

**2018 年国家食品污染物和有害因素
风险监测工作手册
(下卷)**

国家食品安全风险评估中心

2018 年 1 月

适用范围

本工作手册适用于 2018 年国家食品安全风险监测计划中所有涉及卫生计生委开展的内容，为微生物检测方法标准操作程序。

本工作手册也适用于 2018 年国家食品安全风险监测计划中所有其他食品安全监管部门与卫生计生委共同监测项目。

目 录

第六章 微生物检测方法标准操作程序	1
第一节 微生物检测标准操作程序总体要求	1
一、样品接收	1
二、样品的标识和贮存	1
三、检验样品的准备	1
四、样品检验和数据处理	2
五、菌株保存	3
六、检验后样品的处理	4
七、检验方法的具体要求	4
第二节 卫生指示菌标准操作程序	25
一、菌落总数标准操作程序	25
第一法 平板计数法	26
第二法 测试片法	30
二、大肠菌群计数标准操作程序	33
第一法 MPN 计数法	34
第二法 平板计数法	36
第三法 测试片法	38
三、大肠埃希氏菌计数标准操作程序	43
第一法 大肠埃希氏菌 MPN 计数	46
第二法 大肠埃希氏菌平板计数法	49
四、霉菌和酵母菌检验标准操作程序	58
第一法 霉菌和酵母平板计数法	59
第二法 霉菌直接镜检计数法	62
五、肠杆菌科检验标准操作程序	64
第一法 肠杆菌科平板计数法	67
第二法 肠杆菌科 MPN 计数法	70
第三节 食源性致病菌检验标准操作程序	80

一、克罗诺杆菌属（原阪崎肠杆菌）检验标准操作程序	80
第一法 定性检验	81
第二法 MPN 计数法	83
二、创伤弧菌检验标准操作程序	91
第一法 定性检验	92
第二法 MPN 计数法	99
三、大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验标准操作程序	108
第一法 常规培养方法	110
第二法 免疫磁珠捕获方法	113
四、单核细胞增生李斯特氏菌检验标准操作程序	123
第一法 定性检验	124
第二法 平板计数法	128
第三法 MPN 计数法	132
五、副溶血性弧菌检验标准操作程序	140
六、霍乱弧菌检验标准操作程序	160
七、金黄色葡萄球菌检验标准操作程序	167
第一法 定性检验	168
第二法 平板计数法	171
第三法 MPN 计数法	174
八、蜡样芽胞杆菌检验标准操作程序	184
第一法 蜡样芽胞杆菌平板计数法	186
第二法 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法	192
九、沙门氏菌检验标准操作程序	201
第一法 定性检验	203
第二法 MPN 计数法	211
十、铜绿假单胞菌检验标准操作程序	229
十一、弯曲菌检验标准操作程序	236
十二、小肠结肠炎耶尔森氏菌检验标准操作程序	256
十三、志贺氏菌检验标准操作程序	266
十四、致泻大肠埃希氏菌检验标准操作程序	282

十五、产气荚膜梭菌检验标准操作程序.....	302
第四节 病毒检验标准操作程序.....	311
诺如病毒检验标准操作程序.....	312
第五节 寄生虫检验标准操作程序.....	317
一、并殖吸虫检验标准操作程序.....	317
二、东方次睾吸虫检验标准操作程序.....	320
三、颚口线虫检验标准操作程序.....	322
四、广州管圆线虫检验标准操作程序.....	324
五、华支睾吸虫检验标准操作程序.....	326
六、棘口吸虫检验标准操作程序.....	328
七、牛带绦虫囊尾蚴检验标准操作程序.....	330
八、旋毛虫检验标准操作程序.....	332
九、异尖线虫检验标准操作程序.....	335
十、猪带绦虫囊尾蚴检验标准操作程序.....	337
(一) 镜检法.....	337
(二) 多重 PCR.....	339

第六章 微生物检测方法标准操作程序

第一节 微生物检测标准操作程序总体要求

一、样品接收

1. 当样品送达实验室后，应立即对照采样单核查样品，确保样品的相关信息完整并符合检验要求。核查内容包括：

- (1) 样品数量；
- (2) 包装是否完整；
- (3) 采集样品的种类与采样方案的要求是否一致；
- (4) 样品容器上的标记是否清晰可辨；
- (5) 样品保存条件是否符合运输要求；
- (6) 干燥样品是否受潮和有细菌增殖征象；
- (7) 冷冻样品是否融化；
- (8) 易腐样品有无腐败现象。

记录样品核查结果并由核查人签字。若发现异常，不能接收，应重新采样送检。

2. 样品量不能少于规定数量，特殊情况送样量不足应说明。

二、样品的标识和贮存

1. 样品标识

样品应有正确、清晰的唯一性和状态标识，保证样品在检测过程中不被混淆。

2. 样品保存

实验室接到样品后，应立即对样品进行检验；如果检验不能及时进行，应将样品在接近原有贮存温度条件下贮存并尽快检验。一般情况下易腐样品 $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 不超过24h。

三、检验样品的准备

1. 检验用培养基、试剂、标准物质和相关仪器设备应定期进行适用性核查；
2. 样品的全部制备过程均应遵循无菌操作程序；

3. 开启样品容器前，先将容器表面擦干净，然后用75%酒精消毒开启部位及其周围；

4. 确保所有待检样品都在保质期内且冷冻食品在检验前未解冻；

5. 如果检验过程出现了不可接受的偏差而终止，就要重新采样。

6. 各类食品的检验准备

(1) 冷冻样品检验前应先融化。应在原装容器内 45℃以下不超过 15 min 或在 2℃~5℃不超过 18h 解冻。一旦解冻就不能再次冷冻；

(2) 检验液体或半固体样品，取样前应先将其充分摇匀；

(3) 检验干燥粉状或颗粒状样品前，应先混合均匀；

(4) 固体样品，取样品的可食用部分进行检测。可用无菌镊子、剪刀剪碎，将样品搅拌均匀。如是动物性样品，避免取骨头作为检样。

7、各类样品的称（量）取

(1) 非粘性液体样品（粘度不大于牛乳），可直接用吸管吸取一定量，加于适量的稀释液或培养基内，混合均匀。吸管插入样品内的深度不应超过 2.5cm，不得将吸有样品的吸管浸入稀释液或培养基内；

(2) 粘性液体样品，可使用灭菌容器称取一定量，然后加入适量的稀释液或培养基，混合均匀；

(3) 粉状的固体和半固体样品，无菌操作准确称取一定量($\pm 0.1g$)，再加适量的稀释液或培养基进行均质（1min~2min）。

(4) 剪碎搅拌均匀后的固体样品，无菌操作准确称取一定量($\pm 0.1g$)，加入适量的稀释液或培养基进行均质（1min~2min）。

均质后的样品应在 15min 内接种完毕。

四、样品检验和数据处理

1. 必须严格按照《微生物检验标准操作程序》中规定的方法进行检验。

2. 检验过程中，接触食品、食品稀释液、培养基的一切器皿必须经过有效的清洁和灭菌处理。所有检验操作，必须严格遵循无菌操作程序和生物安全相关规定。

3. 检验过程中依据目的不同，应设置阳性对照、阴性对照和/或空白对照；

4. 检测人员对检测方法中的计算公式应正确理解，保证检测数据的计算和转换不出差错，计算结果应进行自校和复核。

5. 检测结果应使用检测方法规定的数量单位。
6. 采用计算机控制的自动化设备进行检测数据的采集、处理、记录、结果打印、储存、检索时，应保证数据完整不丢失；配备符合要求的工作条件和环境条件，使设备的功能正常和安全运行；当所使用的软件发生修改后，应重新进行适当的培训；采取有效措施，防止非法访问、越权使用和随意修改，保障计算机应用的各级授权正常有效。
7. 进行数据处理软件投入使用前或修改后继续使用前的测试验证或检查，确认满足使用要求后方可运用。

五、菌株保存

对于每个阳性样品，保存检出的食源性致病菌分离株，以便用于进一步的研究；分离菌株的编号应具有唯一性，标识清楚；标签应防水、字迹耐冻；各省级实验室应建立食源性致病菌菌种库，妥善保存食源性致病菌分离株。

推荐常见的食源性致病菌菌株保藏方法有以下 2 种：

1. 甘油冷冻保藏法

(1) 保藏时间

本方法适合于菌种的长期保藏，保藏时间可达 10 年以上。

(2) 方法

在充分加热混匀的 BHI(弧菌保存时 BHI 中 NaCl 应加至 3%)中加入甘油，使甘油达总体积的 40%~50%，充分混合，分装至菌种保存管(2 mL 左右)，121 °C 高压 20 min，备用；使用无菌棉签从非选择性平板上取新鲜纯培养菌落，加入装有 BHI 和甘油的无菌冻存管中，混匀后，-80°C 保存(若无-80°C 冰箱，可选择-40°C 保存，但保存效果较差)。

(3) 注意事项

每株菌至少保存 2 管，分别放置在 2 个不同冻存盒中，一盒日常使用，另外一盒长期保存；使用时，取出相应的冻存盒，快速接种，以避免反复冻融；使用时，无菌操作，避免污染。

2. 半固体保藏法

(1) 保藏时间

本方法适合于短期菌种保藏，保藏时间一般为 3~6 个月。

（2） 方法

无菌操作，挑取待保藏的菌种，穿刺接种约含 5 mL 无菌半固体营养琼脂或半固体脑心浸液琼脂（弧菌保存时 BHI 中 NaCl 应加至 3%）的小试管（约 15 mm×100 mm）中。无菌操作吸取灭菌液体石蜡，加入已培养好的菌种上面，液体石蜡用量以高出半固体 1 cm 为准，使菌种与空气隔绝。将试管直立，置 4 ℃ 或室温（弧菌）下保存。

（3） 注意事项

弧菌保存的培养基中的 NaCl 量应加至 3%；

弧菌应放置室温保存。

3. 其他方法

也可以购买商品化的菌种保存管保存菌株，具体方法见生产厂家提供的操作指南。

六、检验后样品的处理

检验结果报告后，被检样品方能处理。

确定有问题项目的预包装产品，应至少保存检样 3 个月，并留电子版样品照片，以便信息核对。

检出致病菌的样品要经过无害化处理。

七、检验方法的具体要求

检验方法按照本手册要求进行，依据相关限量标准、本地区既往监测结果、食品污染程度等合理选择样品的稀释度，以便对检测结果进行评价和分析。具体检验要求如下。

(一) 常规监测

表 1 特殊膳食食品

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
婴幼儿配方食品	肠杆菌科（定性和定量）	定量：第一法 肠杆菌科平板计数法（GB 4789.41-2016）	10 CFU/g	1. 为保证检样的代表性，取样前将样品充分混匀。 2. 用 75%酒精棉球消毒袋口（罐口、瓶口），使用灭菌剪刀或开罐器等无菌开口。 3. 无菌开口后直接用灭菌勺等从表层和深层（四角和中央）多点取样。	——
		定性：参考平板法，见备注。	/10g		——
	单核细胞增生李斯特氏菌	第一法 定性检验（GB 4789.30-2016）	/25g		——
	克罗诺杆菌属（原阪崎肠杆菌）	第一法 定性检验（GB 4789.40-2016）	/100g		——
	蜡样芽胞杆菌（定量）	第一法 平板计数法（GB 4789.14-2014）	10 CFU/g		——
婴幼儿谷类辅助食品	肠杆菌科（定性和定量）	定量：第一法 肠杆菌科平板计数法（GB 4789.41-2016）	10 CFU/g	3. 无菌开口后直接用灭菌勺等从表层和深层（四角和中央）多点取样。	——
		定性：见备注。	/10g		——
	单核细胞增生李斯特氏菌	第一法 定性检验（GB 4789.30-2016）	/25g		——
	克罗诺杆菌属（原阪崎肠杆菌）	第一法 定性检验（GB 4789.40-2016）	/100g		——
	蜡样芽胞杆菌（定量）	第一法 平板计数法（GB 4789.14-2014）	10 CFU/g		——
特殊医学用途婴儿配方食品	肠杆菌科（定性和定量）	定量：第一法 肠杆菌科平板计数法（GB 4789.41-2016）	10 CFU/g		——
		定性：参考平板法，见备注。	/10g		——

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
	克罗诺杆菌属（原阪崎肠杆菌）	第一法 定性检验（GB 4789.40-2016）	/100g		——
	蜡样芽胞杆菌（定量）	第一法 平板计数法（GB 4789.14-2014）	10 CFU/g		——
	生孢梭菌	第一法 定性检验（监测工作手册）	/25g		——
特殊医学用途配方食品	菌落总数（不适用于添加活性菌种的产品）	第一法 平板计数法（GB 4789.2-2016）	10 CFU/g		——
	大肠菌群	第二法 平板计数法（GB 4789.3-2016）	10 CFU/g		——
	金黄色葡萄球菌（定量）	第二法 平板计数法（GB 4789.10-2016）	10 CFU/g		——
	沙门氏菌	第一法 定性检验（GB 4789.4-2016）	/25g		——
	生孢梭菌	第一法 定性检验（监测工作手册）	/25g		——

注：1.根据污染情况，选择适当的稀释度，必须上报具体数值（不得报送为“不可计数”）。

2.直接取平板法的稀释液（25g 样品放入盛有 225mLBPW，制成 1：10 的样品匀液）100mL，置无菌培养瓶 36℃±1℃过夜培养，换线接种 VRBGA 平板，进行肠杆菌科的定性检测——相当于取 10 克样本进行定性检测。

表 2 肉与肉制品

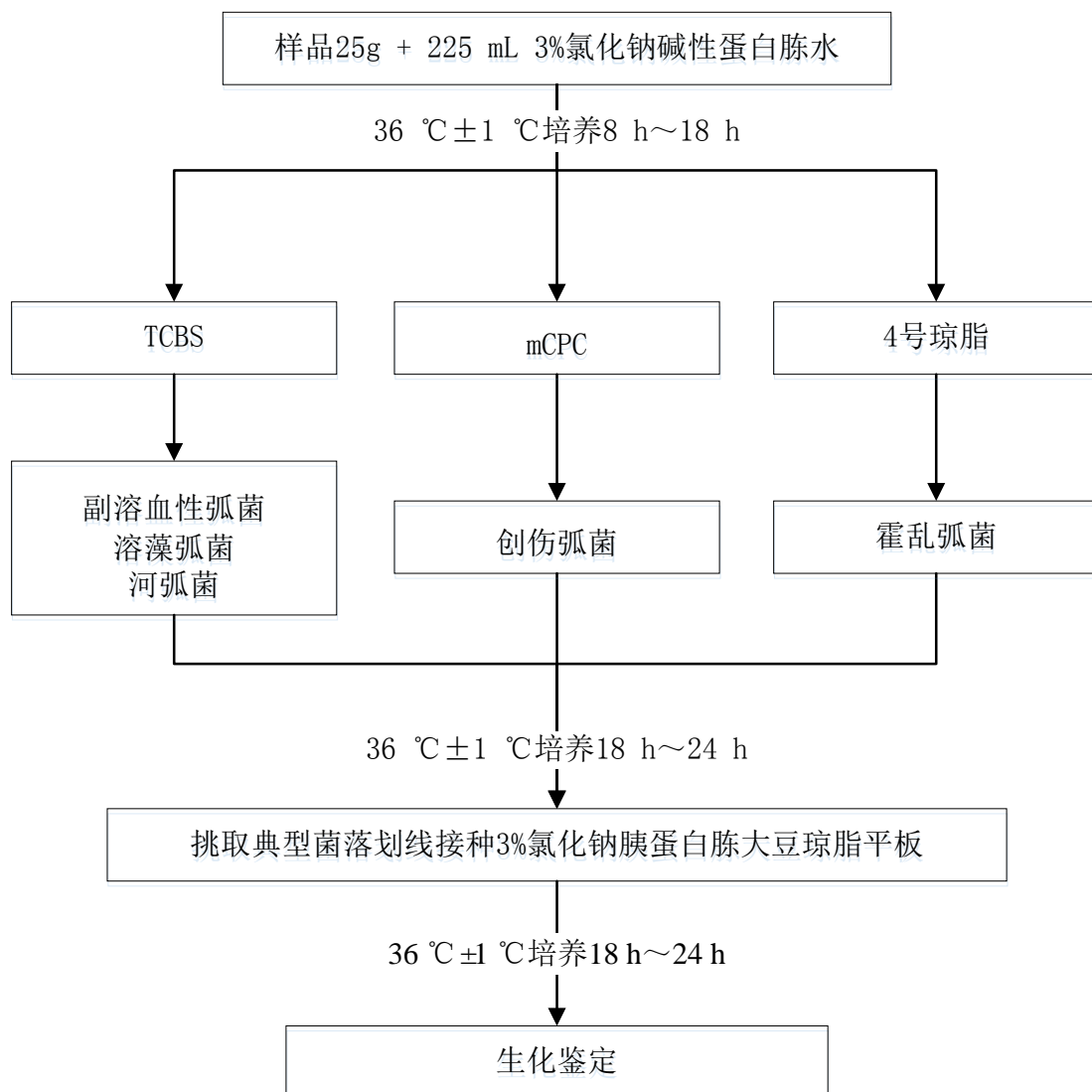
食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
生禽肉（鸡肉、鸭肉等）	单核细胞增生李斯特氏菌	第一法 定性检验 (GB 4789.30-2016)	/25g	<ol style="list-style-type: none"> 禽胴体：无菌操作取禽胴体不同部位（脖子、胸、腿和肛门）处剪取肉和皮共 100g 以上，均质 2min，分别称取 25g 用于单核细胞增生李斯特菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、致泻性大肠埃希氏菌和产气荚膜梭菌检验；剩余禽胴体加入 Preston 增菌肉汤漂洗，按照每公斤鸡肉 500 毫升 Preston 增菌肉汤的量加入，充分洗涤后取漂洗液检验弯曲菌（方法见监测网工作手册）。 分割禽肉：多块分割禽肉一起揉搓，从不同禽块上剪取至少 100g 的肉和皮，均质 2min，分别称取 25g 进行单核细胞增生李斯特菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、致泻性大肠埃希氏菌和产气荚膜梭菌检验；剩余的分割禽肉（大于 100g）依照上法用 Preston 肉汤漂洗后进行弯曲菌检验。 冷冻样品应在 45℃ 以下不超过 15 min，或 2℃~5℃ 不超过 18 h 解冻后进行检验。 	禽胴体为一只完整个体进行所有项目的检测；分割整块禽肉采集一个批次作为一份样品。
	弯曲菌	监测网工作手册-2018 直接过滤法（中国 CDC 传染病所）	——		
	小肠结肠炎耶尔森氏菌（选做）	监测网工作手册 (GB 4789.8-2016)	/25g		
	致泻大肠埃希氏菌	监测网工作手册-2018	/25g		
	产气荚膜梭菌（选做）	监测网工作手册 (GB 4789.13-2012)	/25g		

表 3 水产及其制品

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
生食鱼类	单核细胞增生李斯特氏菌（定性和定量）	第一法 定性检验（GB 4789.30-2016） 第二法 平板计数法（GB 4789.30-2016） 第三法 MPN 计数法（GB 4789.30-2016）	/25g 10 CFU/g 0.3 MPN/g	主要取样部位为鱼的表皮组织和肉，可适当包括鱼鳃、鱼肠、鳞等。	为风险评估提供数据支持，需要对同一样品进行 3 个方法的检测，即定性检验，和定量检测和平板法和 MPN 法。
动物性水产品/动物性海水产品	副溶血性弧菌	第一法 定性检验（GB 4789.7-2013） （副溶血性弧菌的毒力基因：见监测工作手册）	/25g	1. 鱼类：主要取样部位为鱼的表皮组织和肉，适当包括鱼鳃、鱼肠、鳞等。 2. 虾类：取样部位应包括虾壳、肉、头胸节内的内脏和腹节外延处的肠管。 3. 蟹类：取样部位应包括肉、胃和鳃条等。 4. 个体较大的动物性水产品以一个个体为单位单独取样；个体较小的鱼类、虾、蟹等，混合采取样品。取样部位为内容物（应包括肠、消化腺）。	样品于室温（25-30℃）运送至实验室，接收样品后必须当日检测，以避免弧菌的损伤/死亡。
	创伤弧菌	见备注。			
	霍乱弧菌	见备注。			
	溶藻弧菌	见备注。			
	河弧菌	见备注。			
螺	单核细胞增生李斯特氏菌	第一法 定性检验（GB 4789.30-2016）	/25g	取样部位为内容物（应包括肠、消化腺）。	——

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
	沙门氏菌	第一法 定性检验 (GB 4789.4-2016)	/25g		——
	副溶血性弧菌	第一法 定性检验 (GB 4789.7-2013) (副溶血性弧菌的毒力基因: 见监测工作手册)	/25g		<ol style="list-style-type: none"> 1. 建议选择个别能力较强的地市级, 对部分样品同时进行副溶血性弧菌定性 (25g) 和定量检测; 2. 接收样品后必须当日检测, 以避免弧菌的损伤/死亡。
	创伤弧菌	见备注			
	霍乱弧菌				
	溶藻弧菌				
双壳贝类	诺如病毒		监测工作手册 2018	——	
甲肝病毒	——	——			

流程图



常见弧菌不同选择性琼脂平板上的菌落特征

菌种	TCBS	mCPC	4 号琼脂
1. 创伤弧菌	圆形、半透明、表面光滑的绿色菌落,直径 2-3mm	圆型、扁平、中心不透明、边缘透明的黄色菌落,直径 1-2mm	NG
2. 副溶血弧菌	圆形、半透明、表面光滑的绿色菌落,直径 2-3mm,用接种环轻触,有类似口香糖的质感。	NG	NG
3. 霍乱弧菌	圆形、半透明、表面光滑的黄色菌落,直径 2-3mm	圆型、紫色菌落	圆形、半透明、表面光滑的无色菌落,菌落中心常呈灰色或灰黑色,并随培养时间延长而加深
4. 溶藻弧菌	圆形、半透明、表面光滑的黄色菌落,直径 2-3mm	NG	NG
5. 河弧菌	圆形、半透明、表面光滑的黄色菌落,直径 2-3mm	NG	NG

注:

1. NG: 不生长或生长很差。
2. 每种菌均需从选择性琼脂平板上分别挑取 3~5 个典型或可疑菌落进行下一步的实验。
3. 可选择弧菌显色培养基进行前四种菌的选择性分离,但河弧菌必须使用 TCBS (显色培养基效果不佳)。

表 4 两栖及爬行类

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
甲鱼	创伤弧菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、河弧菌	具体见“水产及其制品”中的“动物性淡水产品/动物性海水产品”	—	以一个个体为单位，涂抹取样，使用无菌棉签涂抹体表褶皱处(裙边)和泄殖腔，直接接种于 10mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水增菌液中，增菌后划线分离。	接收样品后必须当日检测，以避免弧菌的损伤/死亡。
蛙			/25g	个体较大的蛙以一个个体为单位单独取样；个体较小的蛙混合采取样品。主要的取样部位为蛙的表皮组织、肉、肠等。	

表 5 蛋与蛋制品

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
鲜蛋	大肠埃希氏菌计数	第二法 平板计数法（GB 4789.38-2016）	<p>1 蛋壳</p> <p>1.1 鸭蛋等（6枚） <u>50 CFU/枚</u></p> <p>1.2 鹅蛋等（3枚）： <u>100 CFU/枚</u></p> <p>1.3 鹌鹑蛋、鸽子蛋等（12枚）： <u>25 CFU/枚</u></p> <p>2 蛋内容物</p> <p><u>10 CFU/g (mL)</u></p>	<p>分别检测蛋壳和蛋内容物。</p> <p>1. 蛋壳：按蛋的大小，取鸭蛋 6 枚（鹅蛋 3 枚、鹌鹑蛋/鸽子蛋等至少 12 枚），放入装有 300mL 无菌 BPW 的无菌袋中，浸泡 10min，反复轻揉 1min 后无菌取出蛋样品，洗液混匀后用于下一步检验。</p> <p>2. 蛋内容物：取在上述步骤中经 BPW 洗过的 6 枚鸭蛋（鹅蛋 3 枚、鹌鹑蛋/鸽子蛋等至少 12 枚），在流水下洗净，待干后置 75%</p>	<p>1 蛋壳：取蛋壳洗液进行检验。</p> <p>1.1 大肠埃希氏菌计数</p> <p>平板法：取洗液 1mL，平行接种 5 个平板，每个平板涂布 0.2mL，计 5 个平板的合计菌落数。若样品污染状况严重，建议取 25mL 洗液进行十倍稀释后，选择适宜稀释度按照上述步骤进行检测。检测结果进行公式换算：菌落数×稀释倍数×300/具体检测用蛋数量（如果是洗液未经稀释直接检测则公式为：菌落数×300/具体检测用蛋数量），结果报告为 CFU/枚。</p> <p>1.2 沙门氏菌</p> <p>剩余洗液直接进行沙门氏菌检测，结果报告检出/未检出沙门氏菌。</p> <p>2 蛋内容物：取蛋黄和蛋清混合液进行检验。</p> <p>2.1 大肠埃希氏菌计数</p> <p>平板法：取检样 25g (mL)，按照 GB 4789.38 进行检验，结果报告为 CFU/g (mL)。</p>

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
	沙门氏菌	第一法定性检验 (GB 4789.4-2016)	——	的酒精浸泡 30~60s, 取出置于生物安全柜中晾干, 酒精棉球擦拭气室端蛋壳, 用无菌镊子敲碎气室位置的蛋壳, 捅破内层卵壳膜, 无菌取出蛋内容物, 混匀用于下一步检验。	2.2 沙门氏菌: 取检样 25g (mL) 进行检验。

表 6 焙烤及油炸类食品

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
中式糕点	菌落总数	第一法 平板计数法 (GB 4789.2-2016)	10 CFU/g	<p>为保证检样的代表性, 取样前将样品充分混匀, 无菌开口后多点 (四角和中央) 取样; 不能混匀的, 无菌开口后直接用灭菌刀 (勺) 从表层和深层多点取样。</p> <p>1 散装 (包括自行简易包装)</p> <p>1.1 散装: 直接无菌打开采样袋。</p> <p>1.2 自行简易包装: 用 75% 酒精棉球消毒袋口 (罐口、瓶口), 使用无菌剪刀或开罐器等无菌开口。</p> <p>2 预包装: 用 75% 酒精棉球消毒袋口 (罐口、瓶口), 使用灭菌剪刀或开罐器等无菌开口。</p>	——
	大肠菌群	第二法 平板计数法 (GB 4789.3-2016)	10 CFU/g		——
	金黄色葡萄球菌 (定量)	第二法 平板计数法 (GB 4789.10-2016)	10 CFU/g		——
	沙门氏菌	第一法 定性检验 (GB 4789.4-2016)	/25g		——

表 7 冷冻饮品

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
冰淇淋、雪糕、冰棍等	菌落总数	第一法 平板计数法 (GB 4789.2-2016)	10 CFU/g	1 样品在原装容器内, 置 45 °C 以下不超过 15 min 或在 2°C~5°C 不超过 18h, 待其稍融化后称取可食部分进行检验。一旦融化, 不能再次冷冻。 2 ① 散装: 混匀样品后多点 (四角和中央) 取样; 不能混匀的, 直接用灭菌刀 (勺) 从表层和深层多点取样。 ② 自行简易包装、预包装: 用 75% 酒精棉球消毒袋口或盒盖, 无菌开口从表层和深层多点取样。	—
	大肠菌群	第二法 平板计数法 (GB 4789.3-2016)	10 CFU/g		—
	单核细胞增生李斯特氏菌 (定性和定量)	第一法 定性检验 (GB 4789.30-2016) 第三法 MPN 计数法 (GB 4789.30-2016)	/25g 0.3 MPN/g		定量检测: 检样量 3.33 g (mL)。
	金黄色葡萄球菌 (定量)	第二法 平板计数法 (GB 4789.10-2016)	10 CFU/g		—
	沙门氏菌	第一法 定性检验 (GB 4789.4-2016)	/25g		—

注: 根据污染情况, 选择适当的稀释度, 必须上报具体数值 (不得报送为“不可计数”)。

表 8 坚果与籽类及其加工制品类

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
坚果 / 籽类的酱	大肠菌群	第二法 平板计数法 (GB 4789.3-2016)	10 CFU/g	取样前将样品充分混匀取样。 1 散装 (自行简易包装): 直接无菌取样。 2 预包装: 用 75% 酒精棉球消毒袋口 (罐口、瓶口、袋口), 使用灭菌剪刀或开罐器等无菌开口。 无菌操作取 25g 样品, 按照手册或国标方法进行检测。	
	霉菌	监测网工作手册 (GB 4789.15-2016)	10 CFU/g		
	单核细胞增生李斯特氏菌	第一法 定性检验 (GB 4789.30-2016)	/25g		
	金黄色葡萄球菌 (定量)	第二法 平板计数法 (GB 4789.10-2016)	10 CFU/g		
	沙门氏菌	第一法 定性检验 (GB 4789.4-2016)	/25g		

表 9 调味品

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
酱及 酱制 品	大肠菌群	第二法 平板计数法 (GB 4789.3-2016)	10 CFU/g	取样前将样品充分混匀取样。 1 散装 (自行简易包装): 直接无菌取样。 2 预包装: 用 75% 酒精棉球消毒袋口 (罐口、瓶口、袋口), 使用灭菌剪刀或开罐器等无菌开口。 无菌操作取 25g 样品, 按照国标方法进行检测。	—
	金黄色葡萄球菌 (定量)	第二法 平板计数法 (GB 4789.10-2016)	10 CFU/g		
	沙门氏菌	第一法 定性检验 (GB 4789.4-2016)	/25 g		

(二) 专项监测

表 10 肉与肉制品-专项

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
活鸡	大肠埃希氏菌 (定性)	监测网工作手册	/g	<p>1 活鸡在市场上宰杀退毛后，整鸡及时送至实验室，取肠中段，过程中注意无菌操作。</p> <p>称取 1g 样品，放入盛有 9mL 磷酸盐缓冲液的无菌袋中，混匀。选取适宜的连续稀释度的样品匀液，每个稀释度接种 2 个无菌平皿，每皿 1 mL，具体分离、鉴定方法见 GB 4789.38。每个活鸡样品至少选择 3 个（分别来自 3 个不同的平板）大肠埃希氏菌阳性样品进行抗生素敏感性试验。</p> <p>2 微生物取样完成后将样品送至负责化学检测的实验室。</p> <p>3 化学和微生物检验必须为同一份样品，并且上报污染物监测系统的样品编号需保持一致。</p>	采样过程中避免交叉污染
	大肠埃希氏菌 抗生素敏感性	《2018 年食源性疾病预防工作手册》			
生鲜猪肉	猪带绦虫囊尾蚴	监测网工作手册（多重 PCR）	—	猪肉标本要求在 48 小时内进行处理。将采集的猪肉用刀每隔 8~10mm 横断切开肌肉纤维，观察有无囊尾蚴或疑似病灶。若发现囊尾蚴或疑似病灶，用镊子和剪刀将囊尾蚴取出，再去掉其表层的肌肉纤维组织，然后将囊尾蚴或病灶保存在无水乙醇中。	网报系统中需填写“检测动物数量”、“检出阳性的动物数量”、“每个阳性动物检出寄生虫的数量”。

表 11 水产及其制品-专项

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
淡水鱼养殖 环节中常见 弧菌专项监 测	创伤弧菌	具体见“水产及其制品”中的“动物性淡水产品/动物性海水产品”	—	见具体工作方案	—
	副溶血性弧菌		—		—
	霍乱弧菌		—		—
	溶藻弧菌		—		—
	河弧菌		—		—
	温度	见具体工作方案	—		—
	盐度		—		—
	PH		—		—
淡水鱼养殖、销售和 餐饮环节监 测	华支睾吸虫囊蚴	消化法	—	将鱼剖杀后，刮去鳞片和皮	东方次睾吸虫与华支睾吸虫相似，以背、尾鳍部感染率较高。消化法：主要取肌肉消化检查。
	东方次睾吸虫囊蚴	消化法	—		

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
	颚口线虫三期幼虫	消化法	——	——	1 颚口线虫主要寄生在鱼的内脏，以肝脏感染率较高。 2 消化法可取内脏和肌肉同时检查。
鲜、活海鱼	异尖线虫三期幼虫	直接解剖法	——	——	1 异尖线虫寄生在鱼的腹腔或内脏。 2 直接解剖法肉眼可以观察到活的幼虫和包囊。 3 网报系统中需填写“检测动物数量”测、“检出阳性的动物数量”、“每个阳性动物检出寄生虫的数量”。

表 12 乳与乳制品

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
乳制品生产加工过程监测	菌落总数	第一法 平板计数法 (GB 4789.2-2016) 第二法 测试片法	——	见具体工作方案	——
	肠杆菌科	监测网工作手册	——		——
	霉菌	第一法 霉菌和酵母平板计数法 (GB 4789.15-2016)	——		——
	李斯特氏菌	第一法 定性检验 (GB 4789.30-2016) 第二法 MPN 计数法 (定量)	——		定性检测为必做项目, 建议选择个别能力较强的地市级, 对部分样品同时进行定性和定量监测, 以了解相关污染水平, 并为风险评估储备基础数据。
	金黄色葡萄球菌 (定量)	第二法 Baird-Parker/显色培养基平板计数 (GB 4789.10-2016)	——		——
	蜡样芽孢杆菌	第一法 平板计数法 (GB 4789.14-2014)	——		——
	沙门氏菌	第一法 定性检验 (GB 4789.4-2016)	——		——

