

附件3

《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》

(征求意见稿)

编制说明

《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》编制组

二〇一四年十月

项目名称：水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法

项目统一编号：989

承担单位：常州市环境监测中心

编制组主要成员：徐东炯、张小琼、张皓、周崑、徐虹、张翔、汤云、

陈桥、陈志宁、沈伟

标准所技术管理负责人：张虞、周羽化

标准处项目负责人：雷晶、吴文晖

目 录

1 项目背景.....	1
1.1 任务来源.....	1
1.2 工作过程.....	1
2 标准制订的必要性分析.....	2
2.1 蛔虫卵的环境危害.....	2
2.2 相关环保标准和环保工作的需要.....	3
3 国内外相关分析方法研究.....	3
3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究.....	3
3.2 国内相关分析方法的特点、应用情况.....	5
3.3 回收率情况的说明.....	6
4 标准制订的基本原则和技术路线.....	7
4.1 标准制订的基本原则.....	7
4.2 标准制订的技术路线.....	7
5 方法研究报告.....	8
5.1 方法研究的目标.....	8
5.2 方法原理.....	9
5.3 试剂和材料.....	9
5.4 仪器与设备.....	9
5.5 样品.....	10
5.6 分析步骤.....	10
5.7 蛔虫卵的形态特征.....	11
5.8 蛔虫卵参考图片.....	11
5.10 精密度与准确度.....	12
5.11 结果计算与表示.....	15
5.12 质量保证和质量控制.....	15
5.13 废物处理.....	15
6 方法验证.....	16
6.1 方法验证方案.....	16
6.2 方法验证过程.....	16
7.参考文献.....	16
附一 方法验证报告.....	18

《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

(1) 2009年5月,国家环境保护部公布了《关于开展2009年度国家环境保护标准制修订项目工作的通知》(环办函[2009]221号),科技标准司向常州市环境监测中心下达了标准编制任务,由江苏省常州市环境监测中心承担《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》。本标准制定任务列入2009年度国家环境保护标准制修订项目,项目统一编号为:989。

(2) 本标准制订任务的承担单位为江苏省常州市环境监测中心,参加单位有:常州邦达诚科技有限公司、江苏省环境监测中心和苏州市环境监测中心。

1.2 工作过程

(1) 成立标准编制组

2009年5月,常州市环境监测中心接到制定《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》的任务后,成立了标准编制组,成员以多年从事生物监测工作的人员为主。

(2) 查询国内外相关标准和文献资料

2009年6月-11月,本标准编制组成员根据国家环境保护标准制修订管理办法的相关规定,检索和收集了国内外相关标准和文献资料,了解国内外相关分析方法进展和我国相关质量标准及排放标准。

(3) 召开专家研讨会,研究建立标准方法,开展方法试验

2009年12月,按照制定标准的要求,参照国内外的相关方法和文献,并邀请专家就标准编制的重点、难点进行研讨,确定实验方案,2010年1月-10月并开展方法试验。编写《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》的方法草案和开题论证报告。

(4) 组织专家论证,确定标准制定技术路线和制订原则

2010年11月,标准开题论证报告和标准草案通过了环保部科技标准司组织的专家论证,论证委员会建议将本标准定位为一种快速筛查方法,并提出了修改建议。根据与会专家的具体意见和建议,明确了下一步的工作方向:进一步明确标准的适用范围。

(5) 落实专家意见,深入开展方法试验

2010年12月-2012年6月,根据开题论证意见,标准编制组按照《国家环境保护标准制修订工作管理办法》(国家环境保护总局2006年第41号)、《环境监测分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168-2010)和《国家环境污染物监测方法标准制修订工作暂行要求》(环科函(2009)10号)的要求开展《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》的相关试验。并准备实验室方法验证工作,编写《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》标准草案及方法验证方案。

(6) 方法验证工作

2012年7月-8月,组织了6家有资质的实验室进行方法验证,于2012年8月底收回所有的验证报告,随后进行了数据的汇总和整理分析工作,编制《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》

验证报告。

(7) 编写标准征求意见稿和编制说明

2012年9月，着手编写《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》的标准征求意见稿及编制说明。

2014年5月，完成《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》的标准征求意见稿及编制说明初稿的编写，同时，环境部科技标准司组织专家对该征求意见稿及编制说明初稿进行了研讨，根据专家委员会的修改意见和建议，重点补充了10L中浓度(4个/L)、高浓度(8个/L)自制参考样品的6家有资质实验室间的方法验证，同时进一步完善征求意见稿及编制说明。

2014年10月，提交了修改后的《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》标准征求意见稿及编制说明。

2 标准制订的必要性分析

2.1 蛔虫卵的环境危害

(1) 蛔虫(卵)的生物学特性

似蚓蛔线虫(*Ascaris lumbricoides* Linnaeus)简称蛔虫，原腔动物门，线虫纲，蛔目，蛔科，是人体内最常见的寄生虫之一，成体略带粉红色或微黄色，体表有横纹，雄虫尾部常卷曲。虫卵随人体粪便排出，卵分受精卵和非受精卵两种。前者大小约为45-75×35-50μm，宽椭圆形，(因与胆汁接触而)呈黄色，表面有一层波浪状的蛋白质膜，内有球形卵细胞，两极有新月状空隙；后者大小约为88-94×39-44μm，长椭圆形，内有一团大小不等的粗大折光颗粒。只有受精卵才能卵裂、发育。在21-30℃、潮湿、氧气充足、荫蔽的泥土中约10天左右发育成杆状蚴。脱一次皮变成具有感染性幼虫的感染性虫卵，此时如被吞食，卵壳被消化，幼虫在肠内逸出。然后穿过肠壁，进入淋巴腺和肠系膜静脉，经肝、右心、肺，穿过毛细血管到达肺泡，再经气管、喉头的会厌、口腔、食道、胃，回到小肠，整个过程约25-29天，脱3次皮，再经1月余就发育为成虫。

蛔虫卵对外界理、化等不良因素的抵抗力很强，在荫蔽的土壤中或蔬菜上，一般可活数月甚至一年，在5-10℃土壤中可生存2年，在干燥环境中(22℃)生存2-3周，在粪坑中存活半年至一年，对寒冷及化学药物有很大抵抗力，不易被杀死。食用醋、酱油或腌菜、泡菜的盐水，均不能将蛔虫卵杀死。蛔虫卵在缺氧环境中仍可以保持存活，在污水缺氧的环境下可生存相当长的时间。蛔虫卵对一些化学品具有抵抗力，主要是由于卵壳蛔甑层的保护作用，如在50%的漂白粉液里经5-10小时才死亡，10%的福尔马林、硫酸、盐酸、硝酸或磷酸溶液均不能影响虫卵内幼虫的发育，但在70℃热水或直射阳光下很快死亡，而对于能溶解或透过蛔甑层的有机溶剂或气体，如氯仿、乙醚、乙醇和苯等有机溶剂，以及氰化氢、氨、溴甲烷和一氧化碳等气体则很敏感，卵细胞或幼虫皆可被杀死。

(2) 蛔虫(卵)的危害

蛔虫是世界性分布种类，是人体最常见的寄生虫，蛔虫病在我国流行相当广泛，农村高于城市，儿童多于成人，其感染率可达85%以上。蛔虫卵在外界环境中无需中间宿主而直接发育为感染期卵，且蛔虫产卵量大，(雌蛔虫一昼夜排出的虫卵多达100-200万枚，一生可排卵2000万枚)。人受感染后，可出现不同程度的发热、咳嗽、食欲不振或善饥、脐周阵发性

疼痛、营养不良、失眠、磨牙等症状，有时还可引起严重的并发症。如蛔虫扭集成团可形成蛔虫性肠梗阻，钻入胆道形成胆道蛔虫病，进入阑尾造成阑尾蛔虫病和肠穿等，如有大量蛔虫的幼虫经过肺部，可以引起病人发热、咳嗽，肺部透视有阴影，称为过敏性肺炎。蛔虫的幼虫如果误入歧途，进入眼部，可能引起失明；进入脑部，可能引起癫痫。对人体危害很大。

