



食品中致病菌和病毒



8.1 肠杆菌科

- 肠杆菌科是存在于人和动物肠道或自然界中的一群生物学性状很相同的革兰氏阴性短小杆菌。无芽孢，多数有周身鞭毛，能运动。
- 在一般培养基上能生长。
- 培养温度为35°C。
- 需氧或兼性厌氧。
- 能还原硝酸盐为亚硝酸盐，氧化酶试验阴性，触酶试验阳性。

8.1.1 大肠杆菌

- 大肠杆菌 *E. coli* 是肠道正常菌群。一般情况下，多不致病，是人和动物肠道中的常居菌。
- 在一定条件下，可引起肠道道外感染。
- 致病性大肠杆菌：肠产毒性大肠杆菌 (*Enterotoxigenic E. coli*); 肠致病性大肠杆菌 (*Enteropathogenic E. coli*); 肠侵袭性大肠杆菌 (*Enteroinvasive E. coli*); 肠出血性大肠杆菌 (*Enterohemorrhagic E. coli*)。引起腹泻、出血性肠炎。

肠产毒性大肠杆菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)

- ❖ 引起婴幼儿和旅游者腹泻，出现轻度水泻，也可呈严重霍乱样症状。腹泻常为自限性，一般2~3d即愈。
- ❖ 鉴定ETEC主要测定大肠杆菌肠毒素，血清型有一定的参照意义。

肠致病性大肠杆菌

- ❖ 肠致病性大肠杆菌 (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC) 是婴儿腹泻的主要病原菌，具有高度传染性，严重者可致死，成人少见。EPEC产生VT毒素。VT毒素具有神经毒素、细胞毒素和肠毒素性。
- ❖ 鉴定EPEC根据临床体现和血清型。

肠侵袭性大肠杆菌 (**Enteroinvasive *E. coli*, EIEC**)

- **EIEC**的多数菌株无动力，生化反应和抗原构造均类似痢疾杆菌。
- **EIEC**可引起豚鼠角结合膜炎，临床上可借此帮助鉴定**EIEC**。

肠出血性大肠杆菌

- 肠出血性大肠杆菌 (**Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC**)可引起散发性或暴发性出血性结肠炎。主要菌型是O₁₅₇: H₇, 还可有O₂₆、O₁₁₁、O₁₀₃、O₁₄₅等。
- 1996年O₁₅₇: H₇在日本引起万人的食物中毒, 另外, 美国、加拿大、瑞典、澳大利亚、英国等国家和地区相继报道了EHEC O₁₅₇: H₇的散发性感染和暴发流行。
- 我国于1999年在苏、皖、鲁、豫发生暴发流行。

肠出血性大肠杆菌O₁₅₇: H₇的检验措施:

1、培养基制备

- 改良EC新生霉素增菌肉汤（mEC）：EC肉汤灭菌后添加20mg/mL过滤除菌的新生霉素，使终浓度为20μg/mL。
- 改良山梨醇麦康凯琼脂（TC-SMAC）：山梨醇麦康凯琼脂加入过滤除菌的1%亚碲酸钾溶液，使终浓度2.5mg/L，头孢克污，使终浓度为0.05mg/L。
- MUG-LST肉汤：LST肉汤中添加4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷（MUG），使终浓度为0.1g/L。

2、增菌培养

- 称取25克样品放入225mL mEC中，均质。于41±1℃培养18-二十四小时。

3、分离

- 将mEC肉汤培养物10倍递增稀释。从 10^{-4} ， 10^{-5} ， 10^{-6} 稀释度，各取0.1mL涂布于TC-SMAC平板。于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养18~二十四小时。
- 可疑 EHEC $\text{O}_{157}:\text{H}_7$ 菌落扁平，透明或半透明，边沿光滑，呈淡褐色中心，直径约2mm。

