



(21)申请号 201910049282.7

(22)申请日 2019.01.18

(71)申请人 河南省商业科学研究所有限责任公
司

地址 450002 河南省郑州市金水区文化路
87号

(72)发明人 朱海华 王法云 李永利 刘红伟
王永 王晓瑞 平洋 王慧 谭静
任钊 郭青照

(74)专利代理机构 郑州立格知识产权代理有限
公司 41126

代理人 田磊

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

(54)发明名称

一种快速检测乳品中单核细胞增生李斯特
氏菌的方法

(57)摘要

一种快速检测乳品中单核细胞增生李斯特
氏菌的方法,包括以下步骤:1)样品前处理和目
标菌的富集;2)乳品样品中单增李斯特菌的
Elisa快速检测;3)根据Elisa快速检测值,得到
乳品样品检测值。与国标方法相比提高了检测的
灵敏度,提高了乳品样品中单增李斯特菌的检出
率和检出限,大大降低了乳品的食品安全风险;
缩短了检测时间,国标方法每检测一个样品总耗
时4-7天,本发明的方法每检测一个样品总耗时
60min,提高了工作效率;本发明操作简单,省略
了恒温培养时间和生化鉴定等繁琐的操作步骤,
大大节约了人力和物力。

1. 一种快速检测乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 样品前处理和目标菌的富集

1.1) 无菌条件下取乳品样品10mL,加入90mL李氏增菌肉汤LB₃和0.02mol/L PBS缓冲液的混合液均质1min;李氏增菌肉汤LB₃与PBS缓冲液的体积比为1:1;李氏增菌肉汤LB₃通过在每200mL LB液中添加1支萘啶酮酸(5.0mg/支)和1支吡啶黄素(5.0mg/支)得到,其中LB液的组成为:胰胨 5.0 g/L,多价胨 5.0g/L,酵母膏5.0g/L,氯化钠20.0 g/L,磷酸二氢钾 1.4 g/L,磷酸氢二钠12.0 g/L,七叶苷1.0 g/L, LB液的pH值 7.2 ± 0.2 (25℃);

1.2) 对均质后的样品溶液离心;

1.3) 上清液采用Φ50mm 0.45μm聚醚PES微孔滤膜抽滤,将微生物富集于微孔滤膜上;

1.4) 将步骤1.3)中的微孔滤膜用洗脱液洗脱得到样品目标菌浓缩液;所述洗脱液为由7mL 0.02mol/L PBS和3mL李氏增菌肉汤LB₃混合制得;

1.5) 取单增李斯特菌免疫磁珠与样品目标菌浓缩液混合,使样品目标菌浓缩液中的单增李斯特菌与单增李斯特菌免疫磁珠结合;

1.6) 第一次静置磁力架上待磁珠充分被磁力聚集,弃上清,加入Hanks溶液混匀,第二次静置磁力架上待磁珠充分被吸附,弃上清,重复洗涤3次,再次加入Hanks溶液震荡后释放目标菌得到样品浓缩待测液;

2) 乳品样品中单增李斯特菌的Elisa快速检测

取500μg/mL标准溶液,分别配制成为0、5、10、15、30、60、90μg/mL的标准溶液,在OD₄₅₀处测其吸光值,根据标准溶液浓度与吸光值,得到标准曲线和标准曲线公式;再测样品浓缩待测液OD₄₅₀处的吸光度值,吸光值代入标准曲线公式,得到样品浓缩液浓度值;

3) 根据Elisa快速检测值,得到乳品样品检测值。

2. 如权利要求1所述的快速富集并检测乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法,其特征在于,步骤1.1)中,离心操作是在2℃低温条件下10000rpm/min离心5min。

3. 如权利要求1所述的快速富集并检测乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法,其特征在于,步骤1.4)中,洗脱液用量为5mL;洗脱时间为2min。

4. 如权利要求1所述的快速富集并检测乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法,其特征在于,步骤1.5)中,单增李斯特菌免疫磁珠与样品目标菌浓缩液的用量比为50μL:0.5mL,混合操作是在20℃、50rpm振荡吸附10min。

5. 如权利要求1所述的快速富集并检测乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法,其特征在于,步骤1.6)中,第一次静置5min,第二次静置8min,两次加入Hanks溶液的量与样品目标菌浓缩液的用量比均为1 mL:0.5mL。

