

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2552.12—2010

### 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第 12 部分：单核细胞增生李斯特氏菌 检测与计数

Microbiological examination for milk and milk products hygiene—  
Part 12: Detection and enumeration of *listeria monocytogenes*

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：假单孢菌属的分离与计数。

本部分是 SN/T 2552 的第 12 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分修改采用了 ISO 11290-1:1996/Amd. 1:2004(E)《食品与动物饲料微生物学 单核细胞增生李斯特氏菌水平检测和计数方法 第 1 部分：检测方法》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*—Part 1: Detection method)和 ISO 11290-2:1998/Amd. 1:2004(E)《食品与动物饲料微生物学 单核细胞增生李斯特氏菌水平检测和计数方法 第 2 部分：计数方法》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*—Part 2: Enumeration method)的修订版，考虑到我国进出口检验检疫的实际应用情况，对其中一些内容进行了删减，并增添了其他一些内容，主要差异如下：

- 按照 GB/T 1.1、GB/T 20000.2 要求和汉语习惯对一些编排格式进行了修改；
- 将一些国际标准的表述方式改为适用于我国标准的表述方式；
- 删除了“目录”、“引言”、“定义”、“原则”和“参考文献”部分；
- 对“规范性引用文件”的描述按照 GB/T 1.1 的要求进行了修改；
- 将“警告”改为“安全要求”，并放置到标准的末尾段；
- 增加了 PCR 检测方法。

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、中华人民共和国内蒙古出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：王海艳、赵贵明、刘中学、刘振、刘虹、赵林立、敖威华。

# 乳及乳制品卫生微生物学检验方法

## 第 12 部分:单核细胞增生李斯特氏菌

### 检测与计数

#### 1 范围

SN/T 2552 的本部分规定了乳及乳制品中单核细胞增生李斯特氏菌检测和计数方法。

本部分适用于乳及乳制品中单核细胞增生李斯特氏菌的检测和计数。其他食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检测和计数也可参照使用。

#### 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 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

SN/T 2552.2 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第 2 部分:检验样品的制备与稀释

#### 3 培养基和试剂

- 3.1 Half Fraser 肉汤:见附录 A 中第 A.1 章。
- 3.2 Fraser 肉汤:见附录 A 中第 A.2 章。
- 3.3 李斯特氏菌显色培养基琼脂(ALOA);见附录 A 中第 A.3 章。
- 3.4 牛津琼脂(OXA):见附录 A 中第 A.4 章。
- 3.5 酵母浸膏胰酪大豆琼脂(TSA-YE);见附录 A 中第 A.5 章。
- 3.6 酵母浸膏胰酪大豆肉汤(TSB-YE):见附录 A 中第 A.6 章。
- 3.7 绵羊血琼脂:见附录 A 中第 A.7 章。
- 3.8 糖发酵培养基(木糖和鼠李糖):见附录 A 中第 A.8 章。
- 3.9 动力培养基:见附录 A 中第 A.9 章。
- 3.10 协同溶血(CAMP)试验培养基和试验菌株:见附录 A 中第 A.10 章。
- 3.11 3%过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液。
- 3.12 革兰氏染色液:见附录 A 中第 A.11 章。
- 3.13 引物:见附录 A 中第 A.12 章。
- 3.14 dNTP 混合物:dATP、dTTP、dGTP、dCTP 各 2.5 mmol/L。
- 3.15 10×Taq 缓冲液。
- 3.16 TaqDNA 聚合酶。
- 3.17 琼脂糖(电泳级)。
- 3.18 溴化乙锭溶液:见附录 A 中第 A.13 章。
- 3.19 DNA 分子量标记 100bp DNA Ladder Marker。
- 3.20 50×电泳缓冲液:见附录 A 中第 A.14 章。
- 3.21 6×加样缓冲液:见附录 A 中第 A.15 章。

#### 4 设备和材料

- 4.1 高压灭菌器。
- 4.2 恒温水浴箱： $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $48\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.3 恒温培养箱： $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.4 pH计。
- 4.5 生物显微镜： $100\times$ ， $1\ 000\times$ 。
- 4.6 均质器。
- 4.7 微量加样器： $1\ \mu\text{L}\sim 10\ \mu\text{L}$ ， $100\ \mu\text{L}$ ， $200\ \mu\text{L}$ ， $1\ 000\ \mu\text{L}$ 。
- 4.8 高速冷冻离心机：最大离心力在  $12\ 000g$  以上。
- 4.9 制冰机。
- 4.10 PCR仪。
- 4.11 凝胶电泳装置及成像系统。
- 4.12 李斯特氏菌标准菌株：单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19111、西尔李斯特氏菌 ATCC35967、绵羊李斯特氏菌 ATCC19119、英诺克李斯特氏菌 ATCC33090 标准菌株和非李斯特菌属的标准菌株（如：杆菌或链球菌）。

注：具有等同效果的标准菌株也可以采用。

#### 5 定性检测方法

##### 5.1 预增菌

单核细胞增生李斯特氏菌检测程序见图1。

取样和制样按照 SN/T 2552.1、SN/T 2552.2 执行。无菌取 25 g(mL)待检样品加入 225 mL Half Fraser 肉汤中，均质后，于  $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h}\sim 3\text{ h}$ 。

预增菌后，将预增菌培养物按照 5.2 的方法转接于 Fraser 肉汤中进行增菌。同时按照 5.3 的方法将预增菌培养物划线接种于固体选择培养基进行分离培养。

##### 5.2 增菌

取 0.1 mL 预增菌培养物转接于 10 mL Fraser 肉汤中，于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

