



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4656.6—2017

---

## 进出口纺织品生物安全检验方法 第6部分：沙门氏菌

Biosafety testing methods of the textiles for import and export—  
Part 6: *Salmonella*

2017-11-07 发布

2018-06-01 实施

---

中 华 人 民 共 和 国 发 布  
国家质量监督检验检疫总局

## 前 言

SN/T 4656《进出口纺织品生物安全检验方法》共分为 6 个部分：

- 第 1 部分：白假丝酵母菌；
- 第 2 部分：大肠埃希氏菌；
- 第 3 部分：大肠菌群；
- 第 4 部分：金黄色葡萄球菌；
- 第 5 部分：菌落总数；
- 第 6 部分：沙门氏菌。

本部分为 SN/T 4656 的第 6 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国河南出入境检验检疫局、中华人民共和国河北出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：李轲、郭会清、禹建鹰、徐超、王蕾、张勤、苗丽、乔晴、孙晓霞。



## 进出口纺织品生物安全检验方法

### 第6部分:沙门氏菌

#### 1 范围

SN/T 4656 的本部分规定了进出口纺织品中沙门氏菌的检验方法。  
本部分适用于进出口纺织品沙门氏菌的检验。

#### 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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分:实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分:培养基性能测试实用指南

#### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

##### 3.1

**纺织品生物安全 biosafety of textiles**

纺织品中携带的有害生物本身或其代谢产物对生态环境和人体健康产生的潜在威胁,及对其所采取的一系列有效预防和控制措施。

##### 3.2

**沙门氏菌 *Salmonella***

一种人畜共患病的病原菌,是一种革兰氏阴性肠杆菌。此菌营养要求不高,自然界分布极为广泛,可在食品、水、土壤、动物毛发、纤维中检出,可感染人和多种动物,大部分具有很强的致病性。目前所发现的沙门氏菌血清型有近3 000个,其中许多血清型菌能在人和动物之间交叉感染,能引起人和动物的多种不同临床表现,主要引起发热、胃肠炎、腹泻和败血症等,给人类的健康造成了严重的危害。

##### 3.3

**环介导恒温扩增 loop-mediated isothermal amplification; LAMP**

根据目标菌特有的靶序列保守基因设计的两对特殊的内、外引物,特异性识别靶序列上的六个独立区域,利用 *Bst* DNA 聚合酶启动循环链置换反应,在等温条件(63 ℃左右)下保温 30 min~60 min 特异、高效、快速的完成核酸扩增。从 dNTP 析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的  $Mg^{2+}$  结合,产生副产物(焦磷酸镁)形成乳白色沉淀,加入显色液,即可通过颜色变化观察判定结果。

#### 4 设备、材料

##### 4.1 常规微生物检测用的基本设备与材料。



- 4.2 无菌剪刀、镊子。
- 4.3 电子天平:感量为 0.01 g。
- 4.4 无菌均质袋。
- 4.5 拍击式均质器:400 mL。
- 4.6 无菌规格板:20 cm<sup>2</sup>。
- 4.7 无菌干燥棉拭子。
- 4.8 恒温培养箱:36 °C±1 °C、42 °C±1 °C。
- 4.9 全自动微生物生化鉴定系统。
- 4.10 接种环。
- 4.11 载玻片。
- 4.12 微量移液器:量程 1 μL~20 μL;量程 200 μL~1 000 μL。
- 4.13 灭菌离心管:1.5 mL。
- 4.14 LAMP 反应管。
- 4.15 高速离心机:2 000 r/min~13 000 r/min。
- 4.16 水浴锅:63 °C±1 °C。
- 4.17 LAMP 实时浊度仪。

## 5 培养基、试剂

- 5.1 SCDLP 液体培养基:见附录 A 中 A.2。
- 5.2 氯化镁孔雀绿肉汤:见 A.3。
- 5.3 亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC):见 A.4。
- 5.4 亚硫酸铋琼脂(BS):见 A.5。
- 5.5 沙门氏菌显色培养基。
- 5.6 营养琼脂:见 A.6。
- 5.7 三糖铁(TSI)琼脂:见 A.7。
- 5.8 赖氨酸脱羧酶培养基和赖氨酸脱羧酶对照培养基:见 A.8。
- 5.9 尿素琼脂(pH7.2):见 A.9。
- 5.10 V-P 半固体琼脂:见 A.10。
- 5.11 V-P 反应甲液:见 A.11。
- 5.12 V-P 反应乙液:见 A.12。
- 5.13 吡啶培养基:见 A.13。
- 5.14 柯凡克试剂:见 A.14。
- 5.15 β-半乳糖苷酶试剂:见 A.15。
- 5.16 生化鉴定试剂盒。
- 5.17 无菌生理盐水:见 A.16。
- 5.18 沙门氏菌 O 多价抗血清。
- 5.19 沙门氏菌 H 多价抗血清。
- 5.20 沙门氏菌 Vi 抗血清。
- 5.21 灭菌双蒸水。
- 5.22 10×LAMP 扩增缓冲液:含 200 mmol/L Tris-HCl(pH8.8)、100 mmol/L 硫酸铵、500 mmol/L 氯化钾、20 mmol/L 硫酸镁、1% Tween20。
- 5.23 引物:根据沙门氏菌属的 *invA* 基因保守序列,设计一套 LAMP 特异性引物。



