

## 实验技术与方法

## 环介导等温扩增方法在食品中沙门菌检测的应用和评价

张蕾<sup>1,2</sup>, 张海予<sup>2</sup>, 魏海燕<sup>1</sup>, 张西萌<sup>1</sup>, 程晋霞<sup>1,2</sup>, 曾静<sup>2</sup>

(1. 北京出入境检验检疫局, 北京 100026; 2. 北京农学院, 北京 102206)

**摘要:**目的 将环介导等温扩增检测方法应用于食品中沙门菌的检验,并在检测方法特异性、灵敏度等方面与实时荧光 PCR 和传统检测方法进行比较。方法 针对沙门菌属高度保守的 *fimY* 基因设计环介导等温扩增检测引物并优化反应体系,在特异性、灵敏度和实际样品检测等方面与实时荧光 PCR 及传统检测方法比对。结果 本研究建立的 LAMP 方法检测沙门菌 93 株和非目标菌 31 株,具有良好的特异性。在纯培养、无需增菌情况下,其检测灵敏度为  $6.4 \times 10^2$  cfu/ml,与实时荧光 PCR 方法相当。食品基质添加试验中,环介导等温扩增方法检测低限为 2 cfu/25 g 样品;对 45 份实际食品样品检测结果表明,该方法实际样品检出率为 11.1%,与实时荧光 PCR 及传统方法检测结果一致。结论 本研究建立的沙门菌环介导等温扩增检测方法具有良好的特异性,检测灵敏度与实时荧光 PCR 相当,适用于沙门菌的快速筛选。

**关键词:**沙门菌; *fimY* 基因; 环介导等温扩增; 实时荧光 PCR; 食源性致病菌

中图分类号: R155.5; TS207.4 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)06-0520-05

### Application and evaluation of loop-mediated isothermal amplification method for detecting of *Salmonella* spp. in food

ZHANG Lei, ZHANG Hai-yu, WEI Hai-yan, ZHANG Xi-meng, CHENG Ji-xia, ZENG Jing  
(Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

**Abstract: Objective** The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection method was applied to detect *Salmonella* spp. in food. The specificity and sensitivity of this method were compared with real-time PCR and conventional detection method. **Methods** The *fimY* gene of *Salmonella* spp. was used to design LAMP primers, and then optimized LAMP reaction system. LAMP method was compared with real-time PCR and conventional detection methods in some aspects, such as specificity, sensitivity and practical food samples detection. **Results** The specificity of LAMP method was tested by using 93 targets and 31 non-targets bacteria. The results showed that the LAMP method was highly specific to *Salmonella* spp.. No cross-reaction was founded. In pure culture, the sensitivity of LAMP was  $6.4 \times 10^2$  cfu/ml, which was consistent with real-time PCR method. The detection limit of LAMP reached 2 cfu/25 g in base-material addition test. The detection of 45 practical food samples showed the detection rate of LAMP was 11.1%, which was as same as real-time PCR and traditional methods. **Conclusion** The LAMP detection method of *Salmonella* spp. established in this study has good specificity and sensitivity, which can apply to the rapid detection of *Salmonella* spp..

**Key words:** *Salmonella* spp.; *fimY* gene; LAMP; real-time PCR; food-borne pathogen

沙门菌(*Salmonella* spp.)是一种重要的人畜共患病致病菌,在自然界中分布极为广泛,主要经消化道感染,引起伤寒、副伤寒和急性胃肠炎等特征性临床症状<sup>[1]</sup>。人类经食用被沙门菌(常见的沙门菌有鼠伤寒沙门菌、猪霍乱沙门菌、肠炎沙门菌等)污染的食物而感染发病,严重威胁着食品安全和人

们的身体健康<sup>[2-3]</sup>。引起沙门菌中毒的食品中,约 90% 是蛋、肉、奶等畜产品<sup>[4]</sup>。因此,建立一种快速、有效的沙门菌检测方法是减少人类沙门菌食物中毒、保护人民群众身体健康的重要措施。目前,沙门菌的检测方法主要是传统的细菌分离鉴定方法,检测一般需要 4~5 d 的时间,PCR 和 real-time PCR (RT-PCR)<sup>[5-9]</sup> 方法虽然敏感、快速,但存在仪器设备昂贵、电泳过程繁琐等缺点,使其难以在基层普及和推广。环介导等温扩增(loop mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新颖的核酸扩增技术,具有简单、特异、快速、灵敏等优点,适合在基层实验室应用与开展。LAMP 技术的关键是靶基

