

# 团体标准

T/CIFST XXX—2023

## 食品中沙门氏菌的快速检测 测试片法

Rapid Detection of *Salmonella* in food-Handy Plate method

(征求意见稿)

2023 - XX - XX 发布

2023 - XX - XX 实施

中国食品科学技术学会 发布

## 前 言

本文件按照 GB/T1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件的某些内容可能涉及专利，发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：



# 食品中沙门氏菌的快速检测

## 测试片法

### 1 范围

本文件规定了沙门氏菌 (*Salmonella*) 的快速检测-测试片法。  
本文件适用于食品及加工环境中沙门氏菌的快速检验。

### 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，仅所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 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

### 3 设备和材料

- 3.1 电子天平：感量 0.1 g。
- 3.2 均质器。
- 3.3 振荡器。
- 3.4 恒温培养箱：36 °C±1 °C、42 °C±1 °C。
- 3.5 无菌锥形瓶：容量 500 mL、250 mL。
- 3.6 无菌量筒：容量 50 mL。
- 3.7 无菌均质杯、无菌均质袋。
- 3.8 无菌吸管：1 mL（0.01 mL 刻度）、10 mL（0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 3.9 无菌试管：10 mm×75 mm。
- 3.10 pH 计或精密 pH 试纸：精密度 0.1。
- 3.11 无菌接种环：10 μL（直径约 3 mm）、1 μL 以及接种针。
- 3.12 生物安全柜。

### 4 培养基和试剂

- 4.1 沙门氏菌增菌液：见附录 A.1。
- 4.2 BHK<sup>®</sup>沙门氏菌核酸检测试剂盒（PCR 荧光探针法）。
- 4.3 氯化镁孔雀绿大豆胨 (RVS) 增菌液：见附录 A.2。
- 4.4 四硫磺酸钠煌绿增菌液 (TTB)：见附录 A.3。
- 4.5 Handy Plate<sup>®</sup>沙门氏菌测试片。
- 4.6 磷酸盐缓冲液，见附录 A.4。
- 4.7 无菌生理盐水，见附录 A.5。
- 4.8 1 mol/L NaOH：见附录 A.6。
- 4.9 1 mol/L HCL：见附录 A.7。
- 4.10 EHK<sup>®</sup> HK-N-PBS 一次性采样管。

