

## GB 4789.40-2016和ISO 22964:2017方法检测婴幼儿配方奶粉中克罗诺杆菌属的实验室适用性研究

张鑫欣, 陈万义, 陈婧, 杨晶华, 徐杰, 刘美云, 胡瑜, 姜勇

### An Interlaboratory Method Applicability Study of GB 4789.40-2016 and ISO 22964:2017 for the Detection of *Cronobacter* spp. in Powdered Infant Formula

ZHANG Xinxin, CHEN Wanyi, CHEN Jing, YANG Jinghua, XU Jie, LIU Meiyun, HU Yu, and JIANG Yong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022100120>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

多重PCR检测婴幼儿配方奶粉中3种食源性致病菌

Multiplex PCR for the Detection of Three Foodborne Pathogens in Powdered Infant Formula

食品工业科技. 2018, 39(14): 213-218 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.14.040>

婴幼儿配方乳粉加工环境中蜡样芽孢杆菌多位点序列分型

Multilocus Sequence Typing of *Bacillus cereus* Isolates from the Processing Environment of Powdered Infant Formula

食品工业科技. 2018, 39(23): 134-138,145 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.23.024>

克罗诺杆菌在特殊环境中耐受性与耐药性的研究进展

Research Progress of Tolerance and Drug Resistance of *Cronobacter* in Special Environments

食品工业科技. 2020, 41(5): 328-331,339 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.05.053>

添加扩增内标的PCR方法快速检测食品中的阪崎克罗诺杆菌

Establishment of a PCR method with an internal amplification control for detection of *Cronobacter sakazakii* in foods

食品工业科技. 2017(02): 49-52 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.02.001>

食品中克罗诺杆菌分离菌株生物被膜形成、耐药性及毒力基因检测

Biofilm Formation, Antimicrobial Susceptibility and Virulence Gene Detection in *Cronobacter* spp. Isolated from Food Sources

食品工业科技. 2019, 40(4): 106-111 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.04.017>

婴幼儿奶粉中阪崎肠杆菌双重荧光PCR快速检测方法的建立

Novel duplex real-time Taqman PCR assay for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula

食品工业科技. 2018, 39(6): 246-249,297 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.06.045>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张鑫欣, 陈万义, 陈婧, 等. GB 4789.40-2016 和 ISO 22964:2017 方法检测婴幼儿配方奶粉中克罗诺杆菌属的实验室适用性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(8): 351-358. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100120

ZHANG Xinxin, CHEN Wanyi, CHEN Jing, et al. An Interlaboratory Method Applicability Study of GB 4789.40-2016 and ISO 22964:2017 for the Detection of *Cronobacter* spp. in Powdered Infant Formula[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(8): 351-358. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100120

· 分析检测 ·

# GB 4789.40-2016 和 ISO 22964:2017 方法检测婴幼儿配方奶粉中克罗诺杆菌属的实验室适用性研究

张鑫欣<sup>1</sup>, 陈万义<sup>2,\*</sup>, 陈婧<sup>2</sup>, 杨晶华<sup>1</sup>, 徐杰<sup>1</sup>, 刘美云<sup>2</sup>, 胡瑜<sup>2</sup>, 姜勇<sup>1</sup>

(1. 达能开放科学研究中心, 上海 201204;

2. 梅里埃营养科学(中国)食品科学中心, 上海 201112)

**摘要:** 克罗诺杆菌属(原阪崎肠杆菌)可在婴幼儿配方粉(Powdered Infant Formula, PIF)中长期存活。随着食品贸易的全球化, 人们对婴幼儿配方粉(PIF)中克罗诺杆菌的污染尤为关注。本文参照 ISO 16140-2 2016 中方法比对的原则要求, 对检测 PIF 中克罗诺杆菌的中国标准方法 GB 4789.40-2016 (参考方法) 和欧盟标准方法 EN ISO 22964:2017 (替代方法) 进行了方法比较研究。共有 12 个外部实验室参与检测 3 个不同污染水平(0 MPN/10 g, 1.299 MPN/10 g 和 2.210 PMN/10 g)下添加了测试菌株的 576 份盲样的测试。结果表明, 在低污染水平和高污染水平下, GB 4789.40-2016 的灵敏度分别为 80.00% 和 81.16%, 而 ISO 22964:2017 对应的灵敏度分别为 90.00% 和 97.10%。无论污染程度如何, 相对检测水平(RLODs)都低于接受限(AL=2.5)。同时, 采用 AOAC 指南中提出的检测概率(POD)模型对统计数据进行了分析, 结果显示替代方法和参考方法之间没有统计学上的显著差异。据此得出用于检测 PIF 中阪崎克罗诺杆菌的 GB 4789.40-2016 方法与 ISO 22964:2017 方法具有等效性。

**关键词:** 方法比较, 克罗诺杆菌, 婴幼儿配方粉, 检测, 等效性

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)08-0351-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100120

本文网刊:



## An Interlaboratory Method Applicability Study of GB 4789.40-2016 and ISO 22964:2017 for the Detection of *Cronobacter* spp. in Powdered Infant Formula

ZHANG Xinxin<sup>1</sup>, CHEN Wanyi<sup>2,\*</sup>, CHEN Jing<sup>2</sup>, YANG Jinghua<sup>1</sup>, XU Jie<sup>1</sup>,  
LIU Meiyun<sup>2</sup>, HU Yu<sup>2</sup>, JIANG Yong<sup>1</sup>

(1. Danone Open Science Research Center, Shanghai 201204, China;