收稿日期:2013-06-25

基金项目:国家质检总局公益性行业科研专项(201110034)

作者简介:张蕾 女 硕士 研究方向为食品安全与控制

E-mail: zlei0605@ yahoo. cn

通讯作者:曾静 女 研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail: zengj@ bjciq. gov. cn

因的选择,目前利用 LAMP 技术检测沙门菌的报道中,多以沙门菌侵袭蛋白 *invA* 基因作为靶基因,而在沙门菌属中利齐菲尔沙门菌(*S. litchfield*)和山夫登堡沙门菌(*S. senftenberg*)不含有该基因<sup>[10]</sup>,因此选择 *invA* 基因为靶基因势必会造成这 2 种沙门菌的漏检。此外,*invA* 基因广泛存在于肠杆菌科细菌中,以此作为检测靶基因,也可造成检测假阳性。研究表明,*fimY* 基因是沙门菌属独有的基因且高度保守,是理想的检测靶基因<sup>[11-12]</sup>。本研究选择沙门菌 *fimY* 基因设计沙门菌 LAMP 检测引

物,通过荧光信号判断 LAMP 反应的技术和设备,建立沙门菌 LAMP 检测方法,并与 RT-PCR 方法及传统检测方法比对,旨在建立切实可行、简单高效的沙门菌检测技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

本试验所用菌株信息见表 1。

表 1 试验菌株及编号

Table 1 Test strains and strain number

序号	菌株	菌株编号	序号	菌株	菌株编号	序号	菌株	菌株编号
1	肠炎沙门菌	CMCC 50041	13	河流弧菌	ATCC 1.1611	25	痢疾志贺菌	CMCC 51252
2	甲型副伤寒沙门菌	CMCC 50001	14	拟态弧菌	ATCC 1.1969	26	阪崎肠杆菌	ATCC 29544
3	鼠伤寒沙门菌	CMCC 50115	15	溶藻弧菌	ATCC 1.1607	27	枸橼酸杆菌	CMCC 48017
4	单核细胞增生李斯特菌	ATCC 15313	16	溶藻弧菌	ATCC 1833	28	丙型溶血性链球菌	CMCC 32206
5	格氏李斯特菌	ATCC 700545	17	费尼斯弧菌	ATCC 1.1612	29	乙型溶血性链球菌	CMCC 32210
6	西尔李斯特菌	ATCC 35967	18	解蛋白弧菌	ATCC 1.1826	30	小肠结肠炎耶尔森菌	CMCC 52212
7	英诺克李斯特菌	ATCC 33090	19	肺炎克雷伯菌	CGMCC 1.1736	31	大肠杆菌	ATCC 25922
8	默氏李斯特菌	ATCC 2540	20	阴沟肠杆菌	CGMCC 1.57	32	金黄色葡萄球菌	ATCC 25923
9	伊氏李希特菌	ATCC 19119	21	腊样芽孢杆菌	ATCC 11778	33	铜绿假单胞菌	ATCC 15442
10	威氏李斯特菌	ATCC 35897	22	表皮葡萄球菌	ATCC 12228	34	粪肠球菌	CGMCC 1.2135
11	副溶血性弧菌	ATCC 17802	23	马红球菌	ATCC 6936	35	沙门菌	分离株 90 株
12	创伤弧菌	ATCC 1758	24	福氏志贺菌	CMCC 51571			

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

LAMP 扩增仪 (QIAGEN)、实时荧光定量 PCR 仪 (7900, Life)、恒温加热块、微量移液器 (10、100、200、1 000  $\mu\text{l}$ , Eppendorf)、恒温培养箱。

