

食品中同一目标微生物不同检测方法之间的比对研究进展

张鑫欣^{1#*}, 陈婧^{2#}, 陈万义², 朱炜¹, 杨晶华¹, 徐杰¹, 胡瑜²

[1. 达能开放科研中心, 上海 201204; 2. 梅里埃营养科学(中国)食品科学中心, 上海 201112]

摘要: 随着世界各国食品贸易往来加剧, 不同国家或区域对同类食品中同一目标微生物存在不同的标准检测方法。各国标准方法正式发布前要进行方法比对研究, 新版标准方法的各项性能参数要优于旧版标准方法才对外公布并作为官方认可的标准检测方法。针对食品中同一目标微生物, 基于分子生物学及免疫学等原理新研发出的检测方法能大大提高检测效率, 但必须要与传统的标准检测方法(基于培养法)进行科学系统的比较性验证研究, 只有取得等效性评价结果后才能作为一种有效的替代检测方法; 另外, 不同国家针对同类食品中的同一目标微生物的检测方法由于检测流程不同也同样需要进行等效性评价, 两种检测方法的等效性评价结果能够为食品在全球不同国家之间的进出口贸易的高效放行提供科学有效的数据支撑。本文阐述了基于食品中同一目标微生物不同检测方法比较研究的进展, 分析讨论并总结了不同检测方法之间进行比较研究的流程和要求, 介绍了 ISO 16140 和国际标准方法委员会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)指南的原则以及其在方法比对研究中的应用情况、需考虑的因素等。此外, 本文也讨论了方法比对研究领域所面临的一些挑战以及未来的研究方向。该文为今后研究开发与采纳新的食品微生物检测方法提供了系统科学和全面的方法比较和确认的说明, 具有十分重要的参考价值。

关键词: 食品; 目标微生物; 检测方法; 比较研究; 等效性

Advances in comparison studies of different detection methods based on the same targeted microorganism

ZHANG Xin-Xin^{1#*}, CHEN Jing^{2#}, CHEN Wan-Yi², ZHU Wei¹, YANG Jing-Hua¹, XU Jie¹, HU Yu²

[1. Danone Open Science Research Center, Shanghai 201204, China;
2. Mérieux Nutri Sciences (China) Food Science Center, Shanghai 201112, China]

ABSTRACT: With the intensification of food trade around the world, different countries or regions have different standard detection methods for the same target microorganism in the same kind of food. Methods comparison research shall be conducted before the official version release of national standard methods. The performance parameters of the new standard methods shall be better than those of the old standard methods before they are

基金项目: 国家重点研发计划中欧食品安全合作项目 EU-China-Safe (2017 THE110800)、欧盟地平线 2020 计划(727864 EU-China-Safe)

Fund: Supported by the National Key Research Program (2017 THE110800), and the EU H2020 (727864 EU-China-Safe)

[#]张鑫欣、陈婧为共同第一作者。

[#]ZHANG Xin-Xin and CHEN Jing are co-first authors.

***通信作者:** 张鑫欣, 硕士, 主要研究方向为食品微生物与食品安全。E-mail: cecilia.zhang@danone.com

***Corresponding author:** ZHANG Xin-Xin, Master, Danone Open Science Research Center, No.1155 Fangdian Road, Shanghai 201204, China. E-mail: cecilia.zhang@danone.com

published and used as an officially recognized standard test method. For the same target microorganism in food, the newly developed detection method based on the principles of molecular biology and immunology can greatly improve the detection efficiency, but it must be scientifically and systematically compared with the traditional standard detection method (based on culture method). It can be used as an effective alternative detection method only after the equivalence evaluation results are obtained; In addition, due to different detection processes, the detection methods of the same target microorganism in similar foods in different countries also need equivalence evaluation. The equivalence evaluation results of the two detection methods can provide scientific and effective data support for the efficient release of food import and export trade between different countries in the world. This paper expounded the progress of comparative research on different detection methods based on the same target microorganism in food, analyzed, discussed and summarized the process and requirements of comparative research between different detection methods, and introduced the principles of ISO 16140 and the guidelines of the Association of Official Analytical Chemicals (AOAC) and their application in method comparison research factors to be considered, *etc.* In addition, this paper also discussed some challenges in the field of method comparison and future research directions. This paper provided a systematic, scientific and comprehensive description of method comparison and confirmation for the future research, development and adoption of new food microbial detection methods, which had a very important reference value.

KEY WORDS: food; target microorganism; detection methods; comparison study; equivalence

0 引言

针对特定食品基质选择有效的微生物学检测方法是保障全球食品质量及安全至关重要的环节。基于同一目标微生物的检测方法比对研究为获取两种或多种检测方法之间的相似性或差异性提供了大量的数据支持。

目前,大部分标准微生物检测方法仍旧基于传统的培养技术。就定性方法而言,通常需要进行预增菌和选择性增菌、生化及血清学鉴定等步骤,检测周期一般长达数天。传统培养的方法因其准确性和可靠性被公认为食品检验的“金标准”,然而自 20 世纪 80 年代后期首批快速检测方法获得认证并开始使用以来,市场上已经出现大量用于替代或补充传统方法的快速方法,且数量呈上升趋势^[1-3]。这些快速筛选方法一般基于分子生物学或免疫学原理,通常能够在短时间内快速得出结果,因而在食品企业生产过程控制和内部产品放行控制中更具备优势^[3-5]。

在新的可替代方法开发后,方法比对研究的应用贯穿替代方法确认的整个过程。在将快速方法应用到日常检验流程之前,必须首先进行科学系统的方法确认,以确保其性能能够满足预期用途的要求。而方法确认的首要目标正是将替代方法与标准参考方法进行比较,以客观数据证明替代方法等同于(或优于)现行使用的标准参考方法^[6-7]。