5 检验程序

沙门氏菌测试片法检验程序见图1。

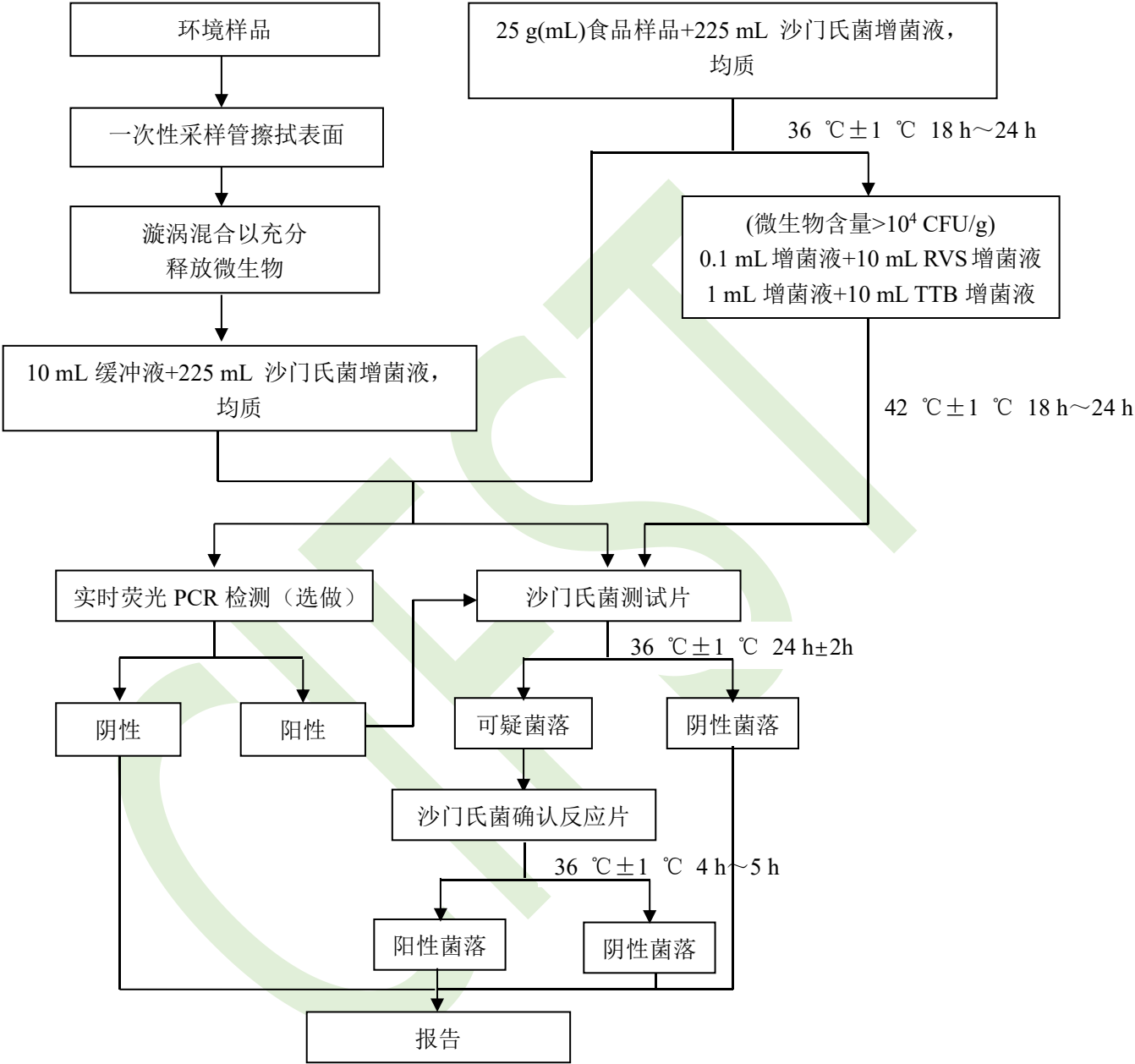


图1 沙门氏菌测试片法检验程序

6 操作步骤

6.1 增菌

6.1.1 无菌操作称取 25 g(mL)样品，置于盛有 225 mL 沙门氏菌增菌液的无菌均质杯或其它合适容器内，以 8000 r/min ~ 10000 r/min 均质 1 min~2 min，或置于盛有 225 mL 沙门氏菌增菌液的无菌均质

袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。若样品为液态，不需要均质，振荡混匀。如需调整 pH，用 1 mol/L 无菌 NaOH 或 HCl 调 pH 至 6.8±0.2。无菌操作将样品转至 500 mL 锥形瓶或其他合适容器内（如均质杯本身具有无孔盖，可不转移样品），如使用均质袋，可直接进行培养，于 36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。

6.1.2 对于乳粉，无菌操作称取 25 g 样品，缓缓倾倒在广口瓶或均质袋内 225 mL 沙门氏菌增菌液的表面，暂不混匀和调节 pH，室温静置 1 h 后再混匀，置于 36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。

6.1.3 冷冻样品如需解冻，取样前在 45 °C 以下解冻不超过 15 min，或在 2 °C~5 °C 冰箱缓慢化冻不超过 18 h。

6.1.4 实验室应根据需要设置阳性对照、阴性对照和空白对照，定期对检验过程进行质量控制。宜选用肠炎沙门氏菌 FSCC(T)215456 或等效标准菌株作为阳性对照菌株，大肠埃希氏菌 FSCC(T)149009 或等效标准菌株作为阴性对照菌株。

6.1.5 对于微生物含量较高（>10<sup>4</sup> CFU/g）如生的或未加工的样品，轻轻摇动上述培养过的沙门氏菌增菌液，移取 0.1 mL，转种于 10 mL RVS 增菌液内，混匀后于 42 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。另取 1 mL 转种于 10 mL TTB 中，42 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。对于微生物含量较低如深加工（≤10<sup>4</sup> CFU/g）的样品，可跳过此步骤。

6.1.6 环境样品：取 1 支 HK-N-PBS 一次性采样管，取出拭子沿规格板擦拭采样表面（100 cm<sup>2</sup>），从两个方向（从左到右，然后从上到下）覆盖整个区域。将拭子放回采样管，涡旋混合以充分释放微生物。将采样管内的 10 mL 缓冲液加入含有 225 mL 沙门氏菌增菌液的无菌均质袋（或其它合适容器）中，用均质器均质 1 min~2 min，充分混匀。36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。

