



中华人民共和国国家标准

GB 4789.45—2023

食品安全国家标准 微生物检验方法验证通则

2023-09-06 发布

2024-09-06 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

目 次

1 范围	1
2 术语和定义	1
3 微生物检验方法验证一般要求	2
3.1 性能参数的选择	2
3.2 代表性食品的选择	2
3.3 验证样品的要求	2
3.4 数据处理要求	3
4 微生物检验方法性能参数的验证	3
4.1 灵敏度	3
4.2 包容性和排他性	4
4.3 准确度	4
附录 A 微生物检验方法验证用食品样品分类表	6
附录 B 灵敏度计算方法	9
附录 C 实验室内验证准确度计算方法	10
附录 D 实验室间验证准确度计算方法	12

食品安全国家标准

微生物检验方法验证通则

1 范围

本标准规定了食品安全国家标准微生物检验方法验证的通用要求。
本标准适用于食品安全国家标准微生物检验方法制定和修订过程中的验证。

2 术语和定义

2.1 方法验证

提供客观有效证据证实分析方法性能参数满足方法预期用途的试验活动。

2.2 定性方法

检验样品中是否存在目标微生物的方法。

2.3 定量方法

测定样品中目标微生物数量或浓度的方法。

2.4 参考方法

得到公认或广泛接受的微生物传统培养法。

2.5 灵敏度

待验证的定性方法从样品中检出目标微生物的能力。

2.6 包容性

待验证方法对目标微生物的检出能力。

2.7 排他性

待验证方法对非目标微生物的抗干扰能力。

2.8 准确度

定量方法的测试结果与样品真值间的一致程度。

2.9 试样

来源于样品,用于测试的且能代表其特性的部分。

2.10 部分检出水平

采用定性方法测试一组平行样品时,检出概率在 25%~75%时样品的污染水平。

2.11 50%检出限(LOD₅₀)

定性方法检出概率为 50%时,样品中目标微生物的浓度。

2.12 相对检出限(RLOD)

如果验证时有参考方法,待验证方法与参考方法两者 50%检出限的比值。

2.13 配对/非配对分析

2 种定性方法同时检验某一样品时,若第一步增菌方法相同,可使用该样品的同一试样进行分析,该分析称为“配对分析”;若第一步增菌方法不同,则使用该样品的不同试样分别进行分析,该分析称为“非配对分析”。

3 微生物检验方法验证一般要求

3.1 性能参数的选择

根据待验证方法的类型按表 1 选择合适的性能参数进行验证。

表 1 性能参数的选择

方法类型	验证阶段	灵敏度	包容性	排他性	准确度
定性方法	实验室内验证	√	√	√	—
	实验室间验证	√	—	—	—
定量方法	实验室内验证	—	√	√	√
	实验室间验证	—	—	—	√

注 1: “√”表示必选性能参数;“—”表示不适用。
 注 2: 不含确证步骤的定量方法(例如:菌落总数、霉菌和酵母计数)无需验证包容性和排他性。
 注 3: MPN 法的验证按照定性方法的验证进行。

3.2 代表性食品的选择

3.2.1 方法验证时,代表性食品的选择应优先考虑目标微生物和食品样品的特性,再考虑法规限量要求涉及的食物种类或高风险的食物种类。代表性食品的选择参见附录 A。选择食品子类时,宜考虑不同的加工方式,每种食品子类应分别进行验证。

3.2.2 实验室内验证时,如果待验证方法的适用范围为“食品”,应至少选择 5 种食品种类,如果适用范围少于 5 种食品种类,应全部选择。每种食品种类至少选择 1 种食品子类。

3.2.3 实验室间验证时,如果待验证方法的适用范围为“食品”,应至少选择 3 种食品种类,如果适用范围少于 3 种食品种类,应全部选择。每种食品种类至少选择 1 种食品子类。

3.3 验证样品的要求

3.3.1 样品类型的选择

如果验证时无参考方法,优先选择标准物质或标准样品,其次选择人工污染样品。

如果验证时有参考方法,宜按自然污染样品、混合污染样品、人工污染样品、标准物质或标准样品的

顺序依次选择样品类型。

注：混合污染样品是指将自然污染样品与不含有目标微生物的同类食品样品进行均匀混合的样品。

3.3.2 人工污染样品的制备

3.3.2.1 培养物的准备

优先选择从食品中分离的菌株，不同食品子类验证用的菌株尽可能分离自相应的食品子类，也可使用其他实验室分离或从菌种保藏机构购买的菌株。所有分离株应经过准确鉴定，且来源应是已知的、可溯源的。

