

微生物检测质量控制



北京出入境检验检疫局技术中心

食品微生物室 曾静 PhD

2017.9

微生物检测质量控制

内部质量控制
外部质量评估

人员

1

设备

2

样品

3

方法

4

环境控制

5

培养基质量控制

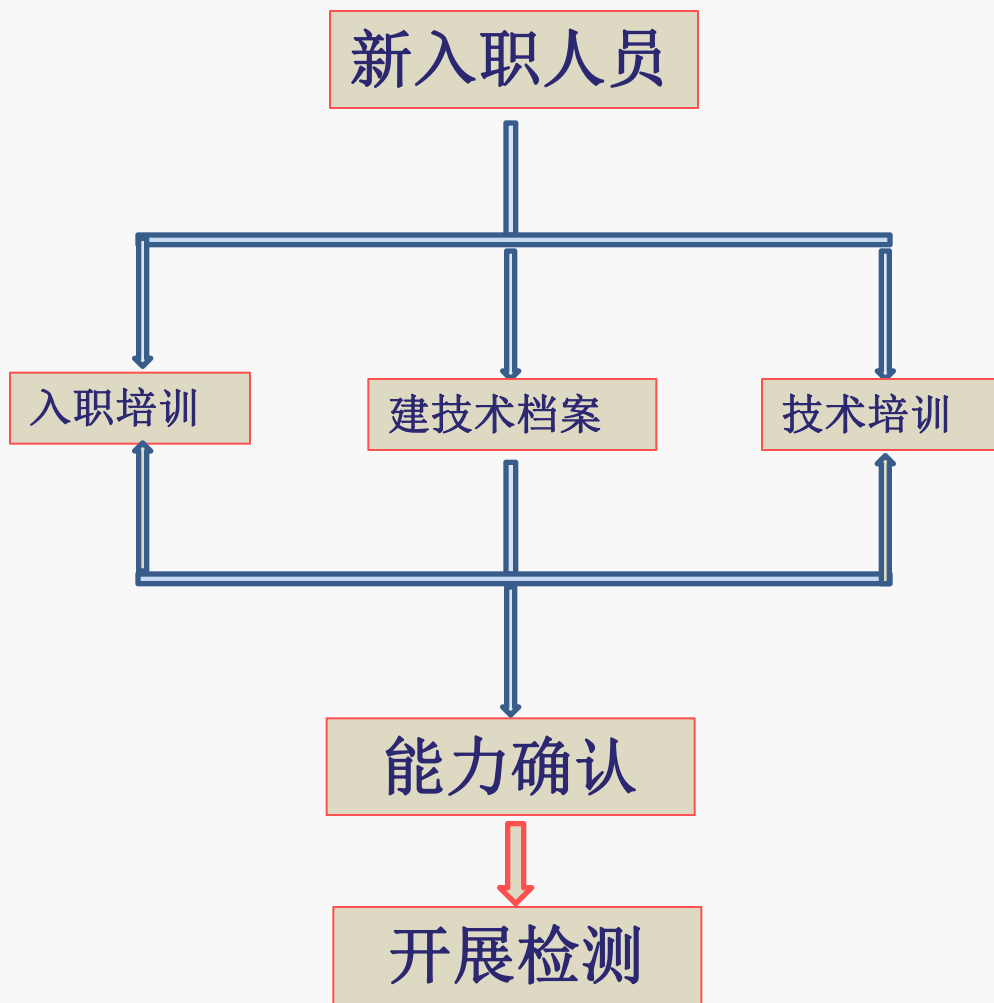
6

污染控制

7

人员

1



人员

1

教育背景 and 经历

人员培训

培训考核

安全培训

人员档案

继续培训

教育背景和经历

合格的经过培训的检验人员是得出准确结果报告的基本保证。实验室管理者必须保证实验人员具有知识、技术、能力来完成他们的任务；检验人员的能力来自于教育、经验、技能和与其岗位相关的培训。

CI09

5.2.1 b) 实验室从事微生物检测的关键检测人员应至少具有微生物或相关专业专科以上学历，或者具有10年以上微生物检测工作经历。

The Laboratory **Manager/Director must ensure that laboratory personnel have the knowledge, skills, and abilities to perform their duties.** Competence is based on education, experience, demonstrated skills, and training. Staff training files contain the documentation of personal education, experience, skills, and training for the position held.

