

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0184.3—2008

进出口食品中单核细胞增生 李斯特氏菌检测方法 第3部分：免疫磁珠法

Determination of *Listeria monocytogenes* in food for import and export—
Part 3: Immuno-magnetic beads assay

2008-09-04 发布

2009-03-16 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

本部分的附录 A、附录 B 均为规范性附录。

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：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：吴斌、李振荣、胡传伟、王玉萍、蒋维旗。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

进出口食品中单核细胞增生 李斯特氏菌检测方法 第3部分:免疫磁珠法

1 范围

SN/T 0184 的本部分规定了进出口食品中单核细胞增生李斯特氏菌取样、制样和免疫磁珠检测方法。

本部分适用于进出口食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 SN/T 0184 本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB 19489 实验室生物安全通用要求

SN/T 0184.1 进出口食品中单核细胞增生李斯特氏菌检验方法

3 方法概述

将直径 $0.05\ \mu\text{m}\sim 4\ \mu\text{m}$ 具有磁性的微珠的表面化学修饰,并与李斯特氏菌特异性抗体结合,制成免疫磁珠,它能与食品中李斯特氏菌抗原结合,从而检出食品中的李斯特氏菌。样品经 24 h~48 h 增菌后,分别取 1 mL 增菌液和 20 μL 免疫磁珠加入带盖塑料管中,在磁板背景下混合,如果有李斯特氏菌抗原存在,免疫磁珠就会将其捕获,然后利用磁性将免疫磁珠聚集,经清洗后接种到显色培养基和任选一种培养基(OXA 或 PALCAM 琼脂),对于选择性分离平板上典型李斯特氏菌菌落进行确认,最终通过系列试验确定是否存在单核细胞增生李斯特氏菌。

4 设备和器具

4.1 培养箱: $37\ \text{C}\pm 1\ \text{C}$; $41.5\ \text{C}\pm 1\ \text{C}$ 。

4.2 水浴锅: $45\ \text{C}\pm 1\ \text{C}$ 。

4.3 微量移液器:20 $\mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$, 10 μL , 1 mL。

4.4 刻度移液管:5 mL、10 mL。

4.5 灭菌玻璃器具:量筒、三角烧瓶、培养皿(直径 90 mm)、试管。

4.6 灭菌管(Eppendorf 管):1.5 mL。

4.7 抗李斯特氏菌免疫磁珠:该磁珠可以通过商业途径获得。应准确地按照生产商的说明书进行操作。

4.8 旋涡混合器。

4.9 带有磁架的磁性分离器。

5 培养基和试剂

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

5.1 胰酪大豆肉汤(TSB-YE):见第 A.1 章。

- 5.2 胰酪大豆琼脂(TSA-YE):见第 A.2 章。
- 5.3 Fraser 肉汤增菌液(FB₁,FB₂):见第 A.3 章。
- 5.4 OXA 琼脂:见第 A.4 章。
- 5.5 PALCAM 琼脂:见第 A.5 章。
- 5.6 显色培养基。

注:本部分使用的培养基为 CHROMagar 公司产品,其他公司的等效显色培养基应验证后使用。

- 5.7 磷酸盐缓冲溶液(PBS):见第 A.6 章。
- 5.8 参考菌株:单核细胞增生李斯特氏菌(CMCC 54002)。

6 检验步骤

6.1 样品制备

在均质袋中加入 25 g 样品,再加入 225 mL FB₁ 增菌肉汤(见 5.3),30 °C 培养 24 h±1 h。

6.2 增菌

取 1 mL 6.1 中制备好的样品,加到 10 mL FB₂ 增菌液(见 5.3)中,35 °C 培养 24 h±1 h 后,进行免疫磁珠分离。

6.3 免疫磁珠分离(IMS)

6.3.1 免疫捕获

混合 6.2 增菌培养液,沉淀所有的粗糙食物残渣,从增菌培养液中移取 1 mL 上层液体(要尽可能避免移取到食物颗粒和脂肪颗粒)加入 Eppendorf 管(见 4.6)中,加 20 μL 准备好的免疫磁珠(见 4.7)。在旋涡混合器(见 4.8)上混合该悬液。

