

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2552.10—2010

乳及乳制品卫生微生物学检验方法
第 10 部分：阪崎肠杆菌检验
免疫荧光方法

Microbiological examination for milk and milk products hygiene—
Part 10: Detection of *Enterobacter sakazakii*—
Fluorescent antibody method

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 10 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：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：杨捷琳、赵贵明、袁飞、顾鸣、袁辰刚、韩伟、关嵘、杨海荣。

乳及乳制品卫生微生物学检验方法

第 10 部分：阪崎肠杆菌检验

免疫荧光方法

1 范围

SN/T 2552 的本部分规定了乳粉中阪崎肠杆菌的免疫荧光检验方法。
本部分适用于乳粉中阪崎肠杆菌的快速筛选，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 1632.1 奶粉中阪崎肠杆菌检验方法 第 1 部分：分离与计数

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

3 溶液与试剂

3.1 PBS 缓冲液：见附录 A 第 A.3 章。

3.2 固定液：见附录 A 第 A.4 章。

3.3 pH9.0 碳酸盐-甘油缓冲溶液：见附录 A 第 A.5 章。

3.4 阪崎肠杆菌多克隆抗体或单克隆抗体试剂及异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠荧光抗体
选用商品化的以阪崎肠杆菌单克隆抗体和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠 Fab 荧光抗体，染色时应按照试剂标明的常规染色工作浓度和稀释方法进行稀释后使用。

注 1：所用荧光抗体应在有效期以内。

注 2：已稀释的荧光抗体试剂置 4℃ 储存可使用 1 个月左右，保持其固有的染色亮度不变，如发现其染色亮度下降，则不能继续使用。

4 设备与材料

4.1 载玻片

76 mm×26 mm，厚度 0.8 mm~1.0 mm，事先刻好编号及八个小方格，自左至右排列，每行四格，上下共两行(或采用供免疫荧光技术专用的多凹涂膜载玻片)，用洗涤剂彻底清洗油污，擦洗干净，并经滴水检查证实无油污后，再浸于 95% 乙醇中保存备用。

4.2 盖玻片

22 mm×22 mm，厚度 0.13 mm~0.17 mm，按同上方法进行去油污处理。

4.3 荧光显微镜

具有投射光或落射光光源装置，配装能投射波长为 330 nm~350 nm 的激发滤片与接受波长大于 400 nm 的阻断滤片。

5 测定方法

5.1 试样制备

抽样和制样按 SN/T 2552.1 执行。无菌称取样品 100 g 至 2 L 的样品稀释瓶中,加入 900 mL 预热到 45 °C 的灭菌蒸馏水,或者将样品直接称量到装有 9 倍于样品质量,并已预热到 45 °C 的灭菌蒸馏水的样品稀释瓶中,振摇使样品充分混匀,36 °C ±1 °C 培养 18 h~22 h。

5.2 染色

5.2.1 染色步骤参见附录 B。以直径 3 mm 的接种环经培养的增菌液一环,制成较薄的标本涂片,置 37 °C 恒温箱(或室温)充分晾干后,用无水乙醇-三氯甲烷-甲醛固定液固定 5 min~10 min,再用 95%乙醇浸洗后晾干(此项乙醇重复使用以不超过三次为宜)。

5.2.2 将阪崎肠杆菌多克隆抗体或单克隆抗体试剂按染色工作浓度滴加于各标本涂片上,放湿盒内,置 37 °C 30 min 后取出,用 0.01 mol/L pH9.0 PBS 冲去多余的抗体,另换相同 PBS 浸洗 10 min,再以蒸馏水冲洗后晾干。

5.2.3 将羊抗小鼠荧光抗体试剂按染色工作浓度滴加于各标本涂片上,放湿盒内,置 37 °C 30 min 后取出,用 0.01 mol/L pH9.0 PBS 冲去多余的荧光抗体,另换相同 PBS 浸洗 10 min,再以蒸馏水冲洗后晾干。

5.2.4 滴加 pH9.0 碳酸盐-甘油缓冲溶液后,加盖玻片封片。

注 1: 对所用荧光抗体之染色工作浓度,必要时可用已知标准菌种重新测定。

注 2: 每次涂片检查时皆应用 1 至数个已知染色阳性菌种作为对照实验。

6 镜检及结果报告

6.1 镜检

先用低倍物镜扫视整个标本,再换高倍物镜进行观察,并记录染色亮度与菌量等情况。

菌体荧光染色亮度评定标准如下:

- a) 4+: 黄绿色闪亮荧光,菌体周围及中心轮廓清晰;
- b) 3+: 黄绿色明亮荧光,菌体周围及中心轮廓清晰;
- c) 2+: 黄绿色荧光较弱,菌体周围及中心轮廓清晰;
- d) 1+: 仅有黯淡的荧光,菌形不清晰;
- e) -: 无荧光或菌形不清。

6.2 结果判定

6.2.1 每个样品制备 2 个~3 个涂片,镜检观察时应结合发荧光菌体的形态与菌量综合判定。

6.2.2 阳性及可疑阳性结果:菌体荧光亮度达到 2+ 左右,菌体形态特征基本符合阪崎肠杆菌短杆状形态,且多数视野中均能检出数个菌体以上。由于抗体与细菌的结合有可能是多价的,观察时菌体形态可能呈现出团块状,应结合普通光和荧光下菌体形态位置的比较进行判断。