注：根据污染情况，选择适当的稀释度，必须上报具体数值（不得报送为“不可计数”）。

表 13 冷冻饮品-专项

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
含乳冷冻饮品加工过程监测	菌落总数	空气沉降菌：医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法（GB/T 16294 沉降菌的测） 其他样品： 第一法 平板计数法（GB 4789.2-2016） 第二法 测试片法	——	见具体工作方案	——
	肠杆菌科	定量：第一法 肠杆菌科平板计数法（GB 4789.41-2016） 定性：见具体工作方案	——		——
	李斯特氏菌	第一法 定性检验（GB 4789.30-2016）	——		——
	金黄色葡萄球菌（定量）	第二法 平板计数法（GB 4789.10-2016）	——		——
	沙门氏菌	第一法 定性检验（GB 4789.4-2016）	——		——

表 14 餐饮食品

食品品种	监测项目	检测方法	方法检出限	检样的处理	注意事项
外卖配送餐	菌落总数（选做）	第一法 平板计数法（GB 4789.2-2016）	固体：10 CFU/g 液体：1 CFU/mL	混匀样品后多点（四角和中央）取样；不能混匀的，直接用灭菌刀（勺）从表层和深层多点取样。	——
	大肠埃希氏菌计数	第二法 平板计数法（GB 4789.38-2016）	固体：10 CFU/g 液体：1 CFU/mL		——
	单核细胞增生李斯特氏菌	第一法 定性检验（GB 4789.30-2016）	/25g（mL）		——
	金黄色葡萄球菌（定量）	第二法 平板计数法（GB 4789.10-2016）	固体：10 CFU/g 液体：1 CFU/mL		——
	蜡样芽胞杆菌（定量）	第一法 平板计数法（GB 4789.14-2014）	固体：10 CFU/g 液体：1 CFU/mL		——
	沙门氏菌	第一法 定性检验（GB 4789.4-2016）	/25 g（mL）		——
	致泻大肠埃希氏菌	监测网工作手册	/25 g（mL）		——

第二节 卫生指示菌标准操作程序

一、 菌落总数标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.2-2016 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》

2 适用范围

本程序规定了食品中菌落总数（aerobic plate count）的测定方法。

本程序适用于食品中菌落总数的测定。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本程序。

菌落总数 aerobic plate count

食品检样经过处理，在一定条件下（如培养基、培养温度和培养时间等）培养后，所得每g（mL）检样中形成的微生物菌落总数。

4 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

4.1 恒温培养箱： $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.2 冰箱： $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.3 恒温水浴箱： $46\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.4 天平：感量 0.1 g。

4.5 均质器。

4.6 振荡器。

4.7 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。

4.8 无菌锥形瓶：容量 250 mL、500 mL。

4.9 无菌培养皿：直径 90 mm。

4.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

4.11 放大镜或/和菌落计数器或自动判读仪。

5 培养基和试剂

5.1 平板计数琼脂培养基：见附录 A 中 A.1。

5.2 磷酸盐缓冲液：见附录 A 中 A.2。

5.3 无菌生理盐水：见附录 A 中 A.3。

5.4 1 mol/L NaOH：称取 40 g 氢氧化钠溶于 1000 mL 蒸馏水中。

5.5 1 mol/L HCl：移取浓盐酸 90 mL，用蒸馏水稀释至 1000 mL。

5.6 菌落总数测试片和压板。

第一法 平板计数法

6 检验程序

菌落总数平板计数的检验程序见图1。

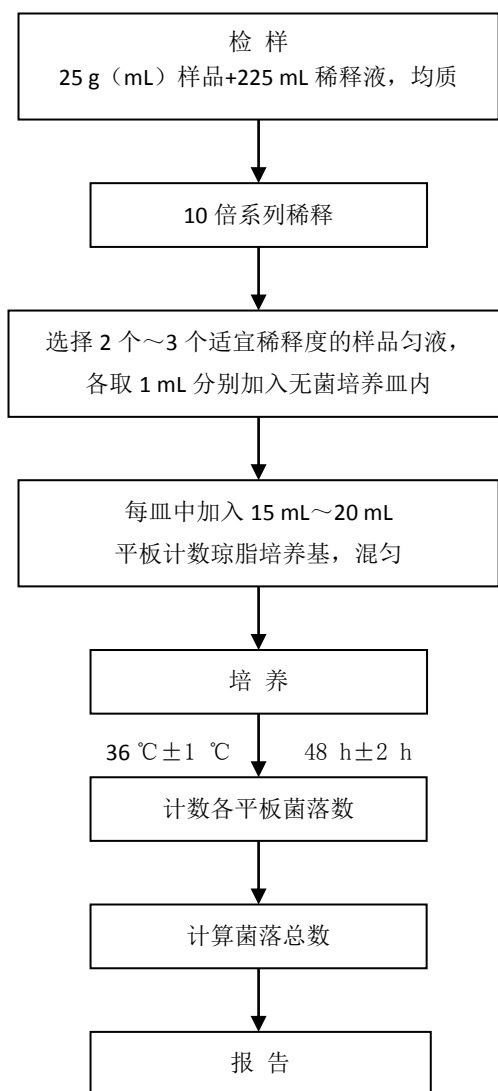


图 1 菌落总数检验程序

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 固体和半固体样品：称取 25 g 样品置盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内，8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min，或放入盛有 225 mL 稀释液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min，制成 1:10 的样品匀液。

7.1.2 液体样品：以无菌吸管吸取 25 mL 样品置盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶/（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成

1:10 的样品匀液。或放入盛有 225 mL 稀释液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min，制成 1:10 的样品匀液。

7.1.3 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用 1 支无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

7.1.4 按 7.1.3 操作程序，制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用 1 次 1 mL 无菌吸管或吸头。

7.1.5 根据对样品污染状况的估计，选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行 10 倍递增稀释时，吸取 1 mL 样品匀液于无菌平皿内，每个稀释度做两个平皿。同时，分别吸取 1 mL 空白稀释液加入两个无菌平皿内作空白对照。

7.1.6 及时将 15 mL~20 mL 冷却至 46 °C 的平板计数琼脂培养基（可放置于 46 °C ±1 °C 恒温水浴箱中保温）倾注平皿，并转动平皿使其混合均匀。

7.2 培养

7.2.1 琼脂凝固后，将平板翻转，36 °C ±1 °C 培养 48 h ±2 h。水产品 30 °C ±1 °C 培养 72 h ±3 h。

7.2.2 如果样品中可能含有在琼脂培养基表面弥漫生长的菌落时，可在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层琼脂培养基（约 4 mL），凝固后翻转平板，按 7.2.1 条件进行培养。

7.3 菌落计数

可用肉眼观察，必要时用放大镜或菌落计数器，记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位（colony-forming units, CFU）表示。

7.3.1 选取菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于 30 CFU 的平板记录具体菌落数，大于 300 CFU 的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。

7.3.2 其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数；若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘以 2，代表一个平板菌落数。

7.3.3 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

8 结果与报告

8.1 菌落总数的计算方法

8.1.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每 g (mL) 中菌落总数结果。

8.1.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，按如下公式计算：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

N —样品中菌落数

$\sum C$ —平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和

n_1 —第一稀释度（低稀释倍数）平板个数

n_2 —第二稀释度（高稀释倍数）平板个数

d —稀释因子（第一稀释度）

示例：

稀释度	1:100（第一稀释度）	1:1000（第二稀释度）
菌落数（CFU）	232, 244	33, 35

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

$$= \frac{232 + 244 + 33 + 35}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{544}{0.022} = 24727$$

上述数据按8.2.2数字修约后，表示为25000或 2.5×10^4 。

8.1.3 若所有稀释度的平板上菌落数均大于 300 CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

8.1.4 若所有稀释度的平板菌落数均小于 30 CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

8.1.5 若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以

最低稀释倍数计算。

8.1.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在 30 CFU~300 CFU 之间，其中一部分小于 30 CFU 或大于 300 CFU 时，则以最接近 30 CFU 或 300 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

8.2 菌落总数的报告

8.2.1 菌落数小于 100 CFU 时，按“四舍五入”原则修约，以整数报告。如，计数结果为 75.5 CFU 时，按“四舍五入”原则修约后报告 76 CFU。

8.2.2 大于或等于 100 CFU 时，第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数；也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

8.2.3 若所有平板上为蔓延菌落而无法计数，则报告菌落蔓延。

8.2.4 若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。

8.2.5 称重取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/mL 为单位报告。

第二法 测试片法

9 检验程序

除将平板计数琼脂培养基改成菌落总数测试片外，其它与检验程序6相同。

10 操作步骤

10.1 样品的稀释

按照6.1.1~6.1.2制备1:10的样品匀液后，用1 mol/L NaOH或1 mol/L HCl调节pH至6.6~7.2。

10.2 接种

根据对样品污染状况的估计，选择2个~3个适宜稀释度的样品匀液进行检验。将测试片置于平坦实验台表面，揭开上层膜，用吸管或微量移液器吸取1 mL样品匀液，垂直滴加在测试片的中央，将上层膜盖下，允许上层膜直接落下，但不要滚动上层膜，将压板（凹面底朝下）放置在上层膜中央，轻轻地压下，使样液均匀覆盖于圆形的培养膜上，切勿扭转压板。拿起压板，静置至少1 min以使培

培养基凝固。每个稀释度接种两张测试片。

10.3 培养

将测试片的透明面朝上，水平置于培养箱内。可堆叠至20片，培养温度和时间同6.2。

10.4 计数

10.4.1 培养结束后立即计数，可肉眼观察计数，或用菌落计数器、放大镜、自动判读仪计数。选取菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间的测试片计数。

10.4.2 计数所有红色菌落。细菌浓度很高时，整个测试片会变成红色或粉红色，将结果记录为“多不可计”。

10.4.3 有时，当细菌浓度很高时，测试片中央没有可见菌落，但圆形培养膜的边缘有许多小的菌落，其结果也记录为“多不可计”；进一步稀释样品可获得准确的读数。

10.4.4 某些微生物会液化凝胶，造成局部扩散或菌落模糊的现象。如果液化现象干扰计数，可以计数未液化的面积来估算菌落数。

11 结果与报告

同“7 结果的表述”。

附录 A 培养基和试剂

A.1 平板计数琼脂（plate count agar, PCA）培养基

A.1.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	2.5 g
葡萄糖	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.0±0.2

A. 1. 2 制法

将上述成分加于蒸馏水中，煮沸溶解，调节pH。分装试管或锥形瓶，121 °C 高压灭菌15 min。

A. 2 磷酸盐缓冲液

A. 2. 1 成分

磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	34.0 g
蒸馏水	500 mL
pH 7.2	

A. 2. 2 制法

贮存液：称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于500 mL蒸馏水中，用大约175 mL的1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH，用蒸馏水稀释至1 000 mL后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液1.25 mL，用蒸馏水稀释至1 000 mL，分装于适宜容器中，121 °C 高压灭菌15 min。

A. 3 无菌生理盐水

A. 3. 1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 3. 2 制法

称取8.5 g 氯化钠溶于1 000 mL蒸馏水中，121 °C 高压灭菌15 min。

二、 大肠菌群计数标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.3-2016 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》

2 适用范围

本程序规定了食品中大肠菌群（Coliforms）计数的方法。

本程序适用于食品中大肠菌群的计数。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本程序。

3.1 大肠菌群 Coliforms

在一定培养条件下能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰氏阴性无芽胞杆菌。

3.2 最可能数 Most Probable Number, MPN

基于泊松分布的一种间接计数方法。

4 检验原理

4.1 MPN 法

MPN法是统计学和微生物学结合的一种定量检测法。待测样品经系列稀释并培养后，根据其未生长的最低稀释度与生长的最高稀释度，应用统计学概率论推算出待测样品中大肠菌群的最大可能数。

4.2 平板计数法

大肠菌群在固体培养基中发酵乳糖产酸，在指示剂的作用下形成可计数的红色或紫色，带有或不带有沉淀环的菌落。

5 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

5.1 恒温培养箱： $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.2 冰箱： $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

- 5.3 恒温水浴箱：46 °C ±1 °C。
- 5.4 天平：感量 0.1 g。
- 5.5 均质器。
- 5.6 振荡器。
- 5.7 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 5.8 无菌锥形瓶：容量 500 mL。
- 5.9 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 5.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 5.11 菌落计数器或自动判读仪。

6 培养基和试剂

- 6.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨（Lauryl Sulfate Tryptose, LST）肉汤：见附录 A 中 A.1。
- 6.2 煌绿乳糖胆盐（Brilliant Green Lactose Bile, BGLB）肉汤：见附录 A 中 A.2。
- 6.3 结晶紫中性红胆盐琼脂（Violet Red Bile Agar, VRBA）：见附录 A 中 A.3。
- 6.4 磷酸盐缓冲液：见附录 A 中 A.4。
- 6.5 无菌生理盐水：称见附录 A 中 A.5。
- 6.6 无菌 1 mol/L NaOH：称取 40 g 氢氧化钠溶于 1000 mL 蒸馏水中见附录 A 中 A.6。
- 6.7 无菌 1 mol/L HCl：见附录 A 中 A.7。
- 6.8 大肠菌群检验测试片和压板。

第一法 MPN 计数法¹

7 检验程序

大肠菌群MPN计数的检验程序见图1。

¹ 2014 年饮用水监测继续按照 2013 年要求：取样量必须是 33.3mL，计数单位为“MPN/100 mL”。

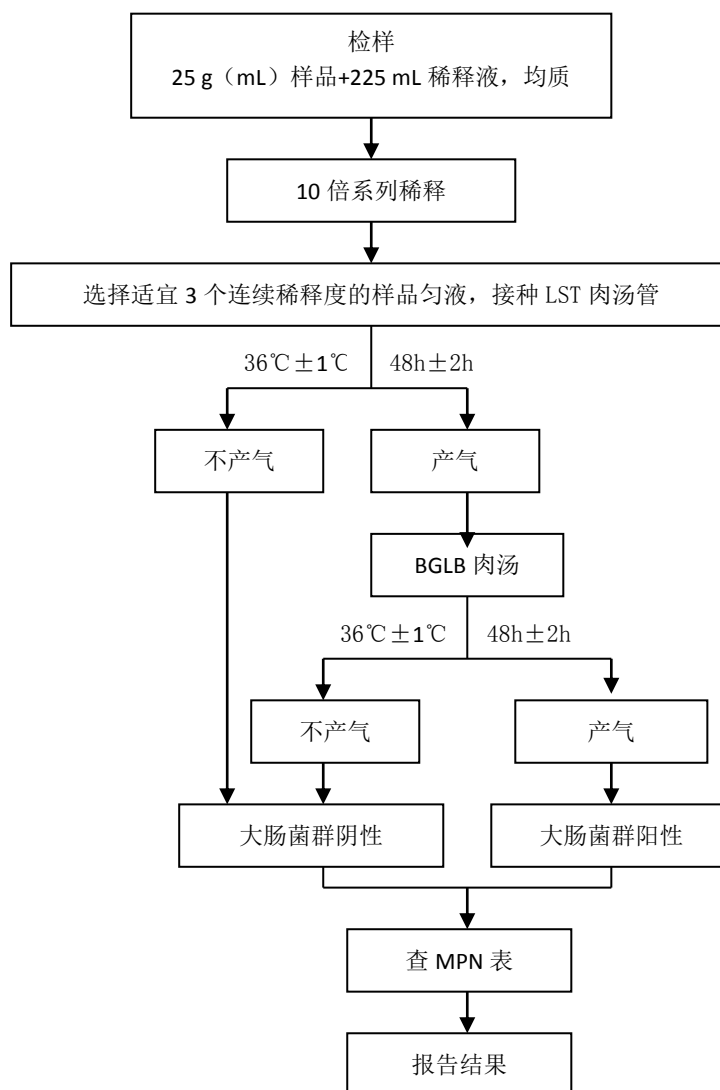


图 1 大肠菌群 MPN 计数法检验程序

8 操作步骤

8.1 样品的稀释

8.1.1 固体和半固体样品：称取 25 g 样品，放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内，8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min，或放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质袋中，用拍击式均质器以 6 次/s~9 次/s 拍打 1 min~2 min，制成 1:10 的样品匀液。

8.1.2 液体样品：以无菌吸管吸取 25 mL 样品置盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成 1:10 的样品匀液。或放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质袋中，

用拍击式均质器拍打 1 min~2 min, 制成 1:10 的样品匀液。

8.1.3 样品匀液的 pH 值应在 6.5~7.5 之间, 必要时分别用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节。

8.1.4 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL, 沿管壁缓缓注入 9 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌试管中(注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面), 振摇试管或换用 1 支 1 mL 无菌吸管反复吹打, 使其混合均匀, 制成 1:100 的样品匀液。

8.1.5 根据对样品污染状况的估计, 按上述操作, 依次制成十倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次, 换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样品接种完毕, 全过程不得超过 15 min。

8.2 初发酵试验

每个样品, 选择 3 个适宜的连续稀释度的样品匀液(液体样品可以选择原液), 每个稀释度接种 3 管月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤, 每管接种 1 mL(如接种量超过 1 mL, 则用双料 LST 肉汤), 36 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h, 观察倒管内是否有气泡产生, 24 h ±2 h 产气者进行复发酵试验, 如未产气则继续培养至 48 h ±2 h, 产气者进行复发酵试验。未产气者为大肠菌群阴性。

8.3 复发酵试验(证实试验)

用接种环从产气的 LST 肉汤管中分别取培养物 1 环, 移种于煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB)管中, 36 °C ±1 °C 培养 48 h ±2 h, 观察产气情况。产气者, 计为大肠菌群阳性管。

8.4 大肠菌群最可能数(MPN)的报告

按 7.3 确证的大肠菌群 LST 阳性管数, 检索 MPN 表(见附录 B), 报告每 g(mL) 样品中大肠菌群的 MPN 值。

第二法 平板计数法

9 检验程序

大肠菌群平板计数法的检验程序见图 2。

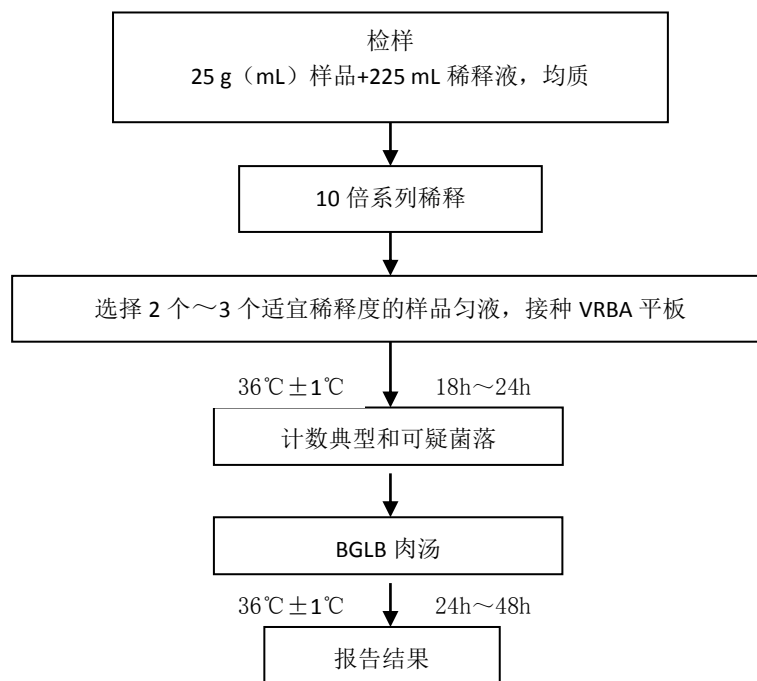


图 2 大肠菌群平板计数法检验程序

10 操作步骤

10.1 样品的稀释

按7.1进行。

10.2 平板计数

9.2.1 选取2个~3个适宜的连续稀释度, 每个稀释度接种2个无菌平皿, 每皿1 mL。同时, 分别吸取1 mL生理盐水加入两个无菌平皿内作空白对照。

9.2.2 及时将15 mL~20 mL冷至46 °C的结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA) 倾注于每个平皿中。小心旋转平皿, 将培养基与样液充分混匀, 待琼脂凝固后, 再加3 mL~4 mLVRBA覆盖平板表层。翻转平板, 置于36 °C ±1 °C培养18 h~24 h。

10.3 平板菌落数的选择

选取菌落数在15 CFU~150 CFU之间的平板, 分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落。典型菌落为紫红色, 菌落周围有红色的胆盐沉淀环, 菌落直径为0.5 mm或更大。

10.4 证实试验

从VRBA平板上挑取10个不同类型的典型和可疑菌落，分别移种于BGLB肉汤管内，36℃±1℃培养24h~48h，观察产气情况。凡BGLB肉汤管产气，即可报告为大肠菌群阳性。

10.5 大肠菌群平板计数的报告

经最后证实为大肠菌群阳性的试管比例乘以9.3中计数的平板菌落数，再乘以稀释倍数，即为每g（mL）样品中大肠菌群数。例：10⁻⁴样品稀释液1 mL，在VRBA平板上有100个典型和可疑菌落，挑取其中10个接种BGLB肉汤管，证实有6个阳性管，则该样品的大肠菌群数为： $100 \times 6 / 10 \times 10^4 / \text{g (mL)} = 6.0 \times 10^5 \text{ CFU/g (mL)}$ 。

第三法 测试片法

11 检验程序

大肠菌群测试片法的检验程序见图3。

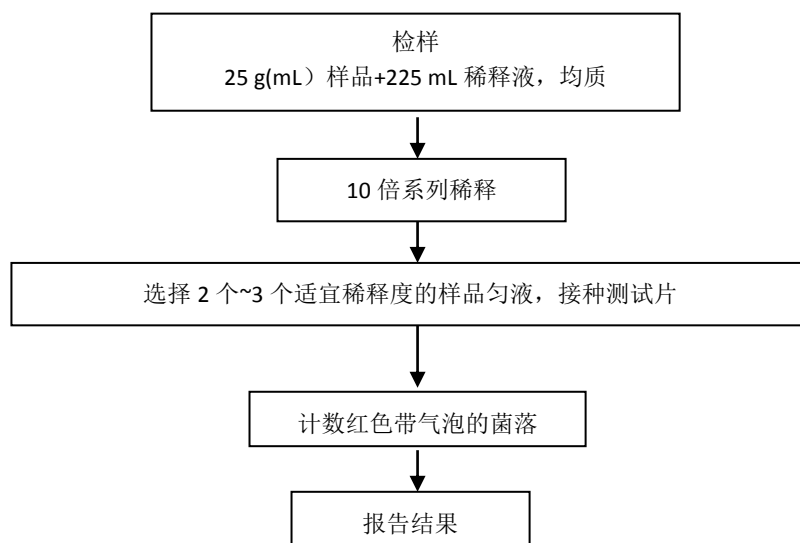


图 3 大肠菌群测试片计数法程序图

12 操作步骤

12.1 样品的稀释

按7.1进行。

12.2 测定

11.2.1 样品接种及培养

将待检样品选取2个~3个适宜的连续稀释度，每个稀释度接种2张测试片。将大肠菌群测试片置于平坦实验台面，揭开上层膜，用吸管吸取1mL样液垂直滴加在测试片的中央略靠上的部位，将上层膜缓慢盖下，避免气泡产生和上层膜直接落下。把压板（平面底朝下）放置在上层膜中央，轻轻地压下，使样液均匀覆盖于圆形的培养面积上，切勿扭转压板。拿起压板，静置至少1 min以使培养基凝固。

将测试片的透明面朝上置于培养箱内，堆叠片数不超过20片， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

11.2.2 判读

培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后应立即计数，可目测、用标准菌落计数器、放大镜、或自动判读仪来计数红色且有气泡的菌落为大肠菌群。圆形培养区边缘上及边缘以外的菌落不作计数。当培养区域出现大量气泡，大量不明显小菌落或培养区呈暗红色三种情况，表明大肠菌群的浓度较高，需要进一步稀释样品以获得更准确的读数。

12.3 大肠菌群测试片计数的报告

11.3.1 选取菌落数在15 CFU~150 CFU之间的测试片进行计数，两个测试片的平均菌落数乘以稀释倍数即为每g（mL）样品中的大肠菌群数。

11.3.2 如果所有稀释度测试片上的菌落数都小于15，则计数稀释度最低的测试片上的平均菌落数乘以稀释倍数报告；

11.3.3 如果所有稀释度的测试片上均无菌落生长，则以小于1乘以最低稀释倍数报告；

11.3.4 如果最高稀释度的菌落数大于150，计数最高稀释度的测试片上的平均菌落数乘以稀释倍数报告。计数菌落数大于150的测试片时，可计数一个或两个具有代表性的方格内的菌落数，换算成单个方格内的菌落数后乘以20即为测试片上估算的菌落数（圆形生长面积为 20 cm^2 ）。报告单位以cfu/g（mL）表示。

10.3.5 若有两个连续稀释度的测试片上菌落数均在上述计数范围时，按如下公式

计算：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

N —样品中菌落数

$\sum C$ —两个稀释度的测试片上菌落数之和

n_1 —第一稀释度（低稀释倍数）测试片个数

n_2 —第二稀释度（高稀释倍数）测试片个数

d —稀释因子（第一稀释度）

附录 A 培养基和试剂

A.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨（LST）肉汤

A.1.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾（ K_2HPO_4 ）	2.75 g
磷酸二氢钾（ KH_2PO_4 ）	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.8±0.2	

A.1.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中，调节 pH。分装到有玻璃小倒管的试管中，每管 10 mL。

121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 煌绿乳糖胆盐（BGLB）肉汤

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
-----	--------

乳糖	10.0 g
牛胆粉（oxgall或oxbile）溶液	200 mL
0.1%煌绿水溶液	13.3 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2±0.1	

A.2.2 制法

将蛋白胨、乳糖溶于约500 mL蒸馏水中，加入牛胆粉溶液200 mL（将20.0 g脱水牛胆粉溶于200 mL蒸馏水中，调节pH至7.0~7.5），用蒸馏水稀释到975 mL，调节pH，再加入0.1%煌绿水溶液13.3 mL，用蒸馏水补足到1 000 mL，用棉花过滤后，分装到有玻璃小倒管的试管中，每管10 mL。121 °C 高压灭菌15 min。

A.3 结晶紫中性红胆盐琼脂（VRBA）

A.3.1 成分

蛋白胨	7.0 g
酵母膏	3.0 g
乳糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
胆盐或3号胆盐	1.5 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.002 g
琼脂	15 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4±0.1	

A.3.2 制法

将上述成分溶于蒸馏水中，静置几分钟，充分搅拌，调节pH。煮沸2 min，将培养基冷却至45 °C~50 °C倾注平板。使用前临时制备，不得超过3 h。

A.4 磷酸盐缓冲液

A.4.1 成分

磷酸二氢钾（KH ₂ PO ₄ ）	34.0 g
---	--------

蒸馏水 500 mL

pH 7.2

A.4.2 制法

贮存液：称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于500 mL蒸馏水中，用大约175 mL的1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH，用蒸馏水稀释至1 000 mL后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液1.25 mL，用蒸馏水稀释至1000 mL，分装于适宜容器中，121 °C高压灭菌15 min。

A.5 无菌生理盐水

A.5.1 成分

氯化钠 8.5 g

蒸馏水 1000 mL

A.5.2 制法

称取8.5 g 氯化钠溶于1000 mL蒸馏水中， 121 °C高压灭菌15 min。

A.6 1 mol/L NaOH

A.6.1 成分

NaOH 40.0 g

蒸馏水 1000 mL

A.6.2 制法

称取40 g氢氧化钠溶于1000 mL蒸馏水中， 121 °C高压灭菌15 min。

A.7 1 mol/L HCl

A.7.1 成分

HCl 90 mL

蒸馏水 1000 mL

A.7.2 制法

移取浓盐酸90 mL，用蒸馏水稀释至1000 mL， 121 °C高压灭菌15 min。

附录 B 最可能数 (MPN) 检索表

表B.1 每g (mL) 样品中大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1 g (mL)、0.01 g (mL) 和 0.001 g (mL)], 每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 g (mL)、0.1 g (mL) 和 0.01 g (mL) 时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01 g (mL)、0.001 g (mL)、0.0001 g (mL) 时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

三、 大肠埃希氏菌计数标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.38-2012 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数》

2 范围

本操作程序规定了食品中大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 计数的方法。

本操作程序适用于食品中大肠埃希氏菌的计数, 其中第二法不适用于贝类产品。

3 术语和定义

3.1 大肠埃希氏菌 *Escherichia coli*

又称为“大肠杆菌”。广泛存在于人和温血动物的肠道中, 能够在 44.5℃ 发酵乳糖产酸产气, IMViC (靛基质、甲基红、VP 试验、柠檬酸盐) 生化试验为 + — — 或 — + — — 的革兰氏阴性杆菌。以此作为粪便污染指标来评价食品的卫生状况, 推断食品中肠道致病菌污染的可能性。

3.2 最可能数 most probable number: MPN

基于泊松分布的一种间接计数方法。

4 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外, 其他设备和材料如下:

- 4.1 恒温培养箱: 36℃ ±1℃。
- 4.2 冰箱: 2℃ ~5℃。
- 4.3 恒温水浴箱: 44.5℃ ±0.2℃。
- 4.4 天平: 感量为 0.1g。
- 4.5 均质器。
- 4.6 振荡器。
- 4.7 无菌吸管: 1 mL (具 0.01 mL 刻度)、10 mL (具 0.1 mL 刻度) 或微量移液器及吸头。
- 4.8 无菌锥形瓶: 容量 500 mL。
- 4.9 无菌培养皿: 直径 90 mm。
- 4.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 4.11 菌落计数器。
- 4.12 紫外灯: 波长 360nm ~366nm, 功率 ≤6 W。

5 培养基和试剂

- 5.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(lauryl sulfate tryptose, LST)肉汤: 见附录 A 中 A.1。
- 5.2 EC 肉汤 (E.coli broth): 见附录 A 中 A.2。
- 5.3 蛋白胨水: 见附录 A 中 A.3。
- 5.4 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红(MR)和 V-P 试验用]: 见附录 A 中 A.4。
- 5.5 西蒙氏柠檬酸盐培养基: 见附录 A 中 A.5。
- 5.6 磷酸盐缓冲液: 见附录 A 中 A.6。
- 5.7 伊红美蓝 (eosin methylene blue,EMB) 琼脂: 见附录 A 中 A.7。
- 5.8 营养琼脂斜面: 见附录 A 中 A.8。
- 5.9 结晶紫中性红胆盐琼脂 (violet red bile,VRBA): 见附录 A 中 A.9。
- 5.10 VRBA-MUG: 见附录 A 中 A.10。
- 5.11 革兰氏染色液: 见附录 A 中 A.11。
- 5.12 Kovacs 靛基质试剂: 见附录 A 中 A.12。
- 5.13 无菌 1 mol/L NaOH: 见附录 A 中 A.13。
- 5.14 无菌 1 mol/L HCl: 见附录 A 中 A.14。

