

中华人民共和国国家标准

GB/T 4789.30—2008
代替 GB/T 4789.30—2003

食品卫生微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验

Microbiological examination of food hygiene—
Examination of *Listeria monocytogenes*

2008-11-21 发布

2009-03-01 实施



中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的第一法修改采用美国 FDA《细菌性检验手册》(Bacteriological analytical manual, Chapter 10, 2002);第二法等同采用国际分析家学会的《单核细胞增生李斯特氏菌检验方法》(AOAC-RI Performance tested methods VIDAS *Listeria monocytogenes* Test, 999. 06);第三法等同采用国际分析家学会的《单核细胞增生李斯特氏菌检验方法》(AOAC International Official Method 2003. 12, BAX *Listeria monocytogenes*)。

本标准的第一法与美国 FDA/BAM 方法相比主要区别如下:

- 增菌培养基以 LB 肉汤替代了 BLEB 肉汤;
- 选择性分离培养基以 PALCAM 代替了 OXA,增加了 CHROMagar *Listeria* 显色培养基;
- 增加了初筛步骤;
- 培养温度以 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 代替 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

本标准代替 GB/T 4789.30—2003《食品卫生微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.30—2003 相比主要修改如下:

- 删除了规范性引用文件。
- 修改了第一法。包括选择性分离培养基以 PALCAM 代替了 MMA,增加了 CHROMagar *Listeria* 显色培养基;增加了初筛步骤;删除了尿素酶试验和硝酸盐还原试验。
- 增加了第二法,全自动酶联荧光免疫分析仪筛选法。
- 增加了第三法,全自动病原菌检测系统筛选法。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准由中华人民共和国卫生部负责解释。

本标准负责起草单位:中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准参加起草单位:福建省疾病预防控制中心、陕西省疾病预防控制中心、湖北省疾病预防控制中心。

本标准主要起草人:刘秀梅、杨洋、陈伟伟、郭云昌、田静、马国柱、马弋。

本标准所代替标准的历年版本发布情况为:

- GB/T 4789.30—1994、GB/T 4789.30—2003。

食品卫生微生物学检验

单核细胞增生李斯特氏菌检验

1 范围

本标准规定了食品中单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的检验方法。
本标准适用于食品和食源性样品中单核细胞增生李斯特氏菌的检验。

2 设备和材料

除微生物实验室常规无菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 2.1 冰箱:2℃~5℃。
- 2.2 恒温培养箱:30℃±1℃,36℃±1℃。
- 2.3 均质器。
- 2.4 显微镜:10×~100×。
- 2.5 电子天平:感量0.1g。
- 2.6 锥形瓶:100 mL、500 mL。
- 2.7 无菌吸管:1 mL(具0.01 mL刻度)、10 mL(具0.1 mL刻度)。
- 2.8 无菌平皿:直径90 mm。
- 2.9 无菌试管:16 mm×160 mm。
- 2.10 离心管:30 mm×100 mm。
- 2.11 无菌注射器:1 mL。
- 2.12 金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)。
- 2.13 马红球菌(*Rhodococcus equi*)。
- 2.14 小白鼠:16 g~18 g。
- 2.15 全自动微生物鉴定系统(VITEK)¹⁾。
- 2.16 全自动酶联荧光免疫分析仪(mini VIDAS或VIDAS)¹⁾。
- 2.17 全自动病原菌检测系统(BAX系统,包含BAX系统Q7)²⁾。

3 培养基和试剂

- 3.1 含0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE):见第A.1章。
- 3.2 含0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE):见第A.2章。
- 3.3 李氏增菌肉汤LB(LB₁,LB₂):见第A.3章。
- 3.4 1%盐酸吡啶黄(acriflavine HCl)溶液:见A.3.2.1。
- 3.5 1%萘啶酮酸钠盐(naladixic acid)溶液:见A.3.2.1。
- 3.6 PALCAM琼脂:见第A.4章。
- 3.7 革兰氏染色液:见第A.5章。