##### 5.3 分离培养

###### 5.3.1 划线接种

取 5.1 中的预增菌培养物或 5.2 中的增菌培养物分别划线接种于固体选择培养基 ALOA 和 OXA 平板上，于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$  后观察结果。如果菌落不明显或不典型，继续培养至  $48\text{ h}\pm 3\text{ h}$  后再观察结果。

###### 5.3.2 菌落观察

单核细胞增生李斯特氏菌在 ALOA 上生长  $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$  后，典型菌落特征为菌落呈现蓝色，周围有不透明的晕圈。在培养  $48\text{ h}\pm 3\text{ h}$  后，菌落增大，晕圈明显。

注1：有些单核细胞增生李斯特氏菌在 ALOA 上菌落周围的晕圈不明显甚至没有晕圈。还有些单核细胞增生李斯特氏菌在 ALOA 琼脂上菌落周围的晕圈出现的比较迟缓，有时需要 4 d 以上才出现。

注2：绵羊李斯特氏菌在 ALOA 上的菌落形态与单核细胞增生李斯特氏菌相似。

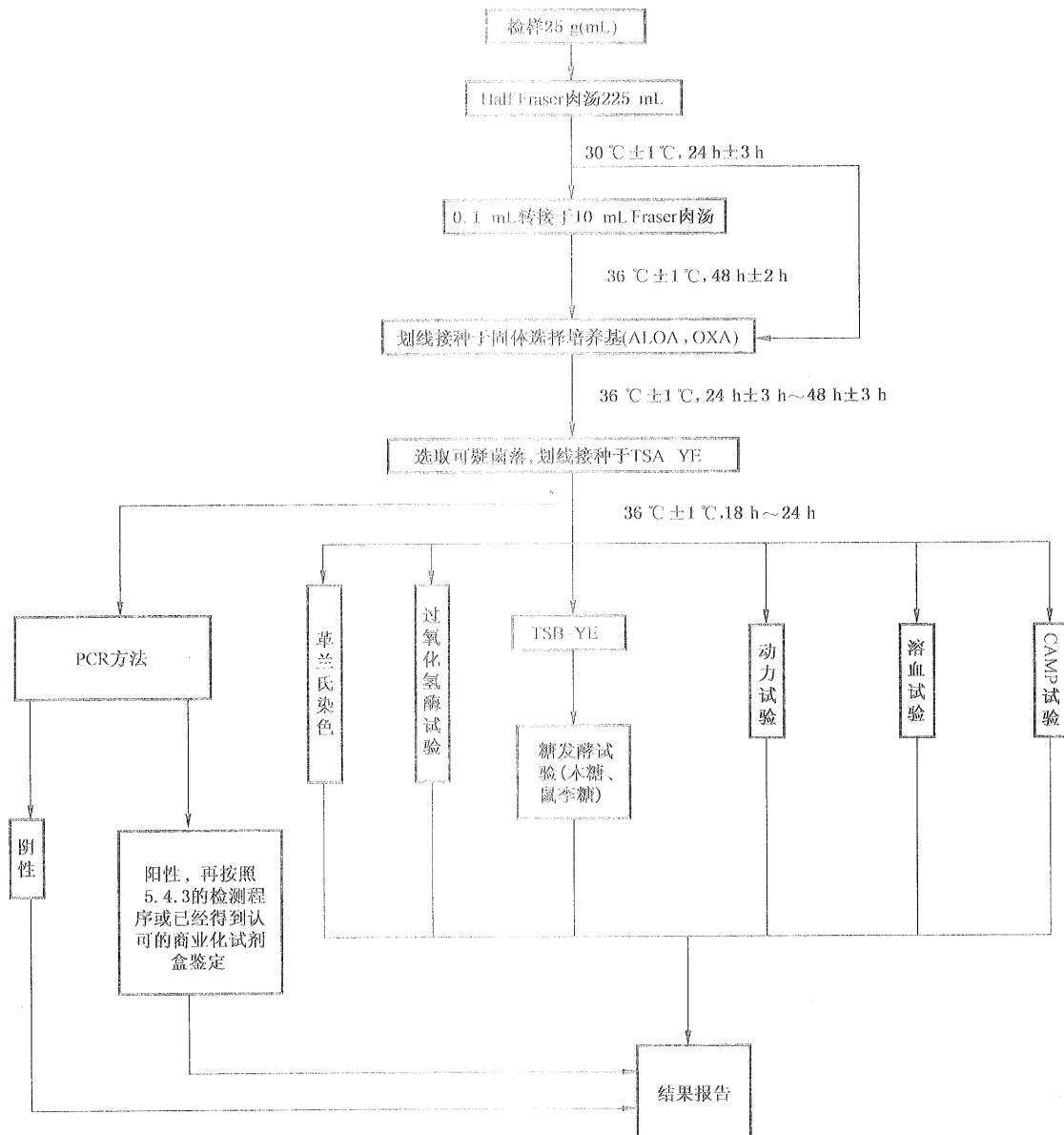


图1 单核细胞增生李斯特氏菌检测程序

单核细胞增生李斯特氏菌在 OXA 上生长 24 h ± 3 h 后, 典型菌落呈现灰色, 直径约 1 mm 左右, 周围有黑色的晕圈。在培养 48 h ± 3 h 后, 菌落增大呈现黑色, 并带有绿色光泽, 菌落中心凹陷, 直径约 2 mm 左右, 菌落周围黑色的晕圈扩大。

#### 5.4 鉴定

##### 5.4.1 可疑菌纯分离培养

从 5.3 中的固体选择培养基平板上选取可疑菌落, 每个平板选取 5 个以上, 分别划线接种于 TSA-YE 平板, 于 36 °C ± 1 °C 培养 18 h ~ 24 h。