随着近年来国际食品安全领域合作和数据交换(尤其是食源性爆发数据分享)需求的不断扩大,各地区标准检验方法的一致性也受到越来越多的关注^[8]。从监管角度来看,食品微生物标准通常由不同级别(例如区域、国家

和国际)的公共机构负责制定,然而不同级别的公共机构采用的标准检验方法不尽相同,这些不同的标准是否能够等同适用的问题上也存在一定争议。检测方法的差异可能导致检验结果判定不一致,也无形中增加了进出口检验成本。这种效应在国际贸易中表现尤为突出^[8]。因此,评价并确立各标准方法之间的等效性,对于制定全球统一的食物贸易标准和立法控制均具有重大的技术意义。

本文重点概述了方法比对在方法研究、方法确认以及标准方法等效性评价等应用中的进展,并总结了方法比对研究的设计原则以及需要考虑的因素。最后,文章还针对当前方法研究和确认过程中存在的问题和挑战以及对应的解决方案进行了讨论,为今后研究开发与采纳新的食品微生物检测方法提供了系统、科学和全面的指导性的说明,具有十分重要的参考价值。

1 方法比对研究现状

根据研究的目的以及是否遵循广泛认可的研究方法指导准则,可将现有文献资料中的大量方法比对研究大致分为 4 类:方法研发阶段的一般方法比对、替代方法比对确认、方法更新中的比对以及不同标准方法间的比对。

1.1 方法研发阶段的比对研究

方法比对研究大量应用于方法研发-阶段。但是,由于研发本身所具有的探索性和灵活性,目前尚难针对新方法研发活动制定具体、严格的方法比对实验标准。任何有条件的组织均可开展方法比对研究,例如政府机构、三方实验室^[9]、学术机构^[10-12],或欲优化筛选检测方法的企业

等^[13]。通常将新方法(包括优化已有方法的特定步骤)与标准检测方法进行比对,对于特定的步骤的不同参数的使用,也可相互进行比较和验证,以达到优化方法的目的。例如,可以在同一研究中将多种不同的样本预处理方法^[14]、不同的分离或选择性琼脂^[12,15-17]及 DNA 提取方法^[18]等条件进行比较,从而获得最优检测结果。近期的一项比对研究将一种基于 rRNA 的新检测方法与 4 种已经确认的聚合酶链式反应法/等温扩增法/传统培养法进行了比较^[19],检验 20 种蛋及蛋制品中的沙门氏菌。结果发现,已经确认的 4 种方法中有一种方法无法检出邦戈尔沙门氏菌,而各个方法的检出限比对结果进一步表明,基于 rRNA 的检测方法比另外两种已经确认的替代方法灵敏度更高。该比对研究为蛋及蛋制品中沙门氏菌的检测方法的选择及方法比较提供了有力的数据支撑。在研究开发新方法的阶段,方法比对的实验设计具有较高的灵活性。

1.2 替代方法确认过程中的方法比对研究

通过方法比对验证替代方法与标准方法之间的等效性是方法确认的一项主要任务。在正式的方法确认过程中,通常由监管机构或资质认可的第三方机构依据国际或地区公认的确证指导原则进行实验。其目的在于为方法的适用性、符合性提供相关数据。除美国官方分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)的《食品微生物定性定量分析方法确认官方指南》(以下简称“AOAC 指南”)^[20]和国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)的 16140 系列-食品微生物学-方法确认(以下简称“ISO 16140”)两项主要的国际公认的方法确认指导准则外,一些区域性的或国家性组织,例如加拿大卫生部微生物学方法委员会、北欧食品分析委员会、美国食品药品监督管理局以及美国农业部等也制定了相关指南或具体的方法性能验证标准。以上所有涉及方法确认的指导准则都要求在单实验室和多实验室研究阶段将替代方法与现行公认的标准方法(即参考方法)进行比较^[20]。法国标准化协会(Association Francaise de Normalisation, AFNOR)是法国的国家标准化组织,由其建立和管理的 NF (Francaise de Normalisation)确认数据库收录了大部分经过 AFNOR 认证的检验方法^[21],而作为 ISO 的会员机构之一,AFNOR 的 NF 确认数据库中涵盖了大量经由 ISO 16140 确认的替代方法,可以作为 ISO 16140 方法确认体系的代表进行分析。而根据另一大方法确认体系——AOAC International 官方方法名录(Official Methods of Analysis, OMA)标准(AOAC International)确认的方法在世界范围内仍占大多数。因此,AFNOR 和 AOAC OMA (Official Methods of Analysis of AOAC International, OMA)两大数据库可以较全面地展现世界范围内在方法确认和方法比对研究领域的现状和趋势。

图 1 列出了针对不同目标微生物的检测方法的已确认数量。其中,定性方法的确认主要是针对监管机构密切监测的两种主要致病菌——沙门氏菌和李斯特菌/单核细胞增生李斯特菌。就定量方法而言,大肠菌群(包括粪大肠菌群)、大肠杆菌、菌落总数和肠杆菌等传统卫生指标菌仍然是新方法中普遍关注的检验对象。

图 2 总结了基于各检验原理的已确认方法数。在众多已确认的定性检验方法中,基于免疫学和分子生物学的方法占据了主导地位。这种现象反映了行业内对快速获取检测结果、简化检验流程以及提高检验自动化水平方面的迫切需求。在定量方法中,基于选择性培养的传统方法仍然占据主要地位。

