
	空肠弯曲杆菌空肠亚种 LMG 18455/ ATCC 33291	P R

续表 11-23

标准和权威方法	参考菌株	特征
ISO 11272:2006《食品和动物饲料微生物学——检测和计数弯曲杆菌的基准方法》, SP-VG M003:1998《动物源食品微生物学——耐热弯曲杆菌检验方法》	大肠杆菌 LMG 8063/ATCC 8739	N R
	奇异变形菌 LMG 3257/ATCC 29906	N R
	金黄色葡萄球菌金黄亚种 LMG 8224/ATCC 25923	N R
ISO 10273:2003《食品和动物饲料微生物学——可疑致病小肠结肠炎耶尔森氏菌检测的基准方法》, SP-VG M004:1998《肉和肉制品微生物学——小肠结肠炎耶尔森氏菌 O:3 血清型的检验方法》	大肠杆菌 LMG 8063/ATCC 8739	N R
	大肠杆菌 LMG 8223/ATCC 25922	N R
	金黄色葡萄球菌金黄亚种 LMG 8224/ATCC 25923	N R
	小肠结肠炎耶尔森氏菌小肠结肠炎亚种 O:3 血清型 LMG 7899/ATCC 9610	P R
	小肠结肠炎耶尔森氏菌小肠结肠炎亚种 O:8 血清型 LMG 15558/ATCC 8141	P R
ISO 11133-2:2003《食品和动物饲料微生物学——培养基制备和生产指南——第 2 部分:培养基性能试验实用指南》	黑曲霉 LMG 3766/ATCC 16404	PM
	蜡样芽孢杆菌 LMG 8221/ATCC 11778	PNM
	枯草芽孢杆菌 LMG 8197/ATCC 6633	N M
	大肠弯曲杆菌 LMG 21266/ATCC 43478	P M
	空肠弯曲杆菌空肠亚种 LMG 18455/ATCC 33291	P M
	白色念珠菌 LMG 3731/ATCC 10231	PM
	产气荚膜梭菌 LMG 11264/ATCC 13124	P M
	粪肠球菌 LMG 7937/ATCC 19433	N M
	大肠杆菌 LMG 8063/ATCC 8739	PNM
	大肠杆菌 LMG 8223/ATCC 25922	PNM
	清酒乳杆菌清酒亚种 LMG 9468/ATCC 15521	P M
	乳杆菌乳亚种 LMG 6890/ATCC 19435	P M
	单核细胞增生李斯特氏菌 LMG 21263/ATCC 19111	P M
	单核细胞增生李斯特氏菌 LMG 21264/ATCC 13932	P M
	有害片球菌 LMG 11484/ATCC 29358	P M
	圆弧青霉 IHEM19610/ATCC 16025	PM
绿脓假单胞菌 LMG 6395/ATCC 27853	N M	
酿酒酵母 IHEM3961/ATCC 9763	PM	

续表 11-23

标准和权威方法	参考菌株	特征
ISO 11133-2:2003《食品和动物饲料微生物学——培养基制备和生产指南——第2部分:培养基性能试验实用指南》	猪霍乱沙门氏菌猪霍乱亚种肠炎血清型 LMG 10395/ATCC 13076	P M
	猪霍乱沙门氏菌猪霍乱亚种鼠伤寒血清型 LMG 14933/ATCC 14028	P M
	金黄色葡萄球菌金黄亚种 LMG 8195/ATCC 6538P	P M
	金黄色葡萄球菌金黄亚种 LMG 8224/ATCC 25923	PNM
	表皮葡萄球菌 LMG 10273/ATCC 12228	N M
	小肠结肠炎耶尔森氏菌小肠结肠炎亚种 O:3 血清型 LMG 7899/ATCC 9610	P M
ISO 13720:1995《肉和肉制品: 假单胞菌属的计数》,NF V 04-504:1998《食品和动物饲料微生物学——肉和肉制品中假单胞菌属的计数——常规方法》	大肠杆菌 LMG 8223/ATCC 10145	N R
	绿脓假单胞菌 LMG 1242/ATCC 6538P	P R
	绿脓假单胞菌 LMG 6395/ATCC 27853	P R
	金黄色葡萄球菌金黄亚种 LMG 8224/ATCC 25923	N R
NF V 04-503:1988《肉和肉制品——乳酸菌计数》	蜡样芽孢杆菌 LMG 8221/ATCC 11778	N R
	大肠杆菌 LMG 8063/ATCC 8739	N R
	大肠杆菌 LMG 8223/ATCC 25922	N R
	清酒乳杆菌清酒亚种 LMG 9468/ATCC 15521	P R
	乳杆菌乳亚种 LMG 6890/ATCC 19435	P R
	有害片球菌 LMG 11484/ATCC 29358	P R

注: P:阳性对照;N:阴性对照;R:推荐菌株;M:强制菌株。

### 三、食品微生物检验方法的确认

实验室必须对非标准方法、实验室设计(制定)的方法、超出其预定范围使用的标准方法、扩充和修改过的标准方法进行严格的完整确认,否则不可使用。可根据 AOAC 关于食品微生物定量和定性检验方法的确认指南(-2002)、ISO /TR 13843:2000、ISO 16140:2003、NV-DOC. D: 2005-01-01 或 C & B and ENV 002 的方案进行确认,其中 AOAC 关于食品微生物定量和定性检验方法的确认指南-2002 和 ISO 16140:2003 最常用(见表 11-24),二者之间的定量检验方法确认与定性检验方法确认的比较分别见表 11-25 和表 11-26。

表 11-24 AOAC 关于食品微生物定量和定性检验方法的确认指南(-2002)与 ISO 16140:2003 的比较

(<http://www.aoac.org/testkits/LearningCenter/MyWebs/MyWebs/ataglance.htm>)

项目	AOAC 方法	ISO 16140:2003(E)
方法类型	专利方法或非商业方法	专利方法或非商业方法
参考方法	AOACI, FDA, USDA	ISO, CEN
确认期限	最少 12 个月	最少 12 个月
统计分析	Youden and Steiner《国际分析化学家协会定性和定量测试清单之统计学指南》, 1987	ISO 3534-3, ISO 5725
实验室认可	不适用	EN ISO 9001 或等效标准
被确认的方法的审查	不适用	必需的
方法出版	AOAC 分析方法杂志	由 ISO 决定

表 11-25 AOAC 关于食品微生物定量和定性检验方法的确认指南(-2002)与 ISO16140:2003 的定量检验方法确认的比较

试验方式	比较的内容	AOAC 方法	ISO 16140:2003(E)
实验室内方法 比较试验 (预协作试验)	食品类型	6 类(对于所有或大多数食品)	5 类(对于所有或大多数食品)
	食品种类	20 种代表性的食品	每一类食品中的 3 种
	分析物等级	3 个等级(高、中、低), 必要时进行空白对照	5 个等级
	样品数量	每个接种水平 5 个样品	每个接种水平 2 个样品(5 个~10 个更适宜)
	敏感性	30 个菌株	30 个菌株
	特异性	20 个菌株	20 个菌株
	竞争微生物菌群	对于某一种食品是必需的	不适用
	抗干扰性	推荐	不适用
多个实验室间 进行试验 (协作试验)	参加实验室	最少 8 个	最少 8 个
	食品类型	6 类(对于所有或大多数食品)	1 类食品
	食品种类	每类中 1 种食品	1 种食品
	分析物等级	3 个污染等级, 必要时进行空白对照	3 个污染等级, 必要时进行空白对照
	样品数量	每个接种水平 2 个样品	每个接种水平 2 个样品

表 11-26 AOAC 关于食品微生物定量和定性检验方法的确认指南(-2002)与 ISO 16140:2003 的定性检验方法确认的比较

试验方式	比较的内容	AOAC 方法	ISO 16140:2003(E)
实验室内方法 比较试验 (预协作试验)	食品类型	6 类(对于所有或大多数食品)	5 类(对于所有或大多数食品)
	食品种类	20 种代表性的食品	每 1 类 3 种食品
	环境样品	对该指南不适用	将适当的环境样品作为一类
	分析物等级	3 个等级(0 cfu/25 g, 1 cfu/25 g~5 cfu/25 g, 10 cfu/25 g~50 cfu/25 g)	没有指定
	样品数量	5 类未接种食品, 每类 20 个样品	每一种食品 20 个样品(每一类食品 60 个样品)
	部分回收率 (~50%)	必需的	必需的
	敏感性	50 个菌株(对于沙门氏菌需要 100 个菌株)	50 个菌株(对于沙门氏菌需要 30 个菌株)
	特异性	30 个菌株(对于沙门氏菌需要 50 个菌株)	30 个菌株
	竞争微生物菌群	对于某一种食品是必需的	不适用
	相对检测水平	不适用	每一类食品中的某一种食品
	抗干扰性	建议	不适用
多个实验室间 进行试验 (协作试验)	参加实验室	最少 10 个实验室	最少 10 个实验室
	食品类型	6 类(对于所有或大多数食品)	1 类食品
	食品种类	每类中 1 种食品	1 类食品
	分析物等级	3 个等级(0 cfu/25 g, 1 cfu/25 g~5 cfu/25 g, 10 cfu/25 g~50 cfu/25 g)	3 个等级(阴性、低、高)
	样品数量	每一接种水平 6 个样品	每一接种水平 8 个样品

编者在参与完成的国家“十五”重大科技攻关计划专项“食品安全关键技术研究”(项目号:2001BA804A33)之子课题“食品安全检测实验室关键技术问题的研究”以及国家质检总局课题“食品安全类实验室质量管理、技术运作和评审认可体系的研究”(项目号:2003IK037)的过程中,参考 AOAC 国际委员会关于食品微生物定量和定性检验方法的确认

指南(2002)(AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis-2002)和 ISO 16140:2003《食品和动物饲料的微生物学——可替代方法的确认规范》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods),依照 GB T 1.1—2000 制定了“食品微生物非标准方法确认指南”(见附录 4)。

### 参 考 文 献

- [1] ISO 16140:2003(E) AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis vs
- [2] BCCM. CATALOGUE OF TEST, CONTROL OR BIOASSAY STRAINS FROM BCCM CULTURE COLLECTIONS—LIST OF STRAINS INVOLVED IN NORMS AND STANDARDISED MICROBIOLOGICAL METHODS[S]. <http://bccm.belspo.be/>.
- [3] BCCM. Normalisation of the certification, distribution and use of microbial reference material[S]. <http://bccm.belspo.be/>.

# 第十二章 内部质量控制和外部质量评估

许多食品微生物学实验室都按照 ISO/IEC 17025 建立了质量管理体系,并通过了认可委员会的认可,即实验室的检测能力获得了认可,实验室出具的检测结果应该是准确的;但在实际工作中,经常发生不同实验室的检测结果或同一实验室不同人员的检测结果差异比较大的现象,还有一些实验室能力验证的结果不满意的现象,究其原因,尽管有诸多因素,但实验室是否实施了有效的质量控制措施,是一个非常重要的因素。本章重点介绍食品微生物检验领域质量控制的一些方法及其应用。

实验室质量控制是确保检测数据满足质量目标要求的一个重要手段,实验室质量控制(其示意图见图 12-1)一般可分为内部质量控制(internal quality control, IQC)和外部质量评估(external quality assessment, EQA)两个方面。

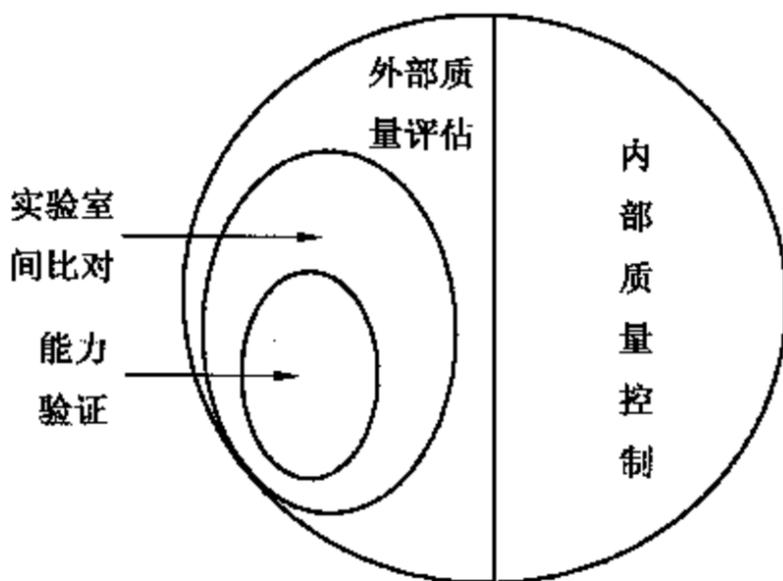


图 12-1 实验室质量控制示意图

## 第一节 内部质量控制

### 一、概述

随着我国进入 WTO 与科技全球化的发展,我国与世界各国的经贸活动越来越频繁,如何准确检测进出口商品的质量,此时实验室的检测水平受到广泛的关注。为确保实验室出具的验证报告具有高度的可靠性,实验室通过内部质量控制和外部质量评估实行检测水平的有效监控。实验室的内部质量控制,是自我质量控制的一个必要手段,能够及时发现系统误差和偶然误差,有效地监控各个检测阶段的顺利进行,是日常检验正常运作的基础和检测水平准确性的保证。广义上内部质量控制适用于得出检测结果的所有步骤的活动,包括从样品接收、检测直至报告检测结果。

### 二、实验室内部质量控制

#### 1. 定义和目的

实验室内部质量控制(IQC): 实验室内为达到质量要求所做的技术操作和活动,其目的在于监测实验室的检测过程,用以评价检验结果是否可靠,并查找和排除质量环节中导致不满意的原因。实验室的内部质量控制适用于整个检测过程的所有活动,包括收集样品、检测直至报告检测结果(见图 12-2)。

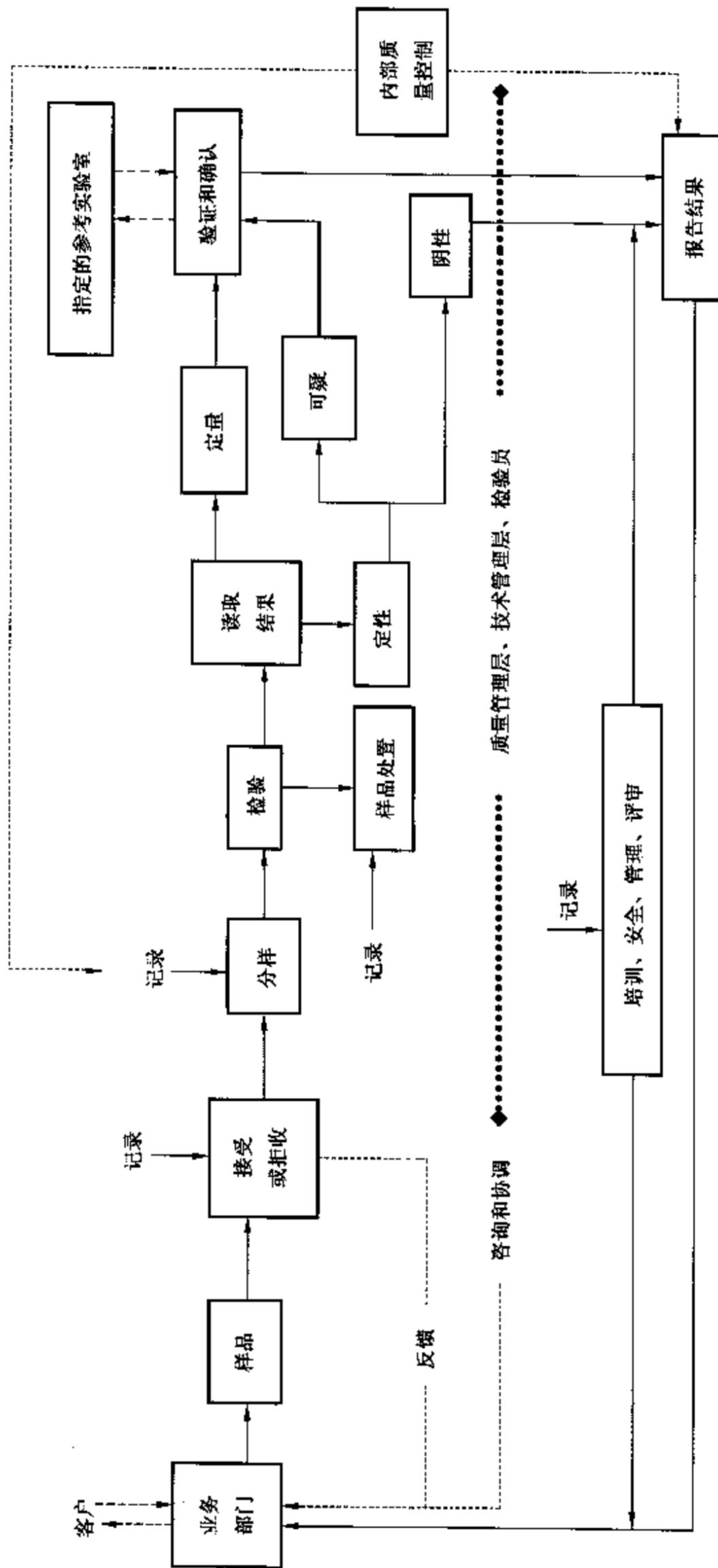


图 12-2 食品微生物实验室作业程序和内部质量控制示意图

## 2. 控制措施

实验室检测的准确性受多种因素的影响,为确保其检测结果的准确、可靠及有效,最终达到实验数据的互认,实验室应遵循一系列严谨的监控措施并进行质量控制,如本书前面章节中介绍的人员的控制,仪器、设备的质量控制,培养基和试剂的质量控制等。实验室内部质量控制的措施和方法包括:人员比对、定期使用有证标准物质(参考物质)进行监控和(或)使用次级标准物质(参考物质)开展内部质量控制、使用相同或不同方法进行重复检测、对存留物品进行再检测等。实验室内部的比对实验是监控措施中的重要组成部分。此外,实验室还可以通过作平行样实验和定期进行盲样测试对已开展的检测项目进行长期的监控。

## 3. 实验室内部比对实验

### (1) 检验人员的操作比对

实验室系统地采用一式双份的菌落计数测定。由一个检验人员进行,也可由多个检验人员对同一质控样品从同一或不同的稀释倍数开始进行比对实验,对所得检测结果进行比较。务求监控检验人员的检测准确性,同时也可对样品检测结果的重复性和再现性作有效的监控。

ISO 4833:2003 中对结果重复性的规定为:用相同的方法,同一试验材料,在相同的条件下获得的一系列结果之间的一致程度。相同的条件是指同一操作者、同一设备、同一实验室和短暂的时间间隔。在此条件下所测得的两个独立测试结果之差的绝对值不能大于重复性极限( $r=0.25$ )。

即:测试 1 所得结果为  $10^5$  (即 100 000) 时,测试 2 结果下限为  $\lg 10^{4.75} = 56\ 000$ ,结果上限为  $\lg 10^{5.25} = 178\ 000$ 。

因此,若测试 2 结果在 56 000 和 178 000 之间,则认为两次测试结果为可接受(如表 12-1 所示)。

表 12-1 重复性测试结果比较

测试结果	测试结果			
	测试 1	测试 2		
检测值	100 000	28 000	86 000	190 000
结果判定	—	不可接受, 低于下限值	可接受	不可接受, 高于上限值

ISO 4833:2003 中对结果再现性规定为:用相同的方法,同一试验材料,在不同条件下获得的单个结果之间的一致程度。不同的条件是指不同的操作者、不同的设备、不同的实验室、不同或相同的时间。在此条件下所得的两个测试结果之差绝对值不能大于再现性极限,即  $R=0.45$ 。

即:第一测试人员的测试结果为  $10^5 = 100\ 000$  时,则第二测试人员的结果下限为  $\lg 10^{4.55} = 36\ 000$ ,结果上限为  $\lg 10^{5.45} = 280\ 000$ 。

若第二测试人员的测试结果在 36 000 和 280 000 之间,则可认为两个测试结果的差值可以接受(见表 12-2)。

表 12-2 再现性结果比较

测试结果	测试人员			
	第一测试人员	第二测试人员		
检测值	100 000	28 000	120 000	300 000
结果判定	—	不可接受， 低于下限值	可接受	不可接受， 高于上限值

若使用同一质控样品进行测试，两次测试结果超出差值范围的上限值或下限值时，则可能是检测人员操作失误引起的，应及时查找原因并纠正。

### (2) 培养基质量的比对

使用同一标准菌株，对不同品牌的培养基进行比对实验，观察同一菌种在不同培养基中的复苏程度、平板上的显色现象以及菌落形态是否典型等参数对培养基的质量进行比对监控。

例如纪绍梅等人对国产与进口 SS 琼脂的质量比较实验。方法如下：选择 4 种国产 SS 琼脂培养基，分别编号为 1、2、3、4，与进口的 Difco SS 琼脂作比较。同时使用 6 株标准菌株，分别是大肠杆菌 CMCC 44156、44102；鼠伤寒沙门氏菌 CMCC 50220；甲型副伤寒沙门氏菌 CMCC 50093；A 群志贺氏菌 CMCC 51336；B 群志贺氏菌 CMCC 51573（由中国药品生物制品检定所提供），采用平板计数方法记录菌株的生长情况，数据见表 12-3。

表 12-3 国产与进口 SS 培养基的质量比较

培养基	44156		44102		50220		50093		51336		51573	
	菌落/ 个	直径/ cm	菌落/ 个	直径 cm								
1	25	1.8	28	2.8	9	0.9	18	1.3	29	1.9	33	1.5
2	26	1.7	29	2.5	11	1.0	34	1.6	24	1.9	23	1.5
3	19	1.6	22	2.5	7	1.1	20	1.3	13	1.9	25	1.3
4	17	1.8	28	2.5	19	1.6	19	1.5	16	1.9	8	1.7
Difco	20	2.1	18	3.3	6	2.6	18	2.5	20	2.3	30	2.5

从菌落生长个数来看，除了 4 号培养基在 B 群志贺氏菌的生长菌落数较少外，其他国产培养基与 Difco 的差别不明显；而菌落直径上，Difco 明显大于国产培养基，6 株标准菌株的直径最大 3.3 cm，最小 2.1 cm。而国产培养基的菌落直径一般在 2.0 cm 以下，除了大肠杆菌 CMCC 44102 均达到 2.5 cm。另外，从培养基的色泽和透明程度比较，Difco 也明显优于国产培养基，这说明进口培养基的营养成分较好，培养基的原材料质量优于国产原料。而国内的培养基之间质量并无明显差异。

### (3) 质量失控的原因分析

出现异常检测结果时，进行原因分析是十分必要的，也是质量监控的一个重要步骤。

1) 考虑试剂是否过期或失效。若是试剂的新变化导致检测结果失准，则需更换试剂。

质量监控后重测样品。

2) 仪器运作是否正常。仪器出现异常,需要相关的技术人员进行维修,使用其他仪器替代进行重新检测。若仪器运作正常,则考虑其他原因。

3) 器皿等用具是否消毒完全。使用重新消毒完全的器皿用具进行检测。

4) 检验人员是否存在操作错误。

逐一分析以上原因是否是异常结果出现的原因,并重新检测同一质控样品。

## 第二节 外部质量评估

### 一、外部质量评估的概念

实验室外部质量评估(EQA):由第三方机构采取一系列的方式连续地、客观地评价各实验室的检验结果,并发现实验室本身不易发现的不准确性;了解实验室之间结果的差异,帮助其校正,使其结果具有可比性。

这是对实验室操作和实验方法的回顾性评价,而不是用来决定实时的测定结果的可接受性。外部质量评估是由第三方权威机构进行的评审和检测,采用国际公认的ISO/IEC 17025:2005《检测和校准实验室能力认可准则》,其评审结果具有高度的可靠性和客观性,是评价该实验室与国际实验室水平差距的客观准则,也是实验室内部质量控制的一个重要必要的补充。

### 二、外部质量评估的措施

实验室的外部质量评估可以通过两种方式进行评定,一是由认可机构派出评审员按照ISO/IEC 17025的要求对实验室进行现场评审;二是通过能力验证活动及实验室间的比对实验来评价实验室的运作。

#### 1. 实验室间的比对实验

##### (1) 概念

实验室间的比对实验是按照预先规定的条件,由两个或多个实验室对相同或类似的被测物品进行检测的组织实施和评价。

##### (2) 目的

1) 可用于评价实验室某些检测项目的检测能力及持续检测能力。通过不定期地参加实验室间的比对实验,可对实验室的检测能力进行持续监控,确保实验室在该检测项目上的检测准确性保持在较高的水平。

2) 有利于实验室检测能力的自我监控。比对实验中所发现的不足之处(例如人员的操作方式、检测方法以及仪器、设备的校准等)可及时制定相关的补救措施改进。

3) 是专家现场评审的必要补充。由于专家现场评审受到时间、阳性样品的可获性等限制,不能对全部的检测项目进行现场评测,因此比对实验为专家现场评审提供了可靠的依据。

4) 确定新测量方法的有效性和可比性,并对这些方法进行监控;

5) 识别实验室间的差异,为标准物质赋值,并评价它们在特定测量程序中应用的适用性。

6) 增强了实验室客户对实验室检测能力的信任度。

### (3) 注意事项

1) 必须由实验室内进行常规检测的人员测试样品。

2) 外部质量评估的样品不能重复测试,除非是测试程序的要求或有关数据超出方法的线性范围。

3) 实验室管理层要对测试的数据和报送的材料进行审查。

4) 实验室不能将外部质量评估样品分包给另一实验室进行检测,任何实验室如从其他实验室收到外部质量评估样品必须通知外部质量评估组织者。当外部质量评估组织者确认某一实验室意图将外部质量评估样品送给其他实验室进行检测,则该实验室此次外部质量评估为不符合的外部质量评估成绩。

5) 实验室在进行实验室间比对试验时,必须将处理、准备、方法、检测、审核的每一步骤形成文件化的记录,并归档保存。

6) 参加外部质量评估活动得到不符合的外部质量评估成绩时,实验室必须对相关人员进行适当的培训及对导致外部质量评估失败的问题进行纠正。对不符合外部质量评估成绩的检验项目或外部质量评估活动必须采取纠正措施,并对其进行文件化的记录。

### (4) 实验室间比对实验实例

2005年中华人民共和国广东出入境检验检疫局组织了单核细胞增生李斯特氏菌实验室间比对试验(SP2004-03),参加实验室有来自广东省内17个市、县共36个测试实验室,其中包括广东检验检疫系统内实验室17家、企业实验室19家。每个参试实验室进行唯一性编码,报告中只出现实验室代码,从而对参试实验室的有关信息保密。

本次比对试验共测试2份样品,均为混合细菌冻干粉,测试项目为单核细胞增生李斯特氏菌定性测试。样品发送前,进行了样品均匀性和稳定性实验以及实验结果评审会。评审结果表明,测试样品足够均匀,且在运输期限中不会发生明显变化。在给各实验室发送检测样品的同时发放操作指导书、分试样品的使用及保存说明、原始记录单、样品领取登记表及结果报告单。

在规定时间内收到结果报告单后,将测试结果与已知结果进行比较,直接判定结果正确与否。37个实验室报名参加本次比对试验,36个实验室领取了测试样品,除2个实验室未返回测试结果外,其余34个实验室按期报告了检测结果。

本次实验室间比对实验的测试结果汇总见表12-4。

表 12-4 2005年中华人民共和国广东检验检疫局单核细胞增生李斯特氏菌比对实验结果汇总表

实验室 代码	测试方法	单核细胞增生李斯特氏菌			评价
		样品标记	报告结果	真实结果	
01	ISO 11290-1:1996	T001	阳性	阳性	S
		T031	阴性	阴性	S

续表 12-4

实验室 代码	测试方法	单核细胞增生李斯特氏菌			评价
		样品标记	报告结果	真实结果	
02	未提供	T002	阴性	阳性	NS
		T032	阳性	阴性	NS
03	SN 0184—1993	T003	阳性	阳性	S
		T033	阴性	阴性	S
04	SN 0184—1993	T004	阳性	阳性	S
		T034	阴性	阴性	S
05	单核增生李斯特氏菌 快速检测方法	T005	阳性	阳性	S
		T035	阴性	阴性	S
06	SN 0184—1993	T061	阴性	阴性	S
		T091	阳性	阳性	S
07	GDFB 161—2002	T092	阳性	阳性	S
		T062	阴性	阴性	S
08	SN/T 0184.1—2005	T063	阴性	阴性	S
		T093	阳性	阳性	S
09	GB 4789.30—2003	T094	阳性	阳性	S
		T064	阴性	阴性	S
10	SN 0184—1993	T095	阳性	阳性	S
		T065	阴性	阴性	S
11	欧洲 AFNOR 认可方法	T006	阳性	阳性	S
		T066	阴性	阴性	S
13	SN 0184—1993	T008	阳性	阳性	S
		T068	阴性	阴性	S
14	生物梅里埃公司方法	T009	阳性	阳性	S
		T069	阴性	阴性	S
15	MimiVIDAS LMO2+APILis+显色培养基	T010	阳性	阳性	S
		T070	阴性	阴性	S
16	SN 0184—1993	T096	阴性	阳性	NS
		T036	阴性	阴性	S
17	SN、VIP 检测试剂盒	T037	阳性	阴性	NS
		T097	阳性	阳性	S

续表 12-4

实验室 代码	测试方法	单核细胞增生李斯特氏菌			评价
		样品标记	报告结果	真实结果	
18	SN 0184—1993	T038	阳性	阴性	NS
		T098	阳性	阳性	S
19	ReVeal 快速检测 + 推荐方法	T099	阴性	阳性	NS
		T039	阴性 (默氏 Lis)	阴性 (Lis)	NS
20	侧流免疫色谱法	T100	阳性	阳性	S
		T040	阳性	阴性	NS
21	ReVeal 快速检测 + 推荐方法	T011	阳性	阳性	S
		T071	阳性	阴性	NS
22	前增菌法	T012	阳性	阳性	S
		T072	阴性	阴性	S
23	SN 0184—1993	T013	阳性	阳性	S
		T073	阳性	阴性	NS
24	SN 0184—1993	T014	阳性	阳性	S
		T074	阳性	阴性	NS
25	SN 0184—1993	T015	阳性	阳性	S
		T075	阴性	阴性	S
26	SN 0184—1993	T041	阳性	阴性	NS
		T101	阴性	阳性	NS
28	SN 0184—1993	T103	阳性	阳性	S
		T043	阳性	阴性	NS
29	SN 0184—1993	T109	阴性	阳性	NS
		T044	阴性	阴性	S
31	SN 0184—1993	T016	阳性	阳性	S
		T076	阳性	阴性	NS
32	ReVeal 快速检测 +推荐方法	T017	阳性	阳性	S
		T077	阳性	阴性	NS
33	GDFB 161—2002	T106	阳性	阳性	S
		T046	阴性	阴性	S

