

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2552.7—2010

乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第7部分：阴沟肠杆菌检验

Microbiological examination for milk and milk products hygiene—
Part 7: Detection of *Enterobacter cloacae*

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

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 7 部分：阴沟肠杆菌检验
SN/T 2552.7-2010

*

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 18 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：155066·2·21209 定价 16.00 元

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 7 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、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：吕敬章、赵贵明、黄李华、宋志强、万志刚、洪小柳、张建莹、葛丽雅。

引 言

阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)是肠杆菌科肠杆菌属的模式菌,广泛分布于自然界,普遍存在于人和动物中肠道中,是医院内感染和机会感染的常见细菌,也能引起食源性疾病,因此常常被当作条件致病菌的代表。

奶粉中阴沟肠杆菌的污染一直受到人们的关注,2004年4月,联合国粮农组织和世界卫生组织的专家在评估婴儿配方奶粉安全性时,认为阴沟肠杆菌在引起新生儿致病方面的重要性正在增长,并且作为肠杆菌属的代表(在婴儿奶粉中以低浓度出现的)是潜在的婴儿奶粉病原菌,在进行婴儿配方奶粉中致病菌的风险分析时,将阴沟肠杆菌列为“B”类危险性生物因子。

据调查报告表明奶粉中污染阴沟肠杆菌的含量一般较低,为此本方法定量检测取样量确定为333 g,以尽可能检测出样品中含量少的目标菌。

乳及乳制品卫生微生物学检验方法

第7部分：阴沟肠杆菌检验

1 范围

SN/T 2552 的本部分规定了乳粉中阴沟肠杆菌的分离与计数方法。

本部分适用于乳粉中阴沟肠杆菌的分离与计数,其他乳及乳制品可参照使用。

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 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

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 设备和材料

- 3.1 水浴箱:45℃±1℃。
- 3.2 温度计:1℃~55℃,分刻度0.1℃。
- 3.3 培养箱:36℃±1℃。
- 3.4 吸管:1 mL,5 mL和10 mL,分刻度0.1 mL。
- 3.5 涂布棒。
- 3.6 接种环。
- 3.7 天平:量程2 kg,感量0.1 g。
- 3.8 灭菌样品处理器具:取样勺,剪刀,开罐器。
- 3.9 样品稀释瓶:100 mL,125 mL,250 mL和2 L。
- 3.10 15 mm×150 mm 灭菌平皿。
- 3.11 阴沟肠杆菌质控菌株:ATCC 35030 或类似菌株。
- 3.12 API 20E¹⁾生化鉴定试剂盒或类似产品。
- 3.13 VITEK¹⁾生化鉴定系统或类似设备。

4 培养基和试剂

- 4.1 胰化大豆蛋白琼脂(TSA):见附录A第A.1章。

1) API 20E和VITEK是由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本部分的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

- 4.2 肠杆菌分离琼脂平板(ECIA);见附录 A 第 A.2 章。
 4.3 肠杆菌增菌肉汤(EE 肉汤);见附录 A 第 A.3 章。
 4.4 氧化酶试验试剂;见附录 A 第 A.4 章。
 4.5 氨基酸脱羧酶试验培养基;见附录 A 第 A.5 章。
 4.6 糖发酵管;见附录 A 第 A.6 章。
 4.7 α -甲基-D-葡萄糖苷测定培养基;见附录 A 第 A.7 章。
 4.8 氰化钾(KCN)培养基;见附录 A 第 A.8 章。

