



中华人民共和国认证认可行业标准

RB/T 228—2023

代替 RB/T 151—2016

食品微生物定量检测的 测量不确定度评估指南

Guidelines for the estimation of measurement uncertainty of
food microbiological quantitative detection

2024-05-20 发布

2024-07-01 实施

国家认证认可监督管理委员会 发布
中国标准出版社 出版

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义、符号	1
4 总则	4
5 技术不确定度	5
6 基质不确定度	10
7 分布不确定度	11
8 合成标准不确定度和扩展不确定度	14
9 检测报告中测量不确定度的表示方法	14
附录 A(资料性) 用两个或两个以上测试部分计算实验室内再现性标准偏差和基质不确定度标准 偏差	16
附录 B(资料性) 基质的影响和基质不确定度	19
附录 C(资料性) 最可能数(MPN)不确定度检索表	23
附录 D(资料性) 合成标准不确定度和扩展不确定度计算示例	26
参考文献	28

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 RB/T 151—2016《食品微生物定量检测的测量不确定度评估指南》，与 RB/T 151—2016 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了与测量不确定度评估有关的术语、定义和符号；
- b) 更改了测量不确定度的评估方案，使用技术不确定度、基质不确定度、分布不确定度来评估测量不确定度。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本文件起草单位：青岛海关技术中心、湖南省产商品质量检验研究院、临沂大学、中国合格评定国家认可中心、大连海关技术中心、中国检验检疫科学研究院粤港澳大湾区研究院、北京鑫汇迈生物科技有限公司、深圳海关食品检验检疫技术中心、达能特殊营养品(青岛)有限公司、青岛疾病预防控制中心、湖北省食品质量安全监督检验研究院、丹东海关综合技术服务中心、广州海关技术中心、厦门海关技术中心、庄河市检验检测认证技术服务中心、沈阳海关技术中心、中国疾病预防控制中心、中国计量科学研究院、中国检验检疫科学研究院、上海市质量监督检验技术研究院、中国工业微生物菌种保藏管理中心。

本文件主要起草人：雷质文、钟文涛、王曼霞、王云帆、王秋艳、高元娇、武维伟、姜勇、马弋、麻丽丹、何飞、丁小平、李宏、凌莉、彭小莉、李金霞、马维兴、杨滔、朱金艳、吕敬章、刘云国、卢行安、王金玲、傅博强、杨娇兰、陈欣欣。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2016 年首次发布为 RB/T 151—2016；

——本次为第一次修订。

食品微生物定量检测的 测量不确定度评估指南

1 范围

本文件描述了食品微生物定量检测的测量不确定度的评估和表示方法。

本文件适用于食品和食品原料,以及食品生产、加工、贮存相关环境样品中微生物定量分析方法的测量不确定度评估和表示。其他领域可参考使用。

注:定量分析方法包括微生物常规平板计数法、最可能数(most probable number, MPN)法、仪器测定方法[如阻抗测量法、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)测量法和流式细胞计数法]。

本文件不适用于评估食品微生物定量检测系统误差及其修正有关的不确定度分量。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定

3 术语和定义、符号

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

样本 sample

按照某种规则从总体(或大量材料)中抽取的、可以代表总体信息的单个或多个个体(或一定比例的材料),在一定情况下可以作为判定该总体或其生产过程情况的依据。

3.1.2

实验室样品 laboratory sample

送往实验室待检测的样本(3.1.1)。

3.1.3

测试样品 test sample

依照方法标准要求,利用实验室样品(3.1.2)制备的样品。

3.1.4

测试部分 test portion

从测试样品(3.1.3)中,称取或吸取一定量(质量或体积)具有代表性的部分,用以制备起始稀释样品匀液。

注:液体样品可以选择一定量具有代表性的原液作为测试部分。

3.1.5

被测量 measurand

拟测量的量。

[来源:JJF 1001—2011,4.7]

3.1.6

偏差 bias**测量偏差 measurement bias**

测量结果的期望值与真值或可接受的参考值之间的差异,系统误差的估计值。

注1:与随机误差相反,偏差是指系统误差的综合,其可能是由一个或多个系统误差引起。

注2:测量结果与真值或接受参考值之差越大,偏差值越大。

注3:系统误差是指在重复测量中保持不变或按可预见方式变化的测量误差的分量。

注4:随机误差是指在重复测量中按不可预见方式变化的测量误差的分量。

[来源:GB/T 3358.1—2009,1.33,有修改]

3.1.7

标准偏差 standard deviation

SD

对同一被测量(3.1.5)进行 n 次测量,表征测量结果分散性的量。注1: n 次测量中某单个测得值为 x_i 的试验标准偏差 SD 可按照贝塞尔公式计算:

$$S(x_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

式中:

 x_i ——第 i 次测量的测得值; n ——测量次数; $\bar{x}$ —— n 次测量所得一组测得值的算术平均值。注2: n 次测量的算术平均值 $\bar{x}$ 的标准偏差 $S(\bar{x})$ 为 $S(\bar{x}) = S(x_i) / \sqrt{n}$ 。

[来源:JJF 1001—2011,5.17,有修改]

3.1.8

测量重复性 measurement repeatability

在同一实验室,由同一操作员使用同一设备,按相同的测试方法,在较短时间间隔内对同一对象进行测试所获得的测试结果之间的一致性。

[来源:JJF 1001—2011,5.13,有修改]

3.1.9

实验室内再现性 intralaboratory reproducibility**中间精密密度 intermediate precision**

在同一实验室,由不同操作员使用不同设备,按相同的测试方法,对同一或类似测试样品(3.1.3)进行测试所获得的测试结果之间的一致性。

[来源:JJF 1001—2011,5.12,有修改]

3.1.10

测量不确定度 measurement uncertainty; MU

与测量结果相关联的参数,用来表征合理赋予被测量(3.1.5)值的分散性。

注1:此参数可以是标准偏差或其倍数,也可以是给定置信概率的置信区间的半宽度。

注2:测量不确定度一般由多个分量组成,其中一些分量可以用测量结果的统计分布来进行测算,并且以试验标准偏差表示;而另一些分量可以根据经验或其他信息的假定概率分布来进行测算,并且也以标准偏差表示。

注3:测量结果为被测量值的最佳估计。所有不确定度的分量都与分散性有关。

[来源:JJF 1001—2011,5.18,有修改]

3.1.11

标准不确定度 standard uncertainty

以标准偏差表示的测量不确定度。

[来源:JJF 1001—2011,5.19]

3.1.12

技术不确定度 technical uncertainty

在食品微生物定量检测程序中,因技术操作的可变性引起的不确定度。

注:在制备起始稀释样品匀液和后续稀释样品匀液时,技术不确定度包括从实验室样品(3.1.2)选取测试部分(3.1.4)时的取样、混匀和稀释的可变性,以及培养过程和培养基变化等因素的影响。

3.1.13

基质不确定度 matrix uncertainty

测试部分(3.1.4)不能真实代表实验室样品(3.1.2)而产生的不确定度。

3.1.14

分布不确定度 distributional uncertainty

微生物在实验室样品(3.1.2)、起始稀释样品匀液和随后的梯度稀释过程中分布不均产生的不确定度。

注:基于微生物在样品匀液中的特性,通常采用泊松分布模型。但是,当部分结果需要进一步确认,或者使用 MPN 法时,其分布可能不符合泊松分布。

3.1.15

泊松不确定度 Poisson uncertainty

对于平板计数法,假设微生物在接种液中随机分布符合泊松分布模型而产生的不确定度。

3.1.16

确证不确定度 confirmation uncertainty

对于部分平板计数法,需要使用确证试验对假定的目标菌总数进行修正。假设菌落为均匀分布,使用二项分布来计算某一特定结果而产生的不确定度。

3.1.17

最可能数不确定度 most probable number uncertainty

基于多次检出或未检出结果组合的最大似然估计得到最可能数(MPN)而产生的不确定度。

3.1.18

合成标准不确定度 combined standard uncertainty

由在一个测量模型中各输入量的标准测量不确定度获得的输出量的标准测量不确定度。

注:3.1.12~3.1.17 均属于标准测量不确定度。

[来源:JJF 1001—2011,5.22]

3.1.19

包含因子 coverage factor

为获得扩展不确定度,对合成标准不确定度所乘的大于 1 的数。

注:包含因子通常用符号 k 表示。

[来源:JJF 1001—2011,5.30]

3.1.20

扩展不确定度 expanded uncertainty

确定测量结果区间的量,使被测量(3.1.5)的结果分布的大部分包含在此区间内。

注 1:此区间也被称为包含概率或区间的置信水平(置信概率)。

注 2:扩展不确定度有一个明确的扩展区间,使一个特定的置信概率与扩展不确定度所规定的区间结合起来。对测

量结果及其合成标准不确定度所表示的概率分布进行明确或隐含假设,这个区间的置信概率只有在这些假设验证成立的范围内有效。

注3:扩展不确定度 U 是由合成标准不确定度 $u_c(y)$ 和包含因子 k 计算得出的, $U = k \times u_c(y)$ 。

[来源:JJF 1001—2011, 5.27, 有修改]

