

《沙门氏菌分子检测试剂盒方法》

编制说明

一、工作简况

（一）任务来源、起草单位、起草人

1.背景

食品安全问题在我国受到高度的重视，沙门氏菌是所有食品类型中的主要致病菌。我国国标目前采用的检测方法，耗时长而且对检测人员要求高。当前，包括等温核酸扩增技术在内的基于核酸的分子生物学检测方法是有效检测致病菌的途径之一。“沙门氏菌分子检测试剂盒方法”对于提升我国食品安全标准中沙门氏菌的检测能力具有积极的意义。本方法检测流程操作简便快捷、灵敏度高，可将检测时间从原来的至少5天缩短至1天左右，且降低对检测人员操作复杂性的要求，节约人力、提高效率，更好的满足食品生产加工过程中原料及半成品快速检测、环境监控、终产品快速放行以及流通过程中的快速检测，以达到及时发现、尽早防范和快速清除沙门氏菌污染的目的，提升沙门氏菌源头控制能力，从而降低因沙门氏菌引发的食源性疾病的风险，提高食品的安全性。

2. 任务来源

2020 年 4月 2 日，中国食品科技学会发布《关于发布2020年团体标准立项计划的通知》（中食学字〔2020〕004号），立项制定《食品中沙门氏菌分子检测方法》（项目编号：ttbz-2020-004）。

3. 起草单位及起草人

本标准起草单位有：

本标准起草人：

（二）起草过程

2020年4月，立项后，起草组确定了项目方案，组织起草标准文本，整合验证数据，开展专家研讨会等，分析讨论，并根据专家意见，修改本标准文本。

二、与我国有关法律法规和其他标准的关系

本标准与我国现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。目前我国现行沙门氏菌检测标准中共计35项，其中国标强制性标准2项，分别使用培养法(GB 4789.4)和噬菌体诊断检验方法(GB 4789.31)。国家推荐标准4项，分别使用酶联免疫方法、PCR方法和培养法。行业性推荐标准共12项，分别使用实时荧光PCR方法、培养法、垂直膜过滤法、分子分型MLST法、等温扩增法、胶囊法。地方及其他标准共17项，分别使用等温扩增方法、免疫色谱反应法、实时荧光核酸恒温扩增法、微滴数字PCR法、PCR方法。沙门氏菌分子检测试剂盒方法意在为企业提供一种可操作性及科学性都比较强的一种快速简便方法。2019年该试剂盒所涉及的SN项目在中国海关进行立项，目前已完成起草，进入到标准审批流程。

三、国外有关法律、法规和标准情况的说明

目前国际上涉及到沙门氏菌检验的标准有培养法(ISO 6579-1、FDA BAM Ch 5)，培养法和分子检测方法联用(MLG 4.10)。法国标准协会AFNOR认证体系下培养法共7项，分子方法共16项，免疫法共9项。“沙门氏菌分子检测试剂盒方法”所使用的 3M MDA 沙门氏菌检测试剂盒在国际上已经获得权威机构认证认可，包括AOAC国际组织方法（AOAC OMA 2016.01、AOAC PTM 091501）和法国标准协会AFNOR认证（沙门氏菌 3M 01/16-11/16，食品、原料及加工环境样品）。同时，于2019年被USDA纳入实验室官方指南中（MLG 4.10）。该试剂盒被澳大利亚农业部检疫和检验服务接受，并纳入已批准方法(AOAC 2016.01)；该方法同时被中美洲（哥斯达黎加、萨尔瓦多、危地马拉、洪都拉斯、尼加拉瓜和巴拿马）纳入决议技术条例附件（RTCA） 402-2018。3M MDA 沙门氏菌检测试剂盒还被巴西农业部畜牧和供应司(MAPA)接受，被加拿大卫生部分析方法简编接受(MFLP-06)。

四、标准的制（修）订与起草原则

参考AOAC方法验证及ISO 16140方法验证文件制定“沙门氏菌分子检测试剂盒方法”（以下称本方法）与国标方法（GB 4789.4-2016）的比对方案，并根据主要技术指标来评价本方法与国标方法的等效性。

本方法与国标GB 4789.4-2016方法验证的主要技术指标包括特异性、灵敏度、与国

标法的一致性和准确度。

- 1) 灵敏度= (本方法检测阳性菌株数/检测该目的菌株总数) × 100%。
- 2) 特异性= (本方法检测阴性菌株数/检测非目的菌菌株总数) × 100%
- 3) 方法一致性= $[1 - (| \text{本方法和国标GB 4789.4-2016法均确证为阳性的数量} - \text{国标GB 4789.4-2016法确证为阳性的数量} | / \text{检测样品总数})] \times 100\%$
- 4) 方法准确度= 本方法确证阳性结果数/本方法或国标GB 4789.4-2016法确证为阳性结果数 × 100%
- 5) 方法之间是否具有显著性差异使用卡方检验。

