

商品化试剂盒检测方法
克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌） 方法一

编制说明

商品化试剂盒检测方法

克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌） 方法一

编制说明

一、目的和意义

食品安全问题在我国受到高度的重视，克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）是婴幼儿配方食品（尤其是婴幼儿乳粉）中的主要致病菌。目前，我国国标采用的检测方法，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。“商品化试剂盒检测方法——克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌） 方法一”对于提升我国食品安全标准中克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）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和灵敏度高，可将检测时间从原来的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监测，以达到及时发现、尽早防范和快速清除克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）污染问题，提升克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）源头控制能力，从而降低因克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）引发的食源性疾病的风险，提高食品尤其是婴幼儿配方食品的安全性。

二、标准起草的基本情况

1. 任务来源

经 2019 年 3 月 中国营养保健食品协会法规标准委员会论证审核，同意《食品中克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）检测等温核酸扩增方法》被列入2019年中国营养保健食品协会团体标准制定立项项目。

2. 起草单位

本标准起草单位有：东北农业大学、3M中国有限公司、中国营养保健食品协会。

3. 标准起草人

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

简要起草过程：

2019 年 3 月，立项。

2019年3月-4月，确立项目方案。

2019年4月-7月，开展验证试验。

2019年8月-9月，结果讨论与分析。

2019年10月，起草编制草案和编制说明。

2019年11月9日，召开第一轮专家评审。根据专家意见，参照SNT 4538.1-2016、SNT4537.1-2016和SNT4546-2017等“中华人民共和国出入境检验检疫行业标准”，对本标准名称、内容和格式等进行了修改。

2020年2月20日，召开第二轮专家评审。确定本标准征求意见稿最终内容。

三、采用国际标准的程度及水平的简要说明

“商品化试剂盒检测方法——克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）方法一”所使用的3M MDS克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）检测试剂盒在国际上已经获得权威机构认证认可，包括美国官方分析化学家协会方法（AOAC OMA 2018.01、AOAC PTM 101703）和法国标准协会AFNOR认证（克罗诺杆菌属3M 01/20-03/18，含与不含益生菌的粉状婴配及婴儿谷物食品、原料及加工环境样品）等。该方法在国际上处于领先水平，比传统培养方法和PCR方法，在准确性、灵敏度和特异性方面都有极大提升。

四、标准编制原则和标准编制主要内容

1. 标准编制原则

参考AOAC方法验证及ISO16140方法验证文件制定“商品化试剂盒检测方法——克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）方法一”（以下称本方法）与国标方法（GB4789.40-2016）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GB4789.40-2016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-(| 本方法和国标GB 4789.40-2016法均确证为阳性的数量 - 国标

GB 4789.40-2016法确证为阳性的数量 / 检测样品总数] × 100%

4) 方法准确度=本方法确证阳性结果数/本方法或国标GB 4789.40-2016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。

2. 编制主要内容

可用于食品成品、原料、过程样以及加工环境样品的克罗诺杆菌属高效率筛查检测。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克罗诺杆菌属的快速检测。

五、主要试验验证分析和报告

1. 方法检出限、灵敏度和特异性

本方法验证共计使用克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）103株（附表1）；使用本实验保存的非目的菌42株（附表2），方法检出限见（附表3）。

如附表3所示，本方法对103株克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）的平均检出限为 1.25×10^3 CFU/mL。

当克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）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103株克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）检测的灵敏度为 $103/103 \times 100\% = 100\%$ 。用本方法对42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

如表1所示，针对乳粉、糊精、乳清、乳糖、维生素、核苷酸样品基质，使用本方法和国标GB 4789.40-2016方法对克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）人工染菌样品进行检验，两方法的一致性结果分别为：100%、100%、96.25%、100%、100%、100%，总体一致性为99.38%；方法准确度结果分别为：100%、100%、92.31%、100%、100%、100%，方法准确度为98.72%，两方法检验结果间未见显著性差异 ($P > 0.05$)。

表1 本方法和国标方法GB4789.40-2016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 4789.40-2016法)
乳粉 (n=80)	阴性对照	0/0
	10 ¹	20/20
	10 ⁰	8/8
	10 ⁻¹	0/0
糊精 (n=80)	阴性对照	0/0
	10 ¹	20/20
	10 ⁰	10/10
	10 ⁻¹	0/0
乳清蛋白粉 (n=80)	阴性对照	0/0
	10 ¹	20/20
	10 ⁰	16/16
	10 ⁻¹	0/3
乳糖 (n=80)	阴性对照	0/0
	10 ¹	15/15
	10 ⁰	7/7
	10 ⁻¹	0/0
维生素 (n=80)	阴性对照	0/0
	10 ¹	20/20
	10 ⁰	15/15
	10 ⁻¹	0/0
核苷酸 (n=80)	阴性对照	0/0
	10 ¹	20/20
	10 ⁰	12/12
	10 ⁻¹	0/0