甜菜碱 (5 mol/L)、dNTP (10 mmol/L, 上海生工)、 $\text{MgSO}_4$  (50 mmol/L)、Bst DNA 聚合酶 (8 U/ $\mu\text{l}$ , NEB)、 $10 \times$  ThermoPol 缓冲液 (1  $\times$  ThermoPol 缓冲液含 0.1% TritonX-100、10 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、10 mmol/L KCl、20 mmol/L Tris-HCl, NEB)、钙黄绿素荧光染料 (广州迪澳生物技术有限公司)、TaqMan Gene Expression Master Mix (稀释倍数 2  $\times$ , Life)、缓冲蛋白胨水培养基 (Buffered Peptone Water, BPW, 北京陆桥有限责任公司)、碱性蛋白胨水培养基 (Alkaline Peptone Water, APW, 北京陆桥有限责任公司)、脑心浸液琼脂培养基 (Brain-Heart Infusion Agar, BHI, 北京陆桥有限责任公司)、RVS 肉汤 (Rappaport-Vassiliadis Soya Broth, 北京陆桥有限责任公司)、MKTtn 肉汤基础及添加剂 (Muller-kauffman Tetrathionate Novobiocin Broth Base, 北京陆桥有限责任公司)、XLD 琼脂 (Xylose Lysine Deoxycholate Agar, BD)、煌绿磺胺嘧啶琼脂 (Brilliant Green Sulfadiazine Agar, BGA, 北京陆桥有

限责任公司),引物由上海生工合成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细菌 DNA 的提取

热裂解法提取 DNA:取 1 ml 增菌液,10 000 r/min 离心 2 min,用 50  $\mu\text{l}$  无菌水重悬,沸水裂解 10 min,冰浴 5 min,10 000 r/min 离心 2 min,取 50  $\mu\text{l}$  上清液作为 DNA 模板,  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.2.2 平板菌落计数

参照 GB 4789.2—2010<sup>[13]</sup>,将沙门菌 CMCC 50041 接种到 BPW 培养基,36  $^\circ\text{C}$  过夜培养,制备 10 倍系列稀释菌悬液,吸取 1 ml 菌悬液于无菌平皿内,每个稀释度做两个平行,用冷却至 46  $^\circ\text{C}$  的平板计数 BHI 琼脂培养基倾注平皿,36  $^\circ\text{C}$  培养 (24  $\pm$  2) h,进行计数。

### 1.2.3 LAMP 方法

LAMP 引物:靶基因选择沙门菌 *fimY* 基因 (NCBI 收录号 M90677)。应用引物设计软件 PrimerExplorer 4.0 设计的引物序列包括:外侧上游引物 F3 (5' -GCTGGTATCA GATAAACCT C-3')、外侧下游引物 B3 (5' -GCCTTGCCT AAAGTTTC-3')、内侧上游引物 FIP (5' -AGGCCAGATTTTGTGTCGCGC CGCTATAACA CAGTTTATCC G-3')、内侧

下游引物 BIP (5'-ACGCGAAGCC TTGTTATCAG ATCAACCAGT CAGTACGG-3')、环状上游引物 LF (5'-GGACAAAAA ACGCCCAGCC-3')、环状下游引物 LB (5'-CCTCCAAACC TCGCTTATCG G-3')。

25  $\mu\text{l}$  反应体系包括 10  $\times$  ThermoPol 缓冲液 12.5  $\mu\text{l}$ , F3、B3 各 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , FIP、BIP 各 1.8  $\mu\text{mol/L}$ , LF、LB 各 0.8  $\mu\text{mol/L}$ , dNTPs 1.6 mmol/L,  $\text{MgSO}_4$  6.0 mmol/L, 甜菜碱 1 mol/L, Bst DNA 聚合酶 1  $\mu\text{l}$ , DNA 模板 3  $\mu\text{l}$ , 其余体系用无菌水补足。

LAMP 反应条件: 65  $^{\circ}\text{C}$  培养 60 min, 反应结束后通过荧光信号图判定反应结果。

#### 1.2.4 RT-PCR 方法

RT-PCR 引物: 选择 *fimY* 基因为靶基因, 应用引物设计软件 PrimerExpress 3.0 设计引物序列。上游引物 Sal-F (5'-AAACCTCGCT TATCGGAAAG C-3')、下游引物 Sal-R (5'-CCTTGGCGCTA AAGTTTCAAT CA-3') 和探针 Sal-T (5'-FAM-TTAGCCGTACTGA CTGGTT-TAMRA-3')。

