

# 酶联免疫分析试剂盒通则

(征求意见稿)

编制说明

标准起草组

2024年 8 月

# 国家标准《酶联免疫分析试剂盒通则》编制说明

## 一 标准修订背景及任务来源

### 1.1 标准修订背景

酶联免疫吸附法（Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）是一种基于免疫的检测技术，它是利用酶标记抗原与抗体特异性结合、显色后，通过比较颜色或荧光强度来测定微量成分的一种现代分析技术。其应用始于医学临床检测毒素和葡萄球菌肠毒素，以其高特异性、高灵敏度、操作简便等优势，研究领域不断延伸，目前已广泛应用于生物化学、医药、食品、农业等领域，涉及农药残留、兽药残留、致病微生物、真菌毒素、非法食品添加剂等成分的检测，为国际认可且广泛应用的一类大批量样本检测技术。为此国家制定了《酶联免疫分析试剂盒通则》（GB/T 33411-2016），该标准 2016 年 12 月 30 日发布，2017 年 4 月 1 日实施，规范了酶联免疫试剂盒评价质量的标准体系，建立了试剂盒质量的指导性标准，为酶免试剂盒的研制、生产、销售及应用提供了标准化技术支撑，也规范引领了生化检测试剂盒产业的健康发展。

目前，我国已初步建立了 ELISA 试剂盒质量评价体系，各部门制定了酶联免疫法检测试剂审查指导原则或评价技术要求，并作为医药领域和食品安全领域评价试剂盒质量的重要指导文件。医药领域体外诊断试剂评定体系健全，国家药品监督管理局对体外诊断试剂实行注册、备案管理，依据体外诊断试剂注册与备案管理办法逐级进行相关类别体外诊断试剂产品的注册与备案，以保证体外诊断试剂的安全、有效和质量可控。ELISA 试剂盒是体外诊断试剂之一种，有具体的审查指导原则和标准，酶联免疫法检测试剂注册技术审查指导原则适用于按有关病原微生物检测的第三类体外诊断试剂，及参考适用于作为二类管理的其他酶联免疫法检测试剂，YY/T 1183-2010 适用于医学试验研究用试剂盒质量要求。农业农村部对兽药残留酶联免疫试剂盒按兽药备案管理，依兽药残留酶联免疫试剂盒备案审查技术资料要求审核；海关总署也建立了商品化食品检测试剂盒评价制度，根据 SN/T 4800-2017 和 SN/T 2775-2023 指导进出境动物检疫 ELISA 试剂盒的评价和食品检测的商业化检测试剂盒评价；国家市场监管总局为规范食品快速检测，启动了食品快速检测产品符合性评价程序，关注到在食品安全检测领域要遵循仲裁方法原则，酶联免疫方法只作为快速筛查检测法，当检

测出阳性样品时需用其他方法确证；GB/T 33411-2016 酶联免疫分析试剂盒通则是首部针对酶联免疫试剂盒质量评价的国家标准。国内外有关 ELISA 试剂盒质量评价方法或技术规程类标准详见表 1。

表 1. 国内外 ELISA 试剂盒质量评价或技术规程类标准

序号	标准编号	标准名称
1	GB/T 14926.50-2001	实验动物 酶联免疫吸附试验
2	GB/T 33411-2016	酶联免疫分析试剂盒通则
3	GB/T 40265-2021	酶免疫检测抗体检测通则
4	SN/T 2775-2023	商品化食品检测试剂盒评价方法
5	SN/T 4800-2017	进出境动物检疫 ELISA 检测试剂盒质量评价技术规程
6	YY/T 1183-2010	酶联免疫吸附法检测试剂（盒）
7	NF U47-019-2010	动物健康分析方法.酶联免疫吸附测定(ELISA)技术应用的良 好实施指南（Animal health analysis methods - Guide of good practices for implementation of ELISA techniques）
8	BS EN ISO 18330-2003	牛奶和奶制品.抗菌剂残留物检测用免疫分析或受体分析的标 准化描述指南
9	NF V03-054:2011	食品.用于食物过敏原检测的 ELISA 技术实施的良好实践指南 （Food products - Good practice guidance on implementation of ELISA techniques for food allergens detection）
10	XP V03-147:2020	食品.真菌毒素的测定.酶免疫试剂盒微孔板（ELISA 试剂盒）的 使用指南（Foodstuffs - Determination of mycotoxins - Guide of use of immunoenzymatic kits microplate format (kits ELISA)）
11	食药监办械函[2013]3 号	酶联免疫法检测试剂注册技术审查指导原则
12	农医发[2005]17 号	兽药残留酶联免疫试剂（盒）备案审查技术资料要求、附件 2： 试剂盒备案参考评判标准

围绕着酶联免疫检测技术，已形成了酶联免疫检测试剂盒（GB/T 33411-2016 酶联免疫分析试剂盒通则）、检验仪器设备（YY/T 1529-2017 酶联免疫分析仪、JJG

861-2007 酶标分析仪检定规程、JJF 2089-2023 全自动酶联免疫分析仪校准规范）、检测方法及试剂盒中相关试剂（GB/T 40265-2021 酶免疫检测抗体检测通则）等完整的控制质量体系标准。经国家标准化委员网 <http://www.sac.gov.cn/>检索“酶联免疫”关键词近 171 条相关国家标准、行业标准、地方标准等，食品伙伴网 <http://www.foodmate.net/>有近 142 条，其中不含许多隐性的含酶联免疫检测方法的标准，相关 ELISA 检测方法国家标准详见表 2。

表 2. 相关 ELISA 检测方法国家标准

序号	标准编号	标准名称
1	GB 5009.22-2016	食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定(第四法 酶联免疫吸附筛查法)
2	GB 5009.24-2016	食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定（第三法 酶联免疫吸附筛查法）
3	GB 5009.96-2016	食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素 A 的测定
4	GB5009.111-2016	食品安全国家标准 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定
5	GB 5009.118-2016	食品安全国家标准 食品中 T-2 毒素的测定(第二法 间接 ELISA 法，以及第三法 直接 ELISA 法)
6	GB 5009.206-2016	食品安全国家标准 水产品中河豚毒素的测定
7	GB/T 17480-2008	饲料中黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> 的测定 酶联免疫吸附法
8	GB/T 17999.6-2008	SPF 鸡 微生物学监测 第 6 部分：SPF 鸡 酶联免疫吸附试验
9	GB/T 18932.21-2003	蜂蜜中氯霉素残留量的测定方法 酶联免疫法
10	GB/T 18932.27-2005	蜂蜜中泰乐菌素残留量测定方法 酶联免疫法
11	GB/T 18932.28-2005	蜂蜜中四环素族抗生素残留量测定方法 酶联免疫法
12	GB/T 21319-2007	动物源食品中阿维菌素类药物残留的测定 酶联免疫吸附法
13	GB/T 21329-2007	动物源性食品中庆大霉素残留量检验方法 酶联免疫法
14	GB/T 21330-2007	动物源性食品中链霉素残留量测定方法 酶联免疫法
15	GB/T 22429-2008	食品中沙门氏菌、肠出血性大肠埃希氏菌 O157 及单核细胞增生



## 李斯特氏菌的快速筛选检验 酶联免疫法

16	GB/T 40175.2-2021	纺织品 生物化学分析方法 第2部分：拟除虫菊酯类农药（酶联免疫法）
17	GB/T 40175.3-2021	纺织品 生物化学分析方法 第3部分：有机磷类农药（酶联免疫法）
18	GB/T 40220-2021	植物代谢产物大豆凝集素测定 酶联免疫吸附法
19	GB/T 40223-2021	植物代谢产物游离棉酚测定 酶联免疫吸附法
20	GB/T 32948-2016	犬科动物感染细粒棘球绦虫粪抗原的抗体夹心酶联免疫吸附试验检测技术
21	GB/T 40368-2021	植物代谢产物胰蛋白酶抑制因子测定 酶联免疫吸附法

原标准技术内容涉及外观、试剂盒主要组成及要求、标准曲线的线性、灵敏度、精密度、正确度参数要求，及相应的试验方法，使用说明书和标签基本内容，规范和满足了试剂盒质量的基本要求。鉴于酶联免疫试剂盒的广泛应用，应用单位反馈建议，拟将试剂盒按判断方式补充定性试剂盒部分，及定量试剂盒的特异性和稳定性技术指标与试验方法的内容。试剂盒的种类很多，检测微生物的试剂盒多为定性分析试剂盒；检测多种类似物或多残留的试剂盒，鉴于可发生许多非特异性反应，严重干扰分析结果，导致测定结果的不准确性，需要界定交叉反应或特异性的指标，以正确评价试剂盒的特异性；试剂盒对贮存及运输环境的温度有一定的要求，所有试剂盒均在外包装上标示贮存条件与保质期，建立试剂盒稳定性评价方法，同时优化各项技术指标，完善酶联免疫分析试剂盒质量评价体系。

## 1.2 任务来源

根据全国生化检测标准化技术委员会[2023]41号《关于下达2023年推荐性国家标准计划的通知》文件，项目编号为：20233863-T-469的“酶联免疫分析试剂盒通则”列入2023年国家标准制修订计划。本标准由全国生化检测标准化技术委员会归口。本标准由无锡市食品安全检验检测中心、江苏省微生物研究有限责任公司修订。

## 二 标准编制过程

### 2.1 成立标准编制小组

2023年12月，国家标准《酶联免疫分析试剂盒通则》修订立项后，成立了标准编制小组，落实了人员分工。

## **2.2 标准修订技术路线和方案制定**

2024年1月，标准编制小组查阅了国内外有关标准文献资料，收集分析了市场上ELISA试剂盒的技术指标及参数，调研ELISA检测方法标准的技术内容，制定了标准修订内容和技术方案。

## **2.3 方法学考察及实际样品本测定**

2024年2月~2024年7月，选取不同类型的ELISA试剂盒，对特异性和稳定性等指标进行测试验证，收集相关第三方验证报告。

## **2.4 编写编制说明和征求意见稿**

2024年5月~8月，标准起草小组根据专家意见，对标准讨论稿进行修改和完善，形成征求意见稿，完成编制说明。

## **三、标准编制原则和编制依据**

按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定和要求编写标准全文。查阅了国内外相关标准，结合现行标准实施情况，以保证标准的先进性和衔接性。本次修订在GB/T 33411-2016 酶联免疫分析试剂盒通则基础上，其技术内容参照农业部的兽药残留酶联免疫试剂(盒)备案参考评判标准、YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)、SN/T 4800-2017 进出境动物检疫ELISA检测试剂盒质量评价技术规程和GB/T 27417-2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南等要求，新增定性试剂盒部分、特异性和稳定性技术指标，并对其他技术要求进行了修改。本次修订结合国内外酶联免疫分析技术发展趋势和我国试剂盒生产行业发展现状，力求技术指标的覆盖面，保证科学、准确、合理评价产品质量，满足我国试剂盒生产行业、检测检验等对各类ELISA试剂盒评价需要。

## **四、主要修订内容**

### **4.1 增加特异性的指标与试验方法**

参考农业部的兽药残留酶联免疫试剂(盒)备案参考评判标准、GB/T 40265-2021 酶免疫检测抗体检测通则、YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)、SN/T

2775-2023 商品化食品检测试剂盒评价方法等标准，按 ELISA 试剂盒说明书，确定特异性的指标与试验方法，并开展验证试验，考察方法的适用性和实际产品测定的可操作性。

4.2 增加稳定性的指标与试验方法

参考 CNAS-GL003-2018 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南、药典 2020 生物制品稳定性试验指导原则、YY/T 1579-2018/ISO 23640:2011 体外诊断医疗器械体外诊断试剂稳定性评价、农业部的兽药残留酶联免疫试剂（盒）备案参考评判标准等标准，按 ELISA 试剂盒说明书，确定稳定性的指标与试验方法，并开展验证试验，考察方法的适用性和实际产品测定的可操作性。

4.3 增加定性试剂盒的技术要求

按结果判定可分定量和定性试剂盒，定性试剂盒通常有两种，一种是直接报告阴/阳性，另一种是通过检验结果与规定临界值比较来报告阴/阳性，前一种可能无法获取原始检验结果或其信号值等详细信息，后一种可以获得原始检验结果或其信号值。可获得原始检验结果或其信号值的定性试剂盒精密度等评价可以参照定量试剂盒的评估方法。但直接报告阴/阳性试剂盒的评估方法不同，有必要制定方法程序。

4.4 修订前后标准对照表

表 3. 修改前后（新旧）标准对照

章条编号	原标准	修订后	修订原因
1 范围	本文件适用于小分子化合物检测用的酶联免疫分析试剂盒。	本文件适用于酶联免疫分析试剂盒。	ELISA 不仅适用真菌毒素、农药、抗生素等小分子，还适用于蛋白、细胞因子、病毒、细菌等大分子，通过增加定性部分等，使该标准的适用范围扩大
2 分类	/	按检验结果的判定方式可分定量分析试剂盒和定性分析试剂盒。按方法原理	试剂盒结果判断方式不同，分定性、定量，其技术要求有不同点；方法原理和步骤的不同，

	和步骤的不同，可分为非竞争法和竞争法两大类。	分非竞争法和竞争法两大类，其计算响应值与浓度成正比或反比。为便于叙述，新增分类。
2.4.1 检出限	一般用空白标准溶液 ( $n \geq 10$ ) 测定均值加或减 2 倍标准差的值 ( $\bar{x}_0 \pm 2s$ ) 所对应的浓度表示检出限。	试剂盒的检出限确证，原用 95.4% 可信限计算：重复测定零剂量点(10 次以上)计算平均反应值，以 $\bar{x}_0 \pm 2S$ 的反应值计算出相应的浓度，即试剂盒的检测限。现用 99.7% 可信限计算：重复测定零剂量点(10 次以上)，求浓度和标准差，计算 $\bar{x}_0 + 3s$ 的浓度。也符合 GB/T 27417-2017 要求。
3.2.2/4.1.2 灵敏度	2.4.2 定量限 用空白标准溶液 ( $n \geq 10$ ) 测定均值加或减 3 倍标准差的值 ( $\bar{x}_0 \pm 3s$ ) 所对应的浓度表示定量限。且定量限值应大于或等于标准曲线中最低浓度点值，满足一定的精密度和准确度的要求。	定量限关联样品及样品的处理方法，ELISA 的相关标准未给出具体的定量限要求，试剂盒产品说明书对不同样品也给出不同的定量限，难于统一规定，不再规定。
3.2.5/4.1.5 特异性	/	检测多种类似物或多残留的试剂盒，鉴于可发生许多非特异性反应，干扰分析结果，导致测定结果的不准确性，需要界定交叉反应或特异性的指标，以正确评价试剂盒的特异性。
3.2.6	/	试剂盒在有效期内，在规定的保存条件下，稳定性
		试剂盒对贮存及运输环境的温度有一定的要求，所有试剂盒

<p>4.1.6</p> <p>稳定性</p>	<p>试验的各项性能指标应符合产品质量标准要求。每一批试剂盒应留样，并定期作2°C~8°C稳定性考核；试剂盒成品出厂前应做加速稳定性试验，在规定的加热条件（如37°C）下放置规定时间，检测的各项性能指标应符合产品质量</p>	<p>均在外包装上标示贮存条件与保质期，建立试剂盒稳定性评价方法。</p>
<p>3.3/4.2 定性分析试剂盒要求/检验方法</p>	<p>定性试剂盒的技术要求：灵敏度（检测限）和特异性（阴性对照品符合率和阳性对照符合率）、精密度（批内、批间差）、稳</p>	<p>定性分析试剂盒是 ELISA 试剂盒的一类别，有必要对其质量进行评价。</p>
<p>4.1.1 标准曲线</p>	<p>增加四参数曲线拟合模型</p> <p>示例</p>	<p>四参数 log-logistic 拟合能获得拟合度更好的 S 型曲线，特别是方程的 4 个参数都有着现实意义，在中国药典 2020 年版中对于活性/效价的规定中所提供的范例都是基于四参数拟合，最符合免疫化学规律，是 WTO 推荐使用的数学模型，ELISA 竞争法和夹心法都可以用到。</p>

## 五 主要技术内容确定的依据

### 5.1 范围及分类

ELISA 的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。检标本与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体，通过反应也结合在固相载体上。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物（或荧光物质），产物的量与标本中受检物质的量直接相关，可根据呈色的深浅（或荧光强弱）进行定性或定量分析。

非均相 ELISA 可分为竞争性和非竞争两大类。根据检测目的和操作步骤不同，用于测定抗体，也可用于测定抗原。非竞争非均相 ELISA：直接法、间接法、夹心法等。竞争非均相 ELISA：间接竞争法、直接竞争法等。在方法学上不断改进和衍生的新 ELISA 方法，灵敏度有了较大的提高，如荧光底物的使用的酶联免疫荧光测量法和生物素-亲和素系统的生物反应放大技术等。

（1）间接法，此法是测定抗体的最常用的方法。

将已知抗原包被在固相载体上，待测抗体与抗原结合后再与酶标二抗结合，形成抗原—待测抗体-酶标二抗的复合物，复合物的形成量与待测抗体量成正比。

固相抗原+待测标本（含相应抗体）+酶标抗抗体+底物显色。

（2）夹心法，此法常用测定抗原，适用于多价大分子抗原的检测，不适用于检测半抗原的小分子物质。

夹心法分为直接夹心和间接夹心法。检测抗体是酶标抗体，则可称为直接夹心 ELISA；检测抗体不带有标记，则还需要使用酶标二抗与检测抗体结合，这种称为间接夹心 ELISA。直接夹心又分为双抗体夹心法和双抗原夹心法。夹心 ELISA 实验需要用到配对抗体（捕获抗体和检测抗体），原理：将捕获抗体结合到 ELISA 板上，通过捕获抗体固定抗原，随后通过直接或间接 ELISA 的方式进行检测。

双抗体夹心法：固相抗体+待测标本（含相应抗原）+酶标抗体+底物显色。

（3）竞争法，此法可用于抗原和半抗原定量测定，也可用于测定抗体。

首先将特异性抗体吸附于固相载体表面，经洗涤后分成两组：一组加酶标记抗原和被测抗原的混合液；另一组只加酶标记抗原，再经孵育洗涤后加底物显色，这两组底物降解量之差，即为所要测定的未知抗原的量，呈色与含量负相关。

以测定抗原为例：

测定管 固相抗体+（酶标抗原+待测抗原）+底物显色（弱）

对照管 固相抗体+（酶标抗原+/-）+底物显色（强）

在商品化试剂盒中用的比较多的是双抗体夹心法和间接竞争法，其中双抗体夹心法多用于大分子化合物检测，如致敏蛋白、细胞因子、病毒、沙门氏菌等微生物；竞争法多用于小分子化合物检测，如真菌毒素、农兽药、抗生素等。

收集整理分析各类试剂盒质量标准或说明书的主要技术要求，从产品质量角度了解技术要求，详见附表 1。同时解读了用酶联免疫分析试剂盒的方法标准，从方法学的角度了解对试剂盒的技术要求，详见附表 2。通过分析总结，综合性制定了本标准的技术要求。鉴于 ELISA 的原理、方法类型、检测目标物、结果的判定，不再界定小分子化合物检测用的酶联免疫分析试剂盒。补充特异性、稳定性，区分定性与定量。

鉴于标准阐述和应用需求，增加分类条款，按检验结果的判定方式可分定量分析试剂盒和定性分析试剂盒。按方法原理和步骤的不同，可分为非竞争法和竞争法两大类。

标准规定了酶联免疫分析试剂盒的技术要求、检验方法、检验规则、使用说明书、标签、包装、运输、贮存。本标准适用于酶联免疫分析试剂盒。技术要求涉及试剂盒主要组分及要求、外观、定量分析试剂盒的技术要求（标准曲线的线性、灵敏度、精密度、正确度、特异性、稳定性）和定性分析试剂盒的技术要求（阴性对照品符合率、阳性对照符合率、灵敏度（检测限）、精密度、稳定性）。

## 5.2 试剂盒主要组成要求和外观

试剂盒是由各种试剂与材料配套才能使用，是试剂盒不可或缺的一部分，所以对试剂盒主要组成进行了规定，以更好的了解试剂盒的组成及检测原理。

外观是对试剂盒质量的基本要求，因此要求试剂盒外观完整，内装试剂齐全；包被抗原或抗体的微孔板透明干燥且用（真空）包装才能保证包被物不脱落或不失活；液体组分应澄清透明，冻干组分呈疏松体则说明试剂的物理性状基本正常。

### 5.3 定量分析试剂盒技术要求

#### 5.3.1 标准曲线的线性及试验方法

定量标记免疫分析的结果都是建立在标准曲线基础上，可用于计算样品中待测物的浓度。选择适当的标准曲线是定量分析质量控制的重要环节，以保证检测可准确量化低浓度到高浓度区间。在 ELISA 检测中数据处理模型有：直线回归、双对数 / 半对数、log—logit、四参数 Logistic 数学模型、样条函数和多项式等。

##### (1) 直线回归

直线回归是最简单的回归模型，也是最基本的曲线拟合回归分析方法，将所有的测试点拟合为一条直线。 $R^2$  值在此通常用于确定拟合，数值大于 0.99 表示拟合非常好。

其拟合函数方程式为： $y=a+bx$ 。

##### (2) 半对数拟合回归方程

半对数拟合即将浓度值取对数值，然后再和对应的 OD 值进行直线回归，理想的状态下，在半对数坐标中是一条直线，常用于浓度随着 OD 值的增加或者减低呈对数增加或者减少的情况，即浓度的变化比 OD 值的变化更为剧烈。在 ELISA 实验中较常用。

拟合函数方程式为： $y = a \lg(x) + b$ 。

##### (3) Log—Log 拟合回归方程

Log—Log 拟合和半对数相似，只是将 OD 值和对应的浓度值均取对数，然后再进行直线回归。

拟合函数方程式为： $\lg(y) = a \lg(x) + b$ 。

##### (4) Logit—Log 拟合回归方程

Logit—log 则是免疫学检测中的模型，本法适用于竞争法标记免疫分析标准曲线的拟合。当竞争性反应物为 0 时结合率为 100%，如果某一浓度下结合率为 B，



$B=OD/OD_0$ ，在对  $B$  进行 Logit 变换： $y=\ln[B/(1-B)]$ ，之后  $y$  与浓度的对数成线性关系，即： $y=a+b\lg(x)$ ，拟合函数方程式为： $\lg(y)=a\lg(x)+b$  就得到了 Logit-log 直线回归模型。

半/双对数和 log-logit 计算方法简单，可以借助于计算器或 microsoft 的 excel 软件进行计算，无需重新编制计算软件，并且能将夹心法和竞争法标记免疫分析的剂量-反应曲线直线化，进行平行性检验。因此，是评价试剂盒的首选。

#### (5) 四参数 Logistic 数学模型拟合回归方程

四参数 log-logistic 拟合能获得拟合度更好的 S 型曲线，特别是方程的 4 个参数都有着现实意义，从而对于判断和理解实验结果有着巨大的帮助，在中国药典 2020 年版中对于活性/效价的规定中所提供的范例都是基于四参数拟合，最符合免疫化学规律，是 WTO 推荐使用的数学模型，ELISA 竞争法和夹心法都可以用到。高端酶标仪都会配备带有数据收集和处理软件。

四参数拟合的方程为： $y=D+(A-D)/(1+(X/C)^B)$ 。

其 4 个参数都有着很好的现实意义。其中  $D$  表示吸光度下限值，代表着 S 型曲线的下渐近线；而  $A$  表示吸光度上限值，代表着 S 型曲线的上渐近线。 $C$  为吸光度增长速度开始发生变化的浓度值，即半效反应浓度 ( $EC_{50}$ )。 $B$  为吸光度增加速率参数，相当于曲线的斜率。

酶联免疫检测试剂盒中的标准曲线拟合规定，要根据各个实验本身的特点，选择最适合的曲线拟合模型，才能得到最合理的实验结果，一般情况下，需要综合考虑标准曲线的趋势走向以及  $R$  值的大小，最终选择适合产品的回归方程。目前，ELISA 分析中，多为直线回归、半对数拟合回归方程，四参数 log-logistic 拟合回归方程因拟合度要好于线性拟合，是应用趋势。因此在本标准中建议以说明书规定的拟合回归方程。

根据 GB/T 27417-2017 《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》：校正标准曲线法定量，至少具有 6 个校准点（包括空白），每个校准点至少重复测量 2 次，最好是 3 次或更多，对于准确定量的方法，线性回归方程的相关系数不低于 0.99；对于筛选方法线性回归方程的相关系数不低于 0.98。SN/T 2775-2023 商品化食品检测试剂盒评价方法：标准浓度应包括一定梯度的至少 5 个浓度(非线性者如免疫分析可适当增

加)和零点;标准曲线应覆盖样品可能的浓度范围。线性要求可由根据检测试剂盒给出的指标制定,一般不低于 0.990。YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒):标准按一定比例稀释至少 5 种浓度,每种浓度重复检测 2 次,试剂盒的相关系数不低于 0.9900。

标准曲线评价方法,应按产品使用说明书的程序操作,以标准溶液考察线性和范围,标准溶液应包括一定梯度的至少 5 个浓度和零点。测定标准溶液的吸光度值或荧光值或其他值,建立标准曲线和计算相关系数,通过曲线的相关系并满足不低于 0.99,确定标准曲线的检测范围。

例 1: Logit-Log 拟合回归方程

绘制 Y-Ln(X)标准曲线为例,获得的每个浓度标准溶液吸光度值(B)除以第一个浓度标准溶液(0 标准)的吸光度值( $B_0$ ),再乘以 100%,即百分吸光度比值。以标准品浓度(C)的自然对数值为 X 轴,对应的百分吸光度比值为 Y 轴,建立方程(1),并计算相关系数 r。

Y-Ln(X)标准曲线拟合,按式(1)计算百分吸光度比值,按式(2)建立方程。

$$Y = \frac{B}{B_0} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

$$Y = a + b \ln X \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- Y——百分吸光度比值;
- $B_0$ ——零浓度标准溶液的吸光度值;
- B——标准溶液吸光度值;
- X——标准品浓度,单位为纳克每毫升 (ng/mL);
- a——截距;
- b——斜率。

相关系数的计算:利用数据统计处理软件计算相关系数。

例2: 四参数log-logistic拟合回归方程

按照酶联免疫试剂盒说明书的程序操作，读取各孔的吸光值并取平均值，通过系列标准浓度与针对每个浓度获得的平均吸光值绘制标准曲线。得到四参数拟合标准曲线或其他规定的标准曲线。以标准品吸光度值为纵坐标，以标准品浓度为横坐标，进行四参数曲线拟合，按式（3）建立方程，并计算相关系数。

$$Y = D + \frac{A-D}{1+[X/C]^B} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- Y— 吸光度值；
- A— 最大吸光度值；
- B— 吸光度增加速率参数，即曲线在 EC50 处的斜率；
- C— 吸光度增长速度开始发生变化的浓度值，即半效反应浓度（EC<sub>50</sub>）；
- D— 最小吸光度值；
- X—— 标准品浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）。

5.3.2 灵敏度及试验方法

灵敏度是在给定的置信水平上可与零剂量相区别的剂量，即可检测的最低分析物浓度。各标准描述如下：

1) GB/T 27417-2017 《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》中定义灵敏度是测量系统的示值变化除以相应被测量的量值变化所得的商。灵敏度可表示为检出限（LOD）和定量限（LOQ），LOD 是指由给定测量程序获得的测得的量值，其对物质种不存在某种成分的误判概率为β，对物质中存在某种成分误判概率为 α，国际理论化学和应用化学联合会推荐α和β的默认值为 0.05。LOQ 是指分析方法可定量测定样品中待测组分的最低浓度或最低量，应满足一定的精密度和准确度的要求。

