

稳健统计方法及 t 检验法在活菌计数能力比对中的应用

张媛, 张磊*, 李建, 丁家波, 李旭妮, 刘轶秋, 王楠, 徐磊

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2012-07-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 04-0019-04 [中图分类号] S854.43

[摘要] 为比较检验员活菌计数能力及常量法和微量法在活菌计数应用中是否存在差异, 8名检验员于同时、同环境中对同一细菌培养物采用常量法和微量法进行活菌计数, 采用稳健统计方法对不同人员相同方法的计数结果进行统计, 将检验结果分为“满意”、“可疑”和“不满意”; 采用 t 检验法对使用不同方法对同一样品的计数结果进行统计, 将结果分为“差异显著”和“差异不显著”。稳健统计方法表明, 用常量法进行检测, 有6名检验员的检验结果全部满意, 而微量法的结果中只有2名检验员获得了全部满意的结果; t 检验法表明常量法和微量法之间存在显著差异。稳健统计方法及 t 检验法统计结果显示, 不能用微量法代替常量法进行检验, 个别检验员的活菌计数能力有待进一步提高。

[关键词] 活菌计数; 能力比对; 稳健统计方法; t 检验法

Application of Robust Statistic Method and t Test of Proficiency Testing for Live Bacteria Counting

ZHANG Yuan, ZHANG Lei*, LI Jian, DING Jia-bo, LI Xu-ni, LIU Yi-qiu, WANG Nan, XU Lei

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: The test was aim to comprehensively grasp inspectors' ability of live bacteria counting and the differences among constant method and trace method in live bacteria. Each inspector counted bacteria in the same culture using two

作者简介: 张媛, 助理研究员, 从事兽用生物制品检验工作。

通讯作者: 张磊. E-mail: kflame@163.com

3个月、4个月、5个月、6个月和-20℃保存1个月、2个月、6个月、12个月、18个月时HA价均未降低, 保持在1:400。

3 小结

本试验室研制的禽流感抗原各项指标经检测均合格、无菌、特异、均一、稳定, 可以作为国家参考品。但根据标准物质的特殊要求, -20℃条件下的保存时间还需每年定期检测确定。

致谢: 对参加该国家参考品协作标定的单位和实验室, 一并表示感谢。

参考文献:

- [1] 李建丽, 刘国英, 张金花. H9N2型禽流感的流行特点及其疫苗市场分析[J]. 兽医导刊, 2010, (3): 69-71.
- [2] 景小冬, 章振华, 李林, 等. H9N2型禽流感病毒流行毒株交叉免疫攻毒保护试验[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(6): 134-137.
- [3] 禽流感病毒H9N2型血凝抑制试验抗原与阴、阳性血清制造及检验试行规程[EB/OL]. [2008-03-04]. http://2010jiuban.agri.gov.cn/xxgkxzsp/t20080304_1028224.htm
- [4] 中华人民共和国兽药典二〇一〇年版三部[S].
- [5] 国家标准物质中心. 一级标准物质技术规范(JJG1006-94)[S]. 1994.

(责任编辑: 李文平)

methods of constant and micro methods in the same environment at the same time. Then robust statistical analysis techniques of Z score values were used to statistically analyse live bacteria counting results of different inspectors using same method. Different inspectors' test results were evaluated as "satisfactory", "suspicious" or "unsatisfactory". t test was used to statistically analyse live bacteria counting results of different methods but the same sample. Test results using different methods were evaluated as "significant difference" and "no significant difference". Three kinds of bacteria were detected by constant method, six inspectors' test results were all satisfactory. But, only two inspectors' test results were all satisfactory using micro method. Besides, results of t test showing differences among inspectors using micro method were more significant than that using constant method. The results of Z score and t test showed that it was no suitable to use micro method instead of constant method for test, and there were needs to be further improved for individual inspectors on ability of live bacteria counting.

