

# 欧盟食品微生物分析替代方法验证系统简介

杨春江\*, 马孝斌, 莫勋

(北京纳百景奕生物科技有限公司, 北京 101111)

**摘要:** 食品分析方法主要有标准方法, 也称为参考方法, 与之相对应的为替代方法, 也就是一般所说的快速方法。商品化检测试剂盒多数都是基于替代方法而开发的, 以弥补参考方法耗时长、成本高等缺点, 达到高通量、快速检测的目的。欧盟在对食品检测试剂盒的评价与认证中主要有 NordVal 和 MicroVal 以及 AFNOR(NF Validation)等第三方组织, 通过这些组织认证认可的检测试剂盒方法, 其结果在欧盟区域内会得到认可。通过对检测方法质量的把控, 很大程度上维护了相关市场的稳定和公正。本文主要对这些认证组织的基本概况、认证过程及费用以及当前已经认证方法的现状进行概述, 为相关研究者提供参考。

**关键词:** 食品检测; 试剂盒; 替代方法; 欧盟方法认证

## Introduction of European validation system of alternative methods for food microbiology analysis

YANG Chun-Jiang\*, MA Xiao-Bin, MO Xun

(NBGen Co., Ltd., Beijing 101111, China)

**ABSTRACT:** Standard method, also known as reference method, is used frequently in food analysis. Alternative method, generally known as rapid method, based on which commercial test kits are established and developed to achieve high through-put and rapid testing, is expected to solve the problems of time-consuming and higher expense that come with reference method. Currently in EU, the main validation organizations include NordVal, Microval and AFNOR (NF Validation). Method or test kits validated by these organizations will be accepted within the member states of EU. With the quality control of the related analysis methods and kits, the related market order is maintained stable and fair. In this article, the basic information, validation process, cost and current status of validated methods were described and analyzed, which were expected to provide general references for interested researchers.

**KEY WORDS:** food analysis; test kit; alternative method; European method validation

## 1 引言

欧盟食品微生物分析方法主要有标准方法, 也称为参考方法(reference method), 与之相对应的为替代方法(alternative method), 也就是一般所说的快速方法。商品化检测试剂盒多数都是基于替代方法而开发的, 以弥补参考

方法耗时长、成本高等缺点, 达到高通量、快速检测的目的<sup>[1]</sup>。目前在欧盟的主要相关认证机构有 NordVal、MicroVal 和 AFNOR(NF Validation)。

NordVal 是北欧国家方法验证委员会的简称, 是专门从事替代方法评审的独立第三方机构, 其以北欧五国为主体, 认证结果在北欧通用<sup>[2]</sup>; MicroVal 是欧盟层面的认证机

\*通讯作者: 杨春江, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测试剂开发。E-mail: yangchj@nbgen.com

\*Corresponding author: YANG Chun-Jiang, Engineer, NBGen Co., Ltd., No 88, Kechuang 6th Street, Beijing 101111, China. E-mail: yangchj@nbgen.com

构,专门验证和认可用于食品和饮料的微生物分析的替代方法,其总部设在荷兰,凡通过 MicroVal 认证的方法,表明其结果与传统的标准方法性能相当,可在欧盟范围内被政府检测实验室及商业实验室广泛认可<sup>[3]</sup>;而 AFNOR 是法国标准化协会的简称,旗下设有 NF Validation 部门,专门负责相关方法的认证和认可, NF Validation 以 EN ISO 16140 为基础对分析方法验证。目前, NF Validation 已在法国和欧盟各国被广泛认可,拥有欧盟认证规模最大的认证标识,在全世界范围内也有较大影响力<sup>[4]</sup>。

NordVal、MicroVal 和 NF Validation 3 种认证均是对现有检测试剂盒开发商的商品化试剂盒进行验证研究,建立替代方法作为参考方法的补充,主要应用为食品、饲料、水质等领域的微生物学分析或其他污染物分析。一般方法的验证过程为开发商根据自身产品、方法特点提出申请并提交相应的研究材料和验证实验报告,由认证机构组织专家文件评审,随后根据开发商提供的内部或者外部验证信息进一步审核、评价,以确定是否需要再次进行外部验证确认及协同试验研究,最后根据所有信息汇总,对方法是否通过验证做出评价,并颁发验证结果声明。

