

团 体 标 准

T/CIFST 023—2024

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

2024-08-20 发布

2024-08-20 实施

中国食品科学技术学会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

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：广东环凯生物科技有限公司、广东省科学院微生物研究所、安利(中国)日用品有限公司、无限极(中国)有限公司、郑州市食品药品检验所、黑龙江飞鹤乳业有限公司。

本文件主要起草人：滕昆仑、吴清平、刘春丽、寇秀颖、王琪、杨宁、于畅游、刘英涛、王迅、杨静、周勇、薛亮、许晓冬。

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涂抹样品中沙门氏菌的快速检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验
GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 设备和材料

- 3.1 电子天平:感量 0.001 g。
- 3.2 拍击式均质器。
- 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)或移液器及吸头(0.1 mL~1 mL)。
- 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 高压蒸汽灭菌器。
- 3.13 涡旋混合器。

4 培养基和试剂

- 4.1 沙门氏菌增菌液:见附录 A.1。
- 4.2 氯化镁孔雀绿大豆胨(RVS)增菌液:见附录 A.2。
- 4.3 Handy Plate[®]沙门氏菌测试片。
- 4.4 Handy Plate[®]沙门氏菌确认反应片。
- 4.5 无菌磷酸盐缓冲液,见附录 A.3。
- 4.6 无菌生理盐水,见附录 A.4。

