

国家计量技术规范规程制修订

《微生物活菌流式计数参考方法》
(征求意见稿)
编制说明

中国计量科学研究院

2026 年 9 月

《微生物活菌流式计数参考方法》

编写说明

一、任务来源

根据市场监管总局办公厅关于下达《2024 年国家计量技术规范制定、修订及宣贯计划》的通知{市监计量发〔2024〕40 号文件}，由中国计量科学研究院、广东省科学院微生物研究所和中国质量检测检验科学研究院（原中国检验检疫科学研究院）作为主要起草单位承担《微生物活菌流式计数参考方法》的制定工作。归口单位为全国生物计量技术委员会，参加起草单位为中国测试技术研究院和内蒙古伊利实业集团股份有限公司。

二、规范制定的必要性

1) 本规范的目的、意义

食品安全、医疗健康、环境检测、生物工程等领域都需要对微生物进行测量，其活菌的精确测量在上述过程中均发挥关键作用。活菌总数是指每克（毫升）检样中所有的活细菌数目，测量活菌总数可准确评价食品生产过程的卫生状况、评估益生菌产品的活力、监测生物样本中细菌的药敏反应等。相比于广泛应用的“菌落总数”指标，活菌总数指标能更准确评价样品中的厌氧菌、活的不可培养细菌等，进而全面评估样品微生物指标。

活菌总数测量最为经典测量方法为平板计数法，该法具有无需设备、成本较低、可获得单菌落培养物等优点，一直沿用至今。然而，平板计数法“测不准、不恒定、测不快”的难题，导致微生物测量结果重复性和再现性有待提升（即不确定度大）、不能复测和测量时间长（近 2 天），无法满足微生物精准快速测量的需求。此外在微生物计量领域，目前国内外研制的微生物标准物质也大多采用平板培养计数方法进行定值，导致了较高的标准物质不确定度。

流式分析技术（Flow cytometry, FCM）是二十世纪 70 年代发展起来的一种用于测量细胞或其他生物粒子的物理和化学特性的技术，主要是通过光学信号来反映每一个粒子物理化学性质，从而获得整个生物种群的统计学信息。流式分析技术刚开始主要应用在科学研究和医学方面的体积较大的真核细胞检测中。主要原因是微生物作为原核细胞，体积比真核细胞要小将近十倍，激光照射后得到的

散射光信号较弱。但随着近年来光学仪器的发展与流式细胞仪的不断改进，流式分析技术逐步实现了微米级甚至纳米级样品检测，也逐渐应用于微生物的测量。国际上也已经将微生物流式计数方法作为下一步研究重点，旨在将经典微生物培养计数方法的培养方式转变为菌体荧光标记的非培养方式，将菌落计数和代谢物检测转变为数字信号测量方式，将人工判读计算方式转变为软件自动分析方式。微生物流式计数方法与传统平板计数法相比有三点优势：第一，该方法基于仪器进行测量，相比于手工菌落计数具有更好的重复性和再现性，实现了微生物测量不确定度的质的飞跃；第二，该方法不依赖培养基，能够准确识别和计数 VBNC 状态的细菌，并且测量时间大大缩短；第三，流式计数法的操作可以完全可以用公式描述和理解，并为微生物测量提供 SI 单位的溯源性。从而大大提升测量精度和节省时间。

综上，鉴于流式分析法快速准确测量活菌总数的广泛应用前景，制定微生物活菌流式计数参考方法的计量技术规范，明确微生物活菌总数测量步骤与质量控制，对支撑活菌总数快速准确测量具有重要的指导意义。

2) 国内外计量技术规范现状和发展趋势

目前，国内外使用流式计数法测量微生物的标准主要有 ISO 19344:2015《牛奶和乳制品.发酵剂、益生菌和发酵产品.用流式细胞术对乳酸菌的定量》和 SN/T 5436-2022《乳及乳制品发酵剂、发酵产品中乳酸菌计数 流式细胞仪法》，这两个标准均使用流式计数法测量乳制品中益生菌的数量。标准推荐了三种活菌总数的荧光标记策略：（1）cFDA 和 PI 策略；（2）SYTO 和 PI 策略；（3）DiOC₂ 策略。这三种荧光策略的原理不同，表征微生物活性时针对的位点不同，因此使用三种策略可能导致结果的不可比。此外，上述两个标准适用的样品基体均为乳及乳制品，检测对象也仅限于乳酸菌，并且没有从计量学角度对方法性能指标进行规定，难以满足日益增长的食品安全、医疗健康、环境检测、生物工程等领域活菌总数精准快速测量的需求。

在计量学领域，国际上已经将基于流式分析技术的微生物活菌测量装置和精准测量方法作为下一步研究重点。美国 NIST 采用类流式技术的库尔特计数法对酵母菌活菌数量进行测量，德国 PTB 采用流式分析技术应用于微米级与纳米级微生物含量测量方面做了尝试性的研究。此外，国际计量局（BIPM）国际计量

委员会物质的量咨询委员会（CCQM）把建立把微生物测量新的溯源途径和计量标准作为重点开展研究，CCQM 细胞分析工作组（CAWG）在 2021-2030 年战略计划中，将流式分析法认定为潜在高等级微生物测量方法。ISO17511:2020《测量生物样品中的量-校准品和控制品定值的计量可追溯性》也首次将流式分析技术为具有溯源性的参考测量程序。此外，我国计量技术规范 JJF 2307-2025《微生物计数标准物质的研制》也提出将流式计数法作为微生物标准物质定值的测量程序。

微物流式计数法所需主要装置为流式细胞仪（流式分析仪），刚开始主要应用在科学研究和医学方面的体积较大的真核细胞检测中。但随着近年来技术的发展，流式细胞仪逐步应用于微生物的测量。我国先后发布了 JJF 1665-2017《流式细胞仪校准规范》、YY/T 0588-2017《流式细胞仪》等标准对流式细胞仪进行质量控制或性能评价。尽管如此，上述标准仅考虑到流式计数法在真核细胞计数的质控，无法满足微生物测量的质量控制。

综上所述，考虑到现有微物流式计数标准的应用场景单一、荧光标记策略不可比、方法性能评价和质量控制缺乏，以及微生物计量领域对参考测量方法的需求，有必要来制定微生物活菌流式计数参考方法的计量技术规范，明确微生物活菌总数测量步骤与质量控制，从而保障测量结果的溯源和可比。

三、规范制定过程

1) 前期科学研究

(1) 文献调研

起草组对国内外关于微物流式计数相关的文献报道进行了充分调研和收集，并对收集的资料进行汇总、整理、分类，确定了本项目的总体方案和基本方法。另外，调研了国内外相似标准、规范的情况。

(2) 科学研究及研制经验

本规范第一起草单位是国家最高的计量科学研究中心和国家级法定计量技术机构，主要职责是研究、建立、保存、维护国家计量基准和国家计量标准，复现单位量值，研制国家重要有证标准物质，开展国际量值比对，实现国际等效；开展量值传递和溯源工作，保持全国量值统一；开展计量科学基础前沿研究，以及国家科技发展需要的测量理论、测量技术和量值溯源方法的研究等。

