

ICS 号:

CCS 号:

# 团体标准

T/CIFST XXX-20XX

## 沙门氏菌分子检测试剂盒方法

Molecular detection assay method for *Salmonella*

(与国际标准一致性的标识)

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 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》给出的规则起草。

本文件修改采用 AOAC OMA 2016.01《筛选出的食品和环境样品中沙门氏菌的检测 3M™ 分子检测试剂盒 2 沙门氏菌方法 第一版》（2016 年）（AOAC Official Method 2016.01 *Salmonella* spp. in Select Foods and Environmental Surfaces 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2 – *Salmonella* Method First Action 2016）。

本文件与 AOAC OMA 2016.01 方法的区别如下：

——方法的适用性由生牛肉末（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改为食品及食品加工环境样品。

——检样均质时间由  $2\pm 0.2$  分钟改为 1 min~2min。

——增加含益生菌样品的增菌条件为使用含万古霉素的缓冲蛋白胨水，于  $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 20 h-26 h。

——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，改为报告为检出疑似沙门氏菌，应按照 GB 4789.4 的传统培养方法和生化方法进行确证。

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：

本文件主要起草人：



# 沙门氏菌分子检测试剂盒方法

## 1 范围

本文件规定了食品及食品加工环境中沙门氏菌的环介导等温核酸扩增（LAMP）检测方法（3M™ MDS 沙门氏菌分子生物学检测方法）。

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及快速筛查。

## 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 4789.4 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

为保证检测结果的准确性和防止工作环境的交叉污染，应由具备资格的工作人员检测，所有培养物和废弃物（含实验器皿和工具）的处理应按照 GB 19489 有关规定执行。

## 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扩增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来检测扩增过程中的荧光信号，通过检测系统的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, Molecular Detection System）设定的 60 分钟运行结束后自动进行判定。

## 5 设备和材料

- 5.1 恒温培养箱：37℃±1℃，41.5℃±1℃。
- 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（5-50 μL）及无菌带滤芯吸头。
- 5.6 干浴加热器：100℃±1℃。
- 5.7 3M 分子检测仪及配件
  - 5.7.1 分子检测仪（型号：MDS100）。
  - 5.7.2 加热模块。
  - 5.7.3 冷却模块。
  - 5.7.4 开盖器。

T/CISFT ×××-20××

- 5.7.5 试剂管架。
- 5.7.6 快速转移托盘。
- 5.7.7 分子检测仪软件。
- 5.8 微生物实验室常规灭菌及培养设备。

## 6 培养基和试剂

- 6.1 缓冲蛋白胨水（Buffer Peptone Water, BPW）。
- 6.2 缓冲蛋白胨水-万古霉素（BPW-Vm）。
- 6.3 3M 沙门氏菌分子检测试剂盒
  - 6.3.1 裂解管。
  - 6.3.2 试剂管。
  - 6.3.3 试剂对照管。