在纯培养后, 可以按照 5.4.2 用 PCR 方法进行鉴定, 也可以按照 5.4.3 的检测程序进行鉴定。

## 5.4.2 PCR 方法

### 5.4.2.1 细菌培养

从 5.4.1 中的 TSA-YE 平板上挑取纯分离培养的细菌接种于 5 mL TSB-YE 中,于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $16\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

### 5.4.2.2 细菌 DNA 的提取

提取方法见附录 B 中的第 B.1 章。

### 5.4.2.3 PCR 扩增

PCR 扩增体系和扩增条件见附录 B 中的第 B.2 章。防止交叉污染措施参见附录 C。

### 5.4.2.4 PCR 质控对照

每次进行 PCR 检测时均需要设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

用单核细胞增生李斯特氏菌标准阳性菌株提取的 DNA 作阳性对照。

用杆菌或链球菌标准阴性菌株提取的 DNA 作阴性对照。

用灭菌双蒸水替代模板作空白对照。

### 5.4.2.5 凝胶电泳检测 PCR 产物

用电泳缓冲液配制 1% 的琼脂糖凝胶,凝胶煮沸溶化后冷却至  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  左右加入溴化乙锭溶液,使其终浓度为  $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ,将  $5\text{ }\mu\text{L}\sim 10\text{ }\mu\text{L}$  PCR 产物与上样缓冲液混合,加入加样孔中,并在其他孔中加入 DNA 分子量标记,以  $90\text{ V}\sim 100\text{ V}$  的电压进行电泳,最后用凝胶成像系统观察结果并分析保存记录。

### 5.4.2.6 结果判断

如果单核细胞增生李斯特氏菌标准菌株 PCR 扩增产物电泳同时出现 702 bp 和 938 bp 两条片段,英诺克李斯特氏菌标准菌株 PCR 扩增产物电泳只出现 938 bp 的片段,非李斯特菌属的标准菌株和空白对照 PCR 扩增产物电泳后未出现目的片段,则试验结果成立,否则试验失败,应该重做。

如果待检样品 PCR 扩增产物电泳同时出现 702 bp 和 938 bp 两条片段,则判定为阳性结果,对阳性结果再按照 4.4.3 的检测程序或已经得到认可的商业化的试剂盒鉴定后再报告结果。

如果待检样品 PCR 扩增产物电泳只出现 702 bp 或 938 bp 中的一条片段或两条片段均不出现,则判定为阴性结果,并报告待检样品中未检出单核细胞增生李斯特氏菌。

## 5.4.3 生物学特征性鉴定方法

### 5.4.3.1 革兰氏染色

将 5.4.1 中纯分离培养的细菌制备涂片火焰固定后,经结晶紫染色 1 min,水洗,再用革兰氏碘液染色 1 min,水洗,95% 酒精脱色 30 s,水洗,沙黄染色液复染 30 s,水洗,干燥,镜检。李斯特氏菌为革兰氏阳性短杆菌。

### 5.4.3.2 过氧化氢酶试验

在洁净的载玻片上滴加一滴 3% 双氧水溶液,挑取 5.4.1 中 TSA-YE 上纯分离培养的细菌混合于 3% 双氧水溶液中,李斯特氏菌会产生气泡,呈过氧化氢酶阳性反应。

### 5.4.3.3 动力试验

将 5.4.1 中 TSA-YE 上纯分离培养的细菌穿刺接种于动力培养基中,于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 48 h。李斯特氏菌有动力,在动力培养基中呈典型的伞状生长。如果伞状不够明显,可以继续培养 5 d 再观察结果。

动力试验的另一种做法是,将 5.4.1 中 TSA-YE 上纯分离培养的细菌接种于 TSB-YE 中,于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 8 h~24 h,当培养基变浑浊时,取一滴置于洁净的载玻片上,盖上盖玻片,在显微镜下观察,李斯特氏菌呈短棒状并且做翻转运动。

### 5.4.3.4 糖发酵试验

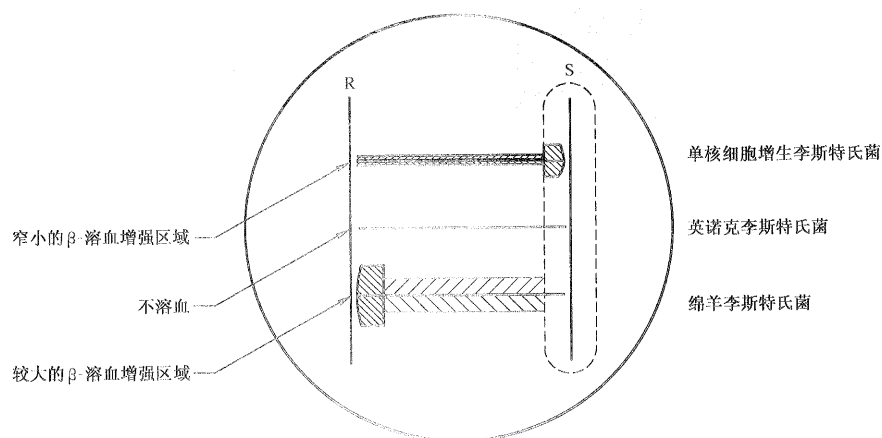
将 5.4.1 中纯分离培养的细菌接种于 TSB-YE 中培养 18 h~24 h。将该细菌培养物分别接种于木糖和鼠李糖发酵培养基,于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h~48 h 后观察结果。液体变黄表明为阳性反应。如果颜色不发生变化,可以继续观察至 5 d 后再判读结果。