25  $\mu\text{l}$  反应体系中包括 2  $\times$  TaqMan Gene Expression Master Mix 12.5  $\mu\text{l}$ , Sal-F、Sal-R、Sal-T 各 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , DNA 模板 3  $\mu\text{l}$ , 蒸馏水 6.5  $\mu\text{l}$ 。反应程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 40 个循环。

#### 1.2.5 LAMP 检测灵敏度

按照 1.2.2 方法制备 CMCC 50041 的菌悬液并平板计数。取 1 ml 各梯度稀释液进行 LAMP 及 RT-PCR 检测; 同时各稀释度菌悬液取 1 环划线 XLD 琼脂培养基, 参照 ISO 6579—2002<sup>[14]</sup> 方法。在灵敏度比对试验过程中同时进行杂菌干扰试验, 选择两种非目标菌单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC 15313、大肠杆菌 ATCC 25922, 两个干扰浓度分别为  $10^4$  和  $10^6$  cfu/ml。

#### 1.2.6 食品基质添加试验

添加基质为经传统方法验证无沙门菌的 5 种食品 (包括牛肉、鸡肉、鱼肉、牛奶和麦片, 均购于京客隆超市甜水园店) 基质。试验过程结合 ISO 6579—2002 方法如下: (1) 按照 1.2.2 方法制备 CMCC 50041 梯度稀释菌悬液并平板计数; (2) 前增菌: 称取 25 g 食品样品加入 225 ml BPW 中, 胃蠕动器混匀 30 s, 如此制备多份样品匀浆液, 每份匀浆液添加 1 ml 经梯度稀释的目标菌悬液, 另设不添加菌悬液的匀浆液为阴性对照, 36  $^{\circ}\text{C}$  培养 (18  $\pm$  2) h; 取 1 ml 前增菌液提取 DNA 进行 LAMP 和 RT-PCR 检测; (3) 选择性增菌: 取前增菌液 0.1 ml 分别接种于 10 ml RVS 肉汤和 MKTTn 肉汤中, RVS 肉汤置于 41.5  $^{\circ}\text{C}$  培养 (24  $\pm$  3) h, MKTTn 肉汤置于 36  $^{\circ}\text{C}$  培养 (24  $\pm$  3) h; 取 1 环增菌液分别划线 XLD 琼脂平板和 BGA 琼脂平板, 参照 ISO 6579—2002 方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAMP 检测特异性

采用 93 株沙门菌, 包括本实验室分离株 90 株、肠炎沙门菌 CMCC 50041、甲型副伤寒沙门菌 CMCC 50001、鼠伤寒沙门氏菌 CMCC 50115, 以及 31 株非目标菌株, 对于 LAMP 和 RT-PCR 引物特异性进行了测试, 结果见表 2。特异性验证结果表明, 所设计的 LAMP 引物具有良好的特异性, 与非目标菌不存在交叉反应。

表 2 LAMP 与 RT-PCR 检测特异性

菌株名称	LAMP	RT-PCR
肠炎沙门菌 CMCC 50041	+	+
甲型副伤寒沙门菌 CMCC 50001	+	+
鼠伤寒沙门菌 CMCC 50115	+	+
90 株沙门菌分离株	+	+
31 株非沙门菌标准菌株	-	-