Key words: live bacteria counting; proficiency test; robust statistical techniques; t test

活菌计数不仅是兽用生物制品检验中的一个重要检验参数,而且在临床微生物检验中也会经常用到。为全面了解各检验员活菌计数的能力,促进各检验员提高细菌计数结果的准确性和有效性,探究方法间的结果差异,寻求更简便、准确的计数方法,提高检验水平,中国兽医药品监察所组织 8 名检验员开展了细菌活菌计数人员比对及方法比对活动,以期为兽用生物制品行业开展能力比对活动提供有益的参考。

1 材料与方法

1.1 样品的制备 制备大肠杆菌菌液、多杀性巴氏杆菌菌液及丹毒杆菌菌液,并制备普通琼脂平皿、含 0.1% 裂解血细胞全血及 4% 胎牛血清马丁琼脂平皿、含 10% 胎牛血清马丁琼脂平皿各 48 付,待用。

1.2 比对的方法 常量稀释法:吸取 1 mL 菌液,用适宜的稀释液以 1 mL + 9 mL 的方式连续 10 倍梯度稀释 6 管,取第 6 管稀释液以 2 mL + 4 mL 的方式进行 3 倍稀释,取稀释后的菌液 0.1 mL 接种适宜的琼脂培养基平板,3 平板/样。轻轻转动平板,使菌液在琼脂表面散布均匀。36 ~ 37 °C 培养适宜时间。

微量稀释法:吸取 100 μ L 菌液,用适宜的稀释液以 100 μ L + 900 μ L 的方式连续 10 倍梯度稀释 6 管,取第 6 管稀释液以 200 μ L + 400 μ L 的方式进行 3 倍稀释,取稀释后的菌液 100 μ L 接种适宜的琼脂培养基平板,3 平板/样。轻轻转动平板,使菌液在琼脂表面散布均匀。36 ~ 37 °C 培养适宜时间。

1.3 结果的处理及评价方法的确立

1.3.1 人员比对 根据 CNAS - GL02:2006《能力

验证结果的统计处理和评价指南》^[1]中稳健统计方法,测定 Z 比分值,用于分析各检验员在总体检测结果中所处的位置。 Z 比分值采用 X 、 X_M 、 $Norm\ IQR$ 来确定^[2]。

Z 比分值计算公式: $Z = (X - X_M) / Norm\ IQR$, 式中: Z 为稳健比分值; X 为检验数据; X_M 为中位值; $Norm\ IQR$ 为标准化四分位距, $Norm\ IQR = 0.7413 \times$ 四分位间距 (IQR)。

判定标准为: $|Z| \leq 2$ 为满意结果; $2 < |Z| < 3$ 时,表示结果可疑; $|Z| \geq 3$ 为不满意结果。

1.3.2 方法比对 t 检验是数理统计中一种检验平均值的检验方法,可用于检查分析方法或操作过程是否存在较大的系统误差。首先根据检验数据求出平均值 $\bar{x}$ 及样本标准偏差 S ,将有关数据代入计算公式中计算 t 值。其次,根据选定的显著性水准 $\alpha = 0.05$ 及 df 值,由 t 分布表查得 t 临界值。最后,将计算得到的 t 值与查表得到的 t 临界值比较,如果前者小于后者,则认为二者之间无显著性差异^[3]。

t 值计算公式^[4]:

$$t = \frac{|\bar{x}_2 - \bar{x}_1|}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}}$$

式中: x_1 - 第一次检验测量数据的平均值; x_2 - 第二次检验测量数据的平均值; s_1 - 第一次检验测量数据的标准偏差; s_2 - 第二次检验测量数据的标准偏差; n_1 - 第一次检验测量的测量次数; n_2 - 第二次检验测量的测量次数。

2 结果与分析

2.1 样品均匀性保证 每个参比人员在相同环境下从同一细菌培养瓶中吸取菌液,同时进行操作,以保证比对样品均一、比对条件一致。

2.2 各检验员活菌计算结果及统计分析

2.2.1 人员比对结果及统计分析 根据 Z 比分值计算公式,计算各参数值(常量法结果见表 1、微量法结果见表 3)及各参比人员每种样品测定结果的 Z 值(常量法结果见表 2、微量法结果见表 4)。结果显示,用常量法进行活菌计数,06 号参比人员对大肠杆菌菌液和多杀性巴氏杆菌菌液检验结果 | Z | 为 2.955 和 2.623,表示结果“可疑”,对丹毒杆菌菌液检验结果 | Z | 为 3.523,结果“不满意”;03 号参比人员对多杀性巴氏杆菌菌液检验结果“可疑”,出现正偏差;其余 6 位参比人员用常量法对 3 种样品的检测结果 | Z | 均 ≤ 2,为“满意”结果。用微量法进行活菌计数,只有两名检验员对 3 种样品的检验结果均为“满意”,其余 6 名检验员均对 1 种或 2 种样品出现了“可疑”或“不满意”的检验结果。从 Z 比分值序列图(图 1、图 2)可以更清楚地看出各参比人员之间检测结果的比较情况。

