

金黄色葡萄球菌标准物质的定值方法

郑洁¹, 柯璐^{1,2}, 张温玲^{1,2}, 戴晓丽^{1,2}, 杨玮玮³, 郑晶^{1,2}

(1. 福建出入境检验检疫局技术中心, 福建 福州 350003; 2. 福建省检验检疫技术研究重点实验室, 福建 福州 350003; 3. 福建农林大学 动物科学学院, 福建 福州 350001)

摘要: 对含鸡肉基质的金黄色葡萄球菌标准物质进行定值, 包括金黄色葡萄球菌计数方式的选择, 标准值的测定, 以及不确定度的分析。总不确定度以扩展不确定度表示。结果显示, 金黄色葡萄球菌 3 种计数方式, BP 平板倾注法计数结果与 PCA 计数法测定一致, BP 平板倾注法 SD 值 < BP 平板涂布法 SD 值, 表明采用 BP 平板倾注法计数金黄色葡萄球菌的结果精密度、再现性较好, 有利于试验结果的复现。标准值测定结果为 275 CFU/瓶; 总不确定度为 6。因此, 标准物质定值结果为 (275±6) CFU/瓶。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 标准物质; 定值; 不确定度

中图分类号: TS 201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)09—0972—06

Discussion About the Fixed Value Method of *Staphylococcus aureus* Reference Materials

ZHENG Jie¹, KE Lu^{1,2}, ZHANG Wenlin^{1,2}, DAI Xiaoli^{1,2}, YANG Weiwei³, ZHENG Jin^{1,2}

(1. Technology Center, Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350003, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Inspection and Quarantine Technology Research, Fuzhou 350003, China; 3. Animal Science College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350001, China)

Abstract: To quantify the SD value of *Staphylococcus aureus* Reference Materials in chicken matrix, the *S. aureus* counting methods, the standard values and the uncertainty were analyzed in this study. As compared to the results of three different *S. aureus* counting methods, BP pouring counting method showed the same result with PCA counting method, The SD value of BP tablet pouring method was smaller as compared to BP tablet coating method. The BP tablet pouring counting showed good precision and reproducibility. The SD values was 275 CFU/bottles and the total uncertainty was 6, the Reference Materials constant value was (275 + 6) CFU/bottle.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, reference materials, fixed value, uncertainty

标准物质的定值是对标准物质特性量赋值的全过程。标准物质作为计量工具的一种, 必须保证

其复现、保存和传递量值的特性, 因此必须保证标准物质的量值具有溯源性, 继而就必须对标准物质

收稿日期: 2014-09-01

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2012IK149)。

作者简介: 郑洁(1981—), 女, 青海西宁人, 高级工程师, 主要从事分析化学研究。E-mail: 2210646@qq.com

* 通信作者: 郑晶(1973—), 女, 福建福州人, 理学硕士, 研究员, 主要从事食品微生物检测及其研究。E-mail: fjciqzj@qq.com

研制单位进行计量认证,对所用的分析测量方法进行研究,对测量结果的不确定度进行分析。金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)是引起食物中毒的常见致病菌,在公共卫生学上具有重要意义。作者对含鸡肉基质的金葡菌菌体标准物质的定值方法进行了对比研究,建立了该标准物质的定值方式,给今后同类型标准物质的定值验证提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验样本

试验样本(含鸡肉基质的金黄色葡萄球菌标准物质),批次编号为JP0212,由作者所在实验室提供。样品检测前进行了均匀性和稳定性试验,在随后统计分析评价中可以忽略样品不稳定性和不均匀性的影响。

1.2 仪器与设备

KD-2100TBC 电子天平,福建科迪技术有限公司制造;SHKE4450 型台式恒温振荡器,美国 Thermo 公司制造;可调移液器(100~1 000 μL),芬兰雷勃(中国)公司制造;BC/BD-718A 冷藏冷冻箱,青岛海尔特种电冰柜有限公司制造;PHW-165Q 恒温培养箱,中科生命科技有限公司研制;MU-425-400E 生物安全柜,美国 NUAIRE 公司制造;MS3 DIGITAL 涡旋振荡器,德国 IKA 公司制造;Stomacher3500 型拍击式均质器,英国 WARD 公司制造;HV-85 型自动高压灭菌器,日本 HIRYAMA 公司制造。

