

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2552.5—2010

乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第5部分:沙门氏菌检验

Microbiological examination method for milk and milk products hygiene—
Part 5: Detection of *Salmonella* spp.

(ISO 6785:2001, Milk and milk products—Detection of *Salmonella* spp., MOD)

2010-05-27 发布

2010-12-01 实施



中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

SN/T 2552《乳及乳制品卫生微生物学检验方法》分为十三个部分：

- 第1部分：取样指南；
- 第2部分：检验样品的制备与稀释；
- 第3部分：酵母、霉菌菌落计数；
- 第4部分：嗜冷菌微生物菌落计数；
- 第5部分：沙门氏菌检验；
- 第6部分：柠檬酸杆菌检验；
- 第7部分：阴沟肠杆菌检验；
- 第8部分：普通变形杆菌和奇异变形杆菌检验；
- 第9部分：克雷伯氏菌检验；
- 第10部分：阪崎肠杆菌检验 免疫荧光法；
- 第11部分：蜡样芽孢杆菌的分离与计数；
- 第12部分：单核细胞增生李斯特氏菌检测与计数；
- 第13部分：假单胞菌属的分离与计数。

本部分是SN/T 2552的第5部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本部分修改采用了ISO 6785:2001《Milk and milk products—Detection of *Salmonella* spp.》，与其主要差异如下：

- 按照GB/T 1.1标准要求 and 汉语习惯对一些编排格式进行了修改；
- 将一些适用于国际标准的表述改为适用于我国标准的表述。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分由中国检验检疫科学研究院负责起草。

本部分主要起草人：赵贵明、刘振、李瑾、于兔、赵勇胜、刘沛、杨海荣、袁飞。

乳及乳制品卫生微生物学检验方法

第5部分：沙门氏菌检验

1 范围

SN/T 2552 的本部分规定了乳粉中沙门氏菌检验方法。
本部分适用于乳粉中沙门氏菌的检验,其他乳制品可参照使用。

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。

SN/T 2552.1 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第1部分:取样指南

SN/T 2552.2 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第2部分:检验样品的制备与稀释

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

沙门氏菌 *Salmonella* spp.

接种选择性平板上生长,菌落典型且其符合沙门氏菌属生化和血清学特征的微生物。

3.2

沙门氏菌显色培养基 *Chromogenic Salmonella Medium*

一种根据沙门氏菌属产C8酯酶或其他特异性酶的特点,在培养基中加入相应显色底物,沙门氏菌生长分解该底物使其菌落显现特有颜色的一类选择性培养基。

4 设备和材料

- 4.1 天平:感量0.1 g。
- 4.2 均质器:拍击式或蠕动式。
- 4.3 培养箱:37℃±1℃。
- 4.4 高压湿热灭菌锅:115℃~121℃。
- 4.5 水浴锅:41.5℃±1℃、37.5℃±1℃、55℃±1℃。
- 4.6 pH计:25℃测量,精度±0.1 pH单位。
- 4.7 刻度吸管或自动移液器:容量1 mL和10 mL,分度分别为0.5 mL和0.1 mL。
- 4.8 无菌平皿:直径90 mm或100 mm。
- 4.9 量筒。

5 培养基和试剂

- 5.1 缓冲蛋白胨水:见附录A第A.1章。

- 5.2 RVS 培养基:见附录 A 第 A.2 章。
- 5.3 亮绿酚红培养基:见附录 A 第 A.3 章。
- 5.4 亚硒酸盐胱氨酸培养基(SC):见附录 A 第 A.4 章。
- 5.5 尿素酶琼脂:见附录 A 第 A.5 章。
- 5.6 L-赖氨酸脱羧培养基:见附录 A 第 A.6 章。
- 5.7 三糖铁琼脂(TSI 琼脂):见附录 A 第 A.7 章。
- 5.8 ONPG 培养基:见附录 A 第 A.8 章。
- 5.9 VP 培养基:见附录 A 第 A.9 章。
- 5.10 胰蛋白胨培养基:见附录 A 第 A.10 章。
- 5.11 半固体营养琼脂:见附录 A 第 A.11 章。
- 5.12 血清:见附录 A 第 A.12 章。
- 5.13 Voges-Proskauer(VP)试剂:见附录 A 第 A.13 章。
- 5.14 Kovac's 试剂:见附录 A 第 A.14 章。
- 5.15 ESMTM沙门氏菌显色培养基¹⁾。

