

# DBS

江 苏 省 地 方 标 准

DBS 32/014—2017

---

## 食品安全地方标准 食源性致病微生物快速检测

2017 - 11 - 27 发布

2017 - 11 - 27 实施

---

江苏省卫生和计划生育委员会

发布

## 前 言

本标准系首次发布。

# 食品安全地方标准

## 食源性致病微生物快速检测

### 1 范围

本标准规定了食品中金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠埃希氏菌O157:H7、副溶血性弧菌和志贺氏菌的实时荧光PCR检测方法。

本标准适用于肉制品、水产制品、即食蛋制品、粮食制品、即食豆类制品、巧克力类及可可制品、即食果蔬制品、饮料、冷冻饮品、即食调味品、坚果籽实制品等食品中金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠埃希氏菌O157:H7、副溶血性弧菌和志贺氏菌的快速检测。

### 2 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：

- 2.1 实时荧光 PCR 仪。
- 2.2 冷冻离心机：12000 r/min，4 ℃。
- 2.3 均质器。
- 2.4 恒温空气振荡摇床：36 ℃±1 ℃、30 ℃±1 ℃、42 ℃±1 ℃。
- 2.5 恒温水浴锅：95 ℃±1 ℃。
- 2.6 天平：感量 0.01 g。
- 2.7 冰箱：2 ℃~5 ℃、-20 ℃。
- 2.8 微量移液器：0.1 μL-2.5 μL、1 μL-10 μL、10 μL-100 μL、100 μL-1000 μL。
- 2.9 灭菌吸头：10 μL、200 μL、1000 μL。
- 2.10 厌氧培养装置。
- 2.11 灭菌 1.5 mL 离心管。

### 3 试剂与培养基

- 3.1 PCR 实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格，121 ℃ 高压灭菌 30 min。
- 3.2 Taq DNA 聚合酶：5 U/μL。
- 3.3 脱氧核苷酸三磷酸（dNTP）：10 mmol/L。
- 3.4 DNA 提取试剂：称取 0.1 g chelex 100 粉末，加入灭菌蒸馏水定容至 100 mL，保存于-20 ℃ 备用；或使用商品化的 DNA 提取试剂盒。
- 3.5 10×PCR 缓冲液：200 mmol/L Tris-HCl（pH 8.4），200 mmol/L 氯化钾，15 mmol/L 氯化镁。
- 3.6 引物和探针：引物和探针序列见附录 A，加水稀释至 10 μmol/L，其中探针的 5'端标记 FAM，3'端标记 TAMRA。

#### 3.7 培养基

- 3.7.1 7.5%氯化钠肉汤：见 GB 4789.10。

- 3.7.2 缓冲蛋白胨水 (BPW)：见 GB 4789.4。
- 3.7.3 亚硒酸盐胱氨酸 (SC) 增菌液：见 GB 4789.4。
- 3.7.4 四硫磺酸钠煌绿 (TTB) 增菌液：见 GB 4789.4。
- 3.7.5 李氏增菌肉汤 LB (LB1, LB2)：见 GB 4789.30。
- 3.7.6 改良 EC 肉汤 (mEC+n)：见 GB 4789.36。
- 3.7.7 3%氯化钠碱性蛋白胨水：见 GB 4789.7。
- 3.7.8 志贺氏菌增菌肉汤-新生霉素：见 GB 4789.5。

## 4 操作步骤

### 4.1 样品制备和增菌培养

#### 4.1.1 金黄色葡萄球菌

样品处理步骤按照GB 4789.10进行,将处理后的7.5%氯化钠肉汤样品匀液放置于恒温空气振荡摇床中, 36 ℃±1 ℃, 200 r/min振摇8 h。

#### 4.1.2 沙门氏菌

样品处理步骤按照 GB 4789.4 进行,将处理后的 BPW 样品匀液放置于恒温空气振荡摇床中,36 ℃±1 ℃、200 r/min 振摇 4 h。从培养后的样品匀液中移取 1 mL, 转接种于 10 mL SC 增菌液, 置于 36 ℃±1 ℃ 恒温空气振荡摇床, 200 r/min 振摇 4 h。另取 1 mL, 转接种于 10 mL TTB 增菌液, 置于 42 ℃±1 ℃ 恒温空气振荡摇床, 200 r/min 振摇 4 h。

#### 4.1.3 单核细胞增生李斯特氏菌

样品处理步骤按照GB 4789.30进行,将处理后的LB1样品匀液放置于恒温空气振荡摇床中, 30 ℃±1 ℃、200 r/min振摇4 h; 移取0.1 mL, 转种于10 mL LB2 增菌液内, 30 ℃±1 ℃, 200 r/min振摇4 h。