6.3.2 分离

将 Eppendorf 管固定在磁架(见 4.9)的管孔中,180°轻缓摆动磁架 5 次~6 次,使免疫磁珠聚集到磁极。小心地打开磁架上的 Eppendorf 管管盖,从磁极对面一侧慢慢吸出液体,注意不要接触管壁上的磁珠,每一个样品换一次枪头;加 1 mL 灭菌的 PBS(见 5.7),并重新盖好盖子,将磁极从支架上移走,180°轻缓摆动磁架 5 次~6 次,使管内各成分混合,然后重新将磁极放回到支架上。重复该清洗步骤几次。将离心管从磁性分离器上移开,并加 100 μL 灭菌的 PBS(见 5.7)到管中,重悬磁珠。如果实验室没有磁性分离器,也可以用手摇代替。

6.4 分离培养

6.4.1 分离培养

吸取 50 μL 免疫磁珠悬液,加到显色培养基(见 5.6)及任一选择性培养基 OXA(见 5.4)、PALCAM(见 5.5)琼脂平板上,用无菌接种环划线,35 °C±1 °C 培养 24 h~48 h。

6.4.2 筛选

李斯特氏菌在 CHROMagar 显色培养基上菌落为蓝色,且在其周围形成一个晕环。李斯特氏菌在 OXA 琼脂平板上生长 24 h 后菌落呈现黑色,直径为 1 mm,在其周围形成一个黑色环,培养 48 h,菌落仍呈黑色,直径 2 mm~3 mm,除在菌落周围有一环外,在菌落中心部位的深层也形成黑点。李斯特氏菌在 PALCAM 琼脂平板上与在 OXA 琼脂平板上菌落相似。在 CHROMagar 显色培养基及 OXA 或 PALCAM 琼脂平板上挑取 5 个或更多可疑菌落,接种于 TSA-YE 琼脂(见 5.2)平板上,纯培养后进鉴定。

6.5 鉴定和确认

单核细胞增生李斯特氏菌的鉴定和确认按 SN/T 0184.1 执行,单核细胞增生李斯特氏菌检验程序图见附录 B。

7 质量控制

每次检验均应用单核细胞增生李斯特氏菌(见 5.8)进行质量控制。

8 结果判定

8.1 凡通过本方法在被检食品中分离获得的纯菌落,各项生化试验结果均符合 SN/T 0184.1 所规定的生化特征,报告为在 25 g 被检食品中检出单核细胞增生李斯特氏菌。

8.2 各项生化试验结果不符合 SN/T 0184.1 所规定的生化特征,报告为在 25 g 被检食品中未检出单核细胞增生李斯特氏菌。

9 安全防护

单核细胞增生李斯特氏菌为生物安全二级病原微生物。微生物检测实验室的工作人员对该菌进行检验时,应遵守 GB 19489 中关于实验室生物安全防护的要求。易被其感染的年幼儿童、虚弱者、年长老人、免疫缺陷者应远离单核细胞增生李斯特氏菌分离、鉴定和确认的试验场所。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A. 1 胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE)**A. 1.1 成分**

胰酪蛋白胨(或胰蛋白胨)	17.0 g
植物蛋白胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	6.5 g
葡萄糖	6.5 g
酵母浸膏	6.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 1.2 制法

将上述各成分加热煮沸溶解冷却后,调 pH 至 7.1~7.5,分装,121 °C 灭菌 15 min,备用。

A. 2 胰酪大豆琼脂(TSA-YE)**A. 2.1 成分**

胰酪蛋白胨(或胰蛋白胨)	15.0 g
植物蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
酵母浸膏	6.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 2.2 制法

除琼脂外,将其他各成分加热煮沸溶解冷却后,调 pH 至 7.1~7.5,再加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min,备用。

