

食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌检验方法的研究

I 肉中小肠结肠炎耶尔森氏菌分离方法的研究

卫生部食品卫生监督检验所 王淑颖 杨宝兰 王淑真 周桂莲

小肠结肠炎耶尔森氏菌是一个近年来引起食物中毒的新型菌，现已从许多种食品中分离到了该菌。近年来国内外多采用在4℃经7、14、21天冷增菌后，用CIN耶尔森氏菌选择性培养基来分离小肠结肠炎耶尔森氏菌^①；同时，对污染较严重的肉类食品，采用分离前用弱碱处理以破坏大量杂菌，提高该菌的检出率^②国内所见报道还多采用MAC、SS这两种常用的肠道分离培养基；也有报道用改良Y选择性培养基进行分离的。根据我国现有条件，我们改变了CIN培养基中的一些成分，命名为CIN-I，比较小肠结肠炎耶尔森氏菌和其他一些肠道菌在该培养基上的生长特性；通过对人为污染的肉样和采集的肉样中该菌的分离，探讨冷增菌和碱处理的价值；对CIN-I、MAC、SS和改良Y 4种培养基作了比较，为建立从食品中检出该菌的检验方法提供依据。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 菌株：为本实验室保存的标准菌株。
2. 血清：卫生部药品、生物制品检定所制备。
3. 样品：采自国营菜市场 and 农贸市场。

二、培养基

1. 冷增菌液 PSB：PH7.6的PBS + 0.15%胆盐 + 2%山梨醇。
2. 碱处理液：以0.5%NaCl做溶剂配制而成的0.5%KOH溶液。
3. CIN培养基：Oxoid公司生产。

4. CIN-I培养基：与CIN成分中不同之处详见后面试验结果。

5. 改良Y培养基。

6. E-18快速生化反应板：河南开封医学生物制品厂生产。

其他的试验用培养基：MAC、SS、TSI。和尿素培养基，半固体的配制方法按常规要求。

三、试验方法

1. 改进和比较分离用培养基：

(1) CIN培养基中某些成分的更换和培养基中胆盐成分的确定，推出CIN-I。

(2) 人为污染肉样，比较CIN-I、MAC SS和改良Y培养基对小肠结肠炎耶尔森氏菌的分离效果。

确定污染量：肉样冷增菌液中该菌的浓度为 1×10^2 个/ml ~ 1×10^6 个/ml。

2. 从采集的肉样中分离小肠结肠炎耶尔森氏菌

(1) 不增菌分离（记为○天）：将样品与冷增菌液混合，在室温放置4~6小时，分离培养。

(2) 冷增菌：将样品与冷增菌液以1:10的比例混合，或将样品表面涂抹拭子放于10ml冷增菌液中，在4℃冰箱分别经7、14、21天冷增菌，分离培养。

(3) 直接分离：挑起一环样液或冷增菌液接种分离培养基。

(4) 碱处理：0.5ml样液（冷增菌液）+ 4.5ml碱处理液，充分混匀15秒，接种分

离培养基。

(5) 分离培养: 接种后的分离培养基于26℃、48小时培养。

(6) 三糖铁试验: 从分离培养基上挑取可疑菌落, 接种TSI, 26℃、24小时观察结果。

(7) 尿素酶试验: 对在TSI上反应符合A/A或-/A, 不产H₂S, 不产气者接种尿素培养基, 26℃, 24小时观察结果。

(8) 动力试验: 将尿素酶反应阳性者接种半固体, 观察在26℃, 24小时培养后的动力情况。

(9) 生化试验: 将上述反应符合该菌特点者, 接种E-18快速生化反应板, 37℃, 4~6小时观察结果。

(10) 血清学试验: 对在E-18快速生化板上反应符合者作血清玻片凝集试验, 同时做盐水对照。

结果和讨论

一、CIN-I与CIN^{①②}分离培养基的比较

1. 成份的改变

2. 小肠结肠炎耶尔森氏菌在CIN和CIN-I生长形态的比较(见表1)。

在CIN和CIN-I培养基上, 该菌都生长为外带透明环的红色牛眼状菌落。

3. 小肠结肠炎耶尔森氏菌和其他的一些肠道菌在CIN-I和CIN上的生长状况

综合上述试验结果, 我们认为在目前实际条件下, 可用CIN-I代替CIN培养基。

二、比较4种分离培养基的分离效果

由于样品污染严重, 直接分离该菌十分困难; 经碱处理后破坏了杂菌, 大大提高了该菌的检出率; 但对于未经过冷增菌的样品, 由于此时杂菌量不很大, 碱处理不仅破坏了杂菌, 也破坏了小肠结肠炎耶尔森氏菌。从分离情况来看, 7天冷增菌后再经过