3.2 符号

下列符号适用于本文件。

ΣC :对于菌落计数方法,用于计算结果的所读取的菌落数量总和。

k :包含因子。

n_c :对于需要部分确证的菌落计数方法, n_c 为实际确证菌落数。

n_g :对于需要部分确证的菌落计数方法, n_g 为所测试的疑似菌落数。

SD:标准偏差。

S_{IR} :实验室内再现性或中间精密度标准偏差。

S_R :再现性标准偏差。

S_r :重复性标准偏差。

U :扩展不确定度。

u :标准不确定度。

u_{distrib} :分布不确定度。

u_{tech} :技术不确定度。

u_{conf} :确证不确定度。

u_{matrix} :基质不确定度。

u_{MPN} :最可能数不确定度。

u_{Poisson} :泊松不确定度。

$u_c(y)$:合成标准不确定度。

4 总则

4.1 不确定度分量

测量不确定度通常包含多个分量。本文件考虑以下三种不同类型的不确定度分量:

- 技术不确定度 u_{tech} (第5章);
- 基质不确定度 u_{matrix} (第6章);
- 分布不确定度 u_{distrib} (第7章)。

注1:食品微生物定量检测通过关键技术因素的优化和控制得到最佳估计值。因标准值或参考量值一般不适用,故不考虑系统误差的评估和修正。

注2:对每一类型的分布不确定度均可基于数学方法进行计算。

注3:以上三个不确定度分量中,技术不确定度通常是最大的。

4.2 合成标准不确定度

本文件提供了两种方法来评估检测结果的合成标准不确定度:

- 分别计算报告值的技术不确定度分量(第5章)、基质不确定度分量(第6章)和分布不确定度分量(第7章),然后将三种分量合成(第8章)。
- 根据实验室规定以及客户要求,可仅使用技术不确定度代替合成标准不确定度报告结果。

5 技术不确定度

5.1 不确定度主要来源的识别

5.1.1 关键技术因素

与平板计数法或最可能数(MPN)法技术不确定度相关的关键操作环节包括:

- 从实验室(或测试)样品中称取或吸取测试部分;
- 制备起始稀释样品匀液;
- 连续梯度稀释;
- 接种;
- 培养;
- 菌落计数过程和/或生长状况(如 MPN 法);
- 确证(适用时)。

图 1 列出了食品微生物学定量检测的测量不确定度的主要来源。可能影响不确定度且宜加以控制的关键技术因素,具体包括培养基和/或试剂的来源和类型、样品稀释、接种和培养过程、计数方法(人工计数或自动计数)以及不同操作人员(操作团队)的变化等。

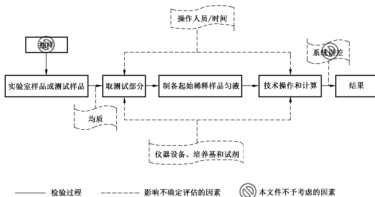


图 1 食品微生物学定量检测的测量不确定度的主要来源

5.1.2 抽样不确定度

抽样不确定度,即从一批待抽检样品中抽取实验室样品(3.1.2)产生的误差,可能会对总体误差产生显著影响,但它不是测量不确定度本身的一部分,本文件不予以考虑。

5.2 技术不确定度的评估

5.2.1 概述

技术不确定度仅仅由操作的可变性引起,是某一检测方法(如 ISO 4833-1、GB 4789.2、GB 4789.10 等)的固有变异特征,一种检测方法的技术不确定度计算结果不适用于另一种检测方法。

注:在实验室关键环节受控且不发生变化的情况下,同一检测方法的技术不确定度可认为是固有不变的,与食品基质类型无关。宜选择易于均质的食品基质类型,并且污染水平满足 5.2.2.3.1 的实验室样品,如奶粉、果汁等。

使用最终测量结果的再现性标准偏差(S_R)计算技术不确定度,即在再现性条件下,通过计算至少10组同一类食品基质样品的最终检测结果(详见表1、表2或表A.1)以评估技术不确定度(5.2.2.3),而不需要对测量过程中每个独立步骤产生的不确定度进行逐一计算。持续进行测量不确定度评估十分重要,表明测试结果在受控范围内。当任何可能会显著影响结果的关键技术因素(5.1.1)发生变更时,需重新评估技术不确定度。

再现性标准偏差的计算均基于对同类样品的重复检测,一般有三种方案,优先顺序为:

- 第一方案:实验室内再现性,即某一实验室内评估的再现性;
- 第二方案:实验室间方法确认结果的再现性;
- 第三方案:实验室间能力验证结果的再现性。

本文件仅对第一方案进行了规定(5.2.2)。实验室可参考 GB/T 22553,评估第二方案和第三方案的技术不确定度。

5.2.2 实验室内的再现性标准偏差(S_{RR})

5.2.2.1 概述

使用实验室内再现性标准偏差评估技术不确定度。本条款中描述的实验方案充分考虑 5.1.1 所列举的关键技术因素。

5.2.2.2 实验方案

5.2.2.2.1 概述

图2为从每份实验室样品中称取或吸取2个测试部分进行分析的实验方案,相应的计算方法见5.2.2.3。对实验室样品取多于两个测试部分的实验方案和计算方法详见附录A。

任意一种检测方法,至少需要对10个实验室样品进行检测,每个实验室样品至少得到2个可接受的结果,5.2.2.3.1规定了结果的可接受条件,具体操作流程详见图2。所收集数据可以来自实验室的特定实验方案,也可以通过实验室日常质量控制累积;如为后者,参照本条款实验方案执行。

注:如果实验室难以按照图2中方案(1)进行测试样品前处理,可用图2中方案(2)替代。

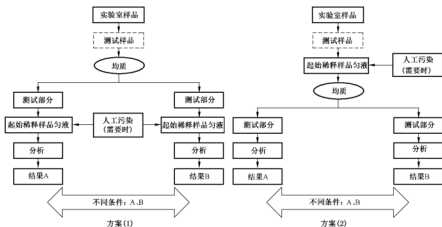


图2 每份实验室样品取2个测试部分的技术不确定度评估实验方案

5.2.2.2.2 实验室样品的选择

设计室内再现性试验时,建议根据 SN/T 3266—2012 中附录 A 所规定的相同或同类食品基质样品进行试验,避免或降低基质间差异过大造成的影响。

实验室样品宜优先选用自然污染食品样品,以便得出真实的测量不确定度,更好地表征自然污染样品的测量结果。如果需要人工染菌,污染水平宜贴近自然水平,微生物含量满足 5.2.2.3.1 可接受的结果。

5.2.2.2.3 实验室样品的制备

为尽可能降低基质不确定度的影响,实验室样品需通过合适的方法进行均质。在称取或吸取测试部分之前,实验室需充分混匀各类测试样品(6.1)。

5.2.2.2.4 测试部分

从每份实验室样品(或测试样品)中至少称取或吸取 2 个测试部分进行再现性平行测试。

5.2.2.2.5 样品起始稀释匀液、人工染菌(需要时)和分析条件

需要人工染菌时,宜在起始稀释样品匀液中进行。人工染菌样品制备的具体操作步骤参考 RB/T 037。

按相关检测方法的常规检验流程,对每个测试部分进行分析(例如制备 10 倍梯度系列稀释液,每个稀释倍数接种 1 个或 2 个平板)。为了最大化体现再现性平行测试间的差异,并体现实验室实际测试的真实情况,对 2 个测试部分进行测试的条件 A 和条件 B 尽可能不同,并尽可能涵盖实验室常见的所有技术不确定度来源(5.1.1),这些来源包括但不限于:

a) 不同批次的培养基、试剂和滤膜;

注:例如测试部分 1 由实验人员 A 用批号为 B 的培养基完成检验,那么测试部分 2 由实验人员 B 使用批号为 A 的培养基完成检验。

b) 不同人员;

c) 不同设备(例如涡旋混匀器、均质器、pH 计、培养箱等);

d) 不同分析时间等。

如果食品中微生物污染水平不稳定,宜在同一天内快速完成再现性平行测试;如果食品中微生物污染水平相对稳定(如自然污染干燥样品或人工污染样品),再现性平行测试可以超过 1 天。

5.2.2.3 计算

5.2.2.3.1 可接受的结果

对于平板计数法(如 GB 4789.2),需保证有足够多的菌落数用于计算,至少有 1 个稀释度的菌落数在 30 CFU/平板~300 CFU/平板之间。

注:其他检测方法明确规定了可接受的菌落计数范围时,按规定执行。

对于包含部分确证的方法(如 GB 4789.10、GB 4789.41),至少二分之一的疑似菌被确证为目标菌的结果为可接受结果,即 $n_c \geq n_p/2$ (符号见 3.2)时为可接受结果,而 $n_c < n_p/2$ 时结果不宜被利用,如果利用,则需要予以注明。

对于 MPN 的方法,3 个稀释度 15 管法时每个独立样品的结果,用于计算结果的阳性管数合计大于 5 个阳性结果时为可接受结果;3 个稀释度 9 管法时每个独立样品的结果,用于计算结果的阳性管数合计大于 3 个阳性结果时为可接受结果。