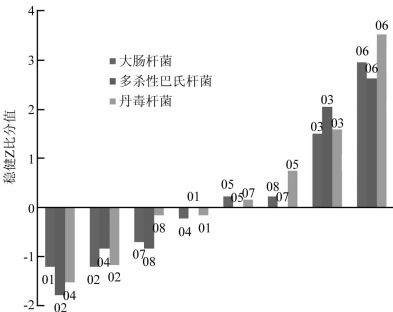


图 1 常量法活菌计数结果 Z 比分序列图

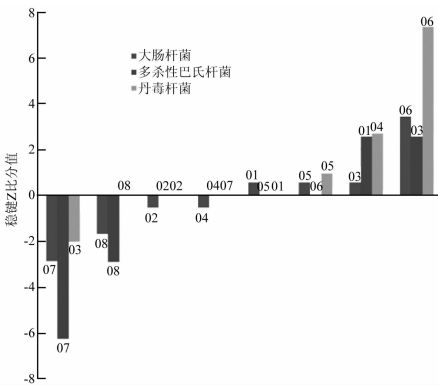


图 2 微量法活菌计数结果 Z 比分序列图

表 1 参比人员常量法检测 results 和 Z 比分值统计处理结果

参比人员编号	大肠杆菌菌液		多杀性巴氏杆菌菌液		丹毒杆菌菌液	
	检测值	Z 值	检测值	Z 值	检测值	Z 值
01	9.279	-1.205	8.954	0	9.491	-0.159
02	9.279	-1.205	8.845	-1.787	9.447	-1.159
03	9.398	1.500	9.079	2.049	9.568	1.591
04	9.322	-0.227	8.903	-0.836	9.431	-1.523
05	9.342	0.227	8.954	0	9.531	0.750
06	9.462	2.955	9.114	2.623	9.653	3.523
07	9.301	-0.705	8.954	0	9.505	0.159
08	9.342	0.227	8.903	-0.836	9.491	-0.159

注:检测值为检测结果的对数值。

表 2 参比人员常量法检测稳健统计参数

统计参数	大肠杆菌菌液	多杀性巴氏杆菌菌液	丹毒杆菌菌液
结果总数	8	8	8
中位值	9.332	8.954	9.498
下四分位值(Q1)	9.296	8.903	9.480
上四分位值(Q3)	9.356	8.985	9.540
四分位距(IQR)	0.060	0.082	0.060
标准化四分位距(NIQR)	0.044	0.061	0.044
稳健变异系数(CV/%)	0.471	0.681	0.463
极大值	9.462	9.114	9.653
极小值	9.279	8.845	9.431
变动范围	0.183	0.269	0.222

表 3 参比人员微量法检测 results 和 Z 比分值统计处理结果

参比人员编号	大肠杆菌菌液		多杀性巴氏杆菌菌液		丹毒杆菌菌液	
	检测值	Z 值	检测值	Z 值	检测值	Z 值
01	9.279	0.545	8.954	2.550	9.380	0
02	9.255	-0.545	8.903	0	9.380	0
03	9.279	0.545	8.954	2.550	9.342	-2.000
04	9.255	-0.545	8.903	0	9.431	2.684
05	9.279	0.545	8.903	0	9.398	0.947
06	9.342	3.409	8.903	0	9.519	7.316
07	9.204	-2.864	8.778	-6.250	9.380	0
08	9.230	-1.682	8.845	-2.900	9.380	0

注:检测值为检测结果的对数值。

2.2.2 方法比对结果及统计分析 结果如表 5 所示。

表 4 参比人员微量法检测稳健统计参数

统计参数	大肠杆菌菌液	多杀性巴氏杆菌菌液	丹毒杆菌菌液
结果总数	8	8	8
中位值	9.267	8.903	9.380
下四分位值(Q1)	9.249	8.889	9.380
上四分位值(Q3)	9.279	8.916	9.406
四分位距(IQR)	0.030	0.027	0.026
标准化四分位距(NIQR)	0.022	0.020	0.019
稳健变异系数(CV/%)	0.237	0.225	0.203
极大值	9.342	8.954	9.519
极小值	9.204	8.778	9.342
变动范围	0.138	0.176	0.177

