

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3724—2013

出口食品中幽门螺杆菌的检验方法

Determination of *Helicobacter pylori* in food for export

www.kinghuat.com
凯恒生物

2013-11-06 发布

2014-06-01 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
出口食品中幽门螺杆菌的检验方法
SN/T 3724—2013

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)64275323
网址 www.spc.net.cn

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
2014年4月第一版 2014年4月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066·2-26880 定价 16.00 元

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、浙江疾病预防控制中心、南京农业大学、南京工业大学、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、福建医科大学、安徽农业大学、上海辉睿生物科技有限公司起草。

本标准主要起草人：祝长青、王毅谦、易海华、金大智、黄明、孙芸、张舒亚、郭桂萍、蒋原、张建中、栾军、周阳、郭云昌、邵景东、曹瑞兵、李能、韩伟、牛雯、付瑞燕、李辉、刘国栋、吴福平。

www.kinghunt.cn
凯恒生物

出口食品中幽门螺杆菌的检验方法

1 范围

本标准规定了食品中幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)的检验方法。
本标准适用于食品中幽门螺杆菌的检验。

2 设备和材料

- 2.1 冰箱:2℃~8℃。
- 2.2 恒温培养箱:25℃±1℃,37℃±1℃,42℃±1℃。
- 2.3 微需氧培养装置:提供微需氧条件(5% O₂,10% CO₂和85% N₂)。
- 2.4 拍击均质器。
- 2.5 电子天平:感量0.1g。
- 2.6 无菌培养皿:直径为90mm。

3 培养基和试剂

- 3.1 改良脑心浸出液肉汤(mBHIB);见附录A中A.1。
- 3.2 改良脑心浸出液血琼脂(mBHIA);见A.2。
- 3.3 氧化酶试剂;见A.3。
- 3.4 改良半固体培养基;见A.4。
- 3.5 尿素酶试剂;见A.5。
- 3.6 马尿酸水解的试剂;见A.6。
- 3.7 硝酸盐试剂;见A.7。
- 3.8 吲哚乙酸酯纸片;见A.8。
- 3.9 甘氨酸。
- 3.10 硝酸钾。
- 3.11 氯化钠。
- 3.12 3%过氧化氢溶液。
- 3.13 生化鉴定试剂盒。