4、鉴定

- 挑取TC-SMAC上的可疑菌落，接种MUG-LST，于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养18~二十四小时，出现产气，且无荧光者，分离到一般营养琼脂。
- 对纯菌落用EHEC $\text{O}_{157}:\text{H}_7$ 原则血清或胶乳凝集试剂作凝集试验，必要时进行生化试验。
- 在检测过程中，也能够在选择性增菌后，取出5mL增菌液，经 100°C 水浴15分钟灭活后，供自动酶联荧光免疫测试（VIDAS），迅速取得初步成果，阳性反应者需作进一步证明。

EHEC O₁₅₇:H₇检验程序图解

检样25g



mEC225mL → 酶联荧光免疫测试VIDAS迅速筛选

↓41±1°C, 18-24h

10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶稀释度涂布TC-SMAC

↓36±1°C, 18-24h

挑取5-10个可疑菌落接种MUG-LST

↓36±1°C, 18-24h

MUG阴性培养物转种一般营养琼脂



生化反应鉴定



血清凝集鉴定或胶乳凝集试验

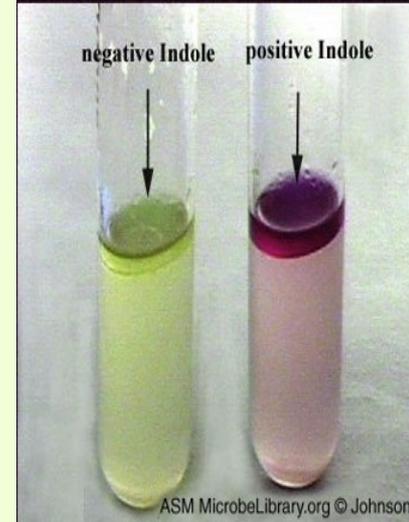
生化试验:

将斜面培养物移种到下列培养基中进行生化试验。

- 1 色氨酸肉汤:** 在 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\pm 2\text{h}$ 后,加Kovacs氏试剂 $0.2\sim 0.3\text{mL}$,上层出现红色为靛基质阳性反应。
- 2 MR-VP培养基:** 在 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\pm 2\text{h}$ 。以无菌操作移取培养物 1 mL 至 $13\text{mm}\times 100\text{mm}$ 试管中,加 5% α -萘酚乙醇溶液 0.6mL , 40% 氢氧化钾溶液 0.2mL 和少许肌酸结晶,振摇试管后静置 2h ,如出现伊红色,为VP试验阳性。
将MR-VP培养物的剩余部分再培养 48h 滴加 5 滴甲基红溶液。如培养物变红色,为甲基红试验阳性,若变黄色则为阴性反应。
- 3 Koser氏枸橼酸盐肉汤:** 于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 96h 统计有无生长。
- 4 LST肉汤:** 于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\pm 2\text{h}$,观察试管中是否产气。
- 5 革兰氏染色:** 取 18h 营养琼脂斜面培养物作革兰氏染色。大肠杆菌为革兰氏阴性。

靛基质 (Indole) 试验:

- 某些细菌能分解蛋白胨中的色氨酸，生成吲哚。吲哚的存在可用显色反应体现出来。吲哚与对二甲氨基苯甲醛结合，形成玫瑰吲哚，为红色化合物。
- 试验措施：将待试纯培养物少量接种于试验培养基管，于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养24h时后，取约2ml培养液，加入Kovacs氏试剂2~3滴，轻摇试管，呈红色为阳性，或先加少许乙醚或二甲苯，摇动试管以提取和浓缩靛基质，待其浮于培养液表面后，再沿试管壁徐缓加入Kovacs氏试剂数滴，在接触面呈红色，即为阳性。



甲基红 (Methyl Red) 试验

- 肠杆菌科各菌属都能发酵葡萄糖，在分解葡萄糖过程中产生丙酮酸，进一步分解中，因为糖代谢的途径不同，可产生乳酸，琥珀酸、醋酸和甲酸等大量酸性产物，可使培养基PH值下降至pH4.5下列，使甲基红指示剂变红。