6.2 实时荧光 PCR 检测(选做)

6.2.1 取沙门氏菌增菌液 1 mL 至离心管，6 000 r 离心 5 min 去上清。加入 30 μL 裂解液充分悬浮管底沉淀，轻弹管壁消除气泡，99 °C 加热 10 min。12 000 r/min 离心 15 min，取上清转移到新的 PCR 管中。

6.2.2 生物安全柜内取 PCR 管 6 个，每管加入充分融化、涡旋混合并短暂离心的预混液 20 μL，2 管加入充分融化、涡旋混合并短暂离心的阳性对照 5 μL，2 管加入充分融化、涡旋混合并短暂离心的阴性对照 5 μL，2 管分别加入上述粗制 DNA 5 μL，盖紧管盖，短暂离心 3 s~5 s。另取 2 管加入 25 μL 充分融化、涡旋混合并短暂离心的预混液作为空白对照。

表 1 实时荧光 PCR 检测反应条件

阶段	反应阶段	温度	时间	信号收集	循环数	目标速率
1	预变性	95 °C	30 s		1	
2	2 步法扩增	95 °C	5 s			2 °C/s
		60 °C	30 s	收集	40	

6.2.3 阴性对照和空白对照应未出现典型的 S 型扩增曲线或 Ct 值>37，阳性对照应出现 S 型扩增曲线且其 Ct 值<30，所有测试结果中的内参 Ct 值均<35，若阴阳性对照、空白对照、内参同时满足上述条件，则实验结果成立，否则实验结果无效。实际样品本扩增后 Ct 值<35 且有典型的 S 型扩增曲线即为沙门氏菌阳性；实际样本扩增后 Ct 值>37 或无典型的 S 型扩增曲线为沙门氏菌阴性；若实际样本扩增后 Ct 值在 35~37 之间，建议重新检测，若重检结果 Ct>37 或无典型的 S 型扩增曲线，则沙门氏菌阴

性，反之则为沙门氏菌阳性；扩增阴性可报告未检出沙门氏菌。扩增有阳性结果，则继续用测试片和确认反应片进行确证。

### 6.3 接种培养

6.3.1 将测试片置于平坦表面处，揭开上层膜。使用 10  $\mu$ L 接种环取 1 环混匀后的增菌液在测试片上划线。用无菌吸管或移液枪吸取 1 mL 无菌水或无菌生理盐水于测试片内。静置至少 1 min 以使培养基凝固。

6.3.2 将测试片正面朝上，堆叠不超过 20 张，放入培养箱中，于 36  $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 24 h  $\pm$  2 h。

### 6.4 判读

观察测试片上生长的菌落，沙门氏菌可疑菌落为有黄色晕圈的红色菌落，有或无气泡，其它的蓝绿色、无色、棕黑色等均为非沙门氏菌。

### 6.5 确认

#### 6.5.1 确认反应片培养

将可疑菌落用记号笔标记。揭开上膜，将确认反应片与培养基贴合，将上膜轻轻盖下，用手轻轻滑动，赶走培养基区域内的气泡，使确认反应片与上膜和下层凝胶完全贴合，于 36  $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 4 h  $\sim$  5 h。

#### 6.5.2 确认反应片的判读

取出带确认反应片的测试片，观察标记的菌落的颜色。若标记的菌落变为蓝绿色、蓝黑色，则判为沙门氏菌，其它颜色为非沙门氏菌。

## 7 结果与报告

综合沙门氏菌测试片和确认反应片的结果，报告 25 g(mL) 样品或 100  $\text{cm}^2$  环境样品中检出或未检出沙门氏菌。

附 录 A  
(规范性)  
培养基和试剂

A.1 沙门氏菌增菌液

A.1.1 成分

A.1.1.1	酪蛋白胨	10 g
A.1.1.2	酵母浸粉	8 g
A.1.1.3	葡萄糖	3 g
A.1.1.4	甘露醇	2 g
A.1.1.5	麦芽糖	1.5 g
A.1.1.6	L赖氨酸盐酸盐	0.5 g
A.1.1.7	氯化钠	5 g
A.1.1.8	胆盐	1.5 g
A.1.1.9	磷酸二氢钾	1.5 g
A.1.1.10	丙酮酸钠	3 g
A.1.1.11	可溶性淀粉	1 g
A.1.1.12	新生霉素钠	0.012 g
A.1.1.13	孔雀石绿	0.015 g
A.1.1.14	蒸馏水	1 000 mL
	pH	7.2±0.2