注: + 表示反应阳性; - 表示反应阴性

### 2.2 LAMP 检测灵敏度

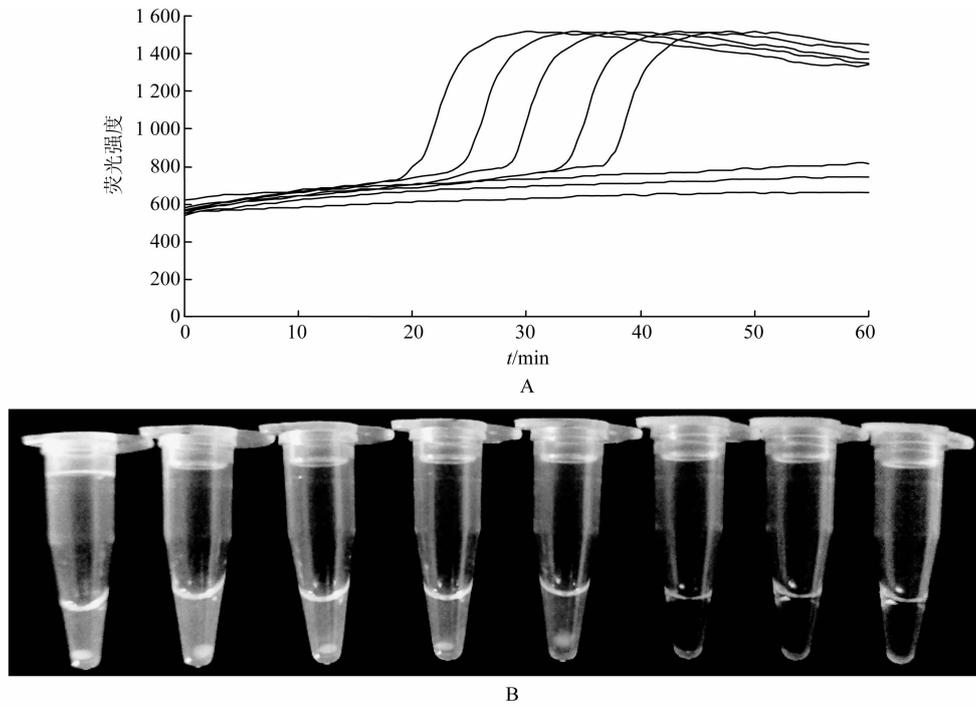
将参比菌株 CMCC 50041 过夜培养物进行梯度稀释, 从  $6.4 \times 10^6$  cfu/ml 菌体浓度水平进行 LAMP 方法检测灵敏度的测试, 结果如图 1 所示。该方法可检测到  $6.4 \times 10^2$  cfu/ml 菌悬液, 与 RT-PCR 检测灵敏度 (图 2) 一致。同时采用 ISO 6579—2002 方法进行检测, 该方法的检测灵敏度为  $6.4 \times 10^4$  cfu/ml。因此, LAMP 检测灵敏度与 RT-PCR 检测水平相当, 比传统检测方法高 100 倍。此外, 在杂菌存在的情况下, LAMP 及 RT-PCR 两种检测方法的灵敏度未受影响, 而传统方法中, XLD 琼脂培养基有非特征菌落生长, 影响检测结果的判断。因此, LAMP 及 RT-PCR 方法与传统方法相比具有更强的抗杂菌干扰能力。

### 2.3 食品基质添加试验

由食品基质添加试验结果 (表 3) 可知, LAMP、RT-PCR 和 ISO 6579—2002 三种方法的检测低限均可达 2 cfu/25 g 样品。其中, 以鱼肉为食品基质, 目标菌添加浓度为 2 cfu/25 g 样品时, LAMP 和 ISO 6579—2002 方法的检测结果为阳性, 而 RT-PCR 的检测结果为阴性, 可能是由于样品增菌液中存在 PCR 抑制剂, 从而影响了 RT-PCR 的检测结果。总体看来, LAMP 与 ISO 6579—2002 检测结果一致。

### 2.4 实际食品样品的检测

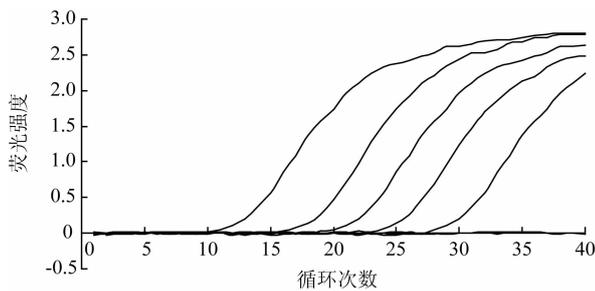
购买不同种类的食品按照 LAMP、RT-PCR 和 ISO 6579—2002 三种方法进行检测, 检测结果如表 4 所示。5 类食品样品, 共 45 批, 三种检测方法同样检出 5 份阳性样品, 检出率为 11.1%。