外引物 F3:5'-ACCGTGGTCCAGTTTATCGT-3'

外引物 B3:5'-CACCGTCAAAGGAACCGTAA-3'

内引物 FIP:5'-CCGGGCATACCATCCAGAGAAA-TACCAAAGGTTTCAGAACGCG-3'

内引物 BIP:5'-TGCCGATTTGAAGGCCGGTA-TTTCCAGTACGCTTCGCC-3'

环引物 LoopF:5'-ATCGGGCCGCGACTTCCGCGA-3'

环引物 LoopB:5'-TTGATGCGGATGCCGCGCGCG-3'

5.24 100 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ 。

5.25 10 mmol/L 脱氧核苷三磷酸(dNTP)混合物:每种核苷酸浓度 10 mmol/L。

5.26 *Bst* DNA 聚合酶:8 U/ $\mu\text{L}$ 。

5.27 显色液:SYBR GreenI 染料,1 000 $\times$ 。

5.28 沙门氏菌标准菌株。

注:除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯;分子检测实验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

## 6 样品制备

### 6.1 称量法

无菌方法打开送检样品,用无菌剪刀(4.2)均匀剪样,在电子天平(4.3)上准确称取剪下的样品 25 g,剪碎后加入到盛有 225 mL SCDLP 液体培养基(5.1)的无菌均质袋(4.4)中,用拍击式均质器(4.5)拍打 1 min~2 min,充分混匀。

### 6.2 多点采样洗脱法

无菌方法打开送检样品,在样品四周和中间均匀布控 5 个采样点,用无菌规格板(4.6)按每个采样点按 4 cm $\times$ 5 cm(20 cm<sup>2</sup>)面积范围剪裁,每 20 cm<sup>2</sup> 采样面积为 1 份检样,每件样品共采集 5 份检样,采样面积为 100 cm<sup>2</sup>。将上述采集好的 5 份检样放入盛有 200 mL SCDLP 液体培养基(5.1)的无菌均质袋(4.4)中,用拍击式均质器(4.5)拍打 1 min~2 min,充分混匀,得到一个灭菌洗脱液。

### 6.3 棉拭子涂抹法

无菌方法打开送检样品,用 SCDLP 液体培养基(5.1)湿润无菌干燥棉拭子(4.7),在样品四周和中间均匀布控 5 个采样点,用无菌规格板(4.6)比照按每个采样点 20 cm<sup>2</sup> 面积范围均匀涂抹,每个采样点用 1 个无菌干燥棉拭子(4.7),在 4 cm $\times$ 5 cm(20 cm<sup>2</sup>)面积范围均匀涂抹,立即用无菌剪刀(4.2),剪去棉拭子手接触部分,将涂抹部分一块放入盛有 50 mL SCDLP 液体培养基(5.1)的无菌均质袋(4.4)中混匀。

### 6.4 样品制备方法的选择

6.4.1 样品制备一般依 6.1 方法,25 g 样品+225 mL SCDLP 液体培养基(5.1)为基准方法。

6.4.2 当样品为面积较大或较厚实或多孔时,样品制备应采用 6.2 方法。采用 6.2 方法时如果被检样品面积过大或过小,采样点可按比例增加或减少。

6.4.3 当样品质地致密不容易剪碎制备,或样品较贵重,客户要求无损检测的,样品制备应采用 6.3 方法。

6.4.4 采用 6.1、6.2 方法时,如果被检样品大量吸水而导致不能吸出足够样品均液转种,稀释液 SCDLP 液体培养基(5.1)可适当增加直至足够吸出转种。



7 方法一：沙门氏菌传统检验方法

7.1 原理

根据沙门氏菌属在其选择性培养基上有特定的生长、形态、其生理生化特征及菌体抗原与相应抗体结合产生凝集反应的特性，通过形态观察、生化试验、血清学实验判断样品中是否检出沙门氏菌。

7.2 检验程序

检验程序见图 1。



图 1 沙门氏菌传统定性检验程序

7.3 操作步骤

7.3.1 一次增菌

将按 6.1、6.2 或 6.3 制备好的样品匀液放入 36 °C ± 1 °C 恒温培养箱(4.8)中，增菌培养 16 h ± 2 h。



### 7.3.2 二次增菌

取 7.3.1 培养物 1 mL 接种于装有 10 mL 氯化镁孔雀绿肉汤(5.2)的试管中,  $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ ; 另取 7.3.1 培养物 1 mL 接种于装有 10 mL 亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)(5.3)的试管中,  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。

