

《鲜米粉中大肠菌群的快速计数法》 标准编制说明

一、 工作简况

1、任务背景

大肠菌群指的是具有某些特性的一组与粪便污染有关的细菌，是评价食品卫生质量的重要指标之一。食品中检出大肠菌群就表示食品受人、温血动物的粪便污染。大肠菌群数的高低，表明了粪便污染的程度，也反映了对人体健康危害性的大小。粪便是人类肠道排泄物，其中有健康人粪便，也有肠道患者或带菌者的粪便，所以粪便内除一般正常细菌外，同时也会有一些肠道致病菌存在（如沙门氏菌、志贺氏菌等），因而食品中有粪便污染，则可以推测该食品中存在着致病菌污染的可能性，潜伏着食物中毒和流行病的威胁，必须看作对人体健康具有潜在的危险性。

目前，《GB 4789.3-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》中的 MPN 法检测周期为 3-4 d，平板计数法为 2-3d。检测周期长且培养基准备繁琐，需要较高的专业技能和配套仪器设备。

快速测试片法检测周期为 1 d，检测周期大大缩短，提高了检测效率，缩减了检测成本，同时也保证了检测结果的一致性。测试片为即用型，免于培养基配制，相对于国标中的倾注法，无热损伤，计数更准确。只需加样、培养、判读三步，操作简便。本次拟制定的标准采用测试片法对鲜米粉中大肠菌群进行快速计数，由于测试片为即用型且操作简便，对检验技术水平和设施设备要求相对较低，能够快速有效地检测鲜米粉中大肠菌群的污染状况，确保食品安全和人民身体健康。

2、主要工作过程

为了适应行业发展及相关检测机构的实际应用，进一步加强我国自主知识产权的微生物相关快速检测方法与国际先进方法的融合与对接，推进我国食品行业不断健康发展，广西壮族自治区产品质量检验研究院组织广东环凯生物科技有限公司等制定《食品安全团体标准 鲜米粉中大肠菌群的快速计数法》。广西分析测试协会于 2023 年 2 月组织专家对《鲜米粉中大肠菌群的快速计数法》、《鲜米粉中菌落总数的快速计数法》、《干米粉中霉菌酵母的快速计数法》团体标准进行了立项评审，经审查，上述申报的团体标准符合立项条件，现予立项。

本标准的研究工作历时约半年，历经了三个阶段的研究历程。第一阶段，2023年，通过检测大量纯菌株和自然污染、人工污染的样品，对方法进行了优化，包括测试片对鲜米粉的适用性和准确度等；第二阶段，完成实验室内和第三方检测机构方法性能指标确认及等共计3家实验室间的验证工作。在上述几个阶段工作的基础上，编制完成了《鲜米粉中大肠菌群的快速计数法》标准文本（内部讨论稿）和编制说明。第三阶段在广泛征求社会意见的基础上对意见进行最好归纳整理，形成送审稿。经专家审查通过后根据专家组意见对标准送审稿做必要修改，形成标准报批稿和编制说明送广西分析测试协会秘书处。