注 1:3 个稀释度 15 管法后文简称“15 管法”,3 个稀释度 9 管法后文简称“9 管法”。

注2：3管或5管阳性检测结果的限值与单次检测结果中所有被测稀释液的阳性结果之和有关，与阴性结果数或总测试结果数无关。

5.2.2.3.2 实验室内再现性标准偏差

满足实验方案(5.2.2.2)时， $n(n \geq 10)$ 个实验室样品，每个实验室样品得到2个可接受的试验数据 x_{iA} 和 x_{iB} 。在计算之前，对 x_{iA} 和 x_{iB} 进行常用对数转换后得到 y_{iA} 和 y_{iB} ，然后用公式(1)计算实验室内再现性标准偏差 S_{IR} 。如果每个实验室样品得到2个以上可接受的试验数据，参照附录A的计算方法。

为确保精确，计算过程中不宜进行数值修约。

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

S_{IR} ——实验室内再现性标准偏差；

n ——实验室样品的数量；

i ——样品序号， $i=1 \sim n(n \geq 10)$ ；

y_{iA} ——在条件A下得出的数值，单位为 $\log_{10}(\text{CFU/g, CFU/mL, MPN/g 或 MPN/mL})$ ；

y_{iB} ——在条件B下得出的数值，单位为 $\log_{10}(\text{CFU/g, CFU/mL, MPN/g 或 MPN/mL})$ 。

表1为按照某检测方法(如ISO 4833-1和ISO 7218)，每个测试部分进行梯度稀释，选择2个适宜稀释度，每个稀释度接种1个琼脂平板，计算实验室内再现性标准偏差的示例。

表1 实验室内再现性标准偏差计算

实验室 样品 i	测试 部分 j	稀释因子(d) 菌落计数(C)				菌落 总数 ΣC_{ij}	菌落总数的 平均数 /(CFU/g 或 mL) x_{ij}	平均数对数转 换值/($\log_{10}$ CFU/g 或 mL) $y_{ij} = \log_{10}(x_{ij})$	差值/ ($\log_{10}$ CFU/g 或 mL) $y_{iA} - y_{iB}$	差的平方 ($y_{iA} - y_{iB}$) ²
		d_1	C_1	d_2	C_2					
1	A	3	102	4	8	110	1.0×10^5	5.000 0	0.242 1	0.058 6
	B	3	59	4	4	63	5.7×10^4	4.757 9		
2	A	5	61	6	6	67	6.1×10^4	6.784 7	-0.043 2	0.001 9
	B	5	66	6	8	74	6.7×10^4	6.827 8		
3	A	4	168	5	18	186	1.7×10^5	6.228 1	0.301 0	0.090 6
	B	4	86	5	7	93	8.5×10^4	5.927 1		
4	A	5	266	6	25	291	2.6×10^5	7.422 5	0.270 8	0.073 3
	B	5	140	6	16	156	1.4×10^5	7.151 7		
5	A	6	45	7	5	50	4.5×10^4	7.657 6	0.540 6	0.292 3
	B	5	129	6	15	144	1.3×10^5	7.117 0		
6	A	4	129	5	12	141	1.3×10^5	6.107 8	0.045 4	0.002 1
	B	4	117	5	10	127	1.2×10^5	6.062 4		
7	A	2	92	3	8	100	9.1×10^4	3.958 6	-0.158 4	0.025 1
	B	2	131	3	13	144	1.3×10^5	4.117 0		

表1 实验室内再现性标准偏差计算(续)

实验室 样品 <i>i</i>	测试 部分 <i>j</i>	稀释因子(<i>d</i>) 菌落计数(C)				菌落 总数 ΣC_{ij}	菌落总数 的平均数 /(CFU/g 或 mL) x_{ij}	平均数对数转 换值/(log ₁₀ CFU/g 或 mL) $y_{ij} = \log_{10}(x_{ij})$	差值/ (log ₁₀ CFU/g 或 mL) $y_{iA} - y_{iB}$	差的平方 ($y_{iA} - y_{iB}$) ²
		<i>d</i> ₁	<i>C</i> ₁	<i>d</i> ₂	<i>C</i> ₂					
8	A	3	139	4	13	152	1.4×10 ⁵	5.140 5	-0.016 8	0.000 3
8	B	3	143	4	15	158	1.4×10 ⁵	5.157 3		
9	A	1	49	2	5	54	4.9×10 ⁴	2.691 0	-0.419 9	0.176 3
9	B	1	129	2	13	142	1.3×10 ⁵	3.110 9		
10	A	4	142	5	13	155	1.4×10 ⁶	6.148 9	0.787 2	0.619 7
10	B	3	227	4	26	253	2.3×10 ⁵	5.361 7		
和=1.340 1 1.340 1/(2×10)=0.067 0 $S_R = \sqrt{0.067\ 0} = 0.258\ 9$										
注: x_{ij} 是测试部分在条件 A 或条件 B 下所得菌落总数的平均数, 例如 $x_{1B} = 10^{61} \times \frac{\Sigma C_{1B}}{1.1} = 10^5 \times \frac{63}{1.1} = 10^5 \times 57.3 = 5.73 \times 10^4$ 。										

表2为按照GB 4789.2,对10个市售散装奶粉样品均质后称取2个测试部分,在条件A和条件B下每个测试部分进行10倍梯度系列稀释,选择两个适宜稀释度,每个稀释度接种2个平板计数琼脂培养基,培养后读取菌落数,并分别计算条件A和条件B下的菌落总数的平均数,最后用公式(1)计算实验室内再现性标准偏差 S_R 的示例(见表2)。

表2 市售散装奶粉样品中菌落总数的实验室内再现性标准偏差计算

实验室 样品 <i>i</i>	条件A时菌落 总数的平均数/ (CFU/g) x_{iA}	条件B时菌落 总数的平均数/ (CFU/g) x_{iB}	条件A时平均数对数 转换值/(log ₁₀ CFU/g) $y_{iA} = \log_{10}(x_{iA})$	条件B时平均数 对数转换值/ (log ₁₀ CFU/g) $y_{iB} = \log_{10}(x_{iB})$	差的平方 ($y_{iA} - y_{iB}$) ²
1	6.7×10 ⁴	8.7×10 ⁴	4.83	4.94	0.012 8
2	7.1×10 ⁵	6.2×10 ⁵	6.85	6.79	0.003 4
3	3.5×10 ⁵	4.4×10 ⁵	5.54	5.64	0.009 8
4	1.0×10 ⁵	4.3×10 ⁵	7.00	6.63	0.134 4
5	1.9×10 ⁵	1.7×10 ⁵	7.28	7.23	0.002 4
6	2.3×10 ⁵	1.5×10 ⁵	5.36	5.18	0.034 4
7	5.3×10 ⁵	4.1×10 ⁵	8.72	8.61	0.012 4
8	1.0×10 ⁴	1.2×10 ⁴	4.00	4.08	0.006 2
9	3.0×10 ⁴	1.3×10 ⁴	4.48	4.11	0.131 8
10	1.1×10 ⁵	2.2×10 ⁵	8.04	8.34	0.090 6
$\text{和} = 0.438\ 2$ $0.438\ 2 / (2 \times 10) = 0.021\ 91$ $S_R = \sqrt{0.021\ 91} = 0.15$					

6 基质不确定度

6.1 概述

基质不确定度表示给定食品基质中微生物分布的影响,即从同一实验室样品中称取或吸取不同测试部分的检验结果之间的差异,反映了单个测试部分不能代表整个实验室样品的微生物污染程度。依据实验室样品物理性状,将基质分为以下四类:

- 非黏流动性液体和粉末(例如果汁、牛奶、可可奶、奶粉等);
- 充分混合的固体(例如肉糜、香肠肉、碎肉、打过泡的奶油、牛奶冰淇淋、大豆乳脂等);
- 小颗粒固体(例如芹菜、蘑菇、胡萝卜、虾、谷物、碎榛子仁等);
- 其他固体(例如没有绞碎的肉块、鱼肉、奶酪、面点、酸奶等)。

实验室样品难以混合均匀,从而导致测试部分之间微生物水平存在再现性差异。对于 a) 类食品基质,其本身均匀性好,基质不确定度较小;对于 b)、c) 和 d) 类食品基质,其基质不确定度较大。

在实验室资源受控的情况下,基质不确定度不受检测方法的影响,同一种基质的不确定度评估适用于该基质的所有定量检测。关于基质的影响和基质不确定度更多详细内容见附录 B。

基质不确定度宜对每种基质分别进行计算。6.2 至 6.4 中规定了三种评估基质不确定度的方式:

- 对于均匀性良好的实验室样品,其基质不确定度较小,可以使用经验值(6.2);
- 从实验室样品中称取或吸取多个测试部分,计算样品的重复性标准偏差(S_r),从而确定样品内基质的不确定度(6.3);
- 已知基质和方法的相关特征,根据先前经验进行计算(6.4)。

6.2 均匀性良好的实验室样品的基质不确定度评估

非黏流动性液体和粉末样品,其均匀性良好,具有相对低的基质不确定度,在称取或吸取测试部分时经过充分均质,基质不确定度可以使用定值,即:

$$u_{\text{matrix}} = 0.1 \log_{10} (\text{CFU/g, CFU/mL, MPN/g 或 MPN/mL})。$$

注:实验室采用图 2 的方案(2)或图 A.1 的方案(2)时,可直接利用基质不确定度 $u_{\text{matrix}} = 0.1 \log_{10} (\text{CFU/g, CFU/mL, MPN/g 或 MPN/mL})$ 。