1.3 主要培养基的配制

营养肉汤、平板计数琼脂(PCA)、脑心浸出液肉汤(BHI 肉汤)、Baird-Parker 培养基(BP 培养基),均购自北京陆桥。

2 试验方法

2.1 金黄色葡萄球菌菌落计数方法的选择试验

2.1.1 试验菌液制备 将新鲜培养的菌悬液(含菌量约为 3.6×10^7 CFU/mL)涡旋均匀,吸取 1 mL 加入 9 mL 无菌生理盐水,制成体积比 1:10 的稀释液,再依次进行 10 倍递增稀释,使菌液稀释液的最终含菌量在 100 CFU/mL 左右。

2.1.2 试验方法 分别采用 PCA 计数法、Baird-Parker 倾注法、Baird-Parker 平板涂布法 3 种计数方法,对 2.1.1 项所述制备的试验菌液进行计数。

1)PCA 计数法:吸取 1 mL 制备的菌液稀释液置于无菌培养皿中,然后倒入 15 mL 冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 的琼脂计数培养基,摇匀。待平板冷却凝固后,在 (36 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 下倒置培养 18~24 h;

2)BP 倾注法:吸取 1 mL 制备的菌液稀释液,倾注入 15 mL 冷却至 42 $^{\circ}\text{C}$ 的 BP 培养基,摇匀。待平板冷却凝固后,在 (36 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 下倒置培养 18~24 h;

3)BP 平板涂布法:取 3 片制好的 BP 琼脂平板,将制备的菌液稀释液以 0.2、0.3、0.4 mL 的量分别加入到 3 个平板中(根据 GB4789.10-2010 规定),用无菌三角推棒将菌液涂布整个平板,静置 10 min,待菌液吸收完全后,在 (36 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 下倒置培养 18~24 h。

以上 3 组试验各进行 10 次平行测定,同时用无菌生理盐水做空白对照,培养后观察结果。

2.1.3 结果判定 计数在 BP 平板上菌落直径为 2~3 mm,颜色呈灰色到黑色,边缘为淡色,周围为一混浊带,其外层有一透明圈,用接种针接触菌落有似奶油至树胶样硬度的菌落。记录具有该典型特征的金黄色葡萄球菌的菌落数。

2.2 样本标准值的检测

本标准物质冷冻干燥后的脱水率为 17.57%,冻干后的质量约为 2 g,根据标准物质冻干前后的质量差,吸取 7 mL 无菌水对冻干物质进行溶解复原。检测步骤如下:

1)用酒精棉球擦拭冻干瓶丁基胶塞,待冻干物恢复至室温后检测;

2)用镊子取下丁基胶塞,倒置放于桌面;

3)加入 7 mL 无菌水对冻干物进行溶解,静置 2 min;

4)加入 9 mL 无菌水,盖上丁基胶塞,于涡旋仪上高速混匀 1 min,制成体积比 1:2 的菌悬液原液;

5)用镊子取下丁基胶塞,倒置放于桌面,用平头移液管吸取 1 mL 菌悬液原液注于盛有 9 mL 无菌生理盐水的试管中,旋好试管盖后于涡旋仪上高速混匀 10 s,制成 10^{-1} 的菌悬液,依次制备 10^{-2} 的菌悬液;