本规范起草团队包括专业从事微生物研究的科研人员，具有深厚的基础研究及应用研究工作经验，具有扎实的微生物流式计数方法研究经验。制定 JJF 1665-2017《流式细胞仪校准规范》和 GB/T 39730-2020《细胞计数通用要求 流式细胞测定法》等多项相关标准。第一起草单位还主导了国际微生物流式计数的计量比对 1 项（CCQM-P205 饮用水中膜完整性大肠杆菌测量比对）。

以上工作基础，为本规范的顺利制定提供了技术和工作积累。

2) 规范草稿确定

在文献调研和起草组近年科研工作的基础上，规范制定承担单位首先提出了规范草案的框架，包括适用范围、测量条件、测量流程、方法确认、不确定度的评定与表示、计量溯源性说明、方法质量控制等，组织微生物检测专家草案进行了深入的讨论，最后初步确定了草案的框架和主体内容。

3) 规范初稿的起草

规范立项后，即成立了起草小组，成员包括中国计量科学研究院专业从事微生物计量的科研人员，也邀请了国内具有微生物检测经验的专家参与规范的起草。起草组汇集了微生物计量、微生物检测、食品安全等领域的专家。

起草小组讨论、确定规范的细节问题，每位起草组成员都提出了修改意见。根据讨论结果，对规范进行了进一步修改，形成了规范初稿。

4) 首次征求意见稿的起草

2025 年 8 月，请国内权威微生物专家对规范初稿进行审阅，专家们提出了许多中肯的意见和建议。之后，起草组内部进行了充分的讨论和修改，形成首次征求意见稿和编制说明，广泛征求意见。

5) 首次报审稿的起草

2025 年 9 月至 12 月，规范广泛征求意见，专家们提出了许多中肯的意见和建议。起草小组根据意见，对规范进行了进一步修改完善，最终形成规范报审稿。

2025 年 12 月，全国生物计量技术委员会对报审稿进行审定。但由于规范框架与写法问题未能统一意见，规范推迟。

6) 二次征求意见稿的起草

审定会后，起草组内部进行了充分的讨论和修改，再次形成征求意见稿和编制说明，提交全国生物计量技术委员会，由委员会将征求意见稿发送国内相关单

位，广泛征求意见。

7) 编制日程

2024 年 1 月，由中国计量科学研究院向全国生物计量技术委员会提出规范制定工作建议；

2024 年 5 月 31 日，市场监督管理总局同意规范立项；

2024 年 6 月，进行市场调研及文献资料查询；

2024 年 12 月，规范制定承担单位完成规范草案的框架，初步确定主体内容；

2025 年 1 月至 7 月，中国计量科学研究院邀请起草小组成员进行讨论与修改，形成规范初稿；

2025 年 8 月至 9 月，中国计量科学研究院组织同行专家审阅，并根据审阅意见，修改完善形成首次征求意见稿。

2025 年 9 月至 12 月，规范广泛征求意见，形成报审稿。

2026 年 1 月至 9 月，起草小组对规范进行了进一步修改完善，最终形成规范二次征求意见稿。

四、规范制定的主要技术依据及原则

本规范以促进微生物领域基于流式计数法的微生物测量工作的规范化和标准化为出发点，以技术标准必须具有广泛性、可操作性和适用性为工作目标，参考了相关国际标准、国内行业标准、企业标准、指导文件和科研文献，选取多种代表性验证实验对象和测量平台，通过系统的测试验证，系统总结出了该标准方法的关键环节和参数依据。规范编制遵循“统一性、协调性、适用性、一致性、规范性”的原则，注重规范的可操作性。

本规范以 JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》、JJF 1001-2011《通用计量术语及定义》、JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》和 GB/T 19702-2021《体外诊断医疗器械 生物源性样品中量的测量 参考测量程序的表述和内容的要求》为指导原则，主要参考了 JJF 1001 通用计量术语及定义、JJF 1265 生物计量术语及定义、JJF 1665 流式细胞仪校准规范、GB 19489 实验室 生物安全通用要求、GB/T 19702 体外诊断医疗器械 生物源性样品中量的测量 参考测量程序的表述和内容的要求、GB/T 21415 体外诊断医疗器械 建立校准品、正确度控制物质和人体样品赋值的计量溯源性要求、GB/T 39730 细胞计数通用要

求 流式细胞测定法、GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定、SN/T 5436 乳及乳制品发酵剂、发酵产品中乳酸菌计数 流式细胞仪法、WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则、YY/T 0588 流式细胞仪、ISO 19344 | IDF 232 乳及乳制品——发酵剂、益生菌和发酵产品——用流式细胞术定量乳酸菌。

另外，规范内容符合国家法律、法规的有关要求，未与已有标准、规程、规范冲突；符合我国标准制修订管理工作规程对编制程序和工作规定和要求；符合标准的科学性、先进性、实用性的要求。规范的技术指标有可靠的技术支撑。

五、规范制定说明

《微生物活菌流式计数参考方法》共分为 12 个部分，即范围、规范性引用文件、术语定义和缩略语、概述、测量条件、测量流程、方法确认、不确定度的评定与表示、计量溯源性说明、方法质量控制、结果报告和附录。

规范框架参考了 JJF 1267、JJF 1508、JJF 1974 等生物和化学领域的方法类计量技术规范。

1、范围：

本规范规定了细菌、真菌等可定量测量的微生物活菌的流式计数参考方法，适用于研究、生产和检验中使用流式细胞仪进行的样本中细菌（真菌）活菌总数测定，以及基于细菌（真菌）特性的分型计数。

2、引用文献

本规范主要参考了 JJF 1001 通用计量术语及定义、JJF 1265 生物计量术语及定义、JJF 1665 流式细胞仪校准规范、GB 19489 实验室 生物安全通用要求、GB/T 19702 体外诊断医疗器械 生物源性样品中量的测量 参考测量程序的表述和内容的要求、GB/T 21415 体外诊断医疗器械 建立校准品、正确度控制物质和人体样品赋值的计量溯源性要求、GB/T 39730 细胞计数通用要求 流式细胞测定法、GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定、SN/T 5436 乳及乳制品发酵剂、发酵产品中乳酸菌计数 流式细胞仪法、WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则、YY/T 0588 流式细胞仪、ISO 19344 | IDF 232 乳及乳制品——发酵剂、益生菌和发酵产品——用流式细胞术定量乳酸菌。

3、术语定义和缩略语

术语和定义部分对规范中使用的名词术语进行了定义。首先，规定了 JJF 1001、JJF 1265、GB/T 19702、GB/T 39730、YY/T 0588、ISO 19344 | IDF 232、SN/T 5436 界定的术语和定义适用于本规范；其次，对重要术语“流式计数”进行的定义。相关术语与相关国家标准、医药行业标准和国际标准中的术语表述一致。

缩略语部分对规范中使用的缩略语进行了规定，包括 FSC（前向角散射光通道，forward scatter channel）和 SSC（侧向角散射光通道，side scatter channel）。相关缩略语在本规范中使用频率较高，且其全称和缩写已经在相关领域形成广泛共识。

4、概述

这部分主要提出了流式计数法主要包括微球法和体积法两种原理，并分别对两种原理的方法进行概述。

5、测量条件

这部分规定了微生物活菌流式计数的测量条件。主要包括三方面：环境条件、仪器和设备、试剂和材料。

1) 环境条件

这部分主要规定了微生物活菌流式计数时需要满足的环境条件，温度应控制在 $(15\sim30)^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $\leq 85\%\text{RH}$ 。当规范的条件与仪器设备和试剂规定不一致时，以说明为准。