确定检测限的方法较多，包括目视评价法、空白标准偏差法、校准方程的适用范围评估、信噪比法等。其中，目视评价法是通过在样品空白中添加已知浓度分析物，然后确定能够可靠检测出分析物的最低浓度值的方法。即在样品空白中加入一系列不同浓度的分析物，随机对每一个浓度点进行约 7 次独立测试，通过绘制阳性（或阴性）结果百分比与浓度相对应的反应曲线，用来检查确定阈值浓度。可用于定性方法中检

出限的确定。空白标准偏差法为通过分析大量的样品空白或加入最低可接受浓度的样品空白来确定 LOD，独立测试的次数应不少于 10 次，计算出检测结果标准偏差 (s)，LOD 表示为样品空白平均值+3s 等，适用定量法。校准方程的适用范围评估：如果在 LOD 或接近 LOD 的样品数据无法获得时，可利用校准方程的参数评估仪器的 LOD。如果用空白平均值加上空白的 3 倍标准偏差，仪器对于空白的响应即为校准的截距 a，仪器响应的标准偏差即为校准的标准偏差 ( $s_{y/x}$ )。故可利用方程  $y_{LOD}=a+3s_{y/x}=a+bx_{LOD}$ ，则  $x_{LOD}=3s_{y/x}/b$ 。这个方程可广泛应用于分析化学。然而由于这是外推法，所以当浓度接近于预期的 LOD 时，结果就不如由实验得到的结果可靠，因此建议分析浓度接近于 LOD 的样品，应确证在适当的概率下被分析物内能够被检测出来。

定量限的确定主要从其可信性考虑，通常建议将空白值加上 10 倍的重复标准偏差作为 LOQ，也可以 3 倍的 LOD 或高于方法确认中使用最低加标量的 50% 作为 LOQ，如为增加数据的可信性，也可用 10 倍 的 LOD 来表示。特定的基质和方法，其 LOQ 可能在不同实验室之间或在同一个实验室内由于使用不同设备、技术和试剂而有差异。

2) YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)标准中，定量试剂盒要求检测限应符合相应规定的要求；定性试剂盒要求检测限对检测限国家对照品或生产企业提供的检测对照品进行检测，结果应符合相应规定的要求。定量试剂盒采用空白标准偏差法评估检测限，用零浓度校准品或样品稀释液作为样本进行检测，重复测定 20 次，得出 20 次测量结果的吸收值 (A)，计算其平均值(X)和标准偏差 (S)，以  $\bar{x}+2S$ (原理为夹心法试剂盒)或  $\bar{x}-2S$ (原理为竞争法试剂盒)所对应的 A 值，根据试剂盒所用校准品的定标曲线方程，将  $\bar{x}+2S$  或  $\bar{x}-2S$  所对应的 A 值带入上述方程中，求出对应的浓度值，即为检出限。定性试剂盒对检测限国家对照品或生产企业提供的检测对照品进行检测。可信限 95.4% 。

3) 农医发[2005]17 号 兽药残留酶联免疫试剂 (盒) 备案审查技术资料要求及附件 2：试剂盒备案参考评判标准要求检测限为 20 份空白样品测定均值加 3 倍标准差。定量限应大于标准曲线中最低浓度点。对于定量方法，应对该浓度样品至少测定 6 次进行验证，而不能通过外延法推断。

4) SN/T 2775-2023 商品化食品检测试剂盒评价方法定义, 检出限:指在给定的置信水平上,样品中目标分析物能被可靠地与基质干扰区分的最低浓度或含量。定量限:指样品中目标物在一个可接受的精密度与正确度水平上能被定量检测的最低浓度或含量。定量限:制备具有一定含量目标分析物的阳性质控样品,在给定的分析条件下进行至少 20 次重复测试,方法定量限水平应至少有 95%测试结果的响应信号是空白样本响应信号的 5 倍,且其正确度与精密度应满足方法和法规的要求。

综合以上标准及规范, ELISA 定量分析方法通常采用空白标准偏差法评估检测限, 且多数 ELISA 试剂盒的说明书中提供最低检出限值。试剂盒的检出限确证, 可用 95.4% 可信限计算: 重复测定零剂量点(10 次以上)计算相应平均浓度和标准偏差, 以  $\bar{x}+2S$  计算出的浓度, 即试剂盒的检测限; 若用 99.7% 可信限计算:  $\bar{x}+3S$  检测限。由于每一品种中的关键试剂抗原、抗体或标记物的不同, 在产品的开发测试中加以优化, 其具体检测试剂盒的灵敏度会有不同, 无论用何种方法, 均可应用一定数量的其浓度为近于或等于检出限样品进行分析, 以可靠地测定检出限。

定量限是指分析方法可定量测定样品中待测组分的最低浓度或最低量, 应满足一定的精密度和准确度的要求。该指标体现了分析方法是否具备灵敏的定量检测能力, 以保证含量很少的成分能够被准确测出。定量限关联样品及样品的处理方法, ELISA 的相关标准未给出具体的定量限要求, 试剂盒产品说明书对不同样品也给出不同的定量限, 难于统一规定, 不再规定。

### 5.3.3 精密度及试验方法

GB/T 27417-2017 《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》中定义精密度是指在规定条件下, 对同一或类似被测对象重复测量所得示值的量值间的一致程度。对于任何一个分析体系而言, 精密度是评价其方法的基本参数之一, 通常以检测结果的重复性和再现性表示。在检验统计学中, 用标准差和变异系数表示测定的精密度。变异系数被定义为标准差与其均值的比值, 以百分数表示(变异系数(coefficient of variation, 简称 CV; 或称相对标准差, relative standard deviation, 简称 RSD)。变异系数越大的样本, 其测定值的精密度越低。依据测定值与分析的关系, 精密度可分为批内精密度和批间精密度, 分别以批内变异系数和批间变异系数表示。批内变异系数指

同一次分析中同一样品平行测定值的重现性,批间变异系数指同一样品在不同次分析中测定值的重现性。因此精密度是考察试剂盒对同一样本重复测定时能否得到相同实验结果的指标,是评价试剂盒质量控制的重要内容。批内精密度是指同一次实验内(同一块微孔板上),同一样本重复测定结果;批间精密度包含内容有:同一试剂盒,不同批次之间;同一试剂盒,同一批次,不同实验室之间;同一试剂盒,同一批次,同一实验室,不同操作者之间;同一试剂盒,同一批次,同一操作者,有效期内不同时间之间等的重复检测结果。

1) 标准 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》资料性附录提供了实验室内变异系数参考范围,规定对于食品中的禁用物质,精密度实验应在方法测定低限、两倍方法测定低限和十倍方法测定低限进行三水平试验;对于已制定 MRL 的,精密度实验应在法测定低限、MRL、选一合适点三个水平进行试验;对于未制定 MRL 的,精密度实验应在方法测定低限、常见限量指标、选一合适点三个水平进行试验。重复测定次数至少为 6。实验室内部的变异系数参考范围见表 4。

表 4. 实验室内变异系数

被测组分含量	实验室内变异系数 (CV) /%
0.1 µg/kg	43
1 µg/kg	30
10 µg/kg	21
100 µg/kg	15
1 mg/kg	11
10 mg/kg	7.5
100 mg/kg	5.3
1000 mg/kg	3.8
1%	2.7
10%	2.0
100%	1.3

2) YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)标准中, 要求定量试剂盒: 重复性(批内)用至少 2 个浓度水平的样本各重复检测 10 次, 手工操作法或仪器操作法的变异系数(CV)应符合相应规定的要求; 用至少 2 个浓度水平的样本各重复检测 10 次, 计算 10 次测量浓度结果的平均值和标准差, 得出变异系数。批间差用 3 个批号的试剂盒检测同一份样本, 则 3 个批号试剂盒之间的变异系数(CV)应符合相应规定的要求; 用 3 个批号的试剂盒分别检测同一份样本, 各重复 10 次, 计算 30 次测量浓度结果的平均值和标准差, 得出变异系数。

农医发[2005]17 号 兽药残留酶联免疫试剂(盒)备案审查技术资料要求及附件 2: 试剂盒备案参考评判标准要求选用标准曲线 50%抑制浓度(IC<sub>50</sub>)附近浓度的标准溶液重复测定。批内变异系数: 每批平行样之间的变异系数小于或等于 25%, 对于禁用药物小于或等于 30%。批间变异系数: 所有样品之间的变异系数值小于或等于 30%, 对于禁用药物小于或等于 40%。

综合以上标准及规范, 试剂盒的精密度又分为批内和批间精密度, 在试剂盒的检测范围内, 不同浓度的样品对试剂的反应的动力学是不同的, 其检测的误差也是不同的, 为了在试剂盒的检测范围内更好地评价其精密性, 用于精密性的样品应含高、中、低三类, 对定量试剂盒, 高、低二类样品应分别代表定量范围的上限和下限。而且每个样品至少检测 6 次, 增加检测次数可以提高可信性, 在实际工作中, 一般对该类样品的检测 10 次或 10 次以上。鉴于待测物质量分数一般小于 100 $\mu$ g/kg, 其批内变异系数应不大于 20%, 批间变异系数应不大于 25%, 根据待测物质量分数, 可适当调整放宽变异系数, 并符合相关标准要求。

批内变异系数: 使用同一批次的试剂盒, 用至少高、低 2 个浓度水平的样本各重复检测 10 次, 其变异系数(CV)应不大于 20%。按产品使用说明书的程序操作测定。统计 10 次测量浓度结果的平均值和标准差, 计算批内变异系数。

批间变异系数: 使用 3 个批号的同一试剂盒检测同一份样本, 用至少高、低 2 个浓度水平的样本各重复检测 10 次, 则 3 个批号试剂盒之间的变异系数(CV)应不大于 25%。按产品使用说明书的程序操作测定。统计 30 次测量浓度结果的平均值和标准差, 计算批间变异系数。按(4)式计算变异系数(CV%)。

$$CV=S/\bar{x}\times100\% \dots\dots\dots(4)$$

式中：

CV——变异系数；

$\bar{x}$ ——平均测量值；

S——标准差。

5.3.4 正确度及试验方法

GB/T 27417-2017 《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》对正确度的表述：测量结果的正确度用于表述无穷多次重复性测定结果的平均值与参考值之间的接近程度，正确度差意味着存在系统误差，通常用偏差表示。而测量结果的偏差则通过回收试验进行评估。验证方法：最理想的偏倚评估是利用样品的基质匹配且浓度相近的有证标准物质（CRMs）进行测试，如果合适的 CRMs 无法获得，需要寻找可替代的物质来评定偏倚。如可采用分析参考物质（RM）来进行评估回收率，即将已知浓度的分析物加到样品中，按照预定的分析方法进行检测，测得的实际浓度减去未添加分析物时样品的测定浓度，并除以所添加浓度的百分率；另外，经过协同实验室确定了特征的物质也可用于评估偏倚。如果合适的证标准物质(CRMs)和分析参考物质(RM)都无法获得，只能通过在基质空白中加入一系列浓度的目标物所得回收率来评估， $R=(C_{\text{加后测定浓度}}-C_{\text{加前测定浓度}})/C_{\text{加入目标物的理论浓度}}$ 。可利用已知偏倚的国际和国家认可参考方法来评定另一种方法的偏倚，或者利用两种方法按照相关测试程序对多种基质或浓度的典型样品进行测定，并用 t-检验对分析方法间的偏倚显著性进行评估。方法回收率的偏差范围参考表 5。

表 5.方法 回收率偏差范围

浓度水平范围 mg/kg	回收率范围%
>100	95~105
1~100	90~110
0.1~1	80~110
<0.1	60~120

标准 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》资料性附录提供了回收率要求，规定对于食品中的禁用物质，回收率应在方法测定低限、两倍方法测定



低限和十倍方法测定低限进行三水平试验；对于已制定最高残留限量 MRL 的回收率应在法测定低限、MRL、选一合适点三个水平进行试验；对于未制定 MRL 的，回收率应在方法测定低限、常见限量指标、选一合适点三个水平进行试验。

YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)要求定量试剂盒标准中有 3 种准确度的表示方法，用参考物质作为样本进行检测，其测量结果的相对偏差应在规定范围内，重复测量 3 次，其平均值结果记为 M，计算公式：测量偏差=（M-理论值）/理论值×100%；回收：将已知浓度的待测物加入到血液基质或其他体液成分中，其回收率在规定范围内；比对：用已知上市试剂盒或参考方法进行比对试验，结果应常相应的要求。

综合以上标准及规范，评估验证正确度的方法主要有 3 种，使用证标准物质/分析参考物质验证法，计算平均值和证标准物质/分析参考物质示值的相对偏差；当无有证标准物质情况下，通过测定标准添加样品中已知量目标分析物的回收率；用已知上市试剂盒或参考方法进行比对试验，并用 t-检验对分析方法间的偏倚显著性进行评估。在 ELISA 分析中主要应用回收率法验证正确度，回收率试验又分为添加回收率和稀释回收率（线性度），添加回收率将已知待测物添加到样本中，以不添加标准品的样本基质为空白对照，回收率数值为靶标的测定浓度与添加的标准品浓度相比较；稀释回收率是在样本基质中添加有适当浓度的标准品，分别稀释 2 倍、4 倍、8 倍来检测，测定各浓度下的回收率。添加回收试验应至少选择低、中、高 3 个添加浓度水平的目标分析物，每个浓度水平至少平行测定 6 次，计算测量结果的平均值与理论值的偏差。依国家标准对不同浓度可接受的回收率判断标准，待测物质量分数若小于 100µg/kg，则平均回收率在 60%-120%。按（5）回收率计算公式

$$R = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100\% \dots\dots\dots(5)$$

式中：  
R——回收率；  
C<sub>1</sub>——加标之后测定的浓度；  
C<sub>2</sub>——加标之前测定折浓度；

C<sub>3</sub>——加入目标分析物的理论浓度。

### 5.3.5 特异性及试验方法

YY/T 1789.5-2023 体外诊断食品检测试剂盒评价系统 性能评价方法 第5部分：分析特异性：分析特异性是评价测量程序抗干扰（包括交叉反应物质）能力的性能特征。在免疫化学测量程序中缺少分析特异性可能是由于交叉反应所致。ELISA试剂盒的检测是基于抗原抗体的反应进行的，特异性一般用交叉反应率表示，即被测物含有与其他类物质相似的抗原性造成非特异性反应。由于被测样本中存在的某些与待测抗原/抗体有相似化学结构或抗原表位的分子，如易共存的其他抗原抗体、某些激素、易使用的药物等，可能与试剂中的单克隆抗体发生交叉反应而影响检测结果。已有检测对象涉及结构类似物的产品有很多，如真菌毒素类：黄曲霉毒素B族和G族、脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物、伏马毒素族、T-2毒素等；兽药残留类：四环素族类、呋喃唑酮类、磺胺类、喹诺酮类、 $\beta$ -兴奋剂类等，及微生物检测菌的干扰菌株等。因此在试剂盒的产品开发与生产过程中，特异性是质量控制指标之一，也是试剂盒性能评价的重要参数之一。

SN/T 2775-2023 商品化食品检测试剂盒评价方法特异性评价方法：制备或选择目标分析物含量为定量限与关注含量水平近的阳性质控样品，选择至少3种与目标分析物相关或相似的干扰物质（内源性物质、异构体、或物理化学性质类似化合物等）或干扰菌株，在各20份阳性质控样品中分别加入含量为定量限10倍、定量限100倍或更高的干扰化合物，采用检测试剂盒测定目标分析物含量，并与样品指定值进行比较，以相对误差表示。一般相对误差应在 $\pm 25\%$ 以内。相对误差的计算公式，相对误差(%)=(测定值-指定值)/指定值 $\times 100\%$ 。

YY/T 1789.5-2023 体外诊断食品检测试剂盒评价系统 性能评价方法 第5部分：分析特异性其体外诊断试剂的评价方式；干扰物的交叉反应性应在存在和不存在分析物的情况下进行测试，干扰物浓度应接近或高于预期在患者标本中发现的浓度上限。分别对存在和不存在分析物的样本重复测试，按式计算每组测量的交叉反应率，与制造商预定的标准进行比较判定。交叉反应率=(测量值-理论值)/干扰物浓度 $\times$

100%（分析物的浓度单位应与干扰物浓度单位一致），其测量值：添加样本的测量均值；理论值：对照样本的测量均值；干扰物浓度：添加干扰物浓度。

在竞争ELISA方法中，目标分析物和干扰物分别配制成标准系列浓度，均用目标分析物试剂盒检测，并分别拟合标准曲线，以目标分析物和干扰物的50%抑制浓度比计算交叉反应率， $W=B_{IC50}/A_{IC50}\times 100\%$  其 $A_{IC50}$ ——类似物的50%抑制浓度； $B_{IC50}$ ——待测物的50%抑制浓度。

综上所述，有必要增加试剂盒特异性技术指标。试剂盒与目标分析物、相关或相似干扰物（目标分析物结构类似物、代谢物、干扰菌等）存在交叉反应的，交叉反应率应符合相应规定的要求。根据试剂盒类型选择交叉反应率的验证方法，方法一，将目标分析物的干扰物加入样本中，其浓度可以是定量限10倍、100倍或更高，采用检测试剂盒测定其含量，计算交叉反应率，适用于各类试剂盒；方法二，分别将目标分析物及干扰物分别配制成标准系列浓度，依法检测，并分别拟合标准曲线，得目标分析物和干扰物半数抑制浓度，计算交叉反应率，适用于竞争法试剂盒，最常用的方法。

### 5.3.6 稳定性及试验方法

YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)标准中定义稳定性为试剂（盒）在生产企业规定界限内保持其特性的能力。稳定性是整个试剂盒研制、生产质量控制的重要内容，为试剂盒的生产工艺、试剂组成、包装材料、贮存、运输条件和有效期确定提供依据。稳定性是产品性能的关键指标之一，也是报备审批产品必要的试验资料之一。贮存及运输环境的温度对试剂盒的稳定性致命的影响，因此所有试剂盒均在外包装上标示贮存条件与保质期。

目前，我国已初步建立了ELISA试剂盒稳定性评价体系，各部门制定的酶联免疫法检测试剂审查指导原则或评价技术要求中均提及稳定性试验，如国家药品监督管理局/酶联免疫法检测试剂注册技术审查指导原则、SN/T 4800-2017 进出境动物检疫ELISA检测试剂盒质量评价技术规程、农业农村部/兽药残留酶联免疫试剂（盒）备案审查技术资料要求，并作为医药领域和食品安全领域评价试剂盒质量的重要指导文件。一般规定了产品稳定性评价的通用要求，包括对实时稳定性和加速稳定性的具体要求，但并未就具体研究内容进行详细描述。

根据实验的目的和条件不同,针对半成品或成品的试剂盒稳定性试验可以分为效期稳定性试验、加速稳定性试验、实际使用情况的稳定性试验,实际使用情况的稳定性涉及运输稳定性、开瓶稳定性、冻融稳定性、机载稳定性、复溶稳定性(冻干产品)等。试剂盒稳定性试验主要效期末稳定性试验和热稳定性试验,可根据试剂盒产品特性选择稳定性试验方法。

**效期末稳定性试验:**将试剂盒在规定的条件下保存至效期末,这是正常的稳定性试验方法,周期比较长,在研制投入生产前必测的。稳定性试验周期根据试剂盒的保存期确定,一般多试验时间两个月的观察计划,如产品保质期为12个月,则效期稳定性试验通常需要观察13个月以上。酶联免疫法检测试剂(盒)注册技术审查指导原则规定,企业应该对每一批试剂的半成品进行稳定性研究。试剂盒各组分应留样,2℃~8℃定期作稳定性考核,同时作37℃热稳定性试验,试验结果应符合产品的质量要求;兽药备案审核要求ELISA试剂盒2℃~8℃产品稳定性试验;用于进出境动物检疫ELISA试剂盒的评价要求在标明的保存条件下进行稳定性试验。

**热稳定性试验:**将试剂盒于37℃放置3天~7天,加速破坏性试验周期短,也是普遍认可的方法。按通常法则,生物试剂在37℃每稳定1天,相当于4℃~10℃保存1.5个月。37℃放置至少3天(有效期为6个月)、6天(有效期为12个月)。酶联免疫法检测试剂注册技术审查指导原则规定,成品在批放行前,每一批试剂应完成37℃热稳定性试验,试验结果应符合产品的质量要求;兽药备案审核推荐37℃加速的稳定性试验,从辅助佐证试剂盒的有效期。基于荧光法的试剂盒,因荧光底物对温度比较敏感,热冲击实验是选15℃~25℃可以放置8天,35℃~39℃至多可以放置2天。

**稳定性试验项目及结果分析,**稳定性试验的评价指标一般选择产品技术要求中规定的项目或评审细则中的技术要求项目。医用试剂盒的稳定性验证选择准确度、最低检测限、测量系统的线性和重复性等项目;兽药残留酶联免疫试剂盒备案稳定性试验的测定项目为0标准液的OD值、IC<sub>50</sub>、代表浓度的添加回收率,一般试剂盒研究开发用此文件指导稳定性试验;进出境动物检疫ELISA试剂盒的稳定性与评价试剂盒

的项目为分析敏感性、特异性、重复性、再现性；一般 ELISA 试剂盒稳定性试验项目应满足 GB/T 33411 酶联免疫分析试剂盒通则中的技术要求。

稳定性试验应建立合理的结果评判方法和可接受的验收标准，应对不同的考察项目分别进行分析，并对产品稳定性试验结果进行综合评估。即根据产品的特性制定各个指标可以接受的最大变化范围，以确保在整个有效期内产品的安全有效。

综上所述，有必要增加试剂盒稳定性技术指标。试剂盒在有效期内，在规定的贮存条件下，稳定性试验的各项性能指标应符合产品质量标准要求。每一批试剂盒应留样，并定期做 2℃~8℃稳定性考核，取至少三批次试剂盒试验，至规定的贮存条件下保存至有效期末，常规保存温度为 2℃~8℃，可根据保存期，间隔一定的时间测定一次，依本标准检测各项指标；试剂盒成品出厂前应做加速稳定性试验，在规定的加热条件（如 37℃）下放置规定时间，检测的各项性能指标应符合产品质量标准要求。取至少三批次试剂盒试验，根据生产企业所声称的热稳定性条件（如 37℃放置至少 2 天~6 天），可根据保存期，间隔一定的时间，测定一次，依本标准检测各项指标。

## 5.4 定性分析试剂盒技术要求

### 5.4.1 技术指标的确定

YY/T 1183-2010指出，定性是参比阴性对照、阳性对照（或称阴性、阳性质控品）等的吸光度（或荧光强度），以P/N或S/C比值等结果时行报告。其对定性试剂盒的要求有外观、阴性对照品符合率、阳性参考符合率、检测限、重复性、批间差、稳定性。SN/T 2775-2023提示，对于定性(含半定量)检测试剂盒，典型的评价参数包括方法的检出限、特异性、假阴性率、假阳性率、相对准确度(或与参考方法的一致性)、批间差异；必要时进行耐变性评价。定性检测试剂盒仅报告阴性/阳性的判断结果，不报送具体检测数值；半定量检测试剂盒一般用于判断目标分析物含量是否符合关注限量水平，可报告为大于关注含量水平或小于等于关注含量水平。SN/T 2435-2010 出入境动物检疫诊断试剂盒质量评价规程中对免疫学检测方法所用的诊断试剂盒的质量评价涉及试剂盒包装及性状检验、敏感性试验、特异性试验、重复性试验。GB 5009.295-2023 食品安全国家标准化学分析方法验证通则中定性方法性能参数选择特异性、检出限。

GB/T 27417-2017合格评定化学分析方法确认和验证指南中确证方法定性方法性能参数选择检出限、灵敏度、选择性、基质效应和稳健度。GB 4789.45-2023食品安全国家标准微生物检验方法验证通则中定性方法性能参数选择包容性、排他性和灵敏度，在本标准中灵敏度体现在检测限、包容性体现在阳性对照品符合率，排他性体现在阴性对照品符合率。

综合以上标准，定性试剂盒的技术要求涉及结果判定、灵敏度（检测限）和特异性体现在阴性对照品符合率和阳性对照符合率、精密度（批内、批间差）、稳定性。与定量试剂最大的区别是结果判定的方式不同，重点关注不同点，其它要求与定量试剂盒相同，如试剂盒主要组成要求和外观、使用说明书要求和标签。

#### 5.4.2 结果判定

定性测定的结果判断是对受检标本中是否含有待测抗原或抗体作出“有”或“无”的简单回答，分别用“阳性”、“阴性”表示。“阳性”表示该标本在该测定系统中有反应，“阴性”则为无反应。

在间接法和夹心法ELISA中阳性孔呈色深于阴性孔。在竞争法ELISA中则相反，阴性孔呈色深于阳性孔。两类反应的结果判断方法不同。

非竞争法(间接法和夹心法)这类反应的定性结果可以用肉眼判断，在条件许可下，应该用比色计测定吸光值，可以得到客观的数据。应设有阳性对照和阴性对照。常用以下几种方法：

阳性判定值(cut-off value)一般为阴性对照A值加上一个特定的常数，以此作为判断结果阳性或阴性的标准阈值。阳性判定值=NCX+0.05(NCX阴性对照A值的平均数)；NCX+2~3SD。标本A值大于阳性判定值为阳性，小于为阴性。或S/CO——标本(S)和临界值(CO)的A值比值。

标本阴性对照比法：在得出标本(S)和阴性对照(N)的A值后，计算S/N值（也有写作P/N）的。或COI——临界指数（相当于阈值×阴性对照(N) A值。S/N≥2.1为阳性；S/N<2.1，但>1.5为可疑；S/N<1.5为阴性。

标本阳性对照比法：S/P（标本OD值/阳性对照OD值）——S/P=（样品OD值均数-阴性对照OD值均数）/（阳性对照OD值均数-阴性对照OD值均数）（NY/T 680-2003）。

竞争法ELISA中，一般调节阴性对照的吸光度在1.0~1.5之间，此时反应最为敏感，但肉眼很难辨别弱阳性反应与阴性对照的显色差异，一般用比色计测定，常用阳性判定值法和抑制率法：

阳性判定值法与非竞争法基本相同，但在计算公式中引入阳性对照A值。标本A值不大于阳性判定值为阳性，大于或等于该值为阴性。

抑制率法：抑制率表示标本在竞争结合中标本对阴性反应显色的抑制程度，按下式计算：

抑制率(%)=(阴性对照A值-标本A值) $\times$ 100%/阴性对照A值，一般规定抑制率不小于50%为阳性，小于50%为阴性。（SN/T1165.1 PI抑制百分比）