## 7 检验程序

沙门氏菌检验程序见图 1。

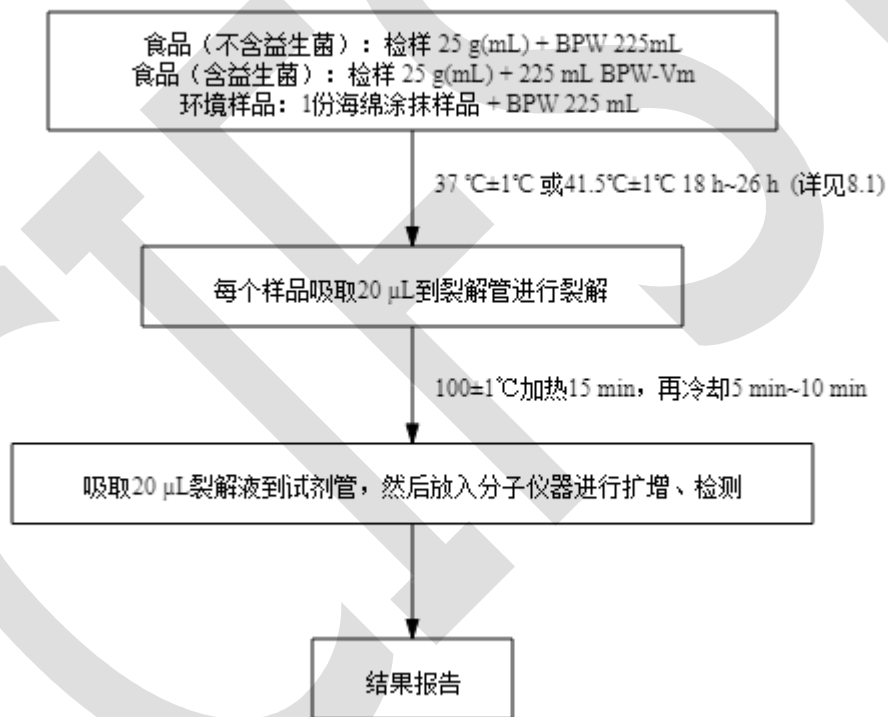


图 1 沙门氏菌检验程序

## 8 操作步骤

### 8.1 增菌

- 8.1.1 食品：取待检样25 g（mL）置于盛有225 mL已预热至37°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，然后37℃±1℃（热加工后产品）或41.5℃±1℃（其他样品）培养18 h~24 h。如果食品中含有益生菌，则使用BPW-Vm，然后37℃±1℃培养20 h~26 h。BPW或BPW-Vm可以放置于41.5±1℃的培养箱内预热。

8.1.2 食品加工环境样品：取1份商品化海绵涂抹样品（含10 mL稀释液），加入225 mL已预热至41.5℃的BPW，用手轻轻挤压海绵至少5次以上，充分混合样品，41.5℃±1℃培养18 h~24 h。

## 8.2 裂解

8.2.1 将裂解管平衡到室温，进行倒置混合后，利用开盖器打开裂解管盖。轻轻摇动培养过的样品混合物，用移液器吸取20 μL至裂解管。移取完所有样品后，吸取20 μL的无菌BPW到新的裂解管中，作为阴性对照，请勿将水用作阴性对照。如果食品中含有益生菌，吸取20 μL的无菌BPW-Vm到新的裂解管中，作为阴性对照。

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

## 8.3 扩增与检测

8.3.1 吸取每支裂解管液体上半部分中的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管中，以避免搅动试剂管中冻干小球，轻轻上下吸动5次充分混合。转移完后，使用开盖器将附加盖盖紧试剂管盖子。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管和试剂对照管中，按上述相同方式充分混合。配置完后立即将盖紧的试剂管放入试剂管架。

8.3.2 将试剂管架从样品制备区转移到扩增区，将试剂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检测相关信息后，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，然后废弃处理试剂管，勿进行高压灭菌。

## 8.5 判读结果

8.5.1 检测程序完成后，分子检测仪软件会自动显示结果。

8.5.1 当某样品的显示值为“检查”时，需从8.2重新检测该样品。

8.5.2 如果样品显示值为阴性，则记为阴性。

8.5.3 如果样品显示值为阳性，则记为推测性阳性。BPW或BPW-Vm增菌后样品在2℃~8℃保存不超过72 h。

## 8.6 报告

8.6.1 判读结果为阴性的样品，报告为未检出沙门氏菌。

8.6.2 判读结果为阳性的样品，报告为检出疑似沙门氏菌，应按照GB 4789.4的传统培养方法和生化方法进行对BPW或BPW-Vm增菌液检验并确证。

## 附 录 A (规范性) 培养基和试剂

### A.1 缓冲蛋白胨水 (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	1000 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至 $7.0 \pm 0.2$ ，高压灭菌 $121^{\circ}\text{C}$ ，15 min。

### A.2 缓冲蛋白胨水-万古霉素 (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。万古霉素溶液可以在 $0^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 保存15 d。配制溶液体积可以根据BPW用量增减，万古霉素和蒸馏水比例保持1:1。

#### A.2.2 缓冲蛋白胨水-万古霉素

每225 mL BPW加入2.5 mL万古霉素溶液，万古霉素终浓度为10 mg/L。