2.2 相关环保标准和环保工作的需要

在现有的国家标准中，《农田灌溉水质标准》（GB5084-2005）明确规定农田灌溉用水中蛔虫卵的排放限值为2个/L；《畜禽养殖业污染物排放标准》（GB18596-2001）规定集约化畜禽养殖业水污染物最高允许蛔虫卵的日均排放限值为2个/L（目前，《GB18596-2001《畜禽养殖业污染物排放标准》正在修订中，修订标准的征求意见稿对现有养殖场水污染物排放蛔虫卵浓度限值是直接排放与间接排放均为2.0个/L；对新建养殖场水污染物排放及特别排放蛔虫卵浓度限值是直接排放与间接排放均为1.0个/L）；《城市污水再生利用农田灌溉用水水质》（GB 20922-2007）中规定蛔虫卵的排放限值为2个/L；《食用农产品产地环境质量评价标准》（HJ332-2006）规定粮食作物灌溉水蛔虫卵的排放限值为2个/L，蔬菜的为1个/L。

表1 环境质量标准与污染物排放（控制）标准的（粪）大肠菌群监测要求

标准类型	标准名称	监测方法	限值
环境质量标准	《农田灌溉水质标准》（GB5084-2005）	《农业环境监测实用手册》第三章中“水质 污水蛔虫卵的测定 沉淀集卵法”	沉 ≤2 个/L
	《城市污水再生利用农田灌溉用水水质》（GB 20922-2007）	《农业环境监测实用手册》第三章中“水质 污水蛔虫卵的测定 沉淀集卵法”	沉 ≤2 个/L
	《食用农产品产地环境质量评价标准》（HJ332-2006）	《农业环境监测实用手册》第三章中“水质 污水蛔虫卵的测定 沉淀集卵法”	粮食作物 ≤2 个/L 蔬菜 ≤1 个/L
污染物排放标准	畜禽养殖业污染物排放标准(GB18596-2001)	《卫生防疫检验》吐温-80 柠檬酸缓冲液离心沉淀集卵法	≤2 个/L
标准	畜禽养殖业水污染物排放标准	修订中	现有 ≤2 个/L 新建 ≤1 个/L

水中蛔虫卵数量是我国环境保护评价水质状况，控制水体病原体污染的重要指标，特别是与农业生产和农村生活相关性很大，建立水中蛔虫卵检测的标准方法，是保护农村环境、建设社会主义新农村的需要，也是建设先进环境监测预警体系的需要。

3 国内外相关分析方法研究

3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究

(1) 国外标准分析方法的特点、应用情况

环境监测工作中，需要对危害人体健康的寄生虫卵进行监控。针对寄生虫卵的种类、大小、性质，都有不同的检测方法。这些方法或对仪器、或对人员、或对实验条件各有侧重。

自然环境存在的寄生虫对人体造成危险,主要是通过食用生鲜或是未经彻底加热的含有寄生虫卵或者幼虫的食物。另一重要途径就是含有寄生虫卵的生活,屠宰、畜牧业行业污水未经充分处理即排放到自然环境中,污染水源,土壤。近年来,随着我国居民饮食的形式多样,活动范围扩大,由此引发的寄生虫发病率大幅上升。

医院等卫生部门目前主要还是定位于对寄生虫卵的阳性检出率方面,主要采用的方法涂片法:直接涂片法、甘油厚涂片法、加藤氏法。还有一些条件较好的卫生部门借助于仪器分析的检测方法,如 DiaSysFE-2 工作站。DiaSysFE-2 工作站是美国 DiaSys Corporation 根据 NCCLS(美国临床检验标准委员会)和 CLIA(临床实验室改进法案)导则的要求研制的,并经 TUV Rheinland(德国莱茵 TUV)确认,已在全世界各国实验室广泛应用的完整的粪便标本收集、操作、镜检的分析系统。但该仪器价格昂贵,数十万元,不利在基层推广。

环保部门水质蛔虫卵的检测方法,目前国际主流方法是两种,分别为 EPA 和 WHO 采用。

1996 年世界卫生组织(WHO)发布了《Analysis of Wastewater for Use in Agriculture - A Laboratory Manual of Parasitological and Bacteriological Techniques》,确定了水和污水中蛔虫卵的检测方法—即 The modified Baileger method。样品沉淀后吸去上清液后,将沉淀转入离心管中离心,离心沉淀用乙酰乙酸缓冲液进行再悬浮,并加入乙酰乙酯或乙醚吸附杂质,再次离心沉淀,样品分为三层,最下层的沉淀包含有蛔虫卵,将其用硫酸锌溶液进行再悬浮后用 McMaster 计数框镜检计数。

美国环境保护署(EPA)1992 年发布、2003 年修订了 EPA/625/R-92/013《Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge》,将蛔虫卵列入了针对水和污泥中病原体监测的主要污染物之一,并建立了相关分析方法—即 Test Method for Detecting, Enumerating, and Determining the Viability of Ascaris Ova in Sludge。该检测方法可用于废水、污泥和堆肥中的致病性蛔虫卵的检测。样品用混合有表面活性剂的缓冲液进行处理。混合物过筛以除去大颗粒。筛过部分中的固体通过离心沉淀,上层清液慢慢倒出。沉淀物用硫酸镁(比重 1.20)进行密度梯度离心。样品通过浮选后产生了一层包含有蛔虫和其他寄生卵的物质。然后用高目筛进行第二次筛选,去除小颗粒。产生的浓缩物在 26℃ 下培养,直到所有蛔虫卵都含有胚胎。然后在显微镜下观察混合物,用 Sedgwick-Rafter 计数框对蛔虫卵进行计数。

国外对于水中蛔虫卵的分析方法目前处于较成熟的阶段,各种方法发展的主要趋势是在蛔虫卵分离浓缩的过程中使用更为便宜,高效的试剂,在效率相当的情况下,尽可能淘汰有腐蚀性、易爆性等危险化学特性的试剂,而使用更为安全的试剂。

表2 国外相关方法标准比较

方法	应用领域	原理	优点	缺点
EPA	环保	漂浮	适用范围广,可用于废水、污泥和堆肥中的检测	步骤繁琐
WHO (<i>Baileger method modified</i>)	农业、环境	沉淀	简单方便	低浓度样品回收率较低

DiaSysFE-2 工作站 根据 NCCLS(美国临床检验标准委员会)和 CLIA(临床实验室改进法案)导则的要求研制的, 并经 TUV Pheinland(德国莱茵 TUV) 认证	医疗	染色涂片直接观察	直观, 方便, 快捷, 自动	价格昂贵
加藤氏涂片法	医疗	涂片后覆盖浸透浸泡液的玻璃纸, 粪膜透明后镜检	可定量、快捷	观察视野较暗, 杂质多

(2) 与本标准的关系

本方法借鉴了 WHO 方法中缓冲液和分离试剂的使用, 以提高方法的安全性, 借鉴了 EPA 方法中的过滤步骤, 以减少沉淀量, 缩短镜检和分析时间。

3.2 国内相关分析方法的特点、应用情况

(1) 国内分析方法的特点及应用

目前国内针对水中蛔虫卵的监测分析方法主要是以《农田灌溉水质标准》(GB5084-2005) 中介绍的吐温-80 柠檬酸缓冲液离心沉淀集卵法为主, 该方法首先通过离心沉淀获得污水沉渣, 然后加入吐温 80 柠檬酸缓冲溶液和乙醚, 再次离心获得集卵后的沉渣, 涂片后在显微镜下查找蛔虫卵并计数。

(2) 与本方法标准的关系

农业部门在 1992 年就发布了《农田灌溉水质标准》(GB 5084-92), 其中对灌溉水质中蛔虫卵的个数做了规定: 2 个/L。其配套的方法是沉淀集卵法。主要利用蛔虫卵比重大于水, 易于沉淀。污水沉渣与吐温-80 柠檬酸缓冲液混合后, 再加乙醚振荡, 蛔虫卵与杂质分离, 离心后, 虫卵沉淀, 杂质上浮, 达到集卵的目的。