人员培训

1. 实验室分析人员进行培训项目应按照实验室的培训程序进行
2. 对新人和新检测方法的培训，首先应仔细阅读**1**检测方法或者SOP，新人应在熟练掌握**2**该检测方法的老**2**老师带领下熟悉检测方法，随后，被培训者**3**观察样品处理和实验的全过程，被培训者使用已**4**知样品在老师的带领下进行全**4**过程的操作，也可以和培训教师进行双人对比实验。用于培训的样品数量应由培训教师特别指定，并记入培训档案。

培训考核

1. 从已知样品获得满意结果
2. 双人比对结果满意

培训的所有过程应记录在培训档案中。

安全培训

1. 实验室布局，逃生通道
2. 实验室安全管理规定
3. 实验室操作的菌株生物等级，危害，以及注意事项，生物安全意外紧急处理措施等
4. 实验室使用的化学试剂危害、意外伤害紧急处理措施
5. 废弃物的处理等

所有安全培训的记录，应记入培训档案

人员档案

证明能力和经历的文件

1. 学历、学位证书、获得的其他相关证书
2. 填写人员技术档案表和人员技术能力评价表

培训记录

3. 人员培训记录表
4. 外部培训记录表、证书复印件
5. 方法培训的原始记录
6. 参加人员比对的记录
7. 参加能力验证的记录、能力验证的结果报告单的复印件
8. 授权书

人员档案

证明能力和经历的文件

1. 学历、学位证书、获得的其他相关证书
2. 填写人员技术档案表和人员技术能力评价表

培训记录

3. 人员培训记录表
4. 外部培训记录表、证书复印件
5. 方法培训的原始记录
6. 参加人员比对的记录
7. 参加能力验证的记录、能力验证的结果报告单的复印件
8. 授权书

人员

1

人员技术档案

编号:

姓名	性别	出生年月	
民族	职称	任职时间	
部门	岗位	联系电话	
教育经历			
起止时间	毕业学校	专业	学历/学位
工作经历			
起止时间	工作单位	职务	
所获能力、资格认证			
时间	发证单位	获证名称	
科研制标			
时间	项目名称	等级	

人员能力年度评价表

(人员技术档案附件)

编号:

姓名	部门	岗位	
从事或分管工作			
年度 培训 情况	时间	培训内容	获证情况
年度 科研 制标 情况	时间	项目名称	备注
年度 能力 评价	评价人:		
部门 意见	签名:		

人员

1



培训记录表

日期： _____ 地点： _____

名称				
培训目的				
效果评价				
主讲(讲)人	主讲单位			
培训形式	<input type="checkbox"/> 专题理论 <input type="checkbox"/> 实践方法 <input type="checkbox"/> 仪器操作培训 <input type="checkbox"/> 法律法规培训 <input type="checkbox"/> 讲座 <input type="checkbox"/> 其他			
序号	姓名	部门	考试成绩	备注
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
培训效果评价:				

人员培训记录表

姓名		岗位	
职 称		培训时间	
培训内容			
主办单位			
培训地点		主讲人	
培训形式			
岗前培训	在岗人员培训	仪器操作培训	法律法规培训
培训总结:			
考核结果		有无证书	
仪器负责人		技术管理员	

授权书

本证书表明持证人 XXX 授权可从事的工作范围如下：

质量体系授权

授予担任_____职务。

检测技术授权

1 授权可从事_____项目的检测工作。

仪器设备授权

授权可使用的关键仪器和设备如下：

名称	编号
----	----

授权日期：

授权人：

继续培训

1. 参加外部能力验证、内部质量控制、或者多实验室参加的协同实验，记入培训档案
2. 可以将内部质量控制样品制备成“盲样”，与日常样品一起检验。
3. 实验室管理者应对异常结果进行分析，找出原因。或者采取纠正措施。

