



肉毒梭菌实验室检测方案

广州千江实验技术有限公司

联系我们：020-87354856

传 真：020-87378977

肉毒梭菌

- 肉毒梭状芽孢杆菌是一种厌氧，棒状、形成孢子的细菌，它产生的蛋白质具有神经毒性。在某些情况下，这些微生物可能会在食品中产生毒素。肉毒杆菌中毒是一种严重的食物中毒事件，虽然这种案例是罕见，但其死亡率非常高。在美国，共记录了962例肉毒杆菌暴发事件，从1899年到1990年共有2320案例，导致1036人死亡。其中A型384人，B型106人，E型105人，F型2人；其中一次暴发事件同时涉及A型和B型。而C型和D型的报告有限，科研界已经质疑其是否病原体。据推测，这些毒素不容易在人体肠道吸收，也有可能是各类动物肉毒毒素中毒的重要原因。



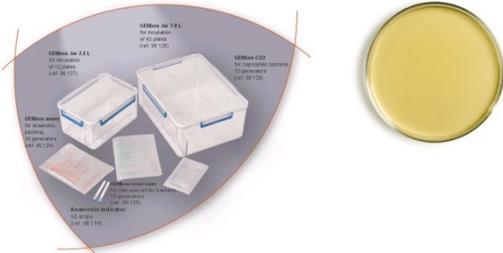
FDA BAM和SN 2525-2010 标准流程



两管庖肉培养基 (35°C) + 两管TPGY (28°C) 各15mL 加入1~2g固体或1~2ml液体食品，培养5天。



无水乙醇去除营养体 1h



用接种环取1环~2环经乙醇或加热处理的培养物在厌氧卵黄琼脂上划线接种，置**厌氧**条件下35°C±1°C培养48h。



挑取阳性菌落 (可用API 20A鉴定) ，进行小鼠毒性试验。



增菌流程

- 样品准备：冷藏样品直至测试。未开封的罐头食品不需要冷藏，除非胀气严重，有爆破的危险。固体和液体食物。液态检样可直接离心。固态或半流动样品需加适量明胶磷酸盐缓冲液，浸泡、研碎，然后离心，取上清液进行检测。
- 增菌：接种前，先将增菌培养基煮沸10min ~ 15min，以排除溶解氧，迅速冷却，切勿摇动。
 - 接种两管各15mL庖肉培养基，加入1~2g固体或1~2ml液体食品，在35°C培养。
 - 接种两管各15mLTPGY如上假如样品，置28±1°C，厌氧培养5d。当致病菌疑似B、E和F非水解型的菌株时，使用TPGYT。
 - 慢慢将接种环从肉汤顶部插入至底部。五天接种后，检查浑浊度、产气、肉粒消化度。注意气味。
 - 如果5天没有生长，额外培养10天，以保证受损孢子的延迟生长。对于纯培养物，调一环平缓期培养物至冰箱冷藏。

相关产品：

货号	名称	品牌	规格
M149-500G	庖肉培养基	HIMEDIA	500g
M969-500G	胰蛋白胨葡萄糖酵母浸膏肉汤	HIMEDIA	500g

分离流程

- 分离培养：取1mL ~ 2mL 培养液置于螺旋帽试管中，加入等量过滤除菌的无水乙醇。混匀，在室温下放置 1h。或80°C加热10min ~ 15min以破坏其繁殖体。用接种环取1环 ~ 2 环经乙醇或加热处理的培养物在厌氧卵黄琼脂上划线接种，置厌氧条件下35°C±1°C培养48h。
- 观察：肉毒梭菌的菌落为隆起或扁平，光滑或粗糙，容易蔓延生长并有不规则边缘。在卵黄培养基上用斜射光检查时，菌落表面通常呈虹彩样，亦称为珠色层。彩带通常向外延伸，继而菌落产生不规则外形。肉毒杆菌C、D和E的菌落通常带哟为2~4mm 黄色沉淀圈。A和B的通常带有更窄的沉淀圈。不产毒素的梭菌通常也有类似的菌落特征，因此不容易分辨。★可用20A筛选鉴定。

相关产品：

货号	名称	品牌	规格
M1043-500G	卵黄琼脂基础	HIMEDIA	500g
FD045-100MLX1VL	卵黄添加剂	HIMEDIA	100ml
20300	API 20A厌氧菌鉴定条	bioMerieux	25测试
96128	GENbox培养盒 7.0L	bioMerieux	1盒
96124	厌氧产气包	bioMerieux	10包
96118	厌氧产气条	bioMerieux	50条

毒素检测

- 纯培养：挑取10个典型菌落，检测毒素。
- 毒素检测：取食品上清液、液体食品或TPGY培养物进行毒素测试。请勿用TPGYT（会降解毒素）。调整至pH6.2用1N的 NaOH或HCL。添加0.2 ml 水溶性胰蛋白酶溶液至1.8ml上述液体中。35~37°C培养1h，偶尔轻轻摇动。按照GB/T 4789.12-2003进行小鼠实验。
- 保存：接种至对应肉汤：E型TPGY，其他型庖肉培养基。培养5天。接种双份卵黄培养基，一份35%厌氧培养培养，另一份35°C需氧培养。如果 *C. botulinum* 典型菌落只在厌氧培养培养基中发现，则为纯培养。用玻璃珠或冻干工艺，冷藏条件下保持孢子状态保存。

相关产品：

货号	名称	品牌	规格
M1043-500G	卵黄琼脂基础	HIMEDIA	500g
FD045-100MLX1VL	卵黄添加剂	HIMEDIA	100ml
M149-500G	庖肉培养基	HIMEDIA	500g
CRYO/M	菌株保存管	bioMerieux	64管

注意事项

- 门上放置生物危害标志，限制进入。实验室里的人的数量保持最低限度。
- 在实验室中所有实验员应佩戴实验室外套和安全眼镜。
- 使用1%次氯酸钠溶液擦拭使用前后的实验室台面。
- 不要使用口吸移液管，必须使用机械移液器。
- 使用生物安全柜操作。
- 使用密封安全杯离心生物毒性物质。
- 独立操作有毒物质，并马上灭菌处理。
- 不要独自一人在实验室或动物房工作，特别是下班后或周末。
- 有脚踏洗眼和洗手装置。
- 进行试验时，请勿在实验室进食。
- 在一个非常显眼的位置，列出紧急治疗的电话号码。这很重要！
- 减少实验室的杂物。