考虑到我国现行环保体制和环保法律、法规的执行, 也考虑在现行的环境监测的投入等因素, 本标准的制订依然以《农田灌溉水质标准》(GB5084-2005) 中引用的《农业环境监测实用手册》中的“水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法”为基础, 并参考原理类似的 WHO 方法(选用了不同的缓冲液和分离试剂)。在镜检时, 采用饱和硝酸钠溶液漂浮的方法观察蛔虫卵, 取代该标准中使用的直接涂片观察。

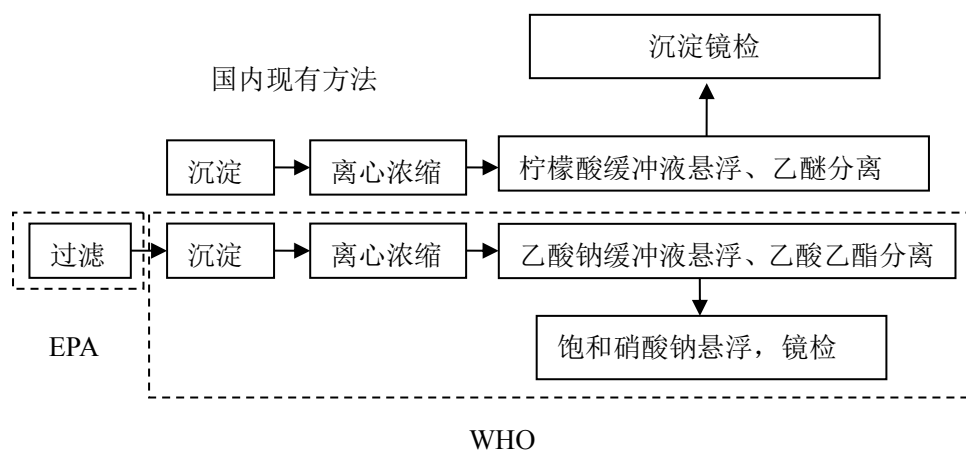


图1 沉淀集卵法技术方法来源

3.3 回收率情况的说明

卫生部门检测的蛔虫卵主要来自于人体的粪便检查，其关注的焦点在于虫卵的检出，从而判定是否感染蛔虫病。由于其检测的目的对检出的蛔虫卵数量未做要求，因此，卫生部门采用的方法以定性为主。

建立蛔虫卵数量的精确测定的方法，主要目的在于评估其数量或浓度是否对环境或其他行业造成潜在的风险。

食品进出口行业商检制定了相关的蛔虫卵检测的行业标准——《泡菜等植物源性食品中寄生虫卵的分离及鉴定规程》（SNT 1908-2007），建立包括洗脱、过滤、离心、漂浮、镜检等程序的虫卵检验标准方法。该标准中并未对回收率有质控要求的规定，但标准起草人吴绍强按照其建立的方法检测，取泡菜样品 200g，在其中掺入 2000 个猪蛔虫(*Ascairs suum*)卵，过滤、沉淀并漂浮后，检测蛔虫卵的数目。蛔虫卵的回收率为 35.4%。食品行业中蛔虫卵检测方法回收率也有其它相关报道，胡风庆等模拟阳性辣白菜样品进行了猪蛔虫卵的回收率实验。建立包括洗脱、过滤、离心、漂浮、镜检等程序的虫卵检验标准方法，泡菜样品中猪蛔虫卵的检出率达 32.6%。

EPA 的方法步骤过多（20 多步），操作繁琐，器皿要求高（需硅烷化）。WHO 的方法简便、对实验场地和器皿要求低，一般基层监测站都能满足，但相对回收率低。有文献报道该方法对各类寄生虫卵的平均回收率在 50%左右。Meritxell 曾组织过该方法对寄生虫回收率实验室间的比对工作，第一轮比对平均回收率为 34%，第二轮平均回收率为 49%。并在结论中指出该方法对人员相对要求较高。

其它环境中存在的寄生虫卵的检测也有着相似的回收率，饮用水监测“两虫”中的贾第鞭毛虫大小为 $9.5-21\mu\text{m}\times 5-15\mu\text{m}\times 2-4\mu\text{m}$ ，包囊大小约 $8-12\mu\text{m}\times 7-10\mu\text{m}$ 。隐孢子虫卵囊呈圆形或椭圆形，直径 $4-6\mu\text{m}$ ，其中《生活饮用水卫生标准》（GB5749-2006）表 3 水质非常规指标与限值 贾第鞭毛虫（个/10L） <1 ，隐孢子虫（个/10L） <1 。该标准对免疫磁分离荧光抗体法的质量控制规定的回收率为 10%-100%。美国 EPA 对两虫的回收率也有相关要求隐孢子虫。

肝吸虫即华支睾吸虫，华支睾吸虫病的传播有赖于粪便中的虫卵有机会下水，而水中存在第一（纹沼螺、赤豆螺，长角涵螺等）、第二中间宿主（淡水鱼、虾类）以及当地人群有

生吃或半生吃淡水鱼虾的习惯。相对其他寄生虫卵，华支睾吸虫体积较大，虫卵大小为 130-150 μm ×62-90 μm ，有研究使用低速离心反向收集肝片形吸虫虫卵，回收率在 85%左右。

寄生虫卵的回收率都不高，即使采用昂贵的仪器设备、先进的实验方法通常也只能接近理化类物质的回收率下限。

由于生物体的独特的生理构造和特性，其回收率不可能超过 100%（理化类回收率可以在 80%-120%之间），这也缩小了生物类样品的回收率范围。

寄生虫卵的大小远大于一般的化学物质分子，在自然界是离散状态存在的，在水体中的存在也是不均匀的，本身取样时就很难保证同等体积能够取到一致数量的样品，虽可以用多次采样并混合的方法弥补不足，但也无法在均匀度和化学溶液相比。

寄生虫卵回收率低（相对化学物质）是一个普遍现象，这是由生物体自身性质决定的。在实验方法的选择上，化学物质可以通过物质间的转化，将难检测的物质转化为容易检测的，如显色等手段。由于生物体的特殊性，通常在检测时不能破坏其结构组成或需保留生物活性，这些要求限制了检测方法的选择。一些新发展起来的生化方法及分子生物学方法目前已被应用于寄生虫卵的检测当中，但相关研究还较少，用于实际工作的应用方法也较少。

4 标准制订的基本原则和技术路线

4.1 标准制订的基本原则

本标准依据《国家环境保护标准制订工作管理办法》和《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2010）的要求，以国内外标准文献为基础而编制。

- （1）方法的检出限和测定范围满足相关环保标准和环保工作的要求；
- （2）方法准确可靠，满足各项方法特性指标的要求；
- （3）方法具有普遍适用性，易于推广使用。

4.2 标准制订的技术路线

蛔虫卵是水中畜禽及人粪便病原体污染的重要监测指标，但目前我国还缺少相应标准检测方法，本标准制订拟以《农田灌溉水质标准》（GB5084-2005）中引用《农业环境监测实用手册》中的“水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法”为基础，借鉴 WHO 方法中缓冲液和分离试剂的使用及 EPA 方法中的过滤步骤，以提高方法的安全性及效率。

“水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法”使用实验室基本设备及常规试剂，适合于广大基层单位特别是农村基层单位使用，对有关水污染物环境管理标准有较好的实际支持作用，具有广泛的应用前景。

