

1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口冷冻和生鲜的猪肉、猪舌、鸡肉、虾和虾仁中小肠结肠炎耶尔森氏菌(以下简称耶氏菌)检测方法。

本标准适用于出口冷冻和生鲜的猪肉、猪舌、鸡肉、虾和虾仁中耶氏菌检验,其他食品可参照使用。

2 样品制备及增菌培养

2.1 如为冷冻食品,应于2~5℃下不超过18h解冻。若不能及时检验,应放于-15℃保存,最多不能超过2d。非冷冻易腐的食品应置于4℃冰箱保存,最多不得超过3d。

2.2 无菌操作称取剪碎后的样品25g(猪舌应剪取舌根、舌两侧及舌尖部肉),置于装有225mL改良的磷酸盐缓冲液的500mL广口玻璃瓶中,充分振荡(若采用均质,可将剪碎后的样品25g置于灭菌均质杯内,加入25mL已灭菌的改良磷酸盐缓冲液,以8 000~10 000r/min均质0.5min,再将均质液将均质液放入装有200mL改良的磷酸盐缓冲液的500mL广口玻璃瓶中,充分振荡),然后于25℃培养48±2h。吸取该培养液1mL移种于预先预热到25℃的装有9mL的5g/L氢氧化钾溶液的试管中,使之充分混合0.5min。立即吸取该混合液2mL移种于预先预热到25℃的装有8mL的改良的酵母浸汁—孟加拉红肉汤的试管中,充分混合,于25℃培养4~6h。

3 分离培养

3.1 将上述经改良的酵母浸汁—孟加拉红肉汤增菌的培养液摇匀,以直径3mm的接种环分别挑取一环划线于表面无凝固水的含吐温80的亚硫酸铋琼脂平板和含吐温80的麦康凯琼脂平板各一个,培养于25℃,含吐温80的亚硫酸铋琼脂平板培养3~4d,含吐温80的麦康凯琼脂平板培养48±2h。

3.2 观察各琼脂平板,有无典型或可疑耶氏菌菌落。

耶氏菌的菌落特征见表1:

表1 小肠结肠炎耶尔森氏菌菌落特征

琼脂平板	菌落类别	菌落特征						形状
		大小,mm	表面	透明度	高度	颜色	边缘	
含吐温80的麦康凯琼脂	A	1~1.5	粗糙,有多层环状皱折	不透明凸起	枕状,中心呈乳头状凸起	淡粉红色,菌落周围绕有毛玻璃样淡粉红色晕	不整齐	圆形
	B	1~1.5	光滑、湿润	半透明	扁平	淡粉红色,菌落周围绕有毛玻璃样淡粉红色晕	整齐	圆形
	C	1~3.0	光滑、湿润	半透明	扁平	淡橙粉红色	有细散放射状皱折	圆形
	D	1~1.5	粗糙,有多层环状皱折	不透明凸起	枕状,中心呈乳头状凸起	淡粉红色,菌落周围培养基为透明淡蔷薇红色	不整齐	圆形
含吐温80的亚硫酸铋琼脂	E	针尖~3.0	光滑	不透明	扁平或凸起	黑绿色或黑灰色至深黑色,菌落周围培养基有时有黑绿色微粒弥漫	整齐	圆形
	F	2~3	粗糙,有多层环状皱折	不透明	扁平,有时中草药心	灰绿色,菌落周围绕有浅灰色或蓝绿色毛玻璃样晕	不整齐	圆形

4 鉴定

4.1 筛选试验

4.1.1 每种琼脂平板至少应挑取两个典型或可疑菌落,分别用光滑的接种针穿刺刺并密布地接种于改良的克氏双糖铁琼脂各一管,于25℃培养24±2h。

4.1.2 挑取菌落后的琼脂平板,应置于5~8℃至少保留24h,以备必要时复查。

4.1.3 按表2试验结果进行判断。

表2 改良的克氏双糖铁琼脂筛选小肠结肠炎耶尔森氏菌

改良的克氏双糖铁琼脂				初步判断
斜面	底层	产气	硫化氢	
A	A	- (+)	-	可疑小肠结肠炎耶尔森氏菌
A	A	+	+	
A	A	+	-	
K	A	+	+	
K	A	-	-	

