

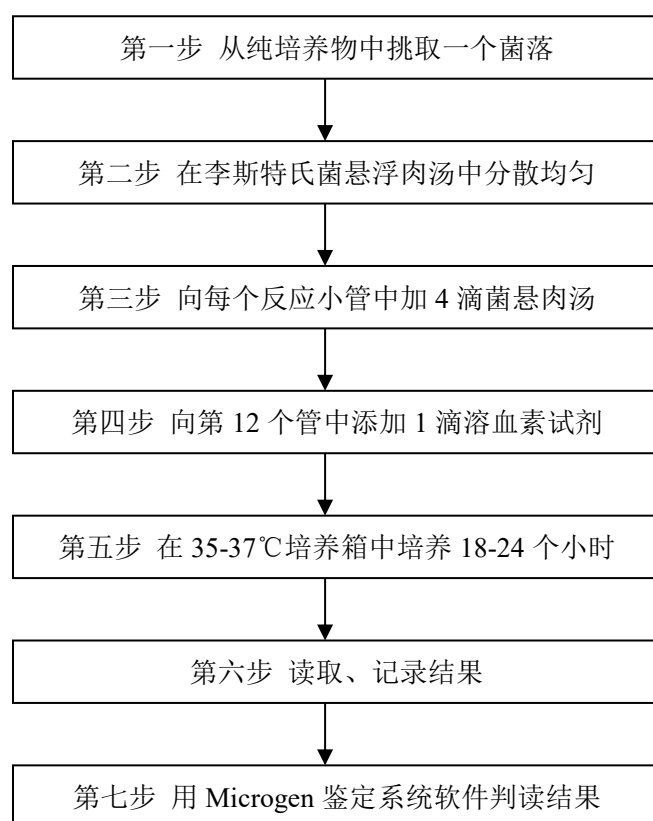
HK-MID 李斯特氏菌生化鉴定系统
(HK-MID-67 Listeria ID)

使用说明书



广东环凯微生物科技有限公司
广东省微生物研究所

鉴定流程:



HK-MID-67 Listeria ID 必须由专业的实验人员严格按各项微生物技术要求进行操作。

HK-MID-67 Listeria ID 应用了 12 种标准反应底物和 MID 鉴定系统软件来鉴定李斯特氏菌属，包括以下 6 个种：

L. monocytogenes 单核细胞增生李斯特氏菌

L. innocua 英诺克李斯特氏菌

L. welshimeri 威尔斯李斯特氏菌

L. seeligeri 西尔李斯特氏菌

L. ivanovii 绵羊李斯特氏菌

L. grayi 格氏李斯特氏菌

在使用 Listeria ID 鉴定系统时，用于鉴定的菌落可以从选择性或非选择性培养基平板上获得。该鉴定方法成功应用于国际标准方法中推荐的所有检测，无需进行其它的补充试验。

原理:

每条 Listeria ID 鉴定条包括 11 份干燥反应底物和 1 个空管，反应底物主要用来检验微生物对碳水化合物的利用，空管则用于溶血试验。鉴定条中底物的选择结合了国际标准（1，2，3）中推荐的底物以及用于确认李斯特氏菌属的反应（七叶苷水解，海藻糖和阿拉伯糖醇发酵（5，6）），和进一步辨别李斯特氏菌属内的种类的测试共同组成。

接种后的鉴定条培养 18-24 小时后通过肉眼可见的颜色变化记录结果（无需添加任何试剂），并通过 MID 鉴定系统软件分析得到鉴定结果。

HK-MID-67 Listeria ID 反应结果对照表：

管编号	底物	反应	阳性	阴性
1	七叶苷 Aesculin	水解七叶苷	黑色	黄褐色
2	甘露醇 Mannitol	发酵糖产酸使 溴甲酚紫指示 剂由紫色变为 黄色	黄色	紫色
3	木糖 Xylose			
4	阿拉伯糖醇 Arabinol			
5	核糖 Ribose			
6	鼠李糖 Rhamnose			
7	海藻糖 Trehalose			
8	塔格糖 Tagatose			
9	1-磷酸葡萄糖 Glucose-1-Phosphate			
10	甲基葡萄糖 Methyl-D-Glucose			
11	甲基甘露糖 Methyl-D-Mannose			
12	溶血素 Haemolysin	绵羊红细胞 溶血试验	黄褐色，管底 部无红细胞	管底部有一层 红细胞，但 细胞可能为红 褐色