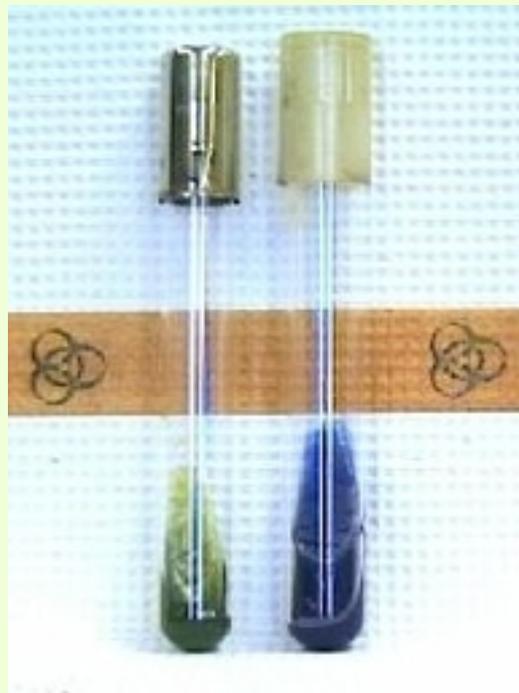
V-P试验

- 某些细菌在葡萄糖蛋白胨水培养基中能分解葡萄糖产生丙酮酸，丙酮酸缩合，脱羧成乙酰甲基甲醇，后者在强碱环境下，被空气中氧氧化为二乙酰，二乙酰与蛋白胨中的胍基生成红色化合物，称V-P (+) 反应。
- 大肠杆菌：MR + /VP -



枸橼酸盐试验：

- 某些细菌能利用枸橼酸盐作为碳源，及磷酸铵作为氮源，将枸橼酸盐分解为二氧化碳，培养基反应后成碱性，因为指示剂的作用，培养基变为兰色。



- 用上述措施在样品中分离取得的纯菌落，经抗E.coli O₁₅₇:H₇原则血清或EHEC O₁₅₇:H₇胶乳凝集测试为阳性者，报告检出肠出血性大肠杆菌O₁₅₇:H₇。
- 如需要进一步检测Vero毒素基因的存在，可经过接种Vero细胞或Hela细胞，观察细胞病变进行鉴定，或可使用基因探针检测和聚合酶链反应（PCR）检测法。

大肠杆菌的检测

- (1) 常规检测方法
- 国家原则：国家原则采用三步法，即：乳糖发酵试验、分离培养和证实试验。
- 乳糖发酵试验：样品稀释后，选择三个稀释度，每个稀释度接种三管乳糖胆盐发酵管。 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\pm 2\text{h}$ ，观察是否产气。
- 分离培养：将产气发酵管培养物转种于伊红美蓝琼脂平板上， $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养18-24h，观察菌落形态。
- 证实试验：挑取平板上的可疑菌落，进行革兰氏染色观察。同时接种乳糖发酵管 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养24-36h，观察产气情况。