### 7.3.3 分离

用无菌接种环(4.10)挑取 7.3.2 增菌液各 1 环, 分别划线接种于一个亚硫酸铋琼脂(BS)(5.4)平板和一个沙门氏菌显色培养基(5.5)平板。放置  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱(4.8), 亚硫酸铋琼脂平板培养  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ , 沙门氏菌显色培养基平板培养  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。培养结束后观察各个平板上菌落生长情况, 如无可疑或典型菌落生长, 可直接报告沙门氏菌未检出; 如有可疑或典型菌落长出, 则挑取可疑或典型菌落纯化后进行生化试验和血清学试验确认。亚硫酸铋琼脂(BS)平板上沙门氏菌菌落特征棕褐色或灰色至黑色, 有时有金属光泽, 周围培养基呈棕色或黑色; 有些菌株呈灰绿色, 周围培养基不变或微变暗。沙门氏菌在其显色培养基上菌落特征按照显色培养基的说明进行判定。

### 7.3.4 确认试验

#### 7.3.4.1 纯化菌落

以上选择性平板上如有可疑或典型菌落长出, 分别挑取亚硫酸铋琼脂(BS)平板、沙门氏菌属显色培养基平板上 2 个以上可疑或典型菌落, 接种营养琼脂(5.6)平板, 于  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$  纯化, 挑取纯化后的菌落同时做如下生化试验。

#### 7.3.4.2 生化试验

##### 7.3.4.2.1 三糖铁(TSI)试验

挑取 7.3.4.1 纯化后的菌落先深层穿刺接种三糖铁(TSI)琼脂(5.7)后再划线接种斜面, 置  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$  后观察结果, 反应过程产碱时培养基变玫瑰红色, 产酸时培养基变黄色, 产硫化氢时培养基会变黑色, 产气时能观察到培养基内有气孔。

三糖铁穿刺接种时, 勿穿到底部, 否则会影响到底层培养基颜色变化的观察。

##### 7.3.4.2.2 赖氨酸脱羧酶试验

接种赖氨酸脱羧酶培养基和赖氨酸脱羧酶对照培养基(5.8), 置  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ , 培养后阳性反应为: 赖氨酸脱羧酶培养基呈紫色, 对照培养基呈黄色。

##### 7.3.4.2.3 尿素酶试验

接种尿素琼脂(pH7.2)(5.9), 置  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ , 阳性反应颜色由黄色或橙色变成玫瑰红色或红色。

##### 7.3.4.2.4 V-P 试验

接种 V-P 半固体琼脂(5.10), 置  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$  结束后, 加入 V-P 反应甲液(5.11) 0.2 mL, 摇匀, 再加入 V-P 反应乙液(5.12) 0.1 mL, 摇匀, 阳性反应会在 15 min 内呈现红色。

##### 7.3.4.2.5 吲哚试验

接种吲哚培养基(5.13), 置  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$  后滴加柯凡克试剂(5.14) 0.1 mL, 阳性反应出现红色环, 阴性为黄棕色环。

##### 7.3.4.2.6 $\beta$ -半乳糖苷酶试验

接种  $\beta$ -半乳糖苷酶试剂(5.15), 置  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ , 阳性反应变黄色, 不变色为阴性。

7.3.4.2.7 根据 7.3.4.2.1、7.3.4.2.2、7.3.4.2.3 结果可对沙门氏菌属进行初筛, 具体生化现象判定可参照



表 1。

表 1 沙门氏菌属初筛生化鉴别表

| 三糖铁试验  |    |      |      | 赖氨酸脱羧酶试验 | 尿素酶试验 | 初步判定    |
|--|----|------|------|----------|-------|---------|
| 斜面   | 底层 | 产气   | 硫化氢  |          |       |         |
| K  | A  | +(—) | +(—) | +        | —     | 可疑沙门氏菌属 |
| K  | A  | +(—) | +(—) | —        | —     | 可疑沙门氏菌属 |
| A  | A  | +(—) | +(—) | +        | —     | 可疑沙门氏菌属 |
| K  | A  | +(—) | +(—) | +        | +     | 非沙门氏菌   |
| A  | A  | +/-  | +/-  | —        | +     | 非沙门氏菌   |
| K  | K  | +/-  | +/-  | +/-      | +/-   | 非沙门氏菌   |
| 注：K：产碱变玫瑰红色，A：产酸变黄；+：阳性，—：阴性；+(—)：多数阳性，少数阴性；+/-：阳性或阴性。 |    |      |      |          |       |         |