本标准制定的技术路线，见图 2。

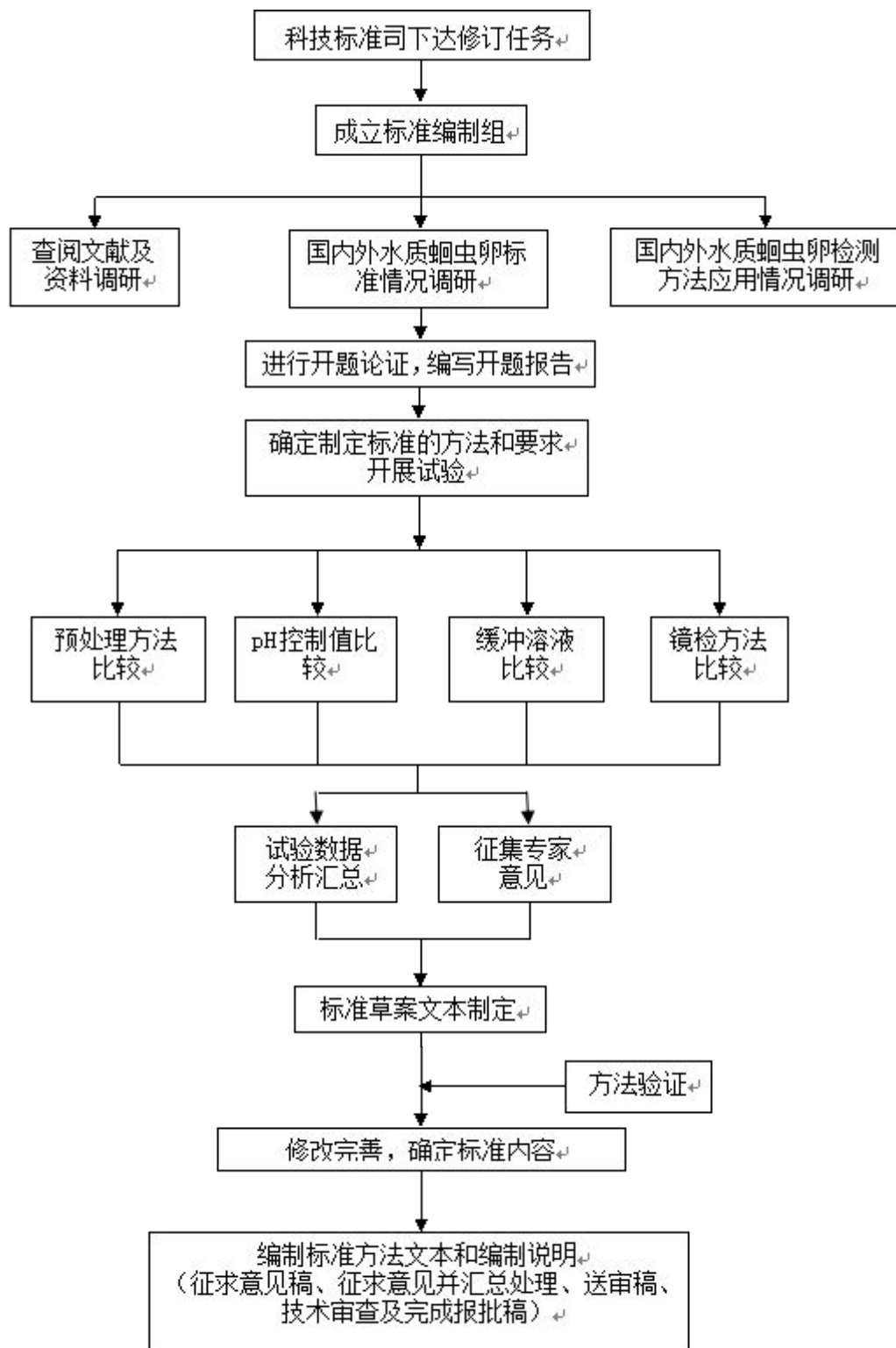


图2 沉淀集卵法标准编制的技术路线图

5 方法研究报告

5.1 方法研究的目标

本标准适用于地表水和废水中蛔虫卵的测定。

本方法的检出限为 0.43 个/L。

5.2 方法原理

通过过滤，去除较大杂质。利用蛔虫卵比重大于水，易于沉淀的特性。加入乙酸-乙酸钠缓冲液控制溶液 pH 值获得最佳亲水-亲脂平衡，乙酸乙酯吸收水中的脂肪类杂质，使蛔虫卵更易下沉。蛔虫卵在以上试剂及表面活性剂吐温 80 的作用下通过离心沉淀与水中的杂质分离，达到集卵的目的。最后将收集的虫卵通过饱和硝酸钠溶液漂浮后镜检，测定其数量。

5.3 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准分析纯化学试剂和蒸馏水（或去离子水）。

5.3.1 乙酸乙酯（ $C_4H_8O_2$ ），化学纯。

5.3.2 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH=4.5)。

将 15g 三水合乙酸钠（ $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ ），溶于适量的蒸馏水或去离子水中，添加去离子水或蒸馏水至 800ml 左右，加入 3.6ml 乙酸（ CH_3COOH ），调节 pH 值至 4.5，最后加蒸馏水或去离子水定容至 1000mL，**此溶液保质期为 30d。**

5.3.3 吐温 80 溶液： $\varphi(C_{24}H_{44}O_6) = 1\%$ 。

1ml 吐温 80（Tween 80），溶于适量的蒸馏水或去离子水中，稀释至 1000mL，现配。

5.3.4 饱和硝酸钠（ $NaNO_3$ ）溶液。

称取略多于室温下溶解度的硝酸钠（ $NaNO_3$ ）溶于 100g 蒸馏水或去离子水中，充分溶解后过滤，滤去残渣，**现配。**

硝酸钠水中溶解度

温度（℃）	溶解度（g）
0	73
10	80
20	87
30	95
40	103

5.4 仪器与设备

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准 A 级玻璃量器。

5.4.1 冰箱：0-4℃。

5.4.2 筛网：60 目。

5.4.3 不锈钢开口直壁容器：10L。

5.4.4 开口直壁量筒：1000ml。

5.4.5 螺口尖底离心管：50ml。

5.4.6 离心机：带 50ml 螺口尖底离心管，离心力 1000g 以上。

5.4.7 一次性巴士滴管：3ml。

5.4.8 漩涡混匀器。

5.4.9 显微镜：物镜 4×、10×倍，目镜 10×倍。

5.4.10 定量计数框：1ml（网格）、5ml（S 型）定量计数框。

5.5 样品

5.5.1 采集和保存

按《HJ/T91 地表水和污水监测技术规范》的一般要求，采集总量不小于 10L 的水样，带回实验室。水样若不能立即进行检验，应置于冰箱中在 0-4℃ 下保存，保存时间不超过 48h。

5.6 分析步骤

5.6.1 水样充分摇匀后，倒入不锈钢开口直壁容器内至 10L 刻度，进行水样沉淀。如水样中含有草梗、纸渣等较大杂质，则应先将水样用 60 目筛网过滤，并用吐温 80 溶液清洗筛网及杂质并将洗液并入 10L 沉淀的水样中。

5.6.2 水样过夜沉淀后，用虹吸管小心吸取上清液，弃去，留 1L 水样，避免水样的扰动。残留的沉淀及水样转置于 1000ml 量筒内进行第二次沉淀。用吐温 80 溶液彻底清洗容器，并将洗液并入量筒内。过夜沉淀后，同上步，用虹吸管吸取并弃去上清液，留 90-100ml 水样，避免水样的扰动。根据体积，沉淀、水样及吐温 80 洗液小心转移至多个离心管，以 1000g 的离心力离心 15min。离心力计算公式如下：

$$RCF = r(rpm)^2 / k$$

RCF——相对离心力(g)

r ——离心机半径（离心管中心至离心机轴的距离）(cm)

rpm ——离心机转速(转/分)

k ——89456

离心力转换为转速公式如下：

$$rpm = \sqrt{(kRCF/r)}$$

5.6.3 弃去上清液。将多个离心中的所有沉淀转移至一个离心管中，用吐温 80 溶液彻底清洗离心管且并入洗液，以确保没有沉淀被丢弃，以 1000g 的离心力离心 15min。

5.6.4 弃去上清液。用等体积的 pH=4.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液对沉淀进行再悬浮（即：如沉淀体积为 2ml，加 2ml 缓冲液）。如果沉淀体积不足 2ml，加缓冲液至 4ml，以确保在用乙酸乙酯浸提之后，沉淀上方有足够体积的缓冲液，避免倒出乙酸乙酯层时蛔虫卵沉淀层的丢失。