由此说明，不同原理的定性试剂盒的结果判定方式不一，每种应规定结果判定方法，且要给出判定阈值。

#### 5.4.3 阴性对照品符合率（特异性）及试验方法

YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)标准要求，对阴性国家对照品或生产企业提供的阴性对照品进行检测，其阴性对照品符合率应符合相应规定的要求。其检测按照试剂盒的说明书进行操作，根据说明书中的临界值进行判定，计算公式：阴性对照品符合率=结果为阴性的对照品数量/总对照品数量 $\times$ 100%。SN/T 2775-2023 规定：假阳性率为检测试剂盒测定为阳性而实际样品为阴性(或参考方法确认为阴性)的数量除以实际样品为阴性(或参考方法确认为阴性)的样品总数,假阳性率=100-特异性。农医发[2005]17号 兽药残留酶联免疫试剂（盒）备案审查技术资料要求及附件 2：定性方法：阴性和阳性样品各测定不少于 50 份，确定假阳性率和假阴性率。SN/T 2435-2010 出入境动物检疫诊断试剂盒质量评价规程：特异性用已知健康动物样品的阴性检出率来表示，对于未知样品，通过与公认的参考方法检测结果的比较确定其特异性。其试验应使用已知阴性样品或经参考方法确认的阴性样品进行试验。在试验中，可采用对样品进行系列稀释的方式，并结合敏感性试验确定其判定标准是否合理。同时应确定判定试验系统的判定条件（同条件下对阴性、弱阳性、强阳性对照试剂的测定值范围）是否成立和合理。

综合相关产品标准、方法标准及试剂盒使用说明书，要求为：

对阴性对照品（菌株）进行检测，其阴性对照品（菌株）符合率应符合相应规定的要求。按照试剂盒的说明书进行操作，根据说明书中的判定方法和阈值进行判定。计算阴性对照品符合率。计算公式：阴性对照品符合率=结果为阴性的对照品数量/总对照品数量×100%。

#### 5.4.4 阳性对照品符合率（灵敏度）及试验方法

YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)标准要求，对阳性国家对照品或生产企业提供的阳性对照品进行检测，其阳性对照品符合率应符合相应规定的要求。其检测按照试剂盒的说明书进行操作，根据说明书中的临界值进行判定，计算公式：阳性对照品符合率=结果为阳性在对照品数量/总对照品数量×100%。SN/T 2775-2023 规定：假阴性率为检测试剂盒测定为阴性而实际样品为阳性(或参考方法确认为阳性)的样品数量除以实际样品为阳性(或参考方法确认为阳性)的样品总数，假阴性率=100-灵敏度。SN/T 2435-2010 出入境动物检疫诊断试剂盒质量评价规程:应使用已知阳性样品或经参考方法确认的阳性样品进行试验。可采用对阳性样品进行系列稀释的方式确定最低检出限量，并与已知样品结果或与参考方法得出的结果进行比较，根据符合率确定试剂盒的敏感性。

综合相关产品标准、方法标准及试剂盒使用说明书，要求为：

对阳性对照品（菌株）进行检测，其阳性对照品（菌株）符合率应符合相应规定的要求。按照试剂盒的说明书进行操作，根据说明书中的判定方法和阈值进行判定。计算阳性对照品符合率。计算公式：阳性对照品符合率=结果为阳性的对照品数量/总对照品数量×100%。

#### 5.4.5 检测限及试验方法

YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)标准要求，对检测限国家对照品或生产企业提供的检测对照品进行检测，结果应符合相应规定的要求。对检测限国家对照品或生产企业提供的检测对照品进行检测。SN/T 2775-2023：检测试剂盒测定结果为阳性的样品数量除以实际样品(或参考方法确认)为阳性的样品总数为灵敏度;当灵敏度 $\geq 0.95$  时样品中所含目标分析物的含量水平即为检出限。SN/T 2435-2010 出入境



动物检疫诊断试剂盒质量评价规程:应使用已知阳性样品或经参考方法确认的阳性样品进行试验。可采用对阳性样品进行系列稀释的方式确定最低检出限量。

综合相关产品标准、方法标准及试剂盒使用说明书,要求为:

对检测限的对照品(菌株)进行检测,结果应符合相应规定的要求。

用阳性对照品(菌株)进行系列稀释,按产品使用说明书的程序操作进行检测,根据说明书中的判定方法和阈值进行判定,满足阈值的最低检出量,即为检出限。

#### **5.4.6 精密度及试验方法**

##### **5.4.6.1 重复性(批内变异系数)**

WS/T 494-2017 临床定性免疫检验重要常规项目分析质量要求:在定性测定中,精密度的概念一个阳性或阴性样本,重复多次测定得到阳性或阴性结果的比率,在评价定性测定时,不能使用强阳性或阴性样本,只能使用接近临界浓度的样本。精密度包括定性测定的精密度和可以 COI 或 S/CO 比值报告结果的精密度评价两类。YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)标准中,用重复性对照品重复检测 10 次,其变异系数(CV)应符合相应规定的要求,公式同定量。SN/T 2435-2010 出入境动物检疫诊断试剂盒质量评价规程:重复性以变异系数表示,是一组数据的标准差与其相应的均值的比值。应使用被评价的试剂盒对已知阴性、弱阳性、强阳性对照样品进行至少 4 次重复测定,计算变异系数,确定试剂盒的重复性。

综合相关产品标准、方法标准及试剂盒使用说明书,要求为:

用重复性对照品(菌株)重复检测 10 次,其变异系数(CV)应符合相应规定的要求。

用接近临界值的阴性或阳性对照品(菌株),重复检测 10 次,按产品使用说明书的程序操作判定,统计 10 次测定吸光度或 COI 或 S/CO 比值等结果的平均值和标准差,计算变异系数。

##### **5.4.6.2 批间差(批间变异系数)**

YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)标准要求,用 3 个批号的试剂盒检测同一份样本,则 3 个批号试剂盒之间的变异系数(CV)应符合相应规定的要求;用 3 个批号的试剂盒分别检测同一份样本,各重复 10 次,计算 30 次测量 P/N 或 S/CO

比值等结果的的平均值和标准差，得出变异系数。SN/T 2775-2023：批间(不同生产批号检测试剂盒)差异，选取不同批号的检测试剂盒,根据检测试剂盒适用样品选择代表性样品,制备目标分析物含量为检测试剂盒检出限或关注浓度水平的评价样品。针对每个批号试剂盒应分析的样本数不少于 40 例。可采用卡方检验方法评价定性(半定量)检测试剂盒的批间差异。

综合相关产品标准、方法标准及试剂盒使用说明书，要求为：

使用 3 批次的试剂盒，用临界限或关注浓度水平的对照品（菌株），各重复检测 10 次，则 3 个批号试剂盒之间的变异系数（CV）应符合相应规定的要求。

使用 3 批次的试剂盒，用临界限或关注浓度水平的对照品（菌株）各重复检测 10 次，按产品使用说明书的程序操作判定，统计 30 次测定吸光度或 COI 或 S/CO 比值等结果的平均值和标准差，计算批间变异系数。

#### 5.4.7 稳定性及试验方法

YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)标准要求，效期稳定性：生产企业应规定试剂盒的失效期。取失效期的试剂盒检测阴性对照品符合率阳性对照品符合率、检测限和重复性，应符合标准要求。热稳定性试验：在规定的加热条件（如 37℃）下放置规定时间，检测阴性对照品符合率、阳性对照品符合率、检测限和重复性，应符合标准要求。按照相关条款方法进行检测。

定性试剂盒的稳定性试验与定量法基本相同，不同点在于考核指标。

试剂盒在有效期内，在规定的保存条件下，稳定性试验的各项性能指标应符合产品质量标准要求。每一批试剂盒应留样，并定期做 2℃~8℃稳定性考核；试剂盒成品出厂前应做加速稳定性试验，在规定的加热条件（如 37℃）下放置规定时间，检测的各项性能指标应符合产品质量标准要求。

稳定性试验：取至少三批次试剂盒试验，至规定的储存条件下保存至有效期末，常规保存温度为 2℃~8℃，可根据保存期，间隔一定的时间测定一次。依相关条款检测检测阴性对照品符合率、阳性对照品符合率、检测限和重复性等指标。加速稳定性试验：取至少三批次试剂盒试验，根据生产企业所声称的热稳定性条件（如 37℃放置至少 2 天~6 天），可根据保存期，间隔一定的时间测定一次，依相关条款检测检测阴

性对照品符合率、阳性对照品符合率、检测限和重复性等指标。

### 5.5 使用说明书要求和标签

相关标准、法规及产品均有对使用说明书和标识、标签的规定，如YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)对试剂盒外包装及试剂盒的单组分的标识、标签及试剂盒使用说明书均有规定；在SN/T 2775-2023 商品化食品检测试剂盒评价方法标准中，标签、有使用说明书作为商品化食品检测试剂盒的通用要求；农医发[2005]17号 附件1：兽药残留酶联免疫试剂（盒）备案审查技术资料要求也涉及使用说明书。可见其重要性。

产品使用说明书是用户认识产品，了解产品性能的媒介。由于酶联免疫试剂盒的种类多，其生产的工艺或原理会有差异，操作步骤也不相同，均需在产品说明书明确规定，因此要求试剂盒应附产品使用说明书，或等同指导性文件。

文件内容应至少包括以下部分：

- a) 产品名称；
- b) 测定原理；
- c) 适用范围，提及检测的目标物和适用的基质范围；
- d) 使用单位需自备的设备和试剂；
- e) 主要组成成分；
- f) 操作指南，包括样品前处理的方法、检测方法、结果判定等；
- g) 分析质量参数：标准曲线、灵敏度、正确度、精密度和交叉反应等；
- h) 保存条件和有效期。

标签是产品的重要组成部分，与质量相关，故对标签的内容作了规定。试剂盒外包装应标注内容：产品名称、生产批号或生产日期、规格和数量、运输和保存温度、有效期、生产企业名称与地址。

### 5.6 应用与验证试验

标准验证采取自验与外单位验证二种方式，验证了该标准适用性。取不同类型有代表性的酶联免疫试剂盒，按试剂盒检测原理和操作步骤可分为竞争法和非竞争法，按检测化合物种类可分毒素、兽药、农药等小分子物质和致敏蛋白、细胞因子等大分

子及病毒、沙门氏菌等微生物，按结果判定可分定量和定性试剂盒。

根据标准要求进行了综合试验，以确证本标准的适用性和有效性，形成验证报告3份，同时收集采用第三方验证报告5份作为佐证材料，详见综述及附件1~5。

表6. 采用第三方验证报告清单

附件序号	酶联免疫试剂盒品种	验证单位
附件1	VIDAS UP 李斯特菌筛选试剂盒(ELFA)	JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL.97,N0.2,2014
附件2	金黄色葡萄球菌肠毒素	北京市科学技术研究院分析测试研究所(北京市理化分析测试中心)
附件3	牛乳铁蛋白	北京市科学技术研究院分析测试研究所(北京市理化分析测试中心)
附件4	莱克多巴胺	农业部饲料质量及畜产品质量安全监督检验测试中心
附件5	黄曲霉毒素B <sub>1</sub>	国家饲料质量监督检验中心(北京)

### 5.6.1 应用试验

#### 小分子定量试剂盒应用示例-AFB<sub>1</sub> ELISA 检测试剂盒

按标准《酶联免疫分析试剂盒通则》（征求意见稿）的规定执行，并按产品说明书进行检验操作。对江苏省苏微微生物有限公司生产的试剂盒标准曲线线性、灵敏度、精密度、正确度、特异性、稳定性等技术要求进行应用试验。

##### 5.6.1.1 标准曲线线性

采用log-logit拟合曲线，验证线性与线性范围，结果见表7和图1。

表7. AFB<sub>1</sub>标准品浓度与吸收值

AFB <sub>1</sub> 标准品浓度 (ng/mL)	OD <sub>450</sub>		平均值
0	1.921	1.916	1.919
0.1	1.610	1.603	1.607
0.25	1.260	1.207	1.234
0.5	0.992	0.917	0.955
1	0.676	0.638	0.657
2	0.482	0.413	0.448

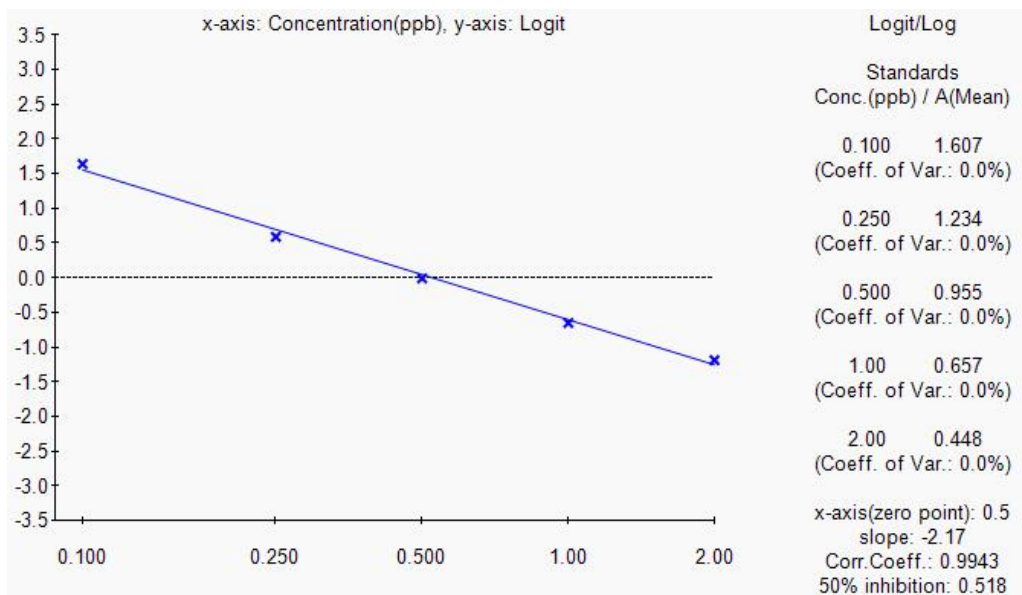


图1 AFB<sub>1</sub>的标准曲线

#### 5.6.1.2 灵敏度

按产品使用说明书的程序操作，测定标准溶液的吸光度值，绘制标准曲线。重复测定空白样品或阴性样品不少于10次，通过标准曲线计算得到对应浓度的平均值( $\bar{x}_0$ )和标准偏差(s)，得出 $\bar{x}_0+3s$ ，即为检出限。按检测方法标准(GB 5009.22-2016第四法)要求处理样本，以大于或等于标准曲线中最低浓度点值，计算样本的浓度，即为定量限，结果见表8。

表8. AFB<sub>1</sub>试剂盒的检出限和定量限

阴性样品浓度 ( $\mu\text{g/kg}$ )		测定平均值 $\bar{x}_0$	标准偏差 $s$	检出限 $\bar{x}_0+3s$ ( $\mu\text{g/kg}$ )	定量限 ( $\mu\text{g/kg}$ )
0.019	0.023	0.0219	0.0037	0.033	0.45
0.028	0.018				
0.024	0.019				
0.017	0.024				
0.026	0.021				

#### 5.6.1.3 精密度

批内、批间变异系数：分别使用3个批次的试剂盒(批号/生产日期：H010532A/2023.10.20、H010632A/2023.11.15、H010142A/2023.12.19)检测小麦粉阳性性质控样1和2，AFB<sub>1</sub>含量分别为2.25  $\mu\text{g/kg}$ 和4.50  $\mu\text{g/kg}$ ，各重复10次，分别计算平均

值、标准偏差及变异系数，结果见表9。

表9. 批内、批间精密度试验结果

试样	试剂盒 批号	检测结果 (μg/kg)					平均值 (μg/kg)	批内变异 系数 (%)	批间变异 系数 (%)
小麦 粉质 控样1	H010532A	1.98	2.11	2.43	2.51	2.48	2.37	10.3	10.3
		2.03	2.60	2.65	2.56	2.33			
	H010632A	2.39	2.68	2.45	2.32	1.99	2.30	10.9	
		2.06	2.41	1.95	2.14	2.57			
	H010142A	2.11	2.18	2.65	1.99	2.61	2.29	10.4	
		2.45	2.33	2.09	2.46	2.07			
小麦 粉质 控样2	H010532A	5.05	4.88	4.66	4.35	5.26	4.85	6.0	
		4.77	4.93	5.19	4.49	4.95			
	H010632A	3.99	4.06	4.85	5.16	4.37	4.57	9.8	
		4.33	4.25	4.56	5.31	4.77			
	H010142A	5.19	4.44	4.79	4.97	3.98	4.68	9.5	
		5.24	4.83	4.92	4.23	4.16			

5.6.1.4 正确度

分别向阴性小麦粉样本中添加一定浓度的AFB<sub>1</sub>标准品，使样品中AFB<sub>1</sub>的添加量分别为0  $\mu\text{g/kg}$ 、2.5  $\mu\text{g/kg}$ 、5.0  $\mu\text{g/kg}$ 、10.0  $\mu\text{g/kg}$ ，测定并计算回收率。结果见表10。

表10. 小麦粉样本添加回收率试验

添加量 ( $\mu\text{g/kg}$ )	检测值 ( $\mu\text{g/kg}$ )	平均值 ( $\mu\text{g/kg}$ )	回收率/%
0	0.3	0.4	/
	0.5		
2.5	2.9	3.1	108.0
	3.2		
5.0	4.8	5.0	92.0
	5.1		
10.0	10.2	9.9	95.0
	9.6		

5.6.1.5 特异性

分别将AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>配制成标准系列浓度，依法检测，分别拟合标

准曲线，得目标分析物和干扰物半数抑制浓度（IC<sub>50</sub>），计算交叉反应率（CR），结果见表11。

表 11. AFB<sub>1</sub> 试剂盒的特异性

标准品	IC <sub>50</sub> ( ng/mL)	CR (%)
AFB <sub>1</sub>	0.51	100
AFB <sub>2</sub>	4.25	12
AFG <sub>1</sub>	2.55	20
AFG <sub>2</sub>	12.75	4

5.6.1.6 稳定性

稳定性试验：取3个批次（批号/生产日期：H010532A/2023.10.20、H010632A/2023.11.15、H010142A/2023.12.19）试剂盒试验，按标准GB/T 33411的要求在规定的储存条件下保存至有效期末，测定相关指标；加速稳定性试验：取3个批次试剂盒试验，至37℃放置4天，测定相关指标。结果见表12。

表12. 试剂盒稳定性试验

检测项目		产品要求	GB/T 33411	稳定性试验			加速稳定性试验		
				批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3
线性	浓度范围			0.1 ng/mL~2 ng/mL					
	相关系数 r	≥0.99	≥0.99	0.9980	0.9969	0.9915	0.9933	0.9947	0.9919
灵敏度	检出限（ng/mL）	<0.1	/	0.033	0.026	0.038	0.042	0.039	0.045
	定量限（μg/kg）	<1	/	0.41	0.49	0.45	0.50	0.42	0.53
批内变异系数（%）	小麦粉质控样 1	≤ 15	≤ 20	9.9	10.9	10.3	10.8	11.5	9.3
	小麦粉质控样 2			9.8	8.5	9.6	10.2	8.7	11.3
批间变异系数（%）	小麦粉质控样 1	≤ 15	≤ 25		11.3			9.8	
	小麦粉质控样 2				9.9		10.5		
回收率（%）	加标 2.5μg/kg			109.2	116.5	100.3	115.3	104.5	102.2
	加标 5.0μg/kg	80~120	60~120	96.5	96.3	98.6	89.3	95.1	88.8
	加标 10.0 μg/kg			93.6	85.3	101.3	96.0	90.5	87.8
交叉反应（%）	AFB <sub>1</sub>	100	符合相应规定的要求	100	100	100	100	100	100
	AFB <sub>2</sub>	<30		11.9	12.2	14.1	13.3	14.8	12.8
	AFG <sub>1</sub>	<30		19.7	20.3	18.6	20.9	22.4	19.5
	AFG <sub>2</sub>	<30		<10	<10	<10	<10	<10	<10

国家标准《酶联免疫分析试剂盒通则》验证报告

一、试验方法

试验方案按标准《酶联免疫分析试剂盒通则》（征求意见稿）的规定执行，并按产品说明书进行检验操作（见附录产品说明书）。对试剂盒标准曲线线性、灵敏度、精密度、正确度、特异性、稳定性等技术要求进行验证。

二、试剂及仪器设备

AFB<sub>1</sub>酶联免疫试剂盒（定量、竞争法试剂盒，产品有效期6个月）；  
酶联免疫分析仪。

三、验证结果

1 标准曲线线性

采用log-logit拟合曲线，验证线性与线性范围，结果见表1和图1。

表1 AFB<sub>1</sub>标准品浓度与吸收值

AFB <sub>1</sub> 标品 (ng/mL)	OD <sub>450</sub>		平均值
0	1.998	2.130	2.064
0.1	1.647	1.711	1.679
0.25	1.334	1.432	1.383
0.5	0.940	0.998	0.969
1	0.687	0.703	0.695
2	0.456	0.493	0.475

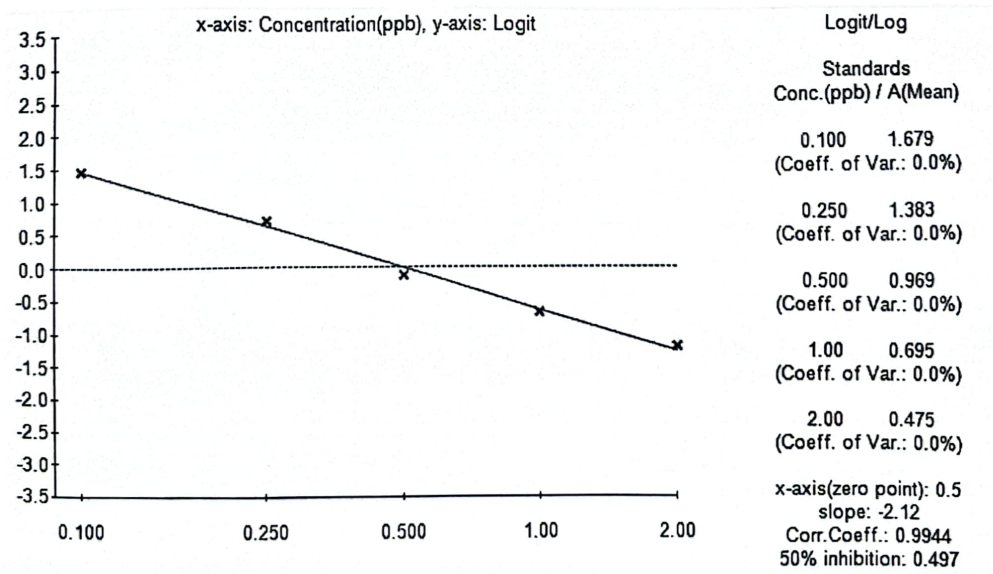


图1 AFB<sub>1</sub>的标准曲线

2 灵敏度

按产品使用说明书的程序操作，测定标准溶液的吸光度值，绘制标准曲线。重复测定空白样品或阴性样品不少于10次，通过标准曲线计算得到对应浓度的平均值 ( $\bar{x}_0$ ) 和标准偏差 (s)，得出  $\bar{x}_0+3s$ ，即为检出限。按检测方法标准（GB 5009.22-2016第四法）要求处理样本，以大于或等于标准曲线中最低浓度点值，计算样本的浓度，即为定量限。结果见表2。



表 2 AFB<sub>1</sub> 试剂盒的检出限和定量限

阴性样品浓度		测定平均值 $\bar{x}_0$	标准偏差 $s$	检出限 $\bar{x}_0+3s$ ( $\mu\text{g/kg}$ )	定量限 ( $\mu\text{g/kg}$ )
0.023	0.021	0.0172	0.0038	0.029	0.83
0.018	0.016				
0.013	0.011				
0.015	0.021				
0.018	0.016				

## 3 精密度

批内、批间变异系数: 分别使用3个批次的试剂盒(批号/生产日期: H010532A/2023.10.20、H010632A/2023.11.15、H010142A/2023.12.19) 检测玉米阳性质控样1和2, AFB<sub>1</sub>含量分别为 10.7  $\mu\text{g/kg}$ 和27  $\mu\text{g/kg}$ , 各重复10次, 分别计算平均值、标准偏差及变异系数, 结果见表3。

表 3 批内、批间精密度试验结果

试样	试剂盒 批号	检测结果 ( $\mu\text{g/kg}$ )					平均值 ( $\mu\text{g/kg}$ )	批内变异 系数 (%)	批间变异 系数 (%)
玉米 质控 样1	H010532A	11.3	9.9	11.6	11.9	9.5	10.7	9.1	8.0
		10.7	11.5	9.8	9.3	11.3			
	H010632A	10.3	9.6	11.3	10.9	10.5	10.5	7.0	
		11.6	10.5	9.9	9.5	11.3			
	H010142A	11.5	9.6	10.3	11.9	11.5	10.7	8.5	
		10.6	9.5	11.8	9.9	10.4			
玉米 质控 样2	H010532A	26.8	25.9	30.5	30.2	29.9	28.9	6.7	7.0
		31.1	30.3	27.3	26.9	30.3			
	H010632A	24.5	26.1	30.9	29.6	28.7	28.0	9.6	
		28.5	23.8	26.4	31.2	30.6			
	H010142A	28.4	27.5	30.2	29.8	26.9	28.3	4.3	
		28.8	29.3	27.6	26.9	27.3			

## 4 正确度

分别向阴性玉米样本中添加一定浓度的 AFB<sub>1</sub> 标准品, 使样品中 AFB<sub>1</sub> 的添加量分别为 0、10、20、40  $\mu\text{g/kg}$ , 测定并计算回收率。结果见表 4。

表 4 玉米样本添加回收率试验

添加量 ( $\mu\text{g/kg}$ )	检测值 ( $\mu\text{g/kg}$ )	平均值 ( $\mu\text{g/kg}$ )	回收率/%
0	1.1	1.0	/
	0.9		
10	11.6	11.9	109.0
	12.2		
20	22.8	22.2	106.0
	21.6		
40	38.9	37.7	91.8
	36.5		

## 5 特异性

分别将 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 配制成标准系列浓度, 依法检测, 分别拟合标准曲

线，得目标分析物和干扰物半数抑制浓度（IC<sub>50</sub>），计算交叉反应率（CR），结果见表5。

表5 AFB<sub>1</sub>试剂盒的特异性

标准品	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	CR (%)
AFB <sub>1</sub>	0.51	100
AFB <sub>2</sub>	3.92	13
AFG <sub>1</sub>	2.22	23
AFG <sub>2</sub>	12.75	4

#### 6 稳定性

稳定性试验:取3个批次(批号/生产日期: H010532A/2023.10.20、H010632A/2023.11.15、H010142A/2023.12.19)试剂盒试验,按标准GB/T 33411的要求在规定的储存条件下保存至有效期末,测定相关指标;加速稳定性试验:取3个批次试剂盒试验,至37℃放置4天,测定相关指标。结果见表6,

表6 试剂盒稳定性试验

检测项目		产品要求	GB/T 33411	稳定性试验			加速稳定性试验		
				批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3
线性	浓度范围	0.1~2 ng/mL							
	相关系数 r	≥0.99	≥0.99	0.9981	0.9979	0.9938	0.9991	0.9973	0.9936
灵敏度	检出限 (ng/mL)	<0.1	/	0.036	0.029	0.048	0.046	0.041	0.037
	定量限 (μg/kg)	<1	/	0.81	0.89	0.85	0.78	0.82	0.87
批内变异系数 (%)	玉米质控样 1	≤15	≤20	8.6	7.9	9.3	7.8	8.9	9.3
	玉米质控样 2			8.8	10.1	8.6	11.5	8.4	11.1
批间变异系数 (%)	玉米质控样 1	≤15	≤25	9.3			7.9		
	玉米质控样 2			10.7			11.6		
回收率 (%)	加标 10 μg/kg	80~120	60~120	110.2	107.5	103.6	105.3	102.5	89.7
	加标 20 μg/kg			97.5	106.1	95.8	93.3	91.0	93.8
	加标 40 μg/kg			91.6	89.3	100.3	90.6	94.5	89.6
交叉反应 (%)	AFB <sub>1</sub>	100	符合相应规定的要求	100	100	100	100	100	100
	AFB <sub>2</sub>	<30		13.6	11.6	13.5	13.0	12.8	14.2
	AFG <sub>1</sub>	<30		23.7	21.3	20.6	21.9	23.3	25.5
	AFG <sub>2</sub>	<30		<10	<10	<10	<10	<10	<10