6.3 从实验室样品中称取或吸取多个测试部分时的基质不确定度评估

基质不确定度可以通过实验室内样品的重复性标准偏差来计算,即在重复性条件下对单个实验室样品中多个测试部分进行分析。实验方案见图 3。

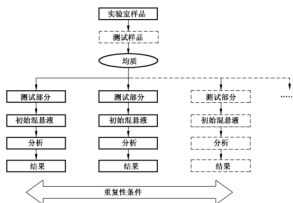


图3 每份实验室样品至少取两个测试部分的基质不确定度评估实验方案

基质不确定度不受被测目标菌和检测方法的影响。人工染菌无法反映真实的基质不确定度,所以宜优先选择自然的污染样品,以容易被检测到微生物为目标菌(例如嗜温需氧菌、肠杆菌科或嗜热芽孢杆菌等)。

建议保证从每个实验室样品中称取或吸取测试部分总数比实验室样品总数至少多10个。所有的测试部分均来自同一个实验室样品时,从1个实验室样品中至少称取或吸取11个测试部分;测试部分来自多个同类实验室样品时,例如从10个实验室样品中的每个样品至少称取或吸取2个测试部分。

根据5.2.2.3.1界定可接受的结果,选择合适的检测方法评估基质不确定度,可按照附录A计算重复性标准偏差。对于单个实验室样品, u_{matrix} 为常用对数转换后菌落数的标准偏差SD;对于多个实验室样品, u_{matrix} 为常用对数转换后菌落数的单因素方差分析(ANOVA)。

6.4 基质特征已知时的基质不确定度评估

实验室可以根据以往的经验来评估样品的基质不确定度,即根据之前对某种基质的多个测试部分分析得到的基质不确定度,可以作为相似基质的基质不确定度。评价基质之间是否相似,可参考SN/T 3266—2012的附录A。

实验室可以使用来源于其他权威实验室估算的基质不确定度,同样某个实验室获得的基质不确定度可以作为其他实验室样品基质不确定度的近似值。

注: B.2给出了欧盟参考实验室研究食品样品的基质不确定度结果,实验室可参考利用。

7 分布不确定度

7.1 概述

食品中微生物个体的随机分布产生分布不确定度 u_{distrib} ,即使是均匀性好的样品,也会存在分布不确定度。分布不确定度类型取决于所使用的检测方法:

- 对于平板计数法,为泊松不确定度(7.2)和/或确证不确定度(7.3);
- 对于最可能数法,为MPN不确定度(7.4)。

合成标准不确定度时,根据微生物检测方法的特点,使用某方法(7.2~7.4)单次检测试验样品的结果的数值计算分布不确定度。

7.2 平板计数法——泊松不确定度(u_{Poisson})

基于菌落计数的方法,分布不确定度取决于计算结果时所使用的菌落总数 ΣC 。

注:例如使用某方法检测实验室样品,制备 10 倍梯度系列稀释液,选择 1 个~3 个适宜的连续稀释度的样品匀液(液体样品可以选择原液),每个稀释度接种 1 个或 2 个平板,然后按方法规定进行培养。

每个稀释度接种 1 个平板时(如 ISO 4833-1), ΣC 为计算结果时每个稀释度平板菌落数的和;每个稀释度接种 2 个平板时(如 GB 4789.2), ΣC 为计算结果时每个稀释度平板菌落数之和。

表 3 列出了菌落总数(ΣC)为 1 到 40 时的 u_{Poisson} ,单位为 $\log_{10}$ (CFU/g、CFU/mL、MPN/g 或 MPN/mL)。如果无菌落生长($\Sigma C=0$),则 $u_{\text{Poisson}}=0.434$,此时需要予以注明。

表 3 菌落总数值($1 \leq \Sigma C \leq 40$)对应的 u_{Poisson}

ΣC	u_{Poisson}	ΣC	u_{Poisson}	ΣC	u_{Poisson}	ΣC	u_{Poisson}
1	0,434	11	0,131	21	0,095	31	0,078
2	0,307	12	0,125	22	0,093	32	0,077
3	0,251	13	0,120	23	0,091	33	0,076
4	0,217	14	0,116	24	0,089	34	0,074
5	0,194	15	0,112	25	0,087	35	0,073
6	0,177	16	0,109	26	0,085	36	0,072
7	0,164	17	0,105	27	0,084	37	0,071
8	0,154	18	0,102	28	0,082	38	0,070
9	0,145	19	0,100	29	0,081	39	0,070
10	0,137	20	0,097	30	0,079	40	0,069

如果 ΣC 是表 3 以外的其他菌落总数 ΣC ,则可用公式(2)计算对应的 u_{Poisson} :

$$u_{\text{Poisson}} = \frac{1/\ln(10)}{\sqrt{\Sigma C}} = \frac{0,434\ 3}{\sqrt{\Sigma C}} \dots\dots\dots (2)$$

假设 $\Sigma C=100$ 时,则 $u_{\text{Poisson}} = \frac{0,434\ 3}{\sqrt{100}} = \frac{0,434\ 3}{10} = 0,043\ 43$ 。

如果 ΣC 值很大,且其他不确定度分量也很大时, u_{Poisson} 分量可以忽略不计。

7.3 平板计数法——确证不确定度(u_{conf})

部分平板计数法(如 GB 4789.3、GB 4789.10、GB 4789.41 等)需要对疑似菌落进行确证,根据确证结果对目标菌落总数进行修正,此时宜使用二项分布来计算某一特定结果的分布不确定度。

假设对 n_p 个疑似菌落进行了确证试验, n_c 个菌落被确证为目标菌。表 4 列出了疑似菌落数 n_p 、确证菌落数 n_c ,以及 n_p 和 n_c 相对应的 u_{conf} 值。

表4 被测试疑似菌落数(n_p)和确证菌落数(n_c)值及对应的 u_{conf} 的常用对数值($\log_{10}$)

确证菌落数(n_c)	被测试疑似菌落数(n_p)			
	5	10	15	20
1	0.355 4	0.430 2	0.460 5	0.476 9
2	0.202 3	0.262 7	0.286 8	0.299 9
3	0.134 9	0.194 6	0.217 7	0.230 0
4	0.088 8	0.154 1	0.177 6	0.190 0
5	0.045 4	0.125 4	0.150 1	0.162 8
6		0.102 7	0.129 3	0.142 7
7		0.083 4	0.112 6	0.126 8
8		0.065 7	0.098 6	0.113 6
9		0.047 8	0.086 2	0.102 4
10		0.026 1	0.075 0	0.092 6
11			0.064 6	0.083 8
12			0.054 4	0.075 7
13			0.044 1	0.068 3
14			0.032 9	0.061 1
15			0.018 3	0.054 3
16				0.047 5
17				0.040 6
18				0.033 3
19				0.025 1
20				0.014 1

注：根据5.2.2.3.1规定，表中 $n_c \geq n_p/2$ 时为可接受结果，而 $n_c < n_p/2$ 时结果不能被利用。如果实验室利用 $n_c < n_p/2$ 时的结果，则需要注明。

可以用公式(3)计算表4以外的其他 u_{conf} 值。

$$u_{conf} = \frac{1}{2.303} \sqrt{\frac{(n_c + 0.5)(n_p - n_c + 0.5)n_p^2}{(n_p + 1)^2(n_p + 2)n_c^2}} \dots\dots\dots (3)$$

如果确证菌落数 $n_c = 0$ ，计算 u_{conf} 时则取 $n_c = 1$ ，但需要注明。

7.4 基于最可能数不确定度(u_{MPN})

最可能数不确定度 u_{MPN} 以 $\log_{10}$ MPN的标准偏差表示，即 $u_{MPN} = SD \log_{10} MPN/g$ 或 MPN/mL ，其数值仅与总管数和阳性管数相关，与所选择的样品稀释梯度无关。对于9管法和15管法，不同接种量的阳性管数所对应的 u_{MPN} 值，可从附录C检索。

注： u_{MPN} 值与所选择的样品稀释梯度无关。在附录D的D.4示例中，将所选择3个连续稀释度更改为 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 时，培养后每个稀释度分别出现阳性结果的管数为3、2和1，查表得 $MPN = 150/mL$ 、 $\log_{10} MPN = \log_{10} 150 = 2.18 \log_{10} MPN/mL$ ，但 u_{MPN} 值不变，仍为 $0.27 \log_{10} MPN/mL$ 。

对于需要对疑似阳性结果进行确证的 MPN 法,在计算 MPN 值及不确定度时宜基于已确证的阳性结果数,即 MPN 值和 u_{MPN} 取决于确证后的阳性结果数。

8 合成标准不确定度和扩展不确定度

8.1 合成标准不确定度

8.1.1 基于技术不确定度、基质不确定度和分布不确定度的合成标准不确定度

计算合成标准不确定度时,先计算技术不确定度的平方、基质不确定度的平方以及相关的分布不确定度的平方,将这些平方相加后开平方得到对应的合成标准不确定度。某个分量的不确定度小于最大不确定度分量五分之一时,该分量的影响忽略不计,不列入合成标准不确定度的计算。

