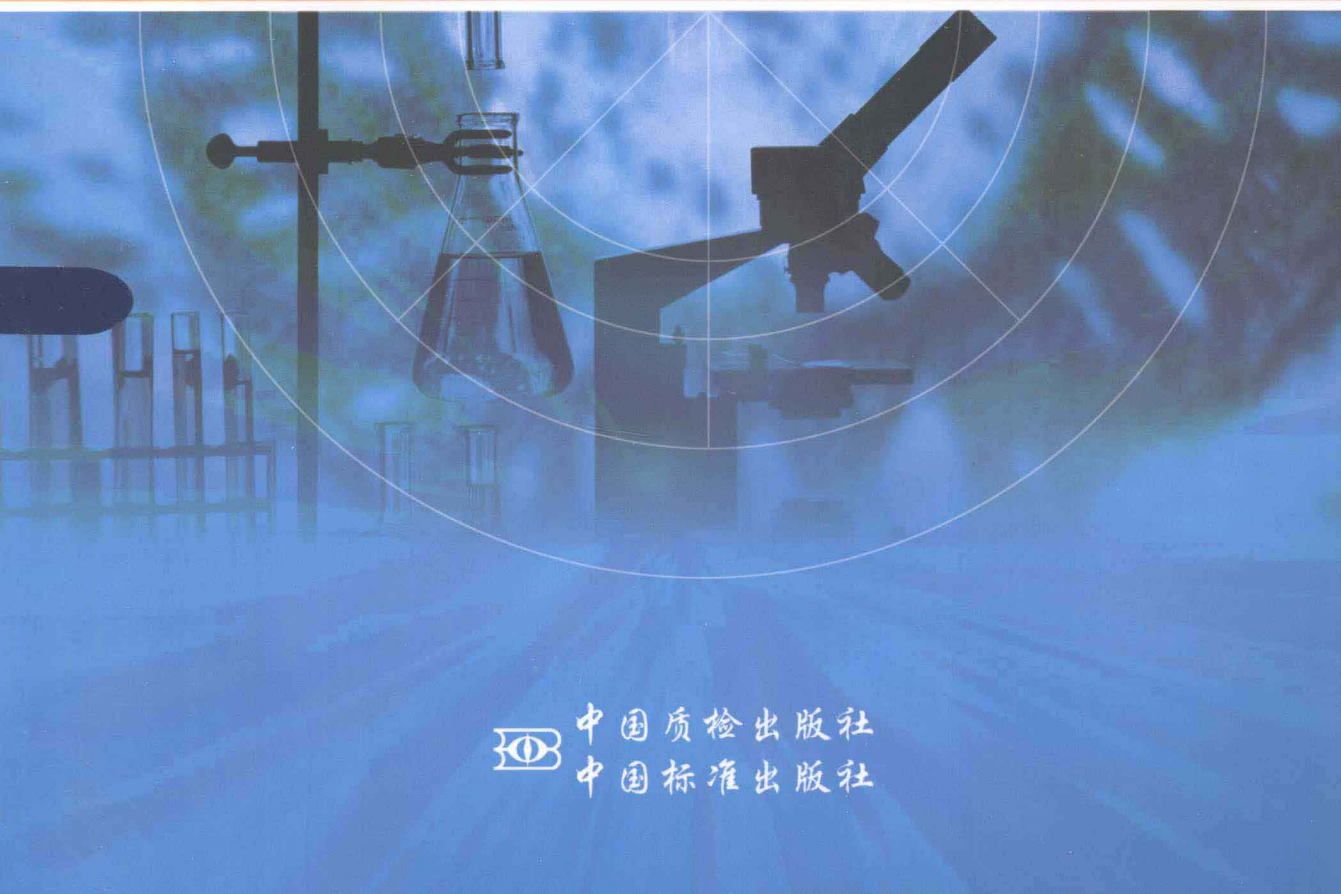




Handbook of Validation and Confirmation of
Food Microbiological Methods

食品微生物检测方法 确认和证实手册

李宏 雷质文 主编



中国质检出版社
中国标准出版社

食品微生物检测方法确认和 证实手册

Handbook of Validation and Confirmation of Food
Microbiological Methods

李 宏 雷质文 主编

中国质检出版社
中国标准出版社

北 京

图书在版编目(CIP)数据

食品微生物检测方法确认和证实手册/李宏, 雷质文主编. —北京: 中国标准出版社, 2013. 10

ISBN 978-7-5066-7371-6

I. ①食… II. ①李…②雷… III. ①食品微生物-微生物检定-技术手册
IV. ①TS207.4-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 242544 号

中国质检出版社
中国标准出版社 出版发行

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号 (100013)
北京市西城区三里河北街 16 号 (100045)

网址: www.spc.net.cn

总编室: (010) 64275323 发行中心: (010) 51780235

读者服务部: (010) 68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 787×1092 1/16 印张 20.75 字数 501 千字
2013 年 10 月第一版 2013 年 10 月第一次印刷

*

定价 66.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 68510107

编 委 会

主任委员：宋桂兰

副主任委员：唐丹舟 刘晓红 曹 实

主 编：李 宏 雷质文

副 主 编：饶 红 李 梅 吕敬章 何翠华 姜英辉
韩 伟 张亚杰 万志刚 苗 丽 杨捷琳
刘淑艳 静 平 卢行安 厉 艳 邵秀玲
魏晓棠 蔡露敏

编写人员：（按姓氏笔画为序）

万志刚	马维兴	王 丹	王 静	王丹慧