第 12 管是空白管，滴加菌悬液后需加溶血素，然后观察溶血结果。

鉴定试剂：

原装整套试剂及用品：（20 次检测）

以铝箔袋单独包装的 20 条反应鉴定条， 20 瓶李斯特氏菌悬浮培养基， 1 瓶溶血素试剂， 结果记录报告单， 培养槽， 使用说明书。

其它必备品：（未在套装中提供）

MID 鉴定系统软件 (MID-60)， 无菌滴管和接菌环， 无风扇培养箱（35-37℃）， 冰箱（2-8℃）， 氧化酶试纸， 3%的过氧化氢（用于触酶试验，见参考文献 I）， 革兰氏染色试剂， 油性笔， 显微镜， 显微镜用玻片， 无风扇培养箱（25℃）。

储存：

未开封的鉴定条以及芽孢杆菌悬浮肉汤储存于 2-8℃ 条件，可保藏至使用有效期，溶血素试剂使用后应立即放回 2-8℃ 冰箱中保存。

使用说明：

（在使用本产品前，请参考注意事项和使用局限性）

1. 选取用于鉴定的菌落

- 1.1 用于鉴定的菌落可由任何选择性或非选择性培养基中挑取；
- 1.2 在接种到 Listeria ID 鉴定条之前，培养物必须经过检验确认其是李斯特氏菌属（革兰氏阳性短杆菌，氧化酶阴性，触酶阳性，在 25℃ 培养具有动力，但在 37℃ 培养则无动力（我们建议按照参考文献 I，用显微镜方法测定动力），或者使用 HKM® 李斯特氏菌乳胶凝集试剂（HM48）方法。

2. 接种准备

- 2.1 接种前将悬浮肉汤和鉴定条置于室温；

2.2 从培养 18-24 小时的纯培养物中挑取单个菌落，置于李斯特氏菌悬浮培养基（2.5ml）中充分混匀。

3. 接种与培养

- 3.1 将鉴定条从铝箔袋中取出，固定在鉴定条培养槽上，小心打开鉴定条的粘性封口膜；
- 3.2 用无菌滴管加 4 滴（约 100 微升）菌悬肉汤至每个反应小管；
- 3.3 培养物纯度检验：加一滴菌悬肉汤至适合的非选择性培养基平板上，置于 35-37℃ 培养箱中有氧培养 18-24 小时；
- 3.4 向管 12 中加入 1 滴溶血素试剂；
- 3.5 用粘性封口膜封住管口，放至 35-37℃ 的培养箱中培养 18-24 小时。

4. 结果分析

- 4.1 培养结束后，小心打开鉴定条的粘性封口膜，读取结果，将结果填写在结果记录报告单上；
- 4.2 读取结果可参考反应结果对照表；
- 4.3 溶血素测试应按以下步骤进行：
 - 4.3.1 检查小管的底部，若覆盖着一层清晰的血红细胞，结果为阴性，若无清晰的血红细胞层，结果为阳性；
 - 4.3.2 检查小管中的培养物，若在底部血红细胞层上方呈现透明的溶液，则结果为阴性；若底部无清晰的血红细胞层，上方出现黄褐色的均匀溶液，则结果为阳性；
 - 4.3.3 若小管结果难以辨认，则应在光源充足的地方观察；
- 4.4 用纯培养基进行接种物的活力和纯度检验；
- 4.5 在鉴定结果记录表中，所有反应都被分配在三元组中（三个反应为一组），每个反应下面均标有对应的数值 1、2、4，将每组中阳性反应对应的数值加起来将得到一个四位数编码，作为信息代码（Octal Code），将这个信息代码输入 MID 鉴定软件系统中（MID-60），系统将显示出数据库中 5 个最接近结果的菌种，从而得到鉴定结果。

结果记录报告单如下：

MICROGEN LISTERIA - ID REPORT FORM												
Lab. No. 2894			Specimen Type: GREEN SALAD			Date: 28th JANUARY 2002			MICROGEN BIOPRODUCTS			
Reaction	Oxidase	Catalase	Urease	Esculin	Mannitol	Xylose	Arabinol	Ribose	Rhamnose	Trehalose	Tagatose	Gluc-1-Phos
Result	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	4			5			4			7		
Profile No: 4547			Final Identification: <i>L. monocytogenes</i>									