此外，考虑到微生物是引起生物安全事件的主要因素，必须保障测量过程中的生物安全。因此本规范参考生物安全相关法律法规，对微生物活菌流式计数的生物安全条件做出了规定。

2) 仪器和设备

流式细胞仪是微生物活菌流式计数的核心仪器，通常均具备荧光检测通道和散射光检测通道。微生物体积比真核细胞要小将近十倍，激光照射后得到的散射光信号较弱，因此流式细胞仪的光学性能应满足微米级别的细菌检测。目前已知最小的细菌为粘质沙雷氏菌，尺寸为 500 nm。起草组以粘质沙雷氏菌为测试对象，对市面上适用于微生物计数的仪器进行了调研和实验，确定了仪器的“可识别最小 500 nm 的颗粒”的技术参数。

表 1 不同型号流式细胞仪检测粘质沙雷氏菌的结果

流式细胞仪品牌型号	声称的最小检测颗粒大小	散射光通道能否检测粘质沙雷氏菌
BD FACSCalibur	500 nm	能
贝克曼 Cytoflex	200 nm	能
Apogee A50-Micro	100 nm	能
层浪生物	100 nm	能
福流 NanoFCM	40 nm	能

微生物活菌流式计数还需要温度控制装置用于微生物荧光标记的孵育温度控制，或者试剂、样本的保存；需要分析天平进行样品和试剂的称量，以及移液器进行试剂移取。本规范对上述仪器设备进行了规定。

3) 试剂和材料

微生物活菌流式计数过程中，活性表征荧光探针可用于活菌的识别与荧光标记；特征识别荧光探针可用于特定目标微生物的识别与荧光标记；鞘液是流式细胞仪液流系统的组成部分；缓冲溶液可用于样品的制备与稀释；计数标准微球是微球法原理的关键内标。

其中，计数标准微球的微球法原理微生物活菌流式计数的关键试剂。项目组对所用微球进行了性能确定和验证。首先，明确了“计数标准微球的尺寸应显著区别与待测微生物的尺寸”，从而确保流式细胞仪可以准确区分微球和微生物。其次，参考 GB/T 39730，确定了微球的重要特征：负载有荧光物质、大小均一、荧光强度一致、具有准确的数量量值和不确定度。

从市面上选择了符合尺寸要求的计数标准微球，BD 公司货号 349502(5.5 μm , $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$)、Thermos Fisher 公司货号 B7277 (6.0 μm , $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$)、7.5 μm 颗粒计数浓度标准物质 GBW(E)120148 (7.5 μm , $1.00 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)。分别将微球与大肠杆菌进行混合后，进行上机分析，按照本规范描述的策略进行圈门。结果显示，在 FSC-SSC 散点图中，微球和大肠杆菌的颗粒区分明显。

同时，项目组采用体积法流式细胞仪，对三种计数微球的数量进行确认。结果显示，2 种商业计数标准微球的标称量值与实测值具有一定误差，国家标准物质的实测值在其不确定度范围内。因此，为了规范计数标准微球的使用和提高测量准确性，因此提出了“计数标准微球的数量量值应能够溯源至国家有证标准物质”的要求。

表 2 不同品牌计数标准微球的量值准确性验证

品牌型号	标称值	实测值	相对示值误差
BD 公司货号 349502	$1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$	$0.93 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$	-7%
Thermos Fisher 公司货号 B7277	$1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$	$1.06 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$	6%
7.5 μm 颗粒计数浓度标准物质 GBW(E)120148	$1.00 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$	$0.96 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$	-4%

6、测量流程

基于微生物活菌流式计数是个多环节的程序过程,包括前期的样品采集与单分散菌悬液制备、稀释与染色、添加标准微球、流式细胞仪参数设置与圈门、数据采集与结果计算。项目组对过程中的每一个环节中的关键操作步骤进行了共性技术规定。

1) 样品制备

对于不同来源、不同形态的样本,目前无通用方法,需要根据原始样本的类型选择合适的采集、运输、分离方法。但是对于制备的待测样本的质量要求有共性要求,就是必须形成单分散的微生物菌悬液,即待测样本中的微生物以单个菌体的形式存在。

2) 样品处理

(1) 最佳测量范围验证

根据原始样品中微生物的预期浓度,必要时对测试样品进行稀释,使上机样品达到流式计数法的最佳测量范围。不同型号流式细胞仪的最佳测量范围存在差异,项目组对市面上常见的流式细胞仪的最佳测量范围进行了验证。采用 10 倍系列稀释的大肠杆菌,分别上机测试,确定 RSD 小于 5%时的浓度。此过程无绝对计数,不需要使用计数标准微球。结果显示,不同型号的流式细胞仪测量 10^7 mL^{-1} 的微生物时,精准度都是较好的。

表 3 不同品牌流式细胞仪的最佳测量范围

流式细胞仪品牌型号	原理	最佳测量范围 (mL^{-1})
BD FACSCalibur	微球法	$10^6 \sim 10^7$
贝克曼 Cytoflex	体积法	$10^5 \sim 10^7$
Apogee A50-Micro	体积法	$10^5 \sim 10^7$
福流 NanoFCM	微球法	$10^7 \sim 10^8$

(2) 荧光探针标记条件

为了确定荧光探针的最佳用量,参考参考和考察了多个主流的和具有代表性

的商用活性表征荧光探针和特征识别荧光探针试剂盒的说明书，包括 BD 公司、Beckman coulter 公司、Thermo fisher 公司、Sigma 公司和 Abcam 公司等。目前，常用探针试剂用量都是基于 $10^5\sim 10^7\text{ mL}^{-1}$ 的数量级进行计算的，但用量没有统一要求。因此规范文本提出了“根据荧光探针的自身特性确定样本用量、探针用量和标记条件”的要求。

(3) 移液器加样方式

移液器在长期使用的过程中，由于不正当的操作和缺乏必要的维护，已经不能达到声称的准确性和精确性。反向加样法即采用移液器吸取微球或样品时，打到移液器的第二档，释放液体时打到移液器的第二档，这样可以避免因微球粘附在吸头。而影响实验结果准确性。项目组通过电子天平验证了反向加样法和一般加样法在加样量上重复性水平的差异，分析了移液器加取 $100\mu\text{L}$ 蒸馏水的实际加取重量，两种加样方式各 10 次的重量结果的相对标准差见表 4。从结果可以看出，反向加样法的加样重量重复性确实高于一般加样法。

表 4 不同加样方式的对比

	一般加样法	反向加样法
重复性 RSD	2.01%	1.66%

(4) 样品混匀方式

处理完成后应尽快上机检测，上机前充分混匀，避免微生物细胞和微球沉降。若使用涡旋振荡器进行样品混匀，应选择适宜的涡旋转速和时间，转速过高或时间过长都可能使微球吸附管壁。有研究表明过高的转速和过长的时间不利于样品混匀，原因是涡旋过渡可能会形成大量的气泡，并使得微球和细菌产生浓度梯度差。本研究优化后的涡旋速度和时间是 1000 r/min ，时间 5 秒。