不是所有检测方法都包含上述所有不确定度分量,不同检测方法的不确定度分量不同。

- a) 仪器分析法(如阻抗测量法、三磷酸腺苷法和流式细胞计数法),不需要菌落计数时,按公式(4)计算合成标准不确定度。

$$u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2} \quad \dots\dots\dots (4)$$

- b) 平板计数法(如 GB 4789.2、GB 4789.15),不需要对可疑菌进行确证时,按公式(5)计算合成标准不确定度。

$$u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{Poisson}}^2} \quad \dots\dots\dots (5)$$

- c) 平板计数法(如 GB 4789.10 第二法、GB 4789.41 第一法),需要对可疑菌进行确证时,按公式(6)计算合成标准不确定度。

$$u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{Poisson}}^2 + u_{\text{conf}}^2} \quad \dots\dots\dots (6)$$

- d) MPN 法(如 GB 4789.3 第一法、GB 4789.39),按公式(7)计算合成标准不确定度。

$$u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{MPN}}^2} \quad \dots\dots\dots (7)$$

8.1.2 基于再现性标准偏差的合成标准不确定度

根据实验室规定和客户要求,仅利用实验室内再现性标准偏差计算合成标准不确定度,见公式(8)。

$$u_c(y) = S_{\text{RR}} \quad \dots\dots\dots (8)$$

8.2 扩展不确定度

通过合成标准不确定度(8.1)和选定的包含因子(k)来计算扩展不确定度。本文件中, k 值等于 2 (相当于 95 % 的置信水平),扩展不确定度 U 的计算见公式(9):

$$U = 2 \times u_c(y) \quad \dots\dots\dots (9)$$

8.3 合成标准不确定度和扩展不确定度相关示例

合成标准不确定度和扩展不确定度示例详见附录 D。

9 检测报告中测量不确定度的表示方法

根据 8.1.1 的规定,按以下两种方式报告 MU:

- a) 技术不确定度、基质不确定度以及相关的分布不确定度进行综合评估;
b) 根据实验室规定以及客户要求,仅可使用技术不确定度代替合成标准不确定度报告结果。
当检测报告中需要体现 MU 时,报告中需明确地表述 MU 是扩展不确定度,同时还需包括置信水

平以及 MU 按本文件进行评估的声明,例如:“报告的扩展测量不确定度依据 RB/T 228 进行评估,基于合成标准不确定度乘以包含因子 $k=2$,置信水平 95%。”

如果 MU 仅基于技术不确定度,则检测报告中需进行明确声明,例如:“报告的扩展测量不确定度依据 RB/T 228 进行评估,基于合成标准不确定度乘以包含因子 $k=2$,置信水平 95%。合成标准不确定度等于实验室内的再现性标准偏差。”

MU 的单位宜与检测结果的单位一致,且报告中的测量结果值修约成与扩展不确定度相同位数的有效数字。修约在最后进行,以避免修约误差累计造成的影响。

在报告中,扩展不确定度与检测结果一起体现,以 $\log_{10}$ 对数值或自然值表示如下:

- a) $\log_{10}$ 结果 $\pm U$: $y \pm U \log_{10}(\text{CFU/g, CFU/mL, MPN/g 或 MPN/mL})$;
例如: $5.00 \pm 0.31 \log_{10}(\text{CFU/g, CFU/mL, MPN/g 或 MPN/mL})$;
- b) $\log_{10}$ 结果加限值: $y \log_{10}(\text{CFU/g, CFU/mL, MPN/g 或 MPN/mL}) [y-U; y+U]$;
例如: $5.0 \log_{10}(\text{CFU/g, CFU/mL, MPN/g 或 MPN/mL}) [4.7; 5.3]$;
- c) 自然值加限值: $x(\text{CFU/g, CFU/mL, MPN/g 或 MPN/mL}) [10^{x-U}; 10^{x+U}]$;
例如: $1.0 \times 10^2(\text{CFU/g, CFU/mL, MPN/g 或 MPN/mL}) [4.9 \times 10^1; 2.0 \times 10^2]$ 。

附录 A

(资料性)

用两个或两个以上测试部分计算实验室内再现性标准偏差和基质不确定度标准偏差

5.2.2.2 规定了每个实验室样品取 2 个测试部分得到实验室内再现性标准偏差的实验方案。每个实验室样品取 2 个以上的测试部分和(或)对不同样品取不同数量的测试部分的实验方案见图 A.1。

注：如果实验室难以按照图 A.1 方案(1)进行测试样品前处理，可用图 A.1 方案(2)替代。

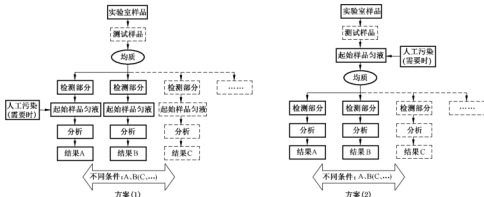


图 A.1 每个实验室样品取两个或两个以上测试部分的实验方案

该实验方案与样品取多个测试部分评估重复性标准偏差 S_r (见 6.3)类似,并且计算方法完全一样。标准偏差计算方法如下:在不同情况下,假设有 n 个实验室样品,从实验室样品 i 取 p_i ($i=1, 2, \dots, n$) 个测试部分,样品 i 的测试部分 j 的结果(x_{ij}),用 x_{ij} CFU/g、CFU/mL、MPN/g 或 MPN/mL 表示。计算标准偏差 S_{IR} 或 S_r ,如公式(A.1)和公式(A.2)所示:

$$S_{IR} \text{ 或 } S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{p_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (p_i - 1)}} \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{p_i} y_{ij}}{p_i} \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中:

S_{IR} ——实验室内再现性或中间精密度标准偏差;

S_r ——重复性标准偏差;

i ——实验室样品编号($i=1, 2, \dots, n$);

j ——从实验室样品 i 中取的测试部分的份数($j=1, 2, \dots, p_i$);

y_{ij} —— x_{ij} 的常用对数,即 $y_{ij} = \log_{10} x_{ij}$ CFU/g、CFU/mL、MPN/g 或 MPN/mL;

$\bar{y}_i$ ——样品 i 的 j 次测得值(对数值)的算术平均值。

表 A.1 为多个实验室样品多个测试部分菌落计数结果的标准偏差计算的示例。

表 A.1 多个实验室样品多个测试部分菌落计数结果的标准偏差计算

实验室 样品	测试 部分	稀释因子(d) 菌落计数(C)				菌落 总数 ΣC_{ij}	菌落总数的 平均数/ (CFU/g 或 mL) $\bar{x}_{ij}$	平均数 对数转换值/ ($\log_{10}$ CFU/g 或 mL) $y_{ij} = \log_{10} x_{ij}$	平均数	差的平方	自由度 $\nu_i - 1$
		d_1	C_1	d_2	C_2						
1	A	3	102	4	8	110	1.00×10^5	5.000 0		0.002 70	2
1	B	3	59	4	4	63	5.73×10^4	4.757 9	5.052 0	0.086 44	
1	C	3	248	4	27	275	2.50×10^5	5.397 9		0.119 70	
2	A	5	61	6	6	67	6.09×10^4	6.784 7	6.806 3	0.000 47	1
2	B	5	66	6	8	74	6.73×10^4	6.827 8		0.000 47	
3	A	4	168	5	18	186	1.69×10^5	6.228 1	6.119 1	0.011 88	3
3	B	4	86	5	7	93	8.45×10^4	5.927 1		0.036 88	
3	C	4	95	5	12	107	9.73×10^4	5.988 0		0.017 20	
3	D	4	216	5	21	237	2.15×10^5	6.333 4		0.045 89	
4	A	5	266	6	25	291	2.65×10^5	7.422 5	7.287 1	0.018 33	1
4	B	5	140	6	16	156	1.42×10^5	7.151 7		0.018 33	
5	A	6	45	7	5	50	4.55×10^4	7.657 6	7.387 3	0.073 06	1
5	B	5	129	6	15	144	1.31×10^5	7.117 0		0.073 06	
6	A	4	129	5	12	141	1.28×10^5	6.107 8	6.085 1	0.000 52	1
6	B	4	117	5	10	127	1.15×10^5	6.062 4		0.000 52	
7	A	2	92	3	18	100	9.09×10^4	3.958 6	4.083 0	0.015 48	2
7	B	2	131	3	13	144	1.31×10^5	4.117 0		0.001 15	
7	C	2	149	3	15	164	1.49×10^5	4.173 5		0.008 18	
8	A	3	139	4	13	152	1.38×10^5	5.140 5	5.148 9	0.000 07	1
8	B	3	143	4	15	158	1.44×10^5	5.157 3		0.000 07	
9	A	1	49	2	5	54	4.91×10^4	2.691 0	2.981 2	0.084 20	3
9	B	1	129	2	13	142	1.29×10^5	3.110 9		0.016 83	
9	C	1	88	2	7	95	8.64×10^4	2.936 3		0.002 01	
9	D	1	151	2	18	169	1.54×10^5	3.186 5		0.042 15	
10	A	4	142	5	13	155	1.41×10^5	6.148 9	5.755 3	0.154 93	1
10	B	3	227	4	26	253	2.30×10^5	5.361 7		0.154 93	
求和									0.985 44	$n=16$	
									0.985 44/16=	0.061 59	
									$S_{ik} = \sqrt{0.061 59} =$	0.248 17	