一种快速检测乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法

技术领域

[0001] 本发明属于检测技术领域,具体涉及一种检测乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法。

背景技术

[0002] 食源性疾病(food-borne illness)是指通过摄食而进入人体的有毒有害物质等致病因子所造成的疾病,其中最常见的致病因子为食源性病原微生物。2001-2010年中国食源性疾病的暴发情况分析表明,微生物污染引发的食源性疾病占总体的56.39%。单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)简称单增李斯特菌,是细胞内寄生的革兰氏阳性杆菌,是一种人畜共患病的病原菌,在2℃的环境中仍可生长繁殖,是冷藏食品威胁人类健康的主要病原菌,极易污染肉、蛋、海产品、乳制品、蔬菜等食品。可通过眼及破损皮肤、粘膜进入体内而造成感染,感染后主要表现为败血症、脑膜炎和单核细胞增多,致死率高达20%-70%,孕妇感染后通过胎盘或产道感染胎儿或新生儿,导致流产、死胎、胎停、胎儿畸形等严重问题。乳品是人们喜欢的食用营养品,它营养丰富,是人体钙的最佳来源。根据《2013-2017年中国原奶行业投资策略分析》统计,当前我国虽已成为全球第三大原奶生产国。乳品因其营养丰富极容易受单增李斯特菌污染,从而影响消费者尤其是孕妇胎儿的安全和健康。

[0003] 目前单增李斯特菌的检测,主要依赖于传统的微生物学检测方法GB 4789.30-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验》,该标准规定的三种检验方法需要经过增菌、培养、鉴定等操作步骤,至少4-7天才能得出明确的诊断结果。操作和步骤非常繁琐、耗时长,而且只能检测样品中存活的单增李斯特菌,检出率较实际样品中的单增李斯特菌低,极易容易出现假阴性结果,难以满足现场、快速、准确的监管需求,危害广大消费者安全。因此,迫切需要改进乳品中单增李斯特菌的检测方法和手段。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种快速检测乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法,用于乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的富集和快速检测、筛查。该方法操作简便、耗时短、耗费试剂少、检测灵敏度高,检测准确率高,最低可以应用于含量10CFU/mL的目标菌检测,大大提高了乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的检出限。该方法较传统的单增李斯特菌检测方法假阴性大大降低。

[0005] 基于上述目的,本发明采取如下技术方案:

[0006] 一种快速检测乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法,包括以下步骤:

[0007] 1) 样品前处理和目标菌的富集

[0008] 1.1) 无菌条件下取乳品样品10mL,加入90mL李氏增菌肉汤LB₃和0.02mol/L PBS缓冲液的混合液均质1min;李氏增菌肉汤LB₃与PBS缓冲液的体积比为1:1;李氏增菌肉汤LB₃通过在每200mL LB液中添加1支萘啶酮酸(5.0mg/支)和1支吡啶黄素(5.0mg/支)得到,其中LB

液的组成为：胰胨5.0g/L，多价胨5.0g/L，酵母膏5.0g/L，氯化钠20.0g/L，磷酸二氢钾1.4g/L，磷酸氢二钠12.0g/L，七叶苷1.0g/L，LB液的pH值 7.2 ± 0.2 (25℃)；

[0009] 1.2) 对均质后的样品溶液离心；

[0010] 1.3) 上清液采用 $\Phi 50\text{mm}$ 0.45 μm 聚醚PES微孔滤膜抽滤，将微生物富集于微孔滤膜上；

[0011] 1.4) 将步骤1.3) 中的微孔滤膜用洗脱液洗脱得到样品目标菌浓缩液；所述洗脱液为由7mL 0.02mol/L PBS和3mL李氏增菌肉汤LB₃混合制得；

[0012] 1.5) 取单增李斯特菌免疫磁珠与样品目标菌浓缩液混合，使样品目标菌浓缩液中的单增李斯特菌与单增李斯特菌免疫磁珠结合；

[0013] 1.6) 第一次静置磁力架上待磁珠充分被磁力聚集，弃上清，加入Hanks溶液混匀，第二次静置磁力架上待磁珠充分被吸附，弃上清，重复洗涤3次，再次加入Hanks溶液震荡后释放目标菌得到样品浓缩待测液；