#### 4.1.4 大肠埃希氏菌 O157: H7

样品处理步骤按照GB 4789.36进行,将处理后的改良EC肉汤样品匀液放置于恒温空气振荡摇床中, 36 ℃±1 ℃, 200 r/min振摇8 h。

#### 4.1.5 副溶血性弧菌

样品处理步骤按照GB 4789.7进行,将处理后的3%氯化钠碱性蛋白胨水样品匀液放置于恒温空气振荡摇床中, 36 ℃±1 ℃, 200 r/min振摇8 h。

#### 4.1.6 志贺氏菌

样品处理步骤按照GB 4789.5进行,将处理后的志贺氏菌增菌肉汤样品匀液放置于厌氧培养装置中, 41.5 ℃±1 ℃厌氧培养8 h。

### 4.2 致病菌 DNA 提取

分别取4.1培养后的增菌液1 mL, 加入1.5 mL无菌离心管中, 8000 r/min离心5 min, 吸弃上清; 加入 50 μL DNA提取试剂(使用前室温解冻并充分混匀, 快速吸取), 混匀后置于95 ℃±1 ℃水浴5 min, 12000 r/min, 4 ℃离心5 min, 取上清, -20 ℃保存, 作为模板DNA备用。

注: 也可使用商品化的细菌DNA提取试剂盒, 按照试剂盒说明书操作提取致病菌DNA。

### 4.3 实时荧光 PCR 检测

4.3.1 配置 PCR 反应体系 (25  $\mu\text{L}$ ): 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ , 引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , 探针 1  $\mu\text{L}$ , dNTP 1  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 无菌水 17  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ 。

4.3.2 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火延伸 40 s, 进行 40 个循环。

注: PCR反应参数可根据PCR仪型号的不同进行适当的调整。

4.3.3 检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照为阳性标准菌株 DNA, 阴性对照为用无菌水代替样品进行增菌得到的 DNA 提取液, 空白对照为无菌水。

### 4.4 实验结果与判定

阳性对照应出现典型扩增曲线, Ct值 $<30$ ; 同时, 阴性对照和空白对照应无扩增曲线, Ct值 $\geq 40$ ; 否则, 实验视为无效, 需重新实验。实验结果Ct值 $\geq 40$ , 可判定样品结果为阴性, 直接报告目标致病菌未检出; Ct值 $\leq 35$ , 样品结果为阳性; Ct值 $>35$ 而 $<40$ , 为可疑结果。阳性结果与可疑结果须按照相应 GB 4789标准进行检验, 根据国家标准方法得出的结果判定。

### 4.5 检测过程中防止交叉污染及生物安全要求

检测过程中防止交叉污染按照GB/T 27403中的规定执行, 实验室生物安全要求应符合GB 19489的规定。

附 录 A  
(规范性附录)

致病菌实时 PCR 检测所用引物和探针序列

A.1 致病菌实时荧光PCR法中所用的引物探针序列见表A.1。

表A.1 致病菌实时 PCR 检测所用引物和探针序列

致病菌名称	引物序列	探针序列	靶基因名称及 GenBank 编码
副溶血性弧菌	5'-GCG ACC TTT CTC TGA AAT ATT AAT TGT-3'	5'-CGC ACA AGG CTC GAC GGC TGA-3'	VP0819(NC_004603.1)
	5'-CAT TCG CGT GGC AAA CAT C-3'		
金黄色葡萄球菌	5'-AAA TTA CAT AAA GAA CCT GCG ACA-3'	5'-AAT TTA ACC GTA TCA CCA TCA ATC GCT TT-3'	SA0UHSC_00818(NC_007795.1)
	5'-GAA TGT CAT TGG TTG ACC TTT GTA-3'		
单核细胞增生李斯特氏菌	5'-CTG AAT CTC AAG CAA AAC CTG GT-3'	5'-ATA CGA TAA CAT CCA CGG CTC TGG CTG G-3'	iap(NC_003210.1)
	5'-CGC GAC CGA AGC CAA CTA-3'		
沙门氏菌	5'-CCA GTT TAT CGT TAT TAC CAA AGG-3'	5'-CTC TGG ATG GTA TGC CCG GTA AAC A-3'	invA(NC_003197.2)
	5'-ATC GCA CCG TCA AAG GTC-3'		
大肠埃希氏菌 O157:H7	5'-TTT CAT ACT TAT TGG ATG GTC TCA A-3'	5'-AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG-3'	ECs2841(NC_002695.1)
	5'-CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT-3'		
志贺氏菌	5'-CGC AAT ACC TCC GGA TTC C-3'	5'-AAC AGG TCG CTG CAT GGC TGG AA-3'	ipaH4.5(NC_007607.1)
	5'-TCC GCA GAG GCA CTG AGT T-3'		