A. 3 Fraser 肉汤增菌液(FB₁,FB₂)**A. 3.1 基础肉汤****A. 3.1.1 基础肉汤成分**

酪蛋白酶消化物	5.0 g
动物组织酶消化物	5.0 g
牛肉浸膏药	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
氯化钠	20.0 g
磷酸氢二钠	16.0 g
磷酸二氢钾	1.35 g
七叶苷	1.0 g
氯化锂	3.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 3.1.2 制法

将上述成分置于 50 ℃ 水浴中充分溶解,冷却后调 pH 至 7.0~7.4,分装,121 ℃ 灭菌 15 min。

A. 3.2 盐酸吡啶黄溶液

盐酸吡啶黄	25 mg
灭菌蒸馏水	10 mL

振摇混匀,充分溶解后过滤除菌,避光保存。

A. 3.3 萘啶酮酸钠盐溶液

萘啶酮酸	20 mg
0.05 mol/L 氢氧化钠溶液	10 mL

振摇混匀,充分溶解后过滤除菌。

A. 3.4 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液

氢氧化钠	0.1 g
灭菌蒸馏水	50 mL

振摇混匀,充分溶解。

A. 3.5 柠檬酸铁铵溶液

柠檬酸铁铵	0.5 g
灭菌蒸馏水	10 mL

振摇混匀,充分溶解后过滤除菌。

A. 3.6 Fraserm 肉汤 FB₁ 增菌液**A. 3.6.1 Fraserm 肉汤 FB₁ 增菌液成分**

盐酸吡啶黄溶液	5 mL
萘啶酮酸钠盐溶液	5 mL
柠檬酸铁铵溶液	10 mL

A. 3.6.2 制法

将 A. 3.6.1 中各成分按上述体积加入到 1 000 mL A. 3.1 基础肉汤中,无菌分装于 10 mL,大试管中备用。

A. 3.7 Fraserm 肉汤 FB₂ 增菌液**A. 3.7.1 Fraserm 肉汤 FB₂ 增菌液成分**

盐酸吡啶黄溶液	5 mL
萘啶酮酸钠盐溶液	5 mL

A. 3.7.2 制法

将 A. 3.7.1 中各成分按上述体积加入到 1 000 mL A. 3.1 基础肉汤中,无菌分装于 10 mL 大试管中备用。

A. 4 OXA 琼脂**A. 4.1 成分**

蛋白胨	23.0 g
淀粉	1.0 g
氯化钠	5.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
七叶苷	1.0 g
氯化锂	15.0 g
琼脂	13.0 g

蒸馏水	1 000 mL
吡啶黄素	5.0 mg
头孢双硫唑甲氧	6.0 mg
放线菌酮	400.0 mg
硫酸盐粘功菌素	20.0 mg
磷霉素	10.0 mg

A. 4.2 制法

除吡啶黄素、头孢双硫唑甲氧、放线菌酮、磷霉素、硫酸盐粘菌素和琼脂外,将其他成分加热煮沸溶解冷却后,调 pH 至 7.0~7.4,再加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min,冷却至 50 °C,无菌操作,加入用 5 mL 乙醇和 5 mL 无菌水溶解的吡啶黄素、头孢双硫唑甲氧、放线菌酮、磷霉素,摇匀,倾注平板。

A. 5 PALCAM 琼脂

A. 5.1 成分

蛋白胨	23.0 g
淀粉	1.0 g
酵母浸膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
D-葡萄糖	0.5 g
D-甘露醇	10.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
七叶苷	0.8 g
氯化锂	15.0 g
酚红	0.08 g
琼脂	13.0 g
蒸馏水	1 000 mL
盐酸吡啶黄素	5.0 mg
硫酸多粘菌素 B	0.01 g
复达新	20.0 mg

A. 5.2 制法

除盐酸吡啶黄素、硫酸多粘菌素 B、复达新和琼脂外,将其他各成分加热煮沸溶解冷却后,调 pH 至 7.0~7.4,再加入琼脂,121 °C 灭菌 15 min,冷却至 50 °C,无菌操作,加入用适量无菌水溶解的盐酸吡啶黄素、硫酸菌素 B、复达新,摇匀,倾注平板。