- 1) 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标准的使用者,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,则可使用这些等效的产品。
- 2) 由美国杜邦公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,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,则可使用这些等效的产品。

- 3.8 SIM 动力培养基:见第 A.6 章。
- 3.9 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红(MR)和 V-P 试验用]:见第 A.7 章。
- 3.10 5%~8%羊血琼脂:见第 A.8 章。
- 3.11 糖发酵管:见第 A.9 章。
- 3.12 过氧化氢酶试验:见第 A.10 章。
- 3.13 科玛嘉李斯特氏菌显色琼脂³⁾。
- 3.14 API *listeria* 10300 生化鉴定试剂盒或 VITEK-GPI 鉴定卡¹⁾。

第一法 常规培养方法

4 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌检验程序见图 1。

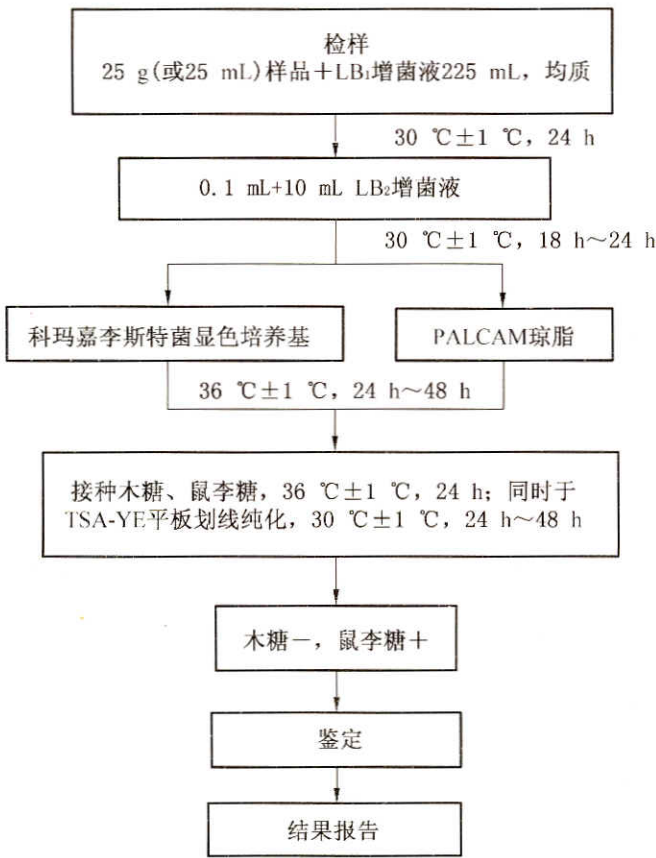


图 1 单核细胞增生李斯特氏菌检验程序

5 操作步骤

5.1 增菌

以无菌操作取样品 25 g(或 25 mL)加入到含有 225 mL LB₁ 增菌液的均质袋中,在拍击式均质器上连续均质 1 min~2 min;或放入盛有 225 mL LB₁ 增菌液的均质杯中,8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min。于 30 °C ± 1 °C 培养 24 h,移取 0.1 mL,转种于 10 mL LB₂ 增菌液内,于 30 °C ± 1 °C

3) 由法国科玛嘉公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,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,则可使用这些等效的产品。

培养 18 h~24 h。

5.2 分离

取 LB₂ 二次增菌液划线接种于 PALCAM 琼脂平板和科玛嘉李斯特氏菌显色琼脂平板上,于 36℃±1℃培养 24 h~48 h,观察各个平板上生长的菌落。典型菌落在科玛嘉李斯特氏菌显色琼脂平板上为小的圆形蓝色菌落,周围有白色晕圈;在 PALCAM 琼脂平板上为小的圆形灰绿色菌落,周围有棕黑色水解圈,有些菌落有黑色凹陷。

5.3 初筛

自选择性琼脂平板上分别挑取 5 个以上典型或可疑菌落,分别接种在木糖、鼠李糖发酵管,于 36℃±1℃培养 24 h;同时在 TSA-YE 平板上划线纯化,于 30℃±1℃培养 24 h~48 h。选择木糖阴性、鼠李糖阳性的纯培养物继续进行鉴定。