对于含确证步骤的方法的验证，每种食品子类仅需选择 1 种目标微生物。对于不含确证步骤的定量方法的验证，每种食品子类应选择不同种类具有代表性的微生物，例如，菌落总数的方法验证样品可以选择金黄色葡萄球菌（代表革兰氏阳性菌）、大肠埃希氏菌（代表革兰氏阴性菌）和枯草芽孢杆菌（代表含芽孢细菌）。

按合适的条件培养目标微生物菌株。如果目标微生物有多种，应先分别培养，再进行等量混合。

如果样品不含自然背景菌群，必要时可添加背景菌群。背景菌群的污染水平应至少高于目标微生物浓度的 10 倍，可采用适当的计数方法确认其污染水平符合要求。

3.3.2.2 样品的人工污染

培养物用稀释液稀释至污染样品所需的合适浓度。如果稀释不能有效去除培养物中的培养基，在稀释前用稀释液漂洗和离心 2 次~3 次去除培养基。

将培养物稀释液添加到样品中时，稀释液体积不能影响样品的状态。当稀释液体积可能影响到样品状态时，应将合适浓度的稀释液制成冻干粉。当冻干粉中目标微生物浓度无法达到制备低污染水平样品所需的浓度水平时，将冻干粉与另外不含培养物的冻干粉混合均匀以稀释至污染样品的合适浓度。

宜选取含背景菌群的样品，但应确保样品中不含有目标微生物。将稀释至合适浓度的培养物（稀释液或冻干粉）接种到样品上。样品应混合均匀并确保稳定性。如果样品不易混合均匀，可单独制备每个样品，将每个样品的量缩小为试样的量，整个样品用于测试。用于非配对分析的样品如果不易混合均匀，可以分别制备不同的试样，视为同一个样品。

3.3.2.3 样品接受参考值的确定

对于无参考方法的验证，可采用适当的计数方法测定所添加的目标微生物的浓度，并换算为样品中目标微生物的浓度作为样品接受参考值。

3.4 数据处理的要求

方法研制实验室需对所有实验室验证数据进行异常值检验和统计分析，方法可采用格拉布斯（Grubbs）检验等统计学方法或技术分析方法。计数结果应转换为常用对数值后，再进行后续计算。

4 微生物检验方法性能参数的验证

4.1 灵敏度

4.1.1 验证方法

实验室内验证时，至少测试 20 个平行样品。

实验室间验证时，每个验证实验室测试 8 个平行样品。

样品污染水平应为部分检出水平。如果验证时无参考方法，且样品的接受参考值未知时，需按

3.3.2.3 规定的方法确定样品接受参考值。

如果验证时无参考方法,采用待验证方法进行测试;如果验证时有参考方法,分别采用参考方法和待验证方法进行测试。测试时,每种食品子类设空白对照和阳性对照(污染水平是部分检出水平 10 倍以上)各 1 个。

本标准中灵敏度用 50%检出限(LOD_{50})或相对检出限(RLOD)表示。如果验证时无参考方法,按 B.1 计算 LOD_{50} ;如果验证时有参考方法,按 B.2 计算 RLOD。

4.1.2 验证要求

如果验证时无参考方法,待验证方法的灵敏度用 LOD_{50} 表示。定性方法的 LOD_{50} 无接受限,MPN 法的 LOD_{50} 接受限为 5 CFU。如果 MPN 法的 LOD_{50} 不超过接受限,则其灵敏度符合要求。

如果验证时有参考方法,待验证方法的灵敏度用 RLOD 表示。对于配对分析,RLOD 接受限为 1.5;对于非配对分析,RLOD 接受限为 2.5。如果 RLOD 不超过接受限,则待验证方法的灵敏度符合要求。

4.2 包容性和排他性

4.2.1 验证方法

包容性和排他性试验所选用菌株应反映目标微生物和非目标微生物的表型、基因型和(或)血清型的多样性。包容性试验所选用菌株应覆盖目标微生物分类单位及其下一级分类单位(如果有)的种类。排他性试验所选用菌株应覆盖目标微生物分类单位外同一级的密切相关的种类,还应包含样品通常含有的优势种类(数量不应超过排他性试验选择菌株总数的 1/3)。

