

附件 1

ICS 67.050

M745

团 体 标 准

T/CAQI XX—20XX

食品及食品包装表面中新型冠状病毒采样与
实时荧光 RT-PCR 检测方法

**Sampling and Real-time RT-PCR assay for detection
of novel coronavirus in food and food packaging
surface**

(征求意见稿)

20XX - XX - XX 发布

20XX - XX - XX 实施

中 国 质 量 检 验 协 会 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。本标准由中国检验检疫科学研究院综合检测中心提出，由中国质量检验协会归口。

本标准主要起草单位：中国检验检疫科学研究院综合检测中心，湖南赫西仪器装备有限公司，赫斯缇亚(北京)生物科技有限公司，北京森康生物技术开发有限公司，北京戴纳实验科技有限公司，鲲鹏基因(北京)科技有限责任公司，北京服装学院，新疆塔里木大学，中检科创(北京)测试认证有限责任公司，国正检验认证有限公司，北京卓诚惠生生物科技股份有限公司，北京化工大学环渤海生物产业研究院。

本标准主要起草人：乐粉鹏、李强、丁凯、寻继勇、迟海鹏、魏晓宏、王梓、袁吉泽、胡孔新、刘丽娟、江丽、龚研成、周立成、赵亚洲、郭汉文、王斌、李鹏程。

引 言

2019 年 12 月以来，全世界爆发新型冠状病毒肺炎（Corona Virus Disease 2019, COVID-19），简称“新冠肺炎”。卫生检疫专家确定新冠肺炎传播途径主要为呼吸道飞沫传播和接触传播，呼吸道飞沫传播可以通过佩戴口罩来进行阻断，人体、环境以及食品的直接接触成为造成新冠肺炎传播的潜在风险。

本标准在满足《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南》（国卫办疾控函〔2020〕156 号）的前提下，进一步规范食品及食品包装表面中新冠病毒的检测方法。目前国内尚未建立食品及食品包装中新型冠状病毒采样及检测的相关标准，本标准的推出将填补国家在食品及食品包装中采集及检测新冠病毒标准的空白，形成统一的采样和核酸检测操作规程。

本标准中涉及到的实验室生物安全要求及人员防护要求应按照《医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册（试行）》、《新型冠状病毒实验室生物安全指南（第二版）》等相关国家规定执行。

高风险地区样品采集及检测工作应在当地实验室进行，防止样品跨区域运输产生污染。

当使用本标准方法检测出阳性样品，应履行国家相关管理要求。

食品及食品包装表面中新型冠状病毒采样与实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了食品及食品包装表面中新型冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法。其中包括检测试剂、仪器设备、实验操作步骤、实验室生物安全、样品采集、保存。本标准适用于食品及食品包装表面中新型冠状病毒的检测。

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。

《医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册（试行）》（联防联控机制医疗发〔2020〕271号）

《新型冠状病毒实验室生物安全指南（第二版）》（国卫办科教函〔2020〕70号）

《农贸（集贸）市场新型冠状病毒环境监测技术规范》（联防联控机制综发〔2020〕221号）

《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南》（国卫办疾控函〔2020〕156号）

《特定场所消毒技术方案》（国卫办疾控函〔2020〕156号）

3 试剂

3.1 样品采集试剂

病毒采样液可选择以下试剂：组织培养液（MEM、RPMI1640 培养液等）、缓冲液（HANKS 液、PBS 缓冲液等）、添加有 RNA 稳定剂的溶液、等渗液（生理盐水等）或商品化采样试剂盒。（建议直接选取商品化无菌病毒采样管，内含采样拭子）。

3.2 RNA 提取试剂

选取商品化的病毒 RNA 提取试剂盒。

3.3 基因位点

本标准中的核酸检测方法主要针对新型冠状病毒基因组中开放读码框 1ab（open reading frame 1ab, ORF1ab）、核壳蛋白（nucleocapsid protein, N）以及包膜蛋白（envelope protein, E）。