4 检验程序

食品中幽门螺杆菌的检验程序见图1。

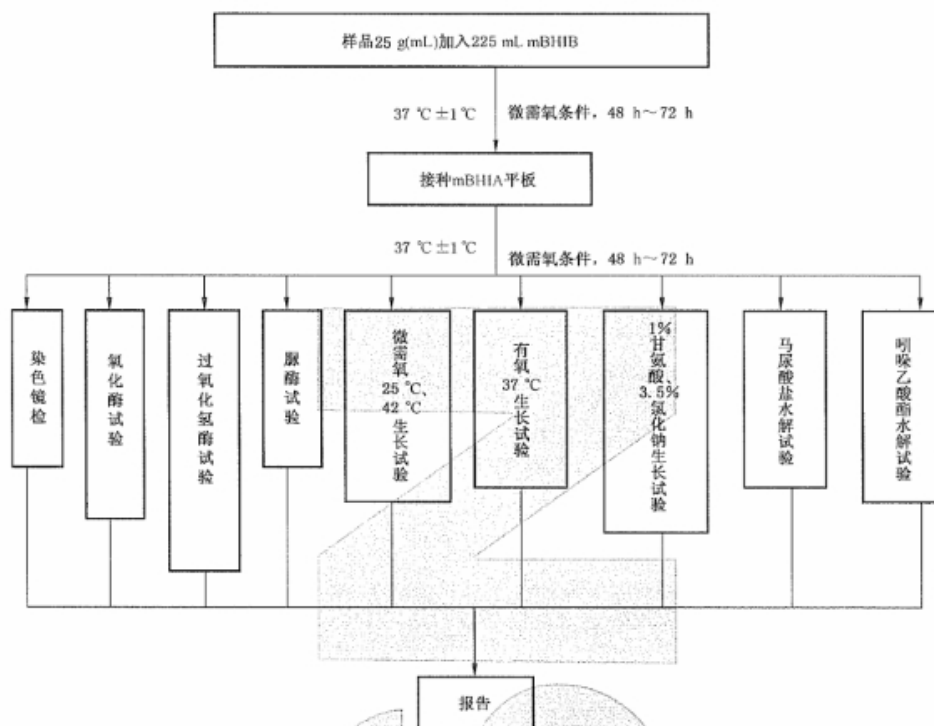


图1 幽门螺杆菌检验程序

5 操作步骤

5.1 增菌

无菌操作条件下取 25 g(mL)样品于 225 mL 改良脑心浸出液肉汤中,在带有滤网的均质袋中拍打均质 2 min~3 min,将滤过液进行培养。如使用无滤网的均质袋可用无菌纱布进行过滤。在微需氧条件下,滤过液 37 °C ± 1 °C 振荡培养 48 h~72 h。

5.2 分离培养

将 48 h 增菌液、72 h 增菌液划线接种于改良脑心浸出液血琼脂平板上,微需氧条件下 37 °C ± 1 °C 培养 48 h~72 h。

5.3 可疑菌落的挑选

观察平板上的菌落形态,幽门螺杆菌在改良脑心浸出液血琼脂的典型菌落为菌落细小、呈针尖状、透明湿润、不溶血。挑取 mBHIA 平板上至少 5 个(如少于 5 个则全部挑取)可疑菌落划线接种到无抗生素的脑心浸出液血平板上,微需氧条件下 37 °C ± 1 °C 培养 48 h~72 h,按照 5.4.1~5.4.10 进行鉴定,结果符合表 1 者的可疑菌落确定为幽门螺杆菌。

表 1 幽门螺杆菌的鉴定

项 目	鉴 定 特 性
形态观察,镜检	革兰氏染色阴性短杆状、弯曲状和海鸥展翅状
氧化酶试验	阳性
过氧化氢酶试验	阳性
脲酶试验	阳性
微需氧条件下 25℃±1℃生长试验	不生长
有氧条件下 37℃±1℃生长试验	不生长
微需氧条件下 42℃±1℃生长试验	不生长
1%甘氨酸生长试验	不生长
硝酸盐还原试验	阴性
3.5%氯化钠生长试验	不生长
马尿酸盐水解试验	阴性
吡啉乙酸酯水解试验	阴性

5.4 幽门螺杆菌的鉴定

5.4.1 形态观察

挑取可疑菌落进行革兰氏染色,镜检。显微镜下可见革兰氏染色阴性细菌,呈螺旋状、逗点状或海鸥展翅状等。

5.4.2 氧化酶试验

用铂/铱接种环或玻璃棒挑取可疑菌落至氧化酶试剂润湿的滤纸上,如果在 10 s 内出现深蓝或黑色反应者为阳性。

5.4.3 过氧化氢酶试验

在载玻片上滴加 1 滴 3%过氧化氢溶液,刮取一环可疑菌落置入后,半分钟内发生气泡者判为阳性。

5.4.4 脲酶试验

取 2%尿素溶液和酚红磷酸缓冲液各 3 滴,刮取较多个菌落,混匀后置 25℃±1℃水浴中温育 4 h,观察颜色的变化。呈红色者为阳性。

5.4.5 微需氧条件下 25℃生长试验

挑取可疑菌落,接种到无抗生素的脑心浸出液血平板上,微需氧条件下 25℃±1℃培养 44 h±4 h,观察细菌生长情况。

5.4.6 有氧条件下 37℃生长试验

挑取可疑菌落,接种到无抗生素的脑心浸出液血平板上,有氧条件下 37℃±1℃培养 44 h±4 h,观察细菌生长情况。

5.4.7 微需氧条件下 42℃ 生长试验

挑取可疑菌落,接种到无抗生素的脑心浸出液血平板上,微需氧条件下 42℃ ± 1℃ 培养 44 h ± 4 h,观察细菌生长情况。

5.4.8 改良半固体培养基中生长情况

在添加有以下生化试剂的改良半固体培养基表面接种 0.1 mL 菌悬液,微需氧下 37℃ ± 1℃ 培养 3 d,硝酸盐培养基培养 5 d。若有生长,应是仅在培养基表面形成狭窄条带状生长,反应情况如下:

- a) 1%甘氨酸:有菌落生长为阳性;
- b) 3.5%氯化钠:有菌落生长为阳性;
- c) 硝酸盐还原试验:培养 5 d 后向培养基中加入硝酸盐试剂 A 和 B,呈现红色为阳性反应。

5.4.9 马尿酸盐水解试验

挑取菌落,加到盛有 0.4 mL 1%马尿酸钠的试管中制成菌悬液。混合均匀后在 37℃ ± 1℃ 水浴中温育 2 h 或 37℃ ± 1℃ 培养箱中温育 4 h。沿着试管壁缓缓加入 0.2 mL 茚三酮溶液,不要振荡,在 37℃ ± 1℃ 的水浴或培养箱中再温育 10 min 后判读结果。若出现深紫色则为阳性;若出现淡紫色或没有颜色变化则为阴性。

5.4.10 吲哚乙酸酯水解试验

挑取菌落至吲哚乙酸酯纸片上,再滴加 1 滴灭菌蒸馏水。如果吲哚乙酸酯水解,则在 5 min ~ 10 min 内出现深蓝色;若无颜色变化则表示没有发生水解。对于可疑菌落,也可使用生化鉴定试剂盒来替代 5.4.1~5.4.10 的鉴定,具体操作按照产品说明书进行。

6 结果报告

按照上述鉴定结果,报告 25 g(mL)样品中检出和/或未检出幽门螺杆菌。

附录 A
(规范性附录)
培养基与试剂

A.1 改良脑心浸出液肉汤(modified Brain Heart Infusion Broth, mBHIB)

A.1.1 基础培养基

A.1.1.1 成分

牛脑浸出液:12.5 g;
牛心浸出液:5.0 g;
蛋白胨:10.0 g;
葡萄糖:2.0 g;
氯化钠:5.0 g;
磷酸氢二钠:2.5 g。

A.1.1.2 制法

取 37.0 g, 加 1 L 蒸馏水, 混匀, 加热至溶解完全, 分装到合适的容器里, 将 pH 调至 6.5 ± 0.2 , 121°C 灭菌 15 min。

A.1.2 无菌裂解脱纤维绵羊血

对无菌脱纤维绵羊血通过多次反复冻融进行裂解。

A.1.3 抗生素溶液

A.1.3.1 成分

万古霉素(vancomycin):10 mg/L;
三甲氧苄胺嘧啶乳酸盐(trimethoprim lactate):0.005 mg/L;
两性霉素 B(amphotericin B):10 mg/L;
多粘菌素 B(polymyxin B):0.005 mg/L。

A.1.3.2 制法

将上述成分溶解于乙醇/灭菌水混合溶液中。

A.1.4 完全培养基

A.1.4.1 成分

基础培养基(A.1.1):1 000 mL;
无菌裂解脱纤维绵羊血(A.1.2):50 mL;
抗生素溶液(A.1.3):5 mL。

A.1.4.2 制法

当基础培养基的温度约为 45 ℃ 时,无菌加入绵羊血和抗生素溶液,混匀,将培养基无菌分装至合适的试管或锥形瓶中备用。配制的增菌液在常温下放置不得超过 4 h,或在 4 ℃ 左右避光保存不得超过 7 d。

A.2 改良脑心浸出液血琼脂(modified Brain Heart Infusion Agar, mBHIA)

A.2.1 基础培养基

A.2.1.1 成分

牛脑浸出液:12.5 g;
牛心浸出液:5.0 g;
蛋白陈:10.0 g;
葡萄糖:2.0 g;
氯化钠:5.0 g;
磷酸氢二钠:2.5 g;
琼脂:10.0 g。

A.2.1.2 制法

称取 47.0 g,加 1 L 蒸馏水,加热至溶解完全,分装到试管或容器里,pH 调至 6.5 ± 0.2 ,121 ℃ 灭菌 15 min。

A.2.2 无菌裂解脱纤维绵羊血

对无菌脱纤维绵羊血通过多次反复冻融进行裂解。

A.2.3 抗生素溶液

A.2.3.1 成分

万古霉素(vancomycin):10 mg/L;
三甲氧苄胺嘧啶乳酸盐(trimethoprim lactate):0.005 mg/L;
两性霉素 B(amphotericin B):10 mg/L;
多粘菌素 B(polymyxin B):0.005 mg/L。