续表 12-4

实验室 代码	测试方法	单核细胞增生李斯特氏菌			评价
		样品标记	报告结果	真实结果	
34	SN 0184—1993	T018	阳性	阳性	S
	GB 4789.30—2003 ISO/T 11290.1:1996	T047	阴性	阴性	S
35	SN 0184—1993	T107	阳性	阳性	S
	GB 4789.30—2003 ISO/T 11290.1:1996	T078	阴性	阴性	S
36	SN/T 0184—2005	T048	阳性	阴性	NS
		T108	阳性	阳性	S
37	GDFB 161—2002 +环凯 LMO 生化鉴定盒	T19	阳性	阳性	S
		T49	阴性	阴性	S

注：S 为满意，NS 为不满意。

从表 12-4 可以看出,19 家实验室两项报告结果均满意,12 家实验室报告结果有一项不满意,3 家实验室两项报告结果均不满意。可疑结果实验室代码为 16、17、18、20、21、23、24、28、29、31、32、36,不可接受的实验室代码为 02、19、26。在测试结果汇总完毕后,及时给各实验室发送了结果反馈报告。

## 2. 能力验证计划

### (1) 概念

能力验证是利用实验室间的比对评估实验室检测其能力的活动。

能力验证测试可对参加比对的实验室在此项实验检测方面的能力进行考核或认可机构对已经获得该检测项目认可的实验室的持续检测能力的监控。

### (2) 实施依据

1) ISO/IEC 指南 43:1997《对实验室间比对进行能力验证》:

第 1 部分:建立和运行能力验证方案;

第 2 部分:实验室认可机构对能力验证方案的选择和利用。

2) ILAC G13:2003《能力验证计划提供者的能力要求指南》。

3) APLAC PT002(2006)《实验室间检测比对》。

### (3) 能力验证的类型

#### 1) 检测比对方案

这个方案一般由协调人从待测物品中随机抽取若干样品(两份以上),同时分发给各参加比对的实验室(两个实验室以上)进行检测。协调人从所有检测结果中获得公议值(公议值作为指定值,采用 Z 比分数来评定结果),再与各检测结果进行比较来评价各实验室的能力。认可机构、法定机构及其他组织在检测或校准领域的的能力验证时,通常采用这种方案。

此方案可评价实验室对某检测项目的检测精密性。但是需要注意的是,分发待测样品时要确保样品的均匀性和稳定性,避免实验室测得的任何极端结果时归咎于样品的差异性,而且此方案要求有一定数量的实验室参加,确保统计结果具有可信性。

#### 2) 分割样品样检测方案

这种方案将检测产品或材料的样品分割成若干份,交由有限数量的实验室进行检测,用于识别较差的复现性和重复性。如有可能,其中一个实验室可作为参考实验室,其检测结果将作为评价的参考值。此方案通常用于发生贸易纠纷中,对于双方争议的检测结果,可将预先平行抽取的保留样品,交由双方认可的第三方权威检测机构进行检测,确定最终结果。

#### 3) 定性方案

这个方案是组织机构在待测样品中加入目标组分,为了评价实验室对待测物品某一特性的识别能力,可由一个或少数实验室参加。测定结果判定简单,只有满意(符合)和不满意(不符合)两种。

#### 4) 已知值方案

这个方案包括制备已知量值的待测物品,通过对实验室的检测结果与已知值的比较来评价实验室的能力。这种方案不需要多个实验室参加,可单一实验室独自评定结果,多用于实验室的自身水平评定。

#### 5) 部分过程方案

这个方案适用于评价实验室对检测全过程的其中一部分或若干部分的执行能力,这个方案同样不需要多个实验室参加。

#### 6) 连续检测方案

此方案是按照一定的时间间隔,连续向实验室发送检测样品。在于检测实验室对某一项目的持续检测能力。

通过参加不同的比对实验和能力验证计划,实验室可得到相关检测水平的客观性评价,并可向同行实验室和客户直接显示自身的检测水平,增强信任度,同时也能及时补救比对实验中出现的问题,使自身检测水平的质量控制得到有效的保障。因此,越来越多的实验室积极参与各种能力的验证活动。

### (4) 国内外主要能力测试机构

#### 1) 亚太实验室认可合作组织(APLAC)

亚太实验室认可合作组织(Asia Pacific Laboratory Accreditation Co-operation, APLAC,其网址为 <http://www.aplac.org>)下属实验室能力验证委员会成立于1994年,其作用和职责是全面负责协调 APLAC 成员认可实验室的能力验证计划的各项工作,包括能力验证计划的组织、实施、相关研讨会的召开以及培训课程的开展等。具体工作内容包括:

- ① 能力验证相关政策、程序的档案管理和定期审查;
- ② 调查 APLAC 成员对实验室比对的需求;
- ③ 设计、组织和报告能力验证计划和水平评估;
- ④ 选择适当的认证机构推动验证计划的施行;
- ⑤ 验证计划结果报告定稿、发布前的审查;

⑥ 与欧洲认可合作组织(EA)和美洲认可合作组织(IAAC)协作。包括实验室能力验证计划在内的各种 APLAC 认可活动,根据国际实验室认可合作组织(ILAC)与 APLAC 相关协议,获得 ILAC 的认可。

实验室能力验证委员会成立至今已完成了 42 项的能力水平测试,正在进行中的项目有 11 项,筹备计划中的项目有 12 项。其中关于微生物方面的能力验证项目有 2 项,分别是 2002 年 6 月~2003 年 1 月与 CNAL 合作举办的编号 T030 食品微生物学能力验证计划,检测菌落总数、大肠菌群、沙门氏菌,共有来自 45 个国家和地区的 226 个实验室参加(包含 18 个 APLAC 成员);编号 APLAC T046 食品微生物学能力验证计划,检测菌落总数、单核细胞增生李斯特氏菌、副溶血性弧菌和空肠弯曲菌,该计划正在进行中。

### 2) 英国中心科学实验室(CSL)

英国中心科学实验室(Central Science Laboratory, CSL, 其网址为 <http://www.ptg.csl.gov.uk>)下属机构实验室能力验证组(Proficiency Testing Group, PTG)早在 1990 年就开始提供食品检测实验能力验证服务。其拥有的 FEPAS<sup>®</sup>(Food Examination Performance Assessment Scheme)食品检测能力评估计划,属于食品微生物实验能力验证系列产品,最初于 1997 年由英国农业、渔业和食品部(Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, MAFF)设立,属于非盈利性的官方组织。

FEPAS<sup>®</sup>的专业测试分为“轮”和“系列”,每一次专业测试称为一轮测试,在这些轮的测试过程中根据不同的检测类别,分为系列。例如,对沙门氏菌的所有检测称为一系列,而分别在不同的检测样品如鸡肉、牛肉、奶粉等食品中进行的沙门氏菌检测则称为不同轮。每一次的测试将几轮测试混合在一起进行分析,各个实验室将报告汇集到能力测试小组 PTG。PTG 对每一份的测试结果进行统计分析,做综合性的评价报告,然后反馈到每一个实验室一份保密的评价报告。由于 FEPAS<sup>®</sup>的评测报告具有高度的保密性,使用科学的统计方法,资料收集全面具有代表性,因此目前 FEPAS<sup>®</sup>已经成为与世界众多国家微生物学相互交流的国际性机构,其出具的能力测试评测报告具有高度的权威性。

FEPAS<sup>®</sup>能力验证的一般申请步骤:

① 实验室应根据《FEPAS<sup>®</sup>/FEPAS<sup>®</sup>/GeMMA<sup>®</sup>年度计划安排》、《水平测试价格表》和《FEPAS<sup>®</sup>/FEPAS<sup>®</sup>/GeMMA<sup>®</sup>标准测试价格表》提出测试申请,确定参加的测试项目的时间;

② 提早 6 周与 FEPAS<sup>®</sup>联系,确定测试的具体时间和签订确认合同;

③ 缴纳相关费用;

④ 接收样品后,按照测试的指示处理样品、进行检测;

⑤ 在规定的时间内向 FEPAS<sup>®</sup>以传真或电子邮件的方式提交检测报告;

⑥ 在测试到期日后的 5 周内将收到评测报告,如在报告发出的 10 日内仍未收到报告的,可直接与 FEPAS<sup>®</sup>处联系。

### 3) 欧洲实验室能力验证信息系统(EPTIS)

实验室能力验证对于证明实验室检测能力、为实验室认证认可程序提供技术支持具有重要意义。然而,国际上多达数百种名目各异的能力验证活动,不但为实验室挑选合适的能

力验证计划带来困扰,也为综合比较和评估同一类型的不同能力验证计划的适用性和有效性设置了障碍。为了解决这些问题,1998年欧洲实验室能力验证信息系统(European Proficiency Testing Information System, EPTIS,其网址为 <http://www.eptis.bam.de>)成立。目前,EPTIS相当于一个以互联网为基础的、非赢利性质的实验室能力验证计划查询系统。通过EPTIS可以查询到包括17个欧洲成员国和美国在内的约750个实验室能力验证计划实施情况。EPTIS在EA、Eurolab、Eurochem、ILAC和IRMM(European Institute for Reference materials and Measurements)的资助下运作。

#### 4) 澳大利亚国家检测机构协会(NATA)

澳大利亚国家检测机构协会(National Association of Testing Authorities, NATA,其网址为 <http://www.nata.asn.au>)现在是一个第三方的、从事实验室认可和企业质量体系认证工作的机构,由澳大利亚工业科学技术部(DIST)授权。开展验证试验活动。具体工作内容包括组织本国已获认可的实验室开展验证试验活动,协助组织APIAC各成员开展验证试验,以及与欧洲实验室认可合作组织(EAL)开展验证试验活动。

#### 5) 国际分析家协会(AOAC)

国际分析家协会(The Association Of Analytical Communities, AOAC International,其网址为 <http://www.aoac.org/proficiencytesting>)始建于1884年,AOAC一直致力完善方法检验,改善的实验室管理,并且分析科学家的专业发展。在过去100年期间,AOAC在美国从一个小型化学家组织演变而来。今天,AOAC作为行业内的领头协会,为生产业、政府机构和学术机关提供实验确认方法,熟练测试样品、检定标准以及提供科学情报。其最为权威项目为每年定期举办食品微生物实验室能力验证计划,为实验室检验其检测结果的精确性和可信性提供了有效渠道,并在当中扮演了重要角色。2005年,AOAC为食品微生物举办了3系列的水平测试计划,包括了从食源性致病菌(如沙门氏菌、*E. coli* O157:H7、李斯特氏菌等)到非致病菌的检测(如大肠菌群、酵母和霉菌以及需氧菌的平板计数等检测项目),实验室可根据自身条件选择参加其中一项或多项水平测试。

#### 6) 美国实验室能力验证研究所(API)

美国实验室能力验证研究所(American Proficiency Institute, API,其网址为 <http://www.api-pt.com>)是美国最大的食品检测实验能力验证活动的组织者。1998年,API为能力测试计划进入食品行业设立了专门的软件和测试样品。其在微生物领域举办的第一个水平测试是要求参加者从样品中检测诸如大肠杆菌 O157:H7、沙门氏菌和李斯特氏菌等致病菌。API实行无纸化的水平测试模式,参加者从递交参加申请、测试结果到结果反馈并打印均可通过互联网完成。API将对测试结果保留5年。目前已经超过400个实验室参与其中一项或全部的水平测试项目。在美国和加拿大超过30家大型食品生产商使用API的水平测试项目作为内部和外部质量控制措施。

#### 7) 中国实验室国家认可委员会(CNAL)

中国实验室国家认可委员会(China National Accreditation Board for Laboratories, CNAL,其网址为 <http://www.cnal.org.cn>)是由原中国实验室国家认可委员会(CNACL)和原中国国家出入境检验检疫认可委员会(CCIBLAC)合并后重新组建的,CNACL和CCI-

BLAC 均为亚太实验室认可合作组织 (APLAC) 和国际实验室认可合作组织 (ILAC) 的正式成员, 并签署了 ILAC-MRA (相互承认协议) 和 APLAC-MRA (相互承认协议)。CNAL 由技术委员会、管理委员会、执行委员会、评定委员会、申诉委员会和秘书处组成。经中国政府授权, CNAL 的工作职责包括: 组织实验室开展和参与国内外能力验证活动。其技术委员会是其内设机构, 参与各专业能力验证的设计、组织、评价提供技术支持; 秘书处是 CNAL 的常设机构, 由秘书长负责, 由业务管理处、认可评审处、评审员处、研究开发与能力验证处 4 个部门组成。目前, 我国实验室能力验证工作的宏观管理由 CNAL 研发与能力验证处负责。

CNAL 依据 ISO/IEC 17025 对实验室进行认可评审, CNAL 规定: 获得其认可前应参加一次能力验证活动; 已认可实验室在其认可范围内的每个主要领域应每 4 年至少参加一次能力验证活动; 当认可实验室的关键技术人员或认可范围发生变化时, 认可委员会将缩短实验室参加能力验证的时间间隔。CNAL 积极履行其职责, 成立至今 CNAL 已经独立或与其他组织共同开展的能力验证计划共有 270 多项, 截止到 2004 年 8 月, 与食品微生物相关的能力验证计划见表 12-5。

表 12-5 CNAL 举办的微生物水平测试项目

序号	计划编号	名称	组织者	状态
18	ACCSQ	食品化学及微生物分析(国际)	IANZ	完成
44	APLAC-T030	食品微生物检验(国际)	APLAC	完成
69	CCIBLAC T004-00	食品微生物水平测试(国内)	CCIBLAC	完成
79	CCIBLAC T014-01	食品微生物(国内)	CCIBLAC	完成
25	CNALT0159	副溶血性弧菌(国内) 菌落总数	CNAL	实施中

#### (5) 能力验证的组织与运作(对组织者而言)

要组织和实施有效的能力验证计划, 应按 ISO/IEC 指南 43:1997 第一部分的要求建立和运行能力验证方案, 并按照其第二部分的要求使用能力验证的结果。

##### 1) 设计方案

实验室认可机构可独立执行也可以与其他认可机构联合设计实验方案。但其目标是一致的, 所设计的方案必须能覆盖需验证的检测项目的全部范围, 以确保该验证计划具有代表性。认可机构也可以根据以往验证计划的统计资料显示, 选择尚未开展的检测项目和大多数实验室未参与的检测项目来安排能力验证活动。

此外, 能力验证项目的选择还要考虑其他因素的影响, 如: 参加实验室选用的检测方法、日常开展的检测项目、检测的时间安排、参加实验室的数目、所需费用等。

##### 2) 能力验证方案的内容

能力验证方案通常包含: 执行能力验证方案的机构的名称和地址; 参与能力验证方案设计和执行的协调人及其他人员的名称和地址; 能力验证方案的性质和目的; 所选测试样品和测试项目的性质, 即作出上述选择的简短描述; 获得、处理、检查和传递样品方式的说明; 采用统计方法的概述、包括确定指定值和离群值的方法等。

### 3) 样品的均匀性和稳定性

待测样品一般由能力验证计划的组织者统一制备,也可以执行外包制度,由具有制备检测样品的组织执行。待测样品在性质上应与参加实验室日常校准(检测)的样品类似。为避免由于待测样品的质量问题而导致检测结果出现极端值,制备组织必须充分考虑待测样品的均匀性和稳定性,以及做好安全措施,防止待测样品的性质在抽样、运输等过程中受到破坏,影响实验结果。

对微生物实验而言,定性检测计划对样品的稳定性和存放条件有较高的要求,避免因不当操作影响实验结果;而定量检测计划则要求待测样品的均匀性和稳定性得到保证。组织者需要在能力验证的开始到结束的期间内,每个星期对待测样品进行监控测试,这样才可保证各实验室对同一质量水平的样品进行检测,得到的数据才具有统计意义。总的来说,样品的均匀性和稳定性是能力验证计划得以顺利进行的前提条件。

### 4) 邀请参加者

能力验证方案的组织者应依据特定方案的性质和目的,根据充分考虑并制定的“参加者准则”来邀请合适的实验室参加,以保证能力验证方案的顺利实施。具有检测相关项目能力的实验室也可以报名参加。

### 5) 样品包装和发送

能力验证方案组织者应根据样品的性质选择合适的样品包装和发送方式,以确保样品的检测特性不因外界条件发生变化,并保证样品如期送达参加实验室。对于微生物能力验证样品而言,为保障运送条件下样品的稳定性和安全性,通常将测试样品制成冻干状态后以安瓿瓶或塑料瓶密封包装,远距离运输可采取在冷冻条件下以特快专递或快件形式进行运送;近距离情况下,可通过交通工具在冷冻条件下运送,并争取尽快运达测试实验室。

### 6) 操作说明

组织者负责在样品发送时附上“操作说明书”和“报告结果单”,确保参加比对的实验室在正确的指导下处理样品、进行实验、并以统一的格式在限定时间内反馈结果,以便组织者统计分析。

### 7) 数据统计

组织者将在各实验室规定时间内反馈的检测结果进行统计分析。不同的能力验证计划可采取不同的统计方法,但目的都是为了能准确分析实验值与真实值之间的差异。而对于检测比对方案,目前国际上通用的统计方法为稳健统计法,常用的统计参数有:(所有结果值的)中位值(即公议值)、IQR 值(四分位数间距),并由此计算出检测结果的稳健值  $Z$  比分数。

### 8) 结果评价

能力验证结果评价工作包含两个方面的工作:计算工作评价值和作出技术评定。对于不同类型的方案,所采用的工作评价值计算模型是不同的,对于检测比对方案,则求取稳健  $Z$  比分数。技术评定是在工作评价值的基础上,有技术专家参与的工作,组织者应充分听取具有丰富经验的技术专家的意见,最终形成该检测项目的技术评定。

### 9) 技术报告

组织者负责起草能力验证计划的技术报告,通常包含以下内容:报告的编号、标志和发布日期;能力验证方案特点的描述(参加试验室、测试样品、测试项目等);统计工作描述;标明超限结果;方案协调人及其他有关人员联系方式;测试工作的技术评定;测试结果及统计数据;样品制备和均匀性检测(稳定性)的有关说明;操作说明书和结果表的副本;必要时,附上统计方法的详细说明。

#### (6) 参加能力验证的一般步骤(对实验室而言)

##### 1) 计划

举办能力验证活动的组织或团体,每年会预先公布当年即将举办的各类能力验证计划,并邀请相关的实验室参加。实验室应根据自身开展的检测项目,参照公布的能力验证计划的时间确定所要参加的能力检测项目。合理安排参加能力验证活动的时间与次数,避免引起不必要的混乱。

对于申请认可的实验室,应该在其申请认可的每个检测或校准领域于适当间隔的时间参加一次能力验证活动。对于已认可的实验室,也应在一定间隔的时间内(四年一次)参加能力验证活动,确保该项目的持续检测水平。

##### 2) 报名

根据所要参加的能力验证计划的组织者的要求,在适当的时间提交报名表格、签订合同和缴纳相关的费用,并且确认参加能力验证计划的项目的具体时间。

##### 3) 准备工作

确认报名及具体测试时间后,应着手准备检测项目所需要的设备和耗材,以及相关的人员培训。例如,沙门氏菌的能力验证,必须准备高效价的诊断血清,作对比实验的标准菌株的菌种验证、相关试剂的配制、仪器的校准等。

##### 4) 进行测试

参加者收到由能力验证组织者送达的测试样品后,应仔细阅读样品说明书,明确测试要求和报告时间,确定测试的方案,然后应立即对待测样品进行分析测试,严格按照检测方法的步骤进行检测,并详细记录测试过程,最后必须在规定的期限内按照能力验证计划的要求将结果报告反馈给组织者。

##### 5) 接收测试报告

组织者将对参加测试的实验室提交的结果进行统计分析,然后将综合评价反馈给各实验室,向参加者通报其检测结果的准确度和公布该次能力验证计划的整体实施情况。

##### 6) 能力验证活动结束

由此可见,通过积极参与国内外的能力验证活动,可及时了解与其他实验室检测水平的差距以及自身所处的位置,弥补自身的不足之处,不断提高检测的准确性。能力验证活动已日益成为补充实验室认可现场评审技术、评价和监督实验室能力维持现状的有效手段。能力验证活动所覆盖的范围也越来越广泛。

### 第三节 统计技术在实验室质量保证中的应用

#### 一、统计技术的作用

任何的研究领域只要牵涉到数据的处理,必然需要运用统计的观点。在实验室的质量控制中,不论是内部的比对实验还是实验室间的比对实验,甚至于国际权威机构举办的能力验证活动,统计技术都占据了极其重要的位置。可以说,能力测试中的实验部分是为结果的统计分析服务的。准确地运用统计方法处理数据,可得到与真实情况最相近的分析结果。良好的分析结果是对实验室检测水平的肯定,若出现了极端分析结果,则可及时提醒技术人员从各个实验程序中查找出现误差的原因,进行改进。因此,正确运用统计技术是关键。

目前微生物能力验证计划中广泛应用稳健统计技术进行检测结果统计,它用中位值代替了算术平均值、标准偏差等容易受数据中极端值影响的参数,将数据中的极端数值赋予更小的权重,使极端值对平均值估计值和标准差估计值的影响减到最小,从而使统计结果更接近于真实反映的结果。

#### 二、稳健统计技术基本概念

##### 1. 中位值

在按照一定大小顺序排列全部数据中,位于中间位置的数值。若数据为奇数,则位于中间位置的数值为中间值;若数据为偶数,则位于中间位置的两个数据的平均值为中间值。

##### 2. 四分位值和四分位值间距(IQR)

在按照一定大小顺序排列的全部数据中,有四分之一的数据比该值大,称该值为上四分位值;有四分之一的数据比该值小,称该值为下四分位值。上四分位值与下四分位值之差,即为全部数据的一半,称此差值为四分位值间距(IQR)。IQR越大,证明数据的分散程度越大,反之则越小。

##### 3. 标准化四分位值间距(NIQR)

四分位值间距的0.741 3倍。标准正态分布的均数为零,标准差为1,此时四分位值间距的宽度为1.348 98,因此,四分位值间距乘以 $1/1.348\ 98(0.741\ 3)$ 就相当于标准差。

##### 4. 稳健变异系数(Robust Cv)

稳健变异系数指标准化四分位值间距除以中位数,并以百分数表示,即 $(NIQR \div \text{中位值}) \times 100\%$ ,此参数可表示同一样品或不同样品中测试值之间的变动性。

##### 5. 极端值

极端值指与指定值有明显差异的数值。包括极小值和极大值。

##### 6. 极小值

极小值指全部数据中最小(低)的一个数值。

##### 7. 极大值

极大值指全部数据中最大(高)的一个数值。

### 8. 极差

极差是指极小值与极大值之间的差值。

### 9. Z 值

$Z \text{ 值} = (\text{观察值} - \text{中位值}) \div \text{标准化四分位值间距}$

相当于一组中其他观察值,给该结果一个标准化的数值。

### 10. 离群值

在统计学处理数据中,该值与其他观察值具有显著差异的值。在稳健统计技术中,离群值的判定标准为: $|Z| \geq 3$  被判定为离群值,具有约 99% 可信度不可接受; $2 < |Z| < 3$ ,具有 95% 可信水平,为可疑值; $|Z| \leq 2$ ,为满意结果。

此外,在定性能力验证中,会出现假阳性和假阴性的结果,即是在待测样品中不含有某物质,却被鉴定出含有该物质,则结果称为假阳性;在待测样品中含有某物质,却未能报告含有该物质,则结果称为假阴性。

## 三、稳健统计技术的数据处理

### 1. 数据处理程序

- (1) 剔除无效数据,例如参加者在能力验证结果中报告的额外数据。
- (2) 检查有效数据的正态分布。
- (3) 使用稳健统计学计算中位值,可根据需要对有效数据进行数学变换(如对数变换)。
- (4) 有效数据与中位值比较,计算 Z 值。
- (5) 仔细分析计算结果以确定峰值分布。

### 2. 稳健统计技术的应用实例

稳健统计技术一般被应用于定量检测的能力验证计划中,现以 CNAL 组织的食品微生物学水平测试中样品 PTS001B 测试结果为例,各实验室测试结果及数据分析见表 12-6。

表 12-6 样品 PTS001B 的测试结果及数据分析

实验室代码	结果/ (cfu/mL)	数据对数变换/ (lgcfu/mL)	Z 值
001	6 500	3.81	0.23
002	3 500	3.54	-1.19
003	12 300	4.09	1.68
004	9 200	3.96	1.02
005	8 100	3.91	0.73
006	11 000	4.04	1.43
007	3 500	3.54	-1.19
008	6 000	3.78	0.04

续表 12-6

实验室 代码	结果/ (cfu/mL)	数据对数变换/ (lgcfu/mL)	Z 值
009	7 900	3.90	0.67
010	27 000	4.43	3.48 §
011	5 200	3.72	-0.28
012	5 200	3.72	-0.28
013	11 000	4.04	1.43
014	6 800	3.83	0.33
015	6 500	3.81	0.23
016	4 200	3.62	-0.77
017	4 700	3.67	-0.52
018	6 000	3.78	0.04
019	3 700	3.57	-1.06
020	5 000	3.70	-0.37
021	10 000	4.00	1.21
022	6 100	3.79	0.08
023	5 300	3.72	-0.24
024	21 000	4.32	2.91 *
025	8 300	3.92	0.78
026	3 700	3.57	-1.06
027	16 000	4.20	2.28 *
028	16 000	4.20	2.28 *
029	5 900	3.77	0.00
030	3 700	3.57	-1.06
031	5 200	3.72	-0.28
032	5 700	3.76	-0.07
033	6 200	3.79	0.12
034	4 300	3.63	-0.72
035	3 800	3.58	-1.00
036	11 000	4.04	1.43
037	6 800	3.83	0.33

续表 12-6

实验室 代码	结果/ (cfu/mL)	数据对数变换/ (lgcfu/mL)	Z 值
038	5 400	3.73	-0.20
039	5 000	4.70	-0.37
040	42 000	3.62	4.49 §
041	5 800	3.76	-0.03
042	3 800	3.58	-1.00
043	6 300	3.80	0.15
044	785	2.89	-4.61 §
045	3 050	3.48	-1.50
046	4 300	3.63	-0.72
047	6 800	3.83	0.33
048	4 200	3.62	-0.77
049	5 200	3.72	-0.28
050	5 000	3.70	-0.37
051	69 000	4.84	5.63 §
052	4 500	3.65	-0.61

注：“§”表示该结果为离群值( $|Z| \geq 3$ )。  
“\*”表示该结果为可疑值( $2 < |Z| < 3$ )。

根据稳健统计技术计算,数据处理结果及 Z 值柱状图分别见表 12-7 及图 12-3。

表 12-7 采用稳健统计技术的数据处理结果

名称	数值	名称	数值
结果数	52	上四分位数	3.911
中位值	3.77	下四分位数	3.648
最大值	4.84	四分位数间距	0.263
最小值	2.89	标准化四分位数间距	0.19
极差	1.94	稳健变异系数	5.2

如图 12-3 所示,Z 值超出 +3 和 -3 范围的数值均为离群值,编码为 010、040、044、051 的实验室属于该类;Z 值在 +2~+3 和 -3~-2 范围的结果为可疑值,编码为 024、027、028 的实验室属于该类;Z 值在 +2 和 -2 范围内的数值为满意结果,其余的 45 个实验室属于此类。

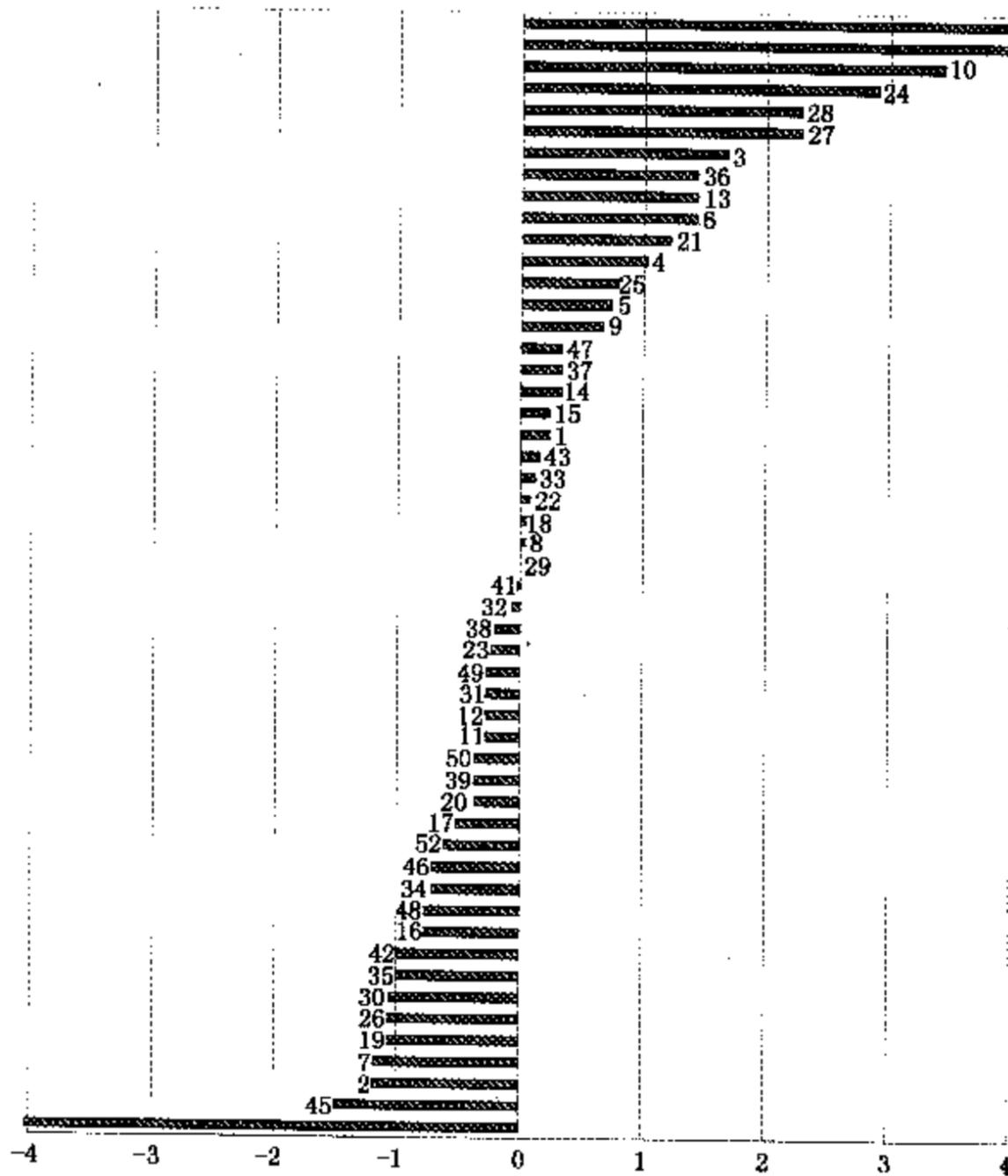


图 12-3 各实验室结果分析的 Z 值柱状图

在能力验证计划中运用稳健统计技术统计数据,并结合 Z 值柱状图可清晰展示实验室的整体水平分布以及各个实验室所测得结果的符合程度,结果简单明了。而且各个实验室还可根据图表了解本实验室的检测水平与其他实验室的差距,达到实验室间比对的目的。因此,稳健统计技术越来越广泛地应用于实验室间的比对实验和能力验证计划中。

### 参 考 文 献

- [1] 李志勇,谢钧宪. 食品微生物检验的质量控制[J]. 检验检疫科学,2004,14(4): 5-9.
- [2] 纪绍梅,赵宏大,谢文. 国内外 SS 琼脂培养基的质量比较[J]. 中国药事 2005, 19(2):125-126.
- [3] 中国实验室国家认可委员会. 能力验证指南[M]. 北京: 中国计量出版社,2001.