注: A: LAMP 荧光信号图, 横坐标从左到右出现扩增曲线依次是:  $6.4 \times 10^6$ 、 $6.4 \times 10^5$ 、 $6.4 \times 10^4$ 、 $6.4 \times 10^3$ 、 $6.4 \times 10^2$  cfu/ml 菌液; B: LAMP 显色图, 从左到右依次是:  $6.4 \times 10^6$ 、 $6.4 \times 10^5$ 、 $6.4 \times 10^4$ 、 $6.4 \times 10^3$ 、 $6.4 \times 10^2$ 、64、6.4 cfu/ml 菌液和阴性对照

图 1 LAMP 检测灵敏度

Figure 1 The sensitivity of LAMP



注: 横坐标从左到右出现扩增曲线依次是  $6.4 \times 10^6$ 、 $6.4 \times 10^5$ 、 $6.4 \times 10^4$ 、 $6.4 \times 10^3$ 、 $6.4 \times 10^2$  cfu/ml 菌液

图 2 RT-PCR 检测灵敏度

Figure 2 The sensitivity of RT-PCR

### 3 讨论

本研究根据沙门菌 *fimY* 基因设计 6 条 LAMP 引物, 优化并建立了 LAMP 反应体系和反应条件。在反应体系中加入含有  $MnCl_2$  的钙黄绿素荧光染料, 反应结果可在白光下肉眼观察是否产生绿色钙锰复合物来判断靶基因存在与否, 亦可通过 LAMP 实时荧光信号直接判定结果。特异性验证结果表明, 该 LAMP 方法检测 3 株沙门菌标准菌株及 90 株沙门菌分离株均为阳性, 31 株非目标菌均为阴性, 具有良好的特异性。其检测灵敏度为  $6.4 \times 10^2$  cfu/ml,

表 3 食品基质添加试验结果

Table 3 The result of base-material addition test

基质名称	沙门菌初始添加浓度/(cfu/25 g)								
	$2 \times 10^1$			2			阴性对照		
	LAMP	RT-PCR	ISO 6579—2002	LAMP	RT-PCR	ISO 6579—2002	LAMP	RT-PCR	ISO 6579—2002
牛肉	+	+	+	+	+	+	-	-	-
鸡肉	+	+	+	+	+	+	-	-	-
鱼肉	+	+	+	+	-	+	-	-	-
牛奶	+	+	+	+	+	+	-	-	-
麦片	+	+	+	+	+	+	-	-	-

注: + 表示反应阳性; - 表示反应阴性

表 4 实际样品检测结果

Table 4 The detection result of practical samples

食品样品类别	批数	阳性结果批数		
		LAMP	RT-PCR	ISO 6579—2002
肉制品	5	1	1	1
海产制品	11	0	0	0
杂品	17	2	2	2
奶制品	5	0	0	0
家禽	7	2	2	2
阳性样品总数		5	5	5
检出率/%		11.1	11.1	11.1

与实时荧光 PCR 方法相当, 并且在杂菌存在的情况下, 其检测灵敏度未受到影响。食品基质添加试验中, LAMP 检测低限为 2 cfu/25 g 样品, 其检测结果不易受到样品基质的影响。为了进一步验证本研究建立的沙门菌 LAMP 检测方法的应用性, 对 45 份实际食品样品进行检测, 其检测结果与实时荧光 PCR 及 ISO 6579—2002 检测结果一致, 检出率为 11.1%。

实时荧光 LAMP 技术的主要优点在于:动态实时监测,能直观地反映整个 LAMP 过程的动态变化;除加样时一次开盖外,全闭管操作,因而能有效地防止因扩增产物污染而导致的假阳性<sup>[15-16]</sup>。此外,气溶胶污染是造成 LAMP 结果出现假阳性的主要原因,也是 LAMP 技术存在的主要问题,其主要原因可能是由于 LAMP 检测技术的灵敏度较高,易受到扩散至反应体系中的气溶胶影响。在操作过程中注意通风,反应完成后避免开盖并及时处理反应产物,反应体系配制过程中注意更换移液枪头,以上措施可有效防止假阳性的出现。本次建立的沙门菌 LAMP 检测方法快速、特异,无需昂贵的仪器即可判读结果;检测时间短,整个过程从 DNA 提取至检测完成只需要 1.5 h 左右,较其他方法有效地缩短了检测时间;操作简单,检验成本低,便于批量检测。综上,本研究建立的沙门菌 LAMP 检测方法简单经济,适用于现场检测,具有在我国县一级疾病预防控制中心实验室或小型医院实验室应用的良好前景。