1.3 方法更新过程中的方法比对研究

当对已经确认过的替代方法进行更新、修改或对其适用范围进行扩大(例如纳入更多的基质)时,非常有必要重新进行方法确认。如果待更新的方法本身即为标准的参考方法,则可以通过比较原方法和其修订版来完成新版标准的确认。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)基于 BAM (bacteriological analytical manual)对婴幼儿配方奶粉中克罗诺杆菌分离和检验方法的确认即是一个典型例子,该检测方法的修订版在公布之前 FDA 组织开展了多家实验室合作的确认比对验证实验,增加了荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、显色琼脂和 RAPID ID 32E 自动生化鉴定的选项,确认更新方法后的各流程的性能与原方法等效或优于原方法。ISO 17468:2016 指出,现行标准参考方法确认并非必须通过与“参考方法”进行比对的形式进行,例如在条件允许时可以使用标准品或人工污染样品代替参考方法比对来评价待确认方法的性能及特征是否符合要求^[22]。

1.4 标准方法之间的等效性评价

方法比较研究指南也可用于两种标准方法之间的等效性评价。标准方法等效性评价的目的是实现各国检验标准的一致性。为此,1982 年 ISO 成立了技术委员会分会(ISO/TC 34/SC 9),负责制修订食品链微生物分析方法以及方法确认的通用标准,并承担了发布国际一致和通用的参考方法的主要任务。

目前,尚未制定适用于两个既定标准方法之间等效性评价的统一国际标准。然而,大多数方法等效性评价研究都是按照 ISO 16140 或 AOAC 指南进行的,有时会对其进行略微改进。我国国家认证认可监督管理委员会也针对此发布了相应的国家行业标准 RB/T 037—2020《食品微生物检验标准方法等效性评估指南》^[23]。该指南中的等效性评价研究设计也是参考了 ISO 16140 中的相关原则。