A.1.2 制法

称取 37 g 干粉溶解于 1 L 去离子水中，121 °C 高压灭菌 15 min。取 1 瓶添加剂加到 225 mL 灭好菌的沙门氏菌增菌液中。

A.2 RVS 增菌液

A.2.1 成分

A.2.1.1	大豆蛋白胨	4.5 g
A.2.1.2	氯化钠	7.2 g
A.2.1.3	磷酸二氢钾	1.26 g
A.2.1.4	磷酸氢二钾	0.18 g
A.2.1.5	氯化镁(含6个结晶水)	28.6 g
A.2.1.6	孔雀绿	0.036 g
A.2.1.7	蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将各成分加入蒸馏水中搅匀后加热溶解，必要时调节pH，定量分装于试管中，115 °C高压灭菌15 min。培养基25 °C的pH为5.2±0.2。

### A. 3 TTB 增菌液

#### A. 3.1 基础液

A. 3.1.1 蛋白胨	9.0 g
A. 3.1.2 牛肉浸粉	4.5 g
A. 3.1.3 氯化钠	2.7 g
A. 3.1.4 碳酸钙	40.5 g
A. 3.1.5 硫代硫酸钠(含5个结晶水)	50.0 g
A. 3.1.6 牛胆盐	5.0 g
A. 3.1.7 蒸馏水	1 000 mL

将各成分加入蒸馏水中，搅匀后加热溶解。煮沸，无需高压灭菌。培养基25°C的pH为7.6±0.2。

#### A. 3.2 碘溶液

A. 3.2.1 碘化钾	25.0 g
A. 3.2.2 碘	20.0 g
A. 3.2.3 蒸馏水	1 000 mL

将碘化钾溶解于少量的蒸馏水中，再加入碘，振摇至碘全部溶解。加蒸馏水至100 mL,转入棕色瓶内，塞紧瓶塞冷藏贮存。

#### A. 3.3 煌绿溶液

A. 3.3.1 煌绿	0.5 g
A. 3.3.2 蒸馏水	100 mL

将煌绿在蒸馏水中溶解后，存放在冷暗处不少于1天。

#### A. 3.4 制法

A. 3.4.1 基础液	1 000 mL
A. 3.4.1 煌绿溶液	2.0 mL
A. 3.4.1 碘溶液	20.0 mL

临用时，在冷却后的基础液中以无菌操作加入煌绿溶液摇匀，加入碘溶液，再摇匀。

### A. 4 磷酸盐缓冲液

#### A. 4.1 成分

A. 4.1.1 磷酸二氢钾	34.0 g
A. 4.1.2 蒸馏水	500 mL

#### A. 4.2 制法

A. 4.2.1 贮存液：称取 34.0 g 磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中，用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2±0.1，用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱。

A. 4.2.2 稀释液：取贮存液 1.25 mL，用蒸馏水稀释至 1 000 mL，分装于适宜容器中，121 °C高压蒸汽灭菌 15 min。

### A. 5 无菌生理盐水



## A. 5.1 成分

A. 5.1.1 氯化钠	8.5 g
A. 5.1.2 蒸馏水	1 000 mL

## A. 5.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠加入 1 000 mL 蒸馏水中，搅拌至完全溶解，分装后，121 °C 灭菌 15 min，备用。

## A. 6 1 mol/L NaOH 溶液

## A. 6.1 成分

A. 6.1.1 NaOH	40.0 g
A. 6.1.2 蒸馏水	1 000 mL

## A. 6.2 制法

称取40 g氢氧化钠溶于1 000 mL无菌蒸馏水中。

## A. 7 1 mol/L HCL 溶液

## A. 7.1 成分

A. 7.1.1 HCL: 90 mL。
A. 7.1.2 蒸馏水: 1 000 mL。

## A. 7.2 制法

移取浓盐酸90 mL，用无菌蒸馏水稀释至1 000 mL。

---