6)分别吸取上述 10^{-1} 、 10^{-2} 的菌悬液进行计数。标准值检测方式根据 2.1 项试验结果决定。

2.3 标准物质不确定度评定

2.3.1 金黄色葡萄球菌菌落总数测定的不确定度评估 随机抽取 15 份样品,每份样品作 2 个平行

测试,按照 2.1 试验选择的计数方法,对这些样品进行菌落计数,再利用贝塞尔计算公式计算出检测结果对数值标准偏差合并样本的标准差,从而计算出不确定度。

2.3.2 标准物质的定值方法不确定度评估 根据对标准物质均匀性不确定度的评估结果,对标准物质定值方法进行不确定度评估。所用的评估方法与金黄色葡萄球菌菌落总数测定的不确定度评估相同。

2.3.3 电子天平的不确定度评估 电子天平不确定度评估的参考测量依据:JJG99-2006《砝码检定规程》;JJG1036-2008《电子天平检定规程》;JJF1059-1999《测量不确定度评定与表示》。电子天平计量误差包括重复性误差、线性误差和四角误差 3 项。

试验过程采用德国制 Satorius BS200S-WEI 电子天平,最大量程为 310 g,测量分度 $d=1$ mg,检定分度 $e=10$ mg,线性误差 $\Delta i=2$ mg,四角误差 $\Delta c=1$ mg。本次试验所用砝码为加载最大标准砝码值 100 g 的 F1 等级。

3 结果与分析

3.1 不同金葡萄计数方式的比较

采用 PCA 计数法(A组)、Baird-Parker 倾注法(B组)、Baird-Parker 平板涂布法(C组)3种计数方法,对含菌量相同的金葡萄样液进行计数,结果如表 1 所示。

表 1 金葡萄 3 种计数方式的对比结果

Table 1 Comparison results of the *S.aureus* count methods

序号	A 组	B 组	C 组
1	78	88	81
2	72	75	81
3	84	73	64
4	85	86	76
5	79	81	86
6	82	79	61
7	86	84	75
8	77	75	74
9	75	82	67
10	84	86	60
平均值	80.2	80.9	72.5
标准偏差	4.71	5.26	9.06

对试验所得结果进行方差分析,分析结果见表 2。

表 2 方差分析结果

Table 2 Results of analysis of variance

计数方法	样品数	菌数($\bar{X} \pm S$)/(CFU/瓶)
A 组	10	80.2 $\pm$ 4.71 ^a
B 组	10	80.9 $\pm$ 5.26 ^{ab}
C 组	10	72.5 $\pm$ 9.06 ^{bb}

注:同列数据肩标大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$);小写字母不同表示差异显著($P<0.05$);相同表示差异不显著($P>0.05$)。

从表 2 可以看出,对 3 种不同计数方法所得数据进行方差分析,结果如下:BP 倾注法用于计数金黄色葡萄球菌,其计数结果与细菌总数测定一致,且从 SD 值来看,BP 平板倾注法小于 BP 平板涂布法,表明采用 BP 平板倾注法计数金黄色葡萄球菌的结果精密性、再现性较好,有利于试验结果的复现。据此,BP 倾注法相比于 BP 平板涂布法具有操作简便、结果稳定、再现性好的特点。本试验中所涉及金黄色葡萄球菌计数均采用 BP 倾注法。

3.2 样本标准值的检测结果

抽检的样品于同一时间同一试验条件下进行检测。试验结果及统计结果如表 3 所示。

表 3 标准物质中金葡萄的含量

Table 3 *S.aureus* content in Reference Material

序号	标准物质中金葡萄的含量/(CFU/瓶)				
	第 1 批	第 2 批	第 3 批	第 4 批	第 5 批
1	278	270	290	286	282
2	290	264	260	284	292
3	282	260	286	266	270
4	272	294	268	266	270
5	272	272	280	286	278
6	260	274	262	272	272
7	286	296	272	268	266
8	288	276	276	266	264
9	274	278	266	264	278
10	290	268	268	270	284
平均值	279	275	273	273	276

由表 3 结果计算得试验用标准物质样本的标准值为 $(279+275+273+273+276)/5=275$ CFU/瓶。

3.3 样本不确定度的评估结果

3.3.1 金黄色葡萄球菌计数方法的不确定度评定结果 取不同批次的 10 份样品进行检测,每份样品平行测定 2 次,共进行 20 次菌计数的检测,检测结果见表 4。