王妍婷	王 蕊	甘琴华	厉 艳	卢行安
付溥博	白庆华	吕敬章	刘 阳	刘淑艳
汤慕瑾	李 丹	李 可	李 宏	李 珂
李 梅	李子尧	李海燕	杨捷琳	何翠华
张亚杰	陈 霞	陈延青	邵秀玲	苗 丽

郑 晶 单 耕 赵守成 赵炳南 饶 红
姜英辉 祝长青 娜仁图亚 袁辰刚 顾 鸣
郭铮蕾 唐 静 陶雨风 崔树玉 韩 伟
傅 蓉 曾 静 雷质文 静 平 蔡 颖
蔡露敏 黎昊雁 鞠玲燕 魏晓棠

序



“十五”期间，中国合格评定国家认可委员会（CNAS）主持完成了“十五”国家重大科技专项“食品安全检测实验室质量控制规范研究”（课题号：2001BA804A33），部分科研成果转化为 GB/T 27405—2008《实验室质量控制规范 食品微生物检测》等一系列标准，并将部分科研成果集册出版，即《食品微生物实验室质量管理手册》和《GB/T 27405—2008〈实验室质量控制规范 食品微生物检测〉理解与实施》，以上成果中都不同程度地涉及食品微生物检测方法证实和确认技术和相关规范。

2011 年 CNAS 认可三处启动了 CNAS-CL09:2006《检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明》的修订工作，食品微生物检测方法证实和确认技术是若干关注点之一；同年 10 月下旬欧盟兽医办公室（FVO）考察了我国山东和福建出口禽肉卫生安全管理体系，其考核报告 [DG (SANCO)/2011—8848] 提出“中国检测沙门氏菌和李斯特氏菌的国家方法未完全与欧盟的要求相一致，但是没有提交中国方法已经按照 EN/ISO 16140《食品和动物饲料微生物学 可替代方法确认规范》或者其他类似的可接受的国际准则充分验证了欧盟参考方法的证据”。2012 年 4 月～5 月，山东出入境检验检疫局收到国家质量监督检验检疫总局文件《关于请组织与欧盟有关禽肉沙门氏菌和单核细胞增生李斯特氏菌检测方法进行等效验证的函》（质检食函 [2012] 33 号）后，迅速组织协调全国检验检疫系统内相关微生物检测实验

室,开展了禽肉中的沙门氏菌国家标准(GB 4789.4—2010)和单核细胞增生李斯特氏菌国家标准(GB 4789.30—2010)与ISO标准检测方法的等效验证,如期圆满完成了验证工作,为类似的检测方法一致性问题的解决提供了参考样板,对今后我实验室接收国外考核工作具有十分重要的借鉴意义。