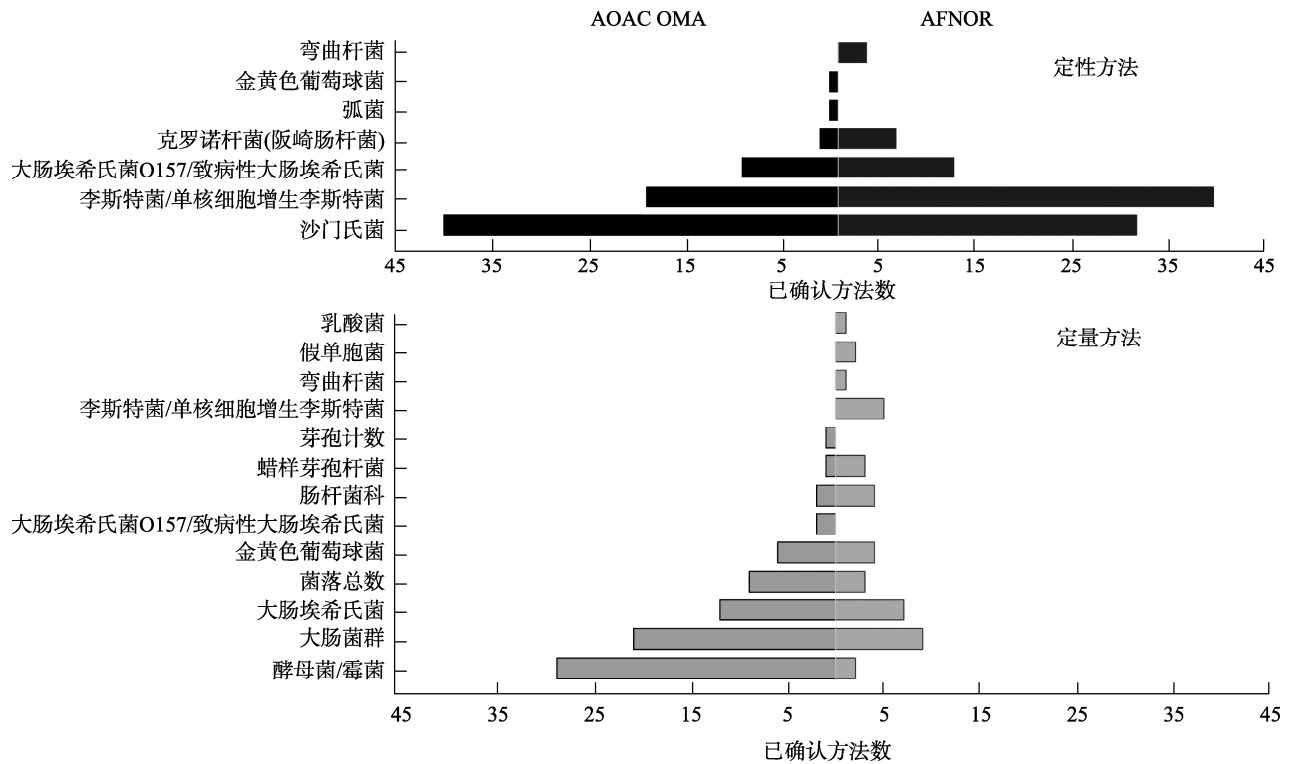


图 1 针对不同目标微生物的已确认的方法数量

Fig.1 Number of validated methods based on target microorganisms

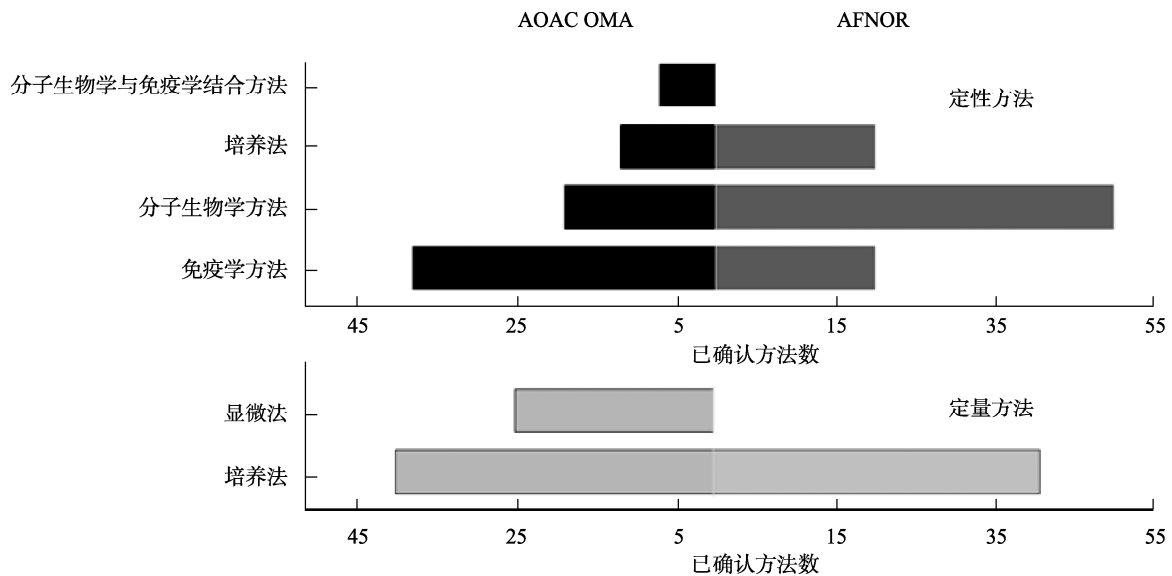


图 2 基于各检测原理的已确认的食源性致病菌的检测方法数

Fig.2 Number of validated methods by analytical technique based on foodborne pathogens

迄今为止,关于标准方法等效性评价的相关研究成果很少对外公开发表,尤其是关于再现性条件下对真实食品基质大范围评价的协作研究,更是少之又少。ISO 6579 和 AOAC 食品中沙门氏菌检验标准培养方法的交叉确认就是一个典型的大范围评价的例子^[24]。另一个例子是在一项多实验室间协作研究中,根据 ISO 16140:2003 方法确认

指南比较了日本国立健康科学研究所(NIHSJ-02)与 ISO 10272-1:2006 中的弯曲杆菌检验方法^[25]。在这项研究中,通过比较 NIHSJ-02 方法与 ISO 10272-1:2006 方法发现,NIHSJ-02 方法用于弯曲杆菌的检出率更高,并且背景菌群检出率更低。

其他单一实验室研究也有发表关于标准等效性评价的

报告。在北欧国家进行的一项关于饲料中沙门氏菌分离标准方法能力的单一实验室比较研究中, 将 NMKL71 方法(北欧食品分析委员会)与改良半固体氯化镁孔雀绿(modified semisolid rappaport vassiliadis, MSR/V)方法(EN ISO 6579:2002 附录 D)和国际标准方法(EN ISO 6579:2002)进行了比较^[26]。该项研究是根据欧盟委员会总司联合研究中心的检验原则进行的, 主要涉及准确性、灵敏度和特异性。结果证明, 这 3 种标准培养方法在不同饲料原料中对沙门氏菌及其血清学的检验能力是等效的。

2 方法确认过程中方法比较研究的原则

国际公认的方法确认指南, 比如 ISO 16140 系列和 AOAC 指南都给出了系统开展方法比对研究的关键原则。这些原则可以为科学合理地设计方法比对实验提供颇有价值的指导。他们在很多比对参数的选用上是相同的或十分相似, 但也有所不同。二者的主要区别之一在于参考方法的选择标准。根据 ISO 16140-2 原则进行的研究中, 只允许使用 ISO 标准以及 ISO 和 CEN 联合发布的标准或其他具有同等地位的区域/国家的标准方法作为参考方法, 而对于根据 AOAC 指南开展的研究, 则允许使用更广泛的方法作为参考方法, 包括 AOAC OMA、FDA BAM、USDA MLG (Microbiological Laboratory Guidebook)、ISO 和加拿大卫生部《分析方法汇编》等。除此之外, AOAC 指南中还对环境样本作了具体要求, 而 ISO 中针对食品基质的选择则制定了相对更严格的规定。

2.1 定性方法要求

定性方法用于检验食品基质中是否存在特定种类的微生物(通常是致病菌), 在其比对研究中需要将替代方法与参考方法的性能特征进行比较。ISO 16140 系列标准中针对定性方法的关键性能参数包括: 替代方法与参考方法的相对正确度(relative trueness, RT)、相对检出水平(relative level of detection, RLOD)^[27], 以及负偏差(negative deviations, ND)和正偏差(positive deviations, PD)等。根据参考方法的确证结果, 还可以计算出替代筛选方法的假阳性率(false positive rate, FPR)。将这些指标与其相应地可接受限(acceptability limits, AL)进行比较, 可判断替代方法是否与参考方法具有等效性。在 AOAC 方法确认中, 还可以通过检出概率(probability of detection, POD)模型^[28]来评估替代方法与参考方法之间的差异。

2.2 定量方法要求

根据 ISO 16140:2003 的说明, 两种方法之间等效性的最终判定应主要基于零假设检验, 以证明替代方法与参考方法在评估的参数方面没有显著差异。但是, 这个标准也存在一定的缺陷。为进一步完善该标准的方法, HUBERT

等^[29-32]研究和改良了数据统计和定量分析方法, 并提出了新的数据统计与判定标准。在这些研究的基础上对 ISO 16140 的定量方法比对研究的流程、数据处理和分析方法等进行了多处更新, 涉及单实验室研究(重复性)和多实验室间协作研究(再现性)的等效性评价等内容。

ISO 16140 和 AOAC 指南关于定量方法确认的要求大体相似, 具体要求略有不同。最需要注意的是, AOAC 指南中主要使用替代方法与参考方法结果之间差异的 95%置信区间(confidence interval, CI)作为评价指标, 而 ISO 16140 中则引入了一个新参数 β -ETI 作为接受标准。此外, ISO 16140 还要求报告仪器法(即根据仪器产生的电信号或光信号计算计数结果的方法)的定量限(limit of quantification, LOQ)。