6 取样

取样和样品运送按 SN/T 2552.1 规定执行。

7 操作步骤

7.1 样品制备

用于微生物检测的样品称量、原液及十倍稀释液的制备方法参照 SN/T 2552.2,检测流程参见附录 B。

7.2 增菌培养

7.2.1 前增菌培养

称取样品(25 g 或 25 mL)加入到 225 mL 缓冲蛋白胨水进行前增菌培养,培养条件:37 °C 培养 16 h~20 h。

7.2.2 选择性增菌培养

转接 0.1 mL 7.2.1 前增菌培养液至 10 mL RVS 培养基,于 41.5 °C 培养 18 h~24 h,或者取 10 mL 上述前增菌培养液至 100 mL SC 中,于 37 °C 培养 18 h~24 h。

7.3 分离培养

将选择性增菌培养液划线接种至沙门氏菌显色培养基平板上,同时接种其他沙门氏菌分离培养基上(如:亮绿酚红琼脂),于 37 °C 培养 18 h~24 h。观察有无可疑沙门氏菌生长。若未发现可疑,则继续培养 18 h~24 h,再进行观察。沙门氏菌在显色培养基上的典型菌落呈紫红色菌落,颜色有深浅,在亮绿酚红琼脂培养基上菌落呈无色,周围培养基为亮红色。

1) ESMTM沙门氏菌显色培养基是适合的市售产品的实例之一。给出这一信息是为了方便本部分的使用者,并不表示对这一产品的认可。

7.4 确证

7.4.1 可疑菌落的挑取

接种针挑取平板上 5 个可疑菌落,若平板上可疑菌落少于 5 个,全部挑取准备以下生化试验。

7.4.2 生化确证

7.4.2.1 接种三糖铁琼脂(TSI 琼脂)

采用斜面划线,底层穿刺的方式接种 TSI 琼脂,37 °C 培养 24 h,观察结果,底层斜面颜色呈红色或颜色无变化,则不利用葡萄糖、乳糖和蔗糖。如果底层变黑,则产 H₂S 反应阳性。如果底层变黄产气斜面颜色呈红色或无变化,则葡萄糖利用阳性。

7.4.2.2 接种尿素酶琼脂

划线接种至尿素酶琼脂斜面,37 °C 培养 24 h,观察斜面颜色变化,若呈酚红至玫瑰红色,反应呈阳性;若颜色无变化,则反应呈阴性。

7.4.2.3 接种 L-赖氨酸脱羧培养基

接种至赖氨酸脱羧液体培养基,37 °C 培养 24 h,观察培养液的颜色,若呈紫色,反应阳性;若呈黄色,反应为阴性。

7.4.2.4 接种 ONPG 培养基

挑取可疑单菌落,加入到含有 0.25 mL 盐水(0.85%)的小试管中,制成菌悬液。取一滴菌悬液加入到含 ONPG 的培养管中,37 °C 培养 18 h~24 h,观察结果,阳性反应,试剂变黄,阴性反应不变色。

7.4.2.5 接种 VP 培养基

挑取单个可疑单菌落接种至含有 VP 培养基的培养管中,37 °C 培养 24 h,然后依次滴加 3 滴萘酚乙醇溶液和 2 滴氢氧化钾溶液,观察实验结果,15 min 内呈红色,则为阳性反应;反之为阴性反应。

7.4.2.6 接种吲哚培养基

挑取单个可疑沙门氏菌菌落接种至含有吲哚培养基的培养管中,37 °C 培养 24 h,然后滴加 1 滴 Kovac 氏试剂,观察结果,液面呈现红色环,则为阳性反应;液面呈现黄色环则为阴性反应。

7.4.2.7 沙门氏菌生化结果

典型沙门氏菌生化试验结果判断如表 1 所示。

表 1 典型沙门氏菌生化反应

确证试验	阳性或阴性反应	生化反应阳性率
TSI 底层变黄(利用葡萄糖产酸)	+	100
TSI 产气(利用葡萄糖产气)	+	91.9
TSI 斜面呈红色或不变色(乳糖/蔗糖阴性)	-/-	99.2/99.5
TSI 产 H ₂ S	+	91.6
尿素分解	--	100
L-赖氨酸脱羧	+	94.6

表 1 典型沙门氏菌生化反应(续)

确证试验	阳性或阴性反应	生化反应阳性率
β-半乳糖苷酶反应	---	98.5
VP 反应	---	100
吲哚反应	---	98.9

注: *Salmonella enterica* 亚种 *Salmonella arizonae* 及 *Salmonella diarizonae* 乳糖利用阴阳性反应不定,但 β-半乳糖苷酶反应总是阳性。沙门氏菌亚属 II 乳糖利用反应阴性,但 β-半乳糖苷酶反应可能为阳性。