二、 标准编制原则

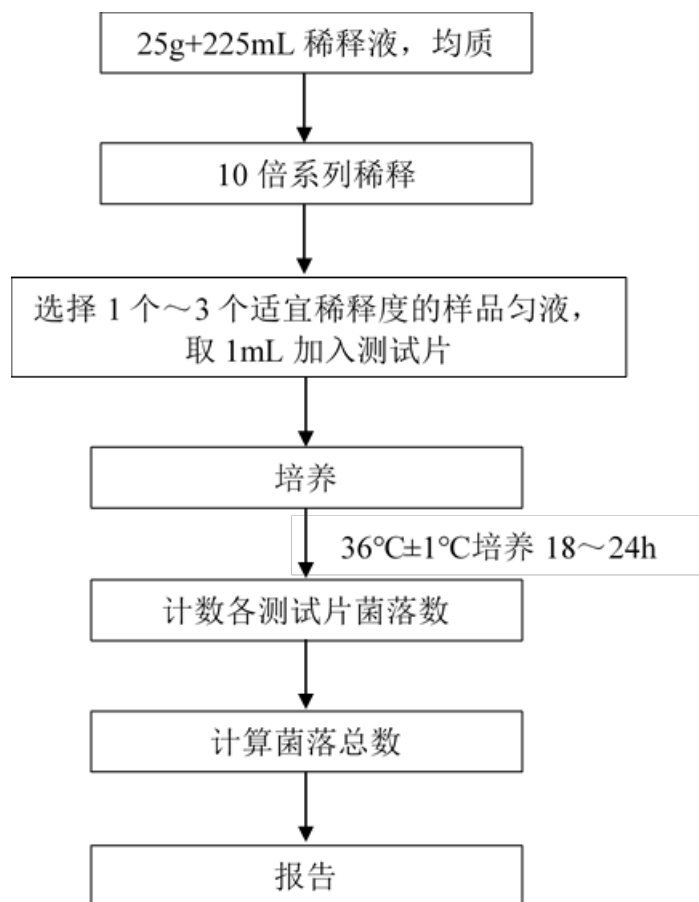
《鲜米粉中大肠菌群的快速计数法》是在科学研究的基础上，结合多家实验室和基层检验人员的检测数据，经过科学研究及实际样品验证而制定的。本标准不仅能填补鲜米粉行业的空白，提高地方食品安全水平，而且对打破国外技术垄断确保我国食品安全具有很高的应用价值。此标准的文本编写按照 GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第一部分：标准的结构和编写》中的相关规定进行；方法验证和确认技术综合参考 GB 4789.28-2013《食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求》、GB 4789.3-2016《食品微生物学检验 大肠菌群计数》、SN/T 3266-2012《食品微生物检验方法确认技术规范》、AOAC 食品微生物定性和定量检验方法的确认指南（2002）、ISO 16140:2003 食品和动物饲料微生物学—可替代方法的确认规范、药品微生物检验替代方法验证指导原则。

三、 主要研究内容

1、方法原理

Handy Plate™ 大肠菌群测试片是含与结晶紫中性红胆盐琼脂和煌绿乳糖胆盐肉汤主要成份一致的营养成份、冷水可溶性凝胶、快速显色复合酶底物指示剂，大肠菌群代谢还原 TTC 变红色，发酵乳糖产酸使菌落周围指示剂变黄，发酵乳糖产气使菌落周围有气泡，判读计数更容易更快速。