A.2.3.2 制法

将上述成分溶解于乙醇/灭菌水混合溶液中。

A.2.4 完全培养基

A.2.4.1 成分

基础培养基(A.2.1):1 000 mL;
无菌裂解脱纤维绵羊血(A.1.2):50 mL;
抗生素溶液(A.1.3):5 mL。

A.2.4.2 制法

当基础培养基的温度约为 45 ℃ 时,无菌加入绵羊血和抗生素溶液,混匀后倒入无菌的培养皿中制备选择性血平板。配制的平板在常温下放置不得超过 4 h,或在 4 ℃ 左右避光保存不得超过 7 d。

A.3 氧化酶试剂(Reagent for the detection of oxidase)

A.3.1 成分

四甲基对苯二胺盐酸盐:1.0 g;
蒸馏水:100 mL。

A.3.2 制法

使用前迅速将上述成分溶于水。

A.4 改良半固体培养基

A.4.1 无血和抗生素的脑心浸出液肉汤成分

琼脂:37 g;
生化试剂:1.8 g。成分为:
a) 硝酸钾(1%):于 250 mL 半固体培养基中加入 2.5 g;
b) 甘氨酸(1%):于含有中性红的 250 mL 半固体培养基中加入 2.5 g;
c) 氯化钠(3.5%):于含有中性红的 250 mL 半固体培养基中加入 8.75 g。

A.4.2 配制

煮沸基础培养基,250.0 mL 分装成两份。二份培养基中加入 2.5 mL 中性红,再加入甘氨酸,氯化钠。另一份无中性红的培养基中加入硝酸钾。每份培养基调节 pH 值为 6.0 ± 0.2 ,分装于带螺旋帽的试管中,每支约 10.0 mL,121 ℃ 灭菌 15 min。

A.5 脲酶检测试剂

A.5.1 2% 尿素溶液:称取 2.0 g 尿素溶于 100 mL 无水乙醇中,过滤除菌。

A.5.2 酚红磷酸缓冲液:0.025 mol/L 的磷酸缓冲液 100 mL,加 0.1% 酚红水溶液 0.2 mL。

A.6 马尿酸水解的检测试剂(Reagents for the detection of hydrolysis of hippurate)

A.6.1 马尿酸钠溶液

A.6.1.1 成分

马尿酸钠:10.0 g;
磷酸盐缓冲液(PBS)组分:
NaCl:8.5 g;
Na₂HPO₄ · 2H₂O:8.98 g;

SN/T 3724—2013

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 2.71 g;
蒸馏水: 1 000 mL。

A.6.1.2 制法

将马尿酸钠溶于磷酸盐缓冲溶液中, 过滤除菌。用合适的试管进行无菌分装, 每管 0.4 mL, 储存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 。

A.6.2 3.5%(水合)茚三酮溶液(质量/体积)

A.6.2.1 成分

(水合)茚三酮(ninhydrin): 1.75 g;
丙酮: 25 mL;
丁醇: 25 mL。

A.6.2.2 制备

将(水合)茚三酮溶解于丙酮/丁醇混合液中。该溶液在避光冷藏时最多不超过一周。

A.7 硝酸盐检测试剂

A.7.1 试剂

试剂 A: 0.6% 二甲基- α -萘胺。
试剂 B: 0.8% 对氨基苯磺酸。

A.7.2 配制

将试剂 A 和试剂 B 溶于 5 mol/L 乙酸中。

A.8 吲哚乙酸酯纸片(Indoxyl acetate disc)

A.8.1 成分

吲哚乙酸酯: 0.1 g;
丙酮: 1 mL。

A.8.2 制法

将吲哚乙酸酯溶于丙酮中, 吸取 25 μL ~50 μL 溶液于空白纸片上(直径为 0.6 cm~1.2 cm)。室温干燥, 用带有硅胶塞的棕色试管/瓶于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。



SN/T 3724-2013

版权专有 侵权必究

*

书号: 155066 · 2-26880

定价: 16.00 元