在我国,除了编写组成员制定的SN/T 3266—2012《食品微生物检测方法确认技术规范》外,没有涉及关于适用于食品微生物检测方法的确认或证实技术。基于以上研究积淀和工作需求,CNAS-CL09:2006修订工作组广泛吸纳一线食品微生物检测方法制定专家、统计学专家和微生物检测专业人员,收集、整理国内外关于食品微生物检测方法的确认或证实技术规范,并汇编成书。

衷心希望该书的出版,能深入推动CNAS-CL09的贯彻执行,并能为进一步提升食品微生物实验室管理水平、保障食品安全起到积极的作用。

李桂三

2013年9月

前



言

食品安全问题是关系国民健康的重大问题，也是国际贸易中的重大瓶颈问题。微生物是影响食品安全各要素中危害最大的一类；食品微生物污染是涉及面最广、影响最大、问题最多的一类污染，对食品微生物进行监控是国家意志的体现。准确、可靠的检验结果是正确评价和保证食品安全性的先决条件，也是国际贸易上公平交易的有力科学依据。

国际上的共识为：“一个实验室必须有适当的措施以保证其所提供的数据的质量”，检验规程规范化和分析方法标准化是检验结果可信性的重要保证。食品微生物检测实验室所提供检测数据的有效性、公正性、可靠性对于食品安全起到决定性的“技术把关”作用，为相关决策部门提供科学的、客观的决策依据。

确保食品微生物检测实验室检测数据有效性、公正性、可靠性的必要条件之一是使用经过确认的食品微生物检测方法。目前，食品微生物检测可选择的方法范围较广，既有国际标准、国际权威组织发布的标准，又有国家标准、行业标准可以使用；针对快速检测技术以及各种仪器设备的开发及使用，实验室可以制定非标准方法作为使用的有效检测方法。

一个实验室拟用某一食品微生物检验方法前，无论是标准方法还是非标准方法，皆应对其进行严格证实或确认。方法的证实和确认的过程是分析操作中的一个必要的程序。对所采用的食品微生物检测方法予以确认，目的是证实某方法某一特定预期用途的特定要求得到满足，或证明由某方法误差而导致试验结果判断错误的概率是否在允许范围之内，并提供客观证据。因此，对食品微生物检测方法进行证实和确认，不仅是实验室质量体系所依据标准的要求，而且通过对检测方法的确认，食品微生物实验室应能够证明其正确使用某个方法，且该方法能够满足某

一特定预期用途的特殊要求。这不仅能对检测结果的可靠性加以信任,而且还能帮助加强已有的管理制度和支持实验室的认可。

GB/T 27025—2008/ISO/IEC 17025:2005《检测和校准实验室能力的一般要求》中5.4.2规定:“当客户未指定所用方法时,实验室应从国际、区域或国家标准发布的,或由知名的技术组织或有关科学书籍和期刊公布的,或由设备制造商指定的方法中合适的方法。实验室制定的或采用的方法如能满足预期用途并经过确认,也可使用。所选用的方法应通知客户。在引入检测或校准之前,实验室应证实能够正确地运用标准方法。如果标准方法发生了变化,应重新进行证实。”5.4.4规定:“所制定的方法在使用前应经适当的确认”。5.4.5.2规定:“实验室应对非标准方法、实验室设计(制定)的方法、超出其预定范围使用的标准方法、扩充和修改过的标准方法进行确认,以证实该方法适用于预期的用途”。

GB/T 27405—2008《实验室质量控制规范 食品微生物检测》的6.3.2中明确规定:实验室应对非标准方法、实验室设计(制定)的方法、超出其预定范围使用的标准方法、扩充和修改过的标准方法进行确认。可替代方法的确认可参照ISO 16140《食品和动物饲料微生物学可替代方法的确认规范》进行。

如何正确的选择、使用、证实或确认检测方法,国际标准化组织(ISO)、国际官定分析检测协会(AOAC)、美国食品药品监督管理局(FDA)、美国农业部/食品安全检验局(USDA/FSIS)、北欧标准委员会、加拿大健康署、澳大利亚/新西兰标准化组织(Australian/New Zealand Standard)、新加坡认可委员会(SAC)等国际组织和国家都对检测方法的确认技术均以“标准”的形式进行了技术规范。