注:K产碱;A产酸;+阳性反应;-阴性反应; (+)偶见少量小气泡。

4.2 生化试验

4.2.1 刮取一满环(直径3 mm)符合表2的典型或可疑耶氏菌特性的改良克氏双糖铁琼脂斜面培养物,接种于装有1mLRustigian氏尿素培养基(改良法)的10mm×100mm的试管中,手握或于电动快速混合器上振荡5~6s,然后于25℃培养,每隔半小时观察一次,培养观察至4h。

4.2.2 将尿素酶试验阳性的改良克氏双糖铁琼脂斜面培养物按表3所列生化项目(尿素酶试验除外)进行生化试验,培养于25℃,氨基酸脱羧酶试验培养24~30h,其他生化试验阴性结果的应培养观察4d。

表3 小肠结肠炎耶尔森氏菌生化反应与血清学试验结果判定

生化反应								血清学试验	结果判定
尿素酶试验	鸟氨酸脱羧酶试验	赖氨酸脱羧酶试验	蔗糖试验	山梨醇试验	L-阿拉伯糖试验	鼠李糖试验	西蒙氏枸橼酸盐试验		
+	+	-	+	+	+	-	-	“0”因子血清试验阳性	小肠结肠炎耶尔森氏菌(典型)
+	+	-	-	+	+	-	-	“0”因子血清试验阳性	小肠结肠炎耶尔森氏菌(非典型) ³
+	-	-	-	-	+	-	-	“0”因子血清试验阳性	
+	+	-	+	+	+	+	+	“0”因子血清试验阳性	
+	+	-	+	+	+	+	-	“0”因子血清试验阳性	
+	+	-	+	+	+	-	+	“0”因子血清试验阳性	

注: +阳性反应;-阴性反应。

4.2.3 观察生化反应结果,将符合表3耶氏菌特性的,按4.3进行血清学试验;如不符合表3所列生化反应,特别是尿素酶试验阴性或赖氨酸脱羧酶试验阳性为非小肠结肠炎耶尔森氏菌。

4.3 血清学试验

在洁净的载玻片上加一滴“0”因子血清,将待试培养物混入其内,使成为均一性混浊悬液,将玻片轻轻摇动0.5~1 min,在黑色背景下观察反应。如在2min内出现比较明显的小颗粒状凝集者,即为阳性反应,反之则为阴性,另用生理盐水作对照试验,以检查有无自凝现象;

4.4 根据4.2和4.3试验结果,按照表3进行判定。

如生化反应结果完全符合表3耶氏菌特性,但与所有“0”因子血清均不发生凝集反应者,其菌落典型,镜检为革兰氏阴性、无芽胞小短杆菌,可按《Bergey氏细菌学鉴定手册》最新版扩大必要的生化试验,判定为可疑小肠结肠炎耶尔森氏菌,并送交上一级单位鉴定。

5 报告结果

5.1 报告阳性结果:“检出小肠结肠炎耶尔森氏菌”。

5.2 报告阴性结果:“未检出小肠结肠炎耶尔森氏菌”。

6 培养基

6.1 改良的磷酸盐缓冲液

磷酸氢二钠	8.23g
磷酸二氢钠(含1个结晶水)	1.20g
氯化钠	5.00g
山梨醇	10.00g
胆盐(3号)	1.50g
蒸馏水	1000mL

将前三种成分溶于水,再加入后两种成分,溶解后调至pH7.6,分装于500mL广口玻璃瓶内,每瓶225mL,高压灭菌121℃15min。

6.2 改良的酵母浸汁—孟加拉红肉汤(modified yeast extract—rOs bengalr0th)