[0014] 2) 乳品样品中单增李斯特菌的Elisa快速检测

[0015] 取500 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液，分别配制成为0、5、10、15、30、60、90 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液，在OD₄₅₀处测其吸光值，根据标准溶液浓度与吸光值，得到标准曲线和标准曲线公式；再测样品浓缩待测液OD₄₅₀处的吸光度值，吸光值代入标准曲线公式，得到样品浓缩液浓度值；

[0016] 3) 根据Elisa快速检测值，得到乳品样品检测值。

[0017] 步骤1.1) 中，离心操作是在2℃低温条件下10000rpm/min离心5min。

[0018] 步骤1.4) 中，洗脱液用量为5mL；洗脱时间为2min。

[0019] 步骤1.5) 中，单增李斯特菌免疫磁珠与样品目标菌浓缩液的用量比为50 μL ：0.5mL，混合操作是在20℃、50rpm振荡吸附10min。

[0020] 步骤1.6) 中，第一次静置5min，第二次静置8min，两次加入Hanks溶液的量与样品目标菌浓缩液的用量比均为1mL：0.5mL。

[0021] 本发明中，

[0022] 1) 本发明采用1:1的LB₃ (自制)+0.02mol/L PBS缓冲液处理乳品样品，能够温和去除乳品中的蛋白质和脂肪等大分子位置，而不杀灭样品中的单增李斯特菌等细菌；

[0023] 2) 本发明采用低温离心和0.45 μm 微孔滤膜抽滤相结合，富集样品中的单增李斯特菌等细菌到微孔滤膜上，达到富集细菌的目的，很好的解决了低水平的病原微生物的检测问题，增大了单增李斯特菌的检出率；

[0024] 3) 本发明采用0.45 μm 的聚醚砜 (PES) 微孔滤膜，0.45 μm 的孔径更有利于截留目标微生物，材质为聚醚砜 (PES) 的微孔滤膜较其他材质的微孔滤膜过滤和洗涤操作时更不易破损；

[0025] 4) 本发明采用特制的 $\Phi 55\text{mm}$ 50mL具塞平底玻璃杯，洗脱微孔滤膜中的目标菌。玻璃杯直径 $\Phi 55\text{mm}$ 略大于滤膜直径 $\Phi 50\text{mm}$ ，即方便取放滤膜，又能有效集中洗脱溶液；采用平底玻璃杯能够使微孔滤膜最大面积接触洗脱液，有助于提高目标菌的洗脱率；玻璃杯采用具塞密封，在震荡洗脱目标菌时，有效避免了洗脱液和目标菌的飞溅逸出，既能保证数据的有效性，又能保障实验操作人员的安全；

[0026] 5) 本发明采用含7mL 0.02mol/L PBS+3mL李氏增菌肉汤LB₃作为洗脱缓冲液，其成分可有效的选择性保护单增李斯特菌，有利于单增李斯特菌被洗脱后在少量溶液的环境中

保存和生长;

[0027] 6) 本发明采用Hanks平衡盐溶液作为免疫磁珠洗涤液,较传统的洗涤液PBS溶液能够更好的保护目标菌菌体和细胞,Hanks平衡盐溶液主要成分为:KCl、KH₂PO₄、NaCl、NaHCO₃、Na₂HPO₄、葡萄糖、Mg²⁺、Ca²⁺等;

[0028] 7) 本发明采用单增李斯特菌免疫磁珠,特异性的吸附菌悬液中的单增李斯特菌。免疫磁性分离作为一种新的免疫技术,具有较快的富集速度、良好的特异性和较高的灵敏度,可以很好的解决低水平的病原微生物的检测问题,用于检测样品中存在的目标微生物,检测快速灵敏,是一种前景广阔的检测技术手段;

[0029] 8) 本发明采用Elisa检测富集后的菌悬液,较传统的单增李斯特菌检测方法,更快,3~5min可出结果;

