

团体标准

T/CAPDA 067-2024

微生物农药有效成分分析方法 确认指南 计数法

Guidelines on validation of analysis methods for microbial pesticides
(counting method)

2024-09-16 发布

2024-09-16 实施

前 言

本文件按照 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》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国农药发展与应用协会提出并归口。

本文件起草单位：赤天化科技集团有限公司、沈阳沈化院测试技术有限公司、农业农村部农药检定所

本文件主要起草人：于海博、宋俊华、祝春华、吴进龙、蔡磊明、季颖、楼少巍、黄啟良、梅宝贵、杨闻翰、王婉秋、白乃茂、刘墁、吴康康、董雪梅、李秀杰、方路、邢平。

微生物农药有效成分分析方法确认指南 计数法

1 范围

本文件提供了微生物农药有效成分（真菌、细菌、病毒）定量分析方法确认的技术方案，并包含了数据统计分析、性能指标及结果报告等内容。

本文件适用于农药微生物有效成分定量分析方法(平板菌落计数法和血球计数法)的方法确认试验。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

平板菌落计数法 Plate count method

将稀释后的孢子悬浮液通过涂布的方法，使其单个分生孢子或芽孢分散在培养基平板上，待培养后每活芽孢或分生孢子形成一个菌落，即一个菌落形成单位（CFU），通过肉眼观察菌落的数量来推算单位微生物农药样品的含量。

3.2

血球计数法 Hemocytometer count method

3.2.1

含孢量 spore content

将稀释后的真菌孢子悬浮液在显微镜下用血球计数板测定每单位样品中所含的分生孢子数量。

3.2.2

活孢率 rate of living spores

将稀释后的真菌孢子悬浮液接种到培养基平板上，培养后于显微镜下观察孢子萌发率，即样品中可萌发的分生孢子数占孢子总数的百分比。

3.2.3

病毒包涵体含量 polyhedral inclusion body content

病毒粒子包埋于蛋白质基质的包涵体中（PIB 为多角体包涵体/OB 为颗粒体包涵体），将稀释后的悬浮液在显微镜下用血球计数板测定每单位样品中所含的病毒包涵体数量。

3.3

方法确认 method validation

通过对方法灵敏度、特异性、精密度、准确度等性能参数进行考察，从而表明该方法适用于特定的分析目的。

3.4

灵敏度 sensitivity

待确认方法对目标微生物的检出能力。

3.5

特异性 specificity

待确认方法对非目标微生物的抗干扰的能力。

3.6

精密度 precision

在规定条件下，同一均匀样品经多次独立测试，结果之间的接近程度。其是偶然误差的量度，可用重复性和再现性表示。

3.7

准确度 accuracy

测试结果与所测样品的真值或约定真值的符合程度。

4 方法确认

4.1 总则

4.1.1 应对微生物农药产品（母药和制剂）中有效成分定量分析方法进行确认。对方法灵敏度、特异性、精密度和准确度等指标进行验证。

4.1.2 以下各项方法确认指标判定标准为通用标准，如因分析物和方法特性等原因导致方法确认相关指标不相关、或不能满足相应标准要求，可提供解释说明。

4.2 灵敏度

4.2.1 测定方法

4.2.1.1 待确认方法的灵敏度验证应选择目标微生物，建议至少采用 30 株目标微生物（菌株/病毒毒株），指定目标微生物应记录并可追溯到其来源。

4.2.1.2 针对目标菌株（真菌/细菌），接种至培养基平板上，适宜条件下培养至菌种形成若干单一菌落。根据菌落形态特征、革兰氏染色结果、菌体形态、分生孢子及分生孢子梗形态特征等对菌株进行鉴别试验。如鉴别试验存在争议时应借助分子测序手段分析鉴定。

4.2.1.3 针对目标毒株（病毒），提取病毒 DNA 后采用特异性引物进行 PCR 扩增、电泳，同时结合测序结果分析鉴别，必要时可借助生物测定方法对毒种进行鉴别。