5 阴沟肠杆菌检验方法

5.1 方法提要

奶粉中阴沟肠杆菌的分离与计数方法是应用微生物检验的增菌培养、分离、生化鉴定等方法对奶粉中可能存在的阴沟肠杆菌进行定性和定量的检验。

5.2 检验程序

阴沟肠杆菌的检验程序见图 1。

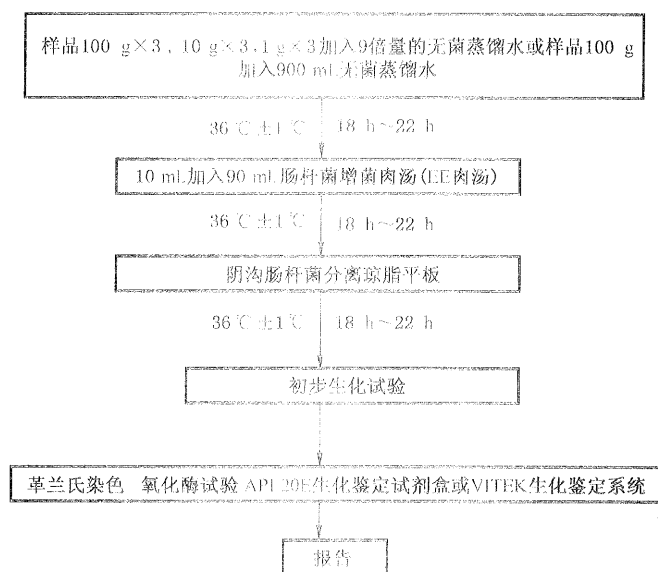


图 1 阴沟肠杆菌的检验程序

5.3 阴沟肠杆菌定量检验(MPN 法)

5.3.1 定量检验是应用“三管”增菌法,检验和定量样品中极少量的阴沟肠杆菌。检验需要 333 g 样品。取样见 SN/T 2552.1。

5.3.2 取样前消毒样品包装的开启处和取样勺。无菌称取样品 100 g、10 g 和 1 g 各三份分别加入 2 L、250 mL 和 125 mL 的样品稀释瓶中,在各样品稀释瓶中分别加入 900 mL、90 mL、9 mL 倍预热到 45℃ 的灭菌蒸馏水(1:10 稀释),振摇使样品充分混匀,36℃±1℃培养 18 h~22 h。

5.3.3 分别移取培养 18 h~22 h 的悬液各 10 mL 加入 90 mL EE 肉汤中,36℃±1℃培养 18 h~22 h。

5.3.4 轻轻混匀增菌液,用下列方法进行平板接种:

——直接涂布法:每份增菌液取 0.2 mL 加到 2 个阴沟肠杆菌分离琼脂平板(ECIA),每个平板

0.1 mL,用无菌玻璃涂布棒涂布(如果预计奶粉中含有大量的细菌,应使用灭菌的 EE 肉汤将增菌液稀释 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 后涂布)。

——直接划线法:每份增菌液用 3 mm 接种环(10 μ L)分别接种 2 个阴沟肠杆菌分离琼脂平板,三区法或四区法划线,以得到单个菌落。将平板置 $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~22 h。

5.3.5 观察平板上阴沟肠杆菌的典型形态:

在阴沟肠杆菌分离琼脂平板上:黄色菌落,圆形,凸起,直径 2 mm~3 mm。

5.3.6 从阴沟肠杆菌分离琼脂平板上挑取 5 个可疑菌落,分别进行初步生化试验:赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶试验。

5.3.7 对赖氨酸脱羧酶阴性、鸟氨酸脱羧酶阳性、精氨酸双水解酶阳性的可疑菌落,进行革兰氏染色,做氧化酶试验。革兰氏染色阴性,氧化酶试验阴性,用 API 20 E 生化鉴定试剂盒或 VITEK 生化鉴定系统进行生化鉴定,或按表 1 进行生化试验。

5.3.8 肠杆菌属细菌生化特性见表 1。

表 1 肠杆菌属细菌生化特性

试 验	生 化 特 性					
	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阪崎肠杆菌 <i>E. sakazakii</i>	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	聚团肠杆菌 <i>E. agglomerans</i>	葛高非肠杆菌 <i>E. gergoviae</i>	
赖氨酸脱羧酶	—	—	+	—	+	
精氨酸双水解酶	+	—	—	—	—	
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	—	+	
KCN 生长	+	+	+	v	—	
发 酵	蔗糖	+	+	(+)	+	
	卫矛醇	(—)	—	(—)	—	
	核糖醇	(—)	—	+	—	
	棉子糖	+	+	+	v	+
	D-山梨醇	+	—	+	v	—
	α -甲基-D-葡萄糖苷	(+)	+	—	—	—
	D-阿拉伯糖	(—)	—	+	—	+
黄色素	—	+	—	(+)	—	

