食源性致病菌快速检测方法 编制说明

一、工作概况

（一）任务来源

为满足粤港澳大湾区人民对高品质产品的需求，推动粤港澳大湾区质量水平的整体提升，以高标准引领行业高质量发展，广东省市场监督管理局筹建粤港澳大湾区标准化研究中心，下设食品工作组。食品工作组归口指导单位为省食品安全委员会办公室和香港、澳门相关食品安全监管部门，具体工作由广东省食品检验所牵头负责。广东省市场监督管理局组织专题研究（《关于首批食品“湾区标准”研制清单及经费分配的报告》（粤食检[2021]57号)），由广东省科学院微生物研究所牵头制订《粤港澳大湾区标准促进会团体标准食源性致病菌快速检测方法》。

（二）起草单位、起草人

起草单位：广东省食品检验所、广州海关技术中心、广东环凯生物科技有限公司、广东省科学院微生物研究所。(港澳参与机构待定)

起草人：

（三）简要起草过程

⑴确立标准制定的基本原则，比较与研究我国国标及国际标准相关内容，并结合方法的研究工作，制定出标准的讨论稿。

二、与现行有关法律法规和其他标准的关系

（一）与现行法律、法规的关系

结合我国的现行法律、法规和实际国情，对个别之处进行完善与补充，按照国家安全标准与粤港澳大湾区高品质食品标准要求与体例进行编写，完成该标准的制定。

（二）与食品安全国家标准、国家标准、行业标准等现行标准的关系

目前，国内与国际标准主要沿用平板培养分离的传统做法检测食源性致病菌。我国现行的食品安全致病菌检测按照国家标准 GB4789 执行，金黄色葡萄球菌按照国标《GB 4789.10-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》、沙门氏菌按照国标《GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》、大肠杆菌 O157：H7 按照国标《GB 4789.36-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157H7NM 检验》、副溶血性弧菌按照国标《GB 4789.7-2013 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》、单核增生李斯特氏菌按照国标《GB 4789.30-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》、克罗诺阪崎肠杆菌按照国标《GB 4789.40-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）检验》开展检验，以上均是传统的分离培养的检验方法。

ISO20837:2006 与我国出入境检验检疫行业标准 SN/T 2102.3《食源性病原体 PCR 检测技术规范第 3 部分：定性检测方法样品制备要求》及 ISO20838:2006 与我国 SN/T 2102.4

《食源性病原体 PCR 检测技术规范第 4 部分：定性检测方法扩增和检测要求》，我国 SN/T 5225-2019《进出口食品中五种致泻大肠埃希氏菌快速检测方法 多重 PCR 法》、SN/T 4603-2016《出口食品及水体中产毒副溶血性弧菌常见致病基因检测方法 多重 PCR 及多重实时荧光 PCR 法》、SN/T 2206.11-2014 《化妆品微生物检验方法 第 11 部分：金黄色葡萄球菌 多重实时荧光 PCR 法》标准中涉及 PCR 检测法和多重 PCR 检测法，但目前的 PCR 或多重 PCR 检测法，大部分都只鉴定到某一特定菌，对于多种致病菌的同步检测较少。由此可见，mPCR 法在食品中食源性致病菌的快速检测标准上有一定的应用基础，尤其是对通关放行速度有要求的出入境标准中，和本项目的立项目标契合，但同时也存在广泛性应用不足的情况，因此亟待建立新的方法标准补充目前检测方法的不足。根据粤港澳大湾区高品质食品标准的总体安排，将根据国家安全标准与行业标准等的要求进行优化与完善，尽快完成该标准的制定。

（三）与香港规例、澳门行政法规的关系

三、主要技术内容确定依据（如技术指标、试验方法、检验规则等的依据）

（一）标准编制原则

标准编制遵循“先进性、实用性、统一性、规范性”的原则，根据粤港澳大湾区的实际情况，参考国家和国际通行标准，尽可能与国家/国际原则接轨，注重标准的可操作性。

（二）主要技术内容确定的依据

制订依据：

（1）《食品微生物检验 GB/T 4789》与《饮用天然矿泉水检验方法 GB 4789.13》。

（2）ISO22174:2005、ISO20837:2006、ISO20838:2006。

（3）国家重点研发专项食品安全关键技术研发科研项目《基于组学的食源性致病微生物快速高通量检测技术与装备研发》(2017YFC1601200)的研究成果。

2、制订内容

标准制订的工作内容包括样品制备、增菌培养和分离、模板 DNA 制备、多重 PCR 检验。

（1）样品制备、增菌培养和分离

1）食品样品处理步骤、增菌培养和分离按照 GB 4789 进行：

GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验；

GB 4789.10-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验；

GB 4789.40-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验；

GB 4789.30-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验；

GB 4789.36-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验；

GB 4789.7-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验；

GB 4789.44-2020 食品安全国家标准 食品微生物学检验 创伤弧菌检验；

GB 4789.13-2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验；

2）饮用水中铜绿假单胞菌、粪链球菌、产气荚膜梭菌按照GB 8538-2016 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法进行；

（2）模板DNA制备

1）增菌液模板DNA制备

取相应致病菌增菌液1ml，加入得到1.5ml无菌离心管中，6 000 r/min离心5min，完全去除上清；加入30μL DNA提取液，混匀后沸水浴10min，12 000 r/min离心15min，取上清保存于-20℃备用以待检测，也可使用商业化的DNA提取试剂盒并按期说明制备模板DNA。

2）可疑菌落模板DNA制备

取分离到的可疑菌落，30μL DNA提取液，混匀后沸水浴10min，12 000 r/min离心15min，取上清保存于-20℃备用以待检测，也可使用商业化的DNA提取试剂盒并按期说明制备模板DNA。

（3）多重PCR检验。

1）配置反应体系（25μL）：

10×PCR 缓冲液 2.5μL，引物对 0.2-1μM，dNTPs 0.2mM，DNA 聚合酶 1.25U，无菌水补足至 25μL。

2）反应程序

94℃预变性 5min，30 个循环：94℃变性 1 min，58℃退火 30s，72℃延伸 30s；72℃延伸 10min 后 4℃保存。

3）电泳检测 PCR 扩增产物

用 0.5×TBE 缓冲液配制 1.5%琼脂糖电泳凝胶并趁凝胶未凝固时加入核酸染色剂制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液，使液面没过凝胶 2-3mm。将适量的多重 PCR 扩增产物分别和相应的 6×加样缓冲液混合，点样，其中一孔加入 100 bp DNA ladder。90 V/cm 恒压，电泳 20-30 min，紫外凝胶成像仪下观察电泳结果，拍照并记录结果。

4）质量控制

阳性对照出现逾期大小的扩增条带；

阴性对照未出现逾期大小的扩增条带；

空白对照未出现逾期大小的扩增条带。

5）结果表述

在符合质量控制的情况下，结果才能判为有效。在结果有效的前提下，样品出现对应目标菌产物大小的扩增条带，则判定样品为该种目标菌可疑阳性，否则为阴性。可疑阳性样品用 GB 4789 与 GB 4789.13 进行确证，最终结果以国标检测结果为准。

四、标准可能带来的经济和社会影响评估

五、征求意见的采纳情况

六、其他应予以说明的事项