2. Mérieux NutriSciences (China) Food Science Center, Shanghai 201112, China)

**Abstract:** It is documented that *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) can survive in powdered infant formula (PIF) for a long period, and special concerns have been raised about the safety of powdered infant formula (PIF) contaminated by *Cronobacter* spp. with the globalization of the food supply. This study compared the methods for detecting *Cronobacter* spp. in PIF of the Chinese standard method GB 4789.40-2016 (reference method) and the European standard method EN ISO 22964:2017 (alternative method) according to the principle requirements of method comparison in ISO 16140-2 2016. A total of 576 blind-coded test portions of the product spiked with the test strain at three different

收稿日期: 2022-10-14 +并列第一作者

基金项目: 国家重点研发计划中欧食品安全合作项目(2017TNE110800); 欧盟地平线 2020 计划(727864)。

作者简介: 张鑫欣(1979-), 硕士, 研究方向: 食品微生物与食品安全, E-mail: cecilia.zhang@danone.com。

陈万义(1975-), 博士, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: ronnie.chen@mxn.cn。

contamination levels (0 MPN/10 g, 1.299 MPN/10 g and 2.210 PMN/10 g) were analyzed by 12 participating laboratories. The results showed that the sensitivity of GB 4789.40-2016 was 80.00% at the low contamination level and 81.16% at the high level, while those of ISO 22964:2017 were 90.00% and 97.10%, respectively. The relative levels of detection (RLODs) were below the acceptance limit (AL=2.5) regardless of the contamination level, and the probability of detection (POD) model proposed in the AOAC guidelines was analyzed. Results revealed no statistically significant difference between the alternative and reference methods. It was concluded that the GB 4789.40-2016 method for the detection of *C. sakazakii* in PIF was equivalent to the ISO 22964:2017 method.

**Key words:** method comparison; *Cronobacter*; powdered infant formula; detection; equivalence

基于生理生化特征和 DNA 杂交和 16s rRNA 测序等分子生物学方法将克罗诺杆菌(原阪崎肠杆菌)归类为肠杆菌科的一个新的属即克罗诺杆菌属(*Cronobacter* spp.)<sup>[1]</sup>。该属包括 7 个种,包括阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)、穆汀斯克罗诺杆菌(*C. muytjensii*)、都柏林克罗诺杆菌(*C. dublinensis*)、广泛克罗诺杆菌(*C. universalis*)、香料克罗诺杆菌(*C. condimenti*)<sup>[2-3]</sup>。克罗诺杆菌属菌株是一类条件致病菌,可引起新生儿和免疫力低下人群严重的感染,如脑膜炎、败血症和坏死性小肠结肠炎等疾病<sup>[4-5]</sup>,其中阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)被认为是导致大多数严重疾病的致病性较强的克罗诺杆菌<sup>[6]</sup>。

尽管克罗诺杆菌属菌株的污染来源及其传播方式仍不十分清楚,但被污染的食物,特别是婴幼儿配方粉(PIF),被认为是克罗诺杆菌的主要传播介质,灰尘和空气被认为是次要传播载体<sup>[5,7]</sup>。文献研究进一步发现,PIF 在包装和运输过程中受到克罗诺杆菌属的二次污染也是主要的污染方式之一<sup>[8]</sup>。同时,生物膜的形成有助于克罗诺杆菌属菌株更好地黏附于设备和包材表面,从而增加了该菌污染 PIF 的可能性。因此,从原辅料到终产品,对生产 PIF 的全产业链中的克罗诺杆菌属进行检测和监控,了解克罗诺杆菌的传播途径(如原料或环境)和潜在的污染介质(如婴幼儿配方粉或谷物制品),为预防该菌污染 PIF 提供更好的监控,为采取控制措施提供可靠的依据<sup>[9]</sup>。

目前,国际标准化组织和国际乳品联合会推荐的用于检测 PIF 中克罗诺杆菌的方法主要依赖传统培养、分离和形态学/生理生化方法。一般来说,ISO 22964:2017 被欧洲地区列为强制执行区域性标准方法。在中国,GB 4789.40-2016 被指定为检测 PIF 中克罗诺杆菌属的官方标准检验方法<sup>[10]</sup>。对于已批准的定性检测标准方法,这些传统培养法的共同特点和检验程序包括预增菌、选择性增菌、生化和/或血清学确认等步骤<sup>[11-12]</sup>。然而,不同标准检测方法在称样量、选择性培养基和培养温度等整个样品检测流程的个别步骤存在一定差异,可能会引起检测灵敏度和特异性等检测指标的差异。

基于对国际合作和数据交流的需求不断增加,

特别是在食源性疾病爆发期间,标准方法的一致性已成为必要<sup>[13]</sup>。从监管角度来看,微生物标准通常由不同级别的公共机构(如国家、区域和国际)定义。每个级别采用不同的标准方法,并根据自己的检测方法建立微生物标准,可能会导致检测结果的解释出现差异和混乱,此外还可能增加检测数量和产品的检验成本。特别是在全球食品贸易中,如果出口国和进口国使用不同的国家标准方法,检验工作就会重复进行,贸易延误就不可避免<sup>[13]</sup>。因此,评估和建立标准方法之间的等效性,对于确保全球食品贸易立法的统一和食品的质量控制具有重要的指导意义。

通过比较研究建立替代方法和标准方法之间的等效性是方法验证的一个重要部分<sup>[14]</sup>。在正式的方法验证过程中,监管部门或有资质的第三方组织根据国际或地区认可的验证准则进行研究,主要按照国际公认的两个主要验证准则进行的,即 AOAC 国际方法委员会的《食品微生物官方分析方法的定性和定量验证准则》<sup>[15]</sup>(以下简称“AOAC 指南”)和 ISO 16140 系列《食品链微生物学-方法验证》(以下简称“ISO 16140”)<sup>[16-18]</sup>。我国认证认可监督管理委员会最近发布了指导食品微生物检测标准方法等效性评价的国家行业标准(RB/T 037-2020)<sup>[19]</sup>。本研究的设计方案主要遵守 ISO 16140 的原则进行设计和操作。