磷酸二氢钾	0.508g
磷酸氢二钠	11.21g
酵母浸汁	5.00g
氯化钠	1.00g
硫酸镁(含7个结晶水)	0.01g
蒸馏水	770mL

将上述各成分溶于蒸馏水中,加热使之完全溶解,调至pH8.0,121℃高压灭菌15min。

6.2.2 40g/L山梨糖水溶液:100.00mL。

6.2.310g/L丙酮酸钠水溶液:100.00mL。

6.2.4 4g/L孟加拉红水溶液:10.00mL。

6.2.2.1,6.2.3溶液流通蒸汽加热0.5h灭菌,6.2.4溶液过滤除菌,将灭菌后的此三种溶液加到灭菌、冷却的基础液中,调至最终pH8.0,以无菌操作分装于18 mm×180mm灭菌的试管中,每管8mL,4℃冰箱保存备用。

6.3 含吐温80的麦康凯琼脂

蛋白胨	12.00g
蛋白胨(proteoseptone)	3.00g
乳糖	10.00g
胆盐(3号)	1.50g
氯化钠	5.00g
吐温80(Tween80)	10.00g
氯化钙(无水)	0.20g
中性红	0.03g
结晶紫	0.001g
琼脂	18.00g
蒸馏水	1000mL

将琼脂于800mL蒸馏水中加热溶化,以50mL蒸馏水将吐温80稀释,再将其他各成分(指示剂除外)加入150mL蒸馏水中,加热使之完全溶解。将后二种溶液加至已溶化的琼脂液中,充分混匀,调至pH7.1±0.2,再加入指示剂,混匀后121℃高压灭菌15min,待冷50~55℃时,立即倾注于灭菌平皿内,每皿约15mL,制成的琼脂平板呈淡橙色。

6.4 含吐温80的亚硫酸铋琼脂

6.4.1 基础液

牛肉膏	5.00g
蛋白胨	10.00g
葡萄糖	5.00g
氯化钠	5.00g
吐温80(Tween80)	10.00g
氯化钙(无水)	0.20g
琼脂	20.00g
蒸馏水	1000mL

6.4.2亚硫酸铋混合液

6.4.2.1 溶解200g无水亚硫酸钠于1 000mL蒸馏水中,配成200g/L水溶液。

6.4.2.2 溶解50g枸橼酸铋铵于500mL蒸馏水中,配成100g/L水溶液,加1 mL杯的氢氧化铵,放置至澄清,可能还需再加数毫升氢氧化铵。加此溶液于6.4.2.1溶液中并混合之。

6.4.2.3 加100g无水磷酸氢二钠并混合之。

6.4.2.4 加10 g枸橼酸铋铵于100 mL蒸馏水中,配成100 g/L水溶液。并将此液加入上述的6.4.2.1、6.4.2.2、6.4.2.3的混合液中。

将混合液于100℃加热2min或3min,用橡皮塞塞瓶,储存于室温暗处,不可放于冰箱内。

6.4.3 加70mL 硫酸铋混合液于1 000mL经121℃灭菌15min并冷至70℃左右的基础液中,彻底摇匀,再加4mL10g/L慢冷水溶液,混匀,待冷至50℃左右时倾注于皿。制成的平板应为淡乳黄色、不透明,存放于室温暗处或冰箱内,以备用前一天制备为宜。

6.5 改良的克氏双糖铁琼脂

牛肉膏	3.00g
酵母膏	3.00g
蛋白胨	15.00g
胨蛋白胨	5.00g
山梨醇	20.00g
葡萄糖	1.00g
葡萄糖亚铁	0.20g
氯化钠	5.00g
硫代硫酸钠	0.30g
酚	0.024g
琼脂	15.00g
蒸馏水	1000mL

以800mL蒸馏水将琼脂加热溶化,再用200mL蒸馏水将其他成分(酚红除外)加热溶解,再将以上两种溶液混匀,调至pH7.4±0.2,然后加入酚红,分装于13 mm×130 mm试管,121℃高压灭菌15min,待冷至50℃左右,斜置成深高是斜面,制成的培养基为淡橙红色。

培养基采用高层穿刺、斜面密布划线接种法。25℃培养24±2h。观察结果:小肠结肠炎耶尔森氏菌的反应为底层斜面均产酸、变黄色、无硫化氢、不产气(偶有少量小气泡)。

6.6 Rustigian氏尿素酶试验培养基(改良法)

6.6.1 基础成分

酵母浸汁	0.10g
磷酸二氢钾	0.091g
磷酸氢二钠(无水)	0.095g
酚	0.01g
蒸馏水	900mL
高压灭菌121℃15min	

6.6.2 浓尿素液

尿素	20.00g
蒸馏水	100.00g
过滤除菌	

6.6.3 将上述两液混合,分装于10mm×100mm的灭菌试管中,每管约1mL左右。制成的培养基为淡橙黄色,尿素酶反应阳性者培养基由淡橙黄色变为桃红色,阴性者颜色不变。