生化现象符合表 1 时，可参照表 2 生化现象对沙门氏菌属做初步判定。

表 2 沙门氏菌属生化反应

| 生化试验项目  | 结果判定             |     |                  |     | 沙门氏菌生化现象 |
|---|------------------|-----|------------------|-----|----------|
|   | 阴性结果             |     | 阳性结果             |     |          |
| 三糖(TSI)试验   | 斜面               | K   | 斜面               | A   | K 或 A    |
|   | 底层               | K   | 底层               | A   | A        |
|   | 硫化氢              | 不变黑 | 硫化氢              | 变黑  | +/-      |
|   | 产气               | 无气孔 | 产气               | 有气孔 | +/-      |
| 刺氨酸脱羧酶试验  | 对照管为黄色<br>试验管为黄色 |     | 对照管为黄色<br>试验管为紫色 |     | +/-      |
| 尿素酶试验   | 黄色或橙色            |     | 玫瑰红色或红色          |     | -        |
| V-P 试验  | 不变色              |     | 红色               |     | -        |
| 吲哚试验  | 黄色环              |     | 红色环              |     | -        |
| β-半乳糖苷酶试验   | 不变色              |     | 黄色               |     | +/-      |
| 注：K：产碱变玫红色，A：产酸变黄；+：阳性，-：阴性；+（-）：多数阳性，少数阴性；+/-：阳性或阴性。 |                  |     |                  |     |          |

7.3.4.2.8 如选择商品化生化鉴定试剂盒(5.16)或全自动微生物生化鉴定系统(4.9)，可选择 7.3.4.1 纯化后的菌落，按其对应操作说明书进行试验。

7.3.4.2.9 生化试验结果符合表 1、表 2 沙门氏菌属特性的，按 7.3.4.3 进行血清学实验。

7.3.4.3 血清学试验

7.3.4.3.1 筛选掉自凝菌株

取出干净载玻片(4.11)，用微量移液器(4.12)吸取 20 μL 无菌生理盐水(5.17)滴加于载玻片中央，用接种环(4.10)挑取营养琼脂平板上分纯单个菌落于生理盐水中，轻轻摇动载玻片，对着黑色背景观察，1 min~2 min 内出现颗粒状的凝集，则视为自凝阳性菌。选取自凝阴性的菌进行下面血清学鉴定。



#### 7.3.4.3.2 沙门氏菌(O)多价抗原鉴定

取出沙门氏菌 O 多价抗血清(5.18),恢复室温;取出干净载玻片(4.11),做好标记;用微量移液器(4.12)吸取 20  $\mu$ L 沙门氏菌 O 多价抗血清(5.18)滴加于载玻片中央;用接种环(4.10)挑取营养琼脂平板上分纯单个菌落于血清中,慢慢磨开使其混匀成乳状液,静置,1 min 后观察凝集情况。将载玻片倾斜摇动混合 1 min,并对着黑暗背景进行观察,任何程度的凝集现象皆为阳性反应。

#### 7.3.4.3.3 沙门氏菌 H 多价抗原鉴定

用沙门氏菌 H 多价抗血清(5.19)代替沙门氏菌 O 多价抗血清(5.18),方法同 7.3.4.3.2。

#### 7.3.4.3.4 沙门氏菌 Vi 抗原鉴定

如果 O 多价抗血清、H 多价抗血清都不凝集,则用沙门氏菌 Vi 抗血清(5.20)检查,方法同 7.3.4.3.2。如 Vi 抗血清凝集,应去除 Vi 抗原的影响,将待检菌做成浓菌液,放入 100  $^{\circ}$ C 沸水中水浴 30 min,破坏 Vi 抗原,然后再挑取菌液做 O 多价血清检查。

### 7.4 结果与报告

综合以上生化试验和血清学试验结果,报告样品中检出或未检出沙门氏菌。

## 8 方法二:沙门氏菌环介导恒温扩增(LAMP)法

### 8.1 原理

根据沙门氏菌属特有的靶基因序列,针对靶基因的 6 个独立区域设计一组特异性引物,利用 DNA 聚合酶启动循环链置换反应,在等温条件(63  $^{\circ}$ C 左右)下保温 30 min~60 min 特异、高效、快速的完成核酸扩增。扩增后的产物形成白色沉淀,通过对比观察可判定结果。