设备

2

责任划分

设备记录

设备校准状态

设备检查

校正因子

校准

责任划分

实验员：负责进行日常维护和保养和使用。只有经过培训的人员才可以使用设备；

实验室管理者：必须确保所有必要的维护和服务是由合格的、受过训练的人员或分包商进行的；

质量负责人：通过内部审核，确保所有员工经过培训后符合开始检测的要求

设备记录

1. 设备和软件的唯一标识
2. 制造商名称、设备型号、序列号
3. 检查设备与特殊要求的符合性
4. 设备的位置和联系人员
5. 使用手册应放置在易于获取的地方，或者放置位置有据可查
6. 校准结果、维护、安全检查，以及下次检查的日期等信息应有记录
7. 设备的任何情况，例如：维修期间、报错等，应贴停用标识，名记录。

设备校准周期

设备的校准周期和性能确认应依据文件规定，以及根据需要、设备类型、以前的使用情况来定。

高压锅	校准	每年
	监控	化学灭菌指示剂（每天），6或3个周期的外部服务；生物指示剂（每周）
	证书	外部校准证书
移液器	校准	每3个月1次
	监控	每个月检查一次(spot check on single pipette)
	证书	使用认可的方法进行内部校准

设备

2

设备校准周期

天平	校准	每年
	监控	每次使用前检查（平衡性，气泡位置、砝码测量）
	证书	外部校准证书
分液器	校准	每3个月1次
	监控	每次使用前检查（多所分装的体积进行检查）
	证书	内部校准

设备

2

设备校准周期

具刻度玻璃器皿	校准	每年Annual gravimetric to required tolerance
	监控	目视检查
	证书	外部校准证书
pH计	校准	每次使用前用标准溶液进行校正
	监控	每次使用前检查
	证书	计量证书

设备

2

设备校准周期

温度计	校准	每年（追溯到国家或者国际温度标准）
	监控	目视检查
	证书	外部校准证书
计时器	校准	每年与校准的计时器进行比对，或者与国家时间比较
	监控	目视检查/更换电池
	证书	内部校准

设备

2

设备校准周期

离心机	服务	由合格服务商每年检查一次
	监控	目视检查
	证书	外部校准证书
计时器	校准	每年与校准的计时器进行比对，或者与国家时间比较
	监控	目视检查/日常清洁
	证书	年度检查证书

设备

2

设备校准周期

温度控制设备 (冰箱、水浴、干燥箱、培养箱)	服务	低温冰箱、CO ₂ 培养箱，每年一次
	监控	每天检查温度、清洁、使用温度监控系统
	证书	外部校准证书
厌氧和微量需氧的罐/盒	校准	N/A
	监控	目视检查/日常清洁
	证书	N/A

设备的移动

设备从一个地方移动到另外一个地方：

1. 必须通知设备管理员
2. 实验室管理者负责确认和保证仪器的正常运转和使用
3. 实验室管理者设备的保养、维护和计量满足要求
4. 应由设备所在位置设备记录和维护

设备维护

对于关键设备，实验室应有规程。应包括：清洁、服务和检查，以及计量证书等；

样品

3

责任划分

实验员：接收样品，保证样品的完整性，并保证适合其检验项目

实验室管理者：确保样品接收员工充分了解样品接收程序

质量负责人：确保样品接收和储存过程的完整性

样品接收程序

1. 记录样品状态（温度、如果是冷冻产品应检查状态）
2. 检查样品的标签，检测项目是否正确。
3. 泄露样品的处理：
 - 1) 在样品接收时，如果发现样品有泄露，连同被污染的文件和包装一起转移到安全的容器内，应该由经过训练的人员打开样品包装，；
 - 2) 不要试图清洁被污染的文件和样品包装，包装应丢弃在生物安全垃圾箱内，携带的文件应无菌操作放入自封袋内，拍照，再将污染的文件丢弃在生物安全垃圾桶内；

样品接收程序

3) 玻璃容器盛放的样品，如果在运输过程中破碎，不要试图清理和包装样品，应将样品丢弃在生物安全垃圾桶内，并告知客户；样品泄露的任何细节应加以记录，并在报告中注明，微生物样品的泄露应与健康和安全经理进行沟通。

样品接收程序

3. 拒收样品：

- 1) 物理性状发生改变
- 2) 由于泄露有潜在的污染风险
- 3) 样品间有交叉污染的风险
- 4) 样品量不足
- 5) 不适于检验的样品：如果客户强烈要求检验，应在检测报告中注明

