

肉、禽食品中单核细胞增生性 李斯特氏菌的分离和鉴定方法

USDA—FSIS方法

DENNIS MCCLALN WEI HWA LEE

1989年5月24日修订

美国农业部(USDA)食品卫生监督机构(FSIS)

本方法适用于已具备分离和鉴定单核细胞增生性李斯特氏菌知识和经验的人。

培养基和试剂

UVM肉汤: 初步增菌用。现此培养基已有成品出售(BBL; DIFCO)

- 尿脲 5g 胰脲 5g
- 牛肉膏粉 5g 酵母浸膏 5g
- NaCl 20g KH₂PO₄ 1.35g
- Na₂HPO₄ 12g 七叶苷 1g
- 耐丁酸(溶于0.1MNaOH中,浓度为2%)

1ml

- 吡啶黄 12mg
- 蒸馏水 1000ml

在121℃消毒15min。注意温度不要过高。从高压锅中取出后立即冷却。如果培养基变黑或变暗,就说明消毒时温度过高,将这种培养基丢弃。培养基应保存在冰箱里。

FRASER肉汤: 第二步增菌用。

- 尿脲5g 胰脲5g 牛肉膏粉5g
- 酵母浸膏5g NaCl20g KH₂PO₄1.35g
- Na₂HPO₄12g 七叶苷1g 氯化锂 3g
- 耐丁酸(以0.1MNaOH做溶剂,浓度为2%)

1ml

- 蒸馏水 1000ml

将培养基完全混匀后,分装到20×150mm的试管中,每管装10ml肉汤。

121℃, 高压15min。不要温度过高,从

高压锅中取出立即冷却,贮存在冰箱中。使用前每管中再加入0.1ml, 2.5mg/ml过滤消毒的吡啶黄(Sigma)和0.1ml过滤消毒的5%浓度的柠檬酸铁铵(Sigma)贮备液。

改良的OXFORD培养基(MOX)

MOX基础培养基:

哥伦比亚血琼脂基础 39~44g/l(根据批号而定)

琼脂: 2g/l 七叶苷1g/l

柠檬酸铁铵0.5g/l 氯化锂(Sigma L0505)15g/l 1%粘菌素溶液1ml

蒸馏水 1000ml

将上述成份在磁力混合器上完全混匀,调正PH为7.2。

121℃, 高压10min, 再摇匀;在水浴中冷却至46℃, 然后加入2ml1%的过滤消毒的甲氧噻吩头孢菌素(Moxalactam)溶液, 混匀后倒平板, 每个平板为12ml。

注意: 在制作本培养基时, 不要使用Oxford的任何补充剂或其它补充剂。

1%粘菌素溶液的制备:

粘菌素, 甲基磺酸盐(Sigma C1511)1g
0.1M的磷酸钾缓冲液 PH6.0 100ml

粘菌素溶液不需要消毒, 以3~5ml为一份冷冻保存在-20℃以下。

1%甲氧噻吩头孢菌素溶液

甲氧噻吩头孢菌素钠盐或氨盐(Sigma

M1900)1g

0.1M磷酸钾缓冲液 PH6.0 100ml

溶解后, 过滤消毒, 以2ml为一份冷冻保存在-20℃以下。

表层加盖马血的培养基(HL)

底层:

哥伦比亚血琼脂基础1000ml(按生产要求制备)。

121℃, 高压15min。然后在直径100mm的平板中倒入10ml; 待凝固后仍温热时, 再在上面盖上一层如下所描述的血琼脂。

顶层:

按4%的比例将马血加到溶化的哥伦比亚血琼脂基础中, 加入时温度为46℃, 小心地搅拌混匀; 然后均匀地倾倒5~6ml到上面的已倒好底层的平板上。将平板放在冰箱中保存。如果有任何变色现象, 这个平板就不能使用了。薄的培养基是为了便于观察表面生长的单核细胞增生性李斯特氏菌菌落的β-溶血现象。

CAMP试验用琼脂培养基

含有5%羊血的胰酶消化大豆琼脂为CAMP试验用培养基。在每个直径为100mm的平板中倾入8ml培养基。平板保存在冰箱里, 变色时就丢弃。

碳水化合物发酵试验用肉汤

基础:

蛋白胨 10g 牛肉膏粉 1g NaCl 5g

蒸馏水900ml 酚红(360mg/20ml 0.1N

NaOH)1ml

校正PH为7.4。于121℃高压15min。当基础液冷却后, 在每100ml基础液中分别加入下列含量的糖:

木糖: 5% 甘露醇10% 鼠李糖5%

无菌分装入13×100mm的带盖的试管中, 每管5ml。

其他培养基:

下列这些培养基都有干燥的成品销售,

只需按照使用说明制备即可。

Bacto动力试验培养基(Difco0105-01-3):

注意: 所有类似的动力培养基都不能产生典型的伞状动力结果。在13×100mm的试管中分装4ml。

脑心浸液肉汤(BHI)