5.6.5 加入两倍体积的乙酸乙酯（在上面的例子中即 4ml），用涡旋混匀器完全混合溶液。

5.6.6 以 1000g 的离心力离心 15min。样品将被分为清晰的三层。所有的非脂肪物质、重碎片，包括蛔虫卵、幼虫和原生动物的在底层。中间是缓冲液层，脂肪和其他脂溶性物质因乙酸乙酯，在上方形成黑而厚的一层。

5.6.7 记下含卵的下层沉淀体积，将沉淀上方的液体平稳地倒出。如有必要，可用细针在离心管壁四周对上层的脂肪层进行松动。

5.6.8 用 5 倍体积的饱和硝酸钠溶液（即：如沉淀体积为 1ml，加 5ml 饱和 NaNO_3 溶液）对沉淀进行再悬浮。

5.6.9 将悬浮液加入定量计数框，在显微镜下计数，直至镜检完全悬浮液。镜检时：需保持环境的稳定，无震动和风扰；人员在使用显微镜观察时，应尽量保持计数框的缓移；

计数时，应自上而下“U”型逐列计数。

注 1：若水样中蛔虫卵浓度在 10 倍检出限以上 (>4.3 个/L)，可不进行 10L 水样的沉淀，直接取 1L 水样进行 7.2 节的沉淀浓缩。

5.7 蛔虫卵的形态特征

5.12.1 受精蛔虫卵

虫卵呈短椭圆形，大小为 $45\sim 75\mu\text{m}\times 35\sim 50\mu\text{m}$ ，卵壳很厚，通常表面有一层波浪式的蛋白质膜，从粪便排出的虫卵常被胆汁染成黄色或棕褐色，内含有一个未分裂的受精卵细胞，与卵壳之间形成半月形间隙。

5.12.2 未受精蛔虫卵

虫卵呈长椭圆形或不规则形，大小为 $88\sim 94\mu\text{m}\times 39\sim 44\mu\text{m}$ ，卵壳较薄，淡黄色，内含有许多大小不一的屈光颗粒。

5.12.3 感染期虫卵

卵内含有一条卷曲的幼虫。

自人体排出的蛔虫卵，有受精卵和未受精卵两种。受精蛔虫卵呈宽卵圆形，大小约为 $45\sim 75\mu\text{m}\times 35\sim 50\mu\text{m}$ ，卵壳自外向内分为三层：受精膜、壳质层和蛔甑层。壳质层较厚，另两层极薄，在普通显微镜下难以分清。卵壳内有一个大而圆的细胞，与卵壳间常见有新月形空隙。卵壳外有一层由虫体子宫分泌形成的蛋白质膜，表面凹凸不平，在肠道内被胆汁染成棕黄色。未受精蛔虫卵多呈长椭圆形，大小约为 $88\sim 94\mu\text{m}\times 39\sim 44\mu\text{m}$ ，壳质层与蛋白质膜均较受精蛔虫卵薄，无蛔甑层，卵壳内含许多大小不等的折光性颗粒。若蛔虫卵的蛋白质膜脱落，卵壳则呈无色透明，应注意与其他线虫卵的鉴别。

5.8 蛔虫卵参考图片

5.8.1 蛔虫卵模式图

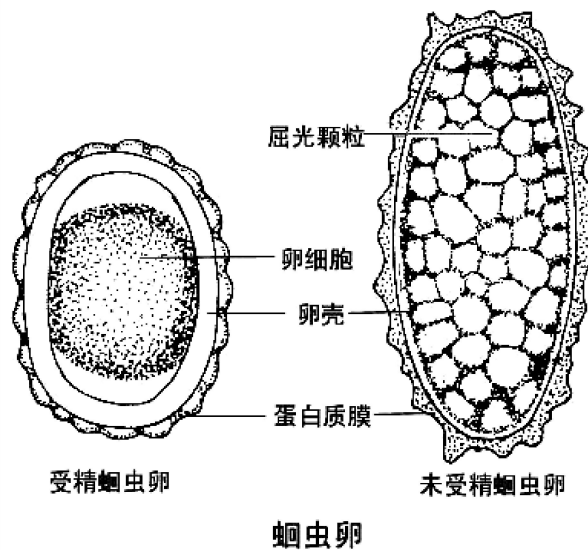
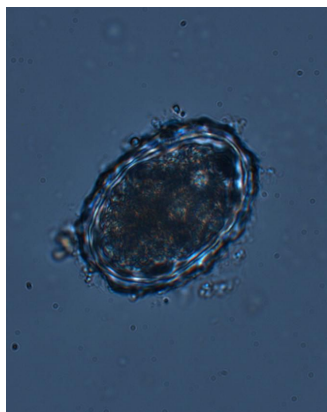
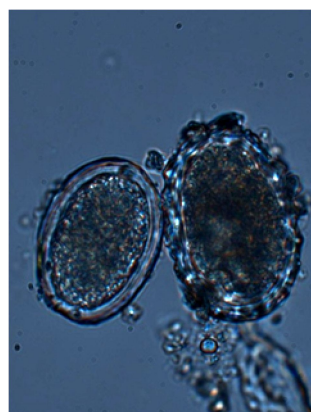


图 3 蛔虫卵模式图

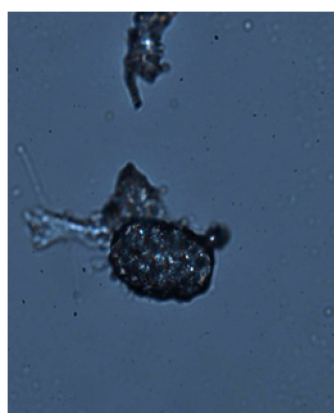
5.8.2 发育各阶段的蛔虫卵



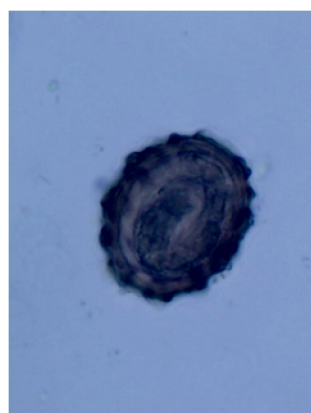
受精蛔虫卵



脱去蛋白质膜的受精蛔虫卵（左）



未受精蛔虫卵



感染期蛔虫卵

5.9 蛔虫卵参考样本的制备

猪蛔虫(*Ascaris suum*)活成虫采集自屠宰场，用蒸馏水洗涤干净后，放置于含 4%甲醛溶液内，0-4 °C 保存备用，可长期保存。

制备蛔虫卵备用液时，选取 2-3 条蛔虫，用 75%乙醇消毒过的解剖刀，划开虫体，取出肠道，每条蛔虫选取一小段靠近阴门的子宫(2-3mm)，解剖后取出内容物。将含组织的蛔虫卵悬浮于含有玻璃珠的 100ml 生理盐水中，涡旋混匀器振荡 3-5min，用 260 目网过筛，此时蛔虫卵呈单个状态存在。滤液加入甲醛至终浓度为 4%，0-4 °C 保存备用，可保存 1 个月。即制即用时可不添加甲醛。

制备加标样品时，摇匀蛔虫卵备用液，用 1000ul 微量移液器，立即吸取适量的蛔虫卵备用液于 1ml 定量计数框（网格）中，计数后用 250ul 微量移液器向计数框中添加或移出蛔虫卵至所需数量。然后，将计数框中所有的液体用吐温 80 溶液冲洗入需要加标的样品中。最后，显微镜下检测计数框，确保无蛔虫卵残留。

5.10 精密度与准确度

5.10.1 精密度的测定

6 家验证单位对沉淀集卵法的精密度进行验证，6 家实验室对 3 种浓度的自制参考样品（水样体积为 10L）以及 1 种浓度的实际水样（水样体积为 1L）进行测定，平行测定 6 次。