4.2.2 判定

灵敏度试验检出目标微生物的测试结果数量与所选择的菌株/毒株数量相等，则待验证方法的灵敏度符合要求。

4.3 特异性

4.3.1 试验方法

4.3.1.1 待确认方法的特异性验证应选择非目标微生物，特异性试验所用菌株/毒株应选择能反映出对目标菌株有潜在的交叉污染/干扰的微生物（菌株/病毒毒株）。

4.3.1.2 建议至少采用 30 株潜在竞争的干扰菌株/毒株，指定非目标微生物应记录并可追溯到其来源。

4.3.1.3 对于干扰菌株的选择，可以参考选择如黑曲霉、米曲霉、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等有潜在的交叉污染的细菌或真菌为干扰菌株。对于干扰毒株的选择，可以参考选择以包涵体形式存在的多角体病毒和颗粒体病毒为干扰毒株。

4.3.1.4 针对干扰菌株（真菌/细菌），接种至培养基平板上，适宜条件下培养至菌种形成若干单一菌落。根据菌落形态特征、革兰氏染色结果、菌体形态、分生孢子及分生孢子梗形态特征等对菌株进行鉴别试验。如鉴别试验存在争议时应借助分子测序手段分析鉴定。

4.3.1.5 针对干扰毒株（病毒），提取病毒 DNA 后采用特异性引物进行 PCR 扩增、电泳，同时结合测序结果分析鉴别，必要时可借助生物测定方法对毒种进行鉴别。

4.3.2 判定

特异性试验检出非目标微生物的测试结果数量与所选择的菌株/毒株数量相等，则待验证方法的特异性符合要求。

4.4 精密度

4.4.1 试验方法

4.4.1.1 平板菌落计数法测定真菌/细菌的含菌量（CFU）的精密度；血球计数法测定真菌含孢量、真菌活孢率、病毒包涵体的精密度。

4.4.1.2 重复性试验应至少进行五次样品测定，每个样品做三次重复，计算其平均值。提供相对标准偏差 RSD 数据。

4.4.2 判定

建议相对标准偏差 $RSD \leq 20\%$ 。

4.5 准确度

4.5.1 试验方法

4.5.1.1 选择已知含量的母药或标准菌种作为标准品，采用标准品添加空白助剂的方法，通过计算回收率评价方法准确度。

4.5.1.2 平板菌落计数法测定真菌/细菌的含菌量（CFU）的回收率；血球计数法测定真菌含孢量、真菌活孢率、病毒包涵体的回收率。

4.5.1.3 应在符合产品规格的水平上进行回收率测定，配制与待测组分含量测定时浓度相同的5份样品，每个样品做三次重复，计算其平均值。

4.5.2 计算

准确度按式(1)计算：

$$R = \frac{A}{B} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

R—回收率，%；

A—测得量，单位CFU或孢子或PIB或OB；

B—理论加入量，单位CFU或孢子或PIB或OB。

4.5.3 判定

建议准确度的判定标准为80~120%。

4.5.4 非分析物干扰

4.5.4.1 在评价准确度时，通常包含非分析物的干扰试验。

4.5.4.2 应分别测定标准品和空白助剂的含量，证明其无相互干扰因素，并提供样本分析典型图片。

5 报告内容

分析方法确认报告建议至少应包括以下内容：

- 1) 方法描述：方法概要、标准品信息、试剂和溶液、仪器、样品配制、操作条件、测定步骤、结果计算等内容。
- 2) 方法确认评价：方法灵敏度、特异性、精密度、准确度等数据和评价结论。
- 3) 提供与方法灵敏度、特异性、非分析物干扰相关的典型图片。

6 参考文献

- [1] FAO/WHO Specification Guidelines for Microbial Pesticides
- [2] Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Microbiological Methods of Analysis
- [3] NY/T 2887-2016 农药产品质量分析方法确认指南
- [4] GB 4789.45-2023 食品安全国家标准 微生物检验方法验证通则
- [5] SN/T 3266-2012 食品微生物检验方法确认技术规范