3 方法比对研究中的考虑因素

方法比对研究的结果取决于方法的选择、实验设计、实验数据分析等诸多因素。在开展方法比对研究之前, 应仔细考量这些因素。

3.1 参考方法的选择

参考方法的选择是所有方法比对研究中应当考虑的首要因素。在方法确认项目中, 参考方法的选择很大程度上取决于待确认方法适用的地区。譬如, 欧盟条例 EC 2073/2005 (欧盟, 2005)确立了 EN ISO 食品链微生物学水平方法在整个欧盟范围内的标准检验方法地位^[33], 因此在欧盟国家申请认证的新替代方法通常都将 EN ISO 系列作为确认比对研究中的参考方法。只有在将 EN ISO 方法作为参考方法时, 欧洲的官方机构才认可经 AOAC 指南确认的新方法^[34]。相比之下, AOAC 确认中允许采用的参考方法范围则更广, 但主要仍然采用在美国普遍使用的标准方法。在 AOAC OMA 确认研究中, 由于方法适用范围往往涵盖多种由 FDA 和 USDA 分别监管的基质, 所以同一替代方法针对基质选择不同参考方法的做法较为常见^[35-38]。拟在我国适用的检验方法, 应优先考虑选择中国国家标准(Chinese National Standard, GB)、ISO、和 AOAC 方法作为参考方法。目前我国制定了的食品微生物方法验证的标准^[39-40], 分别是 RB/T 033—2020《微生物检测方法确认与验证指南》和 SN/T 3266—2012《食品微生物检验方法确认技术规范》。SN/T 3266—2012 和 ISO 16140 以及 AOAC 方法验证指导原则在样品制备和数据处理等方法有较大的差异; 而 RB/T 033 2020 和 ISO 16140 除了对协同实验室数目、低水平污染率测试样品中阳性检出率和定量样品检测的样品数目不同外, 其他要求基本一致。

在对标准方法进行更新或修订时, 可以选择标准方法的现有版本作为参考方法进行比对研究^[41-43]。当已验证的替代方法需要重新验证时, 通常选择初始验证研究中使

用的标准方法作为重新验证的参考方法,如果更新的应用范围有变更需求时,可以选择新的检测方法作为参考方法。下面以沙门氏菌快速检测方法即 VIDAS 方法确认为例进行说明。VIDAS 是一种酶联免疫荧光测定方法,能够快速自动筛选目标微生物。1996 年,利用沙门氏菌 VIDAS 测定法(VIDAS *Salmonella* Assay, SLM)快速筛选沙门氏菌首次得到 AOAC 确认,选用参考方法为 FDA BAM 和 AOAC 的传统培养法^[44]。随后,方法开发者在原 SLM (*Salmonella* Assay)方法的基础上,在预增菌前引入了免疫富集步骤,以取代后续的选择性增菌流程。为此再次以 BAM/AOAC 标准方法为参考方法,对新方法(VIDAS ICS/SLM)的不同版本(有/无选择性平板分离)重新进行了确认(2001.07、2001.08、2001.09)^[45-47]。2004 年,以 RV (rappaport vassiliadis *Salmonella* enrichment broth)肉汤取代了原 SLM 方法(996.08)中的选择性增菌肉汤 SC,并比对 BAM/AOAC 培养方法进行一系列新的确认,进而申请新的方法号(2004.03)^[48]。随后,开发者进一步简化了选择性增菌程序,并针对新方法(SLM Easy, 2011.03)进行了 OMA 确认。在此次方法变更后的确认过程中,选择了两种检测方法作为参考方法,除了选择原方法比对使用的 BAM 法外,还引用了 USDA MLG 标准方法作为参考方法^[49]。2013 年,SLM 方法进行了更新,主要更新内容在于新的 SLM 方法采用重组噬菌体蛋白作为新一代抗体蛋白 VIDAS UP (SPT) (2013.01)代替了旧版方法中的抗体,并以 MLG 为参考方法进行了方法比对确认^[50]。在按照 AOAC 方法比对指导原则进行确认的同时,AFNOR 和加拿大卫生部先后也对部分 VIDAS 方法进行了确认,但他们两家机构却选择了 ISO 标准方法以及相应的国家标准方法作为参考方法^[51]。

3.2 适用范围和基质的选择

除了参考方法,方法的适用范围是另一个需要考虑的关键因素^[52]。一般来说,方法确认的范围越广泛,可以声称的适用范围就越广泛,但这需要耗费大量的资源并且可能带来更高的确认失败率。因此,方法比对研究的范围应选择合适的应用范围。ISO 16140-2 附录 A 提供了详细地针对各种微生物的基质选择指导。

4 面临的挑战和未来研究趋势

方法比对研究是在假定被测试样品是相同的前提下进行的,理论上导致待比较方法和参考方法结果差异的唯一因素是待比较方法本身。但理想与现实往往相距甚远,实际上,目标微生物在大多数食品基质中无法做到均匀性分布,从而造成了不同检测方法之间的结果不完全一致。因此,检验方法在非均匀基质中的应用评价仍然是方法比对研究中的一个主要挑战。与之相关的另一个挑战来自如何保证大规模、多实验室协作研究中盲样的稳定性。根据

ISO 16140 的要求,所有协作实验应当在共同交流后指定的特定时间内启动检验程序,或在某些特殊情况下,由主持实验室分批次发放特定初始浓度的基质与测试菌株给各参与实验室,接着由各参与实验室在开始检验前自行制备各种梯度的人工污染检样。该方法虽然能部分解决目标菌在样品中稳定性差的问题^[53],但分发过程中样品的变化仍然不容忽视。鉴于此,在未来的方法比对研究中有必要进一步改进现有的研究方法,如开发高度稳定的储存、运输基质以及改进样本制备技术,以规避由基质的非均一性所带来的实验误差。此外,在开展多实验室协作研究时,应当同时进行样本的均匀性和稳定性评价实验,以确保获得可靠的结论。