第一法 大肠埃希氏菌 MPN 计数

6 检验程序

大肠埃希氏菌MPN计数的检验程序见图1。

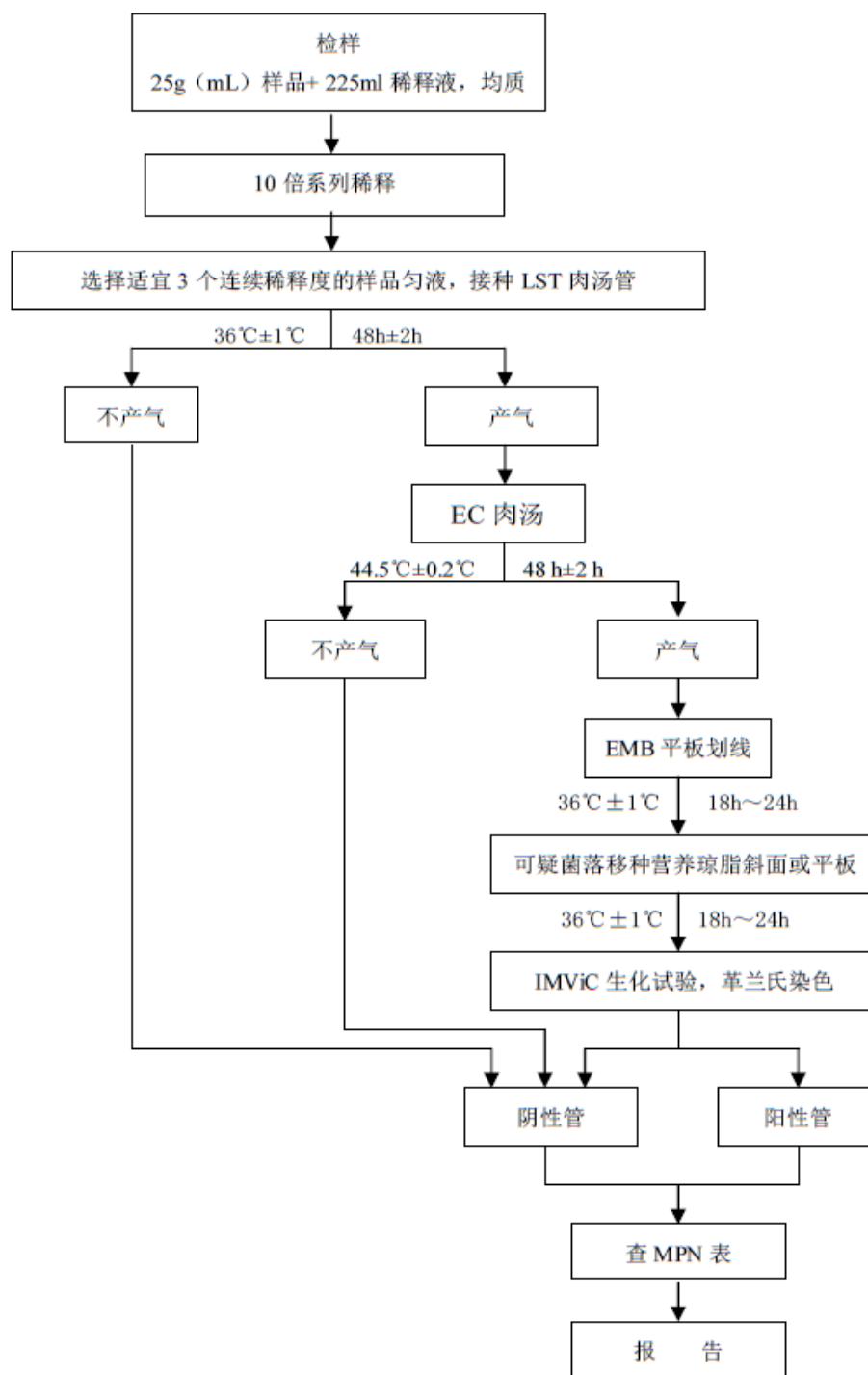


图1 大肠埃希氏菌MPN计数法检验程序

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 固体和半固体样品：称取 25g 样品，放入盛有 225mL 磷酸盐缓冲液的无菌均质杯内，8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min，制成 1:10 样品匀液，或放入盛有 225mL 磷酸盐缓冲液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min 制成 1:10 的样品匀液。

7.1.2 液体样品：以无菌吸管吸取 25 mL 样品置盛有 225mL 磷酸盐缓冲液的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成 1:10 的样品匀液。

7.1.3 样品匀液的 pH 值应在 6.5~7.5 之间，必要时分别用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节。

7.1.4 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1mL，沿管壁缓缓注入 9mL 磷酸盐缓冲液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振荡试管或换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头反复吹打，使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

7.1.5 根据对样品污染状况的估计，按上述操作，依次制成 10 倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次，换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样品接种完毕，全过程不得超过 15 min。

7.2 初发酵试验

每个样品，选择 3 个适宜的连续稀释度的样品匀液（液体样品可以选择原液），每个稀释度接种 3 管月桂基硫酸盐胰蛋白胨（LST）肉汤，每管接种 1 mL（如接种量超过 1mL，则用双料 LST 肉汤），36℃±1℃培养 24h±2h，观察小倒管内是否有气泡产生，24h±2h 产气者进行复发酵试验，如未产气则继续培养 48h±2h。产气者进行复发酵试验。如所有 LST 肉汤管均未产气，即可报告大肠埃希氏菌 MPN 结果。

7.3 复发酵试验

用接种环从产气的 LST 肉汤管中分别取培养物 1 环，移种于已提前预温至 45℃的 EC 肉汤管中，放入带盖的 44.5℃±0.2℃水浴箱内。水浴的水面应高于肉汤培养基液面，培养 24h±2h，检查小倒管内是否有气泡产生，如未有产气则继

续培养至 48h±2h。记录在 24h 和 48h 内产气的 EC 肉汤管数。如所有 EC 肉汤管均未产气，即可报告大肠埃希氏菌 MPN 结果；如有产气者，则进行 EMB 平板分离培养。

7.4 伊红美蓝平板分离培养

轻轻振摇各产气管，用接种环取培养物分别划线接种于 EMB 平板，36℃±1℃ 培养 18h~24h。观察平板上有无具黑色中心有光泽或无光泽的典型菌落。

7.5 营养琼脂斜面或平板培养

从每个平板上挑 5 个典型菌落，如无典型菌落则挑取可疑菌落。用接种针接触菌落中心部位，移种到营养琼脂斜面或平板上，36℃±1℃，培养 18h~24h。取培养物进行革兰氏染色和生化试验。

7.6 鉴定

取培养物进行靛基质试验、MR-VP 试验和柠檬酸盐利用试验。大肠埃希氏菌与非大肠埃希氏菌的生化鉴别见表 1。

表 1 大肠埃希氏菌与非大肠埃希氏菌的生化鉴别

靛基质 (I)	甲基红 (MR)	VP 试验 (VP)	柠檬酸盐 (C)	鉴定 (型别)
+	+	-	-	典型大肠埃希氏菌
-	+	-	-	非典型大肠埃希氏菌
+	+	-	+	典型中间型
-	+	-	+	非典型中间型
-	-	+	+	典型产气肠杆菌
+	-	+	+	非典型产气肠杆菌

注1：如出现表1以外的生化反应类型，表明培养物可能不纯，应重新划线分离，必要时做重复试验。

注2：生化试验也可以选用生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统等方法，按照产品说明书进行操作。

8 大肠埃希氏菌 MPN 计数的报告

大肠埃希氏菌为革兰氏阴性无芽胞杆菌，发酵乳糖、产酸、产气，IMViC 生化试验为++--或-+-。只要有1个菌落鉴定为大肠埃希氏菌，其所代表的LST肉汤管即为大肠埃希氏菌阳性。依据LST肉汤阳性管数查MPN表（见附录

B), 报告每g (mL) 样品中大肠埃希氏菌MPN值。

第二法 大肠埃希氏菌平板计数法

9 检验程序

大肠埃希氏菌平板计数法的检验程序见图2。

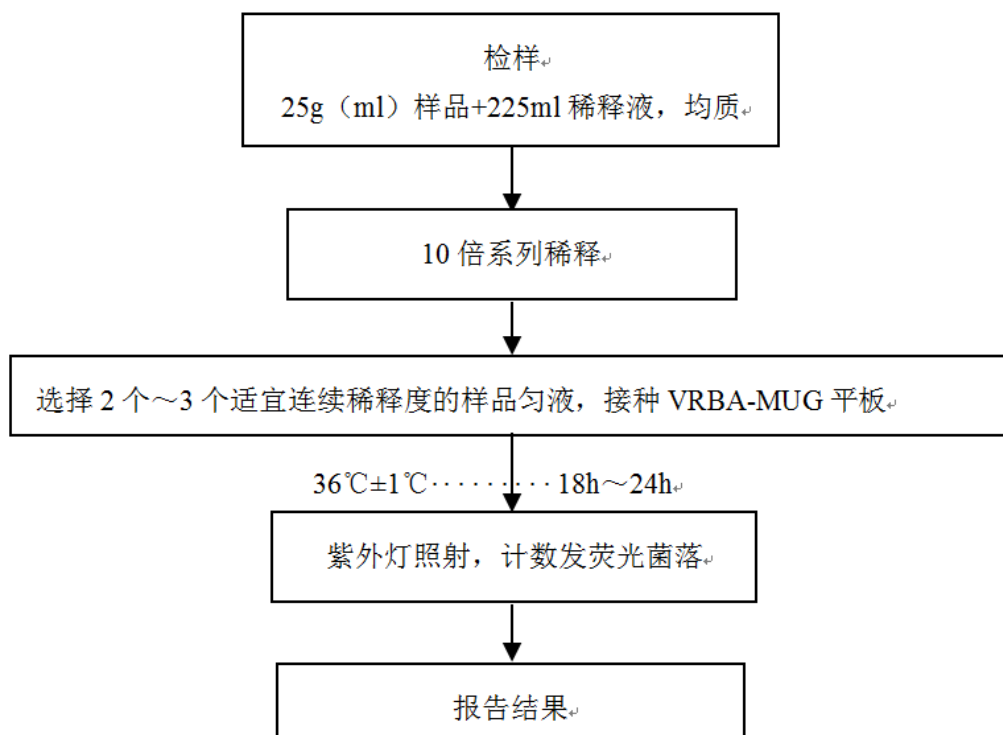


图 2 大肠埃希氏菌平板计数法检验程序

10 操作步骤

10.1 样品的稀释

按7.1进行。

10.2 平板计数

10.2.1 选取2个~3个适宜的连续稀释度的样品匀液, 每个稀释度接种2个无菌平皿, 每皿 1 mL。同时取1 mL稀释液加入无菌平皿做空白对照。

10.2.2 将10mL~15mL 冷至45°C ±0.5°C的结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA) 倾注于每个平皿中。小心旋转平皿, 将培养基与样品匀液充分混匀。待琼脂凝固后, 再加3 mL~4 mL VRBA-MUG覆盖平板表层。凝固后翻转平板, 36°C ±1°C培养18

h~24 h。

10.3 平板菌落数的选择

选择菌落数在10CFU~100CFU之间的平板，暗室中 360 nm~366 nm 波长紫外灯照射下，计数平板上发浅蓝色荧光的菌落。

检验时用已知MUG阳性菌株（如大肠埃希氏菌 ATCC 25922）和产气肠杆菌（如ATCC 13048）做阳性和阴性对照。

11 大肠埃希氏菌平板计数的报告

两个平板上发荧光菌落数的平均数乘以稀释倍数，报告每g (mL) 样品中大肠埃希氏菌数，以CFU/g (mL)表示。若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于1乘以最低稀释倍数报告。

附录 A 培养基和试剂

A.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨（LST）肉汤

A.1.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0g
氯化钠	5.0g
乳糖	5.0g
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄)	2.75g
磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	2.75g
月桂基硫酸钠	0.1g
蒸馏水	1 000 mL

pH6.8±0.2

A.1.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中，调节pH。分装到有玻璃小倒管的试管中，每管 10 mL。

121℃高压灭菌 15 min。

制备双料 LST 肉汤时，除蒸馏水外其他成分加倍。

A.2 EC 肉汤

A.2.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0g
3 号胆盐或混合胆盐	1.5g
乳糖	5.0g
磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	4.0g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	1.5g
氯化钠	5.0g
蒸馏水	1 000 mL

pH6.9±0.1

A.2.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中, 调节pH, 分装到有玻璃小倒管的试管中, 每管8mL。121℃高压灭菌15 min。

A.3 蛋白胨水

A.3.1 成分

胰胨或胰酪胨	10.0g
蒸馏水	1 000 mL

pH6.9±0.2

A.3.2 制法

加热搅拌溶解胰胨或胰酪胨于蒸馏水中。分装试管, 每管5mL。121℃高压灭菌15 min。

A.4 缓冲葡萄糖蛋白胨水 (MR-VP 试验用)

A.4.1 成分

多胨	7.0g
葡萄糖	5.0g
磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	5.0g
蒸馏水	1 000mL

PH7.0

A.4.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中, 调节pH, 分装试管, 每管1 mL, 121℃高压灭菌15 min,

备用。

A.4.3 甲基红（MR）试验

A.4.3.1 甲基红试剂

A.4.3.1.1 成分

甲基红	10 mg
95%乙醇	30 mL
蒸馏水	20 mL

A.4.3.1.2 制法

10mg甲基红溶于30 mL95%乙醇中，然后加入20 mL蒸馏水。

A.4.3.1.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水，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.4.4 V-P 试验

A.4.4.1 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.4.4.2 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.4.4.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水，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.5 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.5.1 成分

柠檬酸钠	2.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢铵	1.0 g
硫酸镁	0.2 g

溴百里香酚蓝	0.08 g
琼脂	8.0 g~18.0g
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.8±0.2	

A.5.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 10 mL，121℃ 高压 15 min，制成斜面。

A.5.3 实验方法

挑取培养物接种于整个培养基斜面，36℃ ±1℃ 培养 24h ±2h，观察结果。阳性者培养基变为蓝色。

A.6 磷酸盐缓冲液

A.6.1 成分

磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	34.0g
蒸馏水	500 mL
pH7.2	

A.6.2 制法

贮存液：称取 34.0g 的磷酸二氢钾溶于 500mL 蒸馏水中，用大约 175mL 的 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH，用蒸馏水稀释至 1000mL 后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液 1.25mL，用蒸馏水稀释至 1 000mL，分装于适宜容器中，121℃ 高压灭菌 15 min。

A.7 伊红美蓝琼脂 (EMB)

A.7.1 成分

蛋白胨	10.0g
乳糖	10.0g
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄)	2.0g
琼脂	15.0g
伊红γ (水溶液)	0.4g 或 2% 水溶液 20 mL
美蓝	0.065g 或 0.5% 水溶液 13mL

蒸馏水	1 000 mL
-----	----------

pH7.1±0.2

A.7.2 制法

在1 000 mL蒸馏水中煮沸溶解蛋白胨、磷酸盐和琼脂，加水补足。分装于三角烧瓶中。每瓶100 mL或200 mL，调节pH，121℃高压灭菌15 min。使用前将琼脂融化，于每 100mL 琼脂中加 5 mL灭菌的20%乳糖溶液，2mL的2%的伊红 γ 水溶液和1.3mL 0.5%的美蓝水溶液，摇匀，冷至45℃~50℃倾注平皿。

A.8 营养琼脂斜面

A.8.1 成分

牛肉膏	3.0g
蛋白胨	5.0g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1 000 mL

pH7.3±0.1

A.8.2 制法

将上述成分加于蒸馏水中，煮沸溶解，调节pH。分装合适的试管，121℃高压灭菌15 min。灭菌后摆成斜面备用。

A.9 结晶紫中性红胆盐琼脂（VRBA）

A.9.1 成分

蛋白胨	7.0g
酵母膏	3.0g
乳糖	10.0g
氯化钠	5.0g
胆盐或3号胆盐	1.5g
中性红	0.03g
结晶紫	0.002g
琼脂	15g~18g
蒸馏水	1 000 mL

pH7.4±0.1

A.9.2 制法

将上述成分溶于蒸馏水中，静置几分钟，充分搅拌，调节pH。煮沸2min，将培养基冷至45℃~50℃倾注平板。使用前临时制备，不得超过3h。

A.10 VRBA-MUG

A.10.1 成分

蛋白胨	7.0g
酵母膏	3.0g
乳糖	10.0g
氯化钠	5.0g
胆盐或3号胆盐	1.5g
中性红	0.03g
结晶紫	0.002g
琼脂	15g~18g
蒸馏水	1 000 mL
4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖苷 (MUG)	0.1g

pH7.4±0.1

A.10.2 制法

将上述成分溶于蒸馏水中，静置几分钟，充分搅拌，调节pH。煮沸2min，将培养基冷至45℃~50℃使用。

A.11 革兰氏染色液

A.11.1 结晶紫染色液

A.11.1.1 成分

结晶紫	1.0g
95%乙醇	20.0mL
1%草酸铵水溶液	80.0mL

A.11.1.2 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.11.2 革兰氏碘液

A.11.2.1 成分

碘	1.0g
碘化钾	2.0g
蒸馏水	300mL

A.11.2.2 制法

将碘与碘化钾先行混合,加入少许蒸馏水充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至300mL。

A.11.3 沙黄复染液

A.11.3.1 成分

沙黄	0.25g
95%乙醇	10.0mL
蒸馏水	90.0mL

A.11.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.11.4 染色法

A.11.4.1 涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染液,染1min,水洗。

A.11.4.2 滴加革兰氏碘液,作用1min,水洗。

A.11.4.3 滴加95%乙醇脱色约15s~30s,直至染色液被洗掉,不要过分脱色,水洗。

A.11.4.4 滴加复染液,复染1min,水洗、待干、镜检。

A.12 Kovacs 靛基质试剂

A.12.1 成分

对二甲氨基苯甲醛	5.0g
戊醇	75.0mL
盐酸(浓)	25.0mL

A.12.2 制法

将对二甲氨基苯甲醛溶于戊醇中,然后慢慢加入浓盐酸即可。

A.12.3 试验方法

将培养物接种蛋白胨水,36℃±1℃培养24h±2h后,加Kovacs靛基质试剂0.2 mL~0.3 mL,上层出现红色为靛基质阳性反应。

A.13 1mol/L NaOH

A.13.1 成分

NaOH	40.0g
蒸馏水	1 000mL

A.13.2 制法:

称取40g氢氧化钠溶于1000mL蒸馏水中，121℃高压灭菌15min。

A.14 1mol/L HCl:

A.14.1 成分

HCl	90 mL
蒸馏水	1 000mL

A.14.2 制法:

移取浓盐酸90mL，用蒸馏水稀释至1000mL，121℃高压灭菌15min。

附录 B 最可能数 (MPN) 检索表

每g (ml) 检样中大肠埃希氏菌最可能数 (MPN) 的检索表B.1。

表 B.1 大肠埃希氏菌最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	-

注1: 本表采用3个稀释度[0.1g (mL)、0.01g (mL)和0.001g (mL)], 每个稀释接种3管。
注2: 表内所列检样量如改用1g (mL)、0.1g (mL)和0.01g(mL)时, 表内数字应相应降低10倍; 如改用0.01g(mL)、0.001g (mL)、0.0001g (mL)时, 则表内数字应相应增高10倍, 其余类推。

四、霉菌和酵母菌检验标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》

2 适用范围

本程序规定了食品中霉菌和酵母菌 (moulds and yeasts) 的计数方法。

本程序第一法适用于各类食品中霉菌和酵母的计数, 第二法适用于番茄酱罐

头、番茄汁中霉菌的计数。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 3.1 培养箱：28℃±1℃。
- 3.2 拍击式均质器及均质袋。
- 3.3 电子天平：感量 0.1 g。
- 3.4 无菌锥形瓶：容量 500 mL。
- 3.5 无菌吸管：1 mL(具 0.01 mL 刻度),10 mL(具 0.1 mL 刻度)。
- 3.6 无菌试管：18 mm×180 mm。
- 3.7 旋涡混合器。
- 3.8 无菌平皿：直径 90 mm。
- 3.9 恒温水浴箱：46℃±1℃。
- 3.10 显微镜：10 倍~100 倍。
- 3.11 微量移液器及枪头：1.0 mL。
- 3.12 折光仪。
- 3.13 郝氏计测玻片：具有标准计测室的特制玻片。
- 3.14 盖玻片。
- 3.15 测微器：具标准刻度的玻片。

4 培养基和试剂

- 4.1 生理盐水：见 A.1。
- 4.2 马铃薯葡萄糖琼脂：见 A.2。
- 4.3 孟加拉红琼脂：见 A.3。
- 4.4 磷酸盐缓冲液：见 A.4。

第一法 霉菌和酵母平板计数法

5 检验程序

霉菌和酵母菌计数的检验程序见图1。

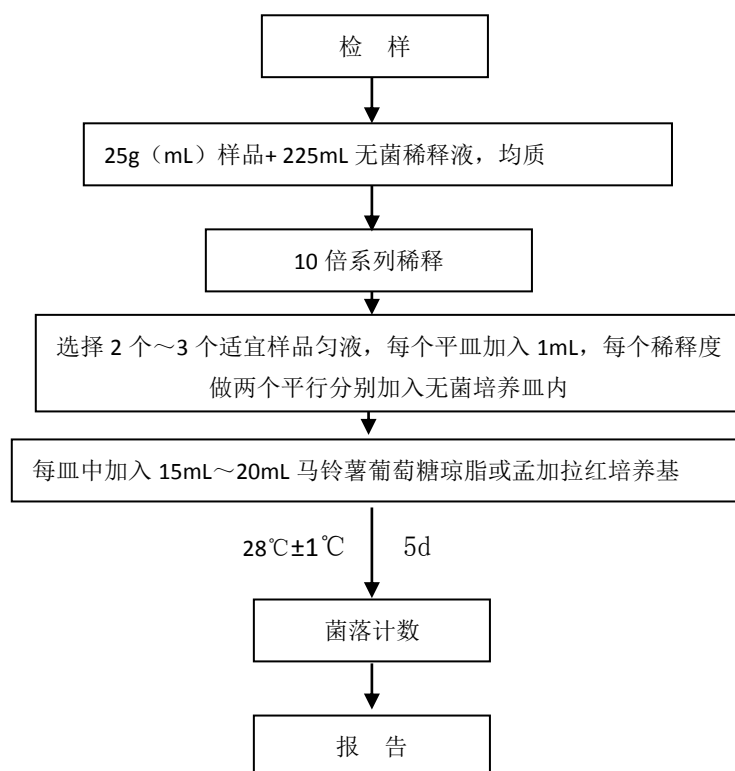


图 1 霉菌和酵母平板计数法的检验程序

6 操作步骤

6.1 样品的稀释

6.1.1 固体和半固体样品：称取 25 g 样品，至盛有 225 mL 无菌稀释液（蒸馏水或生理盐水或磷酸盐缓冲液）的适宜容器中，充分振摇，或用拍击式均质器拍打 1min~2min，制成 1:10 的样品匀液。

6.1.2 液体样品：以无菌吸管吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL 无菌稀释液（蒸馏水或生理盐水或磷酸盐缓冲液）的适宜容器内（可在容器内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分振摇，或用拍击式均质器拍打 1min~2min，制成 1:10 的样品匀液。

6.1.3 取 1 mL 1:10 稀释液注入含有 9 mL 无稀释液的试管中，另换一支 1 mL 无菌吸管反复吹吸，或在旋涡混合器上混匀，此液为 1:100 稀释液。

6.1.4 按 6.1.3 操作程序，制备 10 倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用 1 次 1 mL 无菌吸管。

6.1.5 根据对样品污染状况的估计，选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行 10 倍递增稀释的同时，每个稀释度分别吸取 1 mL

样品匀液于 2 个无菌平皿内。同时分别取 1 mL 稀释液加入 2 个无菌平皿作空白对照。

6.1.6 及时将 20mL~25 mL 冷却至 46℃ 的马铃薯葡萄糖琼脂或孟加拉红培养基（可放置于 46℃ ±1℃ 恒温水浴箱中保温）倾注平皿，并转动平皿使其混合均匀。置水平台面待培养基完全凝固。

6.2 培养

琼脂凝固后，正置平板，28℃ ±1℃ 培养，培养 5d 观察并记录。

6.3 菌落计数

用肉眼观察，必要时可用放大镜或低倍镜，记录稀释倍数和相应的霉菌和酵母数。以菌落形成单位（colony-forming units, CFU）表示。

选取菌落数在 10 CFU~150 CFU 的平板，根据菌落形态分别计数霉菌和酵母数。霉菌蔓延生长覆盖整个平板的可记录为蔓延生长。

7 结果与报告

7.1 计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数计算。

7.1.1 若有两个稀释度平板上菌落数均在 10 CFU~150 CFU 之间，则按照 GB 4789.2 的相应规定进行计算。

7.1.2 若所有平板上菌落数均大于 150 CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

7.1.3 若所有平板上菌落数均小于 10 CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.1.4 若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

7.1.5 若所有稀释度的平板菌落数均不在 10 CFU~150 CFU 之间，其中一部分小于 10 CFU 或大于 150 CFU 时，则以最接近 10 CFU 或 150 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.2 报告

7.2.1 菌落数按“四舍五入”原则修约。菌落数在 10 以内时，采用一位有效数字

报告；菌落数在 10~100 之间时，采用两位有效数字报告。

7.2.2 菌落数大于或等于 100 时，前第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数来表示结果；也可用 10 的指数形式来表示，此时也按“四舍五入”原则修约，采用两位有效数字。

7.2.3 若空白对照平板上有菌落出现，则此次检测结果无效。

7.2.4 称重取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/mL 为单位报告，报告或分别报告霉菌和/或酵母数。

第二法 霉菌直接镜检计数法

8 操作步骤

8.1 检样的制备

取定量检样，加蒸馏水稀释至折光指数为 1.3447~1.3460（即浓度为 7.9%~8.8%），备用。

8.2 显微镜标准视野的校正

将显微镜按放大率 90~125 倍调节标准视野，使其直径为 1.382mm。

8.3 涂片

洗净郝氏计测玻片，将制好的标准液，用玻璃棒均匀的摊布于计测室，以备观察。

8.4 观测

将制好之载玻片放于显微镜标准视野下进行霉菌观测，一般每一检样观察 50 个视野，同一检样应由两人进行观察。

8.5 结果与计算

在标准视野下，发现有霉菌菌丝其长度超过标准视野（1.382mm）的 1/6 或三根菌丝总长度超过标准视野的 1/6（即测微器的一格）时即为阳性（+），否则为阴性（-）。

8.5 报告

报告每 100 个视野中全部阳性视野数为为霉菌的视野百分数（视野%）。

附录 A 培养基和试剂

A.1 生理盐水

A.1.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

称取8.5 g 氯化钠溶于1 000 mL蒸馏水中，121 °C高压灭菌15 min。

A.2 马铃薯葡萄糖琼脂

A.2.1 成分

马铃薯（去皮切块）	300 g
葡萄糖	20.0 g
琼脂	20.0 g
氯霉素	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将马铃薯去皮切块，加 1 000mL 蒸馏水，煮沸 10 min~20 min。用纱布过滤，补加蒸馏水至 1 000 mL。加入葡萄糖和琼脂，加热溶化，分装后，121 °C灭菌 20 min。倾注平板前，用少量乙醇溶解氯霉素加入培养基中

A.3 孟加拉红培养基

A.3.1 成分

蛋白胨	5.0 g
葡萄糖	10.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
硫酸镁（无水）	0.5 g
琼脂	20.0 g
孟加拉红	0.033 g
氯霉素	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

上述各成分加入蒸馏水中，加热溶化，补足蒸馏水至 1 000 mL，分装后，121 °C灭菌 20

min。倾注平板前，用少量乙醇溶解氯霉素加入培养基中。

A4 磷酸盐缓冲液

A4.1 成分

磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	34.0 g
蒸馏水	500 mL
pH 7.2	

A4.2 制法

贮存液：称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于500 mL蒸馏水中，用大约175 mL的1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH，用蒸馏水稀释至1 000 mL后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液1.25 mL，用蒸馏水稀释至1 000 mL，分装于适宜容器中，121 °C高压灭菌15 min。

五、 肠杆菌科检验标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.41-2016 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 肠杆菌科检验》

2 范围

本标准规定了食品中肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)的检验方法。

本标准第一法适用于肠杆菌科含量较低的食品中肠杆菌科的计数；第二法适用于肠杆菌科含量较高食品中肠杆菌科的计数。

3 术语和定义

3.1 肠杆菌科 *Enterobacteriaceae*

在给定条件下发酵葡萄糖产酸、氧化酶阴性的需氧或兼性厌氧革兰氏阴性无芽胞杆菌。

3.2 肠杆菌科计数 *Enumeration of Enterobacteriaceae*

按本标准规定方法，对每克或每毫升检样中的肠杆菌科进行计数。

3.3 最可能数 most probable number, MPN

基于泊松分布的一种间接计数方法。

4 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 4.1 恒温培养箱： $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.2 冰箱： $2^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.3 水浴箱： $46^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.4 天平：感量 0.1 g。
- 4.5 显微镜： $10\times \sim 100\times$ 。
- 4.6 均质器。
- 4.7 振荡器
- 4.8 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 4.9 无菌锥形瓶或等效容器：容量 150 mL、500 mL。
- 4.10 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 4.11 无菌试管：18 mm×180 mm、15 mm×150 mm。
- 4.12 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

5 培养基和试剂

- 5.1 缓冲蛋白胨水（BPW）：见 B.1。
- 5.2 煌绿胆盐葡萄糖肉汤（EE）：见 B.2。
- 5.3 结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂（VRBGA）：见 B.3。
- 5.4 营养琼脂（NA）：见 B.4。
- 5.5 葡萄糖琼脂：见 B.5。
- 5.6 革兰氏染色液：见 B.6。
- 5.7 氧化酶试剂：见 B.7。
- 5.8 无菌 1 mol/L NaOH：见 B.8。
- 5.9 无菌 1 mol/L HCl：见 B.9。

第一法 肠杆菌科平板计数法

6 检验程序

肠杆菌科平板计数法检验程序见图1。

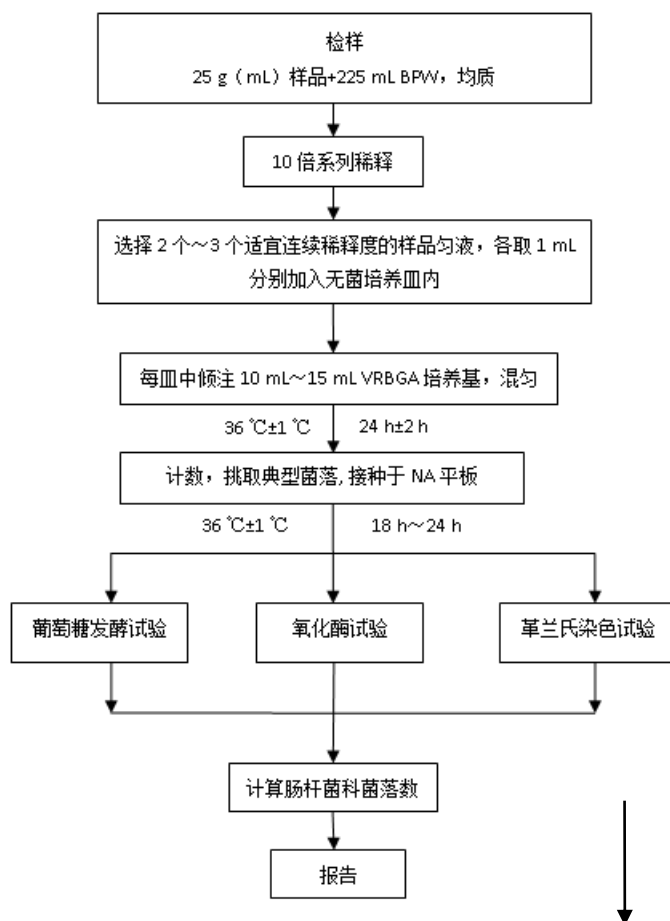


图1 肠杆菌科平板计数法检验程序

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 固体和半固体样品: 称取 25 g 样品置盛有 225 mL BPW, 8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min, 或放入盛有 225 mL BPW 的无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 1 min~2 min, 制成 1:10 的样品匀液。

7.1.2 液体样品: 以无菌吸管吸取 25 mL 样品置盛有 225 mL BPW 的无菌锥形瓶 (瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠) 中, 充分混匀, 制成 1:10 的样品匀液。

7.1.3 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL, 沿管壁缓缓注

入 9 mL BPW 的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用 1 支 1 mL 无菌吸管反复吹打，使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

7.1.4 按 6.1.3 操作程序，依次制成 10 倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次，换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样品接种完毕，全过程不得超过 15 min。

7.2 倾注平板和培养

7.2.1 根据对样品污染状况的估计及相关限量要求，选择 2 个~3 个适宜的连续稀释度的样品匀液（液体样品可以选择原液），每个稀释度接种 2 个无菌平皿。同时，分别吸取 1 mL BPW 加入两个无菌平皿内作为空白对照。

7.2.2 将 10 mL~15 mL 冷却至 46 °C 的 VRBGA（可放置于 46 °C ±1 °C 恒温水浴箱中保温）倾注于每个平皿中。小心旋转平皿，使样品匀液与培养基充分混匀。

7.2.3 待琼脂凝固后，倾注一薄层同样的培养基覆盖平板表层。防止蔓延生长并使菌落特征更为明显。

7.2.4 待 VRBGA 平板上层琼脂凝固后翻转平板，36 °C ±1 °C 培养 18 h~24 h。

7.3 典型菌落计数和确认

7.3.1 肠杆菌科典型菌落为有或无沉淀环的粉红色至红色或紫色菌落。选取典型菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板，只计数典型菌落数。有些肠杆菌科可能导致菌落或培养基脱色，因此，如无典型菌落时则计数无色菌落。菌落计数以菌落形成单位（colony-forming units, CFU）表示。

7.3.2 其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数；若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘以 2，代表一个平板菌落数。

7.3.3 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

7.3.4 从每个平板上至少挑取 5 个（小于 5 个全选）典型菌落进行确认；如果有不同形态的典型菌落，则每种形态分别至少挑取 1 个菌落进行确认。

7.3.5 典型菌落的确认

a) 分别将所挑选的每一个菌落，划线于营养琼脂平板，36 °C ±1 °C，培养

18 h~24 h, 挑取平板上的菌落进行革兰氏染色镜检、氧化酶试验及葡萄糖发酵试验。

b) 革兰氏染色镜检: 肠杆菌科为革兰氏阴性杆菌, 无芽孢, 大小为 (0.3~1.0) μm \times (1.0~6.0) μm 。

c) 氧化酶试验: 用铂/铱接种环或玻璃棒 (不要用镍铬接种环) 挑取单个菌落涂于浸湿氧化酶试剂的滤纸上, 滤纸的颜色在 10 s 内变成蓝紫色, 判为阳性反应。

d) 葡萄糖发酵试验: 用接种针挑取少许氧化酶阴性的同一个菌落, 穿刺于葡萄糖琼脂内, 于 36 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h \pm 2 h, 若试管内的内容物变为黄色, 判为阳性反应。