3、检验程序：



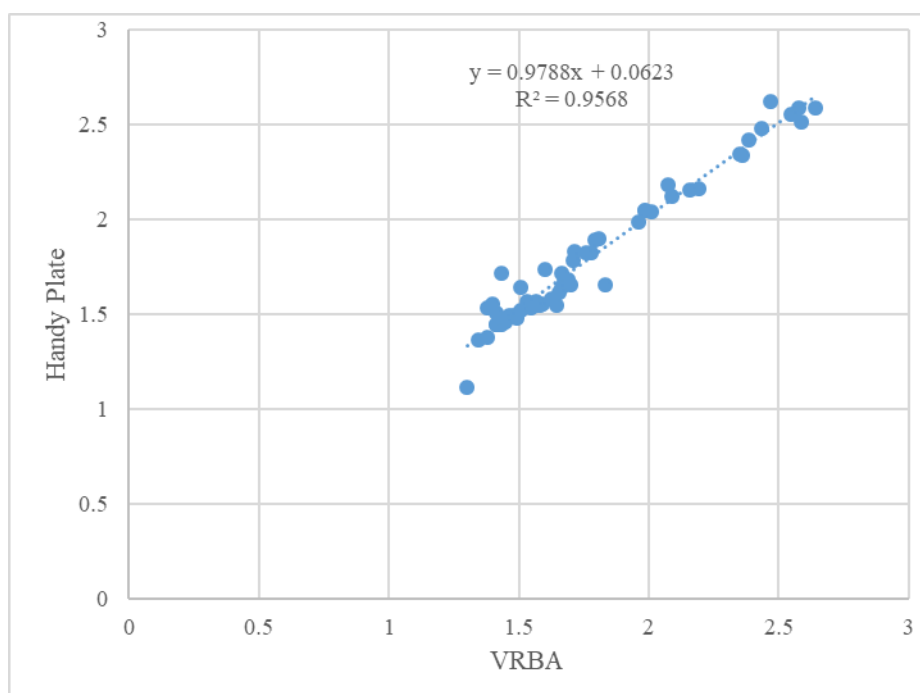
4、实验室内方法性能指标确认实验

根据 ISO 16140-2:2016 的要求, 3 株目标质控菌在测试片法和 VRBA 计数结果的 $\log 10$ 差值在 ± 0.5 之内, 满足一致性要求。鼠伤寒沙门氏菌在测试片上无典型产酸产气特征, 特异性良好。

	接种浓度	VRBA ($\log 10$)	测试片 ($\log 10$)	VRBA ($\log 10$)-测试片 ($\log 10$)
大肠埃希氏菌 ATCC25922	100cfu	1.838849091 紫红色菌落 有胆酸沉淀	1.857332496 红色菌落, 有黄色酸环和气泡	0.018483406
弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	100cfu	1.995635195 紫红色菌落 有胆酸沉淀	2 红色菌落, 有黄色酸环和气泡	0.004364805
产气肠杆菌	100cfu	1.612783857	1.342422681	-0.270361176

ATCC13048		紫红色菌落 有胆酸沉淀	红色菌落, 有黄色酸环和气泡	
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	100cfu	无色菌落, 无粉红色胆酸沉淀	红色菌落, 无黄色酸环和气泡	-
粪肠球菌 ATCC29212	1000cfu	无生长	无生长	-

选择 55 株大肠菌群纯菌株制作菌悬液并梯度稀释，取适宜浓度进行检测，同时采用国标法做对比。以测试片法检验结果为因变量，以国标法检测结果为自变量进行线性回归分析，计算相关系数 r^2 。快速大肠菌群测试片和 VRBA 的线性方程： $y=0.9788x + 0.0623$ ，相关系数 $r=0.9568$ ，快速大肠菌群测试片方法与国标 VRBA 方法两者拟合度良好，说明测试片法的检测结果可以做为国标方法的替代方法。



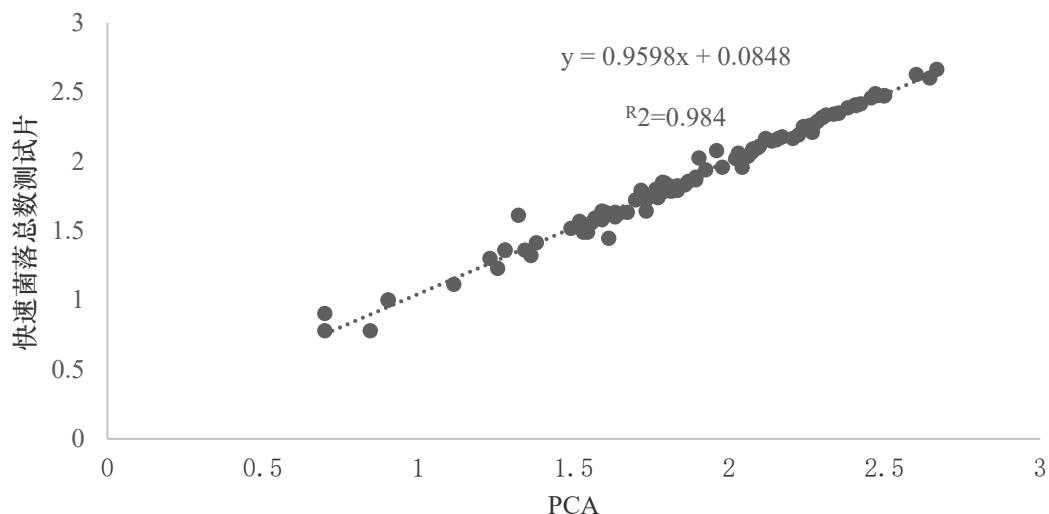


图 1 快速大肠菌群测试片纯菌株 (n=155)