不同指导标准之间缺乏统一性和兼容性,是方法比对和确认研究中另一个长期存在的问题。同一种候选方法往往需要经过不同认证机构的反复确认才能在全球范围内被广泛接受,这无疑将导致本可用于方法研发改进的资源被浪费在不断重复的方法确认的活动中。医药行业已经开始积极致力于建立统一的检测方法确认标准^[29-32],但迄今为止在食品行业尚缺乏利用统一标准进行方法确认,同时满足各认证机构要求的成功案例^[54]。因此,在方法比对及确认标准的进一步融合方向上仍然存在很大的研究空间和较多机遇。

不同标准测试方法之间的等效性问题是食品贸易中一个非常现实的障碍。在某些食品类别中,为满足不同地区以及各监管层面的监管要求,日常的产品检验必须使用多种标准方法重复进行^[8]。这将不可避免地阻碍国际贸易和各国在食品安全上的合作。要想在消除这些障碍方面取得重大进展,建立各标准方法的等效性是必不可少的第一步。目前文献中尚缺乏系统全面的针对标准方法的多实验室协作比对研究,而这也应成为方法比对领域下一步工作的重点研究方向。

我国食品质量监管部门对我国食品产品中微生物的检验制定了强制执行标准,即中国国家标准。但尚未针对食品加工过程控制建立相应的过程样本采集和环境样本检测的方法制定明确的要求^[55]。食品生产企业,尤其是中小型企业中,随意采用产品的 GB 检测方法检测环境样品,或在内部检验中采用未经确认的方法的现象较为普遍。由于许多 GB 标准检验方法的适用范围并不覆盖食品生产加工周期中的所有基质(尤其是环境样品),且许多替代方法并没有进行方法确认,超出方法的适用范围的应用所带来的风险不可忽视^[56-57]。从食品安全和生产角度来看,假阴性和假阳性结果的后果同等严重。原则上,任何方法在用于常规检验前,都必须在符合实际生产的条件下首先经过与标准方法的比对确认,然而许多食品企业并没有足够的资源来进行此类方法的研究^[58]。基于现状,监管机构、学术界及检测行业在食品链基质方法确认和比对方面仍有大

量的工作要做。此外,在食品行业开展方法比对与确认的专业培训对于提高业内人士正确使用微生物学方法的能力也能起到较大的帮助和指导作用。目前我国已经开始重视实验方法的比对、确认和验证。除已有的 SN/T 3266—2012《食品微生物检验方法确认技术规范》和 RB/T 033—2020《微生物检验方法确认与验证指南》,我国国家食品安全风险评估中心已经立项、起草和评审《食品安全国家标准微生物学检验方法验证通则》,相信我国的微生物检测方法的开发和应用正逐步构建更科学和更完善的方法体系。

参考文献

- [1] FLOWERS RS, JOAN KM, ROBISON BJ, *et al.* Enzyme immunoassay for detection of *Salmonella* in low-moisture foods: Collaborative study [J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1987, 70(3): 530–535.
- [2] LOWERS RS, JOAN KM, MOZOLA MA, *et al.* DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* in foods: Collaborative study [J]. *J Ass Anal Chem*, 1987, 70(3): 521–529.
- [3] 周锦祯, 徐红, 陈玲, 等. 3M Petrifilm~(TM)快速测试片与国标法检测饮料中霉菌和酵母的比较[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(11): 262–267. ZHOU JZ, XU H, CHEN L, *et al.* Comparison of 3M petrifilm~(TM) rapid test strips and the national standard method for analyzing the mold and yeast species in beverages [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2018, 34(11): 262–267.
- [4] 陈美莲, 章慧, 王仕英. Soleris 微生物实时光电法与平板计数法测定生乳中菌落总数的比较研究[J]. *乳业科学与技术*, 2018, 41(5): 24–27. CHEN ML, ZHANG H, WANG SY. Comparison of soleris real-time optoelectronic system with aerobic plate count method for detection of total bacterial count in raw milk [J]. *J Dairy Sci Technol*, 2018, 41(5): 24–27.
- [5] 林玉双, 蓝福胜, 廖燕萍, 等. 实时荧光 PCR 法和国标法检测乳粉中单增李斯特菌的比较研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(24): 9425–9429. LIN YS, LAN FS, LIAO YP, *et al.* Comparative study for detection of *Listeria monocytogenes* by real-time fluorescent polymerase chain reaction and national standard method in milk powder [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(24): 9425–9429.
- [6] JASSON V, JACXSENS L, LUNING P, *et al.* Alternative microbial methods: An overview and selection criteria [J]. *Food Microbiol*, 2010, 27(6): 710–730.
- [7] LOMBARD B, LECLERCQ A. Validation of innovative food microbiological methods according to the EN ISO 16140 standard [J]. *Food Anal Methods*, 2011;4(2): 163–172.
- [8] ESPELLAC S. Importance of using international method analysis of ISO/TC 34/SC 9 [Z].
- [9] BELETE T, CROWLEY E, BIRD P, *et al.* A comparison of the BAX system method to the U.S. food and drug administration's bacteriological analytical manual and international organization for standardization reference methods for the detection of *Salmonella* in a variety of soy ingredients [J]. *J Food Protect*, 2014, 77(10): 1778–1783.
- [10] DECORY TR, DURST RA, ZIMMERMAN SJ, *et al.* Development of an immunomagnetic bead-immunoliposome fluorescence assay for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 in aqueous samples and comparison of the assay with a standard microbiological method [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(4): 1856–1864.
- [11] DUFFY G, SHERIDAN JJ, HOFSTRA H, *et al.* A comparison of immunomagnetic and surface adhesion immunofluorescent techniques for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in meat [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1997, 24(6): 445–450.
- [12] WITKOWSKA E, KORSAK D, KOWALSKA A, *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy introduced into the International Standard Organization (ISO) regulations as an alternative method for detection and identification of pathogens in the food industry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(6): 1555–1567.
- [13] WANG H, GILL VS, CHENG CM, *et al.* Evaluation and comparison of rapid methods for the detection of *Salmonella* in naturally contaminated pine nuts using different preenrichment media [J]. *Food Microbiol*, 2015, 46: 58–65.
- [14] JACOBSON AP, HAMMACK TS, ANDREWS WH. Evaluation of sample preparation methods for the isolation of *Salmonella* from alfalfa and mung bean seeds with the Bacteriological Analytical Manual's *Salmonella* culture method [J]. *J AOAC Int*, 2008, 91(5): 1083–1089.
- [15] PINTO AD, FORTE V, GUASTADISEGNI MC, *et al.* A comparison of DNA extraction methods for food analysis [J]. *Food Control*, 2007, 18(1): 76–80.
- [16] IVERSEN C, FORSYTHE SJ. Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii* [J]. *Appl Environ Microb*, 2007, 73(1): 48–52.
- [17] JASSON V, RAJKOVIC A, BAERT L. *et al.* Comparison of enrichment conditions for rapid detection of low numbers of sublethally injured *Escherichia coli* O157 in food [J]. *J Food Protect*, 2009, 72(9): 1862–1868.
- [18] TERAMURA H, FUKUDA N, OKADA Y, *et al.* Comparison of chromogenic selective media for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. *Biocontrol Sci*, 2018, 23(1): 27–33.
- [19] HU L, DENG X, BROWN EW, *et al.* Evaluation of Roka Atlas *Salmonella* method for the detection of *Salmonella* in egg products in comparison with culture method, real-time PCR and isothermal amplification assays [J]. *Food Control*, 2018, 94: 123–131.
- [20] FELDSINE P, ABEYTA C, ANDREWS WH. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis [J]. *J AOAC Int*, 2012, 85(5): 1187–1200.
- [21] QVIST S, NordVal: A nordic system for validation of alternative microbiological methods [J]. *Food Control*, 2007, 18(2): 113–117.
- [22] CHEN Y, NOE KE, THOMPSON S, *et al.* Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration method for the detection of *Cronobacter* in powdered infant formula: A collaborative study [J]. *J Food Protect*, 2012, 75(6): 1144–1147.
- [23] 中华人民共和国认证认可行业标准, RB/T 037-2020. 食品微生物检测标准方法等效性评估指南[Z]. Certification and Accreditation Administration of China. RB/T 037–2020. Guidance for evaluating equivalence of food microbiological testing standard methods [Z].
- [24] FELDSINE PT, LIENAU AH, LEUNG SC, *et al.* Detection of *Salmonella* in fresh cheese, poultry products, and dried egg products by the ISO 6579 *Salmonella* culture procedure and the AOAC official method:

- Collaborative study [J]. J AOAC Int, 2019, 86(2): 275–295.
- [25] MOMOSE Y, OKADA Y, ASAKURA H, *et al.* Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1: 2006 for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: Collaborative study [J]. J AOAC Int, 2013, 96(5): 991–997.
- [26] KOYUNCU S, HAGGBLOM PA. Comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients [J]. BMC Vet Res, 2009, 5(1): 6.
- [27] MARGARITESCU I, WILRICH PT. Determination of the relative level of detection of a qualitative microbiological measurement method with respect to a reference measurement method [J]. J AOAC Int, 2013, 96(5): 1086–1091.
- [28] WEHLING P, LABUDDLE RA, BRUNELLE SL, *et al.* Probability of detection (POD) as a statistical model for the validation of qualitative methods [J]. J AOAC Int, 2011, 94(1): 335–347.
- [29] HUBERT P, NGUYEN-HUU JJ, BOULANGER B, *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-Part I [J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 36(3): 579–586.
- [30] HUBERT P, NGUYEN-HUU JJ, BOULANGER B, *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-part II [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 45(1): 70–81.
- [31] HUBERT P, NGUYEN-HUU JJ, BOULANGER B, *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-part III [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 45(1): 82–96.
- [32] HUBERT P, NGUYEN-HUU JJ, BOULANGER B, *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal part IV. Examples of application [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(3): 760–771.
- [33] Commission Regulation (EU) 2017/1495 amending Regulation (EC) No 2073/2005, 2017, as regards *Campylobacter* in broiler carcasses [Z].
- [34] ROHDE A, HAMMERL, JA, BOONE I, *et al.* Overview of validated alternative methods for the detection of foodborne bacterial pathogens [J]. Trends Food Sci Technol, 2017, 62: 113–118.
- [35] 陈秀云, 何泳媚, 许雪荷, 等. 3 种食品致病菌实时荧光核酸恒温扩增试剂盒方法验证比对研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(3): 1047–1052.
- CHEN XY, HE YM, XU XH, *et al.* Validation comparison analysis of 3 kinds of food pathogens simultaneous amplification and testing kit methods [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(3): 1047–1052.
- [36] 谭静, 平洋, 朱海华. 金黄色葡萄球菌两种检测方法的比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(6): 2277–2280.
- TAN J, PING Y, ZHU HH. Comparative study of 2 kinds of detection methods for *Staphylococcus aureus* [J]. 2016, 7(6): 2277–2280.
- [37] 王曦, 苏章庭, 李宏, 等. 平板计数法与纸片法检测食品微生物菌落总数的比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(16): 5489–5493.
- WANG X, SU ZT, LI H, *et al.* Comparison of plate counting method with paper slice method for detecting total bacterial count in food [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(16): 5489–5493.
- [38] 周阳, 祝长青, 郭桂萍, 等. 3 种单增李斯特氏菌快速检测方法的比较[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(8): 119–124.
- ZHOU Y, ZHU CQ, GUO GP, *et al.* Comparison of three analytical methods for rapid detection of *Listeria monocytogenes* [J]. J Northwest Agric Forest Univ (Nat Sci Ed), 2014, 42(8): 119–124.
- [39] 微生物检测方法确认与验证指南[Z].
- Guidance on verification and validation of microbiological testing methods [Z].
- [40] 食品微生物检验方法确认技术规范[Z].
- Guideline for validation of food microbiological test methods [Z].
- [41] BENITO A, BESSE NG, DESFORGES I, *et al.* Validation of standard method EN ISO 22964: 2017—Microbiology of the food chain—Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. [J]. Int J Food Microbiol, 2019, 288: 47–52.
- [42] BESSE NG, LECLERCQ A, MALADEN V, *et al.* Evaluation of the International Organization for Standardization-International Dairy Federation (ISO/IDF) draft standard method for detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant food formulas [J]. J AOAC Int, 2006, 89: 1309–1316.
- [43] POELMA PL, ANDREWS WH, WILSON CR, *et al.* Recovery of *Salmonella* species from nonfat dry milk rehydrated under rapid and reduced pre-enrichment conditions: Collaborative study [J]. J Ass Anal Chem, 1984, 67(4): 807–810.
- [44] CURIALE MS, GANGAR V, GRAVENS C, *et al.* VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay for detection of *Salmonella* in foods: Collaborative study [J]. J AOAC Int, 1997, 80(3): 491–504.
- [45] LEPPER WA, SCHULTZ AM, CURIALE MS, *et al.* *Salmonella* in selected foods by VIDAS® Immuno-Concentration *Salmonella* plus selective plate method (Hektoen Enteric, Xylose Lysine Desoxycholate, Bismuth Sulfite): Collaborative study [J]. J AOAC Int, 2002, 85(3): 593–608.
- [46] MCMAHON WA, SCHULTZ AM, JOHNSON RL. Evaluation of VIDAS immuno-concentration *Salmonella* (ICS)/VIDAS *Salmonella* (SLM) immunoassay method for detection of *Salmonella* in selected foods (Method modification 2001.09): Collaborative study [J]. J AOAC Int, 2004, 87(2): 390–394.
- [47] MCMAHON WA, SCHULTZ AM, JOHNSON RL. Evaluation of VIDAS® immuno-concentration *Salmonella* (ICS) plus selective plate method (Hektoen enteric, Bismuth Sulfite, *Salmonella* Identification) for detection of *Salmonella* in selected foods (Method modification 2001.07): Collaborative study [J]. J AOAC Int, 2004, 87(2): 380–384.
- [48] MCMAHON WA, SCHULTZ AM, JOHNSON RL, *et al.* Evaluation of VIDAS® *Salmonella* (SLM) immunoassay method with rappaport-vassiliadis (RV) medium for detection of *Salmonella* in foods: Collaborative study [J]. J AOAC Int, 2004, 87(4): 867–883.
- [49] CROWLEY E, BIRD P, FISHER K, *et al.* Evaluation of VIDAS® *Salmonella* (SLM) easy *Salmonella* method for the detection of *Salmonella* in a variety of foods: Collaborative study [J]. J AOAC Int, 2011, 94(6): 1821–1834.
- [50] BIRD P, FISHER K, BOYLE M, *et al.* Evaluation of VIDAS® UP *Salmonella* (SPT) assay for the detection of *Salmonella* in a variety of foods and environmental samples: Collaborative study [J]. J AOAC Int, 2013, 96(4): 808–821.
- [51] ADRIA D. Nf validation summary report: VIDAS UP *Salmonella* (VIDAS SPT ref. 30707) for the detection of *Salmonella* spp. In a broad range of foods, feed, pet food, production environmental samples and primary production samples [Z].
- [52] 谢雪钦. 食品微生物快速检测方法优劣比较[J]. 质量技术监督研究,