### 5.4.3.5 溶血试验

将血平板分成若干个小格,将 5.4.1 中 TSA-YE 上纯分离培养的细菌穿刺接种于血平板上,每个小格接种一次。同时接种单核细胞增生李斯特氏菌、西尔李斯特氏菌、绵羊李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌标准菌株作对照。单核细胞增生李斯特氏菌会出现窄小的、清晰透明的  $\beta$ -溶血环,西尔李斯特氏菌会出现微弱的溶血环,绵羊李斯特氏菌会出现大的  $\beta$ -溶血环,英诺克李斯特氏菌不出现溶血环。

### 5.4.3.6 CAMP 试验

在羊血平板上分别用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和马红球菌(*Rhodococcus equi*)划两条竖线,两条竖线平行相对,在两条竖线之间垂直划线接种待检菌株,并且与两条竖线之间相距 1 mm~2 mm,在同一平板上可同时划线接种多个待检菌株。同时按照同样的方法将单核细胞增生李斯特氏菌、绵羊李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌标准菌株也划线接种于同一平板上。将血平板置于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h 后观察结果。单核细胞增生李斯特氏菌在靠近金黄色葡萄球菌处出现  $\beta$ -溶血增强区域,该区域较小,大约 2 mm;绵羊李斯特氏菌在靠近马红球菌处出现较大的  $\beta$ -溶血增强区域,该区域呈‘箭头’状,大约 5 mm~10 mm,如果只出现较小的微弱的溶血区域,则判为阴性反应。英诺克李斯特氏菌不出现  $\beta$ -溶血增强区域,见图 2。该试验不作为常规检测试验中必须进行的检测步骤,可根据试验需要进行选择。



注: 两条竖线分别代表马红球菌(R)和金黄色葡萄球菌(S);

划斜线区表示溶血增强区;点线围起的区域表示受金黄色葡萄球菌影响的区域。

图 2 CAMP 试验接种方法与结果示意图

## 5.4.3.7 鉴定结果的说明

以上细菌形态和生化特征有些是李斯特氏菌属细菌共有的,有些是某些李斯特氏菌属中个别种所特有的,各李斯特氏菌的种间鉴别特征见表1。

表1 李斯特氏菌的种间鉴别特征

中文菌名	英文菌名	溶血试验	糖发酵试验		CAMP 试验	
			鼠李糖	木糖	金黄色葡萄球菌	马红球菌
单核细胞增生李斯特氏菌	<i>L. monocytogenes</i>	—	+	—	+	—
英诺克李斯特氏菌	<i>L. innocua</i>	—	V	—	—	—
绵羊李斯特氏菌	<i>L. ivanovii</i>	—	—	+	—	+
西尔李斯特氏菌	<i>L. seeligeri</i>	(+)	—	+	(+)	—
威氏李斯特氏菌	<i>L. welshimeri</i>	—	V	+	—	—
格氏李斯特氏菌	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	—	—	—	—	—
默氏李斯特氏菌	<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	—	V	—	—	—

注1: V:反应不定;(+):反应微弱;+:阳性反应;—:没有反应。  
注2:有一些单核细胞增生李斯特氏菌菌株不发生溶血反应和CAMP反应。

## 5.5 质控对照

每次检验均需要用标准阳性菌株(单核细胞增生李斯特氏菌)和标准阴性菌株(如杆菌或链球菌)作质控对照。按照5.1的步骤对待检样品进行预增菌的同时,也同时另取两份培养基分别接种标准阳性菌株和标准阴性菌株(接种量为10 CFU/瓶~100 CFU/瓶),并按照检测程序进行同步试验。

## 5.6 结果报告

5.6.1 阳性结果报告:检出单核细胞增生李斯特氏菌。

5.6.2 阴性结果报告:未检出单核细胞增生李斯特氏菌。

## 6 计数方法

## 6.1 样品的制备与稀释

无菌取25 g(mL)待检样品加入到225 mL不加添加剂的Half Fraser肉汤中,均质后,于20℃±2℃复活1 h±5 min,该最初样品悬液作为10倍样品稀释液,然后取该样品悬液10 mL加入到90 mL的不加添加剂的Half Fraser肉汤中制成100倍样品稀释液,必要时按照同样的方法继续进行10倍系列稀释。

## 6.2 接种与培养

将每个稀释度的样品稀释液接种2个ALOA平板,每个平板接种0.1 mL并用灭菌的涂菌棒涂布均匀,待表面干燥后翻转平板于37℃培养24 h±3 h后观察结果,如果菌落不明显或不典型,继续培养



至 48 h±3 h 后再观察结果。

注：对单核细胞增生李斯特氏菌含量很低的某些特定食品样品，可以分别取 1 mL 涂布于两个大 ALOA 平板（直径 140 mm），或将每 1 mL 分散涂布于三个小的（直径 90 mm）ALOA 平板上，计数时按照一个平板计算。

### 6.3 疑似菌落的计数

按照 5.3.2 的方法进行菌落观察，选取疑似为李斯特氏菌的菌落总数 ≤150 CFU/板的平板进行细菌计数，并保留平板用于进一步鉴定。

### 6.4 鉴定

选取疑似为李斯特氏菌的菌落总数 ≤150 CFU/板的平板，每个平板挑取 5 个菌落，如果可疑菌落数少于 5 个，则将其全部挑取，按照 5.4 的操作程序进行鉴定，也可以采用其他得到认可的商业化试剂盒进行鉴定。

### 6.5 每个平板上单核细胞增生李斯特氏菌菌落数[CFU/板]的计算

鉴定后，用式(1)计算每个平板上单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数：

$$a = \frac{b}{A} \times C \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- a——每个平板上单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；
- b——所挑取的菌落中鉴定为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；
- A——每个平板所挑取的菌落数；
- C——每个平板上可疑为李斯特氏菌的菌落总数。