在我国,除了编写组成员制定的SN/T 3266—2012《食品微生物检验方法确认技术规范》外,《食品安全国家标准管理办法》(卫生部令第77号)、《国家标准管理办法》(国家技术监督局第10号令)、《采用国际标准管理办法(试行)》(一九八二年三月十七日国家经济委员会、国家科学技术委员会、国家标准总局发布)、《出入境检验检疫标准化工作管理办法》(国认法联[2002]55号)、《认证认可科技与标准化工作管理规定(试行)》(国认科[2005]36号)、《出入境检验检疫行业标准制(修)订管理工作》、《食品安全地方标准管理办法》(卫监督发[2011]17号)均从不同行政层面进行了“管理”规定,没有关于适用于食品微生物检测方法的确认或证实技术。针对当前国内食品微生物检测方法制修订和使用现状,CNAS-CL09:2006《检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明》修订工作组广泛吸纳一线食品微生物检测方法制定专家、统计学专家和微生物检测专业人员,收集、

整理国内外关于食品微生物检测方法的确认或证实技术规范，书名定为《食品微生物检测方法确认和证实手册》，希望通过一己之力抛砖引玉，为食品微生物实验室管理水平和食品微生物检测工作的发展尽绵薄之力。

本书不仅包括我国关于食品微生物检测方法的确认/证实规定，还采取罗列的方式，分别将国际标准化组织（ISO）、美国食品药品监督管理局（FDA）、美国食品药品监督管理局（FDA）、美国农业部/食品安全检验局（USDA/FSIS）、北欧标准委员会、加拿大健康署、澳大利亚/新西兰标准化组织、新加坡认可委员会（SAC）等国际组织关于食品微生物检测方法的确认技术规范整理出来，而且根据实际工作需要，本书还涉及了食品微生物免疫学检测方法的确认技术、食品微生物分子生物学检测方法的确认技术、食品微生物检测方法等效性评估技术以及食品微生物检测方法的方法偏离及其控制。

本书面向卫生部门、农业部门、质检部门、高等院校、科研院所、食品生产企业等系统或部门的管理人员和食品微生物检测人员，可作为学习培训及日常工作参考书，同时对食品微生物实验室的认可工作和质量管理方面亦有一定的专业性参考价值。

本书中所涉及商品品牌，是为了利于读者理解与参考，并不表示对这些产品的认可，其他具有相同功能的商品，亦可参考使用。

由于编写人员都是利用业余时间辛勤笔耕，加上编者水平有限，本书难免出现纰漏和欠缺，甚至错误，恳请广大读者批评指正。

编者

2013年9月

目 录



第一章 国内外食品微生物检测方法体系及方法确认和

证实规定	1
第一节 国内外食品微生物检验体系	1
一、标准方法	1
二、非标准方法	3
第二节 微生物快速检测系统	4
一、微生物快速检测方法概述	4
二、微生物快速检测系统的认可	7
三、微生物快速检测系统的局限性	9
第三节 方法的选择	9
第四节 国内外关于方法确认和证实的规定	10
一、食品微生物检测方法的证实要求	10
二、食品微生物检测方法的确认要求	11
三、食品微生物检测方法确认和方法证实的不同之处	11
四、食品微生物检测方法确认和证实的要求	11

第二章 我国关于食品微生物检测方法的确认技术

第一节 我国现行实验室认证认可管理制度	13
一、我国实验室认证机构及相关制度	13
二、我国实验室认可机构及相关制度	14
第二节 我国关于食品微生物检测方法确认的技术规范	14
一、方法确认的基本原则	15
二、定性方法确认试验	15