7.4 结果的计算

7.4.1 一般原则

若有两个连续稀释度的平板典型菌落数在适宜计数范围内, 按式(1)计算。示例见 A.1、A.2、A.3、A.4。

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

N —样品中肠杆菌科菌落数;

$\sum a$ —确证的肠杆菌科菌落数之和;

n_1 —第一稀释度 (低稀释倍数) 平板个数 (含确证的肠杆菌科菌落)

n_2 —第二稀释度 (高稀释倍数) 平板个数 (含确证的肠杆菌科菌落)

d —稀释因子 (第一稀释度)

其中, a 按式 (2) 计算:

$$a = \frac{b}{A} \times C \dots\dots\dots (2)$$

式中:

a —确证的肠杆菌科菌落数；

b —某一平板中 A 个菌落中被确证为肠杆菌科的菌落数， $b \leq A$ ；

A —某一平板中用于确认试验的菌落数；

C —某一平板中典型菌落总数；

7.4.2 低菌落数

若最低稀释度（包括液体样品原液）平板的典型菌落数均小于 15 CFU，具有确证的肠杆菌科菌落，则以确证的菌落数乘以最低稀释倍数计算。

若最低稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，或典型菌落数均小于 15 CFU，且无确证的肠杆菌科菌落，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

7.4.3 特殊情况

第一稀释度平板上的典型菌落数均大于 150 CFU，且有确证的肠杆菌科菌落，以及第二稀释度平板上无确证的肠杆菌科菌落 典型菌落数不在 15 CFU~150 CFU 之间，则以确证的菌落数乘以第一稀释倍数计算，示例见 A.5。

若所有稀释度的平板上典型菌落数均不在适宜计数范围内，且无确证的肠杆菌科菌落，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

8 报告

8.1 菌落数小于 100 时，以整数报告。

8.2 菌落数大于或等于 100 时，对第 3 位数字进行修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数；也可用 10 的指数形式来表示，采用两位有效数字。

8.3 数字修约按“四舍五入”原则进行。

8.4 若所有平板上为蔓延菌落而无法计数，则报告菌落蔓延。

8.5 若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。

8.6 称重取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/mL 为单位报告。

第二法 肠杆菌科 MPN 计数法

9 检验程序

肠杆菌科 MPN 计数法检验程序见图 2。

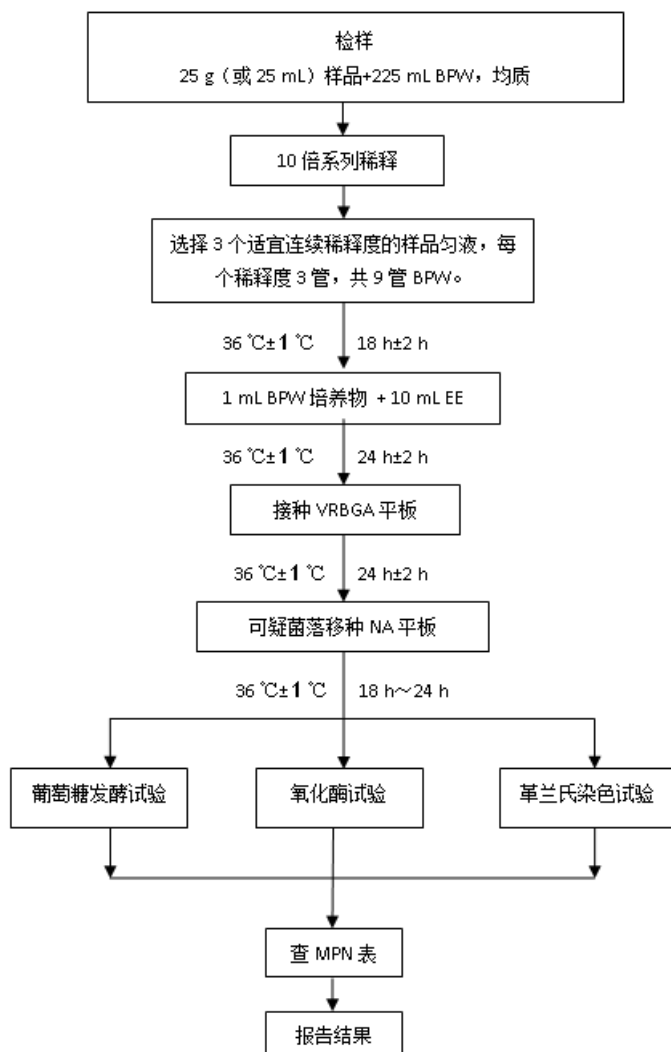


图 2 肠杆菌科 MPN 计数法检验程序

10 操作步骤

10.1 样品的稀释

按7.1进行。

10.2 接种和培养

10.2.1 非选择性前增菌

根据对样品污染状况的估计及相关限量要求，选择3个适宜连续稀释度的样品匀液，每个稀释度3管，共9管BPW于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。

10.2.2 选择性增菌

从BPW各培养管中，分别移取1 mL培养物，接种于10 mL的 EE肉汤中，

36 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h。

10.2.3 分离

用接种环从 EE 各肉汤管中分别取培养物 1 环，划线接种于 VRBGA 平板，36 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h，观察平板上有无典型菌落。

10.3 典型菌落确认

典型菌落确认见 7.3。

11 报告

肠杆菌科为革兰氏阴性无芽胞杆菌，发酵葡萄糖产酸、氧化酶阴性。只要有 1 个菌落确认为肠杆菌科，其所代表的 EE 管即为肠杆菌科阳性，依据 EE 阳性管数查 MPN 表（见附录 B），报告每 g（mL）样品中肠杆菌科的 MPN 值。称重取样以 MPN/g 为单位报告，体积取样以 MPN/mL 为单位报告。

附录 A 结果计算示例

A.1 两个连续稀释度均含适宜的典型菌落数平板，并含有已确证的肠杆菌科菌落，数据见表 A.1。

表 A.1 肠杆菌科平板计数结果示例 1

稀释度	1:100（第一稀释度）		1:1000（第二稀释度）	
典型菌落数（CFU）	126	145	20	24
用于确认试验的菌落数（CFU）	5	5	5	5
确证的菌落数（CFU）	4	5	4	3
<i>a</i>	$4/5 \times 126 = 101$	$5/5 \times 145 = 145$	$4/5 \times 20 = 16$	$3/5 \times 24 = 14$

$$N = \frac{101 + 145 + 16 + 14}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{276}{0.022} = 12545$$

上述数据按 8.2 数字修约后，表示为 13000 或 1.3×10^4 。

A.2 两个连续稀释度均含适宜典型菌落数平板，其中某一稀释度的一个平板菌落数不在适宜范围内，或者两个稀释度各有一个平板菌落数不在适宜范围内，则相应的平板不作为计数平板，数据见表 A.2。

表 A.2 肠杆菌科平板计数结果示例 2

稀释度	1:100（第一稀释度）		1:1000（第二稀释度）	
	典型菌落数（CFU）	126	118	20
用于确认试验的菌落数（CFU）	5	8	5	/
确证的菌落数（CFU）	4	5	4	/
<i>a</i>	4/5×126=101	5/8×118=74	4/5×20=16	/

$$N = \frac{101 + 74 + 16}{[2 + (0.1 \times 1)] \times 10^{-2}} = \frac{191}{0.021} = 9095$$

上述数据按 8.2 数字修约后，表示为 9100 或 9.1×10^3 。

A.3 两个连续稀释度均含适宜典型菌落数平板，其中一个平板无已确证的肠杆菌科菌落，则相应的平板不作为计数平板，数据见表 A.3。

表 A.3 肠杆菌科平板计数结果示例 3

稀释度	1:100（第一稀释度）		1:1000（第二稀释度）	
	典型菌落数（CFU）	126	118	20
用于确认试验的菌落数（CFU）	5	6	5	5
确证的菌落数（CFU）	4	6	4	0
<i>a</i>	4/5×126=101	6/6×118=118	4/5×20=16	0

$$N = \frac{101 + 118 + 16 + 0}{[2 + (0.1 \times 1)] \times 10^{-2}} = \frac{235}{0.021} = 11190$$

上述数据按 8.2 数字修约后，表示为 11000 或 1.1×10^4 。

A.4 两个连续稀释度均含适宜典型菌落数平板，但无已确证的肠杆菌科菌落，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

A.5 第一稀释度平板上的菌落数超过 150 CFU，且有证实的肠杆菌科菌落，以及第二稀释度平板上无确证的肠杆菌科菌落或典型菌落数不在 15 CFU~150 CFU 之间，则以确证的菌落数乘以第一稀释倍数计算，数据见表 A.5。

表 A.5 肠杆菌科平板计数结果示例 5

稀释度	1:100（第一稀释度）		1:1000（第二稀释度）	
	典型菌落数/CFU	220	198	23
用于确认试验的菌落数/CFU	5	5	5	5
确证的菌落数/CFU	4	3	0	0
<i>a</i>	$4/5 \times 220 = 176$	$3/5 \times 198 = 119$	0	0

$$N = \left(\frac{176 + 119}{2} \right) \times 10^{-2} = 14750$$

附录 B 培养基和试剂

B.1 缓冲蛋白胨水 (BPW)

B.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	3.5 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1000.0 mL

B.1.2 制法

将B.1.1成分加热溶解,于25℃时调节pH至7.2±0.2,分装于500 mL 广口瓶中,每瓶225 mL,121℃高压灭菌15 min。

B.2 煌绿胆盐葡萄糖肉汤 (EE肉汤)

B.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钠 (无水)	6.45 g
磷酸二氢钾	2.0 g
牛胆盐	20.0 g
煌绿	3.0 mL (0.5 %水溶液)
蒸馏水	1000.0 mL

B.2.2 制法

将B.2.1成分溶于水中,加热煮沸至完全溶解,加热不宜超过30 min,迅速冷却培养基,于25℃调节pH至7.2±0.2,分装于灭菌的18 mm×180 mm试管中,每管10 mL,不需高压灭菌,5℃±3℃可存放一个月。

B.3 结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBGA)

B.3.1 成分

蛋白胨	7.0 g
酵母浸膏	3.0 g
3号胆盐	1.5 g

葡萄糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
中性红	0.03 g(或0.6 %酒精溶液5 mL)
结晶紫	0.002 g(或0.1 %水溶液2 mL)
琼脂粉	10.0 g~12.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

B.3.2 制法

将B.3.1中成分溶于水中，加热煮沸至完全溶解，25℃时调节pH至 7.4 ± 0.2 ，分装于灭菌的三角烧瓶中，不需高压灭菌，用前制备。倾注平板，使用前干燥平板。未干燥的平板 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 可存放两周。

B.4 营养琼脂

B.4.1 成分

牛肉浸膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂粉	10.0 g~12.0 g
蒸馏水	1000.0 mL

B.4.2 制法

将B.4.1成分溶于水中，加热煮沸，25℃时调节pH至 7.3 ± 0.2 ，121℃高压灭菌15 min。倾注平板，使用前干燥平板。未干燥的平板 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 可存放两周。

B.5 葡萄糖琼脂

B.5.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
酵母浸膏	1.5 g
葡萄糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
溴甲酚紫	0.015 g (或0.4 %溴甲酚紫酒精溶液3.75 mL)
琼脂粉	10.0 g~12.0 g
蒸馏水	1000.0 mL

B.5.2 制法

将B.5.1成分溶于水中，加热煮沸，25℃时调节pH至7.0±0.2，分装于15 mm×150 mm试管，每管约5 mL，121℃高压灭菌15 min后，试管垂直放置。于5℃±3℃可存放1周。为去除培养基中的氧气，使用前可将葡萄糖琼脂试管置于沸水浴中15 min，然后迅速冷却，备用。

B.6 革兰氏染色液

B.6.1 结晶紫染色液

B.6.1.1 成分

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

B.6.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

B.6.2 革兰氏碘液

B.6.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

B.6.2.2 制法

将碘和碘化钾先行混合，加入少许蒸馏水充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至300 mL。

B.6.3 沙黄复染液

B.6.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

B.6.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

B.6.4 试验方法

B.6.4.1 将涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染1 min，水洗。

B.6.4.2 滴加革兰氏碘液，作用1 min，水洗。

B.6.4.3 滴加95%乙醇脱色约15~30 s，直至染色液被洗掉，但不要过分脱色，水洗。

B.6.4.4 加沙黄复染液，复染 1 min，水洗、干燥、镜检。

B.6.4.5 革兰氏阳性菌呈紫色，革兰氏阴性菌呈红色。

B.7 氧化酶试剂

B.7.1 成分

N,N,N',N'-四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100.0 mL

B.7.2 制法

将 B.7.1 成分溶解于冷水中，少量新鲜配制。

B.7.3 试验方法

用细玻璃棒或一次性接种针挑去单个菌落，涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸上。在 10 s 内呈现粉红或紫红色，即为氧化酶试验阳性。不变色者为氧化酶试验阴性。

B.8 无菌 1 mol/L NaOH

B.8.1 成分

NaOH	40.0 g
蒸馏水	1000.0 mL

B.8.2 制法

称取 40 g 氢氧化钠溶于 1000 mL 蒸馏水中，121 °C 高压灭菌 15 min。

B.9 无菌 1 mol/L HCl

B.9.1 成分

HCl	90.0 mL
蒸馏水	1000.0 mL

B.9.2 制法

移取浓盐酸 90 mL，用蒸馏水稀释至 1000 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

附录 C 肠杆菌科最可能数 (MPN) 检索表

每克 (毫升) 检样中肠杆菌科最可能数 (MPN) 的检索表C.1。

表 C.1 肠杆菌科最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	-

注1: 本表采用3个稀释度[0.1g (mL)、0.01g (mL)和0.001g (mL)], 每个稀释接种3管。
 注2: 表内所列检样量如改用1g (mL)、0.1g (mL)和0.01g(mL)时, 表内数字应相应降低10倍; 如改用0.01g(mL)、0.001g (mL)、0.0001g (mL)时, 则表内数字应相应增高10倍, 其余类推。

第三节 食源性致病菌检验标准操作程序

一、 克罗诺杆菌属（原阪崎肠杆菌）检验标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.40-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）检验》

2 适用范围

本程序规定了食品中克罗诺杆菌属（*Cronobacter* spp.）（原阪崎肠杆菌）的检验方法。

本程序适用于婴幼儿配方食品、乳和乳制品及其原料中克罗诺杆菌属的检验。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 3.1 恒温培养箱：25 °C ±1 °C，36 °C ±1 °C，44 °C ±0.5 °C。
- 3.2 冰箱：2 °C ~5 °C。
- 3.3 恒温水浴箱：44 °C ±0.5 °C。
- 3.4 天平：感量 0.1 g。
- 3.5 均质器。
- 3.6 振荡器。
- 3.7 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 3.8 无菌锥形瓶：容量 100 mL、200 mL、2 000 mL。
- 3.9 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 3.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 3.11 全自动微生物生化鉴定系统。

4 培养基和试剂

- 4.1 缓冲蛋白胨水（buffer peptone water, BPW）：见附录 A 中 A.1。
- 4.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素（modified lauryl sulfate tryptose

broth-vancomycin medium, mLST-Vm)：见附录 A 中 A.2。

4.3 阪崎肠杆菌显色培养基。

4.4 胰蛋白胨大豆琼脂 (trypticase Soy Agar, TSA)：见附录 A 中 A.3。

4.5 生化鉴定试剂盒。

4.6 氧化酶试剂：见附录 A 中 A.4。

4.7 L-赖氨酸脱羧酶培养基：见附录 A 中 A.5。

4.8 L-鸟氨酸脱羧酶培养基：见附录 A 中 A.6。

4.9 L-精氨酸双水解酶培养基：见附录 A 中 A.7。

4.10 糖类发酵培养基：见附录 A 中 A.8。

4.11 西蒙氏柠檬酸盐培养基：见附录 A 中 A.9。

第一法 定性检验

5 检验程序

检验程序见图 1。

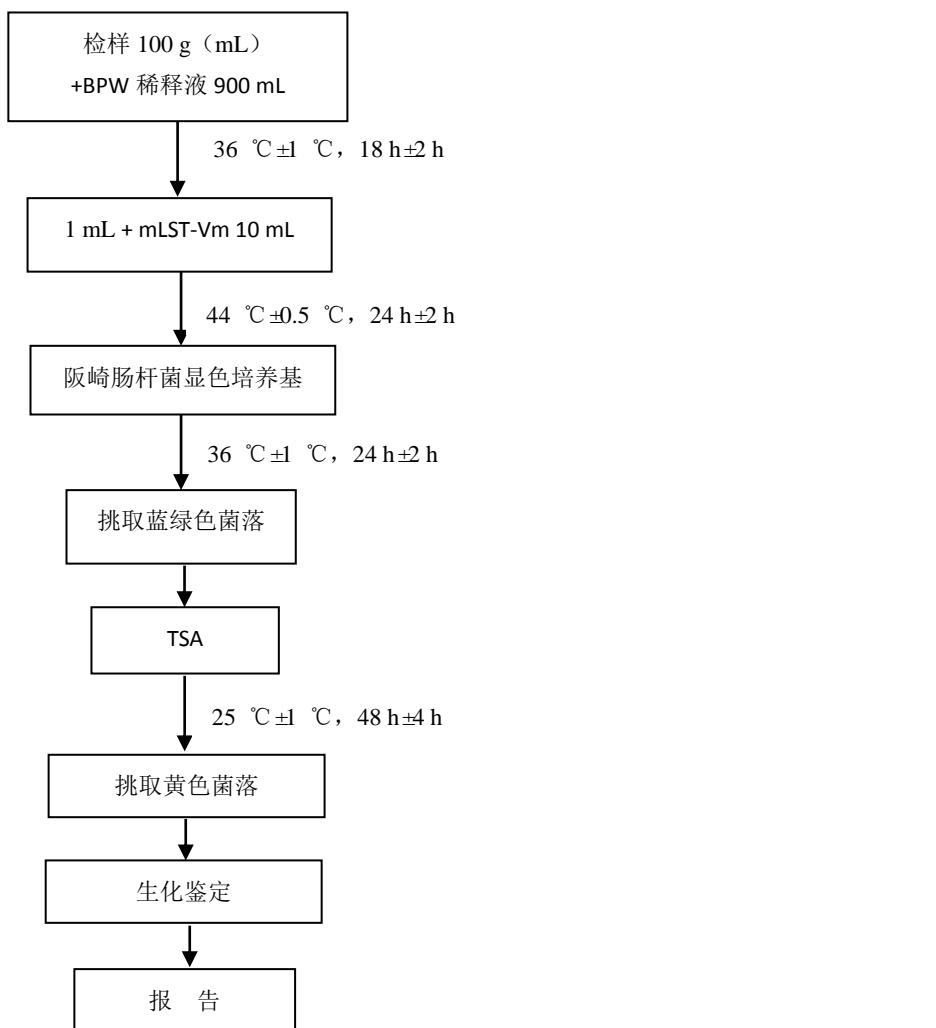


图 1 克罗诺杆菌属检验程序

6 操作步骤

6.1 前增菌和增菌

取检样 100 g (mL) 加入已预热至 44 °C 装有 900 mL 缓冲蛋白胨水 (如果检测样品为配方粉或谷物辅助食品, 可使用无菌水作为稀释液) 的锥形瓶中, 用手缓缓地摇动至充分溶解, 36 °C ± 1 °C 培养 18 h ± 2 h。移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤, 44 °C ± 0.5 °C 培养 24 h ± 2 h。

6.2 分离

6.2.1 轻轻混匀 mLST-Vm 肉汤培养物, 各取增菌培养物 1 环, 分别划线接种于两个阪崎肠杆菌显色培养基平板, 36 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h。

6.2.2 挑取 1 个~5 个可疑菌落, 划线接种于 TSA 平板。25 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 4 h。

6.3 鉴定

自 TSA 平板上直接挑取黄色可疑菌落，进行生化鉴定。克罗诺杆菌属的主要生化特征见表 1。可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统。

表 1 克罗诺杆菌属的主要生化特征

生化试验		特 征
黄色素产生		+
氧化酶		-
L-赖氨酸脱羧酶		-
L-鸟氨酸脱羧酶		(+)
L-精氨酸双水解酶		+
柠檬酸水解		(+)
发酵	D-山梨醇	(-)
	L-鼠李糖	+
	D-蔗糖	+
	D-蜜二糖	+
	苦杏仁甙	+
注：+ >99% 阳性；- >99% 阴性；(+) 90% - 99% 阳性；(-) 90% - 99% 阴性。		

7 结果与报告

综合菌落形态和生化特征，报告每 100 g (mL) 样品中检出或未检出克罗诺杆菌属。

第二法 MPN 计数法

8 操作步骤

8.1 样品的稀释

8.1.1 固体和半固体样品：无菌称取样品 100 g、10 g、1 g 各三份，加入已预热至 44 °C 分别盛有 900 mL、90 mL、9 mL BPW（如果检测样品为配方粉或谷物辅助食品，可使用无菌水作为稀释液）中，轻轻振摇使充分溶解，制成 1:10 样品匀液，置 36 °C ± 1 °C 培养 18h ± 2h。分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤，44 °C ± 0.5 °C 培养 24h ± 2h。

8.1.2 液体样品：以无菌吸管分别取样品 100 mL、10 mL、1 mL 各三份，加入已预热至 44 °C 分别盛有 900 mL、90 mL、9 mL BPW 中，轻轻振摇使充分混匀，

制成 1:10 样品匀液，置 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤， $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。

8.2 分离、鉴定

同 6.2-6.3。

9 结果与报告

综合菌落形态、生化特征，根据证实为克罗诺杆菌属的阳性管数，查 MPN 检索表，报告每 100 g (mL) 样品中克罗诺杆菌属的 MPN 值（见附录 B 中表 B.1）。

附录 A 培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水 (BPW)

A.1.1 成分

蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.2

A.1.2 制法

加热搅拌至溶解，调节 pH， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素 (Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium, mLST-Vm)

A.2.1 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (mLST) 肉汤

A.2.1.1 成分

氯化钠	34.0 g
胰蛋白胨	20.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸二氢钾	2.75 g
磷酸氢二钾	2.75 g

十二烷基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.8±0.2	

A.2.1.2 制法

加热搅拌至溶解，调节 pH。分装每管 10 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2.2 万古霉素溶液

A.2.2.1 成分

万古霉素	10.0 mg
蒸馏水	10.0 mL

A.2.2.2 制法

10.0 mg 万古霉素溶解于 10.0 mL 蒸馏水，过滤除菌。

万古霉素溶液可以在 0 °C-5 °C 保存 15 天。

A.2.3 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素 (Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium, mLST-Vm)

每 10 mL mLST 加入万古霉素溶液 0.1 mL，混合液中万古霉素的终浓度为 10 µg/ mL。

注意：mLST-Vm 必须在 24 h 之内使用。

A.3 胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA)

A.3.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
植物蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.3±0.2	

A.3.2 制法

加热搅拌至溶解，煮沸 1 min，调节 pH，121 °C 高压 15 min。

A.4 氧化酶试剂

A.4.1 成分

<i>N,N,N',N'</i> -四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100 mL

A.4.2 制法

少量新鲜配制，于冰箱内避光保存，在 7 d 之内使用。

A.4.3 试验方法

用玻璃棒或一次性接种针挑取单个特征性菌落，涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸平板上。如果滤纸在 10 s 中之内未变为紫红色、紫色或深蓝色，则为氧化酶试验阴性，否则即为氧化酶实验阳性。

注意：实验中切勿使用镍/铬材料。

A.5 L-赖氨酸脱羧酶培养基

A.5.1 成分

L-赖氨酸盐酸盐 (L-lysine monohydrochloride)	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.5.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL，121 °C 高压 15 min。

A.5.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-赖氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h，观察结果。L-赖氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.6 L-鸟氨酸脱羧酶培养基

A.6.1 成分

L-鸟氨酸盐酸盐 (L-ornithine monohydrochloride)	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g

葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.6.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL。121 °C 高压 15 min。

A.6.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-鸟氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h，观察结果。L-鸟氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.7 L-精氨酸双水解酶培养基

A.7.1 成分

L-精氨酸盐酸盐（L-arginine monohydrochloride）	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.7.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL。121 °C 高压 15 min。

A.7.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-精氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h，观察结果。L-精氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.8 糖类发酵培养基

A.8.1 基础培养基

A.8.1.1 成分

酪蛋白（酶消化）	10 g
氯化钠	5 g

酚红	0.02 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.8±0.2	

A.8.1.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL。121 °C 高压 15 min。

A.8.2 糖类溶液（D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙）

A.8.2.1 成分

糖	8 g
蒸馏水	100 mL

A.8.2.2 制法

分别称取 D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙等糖类成分各 8 g，溶于 100 mL 蒸馏水中，过滤除菌，制成 80 mg/mL 的糖类溶液。

A.8.3 完全培养基

A.8.3.1 成分

基础培养基	875 mL
糖类溶液	125 mL

A.8.3.2 制法

无菌操作，将每种糖类溶液加入基础培养基，混匀；分装到无菌试管中，每管 10 mL。

A.8.4 实验方法

挑取培养物接种于各种糖类发酵培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h，观察结果。糖类发酵试验阳性者，培养基呈黄色，阴性者为红色。

A.9 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.9.1 成分

柠檬酸钠	2.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢铵	1.0 g
硫酸镁	0.2 g

溴百里香酚蓝	0.08 g
琼脂	8.0~18.0g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.9.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 10 mL，121 °C 高压 15 min，制成斜面。

A.9.3 实验方法

挑取培养物接种于整个培养基斜面，36 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h，观察结果。阳性者培养基变为蓝色。

附录 B 最可能数 (MPN) 检索表

表 B.1 每 100 g (mL) 检样中克罗诺杆菌属最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
100	10	1		下限	上限	100	10	1		下限	上限
0	0	0	<0.3	--	0.95	2	2	0	2.1	0.45	4.2
0	0	1	0.3	0.015	0.96	2	2	1	2.8	0.87	9.4
0	1	0	0.3	0.015	1.1	2	2	2	3.5	0.87	9.4
0	1	1	0.61	0.12	1.8	2	3	0	2.9	0.87	9.4
0	2	0	0.62	0.12	1.8	2	3	1	3.6	0.87	9.4
0	3	0	0.94	0.36	3.8	3	0	0	2.3	0.46	9.4
1	0	0	0.36	0.017	1.8	3	0	1	3.8	0.87	11
1	0	1	0.72	0.13	1.8	3	0	2	6.4	1.7	18
1	0	2	1.1	0.36	3.8	3	1	0	4.3	0.9	18
1	1	0	0.74	0.13	2	3	1	1	7.5	1.7	20
1	1	1	1.1	0.36	3.8	3	1	2	12	3.7	42
1	2	0	1.1	0.36	4.2	3	1	3	16	4	42
1	2	1	1.5	0.45	4.2	3	2	0	9.3	1.8	42
1	3	0	1.6	0.45	4.2	3	2	1	15	3.7	42
2	0	0	0.92	0.14	3.8	3	2	2	21	4	43
2	0	1	1.4	0.36	4.2	3	2	3	29	9	100
2	0	2	2	0.45	4.2	3	3	0	24	4.2	100
2	1	0	1.5	0.37	4.2	3	3	1	46	9	200
2	1	1	2	0.45	4.2	3	3	2	110	18	410
2	1	2	2.7	0.87	9.4	3	3	3	>110	42	--

注 1: 本表采用 3 个检样量[100 g (mL)、10 g (mL) 和 1 g (mL)], 每个检样量接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 000 g (mL)、100 g (mL)、和 10 g (mL) 时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 10 g (mL)、1 g (mL)、和 0.1 g (mL) 时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

二、 创伤弧菌检验标准操作程序

1 方法来源

FDA/BAM Chapter 9 Vibrio 2004

2 适用范围

本程序规定了食品中创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 的检验方法。

本程序适用于食品中创伤弧菌的检验。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外, 其他设备和材料如下。

- 3.1 恒温培养箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $39.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 3.2 冰箱: $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $7\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 3.3 恒温水浴箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 3.4 均质器或无菌乳钵。
- 3.5 天平: 感量 0.1 g。
- 3.6 无菌试管: 18 mm×180 mm、15 mm×100 mm。
- 3.7 无菌吸管: 1 mL (具 0.01 mL 刻度)、10 mL (具 0.1 mL 刻度) 或微量移液器及吸头。
- 3.8 无菌锥形瓶: 容量 250 mL、500 mL、1000 mL。
- 3.9 无菌培养皿: 直径 90 mm。
- 3.10 无菌手术剪、镊子。
- 3.11 PCR 仪。
- 3.12 电泳装置。
- 3.13 凝胶分析成像系统。
- 3.14 PCR 超净工作台。
- 3.15 高速台式离心机 (15000 r/min)。
- 3.16 微量可调移液器 (2 μL 、10 μL 、100 μL 、1000 μL) 和相应吸头。

4 培养基和试剂

- 4.1 3%氯化钠碱性蛋白胨水：见附录 A 中 A.1。
- 4.2 改良纤维二糖-多粘菌素 B-多粘菌素 E（mCPC）琼脂：见附录 A 中 A.2。
- 4.3 纤维二糖-多粘菌素 E（CC）琼脂：见附录 A 中 A.3。
- 4.4 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂：见附录 A 中 A.4。
- 4.5 3%氯化钠三糖铁琼脂：见附录 A 中 A.5。
- 4.6 嗜盐性试验培养基：见附录 A 中 A.6。
- 4.7 3%氯化钠赖氨酸脱羧酶试验培养基：见附录 A 中 A.7。
- 4.8 3%氯化钠 MR-VP 培养基：见附录 A 中 A.8。
- 4.9 3%氯化钠溶液：见附录 A 中 A.9。
- 4.10 氧化酶试剂：见附录 A 中 A.10。
- 4.11 革兰氏染色液：见附录 A 中 A.11。
- 4.12 邻硝基酚-β-D-半乳糖苷（ONPG）试剂：见附录 A 中 A.12。
- 4.13 Voges-Proskauer（V-P）试剂：见附录 A 中 A.13。
- 4.14 生化鉴定试剂盒。
- 4.15 DNA 提取液。
- 4.16 6×上样缓冲液。
- 4.17 0.5×TBE。
- 4.18 琼脂糖。
- 4.19 DNA 分子量标记物（100 bp-1000 bp）。
- 4.20 PCR 反应配套试剂。

第一法 定性检验

5 检验程序

创伤弧菌检验程序见图1。

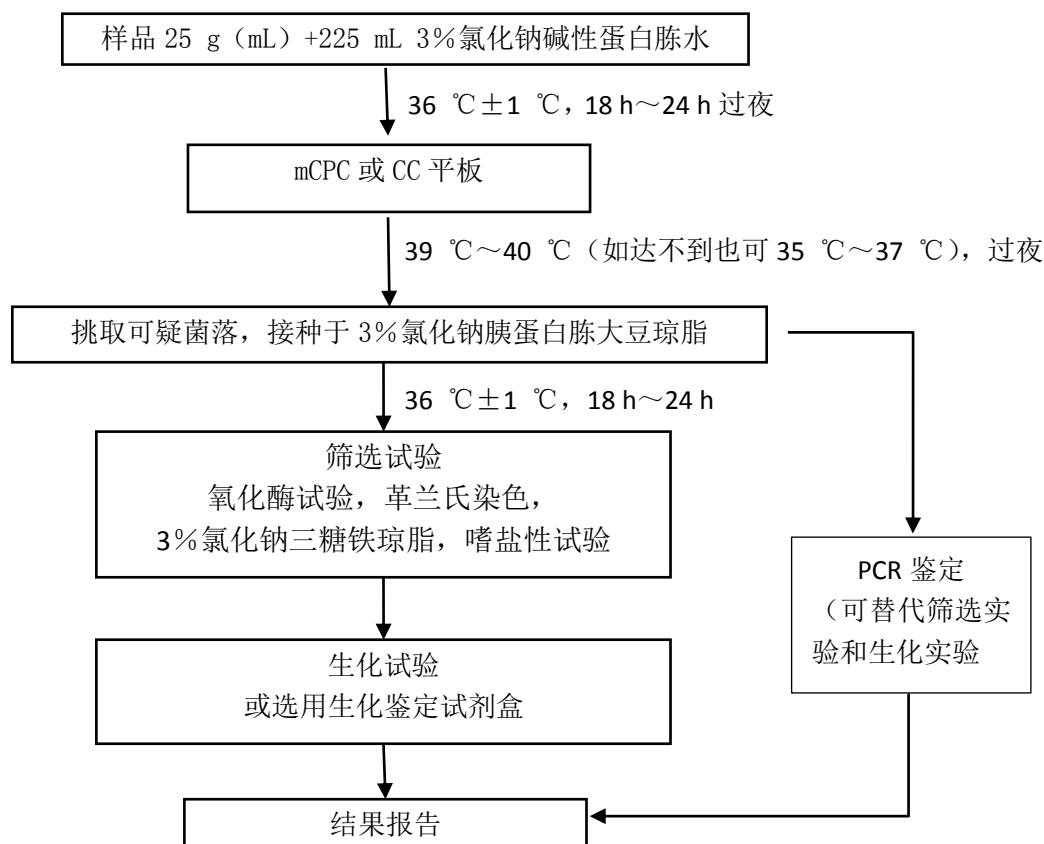


图 1 创伤弧菌检验程序

6 操作步骤

6.1 样品制备

6.1.1 非冷冻样品采集后应立即置 7 °C ~ 10 °C 冰箱保存, 尽可能及早检验; 冷冻样品应在 45 °C 以下不超过 15 min 或在 2 °C ~ 5 °C 不超过 18 h 解冻。