核酸扩增试剂至少含 COVID-19 基因的两个位点（开放读码框 1a/b、核壳蛋白 N），也可包含另一个位点（包膜蛋白基因 E），可根据需求选择。其他通过国家注册的试剂盒中提出的基因位点也可以使用。

靶标一（ORF1ab）：

正向引物（F）：CCCTGTGGGTTTTACACTTAA

反向引物（R）：ACGATTGTGCATCAGCTGA

荧光探针（P）：5'-FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BHQ1-3'

靶标二（N）：

正向引物（F）：GGGGAACTTCTCCTGCTAGAAT

反向引物（R）：CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG

荧光探针（P）：5'-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA-3'

靶标基因三（E）：

正向引物（F）：TGCGTACTGCTGCAAT

反向引物（R）：GGA ACTCTAGAAGAATTCAGAT

荧光探针（P）：5'-FAM-TTAACGTGAGTCTTGTA AAAACCTTCTT-BHQ1-3'

3.4 消毒剂

75%乙醇、0.2%含氯消毒剂或其他有效消毒剂。

4 仪器设备

4.1 必备设备：

分析天平、高速离心机、震荡仪、水浴锅、荧光定量 PCR 仪、冰箱、生物安全柜、可调移液器。

4.2 可选设备：

核酸提取仪、真空离心浓缩仪、组织研磨仪、乙醇水分含量的快速测定仪、方舱式核酸检测实验室。

5 操作步骤

5.1 样品采集

样品采集方法详见附录 A 执行。

5.2 检测样本包装、标识、储存和运输

5.2.1 检测样本应放在大小适合的带螺旋盖内有垫圈、耐冷冻的样本采集管里，拧紧。容器外注明样本编号、种类名称及采样日期。

5.2.2 将密闭后的标本装入密封袋，每袋限一份标本。

5.2.3 将装有检测样本的塑料封口袋放入到样品盛放容器内，保持采样管垂直放置。装入样本的生物安全转运箱冷链转运，用 75%酒精喷洒消毒生物安全转运箱外表面。

5.2.4 采集的检测样本应尽快送至检测实验室，置于 4℃ 中可保存 24h；24h 内无法检测的样本则应置于-70℃或以下保存（如无-70℃保存条件，则于-20℃冰箱保存不超过 48h）；样本运送期间应避免反复冻融。

5.2.5 样本运输应符合《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南》（国卫办疾控函（2020）156号）中相关要求。

5.3 样品处理

提前将水浴箱预热至 56℃，在生物安全柜内用 75%酒精对装有样本的密封袋外表面进行喷洒消毒，用吸水纸擦拭后放入水浴锅中的试管架上，样本盖上搁置重物，防止样本采集管漂浮。每隔 10min 将样本摇匀 1 次（动作轻柔），灭活时间 30min 后备用。

5.4 病毒 RNA 的提取

取出样本，4000rpm 离心 5min 后冰浴 3-5min，在生物安全柜内打开样本采集管，按核酸提取试剂说明书要求吸取一定量样本（动作轻柔）加入核酸提取试剂中。

参照 RNA 核酸提取试剂盒说明书，在生物安全柜内加入细胞病毒裂解液。核酸提取流程参考

相关厂家试剂盒说明，样本量大的实验室使用通量适宜的核酸提取仪，以提高检测效率。

5.5 体系配置

在体系配置区，按照商品化检测试剂盒说明书进行体系配制。每批检测应设置阴性对照、阳性对照及试剂盒质控品。

5.6 实时荧光 RT-PCR 反应条件

RT-PCR 反应条件参考相关厂家商品化核酸检测试剂盒说明书。

5.7 结果分析

5.7.1 实验成立条件

阳性对照 Ct 值 <37 并出现典型的扩增曲线，阴性对照无 Ct 值并且无典型的扩增曲线，实验结果成立。

5.7.2 阈值设定

阈值线设定于刚刚超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。或参照商品化核酸检测试剂盒说明书

5.7.3 结果判定

结果分为“阳性”、“阴性”2种。

实时荧光 PCR 检测结束后，在阴性对照、阳性对照和质控都成立的前提下，根据检测样本扩增的荧光曲线和 Ct 值来分析。

阴性:无 Ct 值或 $Ct \geq 40$ 。

阳性: Ct 值 <37 ，可报告为阳性。

灰度区: Ct 值在 37-40 之间，建议重复实验，若重做结果 Ct 值 <40 ，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