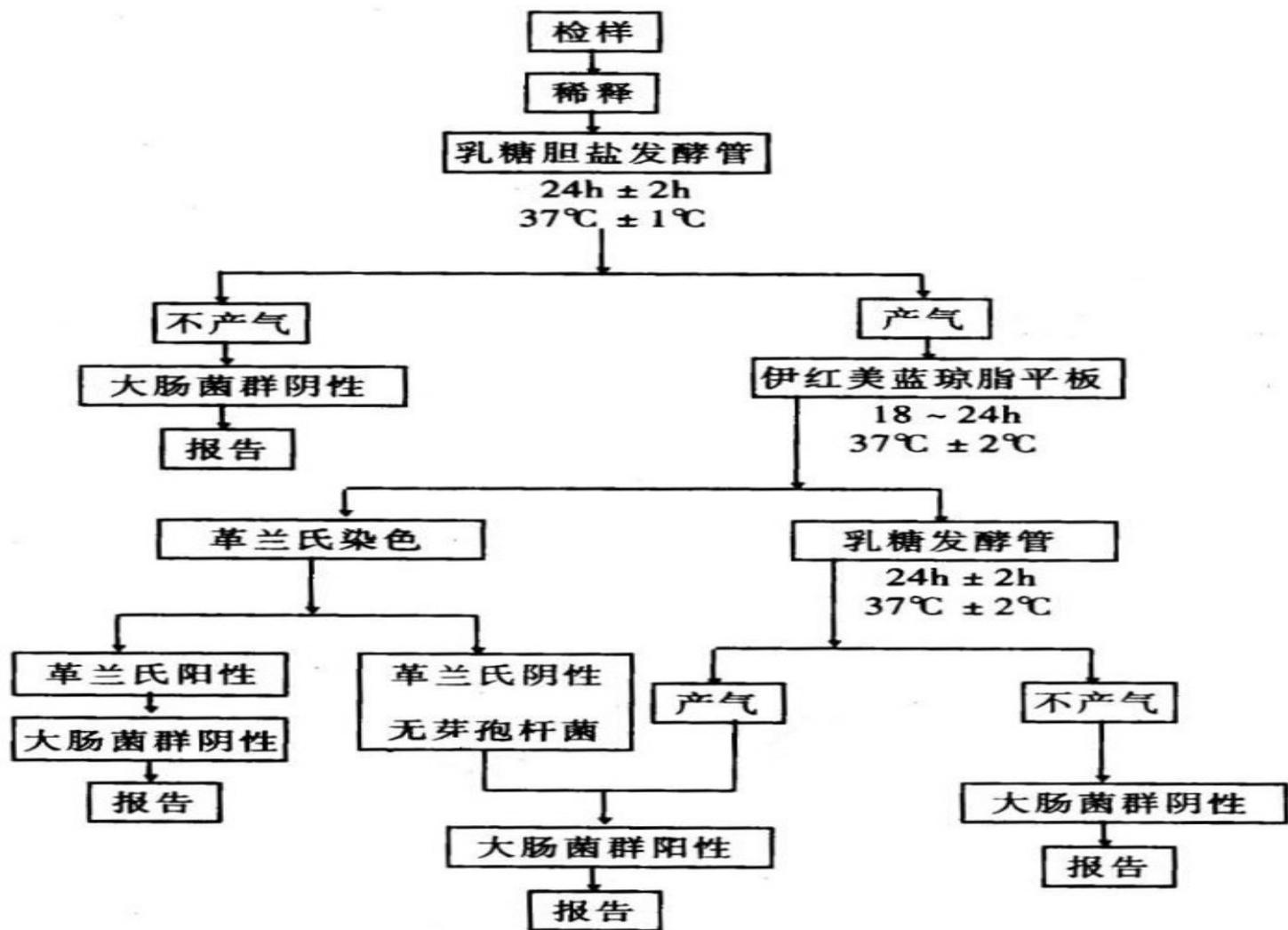


图 大肠菌群的检验程序图

原国家商检局制定的行业原则，等效采用美国FDA的原则措施，用于对出口食品中的大肠杆菌进行检测。本措施采用两步法：

- **推测试验：**样品稀释后，选择三个稀释度，每个稀释度接种三管LST肉汤。 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\pm 2\text{h}$ ，观察是否产气。
- **证明试验：**将产气管培养物接种煌绿乳糖胆盐（BGLB）肉汤管中， $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\pm 2\text{h}$ ，观察是否产气。以BGLB产气为阳性。查MPN表，报告每ml(g)样品中大肠菌群的MPN值。

(2) PCR措施

- 大肠杆菌是食品和水源污染粪便的指示菌。
- Gene-TARK研制出用浸染棒检测大肠杆菌中16SrRNA的探针，样品需前增菌处理，以异硫氰荧光素（FITC）标识探针，再用辣根过氧化物酶标识抗FITC抗体检测杂交复合物。
- Hsu等报导此措施特异性（除相近的志贺氏菌外）达100%，假阳性率达1.2%。

8.1.2 沙门氏菌属 (Salmonella)