#### 7 结论

经验证试验,该试剂盒的标准曲线的线性相关系数、检测限、定量限、精密度、正确度、特异性、稳定性及使用说明书和标签等各项技术要求符合标准规定要求,适用于酶联免疫试剂盒的质量控制。

验证测试人(签字): 郭敬轩

审核人(签字): 张爽

测试单位(盖章): 江南大学分析测试中心

日期: 2024.7.30

国家标准《酶联免疫分析试剂盒通则》验证报告

一、试验方法

试验方案按标准《酶联免疫分析试剂盒通则》（征求意见稿）的规定执行，并按产品说明书进行检验操作（见附录产品说明书）。对试剂盒标准曲线线性、灵敏度、精密度、正确度、特异性、稳定性等技术要求进行验证。

二、试剂及仪器设备

AFB<sub>1</sub>酶联免疫试剂盒(定量、竞争法试剂盒,产品有效期6个月),酶联免疫分析仪(SW-1),均由江苏省苏微微生物研究有限公司提供。

三、验证结果

1 标准曲线线性

采用log-logit拟合曲线，验证线性与线性范围，结果见表1和图1。

表1 AFB<sub>1</sub>标准品浓度与吸收值

AFB <sub>1</sub> 标品 (ng/mL)	OD <sub>450</sub>		平均值
0	1.908	2.020	1.964
0.1	1.597	1.676	1.637
0.25	1.217	1.324	1.271
0.5	0.940	0.969	0.955
1	0.647	0.693	0.670
2	0.439	0.453	0.446

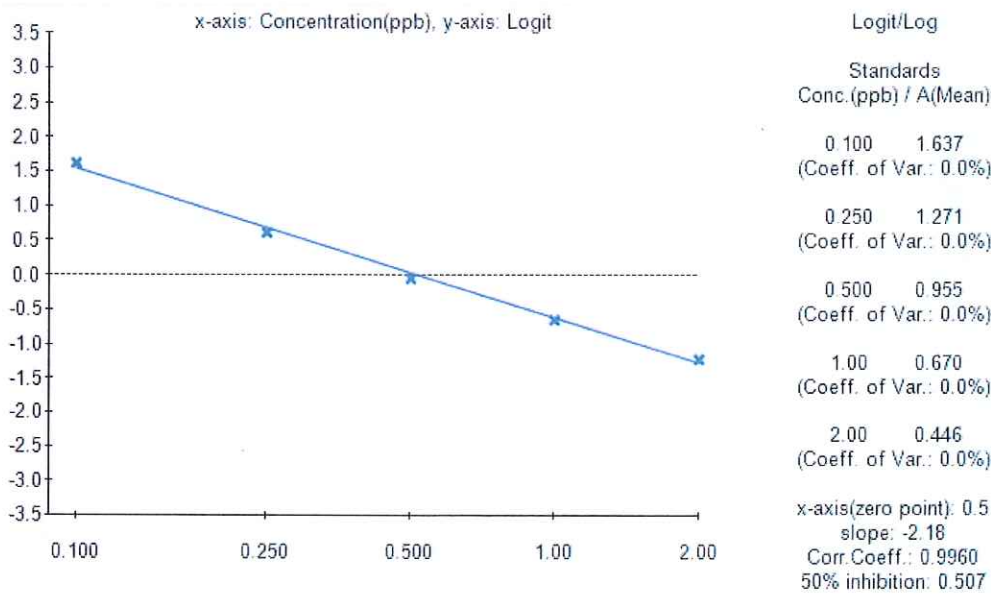


图1 AFB<sub>1</sub>的标准曲线

2 灵敏度

按产品使用说明书的程序操作，测定标准溶液的吸光度值，绘制标准曲线。重复测定空白样品或阴性样品不少于10次，通过标准曲线计算得到对应浓度的平均值( $\bar{x}_0$ )和标准偏差(s)，得出  $\bar{x}_0+3s$ ，即为检出限。按检测方法标准（GB 5009.22-2016第四法）要求处理样本，以大于或等于标准曲线中最低浓度点值，计算样本的浓度，即为定量限。结果见表2。



表2 AFB<sub>1</sub>试剂盒的检出限和定量限

阴性样品浓度 (μg/kg)		测定平均值 $\bar{x}_0$	标准偏差 $s$	检出限 $\bar{x}_0+3s$ (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
0.015	0.021	0.0149	0.0030	0.024	0.87
0.013	0.017				
0.010	0.014				
0.013	0.017				
0.013	0.016				

## 3 精密度

批内、批间变异系数：分别使用3个批次的试剂盒（批号/生产日期：H010532A/2023.10.20、H010632A/2023.11.15、H010142A/2023.12.19）检测大米阳性性质控样1和2，AFB<sub>1</sub>含量分别为4.5 μg/kg和18.9 μg/kg，各重复10次，分别计算平均值、标准偏差及变异系数，结果见表3。

表3 批内、批间精密度试验结果

试样	试剂盒 批号	检测结果 (μg/kg)					平均值 (μg/kg)	批内变异 系数 (%)	批间变异 系数 (%)
大米 质控 样1	H010532A	5.5	4.8	4.6	4.3	5.2	4.8	8.4	9.3
		4.7	4.3	5.1	4.4	4.9			
	H010632A	3.9	4	4.8	5.1	4.3	4.5	9.5	
		4.3	4.2	4.5	5.1	4.7			
	H010142A	5.1	4.4	4.7	4.9	3.9	4.6	9.8	
		5.2	4.3	4.9	4.2	4.1			
大米 质控 样2	H010532A	18.9	19.5	17.7	17.3	18.3	18.7	7.2	8.6
		17.3	17.2	20.2	19.1	21.1			
	H010632A	16.2	16.9	17.2	17.6	16.7	16.4	5.2	
		14.7	15.8	15.6	16.6	16.2			
	H010142A	16.5	17.2	15.1	17.9	15.9	16.7	6.5	
		15.5	17.7	15.8	18.2	17.1			

## 4 正确度

分别向阴性大米样本中添加一定浓度的 AFB<sub>1</sub> 标准品，使样品中 AFB<sub>1</sub> 的添加量分别为 0、5、10、20 μg/kg，测定并计算回收率。结果见表4，

表4 大米样本添加回收率试验

添加量 (μg/kg)	检测值 (μg/kg)	平均值 (μg/kg)	回收率/%
0	0.6	0.5	/
	0.4		
5	5.9	6.1	112.0
	6.3		
10	11.4	11.1	106.0
	10.8		
20	22.2	22.0	107.5
	21.8		

## 5 特异性

分别将 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 配制成标准系列浓度，依法检测，分别拟合标准曲线，得目标分析物和干扰物半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)，计算交叉反应率 (CR)，结果见表5。



表5 AFB<sub>1</sub>试剂盒的特异性

标准品	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	CR (%)
AFB <sub>1</sub>	0.47	100
AFB <sub>2</sub>	4.70	10
AFG <sub>1</sub>	1.81	26
AFG <sub>2</sub>	15.67	3

## 6 稳定性

稳定性试验:取3个批次(批号/生产日期:H010532A/2023.10.20、H010632A/2023.11.15、H010142A/2023.12.19)试剂盒试验,按标准GB/T 33411的要求在规定的储存条件下保存至有效期末,测定相关指标;加速稳定性试验:取3个批次试剂盒试验,至37℃放置4天,测定相关指标。结果见表6。

表6 试剂盒稳定性试验

检测项目		产品要求	GB/T 33411	稳定性试验			加速稳定性试验		
				批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3
线性	浓度范围	0.1~2 ng/mL							
	相关系数 r	≥0.99	≥0.99	0.9991	0.9969	0.9954	0.9981	0.9993	0.9928
灵敏度	检出限 (ng/mL)	<0.1	/	0.046	0.039	0.058	0.036	0.051	0.047
	定量限 (μg/kg)	<1	/	0.85	0.79	0.81	0.88	0.87	0.84
批内变异系数 (%)	大米质控样 1	≤ 15	≤ 20	7.9	9.9	11.3	6.8	8.5	9.1
	大米质控样 2			8.8	10.2	9.6	11.3	7.4	10.8
批间变异系数 (%)	大米质控样 1	≤ 15	≤ 25	9.5			7.9		
	大米质控样 2			10.7			11.6		
回收率 (%)	加标 5 μg/kg	80~120	60~120	107.2	109.9	108.5	110.5	115.2	88.7
	加标 10 μg/kg			97.1	110.3	85.7	90.2	89.9	96.3
	加标 20 μg/kg			97.3	95.2	100.6	85.6	93.4	87.6
交叉反应 (%)	AFB <sub>1</sub>	100	符合相应规定的要求	100	100	100	100	100	100
	AFB <sub>2</sub>	<30		<10	<10	<10	<10	<10	<10
	AFG <sub>1</sub>	<30		26.7	28.1	27.6	24.9	28.3	27.1
	AFG <sub>2</sub>	<30		<10	<10	<10	<10	<10	<10

## 7 结论

经验证试验,该试剂盒的标准曲线的线性相关系数、检测限、定量限、精密度、正确度、特异性、稳定性及使用说明书和标签等各项技术要求符合标准规定要求,适用于酶联免疫试剂盒的质量控制。

验证测试人(签字): 杨婷婷

审核人(签字): 徐江

测试单位(盖章): 安徽生泰生物技术有限公司

日期: 2024.07.29

国家标准《酶联免疫分析试剂盒通则》验证报告

一、试验方法

试验方案按标准《酶联免疫分析试剂盒通则》（征求意见稿）的规定执行，并按产品说明书进行检验操作（见附录产品说明书）。对试剂盒标准曲线线性、灵敏度、精密度、正确度、特异性、稳定性等技术要求进行验证。

二、试剂及仪器设备

AFB<sub>1</sub>酶联免疫试剂盒（青岛普瑞邦生物工程有限公司、定量、竞争法试剂盒）。  
酶联免疫分析仪（美国伯腾仪器有限公司）。

三、验证结果

1 标准曲线线性

采用log—logit拟合曲线，验证线性与线性范围，结果见表1和图1。

表1. AFB<sub>1</sub>标准品浓度与吸光度值

AFB1 标品/ ng/mL	OD450		AVG
0	1.944	1.920	1.932
0.07	1.451	1.481	1.466
0.25	1.041	1.102	1.0715
0.90	0.675	0.645	0.660
3.00	0.375	0.366	0.3705

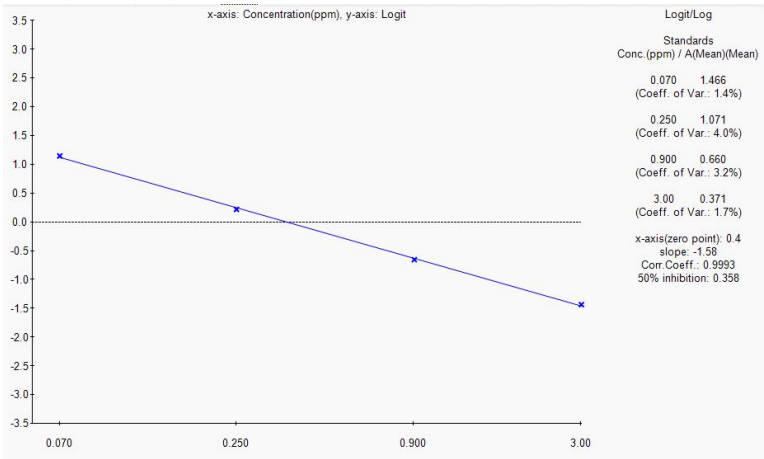


图1 AFB<sub>1</sub> 的标准曲线

2 灵敏度

按产品使用说明书的程序操作，测定标准溶液的吸光度值，绘制标准曲线。重复测定空白样品或阴性样品不少于10次，通过标准曲线计算得到对应浓度的平均值 ( $\bar{x}_0$ ) 和标准偏差 (s)，得出  $\bar{x}_0+3s$ ，即为检出限。按检测方法标准（GB 5009.22-2016第四法）要求处理样本，以大于或等于标准曲线中最低浓度点值，计算样本的浓度，即为定量限，结果见表2。

表 2. AFB<sub>1</sub> 试剂盒的检出限和定量限

阴性样品浓度 (μg/kg)		浓度平均值 $\bar{x}_0$	浓度标准偏差 s	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
0.011	0.012				
0.015	0.014				

0.013	0.012	0.0127	0.0013	0.0167	0.875
0.014	0.011				
0.012	0.013				

### 3 精密度

#### 3.1 批内变异系数

使用同一批次的试剂盒（批号 Z2D00E21），检测小麦阳性质控样本，质控样本中 AFB<sub>1</sub> 含量分别为 2μg/kg 和 19μg/kg，各重复 10 次，分别计算平均值、标准偏差及变异系数，结果见表 3。

表 3. 批内精密度试验

试样	检测结果/μg/kg					平均值 /μg/kg	标准偏差	变异系数 /%
小麦质 控样1	1.82	1.92	1.81	1.86	1.73	1.84	0.070	3.79
小麦质 控样2	21.3	20.96	20.16	21.38	18.74	20.24	1.15	5.66
	21.55	19.77	19.54	20.72	18.25			

#### 3.2 批间变异系数

使用3个批次的试剂盒（批号Z2C00H17、Z2D00E21、Z2D00F14），检测小麦阳性质控样本，AFB<sub>1</sub>含量分别为2μg/kg和19μg/kg，各重复10次，分别计算平均值、标准偏差及变异系数，结果见表4。

表 4. 批间精密度试验

试样(试剂盒批号)	检测结果/μg/kg					平均值 /μg/kg	标准偏差	变异系数/%
小麦质控样1 (批号 Z2C00H17、 Z2D00E21、 Z2D00F14)	1.82	1.92	1.81	1.86	1.73	1.946	0.117	6.01
	1.87	1.94	1.78	1.76	1.89			
	1.91	1.97	2.03	2.11	2.06			
	2.09	2.12	2.16	2.12	2.08			
	1.99	1.86	1.93	1.96	1.82			
	1.96	1.92	1.89	1.97	2.06			
小麦质控样2 (批号 Z2C00H17、 Z2D00E21、 Z2D00F14)	21.3	20.96	20.16	21.38	18.74	20.26	1.117	5.5
	21.55	19.77	19.54	20.72	18.25			
	22.02	21.65	22.16	19.96	20.89			
	21.26	20.68	21.93	19.88	20.96			
	19.11	18.96	19.53	19.59	20.13			
	18.66	19.62	20.64	18.69	19.22			

### 4 正确度

分别向阴性小麦样本中添加浓度为 0μg/kg、1.25μg/kg、6.25μg/kg 以及 25μg/kg 的黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub>，计算回收率。结果见表 5。

表 5. 小麦样本添加回收率试验

添加量/μg/kg	检测值/μg/kg	平均值/μg/kg	回收率/%
0	0	-	-
	0		
1.25	1.13	1.14	91.20
	1.15		

6.25	6.23	6.32	101.15
	6.41		
25.00	23.65	24.05	96.20
	24.45		

#### 5 特异性

分别将AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>配制标准系列浓度，依法检测并分别拟合标准曲线，得目标分析物和干扰物半数抑制浓度，结果表6。

表 6. AFB<sub>1</sub> 试剂盒的特异性

标准品	IC <sub>50</sub> / ng/mL	CR/%
AFB <sub>1</sub>	0.358	100
AFB <sub>2</sub>	2.12	16.9
AFG <sub>1</sub>	-	<1
AFG <sub>2</sub>	0.79	45.3

#### 6 稳定性

稳定性试验:取三批次试剂盒试验，至规定的储存条件下保存至有效期末，测定相关指标；加速稳定性试验:取三批次试剂盒试验，至37℃放置3天，测定相关指标。结果见表7。

试剂盒的批号（Z2C00H17、Z2D00E21、Z2D00F14）。

表7. 试剂盒稳定性试验

检测项目		产品 要求	标准 要求	稳定性试验			加速稳定性试验		
				批号	批号	批号	批号	批号	批号
				Z2C00 H17	Z2D00 E21	Z2D00 F14	Z2C00 H17	Z2D00 E21	Z2D00 F14
线性	浓度范围 ng/mL	0.07-3.0							
	相关系 数 r	≥0.99	≥0.9 9	0.999	0.998	0.996	0.998	0.997	0.996
灵敏度	检出限	<0.1		0.017	0.016	0.019	0.019	0.018	0.018
	定量限	<1		0.869	0.875	0.877	0.872	0.876	0.868
批内 变异 系数 /%	低浓度	≤15 %	≤20 %	3.79	6.23	6.13	5.89	5.67	5.92
	高浓度			5.66	5.89	4.26	5.33	4.89	4.76
批间 变异 系数 /%	低浓度	≤15 %	≤25 %	7.18	7.86	7.29	8.18	7.56	6.36
	高浓度			6.86	6.97	6.33	5.96	6.78	6.82
回收 率/%	1.25ng/m L	80-12 0%	60-1 20%	91.20	89.2	96.3	95.2	94.1	93.6
	6.25ng/m L			101.12	109.3	110.6	108.3	105.4	106.3
	25ng/mL			96.20	97.8	105.6	92.9	98.3	95.8
交叉 反应	AFB <sub>1</sub>			100	100	100	100	100	100
	AFB <sub>2</sub>			17.9	16.2	17.6	17.3	16.5	17.3



/%	AFG1			<1	<1	<1	<1	<1	<1
	AFG2			43.1	46.3	44.6	43.8	45.2	43.3

7 结论

经验证试验，该试剂盒的标准曲线的线性相关系数、检测限、定量限、精密度、正确度、特异性、稳定性及使用说明书和标签等各项技术要求符合标准规定要求，适用于酶联免疫试剂盒的质量控制。

验证测试人（签字）：



审核人（签字）：

胡红兵

测试单位（盖章）：

青 岛 瑞 邦 生 物 工 程 有 限 公 司

日期：2024 年 6 月 27 日

### 5.6.3 佐证材料--采用的第三方验证报告

#### 1) 大分子定性试剂盒应用示例-VIDAS UP 李斯特菌 (Listeria) ELFA 试剂盒

梅里埃诊断产品(上海)有限公司提供资料,根据 AOAC 方法(AOAC International Journal, Vol 97, No.2,2014) Evaluation of VIDAS ® UP Listeria Assay (LPT) for the Detection of Listeria in a Variety of Food and Environmental surfaces: Action 2013.10) 的内容整理编辑,该试剂盒原理双抗夹心法,碱性磷酸酶标记抗体,共轭酶催化底物(4-甲基光酚磷酸)水解成荧光产物(4-甲基光酚酮),其荧光在 450 nm 处测量。

在多实验室合作研究中,VIDAS LPT 方法与 AOAC 官方方法 993.12 AOAC Official Method 993.12 Listeria monocytogenes in Milk and Dairy Products Selective Enrichment and Isolation Method First A 参考方法进行了比较。共有 14 个实验室参与,代表美国政府和工业界。使用两种不同的测试份量 25g 和 125g Queso fresco(软墨西哥奶酪)进行分析,每个试验样本添加三个水平的李斯特菌,未接种对照水平[0 CFU/试验部分]、低接种量(0.2-2 CFU/试验部分)和高接种量水平(2-5 CFU/试验部分),每一水平重复 12 次。汇总了阳性/阴性对照品符合率、检测水平、批内重复性、批间再现性等检测结果,见表 2013.10A\B,详见正文(附件 4)。由于是侧重对方法的评价,未见试剂盒的稳定性数据。

方法阈值:

**Table 2013.10D. Interpretation of test**

Test value threshold	Interpretation
<0.05	Negative
≥0.05	Positive

**Table 2013.10A. Summary of results for the detection of Listeria spp. in queso fresco (25 g)**

Method <sup>a</sup>	VIDAS LPT w/OXA			VIDAS LPT w/ALOA		
	Uninoculated	Low	High	Uninoculated	Low	High
Candidate presumptive positive/total No. samples analyzed	1/156	80/156	156/156	1/156	80/156	156/156
Candidate presumptive POD (CP)	0.01	0.51	1.00	0.01	0.51	1.00
	(0.01, 0.04)	(0.43, 0.59)	(0.98, 1.00)	(0.01, 0.04)	(0.43, 0.59)	(0.98, 1.00)
S <sub>P</sub> <sup>b</sup>	0.08	0.51	0.00	0.08	0.51	0.00
	(0.07, 0.15)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.15)	(0.07, 0.15)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.15)
S <sub>L</sub> <sup>c</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

$S_R^d$	(0.00, 0.03)	(0.00, 0.13)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.03)	(0.00, 0.13)	(0.00, 0.15)
	0.08	0.51	0.00	0.08	0.51	0.00
$P$ value <sup>e</sup>	(0.07, 0.13)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.21)	(0.07, 0.13)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.21)
	0.4395	0.9210	1.0000	0.4395	0.9210	1.0000
Candidate confirmed positive/total No. samples analyzed	0/156	78/156	156/156	0/156	78/156	156/156
Candidate confirmed POD (CC)	0.00	0.50	1.00	0.00	0.50	1.00
$S_T$	(0.00, 0.02)	(0.42, 0.58)	(0.98, 1.00)	(0.00, 0.02)	(0.42, 0.58)	(0.98, 1.00)
	0.00	0.51	0.00	0.00	0.51	0.00
$S_L$	(0.00, 0.15)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.15)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.15)
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$S_R$	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.14)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.14)	(0.00, 0.15)
	0.00	0.51	0.00	0.00	0.51	0.00
$P$ value	(0.00, 0.21)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.21)	(0.00, 0.21)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.21)
	1.0000	0.9161	1.0000	1.0000	0.9161	1.0000
Positive reference samples/total No. samples analyzed	0/156	76/156	156/156	0/156	76/156	156/156
Reference POD	0.00	0.49	1.00	0.00	0.49	1.00
$S_T$	(0.00, 0.02)	(0.41, 0.57)	(0.98, 1.00)	(0.00, 0.02)	(0.41, 0.57)	(0.98, 1.00)
	0.00	0.52	0.00	0.00	0.52	0.00
$S_L$	(0.00, 0.15)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.15)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.15)
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$S_R$	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.10)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.10)	(0.00, 0.15)
	0.00	0.52	0.00	0.00	0.52	0.00
$P$ value	(0.00, 0.21)	(0.47, 0.52)	(0.00, 0.21)	(0.00, 0.21)	(0.47, 0.52)	(0.00, 0.21)
	1.0000	0.9937	1.0000	1.0000	0.9937	1.0000
dLPOD (candidate vs reference)	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00
	(-0.02, 0.02)	(-0.10, 0.13)	(-0.02, 0.02)	(-0.02, 0.02)	(-0.10, 0.13)	(-0.02, 0.02)
dLPOD (candidate presumptive vs candidate confirmed)	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00
	(-0.02, 0.04)	(-0.10, 0.13)	(-0.02, 0.02)	(-0.02, 0.04)	(-0.10, 0.13)	(-0.02, 0.02)

<sup>a</sup> Results include 95% confidence intervals.  
<sup>b</sup> Repeatability standard deviation.  
<sup>c</sup> Among-laboratory standard deviation.  
<sup>d</sup> Reproducibility standard deviation.  
<sup>e</sup>  $P$  value = Homogeneity test of laboratory PODs.