三、定量方法确认试验	22
第三章 ISO 关于食品微生物检测方法的确认技术	25
第一节 概述	25
一、ISO 组织结构	25
二、ISO 组织的相关职责	26
三、ISO 标准的制定程序和体系概况	26
四、与食品微生物检测方法确认与证实相关的 ISO 标准	26
第二节 ISO 16140《食品和饲料微生物学可替代方法	
确认规范》	27
一、可替代方法确认和确认的一般准则	27
二、定性方法确认的技术规范	28
三、定量方法确认的技术规范	38
第三节 ISO/TC 34/SC 9 N 593《实验室内方法确认》	41
一、相关术语和定义	41
二、食品与微生物的选择	42
三、定性方法确认	42
四、定量方法确认	43
第四节 ISO 13843《水质 微生物检测方法确认指南》	44
一、相关术语和定义	44
二、注意事项	47
三、数学模型	47
四、性能特征的确认和描述	52
五、确认的程序和步骤	53
六、测定特性的设计	54
第五节 实例	55
一、欧洲 AFSSA Ploufragan 和美国生化控制系统的国际	
协作测试	55
二、荷兰国家公共卫生研究所组织的一次国际协作测试	57
第四章 AOAC 关于食品微生物检测方法的确认技术	60
第一节 概述	60
一、AOAC 的食品微生物学分析方法确认程序	60
二、AOAC 方法委员会的组织结构	61
第二节 AOAC 方法委员会食品及环境表面微生物方法的	
确认指南	62
一、术语和定义	62
二、定性方法确认的技术方案	64

三、定量方法确认的技术方案	76
四、确证方法确认的技术方案	82
五、安全	85
第三节 其他 AOAC 方法确认技术	85
一、AOAC 同行验证方法确认技术	85
二、AOAC 研究所性能测试方法确认技术	86
三、AOAC 三种方法确认技术的比较	87
第四节 实例	88
第五章 美国关于食品微生物检测方法的确认技术	92
第一节 概述	92
一、美国环境保护局	92
二、美国食品药品监督管理局	92
三、美国农业部食品安全检验局	94
第二节 美国环境保护局的方法确认	94
一、目的和范围	94
二、方法确认定义	94
三、方法确认的一般准则	94
四、微生物培养检验方法的注意事项	99
五、运行限值和质量控制措施	100
六、参与实验室	101
七、试验材料	102
第三节 美国食品药品监督管理局的方法确认	103
一、目的和范围	103
二、方法开发实验室的一般责任	103
三、方法确认	104
四、进行方法确认的条件	104
五、开发方法的确认标准和指导原则	105
六、标准	106
七、注意事项	108
八、评估	109
九、市售的微生物诊断试剂盒核查、确认标准和指导原则	110
第四节 美国农业部食品安全检验局的方法确认	114
一、目的和范围	114
二、评估检测病原体替代方法的性能特点	114
三、一般注意事项	115
第五节 实例	120
一、定性方法确认	120

二、定量方法确认	124
三、泊松分布	127
四、负二项分布	127
五、未配对样本的皮尔逊-卡方统计计算的例子	127
第六章 加拿大健康署关于食品微生物检测方法的	
确认技术	129
第一节 概述	129
一、微生物方法确认组织结构	129
二、关于微生物方法确认的政策声明	130
第二节 方法确认的基本概念	130
一、相关定义	130
二、方法的选择	134
第三节 微生物方法确认的通用要求	136
一、预合作研究的相对确认	136
二、转移性研究的要求	140
三、合作研究和比对研究的要求	140
四、申请方法确认提交材料的要求	140
第四节 食品微生物定量方法确认要求	141
一、定量方法提交的通用数据要求	141
二、食品微生物定量方法确认要求	141
三、微生物方法委员会审查内容	142
四、微生物方法委员会技术组审查定量方法报告摘要	143
第五节 食品微生物间接定性方法确认要求	144
一、范围	144
二、应用	144
三、定性方法提交的通用数据要求	144
四、食品微生物定性方法确认要求	145
五、微生物方法委员会审查内容	147
第六节 食品微生物方法修改、撤销指南	148
一、范围	148
二、已发表方法的复审	148
三、确认方法的修改	148
四、确认方法的撤销	149
第七章 新加坡关于食品微生物检测方法的确认技术	150
第一节 概述	150
一、机构介绍	150