- ❖ 沙门氏菌是引起食物中毒的主要病原菌。在世界各国各类细菌性的食物中毒中，沙门氏菌常居前列。所以，沙门氏菌的检测是各国检验机构对多种进出口食品的必检项目之一。
- ❖ 沙门氏菌属是肠杆菌科中最复杂的菌属。它属于革兰氏阴性杆菌。可根据沙门氏菌的菌体抗原（O抗原）分群（A, B, C等），再根据其鞭毛抗原（H抗原）分血清型（1、2等）。

- 沙门氏菌不产生外毒素，但能产生毒力较强的内毒素。
- 沙门氏菌主要经过食物、饮水经口感染。可存在多种食物中，涉及生肉、禽、蛋、奶制品、虾、鱼和田鸡腿等。
- 沙门氏菌主要经过食物、饮水经口感染。根据侵入机体沙门氏菌菌种的不同，在临床上引起四种不同的疾病。

(1) 伤寒、副伤寒

由沙门氏属中的伤寒杆菌和甲、乙、丙型副伤寒杆菌引起。

(2) 食物中毒

沙门氏菌属引起的食物中毒，主要以肠炎杆菌、鼠伤寒杆菌、猪霍乱杆菌、丙型副伤寒杆菌和汤普逊杆菌等最为多见。临床症状主要是胃肠炎。病程较短，一般2~4d, 可完全恢复。

(3) 败血症

多为猪霍乱杆菌引起，甲、乙、丙型副伤寒杆菌和肠炎杆菌亦可引起败血症。

(4) 慢性肠炎

沙门氏杆菌可引起慢性、持久性肠炎。

从食品中分离沙门氏菌样品制备

- 因为食品种类繁多，且每类中涉及许多品种。因其加工方式不同，造成性状各异。故在进行微生物学检验时，应按不同的形状、加工方式及检验目的合理进行检样处理。

检样处理

- 冷冻的检样 在检样前最佳不要解冻，将沙门氏菌的损伤降低到最低程度。
- 粉状样品 应将225ml增菌液分多次加入，并用灭菌玻棒搅拌成均匀悬液。
- 带壳蛋类 在流水下用刷子刷洗蛋类，并沥干。将蛋类在含0.1%十二烷基磺酸钠的200mg/kg Cl⁻溶液中浸泡30min后方可破壳取蛋。

检测措施

从食品中分离和鉴定沙门氏菌，目前一般采用的措施共分5个环节：

- ① **前增菌：**食品样品在具有营养的非选择性培养基中增菌，使受损伤的沙门氏菌细胞恢复到稳定的生理状态。
- ② **选择性增菌：**此培养基允许沙门氏菌连续增菌，同步阻止大多数其他细菌的增殖。
- ③ **选择性平板分离：**采用固体选择培养基，克制非沙门氏菌的生长，提供肉眼可见的疑似沙门氏菌纯菌落的辨认。
- ④ **生物化学筛选：**排除大多数非沙门氏菌，也提供了沙门氏菌培养物菌属的初步鉴定。
- ⑤ **血清学技术鉴定培养物菌种。**

(1) 沙门氏菌的增菌和分离

- **预增菌** 将制备好的预增菌试液于35℃培养24h后，轻轻振摇培养液。
- **选择性增菌**
- **选择性平板分离** 混匀培养物，用直径3mm的接种环，1满环（10ul）分别划线接种于亚硫酸铋（BS）琼脂、木糖赖氨酸去氧胆酸盐（XLD）琼脂和HEKTONE氏肠道菌（HE）琼脂平板上，于35℃培养24h后，根据沙门氏菌在不同选择性琼脂平板上的菌落特征挑取经典或可疑菌落。

(2) 沙门氏菌的筛选和生化、血清学鉴定

- ① **筛选** 用灭菌接种针挑取每个经典或可疑菌落的中心部位，分别接种三糖铁（TSI）、赖氨酸铁琼脂斜面，于35℃培养24h。

在TSI琼脂中，经典的沙门氏菌培养物可使斜面呈碱色（红色），底层呈酸色（黄色），产生H₂S（琼脂变为黑色）或不产生H₂S。

- ② **生化学、血清学鉴定**

- ③ **混杂培养物** 对呈混杂的TSI琼脂培养物，皆应划线于MC、HE或XLD琼脂上，于35℃培养24h后，进行重新分离并至少挑取2个可疑菌落接种到斜面上进行鉴定。