## 2) 大分子定性试剂盒应用示例 -金黄色葡萄球菌肠毒素 ELISA 试剂盒(夹心法)

金黄色葡萄球菌肠毒 ELISA 检测试剂盒(北京美正生物科技有限公司生产)第三方(北京市科学技术研究院分析测试研究所 北京市理化分析测试中心)验证报告, 评价内容包括准确度、精密度。验证结果详见验证报告(附 5)。经验证:

准确度, 生鲜乳样本中添加浓度 0 $\mu$ g/kg、0.5 $\mu$ g/kg 和 1.0 $\mu$ g/kg 3 个不同浓度水平金黄色葡萄球菌肠毒检测, 重复检测 3 次, 阴性对照品符合率为 100%、阳性对照品符合率为 100%。

精密度, 使用三批次的试剂盒, 选用 1 个浓度水平的样本, 各重复检测 6 次。同批次试剂盒和不同批次试剂盒检测结果无偏差。

### 3) 大分子定量试剂盒应用示例-牛乳铁蛋白 ELISA 检测试剂盒（双抗体夹心法）

牛乳铁蛋白 ELISA 检测试剂盒（山东美正生物科技有限公司生产）第三方（北京市科学技术研究院分析测试研究所 北京市理化分析测试中心）验证报告，评价内容包括准确度、精密度、符合率。验证结果详见验证报告（附件 6）。经验证：

准确度，生鲜乳样本中添加浓度 40.00 mg/kg、100.00 mg/kg 和 200.00mg/kg 3 个不同浓度水平牛乳铁蛋白检测，重复检测 3 次，回收率在 89.0%~102.9% 范围内。

精密度，使用三批次的试剂盒，选用 1 个浓度水平的生鲜乳样本，各重复检测 6 次。不同批次试剂盒批内变异系数 3.4%~4.6%。批间试剂盒变异系数为 4.2%。

### 4) 小分子定量试剂盒应用示例-莱克多巴胺 ELISA 检测试剂盒（间接竞争法）

莱克多巴胺 ELISA 检测试剂盒（江苏美正生物科技有限公司生产）第三方（农业农村部渔业环境及水产品质量监督测试中心（舟山））验证报告，评价内容包括灵敏度、准确度、精密度、阳样样本符合率。验证结果详见验证报告（附件 7）。经验证：

灵敏度（检出限）：阴性组织样本 20 份，分别用 3 批次试剂盒进行检测，计算其平均值( $\bar{x}_0$ )、标准差(s)和  $x_0+3s$ ，检出限达到 0.50  $\mu\text{g/kg}$ 。

准确度：阴性组织样本中添加浓度 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 、2 $\mu\text{g/kg}$  和 10 $\mu\text{g/kg}$  3 个不同浓度水平莱克多巴胺；使用三批次的试剂盒检测，每种加标样品重复检测 10 次，回收率在 96%~102% 范围内。

精密度：使用三批次的试剂盒，选用加标样本，各重复检测 10 次。不同批次试剂盒批内变异系数小于 5%。批间试剂盒变异系数小于 5%。

### 5) 小分子定量试剂盒应用示例 AFM1 ELISA 检测试剂盒（间接竞争法）

黄曲霉毒素 M1 ELISA 检测试剂盒（山东美正生物科技有限公司生产）第三方（北京市科学技术研究院分析测试研究所 北京市理化分析测试中心）验证报告，评价内容包括准确度、精密度、符合率。验证结果详见验证报告（附件 8）。经验证：

准确度，生鲜乳样本中添加浓度 0.050 $\mu\text{g/kg}$ 、0.100 $\mu\text{g/kg}$  和 0.200 $\mu\text{g/kg}$  3 个不同浓度水平 AFM1 检测，重复检测 3 次，回收率在 97.3%~103.5% 范围内。

精密度，使用三批次的试剂盒，选用 1 个浓度水平的样本，各重复检测 6 次。不

同批次试剂盒批内变异系数 2.5%~3.7%。批间试剂盒变异系数为 3.4%。

## 六、采用国际标准情况

无。

## 七、与现行法律、法规和强制性标准的关系

本标准与现行法律、法规和强制性标准没有冲突。

## 八、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编写过程中没有重大意见分歧。

## 九、标准作为强制性或推荐性标准的意见

本标准为酶联免疫试剂盒通用标准，且多用于快速筛选检测试剂盒，并不涉及国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性标准或强制性条文等八项要求之一，因此建议本标准继续作为推荐性标准颁布实施。

## 十、贯彻标准的要求和措施建议

本标准为 ELISA 试剂盒的技术质量通用标准,修订发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议标准化技术委员会秘书处及时组织标准宣贯、培训。

## 十一、废止现行有关标准的建议

本标准实施后，建议替代 GB/T 33411-2016。

## 十二、其他应予说明的事项

无。

## 主要参考文献

- 1、GB/T 1.1-2020 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则
- 2、GB 5009.295-2023 食品安全国家标准 化学分析方法验证通则
- 3、SN/T 2775-2023 商品化食品检测试剂盒评价方法
- 4、SN/T 4800-2017 进出境动物检疫ELISA检测试剂盒质量评价技术规程
- 5、WS/T 124-1999 临床化学体外诊断试剂盒质量检验总则
- 6、YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法检测试剂（盒）
- 7、YY/T 1579-2018/ISO 23640:2011 体外诊断医疗器械体 外诊断试剂稳定性评价
- 8、食药监办械函[2013]3号 酶联免疫法检测试剂注册技术审查指导原则

- 9、CNAS-GL003-2018 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南
- 10、药典2020版 生物制品稳定性试验指导原则
- 11、农业部的兽药残留酶联免疫试剂（盒）备案参考评判标准
- 12、GB/T 40265-2021 酶免疫检测抗体检测通则
- 13、YY/T 1789.6-2023 体外诊断检验系统 性能评价方法第6部分:定性试剂的精密  
度、诊断灵敏度和特异性

附表1 各类试剂盒质量标准或说明书的主要技术要求

序号	名称	原理	定量或定性计算	灵敏度/检出限	精密度	回收率	特异性	贮藏条件和保存期/稳定性试验
1	VIDAS 葡萄球菌肠毒素检测试剂盒II	双抗体夹心法,荧光	RFV-相对荧光值, 检测值=样品 RFV/标准 RFV 结果阈值<0.13 阴性, 结果阈值 ≥0.13 阳性	/	/	/	/	试剂盒存于 2~8℃
2	VIDAS®沙门氏菌 (SLM) ELFA	双抗体夹心法,荧光	RFV-相对荧光值, 检测值=样品 RFV/标准 RFV 结果阈值<0.23 阴性, 结果阈值 ≥0.23 阳性	涵盖性: 所有 51 株沙门氏菌均被检出; 相对检出限 0.3-1.4 cells/25g	/	对比研究: 328 份样 - VIDAS®SLM 假阴性: 1 - 参考方法阴性, - 一致结果: 327	排除性: 30 株 非沙门氏菌中 2 株枸橼酸杆菌 出现交叉反应。	试剂盒存于 2-8℃
3	FineTest® 大肠杆菌宿主细胞蛋白 ELISA 试剂盒	双抗体夹心法,生物素-亲和素	线性: 3.125-200ng/ml; 标准浓度-OD 值, 可使用四参数 方程 4PL 绘制标准曲线	1.875ng/ml	低、中、高浓度样本, 板内: CV%:5.32~3.91 (n=20); 板间: CV%:3.94~4.23 (n=20,3 批)	添加回收 率:95%(n=10)	与其它类似物 无明显交叉反应	试剂盒 2-8℃/ 试剂盒 (n=5)37℃ 一 个月,80%; 2-8℃ 六 个月,95~100%
4	FineTest® 维生素 D ELISA 试剂盒	竞争法, 生物素-亲和素	线性: 1.563-100ng/ml; 标准浓度-OD 值, 可使用四参数 方程 4PL 绘制标准曲线	0.938ng/ml	低、中、高浓度样本, 板内:CV% 4.23~4.69(n=20); 板间:CV%4.68~5.89 (n=20,3 批)	添加法 (n=10) 不同 样品 93%~97%; 线性稀释法:将添加 VD 的样品倍比稀 释检测, 得出回收率 范围。	与其它类似物 无明显交叉反应	未启封试剂盒 2-8℃./ 试剂盒 (n=5)37℃ 一 个月,80%; 2-8℃ 六 个月,95~100%
5	头孢氨苄 (Cefalexin) ELISA 试剂盒	竞争法	定量: 线性: 0.1ppb~8.1ppb: 标 准浓度的对数值-百分吸光度值, 绘制标准曲线;	检测下限为 0.05ppb	吸光度板内<8%;板间 <15%	大于 80%	头孢氨苄 (Cefalexin) 100%	试剂盒贮存于 2~8℃

			半定量：标准液与样品比颜色； 或比吸光度值					
6	FineTest®维生素 B12 ELISA 试剂盒	竞争法， 生物素- 亲和素	线性：50-500pg/ml；标准浓度- OD 值，可使用四参数方程 4PL 绘制 标准曲线	25pg/ml	低、中、高浓度样本，板 内：CV%4.78~5.44 (n=20)；板间： CV%5.004~5.48(n=20,3 批)	回收率，86-104%， 线性度，将添加 VB12 的样品倍比稀 释检测，得出回收率 范围	与其它类似物 无明显交叉反 应	未启封试剂盒 2-8°C./ 试剂盒 (n=5)37°C 一 个月,80%；2-8°C 六个 月,95~100%
7	COIBO BIO®植 物大豆球蛋白 (Gly)ELISA 检 测试剂盒	双抗体夹 心法	线性：1.25mg/mL-40mg/mL；标 准浓度-OD 值，绘制线性回归曲 线；R 值为 0.95 以上	最低检测浓度 小于 0.1mg/mL	批内、批间变异系数 <10%和<15%	/	/	试剂盒保存：2-8°C。 有效期：6 个月
8	COIBO BIO®植 物 6-苄氨基腺 嘌呤 ELISA 试剂 盒	双抗体夹 心法	线性：1.5 ng/mL-48 ng/mL；标准 浓度-OD 值，标准曲线的直线回 归方程式；R 值为 0.95 以上	最低检测浓度 小于0.1ng/mL	批内、批间变异系数 <10%和<15%。	/	/	试剂盒保存：2-8°C。 有效期：6 个月
9	CUSABIO®Zeara lenone (ZEN) ELISA Kit	竞争抑制 法	线性：0.15 µg/kg~4.05 µg/kg； 半定量：样品吸收值与标准品比 较 定量：绘制线性回归曲线	LOD: x0+3s (n=20)； 0.15 µg/kg	Intra-assay Precision: CV%<10%； Inter-assay Precision: CV%<10%	70%~120%	交叉反应率 ZEN 100%	Unopened kit: Store at 2 - 8°C.; Opened kit: one month at 2 - 8° C.
10	CUSABIO®Aflat oxin M1 (AFM1) ELISA Kit	竞争法	线性：0.03 ppb-2.43 ppb； 半定量：样品吸收值与标准品比 较 定量：绘制线性回归曲线	LLD 0.03 ppb; 0.1 ppb~0.3 ppb 不同样	Intra-assay Precision: CV%<10%； Inter-assay Precision: CV%<10%	Milk: 90% ±25% Milk powder、 Yoghurt: 100% ±30%	AFM1 100%； AFB1 12.9%； AFB2 1.4% AFG1 1.9% AFG2 0.3%	Unopened kit: Store at 2 - 8°C.; Opened kit: one month at 2 - 8° C.



11	CUSABIO®Deoxyvalenol (DON) ELISA Kit	竞争抑制法	线性: 1 µg/kg~81µg/kg; 半定量: 样品吸收值与标准品比较 定量: 绘制线性回归曲线	LOD: 1 µg/kg; 检测限 100 µg/kg	Intra-assay Precision: CV%<10%; Inter-assay Precision: CV%<10%	80%~120%	Deoxynivalenol 100%	Unopened kit: Store at 2 - 8°C.; Opened kit: one month at 2 - 8° C.
12	CUSABIO®Enrofloxacin ELISA Kit	竞争法	线性: 1 µg/kg~81µg/kg; 半定量: 样品吸收值与标准品比较 定量: 绘制线性回归曲线	LLD 1 ppb(	Intra-assay Precision: CV%<15%; Inter-assay Precision: CV%<15%	Tissue, egg: 80% ±15% honey: 75% ±15%	Enrofloxacin 100%	Unopened kit: Store at 2 - 8°C.; Opened kit: one month at 2 - 8° C.
13	CUSABIO®Total Aflatoxins ELISA Kit	竞争抑制法	线性: 0.02 ppb-1.62 ppb; 半定量: 样品吸收值与标准品比较 定量: 绘制线性回归曲线	LOD: 0.02 ppb; 2 ppb	Intra-assay Precision: CV%<10%; Inter-assay Precision: CV%<10%	95±35%	AFB1 100%; AFM1 91.2% AFB2 68.4% AFG1 4.7% AFG2 2.7%	Unopened kit: Store at 2 - 8°C.; Opened kit: one month at 2 - 8° C.
14	mlbio®苏丹红 ELISA 试剂盒	间接竞争	线性: 0.1ppb~8.1ppb; 标准浓度对数-百分吸光率, 绘制标准半对数曲线图。	0.1ppb(ng/ml); 检测下限: 20ppb~200ppb 不同样品	/	80% ±10%; 65% ±10%; 70% ±10%不同样品	交叉反应率 苏丹红 100% 对位红 123% 罗丹明 8%	试剂盒于 2-8°C保存, 有效期为 1 年
15	mlbio®磺胺十五合一 ELISA 检测试剂盒	间接竞争	线性: 0.5ppb~40ppb; 标准浓度对数-百分吸光率, 绘制标准半对数曲线图。	0.5ppb(ng/ml); 检测下限: 5ppb~20ppb 不同样本	/	组织、蜂蜜、鸡蛋 85±25% 尿样、牛奶、血清、饲料 80±25%	药物名称 交叉率 灵敏度 ppb: SM2 100% 0.5; SMM 670% 0.07; 等	试剂盒于 2-8°C保存, 有效期为 1 年
16	mlbio®猪胸膜肺炎放线杆菌 ApxIVA 抗体检测试剂盒	夹心法	S/P=样品A值/阳性对照A值的比值; S/P≥1 为 阳性; S/P<1 为阴性。	/	/	/	/	于 2~8°C, 有效期为 12 个月; 包被板开封后 2~8°C, 使用期限为 2 个月。

17	mlbio®猪衣原体 IgG 抗体检测试剂盒 (ELISA)	夹心法	C.O (临界值)=2.1×阴性对照孔均值 样品 A 值≥C.O 为阳性; 样品 A 值<C.O 为阴性。(阴性对照孔均值低于 0.08 时以 0.08 计算)	/	/	/	/	于 2~8℃, 有效期为 12 个月; 包被板开封后, 2~8℃, 使用期限为 2 个月。
18	COIBO BIO®细菌(Bacteria)脂多糖 (LPS) ELISA 检测试剂盒	双抗体夹心法	线性: 50~800 EU/L; 标准品浓度-OD 值, 绘制标准品线性回归曲线; R 大于等于 0.9900	最低检测浓度小于 1.0EU/L。	板内、板间变异系数< 15%。	/	不与其它可溶性结构类似物交叉反应	2-8℃, 有效期: 6 个月
19	MSK®人胰多肽 (PP)酶联免疫分析试剂盒	夹心法, 生物素-亲和素	标准品依次倍比稀释; 标准浓度-OD 值, 标准曲线的直线回归方程式; R 值为 0.990 以上	/	批内、批间 CV<9%和 <11%	/	/	试剂盒保存: 2-8℃, 有效期: 6 个月
20	JLD®植物水杨酸 (SA) 酶联免疫分析试剂盒	双抗体夹心法	线性: 0.25µg/mL -8µg/mL; 标准浓度-OD 值, 标准曲线的直线回归方程式; R 值为 0.95 以上	最低检测浓度小于 0.1µg/mL	/	/	/	试剂盒保存: 2-8℃, 有效期: 6 个月
21	JLD®微生物洛河肽素(Pcs)酶联免疫分析试剂盒	双抗体夹心法	标准浓度-OD 值, 标准曲线的直线回归方程式; R 值为 0.95 以上	/	批内、批间变异系数应 <10%和<15%	/	/	/
22	Elabscience®叶酸/维生素 B9 酶联免疫吸附测定试剂盒	竞争法, 生物素-亲和素	线性: 1.56-100 ng/mL; 标准品浓度-OD 值, 在双对数坐标轴上拟合四参数逻辑函数的标准曲线	0.94 ng/mL	板内, 板间变异系数均 <10% 低, 中, 高浓度样本, (n=20)、(n=20,3 板)	添加平均回收率 91~108%; 线性度, 将添加有 FA/VB9 的样本倍比稀释做回收。	其它类似物无明显交叉反应	试剂盒在 2-8℃可保存 3 个月; 开封后, -20℃, 可存放至有效期(6 个月)
23	Elabscience®乙酰辅酶 A 酶联免疫吸附测定试剂盒	双抗体夹心法, 生物素-亲和素	线性: 0.31-20 ng/mL; 标准品浓度-OD 值, 在双对数坐标轴上拟合四参数逻辑函数的标准曲线。	0.19 ng/mL	板内, 板间变异系数均 <10% 低, 中, 高浓度样本, (n=20)、(n=20,3 板)	添加平均回收率, 91~99%; 线性度, 将添加有 A-CoA 的样本倍比	与其它类似物无明显交叉反应	试剂盒在 2-8℃可保存 3 个月; 开封后, -20℃, 可存放至有效期(6 个月)

						稀释做回收实验。		
24	Hillgene® E.coli HCP ELISA 检测试剂盒	双抗夹心法，生物素-亲和素	线性：3.3-810ng/mL；标准浓度-OD 值，建议采用合四参数的拟合方式进行线性拟合；R 0.99967	定量限： 3.3ng/mL	CV%≤10%，RE%≤±15%	/	/	试剂盒在 2-8℃可保存 8 个月
25	Hillgene® 卡那霉素 ELISA 检测试剂盒	间接竞争法，生物素-亲和素	线性：0.05~5ng/mL；标准品浓度-百分吸光度值，绘制标准曲线，推荐使用合四参数 Logistic 数学模型拟合方式	检测限：<0.05 ng/mL； 定量限： 0.05ng/mL	CV%≤10%，RE%≤±15%	/	/	试剂盒在 2-8℃可保存 12 个月

附表2 各类酶联免疫方法标准的主要技术参数

标准号	名称	原理	定性	定量	标准	附录 质量判定方法
GB 5009.22-2 016	食品安全国家标准 食 品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定(第四法 酶 联免疫吸附筛查法)	竞争法,固相抗体+ (待测抗原+酶标 抗原)+底物;	/	筛查法,标准品浓度与吸 光度变化关系绘制标准 工作曲线	精密密度: 相对偏差应不大于 20%。 当称取谷物、坚果、油脂、调味品等样品 5 g 时,方法 检出限为 1 µg/kg, 定量限为 3µg/kg。 当称取特殊膳食食用食品样品 5 g 时,方法检出限为 0.1µg/kg, 定量限为 0.3µg/kg.	50%~120%(添加水平 2、5、10µg/kg 或根据 限量 0.2µg/kg)
					精密密度: 相对偏差应不大于 20%。 称取液态乳 10g 时,方法检出限为 0.01µg/kg,定量限为 0.03µg/kg。 称取乳粉和含乳特殊膳食食用食品 10g 时,方法检出限为 0.1µg/kg,定量限为 0.3µg/kg。 称取奶酪 5g 时,方法检出限为 0.02µg/kg,定量限为 0.06µg/kg。	
GB 5009.96-2 016	食品安全国家标准 食 品中赭曲霉毒素 A 的测 定 (第四法酶联免疫吸 附测定法)	竞争法: 固相抗抗 体+ (待测抗原+酶 标抗原+OA 抗体) +底物	/	标准品浓度与吸光度变 化关系绘制标准工作曲 线	精密密度: 相对偏差应不大于 15%。 检出限和定量限分别为 1µg/kg 和 2µg/kg.	/
GB5009.1 11-2016	食品安全国家标准 食 品中脱氧雪腐镰刀菌烯 醇及其乙酰化衍生物的 测定 (第四法酶联免疫 吸附筛查法)	竞争法,固相抗体+ (待测抗原+酶标 抗原)+底物; 定量 检测;	/	筛查法,标准品浓度与吸 光度变化关系绘制标准 工作曲线	精密密度: 相对相差应不大于 25%。 当称取谷物及其制品样品 5g 时,方法检出限为 200µg/kg, 定量限为 250µg/kg。	/
GB 5009.118- 2016	食品安全国家标准 食 品中 T-2 毒素的测定 (第二法 间接 ELISA 法, 第三法 直接 LISA	间接法:固相抗原+ (待测抗原+抗体) +酶标二抗+底物。 直接(竞争)法: 一,	/	标准品浓度与吸光度变 化关系绘制标准工作曲 线	精密密度: 相对相差应不大于 20%。 间接法:方法检出限为 1µg/kg,定量限为 3µg/kg。 直接 ELISA 法一的检出限为 1µg/kg,定量限为 3µg/kg。 直接 ELISA 法二的检出限为 3.5µg/kg,定量限为	/

	法)	固相抗原+(待测抗原+酶标抗原)+底物; 二, 固相抗体/(待测抗原+酶标抗体)+底物			11μg/kg。	
GB 5009.206-2016	食品安全国家标准 水产品中河豚毒素的测定 (第四法酶联免疫吸附法)	间接法:固相抗原+(待测抗原+抗体)+酶标二抗+底物,	/	浓度对数-吸光度比值, 与标准曲线比较检测	精密度: 相对相差应不大于 20%。本方法的检出限为 3μg/kg,定量限为 10μg/kg。	/
GB/T 17480-2008	饲料中黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> 的测定 酶联免疫吸附法	竞争法, 固相抗体+(待测抗原+酶标抗原)+底物; 间接法:病原微生物血清抗体检测, 固相病毒抗原+待测标本 (含相应抗体)+酶标抗抗体+底物显色;	吸光度≥最低标准点为限值	相对吸光度/浓度半对数	精密度: 相对相差应不大于 10%。本方法的检出限为 0.1μg/kg	/
GB/T 17999.6-2008	SPF 鸡 微生物学监测 第 6 部分: SPF 鸡 酶联免疫吸附试验	双抗体夹心法:病毒 P27 抗原检测, 固相抗体+待测标本 (含相应抗原)+酶标抗体+底物	间接法: 定性 S/N≥2 为阳性。双抗体夹心法: 定性 S/P≥0.2 为阳性	/	阴性、阳性对照血清 S/P= (样品 OD 值均数-阴性对照 OD 值均数) / (阳性对照 OD 值均数-阴性对照 OD 值均数)	/
GB/T 18932.21-2003	蜂蜜中氯霉素残留量的测定方法 酶联免疫法	竞争法, 固相抗体+(待测抗原+酶标抗原)+底物;	/	大于检出限时, 进一步确认, 相对吸光度/浓度半对数	方法检出限: 氯霉素为 0.30μg/kg, 回收率 89.6~104.7%.	绝对差值不超过重复性限

GB/T 18932.27- 2005	蜂蜜中泰乐菌素残留量 测定方法 酶联免疫法	竞争法,固相抗体+ (待测抗原+酶标 抗原)+底物;	/	大于检出限时, LC-MS-MS 进一步确认, 浓度对数-吸光度比值, 与标准曲线比较检测	方法检出限:泰乐菌素为 10.0µg/kg。 回收率 97.20~104.35%。 精密度:GB/T6379 其重复性和再现性的值是以 95%的可 信度来计算。重复性 lgr 再现性 R 方法检出限:四环素族抗生素为 15.00µg/kg。回收率 95.9~107.0%。 精密度:GB/T6379 其重复性和再现性的值是以 95%的可 信度来计算。 重复性 lgr 再现性 R	再现性限(以 95%可 信度计算)
GB/T 18932.28- 2005	蜂蜜中四环素族抗生素 残留量测定方法 酶联 免疫法	竞争法,固相抗体+ (待测抗原+酶标 抗原)+底物;	/	浓度对数-吸光度比值, 与标准曲线比较检测,大 于检出限时,进一步确认	方法检测限:阿维菌素类药物在牛肝组织和牛肉组织中的 检测限均为 2µg/kg。 交叉反应:阿维菌素 100%,埃普利诺菌素 130%,伊维 菌素 33%,多拉菌素 5%,泰乐菌素<0.1%,替米考星 <0.1% 方法变异系数:批内≤30%,批间≤45%	绝对差值不超过重复 性限
GB/T 21319-200 7	动物源食品中阿维菌素 类药物残留的测定 酶 联免疫吸附法	间接竞争法,固相 抗原+(待测抗原+ 抗体=酶标抗体)+ 底物;	/	吸光度与浓度呈负相关, 浓度对数-吸光度比值, 与标准曲线比较检测。		再现性限(以 95%可 信度计算)
GB/T 21329-200 7	动物源性食品中庆大霉 素残留量检验方法 酶 联免疫法	间接竞争法,固相 抗体+(抗体+酶 标抗原+抗原)+底 物;	/	浓度对数-吸光度比值, 与标准曲线比较检测。大 于检出限时,用其他方法 进一步确认	方法检测限: 10~20µg/kg	试剂盒, 回收率 83.9~93.7%。
GB/T 21330-200 7	动物源性食品中链霉素 残留量测定方法 酶联 免疫法	间接竞争法,固相 抗体+(抗体+酶 标抗原+抗原)+底 物;	/	浓度对数-吸光度比值, 与标准曲线比较检测,大 于检出限时,用其他方法 进一步确认	方法检出下限:肉类、内脏和水产品为 50.0µg/kg;牛 奶和奶粉为 20.0µg/kg。	试剂盒, 回收率 85.9~92.6%。
GB/T 22429-200 8	食品中沙门氏菌、肠出 血性大肠埃希氏菌 O157 及单核细胞增生 李斯特氏菌的快速筛选	双抗体夹心法:固 相抗体+待测标本 (含相应抗原)+ 酶标抗体+底物显	检测荧光或吸 光度,与参照 值比较(标准 菌株对照)	阳性用其他方法进行确 证	试剂盒控制:设立试验对照 不定期用相应可溯源标准菌进行过程控制 标准菌株对照	/

	检验	酶联免疫法	色或荧光，与参照比较。				
GB/T 40220-2021	植物代谢产物大豆凝集素测定	酶联免疫吸附法	夹心法:固相抗体+待测抗原+酶标抗体+底物;	/	标准浓度与吸光度	精密度: 相对偏差应不大于 20%。 回收率 76.2~120.97%。 方法检出限: 30~300µg/kg。方法定量限: 50~500µg/kg	试剂盒,
GB/T 40223-2021	植物代谢产物游离棉酚测定	酶联免疫吸附法	竞争法,固相抗原+待测抗原+酶标抗体+底物;	/	?	精密度: 相对偏差应不大于 20%。 回收率 73.3~111.60%。 方法检出限: 2000µg/kg。方法定量限: 3000µg/kg 当 ELISA 反应结束并加入终止液后 10min 内用酶标仪测量各孔在 450nm 波长时的光吸收值(OD 值)。并计算空白孔、标准阳性孔和每个标准阴性孔的 OD 平均值(N1、N2、N3、N4)。要求空白孔的 OD 平均值<标准阴性孔的 OD 平均值<标准阴性孔的 OD 平均值:标准阳性 OD 平均值(P)与所有标准阴性 OD 平均值(N)之比大于或等于 2.1(即 P/N≥2.1),否则检查 ELISA 板是否合格,加样位置是否有错误等。	试剂盒,
GB/T 32948-2016	犬科动物感染细粒棘球绦虫粪抗原的抗体夹心酶联免疫吸附试验检测技术		抗体夹心法	S/N≥2.1 为阳性, 否则为阴性	定量分析待测样品阴、阳性	/	
GB/T 40368-2021	植物代谢产物胰蛋白酶抑制因子测定	酶联免疫吸附法	夹心法:固相抗体+待测抗原+酶标抗体+底物	/	浓度与吸光度绘制标准工作曲线	精密度: 相对偏差应不大于 20%。 回收率 830~1207%。 方法检出限: 200µg/kg。方法定量限: 300µg/kg,,,,,	试剂盒
SN/T 3132-2012	出口牛乳制品中牛免疫球蛋白 G 的测定	酶联免疫吸附法	间接竞争法, 固相抗原+ (抗体+酶标抗原+抗原)+底物;	/	浓度对数-相对吸光度值, 与标准曲线比较检测。大于检出限时, 用其他方法进一步确认	本标准的测定低限为 9.8mg/g。 精密度: 方法变异系数应不大于 20%。 回收率: 679~99.3%	试剂盒在组成
SN/T 1961.3-2012	食品中过敏原成分检测方法 第 3 部分:酶联免疫吸附法检测荞麦蛋白		双抗夹心法: 固相抗体+待测抗原+生物素化抗体+酶	/	浓度-吸光度值标准曲线	荞麦蛋白定量检测范围: 0.78ng/mL~50ng/mL。	试剂盒组成

成分		标链菌素+底物；					
SN/T 1165.1-20 02	蓝舌病竞争酶联免疫吸 附试验操作规程	竞争法，固相病毒 抗原+（待检抗体+ 病毒 McABb）+酶 标二抗+底物	抑制百分比 （PI）	/	PI≥50% 被检血清 BTV 抗体阳性； PI<45% 被检血清 BTV 抗体阴性； PI 在 45%至 50%之间的样品判为可疑，须重复试验， 如 PI 仍在 45%至 50%之间，则判为阳性。		/
SN/T 1554-2016	鸡法氏囊病检疫技术规 范 3.6 酶联免疫吸附试 验	固相病毒抗原+（待 检抗体+病毒 McABb）+酶标二 抗+底物	P/N≥2 为阳性， P/N<1.5 为阴 性	/	P/N（标本（S）和阴性对照（N）的 A 值比值）1.5≤P/N<2 为可疑，可疑样品应重检一次，重检后的 P/N≥1.5 判为 阳性，P/N<1.5 为阴性		/
NY/T 1873-2010	日本脑炎病毒抗体间接 检测 酶联免疫吸附法	间接法:病毒抗体 检测,固相病毒抗 原+待测标本(含相 应抗体)+酶标抗抗 体+底物显色	S/P≥0.35 为阳 性,<0.35 为阴 性	/	S/P（标本 OD 值/阳性对照 OD 值），阴性对照 OD 平 均值≤0.2 时试验成立	试剂配制	
NY/T 680-2003	禽白血病毒 P 27 抗 原酶联免疫吸附试验方 法	双抗夹心法，病毒 抗原检测,固相病 毒抗体+待测标本 （含相应抗原）+ 酶标抗体+底物显 色	S/P≤0.2 阴性， >0.2 为阳性	/	S/P=（样品 OD 值均数-阴性对照 OD 值均数）/（阳性 对照 OD 值均数-阴性对照 OD 值均数）	试剂配制	
农业部 1025 号公 告 -20-2008	动物性食品中四环素类 药物残留检测酶联免疫 吸附法	直接竞争法	<临界值（空 白样添加低限 标准物时）为 阴性	相对吸光度/浓度半对数	检出限低于 10—30μg/kg（L） 回收率：40%—120% 交叉反应：四环素 100%，金霉素约 100%，多西霉素约 75%，土霉素约 58% 变异系数:批内≤20%，批间≤25%		/



农业部 1025 号公 告 -24-2008	动物源食品中磺胺二甲 嘧啶残留检测酶联免疫 吸附法	直接竞争法	$\geq 9\mu\text{g/L}$ 标准液 的吸收值为未 检出	相对吸光度/浓度半对数 $1-81\mu\text{g/L}$	回收率：50%—110% 变异系数： $\leq 20\%$	/
农业部 1025 号公 告 -25-2008	动物源食品中恩诺沙星 残留检测酶联免疫吸附 法	直接竞争法	$\geq 4.5\mu\text{g/L}$ 标准 液的吸收值为 未检出	相对吸光度/浓度半对数 $0.5-40.5\mu\text{g/L}$	回收率：50%—110% 变异系数： $\leq 20\%$	/

---

## FOOD BIOLOGICAL CONTAMINANTS

# Evaluation of VIDAS<sup>®</sup> UP *Listeria* Assay (LPT) for the Detection of *Listeria* in a Variety of Foods and Environmental Surfaces: First Action 2013.10

ERIN CROWLEY, PATRICK BIRD, JONATHAN FLANNERY, M. JOSEPH BENZINGER, JR, KIEL FISHER, MEGAN BOYLE, TRAVIS HUFFMAN, BEN BASTIN, PAIGE BEDINGHAUS, WILLIAM JUDD, THAO HOANG, JAMES AGIN, and DAVID GOINS  
Q Laboratories, Inc., 1400 Harrison Ave, Cincinnati, OH 45214

RONALD L. JOHNSON<sup>1</sup>

bioMérieux, Inc., 595 Anglum Rd, Hazelwood, MO 63042

Collaborators: A. Bollenbacher; B. Brahmanda; R. Burkhart; J. Cannon; A. Capps; L. Cesanas; D. Davis; D. Ebbing; H. Elgaali; B. Hand; R. Hiles; J. Hirsch; B. Howard; J. Jolly; S. Joseph; A. Kehres; K. Klemms; J. Li; B. May; M. Michels; J. Mills; S. Moore; N. Nagassar; S. Owusu; N. Palen; L. Parker; B. Paul; B. Perry; J. Pickett; N. Rogman; G. Rosario; P. Rule; C. Said; M. Sala-Rhatigan; A. Stegmann; T. Stubblefield; K. Wiggins; J. Zimmerman

The VIDAS<sup>®</sup> UP *Listeria* (LPT) is an automated rapid screening enzyme phage-ligand based assay for the detection of *Listeria* species in human food products and environmental samples. The VIDAS LPT method was compared in a multi-laboratory collaborative study to AOAC Official Method 993.12 *Listeria monocytogenes* in Milk and Dairy Products reference method following current AOAC guidelines. A total of 14 laboratories participated, representing government and industry, throughout the United States. One matrix, queso fresco (soft Mexican cheese), was analyzed using two different test portion sizes, 25 and 125 g. Samples representing each test portion size were artificially contaminated with *Listeria* species at three levels, an uninoculated control level [0 colony-forming units (CFU)/test portion], a low-inoculum level (0.2–2 CFU/test portion), and a high-inoculum level (2–5 CFU/test portion). For this evaluation, 1800 unpaired replicate test portions were analyzed by either the VIDAS LPT or AOAC 993.12. Each inoculation level was analyzed using the Probability of Detection (POD) statistical model. For the low-level inoculated test portions, difference in collaborator POD (dLPOD) values of 0.01, (–0.10, 0.13), with 95% confidence intervals, were obtained for both 25 and 125 g test portions. The range of the confidence intervals for dLPOD values for both the 25 and 125 g test

portions contains the point 0.0 indicating no statistically significant difference in the number of positive samples detected between the VIDAS LPT and the AOAC methods. In addition to Oxford agar, VIDAS LPT test portions were confirmed using Agar *Listeria* Ottavani and Agosti (ALOA), a proprietary chromogenic agar for the identification and differentiation of *L. monocytogenes* and *Listeria* species. No differences were observed between the two selective agars. The VIDAS LPT method, with the optional ALOA agar confirmation method, was adopted as Official First Action status for the detection of *Listeria* species in a variety of foods and environmental samples.