6.7 鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶试验培养基

6.7.1 基础液

蛋白胨	5.00g
牛肉膏	5.00g
溴甲酚紫(16g/L)	0.625mL
甲基红	2.50mL
葡萄糖	0.50g
盐酸吡哆素(维生素B6,pyridoxine)	0.005g
蒸馏水	1000mL
调至pH6或6.5	

6.7.2 基础液分成三等分,第一部分不加任何氨基酸,分装试管作对照用;第二部分按10g/L加入L-赖氨酸双盐盐酸盐;第三部分按10g/L加入L-鸟氨酸双盐盐酸盐。若使用DL氨基酸,应相应地于培养基中按2%浓度加入。加入氨基酸后应再调pH,然后分别分装于10mm×100mm试管中,121℃高压灭菌10min。

6.7.3 培养基接种后,应加一层液体石蜡(约10mm厚),于25℃培养24~30h。阳性反应者为紫色或红紫色,弱阳性者为青灰色,阴性反应为黄色。

6.8糖发酵培养基

6.8.1 糖发酵肉汤基础液

蛋白胨	10.00g
牛肉膏	3.00g
氯化钠	5.00g
Andrade氏指示剂	10.00mL
蒸馏水	1000mL
调至pH7.1~7.2	

6.8.2 蔗糖、山梨醇最终使用浓度为10g/L,可于灭菌前加入基础液中,分装试管,121℃高压灭菌10min。L-阿拉伯糖和鼠李糖最终使用浓度为10g/L,应先配成100g/L水溶液,L-阿拉伯糖水溶液流通蒸汽灭菌30min,鼠李糖水溶液121℃高压灭菌10min,然后分别以无菌操作加入先经121℃高压灭菌15min的基础液中,无菌操作分装于已灭菌的13mm×130mm试管中,每管3mL。

6.8.3 Andrade氏指示剂

蒸馏水	100.00mL
酸性复红	0.50g
氢氧化钠(1.0mol/L)	16.00mL

将酸性复红溶于蒸馏水中,并加入氢氧化钠,数小时后,如复红褪色不够,再加1 mL或2mL氢氧化钠溶液,此试剂如保存时间较长则效果更好。

6.8.4 此培养基制成后近于无色,接种后于25℃培养24±2h,阴性反应应继续培养观察4d。阳性反应为红色,阴性反应则颜色不变。

6.9 西蒙氏枸橼酸盐琼脂

硫酸镁	0.20g
氯化钠	5.00g
磷酸二氢铵	1.00g
磷酸氢二钾	1.00g
枸橼酸钠	2.00g
琼脂	20.00g
蒸馏水	1000mL

加1:500溴麝香草酚蓝指示剂溶液40 mL,混匀,分装13 mm×130 mm试管,每管约4 mL。121℃高压灭菌15min。斜置试管使成2.5cm高层和4cm长的斜面。

制成的培养基为透明、草绿色,接种后于25℃培养24±2h,阴性反应者观察4d。阳性反应者斜面变为蓝色,阴性反应则颜色不变。

6.10 5g/L氢氧化钾溶液

6.10.1 标准溶液

称取40g氢氧化钾,溶于经121℃高压灭菌30min的5g/L氯化钠溶液,中,使成400g/L氢氧化钾标准溶液,于4℃保存备用。

6.10.2 取1mL400g/L氢氧化钾标准溶液,加入经121℃高压灭菌30min的979mL5g/L氯化钠水溶液中,分装于已灭菌的18mm×180mm试管中,每管9mL,此溶液应用前新鲜配制。

6.11 “0”因子血清。

附录A

食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌检验程序

(补充件)

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天津进出口商品检验局起草。

本标准主要起草人齐素瑛、郝士海。