19 种人工污染实际样品测试片法和结晶紫中性红胆盐琼脂计数结果的 \log_{10} 差值在 ± 0.5 之内，满足一致性要求。测试片法检测更快速，比传统方法缩短 24h 以上。

表 2 测试片法和 VRBA 大肠菌群检测结果

产品名称	大肠菌群测试片 24h		VRBA 48h		$\lg_{VRBA} - \lg_{\text{测试片}}$
	cfu	\log_{10}	cfu	\log_{10}	
方便面	348.3	2.541953474	420	2.62324929	0.081295816
鸡肉	350	2.544068044	336	2.526339277	-0.017728767
卤蛋	359	2.555094449	263	2.419955748	-0.1351387
乳酸乳	333	2.522444234	290	2.462397998	-0.060046236
	192	2.283301229	212	2.326335861	0.043034632
合味道	21	1.322219295	15	1.176091259	-0.146128036
出前一丁	17	1.230448921	14	1.146128036	-0.084320886
UFO	20	1.301029996	18	1.255272505	-0.045757491
红牛	44	1.643452676	49	1.69019608	0.046743404
原味纯酸奶 135g	36	1.556302501	31	1.491361694	-0.064940807
原味酸牛奶 150g	50	1.698970004	53	1.72427587	0.025305865
芝士味原生酪乳 115g	48	1.681241237	28	1.447158031	-0.234083206
原生酪乳 115g	39	1.591064607	20	1.301029996	-0.290034611
杀菌发酵酸牛奶饮品 180mL	41	1.612783857	39	1.591064607	-0.02171925

原味纯酸奶 220g	45	1.653212514	31	1.491361694	-0.16185082
原味酸牛奶 100g	52	1.716003344	17	1.230448921	-0.485554422
90 分原味酸奶 200g	36	1.556302501	36	1.556302501	0
鲜牛奶 250mL	45	1.653212514	36	1.556302501	-0.096910013
椰汁	76	1.880813592	71	1.851258349	-0.029555244
气泡水	91	1.959041392	71	1.851258349	-0.107783044

5、实验室间验证结果

(1) 准确度实验

三个实验室以相同批次实际样品和有证标准物质（混合菌种，溯源性：CMCC(B)44102 配制的样品（大肠菌群参考值 583CFU/g，范围值 286-891CFU/g）作为方法准确度试验样品，采用快速计数法（参照《鲜米粉中大肠菌群的快速计数法》）检测其大肠菌群的原始测试数据。见表 3

验证机构	浓度 (MPN/g)	测定值 (CFU/g)						平均值	标准 偏差	相对标准 偏差 (%)
		第一次	第二次	第三次	第四次	第五次	第六次			
1 益谱	低浓度 $10 \sim 10^2$	70	60	70	70	60	80	1.83	0.05	2.6
	中浓度 $10^3 \sim 10^4$	1610	1520	1570	1610	1490	1460	3.19	0.02	0.6
	高浓度 $10^5 \sim 10^6$	156000	161000	170000	145000	145000	141000	5.18	0.03	0.6
	参考值： 583	490	480	530	570	550	600	2.73	0.04	1.4
2 益谱	低浓度 $10 \sim 10^2$	70	80	70	70	60	60	1.83	0.05	2.6
	中浓度 $10^3 \sim 10^4$	1390	1480	1430	1470	1510	1570	3.17	0.02	0.6
	高浓度 $10^5 \sim 10^6$	149000	155000	156000	161000	165000	162000	5.20	0.02	0.3
	参考值： 583	550	510	440	410	490	460	2.68	0.05	1.7
3 合创	低浓度 $10 \sim 10^2$	50	70	50	60	70	60	1.77	0.07	3.7
	中浓度 $10^3 \sim 10^4$	1350	1450	1510	1500	1260	1290	3.14	0.03	1.1
	高浓度 $10^5 \sim 10^6$	139000	147000	162000	156000	151000	152000	5.18	0.02	0.4
	参考值： 583	460	420	410	590	530	500	2.68	0.06	2.3