### 8.2 检验程序

检验程序见图 2。



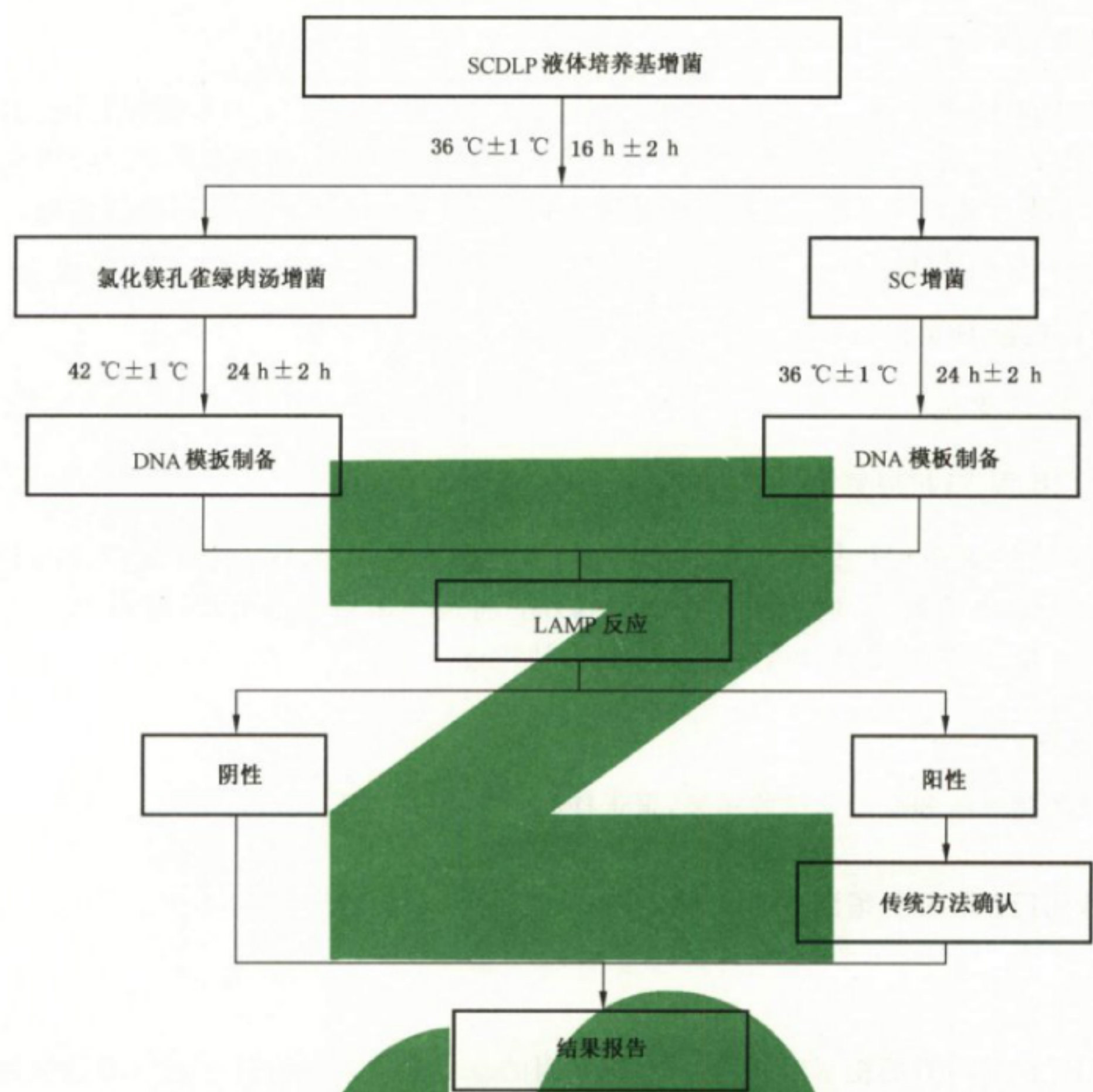


图 2 沙门氏菌 LAMP 检验程序

8.3 操作步骤

8.3.1 样品增菌

样品增菌同 7.3.1、7.3.2。

8.3.2 DNA 模板的制备

取 1 mL 氯化镁孔雀绿肉汤增菌液和 1 mL SC 增菌液分别放入两个 1.5 mL 灭菌离心管(4.13)内，置高速离心机 (4.15)内 10 000 r/min 离心 5 min，吸弃上清；分别加入 1 mL 灭菌双蒸水(5.21)混匀，高速离心机(4.15)内 10 000 r/min 离心 5 min，吸弃上清；然后分别加灭菌双蒸水(5.21)1 mL 混匀，置 100 °C 煮沸 5 min，高速离心机(4.15)内 10 000 r/min 离心 2 min，取上清作为 DNA 模板，可 -20 °C 存放备用。也可使用等效的商品化 DNA 提取试剂盒并按其说明操作。

8.3.3 DNA 扩增反应

8.3.3.1 扩增准备

根据样本数量设定所需要的 LAMP 反应管(4.14)数  $n$  ( $n=1$  管空白对照+1 管阴性对照+1 管阳性对照+样本数 $\times 2$ )。取出  $n$  个 LAMP 反应管(4.14)。扩增反应体系见表 3，按表 3 计算各试剂的使用量，按表 3 的顺序加入灭菌离心管(4.13)中，颠倒混匀，2 000 r/min 离心 10 s，向设定的  $n$  个 LAMP