[0030] 9) 本发明检测鲜乳中单增李斯特菌的时间总共约为60min,较传统的单增李斯特菌检测方法的4-7d大大缩短。

[0031] 本发明检测原理:首先对乳品样品进行前处理,去除蛋白、脂肪等大分子干扰物,将低温离心和微孔滤膜过滤相结合,将样品中的目标菌富集于微孔滤膜上,提高了乳品中单增李斯特菌的检出限,解决了乳品中低水平的单增李斯特菌的检测问题。使用有利于单增李斯特菌生长和保护的洗脱液洗脱,利用单增李斯特菌免疫磁珠与菌悬液中单增李斯特菌的特异性结合,达到富集乳品中单增李斯特菌的目的,增加单增李斯特菌检出率。免疫磁性分离作为一种新的免疫技术,具有较快的富集速度和较高的灵敏度,可以很好的解决低水平的病原微生物的检测问题,用于检测样品中存在的目标菌,检测快速灵敏,是一种前景广阔的检测技术手段。本发明上述研究成果目前国内并无相类似应用研究,具有强大的市场竞争力;

[0032] 与现有技术相比,本发明的优势在于:

[0033] 1) 与国标方法相比提高了检测的灵敏度,提高了乳品样品中单增李斯特菌的检出率和检出限,大大降低了乳品的食品安全风险;

[0034] 2) 本发明缩短了检测时间,国标方法每检测一个样品总耗时4-7天,本发明的方法每检测一个样品总耗时60min,提高了工作效率;

[0035] 3) 本发明操作简单,省略了恒温培养时间和生化鉴定等繁琐的操作步骤,大大节约了人力和物力。

具体实施方式

[0036] 下面通过实施例对本发明做进一步说明。

[0037] 实施例1

[0038] 一种快速富集并检测乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0039] 1) 样品前处理和目标菌的富集

[0040] 1.1) 无菌条件下取乳品样品10mL,加入90mL李氏增菌肉汤LB₃和0.02mol/L PBS缓冲液的混合液均质1min;李氏增菌肉汤LB₃与PBS缓冲液的体积比为1:1;李氏增菌肉汤LB₃通过在每200mL LB液中添加1支萘啶酮酸(5.0mg/支)和1支吡啶黄素(5.0mg/支)得到,其中LB液的组成为:胰胨5.0g/L,多价胨5.0g/L,酵母膏5.0g/L,氯化钠20.0g/L,磷酸二氢钾1.4g/

L,磷酸氢二钠12.0g/L,七叶苷1.0g/L,LB液的pH值 7.2 ± 0.2 (25℃)

[0041] 1.2) 均质后的样品溶液,2℃低温条件下10000rpm/min离心5min,去除脂肪、蛋白等大分子物质,增加流动性,均匀分散检样,收集离心后上清液备用;

[0042] 1.3) 上清液用富集浓缩装置,Φ50mm 0.45μm聚醚PES微孔滤膜抽滤1.2) 样液,将微生物富集于微孔滤膜上;

[0043] 1.4) 将1.3) 中的微孔滤膜放置于Φ55mm 50mL具塞平底玻璃杯中,用5mL洗脱液(洗脱液为7mL 0.02mol/L PBS+3mL李氏增菌肉汤LB₃混合得到) 冲洗浸泡,于微型振荡器震荡1min,使微孔中目标菌释放到溶液中,制备成目标菌浓缩液;此操作要在2min内完成;

[0044] 1.5) 取50μL单增李斯特菌免疫磁珠与0.5mL菌悬液均匀混合,20℃50rpm振荡吸附10min,使样品目标菌浓缩液中的单增李斯特菌与单增李斯特菌免疫磁珠结合;

[0045] 1.6) 静置磁力架上5min,待磁珠充分被磁力聚集,弃上清,加入1mL Hanks溶液,充分混匀,静置磁力架上8min,待磁珠充分被吸附,弃上清,重复洗涤3次,加入1mL Hanks溶液震荡后释放目标菌得到样品浓缩待测液;

[0046] 2) 乳品样品中单增李斯特菌的Elisa快速检测

[0047] 取500μg/mL标准溶液,分别配制成为0、5、10、15、30、60、90μg/mL的标准溶液,在OD₄₅₀处测其吸光值,根据标准溶液浓度与吸光值,得到标准曲线和标准曲线公式;再测样品浓缩待测液OD₄₅₀处的吸光度值,吸光值代入标准曲线公式,得到样品浓缩液浓度值;