7.4.3 血清学确证

7.4.3.1 总的原则

玻片凝集试验,消除自凝集反应后,采用相应的抗血清检测沙门氏菌 O—、Vi—和 H—等抗原。

7.4.3.2 自凝集反应消除

小心滴加一滴盐水于载玻片的一端,挑取可以沙门氏菌单菌落与盐水混合成均匀菌悬液,轻轻晃动载玻片 30 s~60 s,在暗背景下观察试验现象,若出现可见的菌体凝集,则视为自凝集阳性。自凝集阴性的菌进行血清学鉴定参照下面方法。

7.4.3.3 O 抗原检测

选取非自凝集的菌株进行 O 抗原测试,按 7.4.3.2 所述方法,以抗 O 血清(单价或多价)替代盐水进行试验。

7.4.3.4 Vi 抗原检测

选取非自凝集的菌株进行 Vi 抗原测试,按 7.4.3.2 所述方法,以抗 Vi 血清代替盐水进行试验。

7.4.3.5 H-抗原检测

挑取纯的非自凝集沙门氏菌可疑菌落穿刺接种至半固体培养基中,然后放置培养箱 37 °C 培养 18 h~24 h,观察结果。按照 7.4.3.2 所述方法,以抗 H 血清代替盐水进行试验。

7.4.3.6 血清结果判读

表 2 给出了血清学确证试验结果判读标准,可疑菌落进行血清学试验按此表进行判断。

表 2 血清学确证试验结果判读

生化反应	自凝集反应	血清学反应	结果判断
反应典型	---	O、Vi 或 H 抗原阳性	沙门氏菌
反应典型	---	所有反应为阴性	沙门氏菌可疑
反应典型	---	不测试	
反应不典型	---	O、Vi、H 抗原阳性	
反应不典型	---	所有反应阴性	非沙门氏菌

注: 结果判断为沙门氏菌或沙门氏菌可疑的应送到认可的沙门氏菌参考中心进行确证,并随附菌株所有相关的相关数据资料。

7.5 结果报告

根据以上实验的结果,报告沙门氏菌检出或未检出,并指明取样量。

8 安全防范

- 8.1 按照本部分规定进行沙门氏菌检测,应仅在合适设施条件和有资质的微生物专家指导下进行。
- 8.2 因有污染环境的风险,质控实验室、食品生产和加工场不得进行沙门氏菌检测。
- 8.3 按本部分规定进行操作时,整个过程应采取全身防护措施。特别需注意的是使用过的设备和培养基在可疑样品检测完之后及废弃或再使用之前要灭菌消毒。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9.0 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述各组分加热溶解,调整溶液的 pH 至 7.0 ± 0.1 。

将完全溶解的溶液定量分装至 500 mL 三角瓶中,每瓶 225 mL,之后 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压湿热灭菌 15 min,冷却至室温备用。

A.2 RVS 肉汤

大豆胨	5.0 g
氯化钠(NaCl)	8.0 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	1.4 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	0.2 g
氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	400.0 g
孔雀绿	0.04 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述成分混匀,加热溶解,调整 pH 至灭菌后达到 5.2 ± 0.1 ,定量分装于试管中,每管 10 mL,之后 $115\text{ }^\circ\text{C}$ 高压湿热灭菌 15 min,冷却至室温备用。

A.3 亮绿酚红培养基

A.3.1 基础

牛肉粉	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
酵母粉	3.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.0 g
磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)	0.6 g
琼脂	12 g~15 g
蒸馏水	900 mL

将上述成分加热溶解,调整 pH 使其灭菌后达到 7.0 ± 0.1 ,灭菌条件为 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压湿热灭菌 15 min。

A.3.2 蔗糖酚红溶液

乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
酚红	0.09 g
蒸馏水	约 80 mL

将配方前三种成分溶解在含有 50 mL 蒸馏水带有 100 mL 刻度的三角瓶内,然后补加蒸馏水至 100 刻度线。70 °C 水浴加热 20 min,然后放入 55 °C 水浴,冷却后即刻使用。

A.3.3 亮绿溶液

亮绿	约 0.5 g
蒸馏水	100 mL

将亮绿溶解在水中,黑暗处至少存放 1 d 时间使其自然灭菌。

A.3.4 完全培养基

基础	900 mL
蔗糖酚红溶液	100 mL
亮绿溶液	1 mL

无菌操作将亮绿溶液加入到水浴冷却至 55 °C 的蔗糖酚红溶液中,然后将混合液加入到预热至 55 °C 的基础中,混匀后铺制平板。制备好的平板室温放置不超过 4 h,0 °C ~ 5 °C 环境存放不得超过 1 周。