反应管(4.14)中分别加入 23  $\mu\text{L}$ 。

表 3 反应体系

| LAMP 试剂   | 1 管试验用量             | $n$ 管试验用量                    |
|---|---------------------|------------------------------|
| 10 $\times$ LAMP 扩增缓冲液(5.22)  | 2.5 $\mu\text{L}$   | $n \times 2.5 \mu\text{L}$   |
| F3/B3(5.23)   | 各 1.0 $\mu\text{L}$ | 各 $n \times 1.0 \mu\text{L}$ |
| FIP/BIP(5.23)   | 各 1.0 $\mu\text{L}$ | 各 $n \times 1.0 \mu\text{L}$ |
| LoopF/LoopB(5.23)   | 各 1.0 $\mu\text{L}$ | 各 $n \times 1.0 \mu\text{L}$ |
| 100 mmol/L $\text{MgSO}_4$ (5.24)   | 1.5 $\mu\text{L}$   | $n \times 1.5 \mu\text{L}$   |
| 10 mmol/L dNTP 混合物(5.25)  | 3.5 $\mu\text{L}$   | $n \times 3.5 \mu\text{L}$   |
| 8 U/ $\mu\text{L}$ <i>Bst</i> DNA 聚合酶(5.26)   | 1.0 $\mu\text{L}$   | $n \times 1.0 \mu\text{L}$   |
| 灭菌双蒸水(5.21)   | 8.5 $\mu\text{L}$   | $n \times 8.5 \mu\text{L}$   |
| 总体积   | 23 $\mu\text{L}$    | $n \times 23 \mu\text{L}$    |
| 注：引物终浓度 F3 和 B3 为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ , FIP 和 BIP 为 1.6 $\mu\text{mol/L}$ , LoopF 和 LoopB 为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 。 |                     |                              |

#### 8.3.3.2 空白对照、阴性对照、阳性对照

每次反应应设置阴性对照、空白对照和阳性对照。

空白对照：以水代替 DNA 模板。

阴性对照：以水代替样品按 8.3.2 提取模板 DNA 作为 LAMP 反应的模板。

阳性对照：沙门氏菌标准菌株增菌后按 8.3.2 提取模板 DNA 作为 LAMP 反应的模板。

#### 8.3.3.3 加样

将 8.3.2 制备好的 DNA 模板、空白对照、阴性对照、阳性对照各取 2  $\mu\text{L}$  加入相应的反应管中，使反应体系达到 25  $\mu\text{L}$ 。盖紧管盖，混匀，2 000 r/min 离心 10 s。

#### 8.3.3.4 上机反应

将 8.3.3.3 反应管置水浴锅(4.16)或 LAMP 实时浊度仪(4.17)中，63  $^{\circ}\text{C}$  扩增 40 min。

### 8.4 结果观察

#### 8.4.1 可视化观察结果

反应结束后取出反应管，将反应管置黑色背景下观察。先观察对照反应管，有白色沉淀者为阳性，无白色沉淀者为阴性；如果沉淀现象不明显，在反应管中加入 1 000 $\times$  SYBR GreenI 染料(5.27) 2  $\mu\text{L}$ ，轻轻混匀，立即观察颜色变化，绿色为阳性，橙色为阴性。空白对照、阴性对照、阳性对照成立，才能判定样品的检测结果，样品反应管的任何程度沉淀或加染料后的不同于阴性的颜色变化都判定为阳性结果。

#### 8.4.2 浊度仪结果

反应结束后，观察 LAMP 实时浊度仪生成的扩增曲线，空白对照、阴性对照无扩增曲线，反应浊度值小于 0.1，阳性对照有典型扩增曲线且反应浊度值大于 0.1，否则实验视为无效。样品反应浊度值小于 0.1 时，可判定该样品结果为阴性；样品反应浊度值大于或等于 0.1 时，可判定该样品结果为阳性。



## 8.5 结果报告

根据 8.4 结果,判定样品中沙门氏菌初筛检测结果。如果初筛结果为阴性,可直接报告样品中未检出沙门氏菌,如初筛结果为阳性,按 7.3.3 分离菌落,按 7.3.4 进行确认,报告样品中检出或未检出沙门氏菌。

## 9 防止污染和废弃物处理的措施

- 9.1 检测前后,实验室用紫外线消毒及通过反复清洗、擦拭去除各种器具和设备表面残留的 DNA。
- 9.2 检测过程中严格分区操作,应符合 GB/T 27403 的要求,以防止核酸的交叉污染。
- 9.3 检测废弃物应符合 GB 19489 的要求,经高压灭菌等无害化处理。



附 录 A  
(规范性附录)  
培养基和试剂

### A.1 培养基制备及质量保证

应按 SN/T 1538.1 和 SN/T 1538.2, 并对制备好的培养基进行性能测试, 如使用等效商品化脱水合成培养基, 使用前对其进行验收并按其说明书使用。

### A.2 SCDLP 液体培养基

#### A.2.1 成分

|       |          |
|-------|----------|
| 酪蛋白胨  | 17.0 g   |
| 大豆蛋白胨 | 3.0 g    |
| 氯化钠   | 5.0 g    |
| 磷酸氢二钾 | 2.5 g    |
| 葡萄糖   | 2.5 g    |
| 卵磷脂   | 1.0 g    |
| 吐温-80 | 7.0 g    |
| 蒸馏水   | 1 000 mL |