4 合创	低浓度 $10 \sim 10^2$	50	50	50	70	70	70	1.77	0.08	4.5
	中浓度 $10^3 \sim 10^4$	1510	1340	1390	1520	1440	1370	3.15	0.02	0.7
	高浓度 $10^5 \sim 10^6$	149000	157000	148000	136000	151000	139000	5.17	0.02	0.5
	参考值: 583	450	480	470	380	420	440	2.64	0.04	1.4
5 速竞	低浓度 $10 \sim 10^2$	60	50	60	60	90	50	1.78	0.09	5.2
	中浓度 $10^3 \sim 10^4$	1440	1460	1390	1560	1570	1620	3.18	0.03	0.8
	高浓度 $10^5 \sim 10^6$	155000	139000	144000	159000	148000	165000	5.18	0.03	0.5
	参考值: 583	560	360	470	320	410	420	2.62	0.09	3.3
6 速竞	低浓度 $10 \sim 10^2$	50	60	50	40	50	70	1.72	0.08	4.8
	中浓度 $10^3 \sim 10^4$	1460	1380	1350	1510	1580	1470	3.16	0.03	0.8
	高浓度 $10^5 \sim 10^6$	147000	149000	156000	145000	152000	153000	5.18	0.01	0.2
	参考值: 583	510	420	490	520	530	460	2.69	0.04	1.4

注：平均值、标准偏差、相对标准偏差为原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得。

（2）正确度实验

表 4 为三个实验室以有证标准物质（混合菌种，溯源性：CICC24176、CICC23008、CICC10384）配制的样品（大肠菌群参考值 583CFU/g，范围值 286-891CFU/g）作为方法正确度试验样品，采用快速计数法（参照《鲜米粉中大肠菌群的快速计数法》）检测其大肠菌群浓度的原始测试数据。三个实验室的准确度方法验证结果进行统计分析，其结果如表 5。

表 4 正确度测试数据

实验组号	测定值 (CFU/g)						平均值	配制样品		相对误差 (%)
	第一次	第二次	第三次	第四次	第五次	第六次		参考值 (CFU/g)	对数值	
1 益谱	490	480	530	570	550	600	2.73	583	2.77	1.4
2 益谱	550	510	440	410	490	460	2.68			3.2

3 合创	460	420	410	590	530	500	2.68	583	2.77	3.2
4 合创	450	480	470	380	420	440	2.64			4.7
5 速竞	560	360	470	320	410	420	2.62	583	2.77	5.4
6 速竞	510	420	490	520	530	460	2.69			2.9

注：平均值、配制样品对数值、相对误差为原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得。

表 5 有证标准物质配制的样品测试数据汇总表

实验组号	有证标准物质配制的样品			相对误差（%）
	测定值平均值	参考值（CFU/g）	参考值对数	
1 益谱	2.73	583	2.77	1.4
2 益谱	2.68			3.2
3 合创	2.68	583	2.77	3.2
4 合创	2.64			4.7
5 速竞	2.62	583	2.77	5.4
6 速竞	2.69			2.9
实验室内相对误差范围（%）	1.4-5.4			
相对标准偏差 RSD（%）	1.45			

注：表中各项数据均为原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得。

（3）精密度实验

3 个实验室方法验证结果精密度的统计分析。其结果如表 6。

表 6 精密度测试数据汇总表

实验组号	低浓度			中浓度			高浓度			有证标准物质配制的样品		
	平均值	标准偏差	相对标准偏差（%）	平均值	标准偏差	相对标准偏差（%）	平均值	标准偏差	相对标准偏差（%）	平均值	标准偏差	相对标准偏差（%）
1 益谱	1.83	0.05	2.6	3.19	0.02	0.6	5.18	0.03	0.6	2.73	0.04	1.4
2 益谱	1.83	0.05	2.6	3.17	0.02	0.6	5.20	0.02	0.3	2.68	0.05	1.7
3 合创	1.77	0.07	3.7	3.14	0.03	1.1	5.18	0.02	0.4	2.68	0.06	2.3
4 合创	1.77	0.08	4.5	3.15	0.02	0.7	5.17	0.02	0.5	2.64	0.04	1.4
5 速竞	1.78	0.09	5.2	3.18	0.03	0.8	5.18	0.03	0.5	2.62	0.09	3.3
6 速竞	1.72	0.08	4.8	3.16	0.03	0.8	5.18	0.01	0.2	2.69	0.04	1.4
总平均值	1.78			3.17			5.18			2.67		
实验室内相对标准偏差范围	2.6-5.2			0.6-1.1			0.2-0.6			1.4-3.3		

