

团 体 标 准

T/CIFST 003—2021

沙门氏菌分子检测试剂盒(MDS)方法

Molecular detection assay method (MDS) for *Salmonella*

2021-08-23 发布

2021-08-23 实施

中国食品科学技术学会 发布

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。

本文件修改采用 AOAC OMA 2016.01《部分种类食品和环境表面沙门氏菌的检测 3M™ 分子检测试剂盒(MDA)2 沙门氏菌方法 第一版》(2016 年)。

本文件与 AOAC OMA 2016.01 相比做了下述结构调整：

- 方法的适用范围由“生牛肉末(73%瘦肉)、生鸡肉末、鸡胴体清洗液、鸡畜体海绵涂抹样、巴氏杀菌的液态蛋、熟制调理鸡肉、即食脱脂奶粉、黑胡椒、可可粉、生虾、生袋装菠菜、奶油花生酱、干狗粮、巴氏杀菌的干酪、豆芽灌溉水、密封混凝土、不锈钢和密封瓷砖的环境表面”修改为“食品及食品加工环境样品”。
- 检样均质时间由“2 min±0.2 min”修改为“1 min~2 min”。
- 增加含益生菌的食品的增菌要求。
- 报告为检出疑似沙门氏菌，应按照用户选择的首选方法或按照 FDA BAM、USDA-FSIS MLG 或 ISO 6579 参考方法进行确证，修改为报告为检出疑似沙门氏菌，应按照 GB 4789.4 方法进行确证。

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。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：北京市疾病预防控制中心、3M 中国有限公司、光明乳业股份有限公司、石家庄君乐宝乳业有限公司、澳优乳业(中国)有限公司。

本文件主要起草人：陈倩、张晓媛、王迪、张鹏航、黄炎、孟云、张洪沂、张锋华、花榜清、柴艳兵、刘志楠、陶清。

沙门氏菌分子检测试剂盒(MDS)方法

1 范围

本文件规定了食品及食品加工环境中沙门氏菌分子检测试剂盒(MDS)方法。
本文件适用于食品及食品加工环境样品中沙门氏菌的定性检测和快速筛查。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

- GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则
- GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 生物安全措施

应按照 GB 4789.1 的规定由具备资格的微生物检验人员执行检测工作。微生物培养物和实验废弃物(含实验器皿和工具)的处理,应按照 GB 19489 相关规定执行。

4 方法原理

沙门氏菌分子检测试剂盒方法利用环介导等温核酸扩增(LAMP)技术,快速扩增沙门氏菌高特异性的核酸序列,并结合生物发光技术检测扩增过程中的荧光信号,通过检测系统配置的软件实时报告阳性结果(波峰),阴性结果在分子检测系统(MDS 100, Molecular Detection System 100)设定的 60 min 运行结束后自动判定。

5 设备和材料

- 5.1 恒温培养箱:36 °C±1 °C,41.5 °C±1 °C。
- 5.2 电子天平:感量 0.1 g。
- 5.3 均质器(旋刀或拍击式)或等效设备。
- 5.4 pH 计或精密 pH 试纸:精密度 0.1。
- 5.5 微量移液器(5 μL~50 μL)及无菌带滤芯吸头。
- 5.6 干浴加热器:100 °C±1 °C。
- 5.7 3M™分子检测仪及配件:
 - a) 3M™分子检测仪(型号:MDS 100)。
 - b) 加热模块。
 - c) 冷却模块。

- d) 开盖器。
- e) 试剂反应管架。
- f) 快速转移托盘。
- g) 分子检测仪软件。

5.8 微生物实验室常规灭菌及培养设备。

5.9 涂抹海绵。

6 培养基和试剂

6.1 培养基,配制方法见附录 A。

- a) 缓冲蛋白胨水(buffer peptone water, BPW)。
- b) 缓冲蛋白胨水-万古霉素(buffer peptone water-vancomycin medium, BPW-Vm)。