[0048] 3) 根据Elisa快速检测值,得到乳品样品检测值。

[0049] 对比试验

[0050] 1、乳品最佳缓冲液的确定

[0051] 取10mL乳品单增李斯特菌阳性样品,分别加入装有90mL缓冲液的均质袋中,缓冲液分别选择:ddH₂O、磷酸盐缓冲液(0.02mol/L PBS,pH7.4)、碳酸盐缓冲液、李氏增菌肉汤基础LB、LB₁、LB₂、李氏增菌肉汤LB₃+0.02mol/L PBS(体积比1:1)。按照GB 4789.30-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验》第一法,对上述菌悬液进行增菌、平板分离、生化鉴定等操作,得出试验结果。确定最佳的乳品前处理缓冲液;其中LB液基础的组成为:胰胨5.0g/L,多价胨5.0g/L,酵母膏5.0g/L,氯化钠20.0g/L,磷酸二氢钾1.4g/L,磷酸氢二钠12.0g/L,七叶苷1.0g/L,LB液的pH值 7.2 ± 0.2 (25℃)。

[0052] 由检测过程数据可以看出,虽然李氏增菌肉汤基础LB、LB₁、LB₂和0.02mol/L PBS均能有效的保护样品中的单增李斯特菌,但是李氏增菌肉汤不能更好的去除乳品中的蛋白质和脂肪,因此,选择体积比1:1的李氏增菌肉汤LB₃+0.02mol/L PBS作为前处理缓冲液最有利于单增李斯特菌的保护。

[0053] 表1.缓冲液的选择

[0054]

缓冲液种类	李斯特氏菌显色平板分离特征菌落数	PALCAM 平板分离特征菌落数	总阳性菌数
ddH ₂ O	0	0	0
0.02mol/L PBS	8	6	12
碳酸盐缓冲液	2	2	1
LB	10	7	16
LB ₁	13	10	23
LB ₂	11	9	20
LB ₃ +0.02mol/L PBS (1:1)	16	18	33

[0055] 2、微孔滤膜材质和孔径的选择

[0056] 本发明进行目标物质富集时,需要采用抽真空过滤,存在一定的压力,因此对微孔滤膜的材质强度和韧性有一定的要求。试验中对比了混合纤维素(CN-CA)滤膜、聚酰胺类滤膜尼龙(PA-66)、聚醚砜(PES)滤膜、聚丙烯(PP)纤维滤膜,经过滤器负压抽滤对比,聚醚砜(PES)滤膜破损率最低。

[0057] 试验选取孔径0.1 μ m、0.22 μ m、0.45 μ m、0.8 μ m、1.2 μ m的微孔滤膜进行过滤和富集效果验证。用10mL含单增李斯特菌的乳品阳性样品,加入装有90mL缓冲液的均质袋中,用不同孔径的微孔滤膜过滤富集目标菌,将抽滤后的微孔滤膜洗涤,洗涤后的溶液取1mL于李斯特氏菌显色平板,36℃分离培养48h,对李斯特氏菌计数。

[0058] 表2.微孔滤膜孔径的选择

[0059]

孔径直径(μ m)	李斯特氏菌显色平板 分离特征菌落数
0.1	—
0.22	22
0.45	89
0.8	53
1.2	26

[0060] 实验发现,直径0.1 μ m的微孔滤膜过滤时因孔径太小,过滤速度特别缓慢,10s后已经无法继续过滤。直径0.22 μ m的微孔滤膜可以过滤大部分的样品处理液,但是30s后过滤速度下降,5min后仍不能过滤完所有样品溶液。0.45 μ m、0.8 μ m、1.2 μ m的微孔滤膜均可满足过滤速度要求。但是因为0.8 μ m和1.2 μ m的微孔滤膜目标菌的富集率偏低,原因可能是单核细胞增生李斯特氏菌的大小为0.5 μ m-2.0 μ m,孔径大的微孔滤膜目标菌通过滤膜微孔过滤至抽滤瓶中,无法富集所有的目标菌。因此,综合考虑过滤速度、富集效率等因素,采用直径