样品接收程序

4. 接收样品:

样品接收后应立即转移到微生物检测实验室，实验室检测人员对样品进行确认后，可以立即开始检测，或者储存在适当的条件下，随后开始检测

5. 样品的储存:

保持样品的完整直到开始检验，样品储存的方式应尽量减少对样品中微生物的影响；用于微生物检测的样品一般可以储存在2-8度，避光的条件下，开始检验前应将样品温度平衡到室温。

方法

4

方法的选择

1. 标准的选择遵循优先使用国家标准；
2. 确保实验室使用的标准是最新版本，除非最新版本不适用，或者不可能操作；
3. 由权威技术机构或认可的科杂志发布的方法，如果适合使用，经过验证是可以使用的；
4. 在必要时，与客户协商所使用标准方法，应补充额外的信息或细节，确保前后信息一致。
5. 实验室管理者/质量负责人负责选择最适合的检测方法，以满足客户的需要，同时也要满足管理体系需要。
6. 实验室管理者/质量负责人应指定经验丰富的人员开发新检测方法

非标方法和超范围使用

1. 非标准方法在使用前应进行充分验证，给出关键点的测量不确定度；
2. 标准方法超范围使用或者经过任何改动，必须经过验证以证明该方法依然适用，对任何改动应加以记录；
3. 参与检测方法建立的所有实验室人员是合格的并且有经验的工作人员。记录方法建立的全过程
4. 如果必须使用非标准方法，实验室管理者/质量负责人有责任征得客户的同意并保证使用的方法满足客户的需求

实验室在建立非标方法前 应和客户确认的事项

1. 测试方法使用的范围
2. 测试样品的类型
3. 参数
4. 定量范围
5. 仪器设备,包括技术性能要求
6. 需要的参考标准和参考物质
7. 环境要求
8. 过程描述: 装卸、运输、储存、准备和处置(包括样品保存样品的完整性)

实验室在建立非标方法前 应和客户确认的事项

9. 设备维护和校准
10. 健康和安全注意事项和风险评估
11. 接收/拒绝检测结果，以及解释
12. 结果报告
13. IQC、IQA、EQA和不确定度评估

实验室在建立非标方法前 应和客户确认的事项

- 1) **Internal Quality Control (IQC):** Samples of traceable known value which may be used to confirm that a procedure or process has worked as intended.
- 2) **Internal Quality Assurance (IQA/ring trial):** Samples sourced by the laboratory in order to demonstrate competence and may take the place of proficiency samples.
- 3) **Proficiency Sample (External Quality Assurance, EQA):** Samples provided by an external source in order to compare laboratory results between similar laboratories. These may be used as an internal quality control sample. External Proficiency Providers should hold accreditation to ISO/IEC 17043:2010 – Conformity assessment – general requirements for proficiency testing.

方法验证

什么是方法验证

什么时候需要进行方法验证

方法验证是检查确认和提供客观的证据，来证明方法满足需要，并适合其用途

什么时候需要进行方法验证：非标准方法、实验室建立的方法、超范围使用的标准方法、修改使用的标准方法。

方法验证结果是需要被批准以后才可以使用的。由实验室主管批准，形式是**批准文件**，并附**评价报告**。方法验证范围由质量负责人和实验室主管来决定。范围应尽可能的广泛，包括：抽样、样品前处理、储存、运输、取样。

方法验证

检测方法的室内验证包括：

1. 用认可过的参考方法作为标准
2. 用验证过的方法作为参考、
3. EQA（Proficiency Sample）、IQA（Internal Quality Assurance）结果，
内部QC
4. 实验室内部人员比对
5. 影响实验结果因子的评估
6. 根据经验和方法原理的科学理解对实验结果的不确定度评估

方法验证

实验室主管和质量负责人负责确保经验证标准的范围和准确度满足客户的需要

测量不确定度:

1. 检测方法的需要
2. 客户的需要
3. 当测量结果在标准值附近

数据控制

实验室主管和质量负责人决定对计算器和数据的转移进行何种检查，检查要求和检查过程应在相应的SOP中进行描述。

当使用计算机或者自动化设备时：

- 1.应详细记录任何实验室内部开发的计算机软件，并经过验证满足需要；
2. 建立数据保护程序
3. 保证软件和硬件安全，例如设置安全密码等
4. 为了保证检测结果，以及内部验证数据的完整性，计算机和自动设备应经常维护，保证正常功能，其所处的环境满足工作要求