## 2 各认证组织方法验证过程简介

### 2.1 NordVal

根据 NordVal No.2 验证程序文件(2010)<sup>[5,6]</sup>, NordVal 验证具有专利权的化学方法(商品化检测试剂盒),分为定性方法和定量方法。当存在参考方法(标准方法)时,将以参考方法为依据,如果没有标准方法,将以认可的参考样本、不同基质的质控样本或者以不同水平目标分析物添加的人工样本作为参考。以定性方法为例,主要验证过程如下:

(1)方法比较研究:对方法的耐受性、批次变异及关键性能指标做出评价。其中,耐受性是指待测样本特性(pH、成分、内源性干扰物质等)、实验环境(如温度、外源性干扰物质)、实验操作步骤的精确性等对检测结果的影响。批次变异主要是指通过对方法开发商提供的描述性文件分析,确保产品批次间变异性得到控制。关键性能指标主要指方法的适用范围、适用浓度、检测限、灵敏度( $\geq 95\%$ )、精确度、检测全面性(包括不同来源样本的适用性以及对应交叉反应物质的检测能力)、特异性、假阳性率、假阴性率( $\leq 5\%$ )以及与其他参考方法的一致性( $Kappa > 0.8$ )。需要注意的是对方法关键性能指标进行研究尽可能采用真实的天然污染的样本,如果没有则要人工制备,样本的数量与实验重复数也需要严格限制。

(2)中间确认研究:进一步对比较研究的结果重复验证。确认研究需要至少一家独立实验室(与比较研究的实验室相区别)完成,实验所用样本对于该实验室还需是盲样,不同基质类型数量、样品浓度、重复数等均有严格规定。

(3)结果判定:将重复确认研究得到的实验结果与比较

研究得出的所有结论如精确度、灵敏度、特异性、以及与相关方法的一致性进行比较,并根据实际情况得出结论。

针对定量方法,关键性能指标考察多出了定量限、重复性、回收率、准确度等,实验样本等要求与定性方法类似。并且对确认研究部分提出了更高要求,对不同确认实验室结果也会比较,确保方法准确度。

此外, NordVal 目前已经以最新的 ISO 16140 标准为依据对方法验证规程进行了修订并公布了草案<sup>[7]</sup>。

### 2.2 MicroVal

MicroVal 验证过程依据欧盟标准 EN ISO 16140-2 进行。对于特殊方法的验证 MicroVal 技术委员会会单独做出规定。与 NordVal 相区别的是 MicroVal 对方法开发商有严格要求,必须通过 ISO9001 或者 ISO13485 体系认证,否则会有全面审核。根据 ISO16140-2 要求, MicroVal 认证过程分为方法比较研究(CMS)和实验室协同研究(ILS,至少需要来自 3 个欧盟成员国的 10 个不同实验室), MicroVal 技术委员会根据 CMS 和 ILS 研究结果对方法是否通过验证提出意见,最后由认证部门结合方法开发商是否通过质量管理体系审核给出整体的认证结论<sup>[8]</sup>。

### 2.3 NF Validation

与 MicroVal 类似, NF Validation 对微生物检测方法同样依据 EN ISO 16410 进行。此外, NF Validation 还扩大了分析方法的认证范围,如对食品中抗生素残留检测方法依据其技术委员会制定的标准规程进行。对于没有验证规程,而又有验证需求的方法也可由其技术委员会另行讨论协商,制定验证规程<sup>[9]</sup>。通常单个方法前期验证试验周期至少需要 8 个月甚至更长,整体时间超过 12 个月,而整体费用超过 50000 欧元<sup>[10]</sup>。

### 2.4 各认证组织认证更新周期及费用比较

为了确保通过认证的替代分析方法的质量及其适用性,各认证组织还会对已认证的方法进行周期性的审核和监控。以 MicroVal 为例,每 4 年方法开发商需要对已认证的方法提交详尽的技术报告,对替代方法本身是否有过变更、方法相对应的参考方法是否有过变更以及其对替代方法验证研究是否有显著影响等进行描述。MicroVal 技术委员会会就该技术报告评审并提出评审意见以确定替代方法是否需要更新、以及是否需要重复验证试验等,最后认证部门结合实际情况对方法的更新做出结论。各认证组织认证时效及费用比较如表 1 所示。