二、SAC-SINGLAS 的标准体系	151
第二节 微生物检测方法确认指导书	151
一、相关术语和定义	151
二、使用范围	152
三、参考微生物	152
四、检验方法的确认	152
五、致病菌检测	160
第八章 澳大利亚关于食品微生物检测方法的确认技术	161
第一节 概述	161
第二节 定量和定性检测方法的确认和验证准则	162
一、对已确认方法的验证	162
二、方法确认和确认参数	163
三、非常规方法的确认	175
四、主观性方法的确认和验证	176
第三节 AS/NZS 4659: 1999《食品微生物检测方法 等效性评定指南》	177
一、定性试验、定量试验、证实试验 3 个子标准 相同的要求	178
二、定性试验 (AS/NZS 4659.1: 1999)	179
三、定量试验 (AS/NZS 4659.2: 1999)	183
四、证实试验 (AS/NZS 4659.3: 1999)	186
第九章 食品微生物分子生物学检测方法的确认技术	188
第一节 概述	188
第二节 国外食品微生物 PCR 检测方法确认原则	189
一、方法文本应涵盖的内容	190
二、方法开发与优化	191
三、PCR 数据分析	191
四、方法确认基本原则	196
第三节 ISO 2 2174《食源性病原体 PCR 检测通用 要求和定义》	197
一、相关术语和定义	197
二、检测程序	197
三、测试样品	197
四、实验室通用要求	197
五、仪器和设备	198
六、检测步骤	198

七、评估	199
第四节 加拿大健康署关于食源性微生物 PCR 检测	
技术导则	199
一、纲要方法	199
二、PCR 技术的应用	200
三、补充资料	200
第五节 美国环保局关于环境样品 PCR 分析实验室	
质量保证/质量控制导则	201
一、实验室质量保证	201
二、试剂、试剂盒、引物和酶	204
三、方法开发和验证	204
四、PCR 方法中的质量控制样品	211
五、数据记录和评价	216
第六节 动物传染病 PCR 检测技术确认	216
一、PCR 方法确认要素	216
二、应提供的确认材料	219
第七节 实例	219
一、方法开发及实验室内确认	219
二、国际实验室间协作试验	220
第十章 食品微生物免疫学检测方法的确认技术	226
第一节 食品微生物的免疫学检测方法	226
一、食品中微生物的免疫学检测方法的特点	226
二、常用免疫学检测方法介绍	226
三、免疫学检测方法的局限性	228
第二节 食品微生物免疫学检测方法的确认	229
一、我国食品微生物免疫学检测方法的标准采用情况	229
二、食品微生物免疫学检测方法确认需考虑的方法性能	229
第三节 食品微生物免疫学检测方法确认实例	231
一、免疫荧光快速检测方法 VIDAS <i>Listeria</i> DUO 的确认	231
二、一种检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌的酶联免疫	
方法的确认	233
三、AOAC 官方分析方法 2004.06 的方法确认	236
第十一章 食品微生物检测方法等效性评估技术	240
第一节 概述	240

第二节 ISO 21187:2004《牛奶 细菌学质量的定量 检测 常规方法结果和锚方法结果之间换算 关系的建立及验证导则》	241
一、范围	241
二、术语和定义	241
三、原理	241
四、换算关系的建立	242
五、换算关系验证	246
六、测试报告	246
七、其他	247
第三节 ISO 17994:2004《水质 微生物方法之间的 等效性建立准则》	249
一、范围	250
二、术语、定义和符号	250
三、原理	251
四、等效性试验的基本要求	251
五、计算	255
六、评价	256
七、检测报告	258
八、其他	258
第四节 ISO/TS 16489:2006《水质 结果等效性确定 导则》	262
一、范围	262
二、术语和定义	263
三、不同等效性评价方法概述	263
四、数据量	263
五、数据比较	264
六、两组独立获得的检测结果数据的算术平均数比较	264
七、总体和样本的算术平均数比较	265
八、方差分析	266
九、不同基质样品结果等效性比较	268
十、报告	270
十一、其他	270
第五节 国外等效性验证实例	280
一、验证对象	280
二、验证方法	280
三、验证结果	280