当所需要的标准偏差是组内均方差的平方根时,可选用便于运行单因素方差分析(ANOVA)的工具快捷计算出标准偏差。例如:通过电子表格对表 A.1 中 y_{ij} 进行单因素方差分析,运算后得到样品内的均方差是 0.061 59,此时: $S_{ik} = \sqrt{0.061 59} = 0.248 17$,见表 A.2。

注:当每个实验室样品只有 2 个值的时候,方差分析方法也适用。

表 A.2 使用单因素方差分析法计算多个样品的实验室内再现性标准偏差

实验室 样品 i	菌落总数的平均数/(CFU/g 或 mL) $\bar{x}_{ij}$			平均数对数转换值/($\log_{10}$ CFU/g 或 mL) $y_{ij} = \log_{10} x_{ij}$		
1	1.00×10 ⁵	5.73×10 ⁴	2.50×10 ⁵	5.000 0	4.757 9	5.397 9
2	6.09×10 ⁵	6.73×10 ⁵		6.784 7	6.827 8	
3	1.69×10 ⁶	8.45×10 ⁵	9.73×10 ⁵ 2.15×10 ⁶	6.228 1	5.927 1	5.988 0 6.333 4
4	2.65×10 ⁷	1.42×10 ⁷		7.422 5	7.151 7	
5	4.55×10 ⁷	1.31×10 ⁷		7.657 6	7.117 0	
6	1.28×10 ⁶	1.15×10 ⁶		6.107 8	6.062 4	
7	9.09×10 ⁵	1.31×10 ⁶	1.49×10 ⁶	3.958 6	4.117 0	4.173 5
8	1.38×10 ⁵	1.44×10 ⁵		5.140 5	5.157 3	
9	4.91×10 ⁵	1.29×10 ⁵	8.64×10 ⁵ 1.54×10 ⁵	2.691 0	3.110 9	2.936 3 3.186 5
10	1.41×10 ⁶	2.30×10 ⁵		6.148 9	5.361 7	
方差分析:单因素方差分析						
样品	测试部分数量	求和	平均	方差		
样品 1	3	15.155 8	5.051 933	0.104 423		
样品 2	2	13.612 5	6.806 25	0.000 929		
样品 3	4	24.476 6	6.119 15	0.037 286		
样品 4	2	14.574 2	7.287 1	0.036 666		
样品 5	2	14.774 6	7.387 3	0.146 124		
样品 6	2	12.170 2	6.085 1	0.001 031		
样品 7	3	12.249 1	4.083 033	0.012 411		
样品 8	2	10.297 8	5.148 9	0.000 141		
样品 9	4	11.924 7	2.981 175	0.048 401		
样品 10	2	11.510 6	5.755 3	0.309 842		
方差分析						
差异源	SS	df	MS	F	P-value	F-crit
样品间	51.327 008 25	9	5.703 001	92.594 43	4.36E-12	2.537 667
样品内	0.985 459 056	16	0.061 591			
总计	52.312 467 31	25				
注: SS——平方和,df——自由度,MS——均方差,F——F 分布变量,P-value——概率值,F-crit——F 分布变量的关键值						

附录 B

(资料性)

基质的影响和基质不确定度

B.1 概述

在液体基质(例如牛奶、水)中的微生物一般会随机(泊松)分布(见图 B.1,情况 A),单个微生物和微生物簇可以在琼脂平板上形成菌落。在固体食品中,微生物分布在食品微粒之间,但是它们不是随机分布的,而是一种不均匀分布,如在肉或蔬菜中,微生物是随机污染其表面,而不是食品深层,菌落总体来说也是在其表面呈聚集性分布(见图 B.1,情况 B)。

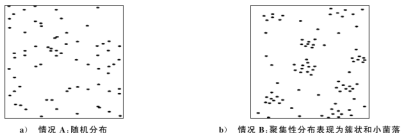
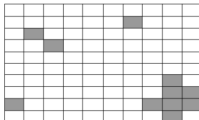


图 B.1 表面微生物分布的假想图

如果一种成分复杂的食物是由一种原料(例如肉)与另一种原料(例如蔬菜和酱料)混合制成,那么所有固体原料表面的微生物将分布到整个多组分产品中,但在终产品中微生物的分布也不是随机的。

食品基质中的微生物数量反应了该食品中每种原料的相对污染水平,以及食品加工过程对微生物破坏的影响程度。从实验室食品样品中选取几个测试部分,检测后发现微生物的污染水平并不一致。特定微生物污染水平可以反应原料的数量和质量,以及食品加工过程对其分布的影响程度。如果奶粉和其他粉状产品仅是一个生产批次中小部分被特定微生物污染,也会出现类似情况(见图 B.2)。

即使实验室样品在检测之前已经充分混匀,微生物污染水平也会因不同的测试部分而发生变化,尤其是在固体食品基质中。这种变化在本文件中称为“基质不确定度”。



注：黑色方块表示有特定目标微生物检出的样品。

图 B.2 100 个粉末状样品或复杂食品中低水平的特定目标微生物分布假想图

B.2 示例

欧盟参考实验室根据 ISO 19036:2019 的规定,研究并计算了一些食品样品的基质不确定度 u_{matrix} ($\log_{10}$ CFU/g 或 CFU/mL)结果(表 B.1),实验室可以利用其作为相同或相似基质的基质不确定度。

表 B.1 欧盟参考实验室研究食品样品的基质不确定度结果

类型	样品	目标微生物	方法	$u_{\text{matrix}} /$ ($\log_{10}$ CFU/g 或 CFU/mL)	实验室	国家或地区	备注
脂肪含量高 的生乳 制品	纳克索斯 岛·阿塞 尼克硬质 奶酪	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,06	雅典食品 卫生局	希腊	技术流程上对 应于 GB 4789.2
脂肪含量 高或高背 景菌的生 乳制品	卡门培 尔·诺曼 底软奶酪	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,14	国家公共 卫生与环 境研究院	荷兰	技术流程上对 应于 GB 4789.2
巴氏杀菌 乳制品	半硬(未 熟)	大肠埃希 氏菌	ISO 16649-2	0,18	农业、食品 和海洋部	爱尔兰	技术流程上对 应于 GB 4789.38
巴氏杀菌 乳制品	羊乳酪	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,10	雅典食品 卫生局	希腊	技术流程上对 应于 GB 4789.2
巴氏杀菌 乳制品	硬质奶酪	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,04	约阿尼纳 兽医实验 室	希腊	技术流程上对 应于 GB 4789.2
鲜肉(未处 理)	牛肉片	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,40	动物源性 食品控制 实验室	塞浦路斯	技术流程上对 应于 GB 4789.2
鲜肉(未处 理)	碎牛肉	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,33	比利时国 家卫生研 究院	比利时	技术流程上对 应于 GB 4789.2
鲜肉(未处 理)	猪肉片	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,12	卫生与普 医公共卫 生研究所	罗马尼亚	技术流程上对 应于 GB 4789.2
巴氏杀菌 牛奶	迷你冰淇 淋甜筒	肠杆菌科	EN ISO 21528-2	0,09	国家综合 实验室	塞浦路斯	技术流程上对 应于 GB 4789.41
熟肉制品	火腿块·珍 宝火腿块	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,11	国家公共 卫生与环 境研究院	荷兰	技术流程上对 应于 GB 4789.2

表 B.1 欧盟参考实验室研究食品样品的基质不确定度结果 (续)

类型	样品	目标微生物	方法	u_{matrix} / (log ₁₀ CFU/g 或 CFU/mL)	实验室	国家或地区	备注
熟肉制品	切片火腿	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,39	奥洛穆茨兽医研究所	捷克	技术流程上对应于 GB 4789,2
发酵或干制肉制品	萨拉米	菌落总数	EN ISO 4833-2	0,09	德国联邦风险评估研究所	德国	技术流程上对应于 GB 4789,2
生腌烟熏	乔利佐·西班牙香肠	单核细胞增生李斯特菌	EN ISO 11290-2	0,10	国家农业和兽医研究所	葡萄牙	技术流程上对应于 GB 4789,30
鲜肉	熟肉制品、切块禽肉	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,08	比利时国家卫生研究院	比利时	技术流程上对应于 GB 4789,2
鲜肉	禽颈皮	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,07	卫生与兽医公共卫生研究所	罗马尼亚	技术流程上对应于 GB 4789,2
预制 (处理)	预制禽肉、用香料腌制禽肉	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,15	约阿尼纳兽医实验室	希腊	技术流程上对应于 GB 4789,2
烟熏或腌制及其他加工产品	熏鱼	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,29	比利时国家卫生研究院	比利时	技术流程上对应于 GB 4789,2
即食水果切块	混合水果	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,19	比利时国家卫生研究院	比利时	技术流程上对应于 GB 4789,2
即食水果切块	伴有生蔬菜	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,05	凝固酶阳性的葡萄球菌的欧盟参考实验室	法国	技术流程上对应于 GB 4789,2
蔬菜	卷心莴苣	肠杆菌科	EN ISO 21528-2	0,07	国家综合实验室	塞浦路斯	技术流程上对应于 GB 4789,41
蔬菜	卷心莴苣	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,13	国家综合实验室	塞浦路斯	技术流程上对应于 GB 4789,2