## 3 目前已通过认证的方法现状

### 3.1 方法种类与数量

NordVal 主要认证的方法为微生物检测方法,包括有氧微生物类、蜡样芽孢杆菌、弯曲菌属、大肠菌群、大肠

表 1 三大认证组织认证更新周期及费用  
Table 1 Renew period and certification fees of the 3 organizations

认证机构	NordVal	MicroVal	NF Validation
申请认证费用	4800	/	5430
更新周期	2 年	4 年	4 年
更新认证费用	2500	/	804.70 -1407.90 年使用费 950.80 年管理费
获得认证期间修订	1500-9500	/	900.90- 2252.30

注: 费用单位: 欧元;

NordVal 费用来自其官方网站;

MicroVal 费用未公开;

NFValidation 费用来自于 2011 年官方数据。

杆菌和大肠杆菌 O157 等, 其中涉及到李斯特氏菌、沙门氏菌、大肠杆菌 3 大致病微生物较多; MicroVal 认证的方法也主要为微生物检测方法, 基本类型与 NordVal 相同, 方法中以沙门氏菌检测方法最多; NF Validation 在 NordVal 和 MicroVal 的基础上扩展了方法认证的范围, 增加了 3 种抗生素检测方法的验证, 总体通过验证的方法达到 127 种。

表 2 所示为三个认证组织已认证的方法信息汇总。从方法数量来看, NF Validation 目前认证规模最大, 涉及到方法种类最多, 涉及到的厂商最多; 同时还根据市场需求对 3 种抗生素试剂盒进行了验证, 对相关需求市场规范提供了有力的技术支撑。

表 2 三大认证机构认证方法分类统计  
Table 2 Category of method certified by the 3 organizations

认证机构	NordVal	NF Validation	MicroVal
认证方法分类	11 类	16 大类	12 类
认证方法总数	25 种	127 种	31 种
微生物检测方法	25 种	124 种	31 种
抗生素检测方法	—	3 种	—
涉及到的厂商	11 家	19 家	11 家

注: 数据源自三大认证机构官方网站, 截止日期为 2015 年 9 月。

### 3.2 方法原理分类及区域分布统计

进一步对认证方法进行分析, 以 NF Validation 为例, 根据方法原理汇总如图 1, 传统的培养基培养法仍然占据主流; 新型的分子生物学方法如各类 PCR 方法(不含分子杂交方法)发展迅速, 数量接近 40 个; ELISA 方法作为快速免疫学检测方法, 数量也达到了 20 种, 表明 ELISA 在微生物检测领域也有了较大发展, 并逐渐被推广为参考方法的替代方法; 相比较之下, 快速检测方法则较少, 这可能与方法的检测敏感性、样本基质干扰较大以及无法避免菌培养过程有较大关系, 对该方法的实际推广有较大影响。

从 NF Validation 验证方法涉及到的开发商统计结果(图 2)来看, 仅就微生物检测方面, 法国生物梅里埃、3M 和 Bio-rad 通过认证方法最多, 合计数量 91 种, 占据所有方法数量的七成多。从区域分布看, 通过验证数量前 10 的厂商中有 6 家法国公司、3 家美国公司和 1 家英国公司。

### 3.3 不同认证组织对替代方法开发商质量管理体系的要求

目前三大认证机构中, NordVal 对开发商质量管理体系无明确要求, MicroVal 和 NF Validation 则有明确要求, 尤其是 NF Validation 要求最为明确和严格: 申请认证时, 如果开发商已通过 ISO9001 质量管理体系和 ISO13485 医疗器械质量管理体系认证, 并且 ISO 认证范围包含申请验证的方法, NF Validation 会根据实际情况出具相应的合格证明而无需现场审核; 如果开发商只通过了 ISO9001 体系认证, 则需要 1 d 的现场审核; 如果开发商两种质量体系认证都没有通过, 则需要 2 d 完整审核。通过认证后, 每 4 年或 2 年还需要进行监控审核 1 d, 比如通过 ISO9001 或 ISO13485 体系认证的开发商, 其监控审核周期为 4 年, 没有任何认证体系的, 则需要每 2 年审核一次。相较之下, MicroVal 仅是针对厂商通过质量管理体系认证情况提出了有限审核和全面审核, 审核时间未列出。由此可知, 欧盟对替代方法开发商质量管理体系的要求是以医疗器械质量管理体系为基础, 并且根据质量管理体系的改版, 审核要求在不断增加。