五、确定标准主要内容依据

本标准规定了可用于食品成品、食品原料、食品加工过程样以及加工环境样品的沙门氏菌高效率筛查检测。新方法运用等温核酸扩增及ATP生物发光相结合的分子生物学技术进行沙门氏菌的快速检测。

本标准规定的食品中沙门氏菌分子检测方法须基于3M分子检测仪 (MDS100)，配合3M沙门氏菌分子检测试剂盒和分子检测软件使用。本标准中所涉及的范围、方法原理、操作步骤、设备和材料、培养基和试剂、检验程序、操作步骤、判读和报告，均参照相关检测仪及试剂盒等产品操作技术规范确定。

以GB 4789.4为参考，验证了奶粉、巧克力、熟制海鲜、熟制鸡肉、生牛肉、生海鲜、生鸡肉、熟制猪肉、熟制牛肉、肉松、冻鸡块、冻牛肉、烤鳗、秋刀鱼、章鱼块、白菜、果酱、萝卜干、奶粉、脱脂牛奶、淡奶油、软糖、胡椒粉、面条、酵母粉、酸奶、环境涂抹样品等。

(一) 部门检验单位报告1和部门检验单位报告2

1. 方法检出限、灵敏度和特异性

本方法验证共计使用沙门氏菌165株，使用保存的非目的菌60株，3M MDS分子检测系统对其中65株沙门氏菌的平均检出限为 5.2×10^2 cfu/mL。

当沙门氏菌浓度在 10^3 cfu/mL以上时，本方法对所有菌株检测结果均为阳性、对165株沙门氏菌检测的灵敏度为 $165/165 \times 100\% = 100\%$ 。用本方法对60株非目的菌进行检测，所有菌株的检测结果均为阴性。

2. 方法一致性、准确性和与国标法的等效性——部门检验单位报告1

表1 本方法和GB 4789.4对人工染菌样品的检测结果

| 种类/样品数量 | 染菌浓度 (cfu/25g) | 阳性结果 (本方法/国标GB 4789.4法) |
|-------------|----------------|-------------------------|
| 奶粉 (n=80) | 阴性对照 | 1/0 |
| | 10^1 | 20/20 |
| | 10^0 | 20/20 |
| | 10^{-1} | 2/2 |
| 巧克力 (n=80) | 阴性对照 | 9/8 |
| | 10^1 | 20/20 |
| | 10^0 | 14/14 |
| | 10^{-1} | 9/8 |
| 熟制海鲜 (n=80) | 阴性对照 | 0/0 |
| | 10^1 | 20/20 |
| | 10^0 | 17/20 |
| | 10^{-1} | 6/5 |
| 熟制鸡肉 (n=80) | 阴性对照 | 0/0 |
| | 10^1 | 20/20 |
| | 10^0 | 20/20 |
| | 10^{-1} | 9/7 |
| 生牛肉 (n=80) | 阴性对照 | 1/0 |
| | 10^1 | 20/20 |
| | 10^0 | 17/17 |
| | 10^{-1} | 4/5 |
| 生海鲜 (n=80) | 阴性对照 | 1/1 |
| | 10^1 | 20/20 |
| | 10^0 | 19/19 |
| | 10^{-1} | 11/9 |
| 生鸡肉 (n=80) | 阴性对照 | 1/1 |
| | 10^1 | 20/20 |
| | 10^0 | 17/15 |
| | 10^{-1} | 5/6 |
| 熟制猪肉 (n=80) | 阴性对照 | 0/0 |
| | 10^1 | 20/20 |
| | 10^0 | 20/20 |
| | 10^{-1} | 4/4 |
| 熟制牛肉 (n=80) | 阴性对照 | 0/0 |
| | 10^1 | 20/20 |
| | 10^0 | 20/20 |

| | | |
|--------|------------------|---------|
| | 10 ⁻¹ | 4/4 |
| 合计：720 | 阴性对照 | 13/10 |
| | 10 ¹ | 180/180 |
| | 10 ⁰ | 164/165 |
| | 10 ⁻¹ | 54/50 |

如表1所示，针对生鸡肉、生牛肉、生海鲜、熟制猪肉、熟制鸡肉、熟制牛肉、熟制海鲜、巧克力、奶粉样品基质，使用本方法和国标GB 4789.4方法对沙门氏菌人工染菌样品进行检验，两方法的一致性结果分别为：98.8%、97.5%、100%、100%、100%、100%、96.3%、100%、100%，总体一致性为99.2%；方法准确度结果分别为：97.7%、95.5%、100%、100%、100%、100%、93.5%、100%、100%，方法准确度为98.5%，两方法检验结果间未见显著性差异(P>0.05)。