- [4] 刘智敏. 测量统计标准及其在认可认证中的应用[M]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [5] ISO/IEC 17025;2005 General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories
- [6] ISO/IEC Guide43;1997 Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons
- [7] ISO 4833;2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the enumeration of microorganisms—Colony-count technique at 30°C
- [8] IUPAC/ISO/AOAC-1993 The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of (chemical) Analytical Laboratories
- [9] Lowthian, P. J. and Thompson, M. Bump-hunting for the proficiency tester—searching for multimodality[J], Analyst, 2002, 127: 1359-1364.

# 第十三章 微生物测量不确定度的评定

## 第一节 概 述

### 一、测量不确定度评定的意义

测量不确定度的评定是实验室质量管理体系的重要组成部分,是测试实验室质量管理的重要内容。在 ISO/IEC 17025:2005《检测和校准实验室能力认可准则》中明确指出:“检测实验室应具有并应用评定测量不确定度的程序”,当不确定度与检测结果的有效性或应用有关,或客户的指令中有要求,或不确定度影响到与规范限度的符合性时,则检测报告中还需要有关不确定度的信息。同时,检测实验室所进行的合同评审、分包、采购、不符合测试的控制、纠正和预防措施、测试结果的质量保证、内部审核和管理评审等工作中也应考虑测量不确定度问题;实验室的人员、设备、环境条件、测试方法及方法确认、测试的溯源性等要素都涉及测量不确定度问题。

虽然《测量不确定度表示导则》(GUM1995)提供了评估不确定度的框架,但不能替代周密的思考、理智的诚实和专业的技巧。不确定度的评定既不是例行的任务,也不是纯粹的数学,它取决于对测量和被测量的本质的详细了解 and 认识。所以测量结果不确定度评定的质量和实用性主要取决于认识的程度、严格的分析和对该值有贡献的影响量的完全性。本章尽可能从多方面来阐述微生物领域的不确定度的评定。

### 二、测量不确定度的定义

测量误差是客观存在的,它是理想的概念,反映测量误差大小的术语“准确度”也是一个定性的概念。测量不确定度是人们对测量的认识不足的程度,是可以定量评定的量。已修正后的测量结果即使具有很大的不确定度,误差也可能可忽略,即有可能测量结果非常接近被测量的真值,但由于认识的不足,只能认为被测量的值落在一个较大的区间内。因此,测量结果的不确定度不应该理解为剩余的求知误差。《测量不确定度表示导则》一再强调:“误差”与“测量不确定度”是两个概念,不要混淆。

测量不确定度是表征合理地赋予被测量之值的分散性、与测量结果相联系的参数。误差是测量结果与被测量真值之差。由于真值往往是不能确切定义和已知的,所以一般不可能确切地得到误差。不确定度概念是在原有的误差理论的基础上提出的,误差的概念仍被广泛使用,而且不确定度理论也不可能替代误差理论而成为该领域的唯一理论。

误差是始终存在的。理论上可以使用已知的误差来修正被测量的值。但是,误差毕竟是理想的概念,用误差修正过的被测量值的不确定度可能仍很大,因为测量者可能对这个修正过的值接近真值的程度是非常不确信的。测量不确定度不能用于被测量值的修正,虽然经常使用与测试结果同量纲的参数,如标准偏差来表示测量不确定度,但测量不确定度是被

测量分散性的度量,它可以表征被测量值的合理范围,但不能与被测量值进行简单的运算。测试结果的不确定度始终不能解释为误差,也不能解释成修正后剩余的误差。

## 第二节 与微生物测量不确定度有关的政策

### 一、CNAL 测量不确定度的政策(参照 CNAL/AR11;2003)

1. 中国实验室国家认可委员会(CNAL)充分考虑目前国际上与合格评定相关的各方对测量不确定度的关注,以及测量不确定度对测量、试验结果的可信性、可比性和可接受性的影响,特别是这种影响和关注可能会造成消费者、工业界、政府和市场对合格评定活动提出更高的要求。因此,CNAL 在认可体系的运行中给予测量不确定度评定以足够的重视,以满足客户、消费者和其他各有关方的期望和需求。

2. CNAL 在测量不确定度评定和应用政策方面将始终遵循国际规范的相关要求,与国际相关组织的要求保持一致,并在国际规范和有关行业制定的相关导则框架内制定具体的测量不确定度要求。

3. CNAL 注意到测量不确定度概念应用的时间不长。因此 CNAL 将按照“目标明确、重要先行、循序渐进”的原则,逐步展开测量不确定度的评定和应用。

4. CNAL 在认可实验室的技术能力时,必须要求校准实验室和开展自校准的检测实验室制定测量不确定度评定程序,并将其用于所有类型的校准工作;必须要求检测实验室制定与检测工作特点相适应的测量不确定度评定程序,并将其用于不同类型的检测工作。

5. CNAL 在认可实验室时,应要求实验室组织校准或检测系统的设计人员或熟练操作人员评定相关项目的测量不确定度,要求具体实施校准或检测人员正确应用和报告测量不确定度,还应要求实验室建立维护评定测量不确定度有效性的机制。

6. 检测实验室应有能力对每一项有数值要求的测量结果进行测量不确定度的评定。当不确定度与检测结果的有效性或应用有关、或在用户有要求时、或当不确定度影响到对规范限度的符合性时、当测试方法中有规定时和 CNAL 有要求时(如认可准则在特殊领域的应用说明中有规定),检测报告必须提供测量结果的不确定度。

7. 检测实验室必须建立测量不确定度的评定程序。对于不同的检测项目和检测对象可以采用不同的评定方法。

8. 检测实验室在采用新的检测方法之前,应制定相关项目的测量不确定度的评定方法。

9. 检测实验室对所采用的非标准方法、实验室自己设计和研制的方法、超出预定使用范围的标准方法以及经过扩展和修改的标准方法重新进行确认,其中应包括对测量不确定度的评定。

10. 对于某些广泛公认的检测方法,如果该方法规定了测量不确定度主要来源的极限值和计算结果的表示形式时,实验室只要按照该检测方法的要求操作,并出具测量结果报告即被认为符合本要求。

11. 由于某些检测方法的性质,决定了无法从计量学和统计学角度对测量不确定度进

行有效而严格的评定,这时至少应通过分析方法,列出各主要的不确定度分量,并作出合理的评定。同时应确保测量结果的报告形式不会使用户造成对所给测量不确定度的误解。

12. 检测实验室测量不确定度评定所需的严密程度取决于:

- 1) 检测方法的要求;
- 2) 用户的要求;
- 3) 用来确定是否符合某规范所依据的误差限的宽窄。

13. 为了便于用户比较实验室的能力和水平,对于一般应用,扩展不确定度应对应95%的置信水平。在表述实验室的能力时,一般采用最佳测量能力,即根据日常校准或检测系统,被校或被测样品接近理想状态时评定的最小测量不确定度。在校准证书或检测报告上应出具测量结果的不确定度。

## 二、APLAC 在测试领域有关测量不确定度的政策

如果测试产生数字结果(或基于数字得出的结果)时,需尝试对结果的不确定度进行合理的评估,无论测试方法是理论的还是经验的。如果测试结果为非数字结果(如合格或不合格、阳性或阴性、基于视觉或触觉或其他定性检测),则不需对不确定度或其他变量进行评估,但鼓励实验室去了解测试结果可能产生的所有变量。

1. 在对微生物测量不确定度评定方面,微生物测试有四种主要类型:常规定量测试、MPN法、定性测试和专家测试如医药测试等。各种不确定度的评定方法是用于常规定量测试的。

2. 泊松分布法和可信区间方法可能明显低估了不确定度,因为它们没有将不确定度的所有贡献量都计算在内。微生物在液体中的分布可以使用泊松分布描述,但测试方法中其他不确定组分不包括在内。一些被确定的组分(如稀释倍数和平板读数的一致性)就不能用泊松分布来描述。

3. 二项分布可能更适合,因为它包括了泊松分布,同时也考虑了过度分散因素。

4. 在 EURACHEM GUIDE 中介绍的一些方法可能也适用于微生物不确定度的评定。按照 ISO 5725 测得的“中间精密度”,认为包含了大部分但非全部的主要不确定度分量。在这个方法中的不确定度的贡献量不包括诸如不同批次培养基的性能、培养箱条件的差异等,可以通过其他统计手段检测到的因素。

5. 平板测试的结果不是正态分布而是属于偏态分布。这些数据首先要转换成对数,使分布接近正态分布。根据对数数据求得标准偏差和可信区间。当不确定的另外一些组分(如取样、设备差异等)需要合成到精确结果中,可能需要使用对数、反对数和高等数学来计算。

在测试结果小于 10 cfu 的情况下,可能接近于正态分布,结果可能不需要对数转换,在这种特殊范围内,将需要精密度的估计。实验室从事单次分析,此时可以采用泊松分布法评估不确定度。

6. 与方法偏差相关的任何不确定度和定量微生物测试无关,因为这种测试的结果依赖于培养基、培养时间和特定温度。当有用于定量测试的标准物质时,该标准物质的值大多来

自于协作试验。因此特定方法仅有的公议值是可用的。

7. 在 MPN 分析中传统做法是通过 MCCRADY 表来获得测试结果和 95% 的置信率。建立在统计和概率上的数据不用考虑不确定度的所有贡献。鼓励实验室识别不寻常的阳性管组合并拒绝这样的结果。如何能有效地操作,在这种情况下从 MPN 表(见附录 3)中引用的置信率进行不确定度评估是合理的。

8. 在现阶段,协作实验中很少有可用于不确定度评估的数据,但是这种情况以后会有所改变。

能力验证数据并不总是能用作测量不确定度评估的数据,因为一些重要情况不能计算在内,这些情况包括:

- 1) 能力验证样品和实验室日常测试样品的基体可能不同;
- 2) 样品中微生物含量与实验室日常测试的含量不同;
- 3) 参试实验室所用的经验方法不同。

9. 报告测量不确定度:在现阶段,建议实验室只在客户提出要求时出具不确定度数据。在这种情况下,也应包括用于评估不确定度过程的说明。在现阶段较好的做法是报告结果和相关的 uncertainty 而不做符合性评定。

### 三、EURACHEM/EA 有关测量不确定度的政策

1. 针对测量不确定度评定,微生物检验属于非严格性、非度量学和非统计学一类。因此单独采用重复性和再现性数据来评定不确定度是合适的方法,但是理想上还应考虑偏离(如来自能力验证的结果)。应能识别出不确定度的各个分量,并可以对它们进行控制,从而可以评价对结果变动的贡献。一些分量(如吸液、称重、稀释的影响)可以比较容易被测出,并经过计算得出,这些分量对于总的 uncertainty 可以忽略不计。其他组成部分(如样品的稳定性和样品的制备)既不能直接测量出来也不能以统计学的方式进行评价,但它们的重要性也值得考虑。

2. 认可的微生物检验实验室在采样时最好能了解微生物在样品基质中的分布情况。但是,在 uncertainty 评定时,不推荐把这种分量计算在内,除非委托人要求。主要是因为样品基质中微生物分布所造成的 uncertainty 并不属于实验室工作范畴之内,而且每个个体样品也可能不一样,同时检测方法考虑到样品的不均匀性而规定了样品的取样量。

3. 不确定度的定义不能直接用于定性检测结果,比如那些检测有或无试验和鉴别属性的试验。不过个别变异的来源(如试剂性能的一致等)都应该被识别并被很好地控制。另外,当判定检出限是该方法是否适用的指标时,使用接种量来决定检测限,要对接种量的 uncertainty 进行计算和评定。实验室也应该清楚进行的定性实验中的假阳性和假阴性结果发生的几率。

## 第三节 微生物测量不确定度的评定

### 一、微生物测量不确定度的评定原理

微生物不确定的评定主要是针对定量测试。定量测试微生物的 uncertainty 的评定,主要

有两种不同意见,一种是通过 A 类评定方法(即由一系列观测值计算统计方差的估计值,直接得出不确定度分量的标准不确定度),来进行不确定度的评定;另一种是按照不确定度传播定律,识别并列方法中非常重要的不确定度来源,对各个不确定度的分量逐项进行评定,最后合成总的不确定度。

前一种意见基于的理论是由 ISO 发布的《测量不确定度指南》,它是一种广泛采用的标准化方法,评价单个变量对测量过程中不确定度的贡献。总的不确定度由不确定度传播的原则产生。在分析测量时,此法常用在化学方面(见 EURACHEM/CITAC 指南)。ISO/TC 34/SC 9 认为这种步步深入的方法,在对食品的微生物学分析方面效果不佳,因为很难建立实际复杂的测量模型。同时如果忽视一个显著的不确定分量,会低估总的不确定度。

另外,很难准确定量单个步骤对总体的影响,因为分析的是活的生物体,它的生理状态是可变的,并且涉及到不同的株、种和属。换句话说,微生物学方面的分析不能从严格的度量测量角度和统计数据来对测量不确定度进行评定。ISO/TC 34/SC 9 因此采取“从上至下”和“总体”分析法对不确定度进行评定。该法基于实验最终结果的重复性的标准偏差。这是基于实验结果(同一方法重复测试)的方法,对于微生物测试,似乎比步步深入法更有意义。同时 ISO/TS 21748 批准总体法,由 ISO/TC 69/SC 6 制定。“统计法的应用——测量方法和结果”该文件阐明步步深入法与总体法不互相矛盾。测量不确定度的所有分量在整个分析过程中都已涵盖,可以通过准确度和偏差表征出来。EA 指南 4-10 中认同总体法可用于食品微生物学领域中,同时指出必须包括偏差。

后一种意见基于的理论是一些化学方法可以利用方法特异的重复性和再现性参数,而微生物很少能成功应用,这主要因为不同情况下不可预知的菌落数量,而这通常是不确定度的主要来源;还因为测试结果的不确定度太多依靠重复试验,而主要的条件无法再现。

但不管哪一种不确定度评定方式,必须考虑微生物测试过程中结果不确定度的主要影响因素或主要不确定度的来源。

## 二、微生物测量不确定度的评定实例

由于微生物测试不是一个严格的计量学和统计学意义上的方法,许多方面来源于个人经验,这样就导致观点的多样化,但还是鼓励测试者结合自己的经验来完善微生物不确定度的评定。

下面就微生物测试的主要影响因素(如取样、样品量、样品种类、目标微生物在样品中的分布、样品中含有的微生物数量水平、样品稳定性、倍比稀释、读数等)进行讨论和评定,同时尽量避免使用大量的统计学公式。

### 1. 取样

微生物取样带来的测量结果不确定度一直以来都是大家关注的事情,也有专门的程序或方法来指导取样不确定度的评定,但微生物测试结果的不确定度的评定不包括取样(见图 13-1)。

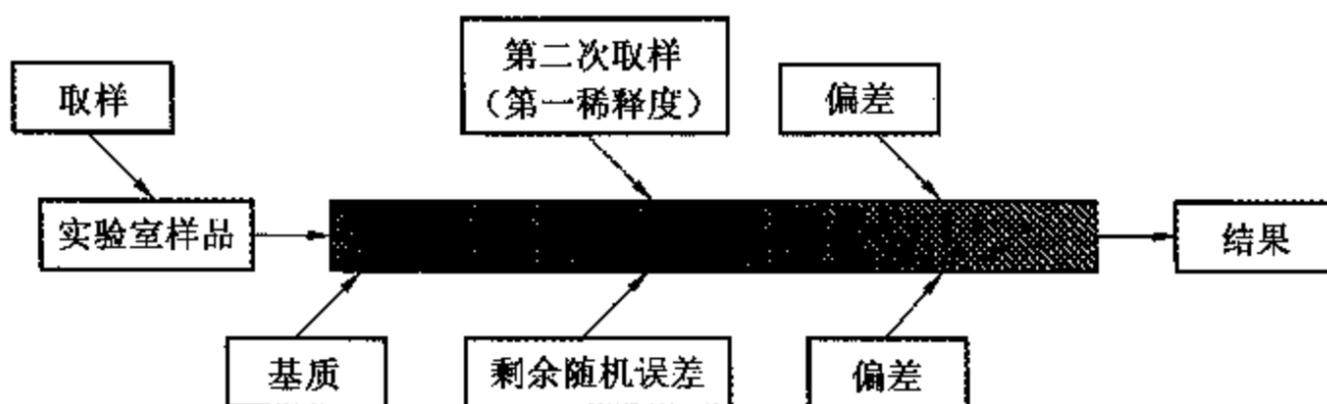


图 13-1 食品微生物学中的主要不确定因素及其“黑匣子”

图 13-1 是食品微生物学中的主要不确定因素以及测量不确定度的“黑匣子”方法,在图中,取样占总体误差的显著一部分,但不属于与测量相关的不确定度中的部分。二次抽样代表从分析样本中获得的被测试部分。按照 ISO 6887.1,二次抽样用于细菌计数方法中的初期悬浮。最后,剩余随机误差与上述因素无关,由实验室内重复操作来评价。

### 2. 样品的质量

样品质量的不确定评定可以通过不确定传播的方式来获得,既称量的天平、量筒等。多数认为样品的质量因素不是主要的结果不确定度的来源。

如一个样品菌数总数含量较高时(300 000 cfu/g),方法要求取 25 g 样品进行测试,但实际取了 12.5 g,理论计算此时的结果应该为 150 000 cfu/g,两个结果之间的差别比较小,所以该因素对结果测量不确定的贡献就比较小。

### 3. 分布

微生物在样品中的分布由于样品的状态(固体或液体)的不同而不同,状态一样的样品由于加工的工艺不同(受污染的情况不同)微生物的分布也不同。

按照统计学的原理,微生物如果在水中均匀分布(图 13-2),菌落总数的结果呈泊松分布,但是微生物在液体样品或水中的分布是呈随机分布的,但结果也呈泊松分布。下面以水中微生物分布为例说明。

整瓶混合好的水中共含有 30 个细菌,将整瓶水平均分成 10 等份,每份平均含 3 个细菌,但实际每份细菌的数量在 0~7 范围内。即使在理想的情况下,上述水中微生物分布的随机变化,至少是可能发生的情况;这可能由于微生物间或微生物与设备间有相互吸引或排斥的倾向导致微生物过度离散。

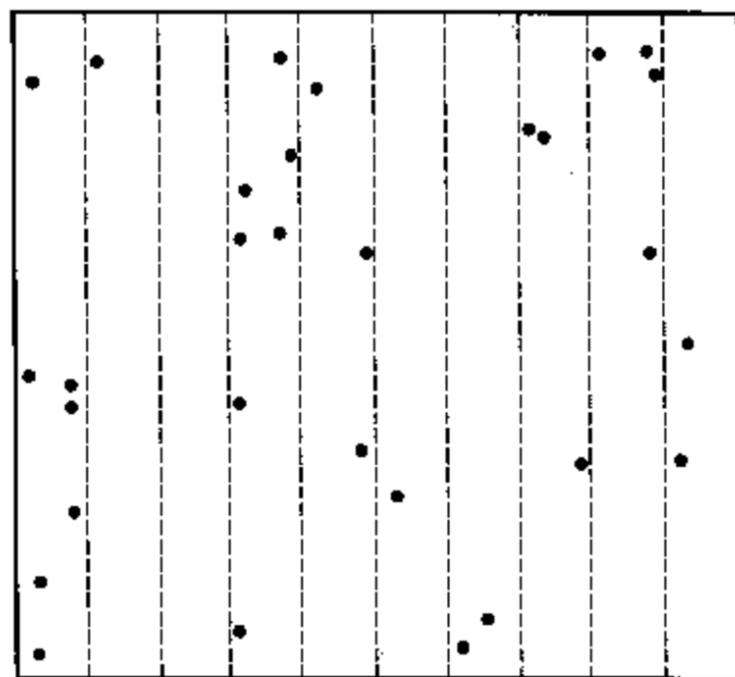


图 13-2 水中微生物的分布图

### 4. 样品中微生物的含量(数量)

大部分测量结果的不确定度评定方法不适用于微生物含量较低的情况,因为当微生物含量较低时,接近方法的检出限,准确测量比较困难,样品中微生物的分布也是未知,测试结

果的重复性和再现性很难测量,其测量不确定度没有简单的统一方法来评定。

### 5. 样品的种类

由于样品的种类不同,即基质不同,同一方法的重复性和再现性的参数(标准偏差等)也不一样。

ISO/PDTS 19036 显示菌落总数的数据中,水:方法重复性标准偏差( $S_r$ )=0.09,方法再现性标准偏差( $S_R$ )=0.10;牛奶: $S_r$ =0.06, $S_R$ =0.12;奶粉: $S_r$ =0.04, $S_R$ =0.05;即食加工的肉: $S_r$ =0.17, $S_R$ =0.33;鱼: $S_r$ =0.29, $S_R$ =0.51。

根据 AOAC 990.12PETRIFILM 测试片检测菌落总数方法的数据,面粉: $S_r$ =0.225, $S_R$ =0.246;调味料: $S_r$ =0.274, $S_R$ =0.303;蔬菜: $S_r$ =0.310, $S_R$ =0.454;虾: $S_r$ =0.540, $S_R$ =0.615。

从以上数据可以看出样品的种类对结果的不确定度的贡献不同,可能由于样品中微生物的分布不同、样品混匀的难易程度不同等因素,导致不确定度结果的不同;因而在对测试结果的不确定度评定时应根据不同的样品种类来进行评定。

### 6. 样品的稳定性

样品的相对稳定是微生物测量不确定度评定的基础,只有稳定的样品才可以获得方法重复性和再现性的一些参数,从而对结果的不确定度进行评定。

### 7. 不同稀释倍数结果的差异

有大量数据显示不同稀释倍数间结果差别比较大,说明了不同稀释倍数是测量结果不确定度的一个重要的分量,应予以充分的重视。见下例菌落总数的结果及其统计处理。

第一个稀释度菌落总数 100 cfu,第二个稀释度菌落总数 17 cfu,采用卡方( $X^2$ )检验:

$$X^2 = \frac{\left(C_1 - \frac{V_1}{V_2} C_2\right)^2}{\frac{V_1}{V_2} (C_1 + C_2)}$$

$$V_1 = 10 \cdot V_2 \Rightarrow X^2 = \frac{(C_1 - 10 \cdot C_2)^2}{10 \cdot (C_1 + C_2)} = 4.19$$

假定样品中的微生物数量呈泊松分布,对不同的两个连续的稀释倍数的结果采用卡方检验,结果卡方值大于 4,表明不同稀释倍数间结果差异较大。

### 8. 均质方式

一般测试方法均可以采用剪切式均质和胃囊式均质,采用两种均质方式可能对结果产生不同的影响,澳门 CP. KOK 对 3M 测试片检测大肠杆菌的方法不确定度评定进行了研究,结果表明两种均质方式对不同的样品影响程度也不相同。

### 9. 读数的差别

菌落数是对基于对典型特征的菌落的观察和计数结果,这主要依赖于人的眼睛和经验,总是会增加或降低不确定度。芬兰 Niemela 等认为读数因素是不确定度来源的一个重要分量,并用一个平板计数和几个平板计数来对这个分量的不确定度贡献进行评定。

### 10. 同一稀释度不同平板计数的差别

同一稀释度各个平板中的菌落数可能不同,可以采用卡方检验的方法对不同平板数进行差异检验,如果卡方值大于4,说明同一稀释度不同平板间的菌落数有差异;如果卡方值远远大于4,说明该样品匀液中细菌的分布不是呈泊松分布。

### 11. 重复测试

目前大多数微生物不确定度的评价均采用单一样品的重复测试和一系列重复测试,采用A类评定方法来尝试进行微生物测量不确定度的评定。

根据微生物检验的主要影响因素的讨论和评定,结合实际工作程序,就菌落总数测试不确定度评估举例说明,其评估报告参见附录5。

## 第四节 国内外对微生物不确定度评定的状况

理论上,测量不确定度的评定是相当简单的。但是在实践中,测量不确定度的评定却可能是复杂的。这不仅由于测量不确定度的某些数学处理过程相对复杂,更重要的是对不确定度来源的分析与分析者对测量过程和被测量的认识有关。另外,迄今为止,在许多测量领域仍没有广泛地使用测量不确定度,这也给测量不确定度的评定带来困难。

从另一个角度探讨不确定度的评定方法,可以将其划分成后验的和先验的两种方法,分别称为测量不确定度的A类和B类评定方法。A类评定方法是由一系列观测值计算统计方差的估计值,直接得出不确定度分量的标准不确定度,属于后验的方法,即进行实验后才能得到有关不确定度信息的方法;B类评定方法是利用有关信息,通过引用或假定的被测量或影响量的分布计算被测量或分量的标准不确定度,属于先验的方法,即在进行实验前就已知不确定度信息的方法。

A、B分类旨在指出评定方法的不同,并不意味着所评定分量之间有本质的区别,与上述的分别处理分量不确定度和由方法的特性参数等得出不确定度的方法没有任何内在的联系。同时,随机效应所导致的测量不确定度均可以使用A、B两类评定方法评定,也就是说,A、B评定方法的分类与产生不确定度的原因的分类也没有任何的联系。

针对微生物测量不确定度的评定,最早的新西兰实验室认可组织(原TELARC,现称IANZ),于1994年在国际实验室认可组织(ILAC)大会所发表的微生物测量不确定度评定(Estimation of Uncertainty of Measurement in Microbiological Analysis)范例,该范例采用A类评定方法,目前香港认可组织和台湾认可组织均采用该范例。

NMKL(2002)给出了微生物测试不同分量的分布模型,并对菌落总数测试、MPN法测试、平行样品测试、同一稀释度不同平板菌落数的差别进行了统计学分析和说明。

芬兰计量顾问委员会微生物专业组(J4/2003)主要依据不确定度的传播定律,逐项对微生物测试不确定度的各个分量进行评定,形成合成不确定度和扩展不确定度。Niemi等尽管按照化学测试的习惯对微生物测量不确定的进行了评定,但总体而言仍是参照微生物测试的经验来识别和划分不确定度分量的。

ISO/DTS 19036(2005)采用总体法对微生物测量不确定度进行评定,尽管采用了“黑匣

子”系统,把不确定度的主要分量列出,但认为测量不确定度的所有分量在整个分析过程中都已涵盖,可以通过准确度和偏差表征出来,所以主要还是采用 A 类评定方法。

最后,引用芬兰计量顾问委员会微生物专业组主席 Seppo I. Niemelä 的话:多年来,关于微生物测试结果不确定度的出版物对常规检测工作没有显著的影响,现在尝试把微生物不确定度来源的因素综合考虑并合并形成总的不确定度的时机似乎成熟了。

### 参 考 文 献

- [1] 曹志军. 测试实验室中测量不确定度评定[M]. 吉林:吉林科学技术出版社,2003.
- [2] CNLA-GG03-2000 测试结果量测不确定度评估指引
- [3] CNAL/AG06-2003 测量不确定度政策实施指南
- [4] ISO/PDTS 19036:2005 Microbiology of food and animal feeding stuffs—Guide on estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations
- [5] ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [6] ISO 5725:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, the International Organization of Standardization
- [7] Seppo Ilmari Niemela. Measurement uncertainty of microbiological viable counts. Accred Qual Assur, 2003(8):559-563
- [8] Laboratories International Accreditation. Uncertainty of Measurement, Precision and Limits of Detection in Chemical and Microbiological Testing [M]. New Zealand, 2004
- [9] EURACHEM/ EA Guide 40/10 Accreditation for Microbiological Laboratories
- [10] APLAC TC 005:2004 Interpretation and Guidance on the Estimation of Uncertainty of Measurement in Testing
- [11] EURACHEM/EA Guide 04/10:2002 Accreditation for Microbiological Laboratories

# 第十四章 结果的处理和报告

## 第一节 结果的处理

微生物检验结果的处理包括了目标微生物的读取、计算及数字修约、结果的综合判定等方面。如何正确地对测试结果进行读取、计算和判定,即如何对测试结果进行正确的处理将直接影响最终的报告,因此本节重点介绍对微生物检验结果进行处理的质量保证。