4.7 1 mol/L NaOH 溶液,见附录 A. 5。

4.8 1 mol/L HCl 溶液,见附录 A. 6。

4.9 EHK[®] 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。

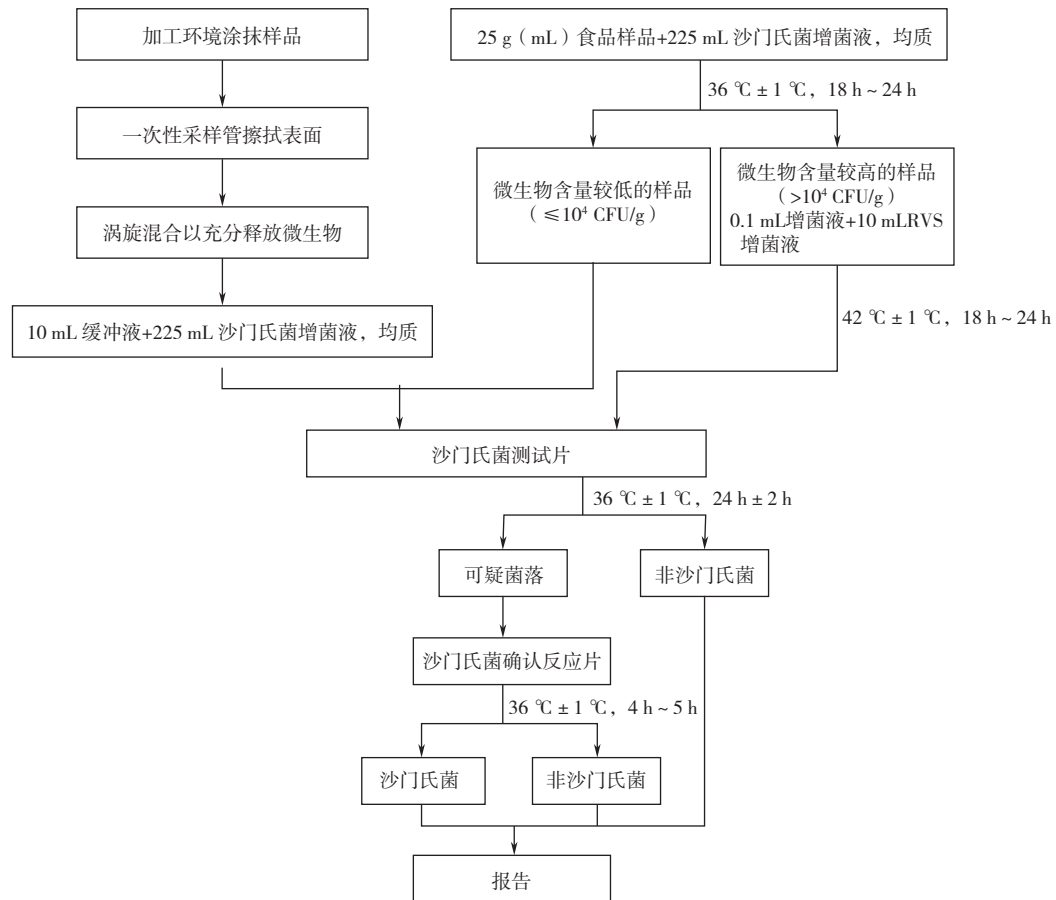


图 1 沙门氏菌测试片法检验程序

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他合适容器内,以 8 000 r/min~10 000 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 NaOH 溶液或 1 mol/L HCl 溶液调 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(如无菌均质杯本身具有无孔盖,可不转移样品)。如使用无菌均质袋,可直接进行培养,于 $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ 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无菌均质袋内 225 mL 沙门氏菌增菌液的表面,勿调节 pH,也暂不混匀,室温静置 1 h 后再混匀,置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。
- 6.1.3 冷冻样品如需解冻,取样前在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下解冻不超过 15 min,或在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内缓慢解冻不超过 18 h。
- 6.1.4 对于微生物含量较高的样品($>10^4$ CFU/g)(如生的或未加工),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 $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。对于微生物含量较低的样品($\leq 10^4$ CFU/g)(如深加工),可跳过此步骤。
- 6.1.5 加工环境涂抹样品:取 1 支 HK-N-PBS 一次性采样管,取出拭子在食品加工接触部位沿不锈钢采样板擦拭采样表面(100 cm^2)从两个方向(从左到右,然后从上到下)覆盖整个区域。将拭子放回含缓冲液的采样管,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(或其他合适容器)中,用均质器均质 1 min~2 min,充分混匀。 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。
- 6.1.6 实验室应根据需要设置阳性对照、阴性对照,定期对检验过程进行质量控制。宜选用肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)FSCC(T)215456 或等效标准菌株作为阳性对照菌株,大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)FSCC(T)149009 或等效标准菌株作为阴性对照菌株。

6.2 接种培养

- 6.2.1 将测试片置于平坦表面处,揭开上膜。使用 $10\text{ }\mu\text{L}$ 无菌接种环取 1 环混匀后的增菌液在沙门氏菌测试片上划线。用无菌吸管或移液器吸取 1 mL 无菌水或无菌生理盐水于沙门氏菌测试片内,静置至少 1 min 以使培养基凝固。
- 6.2.2 将测试片正面朝上,堆叠不超过 20 张,放入培养箱中,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

6.3 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,其他蓝绿色、无色、棕黑色等菌落均为非沙门氏菌。将可疑菌落用记号笔标记。

6.4 确认

6.4.1 确认反应片的培养

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 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h~5 h。

6.4.2 确认反应片的判读

取出带确认反应片的沙门氏菌测试片,观察标记菌落的颜色。若标记菌落变为蓝绿色、蓝黑色,则判为沙门氏菌,其他颜色为非沙门氏菌。

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 cm^2 加工环境涂抹样品中检出或未检出沙门氏菌。

8 废弃物处置

检测过程中产生的废弃物按照 GB 19489 的相关要求进行处置,含微生物的废弃物应 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 30 min 后再按相关规定处置。

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	10.0 g
A.1.1.2	酵母浸粉	8.0 g
A.1.1.3	葡萄糖	3.0 g
A.1.1.4	甘露醇	2.0 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	5.0 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	3.0 g
A.1.1.11	可溶性淀粉	1.0 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

A.1.2 制法

称取 37.0 g 干粉溶解于 1 L 蒸馏水中,121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。增菌液 25 °C 时的 pH 为 7.2±0.2。

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 高压蒸汽灭菌 15 min。增菌液 25 °C 时的 pH 为 5.2±0.2。

A.3 无菌磷酸盐缓冲液

A.3.1 成分

A.3.1.1	磷酸二氢钾	34.0 g
---------	-------	--------

A. 3. 1. 2 蒸馏水 500 mL

A. 3. 2 制法

A. 3. 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 NaOH 溶液调节 pH 至 7.2 ± 0.1 ,用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱中。

A. 3. 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. 4 无菌生理盐水

A. 4. 1 成分

A. 4. 1. 1 氯化钠 8.5 g

A. 4. 1. 2 蒸馏水 1 000 mL

A. 4. 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 高压蒸汽灭菌 15 min,备用。

A. 5 1 mol/L NaOH 溶液

A. 5. 1 成分

A. 5. 1. 1 NaOH 40.0 g

A. 5. 1. 2 无菌蒸馏水 1 000 mL

A. 5. 2 制法

称取 40 g NaOH 溶于 1 000 mL 无菌蒸馏水中。

A. 6 1 mol/L HCl 溶液

A. 6. 1 成分

A. 6. 1. 1 HCl 90 mL

A. 6. 1. 2 无菌蒸馏水 1 000 mL

A. 6. 2 制法

移取浓盐酸 90 mL,用无菌蒸馏水稀释至 1 000 mL。