6.2 3M™沙门氏菌分子检测试剂盒:

- a) 裂解试剂管。
- b) 试剂反应管(含冻干小球)。
- c) 阳性对照管(含冻干小球)。

6.3 3M™基质对照检测试剂盒:基质对照管(含冻干小球)。

6.4 消毒剂中和溶液。

7 检验程序

沙门氏菌检验程序见图 1。

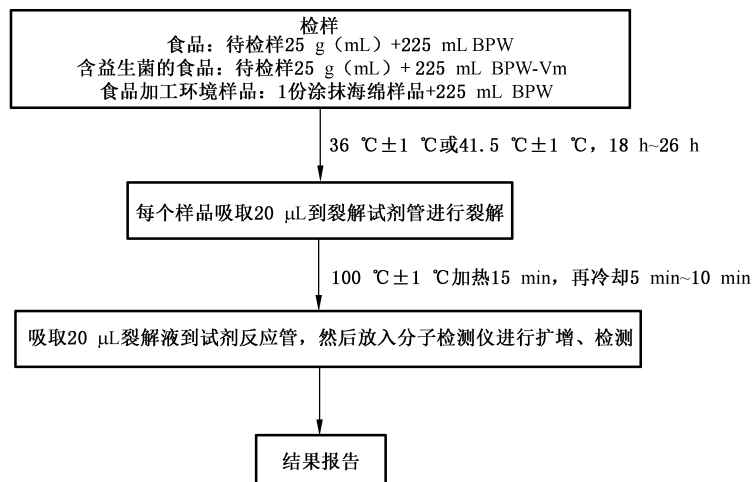


图 1 沙门氏菌检验程序

8 操作步骤

8.1 增菌

8.1.1 食品

取检样 25 g(mL)放入盛有 225 mL 已预热至 36 °C 或 41.5 °C BPW 的无菌均质袋中,用拍击式均质

器拍打 1 min~2 min,置于 36 °C±1 °C(热加工后产品)或 41.5 °C±1 °C(其他样品)培养 18 h~24 h。若样品为液体,不需要均质,振荡混匀。增菌后样品可在 2 °C~8 °C 保存不超过 72 h。如为冷冻产品,应在 45 °C 以下不超过 15 min,或 2 °C~5 °C 不超过 18 h 解冻。

8.1.2 含益生菌的食品

取检样 25 g(mL)放入盛有 225 mL 已预热至 36 °C 或 41.5 °C(仅限发酵乳)BPW-Vm 的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min,置于 36 °C±1 °C 培养 20 h~26 h 或置于 41.5 °C±1 °C 培养 18 h~26 h(仅限发酵乳)。增菌后样品可在 2 °C~8 °C 保存不超过 72 h。如为冷冻产品,应在 45 °C 以下不超过 15 min,或 2 °C~5 °C 不超过 18 h 解冻。

8.1.3 食品加工环境样品

8.1.3.1 取 1 份涂抹海绵,加入 10 mL 消毒剂中和溶液后在食品加工环境中采集样品。消毒剂中和溶液应根据食品加工环境中使用的消毒剂选择相应的标准化产品。可使用含有相应消毒剂中和溶液的商品化涂抹海绵,直接用于采集样品,不必额外加入消毒剂中和溶液。

8.1.3.2 将采集的食品加工环境样品中加入 225 mL 已预热至 41.5 °C 的 BPW,用手轻轻挤压海绵至少 5 次,充分混合样品,置 41.5 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。增菌后样品可在 2 °C~8 °C 保存不超过 72 h。

8.2 裂解

8.2.1 将裂解试剂管平衡到室温,进行倒置混合后,利用开盖器打开裂解试剂管的管盖。轻轻摇动培养后的样品混合物,用移液器吸取 20 μL 至裂解试剂管。移取完所有样品后,吸取 20 μL 的无菌 BPW 到新的裂解试剂管中,作为阴性对照(不得将水用作阴性对照)。如果样品为含益生菌的食品,吸取 20 μL 的无菌 BPW-Vm 到新的裂解试剂管中,作为阴性对照。