表4 计数方法不确定度的检测结果
Table 4 Uncertainty result of count methods

样品号	计数结果/(CFU/mL)		计数结果对数值		测量结果对数值的 平均值($\lg \bar{X}$)
	X_1	X_2	$\lg X_1$	$\lg X_2$	
1	4.7×10^3	5.4×10^3	3.672	3.732	3.702
2	5.1×10^3	5.3×10^3	3.708	3.724	3.716
3	4.3×10^3	4.7×10^3	3.633	3.672	3.653
4	4.6×10^3	6.5×10^3	3.663	3.813	3.738
5	4.7×10^3	4.1×10^3	3.672	3.613	3.642
6	5.5×10^3	6.3×10^3	3.740	3.799	3.770
7	5.8×10^3	4.4×10^3	3.763	3.643	3.703
8	5.1×10^3	4.9×10^3	3.708	3.690	3.699
9	5.3×10^3	6.2×10^3	3.724	3.792	3.758
10	5.3×10^3	4.7×10^3	3.724	3.672	3.698

注: X_1 、 X_2 为每份重复测定的两个结果。

根据公式

$$v_i = \lg X_i - \lg \bar{X} \quad (1)$$

计算每个样品检测结果的残差值 v_i , 并进一步计算样品检测结果的残差平方 v_i^2 及残差平方和 $\sum v_i^2$, 计算结果见表5。

表5 检测结果的残差平方

Table 5 Test results of residual square

样品号	残差平方 v_i^2	
	X_1	X_2
1	0.000 900	0.000 900
2	0.000 064	0.000 064
3	0.000 400	0.000 361
4	0.005 625	0.005 625
5	0.000 900	0.000 841
6	0.000 900	0.000 841
7	0.003 600	0.003 600
8	0.000 081	0.000 081
9	0.001 156	0.001 156
10	0.000 676	0.000 676
$\sum v_i^2$	0.028 447	

根据贝塞尔计算公式

$$S_p = \sqrt{\frac{\sum (\lg X_i - \lg \bar{X})^2}{m(n-1)}} = \sqrt{\frac{\sum v_i^2}{10(2-1)}} \quad (2)$$

可计算出检测结果对数值标准偏差合并样本的标准差 $S_p=0.053$ 。式(2)中, m 为检测的样本数, 即 $m=10$; n 为每个样品重复检测的次数, 即 $n=2$ 。

按公式

$$U_c = \frac{S_p}{\sqrt{2}} \quad (3)$$

计算总体合成的样本差为 $U_c = \frac{0.053}{1.43} = 0.038$; 则扩展不确定度

$$U = t \times U_c \quad (4)$$

取置信水平 95%, v (自由度)=10, 经过查 t 分布表得: $t_{0.05(10)}=2.228$; 得出 $U=2.228 \times 0.038=0.084$ 。

当检测结果以 2 次测量对数值的平均值表示时, 其值区间分布于 ± 0.084 之间。这个取值区间适合于任何一次测量。由于菌落计数结果以整数表示, 因此该不确定度可忽略不计。

3.3.2 金黄色葡萄球菌标准物质定值方法的不确定度评定结果 取不同批次的冻干标准物质 10 份, 每份样品平行测量 3 次, 计数结果见表6。

表6 定值方法的计数结果

Table 6 Result of fixed-value method of counting

m	计数结果/(CFU/瓶)			测量结果的 平均值($\bar{X}$)
	X_1	X_2	X_3	
1	213	210	206	210
2	197	199	210	202
3	189	195	194	193
4	193	197	199	196
5	200	196	193	196
6	187	188	192	189
7	195	194	186	192
8	190	195	189	191
9	196	195	199	197
10	195	195	203	198

注: X_1 、 X_2 、 X_3 为同一样品 3 次测定结果。

据贝塞尔计算公式

$$S_p = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{m(n-1)}} \quad (5)$$