A. 6 磷酸盐缓冲溶液(PBS)

A. 6.1 成分

氯化钠	8 g
磷酸二氢钾	0.2 g
磷酸氢二钾	2.9 g
氧化钾	0.2 g
水	1 000 mL

A. 6.2 制法

将各成分溶解于蒸馏水中,用 1 mol/L 氢氧化钠调至 pH7.2。121 °C 高压灭菌 15 min,用蒸馏水加至 1 000 mL 贮存冰箱。

附录 B
(规范性附录)
单核细胞增生李斯特氏菌检验程序

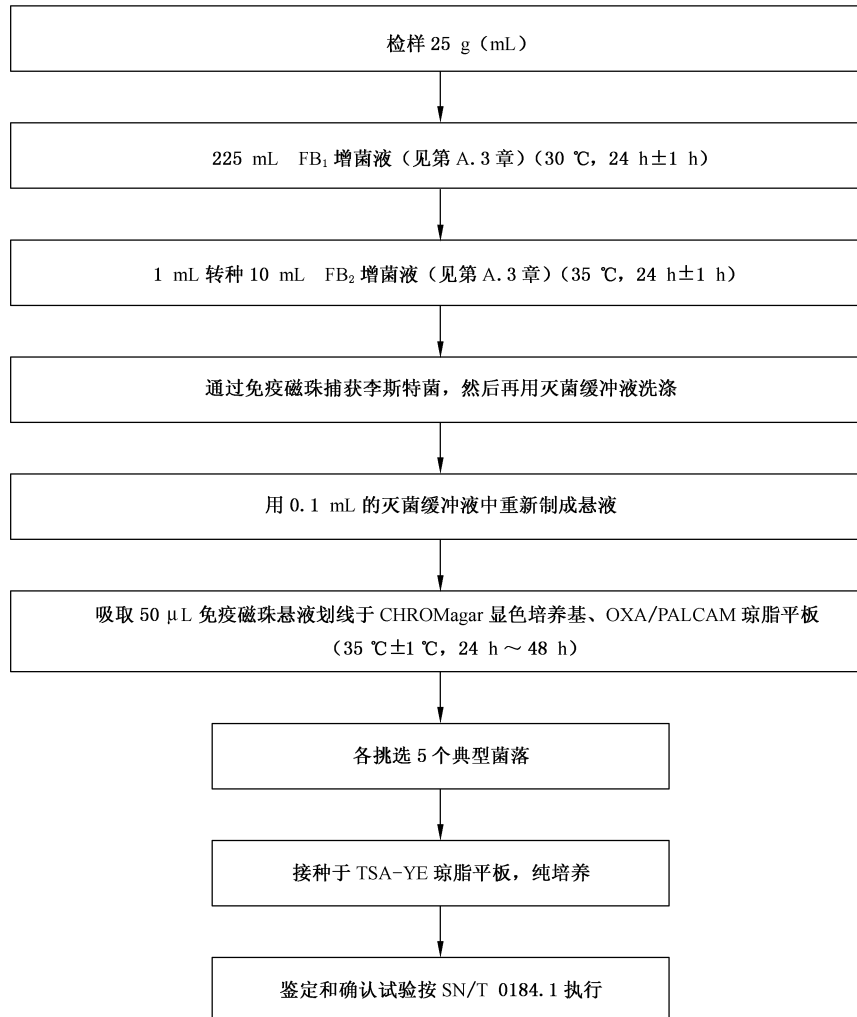


图 B.1 单核细胞增生李斯特氏菌检验程序图

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
进出口食品中单核细胞增生
李斯特氏菌检测方法
第 3 部分:免疫磁珠法
SN/T 0184.3—2008

*

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

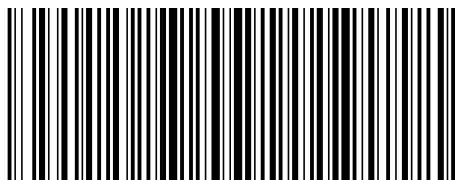
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2008年11月第一版 2008年11月第一次印刷
印数 1—2 000

*

书号: 155066·2-19199 定价 8.00 元



SN/T 0184.3—2008