The current classification of the genus *Listeria* includes six well-characterized species, with *L. monocytogenes* being the species of most concern in foodborne outbreaks (1). *Listeria* species are short, non-spore forming Gram-positive rods that are ubiquitous in the environment and can be found in soil, decaying vegetation, and most environments (2). While the number of people who become ill from listeriosis, the disease caused by *Listeria*, is relatively small, the high mortality rate from infection makes it one of the leading causes of death from foodborne illness (2). Of primary concern for illness from *Listeria* outbreaks are the elderly, pregnant women, infants, and people with compromised immune systems (3). Outbreaks from *Listeria* have been linked to such foods as ready-to-eat deli meats, hot dogs, pâtés, dairy products, soft cheeses, smoked seafood, raw sprouts, and most recently cantaloupes (4). The VIDAS UP *Listeria* (LPT) assay, an automated enzyme phage-ligand based assay for the screening of *Listeria* in food and environmental samples, provides the ability to detect *Listeria* after only 26 h of enrichment.

The VIDAS LPT assay uses a primary enrichment (prewarmed to 18–25°C) to detect *Listeria* species in 25 g test portions after 26–30 h of enrichment. For cantaloupe melons, whole melons are soaked in approximately 1 L LPT broth and incubated following conditions outlined for 25 g test portions. For larger

Submitted for publication November 1, 2013.

The method was approved by the Expert Review Panel for Microbiology Methods for Feed and Environmental Surfaces as First Action.

The Expert Review Panel for Microbiology Methods for Feed and Environmental Surfaces invites method users to provide feedback on the First Action methods. Feedback from method users will help verify that the methods are fit for purpose and are critical to gaining global recognition and acceptance of the methods. Comments can be sent directly to the corresponding author or methodfeedback@aoac.org.

<sup>1</sup> Corresponding author's e-mail: ron.johnson@biomerieux.com

Supplemental data is available on the *J. AOAC Int.* website, <http://aoac.publisher.ingentaconnect.com/content/aoac/jaoac> and follow link to supplemental data.

DOI: 10.5740/jaoacint.13-372

samples sizes, such as 125 g, following 24–30 h primary enrichment incubation, a transfer to a secondary enrichment in 10 mL LPT broth and an additional 22–26 h of incubation is required prior to detection. For smaller test portion sizes and cantaloupe melons, the new enrichment method eliminates the need for secondary enrichments and produces negative and presumptive positive results the following day.

Prior to the collaborative study, the VIDAS LPT method was validated by expert laboratories according to *AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces*, Appendix J (5) in a precollaborative study. The objective of this study was to demonstrate that the VIDAS LPT method could detect *Listeria* spp. in a variety of foods and environmental surfaces as claimed by the manufacturer. For the VIDAS LPT evaluation, 19 matrixes were tested: deli ham (25 and 125 g), pepperoni (25 g), beef hot dogs (25 g), chicken nuggets (25 g), chicken liver pâté (25 g), ground beef (125 g), deli turkey (125 g), cooked shrimp (25 g), smoked salmon (25 g), whole cantaloupe melon, bagged mixed salad (25 g), regular peanut butter (25 g), black pepper (25 g), vanilla ice cream (25 g), queso fresco (25 and 125 g), and stainless steel, plastic, ceramic, and concrete environmental surfaces.

During the precollaborative method comparison evaluation, 525 unpaired samples were analyzed by the VIDAS LPT method. One false-positive result and 0 false-negative results were observed. Using the POD statistical model, no significant difference was observed between the reference method and the VIDAS LPT method for all matrixes analyzed except bagged mixed salad, beef hot dogs, and stainless steel environmental samples. For these three matrixes, the VIDAS LPT detected significantly more positive samples than the reference method, which resulted in the statistically significant difference. The inclusivity and exclusivity evaluation showed no unexpected results. The VIDAS LPT method detected all of the *Listeria* strains analyzed and none of the non-*Listeria* strains analyzed. The precollaborative data and report were reviewed by an expert review panel (ERP) prior to approval of the AOAC collaborative protocol. The precollaborative data are presented as supplemental data on the *J. AOAC Int.* website, <http://aoac.publisher.ingentaconnect.com/content/aoac/jaoac>.

This collaborative study compared the VIDAS LPT method to the AOAC 993.12 *Listeria monocytogenes* in Milk and Dairy Products (6) method for queso fresco at two test portion sizes, 25 and 125 g.

## Collaborative Study

### Study Design

For this collaborative study, one matrix, queso fresco, was analyzed using two test portion sizes: 25 and 125 g. The queso fresco was obtained from local retailers and screened for the absence of *Listeria* by AOAC 993.12 prior to analysis. The 25 and 125 g test portions of queso fresco were each inoculated with a different strain of *Listeria* at two inoculation levels: a high-inoculation level of approximately 2–5 colony-forming units (CFU)/test portion and a low-inoculation level of approximately 0.2–2 CFU/test portion. A set of uninoculated control test portions were also included for each matrix at 0 CFU/test portion. The 25 g test portions were artificially

contaminated with *L. innocua* ATCC 33090 and the 125 g test portions with *L. monocytogenes* ATCC 19115.

Twelve replicate portions from each of the three inoculation levels of product were analyzed. Two sets of samples (72 total) were sent to each laboratory for analysis by VIDAS LPT and AOAC 993.12 due to different sample enrichments for each method.

A detailed collaborative study packet outlining all necessary information related to the study, including media preparation, method-specific test portion preparation, and documentation of results, was sent to each collaborating laboratory prior to the initiation of the study.

### Preparation of Inocula and Test Portions

The *Listeria* cultures used in this evaluation were propagated in 10 mL brain heart infusion (BHI) broth from a frozen stock culture stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  at Q Laboratories, Inc. The broth was incubated for 18–24 h at  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . The inoculum was heat stressed in a  $50 \pm 1^{\circ}\text{C}$  water bath for 10 min to obtain a percent injury of 50–80%, as determined by plating onto selective Oxford agar (OXA) and nonselective trypticase soy agar (TSA). The degree of injury was estimated as

$$\left(1 - \frac{n_{\text{select}}}{n_{\text{nonselect}}}\right) \times 100$$

where  $n_{\text{select}}$  = number of colonies on selective agar and  $n_{\text{nonselect}}$  = number of colonies on nonselective agar. Appropriate dilutions of the heat-stressed cultures were prepared based on previously established growth curves for both low- and high-inoculation levels, resulting in fractional positive outcomes for at least one level. For both test portion sizes, a bulk lot of the queso fresco was inoculated with a liquid inoculum and mixed thoroughly by hand kneading to ensure an even distribution of microorganisms. The queso fresco was inoculated on the day of shipment so that all test portions would have been held for 96 h by the day testing was initiated. The shipment and hold times of the inoculated test material had been verified through 120 h as a quality control measure prior to study initiation. For the analysis of the 25 g test portions, the bulk lot of test material was divided into 30 g portions for shipment to the collaborators. For the analysis of the 125 g test portions, 25 g of inoculated test product was mixed with 100 g of uninoculated test product for shipment to the collaborators for the analysis by the VIDAS LPT method. Collaborators received 30 g portions for analysis by AOAC 993.12. Validation criterion is satisfied when inoculated test portions produce fractional recovery of the spiked organism, defined as either the reference or candidate method yielding 25–75% positive results. To determine the level of *Listeria* spp. in the queso fresco, a 5-tube most probable number (MPN) was conducted on the day of initiation of analysis. From both the high- and low-inoculated batches of queso fresco, five 100 g test portions, the reference method test portions from the collaborating laboratories, and five 10 g test portions were analyzed following AOAC 993.12. The MPN and 95% confidence intervals were calculated from the high, low, and uninoculated levels using the Least Cost Formulations (LCF; Norfolk, VA) MPN Calculator provided by AOAC (7).

Confirmation of the samples was conducted according to AOAC 993.12.

### Test Portion Distribution

All samples were labeled with a randomized, blind-coded 3-digit number affixed to the sample container. Test portions were shipped on a Thursday via overnight delivery according to the Category B Dangerous Goods shipment regulations set forth by the International Air Transportation Association. Upon receipt, samples were held by the collaborating laboratory at refrigeration temperature (3–5°C) until the following Monday when analysis was initiated. All samples were packed with cold packs to target a temperature of <7°C during shipment. In addition to each of the test portions and the total plate count replicate, collaborators also received a test portion for each matrix labeled as ‘temperature control’. Participants were instructed to obtain the temperature of this portion upon receipt of the package, document results on the Sample Receipt Confirmation form provided, and fax to the study director.

### Test Portion Analysis

Collaborators followed the appropriate preparation and analysis protocol according to the method for each test portion size. For both test portion sizes, each collaborator received 72 test portions of each food product (12 high, 12 low, and 12 controls for each evaluation). For the analysis of the 25 g test portions by VIDAS LPT, a 25 g sample replicate was enriched with 225 mL prewarmed (18–25°C) LPT broth and homogenized for 2 min. Test portions were incubated for 26–30 h at 30±1°C. For the 125 g test portions analyzed by VIDAS LPT, a 125 g sample replicate was enriched with 375 mL prewarmed (18–25°C) LPT broth and homogenized for 2 min. Test portions were incubated for 24–30 h at 30±1°C. For 125 g test portions, a 1.0 mL aliquot of the primary enrichment was transferred into 10 mL LPT broth and incubated for an additional 22–26 h at 30±1°C.

Following enrichment, samples were assayed by VIDAS LPT and confirmed following procedures outlined in the standard reference method by streaking an aliquot of the primary enrichment onto OXA and a proprietary chromogenic agar, ALOA. Presumptive positive samples were streaked for isolation on TSA yeast extract (TSAYE) and biochemically confirmed by morphology verification via Gram stain, hemolysis test, and by AOAC 2012.02 VITEK 2 GP Biochemical Identification method (VITEK 2 GP) or API *Listeria* (1) biochemical test kits. Laboratories utilizing API *Listeria* kits were also required to conduct a catalase test and an oxidase test.

Both test portion sizes analyzed by the VIDAS LPT methods were compared to samples (25 g) analyzed using the AOAC 993.12 reference method in conjunction with VITEK 2 GP or API *Listeria* for the confirmation of *Listeria* in an unpaired study design. Twenty-five gram test portions were enriched in prewarmed (45°C) selective enrichment broth, homogenized for 2 min, and incubated at 30±2°C for 48 h. Samples were streaked onto OXA and presumptive positive samples were streaked for isolation onto TSAYE. Colonies from TSAYE were confirmed by morphology verification via Gram stain, hemolysis test, and by VITEK 2 GP or API *Listeria* kits. Laboratories utilizing API

*Listeria* kits were also required to conduct a catalase test and an oxidase test.

### Statistical Analysis

Each collaborating laboratory recorded results for the reference method and VIDAS LPT results. The data sheets were submitted to the study director for analysis at the end of each week. The results of each test portion for each sample were compiled by the study director and the qualitative VIDAS LPT results were compared to the reference method for statistical analysis. Data for each test portion size was analyzed using the POD statistical model (5, 8). For each inoculation level, the probability of detection (POD) was calculated as the number of positive outcomes divided by the total number of trials. The POD was calculated for the candidate presumptive results, POD<sub>CP</sub>, the candidate confirmatory results, POD<sub>CC</sub>/POD<sub>C</sub>, the reference method, POD<sub>R</sub>, the difference in the candidate presumptive and confirmatory results, dLPOD<sub>CP</sub>, and the difference in the candidate confirmed and reference methods, dLPOD<sub>C</sub>. A confidence interval of a dLPOD not containing the point zero would indicate a statistically significant difference between VIDAS LPT and AOAC 993.12 at the 5% probability level (9).

### AOAC Official Method 2013.10 *Listeria* species in a Variety of Foods and Environmental Surfaces VIDAS® UP *Listeria* (LPT) Method First Action 2013

[Applicable to detection of *Listeria* in deli ham (25 and 125 g), pepperoni (25 g), beef hot dogs (25 g), chicken nuggets (25 g), chicken liver pâté (25 g), ground beef (125 g), deli turkey (125 g), cooked shrimp (25 g), smoked salmon (25 g), whole cantaloupe melon, bagged mixed salad (25 g), peanut butter (25 g), black pepper (25 g), vanilla ice cream (25 g), queso fresco (25 and 125 g), stainless steel, plastic, ceramic and concrete environmental surfaces.]

See Tables 2013.10A and B for a summary of results of the collaborative study. See supplemental data, Tables 2A–D, for detailed results of the collaborative study on *J. AOAC Int.* website, <http://aoac.publisher.ingentaconnect.com/content/aoac/jaoac>.

**Caution:** *Listeria monocytogenes* is of particular concern for pregnant women, the aged, and the infirmed. It is recommended that these concerned groups avoid handling this organism. Dispose of all reagents and other contaminated materials by acceptable procedures for potentially biohazardous materials. Some reagents in the kit contain 1 g/L concentrations of sodium azide. Check local regulations prior to disposal. Disposal of these reagents into sinks with copper or lead plumbing should be followed immediately with large quantities of water to prevent potential hazards. This kit contains products of animal origin. Certified knowledge of the origin and/or sanitary state of the animals does not totally guarantee the absence of transmissible pathogenic agents. It is, therefore, recommended that these products be treated as potentially infectious and

**Table 2013.10A. Summary of results for the detection of *Listeria* spp. in queso fresco (25 g)**

Method <sup>a</sup>	VIDAS LPT w/OXA			VIDAS LPT w/ALOA		
	Uninoculated	Low	High	Uninoculated	Low	High
Candidate presumptive positive/total No. samples analyzed	1/156	80/156	156/156	1/156	80/156	156/156
Candidate presumptive POD (CP)	0.01	0.51	1.00	0.01	0.51	1.00
	(0.01, 0.04)	(0.43, 0.59)	(0.98, 1.00)	(0.01, 0.04)	(0.43, 0.59)	(0.98, 1.00)
$s_r^b$	0.08	0.51	0.00	0.08	0.51	0.00
	(0.07, 0.15)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.15)	(0.07, 0.15)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.15)
$s_L^c$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	(0.00, 0.03)	(0.00, 0.13)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.03)	(0.00, 0.13)	(0.00, 0.15)
$s_R^d$	0.08	0.51	0.00	0.08	0.51	0.00
	(0.07, 0.13)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.21)	(0.07, 0.13)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.21)
<i>P</i> value <sup>e</sup>	0.4395	0.9210	1.0000	0.4395	0.9210	1.0000
Candidate confirmed positive/total No. samples analyzed	0/156	78/156	156/156	0/156	78/156	156/156
Candidate confirmed POD (CC)	0.00	0.50	1.00	0.00	0.50	1.00
	(0.00, 0.02)	(0.42, 0.58)	(0.98, 1.00)	(0.00, 0.02)	(0.42, 0.58)	(0.98, 1.00)
$s_r$	0.00	0.51	0.00	0.00	0.51	0.00
	(0.00, 0.15)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.15)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.15)
$s_L$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.14)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.14)	(0.00, 0.15)
$s_R$	0.00	0.51	0.00	0.00	0.51	0.00
	(0.00, 0.21)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.21)	(0.00, 0.21)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.21)
<i>P</i> value	1.0000	0.9161	1.0000	1.0000	0.9161	1.0000
Positive reference samples/total No. samples analyzed	0/156	76/156	156/156	0/156	76/156	156/156
Reference POD	0.00	0.49	1.00	0.00	0.49	1.00
	(0.00, 0.02)	(0.41, 0.57)	(0.98, 1.00)	(0.00, 0.02)	(0.41, 0.57)	(0.98, 1.00)
$s_r$	0.00	0.52	0.00	0.00	0.52	0.00
	(0.00, 0.15)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.15)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.15)
$s_L$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.10)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.15)	(0.00, 0.10)	(0.00, 0.15)
$s_R$	0.00	0.52	0.00	0.00	0.52	0.00
	(0.00, 0.21)	(0.47, 0.52)	(0.00, 0.21)	(0.00, 0.21)	(0.47, 0.52)	(0.00, 0.21)
<i>P</i> value	1.0000	0.9937	1.0000	1.0000	0.9937	1.0000
dLPOD (candidate vs reference)	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00
	(-0.02, 0.02)	(-0.10, 0.13)	(-0.02, 0.02)	(-0.02, 0.02)	(-0.10, 0.13)	(-0.02, 0.02)
dLPOD (candidate presumptive vs candidate confirmed)	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00
	(-0.02, 0.04)	(-0.10, 0.13)	(-0.02, 0.02)	(-0.02, 0.04)	(-0.10, 0.13)	(-0.02, 0.02)

<sup>a</sup> Results include 95% confidence intervals.<sup>b</sup> Repeatability standard deviation.<sup>c</sup> Among-laboratory standard deviation.<sup>d</sup> Reproducibility standard deviation.<sup>e</sup> *P* value = Homogeneity test of laboratory PODs.

handled observing the usual safety precautions (do not ingest or inhale).

### A. Principle

VIDAS<sup>®</sup> UP*Listeria* (LPT) method is for use on the automated VIDAS instrument for the detection of *Listeria* antigens using

the enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) method. The assay also incorporates phage proteins allowing an increase in sensitivity and specificity compared to traditional immunoassay. The Solid Phase Receptacle (SPR<sup>®</sup>) serves as the solid phase as well as the pipetting device. The interior of the SPR is coated with proteins specific for *Listeria* receptors. Reagents for the assay are ready-to-use and predispensed in the sealed reagent

**Table 2013.10B. Summary of results for the detection of *Listeria* spp. in queso fresco (125 g)**

Method <sup>a</sup>	VIDAS LPT w/OXA			VIDAS LPT w/ALOA		
	Uninoculated	Low	High	Uninoculated	Low	High
Candidate presumptive positive/total No. of samples analyzed	0/144	70/144	144/144	0/144	70/144	144/144
Candidate presumptive POD (CP)	0.00	0.49	1.00	0.00	0.49	1.00
	(0.00, 0.03)	(0.40, 0.57)	(0.97, 1.00)	(0.00, 0.03)	(0.40, 0.57)	(0.97, 1.00)
$s_r^b$	0.00	0.51	0.00	0.00	0.51	0.00
	(0.00, 0.16)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.16)	(0.00, 0.16)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.16)
$s_L^c$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	(0.00, 0.16)	(0.00, 0.12)	(0.00, 0.16)	(0.00, 0.16)	(0.00, 0.12)	(0.00, 0.16)
$s_R^d$	0.00	0.51	0.00	0.00	0.51	0.00
	(0.00, 0.22)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.22)	(0.00, 0.22)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.22)
<i>P</i> value <sup>e</sup>	1.0000	0.9730	1.0000	1.0000	0.9730	1.0000
Candidate confirmed positive/total No. of samples analyzed	0/144	70/144	144/144	0/144	70/144	144/144
Candidate confirmed POD (CC)	0.00	0.49	1.00	0.00	0.49	1.00
	(0.00, 0.03)	(0.40, 0.57)	(0.97, 1.00)	(0.00, 0.03)	(0.40, 0.57)	(0.97, 1.00)
$s_r$	0.00	0.51	0.00	0.00	0.51	0.00
	(0.00, 0.16)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.16)	(0.00, 0.16)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.16)
$s_L$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	(0.00, 0.16)	(0.00, 0.12)	(0.00, 0.16)	(0.00, 0.16)	(0.00, 0.12)	(0.00, 0.16)
$s_R$	0.00	0.51	0.00	0.00	0.51	0.00
	(0.00, 0.22)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.22)	(0.00, 0.22)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.22)
<i>P</i> value	1.0000	0.9730	1.0000	1.0000	0.9730	1.0000
Positive reference samples/total No. of samples analyzed	0/144	69/144	144/144	0/144	69/144	144/144
Reference POD	0.00	0.48	1.00	0.00	0.48	1.00
	(0.00, 0.03)	(0.39, 0.56)	(0.97, 1.00)	(0.00, 0.03)	(0.39, 0.56)	(0.97, 1.00)
$s_r$	0.00	0.51	0.00	0.00	0.51	0.00
	(0.00, 0.16)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.16)	(0.00, 0.16)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.16)
$s_L$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	(0.00, 0.16)	(0.00, 0.12)	(0.00, 0.16)	(0.00, 0.16)	(0.00, 0.12)	(0.00, 0.16)
$s_R$	0.00	0.51	0.00	0.00	0.51	0.00
	(0.00, 0.22)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.22)	(0.00, 0.22)	(0.46, 0.52)	(0.00, 0.22)
<i>P</i> value	1.0000	0.9672	1.0000	1.0000	0.9672	1.0000
dLPOD (C vs R)	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00
	(-0.03, 0.03)	(-0.10, 0.13)	(-0.03, 0.03)	(-0.03, 0.03)	(-0.10, 0.13)	(-0.03, 0.03)
dLPOD (CP vs CC)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	(-0.03, 0.03)	(-0.12, 0.12)	(-0.03, 0.03)	(-0.03, 0.03)	(-0.12, 0.12)	(-0.03, 0.03)

<sup>a</sup> Results include 95% confidence intervals.<sup>b</sup> Repeatability standard deviation.<sup>c</sup> Among-laboratory standard deviation.<sup>d</sup> Reproducibility standard deviation.<sup>e</sup> *P* value = Homogeneity test of laboratory PODs.

strips. All of the assay steps are performed automatically by the instrument. The reaction medium is cycled in and out of the SPR several times. An aliquot of enrichment broth is dispensed into the reagent strip. The *Listeria* receptors present will bind to the interior of the SPR. Unbound components are eliminated during the washing steps. The proteins conjugated

to the alkaline phosphatase are cycled in and out of the SPR and will bind to any *Listeria* receptors, which are themselves bound to the SPR wall. A final wash step removes unbound conjugate. During the final detection step, the substrate (4-methyl-umbelliferyl phosphate) is cycled in and out of the SPR. The conjugate enzyme catalyzes the hydrolysis of the

**Table 2013.10C. Reagents included in 10-well reagent strip**

Wells	Reagents (LPT)
1	Sample well: 0.5 mL of enrichment broth, standard or control
2	Prewash solution (400 $\mu$ L): TRIS-NaCl (150 mmol/L) - Tween pH 7.6 + preservative
3–5, 7–9	Wash buffer (600 $\mu$ L): TRIS-NaCl (150 mmol/L) - Tween pH 7.6 + preservative
6	Conjugate (400 $\mu$ L): alkaline phosphatase-labeled proteins specific for <i>Listeria</i> receptors + preservative
10	Reading cuvette with substrate (300 $\mu$ L): 4-Methyl-umbelliferyl phosphate (0.6 mmol/L) + diethanolamine <sup>a</sup> (DEA) (0.62 mol/L or 6.6%, pH 9.2) + preservative

<sup>a</sup> Irritant reagent: See VIDAS LPT package insert for more information.

substrate into a fluorescent product (4-methyl-umbelliferone), the fluorescence of which is measured at 450 nm. At the end of the assay, results are automatically analyzed by the instrument, which calculates a test value for each sample. This value is then compared to internal references (thresholds) and each result is interpreted as positive or negative.

## B. Apparatus and Reagents

Items (a)–(h) are available as the VIDAS UP *Listeria* (LPT) assay kit from bioMérieux (595 Anglum Rd, Hazelwood, MO 63042-2330, USA).

(a) *VIDAS or miniVIDAS automated immunoassay system.*

(b) *LPT reagent strips.*—Sixty polypropylene strips of 10 wells, each strip covered with a foil seal and label. The 10 wells contain the reagents shown in Table 2013.10C.