目前,污染 PIF 的克罗诺杆菌的真正来源和污染途径等流行病学方面的数据相对较少,同时,多个样品混样检测的操作流程也可能会影响检测方法的性能(特异性和灵敏度等)<sup>[20]</sup>。面临以上现状和问题,本研究拟对 GB 4789.40-2016(参考方法)和 ISO 22964:2017(替代方法)两种标准方法进行实验室间比对验证,基于多个实验室提交的数据被用来估计两种检测方法之间的检测性能指标差异,以评估两种标准方法在检测 PIF 中克罗诺杆菌的结果是否具有等效性。因此,评估和建立不同区域或国家的标准方法之间的等效性<sup>[21]</sup>,能够为全球食品贸易的放行和产品安全性的预防与控制提供重要的数据支撑。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

阪崎克罗诺杆菌 *C. sakazakii* ATCC 29544 中国工业微生物菌种保藏中心(CICC 22924);非益生菌婴幼儿配方奶粉 根据 ISO 16140-2:2016 附录 A 和初步的单一实验室研究得到的结果,选择非益生菌



婴幼儿配方奶粉(表 1)作为本次研究的食品基质。同一个生产批次的测试产品从当地超市购买。

表 1 测试基质的分类  
Table 1 Classification of test matrices

类别	类型	项目
婴幼儿配方奶粉和 婴幼儿谷类食品 <sup>a</sup>	非益生菌婴幼儿 配方奶粉	乳清基(乳制品), 大豆基 (蔬菜), 强化配方

注: <sup>a</sup>食品是根据ISO 16140-2的附件A选择的。

SCIENTZ-SOF/A 型冷冻干燥机 宁波新芝冻干设备股份有限公司; Bagnixer 400 型拍打器 英特塞恩斯有限公司; BSC-160411A2 型生物安全柜 苏州安泰空气技术有限公司; GR1100A 型高压灭菌锅 致微仪器有限公司; 5424F 型离心机 德国艾本德公司; VORTEX 3 型旋涡振荡器 德国 IKA 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基质中指示菌的测定 根据 GB 4789.2-2016 和 GB 4789.41-2016(方法 II), 分别测定未人工接种产品的菌落总数(TPC)<sup>[22]</sup>和肠杆菌科总数(EB)<sup>[23]</sup>, 以估计测试产品中指示菌的含量。此外, 根据 GB 4789.40-2016(参考方法 I)<sup>[10]</sup>, 对 5 份 100 g 婴幼儿配方粉进行克罗诺杆菌属的检测。

1.2.2 阪崎克罗诺杆菌种子液准备 阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 在 (36±1) °C 下培养 18~24 h, 并在胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基中于 55 °C 下热应激 10 min。然后将培养液离心(10000 r/min)5 min, 用磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH7.4)清洗, 将颗粒重新悬浮在 PBS 中, 后干燥 48 h 后形成粉末状培养物。通过向 500 g 婴幼儿配方粉中添加粉末状培养物, 然后摇晃 15~20 min 来制备种子。准备好的种子在环境温度下储存至少 2 周, 以使目标菌能够适应产品基质。

1.2.3 人工污染目标菌株的婴幼儿配方奶粉样品的制备 在产品中批量添加种子培养物, 以达到 1~3 CFU/10 g 的低阪崎克罗诺杆菌污染水平(L<sub>1</sub>)和 2~6 CFU/10 g 的略高污染水平(L<sub>2</sub>)<sup>[16]</sup>。在检验程序中, 未添加的产品被用作阴性对照(L<sub>0</sub>)(表 2)。另外, 盲样正式发放前使用最大可能数量估计法(MPN)来确定其人工污染水平<sup>[24]</sup>。

表 2 人工污染接种水平  
Table 2 Inoculation level of artificial pollution

污染水平	污染浓度	样品数量	接种水平
L <sub>0</sub>	0 CFU/10 g	8	阴性对照
L <sub>1</sub>	1~3 CFU/10 g	8	理论检测水平
L <sub>2</sub>	2~6 CFU/10 g	8	高接种水平

注: 实际接种水平L<sub>1</sub>和L<sub>2</sub>取决于实验室人工污染后实际测试结果。

1.2.4 样品分发和寄送 共有 12 家实验室参与该实验室间方法比对研究项目研究, 且所有参与的实验室均获得了 ISO/IEC 17025(ISO/IEC 17025:2017)的认证<sup>[25]</sup>。

样品制备完成后, 根据表 2 向 12 家参与实验室每家发送 48 份盲样(每个污染水平各 16 份), 添加了 3 个不同污染水平的测试菌株的测试盲样(含有编码)共制备有 576 份, 并被分装在带有冰袋的等温容器中邮寄到参与实验室, 收到样品后, 所有样品被立即转移到 4 °C 冰箱进行暂存, 并应在 1~2 周内完成测试。

1.2.5 样品测试程序 本研究选择 GB 4789.40-2016 方法 I 作为参考方法<sup>[10]</sup>, 选择 ISO 22964:2017 作为替代方法<sup>[26]</sup>。根据 ISO 16140:2016 的要求, 替代方法(ISO 22964:2017)的检测(最终)结果必须由参考方法(GB 4789.40-2016)进一步进行确认。由于参考方法和替代方法没有共同的初始富集步骤, 因此本研究属于非配对研究。每个参与实验室中共有 24 个样品(3 个污染水平, 每个污染水平 8 个重复)用参考方法进行检验; 同时, 共有 24 个样品用替代方法进行检验, 替代方法中的预增菌液同时必须使用参考方法进行确认。详细的测试程序见图 1。