包容性试验需要选择至少 30 株目标微生物,对于沙门氏菌检验方法的包容性试验,选择不同血清型的至少 50 株沙门氏菌,应涵盖主要沙门氏菌血清型。排他性试验至少选择 30 株非目标微生物。

直接对纯培养物采用待验证方法进行测试,每个测试中纯培养物的接种量宜为 10^2 CFU ~ 10^3 CFU。

4.2.2 验证要求

包容性试验检出目标微生物的测试结果数量与所选择的菌株数量相等,则待验证方法的包容性符合要求。

排他性试验未检出目标微生物的测试结果数量与所选择的菌株数量相等,则待验证方法的排他性符合要求。

4.3 准确度

4.3.1 验证方法

对于每一种食品子类,应选择低、中、高 3 个浓度水平。低水平大约是理论检出限的 10 倍,高水平至少是限量的 100 倍。如果没有限量,卫生指标菌和致病菌最高污染水平分别设定为约 10^7 CFU/g (mL)和 10^5 CFU/g (mL)。

实验室内验证获得重复性条件下的准确度,每个浓度各取 2 个样品,每个样品分别取 5 个试样进行测试。

实验室内验证获得再现性条件下的准确度,每个浓度各取 1 个样品,每个样品分别取 2 个试样进行测试。

如果验证时无参考方法,采用待验证方法进行测试;如果验证时有参考方法,分别采用参考方法和待验证方法进行测试。测试时,每种食品子类设 1 个空白对照。

实验室内验证和实验室间验证分别按附录 C 和附录 D 计算待验证方法的 β -期望容忍区间(β -ETI)的上下限,必要时计算新的接受限 AL_s 。

4.3.2 验证要求

准确度验证的接受限为 ± 0.5 对数值。

如果所有样品 β -ETI 上限 U 都不高于 0.5 且下限 L 都不低于 -0.5 ,则待验证方法准确度符合要求;如果有样品 β -ETI 上限 U 高于 0.5 或下限 L 低于 -0.5 ,但都不超出 AL_s ,则待验证方法准确度也符合要求。

附 录 A
微生物检验方法验证用食品样品分类表

食品种类和食品子类见表 A.1。

表 A.1 食品种类和食品子类

食品种类	食品子类
乳及乳制品	生乳
	巴氏杀菌乳
	灭菌乳
	发酵乳
	乳粉
	干酪
冷冻饮品	冰淇淋、雪糕类
	风味冰、冰棍类
水果和蔬菜	新鲜水果和蔬菜
	冷冻水果和蔬菜
	水果干和干制蔬菜
	果脯类、蜜饯类
	发酵或腌渍蔬菜
	水果和蔬菜罐头
豆类制品	非发酵豆制品
	发酵豆制品
	豆粉
坚果和籽类	新鲜坚果与籽类
	熟制坚果与籽类
	坚果与籽类的泥(酱)
粮食和粮食制品	生湿面制品
	即食谷物
	熟制面食
	方便米面制品
	冷冻米面制品
	生干面制品
	小麦粉

表 A.1 食品种类和食品子类（续）

食品种类	食品子类
焙烤食品	面包
	糕点
	饼干
肉及肉制品	生鲜肉(禽肉除外)
	酱卤肉(禽肉除外)
	冻肉(禽肉除外)
	发酵肉制品(禽肉除外)
	腌腊肉制品(禽肉除外)
	肉罐头
	生鲜禽肉
	熟禽肉制品
	冻禽肉
水产及其制品	鲜水产
	熟制水产品
	冷冻水产品
	腌制水产品
	水产品罐头
蛋及蛋制品	鲜蛋
	卤蛋、皮蛋、咸蛋
	蛋制品
油脂及其制品	植物油脂
	动物油脂
	油脂制品
甜味料	食糖
	蜂蜜
调味品	酱油
	香辛料
	蛋黄酱、沙拉酱
特殊膳食用食品	婴幼儿配方食品
	婴幼儿辅助食品
	其他特殊膳食用食品

表 A.1 食品种类和食品子类 (续)

食品种类	食品子类
饮料类	鲜果蔬汁(浆)
	果蔬汁(浆)类饮料
	浓缩果蔬汁(浆)
	碳酸饮料
	茶(类)饮料
	咖啡(类)饮料
	固体饮料
可可制品、巧克力和巧克力制品以及糖果	可可制品或巧克力制品
	巧克力
	可可粉或巧克力粉
	糖果