(c) *SPR.*—Sixty SPRs coated with proteins specific for *Listeria* receptors.

(d) *Standard.*—One vial (1  $\times$  6 mL). Ready-to-use. Contains purified and inactivated *Listeria* receptors + preservative + protein stabilizer.

(e) *Positive control solution.*—1  $\times$  6 mL. Contains purified and inactivated *Listeria monocytogenes* antigen + preservative + protein stabilizer.

(f) *Negative control solution.*—1  $\times$  6 mL. Contains Tris-buffered saline (TBS; 150 mmol/L) – Tween pH 7.6 + preservative.

(g) *Master Lot Entry (MLE) card.*—One card providing specifications for the factory master data required to calibrate the test: To read the MLE data, please refer to the Operator's Manual.

(h) *Package insert.*

(i) *Disposable pipet.*—To dispense appropriate volumes.

(j) *VIDAS Heat and Go.*—Available from bioMérieux, Inc.

(k) *Water bath.*—95–100°C, or equivalent.

(l) *Bag with filter.*

(m) *Smasher™ Blender/Homogenizer* available from bioMérieux, Inc., or equivalent.

(n) *LPT broth.*—bioMérieux, Inc.

(o) *Incubators.*—Capable of maintaining 30  $\pm$  1°C and 35  $\pm$  1°C.

(p) *Diagnostic reagents.*—Necessary for culture confirmation of assays.

(q) *ALOA chromogenic agar.*—Necessary for cultural

confirmation as an alternative to selective agar required by appropriate reference method. Available from bioMérieux, Inc.

(r) *Tryptic Soy Agar with yeast additive.*

## C. General Instructions

(a) Components of the kit are intended for use as integral unit. Do not mix reagents or disposables of different lot numbers.

(b) Store VIDAS LPT kits at 2–8°C.

(c) Do not freeze reagents.

(d) Bring reagents to room temperature before inserting them into the VIDAS instrument.

(e) Standard, controls, and heated test portions are mixed well before using.

(f) Include one positive and one negative control with each group of tests.

(g) Return unused components to 2–8°C immediately after use.

(h) See safety precautions in the VIDAS LPT package insert (Warnings and Precautions and Waste Disposal).

(i) See Centers for Disease Control recommendations in handling pathogens. <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/index.htm/>

## D. Preparation of Test Suspension

(a) *Pre-enrichment.*—Pre-enrich test portion using filter Stomacher type bags to initiate growth of *Listeria*. For 25 g test portions, add 225 mL prewarmed (18–25°C) LPT broth to each test portion and homogenize thoroughly for 2 min. For cantaloupe melons, soak entire melon in approximately 1 L prewarmed (18–25°C) LPT broth. For 125 g test portions, add 375 mL prewarmed (18–25°C) LPT broth to each test portion and homogenize thoroughly for 2 min.

(b) *Test portions.*—(1) *25 g test portions/cantaloupe melons rinses.*—After homogenization, incubate for 26–30 h at 30  $\pm$  1°C.

(2) *125 g test portions.*—After homogenization, incubate for 24–30 h at 30  $\pm$  1°C.

From the primary enrichment broth, transfer a 1 mL aliquot into 10 mL prewarmed (18–25°C) LPT broth and incubate for 22–26 h at 30  $\pm$  1°C.

(c) After incubation, homogenize samples manually. Follow appropriate instructions based on heating method.

(1) *Boiling.*—Transfer 2–3 mL of the enrichment broth into a tube. Seal the tube. Heat in a water bath for 5  $\pm$  1 min at 95–100°C. Cool the tube. Mix the boiled broth and transfer 0.5 mL into the sample well of the VIDAS LPT reagent strip. Perform the VIDAS test.

(2) *Heat and Go.*—Transfer 0.5 mL of the enrichment broth into the sample well of the VIDAS LPT reagent strip. Heat for 5  $\pm$  1 min (See VIDAS Heat and Go User's Manual). Remove the strip and allow to cool for 10 min prior to test initiation. Perform the VIDAS test.

**Table 2013.10D. Interpretation of test**

Test value threshold	Interpretation
<0.05	Negative
$\geq$ 0.05	Positive

### E. Enzyme Immunoassay

(a) Enter factory master calibration curve data into the instrument using the MLE card.

(b) Remove the kit reagents and materials from refrigerated storage and let them to come to room temperature for at least 30 min.

(c) Use one VIDAS LPT reagent strip and one VIDAS LPT SPR for each sample, control, or standard to be tested. Reseal the storage pouch after removing the required number of SPRs.

(d) Enter the appropriate assay information to create a work list. Enter the test code by typing or selecting “LPT,” and number of tests to be run. If the standard is to be tested, identify the standard by “S1” and test in duplicate. If the positive control is to be tested, identify it by “C1.” If the negative control is to be tested, identify it by “C2.”

*Note:* The standard must be tested upon receipt of a new lot of reagents and then every 14 days. The relative fluorescence value (RFV) of the standard must fall within the set range provided with the kit.

(e) Load the LPT reagents strips and SPRs into the positions that correspond to the VIDAS section indicated by the work list. Verify that the color labels with the assay code on the SPRs and reagent strips match.

(f) Initiate the assay processing as directed in the VIDAS operator’s manual.

(g) After the assay is completed, remove the SPRs and reagent strips from the instrument and dispose of properly.

### F. Results and Interpretation

The results are analyzed automatically by the VIDAS system. A report is printed which records the type of test performed, the test sample identification, the date and time, the lot number and expiration date of the reagent kit being used, and each sample’s RFV, test value, and interpreted result (positive or negative). Fluorescence is measured twice in the reagent strip’s reading cuvette for each sample tested. The first reading is a background reading of the substrate cuvette before the SPR is introduced into the substrate. The second reading is taken after incubating the substrate with the enzyme remaining on the interior of the SPR. The test value is calculated by the instrument and is equal to the difference between the background reading and the final reading. The calculation appears on the result sheet. A “negative” result has a test value less than the threshold (0.05) and indicates that the sample does not contain *Listeria* spp. or contains *Listeria* spp. at a concentration below the detection limit. A “positive” result has a test value equal to or greater than the threshold ( $\geq 0.05$ ) and indicates that the sample may be contaminated with *Listeria* spp. If the background reading is above a predetermined cutoff, then the result is reported as invalid (Table 2013.10D).

### G. Confirmation

All positive VIDAS LPT results must be culturally confirmed. Confirmation should be performed using the nonheated enrichment broth stored between 2–8°C, and should be initiated within 72 h following the end of incubation (AFNOR Certificate No. BIO 12/33-05/12). Presumptive positive results may be confirmed by isolating on selective agar plates such

as ALOA or on the appropriate reference method selective agar plates. Typical or suspect colonies from each plate are confirmed as described in appropriate reference method. As an alternative to the conventional confirmation for *Listeria*, AOAC 2012.02 VITEK 2 GP Biochemical Identification or API *Listeria* biochemical kits may be used for presumptive generic identification of foodborne *Listeria*.

### Results of Collaborative Study

In this collaborative study, the VIDAS UP *Listeria* (LPT) method was compared to AOAC 993.12 for one food product, queso fresco, at two test portion sizes: 25 and 125 g. A total of 14 laboratories throughout the United States participated in this study, with 14 laboratories submitting data for the 25 g test portions and 13 laboratories submitting data for the 125 g test portions as presented in Table 1. Each laboratory analyzed 36 test portions for each method—12 inoculated with a high level of *Listeria*, 12 inoculated with a low level of *Listeria*, and 12 uninoculated controls. A background screen of the matrix indicated an absence of indigenous *Listeria* species. As per criteria outlined in Appendix J of the AOAC guidelines, fractional positive results were obtained for both the 25 and 125 g test portions sizes. Cultures used to inoculate the matrix were heat stressed, and the results of the inoculum heat stress are presented in Table 2. For each test portion size, the actual level of *Listeria* was determined by MPN determination on the day of initiation of analysis. The individual laboratory and sample results are presented in Tables 3 and 4. Tables 2013.10A and 2013.10B summarize the collaborative study results for all foods tested, including POD statistical analysis (8). Detailed results for each

**Table 1. Participation of each collaborating laboratory<sup>a</sup>**

Lab	Queso fresco	
	25 g test portions	125 g test portions
1	Y	Y
2	Y	Y <sup>b</sup>
3	Y	Y
4	Y	Y
5	Y	Y
6	Y	Y
7	Y	Y
8	Y	Y
9	Y	Y
10	Y	Y
11	Y <sup>c</sup>	Y <sup>c</sup>
12	Y	Y
13	Y	Y
14	Y	Y

<sup>a</sup> Y = Collaborator analyzed the food type.

<sup>b</sup> Results were not submitted to the coordinating laboratory.

<sup>c</sup> Results were not used in statistical analysis due to laboratory error.



**Table 2. Heat-stress injury**

Matrix	Test organism	CFU/OXA (selective agar)	CFU/TSA (nonselective agar)	Degree injury, %
Queso fresco	<i>L. innocua</i>	$5.3 \times 10^8$	$1.3 \times 10^9$	59
LPT – 25 g	ATCC <sup>a</sup> 33091			
Queso fresco	<i>L. monocytogenes</i>	$2.9 \times 10^8$	$9.0 \times 10^8$	68
LPT – 125 g	ATCC 19115			

<sup>a</sup> ATCC = American Type Culture Collection.

laboratory are presented in Tables 2A–D, and Figures 1A–D and 2A–D as supplemental data on *J. AOAC Int.* website.

### Queso Fresco (25 g Test Portions)

Queso fresco test portions, inoculated at a low and high levels, were analyzed for the detection of *Listeria* spp. (Table 3). Uninoculated controls were included in each sample set. Fourteen laboratories participated in the analysis of this matrix, and the results of 13 laboratories were included in the statistical analysis. Laboratory 11 reported data for eight reference method test portions (including seven uninoculated control test portions) that produced doubtful profiles of *L. grayi*. Colonies on these plates were also reported as beta-hemolytic, a characteristic not associated with *L. grayi*. The selective agar plates for these test portions were sent to the coordinating laboratory for further examination. Colonies present on the plates did not possess characteristics typical of *Listeria* spp. Colonies were identified as Gram-positive rods containing spores with morphology typical of *Bacillus* species. Based on the preliminary biochemical tests conducted, the test portions should not have been carried through for final biochemical identification on API *Listeria* strips, which resulted in the misidentification of the test portion as *Listeria* spp. The results for this laboratory were excluded from statistical analysis. The MPNs obtained for this matrix, with 95% confidence intervals, were 0.63 CFU/test portion (0.49, 0.79) for the low-inoculum level and 5.48 CFU/test portion (3.60, 8.36) for the high-inoculum level. For VIDAS LPT test portions, no differences were observed between confirmation of samples using the proprietary chromogenic ALOA and the reference method agar.

For the high-inoculum level, 156 out of 156 test portions were reported as positive by the VIDAS LPT method with all test portions confirming positive. For the low-inoculum level, 80 out of 156 test portions were reported as positive by the VIDAS LPT method with 78 test portions confirming positive, indicating two false-positive results. For the uninoculated controls, 1 out of 156 samples produced a presumptive positive result by the VIDAS LPT method with no samples confirming positive. All three false-positive samples were obtained from the same laboratory. For test portions analyzed by AOAC 993.12, 156 out of 156 high-inoculum test portions and 76 out of 156 low-inoculum test portions confirmed positive. For the uninoculated controls, 0 out of 156 test portions confirmed positive.

For the low-level inoculum, a dLPOD<sub>C</sub> value of 0.01 (–0.10, 0.13) was obtained between AOAC 993.12 and VIDAS

LPT. The confidence intervals obtained for dLPOD<sub>C</sub> indicated no significant difference between the two methods. A dLPOD<sub>CP</sub> of 0.01 (–0.10, 0.13) was obtained between presumptive and confirmed VIDAS LPT results for both confirmation procedures. The confidence intervals obtained for dLPOD<sub>CP</sub> indicated no significant difference between the presumptive and confirmed results.

For the high-level inoculum, a dLPOD<sub>C</sub> value of 0.00 (–0.02, 0.02) was obtained between AOAC 993.12 and VIDAS LPT. The confidence intervals obtained for dLPOD<sub>C</sub> indicated no significant difference between the two methods. A dLPOD<sub>CP</sub> of 0.00 (–0.02, 0.02) was obtained between presumptive and confirmed VIDAS LPT results. The confidence intervals obtained for dLPOD<sub>CP</sub> indicated no significant difference between the presumptive and confirmed results. Results of the POD statistical analysis are presented in Table 2013.10A, Tables 2A–B, and Figures 1A–D, as supplemental data on the *J. AOAC Int.* website.

### Queso Fresco (125 g Test Portions)

Queso fresco test portions were inoculated at a low and high level and analyzed for the detection of *Listeria* spp. (Table 4). Uninoculated controls were included in each sample set. Fourteen laboratories participated in the analysis of this matrix, and the results of 12 laboratories were included in the statistical analysis. Laboratory 2 did not report any data for this matrix. Laboratory 11 reported 10 reference method test portions (including five uninoculated control test portions) that produced non-*L. monocytogenes* profiles, with five of the test portions producing doubtful profiles of *L. grayi*. Colonies on these plates contained one or more of the following biochemical reactions not typically associated with *L. monocytogenes*: Gram-negative, non-beta-hemolytic, and catalase negative. Based on the preliminary biochemical tests conducted, the test portions should not have been carried through for final biochemical identification on API *Listeria* strips which resulted in the misidentification of the test portion as *Listeria* spp. The selective agar plates for these test portions were sent to the coordinating laboratory for further examination. The coordinating laboratory confirmed the supplementary results (Gram stain, hemolysis, and catalase reaction) reported by the participating laboratory and were not able to identify any *Listeria* species. The results from this laboratory were excluded from statistical analysis. The MPN levels obtained for this test portion, with 95% confidence intervals, were 0.59 CFU/test portion (0.46, 0.74) for the low level and 5.41 CFU/test portion (3.53, 8.30) for the high level. For VIDAS LPT test portions, no differences were observed between confirmation of samples using the proprietary chromogenic ALOA and the reference method agar.

For the high level, 144 out of 144 test portions were reported as positive by the VIDAS LPT method with all test portions confirming positive. For the low level, 70 out of 144 test portions were reported as positive by the VIDAS LPT method with all 70 test portions confirming positive. For the uninoculated controls, 0 out of 144 samples produced a presumptive positive result by the VIDAS LPT method and no samples confirming positive. For test portions analyzed by AOAC 993.12, 144 out of 144 high inoculum and 69 out of 144 low inoculum test

**Table 3. Individual collaborator results for queso fresco<sup>a</sup> (25 g test portions)**

VIDAS LPT <sup>b</sup>																																						
Lab	High-level test portions												Low-level test portions												Uninoculated test portions													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11 <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- <sup>d</sup>	-	-	-
AOAC 993.12																																						
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11 <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

<sup>a</sup> + = *Listeria* spp. were detected in samples; - = *Listeria* spp. were not detected in sample.<sup>b</sup> Confirmed results from OXA and ALOA were identical for each test portion.<sup>c</sup> Results were not used in statistical analysis.<sup>d</sup> Sample was presumptive positive on VIDAS LPT but confirmed negative indicating a false-positive result.<sup>e</sup> Result reported as *L. grayi* (doubtful API Profile).

portions confirmed positive. For the uninoculated controls, 0 out of 144 test portions confirmed positive.

For the low-level inoculum, dLPOD<sub>C</sub> values of 0.01 (-0.10, 0.13) were obtained between AOAC 993.12 and VIDAS LPT. The confidence intervals obtained for dLPOD<sub>C</sub> indicated no significant difference between the two methods. dLPOD<sub>CP</sub> values of 0.00 (-0.12, 0.12) were obtained between presumptive and confirmed VIDAS LPT results. The confidence intervals obtained for dLPOD<sub>CP</sub> indicated no significant difference between the presumptive and confirmed results using either confirmation process.

For the high-level inoculum, dLPOD<sub>C</sub> values of 0.00 (-0.03, 0.03) were obtained between AOAC 993.12 and VIDAS

LPT. The confidence intervals obtained for dLPOD<sub>C</sub> indicated no significant difference between the two methods. dLPOD<sub>CP</sub> values of 0.00 (-0.03, 0.03) were obtained between presumptive and confirmed VIDAS LPT results. The confidence intervals obtained for dLPOD<sub>CP</sub> indicated no significant difference between the presumptive and confirmed results. Detailed results of the POD statistical analysis are presented in Table 2013.10B, as supplemental data on the *J. AOAC Int.* website, Tables 2C-D, and Figures 2A-D.

#### ALOA Chromogenic Agar

Confirmatory results obtained from the ALOA chromogenic

**Table 4. Individual collaborator results for queso fresco<sup>a</sup> (125 g test portions)**

VIDAS LPT <sup>b</sup>																																						
Lab	High-level test portions												Low-level test portions												Uninoculated test portions													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
2 <sup>c</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
11 <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
AOAC 993.12																																						
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
2 <sup>c</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
11 <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ <sup>d</sup>	+	+ <sup>e</sup>	+	+	+ <sup>f</sup>	+ <sup>f</sup>	−	−	+ <sup>f</sup>	+	+	−	−	−	−	+ <sup>f</sup>	+ <sup>e</sup>	−	−	−	−	+ <sup>g</sup>	+ <sup>g</sup>	+ <sup>f</sup>	
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

<sup>a</sup> + = *Listeria* spp. were detected in samples; - = *Listeria* spp. were not detected in sample; NA laboratory did not participate in this matrix or results were not received.

<sup>b</sup> Confirmed results from OXA and ALOA were identical for each test portion.

<sup>c</sup> Results not used in statistical analysis.

<sup>d</sup> Result reported as *L. welshimeri*.

<sup>e</sup> Result reported as *L. innocua*.

<sup>f</sup> Result reported as *L. grayi*.

<sup>g</sup> Result reported as *L. ivanovii*.

agar were identical to the results obtained from the OXA agar specified by AOAC 993.12. Out of a total of 451 positives detected by the VIDAS LPT, 448 were confirmed positive using OXA or ALOA selective agars.

## Discussion

No negative feedback was reported to the study directors from the collaborating laboratories in regards to the performance of

the VIDAS LPT assay or the ALOA chromogenic agar. Many laboratories indicated difficulty in identifying and isolating colonies from samples when using OXA plates, but not from test portions analyzed by the VIDAS LPT method. These results may be due to the higher selectivity of the ALOA agar to isolate and differentiate typical *Listeria* colonies from competing microflora, such as *Bacillus* colonies. The high selectivity of the proprietary LPT broth, the high background flora, and the low selectivity of the OXA agar most likely contributed to this observation, as well.

For the analysis of 25 g test portions by the VIDAS LPT method, three false positives were obtained. The test results produced by three false-positive test portions (average test value of 0.34) were much lower than the test values observed with true positives (average value >2.00). By the time the coordinating laboratory received the results, the primary enrichments for these samples had been discarded so no subsequent analysis on the VIDAS LPT was possible. However, the agar plates for these test portions were shipped to the coordinating laboratory for further analysis. Up to 20 different colonies were picked for morphological and biochemical analysis using VITEK 2 GP and no *Listeria* colonies were identified. Additionally, the entire lawn of growth from each agar plate was swabbed and enriched in separate LPT broth tubes and incubated for 26–30 h at  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . An aliquot from each tube was analyzed by the VIDAS LPT assay and negative results for *Listeria* spp. were obtained. Results of this investigation lead the study directors to believe that the false positives were the result of contamination during the analysis of the samples.

For the analysis of both the 25 and 125 g test portions, Laboratory 11 detected the presence of multiple species of *Listeria*. An investigation into the results indicated that colonies picked for confirmation did not meet the characteristics of *Listeria* spp. (i.e., colonies produced Gram-negative stain reactions, non-motile, negative catalase, or produced hemolysis reactions not typically observed with *Listeria* spp.). The results of these tests should have precluded analysis using the API strips, which lead to an inaccurate identification. Due to the fact that final results reported were inconsistent with biochemical results, data produced by Laboratory 11 were removed from the statistical analysis of both the 25 and 125 g test portions.

Typical growth of *Listeria* spp. colonies from ALOA was easy to identify and the ALOA plates produced less background ground from the matrix than the OXA plates for both test portions sizes analyzed. Positive comments were received from collaborators about the ease of use associated with the ALOA plates.

Using the POD statistical model, no significant difference in the number of positive results obtained between the two methods being compared was observed at both the low- and high-inoculum levels for both the 25 and 125 g test portions. No significant difference was observed between presumptive and confirmed results for the candidate method.

## Conclusions

The VIDAS UP *Listeria* (LPT) method with the optional ALOA agar confirmation method was adopted as Official First Action status for the detection of *Listeria* in a variety of foods and environmental surfaces including deli ham (25 and 125 g), pepperoni (25 g), beef hot dogs (25 g), chicken nuggets (25 g), chicken liver pâté (25 g), ground beef (125 g), deli turkey (125 g), cooked shrimp (25 g), smoked salmon (25 g), whole cantaloupe melon, bagged mixed salad (25 g), peanut butter (25 g), black pepper (25 g), vanilla ice cream (25 g), queso fresco (25 and 125 g), stainless steel, plastic, ceramic, and concrete environmental surfaces.

## Acknowledgments

We would like to extend a sincere thank you to the following collaborators for their dedicated participation in this study:

John Mills and Pat Rule, bioMérieux Industry (Hazelwood, MO)

Ben Howard, Neil Rogman, and Jacob Cannon, Certified Laboratories (Bollingbrook, IL)

Barbara Paul, Marianna Sala-Rhatigan, and Susan Joseph, U.S. Food and Drug Administration, Northeast Regional Laboratory (Jamaica, NY)

Nikki Palen, Amber Stegmann, and Bryan Perry, EMS Laboratories (St. Louis, MO)

Rachel Hiles and Tenesha Stubblefield, Silliker Laboratories (Omaha, NE)

Nigel Nagassar, Sylvanus Owusu, and Jacqueline Zimmerman, Silliker Laboratories (Minnetonka, MN)

Jerry Lynn Pickett, Aaron Bollenbacher, Keith Wiggins, and Lori Cesanas, Tyson WBA Analytical (Springdale, AR)

Bharath Brahmanda, Food Safety Net Services (San Antonio, TX)

Andrew Capps, Grisel Rosario, Dawn Davis, Lindsey Parker, Christine Said, and Jianfeng Li, North Carolina Department of Agriculture and CS: Food and Drug Protection Division (Raleigh, NC)

Keith Klemms, Bill May, Becky Hand, and Rose Burkhardt, Sherry Laboratories (Warsaw, IN)

Hesham Elgaali, Indiana State Department of Health, Food and Dairy Microbiology Division (Indianapolis, IN)

Jennifer Jolly, Covance Laboratories (Battle Creek, MI)

Sandy Moore, Dustin Ebbing, Maggie Michels, Amanda Kehres, and Joe Hirsch, John Morrell (Springdale, OH)

## References

- (1) Hitchins, A.D., & Jinneman, K. (2013) *Bacteriological Analytical Manual*, U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC, Chapter 10. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>.
- (2) Chen, Y. (2012) in *Bad Bug Book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*, *Listeria monocytogenes* species, 2nd Ed., U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC
- (3) Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/listeria/> (accessed May 2013)
- (4) FoodSafety.Gov, <http://www.foodsafety.gov/poisoning/causes/bacteriaviruses/listeria/> (accessed May 2013)
- (5) *Official Methods of Analysis* (2012) 19th Ed., Appendix J: *AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces* AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, [http://www.eoma.aoac.org/app\\_j.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_j.pdf) (accessed March 2013)
- (6) Twedt, R.M., Hitchins, A.D., & Prentice, G.A. (1994) *J. AOAC Int.* 77, 395–402
- (7) Least Cost Formulations, Ltd, MPN Calculator - Version 1.6, <http://www.lcfltd.com/customer/LCFMPNCalculator.exe> (accessed May 2013)
- (8) Least Cost Formulations, Ltd, AOAC Binary Data Interlaboratory Workbook, <http://lcfltd.com/aoac/aoac-binary-v2-2.xls> (accessed May 2013)
- (9) Wehling, P., LaBudde, R., Brunelle, S., & Nelson, M. (2011) *J. AOAC Int.* 94, 335–347

# 金黄色葡萄球菌肠毒素 ELISA 酶联免疫检测试剂盒 验证报告

委托单位：山东美正生物科技有限公司

委托日期：2023 年 8 月 25 日

验证单位：北京市科学技术研究院分析测试研究所  
(北京市理化分析测试中心)

验证日期：2023 年 8 月 28 日

# 金黄色葡萄球菌肠毒素 ELISA 酶联免疫检测试剂盒

## 验证报告

### 一、实验目的

受山东美正生物科技有限公司的委托，由北京市科学技术研究院分析测试研究所（北京市理化分析测试中心）对其“金黄色葡萄球菌肠毒素 ELISA 检测试剂盒”检测乳及乳制品中金黄色葡萄球菌肠毒素含量的效果进行验证。验证内容包括：准确度、精密度。

### 二、实验方法

按照产品所附《金黄色葡萄球菌肠毒素 ELISA 检测试剂盒说明书》操作。

#### 2.1 主要仪器

微孔板酶标仪（波长 450nm/630nm）、天平（0.01g）、离心机、振荡器、涡旋仪等。

#### 2.2 试剂及材料

金黄色葡萄球菌肠毒素 ELISA 检测试剂盒：山东美正生物科技有限公司。检测试剂盒说明书中金黄色葡萄球菌肠毒素的检测限为 0.5μg/kg。

试剂：去离子水。

材料：移液器或移液管、离心管、三角瓶。

#### 2.3 实验样本（委托方提供）

生鲜奶样本。

成品奶样本。

#### 2.4 样品的处理

按照山东美正生物科技有限公司提供的金黄色葡萄球菌肠毒素 ELISA 检测试剂盒的说明书进行样品前处理。

#### 2.5 试剂盒准确度、精密度实验

准备三个批次产品，任选一个批次进行准确度验证实验，三个批次进行精密度实验。

①准确度验证实验：任选一批次产品分别按照 0 倍、1 倍和 2 倍检出限添加标准品，不同浓度进行 3 个平行实验。

②精密度验证实验：每批次产品分别检测 2 倍检出限的样本，进行 6 个平行实验。

### 三、验证结果

经过验证得到的结果如表 1，表 2 所示。

表 1 生鲜奶样本准确度和精密度

验证实验			添加标品浓度	结果	平行实验次数
准确度实验	批号 20230815Y	0 倍	0μg/kg	-	N=3
		1 倍	0.5μg/kg	+	N=3
		2 倍	1μg/kg	+	N=3
精密度实验	批号 20230815Y	2 倍	1μg/kg	+	N=6
	批号 20230818Y	2 倍	1μg/kg	+	N=6
	批号 20230822Y	2 倍	1μg/kg	+	N=6
备注：结果阴性用“-”表示，结果阳性用“+”表示。					

表 2 成品奶样本准确度和精密度

验证实验			添加标品浓度	结果	平行实验次数
准确度实验	批号 20230815Y	0 倍	0μg/kg	-	N=3
		1 倍	0.5μg/kg	+	N=3
		2 倍	1μg/kg	+	N=3
精密度实验	批号 20230815Y	2 倍	1μg/kg	+	N=6
	批号 20230818Y	2 倍	1μg/kg	+	N=6
	批号 20230822Y	2 倍	1μg/kg	+	N=6
备注：结果阴性用“-”表示，结果阳性用“+”表示。					