0.45μm的微孔滤膜富集单核细胞增生李斯特氏菌最佳。

[0061] 3、低温离心+微孔抽滤富集法与国标方法检出率的对比

[0062] 无菌取乳品阳性样品10mL,加入盛有90mL 1:1的李氏增菌肉汤LB₃+0.02mol/L PBS无菌均质袋中,用均质器均质1min。均质液2℃10000rpm/min低温离心5min,采用富集浓缩装置,0.45μm微孔滤膜抽滤样液,将微生物富集于微孔滤膜上。将微孔滤膜置于Φ55mm 50mL具塞平底玻璃杯中,用5mL洗脱液(含7mL 0.02mol/L PBS+3mL李氏增菌肉汤LB₃冲洗浸泡,于微型振荡器震荡1min,制备成目标菌样品浓缩液。分别取1mL上述样品浓缩液于李斯特氏菌显色平板和PALCAM平板,36℃培养48h,做单增李斯特菌阳性菌计数。

[0063] 表3. 低温离心+微孔抽滤富集法富集效果试验

[0064]	检测方法	李斯特氏菌显色平板 分离特征菌落数	PALCAM 平板分离特征菌落数	总阳性菌数
	低温离心+微孔抽滤富集法	20	17	37
[0065]	国标方法	1	0	1

[0066] 4、洗脱液的确定

[0067] 选择不同的洗脱液对比洗脱效果,用不同种类的洗脱液洗脱富集后的微孔滤膜,得到样品菌悬液。分别取1mL上述样品菌悬液于李斯特氏菌显色平板和PALCAM平板,36℃培养48h,做单增李斯特菌阳性菌计数。

[0068] 考虑到添加了萘啶酮酸和吡啶黄素后的李氏增菌肉汤有利于单增李斯特菌的分离和保护,因此自制了李氏增菌肉汤LB₃并对其洗脱效果进行了研究。

[0069] 由试验数据可看出,仅使用自制李氏增菌肉汤LB₃效果并不理想,原因可能是自制李氏增菌肉汤LB₃虽然有利于单增李斯特菌的保护和培养,但对于滤膜中的单增李斯特菌洗脱效果并不佳。而选用7mL 0.02mol/L PBS和3mL LB₃的混合溶液,即可以达到洗脱的目的又可以达到保护单增李斯特菌的目的。

[0070] 表4. 洗脱液效果试验

[0071]	洗脱液	李斯特氏菌显色平板 分离特征菌落数	PALCAM 平板分离特征菌落数	总阳性菌数
	10mL PBS	4	7	11
	10mL LB	9	4	13
	7mL PBS+3mL LB ₃	27	22	49

[0072] 5、单增李斯特菌免疫磁珠分离单增李斯特菌敏感性试验

[0073] 将单增李斯特菌菌液,按一定梯度进行10倍的倍比稀释,分别取1mL对每一浓度梯度进行平板计数。另取单增李斯特菌免疫磁珠 (5mg/mL) 50 μ L,分别加入到0.5mL的单增李斯特菌稀释液中,充分混匀后20℃50rpm振荡吸附10min,静置磁力架上5min,待磁珠充分被磁力聚集,弃上清,加入1mL Hanks洗涤液,充分混匀,静置磁力架上8min,待磁珠充分被吸附,弃上清,重复洗涤3次,加入1mL Hanks溶液震荡后制备为样品菌悬液,吸取1mL菌悬液涂于李斯特氏菌显色平板,36℃培养48h观察菌落并计数,详细数据见下表。

[0074] 表5敏感性试验

[0075]	稀释度	直接平板计数	免疫磁珠富集细菌数
	10^{-3}	>300	>300
	10^{-4}	112	>300
	10^{-5}	21	>300
[0076]	10^{-6}	1	65
	10^{-7}	—	9
	10^{-8}	—	2

[0077] 6、免疫磁珠分离单增李斯特菌的特异性试验

[0078] 选择目前常见的食源性致病菌和其他类型的李斯特菌作为干扰菌,对分离效果进行特异性试验,验证分离的有效性。

[0079] 将50 μ L免疫磁珠,分别加入到0.5mL单增李斯特菌、格氏李斯特氏菌、斯氏李斯特氏菌、威氏李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、阪崎肠杆菌、副溶血性弧菌、乙型溶血性链球菌、福氏志贺氏菌、大肠埃希氏菌、肠炎单增李斯特菌、普通变形杆菌、产气肠杆菌、铜绿假单胞菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌中。充分混匀后20℃、50rpm振荡吸附10min,静置磁力架上5min,待磁珠充分被磁力聚集,弃上清,加入1mL Hanks溶液,充分混匀,静置磁力架上8min,待磁珠充分被吸附,弃上清,重复洗涤3次,加入1mL Hanks溶液震荡后制备为样品菌悬液,吸取1mL涂于营养琼脂平板,同时直接吸取各菌培养液1mL涂于营养琼脂平板,36℃培养48h观察菌落并计数。