计算出上述检验值对数值的标准偏差合并样本样品标准差 $S_p = \sqrt{\frac{324}{10(3-1)}} = 4.02$ 。式(5)中, m 为检测的样本数, 即 $m=10$; n 为每个样品重复检测的次数, 即 $n=3$; 则总体合成的样本差 $U_c = \frac{S_p}{\sqrt{2}} = 2.85$; 则

扩展不确定度 $U = t \times U_c$; 取置信水平 95%, v (自由度) = 10, 经过查 t 分布表得 $t_{0.05(10)} = 2.228$; 得出 $U = 2.228 \times 2.85 = 6.34$, 取整数则 $U=6$ 。

当测量检验结果用 3 次测量值平均值表示结果时, 其值分布区间在 ± 6 之间。这个取值的区间适用于每一次测量。

3.3.3 电子天平的不确定度评估 电子天平不确定度的评估结果见表 7。

表 7 电子天平不确定度的评估结果

Table 7 Results of Evaluation of the Uncertainty which is from Electronic Balance

重复性误差 (称量值为 155 g)		四角误差 (称量值 103.33 g)							
		前		后		左		右	
155.005	155.004	103.333	103.334	103.333	103.334	103.334	103.334	103.333	103.334
155.005	155.004	103.333	103.334	103.333	103.334	103.333	103.333	103.334	103.334
155.004	155.004	103.334	103.334	103.334	103.333	103.333	103.334	103.333	103.334
155.004	155.005	103.333	103.333	103.335	103.335	103.335	103.334	103.334	103.333
155.005	155.004	103.335	103.333	103.334	103.335	103.334	103.334	103.335	103.333
155.005	155.005	103.335	103.333	103.334	103.333	103.334	03.335	103.333	103.335
155.005	/	103.334	103.333	103.334	103.333	103.334	103.334	103.335	103.333

1) 四角误差的标准不确定度 U_c 评估: 四角误差的标准测量结果不确定度应该按照正态分布情况考虑。在置信水平为 95% 时, 包含误差因子 $k=3$; 因此四角误差的标准测量结果不确定度为

$$U_c = \Delta c / k \quad (6)$$

评估结果为 $U_c = 1/3 = 0.33$ mg

2) 线性误差的标准不确定度 U_L 评估: U_L 的计算公式为

$$U_L = \sqrt{U_i^2 + U_A^2} \quad (7)$$

式(7)中, 电子天平线性误差 U_i 属于 B 类的不确定度, 该测量值服从均匀性分布, 为

$$U_i = \frac{\Delta i}{k} \quad (8)$$

当置信水平为 95% 时, 包含误差因子 $k = \sqrt{3}$, 则

$$U_i = \frac{2}{\sqrt{3}} = 1.155 \text{ mg}$$

而 U_A 为使用最大量程加载砝码 (100 g) 标准时的不确定度,

$$U_A = \frac{\delta}{k} \quad (9)$$

在置信水平为 95%, 自由度 V_f 足够时, 式中 δ 为砝码量测允许误差值 0.5, 包含误差 $k=3$, 则

$$U_A = \frac{0.5}{3} = 0.1667 \text{ mg}$$

则 $U_L = \sqrt{U_i^2 + U_A^2} = \sqrt{(1.155^2 + 0.1667^2)} = 1.1667 \text{ mg}$

3) 重复性误差测量结果的标准不确定度 U_r 评估: 重复性误差

$$\Delta r = I_{\max} - I_{\min} \quad (10)$$

计算得 $\Delta r = 155.005 - 155.004 = 0.001 \text{ g}$

当 $n=9$, 其测量值接近正态分布的前提下, 每次测量结果的试验标准差

$$S(x_i) = \frac{\Delta r}{C} \quad (11)$$

式(11)中 C 为极差系数, 由表 8 查得为 2.97, $S(x_i) = \frac{1}{2.97} = 0.3367 \text{ mg}$, 则 $U_r = 0.3367 \text{ mg}$ 。