- 2013, 3: 1–7.
- XIE XQ. Comparison of advantages and disadvantages of rapid detection methods for foodborne microbial pathogens [J]. *Qual Technol Superv Res*, 2013, 3: 1–7.
- [53] MOOIJMAN KA, PIELAAT A, KUIJPERS AFA. Validation of EN ISO 6579-1-Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*-Part 1 detection of *Salmonella* spp. [J]. *Int J Food Microbiol*, 2019, 288: 3–12.
- [54] 杨春江, 马孝斌, 莫勋. 欧盟食品微生物分析替代方法验证系统简介 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(12): 5095–5099.
- YANG CJ, MA XB, MO X. Introduction of European validation system of alternative methods for food microbiology analysis [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(12): 5095–5099.
- [55] 姬莉莉, 闫雪. 食品中微生物限量要求及检测技术发展趋势 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(2): 459–465.
- JI LL, YAN X. Requirements of microbial limit and development trend of detection technology [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(2): 459–465.
- [56] 张炎鑫, 芦云, 王新宇, 等. 实时荧光聚合酶链式反应技术与国标方法检测致病菌的应用与研究 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(6): 1941–1946.
- ZHANG YX, LU Y, WANG XY, *et al.* Application and research of real-time polymerase chain reaction and national standard method for detection of pathogenic bacteria [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(6): 1941–1946.
- [57] 张芬. 3 种方法检测食品中菌落总数的比较研究 [J]. *现代食品*, 2020, 5(10): 214–216.
- ZHANG F. A comparative study of three methods to detect the total number of colonies in food [J]. *Mod Food*, 2020, 5(10): 214–216.
- [58] II-HOON C, SEOCKMO K. Current technical approaches for the early detection of foodborne pathogens: Challenges and opportunities [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): 2078.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



张鑫欣, 硕士, 主要研究方向为食品微生物与食品安全。

E-mail: cecilia.zhang@danone.com



陈 婧, 博士, 主要研究方向为食品微生物与环境监控。

E-mail: jing.chen@mxns.com