脑心浸液琼脂斜面

七叶苷胆盐琼脂斜面

MR-VP培养基

氧化/发酵(O/F)培养基

硝酸盐肉汤

氧化酶试验试剂(1%双氢氯四甲基对苯二胺)

上面所谈的培养基都是对热敏感的, 因此在制备的时候要特别注意时间和温度。存放时间过长时, 未用的培养基要丢弃。

检验程序

采样量

根据监督机构不同的监测目的或者监测实施计划采集样品。按照下列采样要求采集25g样品。如果有中毒或中毒隐患存在时, 应采集更大量的样品进行研究分析。

采样:

在修订的样品监测计划指导下, 如果样品的零售包装量少于或等于1磅, 监督员应分别从同一批食品的食品袋中取样。如果这个食品的包装量大于1磅或者是大包装, 监督员应无菌地采集每一个具有代表性部位的样品。实验室的检验程序也因这两种包装规格而不同。

1. 少于或者等于1磅包装的食品

a. 每一批中食品监督员应采集5份零售样品。

b. 在实验室里消毒包装表面, 从每一个包装内取出5g有代表性的样品, 放入均质器中, 使每一样品量是25g。

2. 大包装, 每份食品的包装量大于1磅, 或者在进入实验室分析前, 样品不是处于零售

状态。

a. 监督员应从一批食品中采集有代表性的样品部位(例如:烤牛肉的中心部位的切片)。

b. 在实验室中将具有代表性的25g样品放入均质器,以使每一批样品的组成都是25g。
增菌和分离

将样品25g与225ml的增菌液(UVM)混合后,将混合物倾入消毒容器中于30℃培养20~24hr。

第二步增菌:

将上述培养物0.1ml转种到Fraser肉汤在35℃培养26±2hr。将每一个管子与未接种的空白管比较,产生黑色或变暗的管中培养物再转种分离培养基;这是由于七叶苷水解而产生的现象。如果培养管仍然保持淡黄色,就可报告未检出单核细胞增生性李斯特氏菌。

取一消毒棉签浸入Fraser肉汤阳性管中用此棉签涂抹一半MOX平板,然后再用接种环以垂直的方向在MOX的另一半涂开(见图1所示分离方式)。将此平板在35℃培养24~48hr。

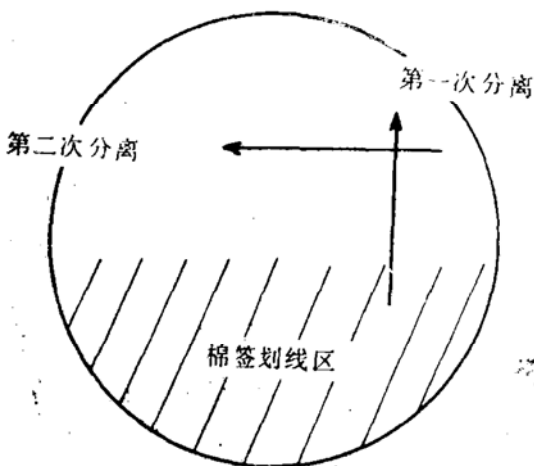


图1 在MOX平板上的分离方式

注意:在检测可疑已造成中毒危害的样品时,接种MOX平板时不考虑Fraser肉汤

的颜色变化;只将Fraser肉汤再培养24hr,然后二次接种MOX平板,于35℃,经24hr和48hr后观察结果。

检查MOX平板的分离培养结果

MOX琼脂具有很强的选择性,在这种培养基上能产生大小和组成都有特点的单核细胞增生性李斯特氏菌,由于七叶苷的水解而导致菌落周围产生一个黑色环带;典型的菌落在培养了24hr后就可以观察到,但是应持续观察到48hr,以检出生长缓慢的菌株。