注：表中各项数据均为原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得。

按 HJ 168-2020《环境监测分析方法标准制订技术导则》、《RB/T 033-2020》微生物检测方法确认与验证指南的方法和要求，制定本方法验标技术方案，采用《鲜米粉中大肠菌群的快速计数法》草案开展验证工作。方法的精密度、准确度是评价方法水平的主要技术指标，经方法验证，结果如下：

（1）3 家实验室 6 个实验组参与了方法验证工作，在进行方法验证报告数据统计时，所有数据全部采用，未进行取舍。

（2）方法精密度：3 家实验室 6 个实验组分别对低、中、高三个浓度的实际样品及有证标准物质配制的样品进行了 6 次重复测定：实验室内相对标准偏差范围分别为 2.6-5.2%，0.6-1.1%，0.2-0.6%，1.4-3.3%。

（3）方法正确度：3 家实验室 6 个实验组分别对有证标准物质配制的样品进行了 6 次重复测定：实验室内的相对误差范围为 1.4-5.4%。

四、相关现行法律、法规和强制性行业标准的关系

目前关于大肠菌群检测的标准主要是：《GB 4789.2-2022 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群的测定》、ISO 4833-1:2013 MICROBIOLOGY OF THE FOOD CHAIN — HORIZONTAL METHOD FOR THE ENUMERATION OF MICROORGANISMS — PART 1: COLONY COUNT AT 30 ° C BY THE POUR PLATE TECHNIQUE、ISO 4833-2:2013 MICROBIOLOGY OF THE FOOD CHAIN — HORIZONTAL METHOD FOR THE ENUMERATION OF MICROORGANISMS — PART 2: COLONY COUNT AT 30 ° C BY THE SURFACE PLATING TECHNIQUE、美国 FDA 的《Bacteriological Analytical Manual Chapter 3: Aerobic Plate Count》、SN/T 0168-2015 《进出口食品中大肠菌群计数方法》，这些标准采用传统平板法，方法的准确性相对较高，数据的重现性较好。其检测周期为 2-3 d，花费的时间较长，检测结果具有滞后性，待样品中污染的数量搞清楚后，一些损失已经无法挽回。且培养基准备繁琐，需要较高的专业技能和配套仪器设备。新国标纳入测试片法，但只对主要成份，质量要求和操作进行简单描述，没有具体的适用性指导。SN/T 4544.1-2016 《商品化试剂盒检测方法 大肠菌群 方法一》适于肉类、鱼类和海产品、水果和蔬菜制品、乳

制品和杂菌等的大肠菌群测定，需要 48-72h；SN/T 4544.2-2022 《商品化试剂盒检测方法 大肠菌群 方法二》、 T/CGCC 58-2021 《食品中大肠菌群的快速测定测试片法》均为国外品牌测试片只针对部分代表性样品进行了验证。

本标准为首创制定，发布实施后将填补我国鲜米粉行业大肠菌群快速检测技术的空白。

五、 行业标准做为强制性或推荐性团体标准的建议

建议做为推荐性团体标准。

六、 贯彻团体标准的要求和措施建议

目前鲜米粉行业对大肠菌群检测的重视度不够，没有针对性的标准指导，采用通用性的食品安全国家标准得到的结果具有滞后性，一旦出现问题将无法弥补损失。而且对基层单位人员、技术、设施设备要求较高。因此，建议相关部门加强鲜米粉大肠菌群检测相关政策的要求，推广简便适用的快速检测相关技术，实现快速、准确的监测鲜米粉生产、运输、储藏时期的大肠菌群污染状况，预测预报危害（毒素产生、超标）的发生，从而减少经济损失，保障人民食品安全。

七、 废止现行有关标准的建议

无。

八、 其他应予说明的情况

无。