结果见表 3。6 家实验室分别为：（1）上海市环境监测中心，（2）江苏省环境监测中心，（3）浙江省环境监测中心，（4）苏州市环境监测中心，（5）泰州市环境监测中心站，（6）徐州市环境监测中心站。

表 3 蛔虫卵精密度测试数据汇总表 （单位：个/L）

实验 室号	低浓度（2 个/L）			中浓度（4 个/L）			高浓度（8 个/L）			实际样品		
	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
1	0.73	0.14	18.94	1.58	0.38	23.77	3.52	0.61	17.38	84.5	5.82	6.89
2	0.64	0.10	15.18	1.60	0.22	13.69	3.42	0.32	9.33	82.5	9.14	11.08
3	0.7	0.08	11.66	1.52	0.19	12.80	3.52	0.39	11.00	87.83	6.11	6.96
4	0.63	0.14	21.96	1.45	0.21	14.30	3.23	0.31	9.52	81.67	5.28	6.46
5	0.67	0.08	11.25	1.42	0.29	20.17	3.25	0.29	8.86	74	13.97	18.88
6	0.69	0.07	10.06	1.47	0.25	17.07	3.13	0.37	11.71	85.5	8.78	10.27
$\bar{\bar{x}}_i$	0.68			1.51			3.34			82.67		
S'	0.04			0.07			0.16			4.78		
RSD'	5.45			4.93			4.83			5.78		
r	0.29			0.74			1.11			24.38		
R	0.29			0.70			1.11			25.97		

5.10.2 准确度的测定

6 家验证单位对沉淀法的准确度进行验证，使用自制参考样品（水样体积为 10L）进行测定，平行测定 6 次。结果见表 4。

表 4： 蛔虫卵参考样品测试数据汇总表 （单位：个/L）

实验室号	标准样品（8 个/L）	
	\bar{x}_i	RE _i %
1	3.52	-56.04
2	3.42	-57.29
3	3.52	-56.04
4	3.23	-59.58
5	3.25	-59.38
6	3.13	-60.83
RE%	-58.19	
S _{RE}	2.02	

5.10.3 实验室内各类水样的验证结果

本研究采用的方法与国内原有方法基本一致，在样品前处理、缓冲液-脂类萃取液选取及镜检方法上依据 WHO 方法进行了改进，其精密度、准确度不低于原方法。

（1）参考样品

选取 3 种不同浓度的自制参考样品进行蛔虫卵的测定，结果见表 5：

表 5 参考样品测试数据汇总表 (单位：个/L)

参考样品	测定值							\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6				
低浓度 (2 个/L)	0.6	0.7	0.8	0.7	0.6	0.6	0.67	0.08	11.26	
中浓度 (4 个/L)	1.5	1.6	1.4	1.7	1.4	1.8	1.57	0.16	10.42	
高浓度 (8 个/L)	3.8	3.2	4.3	3.5	3.4	2.8	3.50	0.51	14.68	

(2) 畜禽废水

选取 6 家有代表性的畜禽养殖场，收集水井中的畜禽废水进行蛔虫卵的测定，结果见表 6。

表 6 畜牧业废水测试数据汇总表 (单位：个/L)

畜牧企业	测定值							\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6				
1	12	12	10	11	12	10	11.17	0.98	8.80	
2	11	13	10	9	9	15	11.17	2.40	21.50	
3	14	12	10	15	11	10	12.0	2.10	17.48	
4	13	12	11	13	10	12	11.83	1.16	9.88	
5	9	9	13	7	11	12	10.17	2.23	21.92	
6	10	13	9	11	10	14	11.17	1.94	17.38	

(3) 城镇污水处理厂进、出水

对 5 家以生活污水为主要进水来源的城镇污水处理厂的进水进行了蛔虫卵测定，结果见表 7：

表 7 城镇污水处理厂进水测试数据汇总表 (单位：个/L)

污水厂名	测定值							\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6				
清潭	35	27	33	28	41	40	34	5.87	17.25	
城北	38	48	58	55	60	49	51.33	8.09	15.76	
戚墅堰	15	12	14	17	9	11	13	2.90	22.29	
城区	90	82	79	95	111	103	93.33	12.27	13.15	
武南	15	17	10	8	12	18	13.33	3.98	29.87	

并对 5 家以生活污水为主要进水来源的城镇污水处理厂的出水进行了蛔虫卵测定, 结果见表 8:

表 8 城镇污水处理厂出水测试数据汇总表 (单位: 个/L)

污水厂名	测定值						\bar{X}_i	S_i	RSD _i (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆			
清潭	0	0	0	0	0	0	0	0	/
城北	1	0	0	0	0	0	0.17	0.41	223.6
戚墅堰	0	0	0	0	0	0	0	0	/
城区	0	0	0	0	0	0	0	0	/
武南	0	0	0	0	0	0	0	0	/

(4) 地表水

表 9 地表水测试数据汇总表 (单位: 个/L)

地表水 点位	测定值						\bar{X}_i	S_i	RSD _i (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆			
魏村自来水厂长江取水口	0	0	0	0	0	0	0	0	/
漏湖	0	0	0	0	0	0	0	0	/
茅山水库	0	0	0	0	0	0	0	0	/
京杭运河	0	0	0	0	0	0	0	0	/
北市河	0	0	0	0	0	0	0	0	/

5.11 结果计算与表示

检测到的蛔虫卵全部计数。

蛔虫卵浓度=检测到的所有蛔虫卵数(个)/实验水样体积(L)

结果的单位为个/L。

5.12 质量保证和质量控制

每批样品做全程序空白样测定并取 10%的样品进行平行样测定。全程序空白样不得检出蛔虫卵, 平行样间的相对偏差不得超过 30%。

5.13 废物处理

实验用过的器具均需进行高温灭活, 置于水中煮沸 10min 后方可再次使用。

实验的虹吸液煮沸 10min 后可按普通废弃物处理, 实验的含乙酸乙酯的废弃液需倒入专门的废弃液回收桶中统一回收。

6 方法验证

6.1 方法验证方案

6.1.1 参与方法验证的实验室、验证人员的基本情况

共有 6 家单位参加了方法验证工作，验证单位及参与验证人员相关信息见表 9。

表 9 方法验证单位及验证人员相关信息

姓名	职称	从事工作年限（年）	单位名称
汤琳	高级工程师	11	上海市环境监测中心
李备军	高级工程师	22	上海市环境监测中心
厉以强	教授级高工	18	江苏省环境监测中心
李娣	工程师	5	江苏省环境监测中心
李勇	工程师	8	徐州市环境监测中心站
李朝	工程师	2	徐州市环境监测中心站
何苏青	工程师	8	苏州市环境监测中心
李继影	工程师	6	苏州市环境监测中心
张宗祥	高级工程师	14	泰州市环境监测中心站
朱宇芳	工程师	16	泰州市环境监测中心站
江启明	助理工程师	1	泰州市环境监测中心站
孙海涛	助理工程师	1	泰州市环境监测中心站
顾卿	工程师	5	浙江省环境监测中心
徐杭英	工程师	5	浙江省环境监测中心

6.1.2 方法验证方案

按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ168-2010）的规定，组织 6 家以上有资质的实验室进行验证。验证工作主要内容是方法精密度、准确度的验证试验。

精密度的验证：标准编制组将 3 种不同浓度的参考样品（低浓度 2 个/L、中浓度 4 个/L、高浓度 8 个/L，水样体积为 1L）以及 1 种实际样品（水样体积为 1L）分配到各验证实验室，各验证实验室分别按本研究制定的检测方法进行蛔虫卵的检测。每个样品平行测定 6 次。分别计算样品的平均值、标准偏差、相对标准偏差。

准确度的验证：标准编制组将 8 个/L 高浓度蛔虫卵参考样品（水样体积为 10L）分配到各验证实验室，各验证实验室进行总蛔虫卵的检测，每个样品平行测定 6 次，分别计算样品的平均值、标准偏差、相对误差。