#### A.2.2 制法

准确称取上述各成分于 1 000 mL 蒸馏水中, 加热溶解, 室温下调 pH  $7.2 \pm 0.1$ , 121 °C 高压灭菌 15 min, 备用。

### A.3 氯化镁孔雀绿肉汤

#### A.3.1 成分

|       |          |
|-------|----------|
| 胰蛋白胨  | 4.5 g    |
| 氯化钠   | 7.2 g    |
| 磷酸二氢钾 | 1.44 g   |
| 氯化镁   | 36.0 g   |
| 孔雀绿   | 0.036 g  |
| 蒸馏水   | 1 000 mL |

#### A.3.2 制法

准确称取将上述各成分, 完全溶解于 1 000 mL 蒸馏水中。分装试管, 每管 10 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min, 备用。



A.4 亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)

A.4.1 成分

|       |          |
|-------|----------|
| 蛋门朊   | 5.0 g    |
| 乳糖    | 4.0 g    |
| 磷酸氢二钠 | 10.0 g   |
| 亚硒酸氢钠 | 4.0 g    |
| L-胱氨酸 | 0.01 g   |
| 蒸馏水   | 1 000 mL |

A.4.2 制法

准确称取上述各成分,除亚硒酸氢钠外,将各成分加入 1 000 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,冷至 55 ℃ 以下,以无菌操作加入 4.0 g 亚硒酸氢钠和 1 g/L L-胱氨酸溶液 10 mL(称取 0.1 g L-胱氨酸,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 15 mL,使溶解,再加无菌蒸馏水至 100 mL,即用即配),摇匀,调节 pH 7.0±0.1,分装试管,每管 10 mL,备用。

A.5 亚硫酸铋琼脂(BS)

A.5.1 成分

|       |          |
|-------|----------|
| 蛋白朊   | 10.0 g   |
| 牛肉浸粉  | 5.0 g    |
| 葡萄糖   | 5.0 g    |
| 磷酸氢二钠 | 4.0 g    |
| 硫酸亚铁  | 0.3 g    |
| 柠檬酸铋铵 | 2.0 g    |
| 亚硫酸钠  | 6.0 g    |
| 煌绿    | 0.025 g  |
| 琼脂    | 20.0 g   |
| 蒸馏水   | 1 000 mL |

A.5.2 制法

- A.5.2.1 准确称取前面 5 种成分溶解于 300 mL 蒸馏水中,搅拌均匀制成基础液。
- A.5.2.2 准确称取柠檬酸铋铵和亚硫酸钠溶解于 50 mL 蒸馏水中,搅拌均匀。
- A.5.2.3 准确称取琼脂于 600 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,冷至 80 ℃。
- A.5.2.4 先将 A.5.2.2 混匀的柠檬酸铋铵和亚硫酸钠溶液倒入 A.5.2.1 基础液中,再混匀。调 pH 7.5±0.1,随即倒入 A.5.2.3 琼脂液中,混合均匀,冷却至 50 ℃~55 ℃。加入煌绿,补充蒸馏水至 1 000 mL,充分混匀后立即倾注平皿。

注:此培养基不需高压灭菌。制备过程不宜过分加热,以免降低其选择性。应在临用前一天制备,贮存于室温暗处。超过 48 h 不宜使用。



## A.6 营养琼脂

## A.6.1 成分

|     |          |
|-----|----------|
| 蛋白胨 | 10.0 g   |
| 牛肉膏 | 3.0 g    |
| 氯化钠 | 5.0 g    |
| 琼脂  | 20.0 g   |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |

## A.6.2 制法

将上述成分混合后,加热溶解,调 pH7.4±0.1,分装到玻璃容器内,121 °C 高压灭菌 20 min,每平板倾注 15 mL~20 mL 琼脂,备用。

## A.7 三糖铁(TSI)琼脂

## A.7.1 成分

|                 |          |
|-----------------|----------|
| 蛋白胨             | 20.0 g   |
| 牛肉膏             | 5.0 g    |
| 乳糖              | 10.0 g   |
| 蔗糖              | 10.0 g   |
| 葡萄糖             | 1.0 g    |
| 硫酸亚铁铵(含 6 个结晶水) | 0.2 g    |
| 酚红              | 0.025 g  |
| 氯化钠             | 5.0 g    |
| 硫代硫酸钠           | 0.2 g    |
| 琼脂              | 12.0 g   |
| 蒸馏水             | 1 000 mL |

## A.7.2 制法

A.7.2.1 准确称取除酚红和琼脂外其他成分加入 400 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH7.4±0.1。

A.7.2.2 准确称取琼脂加入 600 mL 蒸馏水中,煮沸溶解。

A.7.2.3 将上述两溶液混合均匀后,再加入酚红,混匀,分装试管(10 mm×100 mm),每管约 2 mL~4 mL,121 °C 高压灭菌 15 min,灭菌后置成高层斜面,备用。

## A.8 赖氨酸脱羧酶培养基和赖氨酸脱羧酶对照培养基

## A.8.1 成分

|       |         |
|-------|---------|
| 酵母浸粉  | 3.0 g   |
| L-赖氨酸 | 5.0 g   |
| 葡萄糖   | 1.0 g   |
| 溴甲酚紫  | 0.016 g |