### 6.6 样品中单核细胞增生李斯特氏菌的含量计算与报告

6.6.1 对于 15 CFU ≤ 单核细胞增生李斯特氏菌菌落数/板 ≤150 CFU 的样品，用式(2)计算和报告：

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + n_2)d} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

- N——样品中单核细胞增生李斯特氏菌的含量，CFU/g(CFU/mL)；
- ∑ a——所有经过鉴定的平板上单核细胞增生李斯特氏菌的数量之和；
- V——每个平板上接种的样品稀释液的体积，单位为毫升(mL)；
- n<sub>1</sub>——第一个稀释度保留平板的数量；
- n<sub>2</sub>——第二个稀释度保留平板的数量；
- d——用于菌落计数平板接种液的稀释倍数。

报告结果用两位有效数字表示，1.0×10<sup>n</sup>~9.9×10<sup>n</sup>，单位为 CFU/g(CFU/mL)。

6.6.2 对于用最初样品稀释液接种的平板上单核细胞增生李斯特氏菌菌落数/板 <15 CFU 的样品，用式(3)估算和报告：

$$N_E = \frac{y}{d \times V} \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中：

- N<sub>E</sub>——样品中单核细胞增生李斯特氏菌的含量估算值，CFU/g(CFU/mL)；
- y——用最初样品稀释液接种的两个平板上单核细胞增生李斯特氏菌菌落数平均值；
- d——最初的样品稀释液的稀释倍数；
- V——每个平板接种的液体体积。

报告结果用  $N_E$  估算值表示,单位为 CFU/g(CFU/mL)。

6.6.3 对于用最初样品稀释液接种的平板上没有出现任何可疑菌落的样品,用式(4)表示结果和报告:

$$N_E < \frac{1}{d \times V} \dots\dots\dots(4)$$

式中:

$N_E$ ——样品中单核细胞增生李斯特氏菌的含量估算值,CFU/g(CFU/mL);

$d$  ——最初样品稀释液的稀释倍数;

$V$  ——每个平板接种的液体体积。

报告结果用  $< \frac{1}{d \times V}$  CFU/g(CFU/mL)表示。

### 6.7 质控对照

每次检验均需要用标准阳性菌株(单核细胞增生李斯特氏菌)和标准阴性菌株(如:杆菌或链球菌)作质控对照。按照 5.1 中的方法对检测样品进行样品制备和稀释的同时,也同时将稀释肉汤分别接种标准阳性菌株和标准阴性菌株(接种量为 10 CFU/瓶~100 CFU/瓶),并按照检测程序进行同步试验。

## 7 安全要求

为了确保试验室工作人员的安全和健康,建议在三级生物安全试验室进行单核细胞增生李斯特氏菌检测,并由具有实际操作技能的微生物学专家负责管理,对所有细菌培养物都应该进行谨慎处理。另外,建议孕妇不要从事单核细胞增生李斯特氏菌的培养和检测工作。

附 录 A  
(规范性附录)  
培养基和试剂

### A.1 Half Fraser 肉汤

#### A.1.1 基础培养基

##### A.1.1.1 成分

肉脍	5.0 g
胰化蛋白脍	5.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
氯化钠	20.0 g
磷酸氢二钠	12.0 g
磷酸二氢钾	1.35 g
七叶苷	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

##### A.1.1.2 制备

将上述各成分溶于水后加热溶解,调 pH 值至  $7.2 \pm 0.2$ ,分装后于  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min,备用。

#### A.1.2 氯化锂溶液

##### A.1.2.1 成分

氯化锂	3.0 g
蒸馏水	10 mL

##### A.1.2.2 制备

将氯化锂溶解于蒸馏水中,过滤除菌。

#### A.1.3 萘啶酮酸钠盐溶液

##### A.1.3.1 成分

萘啶酮酸钠盐	0.1 g
0.05 mol/L 氢氧化钠溶液	10 mL

##### A.1.3.2 制备

将萘啶酮酸钠盐溶解于氢氧化钠溶液中,过滤除菌。

#### A. 1.4 盐酸吡啶黄素溶液

##### A. 1.4.1 成分

盐酸吡啶黄素	0.25 g
蒸馏水	100 mL

##### A. 1.4.2 制备

将盐酸吡啶黄素溶解于蒸馏水中,过滤除菌。

#### A. 1.5 柠檬酸铁铵溶液

##### A. 1.5.1 成分

柠檬酸铁铵	5.0 g
蒸馏水	100 mL

##### A. 1.5.2 制备

将柠檬酸铁铵溶解于蒸馏水中,过滤除菌。

#### A. 1.6 使用(完全)培养基

##### A. 1.6.1 成分

基础培养基(A. 1.1)	100 mL
氯化锂溶液(A. 1.2)	1.0 mL
萘啶酮酸钠盐溶液(A. 1.3)	0.1 mL
盐酸吡啶黄素溶液(A. 1.4)	0.5 mL
柠檬酸铁铵溶液(A. 1.5)	1.0 mL

##### A. 1.6.2 制备

在临用前,按照需用量将 A. 1.2~A. 1.5 四种溶液加入到 A. 1.1 溶液中。

#### A. 2 Fraser 肉汤

##### A. 2.1 基础培养基

见 A. 1.1。

##### A. 2.2 氯化锂溶液

见 A. 1.2。

##### A. 2.3 萘啶酮酸钠盐溶液

见 A. 1.3。

##### A. 2.4 盐酸吡啶黄素溶液

见 A. 1.4。

## A.2.5 柠檬酸铁铵溶液

见 A.1.5。

## A.2.6 使用(完全)培养基

## A.2.6.1 成分

基础(A.2.1)	100 mL
氯化锂溶液(A.2.2)	1.0 mL
茶啉酮酸钠盐溶液(A.2.3)	0.2 mL
盐酸吡啶黄素溶液(A.2.4)	1.0 mL
柠檬酸铁铵溶液(A.2.5)	1.0 mL