数据控制

5. 实验结果数据应手写，由实验室的全自动设备捕捉数据除外，所有手写的结果记录应有实验完成者的签名或者首字母签字、日期，以及样品的详细信息，培养基和试剂的批号、关键设备的信息

环境控制

5

环境监控

1. 环境涂抹检查：设定关键点，涂抹25平方厘米
2. 关键点：培养基配制间、缓冲间、洁净间的操作台、走廊、培养箱内部、P2实验室等
3. 平板计数，肠道细菌检验
4. 环境清洁剂，3种以上

培养基质量控制

6

培养基质量控制

存储

1. 保证所有的培养基、添加剂、其他成分按照厂商的要求进行储存，在保质期内使用；
2. 收到培养基时，应标记接收日期、打开使用时标注打开日期；
3. 使用完毕，应保证将盖子拧紧，以免培养基受潮
4. 受潮、结块的培养基不应再使用

培养基质量控制

存储

1. 配制好的平板储存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ ，避光，于容器中，或者是袋子，以避免脱水；
2. 使用时，依据先进先出的原则，超过保质期的不要使用；
3. 培养基脱水会造成营养物质的浓缩，影响微生物生长，以及培养基的货架寿命，脱水的检验可以使用称重的方法，重量损失不得超过5%（同一个平板配制好后，表面干燥，在放入冰箱前称重，放置2周或4周后再一次称重）
4. 使用前检查培养基是否被污染

培养基质量控制

内部质量控制

随机检查每一个批号的培养基

1. pH值 如果超过可接受范围，停止使用，调查原因
2. 无菌检查： $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，培养2天，或者 $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，10天
3. 生长情况检查，
4. 选择性检查
5. 保质期检查

培养基质量控制

Table 1: Suggested Conditions for Sterility Testing

Testing/Storage Incubation Temperatures	Minimum Sterility Incubation period
4 – 8 ⁰ C	10 – 14 days
20 - 25 ⁰ C	2 – 5 days
35 - 37 ⁰ C	48 – 72 hours