附录 B 灵敏度计算方法

B.1 LOD₅₀ 的计算

根据式(B.1)计算 LOD₅₀ (单位为“CFU”)。

$$\text{LOD}_{50} = \frac{0.7 \times d \times m}{\ln[n/(n - y)]} \dots\dots\dots (\text{B.1})$$

式中：

d ——样品的接受参考值,单位为 CFU/g(mL)；

m ——试样量,单位为 g(mL)；

n ——测试总数；

y ——阳性结果数。

B.2 RLOD 的计算

根据式(B.2)计算 RLOD。

$$\text{RLOD} = \frac{\ln[n_{\text{ref}}/(n_{\text{ref}} - y_{\text{ref}})]}{\ln[n_{\text{val}}/(n_{\text{val}} - y_{\text{val}})]} \dots\dots\dots (\text{B.2})$$

式中：

n_{ref} ——参考方法的测试总数；

y_{ref} ——参考方法的阳性结果数；

n_{val} ——待验证方法的测试总数；

y_{val} ——待验证方法的阳性结果数。

附 录 C
实验室内部验证准确度计算方法

C.1 偏倚的计算

计算每个样品的偏倚 $B_i = Y_i - X_i$,其中: Y_i 是样品 i 的待验证方法计数结果(对数值)的中位值, X_i 是样品 i 的接受参考值(无参考方法)或参考方法计数结果(对数值)的中位值。

C.2 待验证方法合成标准差的计算

分别计算待验证方法(无参考方法)和参考方法(如果有)的合成标准差 S_{val} 和 S_{ref} 。

$$S_{\text{val},i} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2} \dots\dots\dots (C.1)$$

$$S_{\text{val}} = \sqrt{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q S_{\text{val},i}^2} \dots\dots\dots (C.2)$$

$$S_{\text{ref},i} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2} \dots\dots\dots (C.3)$$

$$S_{\text{ref}} = \sqrt{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q S_{\text{ref},i}^2} \dots\dots\dots (C.4)$$

式中:

- n —— 重复测试数量, $n=5$;
- j —— 某个重复测试, $1 \leq j \leq n$;
- i —— 某个特定的样品, $1 \leq i \leq q$;
- y_{ij} —— 样品 i 的待验证方法第 j 个重复测试结果;
- \bar{y}_i —— 样品 i 的待验证方法重复测试结果的平均值;
- q —— 样品数量, $q=6$;
- $S_{\text{val},i}$ —— 样品 i 的待验证方法重复测试结果标准差;
- x_{ij} —— 样品 i 的参考方法第 j 个重复测试结果;
- \bar{x}_i —— 样品 i 的参考方法重复测试结果的平均值;
- $S_{\text{ref},i}$ —— 样品 i 的参考方法重复测试结果标准差。

C.3 每个样品 β -ETI 上下限的计算

β 设为 80%, 计算每个样品的 β -ETI 的上限 U_i 和下限 L_i :

$$U_i = B_i + t_{0.9}(df) \times S_{\text{val}} \times \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \dots\dots\dots (C.5)$$

$$L_i = B_i - t_{0.9}(df) \times S_{\text{val}} \times \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \dots\dots\dots (C.6)$$

式中:

- $t_{0.9}(df)$ —— 自由度 df 和概率 β 的 t 分布双侧分位数。可以通过查 t 分布分位数表, 或使用相关软件计算获得;
- df —— 自由度, 为 $q \times (n-1)$ 。

C.4 准确度图(实验室内)的绘制

以 X 为横坐标、 B 为纵坐标绘制折线图,并在图上绘制接受限的 2 条水平线(± 0.5 对数值)以及 β -ETI 上下限的 2 条折线。

如果验证时无参考方法,且 β -ETI 上下限有值超出接受限,在可以获得样品重复性标准差的情况下,将此标准差乘以 4 作为新的接受限 AL_s 。

如果验证时有参考方法,且 β -ETI 上下限有值超出接受限,按式(C.7)计算新的接受限 AL_s 。

$$AL_s = \pm 4 \times S_{ref} \quad \dots\dots\dots (C.7)$$

附 录 D
实验室间验证准确度计算方法

D.1 偏倚的计算

对每个污染水平分别进行分析和计算。

计算偏倚 $B=Y-X$, 其中: Y 是所有验证实验室待验证方法的样品计数结果(对数值)平均值, X 是样品的接受参考值(无参考方法)或所有验证实验室参考方法的样品计数结果(对数值)平均值。