## A.2.6.2 制备

在临用前,按照需用量将 A.2.2~A.2.5 四种溶液加入到 A.2.1 溶液中,混匀后每试管分装10 mL 备用。

## A.3 李斯特氏菌显色培养基琼脂(ALOA)

## A.3.1 基础培养基

## A.3.1.1 成分

肉胨	18.0 g
胰化蛋白胨	6.0 g
酶提取物	10.0 g
丙酮酸钠	2.0 g
葡萄糖	2.0 g
甘油磷酸镁	1.0 g
无水硫酸镁	0.5 g
氯化钠	5.0 g
氯化锂	10.0 g
无水磷酸氢二钠	2.5 g
5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-吡喃葡萄糖苷	0.05 g
琼脂粉	12.0 g~18.0 g <sup>1)</sup>
蒸馏水	930 mL <sup>2)</sup>

## A.3.1.2 制备

将上述各成分溶于水后煮沸溶解,调 pH 值至  $7.2 \pm 0.2$ ,分装后于 121 °C 灭菌 15 min,备用。

1) 所用的量根据琼脂的凝胶强度来定。

2) 如果用两性霉素 B 溶液,则用蒸馏水 925 mL。

### A.3.2 萘啶酮酸钠盐溶液

#### A.3.2.1 成分

萘啶酮酸钠盐	0.02 g
0.05 mol/L 氢氧化钠溶液	5 mL

#### A.3.2.2 制备

将萘啶酮酸钠盐溶解于氢氧化钠溶液中,过滤除菌。

### A.3.3 头孢他啶溶液

#### A.3.3.1 成分

头孢他啶	0.02 g
蒸馏水	5 mL

#### A.3.3.2 制备

将头孢他啶溶解于蒸馏水中,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。

### A.3.4 多粘菌素 B 溶液

#### A.3.4.1 成分

多粘菌素 B	76700 IU
蒸馏水	5 mL

#### A.3.4.2 制备

将多粘菌素 B 溶解于蒸馏水中,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。

### A.3.5 抗生素添加剂

#### A.3.5.1 放线菌酮溶液

放线菌酮	0.05 g
乙醇	2.5 mL
蒸馏水	2.5 mL

将放线菌酮溶解于 2.5 mL 乙醇后,再加入 2.5 mL 蒸馏水,过滤除菌。

#### A.3.5.2 两性霉素 B 溶液

两性霉素 B	0.01 g
盐酸溶液(1 mol/L)	2.5 mL
二甲基甲酰胺	7.5 mL

将两性霉素 B 溶解于盐酸溶液/二甲基甲酰胺溶液中,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。

### A.3.6 添加剂

将 2 g L- $\alpha$ -磷脂酰环己六醇溶解于 50 mL 冷水中,摇成均一悬液后,于 121  $^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min,冷却至 48  $^{\circ}\text{C}$ ~50  $^{\circ}\text{C}$  备用。

## A.3.7 使用(完全)培养基

## A.3.7.1 成分

基础培养基(A.3.1)	930 mL <sup>3)</sup>
萘啶酮酸钠盐溶液(A.3.2)	5.0 mL
头孢他啶溶液(A.3.3)	5.0 mL
多粘菌素 B 溶液(A.3.4)	5.0 mL
放线菌酮溶液(A.3.5.1)	5.0 mL
或两性霉素 B(A.3.5.2)	10.0 mL
添加剂(A.3.6)	50.0 mL

## A.3.7.2 制备

将基础培养基 A.3.1 溶解后冷却至 50℃,按照需用量将 A.3.2~A.3.6 五种溶液加入到 A.3.1 中,混匀后倾注平板,待其凝固后备用。

## A.4 牛津琼脂(OXA)

## A.4.1 基础培养基

## A.4.1.1 成分

哥伦比亚琼脂	39.0 g
七叶苷	1.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
氯化锂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
哥伦比亚琼脂成分	
示踪	23.0 g
淀粉	1.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂(所用的量根据琼脂的凝胶强度来定)	9.0 g~15.0 g

## A.4.1.2 制备

将上述各成分溶于水后煮沸溶解,调 pH 值至 7.2±0.2,分装后于 121℃灭菌 15 min,备用。

## A.4.2 用于 1 000 mL 培养基的添加剂

## A.4.2.1 成分

放线菌酮	400 mg
硫酸粘菌素	20 mg
吡啶黄素	5.0 mg
头孢替坦钠	2.0 mg

3) 如果用两性霉素 B 溶液,则用蒸馏水 925 mL。

磷霉素	10 mg
乙醇	5.0 mL
蒸馏水	5.0 mL

## A. 4.2.2 制备

将上述各成分溶解于乙醇/水溶液中,过滤除菌。

## A. 4.3 使用(完全)培养基

将基础培养基(A. 4.1)融化后冷却至 47 °C,加入添加剂 A. 4.2,混匀后倾注平板,待其凝固后备用。

## A. 5 酵母浸膏胰酪大豆琼脂(TSA-YE)

## A. 5.1 成分

胰化蛋白胨大豆肉汤	30.0 g
酶提	6.0 g
琼脂	9.0 g~18.0 g <sup>4)</sup>
蒸馏水	1 000 mL
胰化蛋白胨大豆肉汤成分	
胰化蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g