6.2 方法验证过程

(1) 首先，通过筛选确定有资质和相关能力的方法验证单位，准备验证样品等，确定验证时间。在方法验证前，要通过各种交流形式让参加验证的操作人员都熟悉方法原理、操作步骤及流程。验证过程中使用的仪器、设备、试剂等应符合方法的要求。

(2) 《方法验证报告》见附一。

7. 参考文献

- [1] 世界卫生组织(WHO). 《Analysis of Wastewater for Use in Agriculture - A Laboratory Manual of Parasitological and Bacteriological Techniques》[M].1996
- [2] Published by EPA. Environmental Regulations and Technology, Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge[S].2003.
- [3] Malicki J A. Montusiewicz, and A. Bieganowski. 2001. Improvement of counting helminth eggs with internal standard. Water Res. 35:2333-2335.
- [4] Meritxell M A.2010. Results of the Proficiency Testing of Detection, Identification and Quantification of Parasitic Helminth Eggs in the Years 2010.
- [5] 许建邦, 邝桂星, 林育华. DiaSys FE-2粪便分析工作站的临床应用. 医学研究通讯, 2004. 33(1):60-62.
- [6] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 《农田灌溉水质标准》(GB5084-2005) [S].2005.
- [7] 国家技术监督局, 国家环境保护局. 《农田灌溉水质标准》(GB5084-92) [S].1992.
- [8] 郑思民, 王云方. 《卫生防疫检验-寄生虫检验》[M].上海科学技术出版社.1980
- [9] 郑思民, 王云方. 《卫生防疫检验-寄生虫检验》[M].上海科学技术出版社.1964
- [10] 李士英, 薛金荣. 污水处理去除蛔虫卵效果的评价[J]. 卫生研究, 1987, 16(2).
- [11] 李影林. 中华医学检验全书[M]. 第1版. 北京:人民卫生出版社, 1996.
- [12] 全国人体重要寄生虫病现状调查办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23 (增刊) :332-334.
- [13] 孔繁瑶 主编. 家畜寄生虫学(第二版)[M].北京:中国农业大学出版社, 1997.
- [14] 詹希美 主编. 人体寄生虫学(第五版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001.
- [15] 国家环境保护总局, 国家质量监督检验检疫总局. 《畜禽养殖业污染物排放标准》(GB18596-2001) [S].2001.
- [16] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 《城市污水再生利用农田灌溉用水水质》(GB 20922-2007) [S].2007.
- [17] 国家环境保护总局. 《食品农产品产地环境质量评价标准》(HJ332-2006) [S].2006.
- [18] 国家质量监督检验检疫总局. 《泡菜等植物源性食品中寄生虫卵的分离及鉴定规程》(SNT 1908-2007) [S].2007.
- [19] Dwight D. Bowman*, M. Dale Little, Robert S. Reimers, Precision and accuracy of an assay for detecting Ascaris eggs in various biosolid matrices[J]. Water Research, 2003, 37:2063-2072.
- [20] 黎黎, 陶甲芬等. 用ELISA检测蛔虫感染的血清特异性抗体[J]. 广西预防医学, 1996, 2(3):170-171.
- [18] 吴绍强, 林祥梅, 葛建军. 泡菜等产品中寄生虫卵的检验方法研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(10):173-177.
- [21] 胡风庆, 赵小慧, 王旭. 出口辣白菜中蛔虫卵检出新方法. 辽宁大学学报(自然科学版). 2011, 3.

附一 方法验证报告

方法验证报告

方法名称：水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法

项目主编单位：常州市环境监测中心

验证单位：上海市环境监测中心、江苏省环境监测中心、浙江省环境监测中心、苏州市环境监测中心、徐州市环境监测中心站、泰州市环境监测中心站

项目负责人及职称：徐东炯 研究员级高级工程师

通讯地址：常州市浦前张家村 149 号 电话：0519-86908336

报告编写人及职称：张小琼 工程师

报告日期：2014 年 10 月 25 日

本方法参加验证的 6 家实验室分别为：（1）上海市环境监测中心，（2）江苏省环境监测中心，（3）浙江省环境监测中心，（4）苏州市环境监测中心，（5）泰州市环境监测中心站，（6）徐州市环境监测中心站。

按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ168-2010）的规定，组织 6 家以上有资质的实验室进行验证。验证工作主要内容是方法精密度、准确度的验证试验。

精密度的验证：标准编制组将 3 种不同浓度的参考样品（低浓度 2 个/L、中浓度 4 个/L、高浓度 8 个/L，水样体积 10L）以及 1 种实际样品（水样体积 1L）分配到各验证实验室，各验证实验室分别进行蛔虫卵的检测。每个样品平行测定 6 次。分别计算样品的平均值、标准偏差、相对标准偏差。

准确度的验证：标准编制组将 8 个/L 高浓度蛔虫卵参考样品（水样体积为 10L）分配到各验证实验室，各验证实验室进行总蛔虫卵的检测，每个样品平行测定 6 次，分别计算样品的平均值、标准偏差、相对误差。

编制组将《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》方法验证的结果进行汇总及统计分析，得出验证报告。

1.原始数据

1.1 实验室基本情况

附表 1 方法验证单位及验证人员相关信息

姓名	职称	从事工作年限（年）	单位名称
汤琳	高级工程师	11	上海市环境监测中心
李备军	高级工程师	22	上海市环境监测中心
厉以强	教授级高工	18	江苏省环境监测中心
李娣	工程师	5	江苏省环境监测中心
李勇	工程师	8	徐州市环境监测中心站
李朝	工程师	2	徐州市环境监测中心站
何苏青	工程师	8	苏州市环境监测中心
李继影	工程师	6	苏州市环境监测中心
张宗祥	高级工程师	14	泰州市环境监测中心站
朱宇芳	工程师	16	泰州市环境监测中心站
江启明	助理工程师	1	泰州市环境监测中心站
孙海涛	助理工程师	1	泰州市环境监测中心站
顾卿	工程师	5	浙江省环境监测中心
徐杭英	工程师	5	浙江省环境监测中心

附表 2 参加验证单位仪器情况登记表

验证实验室	仪器名称	规格型号	性能状况
上海市环境监测中心	离心机	TDL-5A	正常
上海市环境监测中心	恒温水浴锅	HH-S11-6	正常
上海市环境监测中心	显微镜	BH-2	正常
江苏省环境监测中心	离心机	LXJ-IIB	正常
江苏省环境监测中心	恒温水浴锅	HH-S2	正常

江苏省环境监测中心	显微镜	BX50	正常
苏州市环境监测中心站	离心机	Allegra X-12R	正常
苏州市环境监测中心	恒温水浴锅	HHS11-2-II	正常
苏州市环境监测中心	显微镜	BX51	正常
泰州市环境监测中心站	离心机	TDL-5A	正常
泰州市环境监测中心站	恒温水浴锅	601-C	正常
泰州市环境监测中心站	显微镜	XTZ-D	正常
徐州市环境监测中心站	离心机	TDL-5	正常
徐州市环境监测中心站	恒温水浴锅	HHS21-4	正常
徐州市环境监测中心站	显微镜	CX-41	正常
浙江省环境监测中心	冷冻高速离心机	5804R	正常
浙江省环境监测中心	恒温水浴锅	HH-6	正常
浙江省环境监测中心	显微镜	DM2500	正常

附表 3 参加验证单位使用试剂登记表

试剂名称	验证实验室	生产厂商
乙酸乙酯	上海市环境监测中心	上海试剂一厂
	江苏省环境监测中心	上海试剂一厂
	苏州市环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	泰州市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
	徐州市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
	浙江省环境监测中心	上海试剂一厂
硝酸钠	上海市环境监测中心	中国医药（集团）上海化学试剂公司
	江苏省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	苏州市环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	泰州市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
	徐州市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
	浙江省环境监测中心	中国医药（集团）上海化学试剂公司
乙酸	上海市环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	江苏省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	苏州市环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	泰州市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
	徐州市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
	浙江省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
乙酸钠	上海市环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	江苏省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	苏州市环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	泰州市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
	徐州市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
	浙江省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
吐温 80	上海市环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	江苏省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	苏州市环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司
	泰州市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司

