

SN

中华人民共和国进出口商品检验行业标准

SN/T 0477—95

出口食品中 B 群链球菌检验方法

Method for detection of group B streptococci in foods for export

1995-09-06 发布

1996-01-01 实施

中华人民共和国国家进出口商品检验局 发布

中华人民共和国进出口商品检验行业标准

出口食品中 B 群链球菌检验方法

SN/T 0477—95

Method for detection of group B streptococci in foods for export

1 主题内容与适用范围

本标准规定了在绵羊血琼脂平板上,用 CAMP(Christie、Atkins、Munch—Petersen 的缩写)试验作为对出口食品中 B 群链球菌检验方法。

本标准适用于出口肉类、奶和奶制品中 B 群链球菌的检验。其他食品可参照使用。

2 设备和材料

- 2.1 离心机 5 000 r/min,离心管 50 mL,10 mL。
- 2.2 蔡氏滤器。
- 2.3 微孔滤膜,孔径 0.45 μm 。
- 2.4 玻璃抽滤瓶。
- 2.5 玻璃水循环真空泵。
- 2.6 电热恒温箱;温度 20~60℃。
- 2.7 显微镜。
- 2.8 定性滤纸。
- 2.9 不锈钢厌氧菌培养罐。
- 2.10 电冰箱。
- 2.11 乳钵、研棒或均质器。
- 2.12 L 形玻璃棒。
- 2.13 金黄色葡萄球菌菌株 ATCC-25923。

3 培养基和试剂

- 3.1 Todd-Hewitt 肉汤〔参见附录 A(补充件)A1〕。
- 3.2 牛心汤培养基〔参见附录 A(补充件)A2〕。
- 3.3 选择性牛心汤增菌培养基〔参见附录 A(补充件)A3〕。
- 3.4 牛心汤琼脂〔参见附录 A(补充件)A4〕。
- 3.5 绵羊血琼脂平板〔参见附录 A(补充件)A5〕。
- 3.6 β -溶血素〔参见附录 A(补充件)A6〕。
- 3.7 β -溶血素带〔参见附录 A(补充件)A7〕。
- 3.8 绵羊血球〔参见附录 A(补充件)A8〕。
- 3.9 生理盐水;灭菌的 0.85% NaCl。
- 3.10 革兰氏染色液〔参见附录 A(补充件)A9〕。
- 3.11 接触酶(过氧化氢酶)试验〔参见附录 B(补充件)〕。

4 样品的制备

4.1 肉类

4.1.1 冷冻产品应在2~5℃过夜解冻,或在45℃及以下经15 min解冻,立即检验。若不能及时检验,应置于-15℃左右暂存。其他非冷冻易腐的食品,亦应置于4℃冰箱保存。

4.1.2 以无菌操作称取剪碎的肉类样品25 g,置于灭菌之乳钵内或均质杯内,加入25 mL灭菌生理盐水进行研磨或均质(8 000~10 000 r/min,均质1 min),移入盛200 mL生理盐水的5 000 mL广口瓶内,混合均匀,制成1:10稀释液。

4.2 奶和奶制品类

4.2.1 鲜奶、酸奶:以无菌手续去掉瓶罩纸盖,瓶口经火焰灭菌后,用无菌操作吸取25 mL检样,放入装有225 mL灭菌生理盐水的三角烧瓶内,振摇均匀。

4.2.2 奶粉:以无菌手续开封取样,称取25 g放入盛有225 mL温热的灭菌生理盐水且装有适量玻璃珠的灭菌广口瓶内,振摇使其充分溶解混匀。

4.2.3 奶酪:先用灭菌刀削去部分表面封蜡,然后用点燃的酒精棉球灭菌表面后,用灭菌刀切开奶酪,再用无菌操作切取表层和深层检样25 g,置于灭菌乳钵内切碎,加入25 mL生理盐水研成糊状,移入盛有200 mL灭菌生理盐水的广口瓶内,混合均匀。制成1:10的稀释液。

4.3 其他食品

样品的制备取决于食品的种类和状态。固体或半固体食品按4.1.2或4.2.3进行。液体食品按4.2.1进行。

5 检验步骤

5.1 增菌培养

将上述制备的检样各取10 mL分别接种于100 mL牛心汤培养基内;如检样污染较严重,可同时按上述量接种于选择性牛心汤增菌液内,经 $35\pm 1^\circ\text{C}$ 培养15 h,再进行CAMP-带或CAMP-点试验。

5.2 CAMP试验的条件

将CAMP试验的绵羊血琼脂平板置于不锈钢厌氧菌培养罐内,在 $35\pm 1^\circ\text{C}$ 培养。

5.3 CAMP-带试验

取 β -溶血素带1~2条平行轻贴于绵羊血琼脂平板上,间距20 mm,将样品或经过增菌的培养物直接在 β -溶血素带两侧(相距3~5 mm处)垂直划线3~4条或涂布接种,经14~18 h培养后观察结果。如在接种线与 β -溶血素带周围朦胧溶血区重叠处能见到协同产生清晰的“箭头”状的增强溶血区为阳性反应,可鉴定为B群链球菌。不见增强溶血为阴性反应,判为B群链球菌阴性。