## A. 5.2 制备

将上述各成分溶于水后煮沸溶解,调 pH 值至 7.3±0.2,于 121 °C 灭菌 15 min,倾注平板,待其凝固后备用。

## A. 6 酵母浸膏胰酪大豆肉汤(TSB-YE)

## A. 6.1 成分

胰化蛋白胨大豆肉汤	30.0 g
酶提	6.0 g
蒸馏水	1 000 mL
胰化蛋白胨大豆肉汤成分	
胰化蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g

4) 所用的量根据琼脂的凝胶强度来定。



## A.6.2 制备

将上述各成分溶于水后煮沸溶解,调 pH 值至  $7.3 \pm 0.2$ ,分装后于  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min,备用。

## A.7 羊血琼脂

## A.7.1 基础培养基

## A.7.1.1 成分

肉胨	15.0 g
肝消化物	2.5 g
酶提	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	$9.0\text{ g} \sim 18.0\text{ g}^{5)}$
蒸馏水	1 000 mL

## A.7.1.2 制备

将上述各成分溶于水后煮沸溶解,调 pH 值至  $7.2 \pm 0.2$ ,于  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min,备用。

## A.7.2 脱纤羊血

## A.7.3 使用(完全)培养基

## A.7.3.1 成分

基础培养基(A.7.1)	100 mL
脱纤羊血(A.7.2)	5 mL~7 mL

## A.7.3.2 制备

将基础培养基 A.7.1 溶解后冷却至  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,将脱纤羊血加入到 A.7.1 中,混匀后倾注平板,凝固后备用。

## A.8 糖发酵培养基(木糖和鼠李糖)

## A.8.1 基础培养基

## A.8.1.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	1.0 g
氯化钠	5.0 g
溴甲酚紫	0.02 g
蒸馏水	1 000 mL

5) 所用的量根据琼脂的凝胶强度来定。

#### A. 8.1.2 制备

将上述各成分溶于水后加热溶解,调 pH 值至  $6.8 \pm 0.2$ ,分装试管后于  $121\text{ }^\circ\text{C}$  灭菌 15 min,备用。

#### A. 8.2 糖溶液

##### A. 8.2.1 成分

糖(L-鼠李糖或 D-木糖)	5.0 g
蒸馏水	100 mL

##### A. 8.2.2 制备

将糖溶解于蒸馏水中,过滤除菌,备用。

#### A. 8.3 使用(完全)培养基

将  $x$  mL 糖溶液 A. 8.2 加入到  $9x$  mL 基础培养基 A. 8.1 中,备用。

#### A. 9 动力培养基

##### A. 9.1 成分

酪蛋白胨	20.0 g
肉胨	6.1 g
琼脂	3.5 g
蒸馏水	1 000 mL

##### A. 9.2 制备

将上述各成分溶于水后煮沸溶解,调 pH 值至  $7.3 \pm 0.2$ ,分装于试管中,每管 5 mL,于  $121\text{ }^\circ\text{C}$  灭菌 15 min,备用。

#### A. 10 CAMP 试验培养基和试验菌株

##### A. 10.1 绵羊血琼脂平板

见第 A. 7 章。

##### A. 10.2 CAMP 试验菌株

CAMP 试验用的金黄色葡萄球菌菌株为 NCTC1803 或 ATCC25923;马红球菌的菌株为 NCTC1621 或 ATCC6939。

将金黄色葡萄球菌、马红球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、绵羊李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌标准菌株接种于 TSA-YE 斜面,于  $36\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  培养 24 h~28 h,储存于  $3\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中备用,至少 1 个月以后再次传代培养。

## A. 11 革兰氏染色液

## A. 11.1 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,然后与草酸铵水溶液混合。

## A. 11.2 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,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

## A. 11.3 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,再加蒸馏水至 100 mL。

## A. 12 引物

引物见表 A.1。

表 A.1 引物

引物名称	引物序列	靶基因	扩增长度/bp	退火温度/°C
FM1	5'-CCTAAGACGCCAATCGAA-3'	hlyA	702	58
FM2	5'-AAGCGCTTGCAACTGCTC-3'			
LII	5'-CTCCATAAAGGTGACCCT-3'	16SRNA	938	58
UI	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'			

## A. 13 溴化乙锭溶液

将 1 g 溴化乙锭加入到 100 mL 蒸馏水中,磁力搅拌器搅拌数小时直至其完全溶解,避光保存备用。

## A. 14 50×电泳缓冲液

Tris	24.2 g
冰乙酸	5.7 mL
0.5 mol/L EDTA 溶液(pH8.0)	10 mL

加蒸馏水  
使用时稀释成 1×电泳缓冲液。 定容至 100 mL

A.15 6×加样缓冲液

溴酚蓝 0.25%  
蔗糖 40%

称取溴酚蓝 0.125 g,加双蒸水 5 mL,室温下过夜,待其溶解后,称取蔗糖 20 g 加入到溴酚蓝溶液中,摇匀定容至 50 mL,加入一滴氢氧化钠溶液,调至蓝色。

## 附 录 B

(规范性附录)