1.3 指标测定

1.3.1 特异性 根据 L<sub>0</sub>, 参考方法和替代方法的特异性百分比(SP)计算如下。

参考方法的特异性:  $SP_{ref}(\%) = \left(1 - \frac{P_0}{N}\right) \times 100$

替代方法的特异性:  $SP_{alt}(\%) = \left(1 - \frac{CP_0}{N}\right) \times 100$

式中: N 是所有 L<sub>0</sub> 结果的数量(份); P<sub>0</sub> 是指在确认前用空白样品得到的假阳性结果的总数(份); CP<sub>0</sub> 是用空白样品得到的假阳性结果的总数(份)。

1.3.2 灵敏度 参照方法和替代方法的灵敏度按照单一实验室研究的描述进行计算。实验室间研究中(ND-PD)的接受限(AL)值是根据 ISO 16140-2:2016 进行计算。

1.3.3 相对检出水平(Relative Levels of Detection, RLOD) 根据 ISO 16140:2-2016, 根据收集到的数据对各实验室之间的相对检测水平(RLOD)差异进行了评估<sup>[27-28]</sup>。

1.3.4 检出概率(Probability of Detection, POD)和 dPOD 检出概率(POD)值以及任何两个不同污染水平 POD 值之间的差异(dPOD)值的计算方法参见 AOAC 验证指南<sup>[29]</sup>。

1.4 数据处理

收集并整理 12 家合作实验室的检测数据, 数据统计和处理根据 ISO 16140-2 附录文件和 AOAC 验证指南附件进行计算(95% 置信区间); 所有实验均重复 8 次, 统计结果以平均值±SD 表示。

2 结果与分析

2.1 样品中指标微生物测定和人工污染菌株的制备

在未接种目标菌株的样品(五个重复)中, 菌落总

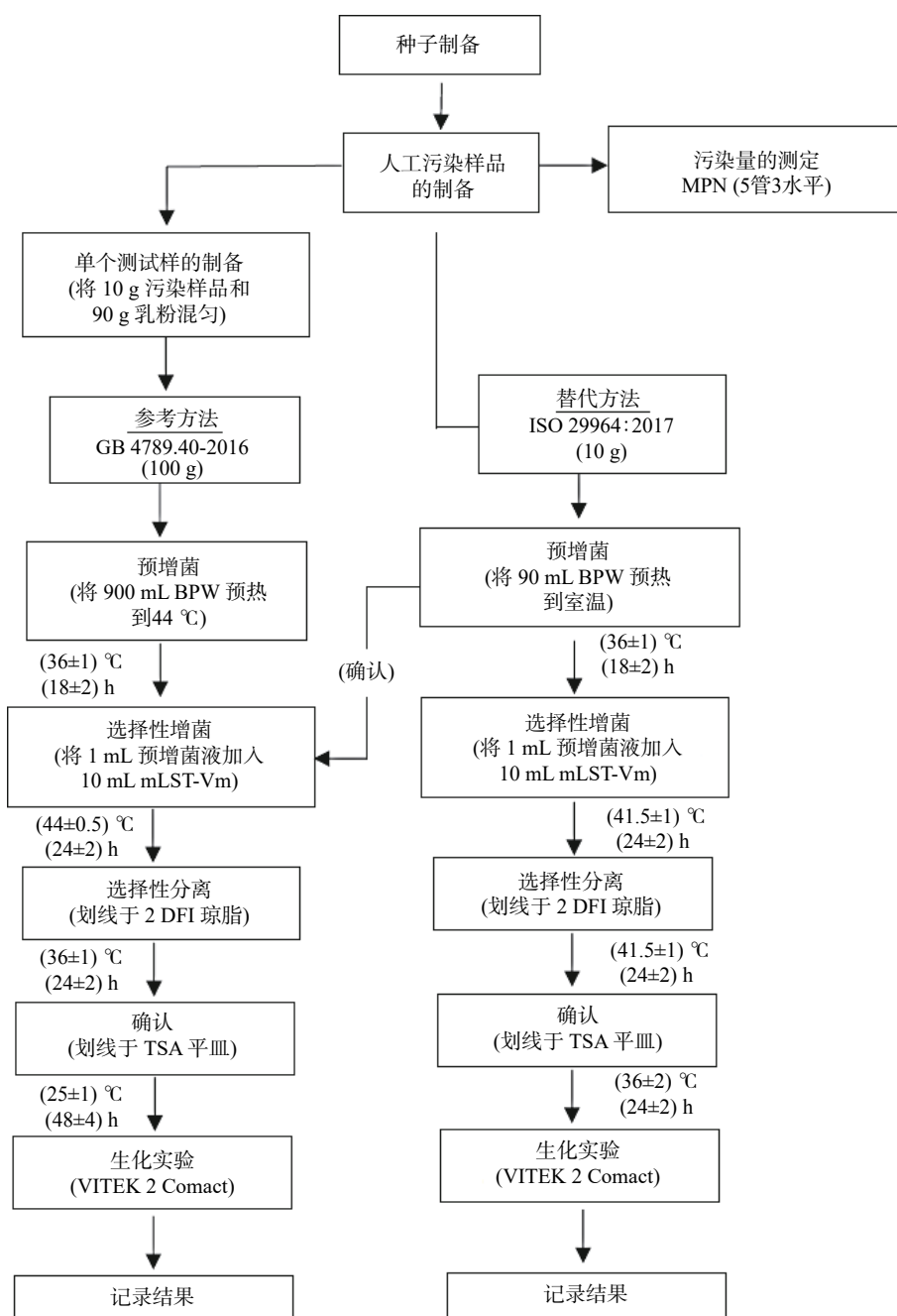


图1 ISO 22964:2017 与 GB 4789.40-2016 同时用于人工污染样品中阪崎克罗诺杆菌的检验流程图

Fig.1 Sample testing procedures based on GB 4789.6 and ISO 2964:2017 respectively