注意事项：

1. Listeria ID 必须由专业的实验人员严格按各项微生物技术要求进行操作；
2. 使用过的材料必须高压灭菌，焚化或用消毒剂浸泡，然后才能丢弃；
3. 鉴定条的封口膜不能彻底密封小管，因此在培养时不能将鉴定条置于二氧化碳培养箱（可导致错误的 pH 影响）或有风扇的培养箱（可导致蒸发过量）；
4. 使用溶血素试剂时应用较好的微生物技术处理从而避免污染：
 - 必须保存在 2-8℃ 条件；
 - 避免添加溶血素的滴管与鉴定条或任何其它表面接触，用后立刻将滴管盖子盖上；若溶血素试剂变质（例如在使用过程当中受到严重污染），测试结果可能会受影响。不应使用变质

后的溶血素试剂，试剂瓶中内容物若出现明显的溶血现象，或出现较深的酒褐色，则证明试剂有变质迹象。

若溶血试验的结果不明显，应将培养物接种在羊血琼脂平板上，在 35-37℃ 条件下培养 18-25 小时，然后检查溶血结果。

使用局限性

1. 尽管针对李斯特氏菌的选择培养基可抑制大多数杂菌的生长，但类似于李斯特氏菌的细菌（芽孢杆菌、肠球菌和葡萄球菌）仍能生长；
2. *Listeria* ID 只用于鉴定李斯特氏菌属的细菌，如鉴定的培养物不能水解七叶苷或发酵海藻糖或阿拉伯糖醇，则要重新进行革兰氏染色、动力、氧化酶、触酶试验。
3. 标本或样品中可能混含有多个菌种，所以选择纯的单菌落对鉴定结果的准确性至关重要。
4. 推荐将接种物进行平板纯化培养，以便于证实接种于鉴定条的接种物为纯菌。

质量控制：

Listeria ID 的鉴定性能应用适当的质控菌株进行检验，建议用以下表格中的菌株进行独立的实验室评估。

	E S C	M A N	X Y L	A R L	R I B	R H A	T R A	T A G	G I P	M D G	M D M	H E M
<i>L.monocytogenes</i> (ATCC35152, NCTC 7973) 单核细胞增生李斯特氏菌	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>L.inocua</i> (ATCC 33090,NCTC11288) 英诺克李斯特氏菌	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>L. grayi</i> (ATCC 19120, NCTC10815) 格氏李斯特氏菌	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-

数据库：

菌种名称	ESC	MAN	XYL	ARL	RIB	RHA	TRE	TAG	GIP	MDG	MDM	HEM
<i>L.monocytogenes</i> 单核细胞增生李斯特氏菌	100	0	0	97	0	98	97	0	2	99	98	99
<i>L.inocua</i> 英诺克李斯特氏菌	100	0	1	100	0	70	100	0	0	100	100	0
<i>L.welshimeri</i> 威尔斯李斯特氏菌	100	0	95	100	0	87	100	94	0	98	94	0
<i>L.seeligeri</i> 西尔李斯特氏菌	100	0	100	100	0	0	97	0	0	100	5	93
绵羊李斯特氏菌 <i>L.ivanovii</i>	100	0	97	100	42	5	86	0	92	95	0	90
<i>L.grayi</i> 格氏李斯特氏菌	100	97	0	100	100	0	98	0	0	30	94	0

注：数据表示阳性的反应几率；灰色区为确认李斯特氏菌属的反应。

参考文献：

1. On Line Bacteriological Analytical Manual – www.FDA/CFSAN Bacteriological Analytical Manual Online, Chapter 10 –Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods.
2. Confirmation of *Listeria* species Method 11.3: 1995 CCRFA Ficrobiological Methods Manual.
3. AS/NZS 1766.2.15:1998 Examination for specific organism-*Listeria monocytogenes* in dairy products.

4. Rodriguez L.D., J.A. Vazquez Boland, if Fernandez Garayzabal, P. Echalecu Tranchant, E.Gomez-Lucia, E.F. Rodriguez Ferri and G. Suarez Fernandez.1986 A Microplate Technique to Determine Hemolytic Activity for Routine Typing of *Listeria* Strains.24:99-103.
5. Mira-Gutierrez J. and C. Perz De Lara and M.A. Rodriguez-Iglesias.1990. Identification of species of the genus *Listeria* by fermentation of carbohydrates and enzymatic patterns. *Acta Microbiologica Hungarica*37:123-129.
6. Wilkinson B.J. and D.Jones.1977. A Numerical Taxonomic Survey of *Listeria* and Related Bacteria. *H.Gen. Microbiol.*98:399-421.
7. Lapage S.P., S.Bascombe, W.R. Willcox and M.A. Curtis.1973 identification of Bacteria by Computer: General Aspects and Perspectives *J.Gen. Microbiol.*77:273-390.