### 一、目标微生物的读取

微生物检验结果的读取按检测方法的不同,可分为菌落计数结果、MPN 值和生物化学试验、血清学试验结果的读取,又可按读取方式分为人工读取和仪器读取两种。

#### 1. 菌落计数结果的读取

菌落计数方法依据不同的方法,首先应选定适宜菌落数的平板来读取。细菌菌落总数通常推荐在菌落数为 30 cfu~300 cfu 或 25 cfu~250 cfu 的平板上计数。霉菌和酵母菌菌落计数一般选择在菌落数为 10 cfu~150 cfu 的平板上计数。在某些培养基中,若菌落数超过 100 cfu,可能会由于缺乏空间,菌落生长受到抑制发生所谓的群集现象。在这种情况下,应选择菌落数为 10 cfu~100 cfu 的平板,如结晶紫-中性红-胆盐-葡萄糖琼脂(VRBGA)作为大肠菌群计数平板时。而使用 3M 纸片法或其他快速纸片法进行菌落计数时,应根据纸片法说明选定适宜菌落数的纸片来读取。

除方法中另有说明外,培养后的平板应于终止培养时间 $\pm 2$ h 读取。培养后若所有的平板不能立即计数,可将其于 0℃~4℃保存 24h,但应尽量避免这种情况。应在充足柔和的光线下进行菌落计数。应注意避免将平板上来源于未溶解的培养基、样品或沉淀物的颗粒当成针尖大小的菌落进行计数。为了区分菌落与外来物质,如需要,可疑的区域应用放大镜或实体显微镜进行检查,物质的碎块常不如细菌规则。应对实验室的常规检测人员进行调配以避免由于眼睛疲劳而导致结果的不准确。

菌落形成单位数、稀释倍数均应记录于实验室记录中。同时应将对照物(稀释液空白、琼脂等)的无菌性测试结果记录在每种样品的结果表中。

#### 2. MPN 值结果的读取

MPN 法通常至少采用 3 个稀释度,倍数稀释和每个稀释度采用 3 管~5 管。在进行 MPN 法测试时,应建立阴阳性质控,作为对 MPN 法多管测试步骤结果判读的参照和质量控制。详细记录稀释度、多管测试步骤判读为可疑管的 MPN 值。当用 MPN 法进行微生物检验时,往往需要对多管测试步骤的可疑结果作进一步的生化鉴定。只有证实结果为阳性的管数,才是最终该样品测试的 MPN 值。根据证实的 MPN 值查 MPN 检索表,并结合所采用的稀释度,报告样品检测的 MPN 结果。

### 3. 生物化学试验的读取和对照

生物化学试验是微生物鉴定中最为常用的试验方式。其结果读取的正确与否将对微生物的鉴定产生影响,因此对生物化学试验结果的读取应加以重视。生物化学试验的结果传统方法通常是以肉眼观察和判别,因此实验人员的目光、经验的差异往往会造成检测结果的差异。为了尽可能消除这样的误差,检测过程中应建立阴阳性质控菌株对照,同时实验室应定期开展不同人员之间的目光比较,统一对生化试验结果现象的判别尺度。

由于同一种别的不同菌株及血清型之间其生物化学反应会有所差异。因此,在评价结果时要把该微生物稳定的及特征性的反应放在首位。当得出偏离的结果时,不应将被检测的微生物排除或认为无关紧要。必须首先核查实验的全过程包括试剂、培养基和培养温度等条件是否正确,有没有出现偏离,以确定该偏离是由菌株差异引起的,评价该偏离的意义。进而还应确定该微生物在试验中是否会得出不一致的反应,及这些偏离多久出现一次。

### 4. 血清学试验的读取和对照

使用血清前,均应对其进行检查,用已知阳性和阴性的细菌培养物作对照。进行凝集实验前,可将一个菌落混悬于生理盐水溶液中作为对照,不发生自然凝集的细菌才可以作血清分型。血清学试验可能发生血清学交叉反应,当用多价抗血清进行凝集试验时有假阴性反应的风险。获得最终结果前,应将血清学试验的结果始终与其他试验的结果进行比较。

### 5. 仪器结果的读取

随着科学技术的发展,微生物实验室出现了很多半自动化、自动化检测鉴定设备,如 VITEK 全自动生化测定仪、mini-VIDAS、Gene-probe、ATB、Biolog 微生物测定仪、全自动螺旋平板接种系统等。仪器读取的结果减少了人工判读的误差,但实验室人员仍应注意对仪器给出的信息进行检查,以确定仪器是否正确使用,使用的检测试剂是否有效,检测条件是否符合等。当确定仪器给出的数据无误后,在仪器报告单上签名确认。如果对仪器给出的结果表示怀疑时,应查找原因,必要时重新测试或用其他方法进行验证。实验室应定期对仪器进行校准、检查,或使用阴阳性质控菌株进行检查。

## 二、菌落计数的基本方法

### 1. 菌落计数的规则

当正确读取和记录菌落数后,需要对数据进行计算和处理。在 ISO、GB 和 SN 等标准方法中均有详细的数据处理和计算的规则,这些方法中规则略有差别,实验室采用何种方法进行检测就采用何种数据计算和处理的规则。无论采用何种计数方法,一般都遵循这样的规则:按相应标准接种后,在含有菌落数小于 300 cfu(或相应标准方法中规定的其他数字)的各培养皿中计菌落数,选择生长有适宜菌落数的平板;由重复的平板计算平均值;选择两个至三个连续的稀释度;按平板上各种可能情况的不同计算规则进行计算。

### 2. 结果的计算和数字修约

当按规则计数菌落数、平板上的菌落总数或平均数后,计算的结果乘以所用稀释度的反比,即为最终样品的结果。当计数同样的和(或)连续稀释度的菌落时,仅在将数换算成每克

或每毫升的菌落形成单位数(cfu/g 或 cfu/mL)时将该结果进行修约到两位有效数字。菌落数在 100 以内时,按其实有数报告,大于 100 时,一般采用两位有效数字。为了缩短数字后面的零数,也可以 10 的指数来表示。

(1) 一般情况计算方法

为使结果具备有效性,一般认为必须计至少一个平板里的菌落数,而且平板里至少含有 15 cfu 的菌落。

利用式(14-1)从两个连续的稀释液给计算测试样品里含的微生物数量  $N$  加权:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots(14-1)$$

式中:

- $N$ ——菌落形成单位数,cfu/g 或 cfu/mL;
- $\sum C$ ——所有从两个连续稀释液里保存的平板里所计菌落数的总和,cfu;
- $V$ ——各平板的接种体积,mL;
- $n_1$ ——保留第一稀释液的平板个数,个;
- $n_2$ ——保留第二稀释液的平板个数,个;
- $d$ ——相应于保留的第一稀释液的稀释因子。

为了计算出含两位有效数字的完美结果,如果最后一个数字比五小就舍去,大于等于五前一个数加一,依次类推直至剩两个有效数字。

作为结果的每毫升(液体产品)或每克(其他产品)所含的微生物数量用在 1.0 和 9.9 之间的数与 10 的倍数的乘积表示(科学计数法)。

例如:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1(2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-2}} = \frac{422}{0.022} = 19\ 182$$

像上面所表示的 19 000 或  $1.9 \times 10^4$  那样对结果凑整。

(2) 表面取样计算方法

利用式(14-2)计算每平方厘米的菌落形成单位(cfu)数量。表面取样通常采用棉拭子取样,因此应当注意:

- 1) 棉拭子悬浮液不是稀释物,计算时当作  $10^0$  倍稀释或零稀释(未稀释)。
- 2) 尽管整组织悬浮液是 1→10 倍稀释,为了与标记的平板一致,计算时也当作  $10^0$  倍稀释或没稀释。
- 3) 计算中输入稀释值时,把  $10^0$  稀释当作 1,  $10^1$  当作 10,  $10^2$  当作 100,依此类推。

计算方法是:

$$D = \frac{\text{菌落数 } 1 + \text{菌落数 } 2}{2} \times \frac{1}{\text{稀释倍数}} \times \frac{1}{C} \times \frac{A}{B} \dots\dots\dots(14-2)$$

式中:

- $D$ ——菌落形成单位数,cfu /cm<sup>2</sup>;
- $A$ ——棉拭子悬浮液的体积,mL;
- $C$ ——接种物的体积,mL;

$B$ ——棉拭子取样的区域面积,  $\text{cm}^2$ 。

(3) 计算方法的验证

如果使用的方法需要证明, 接种  $A$  (一般为 5, 具决定性作用) 个菌落到为计菌落数而保留的各平板中。证明后, 采用式(14-3)计算各平板里确定的微生物数量  $a$ :

$$a = \frac{b}{A} \times C \quad \dots\dots\dots(14-3)$$

式中:

$a$ ——平板确定的微生物数量, cfu;

$b$ ——遵从证明标准的菌落数, cfu;

$C$ ——统计的菌落总数, cfu;

$A$ ——接种的菌落数量, cfu。

像一般计算方法中描述的那样把菌落数化整为最接近的整数。

利用式(14-1)给计算测试样品中存在的确定微生物数量  $N$  加权, 用  $\sum a$  代替  $\sum C$ 。

例如:

液体产品的直接计数给出下列结果:

在保留的第一稀释液里 ( $10^{-3}$ ): 66 个和 80 个菌落;

在保留的第二稀释液里 ( $10^{-4}$ ): 4 个和 7 个菌落。

接种的计算:

如果  $C=66, A=8, b=6$ , 那么  $a=50$ ;

如果  $C=80, A=9, b=6$ , 那么  $a=53$ ;

如果  $C=7, A=5, b=4$ , 那么  $a=6$ ;

如果  $C=4, A=4, b=4$ , 那么  $a=4$ 。

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{50 + 53 + 6 + 4}{1(2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-3}} = \frac{113}{2.2 \times 10^{-3}} = 51\ 364$$

测试样品中找到的微生物个数为  $5.1 \times 10^4$  个/mL。

(4) 估计计数

如果测试样品(液体产品)或样液(其他产品)的两个平板含菌落数少于 15 个, 计算两个平板菌落数和的算术平均数  $y$ 。

如下表示结果:

液体产品: 每毫升所含微生物的估计值  $N_E = y$ ;

其他产品: 每克所含微生物的估计值  $N_E = y/d$ 。

其中  $d$  是样液的稀释因子。

如果测试样品(液体产品)或样液(其他产品)的两个平板没有任何菌落, 如下表示结果:

(液体产品)每毫升少于 1 个微生物;

(其他产品)每克少于  $1/d$  个微生物。

其中  $d$  是样液的稀释因子。

(5) 置信限度

为了估计结果的有效性, 必须确定样品中微生物统计分布的置信区间。

一般情况,95%的可能性,样品中微生物菌落计数的置信区间  $\delta$  用式(14-4)计算:

$$\delta = \left[ \frac{\sum C}{B} + \frac{1.92}{B} \pm \frac{1.96 \sqrt{\sum C}}{B} \right] \frac{1}{d} \dots\dots\dots(14-4)$$

当  $B=V(n_1+0.1n_2)$ , 式中:

$\sum C$ ——保留的所有平板中的菌落数的总和, cfu;

$n_1$ ——在第一稀释液中保留的平板数目, 个;

$n_2$ ——在第二稀释液中保留的平板数目, 个;

$V$ ——用到的各平板接种体积, mL;

$d$ ——与保留的第一稀释液相应的稀释因子。

例一: 极端情况(见表 14-1)

表 14-1 极端情况

统计菌落的数目		加 权	置信区间
稀释度 $n$	稀释度 $n+1$		
300	30	300	278~324
300	30		-7%~+8%
15	1	14	10~20
15	1		-29%~+43%

例二: 2. (1)中给出例子的置信区间

对于统计的 422 个菌落数  $N=1.9 \times 10^4/g$ , 置信区间  $\delta$  是:

$$\delta = \left[ \frac{422}{2.2} + \frac{1.92}{2.2} \pm \frac{1.96 \sqrt{422}}{2.2} \right] \frac{1}{10^{-2}}$$

$$\delta = (191.82 + 0.87 \pm 18.30) * 10^2$$

因此置信区间的极限是:

$$\delta_1 = 1.7 \times 10^4, \delta_2 = 2.1 \times 10^4。$$

在这种情况下, 以百分数表达, 以不全面的数据计算置信区间的极限在 -9.1%~+10.0%之间。

验证后的情况, 95%的可能性, 样品中微生物偏差的置信区间  $\delta$  可以用式(14-1)计算, 但要把  $\sum C$  改成  $\sum a$ 。

例如: 113 个保留的菌落每毫升微生物的个数  $N$  是  $5.1 \times 10^4$ , 因此:

$$\delta = \left[ \frac{113}{2.2} + \frac{1.92}{2.2} \pm \frac{1.96 \sqrt{113}}{2.2} \right] \frac{1}{10^{-3}}$$

$$\delta = (51.36 + 0.87 \pm 9.47) \times 10^3$$

既然这样, 置信区间的极限就在 -16.7%~+20.1%之间。

## (6) 自动化结果计算

当实验室采用自动化设备进行数据计算时,实验室必须保证所采用的计算软件的适用性、等效性和符合性,并保持测试数据完整性所必须的环境和操作条件。商品化的现行软件在其设计应用范围内使用,可以认为已经得到充分确认。如果实验室对软件配置进行了修改,则必须确认符合要求后使用。根据软件提供的使用说明,在自动运算后,实验室人员应对结果进行审核确认。

## 3. 菌落计数的精密度控制

菌落总数的检验是最主要的食品微生物检验项目之一,是开展最广泛的检验项目,也是少数几个定量检验的食品微生物项目,菌落总数检验包括很多方面的事项,其中菌落的计数也是该项目检验中很关键的环节。由于目前多数实验室均采用人工计数的方式,因此对实验人员菌落计数的精密度进行控制显得尤为重要,但这种控制往往被忽视。实验室应定期对菌落计数的精密度进行控制。

精密度试验方法:选择 10 个平板,每个平板具有适宜的菌落数,将平板编号,要求测试人员计数每个平板的菌落并记录结果。将平板在冰箱中过夜保存,并再给个新号,重新计数。每个测试人员都得出了两个结果( $t_1$  和  $t_2$ ),计算每个测试人员每对结果的平均数( $\bar{x}$ ), $\bar{x} = \frac{t_1 + t_2}{2}$ ,再计算相对偏差( $rd$ ), $rd = \frac{t_1 - t_2}{\bar{x}} \cdot 100\%$ 。每个测试人员每对结果相对偏差须小于 5%。分别计算所有测试人员得出的每个平板平均菌落数,每一结果均应在平均值的  $\pm 15\%$  以内。表 14-2 为菌落计数精密度控制的实例。

表 14-2 菌落计数精密度控制的实例

平板	检测人员 A				检测人员 B				$\bar{x}$	$\bar{x} \pm 18.2\%$	$\bar{x} \pm 15\%$
	$t_1$	$t_2$	$\bar{x}$	$rd$	$t_1$	$t_2$	$\bar{x}$	$rd$			
1	23	24	23.5	4.3%	26	24	25	8%	24.25	20/29	21/28
2	35	31	33	12.1%	37	36	36.5	2.7%	34.75	28/41	30/40
3	46	50	48	8.3%	41	48	44.5	15.7%	46.25	38/55	39/53
4	88	92	90	4.4%	85	81	83	4.8%	86.5	71/102	74/99
5	83	89	86	7.0%	90	87	88.5	3.4%	87.25	71/103	74/100
6	21	23	22	9.1%	26	26	26	0%	24	20/28	20/28
7	52	55	53.5	5.6%	57	53	55	7.6%	54.25	44/64	46/62
8	46	45	45.5	2.2%	50	50	50	0%	47.75	39/56	41/55
9	37	38	37.5	2.7%	37	37	37	0%	37.25	30/44	32/43
10	121	122	121	0.8%	128	118	123	8.1%	122.25	100/144	104/141

表 14-2 列出的重复性测试结果说明:

检测人员 A:按 SN 0168—1992,得到的结果中 50%的  $rd < 5\%$  (2 号、3 号、5 号、6 号和 7 号不符合要求)。

检测人员 B:按 SN 0168—1992,得到的结果中 60%的  $rd < 5\%$  (1 号、3 号、7 号和 10 号不符合要求)。

两人之间的偏差按  $\pm 15\%$  分析,结果均在此范围内,两人间的重复性测试结果符合要求。

### 三、MPN(最近似数)法

#### 1. MPN 指数

MPN 法可按两种方式进行:(1)用一个稀释度;(2)用几个连续的稀释度。当预计菌密度最低和最高之间的关系为明显地小于 100 和预计的菌密度非常低时,如检验消毒过的水样,可采用一次稀释。其他情况下该方法需要几个稀释度。在一个稀释度方法中,细菌的密度可按照式(14-5)进行估计。

$$Y = \frac{2.303}{V} \times 10g \times \frac{n}{q} \dots\dots\dots(14-5)$$

式中:

$Y$ ——细菌的密度,MPN/mL;

$V$ ——样品体积,mL;

$n$ ——该稀释系列中管的总数;

$q$ ——培养后无菌生长的管数。

结果序列稀释度的选择,MPN 法通常至少采用 3 个稀释度,对数稀释和每个稀释度采用 3 管~5 管。用  $>3$  个稀释度的方法时,按以下规则选择稀释度。

规则 1:一个稀释度的所有管中至少有一个为阳性结果。

选择所有的管中得出一个阳性结果的最高稀释度,即最低的样品浓度,加上下面两个稀释度(见表 14-3 的例 1),若“下面最高”稀释度不能满足这些,该系列则选用 3 个最高稀释度,即 3 个最低的样品浓度(见表 14-3 的例 2)。也可见规则 3 和规则 4。

规则 2:要有一个所有的管中没有有一个阳性结果的稀释度。如规则 1 不适用,选择三个最高稀释度,即最低的样品浓度(表 14-3 的例 3),也可见规则 3。

规则 3:按照规则 1 或规则 2,如所选择的三个稀释度序列中有一个以上的稀释度未得到出阳性管,则选择这些阴性管中的最低稀释度,即最高的样品浓度及下两个最低稀释度(见表 14-3 的例 4 和例 5)。若阳性管仅在第一个稀释度中出现,则选择前三个稀释度计算 MPN 值。即使该序列已包括了有阴性管的两个稀释度。

规则 4:按照规则 1~3,除所选择的稀释度外,较高的稀释度,即较低的样品浓度,均有得出阳性结果的管,则将这样的管数加到所选择的最低稀释度得出的管数中(见表 14-3 的例 6)。

表 14-3 MPN 指数测定的实例:3 管 MPN 序列中阳性管数(1 mL 样品/管)

例	样品量/g					结果序列	MPN 估计数/g
	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001		
1	3	3*	2*	1*	0	321	$1.5 \times 10^3$
2	3	3*	3*	0*		330	$2.4 \times 10^3$
3	3	2	1*	1*	0*	110	$7.4 \times 10^2$
4	3*	3*	0*	0		330	$2.4 \times 10^2$
5	2	2*	1*	0*	0	210	$1.5 \times 10^2$
6	3	3*	2*	1*	1	322	$2.1 \times 10^3$

\* 为按规则选择的结果序列。

### 2. MPN 结果的计算

根据序列结果从 MPN 表(见附录 7)中得出 MPN 值,若样品的原始数与表中的不同,可按式(14-6)计算最终结果。

$$C_s = N \times \frac{F}{V} \times V_s \quad \dots\dots\dots(14-6)$$

式中:

- $C_s$ ——样品量  $V_s$  中最大可能的细菌密度;
- $N$ ——表中基础样品量  $V$  的 MPN 值,MPN/g 或 MPN/mL;
- $F$ ——该样品与表的稀释度之间的稀释系数;
- $V$ ——样品量,g 或 mL;
- $V_s$ ——得出细菌密度的样品量,g 或 mL。

### 3. MPN 指数概率的控制

附录 3 中列出的 MPN 结果可分为四类,95%的报告结果归为 1 类,4%归为 2 类,0.9%归为 3 类,0.1%归为 0 类。该表显示出每个单独结果所归属的类别。MPN 结果的概率可用下列方法进行检验,将共计 100 个 MPN 结果或  $n \times 100$  个 MPN 结果分成 1 类、2 类、3 类和 0 类,将该分布情况与 95%、4%、0.9%和 0.1%的理论分布进行比较。若理论与观察到的分布有很大差异,必须再检验另 100 个结果,并须特别注意该方法的实际操作。观察到的与理论分布之间仍有差异,应对该方法的实际操作进行彻底调查。类别说明如下:

- 1 类:样品中的细菌数与 MPN 值相同时,那么该结果为最近似的。在最大为 5%的概率下所得结果的概率比这类最小的近似结果小。
- 2 类:样品中的细菌数与 MPN 值相同时,那么该结果达到了一个比 1 类最小近似结果小的概率。在最大为 1%概率的限度内所得结果的概率比这类最小近似结果小。
- 3 类:样品中的细菌数与 MPN 值相同时,那么该结果达到了一个比 2 类最小近似结果小的概率。可是在最大为 0.1%概率的限度内所得结果的概率比这类最小近似结果小。
- 0 类:样品中的细菌数与 MPN 值相同时,那么该结果达到了一个比 3 类最小近似结果

小的概率。然而在最大为 0.1% 概率的限度内得到属于这类的结果不是由于测试操作中的误差造成的。

测试开始前,必须决定认为可以接受的类别。如:仅为 1 类,1 类和 2 类,或 1 类、2 类和 3 类。当结果的可靠性重要时,仅 1 类或最多 1 类和 2 类的结果认为可接受。属于 0 类的结果应当看作最终保留。

#### 四、微生物鉴定结果的判定

微生物的鉴定通常需要结合各项生物化学测试、血清学试验或毒性试验等结果进行综合的判定。在实际检测中,有时会出现生化反应现象不典型,不易判别,或者在生化谱中有某些个别的生化反应与阳性质控菌株的典型反应不一致的情况。此时应对结果进行分析,核查试验材料的有效性、试验操作是否存在误差、试验条件是否符合等因素外,还应注意用于鉴定的分离菌株是否新鲜无杂菌,必要时再次分离后进行鉴定。由于同一种别的不同菌株及血清型之间其生物化学反应会有所差异。因此,也可能出现某些生化反应与典型反应不一致的情况。在评价这样的结果时,要把该微生物稳定的及特征性的反应放在首位,或补充进行其他生化试验,结合补充试验结果或结合血清学试验、毒性试验等其他试验的结果进行综合的判定。

##### 1. 传统生物法鉴定结果的判定

目前标准方法中的传统生物学鉴定试验中,涉及的生化试验项目通常以典型反应项目为主,其生化谱不完全,实验室多采用商品化的生化微量管或者自配培养基进行试验,通过各项生化反应的结果来综合判定微生物种属。这种方法在实际检测中,往往会出现可疑菌的部分生化反应与典型反应不一致的情况,这为判定带来了困难。这就需要实验室在对结果分析的基础上进行重新或补充测试。传统生物法鉴定对人员的经验要求较高,实验全过程须带阴性阳性质控菌株进行对照。

##### 2. 自动化鉴定仪器和商品化检测试剂条或装置检测结果的判定

目前,已有很多自动化鉴定仪器、商品化检测试剂条或装置为微生物检验鉴定带来了便利。在使用这些自动化鉴定仪器、商品化检测试剂条或装置时,应注意其产品的质量保证情况,特别应关注产品是否通过相关的认证,其适用范围和领域怎样,对仪器结果如何使用等问题。在目前的检测标准方法体系中只有较少的一部分标准方法提及自动化检测鉴定设备和检测试剂条或装置的应用,为了保证检测结果的可靠性、合法性,实验室应在采用自动化仪器和检测试剂条前,做好有关技术指标的验证,以确保仪器、检测试剂条或装置的性能和测试结果满足检测的需求。

自动化筛选类设备、试剂条或装置,如:VIDAS 荧光免疫分析仪筛选、PCR 检测、部分致病菌(沙门氏菌、O157:H7 等)快速筛检试剂盒等,其阴性结果可出具报告,筛选阳性结果需用其他方法进一步鉴定。

自动化鉴定类设备、鉴定试剂条或装置,如 VITEK 自动鉴定系统、API 系统等,需注意鉴定系统给出的结论中是否有其他附加信息或提示,需确认是好的鉴定结果后,其鉴定结果可作为最终结论。

## 第二节 结果的报告

报告是实验室的最终产品,报告的质量直接影响客户对报告的理解和使用,因此除了做好检测过程的质量控制和保证外,也应重视对结果报告的质量保证工作。

### 一、报告的文本要求

ISO/IEC 17025:2005 中要求实验室应准确、清晰、明确和客观地报告每一项检测。因此应保证报告的准确性、客观性、完整性,报告内容用语准确清晰。报告至少包括以下内容:实验室的名称和地址,委托人的姓名,样品描述(包括样品名称、状态等信息),使用的检测方法,样品接收及进行检测的日期,检测结果,负责检测人员的签字、报告的日期,声明该结果仅对检测样品的作用。报告的文本和格式的设计除了遵循 ISO/IEC 17025:2005 的规定,设计的格式须满足所进行的微生物检验领域的要求,按使客户易懂的方式,并应尽量降低被误解或误用的可能性进行设计。在报告的编排和数据表达应便于客户理解,尽量标准化。报告可以以纸质或其他多媒体的形式保存。

### 二、检验结果的表示

在微生物检验结果的表示中,菌落计数、MPN 值和定性结果表示方式不同。在结果表示中首先应注意对单位或方法的特殊表示意思,其次是对数字的表示方法。

#### 1. 菌落计数结果表示

通常用菌落形成单位(colony forming unit, cfu)表示菌落计数结果,如:“cfu/g”(一般是固体样品)、“cfu/mL”(一般是液体样品)、“cfu/cm<sup>2</sup>”(表面积取样法时)和“cfu/双”(如加工人员的手)等,也有用“个/g”、“个/mL”表示。菌落计数数字的表示方法,一般用两位有效数字,为了缩短数字后面的零数,也可以 10 的指数来表示。例:“85 cfu/g”、“ $1.6 \times 10^3$  cfu/mL”或“ $2.4E+4$  cfu/g”等是常见的表示方式。

#### 2. MPN 值结果表示

有一些细菌检测结果用最近似数(most probable number, MPN)表示,如:“MPN/g”、“MPN/mL”、“MPN/100g”和“MPN/100mL”等。数值通常从 MPN 表中查得,不必进行数字的处理和计算。

#### 3. 定性检测结果的表示

在微生物检验中,一种常见的结果表示方式是对定性检测结果的报告。如:“阴性或阳性”、“检出或未检出”。在定性结果表示时有时会标注取样量,如“阴性或阳性/25g”、“阴性或阳性/100g”等。

### 三、检测结果的评定

#### 1. 微生物学指标值

不同的国家和地区,不同的食品限量值是不同的。在报告结果时,有时需要对检测结果进行评估和判定,这就涉及到使用不同类别的限量值,如标准、指标和规定。官方食品管理在微生物学测试结果的评价中,常需要使用指标值,当按照一定的方法进行测试时,微生物学的指标值是个象征性的值,它说明微生物学的质量必须好到什么程度、不能差到什么程度。根据指标值检测的食品可按质量进行分类,如何接受,有条件地接受或不合格。当实验室需要在报告中显示此类信息或进行结果的判定时,应注意评估所采用的限量值是否适用,是否是现行有效的,是否是法律法规规定的,其适用范围是否恰当等问题。

#### 2. 检测结果的评定

根据微生物学指标值或限量值对检测结果进行判定,还应考虑抽样方法,以及评定的范围,是对某一样品进行评定,还是对整批产品进行评定。事实上我国的采样方法为二级法,对取某一个样品来说,如果检测致病菌,则只有合格和不合格两种,相当于 $n=1, c=0, m=$ 未检出;如果检测定量指标如菌落总数、大肠菌群等,则也只有合格和不合格两种,相当于 $n=1, c=0, m=$ 限量值。

国际食品微生物标准委员会(The International Committee on Microbiological Specification for Food, ICMSF)制定的食品微生物学分析采样方法,对微生物学检测结果的评定方式目前已在国内外逐步推广采用。ICMSF方法是从统计学角度,依据一批产品检查多少个检样才能够有代表性,才能客观地反映该批产品的质量的原则,其抽样方法包括二级法和三级法。二级法只设有 $n, c$ 及 $m$ 值,三级法则有 $n, c, m$ 及 $M$ 值。

二级法:只设定合格判定标准 $m$ 值,超过 $m$ 值的,则为不合格。

三级法:设有微生物标准值 $m$ 和 $M$ 值,超过 $m$ 值的检样,即为该检样不合格。所有检样均小于 $m$ 值,即为合格。在 $m$ 值到 $M$ 值范围内的检验数,在 $c$ 值范围内,即为附加条件合格,否则为不合格。有检样超过 $M$ 值,则为不合格。

### 四、报告的管理和控制

当报告拟制完成后,实验室应对报告进行审核,并由具有资质的人员签发。签发后的报告应尽快发放给客户或委托人。无论何种形式的报告在发放的过程中都应注意保密性。

报告应有唯一性标志,如果报告中包含分包方的测试结果,则这些结果须清晰的标明。当需要对已发放的报告作实质性修改时,应以追加文件或资料调换的形式,并包括如下声明:“对检测报告的补充,系列号……(或其他标志)”或其他等同的文字形式。这些修改均应满足实验室关于质量保证方面的要求。当有必要发布一份全新的报告时,应以唯一性标志,并注明所替代的原件。实验室通常应对报告的保存期限作出规定,报告应按文件管理的要求妥当保存。

### 参 考 文 献

- [1] 北欧食品分析委员(NMKL). 微生物学实验室质量保证准则[M]. 2版. 1994.
- [2] ISO 7218:1996 食品和动物饲料的微生物学——微生物检测的一般规则
- [3] 李志勇. 国内外的食品微生物检验[J]. 检验检疫科学, 2004, 14(6):53-56.
- [4] ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

# 第十五章 移动微生物实验室的质量控制

移动微生物实验室可直接接近样品源,无需样品的中途运输,具有移动灵活、快速反应、安全可靠等特点,便于食品微生物的实时监测和控制。

移动微生物实验室通常是独立于固定的微生物实验室的操作实体,其检测项目可同于固定实验室,也可另有所求。其质量控制方面同样需要符合 ISO/IEC 17025 的要求。