④ 纯培养物 将每个可疑阳性的TSI琼脂斜面培养物，分别接种于尿素肉汤中，35℃培养24h，获取多量的琼脂斜面培养物接种于迅速尿素肉汤中，于37℃水浴培养2h。弃去全部呈阳性成果的培养物，保存全部呈阴性反应的培养物作进一步鉴定。

⑤ 血清学多价鞭毛（H）试验

⑥ 血清学多价菌体（O）试验

⑦ 菌体（O）群试验

⑧ 鞭毛（H）试验阴性培养物的诱导

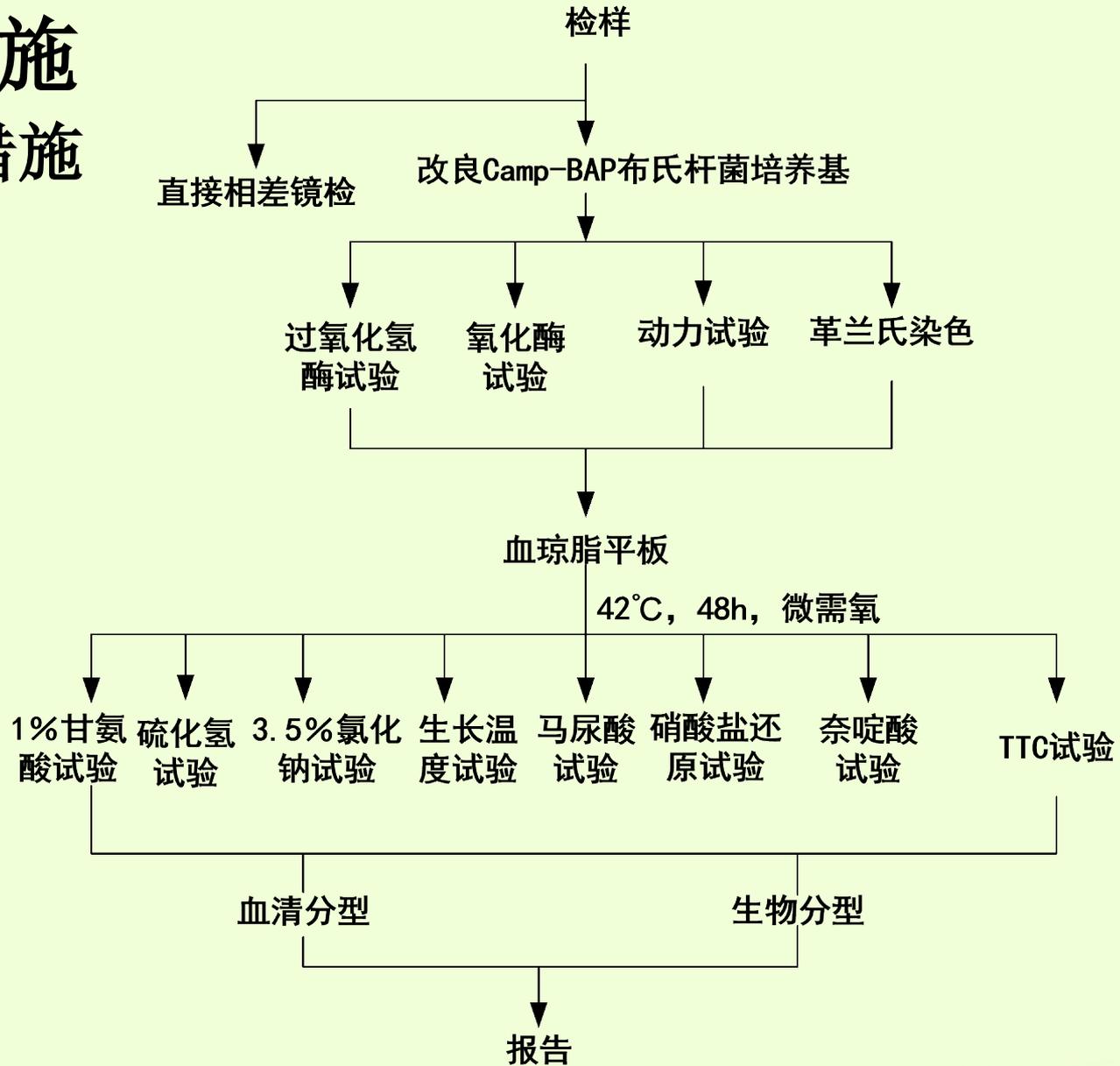
（3）成果鉴定

8.3 弯曲菌

- 弯曲菌是一组人畜共患的病原微生物，能引起人的腹泻和食物中毒，在国外已被广泛的注重，同步也被公以为新发觉的病原菌之一。
- 弯曲菌是革兰氏阴性菌，呈弧形和S型。
- 弯曲菌以病原菌和共生菌广泛存在于动物中，家禽家畜是主要的贮存宿主和传染源，在传染或带菌动物的肠道和生殖道内容物中具有大量的弯曲菌。食用被污染的食物、水，尤其是鸡、鸭、蛋，未消毒或消毒不完全的牛奶，均可致病。

检验措施

(1) 常规措施



(2) 当代检验技术

① 基因探针法

核酸杂交试验是以互补核酸链能够特异性结合并形成稳定的双链复合物为基础。基因探针系统采用的是发光剂标识的单链DNA探针，该探针与核糖体RNA结合形成稳定的DNA:RNA杂交体。选择试剂将未杂交和杂交探针分开。标识的DNA:RNA杂交作用GEN-PROBE发光仪检测。发光仪读数不小于或等于CUT-OFF值的为阳性，低于CUT-OFF值的为阴性。

② PCR法

根据弯曲菌属16sRNA高保守序列设计一对引物；在合适的反应条件和反应体系下进行反应；最终利用电泳观察成果。

③ 荧光酶标试剂盒

检测弯曲杆菌的探针是用非放射性物质标识的。标识物为发光素。靶顺序为rRNA。近年来用碱性磷酸酶人工合成的寡核苷酸检测人工污染的粪便样品，检测量为一百万个菌落形成单位（CFU），敏感性和特异性达100%。