6.1.2 鱼类和头足类动物取表面组织、肠或鳃。贝类取全部内容物, 包括贝肉和体液; 甲壳类取整个动物, 或者动物的中心部分, 包括肠和鳃。如为带壳贝类或甲壳类, 则应先在自来水中洗刷外壳并甩干表面水分, 然后以无菌操作打开外壳, 按上述要求取相应部分。

6.1.3 以无菌操作取样品 25 g (mL), 加入 3% 氯化钠碱性蛋白胨水 225 mL, 用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min ~ 10 000 r/min 均质 1 min ~ 2 min, 或拍击式均质器拍击 1 min ~ 2 min, 制备成 1:10 的样品匀液。如无均质器, 则将样品放入

无菌乳钵，自 225 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水中取少量稀释液加入无菌乳钵，样品磨碎后放入 500 mL 无菌锥形瓶，再用少量稀释液冲洗乳钵中的残留样品 1~2 次，洗液放入锥形瓶，最后将剩余稀释液全部放入锥形瓶，充分振荡，制备 1:10 的样品匀液。

6.2 增菌

将上述 1:10 样品匀液于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

6.3 分离

6.3.1 对所有显示生长的增菌液，用接种环在距离液面以下 1 cm 内沾取一环增菌液，于 mCPC 或 CC 平板上划线分离。于 $39\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养（如果达不到 $39\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，则 $35\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）。

6.3.2 典型的创伤弧菌在 mCPC 和 CC 平板上呈现为圆的、扁平的、中心不透明边缘透明的黄色菌落，直径 1 mm~2 mm。

6.4 纯培养

挑取 3 个或以上可疑菌落，划线接种 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

6.5 初步鉴定

6.5.1 氧化酶试验：挑选纯培养的单菌落进行氧化酶试验，创伤弧菌为氧化酶阳性。

6.5.2 涂片镜检：将可疑菌落涂片，进行革兰氏染色，镜检观察形态。创伤弧菌为革兰氏阴性，呈棒状、弧状、卵圆状等多形态，无芽胞，有鞭毛。

6.5.3 挑取纯培养的单菌落，转种 3% 氯化钠三糖铁琼脂斜面并穿刺底层， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 观察结果。创伤弧菌在 3% 氯化钠三糖铁琼脂中的反应为底层变黄不变黑，无气泡，斜面颜色不变或红色加深，偶尔斜面变黄。

6.5.4 嗜盐性试验：挑取纯培养的单菌落，分别接种 0%、6%、8% 和 10% 不同氯化钠浓度的胰胨水， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h，观察液体混浊情况。创伤弧菌在无氯化钠、8% 氯化钠和 10% 氯化钠的胰胨水中不生长或微弱生长，在 6% 氯化钠的胰胨水中生长旺盛。

6.6 确证鉴定

取纯培养物分别接种含 3% 氯化钠的赖氨酸脱羧酶试验培养基、MR-VP 培养基，36 °C ±1 °C 培养 24 h~48 h 后观察结果；3% 氯化钠三糖铁琼脂隔夜培养物进行 ONPG 试验。可选择生化鉴定试剂盒。创伤弧菌的生化性状见表 1，创伤弧菌主要性状与其他弧菌的鉴别见表 2。

表 1 创伤弧菌的生化性状

试验项目	结果
革兰氏染色镜检	阴性，棒状或弧状
氧化酶	+
动力	+
D-纤维二糖	+
蔗糖	-
葡萄糖	+
分解葡萄糖产气	-
乳糖	+
硫化氢	-
赖氨酸脱羧酶	+
V-P	-
ONPG	+
注：+ 阳性；- 阴性。	

表 2 创伤弧菌主要性状与其他弧菌的鉴别

名称	氧化酶	赖氨酸	精氨酸	鸟氨酸	明胶	脲酶	V P	42 ℃ 生长	蔗糖	D 纤维二糖	乳糖	阿拉伯糖	D 甘露糖	D 甘露醇	ONPG	嗜盐性试验 NaCl 含量 (%)				
																0	3	6	8	10
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	V	+	-	+	+	-	-
副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	+	+	-	+	+	V	-	+	-	V	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	+	+	-	+	+	-	V	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
拟态弧菌 <i>V. mimicus</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
河弧菌 <i>V. fluvialis</i>	+	-	+	-	+	-	-	V	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	V	-
弗氏弧菌 <i>V. furnissii</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
梅氏弧菌 <i>V. metschnikovii</i>	-	+	+	-	+	-	+	V	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	V	-
霍利斯弧菌 <i>V. hollisae</i>	+	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophilia</i>	+	V	+	-	+	-	V	V	+	V	V	V	+	+	+	+	+	+	-	-

名称	氧化酶	赖氨酸	精氨酸	鸟氨酸	明胶	脲酶	V P	42 ℃ 生长	蔗糖	D - 纤维二糖	乳糖	阿拉伯糖	D - 甘露糖	D - 甘露醇	ONPG	嗜盐性试验 NaCl 含量 (%)				
																0	3	6	8	10
类志贺邻单胞菌 <i>P. shigelloides</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

注：nd 表示未试验；V 表示可变。

6.7 PCR 鉴定（可替代 6.5-6.6）

6.7.1 DNA 模板的制备

取可疑的纯菌落加入 500 μL 灭菌 dH₂O 中混匀煮沸 10 min，15000×g 离心 3 min。取上清液储存在-20℃直至使用。也可以用商业化的 DNA 提取试剂盒并按其说明提取制备 DNA 模板。

6.7.2 PCR 扩增

6.7.2.1 引物

Vvh-785F	5' ccg cgg tac agg ttg gcg ca 3'
Vvh-1303R	5' cgc cac cca ctt tcg ggc c 3'

扩增片段长度：519 bp

6.7.2.2 阴性对照、阳性对照设置

阴性对照(空白对照)以灭菌水作为 PCR 反应的模板；

阳性对照采用含有检测序列的 DNA（或质粒）作为 PCR 反应的模板。

6.7.2.3 PCR 反应体系

试剂	反应体积
dH ₂ O	28.2 μL
10× Buffer, MgCl ₂	5.0 μL
dNTPs	8.0 μL
引物	7.5 μL
模板	1.0 μL
Taq 酶	0.3 μL
总体积	50.0 μL

6.7.2.4 PCR 反应程序

预变性	94℃	10 min;
变性	94℃	1 min,
退火	62℃	1 min,
延伸	72℃	1 min, 25 个循环;
终延伸	72℃	10 min;
保存	8℃	——

6.7.2.5 电泳

用 0.5×TBE 制备 1.5% 的琼脂糖凝胶 (含 EB 或 Goldview 0.5μg /mL,)。各取 5 μl PCR 产物点样(可包括适量上样缓冲液),用 DNA 分子量标记物做参照,电压 100 V, 电泳 50 min (根据实验室仪器情况确定具体电泳条件)。使用凝胶成像系统对电泳结果进行保存和分析。

6.8 结果判定

阴性对照未出现条带,阳性对照出现预期大小的扩增条带条件下,如待测样品未出现 519 bp 大小的扩增条带,则可判定该样品检验结果为阴性;如待测样品出现 519 bp 大小的扩增条带,则可判定该样品检验结果为阳性。

如果阴性对照出现条带和/或阳性对照未出现预期大小的扩增条带,本次待测样品的结果无效,应重新进行试验,并排除污染因素。

6.9 报告

根据生化或 PCR 结果，报告 25 g (mL) 样品中检出或未检出创伤弧菌。

第二法 MPN 计数法

7 操作步骤

7.1 样品制备

同6.1。

7.2 增菌

7.2.1 用灭菌吸管吸取 1:10 样品匀液 1 mL，注入含有 9 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水的试管内，振摇试管混匀，制备 1:100 的样品匀液。

7.2.2 另取 1 mL 灭菌吸管，按 6.2.2.1 操作程序，依次制备 10 倍系列稀释样品匀液，每递增稀释一次，换用一支 1 mL 无菌吸管。

7.2.3 根据对检样污染情况的估计，选择 3 个适宜的连续稀释度，每个稀释度接种 3 支含有 9 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水的试管，每管接种 1 mL。置 36 °C ±1 °C 恒温箱内，培养 18 h~24 h。

7.3 分离鉴定

同定性检测。

8 结果与报告

根据证实为创伤弧菌阳性的试管管数，查最可能数 (MPN) 检索表，报告每 g (mL) 创伤弧菌的 MPN 值。

附录 A 培养基和试剂

A.1 3%氯化钠碱性蛋白胨水

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	30.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 8.5±0.2	

A.1.2 制法

将成分（A.1.1）溶于蒸馏水中，调节 pH，121 °C 高压灭菌 10 min。

A.2 改良纤维二糖-多粘菌素B-多粘菌素E（mCPC）琼脂

A.2.1 溶液1

A.2.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	5.0 g
氯化钠	20.0 g
溴麝香草酚蓝	0.04 g
甲酚红	0.04 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	900.0 mL
pH 7.6±0.2	

A.2.1.2 制法

将成分（A.2.1）溶于蒸馏水中，调节 pH，加热煮沸至完全溶解。冷至 48 °C～55 °C 备用。

A.2.2 溶液2

A.2.2.1 成分

纤维二糖	10.0 g
多粘菌素 B	100000 U

多粘菌素 E	400000 U
蒸馏水	100.0 mL

A.2.2.2 制法

纤维二糖溶于蒸馏水中，轻微加热至完全溶解，冷却后加入抗菌素，过滤除菌。将溶液 2 与溶液 1 混合，倾注平板备用。

A.3 纤维二糖-多粘菌素E (CC) 琼脂

A.3.1 溶液1

A.3.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	5.0 g
氯化钠	20.0 g
溴麝香草酚蓝	0.04 g
甲酚红	0.04 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	900.0 mL
pH 7.6±0.2	

A.3.1.2 制法

将成分 (A.3.1) 溶于蒸馏水中，调节 pH，加热煮沸至完全溶解。冷至 48 °C~55 °C 备用。

A.3.2 溶液2

A.3.2.1 成分

纤维二糖	10.0 g
多粘菌素 E	400000 U
蒸馏水	100.0 mL

A.3.2.2 制法

纤维二糖溶于蒸馏水中，轻微加热至完全溶解，冷却后加入抗菌素，过滤除菌。将溶液 2 与溶液 1 混合，倾注平板备用。

A.4 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂

A.4.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠	30.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.3±0.2	

A.4.2 制法

将成分（A.4.1）溶于蒸馏水中，调节 pH，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.5 3%氯化钠三糖铁琼脂

A.5.1 成分

蛋白胨	15.0 g
月示蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	3.0 g
酵母粉	3.0 g
氯化钠	30.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁（FeSO ₄ ）	0.2 g
酚红	0.024 g
硫代硫酸钠（Na ₂ S ₂ O ₃ ）	0.3 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.4±0.2	

A.5.2 制法

将成分（A.5.1）溶于蒸馏水中，调节 pH。分装到适当容量的试管中。121 °C 高压灭菌 15 min。制成高层斜面，斜面长 4 cm~5 cm，高层深度为 2 cm~3 cm。

A.6 嗜盐性试验培养基

A.6.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
氯化钠	按不同量加入
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.2±0.2	

A.6.2 制法

将成分（A.6.1）溶于蒸馏水中，调节 pH，共配制 5 瓶，每瓶 100 mL。每瓶分别加入不同量的氯化钠：（1）不加；（2）3 g；（3）6 g；（4）8 g；（5）10 g。分装试管，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.7 3%氯化钠赖氨酸脱羧酶试验培养基

A.7.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母粉	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.02 g
L-赖氨酸	5.0 g
氯化钠	30.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH6.8±0.2	

A.7.2 制法

除赖氨酸以外的成分（A.7.1）溶于蒸馏水中，调节 pH。再按 0.5% 的比例加入赖氨酸，对照培养基不加赖氨酸。分装小试管，每管 0.5 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.7.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种，于 36 °C ±1 °C 培养不少于 24 h，观察结果。赖氨酸脱羧酶阳性者由于产碱中和葡萄糖产酸，故培养基仍应呈紫色。阴性者无碱性产物，但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管应为黄色。

A.8 3%氯化钠MR-VP培养基

A.8.1 成分

多价蛋白胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄)	5.0 g
氯化钠	30.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 6.9±0.2	

A.8.2 制法

将成分 (A.8.1) 溶于蒸馏水中, 调节 pH, 分装试管, 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.9 3%氯化钠溶液

A.9.1 成分

氯化钠	30.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.2±0.2	

A.9.2 制法

将氯化钠溶于蒸馏水中, 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.10 氧化酶试剂

A.10.1 成分

<i>N,N,N',N'</i> -四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100.0 mL

A.10.2 制法

少量新鲜配制, 于 2 °C~5 °C 冰箱内避光保存, 在 7 d 之内使用。

A.10.3 试验方法

用细玻璃棒或一次性接种针挑取新鲜 (24 h) 菌落, 涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸平板上。如果滤纸在 10 s 之内呈现粉红或紫红色, 即为氧化酶试验阳性。不变色为氧化酶试验

阴性。

A.11 革兰氏染色液

A.11.1 结晶紫染色液

A.11.1.1 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.11.1.2 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.11.2 革兰氏碘液

A.11.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

A.11.2.2 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.11.3 沙黄复染液

A.11.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.11.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.11.4 染色法

A.11.4.1 将涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1 min，水洗。

A.11.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

A.11.4.3 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.11.4.4 滴加复染液，复染 1 min。水洗、待干、镜检。

A.12 邻硝基酚-β-D-半乳糖苷（ONPG）试剂

A.12.1 缓冲液

A.12.1.1 成分

磷酸二氢钠（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）	6.9 g
用蒸馏水加至	50.0 mL

A.12.1.2 制法

将磷酸二氢钠溶于蒸馏水中，调节pH值至7.0。缓冲液置2℃~5℃冰箱保存。

A.12.2 ONPG溶液

A.12.2.1 成分

邻硝基酚-β-D-半乳糖苷（ONPG）	0.08 g
蒸馏水	15.0 mL
缓冲液	5.0 mL

A.12.2.2 制法

将 ONPG 在 36℃±1℃ 的蒸馏水中溶解，加入缓冲液。ONPG 溶液置 2℃~5℃ 冰箱保存，试验前，将所需用量的 ONPG 溶液加热至 36℃±1℃。

A.12.3 试验方法

将待检培养物接种 3% 氯化钠三糖铁琼脂，36℃±1℃ 培养 18 h。挑取 1 满环新鲜培养物接种于 0.25 mL 3% 氯化钠溶液，在通风橱中，滴加 1 滴甲苯，摇匀后置 36℃±1℃ 水浴 5 min。加 0.25 mL ONPG 溶液，36℃±1℃ 培养观察 24 h。阳性结果呈黄色。阴性结果则 24 h 不变色。

A.13 Voges-Proskauer（V-P）试剂

A.13.1 成分

甲液	
α-萘酚	5.0 g
无水乙醇	100.0 mL

乙液

氢氧化钾	40.0 g
用蒸馏水加至	100.0 mL

A.13.2 试验方法

将3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂生长物接种3%氯化钠MR-VP培养基，36℃±1℃培养48 h。取1 mL培养物，转放到一个试管内，加0.6 mL甲液，摇动。加0.2 mL乙液，摇动。加入3 mg肌酸结晶，4 h后观察结果。阳性结果呈现伊红的粉红色。

附录 B 最可能数 (MPN) 检索表

B.1 每g (mL) 检样中创伤弧菌最可能数 (MPN) 的检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1g(mL)、0.01g(mL)和 0.001g(mL)], 每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1g(mL)、0.1g(mL)和 0.01g(mL)时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01g(mL)、0.001g(mL)、0.0001g(mL)时, 则表内数字应相应增加 10 倍, 其余类推。

三、 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验标准操作程序

1 方法来源

GB/T 4789.36-2016《食品卫生微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157: H7/NM 检验》

2 适用范围

本程序规定了食品中大肠埃希氏菌 O157:H7 和 O157:NM 的检验方法。

本程序适用于食品中大肠埃希氏菌 O157:H7 和 O157:NM 的检验。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 3.1 恒温培养箱:36 °C ±1 °C。
- 3.2 冰箱:2 °C~5 °C。
- 3.3 恒温水浴箱:46 °C ±1 °C。
- 3.4 天平:感量 0.1g、0.01g。
- 3.5 均质器。
- 3.6 显微镜:10 倍~100 倍。
- 3.7 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)或移液器及吸头。
- 3.8 无菌均质杯或无菌均质袋:容量 500 mL。
- 3.9 无菌培养皿:直径 90 mm。
- 3.10 pH 计或精密 pH 试纸。
- 3.11 长波紫外光灯:365nm,功率≤6 W。
- 3.12 微量离心管:1.5 mL 或 2.0 mL。
- 3.13 磁板、磁板架、样品混合器。
- 3.14 微生物鉴定系统。

4 培养基和试剂

- 4.1 改良 EC 肉汤(mEC+n):见 A.1。
- 4.2 改良山梨醇麦康凯琼脂(CT - SMAC):见 A.2。
- 4.3 三糖铁琼脂(TS I):见 A.3。
- 4.4 营养琼脂:见 A.4。

- 4.5 半固体琼脂:见 A.5。
- 4.6 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-MUG(MUG - L ST):见 A.6。
- 4.7 氧化酶试剂:见 A.7。
- 4.8 革兰氏染色液:见 A.8。
- 4.9 PBS-Tween20 洗液:见 A.9。
- 4.10 亚碲酸钾(AR 级)。
- 4.11 头孢克肟(Cefixime)。
- 4.12 大肠埃希氏菌 O157 显色培养基。
- 4.13 大肠埃希氏菌 O157 和 H7 诊断血清或 O157 乳胶凝集试剂。
- 4.14 鉴定试剂盒。
- 4.15 抗-E.coli O157 免疫磁珠。

第一法 常规培养方法

5 检验程序

检验程序见图 1。

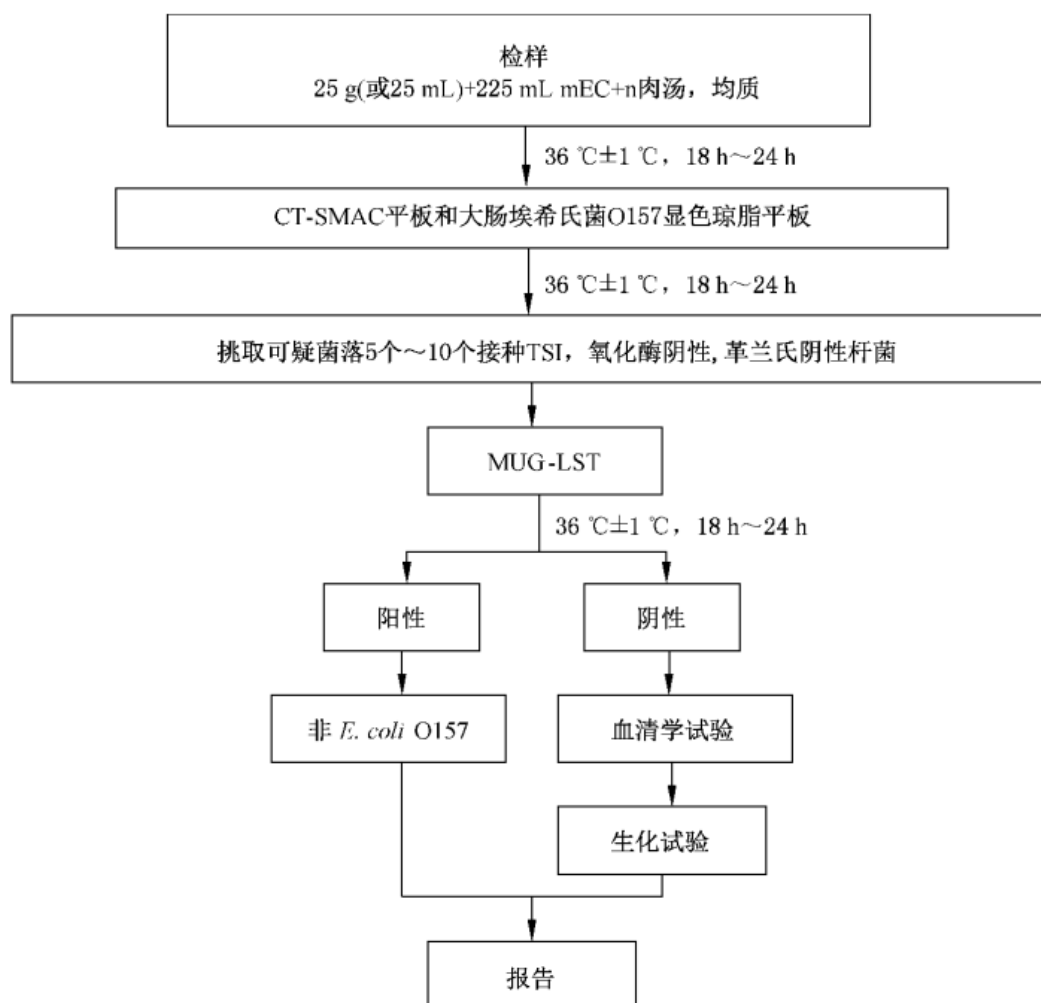


图 1 大肠埃希氏菌 O157:H7 和 O157:NM 常规法检验程序

6 操作步骤

6.1 增菌

样品采集后应尽快检验。若不能及时检验,可在 $2^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 保存 18h。以无菌操作取检样 25g (mL) 加入到含有 225mL mEC+n 肉汤的均质袋中,在拍击式均质器上连续均质 1 min~2min; 或放入盛有 225mL mEC+n 肉汤的均质杯中, $8000\text{r}/\text{min}\sim 10000\text{r}/\text{min}$ 均质 1 min~2min。于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h。同时做阳性及阴性对照。

6.2 分离

取增菌后的 mEC+n 肉汤,划线接种于改良山梨醇麦康凯 (CT-SMAC) 平板和大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板上,于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h,观察菌落形态。必要时将混合菌落分纯。在 CT-SMAC 平板上,典型菌落为圆形、光滑、较

小的无色菌落，中心呈现较暗的灰褐色；在大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板上的菌落特征按产品说明书进行判定。

6.3 初步生化试验

在 CT-SMAC 和大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板上挑取 5 个~10 个可疑菌落，分别接种 TSI 琼脂，同时接种 MUG-LST 肉汤，并用大肠埃希氏菌株（ATCC25922 或等效标准菌株）做阳性对照和大肠埃希氏菌 O157:H7（NCTC12900 或等效标准菌株）做阴性对照，于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h。必要时进行氧化酶试验和革兰氏染色。在 TSI 琼脂中，典型菌株为斜面与底层均呈黄色，产气或不产气，不产生硫化氢（ H_2S ）。置 MUG-LST 肉汤管于长波紫外灯下观察，MUG 阳性的大肠埃希氏菌株应有荧光产生，MUG 阴性的应无荧光产生，大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 为 MUG 试验阴性，无荧光。挑取可疑菌落，在营养琼脂平板上分纯，于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h，并进行下列鉴定。

6.4 鉴定

6.4.1 血清学试验

在营养琼脂平板上挑取分纯的菌落，用 O157 和 H7 诊断血清或 O157 乳胶凝集试剂作玻片凝集试验。对于 H7 因子血清不凝集者，应穿刺接种半固体琼脂，检查动力，经连续传代 3 次，动力试验均阴性，确定为无动力株。如使用不同公司生产的诊断血清或乳胶凝集试剂，应按照产品说明书进行。

6.4.2 生化试验

6.4.2.1 自营养琼脂平板上挑取菌落，进行生化试验。大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 生化反应特征见表 1。

表 1 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 生化反应特征

生化试验	特征反应
三糖铁琼脂	底层及斜面呈黄色，H ₂ S 阴性
山梨醇	阴性或迟缓发酵
靛基质	阳性
MR-VP	MR 阳性，VP 阴性
氧化酶	阴性
西蒙氏柠檬酸盐	阴性
赖氨酸脱羧酶	阳性（紫色）
鸟氨酸脱羧酶	阳性（紫色）
纤维二糖发酵	阴性
棉子糖发酵	阳性
MUG 试验	阴性（无荧光）
动力试验	有动力或无动力

6.4.2.2 如选择生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统，应从营养琼脂平板上挑取菌落，用稀释液制备成浊度适当的菌悬液，使用生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统进行鉴定。

6.4.3 毒力基因测定(可选项目)

样品中检出大肠埃希氏菌 O157:H7 或 O157:NM 时,如需要进一步检测 Vero 细胞毒素基因的存在,可通过接种 Vero 细胞或 HeLa 细胞,观察细胞病变进行判定;也可使用基因探针检测或聚合酶链反应(PCR)方法进行志贺毒素基因(stx1、stx2)、eae、hly 等基因的检测。如使用试剂盒检测上述基因,应按照产品的说明书进行。

7 结果报告

综合生化和血清学试验结果,报告 25g(或 25mL)样品中检出或未检出大肠埃希氏菌 O157:H7 或大肠埃希氏菌 O157:NM。

第二法 免疫磁珠捕获方法

8 原理

免疫磁珠捕获技术是通过将目的细菌进行选择性增菌，然后利用免疫磁珠进行选择性捕获的方法。捕获的目的细菌被结合到由抗体包被的磁性颗粒上，收集后再将磁性颗粒涂布到选择性琼脂平板上进行分离。在 CT-SMAC 平板上生长的可疑的大肠埃希氏菌 O157，因为不分解山梨醇，或在 *E.coli* O157 显色琼脂平板上产生特定的酶促反应呈现颜色变化，而与其它细菌相区别。

免疫磁珠的应用，特别是在样品含有大量杂菌时，对检样中含有少量的大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 的检出提供了更大的可能性。

9 检验程序

检验程序见图 2。

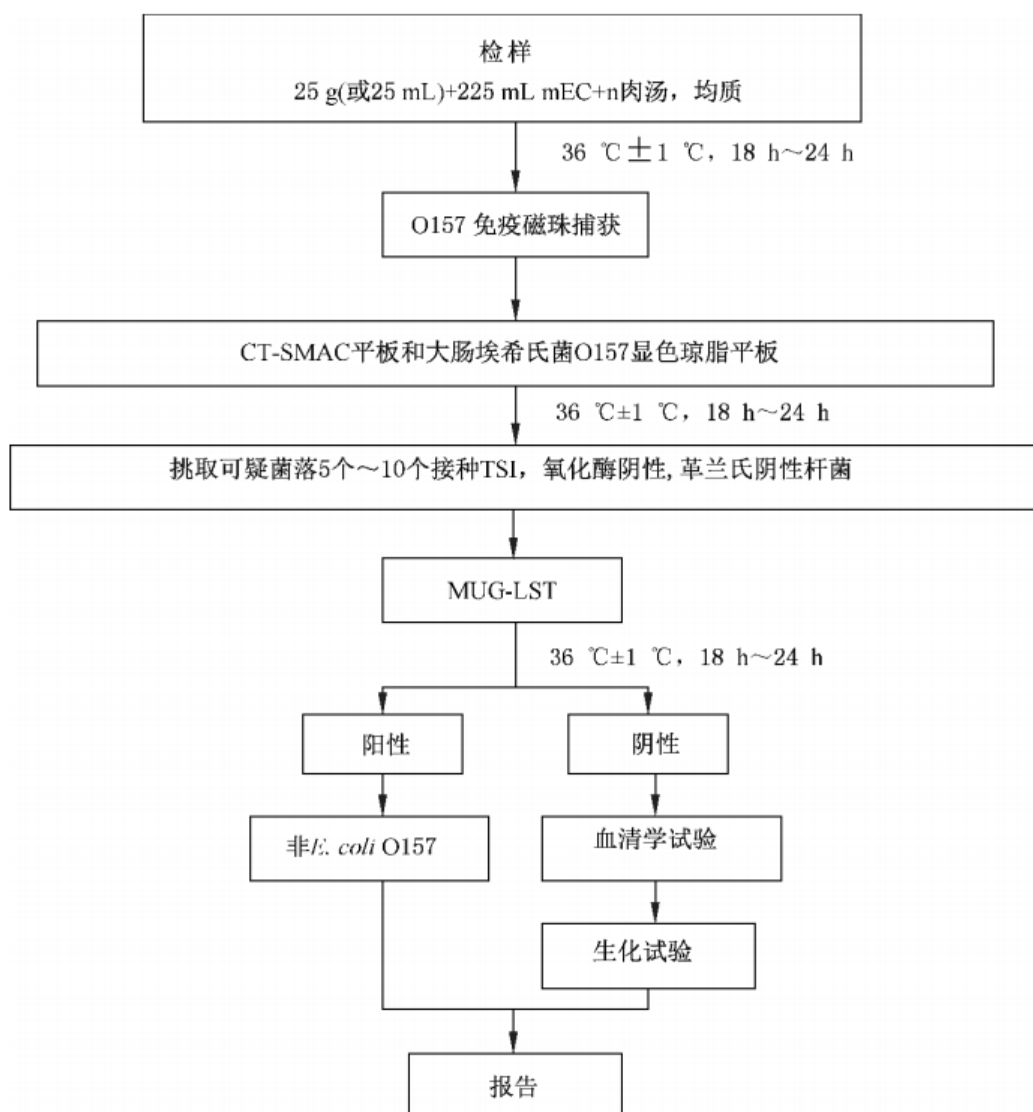


图 2 大肠埃希氏菌 O157 免疫磁珠捕获法检验程序

10 操作步骤

10.1 增菌

同 6.1。

10.2 免疫磁珠捕获与分离

应按照生产商提供的使用说明进行免疫磁珠捕获与分离。当生产商的使用说明与下面的描述可能有偏差时，按生产商提供的使用说明进行。

10.2.1 将微量离心管按样品和质控菌株进行编号，每个样品使用 1 只微量离心管，然后插入到磁板架上。在漩涡混合器上轻轻振荡 *E.coli* O157 免疫磁珠溶液后，用开盖器打开每个微量离心管的盖子，每管加入 20 μ L *E.coli* O157 免疫磁珠悬液。

10.2.2 取 mEC+n 肉汤增菌培养物 1 mL，加入到微量离心管中，盖上盖子，然后轻微振荡 10 s。每个样品更换 1 只加样吸头，质控菌株必须与样品分开进行，避免交叉污染。

10.2.3 结合：在 18 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C 环境中，将上述微量离心管连同磁板架放在样品混合器上转动或用手轻微转动 10min，使 *E.coli* O157 与免疫磁珠充分接触。

10.2.4 捕获：将磁板插入到磁板架中浓缩磁珠。在 3min 内不断地倾斜磁板架，确保悬液中与盖子上的免疫磁珠全部被收集起来，此时，在微量离心管壁中间明显可见圆形或椭圆形棕色聚集物。

10.2.5 吸取上清液：取 1 支无菌加长吸管，从免疫磁珠聚集物对侧深入液面，轻轻吸走上清液。当吸到液面通过免疫磁珠聚集物时，应放慢速度，以确保免疫磁珠不被吸走。如吸取的上清液内含有磁珠，则应将其放回到微量离心管中，并重复 10.2.4 步骤。每个样品换用 1 支无菌加长吸管。

免疫磁珠的滑落：某些样品特别是那些富含脂肪的样品，其磁珠聚集物易于滑落到管底。在吸取上清液时，很难做到不丢失磁珠，在这种情况下，可保留 50 μ L~100 μ L 上清液于微量离心管中。如果在后续的洗涤过程中也这样做的话，脂肪的影响将减小，也可达到充分捕获的目的。

10.2.6 洗涤：从磁板架上移走磁板，在每个微量离心管中加入 1mL PBS-Tween20 洗液，放在样品混合器上转动或用手轻微转动 3min，洗涤免疫磁珠混合物。重复上述步骤 10.2.4~10.2.6。

10.2.7 重复上述步骤 10.2.4~10.2.5。

10.2.8 免疫磁珠悬浮：移走磁板，将免疫磁珠重新悬浮在 100 μ L PBS-Tween20 洗液中。

10.2.9 涂布平板

用漩涡混合器将免疫磁珠混匀，用加样器各取 50 μ L 免疫磁珠悬液分别转移至 CT-SMAC 平板和大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板一侧，然后用无菌涂布棒将免疫磁珠涂布平板的一半，再用接种环划线接种平板的另一半。待琼脂表面水分完全吸收后，翻转平板，于 36 \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 18 h~24 h。