3 食品企业1验证报告

本次试验如表2所示，本方法与国标方法（GB 4789.40-2016）相比，对婴儿配方乳粉中克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）检测的一致性和准确性分别为100%和100%。卡方检验P值为0.71>0.05，所有两种方法之间无显著性差异。

表2 本方法和国标方法GB4789.40-2016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 4789.40-2016法)
婴儿配方乳粉 (n=60)	10 ¹	20/18
	10 ⁰	16/16
	0	0/0

注：1个阴性对照（不染菌的婴儿配方乳粉样品）结果为国标法与试剂盒均阴性；污染浓度为0 CFU/25g为自然样品。

4 食品企业2验证报告

本次试验如表3所示，本方法与国标方法（GB 4789.40-2016）相比，对所有100个样品的检测的一致性和准确性分别为99%和100%。卡方检验P值为0.88>0.05，所有两种方法之间无显著性差异。

表3 本方法和国标方法GB4789.40-2016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 (试剂盒方法/国标GB 4789.40-2016法)
婴幼儿配方乳粉 (n=30)	0	0/0
全脂乳粉 (n=10)	0	0/0
脱盐乳清粉 (n=2)	0	0/0
乳清蛋白粉 (n=2)	0	0/0
乳糖 (n=2)	0	0/0
低聚果糖 (n=2)	0	0/0
脱脂乳粉 (n=2)	0	0/0
环境涂抹样品 (n=20)	0	1/0
乳粉 (n=30)	10 ¹⁻²	29/29

注：染菌浓度为0 CFU/25的样品为自然样品

六、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准未产生重大分歧意见。

八、作为强制性标准或推荐性标准的建议

本标准可作为推荐性行业标准。

九、贯彻标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法、实施日期等内容）

本标准为首次发布。

十、其他需要说明的事项

无其他需要说明的事项。

附表1 方法验证用克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）菌种信息

序号	来源	序号	来源
1	谷类辅食	53	谷类辅食
2	谷类辅食	54	谷类辅食
3	谷类辅食	55	谷类辅食
4	谷类辅食	56	谷类辅食
5	谷类辅食	57	谷类辅食
6	谷类辅食	58	谷类辅食
7	谷类辅食	59	谷类辅食
8	谷类辅食	60	谷类辅食
9	谷类辅食	61	幼儿配方食品
10	谷类辅食	62	幼儿配方食品
11	谷类辅食	63	谷类辅食
12	谷类辅食	64	谷类辅食
13	谷类辅食	65	谷类辅食
14	谷类辅食	66	谷类辅食
15	谷类辅食	67	谷类辅食
16	谷类辅食	68	谷类辅食
17	谷类辅食	69	谷类辅食
18	谷类辅食	70	婴幼儿食品
19	谷类辅食	71	谷类辅食
20	幼儿配方食品	72	谷类辅食
21	谷类辅食	73	谷类辅食
22	谷类辅食	74	谷类辅食
23	谷类辅食	75	谷类辅食
24	谷类辅食	76	谷类辅食
25	谷类辅食	77	谷类辅食
26	婴幼儿配方乳粉	78	婴幼儿配方乳粉
27	原辅料	79	婴幼儿配方乳粉
28	婴幼儿配方乳粉	80	婴幼儿配方乳粉
29	婴幼儿配方乳粉	81	婴幼儿配方乳粉
30	婴幼儿配方乳粉	82	婴幼儿配方乳粉
31	婴幼儿配方乳粉	83	原辅料
32	婴幼儿配方乳粉	84	原辅料
33	婴幼儿配方乳粉	85	婴幼儿配方乳粉加工环境
34	婴幼儿配方乳粉	86	原辅料
35	婴幼儿配方乳粉	87	婴幼儿配方乳粉加工环境
36	婴幼儿配方乳粉	88	婴幼儿配方乳粉加工环境
37	婴幼儿配方乳粉	89	原辅料
38	婴幼儿配方乳粉	90	婴幼儿配方乳粉加工环境
39	原辅料	91	婴幼儿配方乳粉加工环境
40	原辅料	92	原辅料
41	原辅料	93	婴幼儿配方乳粉加工环境
42	婴幼儿配方乳粉	94	原辅料
43	婴幼儿配方乳粉加工环境	95	原辅料
44	婴幼儿配方乳粉	96	婴幼儿配方乳粉加工环境
45	婴幼儿配方乳粉	97	原辅料

