

微生物实验室如何确认快速检测方法

Validate Fast Testing Method

李志培（河南出入境检验检疫局）

《中华人民共和国认证认可条例》颁布和实施以来，寻求认可的实验室数量迅速增加，还有相当数量的实验室按照 CNAL/AC01:2003《检测和校准实验室认可准则》（以下称《认可准则》）的要求建立和运行其质量体系。《认可准则》等同采用了 ISO/IEC17025:1999《检测和校准实验室能力的通用要求》，在《认可准则》的 24 个条款中，“检测和校准方法及方法的确认”是一个涉及如何正确选择检测和校准方法、确认方法、评价方法和控制数据的重要条款。由于工作的特殊性，微生物实验室可能会更多地使用快速检测方法，但是有不少实验室，尤其是对《认可准则》了解不多的实验室，对如何选择标准方法、如何确认非标准的快速检测方法不甚了了，本文拟就此问题提供一些对《认可准则》相关要求的理解和如何对快速方法进行确认的意见，仅供参考。

一、如何认识标准方法、非标准方法和方法确认

《认可准则》5.4.1 规定“实验室应使用适合的方法和程序进行所有检测和/或校准……”，5.4.2 规定“应优先使用以国际、区域或国家标准发布的方法”。在认可实践中，CNAL（中国实验室国家认可委员会）把行业标准也纳入了标准方法之列。关于非标准方法，《认可准则》的表述是“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。……实验室制定的或采用的方法”，简言之，除标准方法以外的方法都是非标准方法。在检测工作和实验室认可评审中，对待标准方法和非标准方法的作法是不一样的。对于标准方法，实验室只要证实能够正确地应用就行了，主要是具备相应的技术和物质资源；对于非标准方法，则需进行确认。“确认是通过核查并提供客观证据，以证实某一特定预期用途的特殊要求得到满足”。确认不仅要用于非标准方法，也要用于“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”。

二、如何认识快速检测方法和进行确认

快速检测方法不是对标准的分类方法，只是对以快速、简便、成本低的一类方法的统称，这些方法都不属于标准方法。它们的来源通常是著名的技术组织、书籍和刊物、生产商提供的说明书、学术报告、实验室自定等等。最近二十年来，在检测领域，新的检测技术和方法大量涌现，它们比传统的、经典的方法有更广的应用范围、更强的能力、更快的速度、更高的灵敏性，它们从开始的不起眼，发展到了与标准方法并立、部分取代之的地步。标准方法和非标准方法之间并没有一条不可逾越的鸿沟，许多非标准方法经过长期的、大量的应用，被公推为标准方法的大有例在，还有许多非标准方法正处在向标准方法过渡的进程中。微生物实验室经常遇到的快速检测方法有：PCR、VIDAS、VITEK、BAX、Petrifilm、IMS、Reveal Kit、Biochemical Sestym、试剂盒等等。如何对这些快速方法进行确认，《认可准则》提供了以下技术，可选其一，或其组合：

- 使用参考标准或标准物质（参考物质）进行校准；
- 与其他方法所得的结果进行比较；
- 实验室间比对；
- 对影响结果的因素作系统性评审；
- 根据对方法的理论原理和实践经验的科学理解，对所得结果不确定度进行的评定。

对于微生物实验室，上述五种技术的第一、二、三种都在可选之列，最常用的当属第二种。由于 CNAL 认可的标准方法为 4 类，与这些标准方法进行比较不失为一个简便、权威性强的途径。下面是几个对快速方法进行确认的例子：

例1. 用3M纸片法和国标法对6类试样菌落计数对比实验结果的差异检验。

试样类别	观察值数	国标法菌落计数平均值	纸片法菌落计数平均值	t-值	P> t
肉与肉制品	29	3.97 ± 1.12	3.96 ± 1.13	- 0.19	0.8481
奶与奶制品	17	2.13 ± 0.84	2.22 ± 0.99	1.11	0.2848
饮料固体饮料	14	2.13 ± 0.91	2.16 ± 0.92	1.32	0.2093
糕点	30	2.68 ± 1.23	2.70 ± 1.28	0.61	0.5462
调味品	27	3.43 ± 2.54	3.55 ± 2.54	1.30	0.2062
冷荤制品	21	5.04 ± 2.34	5.06 ± 2.31	1.30	0.2100
总计	138	3.33 ± 1.93	3.38 ± 1.93	1.84	0.0679

结论：结果在统计学上均无显著性差异，即对于上述6类试样用纸片法和国标法计数，结果无统计学差异。

例2. 用3M纸片法和国标法对金黄色葡萄球菌检出率进行对比实验，样品为96个，国标法检出阳性样品39个，3M法检出阳性49个。用 χ^2 检验判断两种方法的差异是否显著。

结果	国标法	3M法	合计
阳性	39	49	88
阴性	57	47	104
合计	96	96	192

$\chi^2=2.098$ ， $\chi^2_{0.95}=3.84$ ， $\chi^2 < \chi^2_{0.95}$ ，故判断两种方法无显著性差异。

例3. 用沙门氏菌标准菌株测试两种快速方法和国标法的灵敏度（最低检出限）。

	沙门氏菌数量 cfu/mL				
	> 300	220	25	4	1
国标法	+	+	-	-	-
快速法A	+	+	+	-	-
快速法B	+	+	+	+	-

结果表明：国标法的灵敏度为220/mL，快速法A为25/mL，快速法B为4/mL。

三、如何认识确认结果和批准快速检测方法

微生物实验室在进行快速方法与标准方法比较时多采用统计学上的显著性检验和回归分析，也有对快速方法进行灵敏度、稳定性、回收率、特异性、抗干扰性等指标的考核和评审。与标准方法比较的结果一般有两种：差异显著和不显著。如果差异不显著，一般来说就意味着快速方法可以代替标准方法用于预定用途或应用领域，可以作为实验室检测方法正常使用；如果不一致，并不等于快速方法不能使用，要搞清楚差异的原因，如果实验数据确实能够证明快速方法的性能优于标准方法，实验室完全可以采用快速方法。否则，应放弃使用快速方法。在认可实践中，CNAL目前认可国际上普遍采用的、行业广泛认可的某些公司、行业协会的标准，这些也是快速方法的主要来源；对于实验室制定的内部方法，如果有可靠的证据材料，并且确认是有效的，CNAL也予以认可。

快速方法的确认完成后，实验室通常还要履行一个批准手续，简单地说，就是把确认的结果、使用的确认程序、证实可以满足要求的一套资料报给技术管理部门或负责人，最好由更高层次的技术管理者或技术权威对资料进行审查，以确定可否使用。关于这一点，实验室应在质量管理手册和程序文件中给予明确规定。

（文中例1摘自姚景慧等先生的论文，在此致谢。）