## 4 展 望

食品微生物是当前影响食品安全的重要因素之一。目前我国食品微生物分析检测方法多数以美国 AOAC 和欧盟标准等国际方法为基础, 新方法开发和产品质量控制除参考国际标准外, 也结合自身实际情况有了较大进步, 尤其 2010 年以来公布的食物微生物检验国家标准 GB 4789 系列, 去掉了商品化的替代方法如 Petrifilm、mini VIDAS/

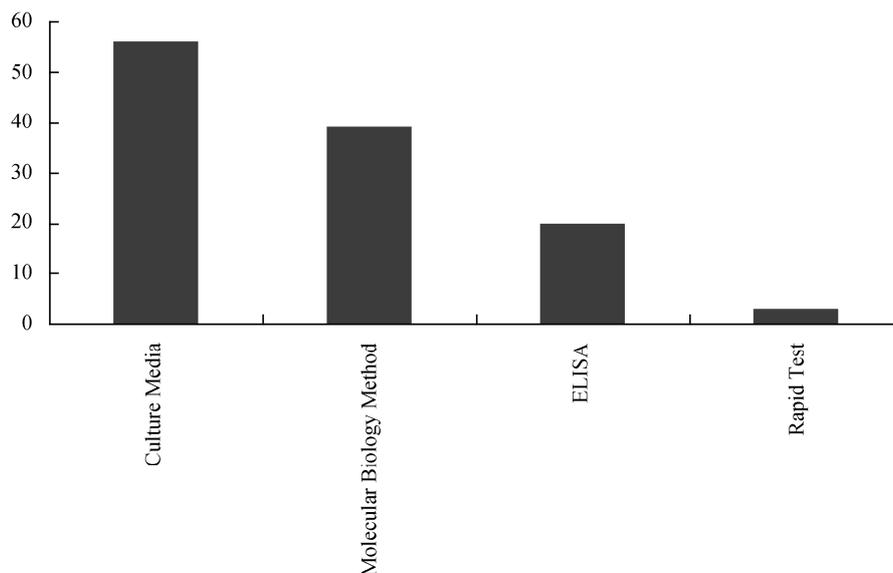


图 1 NF Validation 认证方法汇总排序(按照方法原理)

Fig. 1 Method certified by NF Validation: grouped and sorted by test principle

注: 数据统计自 NF Validation 网站, 截止时间为 2015 年 6 月 8 日

Note: Data collected from NF Validation official website, dated on June 8, 2015

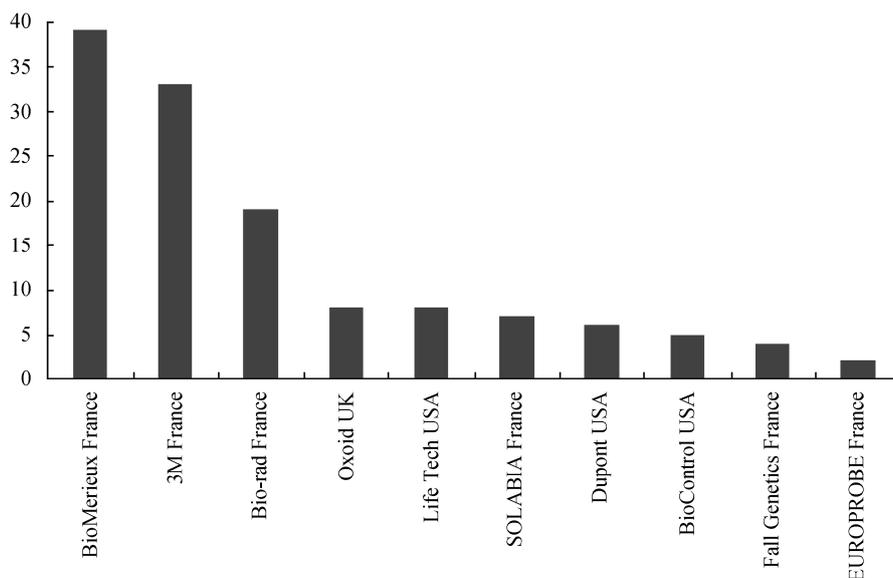


图 2 NF Validation 认证方法汇总排序(按照厂商)

