

# NordVal 食品微生物定性分析方法的验证程序

钱志娟<sup>1</sup>, 薛峰<sup>2</sup>, 蒋原<sup>2\*</sup>

(1. 扬州出入境检验检疫局, 扬州 225000; 2. 江苏出入境检验检疫局, 南京 210001)

**摘要: 目的** 为了在微生物研究过程乃至日常检测工作中, 将国际标准的要求融入到每个检测过程中, 根据 NordVal 对申请为标准的微生物学定性分析方法的验证程序进行了整理和总结。**方法** 定性方法验证包括两个方面: 比较研究和协同研究。方法验证负责人应首先根据要求制定方法确认的技术方案, 先进行试验内比较研究实验, 然后, 由协作实验室用相同的样品进行实验室间协同实验。采用待确认的方法与基准方法进行比较研究的方式, 对方法的性能指标进行确认。**结果** 定性分析方法验证程序的性能指标主要包括: 灵敏度、特异性、相对精度、相对检测水平、方法的一致性。待确认方法与基准方法比较时, 定性方法应达到以下性能指标: 灵敏度 95%; 特异性 95%; 替代方法的检测限应与基准方法的检测限一致; 方法的一致性值>0.8。**结论** 本文将为标准方法的制修订、实验室方法的确认提供规范的依据。

**关键词:** NordVal; 微生物; 定性方法; 方法比较研究; 协同研究

## Confirmation process of NordVal microbial qualitative analysis method

QIAN Zhi-Juan<sup>1</sup>, XUE Feng<sup>2</sup>, JIANG Yuan<sup>2\*</sup>

(1. Yangzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yangzhou 225000, China; 2. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

**ABSTRACT: Objective** In order to apply the international standards to each detection process in microbiological research process and daily inspection work, the NordVal analysis method to apply for the standard microbiology qualitative validation procedures were collated and summarized. **Methods** The qualitative method validation of NordVal included two aspects: the comparative study and collaborative study. The technical scheme of the method validation responsible person should first make the method validation, test in comparative experiments, then, by collaborating laboratories with the same samples for laboratory collaborative experiment. The performance index of the confirmation method were confirmed by the comparison of the method to be confirmed and the baseline methodology. **Results** The performance index about validation of qualitative method included: procedures sensitivity, specificity, accuracy, the relative level of detection and the relative consistency of the method. Compared to the confirmation method and the reference method, qualitative method met the following performance metrics: the rate of sensitivity and specificity was more than 95%. The detection of alternative method detection limits should be consistent with the reference method for the limit and the value of consistency should be more than 0.8.

基金项目: 国家十二科技支撑计划(2012BAK17B10)、国家自然科学基金(31301460)、国家质检总局项目(2013IK197)

**Fund:** Supported by National Science and Technology Support Plan (2012BAK17B10), the National Natural Science Foundation of China (31301460) and the Project of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of P.R. China(2013IK197)

\*通讯作者: 蒋原, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: jiangy@yeah.net

\*Corresponding author: JIANG Yuan, Professor, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.99, Zhonghua Road, Nanjing 210001, China. E-mail: jiangy@yeah.net

**Conclusion** This paper will provide a standardized basis for the formulation and revision of standard methods and the confirmation of laboratory method.

**KEY WORDS:** NordVal; microbiology; qualitative method; method comparison; collaborative study

## 1 引言

微生物污染是影响食品安全各要素中涉及面广、影响大、问题多及危害大的一类污染,准确、可靠的检验结果是正确评价食品安全性的先决条件<sup>[1]</sup>。定性方法是在一定量的样品中分析目标物存在与否的分析方法。微生物定性试验,手工操作较多,并有主观地分析和解释,各个环节都可导致错误。近年来,随着新技术不断出现,食品微生物学检验方法及标准的研究十分活跃,并正逐步走向实际应用和标准化。然而在检验标准方法制修订过程中,由于我国无相关技术规范,方法确认的性能指标不明确,导致确认方案设计缺少科学性,食品种类覆盖面不够,关键性能指标、室内和室间确认试验数据量不完善等问题<sup>[6]</sup>。因此,开展食品微生物检验定性方法确认技术规范的研究和制定工作,将为标准方法的制修订、实验室方法的确认提供规范的依据。本文主要对 NordVal 微生物定性分析方法的确认程序进行了总结与整理。