表 8 极差系数 C 及自由度

Table 8 Terrible coefficient C and degrees of freedom

n	C	v
2	1.13	0.9
3	1.64	1.8
4	2.06	2.7
4	2.33	3.6
6	2.53	4.5
7	2.70	5.3
8	2.85	6.0
9	2.97	6.8

4)合成标准不确定度 U :合成标准不确定度

$$U=\sqrt{U_c^2+U_r^2+U_L^2} \quad (12)$$

计算得 $U=1.425\text{ mg}$ 。

自由度

$$V_{\text{eff}}=\frac{U^4}{\frac{U_c^4}{\infty}+\frac{U_r^4}{6.8}+\frac{U_L^4}{\infty}} \quad (13)$$

式(13)中, U_c 的 V_f 足够大记为 ∞ ; U_L 的 V_f 足够大记为 ∞ ;根据表8极差系数 C 及自由度,当 $n=9$ 时, $V_f=6.8$,则 $V_{\text{eff}}=346$ 。

5)扩展不确定度 U :扩展不确定度

$$U=k \times u \quad (14)$$

置信水平为95%时由JJG 1059-1999附录A得包含因子 $k=1.96$,而 $u=1.425\text{ mg}$ 。因此,本试验用的电子天平的扩展不确定度为 $U=1.96 \times 1.425\text{ mg}=2.793\text{ mg}$,在本标准制备中可忽略不计。

由以上结果可知,本试验标准物质样本的定值结果为 $(275 \pm 6)\text{ CFU/瓶}$ 。

4 结语

标准物质的定值表示为:标准值 $\pm$ 不确定度。本试验中对样品的标准值的计数选用了BP平板倾注法,其结果精密度、再现性较好,有利于试验结果的复现。此外,计数时,由于金葡菌在BP平板上的菌落特征明显,因此在很大程度上降低了操作人员的计数误差。对整个定值过程进行了不确定度的分析,包括了金葡菌计数的不确定度(0.084)、标准值计算的不确定度(6),以及电子天平的不确定度(2.793 4)。由于菌落数为整数,最小值为0,而标准物质的质量单位为g,因此金葡菌计数的不确定度以及电子天平的不确定度在本标准物质定值中可忽略不计。

本试验中使用的标准物质的定值方法及不确定度的评估方案适用于标准物质的定值和不确定度的测定,可作为判断制备成果适用性的理论依据,给同类制作工艺提供了参考。

参考文献:

- [1] 卢晓华,李红梅,郭敬.标准物质领域总体发展趋势[J].中国计量,2010(7):75-76.
LU Xiaohua,LI Hongmei,GUO Jing. Standard material area overall development trend [J]. *China Metrology*,2010(7):75-76. (in Chinese)
- [2] 卫生部,国家标准化委员会. GB 4789.10-2010 食品微生物学检验:金黄色葡萄球菌检验[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [3] 卫生部,国家标准化委员会. GB 4789.2-2010 食品微生物学检验:菌落总数测定[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [4] 杨力.电子天平测量不确定度评定[J].煤质技术,2008(1):41-42.
YANG Li. Electronic balance measurement uncertainty evaluation[J]. *Coal Quality Technology*,2008(1):41-42. (in Chinese)
- [5] 韩永志.标准物质的定值[J].化学分析计量,2001,10(5):38-39.
HAN Yongzhi. Constant value of standard material[J]. *Chemical Analysis of Measurement*,2001,10(5):38-39. (in Chinese)
- [6] 俞晓平,叶子弘,蒋家新,等.生物计量及其在检验检疫中的应用研究[J].中国计量学院学报,2008,19(4):289-295.
YU Xiaopin, YE Zihong, JIANG Jiaxin, et al. The research of biometric and its application in inspection and quarantine [J]. *Journal of China Institute of Metrology*,2008,19(4):289-295. (in Chinese)