A.4 亚硒酸盐胱氨酸盐培养基

A.4.1 基础

胰蛋白胨	5.0 g
乳糖	4.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	10.0 g
亚硒酸氢钠	4.0 g
蒸馏水	1 000 mL

将配方前三种成分加热溶解,煮沸灭菌 5 min 之后冷凝,加入亚硒酸氢钠,调整溶液 pH 至 7.0 ± 0.1。

A.4.2 L-胱氨酸溶液

L-胱氨酸	0.1 g
氢氧化钠溶液(1 mol/L)	15 mL
无菌水	约 85 mL

A.4.3 完全培养基

基础	1 000 mL
L-胱氨酸溶液	10 mL

取 10 mL 胱氨酸溶液加入到基础培养基中,调整 pH 至 7.0 ± 0.1。无菌操作定量分装至合适大小三角瓶内备用。

A.5 尿素琼脂

A.5.1 基础

蛋白胨	1.0 g
葡萄糖	1.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	2.0 g
酚红	0.012 g
琼脂	12 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述成分加热充分溶解,调整溶液的 pH 至 6.8 ± 0.1 , $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压湿热灭菌 15 min。

A.5.2 尿素溶液

尿素	400 g
蒸馏水(至终体积)	1 000 mL

称取 400 g 尿素溶解在水中,使溶液的终体积在 1 000 mL,过滤除菌。

A.5.3 完全培养基

基础	950 mL
尿素溶液	50 mL

将制备好的尿素溶液加入到基础中,充分混匀,10 mL/支定量分装至事先灭菌好的试管中,摆斜面,带培养基凝固后备用。

A.6 L-赖氨酸脱羧培养基

L-胱氨酸盐酸盐	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述各成分充分溶解,必要时可以加热。调整溶液的 pH 值,使灭菌后的 pH 为 6.8 ± 0.1 。按照 0.5 mL/支定量分装至培养试管中,之后 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压湿热灭菌 15 min,冷却后备用。

A.7 三糖铁琼脂(TSI 琼脂)

牛肉粉	3.0 g
酵母粉	3.0 g
蛋白胨	20.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g

柠檬酸铁(Fe^{3+})	0.3 g
硫代硫酸钠	0.3 g
酚红	0.024 g
琼脂	12 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述各成分加热充分溶解,调整溶液 pH 至灭菌后达到 7.4 ± 0.1 。按 10 mL/支定量分装至合适试管中,121 °C 高压湿热灭菌 15 min,灭菌后摆斜面,使底部长约 2.5 mm,斜面长约 4 mm~5 mm。培养基凝固后使用。

A.8 ONPG 培养基

A.8.1 磷酸缓冲液

磷酸二氢钠	6.9 g
氢氧化钠(10 mol/L)	约 3 mL
蒸馏水	约 50 mL

将上述成分充分溶解,必要时可以加热,调整溶液的 pH 至 7.0 ± 0.1 ,121 °C 高压湿热灭菌 15 min。

A.8.2 ONPG 溶液

邻硝基苯 β -D-半乳糖苷(ONPG)	0.08 g
蒸馏水	15 mL

将上述成分溶解,过滤除菌备用。

A.8.3 完全培养基

磷酸缓冲液	5 mL
ONPG 溶液	15 mL

取 5 mL 灭菌磷酸缓冲液与 15 mL 过滤除菌的 ONPG 溶液混合,分装至合适无菌培养管备用。

A.9 VP 培养基

蛋白胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述成分充分溶解,必要时可以加热。调整溶液 pH 使其高压灭菌后为 6.9 ± 0.1 ,按照 3 mL/支定量分装至合适培养管中,115 °C 高压湿热灭菌 20 min,冷却后备用。

A.10 胰蛋白胨培养基

胰蛋白胨	10 g
氯化钠(NaCl)	5 g
DL-色氨酸	1 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述成分加热煮沸溶解,调整溶液的 pH 使其灭菌后为 7.5 ± 0.1 。按照 5 mL/支定量分装至合