## 2 方法比较和协同研究

方法的比较研究和协同研究是申请 NordVal 官方的微生物学定性方法必须提交的。方法的比较研究的目的是通过使用各种不同种类和类型的食品来证实待确认方法的适用性。协同研究的目的在于确定不同实验室使用相同的样品进行检测所得到结果的差异,从而对方法的性能指标作出实际的估计,特别是当该方法在实际应用过程中出现预期的系统及随机误差时。以定义提交的方法的适用性说明,要求适用性说明紧随在方法名称之后,微生物方法的适用性说明一般包括目标菌和所涵盖的食品种类<sup>[2]</sup>。

### 2.1 采用的基准方法和分析对象

基准方法为国际、国家、行业或组织认可并被广泛接受的方法,如北欧食品分析委员会(NMKL)<sup>[14,15]</sup>、国际标准化组织(ISO)<sup>[6]</sup>、美国食品药品监督管理局(FDA)<sup>[9]</sup>、国际分析家协会(AOAC)<sup>[10,11]</sup>及加

拿大卫生署(Health Canada)<sup>[12]</sup>等国际方法,其他国际认可的方法也可以作为基准方法<sup>[3,9]</sup>。NordVal 食品微生物定性方法验证程序提出的分析对象主要为食品、水、动物粪便、饲料、生产车间和设备以及环境等<sup>[4]</sup>。

### 2.2 方法确认基本原则

定性方法验证包括两个方面:比较研究和协同研究。方法验证负责人应首先根据要求制定方法确认的技术方案,先进行试验内比较研究实验,然后,由协作实验室用相同的样品进行实验室间协同实验。可采用待确认的方法与基准方法进行比较研究的方式,对方法的性能指标进行确认<sup>[4]</sup>。

### 2.3 食品种类和类型

方法验证至少需要从 NordVal 基质列表中选择 5 种相关的食品基质。所选择的食品基质应具有代表性,可以从 NV-DOC:F 系统上所列的几个子基质样品中采集。所选择的样品基质如是饲料的话,应包括肉类、骨粉、鱼粉;粪便基质应包括家禽,猪和牛的粪便。沙门氏菌必须从这些基质中提取 2 种不同种的菌株<sup>[5]</sup>。

尽可能的使用自然污染的样品。然而在北欧,很少能够得到足够数量的样本用于验证,因此允许使用人工污染的样品。人工污染后的样品应小心处理,保存在合适的条件下,使微生物在分析前保持稳定<sup>[5]</sup>。

### 2.4 接种水平及检测数量

一般原则,每一种食品分成两份,每份接种三个水平。三种接种水平分别为:0=阴性对照;1 CFU/25 g~10 CFU/25 g;10 CFU/25 g~100 CFU/25 g。

每种类型至少分析 60 个样品,用基准方法得到约 30 种阳性和 30 种阴性结果。每个样品进行一次基准方法分析和一次待验证方法分析。

一般情况下,尽可能使用相同的样品。每个自然污染的食品类型至少需要 2 批。应努力获得自然污染样品,这些产品最大程度地代表了方法使用的真实环境。对于这些自然污染样品,没有阴性对照。要分析由每批自然污染制品而成的样品,如果所有样品都是阳性,可将样品稀释以获得部分阳性,并重复分析该批样品<sup>[8]</sup>。

## 2.5 竞争菌群

竞争菌群的存在使微生物检验更符合实际和更具挑战性。加入竞争菌群可使样品最接近自然状态, 其足以证实某类食品中目标微生物的部分回收率<sup>[3]</sup>。竞争菌群的污染水平应比目标微生物至少高一个对数级。

## 3 方法的比较研究

定性验证方法的性能指标主要有: 选择性(灵敏度/特异性)、相对精度和相对检测水平<sup>[13]</sup>。

### 3.1 选择性

选择性是对灵敏度和特异性的衡量。灵敏度是待确认方法从众多菌中检测到目标菌的能力; 特异性是待确认方法对可能引起交叉反应的相关非目标菌株的抗干扰能力。灵敏度和特异性的数据可以用来证实某个方法能够检测目标菌的主要血清型而对相关的不同属和/或种不反应。

灵敏度: 至少选择 50 株纯培养的目标微生物菌株, 对试验菌株的生长培养基中接种比检测水平大 10 到 100 倍的水平。灵敏度以 SE 表示, 相对灵敏度 SE 95%, 表明待确认方法能满足定性微生物方法的确认要求。

特异性: 从对目标菌种产生干扰的已知菌株和食品基质中自然存在的菌株的纯培养物中选择 30 种竞争菌株来分析。特异性以 SP 表示, 相对特异性 95%, 表明待确认方法能满足定性微生物方法的确认要求。

### 3.2 相对精度

相对精度是指同一种样品用替代方法和基准方法所得结果的一致性程度。

如果替代方法给出的是阳性结果而参考方法是阴性结果, 这说明替代方法存在阳性偏差。阳性偏差结果必须得到验证。阳性偏差(PD)成为一个假阳性(FP)的结果时, 其结果是无效的。阳性偏差为真阳性(TP)的结果时, 其结果是可行的。

