

ICS XX.XXX.XX

T



中国营养保健食品协会团体标准

T/XXXXX 0001-2019

商品化试剂盒检测方法

克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）方法一

（征求意见稿）

Commercial kit method – *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)-Method I

前言

本标准主要参照 AOAC OMA2018.01 标准起草

本标准起草单位：东北农业大学；3M 中国有限公司；中国营养保健食品协会

本标准主要起草人：姜毓君；满朝新；张微；孟云；陆苏飏；黄炎；王梦婷

1 范围

本标准规定了食品及食品加工环境中克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）的 3M MDS 克罗诺杆菌属分子检测法。

本标准适用于食品及食品加工环境样品中克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）的检测及快速筛查。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 食品微生物检验总则

GB19489 实验室 生物安全通用要求。

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检验

3 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全和防止污染，应由具备资格的工作人员检测，所有培养物和废弃物的处理应按照 GB19489 有关规定执行。

4 方法原理

MDS 克罗诺杆菌属分子检测法利用环介导等温扩增技术快速扩增克罗诺杆菌属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，通过检测系统的软件实时报告阳性结果（波峰），阴性结果在 60 分钟运行结束后自动进行判定。

5 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

5.1 恒温培养箱： $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ；

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 微量移液器及无菌带滤芯吸头；

5.6 干浴加热器： $100^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

5.7 3M 分子检测仪及配件：

5.7.1 分子检测仪

5.7.2 加热模块

5.7.3 冷却模块

5.7.4 开盖器

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

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)

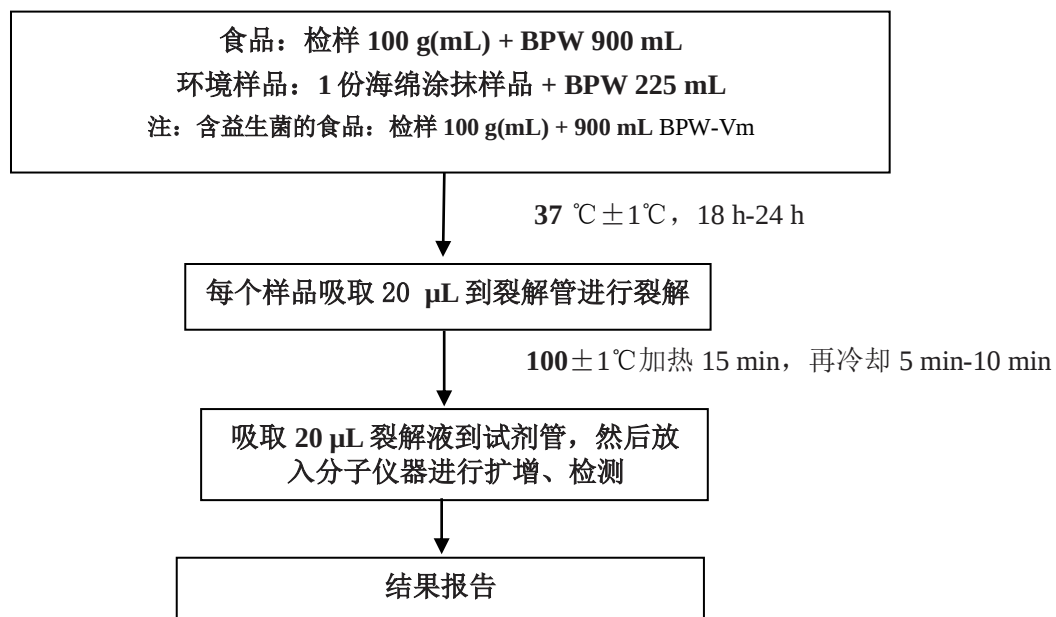
6.3 3M 克罗诺杆菌属分子检测试剂盒

6.3.1 裂解管

6.3.2 试剂管

6.3.3 试剂对照管

6.4 检测程序



7 操作步骤

7.1 增菌

7.1.1 食品：取待检样100 g（mL）置于盛有900 mL已预热至37 °C BPW的无菌锥形瓶中，用手缓缓摇动至充分溶解，或置于盛有900 mL已预热至37 °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°C ±1°C培养18 h-24 h。如果食品中含有益生菌，则使用BPW-Vm，然后37°C ±1°C培养22 h-24 h。BPW或BPW-Vm可以放置于37±1°C的培养箱内预热。

7.1.2 食品加工环境样品：取 1 份海绵涂抹样品（含 10 mL 稀释液），加入 225 mL 已平衡至室温的 BPW，用手轻轻挤压海绵至少 5 次以上，充分混合样品，37°C ±1°C培养 18 h-24 h。

7.2 裂解

7.2.1 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。如果海绵涂抹样品里含影响扩增反应的成分，则吸取 10 µL 增菌液至裂解管。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。

7.2.2 将无盖裂解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。

7.3 扩增与检测

7.3.1 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。

7.3.2 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，将快速转移托盘放入分子检测仪，并在分子检测仪软件上输入检测相关信息，关闭盖子启动分析，60 min 后检测自动结束并生成结果。

7.3.3 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%（质量比）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。

7.4 结果与报告

分子检测仪软件会自动显示结果。当某样品的显示值为“检查”时，需重新检测该样品。如果样品显示值为阴性，则记为阴性。如果样品显示值为阳性，则记为推测性阳性，同时应遵循 GB4789.40 或其他权威机构认可的方法对 BPW 或 BPW-Vm 增菌液进行最终确认。BPW 或 BPW-Vm 增菌液在 2-8℃保存不超过 72h。

附录 A 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 ± 0.2 ，高压灭菌 121°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990 mL BPW加入10 mL万古霉素溶液，万古霉素终浓度为10 mg/L。

附录B 检测过程中防止交叉污染的措施（参照GB/T 27403）

B.1 3M克罗诺杆菌属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%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）。