数(TPC)和肠杆菌科(EB)的总数均小于 10 CFU/g, 且未检出克罗诺杆菌属菌株。当样品接种人工污染菌进行热应激后, 试验菌种数量减少超过 0.5 lgCFU/g, 表明热激强度足够达到要求。在环境温度下储存的第一周, 种子接种物水平下降了 1~2 lg CFU/g, 2 周后变得更加稳定。14 d 后, 根据表 2 的污染水平要求, 使用数量稳定后的种子接种物分别给两份重量适宜的无克罗诺杆菌属检出的样品分别进行批量接种, 接种后的人工污染样品完全均质后使用 MPN 法进行测试, 确定每个人工污染样品的真实污染水平。

## 2.2 数据收集和分析

2.2.1 数据统计 总共向所有参与者(12 个合作实验室)发送了 576 份添加了 3 种不同污染水平的阪

崎克罗诺杆菌 ATCC29544 的测试盲样产品, 共收到了 864 份测试结果。

所有参与者收集到的数据显示(表 3), 实验室 10 和实验室 11 的结果中发现了一些异常值。实验室 10, 有两个样品在  $L_0$  检测中呈阳性(阴性样品), 这表明在样品处理过程中可能存在交叉污染。此外, 参考方法中  $L_1$  的阳性检出率(6/8)高于  $L_2$ (5/8), 而且 3 个样品的阳性检出结果在参考方法确认前和确认后不一致。实验室 11 的检测结果显示 6 个样品的阳性检测结果在用替代方法确认前和确认后在  $L_1$  和  $L_2$  中不一致。基于上述原因, 在随后的分析中略去了实验室 10 和实验室 11 提交的结果。实验室 1~9 和实验室 12 的结果被保留。这些结果在表 3 中

表 3 10 个实验室检测数据统计结果

Table 3 Data statistics of 10 labs results from an interlaboratory study

污染水平(MPN/10 g)	方法	实验室编号	阳性样品数( $n_{pos}$ )	测试样品数( $n_{tested}$ )	方法	实验室编号	阳性样品数( $n_{pos}$ )	测试样品数( $n_{tested}$ )
0	参考方法	1	0	8	替代方法	1	0	8
0	参考方法	2	0	8	替代方法	2	0	8
0	参考方法	3	0	8	替代方法	3	0	8
0	参考方法	4	0	8	替代方法	4	0	8
0	参考方法	5	0	8	替代方法	5	0	8
0	参考方法	6	0	8	替代方法	6	0	8
0	参考方法	7	0	8	替代方法	7	0	8
0	参考方法	8	0	8	替代方法	8	0	8
0	参考方法	9	0	8	替代方法	9	0	8
0	参考方法	12	0	8	替代方法	12	0	8
1.299	参考方法	1	3	8	替代方法	1	4	8
1.299	参考方法	2	3	8	替代方法	2	3	8
1.299	参考方法	3	1	8	替代方法	3	2	8
1.299	参考方法	4	3	8	替代方法	4	3	8
1.299	参考方法	5	2	8	替代方法	5	1	8
1.299	参考方法	6	1	8	替代方法	6	3	8
1.299	参考方法	7	3	8	替代方法	7	3	8
1.299	参考方法	8	3	8	替代方法	8	3	8
1.299	参考方法	9	2	8	替代方法	9	4	8
1.299	参考方法	12	3	8	替代方法	12	1	8
2.210	参考方法	1	5	8	替代方法	1	6	8
2.210	参考方法	2	4	8	替代方法	2	5	8
2.210	参考方法	3	6	8	替代方法	3	8	8
2.210	参考方法	4	6	8	替代方法	4	7	8
2.210	参考方法	5	6	8	替代方法	5	5	8
2.210	参考方法	6	6	8	替代方法	6	7	8
2.210	参考方法	7	5	8	替代方法	7	7	8
2.210	参考方法	8	6	8	替代方法	8	8	8
2.210	参考方法	9	5	8	替代方法	9	8	8
2.210	参考方法	12	7	8	替代方法	12	6	8
		总数	80	240	替代方法		95	240

进行了总结。在两个污染水平(1.299 MPN/10 g 和 2.210 PMN/10 g)中都获得了部分阳性检测结果,符合 ISO 16140-2 的要求。

2.2.2 特异性分析 根据 1.3.1 中的公式,并对收集到的数据进行处理,计算得到参考方法和替代方法的特异性结果都是 100%。

2.2.3 灵敏度分析 FPR 表示假阳性结果(FP)通常被用来计算假阳性比率。根据替代方法得到的经确认后的检测结果与经参考方法得到的检测结果之间的差异值,再结合实际样品数量来计算假阳性比率。

表 4 总结了参考和替代方法的灵敏度。污染水平  $L_1$  和污染水平  $L_2$  的(ND-PD)值分别为-3 和-11,均小于相应的接受限(AL)10.22 和 9.36。根据 ISO 16140-2 的相应规定,如果(ND-PD)值小于接受限,则认为两种比较方法是等同的。根据本研究的结果(表 4)推断,在两个污染水平( $L_1$  和  $L_2$ )上,替代方法和参考方法的检测结果被认为是等同的。