表5 三种样品两种方法活菌计数结果及统计分析						
编号	活菌计数结果(实际检测结果的对数值)					
	大肠杆菌菌液		多杀性巴氏杆菌菌液		丹毒杆菌菌液	
	常量法	微量法	常量法	微量法	常量法	微量法
01	9.279	9.279	8.954	8.954	9.491	9.380
02	9.279	9.255	8.845	8.903	9.447	9.380
03	9.398	9.279	9.079	8.954	9.568	9.342
04	9.322	9.255	8.903	8.903	9.431	9.431
05	9.342	9.279	8.954	8.903	9.531	9.398
06	9.462	9.342	9.114	8.903	9.653	9.519
07	9.301	9.204	8.954	8.778	9.505	9.380
08	9.342	9.230	8.903	8.845	9.491	9.380
总平均值	9.341	9.265	8.963	8.893	9.515	9.401
标准差	0.063	0.041	0.091	0.058	0.071	0.054
<i>t</i> 值	/	2.860	/	1.835	/	3.619

每种样品均由8名参比人员在相同条件下,分别采用常量法和微量法进行测试。3种样品的自由度 $f_{\text{均}} = n_1 + n_2 - 2 = 14$,经查*t*值表,*t*临界值均为 $t_{0.05}(14) = 2.145$ 。多杀性巴氏杆菌菌液测定的*t*值为 $1.835 < t$ 临界值,这表明在 $\alpha = 0.05$ 显著性水平时,两种方法的检测结果差异不显著。大肠杆菌菌液和丹毒杆菌菌液测定的*t*值分别为2.860和3.619,均大于*t*临界值,这表明在 $\alpha = 0.05$ 显著性水平时,两种方法的检测结果差异显著。

3 讨 论

比对试验是评价检验人员检测能力与检验方法可靠性的一种有效手段。活菌计数结果不仅是判断兽用生物制品质量是否合格的一个重要参数,也是临床微生物检验的重要参考信息。由于影响检验员检测结果的因素是多方面的,不同人员对同一样品在同一时间、同一环境下的检测数据也可能不尽相同,对于活菌附加量少的产品,不同检验人员给予的检验结论会出现合格与不合格质的区别。适当开展人员检测能力比对活动能够帮助检验员发现工作中存在的误差,并采取相应的措施提高检

验质量,从而达到不同检验人员检验质量相同,是实验室质量管理体系中质量保证的重要环节。

此次活动发现3种样品用常量法的检验结果均比用微量法的检验结果偏高,这可能是由于在用常量法进行检验时,吸管内的液体不是自然下流,而是将吸管内的菌液(包括管尖残留的菌液)全部打入的原因。另外,多杀性巴氏杆菌菌液浓度低于大肠杆菌菌液和丹毒杆菌菌液,采用常量法和微量法对低浓度菌液进行活菌计数结果差异不显著,对高浓度菌液进行计数结果差异显著。在本次比中对3种菌液进行活菌计数,常量法有6人结果 $|Z| \text{均} \leq 2$,而微量法只有2人结果 $|Z| \text{均} \leq 2$ 。用微量法进行检验,人员之间的差异更大,可能的原因包括部分检验员的移液器使用方法不规范,部分移液器未经标化,存在误差。建议使用统一移液器及吸头,统一操作手法及细节,规范移液器使用方法,以减少人为偏差。

由于暂无第三种方法验证,本次比对未能确定采用常量法还是微量法进行活菌计数更接近待测样品的真实值,需要更多的测试数据来反映两种方法的系统误差。在今后的工作中应建立标准操作规程,统一操作细节,规范操作手法,开展长期的、多次的比对活动,获取更多实验数据来比较常量法和微量法的优劣。

参考文献:

[1] CNAS GL 02:2006 能力验证结果的统计处理和能力评价指南[S].

[2] GB/T 15483.1-1999. 利用实验室间比对的能力验证. 第一部分:能力验证计划的建立和运作[S].

[3] 鲁秀恒,孔宪忱. 如何应用*t*检验正确评价粮油分析检验结果[J]. 粮油仓储科技通讯,1995,(1):37-40.

[4] 陈晓春,高金源. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗病毒含量测定能力比对的实践[J]. 中国兽药杂志,2012,46(2):5-9.

(责任编辑:侯向辉)