徐州市环境监测中心站	国药集团化学试剂有限公司
浙江省环境监测中心	国药集团化学试剂有限公司

1.2 蛔虫卵实验的检出限、测定下限验证数据

附表4 方法检出限、测定下限测试数据汇总表 (单位: 个/L)

实验 室号	测定值								S _i	t 值	检 出 限	测 定 下 限
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	x ₇	\bar{x}_i				
1	0.8	0.9	0.6	0.7	0.8	0.5	0.8	0.73	0.14	3.143	0.43	1.74
2	0.6	0.7	0.7	0.6	0.8	0.5	0.6	0.64	0.10	3.143	0.31	1.23
3	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7	0.8	0.8	0.7	0.08	3.143	0.26	1.03
4	0.8	0.5	0.7	0.6	0.5	0.8	0.5	0.63	0.14	3.143	0.43	1.74
5	0.7	0.8	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.67	0.08	3.143	0.24	0.95
6	0.8	0.7	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7	0.69	0.07	3.143	0.22	0.87

1.3 方法精密度的测试数据

6家验证单位的实际样品及参考样品的精密度数据见附表5-8。

附表5 实际样品精密度测试数据汇总表 (清潭污水处理厂进水口) (单位: 个/L)

实验 室号	测定值							S _i	RSD _i (%)
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	\bar{x}_i		
1	90	89	78	89	77	84	84.5	5.82	6.89
2	73	92	95	80	74	81	82.5	9.14	11.08
3	83	88	92	87	80	97	87.83	6.11	6.96
4	89	85	83	74	78	81	81.67	5.28	6.46
5	79	74	98	91	89	82	85.5	8.78	10.27
6	87	61	72	95	67	62	74	13.97	18.88

附表6 低浓度参考样品 (2个/L) 精密度测试数据汇总表 (单位: 个/L)

实验 室号	测定值								S _i	RSD _i (%)
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	x ₇	\bar{x}_i		
1	0.8	0.9	0.6	0.7	0.8	0.5	0.8	0.73	0.14	18.94
2	0.6	0.7	0.7	0.6	0.8	0.5	0.6	0.64	0.10	15.18
3	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7	0.8	0.8	0.7	0.08	11.66
4	0.8	0.5	0.7	0.6	0.5	0.8	0.5	0.63	0.14	21.96
5	0.7	0.8	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.67	0.08	11.25
6	0.8	0.7	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7	0.69	0.07	10.06

附表7 中浓度参考样品（4个/L）精密度测试数据汇总表（单位：个/L）

实验 室号	测定值						\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆			
1	2.1	1.2	2.0	1.5	1.3	1.4	1.58	0.38	23.77
2	1.5	1.3	1.9	1.6	1.5	1.8	1.60	0.22	13.69
3	1.7	1.2	1.6	1.7	1.5	1.4	1.52	0.19	12.80
4	1.3	1.5	1.2	1.8	1.4	1.5	1.45	0.21	14.30
5	1.4	1.6	1.5	1.0	1.8	1.2	1.42	0.29	20.17
6	1.8	1.3	1.4	1.6	1.6	1.1	1.47	0.25	17.07

附表8 高浓度参考样品（8个/L）精密度测试数据汇总表（单位：个/L）

实验 室号	测定值						\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆			
1	2.9	2.8	4.4	3.4	3.7	3.9	3.52	0.61	17.38
2	3.5	2.9	3.6	3.2	3.5	3.8	3.42	0.32	9.33
3	3.8	3.2	3.6	3.9	2.9	3.7	3.52	0.39	11.00
4	3.7	3.1	2.9	3.5	3.2	3.0	3.23	0.31	9.52
5	3.5	3.4	2.7	3.3	3.2	3.4	3.25	0.29	8.86
6	3.6	3.0	3.4	2.9	2.6	3.3	3.13	0.37	11.71

1.4 方法准确度的测试数据

6家实验室对参考样品的蛔虫卵的测试数据见附表9。

附表9 参考样品（8个/L）测试数据（单位：个/L）

实验 室号	测定值						\bar{x}_i	RE _i %	标准样品 (个/L)
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆			
1	2.9	2.8	4.4	3.4	3.7	3.9	3.52	-56.04	8
2	3.5	2.9	3.6	3.2	3.5	3.8	3.42	-57.29	
3	3.8	3.2	3.6	3.9	2.9	3.7	3.52	-56.04	
4	3.7	3.1	2.9	3.5	3.2	3.0	3.23	-59.58	
5	3.5	3.4	2.7	3.3	3.2	3.4	3.25	-59.38	
6	3.6	3.0	3.4	2.9	2.6	3.3	3.13	-60.83	

2. 方法验证数据汇总

2.1 方法检出限、测定下限数据汇总

附表10是6家实验室方法验证结果中蛔虫卵的检出限、测定下限测试结果的统计分析。

附表 10 蛔虫卵检出限、测定下限测试数据汇总表 (单位: 个/L)

实验室号	检出限	测定下限
1	0.43	1.74
2	0.31	1.23
3	0.26	1.03
4	0.43	1.74
5	0.24	0.95
6	0.22	0.87
最大值	0.43	1.74

2.1 方法精密度数据汇总

附表 11 是 6 家实验室方法验证结果中蛔虫卵的精密度测试结果的统计分析

附表 11 蛔虫卵精密度测试数据汇总表 (单位: 个/L)

实验室号	低浓度 (2 个/L)			中浓度 (4 个/L)			高浓度 (8 个/L)			实际样品		
	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)
1	0.73	0.14	18.94	1.58	0.38	23.77	3.52	0.61	17.38	84.5	5.82	6.89
2	0.64	0.10	15.18	1.60	0.22	13.69	3.42	0.32	9.33	82.5	9.14	11.08
3	0.7	0.08	11.66	1.52	0.19	12.80	3.52	0.39	11.00	87.83	6.11	6.96
4	0.63	0.14	21.96	1.45	0.21	14.30	3.23	0.31	9.52	81.67	5.28	6.46
5	0.67	0.08	11.25	1.42	0.29	20.17	3.25	0.29	8.86	74	13.97	18.88
6	0.69	0.07	10.06	1.47	0.25	17.07	3.13	0.37	11.71	85.5	8.78	10.27
$\bar{\bar{x}}_i$	0.68			1.51			3.34			82.67		
S'	0.04			0.07			0.16			4.78		
RSD'	5.45			4.93			4.83			5.78		
r	0.29			0.74			1.11			24.38		
R	0.29			0.70			1.11			25.97		

2.2 方法准确度数据汇总

附表 12 是 6 家实验室方法验证中蛔虫卵的准确度测试结果的统计分析。

附表 12 蛔虫卵参考样品测试数据汇总表 (单位: 个/L)

实验室号	标准样品 (8 个/L)	
	x_i	RE _i %
1	3.52	-56.04
2	3.42	-57.29
3	3.52	-56.04
4	3.23	-59.58
5	3.25	-59.38
6	3.13	-60.83
RE%	-58.19	
S _{RE}	2.02	

3. 方法验证结论

3.1 检出限、测定下限

取 6 家方法验证实验室检出限及测定下限的最大值为该标准方法的检出限及测定下限。

检出限为 0.43 个/L，测定下限为 1.74 个/L。

3.2 精密度

6 家实验室分别对实际样品、低浓度（2 个/L）、中浓度(4 个/L)、高浓度(8 个/L)自制参考样品的蛔虫卵的进行了测定，实验室内的相对标准偏差范围分别为：6.46%~18.88%，10.06%~21.96%，12.79%~23.77%，8.86%~17.38%；实验室间的相对标准偏差分别为 5.78%、5.45%、4.93%、4.83%；重复性限为 24.38、0.29、0.74、1.11；再现性限为 25.97、0.29、0.70、1.11。

3.3 准确度

6 家实验室对蛔虫卵参考样品(8 个/L)进行测定，实验室内相对误差的范围是-56.04%~-60.83%，相对误差的最终值为-58.19%±4.04%。