注：如果用的是商品化试剂盒，则以厂家提供的说明书为准。

6 实验室安全

6.1 生物安全

实验室安全级别参照最新版《新型冠状病毒实验室生物安全指南（第二版）》的相关内容进行
管理。

6.2 实验室设备使用安全

离心机建议装有不平衡量振动显示及报警，并可设定报警不平衡量，以免影响实验结果，以及对
实验人员造成伤害。

6.3 消毒液使用安全

消毒液使用参考《特定场所消毒技术方案》（国卫办疾控函〔2020〕156号），实验室如采用
75%乙醇消毒液，使用前建议实验室采用乙醇水分含量的快速测定仪测定乙醇浓度后再使用。

附 录 A

(规范性附录)

样品采样方法

A.1 食品和食用农产品表面

A.1.1 水/海产品（含活水生动物）表面

A.1.1.1 对其表面进行涂抹采样，采样拭子涂抹范围除动物外表面外，还应深入包括口腔、腮、泄殖孔、贝壳内部等天然孔隙内进行涂抹；对于已经分割的水产品，还要对水产品的断面进行涂抹。

A.1.1.2 取浸有无菌生理盐水或 PBS 的一次性长柄拭子，或打开采样试剂包装，取出采样拭子，将拭子伸入采样管的采样液中，提起，离开液面，在采样管壁轻轻挤掉多余采样液，用拭子在包装表面选择采样的位置横竖往返各涂抹 5 次以上，并随之用手指捻转拭子。

A.1.1.3 将拭子插入装有 3.0mL 采样液的采样管中，拭子离采样管底约 1cm 时，弯曲折断采样拭子柄，盖好采样管盖子，做好记录，完成采样。

A.1.2 动物类产品表面

A.1.2.1 对于动物胴体对其表面进行涂抹采样，采样拭子涂抹范围除动物外表面外，还应深入包括口腔及其他可探及腔隙进行涂抹；对于分割动物产品、蛋类以及动物油脂，应直接在其表面进行涂抹采样。

A.1.2.2 同 A.1.1.2

A.1.2.3 同 A.1.1.3

A.1.3 植物类食品表面

A.1.3.1 对其表面包括表面缝隙进行涂抹采样。

A.1.3.2 取浸有无菌生理盐水或 PBS 的一次性长柄采样拭子，在各部分表面横竖往返各涂抹 5 次，并随之转动采样拭子。

A.1.3.3 剪去手接触的部分，放入装有 3.0mL 采样液的采样管中。

A.1.3.4 对于酸性或软质水果（如草莓）表面采样。具体方法为：随机抽取 25g 样品转移至无菌袋中，加入 40mLTGBE 缓冲液（Tris 基质 12g、甘氨酸 3.8g、牛肉膏 10g，溶于 1000mL 水中，pH9.5），室温震荡 20 分钟。将悬浮液转移至干净 50mL 离心管，用于后续 RNA 提取。

A.2 内外包装表面

A.2.1 表面积 $<100\text{cm}^2$ ，取全部表面； $1000\text{cm}^2 \geq \text{表面积} \geq 100\text{cm}^2$ ，取 100cm^2 。表面积 $>1000\text{cm}^2$ ，可多

次采样，总采样面积不低于表面积的 10%，重点采集经常接触的部位。

A. 2. 2 同 A. 1. 1. 2。

A. 2. 3 同 A. 1. 1. 3。