在10¹ cfu/25g 污染浓度下，该方法和国标方法之间完全一致，总体一致性（方法一致性=[1-(|该方法和GB方法均为阳性的数量-GB为阳性的数量|/样品总数)]）为100%。在10⁰ cfu/25g 污染浓度下，该方法出现偏差，180个样品中，3个样品出现假阳性，4个样品出现假阴性，总体一致性为97.8%。同样，在10⁻¹cfu/25g 污染浓度下，180个样品中出现6个样品假阳性，2个样品出现假阴性，总体一致性为98.9%。针对污染低浓度出现的结果偏差，是由于染菌浓度过低而出现的随机性结果。

3. 方法一致性、准确性和与国标法的等效性——部门检验单位报告2

表2 15个食品类型的试验结果（+/-）

| 食品基质 | | 未添加目标菌 | | 低浓度（1-9 cfu/25g）添加目标菌 | | | 高浓度（10-99 cfu/25g）添加目标菌 | | |
|----------|-----|--------|--------|-----------------------|------|--------|-------------------------|------|--------|
| | | 试剂盒 | GB | 平板计数 | 试剂盒 | GB | 平板计数 | 试剂盒 | GB |
| | | 方法 | 4789.4 | （cfu/25g） | 方法 | 4789.4 | （cfu/25g） | 方法 | 4789.4 |
| 1.肉类 | 肉松 | 0/5 | 0/5 | 1 | 16/0 | 16/0 | 33 | 16/0 | 16/0 |
| | 冻鸡块 | 0/5 | 0/5 | 3 | 16/0 | 16/0 | 22 | 16/0 | 16/0 |
| | 冻牛肉 | 0/5 | 0/5 | 3 | 16/0 | 16/0 | 26 | 16/0 | 16/0 |
| 2.鱼类和海产品 | 烤鳗 | 0/5 | 0/5 | 1 | 16/0 | 16/0 | 16 | 16/0 | 16/0 |
| | 秋刀鱼 | 0/5 | 0/5 | 4 | 16/0 | 16/0 | 28 | 16/0 | 16/0 |
| | 章鱼块 | 0/5 | 0/5 | 3 | 16/0 | 16/0 | 15 | 16/0 | 16/0 |
| 3.果蔬 | 白菜 | 0/5 | 0/5 | 4 | 16/0 | 16/0 | 81 | 16/0 | 16/0 |

| | | | | | | | | | |
|-------|------|-----|-----|---|------|------|----|------|------|
| | 果酱 | 0/5 | 0/5 | 9 | 16/0 | 16/0 | 56 | 16/0 | 16/0 |
| | 萝卜干 | 0/5 | 0/5 | 1 | 16/0 | 16/0 | 89 | 16/0 | 16/0 |
| 4.乳制品 | 奶粉 | 0/5 | 0/5 | 4 | 16/0 | 16/0 | 15 | 16/0 | 16/0 |
| | 脱脂牛奶 | 0/5 | 0/5 | 9 | 16/0 | 16/0 | 71 | 16/0 | 16/0 |
| | 淡奶油 | 0/5 | 0/5 | 5 | 16/0 | 16/0 | 62 | 16/0 | 16/0 |
| 5.杂品 | 软糖 | 0/5 | 0/5 | 7 | 16/0 | 16/0 | 74 | 16/0 | 16/0 |
| | 胡椒粉 | 0/5 | 0/5 | 8 | 16/0 | 16/0 | 87 | 16/0 | 16/0 |
| | 面条 | 0/5 | 0/5 | 5 | 16/0 | 16/0 | 50 | 16/0 | 16/0 |

备注：脱脂牛奶试验中添加大肠埃希氏菌720 cfu/25g作为干扰菌

选择5个食品种类，15个食品类型的样品，采用人工污染的方式准备试验样品。每种食品基质需要有3组处理样品（标准的测试组分为25g），其中一个未污染、一个样品的污染水平为1-9 cfu/25g、一个样品的污染水平为10-99 cfu/25g。对于低和高的污染水平，分别进行16次平行测试；未接种的样品进行5平行测试。添加菌为肠炎沙门氏菌（ATCC13076）。结果见表2。

该试剂盒用作检测沙门氏菌时，在5个食品种类，15个食品类型的样品的检测结果表明，该试剂盒相对灵敏度高，相对特异性好，相对准确度高。两种方法标准偏差S为0，说明两种方法在统计学上无显著性差异。