如果替代方法给出了阴性结果时, 基准方法给出了一个阳性结果, 就说明替代的方法存在阴性偏差。阴性偏差变为假阴性(FN)时的结果才是可行的。

### 3.3 相对检测水平

替代方法的检测水平应跟基准方法的检测水平一样低。

至于检测限的测定, 推荐使用 LOD<sub>50</sub>, 不管是正的或负的 50%的重复性水平, 均可作为定性方法独立的性能参数。使用 Spearman-Kärber 方法计算 LOD<sub>50</sub>。

$$\text{LOD}_{50} = e^m$$

$$m = \sum_{i=1}^{k-1} (p(i) + (p(i+1) - p(i)) \frac{(x(i) + x(i+1))}{2})$$

K=水平数

P(i)=在某一水平 i(i=1,2,3)的阳性比例-每个级别的灵敏度

X(i)=i 时对数值

使用比较研究的结果来计算 LOD 值。

## 4 实验室间协同试验

实验室间协同研究是申请为标准的微生物学方法必须进行的实验<sup>[11]</sup>。实验室间协同实验的目的在于确定不同实验室使用同一样品进行检测所得到的结果的差异, 从而对方法的性能指标作出实际估计, 特别是当该方法在实际应用过程中出现预期的系统及随机误差时<sup>[6]</sup>。

### 4.1 实验室的数量

每个样品类型至少需要 8 个协作实验室的数据(最好选择 10~12 家实验室)。涉及到贵重仪器或对实验室有特殊要求时, 其结果必须至少有 5 家实验室的结果是可用的<sup>[4]</sup>。

### 4.2 测试样品要求

测试样品为 NordVal 基质表中的所列食品。由组织实验室制备统一的测试样品。实验的数据能否用来研究计算应由专业实验室确定<sup>[4]</sup>。

## 5 定性方法的计算

### 5.1 计算

实验室内比较研究所得阳性结果, 见表 1。

通过协同研究得到的阳性结果, 见表 2。

对 L<sub>0</sub> 级别和每种方法, 计算特异性 SP。

$$SP = \left[ 1 - \left( \frac{FP}{N-} \right) \right] \cdot 100\%$$

N- 是指所有 L<sub>0</sub> 测试数据之和;

FP 是指假阳性值。

对每一种污染水平 L<sub>1</sub> 和 L<sub>2</sub> 以及每种方法, 计算灵敏度 SE。

表1 实验室内确认试验阳性结果  
Table 1 Positive results by the expert laboratory

检测方法	污染水平		
	$L_0$	$L_1$	$L_2$
基准方法	/2	/2	/2
待确认方法	/2	/2	/2

$L_0$ =阴性质控  
 $L_1$ =每 25 g 样品 1~10 个细胞  
 $L_2$ =每 25 g 样品中 10~100 个细胞

表2 协同研究试验阳性结果  
Table 2 Positive results by the alternative method from the collaborative study

实验室	污染水平		
	$L_0$	$L_1$	$L_2$
实验室 1	/2	/2	/2
实验室 2	/2	/2	/2
实验室 3	/2	/2	/2
等等	/2	/2	/2
总计	$FP_a$	$TP_b$	$TP_c$

a 替代方法的假阳性  
b 替代方法在水平 1 级得到的真阳性  
c 替代方法在水平 2 级得到的真阳性

$$SE = \frac{TP}{N+} \cdot 100\%$$

$N+$  是指所有  $L_1$  或  $L_2$  测试值总和;  
 $TP$  是指真阳性值。

对于每个级别的污染和整体结果, 专家实验室会比较替代方法和基准方法的结果, 目的是为了在研究中计算相对准确度。通过替代方法和基准方法得到的每组结果必须报告在表 3 中。

计算准确度,  $AC$

$$AC = \frac{(PA + NA + FP)}{N} \cdot 100\%$$

表3 替代方法和基准方法比较  
Table 3 The results from a sample measured by the alternative and the reference method

替代方法	基准方法		总计
	+	-	
+	$PA$	$TP$	$n+$
-	$FN$	$NA+FP$	$n-$
总计	$N+$	$N-$	$N$

$N$  是指测试样品数;  
 $PA$  是指阳性结果数;  
 $NA+FP$  是指阴性结果数。

## 5.2 方法的一致性检验

一致性检验适用于实验室内确认试验和实验室间协同试验, 用于判断待确认方法与基准方法阳性比例的差异显著性。统计待确认方法和基准方法针对每个食品类型和每个接种水平得到的检验结果的一致性, 采用 Kappa(k)来量化计算。计算方法如下:

准确度  $P_0$ :

$$P_0 = AC = \frac{PA + NA + FP}{N}$$

一致性概率  $P_e$ :

$$P_e = \frac{(N+ \cdot N-) + (n+ \cdot n-)}{N^2}$$

测定方法之间的一致性  $k$ :

$$k = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e}$$

在一般情况下,

- .  $k \leq 0.20$ : 表示一致性差;
- .  $k \in \{0.21-0.40\}$ : 表示一致性一般;
- .  $k \in \{0.41-0.60\}$ : 表示一致性中等;
- .  $k \in \{0.61-0.80\}$ : 表示一致性较好;
- .  $k > 0.80$ : 一致性很好。

在方法验证时, “一致性很好”是必须的, 即  $k > 0.80$ 。

## 6 总结

NordVal 食品微生物定性分析方法的验证程序所分析的对象为食品、水、动物粪便、饲料、生产车间和设备以及环境等。确认的原则为先进行试验内确认研究实验, 然后, 由协作实验室用相同的样品进行实验室间协同实验。定性分析方法性能指标主要包括: 灵敏度、特异性、相对精度、检测限。待确认方法与基准方法比较时, 定性方法应达到以下性能指标: 灵敏度 95%; 特异性 95%; 替代方法的检测限应跟基准方法的检测限一样低; 方法的一致性值,  $k > 0.8$ 。

## 参考文献

- [1] 郑晶, 黄晓蓉, 陈彬, 等. 食品微生物学检测方法确认技术指南的标准化研究[J]. 现代测量与实验室管理, 2011, 6: 54-56  
Zheng J, Huang XR, Chen B, et al. Technical research guide to

- standard confirmation method for the detection of food microbiology [J]. *Mod Measur Lab Manag*, 2011, 6: 54–56
- [2] 张宏伟, 郑文杰, 赵宏, 等. AOAC 食品微生物定量分析方法确认要求[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(04): 241–243  
Zhang HW, Zheng WJ, Zhao H, *et al.* AOAC the metod of quantitive analysis to confirm the requirements of food mircroorganism [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2007, 28(04): 241–243
- [3] 雷质文. 食品微生物实验室质量管理手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2006  
Lei ZW. *Food microbiology laboratory quality management handbook*[M]. Beijing: Standards Press of China, 2006.
- [4] NordVal/NMKL 2009 Protocol for the validation of alternative microbiological methods [S]. Department of Microbial Food Safety. Danish Institute for Food and Veterinary Research. <http://www.nmkl.org/NordVal/NordVal.htm>
- [5] 刑增威, 游勇来, 刘英, 等. 食品卫生微生物学检验的质量控制[J]. *商品与质量*, 2013, 10: 250–253  
Xing ZQ, You YL, Liu Y, *et al.* Quality control of food microbiological examination [J]. *Good Qual*, 2013, 10: 250–253.
- [6] ISO 17025: 2005 General requirement for the competence of calibration and testing laboratories.
- [7] AOAC Guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis[S]. <http://www.aoac.org/Offical-Methods>
- [8] ISO 16140: 2003 Microbiology of food animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods [S].
- [9] USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook. Available at: [http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological\\_Lab\\_Guidebook/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp)
- [10] AOAC INTERNATIONAL. 1999. Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods validation. *Microbiology Guidelines: J. of AOAC Int.* 82: 402–416.
- [11] Andrews, Wallace H. 1996. Validation of modern methods in food microbiology by AOAC INTERNATIONAL collaborative study. *Food Control*. 1: 19–29
- [12] Government of Canada Part 4: Guidelines for the relative validation of indirect qualitative food microbiological methods. March 2011  
<http://www.hc-sc.gc.ca/fin-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume1-eng.php>
- [13] 郝京京, 颜喜亚, 赵谦, 等. 微生物检验替代法的验证概述[J]. *中国药品标准*, 2007, 8(02): 9–12  
Hao JJ, Yan XY, Zhao Q, *et al.* Introduction of validation of alternative microbiological methods [J]. *Drug Standard China*, 2007, 8(02): 9–12
- [14] NMKL Procedure No 20, 2007: Evaluation of results from qualitative methods
- [15] NMKL Procedure No 23, 2008: Guide on quality assurance for microbiological laboratories.

(责任编辑: 杨翠娜)

## 作者简介



钱志娟, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。  
E-mail: qianzj@jsciq.gov.cn



蒋原, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品微生物检测。  
E-mail: jiango@yeah.net