5.4 鉴定

5.4.1 染色镜检:李斯特氏菌为革兰氏阳性短杆菌,大小为(0.4 μm~0.5 μm)×(0.5 μm~2.0 μm);用生理盐水制成菌悬液,在油镜或相差显微镜下观察,该菌出现轻微旋转或翻滚样的运动。

5.4.2 动力试验:李斯特氏菌有动力,呈伞状生长或月牙状生长。

5.4.3 生化鉴定:挑取纯培养的单个可疑菌落,进行过氧化氢酶试验,过氧化氢酶阳性反应的菌落继续进行糖发酵试验和 MR-VP 试验。单核细胞增生李斯特氏菌的主要生化特征见表 1。

表 1 单核细胞增生李斯特氏菌生化特征与其他李斯特氏菌的区别

菌种	溶血反应	葡萄糖	麦芽糖	MR-VP	甘露醇	鼠李糖	木糖	七叶苷
单核细胞增生李斯特氏菌 (<i>L. monocytogenes</i>)	+	+	+	+/+	—	+	—	+
格氏李斯特氏菌 (<i>L. grayi</i>)	—	+	+	+/+	+	—	—	+
斯氏李斯特氏菌 (<i>L. seeligeri</i>)	+	+	+	+/+	—	—	+	+
威氏李斯特氏菌 (<i>L. welshimeri</i>)	—	+	+	+/+	—	V	+	+
伊氏李斯特氏菌 (<i>L. ivanovii</i>)	+	+	+	+/+	—	—	+	+
英诺克李斯特氏菌 (<i>L. innocua</i>)	—	+	+	+/+	—	V	—	+

注: + 阳性; — 阴性; V 反应不定。

5.4.4 溶血试验:将羊血琼脂平板底面划分为 20 个~25 个小格,挑取纯培养的单个可疑菌落刺种到血平板上,每格刺种一个菌落,并刺种阳性对照菌(单核细胞增生李斯特氏菌和伊氏李斯特氏菌)和阴性对照菌(英诺克李斯特氏菌),穿刺时尽量接近底部,但不要触到底面,同时避免琼脂破裂,36℃±1℃培养 24 h~48 h,于明亮处观察,单核细胞增生李斯特氏菌和斯氏李斯特氏菌在刺种点周围产生狭小的透明溶血环,英诺克李斯特氏菌无溶血环,伊氏李斯特氏菌产生大的透明溶血环。

5.4.5 协同溶血试验(cAMP):在羊血琼脂平板上平行划线接种金黄色葡萄球菌和马红球菌,挑取纯培养的单个可疑菌落垂直划线接种于平行线之间,垂直线两端不要触及平行线,于 30℃±1℃培养 24 h~48 h。单核细胞增生李斯特氏菌在靠近金黄色葡萄球菌的接种端溶血增强,斯氏李斯特氏菌的

溶血也增强,而伊氏李斯特氏菌在靠近马红球菌的接种端溶血增强。

5.5 生化鉴定系统

可选择 API *Listeria* 10300 生化鉴定试剂盒或 VITEK 全自动微生物鉴定系统等生化鉴定系统对 5.3 中 3 个~5 个纯培养的可疑菌落进行鉴定。

5.6 小鼠毒力试验(可选择)

将符合上述特性的纯培养物接种于 TSB-YE 中,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,4 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用无菌生理盐水制备成浓度为 10^{10} CFU/mL 的菌悬液,取此菌悬液进行小鼠腹腔注射 3 只~5 只,每只 0.5 mL,观察小鼠死亡情况。致病株于 2 d~5 d 内死亡。试验时可用已知菌做对照。单核细胞增生李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌对小鼠有致病性。