5.4 CAMP-点试验

将样品或经过增菌的培养物直接划线或用L形玻璃棒涂布接种于绵羊血琼脂平板上,经14~18 h培养后,用接种环取 β -溶血素滴加在圆形突起,细小的可疑为链球菌的单个菌落边缘,再将平板进行孵育,分别在30,45,60 min检查溶血变化情况。在滴加 β -溶血素的菌落边缘有协同产生“扇形”增强溶血区的为阳性反应,可鉴定为B群链球菌。不出现增强溶血现象的为阴性反应,判为非B群链球菌。

每次检验时都要用已知阳性菌株作为对照试验。

5.5 CAMP-带或CAMP-点试验阳性反应,再进行革兰氏染色,镜检和接触酶试验,以此来与其他溶血性细菌如李斯特氏菌,肉毒梭状芽胞杆菌和葡萄球菌等区别开。

6 报告结果

6.1 CAMP-带或CAMP-点试验阳性,细菌形态相符,革兰氏阳性,接触酶阴性,报告B群链球菌阳性。

6.2 CAMP-带或CAMP-点试验阴性,报告B群链球菌阴性。

附录 A
培养基和试剂
(补充件)

A1 Todd-Hewitt 肉汤

牛肉浸液	1 000 mL
蛋白胨	20 g
10 mol/L NaOH	2.7 mL
NaHCO ₃	2 g
NaCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1 g
葡萄糖	2 g
pH	7.8

将各成分溶解后,调 pH7.8。分装在 150 mL 烧瓶中,每瓶 100 mL,在 115℃ 下灭菌 20 min。

A2 牛心汤培养基

牛心浸液(可以用牛肉膏 5 g,蒸馏水 1 000 mL 代替)	1 000 mL
蛋白胨	20 g
葡萄糖	3 g
NaHCO ₃	2 g
NaCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2 g
pH	7.4

将各成分溶解后,加入 1 mol/L 3% NaOH,校正 pH7.4,分装试管中,每管 10 mL,于 115℃ 下高压灭菌 20 min。

A3 选择性牛心汤增菌培养基

牛心汤培养基	1 000 mL
三氯化钠	0.075 g
结晶紫	0.002 g
pH	7.4

除结晶紫外,将其他成分混合,加热溶解,校正 pH7.4,再加入结晶紫,充分混合溶解后,分装于试管内,每管 10 mL,于 115℃ 下高压灭菌 20 min。

A4 牛心汤琼脂

牛心浸液(可以用牛肉膏 5 g,蒸馏水 1 000 mL 代替)	1 000 mL
蛋白胨	20 g
葡萄糖	3 g
NaHCO ₃	2 g
NaCl	2 g

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2 g
琼脂粉	12 g
pH	7.4

将各成分溶解后,加入 1 mol/L 3% NaOH,校正 pH7.4,加入琼脂粉 12 g,于 115℃下高压灭菌 20 min。

A5 绵羊血琼脂平板

将牛心汤琼脂加热溶化后,待冷却到 50℃时,加经洗过的绵羊血球 5%,旋转混合均匀,倾注平板,冷凝备用。

A6 β-溶血素

将金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 菌株接种在 Todd-Hewitt 肉汤里,于 35±1℃生长 48 h,培养液以 3 500 r/min 离心 10 min。取其上清液,用装有微孔滤膜的蔡氏滤器作真空抽滤除菌,滤液则为 β-溶血素。分装在灭菌带盖小瓶内,每瓶 5 mL,冰冻保存,备用。

A7 β-溶血素带

把灭菌的定性滤纸条(约 4 cm×0.4 cm)浸泡在装有 β-溶血素的带塞玻璃瓶中,则制成 β-溶血素带。置 4℃冰箱中备用。

A8 绵羊血球制备

将无菌新采绵羊血,用三倍灭菌生理盐水以 2 500 r/min 离心 15 min,弃去上清液,洗两次,最后用生理盐水将血球悬浮到原体积。

A9 革兰氏染色液

A9.1 结晶紫染色液:

结晶紫	1 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

将结晶紫溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A9.2 革兰氏碘液:

碘	1 g
碘化钾	2 g
蒸馏水	300 mL

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振荡,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

A9.3 沙黄复染液:

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A9.4 染色法:

A9.4.1 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗。

A9.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A9.4.3 滴加 95%乙醇脱色,约 30 s;或将乙醇滴满整个涂片,立即倾去,再用乙醇滴满整个涂片,脱色

10 s。

A9.4.4 水洗,滴加复染液,复染 1 min。水洗,待干,镜检。

A9.4.5 结果:革兰氏阳性菌呈紫色,革兰氏阴性菌呈红色。

附录 B
接触酶(过氧化氢酶)试验
(补充件)

B1 试剂

3%过氧化氢溶液:临时配制。

B2 试验方法

挑取固体培养基上菌落一接种环,置于洁净试管内,或涂于干净的载玻片上,然后分别滴加 3%过氧化氢溶液 2 mL 或一滴观察结果。

B3 结果

于 0.5 min 内发生气泡(氧气)者则为接触酶阳性反应(葡萄球菌),不发生气泡者则为阴性反应(链球菌)。

附加说明:

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出。

本标准由中华人民共和国陕西进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人卢敬堂。