8.2.2 将无盖裂解试剂管架放在加热模块中,100 °C±1 °C 加热 15 min±1 min。从加热模块中取出无盖裂解试剂管架,将其放进冷却模块冷却 5 min,直至裂解试剂管颜色由黄色变为粉色,然后将裂解试剂管架移出冷却模块终止冷却,冷却时间不超过 10 min。

8.3 扩增与检测

8.3.1 吸取每支裂解试剂管中液体的上半部分 20 μL 样品裂解液(避免吸出沉淀),贴壁轻轻倾斜注入新的试剂反应管中,应避免搅动试剂反应管中冻干小球,轻轻上下吸动 5 次充分混合。转移完成后,使用开盖器盖紧试剂反应管附加盖。当转移完所有样品裂解液后,分别吸取 20 μL 阴性对照裂解溶液转移到试剂反应管(作为阴性对照)和阳性对照管中,按上述相同方式充分混合。混合完成后立即将盖紧的试剂反应管放入试剂反应管架。

8.3.2 如果第一次采用本方法检测未知样品基质,应使用基质对照管来确定样品基质是否影响扩增检测结果。吸取 20 μL 样品裂解溶液转移到基质对照管中,按照 8.3.1 相同方式充分混合。混合完成后立即将盖紧的基质对照管放入试剂反应管架。

8.3.3 将试剂反应管架从样品制备区转移到扩增区,将所配制的试剂反应管放入快速转移托盘,关闭并锁定托盘盖,在分子检测仪配置的软件上输入相关检测信息后,将快速转移托盘放入分子检测仪,关闭盖子启动分析程序,60 min 后检测自动结束并生成结果。

8.4 扩增产物处理

检测结束后,从分子检测仪中取出快速转移托盘,将试剂反应管浸入有效氯含量为 0.05%~0.25%(浓度比)的含氯消毒溶液 1 h 后投入固体废物垃圾箱,不得进行高压灭菌。

9 判读结果

- 9.1 在阴性对照和阳性对照的检测结果均有效的情况下,对样品检测结果进行判读。
- 9.2 检测程序完成后,分子检测仪软件会自动显示结果。
- 9.3 当显示结果为“检查”,从 8.2 重新检测该样品。
- 9.4 当显示结果为“阴性”,则判读结果为阴性。
- 9.5 当显示结果为“阳性”,则判读结果为可疑阳性。可疑阳性应按照 GB 4789.4 的方法对增菌后样品检验并确证。

10 报告

- 10.1 判读结果为阴性的样品,报告 25 g(mL)样品中未检出沙门氏菌。
- 10.2 判读结果为可疑阳性的样品,确证结果为阳性的,报告 25 g(mL)样品中检出沙门氏菌;确证结果为阴性的,报告 25 g(mL)样品中未检出沙门氏菌。

附 录 A
(规范性)
培养基

A.1 缓冲蛋白胨水(buffer peptone water, BPW)

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠(含 12 个结晶水)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅混均匀,静置约 10 min,煮沸溶解,调节 pH 值至 7.0 ± 0.2 ,高压灭菌 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$,15 min。

A.2 缓冲蛋白胨水-万古霉素(buffer peptone water-vancomycin medium, BPW-Vm)

A.2.1 万古霉素溶液

A.2.1.1 成分

万古霉素	50.0 mg
蒸馏水	50.0 mL

A.2.1.2 制法

50.0 mg 万古霉素溶解于 50.0 mL 蒸馏水,过滤除菌。万古霉素溶液浓度 1 000 mg/L。该溶液可以在 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 15 d。

A.2.2 缓冲蛋白胨水-万古霉素

每 225 mL BPW 加入 2.25 mL 万古霉素溶液,万古霉素终浓度为 10 mg/L。