注：若 CT-SMAC 平板和大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板表面水分过多时，应在 36 \pm 1 $^{\circ}$ C 下干燥 10 min~20 min，涂布时避免将免疫磁珠涂布到平板的边缘。

10.3 菌落识别

大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 在 CT-SMAC 平板和大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板上的菌落特征见 6.2。

初步生化试验：同 6.3。

10.4 鉴定：同 6.4。

10.5 结果报告：同 7。

附录 A 培养基和试剂

A.1 改良 EC 肉汤 (mEC+n)

A.1.1 成分：

胰蛋白胨	20.0 g
3 号胆盐	1.12 g
乳糖	5.0 g
K ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	4.0 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
NaCl	5.0 g
新生霉素钠盐溶液 (20mg/mL)	1.0 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.9 \pm 0.1	

A.1.2 制法：

除新生霉素外,所有成分溶解在水中,加热煮沸,在20℃~25℃下校正pH至6.9±0.1,分装。于121℃高压灭菌15 min,备用。制备浓度为20 mg/mL的新生霉素储备溶液,过滤法除菌。待培养基温度冷至50℃以下时,按1000 mL培养基内加1 mL新生霉素储备液,使最终浓度为20 mg/L。

A.2 改良山梨醇麦康凯(CT-SMAC)琼脂

A.2.1 山梨醇麦康凯(SMAC)琼脂

A.2.1.1 成分

蛋白胨	20.0 g
山梨醇	10.0 g
3号胆盐	1.5 g
氯化钠	5.0 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.001 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2±0.2	

A.2.1.2 制法

除琼脂、结晶紫和中性红外,所有成分溶解在蒸馏水中,加热煮沸,在20℃~25℃下校正pH至7.2±0.2,加入琼脂、结晶紫和中性红,煮沸溶解,分装。于121℃高压灭菌15 min。

A.2.2 亚硝酸钾溶液

A.2.2.1 成分

亚硝酸钾	0.5 g
蒸馏水	200 mL

A.2.2.2 制法

将亚硝酸钾溶于水,过滤法除菌。

A.2.3 头孢克肟(Cefixime)溶液

A.2.3.1 成分

头孢克肟	1.0 mg
95%乙醇	200 mL

A.2.3.2 制法

将头孢克肟溶解于 95%乙醇中，静置 1 h 待其充分溶解后过滤除菌。分装试管，储存于 -20 ℃，有效期 1 年。解冻后的头孢克肟溶液不应再冻存，且在 2 ℃~8 ℃下有效期 14d。

A.2.4 CT-SMAC 制法

取 1000 mL 灭菌融化并冷却至 46 ℃±1 ℃的山梨醇麦康凯(SMAC)琼脂，加入 1 mL 亚碲酸钾溶液和 10 mL 头孢克肟溶液，使亚碲酸钾浓度达到 2.5 mg/L，头孢克肟浓度达到 0.05 mg/L，混匀后倾注平板。

A.3 三糖铁琼脂 (TSI)

A.3.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁铵[(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O]	0.2 g
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	0.2 g
酚红	0.025 g 或 5.0 g/L 溶液 5.0 mL
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1000 mL

pH 7.4±0.2

A.3.2 制法

除酚红和琼脂外，将其它成分加于 400 mL 蒸馏水中，煮沸溶解，在 20 ℃~25 ℃下校正 pH 至 7.4±0.2。另将琼脂加于 600 mL 蒸馏水中，煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后，加入 5 %酚红水溶液 5 mL，混匀，分装小号试管，每管约 2 mL~4 mL。于 121 ℃ 10 min 或 115 ℃ 15 min，制成高层斜面。冷却后呈桔红色。如不立即使用，在 2~8 ℃条件下可储存一个月。

A.4 营养琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1000 mL
pH 7.4±0.2	

A.4.2 制法

将各成分溶解于蒸馏水中，加热煮沸至完全溶解，在20℃~25℃下校正pH至7.4±0.2，分装。于121℃高压灭菌15 min。

A.5 半固体琼脂

A.5.1 成分

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	0.3g~0.4g
蒸馏水	100 mL
pH 7.4±0.2	

A.5.2 制法

将各成分溶解于蒸馏水中，加热煮沸至完全溶解，校正pH至7.4±0.2，分装小试管，于121℃高压灭菌15 min。直立凝固备用。

A.6 月桂基硫酸盐蛋白胨肉汤-MUG (LST-MUG)

A.6.1 成分

胰蛋白胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	5.0 g

磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	2.75 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	2.75 g
十二烷基硫酸钠	0.1 g
4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷 (MUG)	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.8 \pm 0.2	

A.6.2 制法

将各成分溶解于蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,于 20℃~25℃下校正 pH 至 6.8 \pm 0.2,分装到带有倒管的试管中,每管 10 mL,于 121℃高压灭菌 15 min。

A.7 氧化酶试剂

A.7.1 成分

N,N'-二甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
或 N,N,N',N'-四甲基对苯二胺盐酸盐	
蒸馏水	100 mL

A.7.2 制法

少量新鲜配制,于冰箱内避光保存,在 7 d 内使用。

A.7.3 试验方法

用无菌棉拭子取单个菌落,滴加氧化酶试剂,10 s 内呈现粉红或紫红色,即为氧化酶试验阳性。不变色者为氧化酶试验阴性。

A.8 革兰氏染色液

A.8.1 结晶紫染色液

A.8.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

A.8.1.2 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.8.2 革兰氏碘液

A.8.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.8.2.2 制法

将碘与碘化钾先行混合，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.8.3 沙黄复染液

A.8.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.8.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.8.4 染色法

A.8.4.1 涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染液，染 1 min，水洗。

A.8.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

A.8.4.3 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.8.4.4 滴加复染液，复染 1 min，水洗、待干、镜检。

A.9 PBS-Tween 20 洗液

按照商品用 *E. coli* O157 免疫磁珠的洗液配方进行制备，或按照下列配方制备。

A.9.1 成分

氯化钠	8.0 g
氯化钾	0.2 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.15 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	0.2 g
Tween 20	0.5 g
蒸馏水	1000 mL
pH 7.3±0.2	

A.9.2 制法

将上述成分溶解于水中，于 20 °C~25 °C 下校正 pH 至 7.3±0.2，分装锥形瓶。121 °C 高

压灭菌 15 min，备用。

四、单核细胞增生李斯特氏菌检验标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.30-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》

2 适用范围

本标程序规定了食品中单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 的检验方法。

本程序第一法适用于食品中单核细胞增生李斯特氏菌的定性检验;第二法适用于单核细胞增生李斯特氏菌含量较高的食品中单核细胞增生李斯特氏菌的计数;第三法适用于单核细胞增生李斯特氏菌含量较低(<100 CFU/g)而杂菌含量较高的食品中单核细胞增生李斯特氏菌的计数,特别是牛奶、水以及含干扰菌落计数的颗粒物质的食品。

3 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:

- 3.1 冰箱: 2 °C~5 °C。
- 3.2 恒温培养箱: 30 °C ±1 °C、36 °C ±1 °C。
- 3.3 均质器。
- 3.4 显微镜: 10×~100×。
- 3.5 电子天平: 感量 0.1 g。
- 3.6 锥形瓶: 100 mL、500 mL。
- 3.7 无菌吸管: 1 mL (具 0.01 mL 刻度)、10 mL (具 0.1 mL 刻度) 或微量移液器及吸头。
- 3.8 无菌平皿: 直径 90 mm。
- 3.9 无菌试管: 16 mm×160 mm。
- 3.10 离心管: 30 mm×100 mm。
- 3.11 无菌注射器: 1 mL。
- 3.12 单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)ATCC 19111 或 CMCC

- 54004,或其他等效标准菌株。
- 3.13 英诺克李斯特氏菌(*Listeria innocua*)ATCC 33090,或其他等效标准菌株。
- 3.14 伊氏李斯特氏菌(*Listeria ivanovii*)ATCC 19119,或其他等效标准菌株。
- 3.15 斯氏李斯特氏菌(*Listeria seeligeri*)ATCC 35967,或其他等效标准菌株。
- 3.16 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC 25923 或其他产 β -溶血环金葡菌,或其他等效标准菌株。
- 3.17 马红球菌(*Rhodococcus equi*)ATCC 6939 或 NCTC 1621,或其他等效标准菌株。
- 3.18 小白鼠: ICR 体重 18g~22g。。
- 3.19 全自动微生物生化鉴定系统。

4 培养基和试剂

- 4.1 含 0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE):见 A.1。
- 4.2 含 0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE):见 A.2。
- 4.3 李氏增菌肉汤 LB(LB1, LB2):见 A.3。
- 4.4 1%盐酸吡啶黄(acriflavine HCl)溶液:见 A.3.2.1、A.3.2.2。
- 4.5 1%萘啶酮酸钠盐(naladixic acid)溶液:见 A.3.2.1、A.3.2.2。
- 4.6 PALCAM 琼脂:见 A.4。
- 4.7 革兰氏染液:见 A.5。
- 4.8 SIM 动力培养基:见 A.6。
- 4.9 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红(MR)和 V-P 试验用]:见 A.7。
- 4.10 5%~8%羊血琼脂:见 A.8。
- 4.11 糖发酵管:见 A.9。
- 4.12 过氧化氢试剂:见 A.10。
- 4.13 李斯特氏菌显色培养基。
- 4.14 生化鉴定试剂盒或全自动微生物鉴定系统。
- 4.15 缓冲蛋白胨水:见 A.11。

第一法 定性检验

5 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌检验程序见图 1。

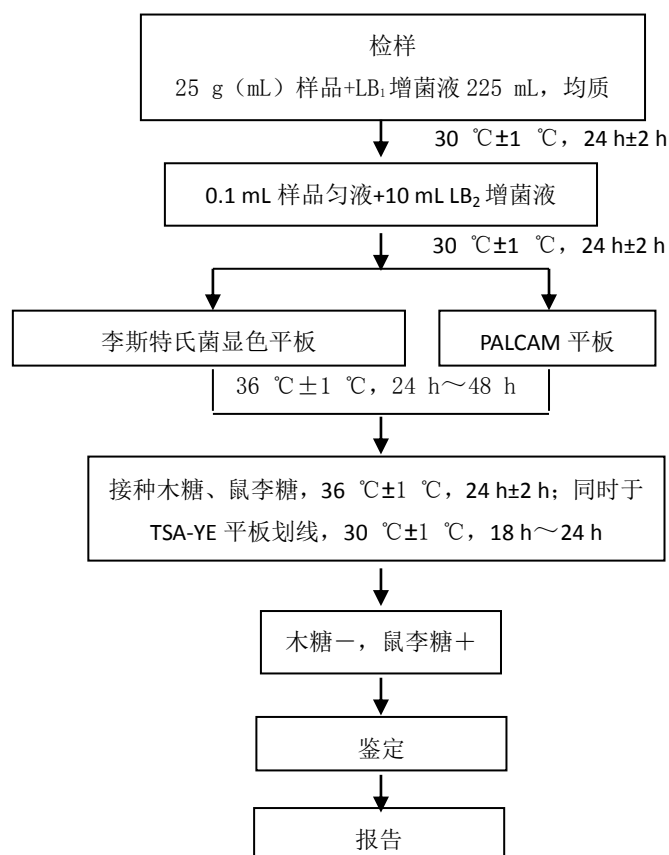


图 1 单核细胞增生李斯特氏菌检验程序

6 操作步骤

6.1 增菌

以无菌操作取样品 25 g (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, 8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min。于 30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h, 移取 0.1 mL, 转种于 10 mL LB₂ 增菌液内, 于 30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h。

6.2 分离

取 LB₂ 二次增菌液划线接种于李斯特氏菌显色平板和 PALCAM 琼脂平板上, 于 36 °C ± 1 °C 培养 24 h ~ 48 h, 观察各个平板上生长的菌落。典型菌落在 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;在李斯特氏菌显色平板上的菌落特征,参照产品说明进行判定。

6.3 初筛

自选择性琼脂平板上分别挑取 3 个~5 个典型或可疑菌落,分别接种在木糖、鼠李糖发酵管,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$;同时在 TSA-YE 平板上划线,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$ 。选择木糖阴性、鼠李糖阳性的纯培养物继续进行鉴定。

6.4 鉴定(或选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物鉴定系统等)

6.4.1 染色镜检:李斯特氏菌为革兰氏阳性短杆菌,大小为 $(0.4\mu\text{m}\sim 0.5\mu\text{m})\times(0.5\mu\text{m}\sim 2.0\mu\text{m})$;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。

6.4.2 动力试验:挑取纯培养的单个可疑菌落穿刺半固体或 SIM 动力培养基,于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48h,李斯特氏菌有动力,在半固体或 SIM 培养基上方呈伞状生长,如伞状生长不明显,可继续培养 5d,再观察结果。

6.4.3 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。

6.4.4 溶血试验:将新鲜的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(单增李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌和斯氏李斯特氏菌)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, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\sim 48\text{ h}$,于明亮处观察,单增李斯特氏菌呈现狭窄、清晰、明亮的溶血圈,斯氏李斯特氏菌在刺种点周围产生弱的透明溶血圈,英诺克李斯特氏菌无溶血圈,伊氏李斯特氏菌产生宽的、轮廓清晰的 β -溶血区域,若结果不明显,可置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱 $24\text{ h}\sim 48\text{ h}$ 再观察。

注:也可用划线接种法。

6.4.5 协同溶血试验 cAMP(可选项目):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,距离 $1\text{ mm}\sim 2\text{ mm}$,同时接种单核细胞增生李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌和斯氏李斯特氏菌,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\sim 48\text{ h}$ 。

单核细胞增生李斯特氏菌在靠近金黄色葡萄球菌处出现约 2 mm 的 β -溶血增强区域,斯氏李斯特氏菌也出现微弱的溶血增强区域,伊氏李斯特氏菌在靠近马红球菌处出现约 5 mm~10 mm 的“箭头状” β -溶血增强区域,英诺克李斯特氏菌不产生溶血现象。若结果不明显,可置 4 °C 冰箱 24h~48h 再观察。

注: 5%~8%的单核细胞增生李斯特氏菌在马红球菌一端有溶血增强现象。

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。

6.5 小鼠毒力试验（可选项目）

将符合上述特性的纯培养物接种于 TSB-YE 中，于 36 °C ±1 °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 10¹⁰ CFU/mL 的菌悬液，取此菌悬液对 3 只~5 只小鼠进行腹腔注射，每只 0.5 mL，观察小鼠死亡情况。致病株于 2 d~5 d 内死亡。试验设单增李斯特氏菌致病株和灭菌生理盐水对照组。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。

6.6 结果与报告

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

第二法 平板计数法

7 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌检验程序见图 2。

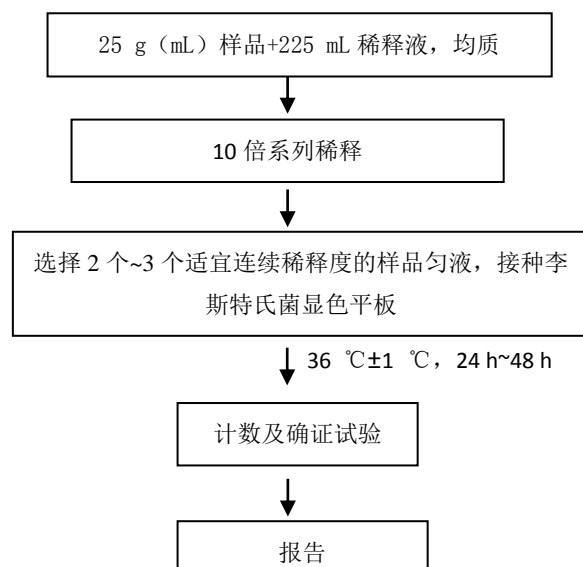


图 2 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数程序

8 操作步骤

8.1 样品的稀释

8.1.1 以无菌操作称取样品 25g (mL)，放入盛有 225 mL 缓冲蛋白胨水或无添加剂的 LB 肉汤的无菌均质袋内(或均质杯)内，在拍击式均质器上连续均质 1 min~2 min 或以 8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min。液体样品，振荡混匀，制成 1:10 的样品匀液。

8.1.2 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 缓冲蛋白胨水或无添加剂的 LB 肉汤的无菌试管中(注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面)，振摇试管或换用 1 支 1 mL 无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

8.1.3 按 8.1.2 操作程序，制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。

8.2 样品的接种

根据对样品污染状况的估计，选择 2 个~3 个适宜连续稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液)，每个稀释度的样品匀液分别吸取 1 mL 以 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 的接种量分别加入 3 块李斯特氏菌显色平板，用无菌 L 棒涂布整个平板，注意不要触及平板边缘。使用前，如琼脂平板表面有水珠，可放在 25 °C~50 °C

的培养箱里干燥，直到平板表面的水珠消失。

8.3 培养

8.3.1 在通常情况下，涂布后，将平板静置 10 min，如样液不易吸收，可将平板放在培养箱 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h；等样品匀液吸收后翻转平皿，倒置于培养箱， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24h~48h。

8.4 典型菌落计数和确认

8.4.1 单核细胞增生李斯特氏菌在李斯特氏菌显色平板上的菌落特征以产品说明为准。

8.4.2 选择有典型单核细胞增生李斯特氏菌菌落的平板，且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 15 CFU~150 CFU 之间的平板，计数典型菌落数。如果：

- a) 只有一个稀释度的平板菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间且有典型菌落，计数该稀释度平板上的典型菌落；
- b) 所有稀释度的平板菌落数均小于 15 CFU 且有典型菌落，应计数最低稀释度平板上的典型菌落；
- c) 某一稀释度的平板菌落数大于 150 CFU 且有典型菌落，但下一稀释度平板上没有典型菌落，应计数该稀释度平板上的典型菌落；
- d) 所有稀释度的平板菌落数大于 150 CFU 且有典型菌落，应计数最高稀释度平板上的典型菌落；
- e) 所有稀释度的平板菌落数均不在 15 CFU~150 CFU 之间且有典型菌落，其中一部分小于 15 CFU 或大于 150 CFU 时，应计数最接近 15 CFU 或 150 CFU 的稀释度平板上的典型菌落。

以上按公式（1）计算。

- f) 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 15 CFU~150 CFU 之间，按公式（2）计算。

8.4.3 从典型菌落中任选 5 个菌落（小于 5 个全选），分别按 6.3、6.4 进行鉴定。

9 结果计数

$$T = \frac{AB}{Cd} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

T ——样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌落数；

A ——某一稀释度典型菌落的总数；

B ——某一稀释度确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；

C ——某一稀释度用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；

d ——稀释因子。

$$T = \frac{A_1 B_1 / C_1 + A_2 B_2 / C_2}{1.1d} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

T ——样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌落数；

A_1 ——第一稀释度（低稀释倍数）典型菌落的总数；

B_1 ——第一稀释度（低稀释倍数）确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；

C_1 ——第一稀释度（低稀释倍数）用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；

A_2 ——第二稀释度（高稀释倍数）典型菌落的总数；

B_2 ——第二稀释度（高稀释倍数）确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；

C_2 ——第二稀释度（高稀释倍数）用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；

1.1——计算系数；

d ——稀释因子（第一稀释度）。

10 结果报告

报告每 g (mL) 样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌数，以 CFU/g (mL) 表示；如 T 值为 0，则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

第三法 MPN 计数法

11 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数法检验程序见图 3。

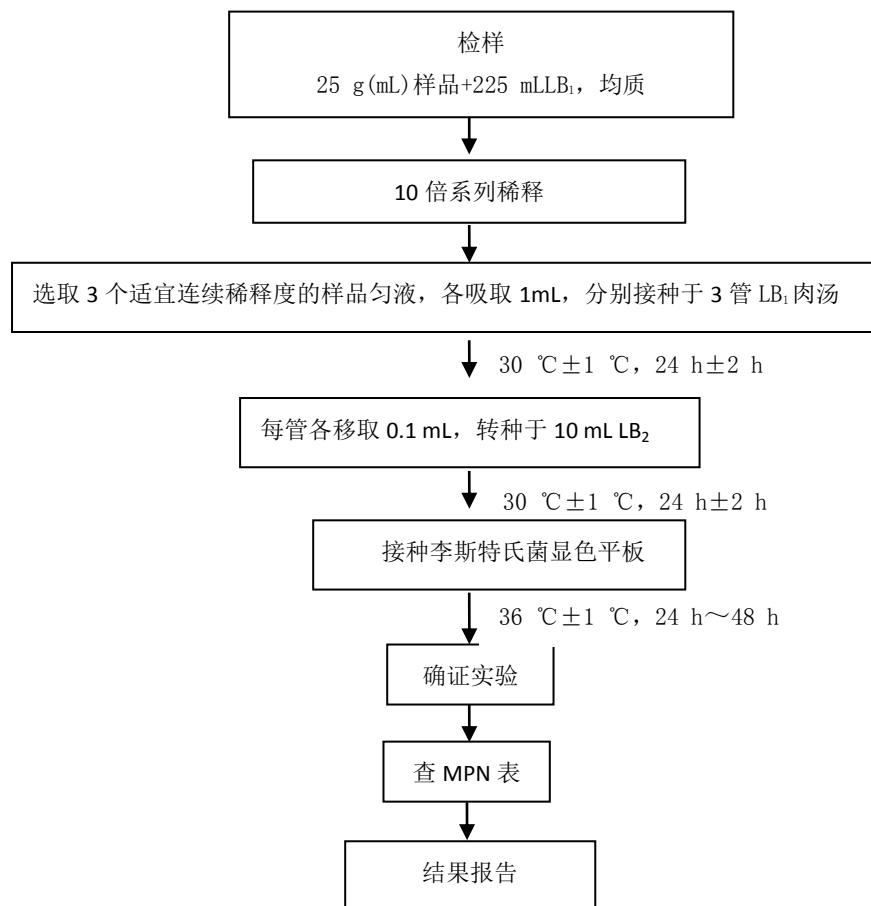


图 3 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数程序

12 操作步骤

12.1 样品的稀释

按 8.1 进行。

12.2 接种和培养

12.2.1 根据对样品污染状况的估计, 选取 3 个适宜连续稀释度的样品匀液 (液体样品可包括原液), 接种于 10 mL LB₁ 肉汤, 每一稀释度接种 3 管, 每管接种 1 mL (如果接种量需要超过 1 mL, 则用双料 LB₁ 增菌液) 于 30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h。每管各移取 0.1 mL, 转种于 10 mL LB₂ 增菌液内, 于 30 °C ± 1 °C 培养 24 ± 2 h。

12.2.2 用接种环从各管中移取 1 环，接种李斯特氏菌显色平板， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h。

12.3 确证试验

自每块平板上挑取 5 个典型菌落（5 个以下全选），按照 6.3、6.4 进行鉴定。

13 结果报告

根据证实为单核细胞增生李斯特氏菌阳性的试管管数，查 MPN 检索表（见附录 B），报告每 g（mL）样品中单核细胞增生李斯特氏菌的最可能数，以 MPN/g（mL）表示。

附录 A 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	5.0g
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，调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ，分装， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，备用。

A.2 含 0.6% 酵母浸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，调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ，分装， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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，调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ，分装， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 % 丫啶黄 (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 % 丫啶黄	0.5 mL

A.4 PALCAM

A.4.1 成分

酵母膏	8.0 g
葡萄糖	0.5 g

七叶甙	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，调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ，分装， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，备用。

A.4.2.1 PALCAM 选择性添加剂

多粘菌素 B	5.0 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 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，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 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，调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ，分装小试管， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h，观察结果。

A.7 缓冲葡萄糖蛋白胨水（MR 和 VP 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
pH 7.0	

A.7.2 制法

溶化后调节 pH 至 7.0 ± 0.2 ，分装试管，每管 1 mL， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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

A.7.3.1.1 成分

甲基红	10 mg
95 % 乙醇	30 mL
蒸馏水	20 mL

A.7.3.1.2 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.7.3.1.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于本培养基， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续培养 1 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~8 mL

A.8.2 制法

除新鲜脱纤维羊血外，加热溶化上述各组分， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，冷到 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，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，调节 pH 至 7.4， $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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， $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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, 以无菌操作分装于含倒置小管的小试管中。或按照 A.9.2.1 葡萄糖发酵管的配制方法制备其他糖类发酵管。

A.9.3 试验方法

取适量纯培养物接种于糖发酵管, $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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, 置于洁净玻璃平皿内, 滴加 3% 过氧化氢溶液 2 滴, 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.12. 缓冲蛋白胨水 (BPW)

A.12.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1000 mL

A.12.2. 制法

加热搅拌至溶解, 调节 pH 至 7.2 ± 0.2 , $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

附录 B 最可能数 (MPN) 检索表

表B.1 每g (mL) 检样中单核细胞增生李斯特氏菌最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1g (mL)、0.01g (mL) 和 0.001g (mL)], 每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1g (mL)、0.1g (mL) 和 0.01g (mL) 时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01g (mL)、0.001g (mL)、0.0001g (mL) 时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

五、副溶血性弧菌检验标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.7-2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》。

FDA/BAM Chapter 9 Vibrio 2004。

2 适用范围

本程序规定了食品中副溶血性弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）的检验方法。本程序适用于食品中副溶血性弧菌的检验。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 3.1 恒温培养箱：36 °C ±1 °C。
- 3.2 冰箱：2 °C ~5 °C、7 °C ~10 °C。
- 3.3 恒温水浴箱：36 °C ±1 °C。
- 3.4 均质器或无菌乳钵。
- 3.5 天平：感量 0.1 g。
- 3.6 无菌试管：18 mm×180 mm、15 mm×100 mm。
- 3.7 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 3.8 无菌锥形瓶：容量 250 mL、500 mL、1000 mL。
- 3.9 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 3.10 全自动微生物生化鉴定系统。
- 3.11 无菌手术剪、镊子。
- 3.12 PCR 仪。
- 3.13 电泳装置。
- 3.14 凝胶分析成像系统。
- 3.15 PCR 超净工作台。
- 3.16 高速台式离心机。
- 3.17 微量可调移液器（2μL、10μL、100μL、1000μL）和相应吸头。

4 培养基和试剂

- 4.1 3%氯化钠碱性蛋白胨水：见附录 A 中 A.1。
- 4.2 硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖（TCBS）琼脂：见附录 A 中 A.2。
- 4.3 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂：见附录 A 中 A.3。
- 4.4 3%氯化钠三糖铁琼脂：见附录 A 中 A.4。
- 4.5 嗜盐性试验培养基：见附录 A 中 A.5。
- 4.6 3%氯化钠甘露醇试验培养基：见附录 A 中 A.6。
- 4.7 3%氯化钠赖氨酸脱羧酶试验培养基：见附录 A 中 A.7。
- 4.8 3%氯化钠 MR-VP 培养基：见附录 A 中 A.8。
- 4.9 3%氯化钠溶液：见附录 A 中 A.9。
- 4.10 我妻氏血琼脂：见附录 A 中 A.10。
- 4.11 氧化酶试剂：见附录 A 中 A.11。
- 4.12 革兰氏染色液：见附录 A 中 A.12。
- 4.13 ONPG 试剂：见附录 A 中 A.13。
- 4.14 Voges-Proskauer（V-P）试剂：见附录 A 中 A.14。
- 4.15 弧菌显色培养基。
- 4.16 生化鉴定试剂盒。
- 4.17 PCR 反应配套试剂
- 4.18 6×上样缓冲液
- 4.19 0.5×TBE
- 4.20 琼脂糖
- 4.21 DNA 分子量标记物（100 bp-1000 bp）。

5 检验程序

副溶血性弧菌检验程序见图1。

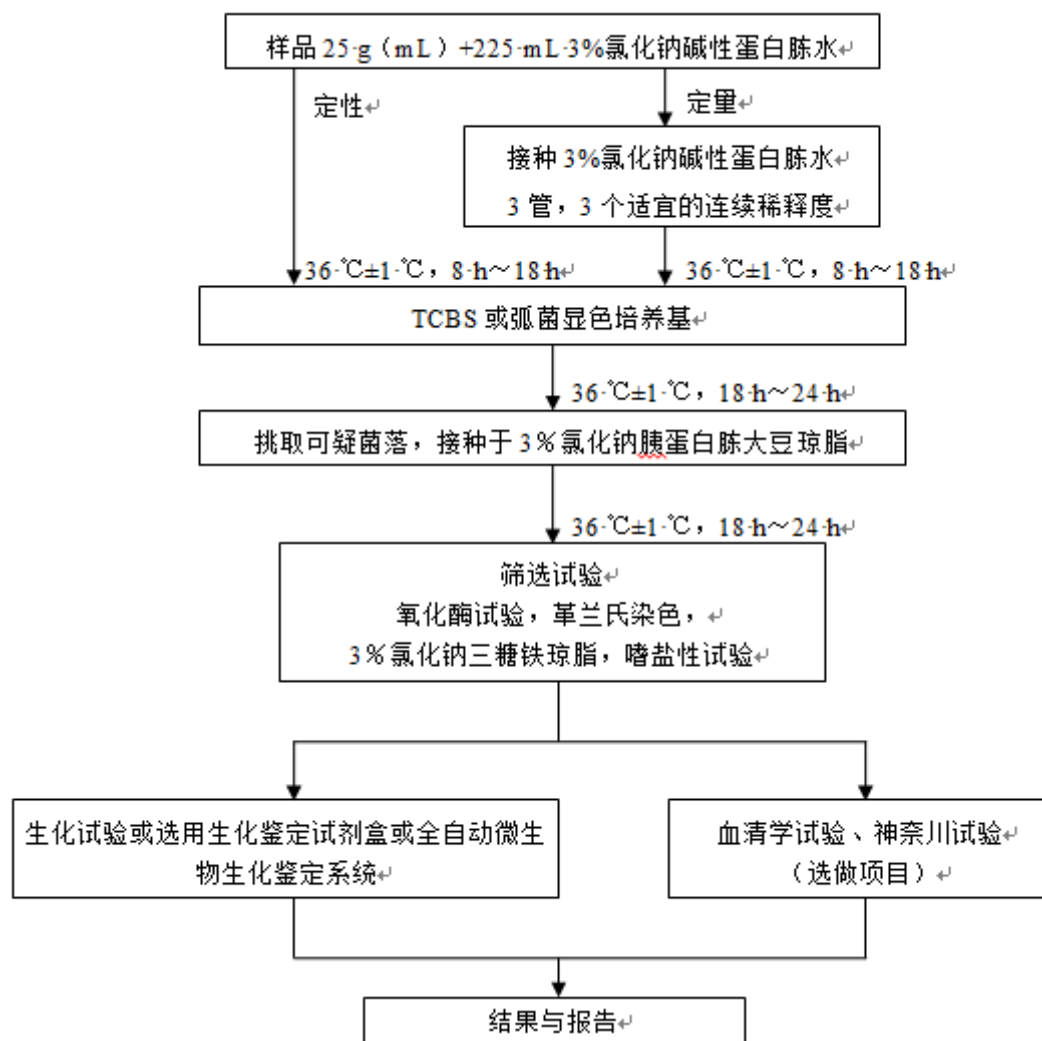


图 1 副溶血性弧菌检验程序

6 操作步骤

6.1 样品制备

6.1.1 非冷冻样品采集后应立即置 7 °C ~ 10 °C 冰箱保存, 尽可能及早检验; 冷冻样品应在 45 °C 以下不超过 15 min 或在 2 °C ~ 5 °C 不超过 18 h 解冻。

6.1.2 鱼类和头足类动物取表面组织、肠或鳃。贝类取全部内容物, 包括贝肉和体液; 甲壳类取整个动物, 或者动物的中心部分, 包括肠和鳃。如为带壳贝类或甲壳类, 则应先在自来水中洗刷外壳并甩干表面水分, 然后以无菌操作打开外壳, 按上述要求取相应部分。

6.1.3 以无菌操作取样品 25 g (mL), 加入 3% 氯化钠碱性蛋白胨水 225 mL, 用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min 均质 1 min, 或拍击式均质器拍击 2 min, 制备

成 1:10 的样品匀液。如无均质器，则将样品放入无菌乳钵，自 225 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水中取少量稀释液加入无菌乳钵，样品磨碎后放入 500 mL 无菌锥形瓶，再用少量稀释液冲洗乳钵中的残留样品 1~2 次，洗液放入锥形瓶，最后将剩余稀释液全部放入锥形瓶，充分振荡，制备 1:10 的样品匀液。

6.2 增菌

6.2.1 定性检测

将上述 1:10 样品匀液于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 8 h~18 h。

6.2.2 定量检测

6.2.2.1 用无菌吸管吸取 1:10 样品匀液 1 mL，注入含有 9 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水的试管内，振摇试管混匀，制备 1:100 的样品匀液。