5.7 结果报告

综合以上生化试验和溶血试验的结果,报告 25 g(或 25 mL)样品中检出或未检出单核细胞增生李斯特氏菌。

第二法 全自动酶联荧光免疫分析仪筛选法

6 原理

mini VIDAS 或 VIDAS 单核细胞增生李斯特氏菌分析,是在自动 VIDAS 仪器上进行的双抗体夹心酶联荧光免疫分析方法。固相容器(SPR)用抗单核细胞增生李斯特氏菌抗体包被,各种试剂均封闭在试剂条内。煮沸过的增菌肉汤加入试条孔后,在特定时间内样本中的单核细胞增生李斯特氏菌抗原与包被在 SPR 内部的单核细胞增生李斯特氏菌抗体结合,未结合的其他成分通过洗涤步骤清除。标记有碱性磷酸酶的抗体与固定在 SPR 壁上的单核细胞增生李斯特氏菌抗原结合,最后洗去未结合的抗体标记物。SPR 中所用荧光底物为磷酸 4-甲基伞型物。结合在 SPR 壁上的酶将催化底物转变成具有荧光的产物:4-甲基伞形酮。VIDAS 光扫描器在波长 450 nm 处检测该荧光强度。试验完成后由 VIDAS 自动分析结果,得出检测值,并打印出每份样本的检测结果。

7 设备和材料

mini VIDAS 或 VIDAS。

8 试剂

8.1 LMO2 试剂条。

8.2 校正液:纯化灭活的单核细胞增生李斯特氏菌抗原标准溶液。

8.3 阳性对照。

8.4 阴性对照。

8.5 MLE 卡。

9 操作步骤

9.1 前增菌

以无菌操作取样品 25 g(或 25 mL)加入到含有 225 mL Demi-Fraser 肉汤的均质袋中,在拍击式均质器上连续均质 1 min~2 min;或放入盛有 225 mL Demi-Fraser 肉汤的均质杯中,8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min。于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。同时做阳性及阴性对照。

9.2 增菌与处理

取 1 mL 前增菌液接种于 10 mL Fraser 肉汤,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,取 1 mL 增菌液加入试管中,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min。剩余增菌液保存于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$,以备对阳性检测结果进行确认。

9.3 上机操作

9.3.1 输入 MLE 卡信息

每个试剂盒在使用之前,首先要用试剂盒中的 MLE 卡向仪器输入试剂规格(或曲线数据)。每盒试剂只需输入一次。

9.3.2 校正

在输入 MLE 卡信息后,使用试剂盒内的校正液进行校正,校正必须做双份测试。以后每 14 天进行一次校正。

9.3.3 检测

取出试剂条,待恢复至室温后进行样本编号。

建立 work list,输入样本编号。

分别吸取 500 μ L 对照和样本(冷却至室温)加入到试剂条样本孔中央。依屏幕提示,将试剂条放入仪器相应的位置。

所有分析过程均由仪器自动完成,检测约需 45 min。

9.4 结果报告

9.4.1 检测值(X)是样品的相对荧光值(RFV₁)与标准溶液的相对荧光值(RFV₂)的比值,见式(1)。

$$X = \frac{RFV_1}{RFV_2} \dots\dots\dots (1)$$

若检测值<0.05,则检测结果为阴性;检测值 $\geq$ 0.05,则检测结果为阳性。

9.4.2 检测结果阴性,可直接报告 25 g(或 25 mL)样品中未检出单核细胞增生李斯特氏菌。检测结果阳性的样品,应按照 5.2~5.4 对保存于 2 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C 的增菌液进行确认并报告。

第三法 全自动病原菌检测系统筛选法

10 原理

BAX 系统或 BAX 系统 Q7 利用多聚酶链反应(PCR)来扩增并检测细菌 DNA 中特异片段来判断目标菌是否存在。反应所需的引物、DNA 聚合酶和核苷酸等被合并成为一个稳定、干燥的片剂,并装入 PCR 管中,检测系统运用荧光检测来分析 PCR 产物。每个 PCR 试剂片都包含有荧光染料,该染料能结合双链 DNA,并且受光激发后发出荧光信号。在检测过程中,BAX 系统通过测量荧光信号的变化,分析测量数据,从而判定阳性或阴性结果。