3) 流式细胞仪测量

(1) 仪器参数设置

流式细胞仪测量前，需要对仪器参数进行设置。不同型号的流式细胞仪，可根据自身使用说明书进行参数设置。例如：项目组使用 Apogee A50-Micro 流式细胞仪测量大肠杆菌时，主要参数有电压、上样体积、液流速度和分析时间，为了能够使得结果更加精确，对参数进行了优化。

FSC 和 SSC 两个散射光与 FL1 和 FL3 两个荧光通道的背景光噪声值均随着电压升高而升高。当 FSC 通道的电压为 250 V 时，FSC 直方图中细菌的峰与杂

质的峰区分明显，且背景信号值最低。因此，FSC 通道的电压最佳值为 250 V。同理，SSC 通道的电压最佳值为 250 V，FL1 通道的电压最佳值为 350 V，FL3 通道的电压最佳值为 300 V。

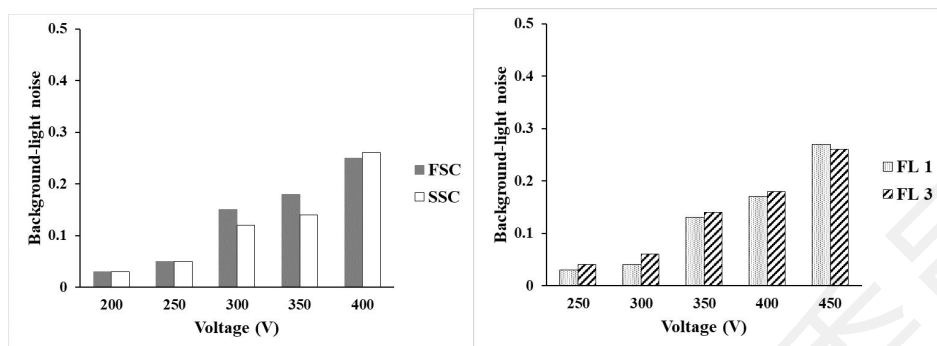


图 1 流式细胞仪散射光和荧光通道电压优化

仪器首先从 EP 管中吸取一定体积（即上样体积）的样品到仪器内的注射器中，然后将注射器内的样品运送至检测区域进行分析。样品分析的实际体积是由注射器的内径和活塞的行程决定。注射器内的不同分析体积可能存在较大偏差，因此需要通过优化上样体积来减小该因素的影响。结果显示当上样体积为 150 μL 时，测量结果最为精确，其 RSD 为 3.02%。

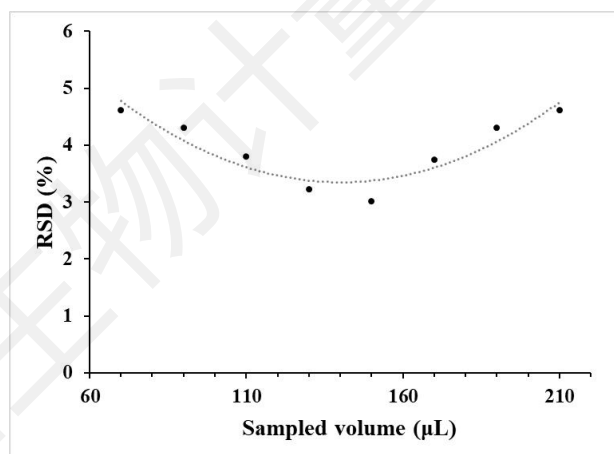


图 2 仪器设定的上样体积电压优化

本研究中使用的是基于体积的流式细胞仪，实际的分析体积为液流速度和分析时间的乘积。因此，液流速度和分析时间保障结果准确的关键参数。结果显示当液流速度为 10.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时，测量结果最为精确，RSD 为 3.13%。当分析时间为 40 s 时，测量结果最为精确，其 RSD 为 3.24%。

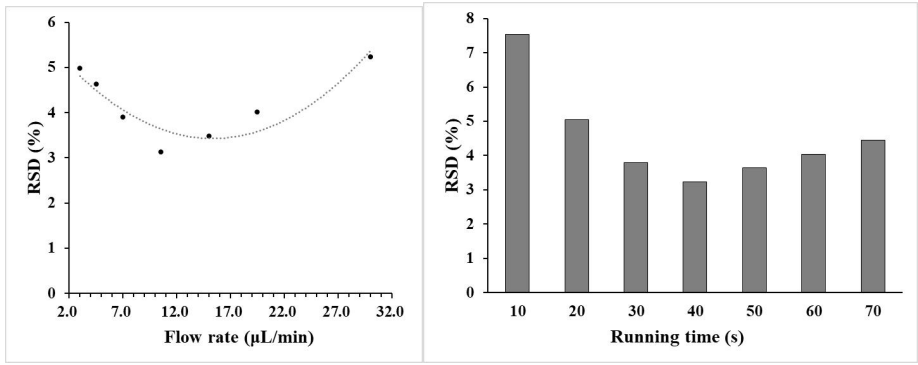


图 3 流式细胞仪液流速度和分析时间优化

(2) 圈门策略

微生物流式计数的圈门策略通常包括两步：一是通过散射光通道区分微生物和杂质颗粒，二是通过荧光识别目标微生物。本规范基于该策略，对圈门方法进行了一般性表述。

项目组使用 Apogee A50-Micro 流式细胞仪测量大肠杆菌时，选择了有三个有能力执行流式计数法的熟练分析者，分别对单次检测结果进行圈门。三个分析者圈门内事件数的平均值为 1925，标准差为 20，说明圈门形状引入的相对标准不确定度为 1.04%。因此，圈门操作需要熟练分析者来执行，从而提高测量精度。

(3) 数据采集

流式计数法的准确性和精确性主要依赖于其高分析速度带来的高分析通量。因此为了保证该方法的性能，需要保证被分析的微生物信号采集数量。本研究分析了 1000-50000 个目标细胞信号采集量下细胞数量的精确性。结果显示，采集数量高于 10000 时，RSD 即可低于 4%，而采集数量更高时，RSD 变化并不明显。因此提出“总细胞信号采集数量不应小于 10000”。

表 5 不同目标信号采集数量的对比

目标信号采集数量	6 次采集的 RSD
2000	5.53%
5000	4.75%
10000	3.88%
20000	3.75%
30000	3.42%

7、方法确认

应对具体测量方法进行方法性能确认。方法性能参数通常包括准确度、精密度、工作范围（检出限、定量限、测量上限等）、特异性和组间精密度（如操作

者间、仪器间和日间变化）等。

项目对微生物活菌流式计数的两个常见策略进行了实验研究：

（1）活菌总数测量——基于 SYTO 9 和 PI 标记的乳酸菌总数测量。

（2）细菌分型计数——基于特异性荧光抗体（FITC-Ab）和 PI 的大肠杆菌 O157:H7 活菌计数。

方法验证结果详见本说明第六部分（方法验证）。

8、不确定度的评定及表示

流式计数法测量样品的微生物数量时，测量结果的不确定度来源包括：（1）微生物流式计数（FCM）引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(FCM)$ ；（2）样品稀释（ d ）引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(d)$ ；（3）荧光标记过程中样品、试剂和计数标准微球的体积（ V ）引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V)$ ；（4）计数标准微球（beads）的浓度引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(beads)$ ，仅限于微球法流式计数。