## 细菌 DNA 的提取和 PCR 扩增方法

## B.1 细菌 DNA 的提取方法

## B.1.1 试剂

## B.1.1.1 10×TE 缓冲液(pH8.0)

Tris	1.21 g
EDTA	0.292 g
蒸馏水	100 mL

将上述成分溶解于 80 mL 蒸馏水中,用盐酸调 pH 值至 8.0,再定容至 100 mL,115 °C 灭菌 15 min。使用时作 10 倍稀释。

## B.1.1.2 50 mg/mL 溶菌酶溶液

将 1 g 溶菌酶溶解于 20 mL TE 缓冲液(pH8.0)中,分装后保存备用。

## B.1.1.3 5 mol/L 异硫氰酸胍溶液

异硫氰酸胍	30.0 g
0.5 mol/L EDTA 溶液(pH8.0)	10 mL
用蒸馏水	定容至 50 mL

先将前两种成分加入到 10 mL 蒸馏水中,65 °C 加热溶解,冷却后加入 2.5 mL 10% sarkosyl,再将溶液定容至 50 mL,用 0.45 μm 的滤膜过滤除菌。

## B.1.1.4 7.5 mol/L 乙酸铵

乙酸铵	57.81 g
用双蒸水	定容至 100 mL

上述溶液溶解定容后,用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌。

## B.1.2 仪器设备

除常规实验室仪器设备之外,还需要以下特殊仪器设备:

- 微量移液器;
- 台式离心机:配有可容纳 1.5 mL~2 mL 微量反应管的转子,加速度可调至 12 000g;
- 恒温水浴箱:36 °C ± 1 °C;
- 涡旋混匀器。

## B.1.3 操作步骤

按照下述方法提取细菌 DNA:

- 取 1 mL 细菌悬液加入到 1.5 mL 反应管中,于 8 000g 离心 5 min,弃去上清液;
- 将沉淀用 0.5 mL TE 缓冲液重悬,于 8 000g 离心 5 min,弃去上清液;

- c) 对于革兰氏阳性菌,用 100  $\mu\text{L}$  溶菌酶溶液重悬沉淀物,于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min(对于革兰氏阴性菌,则直接用 100  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液重悬后,继续进行下一步);
- d) 将反应管移置到冰浴中使其迅速冷却;
- e) 加入 0.5 mL 异硫氰酸胍溶液,于室温下作用 10 min,期间轻弹管壁;
- f) 将反应管置于冰上,加入 7.5 mol/L 乙酸铵溶液 0.25 mL,混匀后冰浴 10 min;
- g) 加入 0.5 mL 酚/三氯甲烷/异戊醇溶液(25:24:1),充分混匀后,于 12 000g 离心 10 min;
- h) 将上清液移入新的反应管中,加入 0.54 体积的冷的异丙醇,混匀后,于 -20  $^{\circ}\text{C}$  放置 10 min;
- i) 弃去上清液,用 75%乙醇洗沉淀一次,真空干燥;
- j) 将沉淀用 50  $\mu\text{L}$ ~60  $\mu\text{L}$  灭菌双蒸水溶解,立即使用或于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

细菌 DNA 的提取也可以选用市售的核酸提取和纯化试剂盒并按试剂盒说明书进行操作。

## B.2 PCR 扩增方法

以提取的细菌 DNA 为模板,分别用各对引物进行 PCR 扩增,反应体系均为 50  $\mu\text{L}$ :

模板 DNA	5 $\mu\text{L}$
Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.25 $\mu\text{L}$
10 $\times$ Taq Buffer	5 $\mu\text{L}$
dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L)	2 $\mu\text{L}$
引物 LM1 或 LI1(25 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
引物 LM2 或 U1(25 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
灭菌蒸馏水	35.75 $\mu\text{L}$

循环参数为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,58  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,35 个循环,最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

## 附录 C

(资料性附录)

## PCR 检测过程中防止交叉污染的措施

## C.1 抽样和制样过程

抽样和制样工具,应清洗干净,121℃高压灭菌 15 min~20 min,一套洁净工具限于一份样品使用。存放样品的容器应该经过清洗、高压灭菌,或使用一次性无菌容器。

## C.2 检测过程

C.2.1 PCR 实验室应分为样品制备区、前 PCR 区、PCR 区和后 PCR 区。将模板提取、PCR 反应液的配制、PCR 循环扩增及 PCR 产物的鉴定等步骤分区域或分室进行。实验室的运作应从“净区”到“脏区”单向进行。

C.2.2 实验过程中,应穿戴试验服和手套。手套要经常更换。各区要有专用试验服,经常清洗。

C.2.3 各区所有的试剂、器材(尤其是移液器)、仪器都应专用,不得带出该区。

C.2.4 所有溶液、水、耗材和器具要 121℃高压灭菌 15 min~20 min,避免核酸和(或)核酸酶污染。每种溶液应使用分析纯试剂和新蒸馏的双蒸水配制。在 20℃~25℃储存的试剂中,可加入 0.025%的叠氮钠。所有试剂应该以大体积配制,然后分装成仅够一次或几次使用的量进行小体积储存。

C.2.5 DNA 模板或引物的离心管打开之前,要简单离心,离心管不能用力崩开,以免产生气溶胶。

C.2.6 前 PCR 区中,最好能在 PCR 操作箱中加入 PCR 反应各组分。

C.2.7 实验前后,实验室用紫外线消毒及通过反复清洗、擦拭去除各种器具和设备表面残留的 DNA。

C.2.8 可使用 UDG 和 dUTP 系统控制污染。

C.2.9 应遵循 PCR 操作的其他要求。

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 12 部分:单核细胞增生李斯特氏菌  
检测与计数

SN/T 2552.12—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](http://www.spc.net.cn)

电话:68523946 68517548

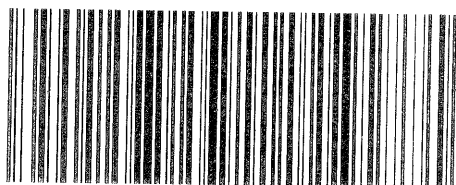
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 1.75 字数 39 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: 155066·2-21214 定价 27.00 元



SN/T 2552.12-2010