D.2 待验证方法精密度的计算

先按式(D.1)和式(D.2)计算每个验证实验室的待验证方法测试结果的方差。

$$\bar{y}_k = \frac{\sum_{j=1}^n y_{jk}}{n} \dots\dots\dots (D.1)$$

$$S_k^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_k)^2}{n - 1} \dots\dots\dots (D.2)$$

式中:

\bar{y}_k ——第 k 个验证实验室的待验证方法重复测试结果的平均值;

y_{jk} ——第 k 个验证实验室的待验证方法第 j 个重复测试结果;

S_k^2 ——第 k 个验证实验室的待验证方法测试结果的方差;

n ——重复测试数, $n=2$ 。

再分别按式(D.3)和式(D.4)计算待验证方法的重复性标准差 S_r , 实验室间标准差 S_L 。

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^p S_k^2}{p}} \dots\dots\dots (D.3)$$

$$S_L^2 = \frac{1}{p - 1} \sum_{k=1}^p (\bar{y}_k - Y)^2 - \frac{S_r^2}{2} \dots\dots\dots (D.4)$$

式中:

p ——返回有效数据的验证实验室数。

由于受到误差影响, 当 $S_L^2 < 0$ 时, 应将该值设置为零。

按式(D.5)计算再现性标准差 S_R , 分别按式(D.6)和式(D.7)计算重复性限 r 和再现性限 R :

$$S_R = \sqrt{S_L^2 + S_r^2} \dots\dots\dots (D.5)$$

$$r = 2.8 S_r \dots\dots\dots (D.6)$$

$$R = 2.8 S_R \dots\dots\dots (D.7)$$

重复性限 r 和再现性限 R 虽然不参与后续计算, 但作为方法的关键性能参数需在验证报告中列出。

D.3 每个污染水平 β -ETI 上下限的计算

按式(D.8)计算待验证方法的容忍区间标准差 S_{TI} :

$$S_{TI} = S_R \times \sqrt{1 + \frac{n \times S_L^2 + S_r^2}{p \times n \times S_R^2}} \dots\dots\dots (D.8)$$

再按式(D.9)计算自由度:

$$df = \frac{(S_R^2 / S_r^2)^2}{(S_L^2 / S_r^2 + 1/n)^2 / (p-1) + (n-1) / (p \times n^2)} \quad \dots\dots\dots (D.9)$$

β 设为 80%, 分别按式(D.10)和式(D.11)计算待验证方法每个污染水平的 β -ETI 的上限 U 与下限 L 。

$$U = B + t_{0.9}(df) \times S_{TI} \quad \dots\dots\dots (D.10)$$

$$L = B - t_{0.9}(df) \times S_{TI} \quad \dots\dots\dots (D.11)$$

式中:

df —— 自由度;

$t_{0.9}(df)$ —— 自由度 df 和概率 $\beta(\beta=80\%)$ 的 t 分布双侧分位数。 df 不是整数, 可以查扩展 t 分布分位数表, 或使用相关软件计算获得。

D.4 准确度图(实验室间)的绘制

以 X 为横坐标、 B 为纵坐标绘制折线图, 并在图上绘制接受限的 2 条水平线(± 0.5 对数值)以及 β -ETI 上下限的 2 条折线。

如果验证时无参考方法, 且 β -ETI 上下限有值超出接受限, 在可以获得样品再现性标准差的情况下, 将此标准差乘以 3.3 作为新的接受限 AL_s 。

如果验证时有参考方法, 且 β -ETI 上下限有值超出接受限, 则按式(D.12)和式(D.13)计算新的接受限 AL_s :

$$AL_s = \pm 3.3 \times S_{R, \text{ref}} \quad \dots\dots\dots (D.12)$$

$$S_{R, \text{ref}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^q S_{Ri}^2}{q}} \quad \dots\dots\dots (D.13)$$

式中:

q —— 污染水平数, $q=3$;

$S_{R, \text{ref}}$ —— 全部污染水平参考方法的合成再现性标准差;

S_{Ri} —— 污染水平 i 的参考方法的再现性标准差。