9、计量溯源性说明

流式计数法已被 GB/T 21415 认定为具有溯源性的原级参考测量程序；其国际计量局（BIPM）国际计量委员会物质的量咨询委员会（CCQM）细胞分析工作组（CAWG）2021-2030 战略报告中，被认定为潜在的高等级微生物测量方法。

微生物细胞个数虽不能用国际单位制的七个基本单位表示，但具有计数的性质。通过适当的、经过确认的流式计数法可建立计数到 SI 单位的溯源性。

10、方法质量控制

本部分对样品采集、流式细胞仪维护与质控、二聚体和多聚体的识别与处理、气泡等影响测量结果的因素进行了分析和描述。

11、结果报告

报告提供的信息应至少包括：a) 样品的完整信息，包括基本信息、采样策略、贮存和运输、分离方法等。b) 流式细胞仪的完整信息，包括基本信息、参数设置等。c) 关键试剂名称、来源、批号等。d) 测量结果，包括圈门策略图、原始数据、数据分析程序等。e) 意外情况。

12、附录

征求意见稿中附录 A 给出了酸奶中活菌总数（即乳酸菌总数）测量的示例，附录 B 给出了液体培养基中大肠杆菌 O157:H7 活菌计数的示例。

六、方法验证

项目组对两种不同策略的微生物活菌流式计数方法进行了性能验证，分别为

- （1）活菌总数测量——基于 SYTO 9 和 PI 标记的乳酸菌活菌总数测量。
- （2）细菌分型计数——基于特异性荧光抗体（FITC-Ab）和 PI 的大肠杆菌 O157:H7 活菌计数。

1、活菌总数测量方法

1) 方法荧光标记原理

活菌总数测量方法使用 SYTO 9 和 PI 对活菌进行双重荧光标记。SYTO 9 能够穿透微生物细胞膜，将核酸标记绿色荧光。PI 仅能穿透细胞膜受损的微生物，将核酸标记红色荧光。当两种染料都存在时，核酸会优先与 PI 结合，从而降低 SYTO 9 带来绿色荧光。因此，具有完整细胞膜的活菌发绿色荧光，细胞膜轻微受损的细菌同时发绿色和红色荧光，细胞膜破裂的死菌发红色荧光。

2) 最佳测量范围和准确度

人工制备乳杆菌活菌菌液，混合后稀释至浊度值 0.5 MCF，然后进行 10 倍系列稀释。分别使用流式计数法和 GB 4789.35-2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》中乳杆菌平板计数法，对 10 倍系列稀释的菌液进行检测，每种浓度水平均进行了六次重复测量。将流式计数结果和平板计数结果进行比较。结果显示：流式计数法与平板计数法的结果一致（ $P > 0.05$ ），具有较高的准确度；方法的最佳测量范围为 $10^5 \sim 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ，在此范围内且流式计数结果的 RSD 小于 5%。

不同型号流式细胞仪的最佳测量范围存在差异，项目组对市面上常见的流式细胞仪的最佳测量范围进行了验证。采用 10 倍系列稀释的保加利亚乳杆菌，分别上机测试，确定 RSD 小于 5% 时的浓度。此过程无绝对计数，不需要使用计数标准微球。结果显示，不同型号的流式细胞仪测量 10^7 mL^{-1} 的微生物时，精准度都是较好的。

表 6 流式计数法与平板计数法测量乳杆菌的对比

样本浓度	流式计数法（ $n=6$ ）	平板计数法（ $n=6$ ）
------	----------------	----------------

	平均值 (cells/mL)	SD (cells/mL)	RSD (%)	平均值 (CFU/mL)	SD (CFU/mL)	RSD (%)
10 ⁸	1.90 × 10 ⁸	1.17 × 10 ⁷	6.16	1.75 × 10 ⁸	1.40 × 10 ⁷	12.14
10 ⁷	1.81 × 10 ⁷	8.72 × 10 ⁵	4.82	1.69 × 10 ⁷	1.01 × 10 ⁶	5.98
10 ⁶	1.89 × 10 ⁶	7.37 × 10 ⁴	3.91	1.79 × 10 ⁶	2.40 × 10 ⁵	13.41
10 ⁵	1.95 × 10 ⁵	9.20 × 10 ³	4.72	1.85 × 10 ⁵	1.64 × 10 ⁴	8.86
10 ⁴	2.01 × 10 ⁴	2.27 × 10 ³	11.30	1.88 × 10 ⁴	2.00 × 10 ³	10.64

3) 检出限和定量限

采用活菌总数荧光标记策略的流式计数法，对空白的PBS样品进行分析，其噪声信号为1000 mL⁻¹。根据噪声信号的3倍和10倍用于计算方法的检出限和定量限，分别为3.00×10³ mL⁻¹和1.00×10⁴ mL⁻¹。

4) 重复性

重复性被定义为在相同测量条件下，对同一被测量按方法规定的步骤，进行多次连续测量所得结果之间的一致性，这些条件称为重复性条件，它包括相同的测量程序、相同的观测者、在相同的条件下使用相同的测量仪器、相同地点、在短时间内重复测量。重复性验证中，每天采用流式计数法测试3个单元的乳杆菌标准物质，每个样品重复3次，共9次，连续测试5天。经计算，活菌总数流式计数法的重复性（即重复性相对标准偏差）为5.1%，远优于经典微生物平板计数法的30%，说明活菌总数流式计数法具有很好的重复性。

表 7 活菌总数流式计数法的重复性

实验 天数 D	乳杆菌计数 (×10 ⁷ cells/mL)									$\bar{x}_d$
	样品1			样品2			样品3			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1	4.9	5.2	5.2	4.8	5.2	5.0	5.3	5.4	4.8	5.0
2	5.2	5.2	4.8	5.1	5.0	4.8	5.0	4.6	5.2	5.0
3	5.2	5.4	5.0	4.7	5.0	4.8	4.8	5.0	5.0	5.0
4	5.2	4.6	4.8	5.0	5.2	5.2	4.8	5.4	5.2	5.0
5	5.6	5.4	5.0	4.6	5.2	5.2	4.6	4.8	5.2	5.1
$\bar{x}$	5.0 × 10 ⁷ cells/mL									
s	0.26 × 10 ⁷ cells/mL									
RSD	5.1%									

5) 广谱程度

选择 13 株常见的微生物菌株，人工制备等浓度死活菌菌液并等体积混合，使得混合液中死活菌的比例为 1:1。对每个菌株的菌悬液进行 SYTO 9 和 PI 双荧

光标记，并用流式计数法测量死活菌浓度。结果表明：13 个菌株的死活菌比例都接近 1:1，与添加值接近，说明死活菌荧光标记的准确性，且流式计数法可以有效识别测量不同微生物的死活菌，具备较高的广谱性。

表 8 活菌总数流式计数法的测量不同微生物的等比例死活菌菌液

菌株	添加比例（%）	实际比例	
		活菌比例（%）	死菌比例（%）
乳杆菌	50:50	48.53	51.47
双歧杆菌		49.20	50.80
嗜热链球菌		48.88	51.12
大肠杆菌		49.35	50.65
金黄色葡萄球菌		47.41	52.59
枯草芽胞杆菌		50.07	49.93
沙门氏菌		48.66	51.34
阪崎肠杆菌		49.20	50.80
志贺氏菌		47.31	52.69
霍乱弧菌		45.13	54.87
副溶血弧菌		47.34	52.66
马红球菌		51.11	48.89
单增李斯特菌		46.71	53.29