表 B.1 欧盟参考实验室研究食品样品的基质不确定度结果 (续)

类型	样品	目标微生物	方法	M_{matrix} / (log ₁₀ CFU/g 或 CFU/mL)	实验室	国家或地区	备注
未加工和冷冻	冬瓜球	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,36	单核细胞增生李斯特氏菌的欧盟参考实验室	法国	技术流程上对应于 GB 4789.2
糕点	蛋糕, 其中包括奶油、新鲜水果	肠杆菌科	EN ISO 21528-2	0,03	国家综合实验室	塞浦路斯	技术流程上对应于 GB 4789.41
复合食品	冷藏意大利面沙拉	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,31	比利时国家卫生研究院	比利时	技术流程上对应于 GB 4789.2
复合食品含大量生制原料	Sandwich (主要原料: 面包、熟火腿片、半硬奶酪片、冰山沙拉、生黄瓜片、美味酱)	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,08	卫生与兽医公共卫生研究所	罗马尼亚	技术流程上对应于 GB 4789.2
基于蛋黄酱的生熟沙拉	肉沙拉配意大利面、生蔬菜和奶酪	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,09	凝固酶阳性的葡萄球菌的欧盟参考实验室	法国	技术流程上对应于 GB 4789.2
湿粮	狗食用的生骨肉饲料, 主要用生牛瘤胃 (99%)	肠杆菌科	NMKL 144 第3版, 2005年修改	0,09	空肠弯曲菌的欧盟参考实验室-国家兽医研究所	欧盟	技术流程上对应于 GB 4789.41
动物饲料 (鱼)	面粉	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,08	卫生与兽医公共卫生研究所	罗马尼亚	技术流程上对应于 GB 4789.2
动物粪便	蛋鸡粪便	菌落总数	EN ISO 4833-1	0,51	国家公共卫生与环境研究院	荷兰	技术流程上对应于 GB 4789.2

附录 C

(资料性)

最可能数(MPN)不确定度检索表

C.1 9管法的最可能数(MPN)不确定度检索

使用3个接种量1 mL或g, 3个接种量0.1 mL或g和3个接种量0.01 mL或g, 阳性管数对应的最可能数(MPN)不确定度检索见表C.1。

表 C.1 9管法的最可能数(MPN)不确定度检索表

不同接种量的阳性管数/mL(或g)			MPN	$\log_{10}$ MPN	u_{MPN} (SD $\log_{10}$ MPN)	稀有度 指数	稀有度 分类
1,00	0,10	0,01					
0	0	0	0	NA*	NA*	1,00	1
0	1	0	0,30	0,52	0,43	0,09	1
1	0	0	0,36	0,45	0,44	1,00	1
1	0	1	0,72	0,14	0,31	0,02	2
1	1	0	0,74	0,13	0,31	0,21	1
1	2	0	1,1	0,06	0,26	0,02	2
2	0	0	0,92	0,04	0,32	1,00	1
2	0	1	1,4	0,16	0,26	0,04	2
2	1	0	1,5	0,17	0,27	0,43	1
2	1	1	2,0	0,31	0,23	0,02	2
2	2	0	2,1	0,32	0,24	0,07	1
3	0	0	2,3	0,36	0,31	1,00	1
3	0	1	3,8	0,59	0,31	0,08	1
3	1	0	4,3	0,63	0,33	1,00	1
3	1	1	7,5	0,87	0,30	0,21	1
3	1	2	12	1,1	0,26	0,02	2
3	2	0	9,3	0,97	0,32	1,00	1
3	2	1	15	1,2	0,27	0,42	1
3	2	2	21	1,3	0,24	0,07	1
3	3	0	24	1,4	0,32	1,00	1
3	3	1	46	1,7	0,34	1,00	1
3	3	2	110	2,0	0,32	1,00	1
3	3	3	∞	NA*	NA*	1,00	1

表中仅列出了类别1和类别2中结果的组合

注1: 表中所列检样量, 如改用1 g(mL), 0.1 g(mL)和0.01 g(mL)时, 则表中数字相应降低10倍; 如改用0.01 g(mL), 0.001 g(mL)和0.000 1 g(mL)时, 则表中数字相应增高10倍, 其余类推。

注2: 稀有度指数介于0~1之间。如果连续稀释试验结果得到的浓度非常可能等于MPN值, 则稀有度指数是1; 连续稀释试验结果得到的浓度几乎不可能等于MPN值, 则稀有度指数是0。稀有度指数分为3类:

- 1) 类别1: 如果稀有度指数落在0.05到1之间, 该结果出现的可能性大于95%;
- 2) 类别2: 如果稀有度指数落在0.05到0.01之间, 该结果出现的可能性小于5%;
- 3) 类别3: 如果稀有度指数落在0到0.01之间, 该结果出现的可能性小于1%。

* 不适用。

C.2 15 管法的最可能数(MPN)不确定度检索

使用 5 个接种量 1 mL 或 g, 5 个接种量 0.1 mL 或 g 和 5 个接种量 0.01 mL 或 g, 阳性管数对应的最可能数(MPN)不确定度检索见表 C.2。

表 C.2 15 管法的最可能数(MPN)不确定度检索表

不同接种量的阳性管数/mL(或 g)			MPN	$\log_{10}$ MPN	μ_{MPN} (SD $\log_{10}$ MPN)	稀有度 指数	稀有度 分类
1	0.1	0.01					
0	0	0	0	NA ^a	NA ^a	1	1
0	1	0	0.18	0.74	0.43	0.09	1
1	0	0	0.20	0.70	0.44	1.00	1
1	0	1	0.40	0.40	0.31	0.02	2
1	1	0	0.40	0.39	0.31	0.21	1
1	2	0	0.61	0.21	0.25	0.02	2
2	0	0	0.45	0.35	0.31	1.00	1
2	0	1	0.68	0.17	0.25	0.03	2
2	1	0	0.68	0.16	0.25	0.35	1
2	1	1	0.92	0.04	0.22	0.02	2
2	2	0	0.93	0.03	0.22	0.06	1
3	0	0	0.78	0.11	0.26	1.00	1
3	0	1	1.1	0.02	0.22	0.05	1
3	1	0	1.1	0.03	0.22	0.57	1
3	1	1	1.4	0.14	0.20	0.03	2
3	2	0	1.4	0.14	0.20	0.15	1
3	2	1	1.7	0.23	0.19	0.10	2
3	3	0	1.7	0.24	0.19	0.03	2
4	0	0	1.3	0.11	0.23	1.00	1
4	0	1	1.7	0.22	0.21	0.08	1
4	1	0	1.7	0.23	0.21	0.92	1
4	1	1	2.1	0.33	0.20	0.07	1
4	2	0	2.2	0.33	0.20	0.31	1
4	2	1	2.6	0.42	0.19	0.03	2
4	3	0	2.7	0.43	0.19	0.07	1
4	4	0	3.4	0.53	0.18	0.01	2
5	0	0	2.3	0.36	0.24	0.77	1
5	0	1	3.1	0.50	0.24	0.09	1
5	1	0	3.3	0.52	0.24	1.00	1
5	1	1	4.6	0.66	0.25	0.20	1

表 C.2 15 管法的最可能数(MPN)不确定度检索表(续)

不同接种量的阳性管数/mL(或 g)			MPN	$\log_{10}$ MPN	u_{MPN} (SD $\log_{10}$ MPN)	稀有度 指数	稀有度 分类
1	0.1	0.01					
5	1	2	6.3	0.80	0.24	0.02	2
5	2	0	4.9	0.69	0.26	1.00	1
5	2	1	7.0	0.84	0.24	0.36	1
5	2	2	9.4	0.97	0.22	0.06	1
5	3	0	7.9	0.90	0.25	1.00	1
5	3	1	11	1.0	0.22	0.57	1
5	3	2	14	1.1	0.20	0.15	1
5	3	3	17	1.2	0.19	0.03	2
5	4	0	13	1.1	0.23	1.00	1
5	4	1	17	1.2	0.21	0.94	1
5	4	2	22	1.3	0.20	0.30	1
5	4	3	28	1.4	0.19	0.07	1
5	4	4	35	1.5	0.18	0.01	2
5	5	0	24	1.4	0.24	0.74	1
5	5	1	35	1.5	0.25	1.00	1
5	5	2	54	1.7	0.27	1.00	1
5	5	3	92	2.0	0.26	1.00	1
5	5	4	160	2.2	0.24	1.00	1
5	5	5	∞	NA*	NA*	1.00	1
表中仅列出了类别 1 和类别 2 中结果的组合 注 1: 表中所列检样量,如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时,则表中数字相应降低 10 倍;如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)和 0.000 1 g(mL)时,则表中数字相应增高 10 倍,其余类推。 注 2: 稀有度指数介于 0~1 之间。如果连续稀释试验结果得到的浓度非常可能等于 MPN 值,则稀有度指数是 1;连续稀释试验结果得到的浓度几乎不可能等于 MPN 值,则稀有度指数是 0。稀有度指数分为 3 类: 1) 类别 1:如果稀有度指数落在 0.05 到 1 之间,该结果出现的可能性大于 95%; 2) 类别 2:如果稀有度指数落在 0.05 到 0.01 之间,该结果出现的可能性小于 5%; 3) 类别 3:如果稀有度指数落在 0 到 0.01 之间,该结果出现的可能性小于 1%。 *不适用。							