移动微生物实验室质量保证和质量控制的计划应包括如下部分:

## 一、移动微生物实验室的介绍

该部分应包括实验室的总体介绍和其承担的检测项目的种类。

1. 移动实验室的任务声明,即对其检测任务的说明;
2. 移动实验室的质量保证方针;
3. 实验室的规模:
  - (1) 面积大小和工作量;
  - (2) 主要设备清单。
4. 检验术语的定义;
5. 实验室的相关证书。

## 二、移动微生物实验室的组织和职责

该部分应列出实验室的关键人员(参见第四章)。

1. 组织结构图(包括移动实验室及其所属的机构);
2. 移动实验室的各个工作岗位;
3. 移动实验室内关键岗位的简要描述。

## 三、样品的保管

该部分应详细描述从样品接收直至检毕处理的全过程(适当的时候可引用“标准操作程序”)(参见第八章)。

1. 样品接收方面的规定;
2. 样品登记与有关信息的输入;
3. 样品传输的要求;
4. 样品接收状态要求;
5. 实验室内样品的保存、保护和污染控制;
6. 对政府要求的样品需要有文件化说明;
7. 样品的处理。

#### 四、校准过程和校准频次

该部分应描述实验室设备与仪器(包括天平)的校准要求。适当的时候可引用“标准操作程序”。移动实验室涉及的所有检测项目均应于注意(参见第九章)。

1. 所有设备校准的频次:
  - (1) 校准曲线设立应该是 3 点到 5 点,不包括方法的空白点;
  - (2) 校准曲线的类型。
2. 可接受的校准标准。
3. 校准证书和更新:
  - (1) 延续“校准证书”标准;
  - (2) 延续校准空白(对连续的分析有频次要求);
  - (3) 校准曲线更新频次。
4. 设备校准的记录。
5. 标准物质的保存、使用和处理:
  - (1) 有效期;
  - (2) 纯度和验证试验;
  - (3) 接受和溯源记录;
  - (4) 废弃标准品的处理。

#### 五、内部质量控制和检查

移动实验室应该详细描述室内所有质量保证(质量控制)的行动的细节。建议采用流程图的方式显示从样品接收到签发报告的全过程。质量保证(质量控制)的关系。以下所列与内部质量管理有关的一些要素,并不能包括全部的质量保证(质量控制)行动(参见第十二章)。

1. 培养基、试剂的制备和储存;
2. 检测器具的清洗与灭菌;
3. 检测的本底(移动实验室的仪器、场地、试剂、设备和冰箱等);
4. 重复性监测;
5. 再现性监测。

保持测定的可靠性和精密度,若超过限值应采取纠偏措施。内部质量控制的具体方法有:

- 1) 双试验检测用于定量测定;
- 2) 阳性对照法用于定性测定;
- 3) 操作者之间的比对;
- 4) 盲样测试。

#### 六、测试数据的取得、确认和报告

该部分应详细描述移动微生物实验室内检测数据取得并确认的过程,过程中所有涉及

的“标准操作规程”均应作为参考。建议由实验室以外的分析人员对过程进行评价,包括原始数据到最终报告。

1. 分析方法的选择(参见第十一章)。
2. 稀释和培养的要求(参见第八章)。
3. 生化试验、血清学试验及其他试验的读取和对照(标准样品及空白对照的应用)(参见第十四章)。
4. 测试的证实:
  - (1) 定性试验的证实;
  - (2) 定量试验的证实。
5. 定量数据读取和计算(包括双试验的应用)(参见第十四章):
  - (1) 计数的方法;
  - (2) MPN(最大近似值)的方法。
6. 测试结果的评价,应考虑:
  - (1) 样品的资料;
  - (2) 抽样对结果可靠性的影响;
  - (3) 测试的时间;
  - (4) 食品中微生物的限量。
7. 数据报告的格式与内容要求(参见第六章)。

## 七、运转情况及审核

移动微生物实验室应有内部审核的制度以证实质量保证/质量控制计划被执行。该审核应包括样品接收的文件、样品登记、样品保存、保管的过程、样品的检测和处理、设备使用记录等(参见第二章)。

## 八、评估数据质量和决定报告限值的常规程序

移动微生物实验室用于评定数据的过程应予以评注(参见第十二章),如:

1. 数据的精确度;
2. 数据的准确度;
3. 样品的代表性;
4. 检测报告的限值:
  - (1) 设备的检测限值;
  - (2) 方法的检测限值;
  - (3) 操作者的检测限值。

注:对方法的检测水平的研究应先于样品检测的进行。

## 九、预防措施和纠偏措施

该部分应描述移动微生物实验室的预防措施,如为减少设备受损而要求的常规维护等

(参见第二章)。

该部分应描述移动微生物实验室的纠偏措施,包括仪器设备的纠偏和检测过程的纠偏,实验室应列出与纠偏措施相关的问题。所有纠偏行动应予以记录(参见第二章)。

## 十、管理评审质量保证报告

若移动微生物实验室是长期计划的,实验室应向上属机构定期提交质量保证报告(参见第二章)。报告应包括:

1. 质量保证(质量控制)计划的任何改动;
2. 任何“标准操作规程”的任何改动;
3. 任何严重的质量保证(质量控制)问题和推荐的解决方案;
4. 纠偏行动的结果;
5. 接收、保存状态有问题的样品;
6. 对检测有影响的人员及管理变化;
7. 其他任何可能影响测试的问题。

## 十一、文件保存

该部分应规定移动微生物实验室短期或长期保存文件的方法及方式(参见第六章)。

## 十二、移动微生物实验室的安全措施

移动微生物实验室有责任采取适当的安全防护措施、使微生物或其毒素引起的疾病的危险减至最低(参见第七章)。应考虑:

1. 通知和指示(警示标志);
2. 工作区域和设备的安全和密闭;
3. 消除污染的措施和废弃物的处理。

## 附录 1

# 分包协议书

甲方：××××单位(以下简称甲方)

乙方：××××单位(以下简称乙方)

为进一步加强出入境检验检疫工作,促进对外贸易的发展,根据有关法律法规和国家质检总局以及省局的规定,经双方协商,委托乙方按照甲方的要求,从事有关检验检疫的具体检测工作。

为了保证委托检验检疫工作以及检测结果的及时、准确、公正、公平,经双方协调,达成如下协议:

### 一、甲方的责任和义务

1. 根据国内外的有关法规和技术要求以及相关的标准,结合进出境提供的报检单、提单、发票等有关单证,及时、准确的给乙方下达委托检验工作联系单。

2. 根据委托检验工作的实际情况,参与乙方的质量和技术管理。对乙方的检测人员进行技术指导、业务培训和监督管理。

3. 制定监管计划,对乙方的检验过程,实施定期的考核与抽查。审核乙方出具的检测报告。及时与乙方沟通联络,保证检测结果的准确和有效。

4. 按时统计乙方实际完成的委托检测数量,按双方商定的比例(甲方:××%,乙方:××%),自甲方实际收取的该部分检测费用中向乙方划拨。

5. 根据有关规定和检验工作的需要,甲方有权提出终止本协议的执行。

### 二、乙方的责任和义务

1. 建立满足甲方要求的质量保证体系,配备满足甲方要求的检测仪器和设备以及相应的工作环境,具有满足甲方要求的检测人员的相应数量和资格。

2. 严格按照有关规定和程序,进行检验工作,按照规定的检测周期,及时、准确的出具检测报告,并承担相应的法律责任。

3. 对甲方提供的有关资料及样品的检测数据、检测报告有保密的义务。未经甲方同意,不得向任何部门和人员提供。

4. 在本协议有效期内,进一步加强实验室的内部管理,确保其质量管理体系有效运行,确保检测结果准确可靠。并按照甲方档案管理的有关要求保存完整的检测原始记录和相关检测报告,保存期不少于3年。

5. 服从甲方的监督管理,接受甲方的业务指导和培训。

### 三、其他事宜

1. 本协议有效期自 年 月 日至 年 月 日止。
2. 本协议未尽事宜由双方本着互谅、互利的原则,协商解决。
3. 本协议一经签字盖章,即可生效。

甲方:××××单位

代表签字:(盖章)

年 月 日

乙方:××××单位

代表签字:(盖章)

年 月 日

## 附录 2

# 食品及食品加工环境样品大肠杆菌和 大肠菌群 COLI ID 计数法

### 1 范围

本方法规定了大肠杆菌和大肠菌群的 COLI ID 计数法。

本方法适用于食品及食品加工环境样品大肠杆菌和大肠菌群的计数,其他产品可参考执行本方法。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本方法的引用而成为本方法的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本方法,然而,鼓励根据本方法达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本方法。IEC 和 ISO 成员保留目前有效的国际标准的注册。

GB/T 4789.28 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

SN 0330 出口食品中微生物检测通则

SN 0167 出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法

ISO 17604 Microbiology of food and animal feeding stuffs—Carcass sampling for microbiological analysis

ISO 18593 Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs

### 3 原理

COLI ID 培养基是法国生物梅里埃(bioMérieux)公司生产的一种显色培养基商品,该培养基含有 SalmonGlu 和 XGAL。大肠菌群具有特异性的半乳糖苷酶,而大肠菌群中的大肠杆菌有特异性的葡糖醛酸糖苷酶。大肠杆菌在该培养基上为红色,大肠菌群在该培养基上蓝色菌落。

### 4 材料与设备

4.1 拍击器及无菌蠕动袋。

4.2 灭菌吸管:1 mL、5 mL、10 mL。

4.3 移液器:0.5  $\mu$ L~10  $\mu$ L、10  $\mu$ L~100  $\mu$ L、100  $\mu$ L~1 000  $\mu$ L。

4.4 培养箱:36℃±1℃。

4.5 pH计。

4.6 拭子。

4.7 水浴锅。

4.8 试管。

## 5 培养基和试剂

5.1 缓冲蛋白胨水(见 GB/T 4789.28—2003)。

5.2 COLI ID 培养基:法国生物梅里埃(bioMérieux)公司。

## 6 操作过程

### 6.1 样品采集

#### 6.1.1 产品样品的采取

按照 SN 0330 进行。

#### 6.1.2 整禽(鸡、鸭、火鸡等)胴体的冲洗取样

以无菌的方式,从胴体上除去多余的水分并将胴体转移到无菌蠕动袋中。向已放入蠕动袋的鸡体腔中倒入 400 mL(或检测程序要求的其他体积)无菌缓冲蛋白胨水。从袋子外边,用一只手握住禽胴体,同时用另一只手握紧袋子的顶部。摇振放有禽肉胴体的袋子,频率每分钟大约 35 次,幅度为 45.72 cm~60.96 cm 的弧度,以确保胴体内外的表面都能被洗到。从放有禽肉胴体的袋子中无菌转移样品淋洗液到已消毒的容器内进行菌落总数分析。

#### 6.1.3 畜(猪、牛、羊等)胴体的取样(参照 ISO 17604:2003)

##### 6.1.3.1 擦拭取样法

在盛装 10 mL 无菌缓冲蛋白胨水的容器或样品袋中浸湿拭子,在其内壁沥去多余无菌缓冲蛋白胨水。选择取样位点[猪胴体的取样位点为后蹄、后大腿股外侧、腹部(猪肚)外侧、背部外侧和腹部(猪肚)内侧,牛胴体的取样位点为牛颈下垂肉外侧、前胸肋部外侧、后腹部外侧、后大腿股外侧和腹股沟内侧,羊的取样位点为后腹部外侧、腹部外侧、后腿分叉处和胸部外侧],在 10 cm×10 cm 的面积内纵向和横向各擦拭 10 次,然后将拭子折断,放回盛装 10 mL 无菌缓冲蛋白胨水容器或样品袋中,加入无菌缓冲蛋白胨水至 25 mL。整个过程必须无菌操作。

##### 6.1.3.2 挖取法

选择取样位点[猪胴体的取样位点为后蹄、后大腿股外侧、腹部(猪肚)外侧、背部外侧和腹部(猪肚)内侧,牛胴体的取样位点为牛颈下垂肉外侧、前胸肋部外侧、后腹部外侧、后大腿股外侧和腹股沟内侧,羊的取样位点为后腹部外侧、腹部外侧、后腿分叉处和胸部外侧],用无菌刀挖取 10 cm<sup>2</sup>、20 cm<sup>2</sup> 或 25 cm<sup>2</sup> 约 2 mm 厚的肉,放入样品袋中。整个过程必须无菌操作。

#### 6.1.4 食品加工台面、机械表面和食品包装材料表面擦拭取样(参考 ISO 18593:2004)

对于使用消毒剂消毒过的食品加工台面、机械表面和食品包装表面,在盛装 10 mL 无菌

D/E 中和肉汤的容器或样品袋中浸湿拭子,在其内壁沥去多余 D/E 中和肉汤,在  $20\text{ cm}^2 \sim 100\text{ cm}^2$  的面积内纵向和横向至少各擦拭 10 次,然后将拭子折断,放回盛装 10 mL 无菌 D/E 中和肉汤的容器或样品袋中。

对于没有使用消毒剂消毒过的食品加工台面、机械表面和食品包装表面,可以使用缓冲蛋白胨水作为稀释剂。

#### 6.1.5 食品加工用水取样

根据不同食品加工类型,确定取样位点,每个位点取 50 mL 食品加工用水。整个过程必须无菌操作。

#### 6.2 样品的标记、保存和运送

按照 SN 0330 进行。

#### 6.3 样品制备

##### 6.3.1 食品样品和胴体挖取样品的制备

6.3.1.1 固体或半固体食品:以无菌操作取 25 g 样品,放入装有一定量缓冲蛋白胨水的样品袋内,拍击蠕动大约 2 min,制成 1+10 的样品匀液。

6.3.1.2 干燥或干粉食品以无菌操作取 25 g 样品,放入装有一定量缓冲蛋白胨水的样品袋中,拍击蠕动大约 2 min,制成 1+10 的样品匀液。

6.3.1.3 液体食品:用灭菌吸管吸取 25 mL 样品,放入装有一定量缓冲蛋白胨水的样品袋中,拍击蠕动大约 2 min,制成 1+10 的样品匀液。

##### 6.3.2 整禽(鸡、鸭、火鸡等)胴体冲洗液样品的制备

拭子悬浮液不是稀释物,计算时当作  $10^0$  倍稀释或零稀释(未稀释)。用灭菌吸管吸取 25 mL 冲洗液样品,放入装有 225 mL 缓冲蛋白胨水的样品袋中,拍击蠕动大约 2 min,制成 1+10 的样品匀液。

##### 6.3.3 胴体和食品加工表面拭子样品的制备

拭子悬浮液不是稀释物,计算时当作  $10^0$  倍稀释或零稀释(未稀释)。将装有拭子样品和缓冲蛋白胨水的样品袋中,拍击蠕动大约 2 min;如果拭子样品和缓冲蛋白胨水装在容器中,应加入适量的无菌玻璃珠,充分搅拌混合。

##### 6.3.4 食品加工用水样品的制备

一般直接吸取适量水样,进行试验,不必特殊处理。

#### 6.4 样品稀释

使用缓冲蛋白胨水,将以上样品匀液制成 10 倍递增稀释的样品液,如  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ ……

### 7 接种与培养

#### 7.1 准备 COLI ID 培养基

松开 COLI ID 培养基瓶盖,放在  $100^\circ\text{C}$  水浴中直至完全溶解,然后置于  $45^\circ\text{C} \sim 47^\circ\text{C}$  水浴锅中保温。

## 7.2 倾注培养基和培养

7.2.1 选取适宜的3个连续稀释度的样品液,每个稀释度接种两个灭菌平皿,每皿1 mL。另取1 mL 稀释剂加入一个灭菌平皿中,作空白对照。

注:在严格风险分析的基础上,可选取适宜的1个~2个连续稀释度的样品液进行试验。

7.2.2 倾注10 mL~15 mL 45℃~47℃ COLI ID 培养基至每个平皿中,小心旋转平皿,将培养基与样液充分混匀。

7.2.3 待其凝固后,再加入大约3 mL~4 mL 45℃~47℃ COLI ID 培养基覆盖平板表层。

7.2.4 翻转平板,37℃培养18 h~24 h,如有需要可延长24 h。

## 8 判读

### 8.1 读取和计数

到培养时间后,从培养箱拿出平板,察看平板上的菌落,大肠杆菌菌落呈玫瑰红色,大小在0.5 mm~2.0 mm之间,其他大肠菌群菌落呈蓝色,大小在0.5 mm~2.0 mm。

读取和计算每个稀释度平板上的大肠杆菌菌落数量和总大肠菌群菌落数量。每个稀释度平板上总大肠菌群菌落数量等于大肠杆菌菌落数量和其他大肠菌群菌落数量之和。

### 8.2 计算样品中大肠杆菌和总大肠菌群数的简单计算方法

#### 8.2.1 表面拭子样品

当平板上的大肠杆菌数量( $x$ )或总大肠菌群数量( $x$ )不高于150个,且其中至少有一个平板大肠杆菌数量或总大肠菌群数量不少于15个时,按式(1)进行计算。

$$x = \frac{\text{菌落数}_1 + \text{菌落数}_2}{2} \times \text{稀释倍数} \times \frac{1}{1 \text{ mL}} \times \frac{\text{初始悬浮液体积}}{\text{擦拭面积}} \dots\dots(1)$$

其中 $x$ 的单位为cfu/cm<sup>2</sup>,擦拭面积的单位为cm<sup>2</sup>。如果接种所有(3个)稀释样品的平板上大肠杆菌数量或总大肠菌群数量均少于15个时,仍按式(1)计算。

如果平板上的大肠杆菌数量或总大肠菌群数量高于150个时,按式(1)计算,在结果旁加“\*”号表示估计值或视情况重新选择较高的稀释倍数进行测定。

如果接种未稀释样品和所有稀释样品的平板上,大肠杆菌数量或总大肠菌群数量均少于15个时,报告结果为:每平方厘米样品少于15个大肠杆菌或总大肠菌群数量。

如果接种未稀释样品和所有稀释样品的平板上,均未发现大肠杆菌数量或总大肠菌群数量时,报告结果为:每平方厘米样品少于1个大肠杆菌数或总大肠菌群数量。

#### 8.2.2 食品固体样品(包括牲畜胴体表面挖取样品)和液体样品(包括整禽胴体冲洗液和食品加工用水)

当稀释度平板上的大肠杆菌数量或总大肠菌群数量不高于150个,且其中至少有一个平板大肠杆菌数量或总大肠菌群数量不少于15个时,按式(2)进行计算。

$$x = \frac{\text{菌落数}_1 + \text{菌落数}_2}{2} \times \text{稀释倍数} \times \frac{1}{1 \text{ mL}} \times \frac{250 \text{ mL}}{25 \text{ g 或 } 25 \text{ mL}} \dots\dots(2)$$

其中 $x$ 的单位为cfu/g或cfu/mL。如果接种所有(3个)稀释样品的平板上大肠杆菌数量或总大肠菌群数量均少于15个时,仍按式(2)计算,但应在所得结果旁加“\*”号,表示为

估计值。

如果平板上的大肠杆菌数量或总大肠菌群数量高于150个时,按式(2)计算,在结果旁加“\*”号表示估计值或视情况重新选择较高的稀释倍数进行测定。

如果接种未稀释样品和所有稀释样品的平板上,大肠杆菌数量或总大肠菌群数量均少于15个时,报告结果为:每毫升(克)样品少于15个大肠杆菌或总大肠菌群数量。

如果接种未稀释样品和所有稀释样品的平板上,均未发现大肠杆菌数量或总大肠菌群数量时,报告结果为:每毫升(克)样品中大肠杆菌数或总大肠菌群数量小于1个。

### 8.3 结果报告

根据COLI ID培养基上的菌落数和稀释倍数,计算和报告每毫升、每克或平方厘米样品中的大肠杆菌或大肠菌群。

对于固体样品(包括牲畜胴体表面挖取样品),结果记为: $\times\times\times$  cfu/g;如果是估算值,则结果记为: $\times\times\times$  \* cfu/g。

对于液体样品(包括整禽胴体冲洗液和食品加工用水),结果记为: $\times\times\times$  cfu/mL;如果是估算值,则结果记为: $\times\times\times$  \* cfu/mL。

对于表面擦拭样品,结果记为: $\times\times\times$  cfu/cm<sup>2</sup>;如果是估算值,则结果记为: $\times\times\times$  \* cfu/cm<sup>2</sup>。

××××××××(单位名称)实验室  
The Laboratory of ×××××××

# 标准操作程序

Standard Operation Procedure

## 沙门氏菌的检测方法

(等同采用 ISO 6579:2002, Microbiology of Food and Animal Feeding stuffs  
—Horizontal Method for the Detection of *Samonella* spp. ,Second Edition)

### Method for detection of *Salmonella* spp.

(IDT ISO 6579:2002, Microbiology of Food and Animal Feeding stuffs  
—Horizontal Method for the Detection of *Samonella* spp. , Second Edition)

编写人(签名/盖章)		时间	年 月 日
审核人(签名/盖章)		时间	年 月 日
批准人(签名/盖章)		时间	年 月 日
文件编号		受控状态	
修订号		发放序号	

## 1 目的

沙门氏菌是最常见的食源性细菌病原体。年幼儿童、虚弱者、年长老人、免疫缺陷者等最易被其感染。污染源主要是人和家畜的粪便,沙门氏菌常存在于动物中,特别是禽类和猪,从水、土壤、昆虫、工厂和厨房设施的表面以及动物粪便中已发现该类细菌。生肉、禽、奶制品、蛋、鱼、虾、田鸡腿、酵母、椰子、酱油、沙拉调料、蛋糕粉、奶油夹心甜点、顶端配料、干明胶、花生露、橙汁、可可和巧克力可被沙门氏菌污染。

我国现行检测沙门氏菌的标准主要为 SN 0172—1992《出口食品中沙门氏菌属(包括亚利桑那菌)检验方法》和 GB/T 4789.4—2003《食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验》,但以上方法与 ISO 6579—2002(Microbiology of Food and Animal Feeding stuffs—Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp., Second Edition)在样品制备、目标菌的分离鉴定等方面存在一定区别,为完善食品微生物检验实验室的检测方法体系,满足客户的特殊检测要求,特制定本 SOP。

## 2 范围

本 SOP 详述了沙门氏菌的基准方法(其检测程序见附图 A.1),包括伤寒沙门氏菌和副伤寒沙门氏菌,适用于供人类消费或动物饲养所使用的产品和在食物生产和处理范围内的环境样品。

所有承担食品致病性微生物检验的人员必须能够按照本 SOP 进行供人类消费或动物饲养所使用的产品和在食物生产和在食物生产和处理范围内的环境样品中沙门氏菌的检测工作。

## 3 原理

沙门氏菌可能少量存在,经常伴随着相当数量的其他肠杆菌属或其他菌属。因此,选择性增菌是必需的;此外,为尽可能地检测到受伤沙门氏菌,经常需要进行前增菌。

### 3.1 前增菌——非选择性液体培养基

将试验部分接种于缓冲蛋白胨水,在  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养  $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。

对于某些食品,则需利用其他的前增菌程序。

数量比较庞大时,在接种测试样品前应将缓冲蛋白胨水加热到  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

### 3.2 增菌——选择性液体培养基

将 3.1 得到的培养物接种到 RVS 肉汤和 MKTTn 肉汤。

RVS 肉汤在  $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  孵育  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ ,MKTTn 肉汤在  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  孵育  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ 。

### 3.3 典型可疑菌落分离

从 3.2 中获得的培养物接种于两种选择性固体培养基上。

——木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(XLD 琼脂);

——XLD 琼脂以外的任何其他补充性的选择性培养基,特别是适合于分离乳糖阳性的沙门氏菌、伤寒沙门氏菌和副伤寒沙门氏菌的培养基,实验室可以选择使用。

XLD琼脂在 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养,在 $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 后检查结果。第二种选择性琼脂按照厂家说明书进行培养。

注:作为资料,BGA、BS、XLT4、HE、DHL等可用作第二种平板划线培养基。

### 3.4 鉴定和确认

挑选可疑沙门氏菌的菌落进行次培养,再按3.3所描述的划线分离,通过适当的生化试验和血清学试验加以证实。

## 4 程序提纲

- 8.1 培养基、试剂和血清
- 8.2 设备和玻璃器皿
- 8.3 取样
- 8.4 测试样品的制备
- 8.5 测试样品和最初悬浮液
- 8.6 非选择性前增菌
- 8.7 选择性增菌
- 8.8 筛选
- 8.9 可疑典型菌落的分离和纯化
- 8.10 生化鉴定
- 8.11 血清学确认和血清型
- 8.12 确认

## 5 安全性

沙门氏菌为生物安全二级病原体。试验室的工作人员必须遵守二级生物安全防护的要求。易被其感染的年幼儿童、虚弱者、年长老人、免疫缺陷者必须远离进行沙门氏菌分离、鉴定和确认的试验室。

生物安全柜Ⅱ级的高效过滤网被用来防止致病菌引起的气溶胶。

手套和眼罩的保护是必须的并且所有的工作区的表面在工作前和后必须马上消毒。

检测所用培养基、化学试剂以及微生物的生产商必须提供相关的有效的安全数据。

## 6 质量保证

在所有检测过程中至少包含三种控制方法,即包括硫化氢( $\text{H}_2\text{S}$ )阴性沙门氏菌、硫化氢( $\text{H}_2\text{S}$ )阳性沙门氏菌和培养基空白对照。质控菌株需要接种到待验样品中。在相同条件下同样的程序同时分析质控样品与样品待验样品。确保从每个阳性控制样品中能检出至少一个菌落。在生化试验和血清学试验需要使用适当的对照来证实结果的正确性。

6.1 在使用前,所有冷藏或冷冻的培养物、培养基、试剂必须预热至室温。

6.2 按相关标准规定保存培养物、培养基、试剂。

6.3 在实验室内处理所有样品、培养物、培养基、试剂时必须严格执行无菌操作程序。

6.4 在对沙门氏菌检测过程中,为确保培养基和检测方法的有效性,务必设置阳性对照[伤寒沙门氏菌(*Samonella typhi*)和副伤寒沙门氏菌(*Samonella paratyphi*)]、阴性对照[产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)]以及空白对照。

6.5 务必设置阳性对照菌株、阴性对照菌株和空白对照,确保沙门氏菌多价“H”抗血清和“O”抗血清的有效性。

6.6 确保沙门氏菌检测中的所有危害性废弃物在丢弃前按相关标准的规定进行无害化处理。

## 7 参考文献

下列文件中的条款通过本 SOP 的引用而成为本 SOP 的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本 SOP,然而,鼓励根据本 SOP 达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本 SOP。IEC 和 ISO 成员保留目前有效的国际标准的注册。

ISO 6579:2002 Microbiology of Food and Animal Feeding stuffs—Horizontal Method for the Detection of *Samonella* spp., Second Edition

## 8 特殊程序

### 8.1 培养基、试剂和血清

注:由于培养基和试剂的数量庞大,为了表述清晰,将它们的组成和配制方法在附录 B 中列出。

8.1.1 非选择性前增菌液:缓冲蛋白胨水(见第 B.1 章)。

8.1.2 第一种选择性增菌液:RVS 肉汤(见第 B.2 章)。

8.1.3 第二种选择性增菌液:MKTTn 肉汤(见第 B.3 章)。

8.1.4 固体选择性平板培养基:

8.1.4.1 第一种培养基:木糖赖氨酸去氧胆酸盐琼脂(XLD 琼脂)(见第 B.4 章)。

8.1.4.2 第二种培养基:第二种培养基的选择依靠检测实验室自定。在制备使用此种培养基时应按厂家说明书准确执行。

8.1.5 营养琼脂(见附录 B 的 B.5)。

8.1.6 三糖铁琼脂(TSI 琼脂)(见附录 B 的 B.6)。

8.1.7 尿素琼脂(christensen)(见附录 B 的 B.7)。

8.1.8 L-赖氨酸脱羧酶培养基(见附录 B 的 B.8)。

8.1.9  $\beta$ -半乳糖苷酶检测试剂(或依照厂商说明书使用的成品圆纸片)(见附录 B 的 B.9)。

8.1.10 V-P 反应试剂(见附录 B 的 B.10)。

8.1.11 吲哚反应试剂(见附录 B 的 B.11)。

8.1.12 半固体营养琼脂(见附录 B 的 B.12)。

8.1.13 生理盐水溶液(见附录 B 的 B.13)。

8.1.14 API 20E(法国生物梅里埃)。

3.1.15 血清:含有一种或多种 O 抗原的抗体的多种凝集血清可由商品化获得;例如,包含一个或更多个 O 群抗血清(称为单价或多价抗 O 血清),抗 Vi 血清和含有一个或多个 H 因子抗体的抗血清(称为单价或多价抗 H 血清)。应确保所用的抗血清足以检测所有的沙门氏菌血清型。为满足这一要求应该使用有实力的供应商(例如,适合的政府实验室)制备的抗血清。

## 8.2 设备和玻璃器皿

一次性器具如果合乎使用可以替代可重复使用的玻璃器皿。

通常或特殊情况下微生物实验室设备(见 ISO 7218)如下:

8.2.1 干热灭菌(烘箱)或湿热灭菌(高压灭菌器)的设备(见 ISO 7218)。

8.2.2 干燥柜或烘箱,通过对流通风,能在 37℃~55℃之间调节温度。

8.2.3 培养箱,能调节温度至 37℃±1℃。

8.2.4 水浴,能调节温度至 41.5℃±1℃,或培养箱,能调节温度至 41.5℃±1℃。

8.2.5 水浴,能在 44℃~47℃间调节温度。

8.2.6 水浴,能调节温度至 37℃±1℃。

由于存在低感染剂量沙门氏菌,推荐在水浴中使用抗菌剂(见 6.4、6.5 和 6.6)。

8.2.7 灭菌环,直径约为 3 mm 或容量 10 μL,或灭菌吸管。

8.2.8 pH 计,要求在 20℃~25℃时精确校准到±0.1pH 单位。

8.2.9 适当容量的试管或烧瓶:可以使用带无毒金属或塑料螺旋帽的试管或烧瓶。

8.2.10 刻度吸管或自动移液器标记容量为 10 mL 和 1 mL,分别以 0.5 mL 和 0.1 mL 标度。

8.2.11 培养皿:小规格(直径为 90 mm~100 mm)和(或)大规格(直径为 140 mm)。

## 8.3 取样

实验室收到的样品具有代表性,且在运输或贮存过程中没有损坏或改变,这一点是非常重要的。

取样不是本 SOP 的一部分。可参见关于本 SOP 涉及产品的特定国际标准。如果没有特定国际标准,建议相关各方就这一问题达成一致意见。

## 8.4 测试样品的制备

根据关于本 SOP 涉及产品的特定国际标准来制备测试样品。如果没有特定国际标准,建议相关各方就这一问题达成一致意见。

## 8.5 测试样品和最初悬浮液

### 8.5.1 概要

关于本 SOP 涉及产品的特定的国际标准,见 ISO 6887-1。牛奶及奶制品见 ISO 8261。

制备最初悬浮液,通常用前增菌培养基(缓冲蛋白胨水)作为稀释液。

如果特定测试样品的质量不是 25 g,则需用一定量的前增菌液达到 1→10 稀释。

为减少检测工作量,当检测指定食品中的样品不止一个 25 g 样品时,并且有证据表明混合物(将测试样品合并)不会影响到特定食品的检测结果时,则样品可以混合测定。例如,如果要测定 10 份 25 g 的样品,则取 10 份样品混合形成一个 250 g 混合测试样品,加入

2 250 mL前增菌肉汤。另外,从10份单独测试样品的前增菌液中吸取的0.1 mL(加入到10 mL RVS肉汤)和1 mL(加入到10 mL MKTTn肉汤)增菌液可以分别合并并在100 mL选择性增菌液中进行增菌培养。

#### 8.5.2 某些食品最初悬浮液的特殊制备

注:下列特殊的制备仅涉及沙门氏菌的情况。在ISO 6887-2、ISO 6887-3、ISO 6887-4和ISO 8261中描述了适用于其他病原微生物检验的特殊制备。

##### 8.5.2.1 可可和含可可产品(例如,含量超过20%)

在缓冲蛋白胨水中加入终浓度50 g/L的酪蛋白(避免使用酸性酪蛋白),或者终浓度100 g/L灭菌脱脂奶粉,如果食品中可能含有大量革兰氏阳性菌群,在培养大约2 h后加入终浓度0.018 g/L的亮绿。

##### 8.5.2.2 酸性和酸化食品

确保前增菌时pH不低于4.5。

注:如果用双料缓冲蛋白胨水,酸性和酸化食品的pH会更稳定。

##### 8.5.2.3 即食食品

称325 g的混合样品加入蠕动袋(或无菌的均质瓶,根据委托人要求或样品种类需要),加入于室温一致的无菌的约1/3倍~1/2倍2 925 mL缓冲蛋白胨水,混合或均质约2 min,然后把2 925 mL BPW的剩余部分加进去。

#### 8.6 非选择性前增菌

将最初悬浮液8.5于 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

#### 8.7 选择性增菌

8.7.1 将8.6获得的培养物0.1 mL接种到含有10 mL RVS肉汤的试管中;另取9.2获得的培养液1 mL接种到含有10 mL MKTTn肉汤试管中。

8.7.2 接种的RVS肉汤于 $41.5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ ;接种的MKTTn肉汤于 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 。需要引起注意的是不得超过最高允许的培养温度( $42.5^{\circ}\text{C}$ )。

#### 8.8 筛选

8.8.1 在培养 $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 后,取RVS肉汤培养物一环接种于含有第一种选择性平板培养基(XLD平板)的大规格培养皿表面,以便获得好的单个菌落。

若缺少大的培养皿,则可采用两个小的培养皿,用同一个接种环一个接着一个地划平板。

用灭菌接种环和培养皿按相同的步骤划线于第二种选择性平板培养基。

8.8.2 在培养 $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 后,用MKTTn肉汤培养物,重复8.8.1描述的步骤划线于两种选择性平板培养基上。

8.8.3 倒置培养皿(见8.8.1和8.8.2)使底部在最上面,将第一种选择性培养基放在设定为 $37^{\circ}\text{C}$ 的培养箱内。第二种选择性培养基则按照生产商的说明书执行。

8.8.4 在培养 $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 后,检查平板(见8.8.3)上存在的沙门氏菌的典型菌落或可能是沙门氏菌非典型菌落(见注)。在培养皿的底部标示它们的位置。在XLD平板上生长的沙门氏菌典型菌落有黑色中心,周围由于指示剂颜色的改变而出现淡红色的轻微透明带。

注：硫化氢(H<sub>2</sub>S)阴性的变种沙门氏菌(例如，A型副伤寒沙门氏菌)在XLD平板上长成粉红色菌落，中间是暗红色。乳糖阳性沙门氏菌在XLD平板上呈黄色，有或没有黑色中心。

在适当的温度下培养第二种选择性平板培养基，经过适当的培养时间，通过它们的特征，检查并核对被认为可疑沙门氏菌菌落的存在。如果商业化的可供沙门氏菌生化试验用的鉴别试剂盒表明是可靠的，那么可以使用这些鉴定试剂盒。鉴别试剂盒的使用涉及到菌落的生化确认。这些试剂盒应在生产商的说明书指导下使用。

注：辨认沙门氏菌菌落，在很大程度上依靠经验，而且它们的表面特征略有变化，这种变化不仅来源于不同血清变种，而且来源于培养基不同批次。

### 8.9 可疑典型菌落的分离和纯化

为了确认，从每个选择性培养基的每个平板(两个小规格的平板或一个大规格的平板)上挑取至少一个被认为典型的或可疑的菌落，如果第一个挑取菌落为阴性，则需挑选另外四个菌落。

在流行病学研究的情况下，建议至少有五个菌落需被鉴别。如果一个培养皿上少于五个典型的或可疑的菌落，则取所有典型的或可疑的菌落做确认。

将挑选的菌落在预先干燥的营养琼脂平板表面上划线，这种方式易于形成好的单个菌落。将接种的平板在37℃±1℃培养24 h±3 h。

用纯培养物进行生化试验和血清学确认。

### 8.10 生化鉴定

#### 8.10.1 概要

用接种针，将8.9所选菌落的每个培养物接种于8.10.2至8.10.8指定培养基，或根据法国生物梅里埃API20E的说明书，结合使用API20E进行确认。

#### 8.10.2 TSI琼脂

在TSI琼脂斜面上划线，底层穿刺。在37℃±1℃培养24 h±3 h。

培养基上颜色变化的解释如下：

##### a) 底部

- 黄色：葡萄糖阳性(葡萄糖被利用)；
- 红色或未变：葡萄糖阴性(葡萄糖未被利用)；
- 黑色：硫化氢形成；
- 气泡或裂缝：葡萄糖产气。

##### b) 斜面

- 黄色：乳糖和(或)蔗糖阳性[乳糖和(或)蔗糖被利用]；
- 红色或不变色：乳糖和蔗糖阴性(乳糖和蔗糖均不被利用)。

典型的沙门氏菌培养物显示碱性(红色)斜面和酸性(黄色)底部，伴随着产气(气泡)和(约90%情况下)硫化氢产生(琼脂变黑)。

当分离到乳糖阳性的沙门氏菌时，TSI的斜面是黄色的。因此，沙门氏菌培养物的初步确认并不能仅仅根据TSI琼脂试验的结果。

### 8.10.3 尿素琼脂

在琼脂斜面上划线。在  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ , 间隔一定时间检查。

如果反应是阳性, 尿素分解释放氨, 使酚红的颜色变成玫瑰红, 最后变成深樱红色。反应通常在  $2\text{ h} \sim 4\text{ h}$  后可见。

### 8.10.4 L-赖氨酸脱羧酶培养基

接种于液体培养基表面以下, 在  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ 。

培养后出现浑浊及出现紫色表明为阳性反应。黄色表明阴性反应。

### 8.10.5 $\beta$ -半乳糖苷酶试验

取满环可疑菌落放于含有  $0.25\text{ mL}$  生理盐水的小管中。

加 1 滴甲苯并摇匀。把小管放入  $37^{\circ}\text{C}$  水浴, 保持几分钟(约  $5\text{ min}$ )。加  $0.25\text{ mL}$  检测  $\beta$ -半乳糖苷酶的试剂, 混匀。

再将小管放入  $37^{\circ}\text{C}$  水浴锅中, 保持  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ , 间隔一定时间检查试管。

黄色表明为阳性反应。反应通常在  $20\text{ min}$  后可见。

如果用准备好的圆纸片, 则按照生产厂商的说明书操作。

### 8.10.6 V-P 反应培养基

取满环可疑菌落放于含有  $3\text{ mL V-P}$  培养基的灭菌试管中。

在  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ 。

培养后, 加入 2 滴肌氨酸溶液, 3 滴  $\alpha$ -萘酚乙醇溶液, 随后加入 2 滴氢氧化钾溶液; 每种试剂加完后要摇匀。

$15\text{ min}$  内颜色变为粉红至鲜红表明阳性反应。

### 8.10.7 吲哚反应培养基

将可疑菌落接种于含有  $5\text{ mL}$  的胰蛋白胨/色氨酸培养基的试管中。

在  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ 。培养后, 加  $1\text{ mL}$  Kovacs 试剂。

出现红色环表明阳性反应。黄褐色环表明阴性反应。

### 8.10.8 生化试验的解释

常见沙门氏菌出现的反应结果见附表 3-1。

## 8.11 血清学确认和血清型

### 8.11.1 概要

在排除有自凝现象的菌株后, 用适当的血清通过玻片凝集试验对纯菌落检测沙门氏菌 O 抗原、Vi 抗原和 H 抗原的存在。如果与以下描述有差异的话, 则按照产品说明书使用抗血清。

### 8.11.2 排除自凝现象的菌株

放一滴生理盐水于仔细清洁过的玻片上。用接种环挑取被测菌落的一部分, 并在水滴中研磨, 以获得均一浑浊的悬浮液。

注: 允许被测菌落在一滴水中研磨时, 加入一滴生理盐水与它混匀。

轻轻摇动玻片  $30\text{ s} \sim 60\text{ s}$ 。在暗背景下观察结果, 用放大镜观察结果更好。

如果细菌凝集成或多或少的明显块状, 则可认为是自凝集, 那么按照后续的方法进行沙

沙门氏菌的抗原测定是不可行的。

附表 3-1 生化试验的解释

试验 <sup>a</sup> (9.5.3.2~9.5.3.7)	沙门氏菌属									
	伤寒沙门氏菌		A型副伤寒沙门氏菌		B型副伤寒沙门氏菌		C型副伤寒沙门氏菌		其他菌属	
	反应	% <sup>b</sup>	反应	% <sup>b</sup>	反应	% <sup>c</sup>	反应	% <sup>c</sup>	反应	% <sup>b</sup>
TSI 葡萄糖产酸	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI 葡萄糖产气	- <sup>d</sup>	0	+	100	+		+		+	92
TSI 乳糖产酸	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI 蔗糖产酸	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI 硫化氢产生	-	97	-	10	-		-		+	92
尿素水解	-	0	-	0	-		-		-	1
赖氨酸脱羧酶	+	98	-	0	+		+		+	95
$\beta$ -半乳糖苷酶反应	-	0	-	0	-		-		-	2 <sup>e</sup>
V-P 反应	-	0	-	0	-		-		-	0
吲哚反应	-	0	-	0	-		-		-	1

<sup>a</sup> 来源于参考资料[5]。  
<sup>b</sup> 这些百分率表明并不是所有分离到的沙门氏菌血清型都会显示出+或-的反应结果。这些百分率会在来自不同地方的血清型之间和之内而起变化。  
<sup>c</sup> 这些百分率不能从现有的文献中获得。  
<sup>d</sup> 伤寒沙门氏菌不产气。  
<sup>e</sup> 肠炎沙门氏菌亚利桑那亚型为乳糖阳性或阴性反应,但通常 $\beta$ -半乳糖苷酶为阳性反应。执行补充试验对于此类菌的研究可以很有用处。

### 8.11.3 O-抗原测定

用一个无自凝集的纯菌落,用一滴抗O血清代替生理盐水,按8.8.2步骤操作。如果出现凝集,则认为该反应为阳性。

用多价和单价血清接连重复操作以上步骤。

### 8.11.4 Vi-抗原测定

按8.8.2步骤操作,但用一滴抗Vi血清代替生理盐水。

如果出现凝集,则认为该反应为阳性。

### 8.11.5 H-抗原测定

将纯的无自凝集的菌落接种于半固体营养琼脂。在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ 。

用此培养物来检测H-抗原,用一滴抗H血清代替生理盐水,按8.8.2步骤操作。

如果出现凝集,则认为该反应为阳性。

#### 8.11.6 生化和血清学反应的解释

附表 3-2 给出的是所取菌落完成的确认试验的解释。

附表 3-2 确认试验的解释

生化反应	自凝集	血清学反应	解 释
典型	无	O <sub>-</sub> 、Vi <sub>-</sub> 或 H-抗原阳性	沙门氏菌
典型	无	所有反应为阴性	可能是沙门氏菌
典型	有	未进行试验(见 8.11.2)	
不典型反应	无/有	O <sub>-</sub> 、Vi <sub>-</sub> 或 H-抗原阳性	
不典型反应	无/有	所有反应为阴性	非沙门氏菌

#### 8.12 确认

被考虑为沙门氏菌,或可能是沙门氏菌(见表 2)的菌落。

送确认时应同时附上关于此菌的所有尽可能多的信息,包括是否是一次爆发流行还是仅在食物中发现。

#### 9 结果表达

与解释的结果相一致,指明  $\chi$  g 或  $\chi$  mL 测试样品中是否存在沙门氏菌(见 ISO 7218)。

#### 10 测试报告

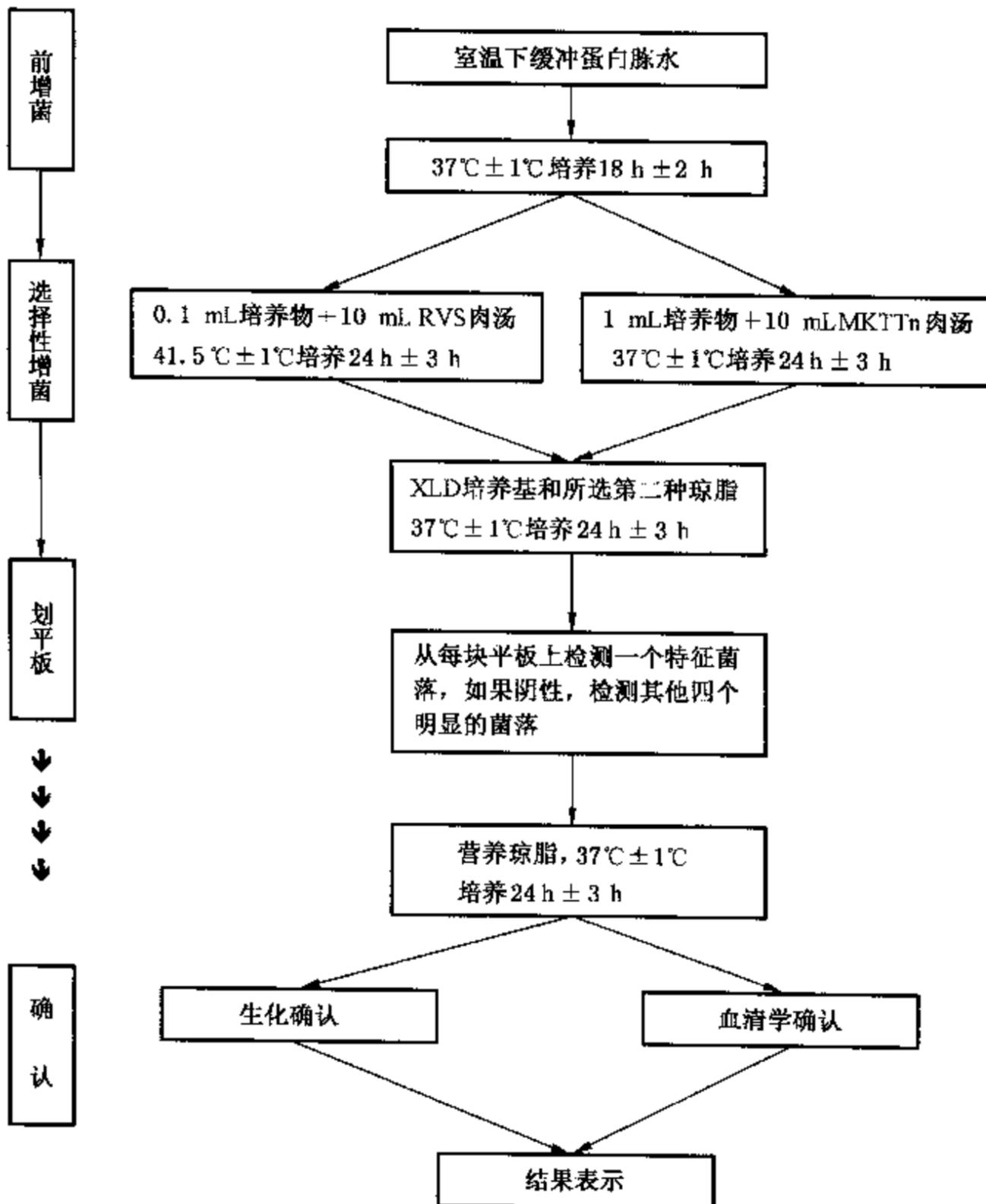
测试报告应详细说明:

- 制样方法,如果已知;
- 任何增菌液或培养条件的偏移;
- 所有非本 SOP 指定的操作条件,或者被认为可选择的、和可能影响结果的任何事件的细节;
- 得到的结果。

测试报告也应该声明是否阳性结果的获得使用了非本 SOP 指定的平板划线培养基。

附录 A  
(规范性附录)  
检测程序图

沙门氏菌的检测程序图见附图 A.1。



附图 A.1 检测程序图

## 附录 B

(规范性附录)

## 培养基和试剂的成分和制备

## B.1 缓冲蛋白胨水

## B.1.1 成分

酪蛋白胨	10.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
十二水磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	9.0 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.5 g
水	1 000 mL

## B.1.2 制备

将上述成分溶解于水,如需要可以加热。

如需要,调节 pH 值,以便在消毒后 25℃ 下 pH 值为  $7.0 \pm 0.2$ 。

分装培养基于适当容量的烧瓶中,以便满足实验的需要。

置于高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 15 min。

## B.2 RVS 肉汤

## B.2.1 溶液 A

## B.2.1.1 成分

大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠(NaCl)	8.0 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.4 g
磷酸氢二钾( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0.2 g
水	1 000 mL

## B.2.1.2 制备

将上述成分溶解于水,如需要可以加热到 70℃ 左右。

溶液应该在制备完全 RVS 培养基当天制备。

**B. 2. 2 溶液 B****B. 2. 2. 1 成分**

六水氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	400.0 g
水	1 000 mL

**B. 2. 2. 2 制备**

将氯化镁溶于水中。

由于氯化镁容易吸湿,建议从新开的瓶中取六水氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ),根据换算,溶解整个成分。例如,250 g 六水氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )加入 625 mL 水中,得到一个总体积为 788 mL 的溶液,六水氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )的质量浓度约为 31.7 g/100 mL。

此溶液在配有紧密瓶盖的暗色瓶中可以室温保藏至少 2 年。

**B. 2. 3 溶剂 C****B. 2. 3. 1 成分**

孔雀石绿草酸盐	0.4 g
水	100 mL

**B. 2. 3. 2 制备**

将孔雀石绿草酸盐溶于水中。

此溶液置于棕色瓶中,可以室温保存至少 8 个月。

**B. 2. 4 完全培养基****B. 2. 4. 1 成分**

溶液 A(B. 2. 1)	1 000 mL
溶液 B(B. 2. 2)	100 mL
溶液 C(B. 2. 3)	10 mL

**B. 2. 4. 2 制备**

加入 1 000 mL 溶液 A、100 mL 溶液 B、10 mL 溶液 C。

如需要,调节 pH,以便在灭菌后 pH 值为  $5.2 \pm 0.2$ 。

使用前,用 10 mL 量分装试管。

置高压灭菌锅中  $115^\circ\text{C}$  灭菌 15 min。

已配好的培养基于  $3^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  保存。该培养基现用现配。

注:最终培养基成分是:大豆蛋白胨,4.5 g/L;氯化钠,7.2 g/L;磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ ),1.44 g/L;无水  $\text{MgCl}_2$ ,13.4 g/L 或  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,28.6 g/L;孔雀石绿草酸盐,0.036 g/L。

**B.3 MKTTn 肉汤****B.3.1 基础培养基****B.3.1.1 成分**

肉浸膏	4.3 g
酪蛋白胨	8.6 g
氯化钠(NaCl)	2.6 g
碳酸钙(CaCO <sub>3</sub> )	38.7 g
五水硫代硫酸钠(Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	47.8 g
细菌学用牛胆汁	4.78 g
亮绿	9.6 mg
水	1 000 mL

**B.3.1.2 制备**

将脱水的基础组分或脱水完全基础培养基溶解于水中,并煮沸 5 min。

如需要,调节 pH,使其 25℃时值为 8.2±0.2。

彻底混匀培养基。

该基础培养基于 3℃±2℃可保存 4 周。

**B.3.2 碘-碘化钾溶液****B.3.2.1 成分**

碘	20.0 g
碘化钾(KI)	25.0 g
水	100 mL

**B.3.2.2 制备**

将碘化钾完全溶于 10 mL 水中,再加入碘,然后加无菌水补足 100 mL。不需加热。

在室温下将配制好的溶液置于密闭容器,暗处保存。

**B.3.3 新生霉素溶液****B.3.3.1 成分**

新生霉素钠盐	0.04 g
水	5 mL

**B.3.3.2 制备**

将新生霉素钠盐溶于水中,过滤除菌。

3℃±2℃可保存 4 周以上。

**B. 3.4 完全培养基****B. 3.4.1 成分**

基础培养基(B. 3.1)	1 000 mL
碘-碘化钾溶液(B. 3.2)	20 mL
新生霉素溶液(B. 3.3)	5 mL

**B. 3.4.2 制备**

无菌条件下,将5 mL 新生霉素溶液(B. 3.3)加入到1 000 mL 基础培养(B. 3.1)中,混匀,然后加入20 mL 碘-碘化钾溶液(B. 3.2),混匀。

在无菌条件下,按实验需要量将培养基分装于灭菌好的烧瓶中。

完全培养基应现用现配。

**B. 4 木糖赖氨酸去氧胆酸盐(XLD)琼脂****B. 4.1 基础培养基****B. 4.1.1 成分**

酵母浸出物	3.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
木糖	3.75 g
乳糖	7.5 g
蔗糖	7.5 g
L-盐酸赖氨酸	5.0 g
硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	6.8 g
柠檬酸铁(Ⅲ)铵	0.8 g
苯酚红	0.08 g
脱氧胆酸钠	1.0 g
琼脂	9 g~18 g
水	1 000 mL

**B. 4.1.2 制备**

将脱水的基础组分或脱水的基础完全培养基溶解于水中,加热,不停地搅拌,直至培养基开始沸腾。避免加热过度。

如需要,调节pH值,以便在灭菌后25℃时pH值为 $7.4 \pm 0.2$ 。

将此培养基适量装入试管或烧瓶中。

加热并不断搅拌,直到培养基沸腾琼脂溶解。不要加热过度。

依据琼脂的凝胶强度酌量添加。

**B. 4.2 琼脂平板的制备**

立即放入44℃~47℃的水浴中,搅拌并倒平板。待其凝固。

使用前,在 37℃~55℃ 的烘箱里小心干燥琼脂板,直到琼脂表面干燥(若把盖子拿掉并使琼脂面朝下效果更好)。

倒好的平板在 3℃±2℃ 可保存 5 d。

## B.5 营养琼脂

### B.5.1 成分

肉浸膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂	9 g~18 g
水	1 000 mL

### B.5.2 制备

将相应组分或脱水完全培养基溶于水,如需要可加热。

如需要,调节 pH,以便在灭菌后 25℃ 时 pH 为 7.0±0.2。

将培养基转移到适当容量的试管或瓶中。

高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 15 min。

### B.5.3 营养琼脂平板的制备

将约 15 mL 融化的培养基移到灭菌的小规格培养皿中,按 B.4.2 进行操作。

## B.6 三糖铁琼脂(TSI 琼脂)

### B.6.1 成分

肉浸膏	3.0 g
酵母浸出物	3.0 g
蛋白胨	20.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
柠檬酸铁(Ⅲ)铵	0.3 g
硫代硫酸钠(Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0.3 g
苯酚红	0.024 g
琼脂	9 g~18 g
水	1 000 mL

### B.6.2 制备

将相应组分或脱水完全培养基溶于水,如需要可加热。

如需要,调节 pH,以便在灭菌在 25℃ 时 pH 为  $7.4 \pm 0.2$ 。

将培养基按 10 mL 量分装于试管或培养皿中。

高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 15 min。

在倾斜的位置摆放试管,使底部的深度 2.5 cm 到约 5 cm。

## B.7 尿素琼脂(christensen)

### B.7.1 基础培养基

#### B.7.1.1 成分

蛋白胨	1.0 g
葡萄糖	1.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2.0 g
苯酚红	0.012 g
琼脂	9 g~18 g
水	1 000 mL

#### B.7.1.2 制备

将相应组分或脱水完全培养基溶于水,如需要可加热。

如需要,调节 pH,以便在灭菌在 25℃ 时 pH 为  $6.8 \pm 0.2$ 。

高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 15 min。

### B.7.2 尿素溶液

#### B.7.2.1 成分

尿素	400 g
水,补足体积至	1 000 mL

#### B.7.2.2 制备

将尿素溶于水中,过滤除菌并检查是否无菌(见 ISO 7218:1996 的 7.3.2)。

### B.7.3 完全培养基

#### B.7.3.1 成分

基础培养基(B.7.1)	950 mL
尿素溶液(B.7.2)	50 mL

#### B.7.3.2 制备

在无菌条件下,将尿素溶液加入到先前融化并已冷至 44℃~47℃ 的基础培养基中。

将完全培养基按 10 mL 的量分装于灭菌试管。

要求倾斜摆放试管。

## B.8 L-赖氨酸脱羧酶培养基

### B.8.1 成分

L-盐酸赖氨酸	5.0 g
酵母浸出物	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
水	1 000 mL

### B.8.2 制备

将上述成分溶于水中,需要时可加热。

如需要,调节 pH 值,以便在灭菌后 25℃ 时 pH 值为  $6.8 \pm 0.2$ 。

将培养基按 2 mL~5 mL 的量转移到具螺旋帽的细培养管中。

高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 15 min。

## B.9 $\beta$ -半乳糖苷酶检测试剂

### B.9.1 缓冲溶液

#### B.9.1.1 成分

磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	6.9 g
10 mol/L 的氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )溶液	约 3 mL
水,补足体积至	50 mL

#### B.9.1.2 制备

将磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )溶于约 45 mL 水的容量瓶中。

用氢氧化钠溶液调节 pH 值至  $7.0 \pm 0.2$  (25℃)。

加水至终体积 50 mL。

### B.9.2 ONPG 溶液

#### B.9.2.1 成分

$\alpha$ -硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)	0.08 g
水	15 mL

#### B.9.2.2 制备

在 50℃ 左右将 ONPG 溶于水中。

冷却溶液。

**B. 9.3 完全培养基****B. 9.3.1 成分**

缓冲溶液(B. 9. 1)	5 mL
ONPG 溶液(B. 9. 2)	15 mL

**B. 9.3.2 制备**

将缓冲溶液加入到 ONPG 溶液中。

**B. 10 V-P 反应试剂****B. 10.1 V-P 培养基****B. 10.1.1 成分**

蛋白胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾( $K_2HPO_4$ )	5.0 g
水	1 000 mL

**B. 10.1.2 制备**

将上述成分溶于水中,如需要可加热。

如需要,调节 pH,以便在灭菌后 25℃ 时 pH 值为  $6.9 \pm 0.2$ 。

将培养基分装到试管中,每管 3 mL。

高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 15 min。

**B. 10.2 肌氨酸溶液(N-氨基肌氨酸)****B. 10.2.1 成分**

一水合肌氨酸	0.5 g
水	100 mL

**B. 10.2.2 制备**

将肌氨酸一水化物溶于水中。

**B. 10.3  $\alpha$ -萘酚乙醇溶液****B. 10.3.1 成分**

$\alpha$ -萘酚	6 g
96%乙醇(体积比)	100 mL

**B. 10.3.2 制备**

将  $\alpha$ -萘酚溶于乙醇溶液。

**B. 10.4 氢氧化钾溶液****B. 10.4.1 成分**

氢氧化钾	40 g
水	100 mL

**B. 10.4.2 制备**

将氢氧化钾溶于水中。

**B. 11 吲哚反应试剂****B. 11.1 胰蛋白胨(色氨酸培养基)****B. 11.1.1 成分**

胰蛋白胨	10 g
氯化钠(NaCl)	5 g
DL-色氨酸	1 g
水	1 000 mL

**B. 11.1.2 制备**

将上述成分溶于沸腾的水中。

如需要,调节 pH,以便在灭菌后 25℃时 pH 为 7.5±0.2。

分装培养基到试管,每管 5 mL。

高压灭菌锅中 121℃灭菌 15 min。

**B. 11.2 Kovacs 试剂****B. 11.2.1 成分**

4-二甲氨基苯甲醛	5 g
盐酸, $\rho=1.18 \text{ g/mL} \sim 1.19 \text{ g/mL}$	25 mL
2-甲基 2-丁醇	75 mL

**B. 11.2.2 制备**

混合上述成分。

**B. 12 半固体营养琼脂****B. 12.1 成分**

肉浸膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂	4 g~9 g
水	1 000 mL

**B. 12.2 制备**

将上述成分溶于水中,需要时可加热。

如需要,调节 pH 值,以便在灭菌后 25℃ 时 pH 为  $7.0 \pm 0.2$ 。

将培养基转移到适量的烧瓶中。

高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 15 min。

**B. 12.3 琼脂平板的制备****B. 13 生理盐水溶液****B. 13.1 成分**

氯化钠(NaCl)	8.5 g
水	1 000 mL

**B. 13.2 制备**

将氯化钠溶于水中。

如需要,调节 pH,以便在灭菌后 25℃ 时 pH 为  $7.0 \pm 0.2$ 。

分装上述溶液于烧瓶或试管中,使得它们灭菌后的体积为 90 mL~100 mL。

高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 15 min。

## 附录 4

# 食品微生物非标准方法确认指南

### 1 范围

本标准规定了食品微生物非标准方法确认要求。

本标准适用于食品微生物非标准定性和定量方法的确认。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

AOAC International methods committee;2002 Guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis

ISO 16140:2003 Microbiology of food animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods

ISO/TC 34/SC 9N 593:2002 In-house method validation

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

#### 3.1

标准方法 reference method or standard method

国际、国家或行业或组织认可并被广泛接受的方法(如 ISO、AOAC、USDA BAM、APHA、GB、SN 等)。

#### 3.2

非标准方法 non-standard method

标准方法以外的方法。

#### 3.3

非标准方法确认 validation of an alternative method

使用批准生效的确认方案中所规定的统计方法,比较分析使用非标准方法和标准方法获得的检测结果,以获得足够的可信性。

#### 3.4

分析对象 analyte

分析方法所测定的成分。就微生物学方法而言,它是指微生物本身及其相关的副产物(如酶或毒素)。

3.5

定性方法 qualitative method

检验一定数量的样品中是否存在分析对象的方法。

3.6

定量方法 quantitative method

对一定数量的样品进行直接(如质量或体积)或间接(如吸收度、阻抗等)测量的方法。

3.7

实验室内确认 validated in the laboratory

在组织实验室或方法确认负责人的指导下,在非标准方法制定(使用)的实验室内对非标准方法和标准方法进行比较。

4 非标准方法确认基本原则

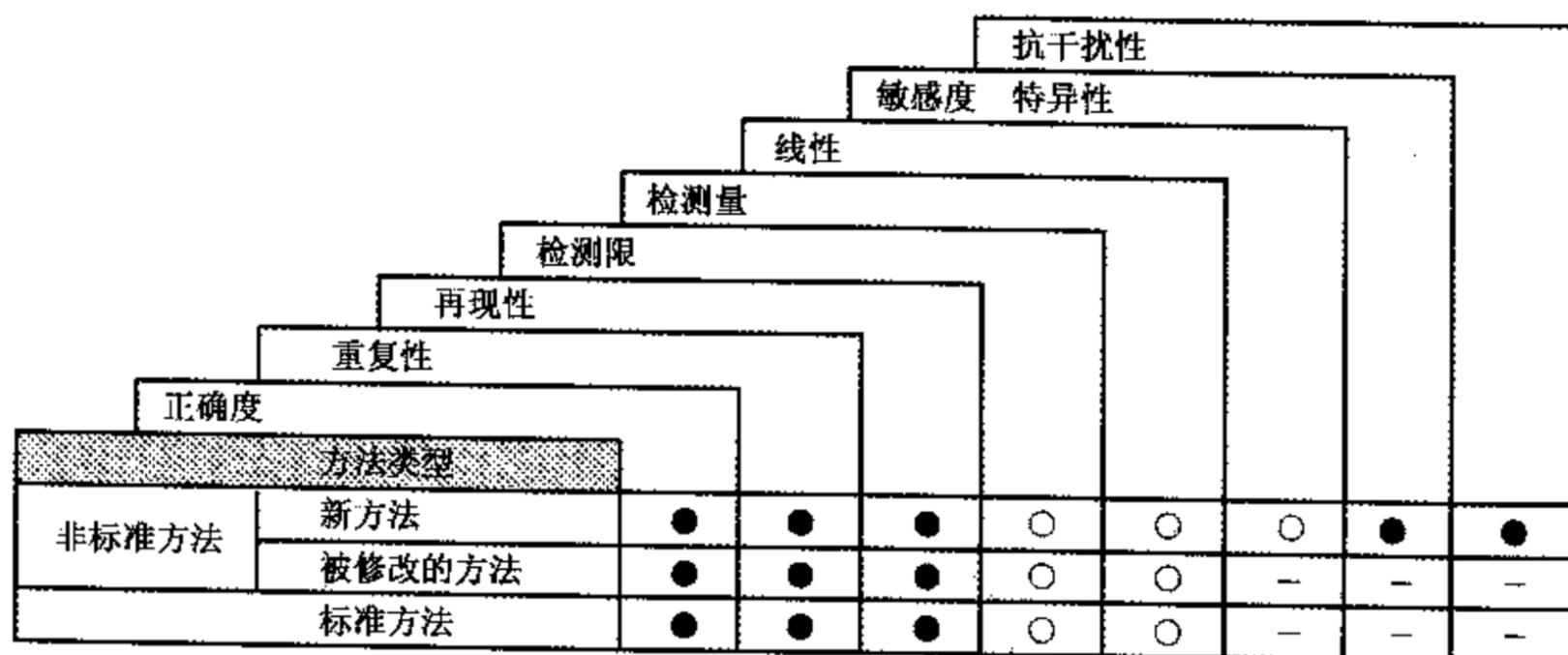
4.1 非标准方法的确认方案

实验室内确认:在非标准方法制定(使用)的实验室内对非标准方法与标准方法进行比较研究,包括系统参加国内外权威机构组织的能力确认。

4.2 性能指标(ISO/TC 34/SC 9N 593 和 ISO 16140)

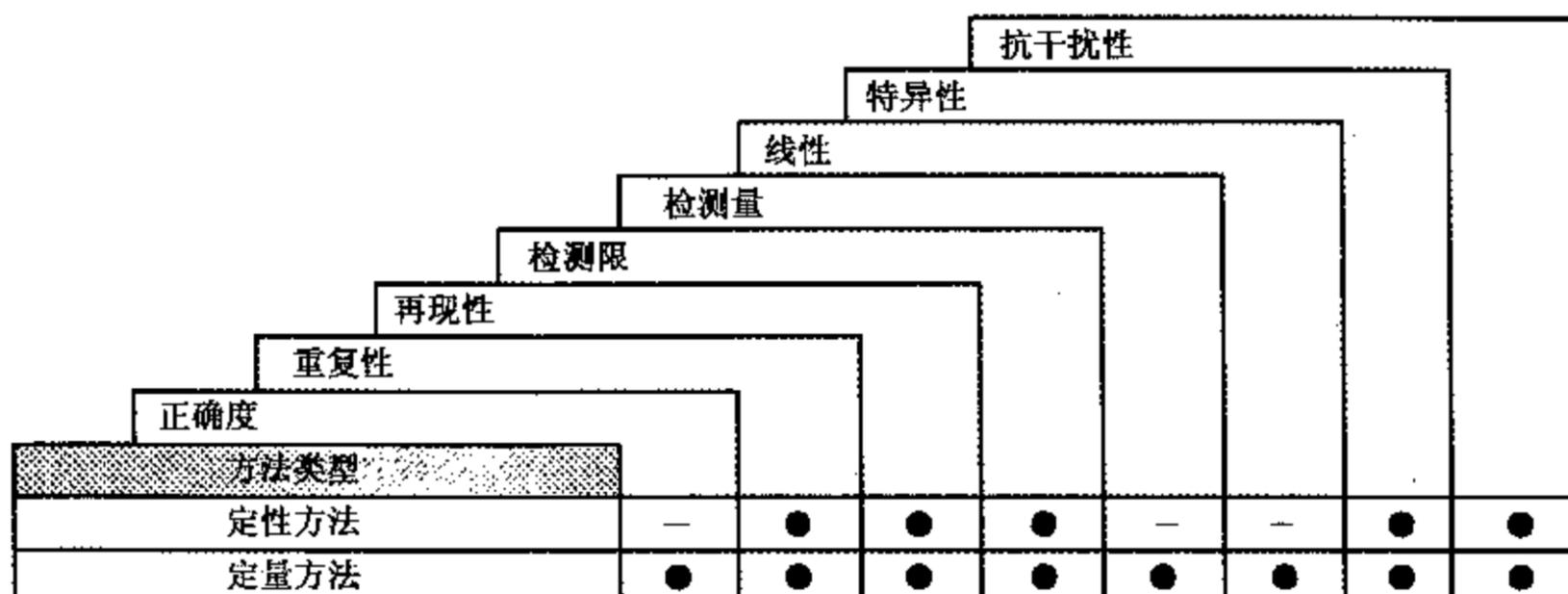
对于非标准方法,与标准检验方法比较时,应达到或超过以下性能指标(见附图 4-1 和附图 4-2):敏感度(sensitivity)  $\geq 97\%$ 、特异性(specificity)  $\geq 90\%$ 、假阴性(false negative rate)  $< 2\%$ 、假阳性(false positive rate)  $< 9.6\%$ 、检测效率(test efficacy)  $\geq 94\%$ 、检测限(limit of detection)  $\geq 3\text{cfu/g}$  或 mL,卡平方( $\chi^2$ )  $< 3.84$ 。

对于非标准方法,与标准方法比较时,需统计分析二者的重复性(r)、重复性标准偏差( $S_r$ )、重复性相对标准偏差( $RSD_r$ )、再现性(R)、再现性标准偏差( $S_R$ )、再现性相对标准偏差( $RSD_R$ ),且在一般情况下,二者的重复性没有显著差别。



●—原则上需要确定的指标;○—根据表 2 确定指标;— —原则上不需要确定的指标。

附图 4-1 微生物检验方法确认时可能(应当)确定的性能特征



● 原则上需要确定的指标；— 原则上不需要确定的指标。

附图 4-2 不同类型微生物检验方法确认时应当确定的性能指标

## 5 食品微生物非标准定性方法确认方案

### 5.1 实验室内确认

#### 5.1.1 标准程序

非标准方法一般与标准方法相比较,可参看 ISO、AOAC、USDA BAM、APHA、GB、SN 等食品微生物检验体系中的相关标准方法。

#### 5.1.2 实验室数目

实验室内确认一般在制定(使用)非标准方法的实验室内进行。

#### 5.1.3 食品种类

为减少当地特殊食品造成的偏差,应当尽可能一个宽的范围选择食品的种类,并且应当包括那些涉及食物中毒和有召回要求的食品。

推荐参考附录 A 中所列的确认微生物学方法的食品种类和食品类型。如果非标准方法适用范围为所有或绝大部分食品(关于沙门氏菌的检测方法),那么应从附录 A 中挑选至少 6 大类 20 种不同的食品进行分析。如果非标准方法仅限于特定的食品范围,那么从附录 A 中挑选的食品种类数目可以缩减到 1 类、2 类、3 类、4 类或 5 类食品。

对于每一类食品,如果不可能获得足够数目的自然污染食品,允许使用人工污染食品样品。

#### 5.1.4 接种培养物以及微生物的状况

既然很少获得自然污染产品,故经常使用目标菌接种污染食品。对于一个属水平的非标准方法而言,如检测沙门氏菌属,需要使用许多代表不同血清型的菌株。

对于每一类食品,应使用一株不同的血清型或不同种类的有代表性的纯化菌株,不推荐使用混合培养物。

加工食品中的微生物受到明显胁迫,因而接种到这些食品中的污染微生物也应被胁迫。在接种时或食品准备过程中可能导致微生物胁迫。可把未受到胁迫的微生物接种到未加工食品中,把冻干菌种接种到干粉/粒状食品中,把湿润菌株接种到潮湿食品中。进行方法确

认前,为稳定人工污染固态食品样品中的菌落,应当在适宜的条件下储藏。

#### 5.1.5 接种水平和对照

每一类食品至少要分成两份,其中一份作为阴性对照,另一份在保证部分回收率的水平上接种,应同时制备以上两个样品;如果需要,推荐制备一份高接种水平的样品。一般情况下,根据在测试方法的最低检测限设定低接种水平,如:1 cfu/25 g~5 cfu/25 g 测试样品,而高接种水平设定为 10 cfu/25 g~50 cfu/25g 测试样品。其他接种水平可根据需要添加。

一个以上接种水平可以增加表示每一接种水平部分回收率的可能性,在测定方法的最低检测限时测试结果全部阴性或阳性的接种水平是没有价值的,不符合方法确认要求。

#### 5.1.6 测试样品数

每个接种水平的测试样品数是 20 个。

#### 5.1.7 自然污染样品

把每一类自然污染的食品至少分成两批。对于方法的使用,自然污染样品很有代表性,应努力获得,然而,绝大多数微生物检验人员很少获得自然污染产品,对于这些自然污染产品,没有阴性对照。要分析 20 份由每批自然污染产品制备而成的样品。

#### 5.1.8 竞争菌群

竞争菌群的存在使微生物检验更符合实际和更具挑战性。使用竞争菌群的目的是模拟自然状况,其足以证实某类食品中目标微生物的部分回收率。竞争菌群的污染水平至少高于目标微生物一个对数级。

#### 5.1.9 敏感性和特异性

敏感性是指使用非标准方法从众多微生物中检测目标菌株的能力。特异性是指非标准方法对可能引起交叉反应的相关非目标菌株的抗干扰能力。

至少选择 50 个某一特定微生物的纯化菌株和至少 30 个竞争菌株来分析非标准方法的敏感性和特异性。

#### 5.1.10 污染对照

同时制备人工污染样品和未接种目标菌株的对照样品。如果从阴性对照样品中检测目标菌株,表明可能发生了交叉污染,则该测试结果无效,此时需要进行重复测试。对照样品不包括自然污染食品。

### 5.2 显著性差异检验和性能指标

#### 5.2.1 显著性差异检验( $\chi^2$ )

对于每一种食品类型和每一个接种水平,非标准方法的阳性确证比率与标准方法的阳性确证比率不一定存在统计学差别。McNemar's 检验[卡平方( $\chi^2$ )检验][见式(1)]可用于上比较方法的确证比率。

如果  $\chi^2 < 3.84$ ,表示非标准方法与标准方法的阳性确证比率在 5% 的置信区间内没有统计学差异。每一类食品的每一个接种水平必须达到该标准。然而,如果非标准方法比标准方法有更高的回收率,则以上两种方法的阳性确证比率存在统计学差异是可以接受的。

$$\chi^2 = \frac{(|a-b|-1)^2}{a+b} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

$a$ ——非标准方法证实为阳性而标准方法证实为阴性的样品数;

$b$ ——非标准方法证实为阴性而标准方法证实为阳性的样品数。

参照式(1)进行计算。如果  $\chi^2 \geq 3.84$ , 表示两种方法的阳性确证比率在 5% 的置信区间内有统计学差异。如果某类食品的某一个接种水平的分析结果经卡平方检验表示存在统计学差异, 则必须从方法的适用范围内删除这一类食品, 或者必须对该方法进行修改, 并进行额外的测试以证明该结果可接受。

### 5.2.2 性能指标

定性方法主要有四个性能指标: 敏感性、特异性、假阴性率和假阳性率, 它们与显著性差异检验一起对测试方法提供了一个总的评价。表 1 提供了四种性能指标的计算方法。

#### 5.2.2.1 敏感性比率( $p+$ )

敏感度指数定义为: 非标准方法和标准方法均确证为阳性的数量除以标准方法确证为阳性的总数。

#### 5.2.2.2 特异性比率( $p-$ )

特异性比率定义为: 非标准方法和标准方法均确证为阴性的数量除以标准方法确证为阴性的总数。

#### 5.2.2.3 假阴性比率( $pf-$ )

假阴性比率定义为: 非标准方法确证为阴性而标准方法确证为阳性的数量除以标准方法确证为阳性的总数。

$$\text{假阴性率} = 100 - \text{敏感性比率}$$

#### 5.2.2.4 假阳性率( $pf+$ )

假阳性比率定义为: 非标准方法确证为阳性而标准方法确证为阴性的数量除以标准方法确证为阴性的总数。

$$\text{假阳性率} = 100 - \text{特异性比率}$$

将比较研究获得的数据输入附表 4-1 中, 计算显著性差异结果和性能指标。计算应当在每一个接种水平上进行。

附表 4-1 性能指标的计算(AOAC:2002 及 ISO 16140:2003)

测试样品状态 <sup>a</sup>	测试结果 <sup>b</sup>		总计
	阳性	阴性	
阳性	N11	N12	$N1 \cdot = N11 + N12$
阴性	N21	N22	$N2 \cdot = N21 + N22$
总计	$N \cdot 1 = N11 + N21$	$N \cdot 2 = N12 + N22$	$N = N1 \cdot + N2 \cdot$ 或 $N = N \cdot 1 + N \cdot 2$

注:  $N \cdot$ : 每一格内结果的数目, 前面的数字是指行, 后面的数字是指列。

<sup>a</sup> 标准方法的结果。

<sup>b</sup> 非标准方法的结果, 在计算敏感度时, 使用确证结果。

$\chi^2 = (|N_{12} - N_{21}| - 1)^2 \div (N_{12} + N_{21})$ , 自由度 = 1;

敏感性比率 =  $p_+ = N_{11} \div N_{1\cdot}$ ;

特异性比率 =  $p_- = N_{22} \div N_{2\cdot}$ ;

假阴性率 =  $pf_- = N_{12} \div N_{1\cdot} = 1 - \text{敏感性比率}$ ;

假阳性率 =  $pf_+ = N_{21} \div N_{2\cdot} = 1 - \text{特异性比率}$ ;

测试效率(test efficacy) =  $(N_{11} + N_{22}) \div (N_{11} + N_{12} + N_{21} + N_{22}) = (N_{11} + N_{22}) \div N$ 。

## 6 食品微生物非标准定量方法确认方案

### 6.1 实验室内确认

#### 6.1.1 标准程序

见 5.1.1。

#### 6.1.2 实验室数目

见 5.1.2。

#### 6.1.3 食品种类

见 5.1.3。

#### 6.1.4 接种培养物

如果一种非标准方法用来检测通常在所有的食品类型中都不易发现的特定菌株(如李斯特氏菌属计数),或者根据参考文献,某类食品的目标微生物不在检测水平内,就可以接种培养物。

#### 6.1.5 接种水平和对照以及测试样品数目

对于人工污染的食品,要求有高、中、低 3 个接种水平(如  $10^2$  cfu/g ~  $10^3$  cfu/g、 $10^4$  cfu/g、 $10^5$  cfu/g)和一个未接种对照。对于每一接种水平和阴性对照,非标准方法和标准方法各要求有 5 个测试样品。低接种水平应设定在检测限左右,中等接种水平和高接种水平应当分别高 1 个和 2 个对数级。

#### 6.1.6 人工和自然污染样品的使用

约有 50% 的自然污染食品,除非非标准方法用来检测某一特定微生物,而这一微生物可能不发生自然污染各个测试食品种类。对于自然污染食品,要求每一类食品有三个不同的批次,自然污染的食品类型不需要未接种对照。

#### 6.1.7 竞争菌群

见 5.1.8。

#### 6.1.8 敏感性和特异性

该要求不适用于那些未针对某一特定微生物的计数方法(如活菌计数、酵母和霉菌计数等)。

敏感性是指使用非标准方法从众多菌群中检测目标微生物的能力。特异性是指非标准方法对可能引起交叉反应的相关非目标菌株的抗干扰能力。

在微生物学中,除了总计数方法外,获得敏感性和特异性要:至少 30 株纯化的特定目标

菌株,至少要有20株已知在通常情况下对目标微生物有干扰的纯化菌株。

## 6.2 确认结果的计算

### 6.2.1 总则

在生物学方法中,实验数据常常不能体现标准的统计学分布。为了获得更为对称的分布,应将计数结果转换成对数形式。

首先将原始结果绘成图,垂直 $y$ 轴(因变量轴)代表非标准方法而水平 $x$ 轴(自变量轴)代表标准方法。自变量被认为是精确的已知值。

非标方法确认负责人仔细审查和评估个协作实验室提交的确认数据,然后对有效的数据进行统计分析。对于非标准方法确认结果的统计分析和详细解释,可参考ISO 16140。

### 6.2.2 异常值

很难对微小偏差和异常值进行可靠评估(平均数、标准偏差等)。检查数据以确定任一协作实验室的数据是否连续偏高,或连续偏低,或者偶然的结果,这些数据与其他大多数预期数据有较大差异。为了剔除无关离群值而得以更好评估,需进行异常值检验(ISO 16140)。

### 6.2.3 性能指标

定量方法的性能指标包括:重复性、再现性和相对标准差。

#### 6.2.3.1 变异分析

为确定使用非标准方法和标准方法所得均值是否存在显著性差异,根据食品类型和接种水平使用单因素方差分析、配对 $t$ 检验。

#### 6.2.3.2 重复性( $S_r$ )

重复性是实验室内精密度,用 $S_r$ 表示,是指在相同的条件下(如仪器、操作人、实验室或培养时间)对同一个样品使用相同的方法分析获得的连续的或独立测试结果之间的一致程度。

#### 6.2.3.3 重复性值( $r$ )

重复性值是一个数值,在重复性条件下,两次独立测试结果之间的绝对差值不超过此数值的概率为95%。

#### 6.2.3.4 再现性( $S_R$ )

再现性是指实验室间精密度,用 $S_R$ 表示,是指在不同实验室不同操作者使用不同仪器和同一方法对同一样品进行分析所得独立结果之间的一致程度。

#### 6.2.3.5 再现性值( $R$ )

再现性值是一个数值,在再现性条件下,独立测试结果之间的绝对差值不超过此数值的概率为95%。

#### 6.2.3.6 相对标准偏差( $RSD$ )

在定量研究时,相对标准偏差是一个有用的衡量精密度的工具。 $RSD$ 等于 $S_r$ 和 $S_R$ 除以平均值,目的是用于比较不同平均值之间的变异程度。微生物检验方法协同确认的结果可以使用 $RSD_R$ (再现性相对标准偏差)和 $RSD_r$ (重复性相对标准偏差)来综合描述。

附录 A  
(规范性附录)

用于方法确认研究的食品种类(ISO 16140 & AOAC)

与食源致病菌、非致病菌相关联的食品种类分别见附表 A. 1、附表 A. 2, 具体实例见附表 A. 3。

附表 A. 1 与食源致病菌相关联的食品种类

食品类型		耶尔森氏菌属	产气荚膜梭菌	单核细胞增生李斯特氏菌	O157:H7 和 VTEC	金黄葡萄球菌	产肠毒素金葡菌	弯曲菌属	沙门氏菌属	蜡样芽胞杆菌
1. 肉制品	未加工	■		■	■			■	■	■
	热加工			■	■	■	■		■	
	冷冻			■	■				■	
	发酵			■	■				■	
	腌制		■	■		■	■		■	
	其他		肉汁(肉汤)	肉馅饼					■	
2. 家禽	未加工	■						■	■	
	热加工								■	
	冷冻								■	
	其他		肉汁(肉汤)							
3. 鱼类和海产品	未加工	■		■	■			■	■	
	热加工								■	
	冷冻			■	■				■	
	贝类(甲壳类)	■			■			■	■	
	烟熏		■	■		■	■		■	
	其他								■	
4. 水果和菜制品	未巴斯德消毒果汁				■				■	
	未加工	■		■	■			■	■	
	热加工		■							
	冷冻			■					■	
	干制									■
	液汁(浓缩)				■				■	

续附表 A.1

食品类型		耶尔森氏菌属	产气荚膜梭菌	单核细胞增生李斯特氏菌	O157:H7和VTEC	金黄葡萄球菌	产肠毒素金黄色葡萄球菌	弯曲菌属	沙门氏菌属	蜡样芽胞杆菌
4. 水果和蔬菜制品	低湿								■	
	果肉			■	■				■	
	其他								加工蘑菇	
5. 乳制品	未加工	■		■	■	■	■	■	■	■
	热加工			■						■
	冷冻			■	■	■	■		■	■
	发酵			■	■	■	■		■	
	干制					■	■		■	■
	其他									
	冰淇淋			■					■	
干酪			■	■				■		
6. 巧克力/面包制品	低湿								■	
	干制								■	
	巧克力奶								■	
	其他					面制糕点	面制糕点			蛋奶冻
7. 动物饲料	低湿								■	
	宠物食品								■	
8. 意大利面食	未煮面条								■	
9. 杂品	敷料剂			■	■				■	
	香料		■						■	
	蛋黄酱			■	■			■	■	
	面粉			■				■	■	
	鸡蛋及其制品				■				■	
	谷类(米饭)									■
注：本表未列出致病弧菌(霍乱弧菌、副溶血性弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌等)，霍乱弧菌主要污染蔬菜、水产品、肉制品等食品。其他致病弧菌主要污染海产品。■表示需检测的食源致病菌。										

附表 A.2 与非致病菌相关联的食品种类

食品类型	霉菌和酵母菌	乳酸菌	细菌总数	大肠菌群	大肠杆菌
1. 肉制品	未加工	■	■	■	■
	热加工		■	■	
	冷冻	■		■	■
	发酵	■	■	■	
	腌制		■	■	
2. 家禽	未加工	■	■	■	■
	热加工		■	■	
	冷冻	■		■	■
3. 鱼类和 海产品	未加工	■	■	■	■
	热加工		■	■	
	冷冻	■		■	■
	烟熏	■	■	■	
4. 水果和 菜制品	未加工	■	■	■	■
	热加工			■	■
	冷冻	■		■	■
	干制	■		■	■
	发酵	■		■	
	腌制(盐渍)	■		■	
	液汁(浓缩)	■	■	■	
	低湿	■			
5. 乳制品	未加工	■	■	■	■
	热加工			■	■
	冷冻	■		■	■
	发酵	■			■
	干制			■	■
6. 巧克力/ 面包制品	低湿(IMF)	■		■	■
	干制			■	■
	巧克力奶	■		■	■
7. 动物饲料	低湿	■		■	
	干宠物食品	■			■

续附表 A.2

食品类型		霉菌和酵母菌	乳酸菌	细菌总数	大肠菌群	大肠杆菌
8. 意大利面食	未煮面条	■		■	■	
9. 杂品	敷料剂	■	■	■	■	■
	香料			■		■
	蛋黄酱	■	■	■		■
	鸡蛋及其制品			■	■	
	谷类(米饭)			■	■	
注：■表示需检测的食源致病菌。						

附表 A.3 列入附表 A.1 和附表 A.2 食品类中代表性食品实例

食品分类	代表性食品实例
1. 肉制品	绞碎牛肉、绞碎猪肉、肉产品、腺体产品、蛙腿、兔肉畜体、羊羔、香肠、法兰克福香肠、午餐肉、牛肉干、代肉品
2. 家禽	绞碎鸡肉、绞碎火鸡肉、煮熟的鸡肉、生鸡肉块
3. 鱼类和海产品	生虾、炸鱼排、鱼酱、生鱼片、生牡蛎、生贻贝、生蛤、煮熟的小龙虾、烟鱼、巴斯德消毒螃蟹肉
4. 水果和蔬菜制品	新鲜(冷冻)水果或干果、橙汁、苹果汁、苹果酒、西红柿汁、瓜片、浆果、美洲山核桃、胡桃、花生酱、椰子、杏仁、莴苣、菠菜、羽衣甘蓝、羽衣甘蓝叶、卷心菜、豆芽、种子芽、豆芽(种子芽)下脚水、豌豆、蘑菇、青豆
5. 乳制品	酸乳酪、白软干酪、硬的和软的干酪、生的和巴斯德消毒的牛奶、婴儿配方奶粉、咖啡稀奶油、干酪乳、干酪喷剂
6. 巧克力/面包制品	霜冻混合物、糖果及其包装、奶油巧克力
7. 动物饲料	干宠物食品、肉和骨头、鸡肉和带羽毛的鸡肉
8. 生面食	未煮熟的面条、通心面、意大利式细面条
9. 杂品	带壳鸡蛋、液态全蛋、罐装鸡蛋食品、干全蛋或干蛋黄、干蛋白、牛至、胡椒粉、红辣椒、黑辣椒、白胡椒、芹菜种子或芹菜片、红辣椒粉、孜然、欧芹片、迷迭香、芝麻籽、百里香、蔬菜片、洋葱片、洋葱粉、大蒜片、多香果、小麦粉干酪素、蛋糕混合物、乳清、脱脂干奶、干全奶、玉米面、干全蛋或干蛋黄、干蛋白、大豆粉、干酵母粉、谷类食品、干酪乳、干酪喷剂

## 菌落总数测试不确定度评估报告

### 1 前言

本报告旨在说明本实验室依照 1995 年版 ISO 测量不确定度表示指南,分析评估本实验室菌落总数测试的测量不确定度的评定方法与结果。

### 2 菌落总数测试程序

- 1) 培养基及稀释液配制;
- 2) 样品的处理;
- 3) 样品稀释;
- 4) 微生物培养;
- 5) 菌落计数。

菌落总数测试的主要过程未使用任何设备进行量测,所以误差的来源均为人为操作的随机误差,适合用 A 类的评估方式。可以下列方式进行评估:

(1) 一项产品至少准备 15 组样品作重复测试,每一个样品必须包含可计算得出数目的微生物。

(2) 这些微生物测试应在实验室由不同人员进行一段时间,但重复测试的部分必须由同一位测试人员执行。

(3) 必须建立重复测试的步骤,例如样品之重复次数、重复样品之均匀性、重复样品之稀释。

### 3 试验与不确定度评估数学模式

菌落总数测试必须作重复性测试,再取二次测试的平均值而得到结果。

即测试结果为  $B$ , 则  $B = \frac{B_1 + B_2}{2}$ 。

若假设每次试验结果均为真值加上应修正之变异值,则

$$B = \frac{(B_T + e_1) + (B_T + e_2)}{2}$$

$$B = B_T + \bar{e}_{\dots} \dots\dots\dots(1)$$

因此根据量测不确定度传播定律,可得出式(2):

$$u_B^2 = u_{BT}^2 + u_e^2 \dots\dots\dots(2)$$

## 4 标准不确定度评估

### 4.1 生菌数真值之标准不确定度 $u_{BT}$

由于真值没有可能变异,所以标准不确定度  $u_{BT} = 0$ 。

### 4.2 人员、环境等随机效应所造成之可能变异的标准不确定度 $u_c$

本测试的唯一误差来源为人员、样品及环境等随机效应所造成之不确定度,计算方式如下:

- (1) 每组重复样品之测试结果称为  $X_1$  及  $X_2$ 。
- (2) 计算每个测试结果的  $\lg$  值。
- (3) 计算每一组重复测试结果  $\lg$  值的差值。
- (4) 所得之差值开平方。
- (5) 每一组差值的平方相加并除以总样品数目得到变异数。
- (6) 变异数开根号后得到标准偏差。

使用的公式见式(3):

$$S = \left[ \frac{\sum_{i=1}^P (n_i - 1) S_i^2}{\left[ \sum_{i=1}^P n_i \right] - P} \right]^{1/2} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

$S_i$ ——由第  $i$  个样品所得之标准偏差;

$n_i$ ——第  $i$  个样品重复测试之数目;

$\sum_{i=1}^P n_i$ ——所有测试数目;

$P$ ——样品之数目;

$\left[ \sum_{i=1}^P n_i \right] - P$ ——自由度。

因每一组样品重复次数  $n$  均等于 2,所以由第  $i$  个样品所得之标准偏差  $S_i =$

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

可将式(3)简化为:

$$S = \sqrt{\frac{1}{2P} \sum_{i=1}^P (X_{i1} - X_{i2})^2} \dots\dots\dots(4)$$

其中  $X_{i1} - X_{i2}$  为每一组样品重复测试之差值。

若测试 15 组样品,而每组样品均测试 2 次,测试结果如附表 5-1 所示,则依照式(4)计算:

$$S = \sqrt{\frac{0.092\ 219}{30}} = 0.055$$

所以标准不确定度  $u_x = \frac{0.055}{\sqrt{2}} = 0.0389$ 。

附表 5-1 一项产品准备 15 个样品重复测试之结果

样品编号	重复测试		取 lg 值		差值	(差值) <sup>2</sup>
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	d=L <sub>1</sub> -L <sub>2</sub>	d <sup>2</sup>
1	2 300	2 900	3.361 7	3.462 4	0.100 7	0.010 140
2	360	290	2.556 3	2.462 4	0.093 9	0.008 817
3	540	500	2.732 4	2.699 0	0.033 4	0.000 111 6
4	57	65	1.755 9	1.812 9	0.057 0	0.003 249
5	89	71	1.949 4	1.851 3	0.098 1	0.009 624
6	110	121	2.041 4	2.082 8	0.041 4	0.001 714
7	4 400	5 600	3.643 5	3.748 2	0.104 7	0.010 962
8	450	470	2.653 2	2.672 1	0.018 9	0.000 357
9	225	290	2.352 2	2.462 4	0.110 2	0.012 144
10	56	69	1.748 2	1.838 8	0.090 6	0.008 208
11	950	880	2.977 7	2.944 5	0.033 2	0.001 102
12	840	630	2.924 3	2.799 3	0.125 0	0.015 625
13	1 100	990	3.041 4	2.995 6	0.045 8	0.002 098
14	670	650	2.826 1	2.812 9	0.013 2	0.000 174
15	95	115	1.977 7	2.060 7	0.083 0	0.006 889
标准偏差=0.092 219						

## 5 合成标准不确定度

依照式(2),计算合成标准不确定度为 0.038 9。

附表 5-2 组合标准不确定度计算表

不确定度来源	不确定度	分配系数	标准不确定度 $u_i$	敏感系数 $c_i$	$u_i \times c_i$	$(u_i \times c_i)^2$
随机效应	0.055	2	0.038 9	1	0.038 9	0.038 9 <sup>2</sup>
$\Sigma(u_i \times c_i)^2 = 0.038 9^2$						
$u_f = 0.038 9$						

## 6 扩展不确定度

由  $t$  分配之概率表,可查得在 95% 置信水平,自由度为 15 时之  $t$  值等于 2.13,因此在 95% 置信水平时,若以对数  $\lg$  的方式表示此测试方法之不确定度时,其值如下:

$$\lg X = \frac{\lg X_1 + \lg X_2}{2} \pm (0.0389 \times 2.13) = \frac{\lg X_1 + \lg X_2}{2} \pm 0.083$$

$X$  为测试结果,  $X_1$ 、 $X_2$  为重复测试的结果,所以在 95% 之信赖水准时,此测试方法之不确定度为 0.083。

以第一个样品为例,两组结果 2 300 及 2 900 之  $\lg$  值的平均值为 3.412 1,因此  $\lg$  值的结果为  $3.412 1 \pm 0.083$ ,即分布于 3.329 1~3.459 1 之间。取反对数  $\text{antilg}$  之值,其结果分布于 2 133~3 126 之间。

# 互联网上的食品微生物资源

随着信息科学技术的发展,文献载体的多样化,人们获取信息的方式发生了很大的变化。过去,要获得这方面的信息主要是通过联机检索、光盘检索及手工检索等方式,随着互联网的迅速发展,互联网上蕴涵着丰富的信息资源,可在全球范围内迅速、方便地实现信息数据共享。现在,食品科研人员可以从丰富的数据库和网站中获得食品科学方面的信息。可以说,高度发展的网际互联为食品科学的信息交流、资源共享和国际合作带来了前所未有的机会。

在食品科学研究中,为了检索有关信息,了解食品科学发展动向,占用了食品科学研究人员大量宝贵时间,研究如何从浩如烟海的互联网信息中有效地开发和利用这些资源,是信息化社会每位食品科学工作者必须掌握的基本技能,探索如何充分利用 Internet 网络及时获得信息,对避免低水平重复和开拓新的研究领域,有着非常重要的现实意义。

互联网上的食品微生物资源很多,一般可以利用搜索引擎、专业的集成化数据库网站和食品微生物相关的专业网站来获取相关信息。

## 一、利用综合搜索引擎

要在互联网上检索某一领域的内容,最有效快捷的方法是利用搜索引擎。常用的搜索引擎包括:

### 1. Google(<http://www.google.com>)

Google 目前规模最大的搜索引擎,属于全文(full text)搜索引擎,提供常规及高级搜索功能,允许以多种语言进行搜索。以 google 为例,如要检索微生物方面的资料,只要在进入 google 主页后键入关键词“微生物”或“microbiology”即可检索到大量相关中文或英文资料,并可获得相关网址。目前大多数搜索引擎都提供针对文件属性的搜索,比如要搜索食品微生物教学的课件,可以在 google 中键入“食品微生物 ppt”,这样会搜索出很多 ppt 课件,如果搜索“食品微生物 pdf”就可以得到很多与食品微生物学相关的文献资料。

### 2. Serach.com(<http://www.search.com>)

全球性的英文搜索引擎。

### 3. 百度(<http://www.baidu.com>)

全球最大的中文搜索引擎。

### 4. 天网(<http://e.pku.edu.cn>)

除网页搜索外,有较强的文件搜索能力,特别是对 ftp 文件资源对搜索功能。

## 二、集成化数据库信息网站

1. 万方数据资源系统(<http://www.wanfangdata.com.cn>):数据库包括:如中国学位论文类数据库、中国会议论文数据库、中国科技成果数据库、专利技术数据库、中外标准数据库、科技文献数据库一级数字化期刊数据库等,从中可以查阅获取大量食品微生物信息资源。

2. 中国期刊网(<http://www.cnki.net>):数据库包括:中国期刊全文数据库、中国优秀博硕士学位论文全文数据库、中国重要会议论文全文数据库、中国重要报纸全文数据库、中国图书全文数据库、中国年鉴全文数据库等,其中期刊题录数据库提供免费服务,全文检索要收费,其检索方法分专项检索和组合检索。

3. 维普数据资源系统(<http://www.cqvip.com>)。

4. 国家科技图书文献中心(<http://www.nstl.gov.cn>)。

5. 科学引文索引(<http://www.isinet.com>)。

6. PUBMED(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>)。

7. Elsevier SDOS(<http://www.sciencedirect.com/>)。

8. Springer Link 清华大学图书馆镜像(<http://springer.lib.tsinghua.edu.cn/>)。

9. WorldScinet 清华大学图书馆镜像(<http://worldscinet.lib.tsinghua.edu.cn/>)。

## 三、相关食品微生物专业网站

### 1. 实验室管理相关网站

(1) 亚太实验室认可合作组织(Asia Pacific Laboratory Accreditation Co-operation, APLAC);<http://www.aplac.org>

其下属实验室能力验证委员会成立于1994年,其作用和职责是全面负责协调APLAC成员认可实验室的能力验证计划的各项工作,包括能力验证计划的组织、实施、相关研讨会的召开以及培训课程的开展等。具体工作内容包括:

① 能力验证相关政策、程序的档案管理和定期审查;

② 调查APLAC成员对实验室比对的需求;

③ 设计、组织和报告能力验证计划和水平评估;

④ 选择适当的认证机构推动验证计划的施行;

⑤ 验证计划结果报告定稿、发布前的审查;

⑥ 与欧洲认可合作组织(EA)和美洲认可合作组织(IAAC)协作,包括实验室能力验证计划在内的各种APLAC认可活动,根据国际实验室认可合作组织(ILAC)与APLAC相关协议,获得ILAC的认可。

(2) 英国中心科学实验室(Central Science Laboratory, CSL): <http://www.ptg.csl.gov.uk>

其下属机构实验室能力验证组(Proficiency Testing Group, PTG)早在1990年就开始提供食品检测实验能力验证服务。其拥有的FEPAS<sup>®</sup>(Food Examination Performance As-

essment Scheme)食品检测能力评估计划,属于食品微生物实验能力验证系列产品,最初于1997年由英国农业、渔业和食品部(Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, MAFF)设立,属于非盈利性的官方组织。

(3) 澳大利亚国家检测机构协会(National Association of Testing Authorities, NATA):<http://www.nata.asn.au>

现在是一个第三方的、从事实验室认可和企业质量体系认证工作的机构,由澳大利亚工业科学技术部(DIST)授权。开展验证试验活动。具体工作内容包括组织本国已获认可的实验室开展验证试验活动,协助组织 APLAC 各成员开展验证试验,以及与欧洲实验室认可合作组织(EAL)开展验证试验活动。

(4) 国际分析家家协会(American Organization of Analytical Chemists International, AOAC):<http://www.aoac.org/>

AOAC 始建于 1884 年, AOAC 一直致力完善方法检验,改善实验室管理。在过去 100 年期间, AOAC 在美国从一个小型化学家组织演变而来。

(5) 中国实验室国家认可委员会(China National Accreditation Board for Laboratories, CNAL):<http://www.cnal.org.cn/>。

## 2. 食品微生物检验方法相关网站

(1) 国际分析家协会(AOAC):<http://www.aoac.org/>;

(2) 国际食品法典委员会(CAC):<http://www.codexalimentarius.net/>,免费下载;

(3) 联合国粮农组织(FAO):<http://www.fao.org/>,免费下载;

(4) 国际食品微生物标准委员会(ICMSF):<http://www.icmsf.iit.edu/>,部分免费下载;

(5) 国际乳品业联合会(IDF):<http://www.fil-idf.org/>;

(6) 国际标准化组织(ISO):<http://www.iso.org/>;

(7) 北欧食品分析委员会(NMKL):<http://www.nmkl.org/>;

(8) 世界卫生组织(WHO):<http://www.who.org/>,部分免费下载;

(9) 加拿大健康署(Canada HPB)“Official Methods for the Microbiological Analysis of Foods”:<http://www.hc-sc.gc.ca/>,免费下载;

(10) 欧盟(EN)标准:<http://europa.eu.int/>,免费下载;

(11) 澳新食物标准协会(FSANZ):<http://www.foodstandards.gov.au/>,部分免费下载;

(12) 英国健康保护机构(HPA):<http://www.hpa-standardmethods.org.uk/>,免费下载;

(13) 英国食品标准局(Food Standards agency):<http://www.food.gov.uk/>,免费下载;

(14) 新西兰食品安全局(NZFSA)“National Microbiology Database”:<http://www.nzfsa.govt.nz/>,免费下载;

(15) 美国食品药品监督管理局(USA FDA)“Bacteriological Analytical Manual Online”:

<http://www.fda.gov/>,免费下载;

(16) 美国农业部(USDA)“Microbiology Laboratory Guidebook”; <http://www.fsda.gov/>,免费下载。

### 3. 食品微生物保质期预测软件免费下载网站

(1) ComBase; <http://www.ifr.ac.uk/combase/>;

(2) Growth Predictive Software; <http://www2.ifr.bbsrc.ac.uk/safety/growth/predictor/>;

(3) Listeria Monocytogenes Risk Assessment; <http://www.foodsafety.gov/~dms/>;

(4) Microbial Pathogen Data Sheets; <http://www.nzfsa.govt.nz/science-technology/>;

(5) Pathogen Modelling Program; <http://www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm>;

(6) Risk Assessment Calculator; <http://www.smas.schemeng.ntua.gr/>;

(7) Seafood Spoilage Predictor(SSP)v 1.1; <http://www.dfu.min.dk/micro/ssp>.

### 4. 国内外微生物菌种保藏机构及其网址

(1) 中国微生物菌种保藏管理委员会(China Committee of Culture Collection for Microorganisms, CCCCMM); <http://micronet.im.ac.cn/>

其下设7个分中心:中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)、中国农业微生物菌种保藏中心(ACCC)、中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)、中国医学微生物菌种保藏中心(CMCC)、中国抗生素微生物菌种保藏中心(CACC)、中国兽医微生物菌种保藏中心(CVCC)、中国林业微生物菌种保藏中心(CFCC)。

(2) 中国科学院典型培养物保藏委员会(The Committee on Type Culture Collection of Chinese Academy of Sciences, CTCCAS); <http://www.ctccas.ac.cn>。

其下设9个库,分别是:中国普通微生物保藏管理中心(CGMCC);中国病毒保藏中心(CCGVCC);细胞库;昆明细胞库;基因库;植物离体种质库(IVPGC);稀有濒危特有植物种质库(REPE);海洋生物种质库及淡水藻种库(FACHB)。

(3) 中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC),也称武汉大学保藏中心; <http://www.cctcc.org>。

(4) 世界培养物保藏联合会(World Federation for Culture Collection, WFCC); <http://www.wfcc.info>。

(5) 世界微生物数据中心(WFCC-MIRCEN World Data Center for Microorganisms, WDCM); <http://wdcn.nig.ac.jp>。

(6) 欧洲培养物保藏组织(European Culture Collections Organizations, ECCO); <http://www.eccosite.org>。

(7) 国际菌根真菌保藏中心(International Culture Collection of VA Mycorrhizal Fungi, INVAM); <http://invam.caf.wvu.edu>。

(8) 美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC); <http://www.atcc.org>。

(9) 美国农业部菌种保藏中心(Agricultural Research Service Culture Collection,

ARS): <http://nrrl.ncaur.usda.gov>。

(10) 英国国家微生物菌种保藏中心(The United Kingdom National Culture Collection, UKNCC): <http://www.uknee.co.uk>。

(11) 英国国家典型培养物保藏中心(National Collection of Type Cultures, NCTC): <http://www.phls.co.uk/services/nctc/index.htm>。

(12) 英国酵母菌种保藏中心(National Collection of Yeast Cultures, NCYC): <http://www.ifrn.bbsrc.ac.uk/ncyc>。

(13) 荷兰细菌菌种保藏中心(The Netherlands Culture Collection of Bacteria, NCCB): <http://www.cbs.knaw.nl/nccb>。

(14) 荷兰真菌菌种保藏中心(Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands, CBS): <http://www.cbs.knaw.nl>。

(15) 比利时微生物菌种保藏中心(Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, BCCM): <http://www.belspo.be/bccm/bccm.htm>。

## 5. 风险分析网站

(1) 食品安全风险分析交换网(Food Safety Risk Analysis Clearinghouse): <http://www.foodriskclearinghouse.umd.edu/>;

(2) 欧盟风险分析信息网(European Union-risk analysis information network): <http://www.eu-rain.com/>;

(3) 肉制品微生物风险评估网(Microbial Risk Assessment of Meat Products): <http://smas.chemeng.ntua.gr/miram/?module=links>。

## 6. 其他有用网站

(1) 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局: <http://www.aqsiq.gov.cn>;

(2) 中华人民共和国国家食品药品监督管理局: <http://www.sda.gov.cn>;

(3) 中华人民共和国卫生部: <http://www.moh.gov.cn>;

(4) 中华人民共和国农业部: <http://www.agri.gov.cn>;

(5) 中国食品安全资源网: <http://www.fsr.org.cn>;

(6) 食品伙伴网: <http://www.foodmate.net>;

(7) 国际微生物联合会(International Union of Microbiology Society): <http://www.iuims.org/>;

(8) 美国微生物协会(American society for microbiology, ASM): <http://www.asm.org/>;

(9) 冷冻食品协会(Chilled Food Association): <http://www.chilledfood.org/>;

(10) 加拿大食品检验局(The Canadian Food Inspection Agency, CFIA): <http://www.inspection.gc.ca>;

(11) MEDLINE 数据库: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>;

(12) 微生物世界数据库: <http://wdbm.nig.ac.jp/>。

随着互联网技术的迅猛发展,互联网上资源将越来越丰富,信息的交流将会越来越方

便,食品科技人员应该学会充分利用互联网技术,获取更多的信息,和同行进行更多的交流,不断提高自己的技术水平。

# 附录 7

## MPN 表

附表 7-1 3×1 g (mL)、3×0.1 g (mL)、3×0.01 g (mL) 序列 MPN 表

阳性样品数 结果序列			MPN	根据测定数的分类					可信限			
				1	2	3	5	10	>95%		>99%	
0	0	0	<0.30						0.00	0.94	0.00	1.40
0	0	1	0.30	3	2	2	2	1	0.01	0.95	0.00	1.40
0	1	0	0.30	2	1	1	1	1	0.01	1.00	0.00	1.60
0	1	1	0.61	0	3	3	3	3	0.12	1.70	0.05	2.50
0	2	0	0.62	3	2	2	2	1	0.12	1.70	0.05	2.50
0	3	0	0.94	0	0	0	0	3	0.5	3.50	0.18	4.60
1	0	0	0.36	1	1	1	1	1	0.02	1.70	0.01	2.50
1	0	1	0.72	0	2	1	1	1	0.12	1.70	0.05	2.50
1	0	2	1.1	0	0	0	3	3	0.4	3.5	0.2	4.6
1	1	0	0.74	1	1	1	1	1	0.13	2.00	0.06	2.70
1	1	1	1.1	3	3	2	2	2	0.4	3.5	0.2	4.6
1	2	0	1.1	2	2	1	1	1	0.4	3.5	0.2	4.6
1	2	1	1.5	3	3	3	3	2	0.5	3.8	0.2	5.2
1	3	0	1.6	3	3	3	3	2	0.5	3.8	0.2	5.2
2	0	0	0.92	1	1	1	1	1	0.15	3.50	0.07	4.60
2	0	1	1.4	2	1	1	1	1	0.4	3.5	0.2	4.6
2	0	2	2.0	0	3	3	3	3	0.5	3.8	0.2	5.2
2	1	0	1.5	1	1	1	1	1	0.4	3.8	0.2	5.2
2	1	1	2.0	2	2	1	1	1	0.5	3.8	0.2	5.2
2	1	2	2.7	0	3	3	3	3	0.9	9.4	0.5	14.2
2	2	0	2.1	1	1	1	1	1	0.5	4.0	0.2	5.6
2	2	1	2.8	3	2	2	2	1	0.9	9.4	0.5	14.2
2	2	2	3.5	0	0	0	0	3	0.9	9.4	0.5	14.2
2	3	0	2.9	3	2	2	2	1	0.9	9.4	0.5	14.2

续附表 7-1

阳性样品数 结果序列			MPN	根据测定数的分类					可信限			
				1	2	3	5	10	>95%		>99%	
2	3	1	3.6	0	3	3	3	3	0.9	9.4	0.5	14.2
3	0	0	2.3	1	1	1	1	1	0.5	9.4	0.5	14.2
3	0	1	3.8	1	1	1	1	1	0.9	10.4	0.5	15.7
3	0	2	6.4	3	3	2	2	2	1.6	18.1	1.0	25.0
3	1	0	4.3	1	1	1	1	1	0.9	18.1	1.0	25.0
3	1	1	7.5	1	1	1	1	1	1.7	19.9	1.1	27.0
3	1	2	12	3	2	2	2	1	3	36	2	44
3	1	3	16	0	0	0	3	3	3	38	2	52
3	2	0	9.3	1	1	1	1	1	1.8	36.0	1.2	43.0
3	2	1	15	1	1	1	1	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	1	1	1	1	3	40	2	56
3	2	3	29	3	3	3	2	2	9	99	5	152
3	3	0	24	1	1	1	1	1	4	99	3	152
3	3	1	46	1	1	1	1	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	1	1	1	1	20	400	10	570
3	3	3	>110									

附表 7-2 5×1 g(mL)、5×0.1 g(mL)、5×0.01 g(mL)序列 MPN 表

阳性样品数 结果序列			MPN	根据测定数的分类					可信限			
				1	2	3	5	10	>95%		>99%	
0	0	0	<0.18						0.00	0.65	0.00	0.93
0	0	1	0.18	2	2	2	1	1	0.00	0.65	0.00	0.93
0	1	0	0.18	1	1	1	1	1	0.01	0.65	0.00	0.93
0	1	1	0.36	3	3	3	2	2	0.07	0.99	0.02	1.40
0	2	0	0.37	3	2	2	2	1	0.07	0.99	0.02	1.40
0	2	1	0.55	0	0	0	3	3	0.17	1.40	0.09	2.10
0	3	0	0.56	0	3	3	3	3	0.17	1.40	0.09	2.10
1	0	0	0.20	1	1	1	1	1	0.02	0.99	0.01	1.40
1	0	1	0.40	2	1	1	1	1	0.07	1.00	0.02	1.40
1	0	2	0.60	0	0	3	3	3	0.17	1.40	0.09	2.10

续附表 7-2

阳性样品数 结果序列			MPN	根据测定数的分类					可信限			
				1	2	3	5	10	>95%		>99%	
1	1	0	0.40	1	1	1	1	1	0.07	1.10	0.03	1.40
1	1	1	0.61	3	2	2	2	1	0.17	1.40	0.09	2.10
1	1	2	0.81	0	0	0	0	3	0.33	2.20	0.20	2.80
1	2	0	0.61	2	1	1	1	1	0.18	1.40	0.09	2.10
1	2	1	0.82	3	3	3	3	2	0.33	2.20	0.20	2.80
1	3	0	0.83	3	3	3	3	2	0.33	2.20	0.20	2.80
1	3	1	1.0	0	0	0	0	3	0.3	2.2	0.2	2.8
1	4	0	1.1	0	0	0	0	3	0.3	2.2	0.2	2.8
2	0	0	0.45	1	1	1	1	1	0.08	1.40	0.04	2.10
2	0	1	0.68	2	1	1	1	1	0.18	1.50	0.09	2.10
2	0	2	0.91	0	3	3	3	3	0.33	2.20	0.20	2.80
2	1	0	0.68	1	1	1	1	1	0.19	1.70	0.10	2.30
2	1	1	0.92	2	2	1	1	1	0.33	2.20	0.20	2.80
2	1	2	1.2	0	0	3	3	3	0.4	2.5	0.2	3.4
2	2	0	0.93	1	1	1	1	1	0.34	2.20	2.20	2.80
2	2	1	1.2	3	3	2	2	2	0.4	2.5	0.2	3.4
2	2	2	1.4	0	0	0	0	3	0.6	3.4	0.4	4.4
2	3	0	1.2	3	2	2	2	1	0.4	2.5	0.2	3.4
2	3	1	1.4	0	3	3	3	3	0.6	3.4	0.4	4.4
2	4	0	1.5	0	3	3	3	3	0.6	3.4	0.4	4.4
3	0	0	0.78	1	1	1	1	1	0.21	2.20	0.12	2.80
3	0	1	1.1	1	1	1	1	1	0.4	2.2	0.2	2.9
3	0	2	1.3	3	3	3	2	2	0.6	3.4	0.4	4.4
3	1	0	1.1	1	1	1	1	1	0.4	2.5	0.2	3.4
3	1	1	1.4	2	1	1	1	1	0.6	3.4	0.4	4.4
3	1	2	1.7	3	3	3	3	2	0.6	3.4	0.4	4.4
3	2	0	1.4	1	1	1	1	1	0.6	3.4	0.4	4.4
3	2	1	1.7	2	2	2	1	1	0.7	3.9	0.5	5.1
3	2	2	2.0	0	3	3	3	3	0.7	3.9	0.5	5.2

续附表 7-2

阳性样品数 结果序列			MPN	根据测定数的分类					可信限			
				1	2	3	5	10	>95%		>99%	
3	3	0	1.7	2	2	1	1	1	0.7	3.9	0.5	5.2
3	3	1	2.1	3	3	3	2	2	0.7	3.9	0.5	5.2
3	3	2	2.4	0	0	0	3	3	1.0	6.6	0.7	9.4
3	4	0	2.1	3	3	2	2	2	0.7	3.9	0.5	5.2
3	4	1	2.4	0	3	3	3	3	1.0	6.6	0.7	9.4
3	5	0	2.5	0	0	0	3	3	1.0	6.6	0.7	9.4
4	0	0	1.3	1	1	1	1	1	0.4	3.4	0.3	4.4
4	0	1	1.7	1	1	1	1	1	0.6	3.4	0.4	4.4
4	0	2	2.1	3	2	2	2	2	0.7	3.9	0.5	5.2
4	1	0	1.7	1	1	1	1	1	0.6	3.9	0.4	5.1
4	1	1	2.1	1	1	1	1	1	0.7	4.1	0.5	5.3
4	1	2	2.6	3	3	2	2	2	1.0	6.6	0.7	9.4
4	1	3	3.1	0	0	0	0	3	1.0	6.6	0.7	9.4
4	2	0	2.2	1	1	1	1	1	0.7	4.8	0.5	6.1
4	2	1	2.6	2	1	1	1	1	1.0	6.6	0.7	9.4
4	2	2	3.2	3	3	3	2	2	1.0	6.6	0.7	9.4
4	2	3	3.8	0	0	0	0	3	1.3	10.0	0.9	14.7
4	3	0	2.7	1	1	1	1	1	1.0	6.6	0.7	9.4
4	3	1	3.3	2	2	1	1	1	1.0	6.6	0.7	9.4
4	3	2	3.9	3	3	3	3	2	1.3	10.0	0.9	14.7
4	4	0	3.4	2	2	1	1	1	1.3	10.0	0.9	14.7
4	4	1	4.0	3	3	2	2	2	1.3	10.0	0.9	14.7
4	4	2	4.7	0	0	0	3	3	1.4	11.3	0.9	14.7
4	5	0	4.1	3	3	3	3	2	1.3	10.0	0.9	14.7
4	5	1	4.8	0	0	3	3	3	1.4	11.3	0.9	14.7
5	0	0	2.3	1	1	1	1	1	0.7	6.6	0.5	9.4
5	0	1	3.1	1	1	1	1	1	1.0	6.6	0.7	9.4
5	0	2	4.3	3	2	2	2	1	1.3	10.0	0.9	14.7
5	0	3	5.8	0	0	0	3	3	2.1	14.9	1.4	20.0

附录7 MPN表

续附表 7-2

阳性样品数 结果序列			MPN	根据测定数的分类					可信限			
				1	2	3	5	10	>95%		>99%	
5	1	0	3.3	1	1	1	1	1	1.0	10.0	0.7	14.7
5	1	1	4.6	1	1	1	1	1	1.4	11.3	0.9	14.7
5	1	2	6.3	2	2	1	1	1	2.1	14.9	1.4	20.0
5	1	3	8.4	3	3	3	3	2	3.4	22.0	2.1	27.0
5	2	0	4.9	1	1	1	1	1	1.5	14.9	0.9	20.0
5	2	1	7.0	1	1	1	1	1	2.2	16.8	1.4	23.0
5	2	2	9.4	2	2	1	1	1	3.4	22.0	2.1	28.0
5	2	3	12	3	3	2	2	2	3	24	2	32
5	2	4	15	0	0	0	0	3	6	35	4	45
5	3	0	7.9	1	1	1	1	1	2.3	22.0	1.5	27.0
5	3	1	11	1	1	1	1	1	3	24	2	32
5	3	2	14	1	1	1	1	1	5	35	3	45
5	3	3	17	3	2	2	2	1	7	39	4	51
5	3	4	21	3	3	3	3	2	7	39	4	51
5	4	0	13	1	1	1	1	1	3	35	3	45
5	4	1	17	1	1	1	1	1	6	39	4	51
5	4	2	22	1	1	1	1	1	7	44	4	57
5	4	3	28	2	1	1	1	1	10	70	6	92
5	4	4	35	2	2	2	1	1	10	70	6	92
5	4	5	43	0	0	3	3	3	15	106	9	150
5	5	0	24	1	1	1	1	1	7	70	4	92
5	5	1	35	1	1	1	1	1	10	106	6	150
5	5	2	54	1	1	1	1	1	15	166	10	223
5	5	3	92	1	1	1	1	1	23	253	15	338
5	5	4	160	1	1	1	1	1	40	460	20	620
5	5	5	>160									



## 内 容 简 介

本书以ISO/IEC 17025: 2005的25个要素为主线, 紧密结合食品微生物的专业要求, 融入国内外先进的规章、标准、实验室质量管理理念和管理模式, 从质量管理体系、实验室设施和环境条件、人员和组织、分包和客户服务、文件、记录的管理和控制、实验室的生物安全管理、样品、实验室设备、实验器具和材料、微生物检验方法、内部质量控制和外部质量评估、微生物测量不确定度的评定、结果的处理和报告、移动微生物实验室的质量控制等方面提出相应的质量管理措施。本书整体架构设置全面、合理, 资料丰富, 与实际工作密切联系, 具有较强的系统性、前瞻性、实用性和可操作性。

本书面向农业部门、质检部门、卫生部门、高等院校、食品生产企业及相关领域从事食品微生物检验和管理的业务人员(包括管理层、检验人员和后勤保障人员等), 可作为学习培训及日常工作参考指导书, 对食品微生物实验室进行认可的机构亦有一定的参考价值。

ISBN 7-5066-4065-1



9 787506 640657 >

策划编辑: 魏丽萍  
责任编辑: 杨 玮  
封面设计: 李冬梅  
版式设计: 李 玲  
责任校对: 罗 莉  
责任印制: 邓成友

ISBN 7-5066-4065-1/TB · 1637

定价: 50.00 元