6) 组间精密度

(1) 使用大肠杆菌标准物质开展国际比对验证

通过本标准建立的活菌总数流式计数方法，项目组在国际计量局 CCQM 主导开展了 CCQM P205 膜完整性大肠杆菌流式计数的国际比对。表 9 列出了 CCQM P205 国际比对的参与国家、参与机构、使用的流式细胞仪型号以及计数原理。图 4 列出了本次国际比对参与实验室的测量结果，从图示可以看本次比对参与的各个国家、各个流式细胞仪测量平台的测量一致性较好，测量结果均落在比对主导实验室预期的靶值范围内。

表 9 国际比对参与机构信息

参与国家	参加机构	流式细胞仪品牌型号	计数原理
中国	NIM	Apogee A50-Micro	体积法
美国	NIST	Apogee Micro-Plus A60	体积法
韩国	KRISS	贝克曼 Cytoflex LX	体积法
巴西	INMETRO	BD FACSAria™ III Cell Sorter	磁珠法
英国	NPL	贝克曼 Cytoflex S	磁珠法

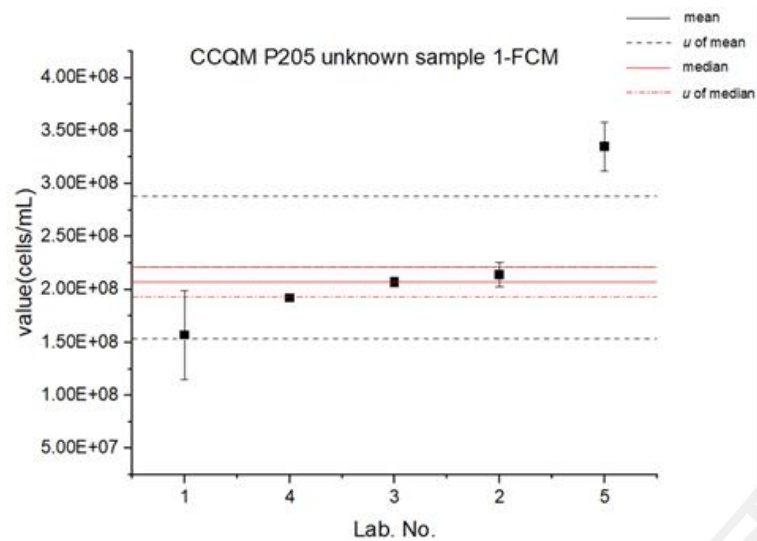


图 4 国际比对结果

(2) 使用细菌总数标准物质进行实验室间方法验证

项目组采用 GBW (E) 091310 活菌总数流式和平板计数标准物质，对活菌总数流式计数法开展实验室间验证。GBW (E) 091310 的量值为 $(2.2 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。项目组邀请北京市食品检验研究院、伯齐科技有限公司对标准物质进行核验。北京市食品安全监控和风险评估中心使用贝克曼 Cytoflex 流式细胞仪进行测量，伯齐科技有限公司使用 Apogee A50-Micro 流式细胞仪进行测量。各机构测量 3 个单元，每个单元重复测量 3 次。结果表明，量值核验结果均在标准物质不确定度范围内，证明了该方法的可靠性。

表 10 北京市食品检验研究院测量 GBW (E) 091310 的结果

编号	活菌总数流式计数 ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)		
	重复 1	重复 2	重复 3
1	2.2	2.1	2.0
2	2.3	2.4	2.4
3	2.4	2.3	2.3
平均值	2.3		

表 11 伯齐科技有限公司测量 GBW (E) 091310 的结果

编号	活菌总数流式计数 ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)		
	重复 1	重复 2	重复 3
1	2.3	2.3	2.4
2	2.5	2.3	2.5
3	2.4	2.4	2.5

平均值	2.4
-----	-----

（3）使用蜡样芽孢杆菌计数标准物质进行实验室间方法验证

项目组采用 GBW（E）091356 蜡样芽孢杆菌计数标准物质，对活菌总数流式计数法开展实验室间验证。GBW（E）091356 的量值为 $(4.0 \pm 0.6) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。项目组邀请北京大学、北京市食品检验研究院对标准物质进行核验。北京大学使用 Amnis ImageStream MK II 流式细胞仪进行测量，北京市食品检验研究院使用贝克曼 Cytoflex 流式细胞仪进行测量。各机构测量 2 个单元，每个单元重复测量 3 次。结果表明，量值核验结果均在标准物质不确定度范围内，证明了该方法的可靠性。

表 12 北京大学测量 GBW（E）091356 的结果

编号	蜡样芽孢杆菌计数 ($\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$)		
	重复 1	重复 2	重复 3
1	4.1	4.2	4.5
2	3.9	4.5	4.4
平均值	4.3		
标准偏差	0.27		
相对标准偏差 (%)	5.7		

表 13 北京市食品检验研究院测量 GBW（E）091356 的结果

编号	蜡样芽孢杆菌计数 ($\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$)		
	重复 1	重复 2	重复 3
1	4.1	4.4	4.5
2	3.7	4.2	4.8
平均值	4.1		
标准偏差	0.32		
相对标准偏差 (%)	7.7		

（4）使用单核细胞增生李斯特氏菌计数标准物质进行实验室间方法验证

项目组采用 GBW（E）091353 单核细胞增生李斯特氏菌计数标准物质，对活菌总数流式计数法开展实验室间验证。GBW（E）091353 的量值为 $(3.4 \pm 0.5) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。项目组邀请北京大学、北京市食品检验研究院对标准物质进行核验。北京大学使用 Amnis ImageStream MK II 流式细胞仪进行测量，北京市食品检验研究院使用贝克曼 Cytoflex 流式细胞仪进行测量。各机构测量 2 个单元，每个单元重复测量 3 次。结果表明，量值核验结果均在标准物质不确定度范围内，证明

了该方法的可靠性。

表 14 北京大学测量 GBW (E) 091353 的结果

编号	单核细胞增生李斯特氏菌计数 ($\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$)		
	重复 1	重复 2	重复 3
1	3.5	3.2	3.4
2	3.5	3.8	3.1
平均值	3.4		
标准偏差	0.25		
相对标准偏差 (%)	7.3		

表 15 北京市食品检验研究院测量 GBW (E) 091353 的结果

编号	单核细胞增生李斯特氏菌计数 ($\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$)		
	重复 1	重复 2	重复 3
1	3.6	3.3	3.3
2	3.8	3.7	3.3
平均值	3.5		
标准偏差	0.25		
相对标准偏差 (%)	7.2		