11 设备和材料

11.1 系统主机及工作站。

11.2 加热槽。

11.3 冷却槽。

12 试剂

12.1 BAX 单核细胞增生李斯特氏菌检测试剂盒

12.1.1 裂解缓冲液。

12.1.2 蛋白酶。

12.1.3 带药片的 PCR 管。

12.1.4 透明盖。

12.2 溶菌试剂

见第 A.11 章。

12.3 李斯特氏菌缓冲增菌肉汤(buffered *Listeria* enrichment broth, BLEB)

见第 A.12 章。

12.4 丙磺酸钠-李斯特氏菌缓冲增菌肉汤(MOPS-buffered *Listeria* enrichment broth, MOPS-BLEB)

见第 A.13 章。

12.5 半量 FRASER 肉汤(demi-Fraser)

见第 A.14 章。

12.6 UVM 李斯特氏菌增菌肉汤(UVM *Listeria* enrichment broth, UVM-LEB)

见第 A.15 章。

12.7 李斯特氏菌增菌肉汤(*Listeria* enrichment broth, LEB)

见第 A.16 章。

13 操作步骤

13.1 增菌

13.1.1 生肉:称取 25 g 样品于 225 mL demi-Fraser 肉汤中,均质后,30℃±1℃培养 22 h~24 h;移取 100 μL 转种于 9.9 mL MOPS-BLEB 中,36℃±1℃培养 18 h~24 h。

13.1.2 熟肉制品:称取 25 g 样品于 225 mL UVM-LEB 中,均质后,30℃±1℃培养 22 h~24 h;移取 100 μL 转种于 9.9 mL MOPS-BLEB 中,36℃±1℃培养 18 h~24 h。

13.1.3 乳品:称取 25 g 样品于 225 mL LEB 中,均质后,在 36℃±1℃培养 22 h~26 h;移取 1 mL 转种于 9 mL MOPS-BLEB 中,36℃±1℃培养 18 h~24 h。

13.1.4 熏鱼:称取 25 g 样品于 225 mL LB₁ 中,均质后,36℃±1℃培养 22 h~26 h;移取 1 mL 转种于 9 mL MOPS-BLEB 中,36℃±1℃培养 18 h~24 h。

13.1.5 其他食品:称取 25 g(或 25 mL)样品于 225 mL 不含抗生素的 BLEB 中,均质后,在 30℃±1℃培养 4 h,然后加入抗生素在 30℃±1℃培养 20 h,移取 100 μL 转种于 9.9 mL MOPS-BLEB 中,36℃±1℃培养 18 h~24 h。

13.2 上机操作

13.2.1 打开加热槽分别加热至 55℃和 95℃,检查冷藏过夜的冷却槽(4℃),开机并启动 BAX 系统软件。如果仪器自检后建议校正,按屏幕提示进行校正操作。

13.2.2 创建“rack”文件:根据提示在完整的“rack”文件和“个样”资料中输入样品信息。

13.2.3 溶菌操作:在每个溶菌管加入 200 μL 配制好的溶菌试剂,取 5 μL 增菌肉汤加入相应的溶菌管中,盖上盖子。将溶菌管放在 55℃加热槽中,加热 60 min;再将溶菌管转移到在 95℃的加热槽中,加热 10 min;最后将溶菌管转移到冷却槽上(冷却槽从冰箱取出后 30 min 内使用完毕),冷却 5 min。剩余增菌肉汤保存于 2℃~8℃,以备对阳性检测结果确认。

13.2.4 加热循环仪/检测仪:从菜单中选择“RUN FULL PROCESS”,加热到设定温度(加热槽 90℃,盖子 100℃)。

13.2.5 溶菌产物转移:将 PCR 管支架放到专用冷却槽上,然后将带药片的 PCR 管放入到支架内。将所有的管盖放松并除去一排水管盖。用多道加样器将 50 μL 溶菌产物加入此排管中,并用替代的透明盖密封 PCR 管。换用新吸头,重复上述操作,直至将所有样品转入带药片的 PCR 管中。