培养基质量控制

QC生长比较方法：该方法适用于**非选择性培养基**和**选择性培养基**对目标微生物的回收率

McFarland浊度 0.5（生理盐水）



1:100稀释

转移10ul 到1mL生理盐水

A

1:1000稀释

B

1:10000稀释

C

1:100000稀释

D



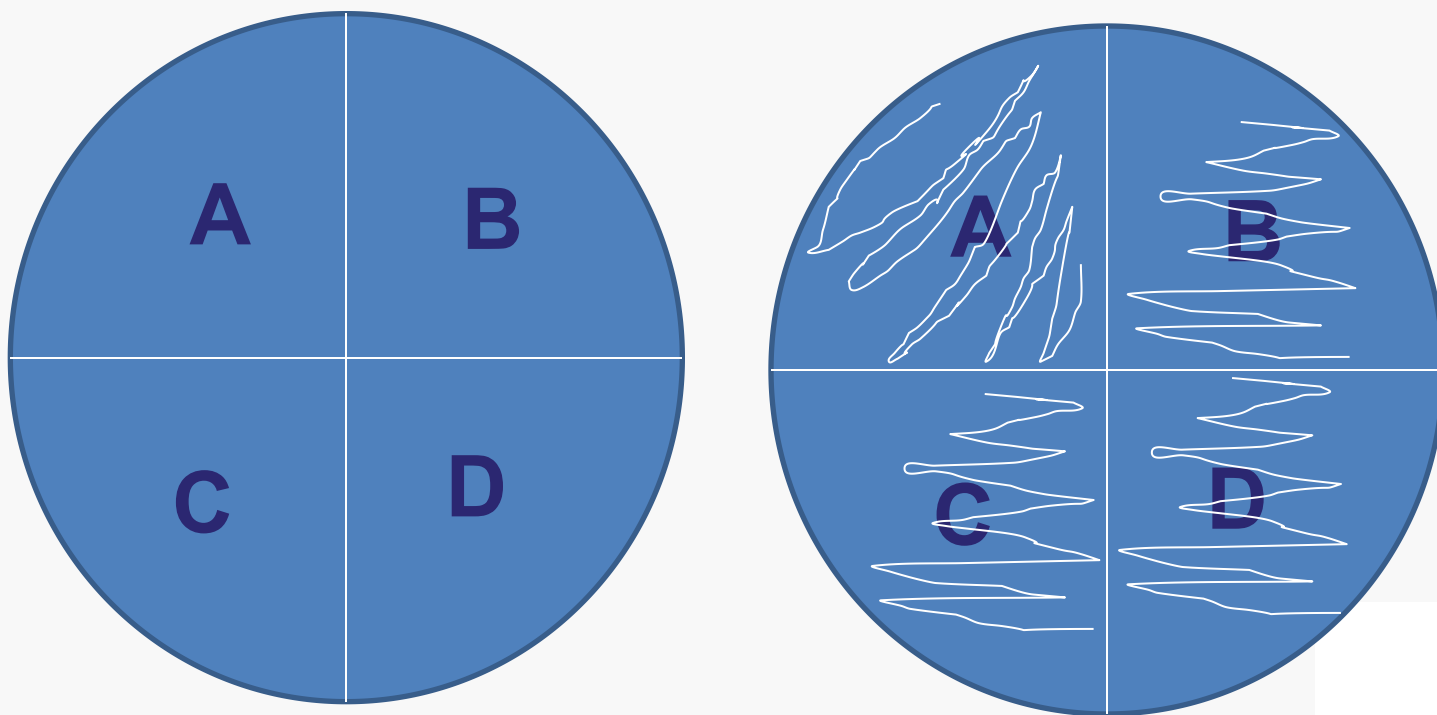
在测试平板底部分成4份，转移25ul ABCD 稀释液到每一份中，用无菌接种环进行涂布