(5) 使用金黄色葡萄球菌计数标准物质进行实验室间方法验证

项目组采用 GBW (E) 091354、GBW (E) 091355 口罩细菌过滤效率检测用金黄色葡萄球菌计数标准物质，对活菌总数流式计数法开展实验室间验证。GBW (E) 091354 的量值为 $(5.3 \pm 1.0) \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ，GBW (E) 091355 的量值为 $(5.0 \pm 0.9) \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 。项目组邀请北京大学、北京市食品检验研究院对 2 种标准物质进行核验。北京大学使用 Amnis ImageStream MK II 流式细胞仪进行测量，北京市食品检验研究院使用贝克曼 Cytoflex 流式细胞仪进行测量。每种标准物质各机构测量 2 个单元，每个单元重复测量 3 次。结果表明，量值核验结果均在标准物质不确定度范围内，证明了该方法的可靠性。

表 16 北京大学测量金黄色葡萄球菌计数标准物质的结果

标准物质	编号	金黄色葡萄球菌流式计数 ($\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)			
		重复 1	重复 2	重复 3	平均值
GBW (E) 091354	样品 1	5.7	5.3	5.6	5.5
	样品 2	5.5	5.4	5.7	
GBW (E) 091355	样品 1	4.9	5.0	5.2	5.0
	样品 2	4.8	5.2	5.1	

表 17 北京市食品检验研究院测量金黄色葡萄球菌计数标准物质的结果

标准物质	编号	金黄色葡萄球菌流式计数 ($\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)			
		重复 1	重复 2	重复 3	平均值
GBW (E) 091354	样品 1	5.2	5.3	5.2	5.2
	样品 2	5.4	5.4	5.0	
GBW (E) 091355	样品 1	5.0	5.5	5.1	5.2
	样品 2	4.9	5.2	5.2	

2、细菌分型计数方法

1) 方法荧光标记原理

大肠杆菌O157:H7活菌分型计数方法使用大肠杆菌O157单克隆荧光抗体（FITC-Ab）和PI对大肠杆菌O157:H7进行双重荧光标记。FITC-Ab通过特异性识别大肠杆菌O157:H7的菌体O抗原，将菌体标记绿色荧光。PI仅能穿透细胞膜受损的微生物，将其核酸标记红色荧光。当两种探针都存在时，具有完整细胞膜的活菌仅发绿色荧光，细胞膜破裂或受损的非活菌同时发绿色和红色荧光。

2) 最佳测量范围和准确度

人工制备大肠杆菌O157:H7活菌菌液，混合后稀释至浊度值0.5 MCF，然后进行10倍系列稀释。分别使用流式计数法和GB 4789.38-2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数》的平板计数法，对10倍系列稀释的大肠杆菌O157:H7菌液进行检测，每种浓度水平均进行了六次重复测量。将流式计数结果和平板计数结果进行比较。结果显示：流式计数法与平板计数法的结果一致（ $P>0.05$ ），具有较高的准确度；方法的最佳测量范围为 $10^5\sim 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ，在此范围内且流式计数结果的RSD小于5%。

不同型号流式细胞仪的最佳测量范围存在差异，项目组对市面上常见的流式细胞仪的最佳测量范围进行了验证。采用 10 倍系列稀释的大肠杆菌 O157:H7 菌液，分别上机测试，确定 RSD 小于 5%时的浓度。此过程无绝对计数，不需要使用计数标准微球。结果显示，不同型号的流式细胞仪测量 10^7 mL^{-1} 的大肠杆菌 O157:H7 时，精准度都是较好的。

表 17 流式计数法与平板计数法测量大肠杆菌 O157:H7 的对比

样本 浓度	流式分析法 ($n=6$)			平板计数法 ($n=6$)		
	平均值 (CFU/mL)	SD (CFU/mL)	RSD (%)	平均值 (CFU/mL)	SD (CFU/mL)	RSD (%)

10^8	1.12×10^8	5.52×10^6	4.93	1.01×10^8	9.78×10^6	9.68
10^7	1.10×10^7	4.98×10^5	4.53	1.02×10^7	1.25×10^6	12.25
10^6	1.03×10^6	3.59×10^4	3.49	0.98×10^6	9.15×10^4	9.34
10^5	1.02×10^5	5.65×10^3	5.54	0.95×10^5	1.16×10^4	12.21
10^4	1.06×10^4	1.29×10^3	12.17	0.97×10^4	1.25×10^3	12.89

3) 检出限和定量限

采用大肠杆菌O157:H7荧光标记策略的流式计数法，对空白的PBS样品进行分析，其噪声信号为 1000 mL^{-1} 。根据噪声信号的3倍和10倍用于计算方法的检出限和定量限，分别为 $3.00 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ 和 $1.00 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 。

4) 重复性

重复性被定义为在相同测量条件下，对同一被测量按方法规定的步骤，进行多次连续测量所得结果之间的一致性，这些条件称为重复性条件，它包括相同的测量程序、相同的观测者、在相同的条件下使用相同的测量仪器、相同地点、在短时间内重复测量。

日内重复性验证中，采用流式计数法测试6个单元的大肠杆菌O157:H7标准物质，每个样品重复3次，经计算方法的日内重复性为5.01%（表18）。日间重复性验证中，采用流式计数法每天测试1个单元的大肠杆菌O157:H7标准物质，重复3次，经计算方法的日间重复性为4.30%（表19）。综上，方法的重复性远优于经典微生物平板计数法的30%，说明大肠杆菌O157:H7流式计数法具有很好的重复性。

表 18 大肠杆菌 O157:H7 流式计数法的日内重复性

标准物质	大肠杆菌 O157:H7 计数($\times 10^8 \text{ cells/mL}$)		
	重复 1	重复 2	重复 3
Vial 1	5.18	5.23	5.29
Vial 2	5.92	5.87	5.64
Vial 3	5.67	5.51	5.73
Vial 4	5.09	5.29	5.24
Vial 5	5.77	5.83	5.75
Vial 6	5.23	5.44	5.26
平均值	5.50		
RSD	5.01%		

表 19 大肠杆菌 O157:H7 流式计数法的日间重复性

时间（天）	标准物质	大肠杆菌 O157:H7 计数($\times 10^8 \text{ cells/mL}$)		
		重复 1	重复 2	重复 3
1	Vial 1	5.27	5.31	5.20

2	Vial 2	5.82	5.77	5.64
3	Vial 3	5.54	5.41	5.65
平均值			5.53	
RSD			4.30%	

4) 特异性

为了评估大肠杆菌O157:H7流式计数法的特异性，选取了常见的51株菌株，包括3株大肠杆菌O157:H7菌株、15株非O157的大肠杆菌菌株和33株其它菌株。分别采用本方法的策略进行双荧光标记后，采用流式细胞仪进行检测。结果显示，仅3株大肠杆菌O157:H7可以被FITC-Ab标记绿色荧光并被流式细胞仪检测到，其余菌株均无法被FITC-Ab标记。说明大肠杆菌O157:H7流式计数法的具有良好的特异性。