2.2.4 RLOD 分析 通过将 CLL 模型拟合为广义线性模型(GLM)来分析实验室间数据。将包括实验室

表 4 10 家参与实验室检测灵敏度统计结果

Table 4 Summary of data for sensitivity calculation from ten labs

参数	污染水平	
	$L_1$	$L_2$
阳性结果一致性(PA)	21	54
正偏差(PD)	6	13
阴性结果一致性(NA)	50	11
负偏差(ND)	3	2
参考方法的灵敏度( $SE_{ref}$ , %)	80.00	81.16
替代方法的灵敏度( $SE_{alt}$ , %)	90.00	97.10
相对真实度(RT, %)	88.75	81.25
替代方法的假阳性比率(FPR, %)	0	0
(ND-PD)	-3	-11
接受限度(AL)	10.22	9.36
总结	(ND-PD)<AL	(ND-PD)<AL

注: RT表示基于同一污染水平的样品经参考方法获得的结果和替代方法获得的结果之间的一致性程度。

效应的 CLL 模型拟合到 3 个水平和 10 个实验室(不包括 10 号和 11 号实验室)的综合数据中,其中

表 5 实验室间阪崎克罗诺杆菌的检测数据及统计分析结果  
Table 5 Results of interlaboratory data of detection of *Cronobacter sakazakii*

替代方法					参考方法				
浓度(MPN/10 g)	实验室编号	n	x	PODa或LPODa	95% CI	x	PODr或LPODa	95% CI	dPODa或dLPODa
0	1	8	0	0		0	0		0.000
0	2	8	0	0		0	0		0.000
0	3	8	0	0		0	0		0.000
0	4	8	0	0		0	0		0.000
0	5	8	0	0		0	0		0.000
0	6	8	0	0	(0.00, 0.046)	0	0	(0.00, 0.046)	0.000
0	7	8	0	0		0	0		0.000
0	8	8	0	0		0	0		0.000
0	9	8	0	0		0	0		0.000
0	10	8	0	0		0	0		0.000
0	总计	80	0	0.000		0	0		0.000
1.299	1	8	4	0.500		3	0.375		0.125
1.299	2	8	3	0.375		3	0.375		0.000
1.299	3	8	2	0.250		1	0.125		0.125
1.299	4	8	3	0.375		3	0.375		0.000
1.299	5	8	1	0.125		2	0.250		-0.125
1.299	6	8	3	0.375	(0.243, 0.446)	1	0.125	(0.211, 0.408)	0.200
1.299	7	8	3	0.375		3	0.375		0.000
1.299	8	8	3	0.375		3	0.375		0.000
1.299	9	8	4	0.500		2	0.250		0.250
1.299	10	8	1	0.125		3	0.375		-0.200
1.299	总计	80	27	0.3375		24	0.300		0.0375
2.210	1	8	6	0.750		5	0.625		0.125
2.210	2	8	5	0.625		4	0.500		0.125
2.210	3	8	8	1.000		6	0.750		0.250
2.210	4	8	7	0.875		6	0.750		0.100
2.210	5	8	5	0.625		6	0.750		-0.125
2.210	6	8	7	0.875	(0.727, 0.892)	6	0.750	(0.592, 0.789)	0.125
2.210	7	8	7	0.875		5	0.625		0.250
2.210	8	8	8	1.000		6	0.750		0.250
2.210	9	8	8	1.000		5	0.625		0.375
2.210	10	8	6	0.750		7	0.875		-0.125
2.210	总计	80	67	0.8375		56	0.700		0.1375

注: MPN为最大可能的数目; x为阳性结果的数量; CI为置信区间。

1~9、12 号实验室的实验室效应  $Lab_j$ , 没有发现明显的实验室效应( $P=0.16$ )。偏差检验分析结果表明, 替代方法和参考方法没有明显的差异( $D_{method}=1, P=0.32$ )。相比参考方法, 替代方法的 RLOD 值为 0.85, 90% 的 CI 为 0.66~1.11, 并低于 AL(非配对研究中设定可接受限值 2.5), 综上表明在检测非益生菌婴幼儿配方奶粉中的阪崎克罗诺杆菌时, 替代方法的灵敏度与参考方法没有显著性区别。

**2.2.5 POD 分析** 参考 AOAC 验证指南使用 POD 模型对实验室间数据进行分析(表 5)。结果显示, 在 POD 值落在 0.15 和 0.85 之间的两个污染浓度中, 每个实验室内的数据都存在变化。在低污染水平(1.299 MPN/10 g)下, dLPOD 值为 0.0375。而在稍高的污染水平(2.210 MPN/10 g 或 100 g)下, dLPOD 值为 0.1375。根据 AOAC 验证指南原则, 在 95% 的置信度下, 无论是较低的污染水平(1.299 MPN/10 g)还是稍高的污染水平(2.210 MPN/10 g), 替代方法和参考方法的检测结果之间均没有显著性差异(置信区间的上限和下限之间均包含 0)。

### 3 讨论与结论

当前, 基于传统培养法的标准检测方法费时耗力的现状, 有些食品企业采用了快速检测方法作为替代传统的标准方法, 但是许多替代方法并没有经过 ISO 16140 或 AOAC OMA 原则要求进行系统验证和评价。因此, 因为从食品安全和生产的角度来看, 基于替代方法得到的假阴性或假阳性的检测结果可能带来不良的后果。随着对国际合作和数据共享的要求越来越高, 特别是在发生食源性疾病爆发事件时<sup>[13]</sup>, 标准方法之间的一致性对于检测结果的准确性是非常必要的。

该项研究中, 对于测试样品的制备, 考虑到低污染水平(1~3 MPN/10 g)的样品, 人工污染的婴幼儿配方奶粉样品的同质性和均匀性是获得部分阳性样本的关键。本研究成功实现了部分样本的阳性接种, 在低接种水平(1.299 MPN/10 g)的接种样品中, 替代方法和参考方法的阳性率分别为 33.75% 和 30%, 介于 25% 和 50% 之间(表 5)。而对于较高水平的接种(2.210 MPN/10 g), 替代方法和参考方法的阳性