附录 D

(资料性)

合成标准不确定度和扩展不确定度计算示例

D.1 示例 1——包含技术、基质和泊松不确定度分量的不确定度

对均匀性良好液体样品,按照第 5 章计算技术不确定度,得到 $u_{\text{tech}}=0.15\log_{10}\text{CFU/mL}$;根据 6.2,基质不确定度可以取定值,即 $u_{\text{matrix}}=0.1\log_{10}\text{CFU/mL}$ 。

假设某一批次液体样品进行菌落总数检测,取连续 2 个稀释度,每个平板接种 1.0 mL,得到 10^{-3} 稀释度 102 CFU, 10^{-4} 稀释度 8 CFU,菌落总数之和 $\Sigma C=102+8=110\text{ CFU}$,此时用公式(2)计算菌落总数之和 $\Sigma C=110$ 时的泊松分布不确定度 u_{Poisson} :

$$u_{\text{Poisson}} = \frac{0.434\ 3}{\sqrt{110}} = \frac{0.434\ 3}{10.49} = 0.041\ 4\log_{10}\text{CFU/mL}$$

泊松分布不确定度 $u_{\text{Poisson}}=0.0414\log_{10}\text{CFU/mL}$,此时比值 $u_{\text{Poisson}}/u_{\text{tech}}=0.041\ 4/0.15=0.276$,大于 0.2,则 u_{Poisson} 不能忽略不计(8.1.1)。

此时,合成标准不确定度 $u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{Poisson}}^2} = \sqrt{0.15^2 + 0.10^2 + 0.041\ 4^2} = \sqrt{0.034\ 21} = 0.185\log_{10}\text{CFU/mL}$, $u_c(y)$ 乘以包含因子 $k(k=2)$,得出扩展不确定度 $U=0.37\log_{10}\text{CFU/mL}$ (保留 2 位有效数字)。

本示例中,菌落计数的平均数为 $\frac{102+8}{1,1} \times 10^3 = 1.0 \times 10^5\text{ CFU/mL}$,换算成以 10 为底的对数是 $5.0\log_{10}\text{CFU/mL}$,此时测试结果可表示为 $5.0 \pm 0.37\log_{10}\text{CFU/mL}$ 。

D.2 示例 2——可以忽略不计的泊松不确定度分量

假设示例 1 中技术不确定度计算值 $u_{\text{tech}}=0.25\log_{10}\text{CFU/mL}$,其他不变。

比值 $u_{\text{Poisson}}/u_{\text{tech}}=0.0414/0.25=0.166$,小于 0.2,则 u_{Poisson} 可以忽略不计(8.1.1)。

此时,合成标准不确定度 $u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2} = \sqrt{0.25^2 + 0.10^2} = \sqrt{0.072\ 5} = 0.269\log_{10}\text{CFU/mL}$, $u_c(y)$ 乘以包含因子 $k(k=2)$,得出扩展不确定度 $U=0.54\log_{10}\text{CFU/mL}$ (保留 2 位有效数字)。

本示例中,菌落计数的平均数为 $\frac{102+8}{1,1} \times 10^3 = 1.0 \times 10^5\text{ CFU/mL}$,换算成以 10 为底的对数是 $5.0\log_{10}\text{CFU/mL}$,此时测试结果可表示为 $5.0 \pm 0.54\log_{10}\text{CFU/mL}$ 。

D.3 示例 3——包含泊松、基质和确证不确定度分量的不确定度

按照示例 1,需要挑取选择性培养基上的典型和可疑菌落进行目标菌确证,例如选取的 5 个典型和可疑菌落进行确证后,有 4 个为目标菌,对结果进行修正,见表 D.1。

表 D.1 包含泊松、基质和确证不确定度分量的不确定度的计算示例

计算内容	疑似菌落数	确认试验修正后的菌落数
ΣC	110	
结果 $x/(CFU/mL)$	100 000	$100\ 000 \times 4/5 = 80\ 000$
取对数后 $y/(\log_{10}\text{CFU/mL})$	5.0	4.903

根据 7.3, 当 $n_p=5$, $n_c=4$, 检索表 4 得出 $u_{\text{conl}}=0.088\ 8$, $u_{\text{conl}}/u_{\text{tech}}=0.088\ 8/0.15=0.592$, 大于 0.2, 则 u_{conl} 不能忽略不计(8.1.1)。

比值 $u_{\text{Poisson}}/u_{\text{tech}}=0.041\ 4/0.15=0.276$, 大于 0.2, 则 u_{Poisson} 不能忽略不计(8.1.1)。

此时, 计算合成标准不确定度 $u_c(y)=\sqrt{u_{\text{tech}}^2+u_{\text{matrix}}^2+u_{\text{Poisson}}^2+u_{\text{conl}}^2}=\sqrt{0.15^2+0.10^2+0.041\ 4^2+0.088\ 8^2}=\sqrt{0.042\ 1}=0.205\log_{10}\text{CFU/mL}$, $u_c(y)$ 乘以包含因子 $k(k=2)$ 后, 得出扩展不确定度 $U=0.41\log_{10}\text{CFU/mL}$ (保留 2 位有效数字)。

本示例中, 确认试验修正后的菌落数换算成以 10 为底的对数是 $4.903\log_{10}\text{CFU/mL}$, 此时测试结果可表示为 $4.9\pm0.41\log_{10}\text{CFU/mL}$ 。

D.4 示例 4——包含技术、基质和最可能数不确定度分量的不确定度

某实验室用 GB 4789.3 第一法(MPN 法, 3 个稀释度, 每个稀释度 3 管)来计数液态牛奶中大肠菌群。技术标准不确定度 u_{tech} 等于再现性标准偏差 S_R , 如对 20 个样品在再现性条件下检测后, $u_{\text{tech}}=S_R=0.49\log_{10}\text{MPN/mL}$ 。

液态牛奶样品均匀性良好, 其基质不确定度为 $u_{\text{matrix}}=0.1\log_{10}(6.2)$ 。比值 $u_{\text{matrix}}/u_{\text{tech}}=0.10/0.49=0.204$, 大于 0.20, 则 u_{matrix} 不能忽略不计(8.1.1)。

假设选取液态牛奶样品三个连续稀释度(原液、 10^{-1} 和 10^{-2}), 每个稀释度接种 3 管液体培养基, 每管接种 1mL, 共接种 9 管培养基, 培养后每个稀释度出现阳性管数分别为 3、2 和 1。检索表 C.1 得出 $u_{\text{MPN}}=0.27\log_{10}\text{MPN}$ 。比值 $u_{\text{MPN}}/u_{\text{tech}}=0.27/0.49=0.55$, 大于 0.2, 则 u_{MPN} 不能忽略不计(8.1.1)。

此时, 计算合成标准不确定度 $u_c(y)=\sqrt{u_{\text{tech}}^2+u_{\text{matrix}}^2+u_{\text{MPN}}^2}=\sqrt{0.49^2+0.1^2+0.27^2}=\sqrt{0.323}=0.568\log_{10}\text{MPN/mL}$, $u_c(y)$ 乘以包含因子 $k(k=2)$ 后, 得出扩展不确定度 $U=1.1\log_{10}\text{CFU/mL}$ (保留 2 位有效数字)。

本示例中, MPN 法检测液态牛奶中大肠菌群结果可表示为 $1.2\pm1.1\log_{10}\text{MPN/mL}$ 。

参 考 文 献

- [1] GB/T 3358.1—2009 统计学词汇及符号 第1部分：一般统计术语与用于概率的术语
- [2] GB 4789.3 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数
- [3] GB 4789.10 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验
- [4] GB 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数
- [5] GB 4789.30 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验
- [6] GB 4789.38 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数
- [7] GB 4789.39 食品安全国家标准 食品微生物学检验 粪大肠菌群计数
- [8] GB 4789.41 食品安全国家标准 食品微生物学检验 肠杆菌科检验
- [9] GB/T 22553 利用重复性、再现性和正确度的估计值评定测量不确定度的指南
- [10] JJF 1001—2011 通用计量术语及定义
- [11] RB/T 037 食品微生物检测标准方法等效性评估指南
- [12] SN/T 3266—2012 食品微生物检验方法确认技术规范
- [13] ISO 4833-1 Microbiology of the food chain—Horizontal method for the enumeration of microorganisms—Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique
- [14] ISO 7218 Microbiology of food and animal feeding stuffs—General requirements and guidance for microbiological examinations
- [15] ISO 19036:2019 Microbiology of the food chain—Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations
- [16] 欧盟参考实验室研究食品样品的基质不确定度结果, <https://sitesv2.anses.fr/en/minisite/listeria-monocytogenes/matrix-uncertainty-mau-values>