表1 CIN-I与CIN成份的比较

	CIN	CIN-I
Irgasan	2,4,4'-三氯-2'-羟基苯醚	二苯醚
头孢菌素类	Cefsulodin (磺吡苄头孢菌素)	Cephlosporin (头孢菌素)
胆盐	三号胆盐 2g/1000ml ^① 去氧胆酸钠 0.5g/1000ml ^②	去氧胆酸钠 2g/1000ml

表2 小肠结肠炎耶尔森氏菌和一些常见肠道菌在CIN-I和CIN上生长状况的比较

菌株名称	试验用菌株数		生长株数		菌落形成特点	
	CIN	CIN-I	CIN	CIN-I	CIN	CIN-I
小肠结肠炎耶尔森氏菌	25	24	25	24	红色牛眼状	红色牛眼状
普通变形菌	2	1	0	0		
摩根变形菌	3	1	3	0	白色	
奇异变形菌	1	1	0	0		
大肠埃希氏菌	3	3	0	3		粉红色光滑菌落
肺炎克雷白	1	2	0	1		红色粘稠菌落
粘质沙雷氏	1	1	1	1	粉色	粉色
枸橼酸杆菌	2	1	2	1	粉色	粉灰色
假单胞菌	4	1	4	1	色白	黄色

表3 4种分离培养基对小肠结肠炎耶尔森氏菌的检出情况

样品增菌液中小肠结肠炎耶尔森氏菌的含量 (个/ml)	CIN-1				MAC				SS				改良Y				
	0天		7天		14天		21天		0天		7天		14天		21天		
	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	
1×10 ² 个/ml	-	NG	-	-	-	-	-	-	-	NG	-	-	-	-	-	-	-
1×10 ³ 个/ml	-	NG	-	+	-	-	-	+	-	NG	-	-	-	-	-	-	+
1×10 ⁴ 个/ml	-	NG	-	-	-	-	-	+	-	NG	-	-	-	-	-	-	+
1×10 ⁵ 个/ml	-	NG	-	+	-	+	-	+	-	NG	-	+	-	+	-	+	-
1×10 ⁶ 个/ml	-	NG	-	+	-	+	-	+	-	NG	-	+	-	+	-	+	-

表4 66份肉样的分离检出情况

培养基	样品数 (份)	0天		7天冷增菌		14天冷增菌		21天冷增菌		总的分离情况	
		直接	直接	碱处理	直接	碱处理	直接	碱处理	直接	碱处理	
CIN-I	66	0	0	6	0	4	2	9	2	15(22.7%)	
MAC	66	0	0	9	1	6	0	4	1	15(22.7%)	
SS	66	1	0	8	0	8	1	14	2	20(30.3%)	
改良Y	66	0	1	12	0	6	2	15	3	22(33.3%)	
四种培养基的总合	66	1 (1.5%)	1 (1.5%)	23 (34.8%)	2 (3.0%)	17 (15.%)	5 (7.6%)	27 (40.8%)	8 (12.1%)	39 (59.1%)	

碱处理，污染量为1×10³个/ml的样品中可分离出该菌。随着冷增菌时间的延长，总的检出趋势是增加的。比较几种培养基的分离情况，CIN-N和改良Y的分离敏感度较高。

三、从肉样中分离小肠结肠炎耶尔森氏菌

66份肉样经21天冷增菌和碱处理后，总的阳性分离率为59.1%，而未经过碱处理直接分离的样品检出率为12.1%。不经过冷增菌而直接分离的阳性检出率最低，而经过7天冷增菌再进行碱处理后分离，检出率由15%迅速提高到34.8%。比较冷增菌时间对该菌分离率的影响，结果表明：一般经过7天冷增菌后四种培养基的分离率都迅速提高，而经过14天冷增菌后分离率则有所下降(25.7%)；这可能是由于在冷增菌达到两周时，该菌虽然有了一定量的增加，而杂菌也达到了最大浓度，二者发生拮抗作用，使得该菌的分离率有所下降，在冷增菌达到21

天时，杂菌逐渐衰亡，该菌显示出极大优势，故对该菌的分离率达到最高(40.8%)。从4种培养基的分离情况来看，改良Y的分离率最高(33.3%)；CIN-I和MAC的分离情况相同。

小 结

本试验通过对人为污染的肉样，以及66份肉样中小肠结肠炎耶尔森氏菌检验方法的研究，比较了PSB冷增菌条件和0.5%KOH-NaCl碱处理方式的效果，及CIN-I、MAC、SS和改良Y四种选择性培养基对该菌的检出情况；结果表明：对于肉类样品，碱处理能明显地提高该菌的分离率，冷增菌适于该菌生长和分离的条件；由于该菌在CIN-I培养基上生长为有特点的、易鉴别的菌落，而改良Y具有强选择性，因此我们认为CIN-I和改良Y为较好的小肠结肠炎耶尔森氏菌选择性培养基。

(转45页)