13.2.6 扩增和检测:按“PCR Wizard”的屏幕提示,将加完样的 PCR 管放入 PCR 仪/检测仪中开始扩增。全过程(扩增和检测)需要大约 3.5 h。当检测完成后,“PCR Wizard”提示取出样品,并自动显示结果。

13.3 结果报告

绿色“-”表示阴性结果。

红色“+”表示阳性结果。

黄色“?”表示不确定结果。

黄色“×”表示错误结果。

- 13.3.1 不确定或错误结果,对保存于 2℃~5℃的增菌液重新上机检测。
- 13.3.2 检测结果阴性,可直接报告 25 g(或 25 mL)样品中未检出单核细胞增生李斯特氏菌。
- 13.3.3 检测结果阳性的样品,应按照 5.2~5.4 对保存于 2℃~5℃的增菌液进行确认并报告。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤 (TSB-YE)

A.1.1 成分

胰胨	17.0 g
多价胨	3.0 g
酵母膏	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解,调 pH 至 7.2~7.4,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.2 含 0.6% 酵母膏的胰酪胨大豆琼脂 (TSA-YE)

A.2.1 成分

胰胨	17.0 g
多价胨	3.0 g
酵母膏	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解,调 pH 至 7.2~7.4,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.3 李氏增菌肉汤 (LB₁, LB₂)

A.3.1 成分

胰胨	5.0 g
多价胨	5.0 g
酵母膏	5.0 g
氯化钠	20.0 g
磷酸二氢钾	1.4 g
磷酸氢二钠	12.0 g
七叶苷	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

将上述成分加热溶解,调 pH 至 7.2~7.4,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.3.2.1 李氏Ⅰ液 (LB₁)225 mL 中加入:

1%萘啶酮酸 (用 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液配制)	0.5 mL
1%吡啶黄 (用无菌蒸馏水配制)	0.3 mL

A.3.2.2 李氏Ⅱ液 (LB₂)200 mL 中加入:

1%萘啶酮酸	0.4 mL
1%吡啶黄	0.5 mL

A.4 PALCAM 琼脂

A.4.1 成分

酵母膏	8.0 g
葡萄糖	0.5 g
七叶苷	0.8 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
甘露醇	10.0 g
酚红	0.1 g
氯化锂	15.0 g
酪蛋白胰酶消化物	10.0 g
心胰酶消化物	3.0 g
玉米淀粉	1.0 g
肉胃酶消化物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将上述成分加热溶解,调 pH 至 7.2~7.4,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.4.2.1 PALCAM 选择性添加剂

多粘菌素 B	3.0 mg
盐酸吡啶黄	2.5 mg
头孢他啶	10.0 mg
无菌蒸馏水	500 mL

A.4.2.2 制法

将 PALCAM 基础培养基溶化后冷却到 50 °C,加入 2 mL PALCAM 选择性添加剂,混匀后倾倒在无菌的平皿中,备用。

A.5 革兰氏染色液

A.5.1 结晶紫染色液

A.5.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20.0 mL
1%草酸铵水溶液	80.0 mL

A.5.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.5.2 革兰氏碘液

A.5.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

A.5.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

A.5.3 沙黄复染液

A.5.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.5.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.5.4 染色法

A.5.4.1 将纯培养的单个可疑菌落涂片,火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗。

A.5.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A.5.4.3 滴加 95%乙醇脱色,约 15 s~30 s,直至染色液被洗掉,不要过分脱色,水洗。

A.5.4.4 滴加复染液,复染 1 min,水洗、待干、镜检。

A.6 SIM 动力培养基

A.6.1 成分

胰胨	20.0 g
多价胨	6.0 g
硫酸铁铵	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	3.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

将上述各成分加热混匀,调 pH7.2,分装小试管,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.6.3 试验方法

挑取纯培养的单个可疑菌落穿刺接种到 SIM 培养基中,于 30 °C 培养 24 h~48 h,观察结果。

A.7 缓冲葡萄糖蛋白胨水(MR 和 V-P 试验用)

A.7.1 成分

多胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

溶化后校正 pH7.0,分装试管,每管 1 mL,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.7.3 甲基红(MR)试验