适培养管中,121℃高压湿热灭菌 15 min,冷却后备用。

A. 11 半固体营养琼脂

牛肉粉	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂	4 g~9 g
蒸馏水	1 000 mL

上述成分加热充分溶解,调整溶液 pH 使其灭菌后为 7.0 ± 0.1 ,灭菌条件为 121℃高压湿热灭菌 15 min。灭菌之后铺平板,不得对其进行干燥。

A. 12 血清

血清采用市售血清,使用前要采用已知血清型的标准菌株进行试验质控。

A. 13 Voges-Proskauer(VP)试剂

VP 甲液	
1-萘酚	6.0 g
96%乙醇(体积分数)	100 mL

配制方法:将 1-萘酚溶解在 96%的乙醇溶液中。

VP 乙液	
氢氧化钾	40.0 g
蒸馏水	100 mL

配制方法:将氢氧化钾溶在蒸馏水中。

A. 14 Kovac's 试剂

4-二甲基苯甲醛	5.0 g
盐酸(密度为 1.18 g/mL~1.19 g/mL)	25 mL
2-甲基-2-丁醇	75 mL

将上述各成分充分混匀后备用。

附录 B
(资料性附录)
沙门氏菌检测流程图

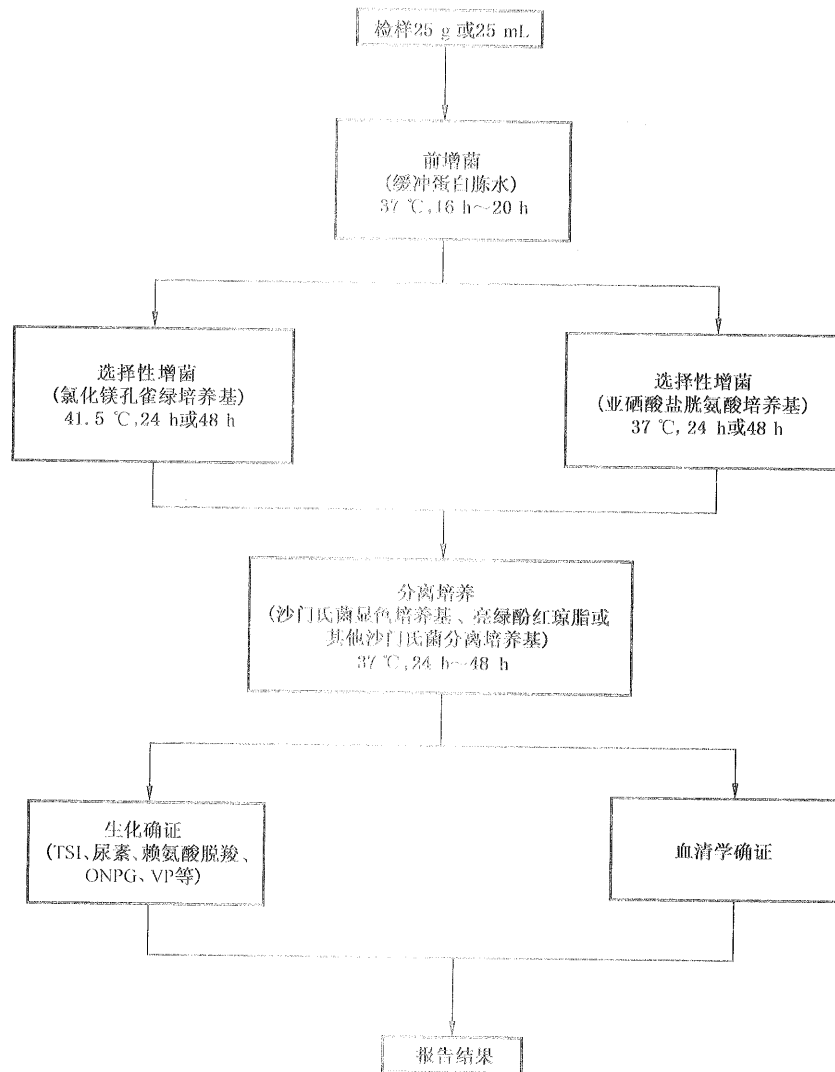


图 B.1 沙门氏菌检测流程图

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
乳及乳制品卫生微生物学检验方法
第 5 部分：沙门氏菌检验
SN/T 2552.5—2010

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码：100045

网址 www.spc.net.cn

电话：68523946 68517548

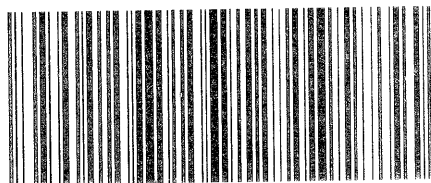
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 23 千字
2010年10月第一版 2010年10月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号：155066·2-21207 定价 18.00 元



SN/T 2552.5—2010