注: +,90%~100%阳性;(+),75%~89%阳性;v,25%~74%阳性;(—),10%~24%阳性;—,0%~9%阳性

5.3.9 计算 MPN 值,根据每一稀释度检出的阴沟肠杆菌的结果查 MPN 表(见附录 B),计算并报告每 100 g 样品中的阴沟肠杆菌的最近似值。

5.4 阴沟肠杆菌定性检验

5.4.1 检验样品中是否有阴沟肠杆菌,检验需要 100 g 样品。

5.4.2 取样前消毒样品包装的开启处和取样勺。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 $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的灭菌蒸馏水,或者将样品直接称量到装有 9 倍预热到 $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的灭菌蒸馏水的样品稀释瓶中,振摇使样品充分混匀, $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~22 h。

5.4.3 移取培养 18 h~22 h 的悬液 10 mL 加入 90 mL EE 肉汤中, $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~22 h。

5.4.4 操作同 5.3.4~5.3.8。

5.4.5 根据检验结果,报告每 100 g 样品中是否检出阴沟肠杆菌。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

为保证培养基的质量,宜按照 SN/T 1538.1 和 SN/T 1538.2 对自制进行培养基的制备与性能测试。

A.1 胰化大豆蛋白琼脂(TSA)

A.1.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
植物蛋白	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热并不断搅拌,煮沸 1 min,使琼脂溶解,分装适当的容器,121 °C 高压灭菌 15 min,最终 pH 7.3±0.2。

测定黄色色素时,将待测的纯菌密集接种于 TSA 上,于 25 °C±1 °C 培养 48 h~72 h,阳性者呈现黄色无光泽菌落。试验时宜用阴、阳性对照,以利于结果判定。

A.2 阴沟肠杆菌分离琼脂(ECIA)

A.2.1 成分

特殊蛋白胨	23.0 g
氯化钠	5.0 g
3 号胆盐	1.5 g
棉子糖	10.0 g
溴麝香草酚蓝	0.03 g
结晶紫	0.002 g
琼脂	10.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将各成分加入蒸馏水中(染料配成 1% 的水溶液过滤后加入),加热煮沸,使各成分完全溶解,调节 pH 至 7.4±0.1。冷却至 45 °C 倾注灭菌平皿,可放置 2 °C~8 °C 冷藏柜保存,4 周内使用。

A.3 肠杆菌增菌肉汤(EE 肉汤)

A.3.1 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 mL

A.3.2 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,分装每瓶 90 mL。制成的培养基为绿色,可放置 2℃~8℃冷藏柜保存,4 周内使用。

A.4 氧化酶试验试剂

A.4.1 1%盐酸二甲基对苯二胺

盐酸二甲基对苯二胺	1.0 g
蒸馏水	100 mL

A.4.2 制法

将盐酸二甲基对苯二胺溶于蒸馏水即可。使用新鲜配制的试剂,如放置于冷藏柜,可在配制后保存于棕色瓶中,7 d 内使用。

A.4.3 1% α -萘酚乙醇溶液

α -萘酚	1.0 g
乙醇	100 mL

A.4.4 制法

将萘酚溶于乙醇即可。

试验时取白色洁净滤纸沾取菌落。加盐酸二甲基对苯二胺溶液一滴,阳性者呈现粉红色,并逐渐加深;再加 α -萘酚溶液一滴,阳性者于 0.5 min 内呈现鲜蓝色。阴性于 2 min 内不变色。

A.5 氨基酸脱羧酶试验培养基

A.5.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
1.6%溴甲酚紫-乙醇溶液	1.0 mL
L-氨基酸或 DL-氨基酸	5.0 或 10.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

除氨基酸以外的成分加热溶解后,分装每瓶 100 mL,分别加入各种氨基酸:赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸。L-氨基酸按 0.5%加入,DL-氨基酸按 1%加入。再行校正 pH 至 6.8。对照培养基不加氨基酸。