表3 试验结果统计分析

| 食品 | | 相对灵敏度 P ⁺ | 相对特异性 P ⁻ | 假阴性率 pf ⁻ | 假阳性率 pf ⁺ | 相对准确度 |
|----------|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| 1.肉类 | 肉松 | 100.0% | 100.0% | 0.0% | 0.0% | 100.0% |
| | 冻鸡块 | | | | | |
| | 冻牛肉 | | | | | |
| 2.鱼类和海产品 | 烤鳗 | 100.0% | 100.0% | 0.0% | 0.0% | 100.0% |
| | 秋刀鱼 | | | | | |
| | 章鱼块 | | | | | |
| 3.果蔬制品 | 白菜 | 100.0% | 100.0% | 0.0% | 0.0% | 100.0% |
| | 果酱 | | | | | |
| | 萝卜干 | | | | | |

| | | | | | | |
|-------|------|--------|--------|------|------|--------|
| 4.乳制品 | 奶粉 | 100.0% | 100.0% | 0.0% | 0.0% | 100.0% |
| | 脱脂牛奶 | | | | | |
| | 淡奶油 | | | | | |
| 5.杂品 | 软糖 | 100.0% | 100.0% | 0.0% | 0.0% | 100.0% |
| | 胡椒粉 | | | | | |
| | 面条 | | | | | |
| 所有食品 | | 100.0% | 100.0% | 0.0% | 0.0% | 100.0% |
| 标准偏差S | | 0 | | | | |

$$POD = \frac{x}{N}$$

其中x为检出阳性结果次数，N为测定总次数；POD值>0.5时，25g基质中的菌含量即为方法的检出限。

检测结果表明，该试剂盒的批间变异无显著性差异。POD值=1.0>0.5，即25g基质中的菌含量1~9 cfu为方法的相对检出限。

（二）食品企业1验证报告

表4 本方法和GB 4789.4对人工染菌和自然样品的检测结果

| 种类/样品数量 | 染菌浓度（cfu/25g） | 阳性结果（本方法/国标GB 4789.4法） |
|-----------|-------------------------|------------------------|
| 酵母粉（n=25） | 10 ¹ （n=5） | 5/5 |
| | 10 ⁰ （n=10） | 10/10 |
| | 10 ⁻¹ （n=10） | 2/2 |

本次试验如表4所示，本方法与国标方法（GB 4789.4）相比，对酵母粉中沙门氏菌检测的一致性和准确性分别为100%和100%。卡方检验P值>0.05，所有两种方法之间无显著性差异。

（三）食品企业2验证报告

表5 本方法和GB 4789.4对人工染菌的检测结果

| 种类/样品数量 | 染菌浓度（cfu/25g） | 阳性结果（试剂盒方法/国标GB 4789.4-2016法） |
|----------|----------------------------------|-------------------------------|
| 酸奶（n=20） | 10 ⁰ | 20/20 |
| 奶粉（n=10） | 10 ⁰ -10 ² | 7/7 |

本次试验如表5所示，本方法与国标方法（GB 4789.4）相比，对所有40个样品的检测的一致性和准确性分别为100%和100%。卡方检验P值>0.05，所有两种方法之间无显著性差异。

综上所述，该方法检验结果和国标方法高度一致，可满足实验室对食品基质的快速定性检测需求，从而提高检测效率。方法通常对目标靶向具有较低的检出限和较高的特异性。方法验证的结果同时也提示，本方法在实际检验自然食品样品时，其检验的灵敏度和准确性，可能会不同程度的受到沙门氏菌污染浓度的影响，若沙门氏菌污染浓度低于10¹ cfu/25g时，有可能出现检验误差引起的不到2%的准确度差异。

六、其他需要说明的事项

为了保证检测结果的准确性，检测过程中防止交叉污染的措施见附录A。

附录A 检测过程中防止交叉污染的措施

B.1 3M沙门氏菌分子检测试剂盒包含即用型裂解管、试剂管和试剂对照管，均无需配制，所以无需试剂准备区。分子检测仪为全自动封闭系统，所以无需产物分析区。

B.2 实验室应划分出样品制备区和扩增区，其中扩增区为单独房间。微生物分子生物学实验中，样品制备区通常为无菌室，配备生物安全柜或带紫外杀菌的分子生物学工作站。实验室的操作流程应从样品制备区到扩增区单方向进行。

B.3 7.2节和7.3.1节在样品制备区进行，其中7.3.1节应在生物安全柜（操作时关闭风机）或带紫外杀菌的分子生物学工作站内进行。7.3.2节和7.3.3节在扩增区进行。

B.4 干浴加热器、开盖器、加热/冷却模块和试剂管架放置在样品制备区，分子检测仪和快速转移托盘放置在扩增区。各区所有的试剂、器材、仪器都应专用且不得带出该区。

B.5 实验过程中，穿实验服和戴手套，手套应及时更换。各区应有专用实验服，定期清洗。

B.6 实验前后，实验室用紫外灯消毒以破坏残留的DNA气溶胶。

B.7 使用有效氯含量为0.05%-0.25%（浓度比）的含氯消毒溶液或 DNA 去除溶液定期清洁实验室工作台和设备（微量移液器、分子检测仪及其配件等）。