46	婴幼儿配方乳粉	98	原辅料
47	婴幼儿配方乳粉	99	原辅料
48	婴幼儿配方乳粉	100	原辅料
49	婴幼儿配方乳粉加工环境	101	标准菌株
50	标准菌株	102	标准菌株
51	标准菌株	103	标准菌株
52	标准菌株		

附表2方法验证用非目的菌菌种信息

序号	种属	序号	种属
1	大肠埃希氏菌	22	表皮葡萄球菌
2	大肠埃希氏菌	23	中间葡萄球菌
3	志贺氏菌	24	松鼠葡萄球菌
4	志贺氏菌	25	腐生葡萄球菌
5	柠檬酸杆菌	26	沃氏葡萄球菌
6	柠檬酸杆菌	27	肠球菌
7	副溶血性弧菌	28	盲肠肠球菌
8	肺炎克雷伯菌	29	粪肠球菌
9	小肠结肠炎耶尔森氏菌	30	粪肠球菌
10	奇异变形菌	31	尿肠球菌
11	奇异变形菌	32	弗氏柠檬酸菌
12	阴沟肠杆菌	33	蜡样芽胞杆菌
13	铜绿假单胞菌	34	普通变形杆菌
14	铜绿假单胞菌	35	绿脓假单胞菌
15	单增李斯特氏菌	36	枯草芽孢杆菌
16	单增李斯特氏菌	37	植物乳杆菌
17	英诺克李斯特氏菌	38	产气肠杆菌
18	英诺克李斯特氏菌	39	溶藻弧菌
19	福氏志贺氏菌	40	德氏乳杆菌
20	奇异变形杆菌	41	干酪乳杆菌
21	金黄色葡萄球菌	42	蜡样芽孢杆菌

附表3 本方法对于克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）的检出限

序号	检出限 (CFU/mL)	序号	检出限 (CFU/mL)
1	3.32×10^3	53	2.94×10^2
2	2.29×10^3	54	1.85×10^2
3	2.94×10^2	55	2.32×10^3
4	3.07×10^3	56	1.82×10^2
5	3.35×10^3	57	4.52×10^3
6	2.85×10^3	58	2.94×10^2
7	2.70×10^3	59	3.39×10^3
8	4.40×10^3	60	3.18×10^3
9	3.80×10^2	61	2.26×10^3
10	3.45×10^2	62	2.17×10^3
11	1.27×10^3	63	3.05×10^2
12	2.27×10^3	64	1.59×10^3
13	1.98×10^3	65	3.02×10^2
14	4.16×10^3	66	2.60×10^3
15	2.97×10^3	67	1.92×10^3
16	1.71×10^2	68	3.43×10^3
17	4.23×10^2	69	3.19×10^2
18	3.11×10^2	70	3.92×10^2
19	4.13×10^3	71	1.98×10^3
20	3.17×10^2	72	4.20×10^3
21	3.03×10^2	73	2.34×10^2
22	2.88×10^2	74	2.42×10^2
23	2.81×10^3	75	2.33×10^3
24	2.98×10^3	76	2.22×10^2
25	3.91×10^2	77	2.87×10^3
26	1.85×10^2	78	3.58×10^3
27	1.33×10^3	79	2.06×10^2
28	2.45×10^2	80	2.66×10^2
29	3.83×10^2	81	1.78×10^3
30	2.65×10^2	82	2.19×10^2
31	2.93×10^2	83	2.33×10^2
32	1.22×10^3	84	1.85×10^3
33	3.63×10^2	85	2.31×10^2
34	4.15×10^2	86	2.77×10^3
35	2.56×10^2	87	2.13×10^2
36	3.05×10^2	88	1.85×10^3
37	2.03×10^3	89	2.82×10^2
38	1.74×10^2	90	2.08×10^3
39	1.97×10^2	91	2.09×10^2
40	2.62×10^2	92	1.88×10^2
41	3.23×10^2	93	2.89×10^3
42	1.38×10^2	94	2.45×10^2
43	2.24×10^2	95	2.84×10^2
44	2.72×10^2	96	1.85×10^2
45	3.57×10^2	97	2.53×10^2
46	1.25×10^3	98	2.47×10^2

47	2.19×10^2	99	1.43×10^2
48	3.17×10^2	100	1.05×10^3
49	4.62×10^2	101	2.00×10^3
50	1.48×10^3	102	3.19×10^2
51	2.32×10^3	103	2.61×10^2
52	3.31×10^3		