#### 四、结论

经验证,使用山东美正生物科技有限公司金黄色葡萄球菌肠毒素 ELISA 检测试剂盒检测乳及乳制品中金黄色葡萄球菌肠毒素,准确度实验 3 平行样品无假阴性和假阳性情况,精密度实验 6 平行样品偏差为 0。此结果表明,产品“金黄色葡萄球菌肠毒素 ELISA 检测试剂盒”满足乳及乳制品中对金黄色葡萄球菌肠毒素检测的要求。

北京市科学技术研究院分析测试研究所  
(北京市理化分析测试中心)

2023 年 8 月 28 日





# 牛乳铁蛋白 ELISA 检测试剂盒 验证报告

委托单位：山东美正生物科技有限公司

委托日期：2023 年 11 月 8 日

验证单位：北京市科学技术研究院分析测试研究所  
(北京市理化分析测试中心)

验证日期：2023 年 11 月 9 日

# 牛乳铁蛋白 ELISA 检测试剂盒性能评价报告

## 一、实验目的

受山东美正生物科技有限公司的委托,由北京市科学技术研究院分析测试研究所(北京市理化分析测试中心)对其“牛乳铁蛋白 ELISA 检测试剂盒”检测乳及乳制品中乳铁蛋白含量的性能进行评价。评价内容包括:准确度、精密度、符合率。

## 二、实验方法

按照产品所附《牛乳铁蛋白 ELISA 检测试剂盒说明书》操作。

### 2.1 主要仪器

微孔板酶标仪(波长 450nm/630nm)、天平(0.01g)、离心机、振荡器、涡旋仪等。

### 2.2 试剂及材料

牛乳铁蛋白 ELISA 检测试剂盒:山东美正生物科技有限公司。

试剂:去离子水。

材料:移液器或移液管、离心管、三角瓶。

### 2.3 实验样本

①生鲜乳 1#、奶粉 1#

②生鲜乳 2#、奶粉 2#:经《T/TDSTIA 006-2019 奶及奶制品中乳铁蛋白的测定 液相色谱法》检测,浓度分别为 29.73mg/kg、169.65mg/kg。

### 2.4 样品的处理

按照山东美正生物科技有限公司提供的牛乳铁蛋白 ELISA 检测试剂盒的说明书进行样品前处理。

### 2.5 试剂盒准确度、精密度实验

准备三个批次产品,任选一个批次进行准确度验证实验,三个批次进行精密度实验,三个批次进行符合率实验。

①样本本底值测定:按照产品所附《牛乳铁蛋白 ELISA 检测试剂盒说明书》,对实验样本(生鲜乳 1#、奶粉 1#)进行 3 平行实验,平均值即为样本本底值。

②准确度验证实验:分别向生鲜乳 1#、奶粉 1#样本中添加 3 个不同浓度的



乳铁蛋白标准溶液，任选一批次产品检测加标浓度，各添加浓度进行 3 个平行实验。

③精密度验证实验：向生鲜乳 1#、奶粉 1#样本中添加 1 个浓度的乳铁蛋白标准溶液，每批次产品分别检测加标浓度，每批次产品进行 6 个平行实验。

根据向生鲜乳 1#、奶粉 1#样本中添加浓度的实际测定结果扣除本底值后计算添加回收率和批内、批间变异系数，从而判定试剂盒的准确度和精密度。

④符合率实验：每批次产品分别对生鲜乳 2#、奶粉 2#样本进行 2 平行检测，计算符合率。

符合率公式：符合率（%）=  $\frac{\text{试剂盒检测结果（mg/kg）}}{\text{国标方法测试浓度（mg/kg）}} \times 100\%$

三、验证结果

3.1 实验样本本底值测定

按照产品所附《牛乳铁蛋白 ELISA 检测试剂盒说明书》，对实验样本进行测定，本底值数据见表 1、表 2。

表 1 生鲜乳 1#、奶粉 1#样本本底值

批号	样本	数据 1(mg/kg)	数据 2(mg/kg)	数据 3(mg/kg)	本底值(mg/kg)
20231027	生鲜乳 1#	未检出	未检出	未检出	未检出
20230930		未检出	未检出	未检出	未检出
20231019		未检出	未检出	未检出	未检出
20231027	奶粉 1#	153.31	155.43	151.21	153.32
20230930		149.64	150.69	153.27	151.20
20231019		151.23	148.96	13.24	104.48

3.2 准确度、精密度、符合率测定

生鲜乳 1#样本准确度、精密度、符合率数据见表 2~表 7。

表 2 生鲜乳 1#样本准确度测定结果

批号	添加浓度（mg/kg）	实测浓度（mg/kg）	回收率（%）	平均回收率（n=3,%）
20231027	40.00	41.79	104.48	102.9
		38.95	97.38	
		42.78	106.95	



批号	添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (n=3,%)
	100.00	94.52	94.52	94.7
		96.23	96.23	
		93.26	93.26	
	200.00	181.34	90.7	89.0
		175.43	87.7	
		177.12	88.6	

表 3 奶粉 1#样本准确度测定结果

批号	添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (n=3,%)
20231027	80.00	229.69	95.47	97.6
		237.31	104.99	
		227.23	92.39	
	160.00	309.78	97.79	100.4
		311.11	98.62	
		321.01	104.81	
	320.00	481.12	102.44	100.1
		468.91	98.62	
		471.1	99.31	

表 4 生鲜乳 1#样本精密度测定结果

批号	添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	批内变异系数 (%)	批间变异系数 (%)
20231027	40.00	43.21	3.4	4.2
		41.68		
		39.65		
		38.98		
		40.12		
		41.23		

批号	添加浓度(mg/kg)	实测浓度(mg/kg)	批内变异系数(%)	批间变异系数(%)
20230930	40.00	41.98	4.3	
		43.12		
		39.56		
		37.85		
		41.11		
		42.09		
20231019	40.00	43.19	4.6	
		42.77		
		43.1		
		40.66		
		39.75		
		38.14		

表 5 奶粉 1#样本精密度测定结果

批号	添加浓度(mg/kg)	实测浓度(mg/kg)	批内变异系数(%)	批间变异系数(%)
20231027	160.00	241.11	2.4	2.2
		239.13		
		227.94		
		229.37		
		230.14		
		241.01		
20230930	160.00	238.45	1.8	
		239.44		
		237.63		
		240.21		
		227.82		
		239.01		



批号	添加浓度(mg/kg)	实测浓度(mg/kg)	批内变异系数(%)	批间变异系数(%)
20231019	160.00	229.34	2.0	
		231.01		
		235.12		
		241.64		
		227.69		
		230.54		

表 6 生鲜乳 2#样本符合率测定结果

批号	国标方法测试浓度(mg/kg)	试剂盒检测结果平均值(mg/kg) (n=2)	符合率(%)
20231027	29.73	30.77	103.5
20230930		27.69	93.1
20231019		28.13	94.6

表 7 奶粉 2#样本符合率测定结果

批号	国标方法测试浓度(mg/kg)	试剂盒检测结果平均值(mg/kg) (n=2)	符合率(%)
20231027	169.65	158.13	93.2
20230930		163.12	96.2
20231019		171.04	100.8

#### 四、结论

经验证,使用山东美正生物科技有限公司牛乳铁蛋白 ELISA 检测试剂盒检测乳及乳制品中乳铁蛋白含量,生鲜乳样本加标浓度为 40 mg/kg 时,平均回收率为 102.9%,加标浓度为 100 mg/kg 时,平均回收率为 94.7%,加标浓度为 200 mg/kg 时,平均回收率为 89.0%。奶粉样本加标浓度为 80 mg/kg 时,平均回收率为 97.6%,加标浓度为 160 mg/kg 时,平均回收率为 100.4%,加标浓度为 320 mg/kg 时,平均回收率为 100.1%

不同批次试剂盒测试生鲜乳的批内精密度(变异系数)范围为 3.4%-4.6%,批间精密度(变异系数)为 4.2%。测试奶粉的批内精密度(变异系数)范围为 1.8%-2.4%,批间精密度(变异系数)为 2.2%。

不同批次试剂盒测试生鲜乳与国标方法的符合率分别为 103.5%、93.1%、94.6%。测试奶粉与国标方法的符合率分别为 93.2%、96.2%、100.8%。

此结果表明产品“牛乳铁蛋白 ELISA 检测试剂盒”满足生鲜乳中对乳铁蛋白检测的要求。

北京市科学技术研究院分析测试研究所  
(北京市理化分析测试中心)

2023 年 11 月 9 日



# 莱克多巴胺快速检测试剂盒风险评估(复核) 报告

委托单位：江苏美正生物科技有限公司

试验单位：农业部饲料质量及畜产品质量安全监督检验测试  
中心（沈阳）

试验负责人：张秀芹

试验人员：郭国贤

试验日期：2016年7月29日至2016年8月1日



# 莱克多巴胺快速检测试剂盒风险评估（复核）报告

农业部饲料质量及畜产品质量安全监督检验测试中心（沈阳）对江苏美正生物科技有限公司研制的莱克多巴胺快速检测试剂盒进行现场抽样，并于 2016 年 7 月 29 日至 2016 年 8 月 1 日，对抽检样品进行风险评估（复核）试验。试验内容包括：试剂盒的  $IC_{50}$ 、检测限、准确度、精密度、假阴性率、假阳性率和仪器比对试验。本报告只对评估（复核）批次产品负责，本报告不得用于商业宣传。

## 1 材料与仪器

1.1 材料：莱克多巴胺对照品（Dr.Ehrenstorfer GmbH）、莱克多巴胺酶联免疫检测试剂盒（江苏美正生物科技有限公司提供，批号：J060301A、J061401A、J071301A）。

1.2 仪器：酶标仪、涡旋仪、离心机、微量移液器等。

## 2.实验方法

### 2.1 对照品储备液及工作液

1mg/mL 莱克多巴胺储备液：准确称取莱克多巴胺对照品 0.050g，置于 50mL 棕色容量瓶，甲醇定容至刻度。

10 $\mu$ g/mL 莱克多巴胺工作液：取 1mg/mL 莱克多巴胺储备液 100 $\mu$ L 于 10mL 棕色容量瓶中，水定容至刻度。

100 $\mu$ g/L 莱克多巴胺工作液：取 10 $\mu$ g/mL 莱克多巴胺储备液 100 $\mu$ L 于 10mL 棕色容量瓶中，水定容至刻度。

### 2.2 样品制备

#### 2.2.1 阴性样品的制备

经 LC-MS/MS 法（农业部 1025 号公告-18-2008、农业部 1063 号公告-6-2008、农业部 1063 号公告-3-2008）检测克仑特罗为阴性的猪尿液、饲料和动物组织等。

#### 2.2.2 莱克多巴胺阳性添加样品的制备

0.5 $\mu$ g/L 阳性添加样品：取 100 $\mu$ g/L 莱克多巴胺工作液 50 $\mu$ L 于 9.9mL 阴性猪尿中，涡旋混匀。

2.0 $\mu$ g/L 阳性添加样品：取 100 $\mu$ g/L 莱克多巴胺工作液 200 $\mu$ L 于 9.8mL 阴性猪尿中，涡旋混匀。

1 $\mu$ g/kg 阳性添加样品：取 100 $\mu$ g/L 莱克多巴胺工作液 20 $\mu$ L 于 2g 阴性动物组织中，按说明书提取过程制作样品。

1000μg/kg 阳性添加样品：取 10μg/mL 莱克多巴胺工作液 200μL 于 2g 阴性饲料中，按说明书提取过程制作样品。

2.3 50%抑制浓度（IC<sub>50</sub>）

50%抑制浓度（IC<sub>50</sub>）指标准曲线上吸光度与零浓度标准溶液吸光度比值为 50%处所对应的药物浓度。根据实验要求，测定 5 次标准曲线，用相应软件计算出每条标准曲线的 IC<sub>50</sub> 即得到 5 次 IC<sub>50</sub>，计算平均值和波动范围。结果见表 1。

表 1 试剂盒 IC<sub>50</sub> 计算结果

						μg/L	
次数	1	2	3	4	5	平均值	波动范围
IC <sub>50</sub>	0.251	0.252	0.249	0.251	0.249	0.250	0.249~0.252

2.4 检测限

根据相关要求，分别测定了 20 个空白猪尿样品，根据标准曲线求出测定值，计算出其平均值，再加上 3 倍标准差，即为检测限。结果见表

表 2 试剂盒空白猪尿测定结果统计表

											μg/L		
样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	标准差	检测限
测定值	0.00	0.00	0.00	0.02	0.005	0.001	0.00	0.00	0.00	0.00			
样品号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	0	0.001	0.003
测定值	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			

2.5 准确度和精密度

在 ELISA 测定中，准确度常以回收率表示，精密度常以变异系数表示。在空白猪尿中，将莱克多巴胺添加浓度为 0.5 μg/L、2.0 μg/L，每个浓度各 6 个平行，测定 3 批。计算平均值、添加回收率及批内与批间变异系数，结果见表 3。

表 3 试剂盒准确度和精密度测定结果

添加浓度 ( μ g/L)	/	1	2	3	4	5	6	回收率平 均值%	标准差	批内 CV%	批 间 CV%
0.5	实测值	0.336	0.319	0.371	0.405	0.335	0.348	70.47	6.21	8.81	6.80
	回收率%	67.2	63.8	74.2	81.0	67.0	69.6				
	实测值	0.338	0.338	0.358	0.328	0.336	0.374	69.07	3.44	5.00	
	回收率%	67.6	67.6	71.6	65.6	67.2	74.8				
	实测值	0.366	0.356	0.325	0.338	0.334	0.305	67.47	4.36	6.47	
	回收率%	73.2	71.2	65.0	67.6	66.8	61.0				
2.0	实测值	1.62	1.63	1.60	1.68	1.70	1.64	82.25	1.89	2.30	3.69
	回收率%	81.0	81.5	80.0	84.0	85.0	82.0				
	实测值	1.52	1.53	1.52	1.52	1.54	1.55	76.50	0.63	0.83	
	回收率%	76.0	76.5	76.0	76.0	77.0	77.5				



	实测值	1.52	1.56	1.62	1.64	1.62	1.62	79.83	2.31	2.90	
	回收率%	76.0	78.0	81.0	82.0	81.0	81.0				

从表 3 可知，测定三批试剂盒，每批试剂盒测定结果取均值计算显示，莱克多巴胺在空白猪尿中各添加浓度的平均回收率在 67.47%~82.25%之间；批内变异系数在 0.83%~8.81%之间，批间变异系数分别为 6.80%和 3.69%。

### 2.6 假阳性率

用莱克多巴胺酶联免疫检测试剂盒对 50 份经 LC-MS/MS 确证为阴性的猪尿、动物组织及饲料等样品进行检测，计算假阳性率，检测结果表明，其假阳性率为 0。具体实验数据见表 4。

表 4 莱克多巴胺试剂盒假阳性率实验数据

样 品	试剂盒检测结果	样 品	试剂盒检测结果	样 品	试剂盒检测结果
阴尿 1	阴性	阴尿 18	阴性	阴动物组织 15	阴性
阴尿 2	阴性	阴尿 19	阴性	阴动物组织 16	阴性
阴尿 3	阴性	阴尿 20	阴性	阴动物组织 17	阴性
阴尿 4	阴性	阴动物组织 1	阴性	阴动物组织 8	阴性
阴尿 5	阴性	阴动物组织 2	阴性	阴动物组织 19	阴性
阴尿 6	阴性	阴动物组织 3	阴性	阴动物组织 20	阴性
阴尿 7	阴性	阴动物组织 4	阴性	阴饲料 1	阴性
阴尿 8	阴性	阴动物组织 5	阴性	阴饲料 2	阴性
阴尿 9	阴性	阴动物组织 6	阴性	阴饲料 3	阴性
阴尿 10	阴性	阴动物组织 7	阴性	阴饲料 4	阴性
阴尿 11	阴性	阴动物组织 8	阴性	阴饲料 5	阴性
阴尿 12	阴性	阴动物组织 9	阴性	阴饲料 6	阴性
阴尿 13	阴性	阴动物组织 10	阴性	阴饲料 7	阴性
阴尿 14	阴性	阴动物组织 11	阴性	阴饲料 8	阴性
阴尿 15	阴性	阴动物组织 12	阴性	阴饲料 9	阴性
阴尿 16	阴性	阴动物组织 13	阴性	阴饲料 10	阴性
阴尿 17	阴性	阴动物组织 14	阴性	/	/

### 2.7 假阴性率

用莱克多巴胺酶联免疫检测试剂盒对 50 份莱克多巴胺添加猪尿、动物组织及饲料等样品进行检测，计算假阴性率。尿液样品添加浓度为 0.5ug/L,组织样品添加浓度为 1.0 ug/kg，饲料样品添加浓度为 1000 ug/kg。检测结果表明，其假阴性率为 0。实验数据见表 5。

表 5 莱克多巴胺试剂盒假阴性率实验数据 (单位:  $\mu\text{g/L}$  或  $\mu\text{g/kg}$ )

样 品	试剂盒检测结果	样 品	试剂盒检测结果	样 品	试剂盒检测结果
阳尿 1	0.365	阳尿 18	0.325	阳动物组织 15	0.899
阳尿 2	0.386	阳尿 19	0.413	阳动物组织 16	0.856
阳尿 3	0.336	阳尿 20	0.441	阳动物组织 17	0.873
阳尿 4	0.352	阳动物组织 1	0.674	阳动物组织 18	0.911
阳尿 5	0.339	阳动物组织 2	0.500	阳动物组织 19	0.888
阳尿 6	0.345	阳动物组织 3	0.504	阳动物组织 20	0.925
阳尿 7	0.391	阳动物组织 4	0.653	阳饲料 1	689
阳尿 8	0.395	阳动物组织 5	0.597	阳饲料 2	683
阳尿 9	0.356	阳动物组织 6	0.591	阳饲料 3	605
阳尿 10	0.334	阳动物组织 7	0.502	阳饲料 4	705
阳尿 11	0.352	阳动物组织 8	0.513	阳饲料 5	690
阳尿 12	0.396	阳动物组织 9	0.625	阳饲料 6	715
阳尿 13	0.356	阳动物组织 10	0.625	阳饲料 7	711
阳尿 14	0.346	阳动物组织 11	0.895	阳饲料 8	802
阳尿 15	0.366	阳动物组织 12	0.921	阳饲料 9	705
阳尿 16	0.346	阳动物组织 13	0.960	阳饲料 10	711
阳尿 17	0.345	阳动物组织 14	0.891	/	

2.8 试剂盒与仪器检测方法比较

取猪尿实际样本 5 份, 使用本试剂盒与仪器检测方法进行检测。仪器方法参照: 农业部 1063 号公告-3-2008, 检测结果表明, 试剂盒法定性和仪器法结果一致。实验数据见表 6。

表 6 试剂盒与仪器方法检测数据比较

	ELISA ( $\mu\text{g/L}$ )	LC / MS / MS ( $\mu\text{g/L}$ )
样品 1	0	未检出
样品 2	0	未检出
样品 3	0.123	未检出
样品 4	0.100	未检出
样品 5	1.25	3.51

3 结论

评估 (复核) 结果表明:

3.1 试剂盒提供的 6 个标准溶液浓度为 0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1  $\mu\text{g/L}$ ， $\text{IC}_{50}$  的平均值为 0.250 $\mu\text{g/L}$ ，其变化范围为 0.249 $\mu\text{g/L}$ ~0.252 $\mu\text{g/L}$ 。

3.2 所检批次试剂盒猪尿中莱克多巴胺检测限 0.003 $\mu\text{g/L}$ 。

3.3 对于猪尿样品，所检批次试剂盒在 0.5  $\mu\text{g/L}$  和 2.0 $\mu\text{g/L}$  莱克多巴胺添加浓度处的准确度范围为 67.47%~82.25%，批内变异系数 0.83%~8.81%之间，批间变异系数分别为 6.80%和 3.69%。

3.4 所检试剂盒假阴性率和假阳性率均为 0。

3.5 所检试剂盒对实际样品的定性结果与仪器方法测定结果一致。

试验结果表明，江苏美正生物科技有限公司生产的莱克多巴胺试剂盒可用于尿液、动物组织及饲料等产品中莱克多巴胺的快速筛查。本结果仅对所检测批次产品负责。本报告不得用于商业宣传。

试验人员：郭国贤

审核人：张永青

农业部饲料质量及畜产品质量安全监督检验测试中心（沈阳）

二零一六年八月三日



# 国家饲料质量监督检验中心（北京）

国检（京饲）（验）[2018]075号

## 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 酶联免疫检测试剂盒 验证实验报告

### 一、内容概要

国家饲料质量监督检验中心（北京）（以下简称“中心”）于 2018 年 10 月对青岛普瑞邦生物工程有限公司（以下简称：青岛普瑞邦）提供的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>（以下简称：AFB<sub>1</sub>）酶联免疫检测试剂盒进行了实验验证，主要实验内容包括：对青岛普瑞邦的 AFB<sub>1</sub> 试剂盒检测方法灵敏度、准确度、精密度、与仪器方法检测结果吻合程度的验证。

### 二、试验材料

AFB<sub>1</sub> 标准品：由“中心”自行购自 Sigma 公司。

饲料基体标准物质：由“中心”自行购自 ERM。

AFB<sub>1</sub> 酶联免疫检测试剂盒（批号 1L00F01、1L00I12、1L00G19）、配合饲料、玉米、花生粕、小麦样本：由青岛普瑞邦提供。

### 三、技术原理

本试剂盒采用竞争 ELISA 方法，在酶标板微孔内，样品中的 AFB<sub>1</sub> 和酶标物竞争结合抗 AFB<sub>1</sub> 抗体，酶标物催化 TMB 底物显色，样品孔的吸光值与其含有的 AFB<sub>1</sub> 成负相关，与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样品中 AFB<sub>1</sub> 的含量。

## 四、 试验方法

### 1. 检测方法

#### 1.1 ELISA 法:

按照青岛普瑞邦提供的 AFB<sub>1</sub> 酶联免疫试剂盒检测方法的操作说明进行。

#### 1.2 仪器确证分析方法:

参考《饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的测定 液相色谱-串联质谱法》(NY/T 2071-2011)。

### 2. 试样的制备

#### 2.1 添加试样的制备:

选取低于检出限的玉米样品 ( $\text{AFB}_1 < 0.1 \mu\text{g/kg}$ )，添加 AFB<sub>1</sub> 标准溶液，添加水平分别为： $5 \mu\text{g/kg}$ 、 $10 \mu\text{g/kg}$  和  $20 \mu\text{g/kg}$ ；再按照说明书所提供的样品处理方法处理样品，每个添加水平的样品各制备 6 个平行样。

#### 2.2 样本前处理:

称取 5.0 g 样品，置于 50 mL 离心管中，加入 25 mL 样品提取液，高速震荡提取 5 min，4000 r/min 离心 5 min，取上清液待测。

## 五、 验证实验内容和结果

### 1. 准确度和精密度

对玉米样本选择 3 个添加浓度，分别对青岛普瑞邦提供的 3 批试剂盒开展添加回收试验，各添加浓度做 6 个平行，根据各添加浓度的实际测定结果扣除本底值后计算添加回收率和批内、批间变异系数，从而判定试剂盒准确度和精密度。测定结果见表 1:



表 1 准确度和精密度测定结果

批次号	添加浓度( $\mu\text{g/kg}$ )	5	10	20
1L00F01	实测浓度( $\mu\text{g/kg}$ )	3.52	9.95	18.74
		3.83	9.95	19.49
		4.68	10.42	13.42
		3.88	9.90	15.49
		4.03	11.20	14.49
		3.88	10.40	14.13
	回收率 (%)	79.4	103	79.8
	变异系数 (%)	9.75	4.83	15.9
1L00I12	实测浓度( $\mu\text{g/kg}$ )	3.98	7.18	17.35
		3.85	8.25	20.60
		3.64	9.11	21.18
		4.88	6.78	19.78
		4.99	7.91	20.71
		3.78	7.08	22.95
	回收率 (%)	83.7	77.2	102
	变异系数 (%)	14.1	11.4	9.01
1L00G19	实测浓度( $\mu\text{g/kg}$ )	4.06	10.84	18.43
		5.03	11.97	20.93
		3.97	11.43	17.16
		3.87	8.18	20.88
		3.82	9.06	19.89
		3.42	9.99	19.84
	回收率 (%)	80.6	102	97.6
	变异系数 (%)	13.3	14.1	7.56
回收率 (%)		81.2	94.2	93.2
变异系数 (%)		2.8	15.7	12.7



从表 1 中结果可以看出,在玉米样本中添加不同浓度 AFB<sub>1</sub> 标准品:

(1)添加浓度为 5  $\mu\text{g/kg}$  时,检测浓度范围为(3.42~5.03) $\mu\text{g/kg}$ ,回收率范围为 79.4%~83.7%,批内变异系数范围为 9.75%~14.1%,批间变异系数为 2.8 %;

(2)添加浓度为 10  $\mu\text{g/kg}$  时,检测浓度范围为(6.78~11.97) $\mu\text{g/kg}$ ,回收率范围为 77.2%~103 %,批内变异系数范围为 4.83 %~14.1%,批间变异系数为 15.7 %;

(3)添加浓度为 20  $\mu\text{g/kg}$  时,检测浓度范围为(13.42~22.95) $\mu\text{g/kg}$ ,平均回收率范围为 79.8 %~102 %,批内变异系数范围为 7.56 %~15.9%,批间变异系数为 12.7 %。

## 2. 与仪器方法检测结果的吻合情况

选取配合饲料、玉米、花生粕、小麦等样本,选择试剂盒和仪器方法分别进行检测,比较试剂盒与仪器检测方法对 AFB<sub>1</sub> 检测结果的符合性情况,检测结果见表 2:

表 2 仪器复核测定结果

序号	样品名称	试剂盒测定结果 ( $\mu\text{g/kg}$ )	仪器确证结果 ( $\mu\text{g/kg}$ )	标示含量( $\mu\text{g/kg}$ )
1	玉米	$20.70 \pm 0.52$	$19.8 \pm 1.46$	—
2	质控-1	$13.90 \pm 0.52$	$12.46 \pm 1.02$	$12.9 \pm 1.8$
3	玉米蛋白粉	$15.41 \pm 0.11$	$16.96 \pm 1.71$	—
4	小麦	$1.15 \pm 0.02$	$<2.0$	—
5	配合饲料	$1.55 \pm 0.02$	$<2.0$	—
6	花生粕	$4.12 \pm 0.38$	$4.37 \pm 0.36$	—

表 2 结果表明:青岛普瑞邦的 AFB<sub>1</sub> 酶联免疫试剂盒检测结果与高效液相色谱仪器确证分析结果基本吻合。

## 六、验证结论

验证实验表明:

1. 青岛普瑞邦的 AFB<sub>1</sub> 酶联免疫检测试剂盒在 3 个不同添加水平下对 AFB<sub>1</sub> 的平均回收率范围为 81.2% ~ 94.2%。
2. 青岛普瑞邦的 AFB<sub>1</sub> 酶联免疫试剂盒的批内变异系数范围为 4.83% ~ 15.9%，批间变异系数范围为 2.8% ~ 15.7%。
3. 青岛普瑞邦的 AFB<sub>1</sub> 酶联免疫试剂盒检测结果与高效液相色谱仪器确证分析结果基本吻合。

验证单位验证人签名: 王石

验证单位批准人签名: 梁智

验证单位: 国家饲料质量监督检验中心 (北京)

2018 年 11 月 26 日