挑选可疑菌落进一步分离。

用接种针挑选5个可疑菌落,然后接种HL培养基;平板应是头一天制备的。由于这种平板很薄,很容易划破,因此应该用纯铂针小心地分离,然后在35℃培养过夜。

检查HL平板的分离培养结果

用一个荧光灯来检查平板。将平板放在荧光灯的右方,观察平板的底部(图2)。选择直径为1~2mm,周围有一个窄窄的溶血环的透明菌落。血平板的底部是完全透明的。

薄的培养基和荧光灯是用来检查确证表面生长的单核细胞增生性李斯特氏菌具有β-溶血性。

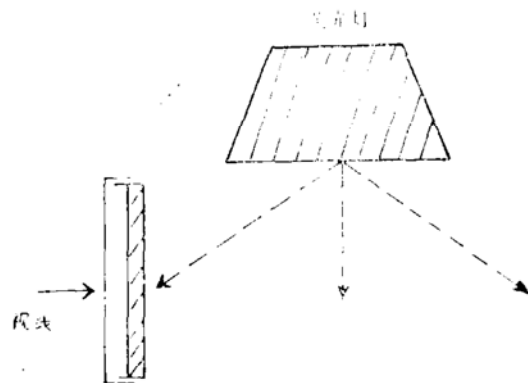


图2

筛选试验

将分离得到的可疑菌落用一接种针转种到BHI肉汤,穿刺接种Bacto动力试验培养基。将上述两个培养基都在20~25℃培养过

夜，检查BHI肉汤中形成的丘峰或由于活泼的动力作用而形成的悬垂状生长。同时做革兰氏染色检查。注意：只有当菌株是具有β-

溶血性的，G⁺，具有活泼的动力，并且是一个纯菌株时，才需做进一步的鉴定试验。流程图图3和表1可以帮助完成初筛试验。

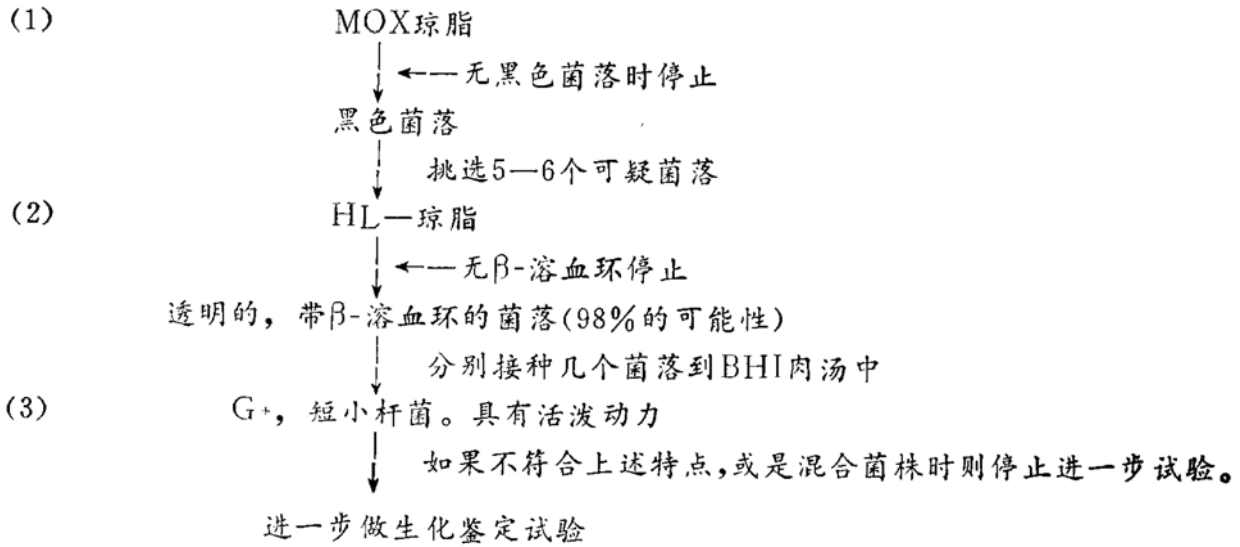


图 3 FSIS的鉴定和分离单核细胞增生性李斯特氏菌的程序

表 1 李斯特氏菌的初筛反应

菌 种	反 应				
	HL琼脂		动力(25℃)		G
	菌落	溶血性	琼脂	肉汤	
单核细胞增生性李斯特氏菌	透明	β	伞状	活泼	G ⁺
Seeligeri 李斯特氏菌	透明	β	伞状	活泼	G ⁺
Ivanovii 李斯特氏菌	透明	β	伞状	活泼	G ⁺
Innocca 李斯特氏菌	透明	—	伞状	活泼	G ⁺
Welshimexi 李斯特氏菌	透明	—	伞状	活泼	G ⁺



图4 伞状动力

鉴定和确证试验

鉴定试验和确证试验用的培养基可以从BHI肉汤转种；并准备一个BHI琼脂斜面，以用来做过氧化氢酶和氧化酶试验。

同时还要接种胆盐七叶苷琼脂，MR-VP培养基，O/F培养基，硝酸盐肉汤、鼠李糖、木糖和甘露醇发酵管。

将动力培养基培养2天或多于2天的时间观察伞状的生长(图4)，这是典型的单核细胞增生性李斯特氏菌的特点。如果没有出现这种结果，放弃这个菌株。

改良的CAMP试验

在试验用培养基上接种一条在BHI肉汤

中新鲜培养的金黄色葡萄球菌(ATCC25923)和马红球菌[Rhodococcus equi (FDA)]。将疑为李斯特氏菌的培养液与之垂直划线(图5)。将这个平板在35℃培养24~48hr。阳性反应的结果是靠近金黄色葡萄球菌或马红球菌生长的地方有一个窄窄的溶血带。单核细胞增生性李斯特氏菌和 Seeligeri 李斯特氏菌对金黄色葡萄球菌是阳性，而对马红球菌是阴性；Ivanovii李斯特氏菌则对两个菌都是阳性结果。

单核细胞增生性李斯特氏菌的基本鉴别特点