6.2.2.2 另取 1 mL 无菌吸管，按 6.2.2.1 操作程序，依次制备 10 倍系列稀释样品匀液，每递增稀释一次，换用一支 1 mL 无菌吸管。

6.2.2.3 根据对检样污染情况的估计，选择 3 个适宜的连续稀释度，每个稀释度接种 3 支含有 9 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水的试管，每管接种 1 mL。置 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内，培养 8 h~18 h。

6.3 分离

6.3.1 对所有显示生长的增菌液，用接种环在距离液面以下 1 cm 内沾取一环增菌液，于 TCBS 平板或弧菌显色培养基平板上划线分离。一支试管划线一块平板。于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

6.3.2 典型的副溶血性弧菌在 TCBS 上呈圆形、半透明、表面光滑的绿色菌落，用接种环轻触，有类似口香糖的质感，直径 2 mm~3 mm。从培养箱取出 TCBS 平板后，应尽快（不超过 1 h）挑取菌落或标记要挑取的菌落。典型的副溶血性弧菌在弧菌显色培养基上的特征按照产品说明进行判定。

6.4 纯培养

挑取 3 个或以上可疑菌落，划线接种 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

6.5 初步鉴定

6.5.1 氧化酶试验：挑选纯培养的单个菌落进行氧化酶试验，副溶血性弧菌为氧化酶阳性。

6.5.2 涂片镜检：将可疑菌落涂片，进行革兰氏染色，镜检观察形态。副溶血性弧菌为革兰氏阴性，呈棒状、弧状、卵圆状等多形态，无芽胞，有鞭毛。

6.5.3 挑取纯培养的单个可疑菌落，转种 3%氯化钠三糖铁琼脂斜面并穿刺底层， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 观察结果。副溶血性弧菌在 3%氯化钠三糖铁琼脂中的反应为底层变黄不变黑，无气泡，斜面颜色不变或红色加深，有动力。

6.5.4 嗜盐性试验：挑取纯培养的单个可疑菌落，分别接种 0%、6%、8%和 10%不同氯化钠浓度的胰胨水， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h，观察液体混浊情况。副溶血性弧菌在无氯化钠和 10%氯化钠的胰胨水中不生长或微弱生长，在 6%氯化钠和 8%氯化钠的胰胨水中生长旺盛。

6.6 确定鉴定

取纯培养物分别接种含 3%氯化钠的甘露醇试验培养基、赖氨酸脱羧酶试验培养基、MR-VP 培养基， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h 后观察结果；3%氯化钠三糖铁琼脂隔夜培养物进行 ONPG 试验。可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统。

7 血清学分型（选做项目）

7.1 制备

接种两管 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂试管斜面， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。用含 3%氯化钠的 5%甘油溶液冲洗 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂斜面培养物，获得浓厚的菌悬液。

7.2 K 抗原的鉴定

取一管 6.1 制备好的菌悬液，首先用多价 K 抗血清进行检测，出现凝集反应时再用单个的抗血清进行检测。用蜡笔在一张玻片上划出适当数量的间隔和一个对照间隔。在每个间隔内各滴加一滴菌悬液，并对应加入一滴 K 抗血清。在对照间隔内加一滴 3%氯化钠溶液。轻微倾斜玻片，使各成分相混合，再前后倾动玻片 1 min。阳性凝集反应可以立即观察到。

7.3 O 抗原的鉴定

将另外一管的菌悬液转移到离心管内，121 °C 灭菌 1 h。灭菌后 4 000 r/min 离心 15 min，弃去上层液体，沉淀用生理盐水洗三次，每次 4 000 r/min 离心 15 min，最后一次离心后留少许上层液体，混匀制成菌悬液。用蜡笔将玻片划分成相等的间隔。在每个间隔内加入一滴菌悬液，将 O 群血清分别加一滴到间隔内，最后一个间隔加一滴生理盐水作为自凝对照。轻微倾斜玻片，使各成分相混合，再前后倾动玻片 1 min。阳性凝集反应可以立即观察到。如果未见到与 O 群血清的凝集反应，将菌悬液 121 °C 再次高压 1 h 后，重新检测。如果仍为阴性，则培养物的 O 抗原属于未知。根据表 1 报告血清学分型结果。

表 1 副溶血性弧菌的抗原

O 群	K 型
1	1, 5, 20, 25, 26, 32, 38, 41, 56, 58, 60, 64, 69
2	3, 28
3	4, 5, 6, 7, 25, 29, 30, 31, 33, 37, 43, 45, 48, 54, 56, 57, 58, 59, 72, 75
4	4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 34, 42, 49, 53, 55, 63, 67, 68, 73
5	15, 17, 30, 47, 60, 61, 68
6	18, 46
7	19
8	20, 21, 22, 39, 41, 70, 74
9	23, 44
10	24, 71
11	19, 36, 40, 46, 50, 51, 61
12	19, 52, 61, 66
13	65

8 神奈川试验（选做项目）

神奈川试验是在我妻氏琼脂上测试是否存在特定溶血素。神奈川试验阳性结果与副溶血性弧菌分离株的致病性显著相关。

用接种环将测试菌株的 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂 18 h 培养物点种于表面

干燥的我妻氏血琼脂平板。每个平板上可以环状点种几个菌。36 °C ±1 °C 培养不超过 24 h，并立即观察。阳性结果为菌落周围呈半透明环的 β 溶血。

9 结果与报告

综合以上实验结果，报告 25 g (mL) 样品中检出副溶血性弧菌。如果进行定量检测，根据证实为副溶血性弧菌阳性的试管管数，查最可能数 (MPN) 检索表，报告每 g (mL) 副溶血性弧菌的 MPN 值。副溶血性弧菌菌落生化性状和与其他弧菌的鉴别情况分别见表 2 和表 3。

表 2 副溶血性弧菌的生化性状

试验项目	结果
革兰氏染色镜检	阴性，无芽胞
氧化酶	+
动力	+
蔗糖	-
葡萄糖	+
甘露醇	+
分解葡萄糖产气	-
乳糖	-
硫化氢	-
赖氨酸脱羧酶	+
V-P	-
ONPG	-

注：+表示阳性；-表示阴性。

表 3 副溶血性弧菌主要性状与其他弧菌的鉴别

名称	氧化酶	赖氨酸	精氨酸	鸟氨酸	明胶	脲酶	V-P	42℃生长	蔗糖	D-纤维二糖	乳糖	阿拉伯糖	D-甘露糖	D-甘露醇	ONPG	嗜盐性试验 氯化钠含量				
																0%	3%	6%	8%	10%
副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	+	+	-	+	+	V	-	+	-	V	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	V	+	-	+	+	-	-
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	+	+	-	+	+	-	V	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
拟态弧菌 <i>V. mimicus</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
河弧菌 <i>V. fluvialis</i>	+	-	+	-	+	-	-	V	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	V	-
弗氏弧菌 <i>V. furnissii</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
梅氏弧菌 <i>V. metschnikovii</i>	-	+	+	-	+	-	+	V	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	V	-
霍利斯弧菌 <i>V. hollisae</i>	+	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-

注：+表示阳性；-表示阴性；nd 表示未试验；V 表示可变。

10 毒力基因检测

采用多重 PCR 的方法，在一个 PCR 反应体系中同时检测副溶血性弧菌(tlh)和致病性副溶血性弧菌(tdh、trh)。

注意：鉴于同一食品中副溶血性弧菌的多样性，需要从每份样品中取 3-5 个不同的副溶血性弧菌纯菌落分别进行检测。可采用经过验证的可靠的普通 PCR 或实时荧光 PCR 试剂盒。

10.1 DNA 模板的制备

取适量纯培养菌落加入 500 μ L 灭菌 dH₂O 中混匀，煮沸 10 min，15000 \times g 离心 3 min。取上清液储存在-20 $^{\circ}$ C 直至使用。也可以用商业化的 DNA 提取试剂盒，按其说明提取制备 DNA 模板。

10.2 PCR 扩增

10.2.1 引物

tlh (450bp)	tlh-F	5' aaa gcg gat tat gca gaa gca ctg 3'
	tlh-R	5' gct act ttc tag cat ttt ctc tgc 3'
tdh (270bp)	tdh-F	5' gta aag gtc tct gac ttt tgg ac 3'
	tdh-R	5' tgg aat aga acc ttc atc ttc acc 3'
trh (500bp)	trh-F	5' ttg gct tcg ata ttt tca gta tct 3'
	trh-R	5' cat aac aaa cat atg ccc att tcc g 3'

10.2.2 阴、阳性对照设置

阴性对照(空白对照)以灭菌水作为 PCR 反应的模板；

阳性对照采用含有检测序列的 DNA (或质粒) 作为 PCR 反应的模板。

10.2.3 PCR 反应体系

试剂	反应体积
dH ₂ O	28.2 μ L
10 \times Buffer, MgCl ₂	5.0 μ L
dNTPs	8.0 μ L

混合引物 (6 primers)	7.5 μ L
模板	1.0 μ L
Taq 酶	0.3 μ L
总体积	50.0 μ L

10.2.4 PCR 反应程序

预变性	94 $^{\circ}$ C	3 min;
变性	94 $^{\circ}$ C	1 min,
退火	60 $^{\circ}$ C	1 min,
延伸	72 $^{\circ}$ C	2 min, 25 个循环;
终延伸	72 $^{\circ}$ C	3 min;
保存	8 $^{\circ}$ C	—

10.2.5 电泳

用 0.5 \times TBE 制备 1.5% 的琼脂糖凝胶 (含 EB 或 Goldview 0.5 μ g/mL)。各取 5 μ L 产物点样 (可包括适量上样缓冲液), 用 DNA 分子量标记物做参照, 电压 100 V, 电泳 50 min (根据实验室仪器情况确定具体电泳条件)。使用凝胶成像系统对电泳结果进行保存和分析。

10.3 结果判定

阴性对照未出现条带, 阳性对照出现预期大小的扩增条带条件下, 如待测样品出现 450 bp 大小的扩增条带, 则可判定该菌株携带 t1h 基因; 未出现 450 bp 大小的扩增条带, 则可判定不携带 t1h 基因。

如出现 270bp 大小的扩增条带, 可判定该副溶血性弧菌携带 tdh 毒力基因; 如出现 500bp 大小的扩增条带, 可判定该菌株携带 trh 毒力基因。如未出现 270bp 和/或 500bp 大小的扩增条带, 则可判定该菌株不携带相应的毒力基因。

如果阴性对照出现条带和/或阳性对照未出现预期大小的扩增条带, 本次待测样品的结果无效, 应重新进行试验, 并排除污染因素。

附录 A 培养基与试剂

A.1 3%氯化钠碱性蛋白胨水

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	30.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2 制法

将 A.1.1 中成分溶于蒸馏水中，校正 pH 至 8.5 ± 0.2 ，121 °C 高压灭菌 10 min。

A.2 硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖（TCBS）琼脂

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
酵母浸膏	5.0 g
柠檬酸钠 ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$)	10.0 g
硫代硫酸钠 ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)	10.0 g
氯化钠	10.0 g
牛胆汁粉	5.0 g
柠檬酸铁	1.0 g
胆酸钠	3.0 g
蔗糖	20.0 g
溴麝香草酚蓝	0.04 g
麝香草酚蓝	0.04 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.2 制法

将 A.2.1 中成分溶于蒸馏水中，校正 pH 至 8.6 ± 0.2 ，加热煮沸至完全溶解。冷至 50 °C 左右倾注平板备用。

A.3 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂

A.3.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠	30.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.3.2 制法

将 A.3.1 中成分溶于蒸馏水中，校正 pH 至 7.3 ± 0.2 ， $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.4 3%氯化钠三糖铁琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	15.0 g
胨蛋白胨	5.0 g
牛肉膏	3.0 g
酵母浸膏	3.0 g
氯化钠	30.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁 (FeSO_4)	0.2 g
苯酚红	0.024 g
硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.3 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.4.2 制法

将 A.4.1 中成分溶于蒸馏水中，校正 pH 至 7.4 ± 0.2 。分装到适当容量的试管中。 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。制成高层斜面，斜面长 4 cm~5 cm，高层深度为 2 cm~3 cm。

A.5 嗜盐性试验培养基

A.5.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
氯化钠	按不同量加入

蒸馏水 1 000.0 mL

A.5.2 制法

将 A.5.1 中成分溶于蒸馏水中，校正 pH 至 7.2 ± 0.2 ，共配制 5 瓶，每瓶 100 mL。每瓶分别加入不同量的氯化钠：（1）不加；（2）3 g；（3）6 g；（4）8g；（5）10 g。分装试管，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.6 3%氯化钠甘露醇试验培养基

A.6.1 成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	30.0 g
磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g
甘露醇	5.0g
溴麝香草酚蓝	0.024 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.6.2 制法

将 A.6.1 中成分溶于蒸馏水中，校正 pH 至 7.4 ± 0.2 ，分装小试管，121 °C 高压灭菌 10 min。

A.6.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种，于 $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ 培养不少于 24 h，观察结果。甘露醇阳性者培养物呈黄色，阴性者为绿色或蓝色。

A.7 3%氯化钠赖氨酸脱羧酶试验培养基

A.7.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.02 g
L-赖氨酸	5.0 g
氯化钠	30.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.7.2 制法

除赖氨酸以外的成分溶于蒸馏水中,校正 pH 至 6.8 ± 0.2 。再按 0.5% 的比例加入赖氨酸,对照培养基不加赖氨酸。分装小试管,每管 0.5 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.7.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种,于 $36\text{ °C}\pm 1\text{ °C}$ 培养不少于 24 h,观察结果。赖氨酸脱羧酶阳性者由于产碱中和葡萄糖产酸,故培养基仍应呈紫色。阴性者无碱性产物,但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管应为黄色。

A.8 3%氯化钠MR-VP培养基

A.8.1 成分

多胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	5.0 g
氯化钠	30.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.8.2 制法

将 A.8.1 中成分溶于蒸馏水中,校正 pH 至 6.9 ± 0.2 ,分装试管,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.9 3%氯化钠溶液

A.9.1 成分

氯化钠	30.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.9.2 制法

将氯化钠溶于蒸馏水中,校正 pH 至 7.2 ± 0.2 ,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.10 我妻氏血琼脂

A.10.1 成分

酵母浸膏	3.0 g
蛋白胨	10.0 g

氯化钠	70.0 g
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄)	5.0 g
甘露醇	10.0 g
结晶紫	0.001 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.10.2 制法

将 A.10.1 中成分溶于蒸馏水中，校正 pH 至 8.0±0.2，加热至 100 °C，保持 30 min，冷至 45 °C~50 °C，与 50 mL 预先洗涤的新鲜人或兔红细胞（含抗凝血剂）混合，倾注平板。干燥平板，尽快使用。

A.11 氧化酶试剂

A.11.1 成分

<i>N,N,N,N'</i> -四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100.0 mL

A.11.2 制法

将 *N,N,N,N'*-四甲基对苯二胺盐酸盐溶于蒸馏水中，2 °C~5 °C 冰箱内避光保存，在 7 d 之内使用。

A.11.3 试验方法

用细玻璃棒或一次性接种针挑取新鲜（24 h）菌落，涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸上。如果滤纸在 10 s 之内呈现粉红或紫红色，即为氧化酶试验阳性。不变色为氧化酶试验阴性。

A.12 革兰氏染色液

A.12.1 结晶紫染色液

A.12.1.1 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.12.1.2 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.12.2 革兰氏碘液

A.12.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

A.12.2.2 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.12.3 沙黄复染液

A.12.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.12.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.12.4 染色法

A.12.4.1 将涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1 min，水洗。

A.12.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

A.12.4.3 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.12.4.4 滴加复染液，复染 1 min。水洗、待干、镜检。

A.13 ONPG试剂

A.13.1 缓冲液

A.13.1.1 成分

磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	6.9 g
蒸馏水加至	50.0 mL

A.13.1.2 制法

将磷酸二氢钠溶于蒸馏水中，校正pH至7.0。缓冲液置2℃~5℃冰箱保存。

A.13.2 ONPG溶液

A.13.2.1 成分

邻硝基酚-β-D-半乳糖苷 (ONPG)	0.08 g
蒸馏水	15.0 mL
缓冲液	5.0 mL

A.13.2.2 制法

将 ONPG 在 37℃ 的蒸馏水中溶解，加入缓冲液。ONPG 溶液置 2℃~5℃ 冰箱保存。试验前，将所需用量的 ONPG 溶液加热至 37℃。

A.13.3 试验方法

将待检培养物接种 3% 氯化钠三糖铁琼脂，36℃ ± 1℃ 培养 18 h。挑取 1 满环新鲜培养物接种于 0.25 mL 3% 氯化钠溶液，在通风橱中，滴加 1 滴甲苯，摇匀后置 37℃ 水浴 5 min。加 0.25 mL ONPG 溶液，36℃ ± 1℃ 培养观察 24 h。阳性结果呈黄色。阴性结果则 24 h 不变色。

A.14 Voges-Proskauer (V-P) 试剂

A.14.1 成分

甲液	
α-萘酚	5.0 g
无水乙醇	100.0 mL
乙液	
氢氧化钾	40.0 g
用蒸馏水加至	100.0 mL

A.14.2 试验方法

将 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂生长物接种 3% 氯化钠 MR-VP 培养基，36℃ ± 1℃ 培养 48 h。取 1 mL 培养物，转放到一个试管内，加 0.6 mL 甲液，摇动。加 0.2 mL 乙液，摇动。加入 3 mg 肌酸结晶，4 h 后观察结果。阳性结果呈现伊红的粉红色。

附录 B

每g (mL) 检样中副溶血性弧菌最可能数 (MPN) 的检索见表B.1。

表B.1 副溶血性弧菌最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 0.001 g(mL)], 每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)、0.0001 g(mL)时, 则表内数字应相应增加 10 倍, 其余类推。

六、 霍乱弧菌检验标准操作程序

1 方法来源

- 1.1 进出口食品中霍乱弧菌检测方法(SN/T 1022-2010)
- 1.2 卫生部《霍乱防治手册》第六版(2013年)

2 适用范围

本程序规定了食品中霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*) 的检验方法。

本程序适用于食品中霍乱弧菌的检验。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 3.1 恒温培养箱：36 °C ±1 °C。
- 3.2 冰箱：2 °C ~5 °C。
- 3.3 恒温水浴箱：36 °C ±1 °C。
- 3.4 均质器或无菌乳钵。
- 3.5 天平：感量 0.1 g。
- 3.6 无菌试管：18 mm×180 mm、15 mm×100 mm。
- 3.7 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 3.8 无菌锥形瓶：容量 250 mL、500 mL、1000 mL。
- 3.9 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 3.10 微生物生化鉴定系统。
- 3.11 无菌手术剪、镊子。

4 培养基和试剂

- 4.1 碱性蛋白胨水：见附录 A 中 A.1。
- 4.2 硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖（TCBS）琼脂：见附录 A 中 A.2。
- 4.3 4 号琼脂：见附录 A 中 A.3。
- 4.4 庆大霉素琼脂：见附录 A 中 A.4。
- 4.5 商品化生化鉴定试剂：见附录 A 中 A.5。

5 检验程序

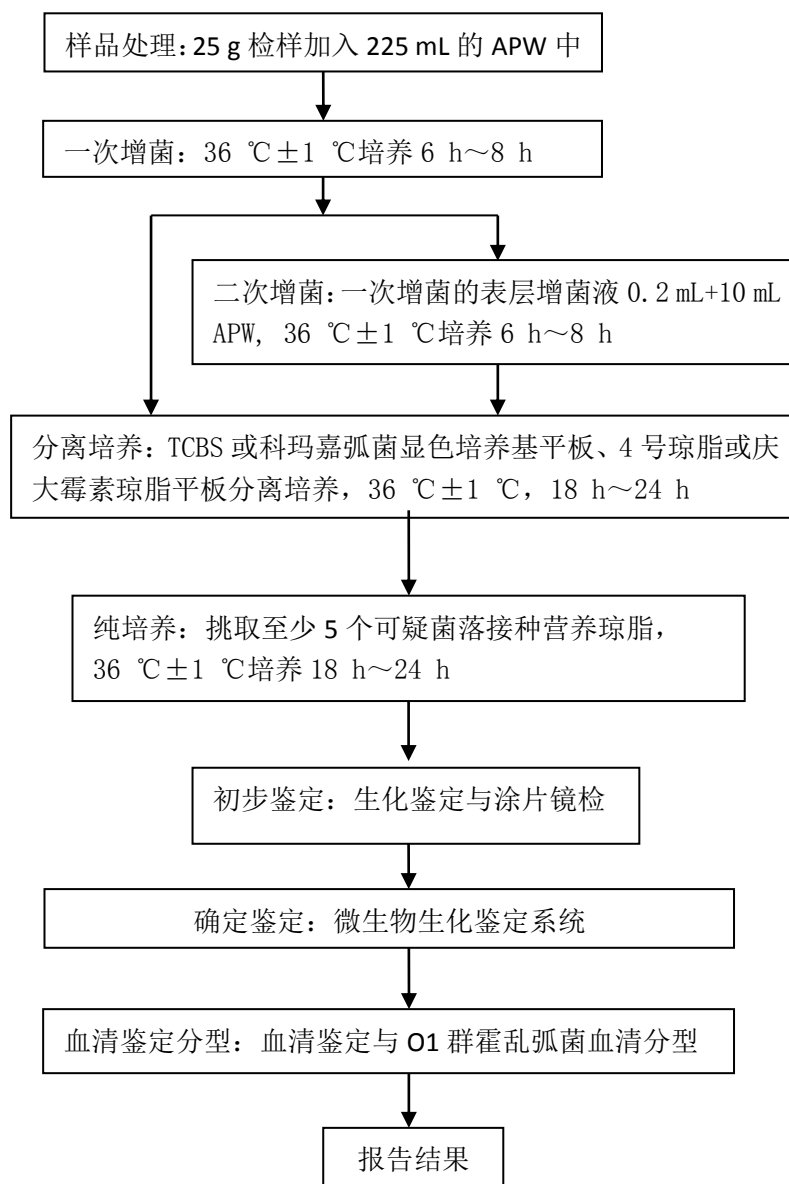


图1 霍乱弧菌检验程序图

6. 操作步骤

6.1 样品处理

称取25 g样品放入盛有225 mL碱性蛋白胨水的无菌均质杯中，以8 000 r/min~10 000 r/min均质1 min~2 min，或置于盛有225 mL 碱性蛋白胨水的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打1 min~2 min。如无均质器，则将样品放入无菌乳钵中磨碎，然后放在500 mL的灭菌容器内，加225 mL碱性蛋白胨水，并充分振荡。

如为冷冻产品,应在45 °C以下不超过15 min,或2 °C~5 °C不超过18 h解冻。

6.2 一次增菌

将上述处理好的样品于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $6\text{ h}\sim 8\text{ h}$ （如无明显的细菌生长现象则继续培养，但不能超过 20 h ）。

6.3 二次增菌

同时吸取上述一次增菌的表层增菌液 0.2 mL ，加入 10 mL 碱性蛋白胨水管中， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $6\text{ h}\sim 8\text{ h}$ 。

6.4 分离

6.4.1 在所有显示生长的一、二次增菌管中用接种环沾取一环表层增菌液，分别于TCBS（或科玛嘉弧菌显色培养基）平板、4号琼脂（或庆大霉素琼脂）平板上划线分离。于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$ 。

6.4.2 各种平板上霍乱弧菌的典型菌落特征见表1。

表1 霍乱弧菌在不同选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	霍乱弧菌
TCBS	圆形、边缘半透明而中央不透明、表面光滑的黄色菌落，直径约 3 mm 左右。
科玛嘉弧菌显色培养基	蓝色，蓝绿色到绿色菌落。
4号琼脂培养基	圆形、半透明、光滑湿润、灰黑色水滴样菌落，直径约 3 mm 左右。
庆大霉素琼脂平板	略带青灰色、半透明、扁平、微隆起、光滑湿润。如延长培养时间或室温放置到 48 h ，菌落略带黄色，中心形成黑色金属碲沉淀。

6.4.3 纯培养

每个平板上各挑取5个或以上可疑菌落（少于5个全部挑取），接种于营养琼脂斜面（或平板）， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$ 。

6.5 初步鉴定

6.5.1 氧化酶试验

挑选纯培养的单个菌落进行氧化酶试验，霍乱弧菌为阳性。

6.5.2 粘丝试验

挑选纯培养的单个菌落进行粘丝试验，霍乱弧菌为阳性。

6.5.3 涂片镜检

将可疑菌落涂片，进行革兰氏染色，镜检观察形态。霍乱弧菌为革兰氏阴性，呈弧形、逗点状等多形态，无芽胞，有鞭毛。

6.5.4 挑取纯培养的单个可疑菌落，转种三糖铁琼脂斜面并穿刺底层， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养24 h观察结果。霍乱弧菌在三糖铁琼脂中的反应为底层变黄不变黑，无气泡，斜面颜色变黄，有动力。

6.6 确定鉴定

初步鉴定结果相符者用微生物生化鉴定系统或商品化生化鉴定试剂进行系统鉴定。

6.7 血清鉴定分型

6.7.1 血清鉴定

自营养琼脂斜面上挑取纯培养物与O1群及O139群霍乱弧菌诊断血清做玻片凝集试验。玻片凝集用血清的效价一般应为1: 40~1: 50。如可疑菌落在血清中很快（一般在10 s内）出现肉眼可见的明显凝集，在生理盐水中不凝集者判为阳性。均不凝集方可报告未检出O1群及O139群霍乱弧菌。

6.7.2 O1群霍乱弧菌血清分型

上述确定为O1群霍乱弧菌的培养物，分别使用小川型及稻叶型单价血清做玻片凝集，同时做生理盐水对照。

6.8 报告

当检出的可疑菌落生化学性状符合表1要求，同时与霍乱弧菌诊断血清凝集（生理盐水不凝集），报告25 g（mL）样品中检出霍乱弧菌。霍乱弧菌主要性状与其他弧菌的鉴别见表2。

表1 霍乱弧菌的生化性状

试验项目	结果
革兰氏染色镜检	阴性，无芽胞
氧化酶	+
粘丝试验	+
动力	+
蔗糖	+
葡萄糖	+
分解葡萄糖产气	-
乳糖	-/ +
硫化氢	-
注：+阳性；-阴性	

表2 霍乱弧菌主要性状与其他弧菌的鉴别

名称	氧化酶	赖氨酸	精氨酸	鸟氨酸	明胶	脲酶	V P	42℃生长	蔗糖	D 纤维二糖	乳糖	阿拉伯糖	D 甘露糖	D 甘露醇	O N P G	嗜盐性试验NaCl含量 (%)				
																0	3	6	8	10
副溶血性弧菌	+	+	-	+	+	V	-	+	-	V	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
创伤弧菌	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	V	+	-	+	+	-	-
溶藻弧菌	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
霍乱弧菌	+	+	-	+	+	-	V	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
拟态弧菌	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
河弧菌	+	-	+	-	+	-	-	V	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	V	-
弗氏弧菌	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
梅氏弧菌	-	+	+	-	+	-	+	V	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	V	-
霍利斯弧菌	+	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-

注：nd表示未试验；V表示可变。

附录 A 培养基和试剂

A.1 碱性蛋白胨水(APW)

A.1.1 成分

成分	数量
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	10.0 g
H ₂ O	1000 mL

A.1.2 制法

将上述成分混合，调pH 8.5±0.2，121 °C 高压灭菌10 min。

A.2 硫代硫酸盐—柠檬酸盐—胆盐—蔗糖琼脂 (TCBS)

A.2.1 成分

成分	数量
多价蛋白胨	10.0 g
酵母浸膏	5.0 g
柠檬酸钠 (C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ ·2H ₂ O)	10.0 g
硫代硫酸钠 (Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O)	10.0 g
氯化钠	10.0 g
牛胆汁粉	5.0 g
柠檬酸铁	1.0 g
胆酸钠	3.0 g
蔗糖	20.0 g
溴麝香草酚蓝	0.04 g
麝香草酚蓝	0.04 g
琼脂	15.0 g
H ₂ O	1 000.0 mL

A.2.2 制法

加热煮沸至完全溶解，最终的pH 应为8.6±0.2。冷至50 °C 倾注平板备用。

A.3 4号琼脂

A.3.1 成分

成分	数量
蛋白胨	20.0 g
牛肉膏粉	5.0 g
氯化钠	5.0 g
无水亚硫酸钠	3.0 g
十二烷基硫酸钠	0.5 g
雷佛奴尔	0.03 g
猪胆汁粉	5.0 g
庆大霉素	500U
琼脂	15.0 g
H ₂ O	1 000.0 mL

A.3.2 制法

加热煮沸至完全溶解,最终的 pH 应为 8.5 ± 0.2 。冷至 50℃左右,每 100 mL 培养基加入 0.05% 亚硝酸钾溶液 2 mL,摇匀立即倾注平皿。待凝固后备用。

A.4 庆大霉素琼脂

A.4.1 成分

成分	数量
蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	3.0 g
亚硫酸钠	3.0 g
氯化钠	5.0 g
枸橼酸钠	10.0 g
蔗糖	10.0 g
庆大霉素	500U
琼脂	15.0 g
H ₂ O	1000 mL

A.4.2 制法

称取上述成分,溶解于 1000 mL 蒸馏水中,调 pH 值 8.3~8.7,煮沸加热搅拌,冷至 50℃左右时,加入无菌 0.05% 亚硝酸钾溶液 10 mL,混匀,倾入无菌平皿,备用。

A.4.3 添加剂

1%亚硝酸钾溶液，现配现用。

A.4 商品化生化鉴定试剂

见生产厂家使用说明书。

七、金黄色葡萄球菌检验标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.10-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》

2 适用范围

本程序规定了食品中金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的检验方法。

本程序第一法适用于食品中金黄色葡萄球菌的定性检验；第二法适用于金黄色葡萄球菌含量较高的食品中金黄色葡萄球菌的计数；第三法适用于金黄色葡萄球菌含量较低而杂菌含量较高的食品中金黄色葡萄球菌的计数。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 3.1 恒温培养箱：36 °C ±1 °C。
- 3.2 冰箱：2 °C ~5 °C。
- 3.3 恒温水浴箱：37 °C ~65 °C。
- 3.4 天平：感量 0.1 g。
- 3.5 均质器。
- 3.6 振荡器。
- 3.7 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 3.8 无菌锥形瓶：容量 100 mL、500 mL。
- 3.9 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 3.10 涂布棒。
- 3.11 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

4 培养基和试剂

- 4.1 7.5%氯化钠肉汤：见附录 A 中 A.1。
- 4.2 血琼脂平板：见附录 A 中 A.2。
- 4.3 Baird-Parker 琼脂平板：见附录 A 中 A.3。
- 4.4 脑心浸出液肉汤（BHI）：见附录 A 中 A.4。
- 4.5 兔血浆：见附录 A 中 A.5。
- 4.6 稀释液：磷酸盐缓冲液（见附录 A 中 A.6）。
- 4.7 营养琼脂小斜面：见附录 A 中 A.7。
- 4.8 革兰氏染色液：见附录 A 中 A.8。
- 4.9 无菌生理盐水：称取 8.5 g 氯化钠溶于 1000 mL 蒸馏水中，121 °C 高压灭菌 15 min。

第一法 定性检验

5 检验程序

检验程序见图1。

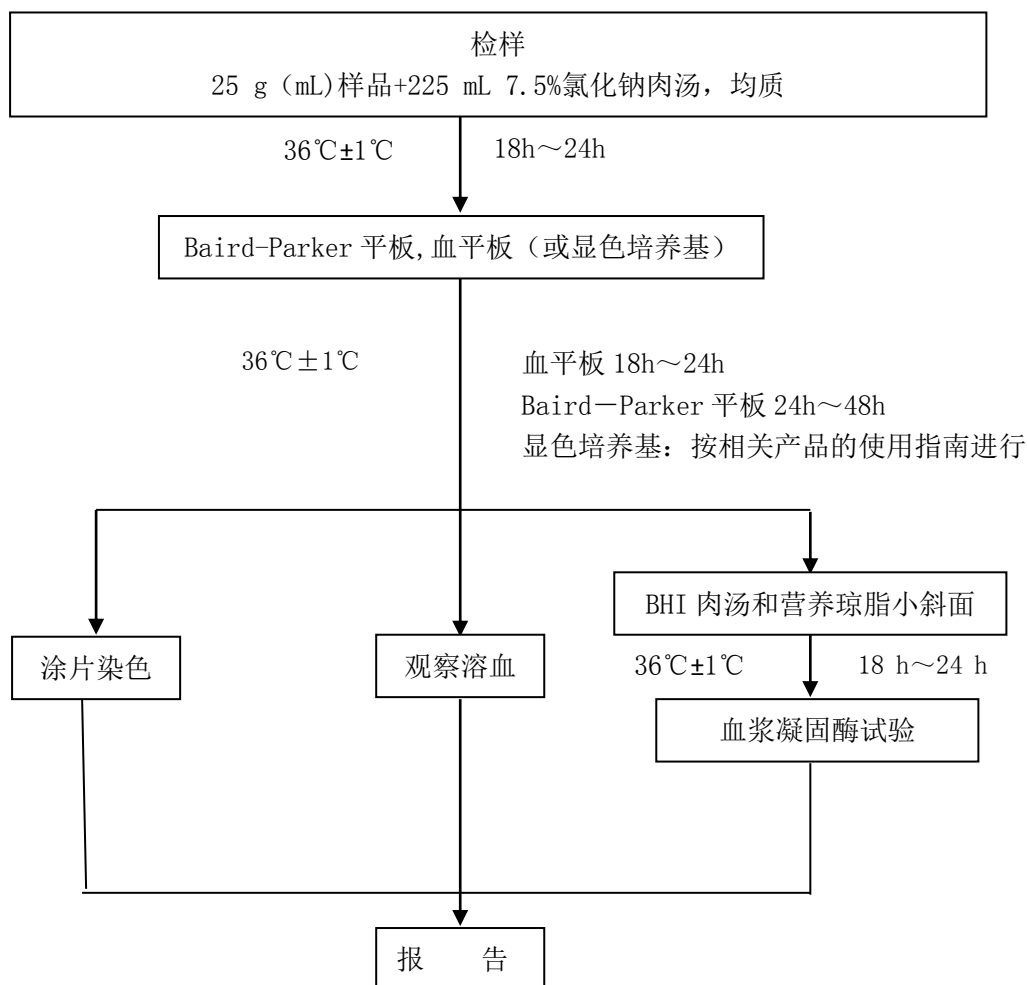


图1 金黄色葡萄球菌检验程序

6 操作步骤

6.1 样品的处理

称取 25 g 样品至盛有 225 mL 7.5% 氯化钠肉汤的无菌均质杯内, 8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min, 或放入盛有 225 mL 7.5% 氯化钠肉汤的无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。若样品为液态, 吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL 7.5% 氯化钠肉汤的无菌锥形瓶 (瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠) 中, 振荡混匀。