分装于灭菌的小试管内,每管 0.5 mL,上面滴加一层液体石蜡,115 °C 高压灭菌 10 min。

试验时从琼脂斜面上挑取培养物接种,于 36 °C ±1 °C 培养 18 h~24 h,观察结果。氨基酸脱羧酶阳性者由于产碱,培养基应呈紫色。阴性者无碱性产物,但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管应为黄色。

A.6 糖发酵管

A.6.1 成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

葡萄糖发酵管按上述成分配好后,按 0.5 mL 加入葡萄糖,分装于有一个倒置小管的小试管内,121 °C 高压灭菌 15 min。其他各种糖发酵管可按上述成分配好后,分装每瓶 100 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。另将各种糖类分别配好 10% 溶液,同时高压灭菌。将 5.0 mL 糖溶液加入于 100 mL 培养基内,以无菌操作分装小试管。

试验时从琼脂斜面上挑取少量培养物接种,于 36 °C ±1 °C 培养,一般观察 2 d~3 d。迟缓反应需观察 14 d~30 d。

A.7 α -甲基-D-葡萄糖苷测定培养基

A.7.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	20.0 g
月桂基硫酸钠	0.25 g
5-溴 4-氯 3 吡啶 α -D 葡萄糖苷	0.08 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热溶解,调节 pH 至 7.3 ±0.1,分装适当容器,121 °C 高压灭菌 3 min。

试验时将待测菌接种于培养基上,于 36 °C ±1 °C 培养 18 h~22 h。阳性者出现蓝绿色菌落,圆形,直径 1 mm~2 mm。

A.8 氰化钾(KCN)培养基

A.8.1 成分

蛋白胨	10.0 g
-----	--------

氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	0.225 g
磷酸氢二钠	5.64 g
0.5%氰化钾溶液	20.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.8.2 制法

将除氰化钾以外的成分配好后分装烧瓶,调至 pH 6.8 ± 0.2 ,121 °C 高压灭菌 15 min。放在冰箱内使其充分冷却。每 100 mL 培养基加入 0.5% 氰化钾溶液 2.0 mL(最后浓度为 1:10 000),分装于 12 mm×100 mm 灭菌试管,每管约 4.0 mL,立刻用灭菌橡皮塞塞紧,放在 4 °C 冰箱内,至少可保存 2 个月。同时,将不加氰化钾的培养基作为对照培养基,分装试管备用。

将琼脂培养物接种于蛋白胨水内成为稀释菌液,挑取 1 环接种于氰化钾(KCN)培养基。并另挑取 1 环接种于对照培养基。在 36 °C ± 1 °C 培养 1 d~2 d,观察结果。如有细菌生长即为阳性(不抑制),经 2 d 细菌不生长为阴性(抑制)。

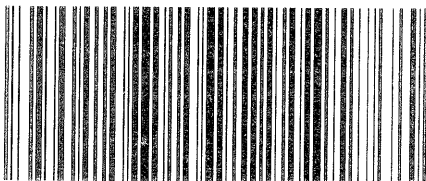
注:氰化钾是剧毒药物,使用时应小心,切勿沾染,以免中毒。夏天分装培养基应在冰箱内进行。试验失败的主要原因是封口不严,氰化钾逐渐分解,产生氢氰酸气体逸出,以致药物浓度降低,细菌生长,因而造成假阳性反应。试验时对每一环节都要特别注意。

附录 B
(规范性附录)
最可能数(MPN)检索表

接种量分别为 10.0 g, 1.0 g 和 0.1 g 时三管法的 MPN 表及 95% 可信区间

阳性管数			MPN/100 g	可信限		阳性管数			MPN/100 g	可信限	
10.0	1.0	0.1		低	高	10.0	1.0	0.1		低	高
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.5	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1 000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1 000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2 000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1 100	180	4 100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1 100	420	—

注：如果接种量扩大 10 倍，分别为 100.0 g, 10.0 g 和 1.0 g 时，表中的数字相应缩小 10 倍。
如果接种量缩小 10 倍，分别为 1.0 g, 0.1 g 和 0.01 g 时，表中的数字相应扩大 10 倍。



SN/T 2552.7-2010

书号: 155066 · 2-21209

定价: 16.00 元