[0080] 经过检测培养、生化鉴定后发现单增李斯特菌平板菌落较多,与直接涂布较为接近,其它菌经磁珠富集分离后涂布平板相对直接涂布则较少或未生长,说明单增李斯特菌免疫磁珠的吸附富集单增李斯特菌特异性良好。

[0081] 表6特异性试验

[0082]

菌液类型	平板计数菌落
单增李斯特菌	175
格氏李斯特氏菌	——
斯氏李斯特氏菌	——
威氏李斯特氏菌	1
伊氏李斯特氏菌	1

[0083]

英诺克李斯特氏菌	——
金黄色葡萄球菌	——
阪崎肠杆菌	——
副溶血性弧菌	——
乙型溶血性链球菌	——
福氏志贺氏菌	——
大肠埃希氏菌	——
肠炎单增李斯特菌	——
普通变形杆菌	——
产气肠杆菌	——
铜绿假单胞菌	——
小肠结肠炎耶尔森氏菌	——

[0084] 效果试验

[0085] 将浓度为 1×10^9 CFU/mL的单增李斯特菌菌液进行10倍梯度稀释,分别取1mL稀释液加入到9mL的乳品样品中,制备成乳品单增李斯特菌污染阳性样品。按照实施例1所述的方法检测,同时采用《GB 4789.30-2016》第二法进行检测对比,检测乳品阳性样品和乳品样品,对比检测结果如表7所示。

[0086] 表7本发明的检测方法 with 国标方法的对比检测结果

[0087]

	倍比稀 释度	利用实施例 2 的方法 检测 (cfu/mL)	国标方法检测 (cfu/mL)
阳性样品	10^{-5}	>300	22
	10^{-6}	257	15
	10^{-7}	39	0
	10^{-8}	11	0
	10^{-9}	1	0
乳品样品 1		0	0
乳品样品 2		0	0

[0088]

乳品样品 3		0	0
乳品样品 4		0	0
乳品样品 5		0	0
乳品样品 6		0	0

[0089] 由表7数据可知：(1) 本发明与国标方法相比提高了检测的灵敏度，提高了乳品样品中单增李斯特菌的检出率和检出限，大大降低了乳品的食品安全风险。(2) 本发明缩短了检测时间，国标方法每检测一个样品总耗时4-7天，本发明的方法每检测一个样品总耗时60min，提高了工作效率。(3) 本发明操作简单，省略了恒温培养时间和生化鉴定等繁琐的操作步骤，大大节约了人力和物力。

专利名称(译)	一种快速检测乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法		
公开(公告)号	CN109557308A	公开(公告)日	2019-04-02
申请号	CN201910049282.7	申请日	2019-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	河南省商业科学研究所有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	河南省商业科学研究所有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	河南省商业科学研究所有限责任公司		
[标]发明人	朱海华 王法云 李永利 刘红伟 王永 王晓瑞 平洋 王慧 谭静 任钊 郭青照		
发明人	朱海华 王法云 李永利 刘红伟 王永 王晓瑞 平洋 王慧 谭静 任钊 郭青照		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/531		
代理人(译)	田磊		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种快速检测乳品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法，包括以下步骤：1) 样品前处理和目标菌的富集；2) 乳品样品中单增李斯特菌的Elisa快速检测；3) 根据Elisa快速检测值，得到乳品样品检测值。与国标方法相比提高了检测的灵敏度，提高了乳品样品中单增李斯特菌的检出率和检出限，大大降低了乳品的食品安全风险；缩短了检测时间，国标方法每检测一个样品总耗时4-7天，本发明的方法每检测一个样品总耗时60min，提高了工作效率；本发明操作简单，省略了恒温培养时间和生化鉴定等繁琐的操作步骤，大大节约了人力和物力。