## 参考文献

- [ 1 ] 赵贵,张华. 畜产品中沙门氏菌的危害及检测方法概述[J]. 贵州畜牧兽医,2004,28(3):122.
- [ 2 ] Danylu K M D, Harris L J, Schaffner D W. Monte carlo simulations assessing the risk of salmonellosis from consumption of almonds[J]. J Food Prot,2006,69(7):1594-1599.
- [ 3 ] Sagoo S K, Little C L, Greenwood M, et al. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom[J]. Food Microbiol, 2009,26(1):39-43.
- [ 4 ] Riemann H, Himathongkham S, Willoughby D, et al. A survey for Salmonella by drag swabbing manure piles in California egg ranches[J]. Avian Dis,1998,42(1):67-71.
- [ 5 ] O'Regan E, McCabe E, Burgess C, et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple Salmonella serotypes in chicken samples[J]. BMC Microbiol,2008,8:156.
- [ 6 ] Park H J, Kim H J, Park S H, et al. Direct and quantitative analysis of Salmonella enterica serovar Typhimurium using real-time PCR from artificially contaminated chicken meat [J]. J Microbiol Biotechnol,2008,18(8):1453-1458.
- [ 7 ] Nath G, Maurya P, Gulati A K. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella Typhi* strains isolated over a period of two decades[J]. Infect Genet Evol,2010,10(4):530-536.
- [ 8 ] CHEN J, ZHANG L, Paoli G C, et al. A real-time PCR method for the detection of Salmonella enterica from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis [J]. Int J Food Microbiol,2010,137(2/3):168-174.
- [ 9 ] 唐梦君,周生,张小燕,等. 检测鸡蛋中沙门氏菌的 LAMP 方法的建立及初步应用[J]. 安徽农业大学学报,2011,38(1):43-47.
- [ 10 ] 王俊红,王艳明. 沙门氏菌的致病性和耐药性研究进展[J]. 畜牧市场,2007,8(4):43-44,46.
- [ 11 ] Yeh K S, CHEN T H, LIAO C W, et al. PCR amplification of the *Salmonella typhimurium fimY* gene sequence to detect the *Salmonella* species[J]. Int J Food Microbiol,2002,78(3):227-234.
- [ 12 ] 徐义刚,崔丽春,杨君宏,等. 食品中沙门氏菌 DNA 环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. 中国兽医科学,2010,40(5):452-458.
- [ 13 ] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 2—2010 食品微生物学检验菌落总数测定[S]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [ 14 ] ISO. ISO 6579—2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection and enumeration of *Salmonella* spp. [S]. 2002-07-15.
- [ 15 ] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA [J]. Biochem Biophys Methods,2004,59(2):145-157.
- [ 16 ] Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T. Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplication products [J]. Biochem Biophys Res Commun,2002,290(4):1195-1198.

## · 法规文件 ·

# 食药总局关于印发《食品安全风险监测管理规范(试行)》等四个文件的通知

食药监食监三〔2013〕215号

各省、自治区、直辖市食品药品监督管理局,中国食品药品检定研究院、中国计量科学研究院、中国标准化研究院,各有关风险监测承检机构:

为加强和规范食品安全风险监测工作,根据《中华人民共和国食品安全法》、《中华人民共和国食品安全法实施条例》等法律法规和国务院赋予国家食品药品监督管理总局的职责,食品药品监管总局制定了《食品安全风险监测管理规范(试行)》、《食品安全风险监测问题样品信息报告和核查处置规定(试行)》、《食品安全风险监测承检机构管理规定(试行)》和《食品安全风险监测样品采集技术要求》,现印发你们,请遵照执行。执行中发现的问题,及时向食品药品监管总局报告。

附件:1. 食品安全风险监测管理规范(试行)

2. 食品安全风险监测问题样品信息报告和核查处置规定(试行)

3. 食品安全风险监测承检机构管理规定(试行)

4. 食品安全风险监测样品采集技术要求

(相关链接:<http://www.cfd.com.cn/newsdetail.aspx?id=65958>)

国家食品药品监督管理总局

二〇一三年十月十日