表 20 大肠杆菌 O157:H7 流式计数法的日间重复性

标准菌株	菌株号	FITC-Ab
大肠杆菌 O157:H7 菌株 ($n = 3$)		
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43895	+
<i>E. coli</i> O157:H7	CICC 21530	+
<i>E. coli</i> O157:H7	CICC 10907	+
非 O157 的大肠杆菌菌株($n = 15$)		
<i>E. coli</i> O26:H11	FC 7819	-
<i>E. coli</i> O26:H11	CHPC 1.7944	-
<i>E. coli</i> O111:H8	FC 7825	-
<i>E. coli</i> O111:H8	CHPC 1.7945	-
<i>E. coli</i> O103:H2	FC 7823	-
<i>E. coli</i> O103:H2	CHPC 1.7946	-
<i>E. coli</i> O121:H19	FC 7829	-
<i>E. coli</i> O121:H19	CHPC 1.7947	-
<i>E. coli</i> O145:H28	FC 7827	-
<i>E. coli</i> O145:H28	CHPC 1.7948	-
<i>E. coli</i> O45:H2	FC 7821	-
<i>E. coli</i> O45:H2	CHPC 1.7949	-
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	-
<i>E. coli</i>	CICC 10389	-
<i>E. coli</i>	ATCC 13706	-
其它菌株($n = 33$)		
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	-
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	-

<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 25944	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CICC 10419	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CICC 20093	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19112	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	CICC 21540	-
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 6939	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 13311	-
<i>Salmonella</i> Paratyphi-A	CICC 21501	-
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	ATCC 10708	-
<i>Salmonella</i> Infantis	CICC 21482	-
<i>Salmonella</i> Bovis-morbificans	CICC 21499	-
<i>Salmonella</i> Kentucky	CICC 21488	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ATCC 13076	-
<i>Salmonella</i> Meleagridis	CICC 21526	-
<i>Salmonella</i> Senftenberg	ATCC 8400	-
<i>Salmonella</i> Abaetetuba	ATCC 35640	-
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 8039	-
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	CICC 23829	-
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931	-
<i>Shigella boydii</i>	ATCC 9207	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	-
<i>Vibrio cholerae</i>	CICC 23794	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CICC 10869	-

5) 组间方法验证

为评估方法在不同平台的流式细胞仪的效果，分别制备了 10 倍系列稀释的大肠杆菌 O157:H7 菌悬液，各菌液作为独立样本分别经流式分析法与平板计数法检测。北京食品检验研究院使用贝克曼 Cytotflex 流式细胞仪进行测量，当菌浓度在 $10^4 \sim 10^8$ cells/mL 范围内时，检测结果与平板计数法有较好的线性关系， $R^2=0.9988$ 。朝阳区疾病预防控制中心使用 BD Calibur 流式细胞仪进行测量，当

菌浓度在 $10^4 \sim 10^8$ CFU/mL 范围内时, 检测结果与平板计数法有较好的线性关系, $R^2=0.9956$ 。上述说明方法可以成功用于不同流式分析平台的大肠杆菌 O157:H7 检测, 证明了方法的可靠性。

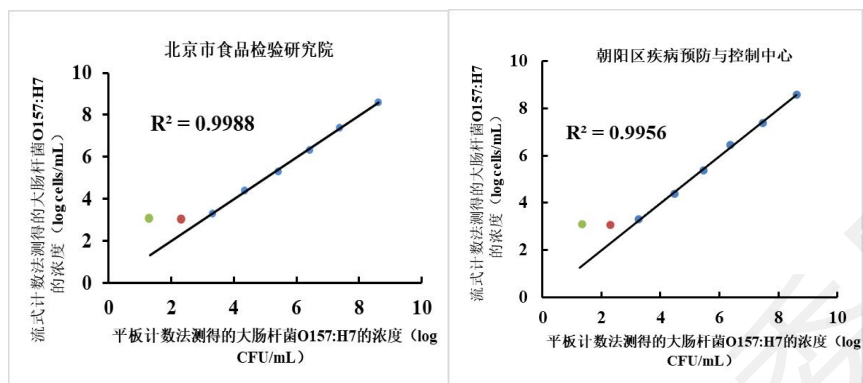


图5 大肠杆菌 O157:H7 流式计数法在不同平台的验证结果

《微生物活菌流式计数参考方法》规范制定起草小组

2025 年 9 月

参考文献

- [1] 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[S].
- [2] Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 3: Aerobic Plate Count[S]. Washington DC: Food and Drug Administration, 2001.
- [3] Śliwa-Dominiak J, Czechowska K, Blanco A, et al. Flow cytometry in microbiology: A review of the current state in microbiome research, probiotics, and industrial manufacturing[J]. Cytometry Part A, 2025.
- [4] Büscher M. Flow cytometry instrumentation - An overview[J]. Current Protocols in Cytometry, 2019, 87(1): e52.
- [5] ISO 19344 - 2015, Milk and milk products-Starter cultures, probiotics and fermented products - Quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry[S].
- [6] ISO 17511 - 2020, In vitro diagnostic medical devices - Requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples[S].
- [7] Davey H, Guyot S. Estimation of microbial viability using flow cytometry[J]. Current Protocols in Cytometry, 2020, 93(1): e72.
- [8] Givan A L. Flow cytometry: An introduction[J]. Methods in Molecular Biology, 2011, 699: 1~29.
- [9] Radcliff G, Jaroszeski M J. Basics of flow cytometry[J]. Methods in Molecular Biology, 1998, 91: 1~24.
- [10] McKinnon K M. Flow cytometry: An overview[J]. Current Protocols in Immunology, 2018, 120: 5.1.1~5.1.11.
- [11] Telford W G. Overview of lasers for flow cytometry[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1678: 447~479.
- [12] SN/T 5436-2022, 乳及乳制品发酵剂、发酵产品中乳酸菌计数 流式细胞仪法[S].
- [13] GB/T 19702-2021, 体外诊断医疗器械 生物源性样品中量的测量 参考测量程序的表述和内容的要求

- [S].
- [14] JJF 1665, 流式细胞仪校准规范[S].
- [15] GB/T 39730, 细胞计数通用要求 流式细胞测定法[S].
- [16] YY/T 0588, 流式细胞仪[S].
- [17] GB 4738.35-2023, 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S].
- [18] 刘思渊. 流式分析技术快速定量检测牛乳中细菌总数与大肠杆菌 O157:H7 的研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2018.
- [19] 隋志伟, 王梓权, 刘思渊, 等. 微生物计量技术研究进展及发展趋势[J]. 计量科学与技术, 2021, 65(6): 54~59.
- [20] Liu S, Wang Z, Wang M, et al. Evaluation of volume-based flow cytometry as a potential primary method for quantification of bacterial reference material[J]. Talanta, 2023,255:124197.
- [21] GB/T 6379.1-2004 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法[S].
- [22] 韩永志. 统计学在理化检验中的应用 第四讲 测量方法的重复性及复现性[J]. 理化检验(化学分册), 1999, 35(12): 571-572.
- [23] Parenteral Drug Association, PDA Technical Report No. 33 Evaluation, validation and implementation of new microbiological testing methods, first ed., 2000. Bethesda.
- [24] GB 4789.2-2016 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[S].
- [25] GB 4789.14-2014 食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验[S].
- [26] GB 4789.30-2016 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[S].
- [27] GB 4789.38-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数[S].
- [28] Bureau International des Poids et Mesures, SI Brochure: The International System of Units, ninth ed., 2019. Pavillon de Breteuil. Available from: <https://www.bipm.org/en/publications/si-brochure>.
- [29] Bureau International des Poids et Mesures, Consultative Committee for Amount of Substance – Metrology in Chemistry and Biology Working Group on Cellular Analysis: Strategy 2021-2030, first ed., 2000. Pavillon de Breteuil. Available from: <https://www.bipm.org/en/strategy>.