率则分别为 83.75% 和 70%(表 5), 介于 70% 和 100% 之间, 其中低水平略低于 75%<sup>[17]</sup>。这可能是由于低接种水平(1.299 MPN/10 g)的样本在制备和获得阳性检出方面具有更大的难度。

该项目中替代方法和参考方法的特异性为均 100%, 实验室 3 得到一个假阳性的结果。造成这一假阳性结果的可能的原因是在整个测试过程中的某个步骤出现了交叉污染, 例如是由于操作者的不规范操作所引起, 或者是在样品预处理过程中使用的不合规的耗材所导致。此外, 推测出现这种现象也可能是由于样品检测顺序安排不当, 导致了样本之间的交叉污染, 但出现这种情况的概率通常是极低的。

污染水平 1(1.299 MPN/10 g)和污染水平 2(2.210 MPN/10 g)的(ND-PD)值都低于 0(表 4), 这表明替代方法和参考方法对同一污染水平样品的检测灵敏度结果不一致。根据表 4 反映出替代方法的灵敏度略微高于参照方法, 这主要是由于检测程序的不一致等因素所造成的。此外, 与参考方法相比, 替代方法的 RLOD 为 0.85, 90% 的 CI 为 0.66~1.11, 均低于本次非配对研究中的接受限值 AL。替代方法和参考方法之间阳性检测率的差异可能是由于在低污染水平(1.299 MPN/10 g)下目标微生物的不均匀分布及实验室设备和操作人员的差异造成的。

据报道, 灵敏度的差异可能是由于两个标准方法之间的样品称样量、混样和测试程序的差异造成的<sup>[18,20]</sup>。GB 4789.40-2016 和 ISO 22964:2017 之间测试程序的主要差异在于测试样品的初始检测样本重量、增菌温度和选择性培养基不同(图 1)。两个预富集步骤是为了恢复克罗诺杆菌属的受损伤细胞, 这将可以提高方法的灵敏度。对于第二个富集步骤, 与 ISO 22964:2017 中使用的克罗诺杆菌筛选肉汤相比, GB 4789.40-2016 中使用的改良十二烷基硫酸盐色氨酸溶液(mLST)是一种强选择性的富集肉汤, 虽然 mLST 中的成分可以抑制其他非克罗诺杆菌的肠杆菌科细菌的生长<sup>[30]</sup>; 但是, 也发现极少数克罗诺杆菌属菌株的生长也会被 mLST 轻微抑制<sup>[30]</sup>。然而, 这种克罗诺杆菌筛选肉汤(CSB)的设计是为了促进所有克罗诺杆菌菌株的生长, 而不会刻意抑制其他肠杆菌科细菌的生长<sup>[31]</sup>。因此, 推测 mLST 中热损伤克罗诺杆菌的回收率略低于 CSB 中热损伤克罗诺杆菌的回收率, 这可能降低了 GB 4789.40-2016 检测方法的灵敏度。

另一方面, GB 4789.40-2016 和 ISO 22964:2017 中克罗诺杆菌属的培养温度分别为 (44.0±0.5) °C 和 (41.5±1.0) °C(图 1)。之前的研究发现, 与 37 °C 相比, 克罗诺杆菌属在 43 °C 下生长更为适宜<sup>[30]</sup>, 选择 (44.0±0.5) °C 是因为较高的培养温度会抑制肠杆菌科许多杂菌的生长, 并提高热损伤克罗诺杆菌属的恢复速度和检测特异性<sup>[31]</sup>。此外, Guillaume-Gentil 等<sup>[32]</sup>指出, 克罗诺杆菌属在高渗透压(1 mol/L NaCl)下,

在 37 °C 相对较低的培养温度下, 与 45 °C 相比表现出更好的生长性能。需要进一步研究的是, 通过在 Al-Holy-Rasco(AR)肉汤中补充丙酮酸钠和 3,3-硫代丙酸等成分, 有助于提高浓缩肉汤对一些受胁迫抑制和生长不良的克罗诺杆菌属菌株的生长活力和恢复水平<sup>[33]</sup>。

本研究中两种标准方法的灵敏度都与富集和整个检测过程密切相关。以前的文献显示, 在实验室开展 PIF 的实际检测过程中, 由于增加了背景菌的干扰, 混样对 PIF 中克罗诺杆菌属的富集具有不利影响, 而对生长的起始时间没有明显影响<sup>[20]</sup>。本次研究的检测数据同样证实了混样的做法可能会影响检测方法的性能。未来的研究可能会集中在测试不同富集肉汤和相应培养温度的组合, 从自然污染的 PIF 中最大程度提高回收克罗诺杆菌属细菌的能力水平。

总之, 实验室间方法比较研究结果来自 12 个合作实验室的检测数据, 其中 10 组为有效数据。本项目分别按 ISO22964:2017 和 GB 4789.40-2016 对 576 份人工污染的婴幼儿配方奶粉的克罗诺杆菌进行测试。结果显示: a. 在两个不同的人工污染浓度(2.210 MPN/10 g 和 1.299 MPN/10 g)下, 阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 的(ND-PD)值低于可接受限值(AL); b. 基于 95% 置信度水平的非配对数据研究, 相对检测水平(RLOD)都低于接受限值(AL); c. 根据 AOAC 验证指南, 使用 POD 模型的计算结果表明, 在 95% 的置信水平下, 替代方法与参考方法之间没有统计学上的显著差异。