此措施只在临床检测中应用，还未用于食品检测。

8.4 金黄色葡萄球菌

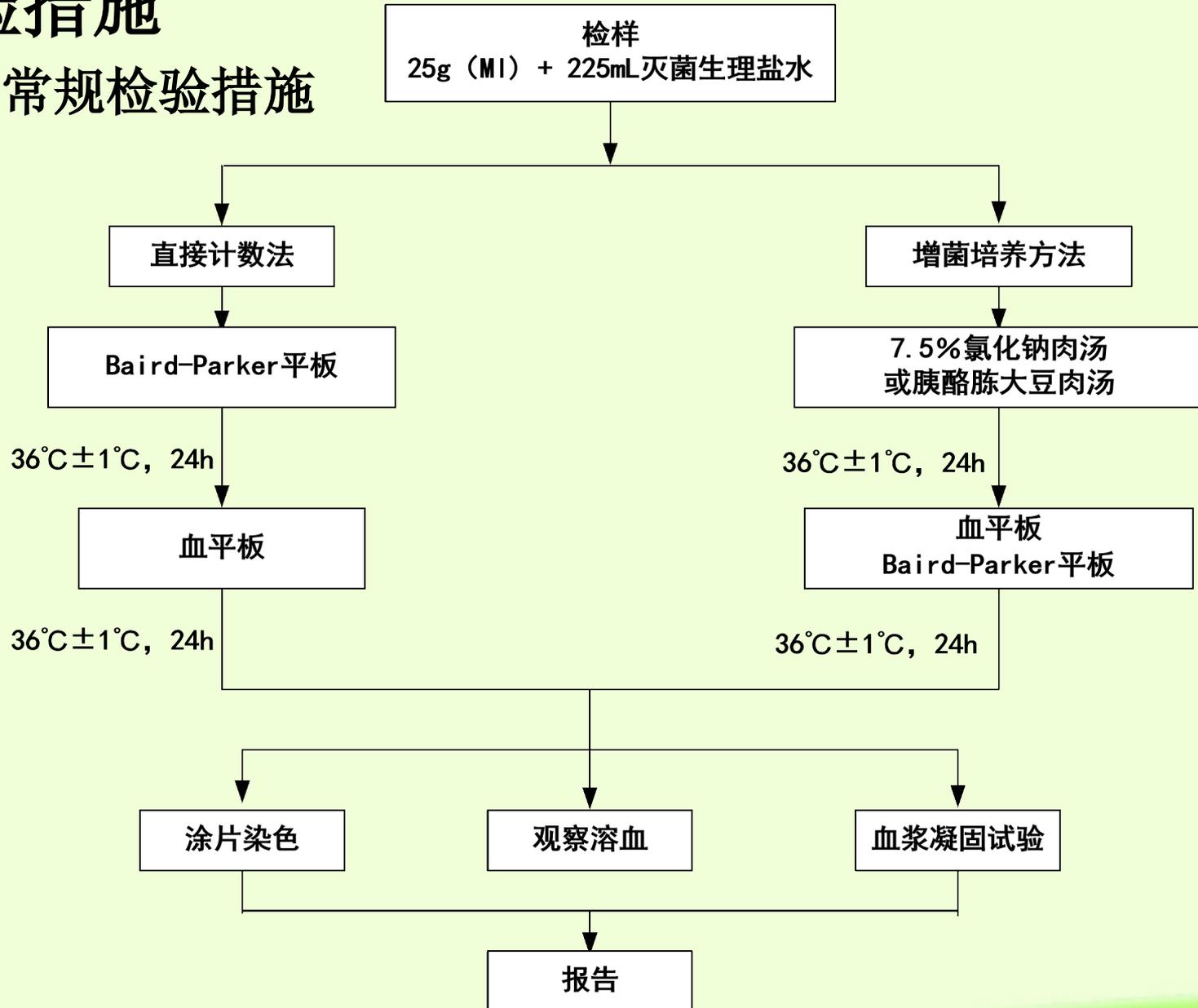
- 葡萄球菌是一类革兰氏阳性菌。它的致病力的强弱与其产生的毒素及酶类有关。人一旦感染该菌，当机体抵抗力减弱或皮肤受损时，易被感染，引起伤口化脓、中耳炎、毛囊炎等。产生葡萄球菌肠毒素的还可引起食物中毒。
- 对人有致病性的葡萄球菌多产生 α -溶血素；对动物有致病性的葡萄球菌多产生 β -溶血毒素。

- 金黄色葡萄球菌某些菌株能产生一种能引起急性肠胃炎的肠毒素，当这些菌株污染了食物，在温度条件合适时，即可产生相当数量的肠毒素，根据肠毒素的血清型别不同，分为A、B、C、D、E五型。其中以A型引起的食物中毒最多，B和C型次之。肠毒素是一种可溶性蛋白质纯化的肠毒素，能耐高温。

- 血浆凝固酶是鉴别葡萄球菌有无致病性的主要指标。血浆凝固酶具有抗原性，可分为8型。大多数致病性葡萄球菌能产生此酶，而非致病菌不产生。可应用8个型的凝固酶抗血清进行分型试验，用来研究葡萄球菌的流行病学情况。

检验措施

(1) 常规检验措施



(2) 当代检验技术

- ① 利用mini-Vidas全自动免疫分析仪，它是应用酶联免疫技术，用荧光分析技术经过固相吸附器，用已知抗体来捕获目的生物体，然后以带荧光的酶联抗体再次结合，经充分冲洗，经过激发光源检测，即能自动读出发光的阳性标本，其优点是检测敏捷度高、速度快，可在48h的时间内迅速筛选鉴定出金黄色葡萄球菌及金黄色葡萄球菌肠毒素。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/127110015154006154>