保温培养，选择给出单菌落的区域，计数，进行记录菌数的log值

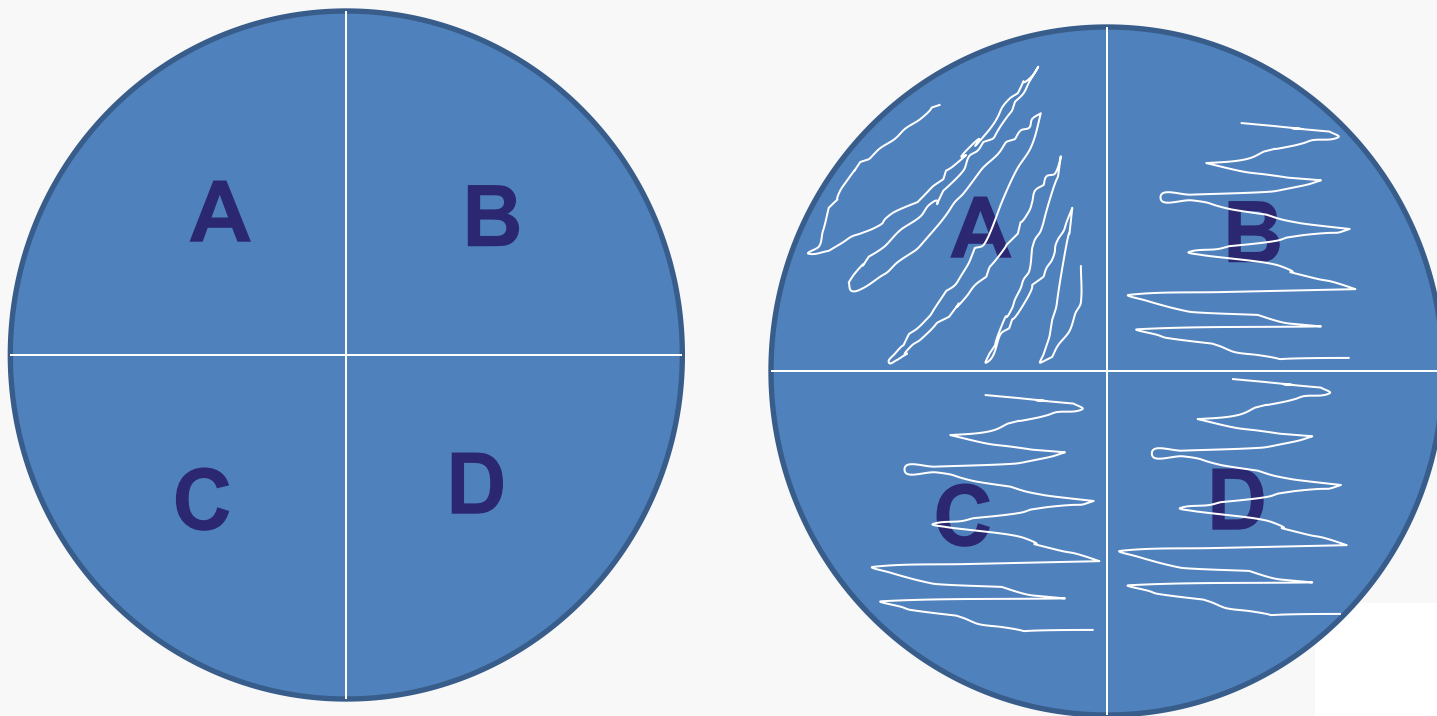
培养基质量控制

实验室内部制备的培养基，与对照培养基比较，回收率在50%以上是满意的。



培养基质量控制

实验室内部制备的培养基，与对照培养基比较，回收率在50%以上是满意的。



培养基质量控制

选择性液体培养基

McFarland浊度 0.5 (生理盐水)



1:100 稀释

转移 10ul 到 1mL 生理盐水

A

1:1000 稀释

B

1:10000 稀释

C

1:100000 稀释

D



转移 25ul ABCD 稀释液到 4 份液体培养基中，和对照培养基（以前的批号）培养，进一步接种到固体培养基上，培养



每一个稀释度都应该有生长

培养基质量控制

选择性培养基的选择性检查

McFarland浊度 0.5（生理盐水）



应接种环在选择性平板表面接种，或者接种一环到液体选择性培养基中，同时接种营养培养基或者血平板，培养



检查测试菌株的生长情况，应该被抑制的菌株应该完全没有生长或者微弱的生长，如果抑制剂没有作用，调查可能的原因

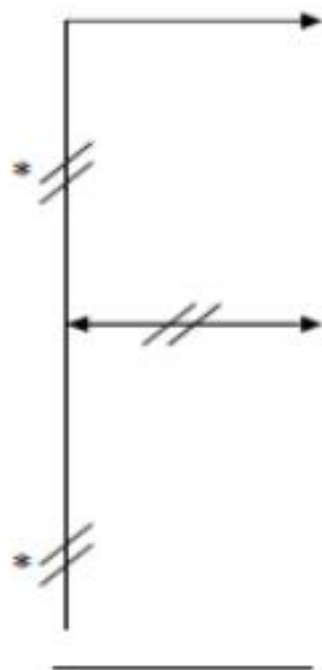
培养基质量控制

选择性培养基选择性检查（选择性平板）

For example when *E. coli* is being tested as a negative control organism on Baird Parker medium

Medium	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
TSA						TNTC	55	5
BP	120	13	1	-	-	-	-	-

The key dilutions are 10^{-7} on the non-selective and 10^{-2} on the selective test medium and there is a difference of five ten fold dilutions.



MASTER CULTURE
 Freeze dried, -70°C, -20°C or less
 Purity + Culture identity verified

(First Generation)**
 Store for years

STOCK CULTURE (Multiple)
 Frozen at -20°C
 years

(Second Generation)
 Store for 0.5 – 1.0

Purity Check

WORKING CULTURE
 Non-Selective Media
 at 4°C or other storage temp.
 Purity Check
 Minimal confirmation (voluntary)

(Third Generation)
 Store for 2 weeks ***
 Discard after this time

STANDARDISED CELL SUSPENSIONS

**PERFORMANCE OF MEDIA
 QUALITY CONTROL TESTS OR
 TEST METHOD CONTROLS**

污染控制

7

污染控制

实验室内部控制

1. 制备无菌样品
2. 对使用的培养基进行计数检验