综上所述, 基于婴幼儿配方奶粉基质, 采用 ISO 22964:2017 进行克罗诺杆菌属的检测方法被认为等同于 GB 4789.40-2016。

## 参考文献

- [1] IVERSEN C, LEHNER A, MULLANE N, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: Proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonicus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1 [J]. *BMC Evol Biol*, 2007, 7: 64.
- [2] JOSEPH S, CETINKAYA E, DRAHOVSKA H, et al. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients [J]. *Intern J Syst Evol Microbiol*, 2012, 62: 1277-1283.
- [3] JOSEPH S, DESAI P, JI Y, et al. Comparative analysis of genome sequences covering the seven *Cronobacter* species [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e49455.
- [4] IVERSEN C, FORSYTHE S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emerging pathogen associated with infant milk formula [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2003, 14: 443-454.
- [5] ESPEILLAC, S. Importance of using international method



- analysis of ISO/TC 34/SC 9[C]// Beijing: The 1st Sino-French Standardization Seminar, 2015.
- [6] JARADAT Z W, AL MOUSA W, ELBETIEHA A, et al. *Cronobacter*, an opportunistic food borne pathogen: A review of its virulence and environmental adaptive traits[J]. *J Med Microbiol*, 2014, 63: 1023–1037.
- [7] JUNG M K, PARK J H. Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas[J]. *Food Sci Biotechnol*, 2006, 15: 152–157.
- [8] Peng Fei, He Jing. *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula collected from nine provinces in China: Prevalence, genotype, biofilm formation, and antibiotic susceptibility[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 900690.
- [9] HYEIN J, ATHMANYA E, ANGELIKA L, et al. Characterization of *Cronobacter sakazakii* strains originating from plant-origin foods using comparative genomic analyses and zebrafish infectivity studies[J]. *Microorganisms*, 2022, 10: 1396.
- [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会和国家食品药品监督管理总局. GB 4789.40-2016 食品安全国家标准-食品微生物学检验-克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验[S]. 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China and China Food and Drug Administration, GB 4789.40-2016 National food safety standard - food microbiological examination-examination of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* [S]. 2016.]
- [11] NORBERG S, STANTON C, ROSS R P, et al. *Cronobacter* spp. in powdered infant formula[J]. *Journal of Food Protection*, 2012, 75: 607–620.
- [12] United States Food and Drug Administration [USFDA]. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated infant formula[EB/OL]. (2002) Available at: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114665.htm>.
- [13] ESPEILLAC, S. Importance of using international method analysis of ISO/TC 34/SC 9. 2015[C]// Beijing: Paper presented at the 1st Sino-French Standardization Seminar.
- [14] JASSON V, JACXSENS L, LUNING P, et al. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria[J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(6): 710–730.
- [15] FELDSINE P, ABEYTA C, ANDREWS WH. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis [J]. *Journal of AOAC International*, 2012, 85: 1187–1200.
- [16] International Organization for Standardization. ISO 16140-1:2016 Microbiology of the food chain-Method validation-Part 1: Vocabulary[S]. 2016.
- [17] International Organization for Standardization. ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain-Method validation-Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method[S]. 2016.
- [18] International Organization for Standardization. ISO 16140-3:2017 Microbiology of the food chain-Method validation-Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory[S]. 2017.
- [19] 中国国家认证认可监督管理委员会. RB/T 037-2020 食品微生物检测标准方法等效性评价指南[S]. 2020. [Certification and Accreditation Administration of China. RB/T 037-2020 Guidance for evaluating equivalence of food microbiological testing standard methods[S]. 2020.]
- [20] MILED R B. Impact of pooling powdered infant formula samples on bacterial evolution and *Cronobacter* detection[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 138: 250–259.
- [21] BENITO A DE, NATHALIE G B, ISABELLE D, et al. Validation of standard method EN ISO 22964:2017-Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 288: 47–52.
- [22] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会和国家食品药品监督管理总局. GB 4789.2-2016 食品安全国家标准-食品微生物学检验-菌落总数测定[S]. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China and China Food and Drug Administration. GB 4789.2-2016 National food safety standards - microbiological examination of food hygiene-examination of aerobic plate count[S].]
- [23] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会和国家食品药品监督管理总局. GB 4789.41-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验-肠杆菌科检验 [S]. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China and China Food and Drug Administration. GB 4789.41-2016 National food safety standards. Microbiological examination of food hygiene-examination of Enterobacteriaceae [S].]
- [24] EKELUND F, CHRISTENSEN S, RØNN R, et al. An automated technique for most-probable-number (MPN) analysis of densities of phagotrophic protists with *lux* AB labelled bacteria as growth medium[J]. *J Microbiol Methods*, 1999, 38(3): 177–182.
- [25] International Organization for Standardization, ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories[S].
- [26] International Organization for Standardization. ISO 22964: 2107(E) Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp[S]. 2017.
- [27] International Organization for Standardization. RLOD calculation program for method comparison studies[S]. 2015.
- [28] International Organization for Standardization. RLOD calculation program for comparing laboratories/methods, version 1[S]. 2015.
- [29] WEHLING P, LABUDDE R A, BRUNELLE S L, et al. Probability of detection (POD) as a statistical model for the validation of qualitative methods[J]. *J AOAC Int*, 2011, 94(1): 335–47.
- [30] AL-HOLY M A, SHIN J H, OSAILI T M, et al. Evaluation of a new enrichment broth for detection of *Cronobacter* spp. in Powdered infant formula[J]. *Journal of Food Protection*, 2011, 74: 387–393.
- [31] IVERSEN C, DRUGGAN P, SCHUMACHER S, et al. Development of a novel screening method for the isolation of “*Cronobacter*” spp. *Enterobacter sakazakii*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74: 2550–2553.
- [32] GUILLAUME-GENTIL O, SONNARD V, KANDHAI M C, et al. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples[J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68: 64–69.
- [33] GURTLE J B, KORNACKI J L. Comparison of media supplements to enhance recovery of *Salmonella* spp. from thermally treated egg albumen[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2009, 49: 503–509.