A.7.3.1 甲基红试剂成分

甲基红	10 mg
95%乙醇	30 mL
蒸馏水	20 mL

A.7.3.2 制法

10 mg 甲基红溶于 30 mL 95 %乙醇中,然后加入 20 mL 蒸馏水。

A.7.3.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于本培养基,36℃±1℃培养 2 d~5 d。滴加甲基红试剂一滴,立即观察结果。鲜红色为阳性,黄色为阴性。

A.7.4 V-P 试验

A.7.4.1 6% α-萘酚-乙醇溶液

成分及制法:取 α-萘酚 6.0 g,加无水乙醇溶解,定容至 100 mL。

A.7.4.2 40%氢氧化钾溶液

成分及制法:取氢氧化钾 40 g,加蒸馏水溶解,定容至 100 mL。

A.7.4.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于本培养基,36℃±1℃培养 2 d~4 d。加入 6% α-萘酚-乙醇溶液 0.5 mL 和 40 %氢氧化钾溶液 0.2 mL,充分振摇试管,观察结果。阳性反应立刻或于数分钟内出现红色,如为阴性,应放在 36℃±1℃继续培养 4 h 再进行观察。

A.8 血琼脂

A.8.1 成分

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	1.5 g
蒸馏水	100 mL
脱纤维羊血	5 mL~10 mL

A.8.2 制法

除新鲜脱纤维羊血外,加热溶化上述各组分,121℃高压灭菌 15 min,冷到 50℃,以无菌操作加入新鲜脱纤维羊血,摇匀,倾注平板。

A.9 糖发酵管

A.9.1 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.9.2 制法

A.9.2.1 葡萄糖发酵管按上述成分配好后,按 0.5%加入葡萄糖,分装于有一个倒置小管的小试管内,pH7.4,115℃高压灭菌 15 min,备用。

A.9.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后,分装每瓶 100 mL,115 °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 mL 糖溶液加入于 100 mL 培养基内,以无菌操作分装小试管。

A.9.3 试验方法

取适量纯培养物接种于糖发酵管,36 °C ± 1 °C 培养 24 h~48 h,观察结果,蓝色为阴性,黄色为阳性。

A.10 过氧化氢酶试验

A.10.1 试剂

3% 过氧化氢溶液:临用时配制。

A.10.2 试验方法

用细玻璃棒或一次性接种针挑取单个菌落,置于洁净试管内,滴加 3% 过氧化氢溶液 2 mL,观察结果。

A.10.3 结果

于半分钟内发生气泡者为阳性,不发生气泡者为阴性。

A.11 溶菌试剂

A.11.1 成分

蛋白酶

150.0 μL

裂解缓冲液

12.0 mL

A.11.2 制法

将 150.0 μL 蛋白酶加入 1 瓶 12.0 mL 的裂解缓冲液中。将准备日期标记在瓶上,储存在 2 °C ~ 8 °C,在两周内使用。

A.12 李斯特氏菌缓冲增菌肉汤(buffered *Listeria* enrichment broth,BLEB)

A.12.1 成分

胰酪胨大豆粉

3.0 g

酵母膏

6.0 g

磷酸氢二钾

1.4 g

磷酸氢二钠

9.6 g

萘啶酮酸

40.0 mg/L

放线菌酮

50.0 mg/L

盐酸吡啶黄素

15.0 mg/L

A.12.2 制法

将各组分混合,不加入抗生素,调节 pH 到 7.3 ± 0.2,121 °C 高压灭菌 15 min。

用无菌水分别制备 0.5% (质量浓度) 的吡啶黄素溶液和萘啶酮酸溶液,用 40% (体积分数) 的酒精制备 1% (质量浓度) 放线菌酮溶液。过滤除菌后,分别取 3 mL 吡啶黄素溶液、8 mL 萘啶酮酸溶液和 5 mL 放线菌酮溶液加入到 1 000 mL 培养基中。

A.13 丙磺酸钠-李斯特氏菌缓冲增菌肉汤(MOPS-buffered *Listeria* enrichment broth,MOPS-BLEB)