6.2.3 阴性结果:荧光亮度在 2+ 以下(不包括 2-),且不属于可疑阳性结果范围者,均为阴性。

6.3 报告方法

6.3.1 荧光染色镜检为阴性结果:报告为“未检出阪崎肠杆菌”。

6.3.2 荧光染色镜检为阳性或可疑阳性结果:按 SN/T 1632.1 继续进行培养法检查,并根据培养法检查结果做报告。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 肠杆菌增菌肉汤(EE 肉汤)

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钠	8.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
牛胆盐	20.0 g
煌绿	0.015 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2 制法

应使用纯净的牛胆盐和煌绿,减少对受损伤且数量极少的肠杆菌的生长抑制。将各成分加入蒸馏水中,加热煮沸,调节 pH 至 7.2 ± 0.1 ,分装适宜容器。115 °C 高压灭菌 15 min,制成的培养基为绿色,可放置 2 °C~8 °C 冷藏柜保存,4 周内使用。

A.2 脑心浸液(BHI)

A.2.1 成分

小牛脑浸汁	200 g
牛心浸汁	250 g
胰蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	2.5 g
葡萄糖	2.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,缓缓加热至溶解,分装 5 mL 于 16 mm×150 mm 试管中,121 °C 高压灭菌 15 min,最终 pH 7.4 ± 0.2 。

A.3 PBS 缓冲液

0.01 mol/L pH9.0 磷酸盐-生理盐水缓冲溶液,溶解无水磷酸氢二钠 1.42 g,氯化钠 8.5 g 于 1 000 mL 蒸馏水中,使完全溶解,用酸度计测定其 pH 值 9.0 以上即可,必要时可用 1 mol/L 氢氧化钠调整至 pH9.1 左右。

注:此项固定液配制后可置 4 °C 储存,但重复使用次数以不超过 3 次为宜。

A.4 固定液

按顺序将无水乙醇 60 mL、三氯甲烷(CHCl_3) 30 mL 混匀,再加入 36%~38%甲醛 10 mL,混匀即成。

A.5 pH9.0 碳酸盐-甘油缓冲溶液

溶解无水碳酸钠 6 g,无水碳酸氢钠 37 g 于蒸馏水中,加至 1 000 mL,使完全溶解,混匀,即成 pH9.2 碳酸盐缓冲液。

以上项缓冲液 1 份加甘油 9 份混匀即成。

注 1: 所用甘油应选用优质纯品或分析纯品。

注 2: 配成后置 4℃ 储存,在储存期间其 pH 值逐渐下降,应以每 2 周左右重新配制一次为宜。

附录 B
(资料性附录)

间接法免疫荧光染色步骤示意图

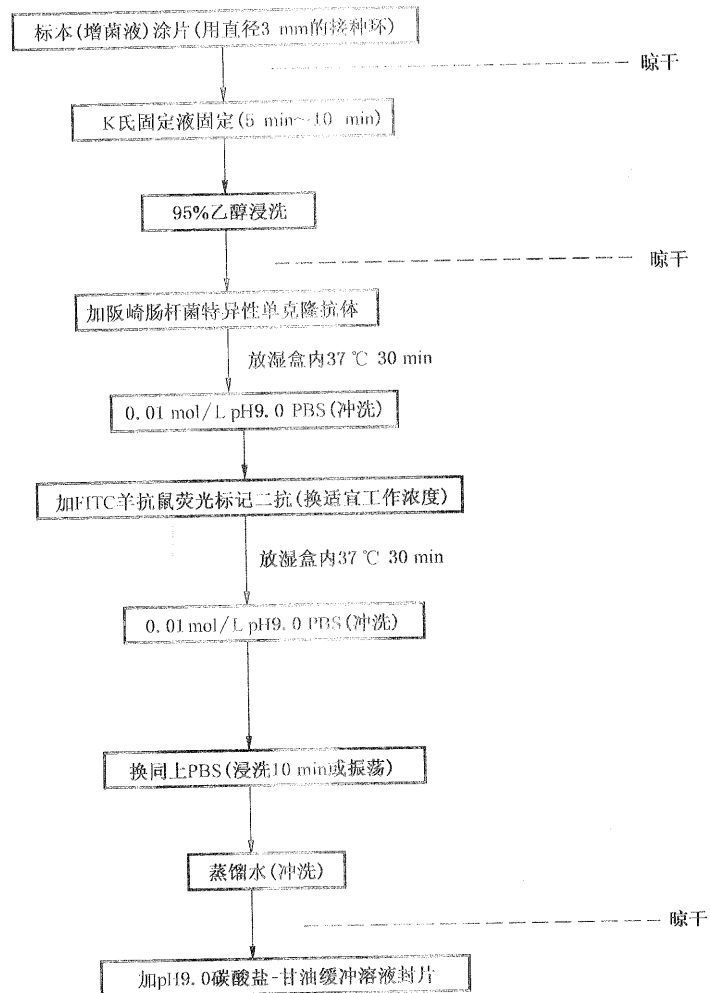


图 B.1 间接法免疫荧光染色步骤示意图

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10部分：阪崎肠杆菌检验
免疫荧光方法

SN/T 2552.10—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 0.75 字数 11 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：155066·2-21212 定价 16.00 元



SN/T 2552.10—2010