## A.8.2 制法

准确称取上述成分加热溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,调 pH6.7±0.1。对照培养基不加 L-赖氨酸。分装无菌试管(10 mm×100 mm),每管 1.5 mL,上面滴加一层液体石蜡,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

## A.9 尿素琼脂(pH7.2)

## A.9.1 成分

|         |          |
|---------|----------|
| 蛋白胨     | 1.0 g    |
| 氯化钠     | 5.0 g    |
| 葡萄糖     | 1.0 g    |
| 磷酸二氢钾   | 2.0 g    |
| 0.4%酚红  | 3.0 mL   |
| 琼脂      | 20.0 g   |
| 蒸馏水     | 1 000 mL |
| 20%尿素溶液 | 100 mL   |

## A.9.2 制法

A.9.2.1 准确称取除尿素、琼脂、酚红外的其他成分加入 400 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,调 pH7.2±0.1。

A.9.2.2 准确称取琼脂加入 600 mL 蒸馏水中,煮沸溶解。

A.9.2.3 将上述两种溶液混合均匀后,加入 0.4%酚红,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却至 50 °C~55 °C,加入 20%尿素溶液 100 mL,分装无菌试管(10 mm×100 mm),每管 1.5 mL,制成斜面备用。

## A.10 V-P 半固体琼脂

## A.10.1 成分

|     |        |
|-----|--------|
| 蛋白胨 | 12.0 g |
| 酵母膏 | 1.0 g  |
| 葡萄糖 | 10.0 g |
| 氯化钠 | 5.0 g  |
| 琼脂  | 3.0 g  |
| 蒸馏水 | 100 mL |

## A.10.2 制法

准确称取各成分加入蒸馏水中,搅拌均匀,静置 10 min,加热煮沸至完全溶解,调 pH7.3±0.1,分装试管(10 mm×100 mm),每管 1.5 mL,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

## A.11 V-P 反应甲液

准确称取 α-萘酚 6.0 g 溶于 100 mL 无水乙醇溶液中,保存于 4 °C 冰箱中备用。



## A.12 V-P 反应乙液

准确称取氢氧化钾 40.0 g 溶于 100 mL 蒸馏水中,混匀;再称取 0.3 g 肌酸,混匀,保存于 4 ℃ 冰箱中备用。

## A.13 吲哚培养基

## A.13.1 成分

|        |          |
|--------|----------|
| 蛋白胨    | 10.0 g   |
| 氯化钠    | 5.0 g    |
| DL-色氨酸 | 1.0 g    |
| 蒸馏水    | 1 000 mL |

## A.13.2 制法

A.13.2.1 准确称取除 DL-色氨酸外其他成分加入 1 000 mL 蒸馏水中,搅拌均匀,静置约 10 min。

A.13.2.2 准确称取 DL-色氨酸加入约 4 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液中,完全溶解。

A.13.2.3 将两液进行混合,加热煮沸至完全溶解,调 pH7.4±0.1,分装试管(10 mm×100 mm),每管 1.5 mL,121 ℃ 高压灭菌 15 min,备用。

## A.14 柯凡克试剂

## A.14.1 成分

|          |        |
|----------|--------|
| 对二甲氨基苯甲醛 | 10.0 g |
| 戊醇       | 150 mL |
| 浓盐酸      | 50 mL  |

## A.14.2 制法

准确称取对二甲氨基苯甲醛溶于戊醇中,缓慢搅拌加入盐酸,加热至 60 ℃,呈深黄色,静置 6 h~7 h,变成黄色即可使用。

A.15  $\beta$ -半乳糖苷酶试剂

## A.15.1 缓冲液

## A.15.1.1 成分

|                  |       |
|------------------|-------|
| 磷酸二氢钠            | 6.9 g |
| 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 | 3 mL  |
| 蒸馏水              | 50 mL |

## A.15.1.2 制法

准确称取磷酸二氢钠溶于大约 45 mL 蒸馏水中,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH7.0±0.1,加蒸馏水至最后容量 50 mL,冷藏保存备用。



SN/T 4656.6—2017

### A.15.2 ONPG 溶液

#### A.15.2.1 成分

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| 邻硝基酚 $\beta$ -D-半乳糖苷(ONPG) | 80 mg |
| 蒸馏水                        | 15 mL |

#### A.15.2.2 制法

准确称取 ONPG 溶解于蒸馏水中。

### A.15.3 $\beta$ -半乳糖苷酶试剂配制

将以上两种溶液混合,过滤除菌,分装于无菌试管(10 mm $\times$ 100 mm),每管 1.5 mL,冷藏备用。

### A.16 灭菌生理盐水

#### A.16.1 成分

|     |          |
|-----|----------|
| 氯化钠 | 8.5 g    |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |

#### A.16.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,121  $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 min。

---