Fig. 2 Method certified by NF Validation: grouped and sorted by manufacturer and country

注: 数据统计自 NF Validation 网站, 截止时间为 2015 年 6 月 8 日

Note: Data collected from NF Validation official website, dated on June 8, 2015

VIDAS、BAX 等, 使得标准参考方法更为独立, 为后续替代方法的验证对比提供了更严谨的参考依据。

我国当前基层检测使用的方法多属于基于替代方法的商品化试剂盒, 如何评价这些试剂盒及建立相应的替代方法评价体系对相关行业和企业至为重要。国家质检总局曾立项对商品化试剂盒评价方法进行研究, 并公布了 SN/T

2775《商品化食品检测试剂盒评价方法》标准<sup>[11]</sup>, 但目前还只属于出入境检验检疫行业标准; 农业部也曾经对兽药残留检测试剂盒实施过备案登记制度<sup>[12]</sup>, 但目前已处于暂停状态; 我国国家标准体系中并未见相应的替代方法评价细则, 对于目前在广泛使用的如 PCR、ELISA 及快速检测试剂盒质量的评估亦缺乏相应的指导性规程。因此有必要

结合相关标准和参考国外的评价方法建立相应评价体系, 为基层检测服务。

#### 参考文献

- [1] Bertrand Lombard, Alexandre Leclercq. Validation of innovative food microbiological methods according to the en ISO 16140 standard[J]. Food Anal Method, 2011, 4(2): 163-172.
- [2] Nordval, an independent third-party, reviewing alternative methods, [http://www.nmkl.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=19&Itemid=104&lang=en](http://www.nmkl.org/index.php?option=com_content&view=article&id=19&Itemid=104&lang=en). Accessed at Oct 10, 2015.
- [3] Betts Roy P, Rentenaar Irene MF. MicroVal: A European approach to the certification of new microbiological methods[J]. J Food Prot, 1998, 61(11): 1579-1582.
- [4] NF Validation Organization, <http://nf-validation.afnor.org/en/organisation/>, Accessed at Oct 10, 2015.
- [5] NordVal Protocol No. 2, Guide in validation of alternative proprietary chemical methods [Z].
- [6] 钱志娟, 薛峰, 蒋原. NordVal 食品微生物定性分析方法的验证程序[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(2): 609-613.  
Qian ZJ, Xue F, Jiang Y. Confirmation process of NordVal microbial qualitative analysis method [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(2):609-613.
- [7] NordValInternational Protocol, Protocol for the validation of microbiological alternative(proprietary) methods against a referencemethod [EB/OL]. <http://www.nmkl.org/dokumenter/nordval/DraftNordValInternationalProtocol2015.pdf>
- [8] MicroVal secretariat, Microval rules and certification scheme [EB/OL]. 2013-08. <https://www.nen.nl/web/file?uuiid=8250df47-6fcb-4880-9902-facd4f2fe820>.
- [9] NF102 certification rules. NF Validation, Validation of alternative analysis methods: application to the food industry[S].
- [10] Robert Koeritzer. The importance of validated rapid methods for international trade [EB/OL]. 2010-06. <http://multimedia.3m.com/mws/media/6606380/koeritzer-brazil-june-17-2010-ce-validation.pdf>
- [11] SN/T 2775-2011 商品化食品检测试剂盒评价方法[S].  
SN/T 2775-2011 Evaluation method of commercial food test kit [S].
- [12] 农业部. 关于加强兽药残留检测试剂(盒)管理的通知[Z]. 2005-01.  
Ministry of Agriculture. Announcement on strengthening the management of veterinary drug residue test kit [Z]. 2005-01.

(责任编辑: 杨翠娜)

#### 作者简介



杨春江, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测试剂开发。  
E-mail: yangchj@nbgen.com