A.13.1 成分

胰酪胨大豆粉

3.0 g

3-(N-吗啉代)丙磺酸

6.7 g

3-(N-吗啉代)丙磺酸钠

10.5 g

酵母膏	6.0 g
萘啶酮酸	40.0 mg/L
放线菌酮	50.0 mg/L
盐酸吡啶黄素	15.0 mg/L
蒸馏水	1 000 mL

A. 13.2 制法

将各组分混合,不加入抗生素,调节 pH 到 7.3 ± 0.2 , $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

用无菌水分别制备 0.5% (质量浓度) 的吡啶黄素溶液和萘啶酮酸溶液,用 40% (体积分数) 的酒精溶液制备 1% (质量浓度) 放线菌酮溶液。过滤除菌后,分别取 3 mL 吡啶黄素溶液、8 mL 萘啶酮酸溶液和 5 mL 放线菌酮溶液加入到 1 000 mL 培养基中。

A. 14 半量 Fraser(demi-Fraser)肉汤和 Fraser 肉汤

A. 14.1 基础培养基

A. 14.1.1 成分

蛋白胨	5.0 g
胰蛋白胨	5.0 g
酵母膏	5.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	20.0 g
磷酸氢二钠	12.0 g
磷酸氢二钾	1.4 g
氯化锂	3.0 g
七叶苷	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 14.1.2 制法

将各组份混合,调节 pH 到 7.2 ± 0.2 , $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A. 14.2 抗生素溶液的配制

用蒸馏水分别制备 0.5% (质量浓度) 的盐酸吡啶黄素溶液和萘啶酮酸溶液,过滤除菌。

A. 14.3 完全培养基

A. 14.3.1 半量 Fraser 肉汤

分别取 3.2 mL 盐酸吡啶黄素溶液、8 mL 萘啶酮酸溶液加入到 1 000 mL 基础培养基中。

A. 14.3.2 Fraser 肉汤

分别取 6.4 mL 盐酸吡啶黄素溶液、16 mL 萘啶酮酸溶液加入到 1 000 mL 基础培养基中。

A. 15 UVM 李斯特氏菌增菌肉汤(UVM *Listeria* enrichment broth, UVM-LEB)

A. 15.1 成分

蛋白胨	5.0 g
胰蛋白胨	5.0 g
牛肉膏	5.0 g
酵母膏	5.0 g
氯化钠	20.0 g
磷酸二氢钾	1.4 g
磷酸氢二钠	12.0 g

七叶苷	1.0 g
萘啶酮酸	20.0 mg/L
盐酸吡啶黄素	12.0 mg/L
蒸馏水	1 000 mL

A. 15.2 制法

将各组分混合,不加入抗生素,调节 pH 到 7.3 ± 0.2 , $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

用无菌水分别制备 0.5 % (质量浓度) 的吡啶黄素溶液和萘啶酮酸溶液,过滤除菌后。分别取 3 mL 吡啶黄素溶液、8 mL 萘啶酮酸溶液加入到 1 000 mL 培养基中。

A. 16 李斯特氏菌增菌肉汤(*Listeria enrichment broth*, LEB)

A. 16.1 成分

胰胨	17.0 g
多价胨	3.0 g
酵母膏	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL
盐酸吡啶黄素	15.0 mg/L
萘啶酮酸	40.0 mg/L

A. 16.2 制法

将各组分混合,不加入抗生素,调节 pH 到 7.3 ± 0.2 , $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

用无菌水分别制备 0.5 % (质量浓度) 的吡啶黄素溶液和萘啶酮酸溶液,过滤除菌后。分别取 3 mL 吡啶黄素溶液、8 mL 萘啶酮酸溶液加入到 1 000 mL 培养基中。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
食品卫生微生物学检验
单核细胞增生李斯特氏菌检验
GB/T 4789.30—2008

*

中国标准出版社出版发行
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
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 29 千字
2009年3月第一版 2009年3月第一次印刷

*

书号: 155066·1-36035 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 4789.30—2008