6.2 增菌

将上述样品匀液于 36 °C ±1 °C 培养 18 h~24 h。金黄色葡萄球菌在 7.5% 氯化钠肉汤中呈混浊生长。

6.3 分离

将增菌后的培养物，分别划线接种到 Baird-Parker 平板和血平板（或显色培养基），血平板 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h；Baird-Parker 平板 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h；显色培养基，按相关产品的使用指南进行。

6.4 初步鉴定

金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上呈圆形，表面光滑、凸起、湿润、菌落直径为 2mm~3mm，颜色呈灰黑色至黑色，有光泽，常有浅色（非白色）的边缘，周围绕以不透明圈（沉淀），其外常有一清晰带。当用接种针触及菌落时具有黄油样黏稠感。有时可见到不分解脂肪的菌株，除没有不透明圈和清晰带外，其他外观基本相同。从长期贮存的冷冻或脱水食品中分离的菌落，其黑色常较典型菌落浅些，且外观可能较粗糙，质地较干燥。在血平板上，形成菌落较大，圆形、光滑凸起、湿润、金黄色（有时为白色），菌落周围可见完全透明溶血圈。挑取上述菌落进行革兰氏染色镜检及血浆凝固酶试验。

6.5 确证鉴定

6.5.1 染色镜检：金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性球菌，排列呈葡萄球状，无芽胞，无荚膜，直径约为 $0.5\text{ }\mu\text{m}\sim 1\text{ }\mu\text{m}$ 。

6.5.2 血浆凝固酶试验：挑取 Baird-Parker 平板或血平板上至少 5 个可疑菌落（小于 5 个全选），分别接种到 5 mL BHI 和营养琼脂小斜面， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

取新鲜配置兔血浆 0.5 mL，放入小试管中，再加入 BHI 培养物 0.2 mL~0.3 mL，振荡摇匀，置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱或水浴箱内，每半小时观察一次，观察 6 h，如呈现凝固（即将试管倾斜或倒置时，呈现凝块）或凝固体积大于原体积的一半，被判定为阳性结果。同时以血浆凝固酶试验阳性和阴性葡萄球菌菌株的肉汤培养物作为对照。也可用商品化的试剂，按说明书操作，进行血浆凝固酶试验。

结果如可疑，挑取营养琼脂小斜面的菌落到 5 mL BHI， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~48 h，重复试验。

6.6 葡萄球菌肠毒素的检验（选做）

可疑食物中毒样品或产生葡萄球菌肠毒素的金黄色葡萄球菌菌株的鉴定，应按附录B检测葡萄球菌肠毒素。

7 结果与报告

7.1 结果判定：符合 6.4、6.5，可判定为金黄色葡萄球菌。

7.2 结果报告：在 25g (mL) 样品中检出或未检出金黄色葡萄球菌。

第二法 平板计数法

8 检验程序

金黄色葡萄球菌检验程序见图2。

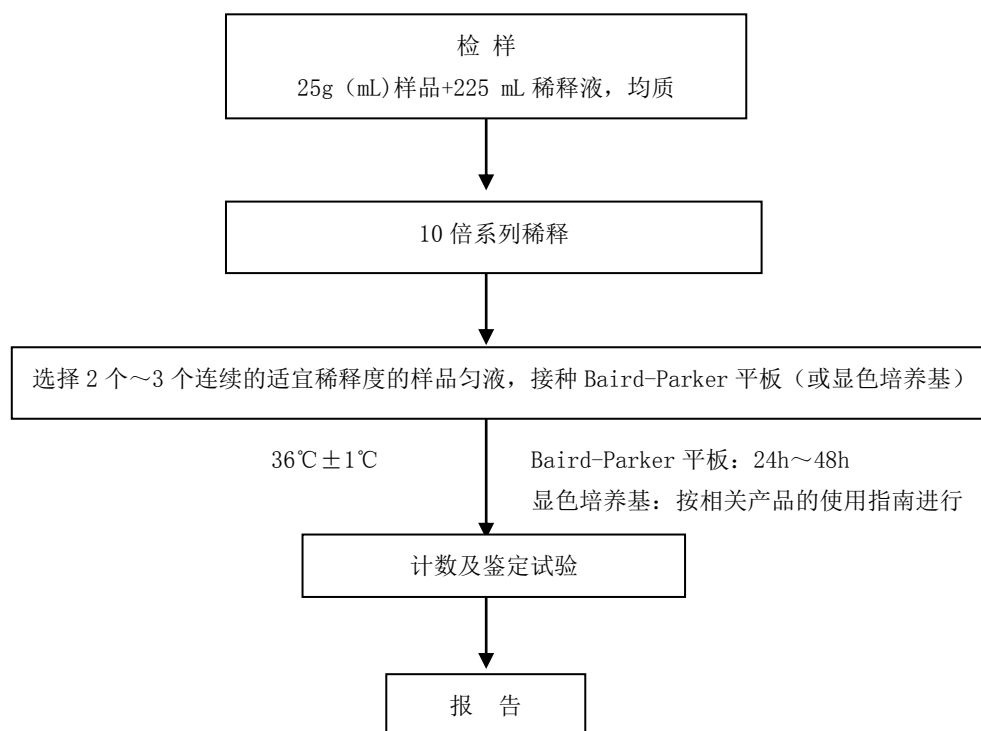


图2 金黄色葡萄球菌平板计数法检验程序

9 操作步骤

9.1 样品的稀释

9.1.1 固体和半固体样品：称取 25 g 样品置盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内，8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min，或置盛有 225 mL 稀释液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min，制成 1:10 的样品

匀液。

9.1.2 液体样品：以无菌吸管吸取 25 mL 样品置盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成 1:10 的样品匀液。

9.1.3 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用 1 支 1 mL 无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

9.1.4 按 9.1.3 操作程序，制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用 1 次 1 mL 无菌吸管或吸头。

9.2 样品的接种

根据对样品污染状况的估计，选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行 10 倍递增稀释时，每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液以 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 接种量分别加入三块 Baird-Parker 平板（或显色培养基平板），然后用无菌 L 棒涂布整个平板，注意不要触及平板边缘。使用前，如平板表面有水珠，可放在 25 °C~50 °C 的培养箱里干燥，直到平板表面的水珠消失。

9.3 培养

在通常情况下，涂布后，将平板静置 10 min，如样液不易吸收，可将平板放在培养箱 36 °C ±1 °C 培养 1 h；等样品匀液吸收后翻转平皿，倒置于培养箱，36 °C ±1 °C，Baird-Parker 平板培养 45 h~48 h（显色培养基平板，按使用说明）。

9.4 典型菌落计数和确认

9.4.1 金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上典型菌落的确认同 6.2.3，在显色培养基平板上典型菌落形态见相关产品使用说明。

9.4.2 选择有典型的金黄色葡萄球菌菌落的平板，且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 20 CFU~200 CFU 之间的平板，计数典型菌落数。

9.4.3 从典型菌落中至少选 5 个可疑菌落（小于 5 个全选）进行鉴定试验。分别做染色镜检，血浆凝固酶试验（见 6.5）：同时划线接种到血平板 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h 后观察菌落形态。

10 结果计算

10.1 如果只有一个稀释度平板的菌落数在 20 CFU~200 CFU 之间且有典型菌落，计数该稀释度平板上的典型菌落；

10.2 最低稀释度平板的菌落数小于 20 CFU 且有典型菌落，计数该稀释度平板上的典型菌落；

10.3 某一稀释度平板的菌落数大于 200 CFU 且有典型菌落，但下一稀释度平板上没有典型菌落，应计数该稀释度平板上的典型菌落；

10.4 某一稀释度平板的菌落数大于 200 CFU 且有典型菌落，且下一稀释度平板上有典型菌落，但其平板上的菌落数不在 20 CFU~200 CFU 之间，应计数该稀释度平板上的典型菌落；

以上按公式（1）计算。

10.5 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 20 CFU~200 CFU 之间，按公式（2）计算。

10.6 计算公式

公式（1）：

$$T = \frac{AB}{Cd} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

T—样品中金黄色葡萄球菌菌落数

A—某一稀释度典型菌落的总数

B—某一稀释度血浆凝固酶阳性的菌落数

C—某一稀释度用于血浆凝固酶试验的菌落数

d—稀释因子

公式 (2):

$$T = \frac{A1B1/C1 + A2B2/C2}{1.1d} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

T—样品中金黄色葡萄球菌菌落数

A1—第一稀释度 (低稀释倍数) 典型菌落的总数

B1—第一稀释度 (低稀释倍数) 血浆凝固酶阳性的菌落数

C1—第一稀释度 (低稀释倍数) 用于血浆凝固酶试验的菌落数

A2—第二稀释度 (高稀释倍数) 典型菌落的总数

B2—第二稀释度 (高稀释倍数) 血浆凝固酶阳性的菌落数

C2—第二稀释度 (高稀释倍数) 用于血浆凝固酶试验的菌落数

1.1 —计算系数

d—稀释因子 (第一稀释度)

11 报告

根据10中公式计算结果, 报告每g (mL) 样品中金黄色葡萄球菌数, 以CFU/g (mL) 表示; 如*T*值为0, 则以小于1乘以最低稀释倍数报告。

第三法 MPN 计数法

12 检验程序

检验程序见图3。

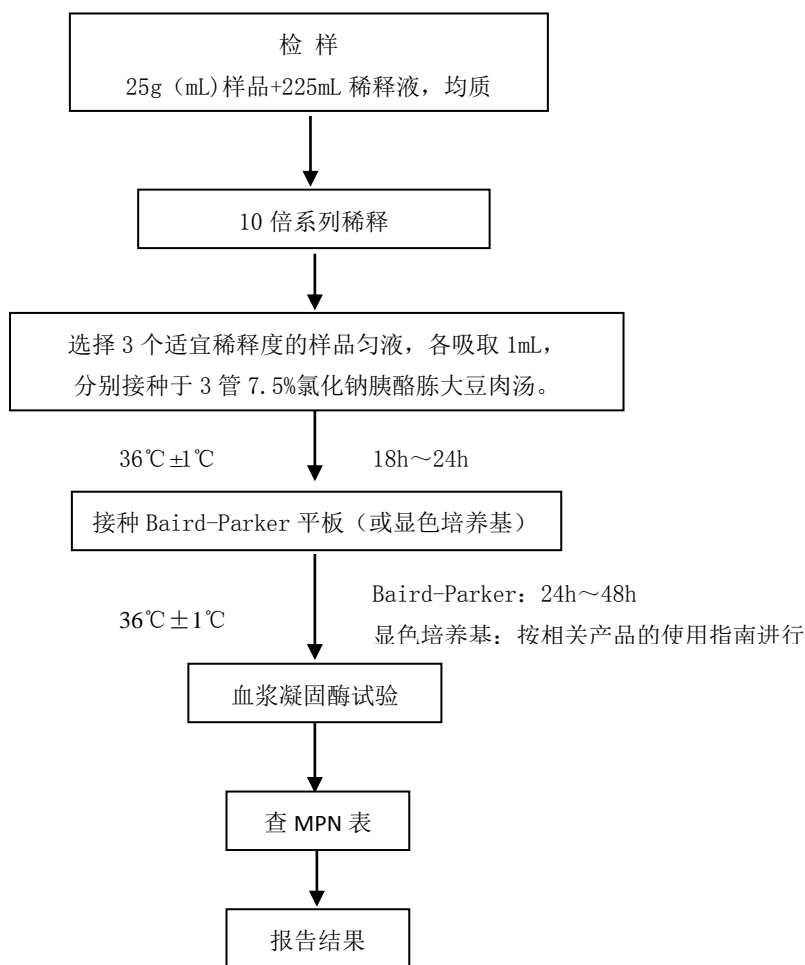


图3 金黄色葡萄球菌MPN法检验程序

13 操作步骤

13.1 样品的稀释

按9.1进行。

13.2 接种和培养

13.2.1 根据对样品污染状况的估计, 选择 3 个适宜的连续稀释度的样品匀液 (液体样品可以选择原液), 在进行 10 倍递增稀释的同时, 每个稀释度分别接种 1mL 样品匀液至 7.5%氯化钠肉汤管 (如接种量超过 1 mL, 则用双料 7.5%氯化钠肉汤), 每个稀释度接种 3 管, 将上述接种物 36 °C ± 1 °C 培养, 18 h~24 h。

13.2.2 用接种环从培养后的 7.5%氯化钠肉汤管中分别取培养物 1 环, 移种于 Baird-Parker 平板 (或显色培养基) 36 °C ± 1 °C 培养, 24 h~48 h (显色培养基平

板按产品使用说明进行)。

13.3 典型菌落确认

按 9.4.1、9.4.3 进行。

14 结果与报告

计算证实为血浆凝固酶试验阳性的试管管数，查 MPN 检索表（见附录 C），报告每 g（mL）样品中金黄色葡萄球菌的最可能数，以 MPN/g（mL）表示。

附录 A 培养基和试剂

A.1 7.5%氯化钠肉汤

A.1.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
氯化钠	75 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4±0.2	

A.1.2 制法

将上述成分加热溶解，调节 pH，分装，每瓶 50 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 血琼脂平板

A.2.1 成分

豆粉琼脂（pH7.4~7.6）	100 mL
脱纤维羊血（或兔血）	5 mL~10 mL

A.2.2 制法

加热溶化琼脂，冷却至 50 °C，以无菌操作加入脱纤维羊血，摇匀，倾注平板。

A.3 Baird—Parker琼脂平板

A.3.1 成分

胰蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
酵母膏	1 g
丙酮酸钠	10 g
甘氨酸	12 g
氯化锂 (LiCl 6H ₂ O)	5 g
琼脂	20 g
蒸馏水	950 mL
pH 7.0±0.2	

A.3.2 增菌剂的配法

30%卵黄盐水 50 mL 与经过除菌过滤的 1%亚碲酸钾溶液 10 mL 混合，保存于冰箱内。

A.3.3 制法

将除琼脂以外的各种成分加到蒸馏水中，加热煮沸至完全溶解，调节 pH。分装每瓶 95 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂，冷至 50 °C，每 95 mL 加入预热至 50 °C 的卵黄亚碲酸钾增菌剂 5 mL 摇匀后倾注平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱储存不得超过 48 h。

A.4 脑心浸出液肉汤 (BHI)

A.4.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠 (12H ₂ O)	2.5 g
葡萄糖	2.0 g
牛心浸出液	500 mL
pH 7.4±0.2	

A.4.2 制法

加热溶解，调节 pH，分装 16 mm×160 mm 试管，每管 5 mL 置 121 °C，15 min 灭菌。

A.5 兔血浆

取柠檬酸钠 3.8 g，加蒸馏水 100 mL，溶解后过滤，装瓶，121 °C 高压灭菌 15 min。

兔血浆制备：取 3.8% 柠檬酸钠溶液一份，加兔全血四份，混好静置（或以 3000 r/min 离心 30 min），使血液细胞下降，即可得血浆。

A.6 磷酸盐缓冲液

A.6.1 成分

磷酸二氢钾（KH ₂ PO ₄ ）	34.0 g
蒸馏水	500 mL
pH 7.2	

A.6.2 制法

贮存液：称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中，用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2，用蒸馏水稀释至 1000 mL 后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液 1.25 mL，用蒸馏水稀释至 1000 mL，分装于适宜容器中，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.7 营养琼脂小斜面

A.7.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g~20 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2~7.4	

A.7.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，加入 15% 氢氧化钠溶液约 2 mL 调节 pH 至 7.2~

7.4. 加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化，分装13 mm×130 mm管，121 °C高压灭菌15 min。

A.8 革兰氏染色液

A.8.1 结晶紫染色液

A.8.1.1 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.8.1.2 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.8.2 革兰氏碘液

A.8.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.8.2.2 制法

将碘与碘化钾先行混合，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.8.3 沙黄复染液

A.8.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.8.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.8.4 染色法

- 涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染液，染 1 min，水洗。
- 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

- c. 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。
- d. 滴加复染液, 复染 1 min, 水洗、待干、镜检。

附录 B 葡萄球菌肠毒素检验

B.1 试剂和材料

除另有规定外, 所用试剂均为分析纯, 试验用水应符合 GB/T 6682 对一级水的规定。

B.1.1 A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型 ELISA 检测试剂盒。

B.1.2 pH 试纸, 范围在 3.5~8.0, 精度 0.1。

B.1.3 0.25 mol/L、pH8.0 的 Tris 缓冲液: 将 121.1g 的 Tris 溶解到 800mL 的去离子水中, 待温度冷至室温后, 加 42 mL 浓 HCL, 调 pH 值至 8.0。

B.1.4 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液: 称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.55g (或 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.62g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.85g (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.73g)、NaCl 8.7g 溶于 1000 mL 蒸馏水中, 充分混匀即可。

B.1.5 庚烷。

B.1.6 10%次氯酸钠溶液。

B.1.7 肠毒素产毒培养基

B.1.7.1 成分

蛋白胨	20 g
胰消化酪蛋白	200 mg (氨基酸)
氯化钠	5 g
磷酸氢二钾	1 g
磷酸二氢钾	1 g
氯化钙	0.1 g
硫酸镁	0.2 g
菸酸	0.01 g
蒸馏水	1000 mL
pH	7.3±0.2

B.1.7.2 制法

将所有成分混于水中, 溶解后调节 pH, 121℃ 高压灭菌 30min。

B.1.8 营养琼脂

B.1.8.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5g
琼脂	15~20g
蒸馏水	1 000 mL

B.1.8.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内,加入 15%氢氧化钠溶液约 2mL 校正 pH 至 7.2~7.4。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂溶化。分装烧瓶,121℃ 高压灭菌 15min。

B.2 仪器和设备

B.2.1 电子天平:感量 0.01g。

B.2.2 均质器。

B.2.3 离心机:转速 3000g~5000g。

B.2.4 离心管:50 mL。

B.2.5 滤器:滤膜孔径 0.2 μ m。

B.2.6 微量加样器:20 μ L ~200 μ L、200 μ L ~1000 μ L。

B.2.7 微量多通道加样器:50 μ L ~300 μ L。

B.2.8 自动洗板机(可选择使用)。

B.2.9 酶标仪:波长 450nm。

B.3 原理

本方法可用 A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型酶联免疫吸附试剂盒完成。本方法测定的基础是酶联免疫吸附反应(ELISA)。96 孔酶标板的每一个微孔条的 A~E 孔分别包被了 A、B、C、D、E 型葡萄球菌肠毒素抗体, H 孔为阳性质控,已包被混合型葡萄球菌肠毒素抗体, F 和 G 孔为阴性质控,包被了非免疫动物的抗体。样品中如果有葡萄球菌肠毒素,游离的葡萄球菌肠毒素则与各微孔中包被的特定抗体结合,形成抗原抗体复合物,其余未结合的成分在洗板过程中被洗掉;抗原抗体复合物再与过氧化物酶标记物(二抗)结合,未结合上的酶标记物在洗板过程中被洗掉;加入酶底物和显色剂并孵育,酶标记物上的酶催化底物分解,使无色的显色剂变为蓝色;加入反应终止液可使颜色由蓝变黄,并终止了

酶反应；以 450 nm 波长的酶标仪测量微孔溶液的吸光度值，样品中的葡萄球菌肠毒素与吸光度值成正比。

B.4 检测步骤

B.4.1 从分离菌株培养物中检测葡萄球菌肠毒素方法

待测菌株接种营养琼脂斜面（试管 18 mm×180 mm）36 °C 培养 24 h，用 5 mL 生理盐水洗下菌落，倾入 60 mL 产毒培养基中，36 °C 振荡培养 48 h，振速为 100 次/min，吸出菌液，100 °C 加热 10 min，8000 r/min 离心 20 min，取上清液 100 μ L 进行试验。

B.4.2 从食品中提取和检测葡萄球菌毒素方法

B.4.2.1 牛奶和奶粉

将 25g 奶粉溶解到 125 mL、0.25 M、pH8.0 的 Tris 缓冲液中，混匀后同液体牛奶一样按以下步骤制备。将牛奶于 15 °C，3500 \times g 离心 10 min。将表面形成的一层脂肪层移走，变成脱脂牛奶。用蒸馏水对其进行稀释（1：20）。取 100 μ L 稀释后的样液进行试验。

B.4.2.2 脂肪含量不超过 40% 的食品

称取 10g 样品绞碎，加入 pH7.4 的 PBS 液 15 mL 进行均质。振摇 15 min。于 15 °C，3500 \times g 离心 10 min。必要时，移去上面脂肪层。取上清液进行过滤除菌。取 100 μ L 的滤出液进行试验。

B.4.2.3 脂肪含量超过 40% 的食品

称取 10g 样品绞碎，加入 pH7.4 的 PBS 液 15 mL 进行均质。振摇 15 min。于 15 °C，3500 \times g 离心 10 min。吸取 5 mL 上层悬浮液，转移到另外一个离心管中，再加入 5 mL 的庚烷，充分混匀 5 min。于 15 °C，3500 \times g 离心 5 min。将上部有机相（庚烷层）全部弃去，注意该过程中不要残留庚烷。将下部水相层进行过滤除菌。取 100 μ L 的滤出液进行试验。

B.4.2.4 其它食品可酌情参考上述食品处理方法。

B.4.3 检测

B.4.3.1 所有操作均应在室温（20 °C ~ 25 °C）下进行，A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型 ELISA 检测试剂盒中所有试剂的温度均应回升至室温方可使用。测定中吸取不同的试剂和样品溶液时应更换吸头，用过的吸头以及废液要浸泡到 10% 次氯酸钠溶液中过夜。

B.4.3.2 将所需数量的微孔条插入框架中（一个样品需要一个微孔条）。将样品液加入微孔条

的 A~G 孔，每孔 100 μ L。H 孔加 100 μ L 的阳性对照，用手轻拍微孔板充分混匀，用粘胶纸封住微孔以防溶液挥发，置室温下孵育 1 h。

B.4.3.3 将孔中液体倾倒至含 10% 次氯酸钠溶液的容器中，并在吸水纸上拍打几次以确保孔内不残留液体。每孔用多通道加样器注入 250 μ L 的洗液，再倾倒掉并在吸水纸上拍干。重复以上洗板操作 4 次。本步骤也可由自动洗板机完成。

B.4.3.4 每孔加入 100 μ L 的酶标抗体，用手轻拍微孔板充分混匀，置室温下孵育 1 h。

B.4.3.5 重复 4.2.2.3 的洗板程序。

B.4.3.6 加 50 μ L 的 TMB 底物和 50 μ L 的发色剂至每个微孔中，轻拍混匀，室温黑暗避光处孵育 30 min。

B.4.3.7 加入 100 μ L 的 2 mol/L 硫酸终止液，轻拍混匀，30 min 内用酶标仪在 450 nm 波长条件下测量每个微孔溶液的 OD 值。

B.4.4 结果的计算和表述

B.4.4.1 质量控制

测试结果阳性质控的 OD 值要大于 0.5，阴性质控的 OD 值要小于 0.3，如果不能同时满足以上要求，测试的结果不被认可。对阳性结果要排除内源性过氧化物酶的干扰。

B.4.4.2 临界值的计算

每一个微孔条的 F 孔和 G 孔为阴性质控，两个阴性质控 OD 值的平均值加上 0.15 为临界值。

示例：阴性质控 1=0.08

阴性质控 2=0.10

平均值=0.09

临界值=0.09+0.15=0.24

B.4.4.3 结果表述

OD 值小于临界值的样品孔判为阴性，表述为样品中未检出某型金黄色葡萄球菌肠毒素；OD 值大于或等于临界值的样品孔判为阳性，表述为样品中检出某型金黄色葡萄球菌肠毒素。

B5 生物安全

因样品中不排除有其它潜在的传染性物质存在，所以要严格按照 GB19489《实验室生物安全通用要求》对废弃物进行处理。

附录 C 最可能数 (MPN) 检索表

表C.1 每g (mL) 检样中金黄色葡萄球菌最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1, 000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1, 000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2, 000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4, 100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1 g (mL)、0.01 g (mL) 和 0.001 g (mL)]、每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 g (mL)、0.1 g (mL) 和 0.01 g (mL) 时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01 g (mL)、0.001 g (mL)、0.0001 g (mL) 时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

八、 蜡样芽胞杆菌检验标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.14-2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》

2 适用范围

本程序规定了食品中蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 的检验方法。

本程序第一法适用于蜡样芽胞杆菌含量较高的食品中蜡样芽胞杆菌的计数；第二法适用于蜡样芽胞杆菌含量较低的食品样品中蜡样芽胞杆菌的计数。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其它设备和材料如下：

- 3.1 冰箱：2℃~5℃。
- 3.2 恒温培养箱：30℃±1℃、36℃±1℃。
- 3.3 均质器。
- 3.4 电子天平：感量 0.1 g。
- 3.5 无菌锥形瓶：100 mL、500 mL。
- 3.6 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 3.7 无菌平皿：直径 90 mm。
- 3.8 无菌试管：18 mm×180 mm。
- 3.9 显微镜：10×*100×（油镜）。
- 3.10 L 涂布棒。

4 培养基和试剂

- 4.1 磷酸盐缓冲液 (PBS)：见附录 A 中 A.1。
- 4.2 甘露醇卵黄多粘菌素(MYP)琼脂：见附录 A 中 A.2。
- 4.3 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤：见附录 A 中 A.3。
- 4.4 营养琼脂：见附录 A 中 A.4。
- 4.5 胰酪胨大豆羊血(TSSB)琼脂：见附录 A 中 A.5。
- 4.6 酪蛋白琼脂：见附录 A 中 A.6。
- 4.7 动力培养基：见附录 A 中 A.7。
- 4.8 V-P 培养基：见附录 A 中 A.8。

- 4.9 硝酸盐肉汤：见附录 A 中 A.9。
- 4.10 西蒙氏柠檬酸盐培养基：见附录 A 中 A.10。
- 4.11 明胶培养基：见附录 A 中 A.11。
- 4.12 糖发酵管：见附录 A 中 A.12。
- 4.13 溶菌酶营养肉汤：见附录 A 中 A.13。
- 4.14 过氧化氢溶液：见附录 A 中 A.14。

第一法 蜡样芽胞杆菌平板计数法

5 检验程序

蜡样芽胞杆菌平板计数法检验程序见图 1。

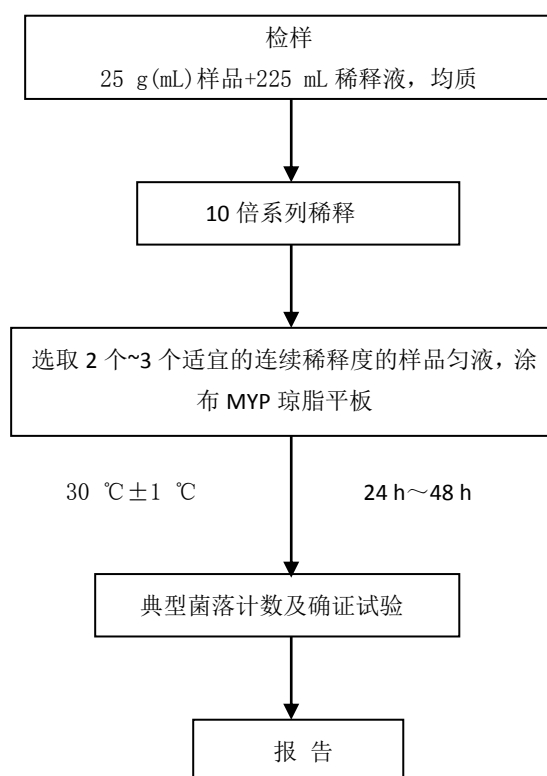


图 1 蜡样芽胞杆菌平板计数法检验程序

6 操作步骤

6.1 样品处理

冷冻样品应在 45 °C 以下不超过 15 min 或在 2 °C~5 °C 不超过 18 h 解冻, 若不能及时检验, 应放于 -10 °C ~ -20 °C 保存; 非冷冻而易腐的样品应尽可能及时检

验，若不能及时检验，应置于 2℃~5℃ 冰箱保存，24 h 内检验。

6.2 样品制备

称取样品 25 g，放入盛有 225 mL PBS 或生理盐水的无菌均质杯内，用旋转刀片式均质器以 8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min，或放入盛有 225 mL PBS 或生理盐水的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。若样品为液态，吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL PBS 或生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)中，振荡混匀，作为 1:10 的样品匀液。

6.3 样品的稀释

吸取上述 1:10 的样品匀液 1 mL 加到装有 9 mL PBS 或生理盐水的稀释管中，充分混匀制成 1:100 的样品匀液。据对样品污染状况的估计，按上述操作，依次制成十倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次，换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。

6.4 样品接种

根据对样品污染状况的估计，选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），以 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 接种量分别入三块 MYP 琼脂平板，然后用无菌 L 棒涂布整个平板，注意不要触及平板边缘。使用前，如 MYP 琼脂平板表面有水珠，可放在 25℃~50℃ 的培养箱里干燥，直到平板表面的水珠消失。

6.5 分离、培养

6.5.1 分离

在通常情况下，涂布后，将平板静置 10 min。如样液不易吸收，可将平板放在培养箱 30℃±1℃ 培养 1 h，等样品匀液吸收后翻转平皿，倒置于培养箱，30℃±1℃ 培养 24 h±2 h。如果菌落不典型，可继续培养 24 h±2 h 再观察。在 MYP 琼脂平板上，典型菌落为微粉红色(表示不发酵甘露醇)，周围有白色至淡粉红色沉淀环（表示产卵磷脂酶）。

6.5.2 纯培养

从每个平板（按 8.1.1 要求需要计数的稀释度的平板）中至少挑取 3 个典型菌落（小于 3 个全选），分别划线接种于营养琼脂平板做纯培养，30℃±1℃ 培养 24 h±2 h，进行确证实验。在营养琼脂平板上，典型菌落为灰白色，偶有黄绿色，

不透明,表面粗糙似毛玻璃状或融蜡状,边缘常呈扩展状,直径为 4 mm~10 mm。

7 确证实验

7.1 染色镜检

挑取纯培养的单菌落,革兰氏染色镜检。蜡样芽胞杆菌为革兰氏阳性芽胞杆菌,大小为 $(1\mu\text{m}\sim 1.3\mu\text{m})\times(3\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m})$,芽胞呈椭圆形位于菌体中央或偏端,不膨大于菌体,菌体两端较平整,多呈短链或长链状排列。

7.2 生化鉴定

挑取纯培养的单菌落,进行过氧化氢酶试验、动力试验、硝酸盐还原试验、酪蛋白分解试验、溶菌酶耐性试验、V-P 试验、葡萄糖利用(厌氧)试验、根状生长试验、溶血试验、蛋白质毒素结晶试验。蜡样芽胞杆菌生化特征与其它芽胞杆菌的区别见表 1。

7.2.1 溶血试验

挑取纯培养的单菌落接种于 TSSB 琼脂平板上,30℃ \pm 1℃培养 24 h \pm 2 h。蜡样芽胞杆菌菌落为浅灰色,不透明,似白色毛玻璃状,有草绿色溶血环或完全溶血环。苏云金芽胞杆菌和蕈状芽胞杆菌呈现弱的溶血现象,而多数炭疽芽胞杆菌为不溶血,巨大芽胞杆菌为不溶血。

7.2.2 根状生长试验

挑取单个可疑菌落按间隔 0.5cm 左右距离划平行直线于营养琼脂平板上,30℃ \pm 1℃培养 24 h \pm 2 h。蕈状芽胞杆菌形成根状生长的特征。蜡样芽胞杆菌菌株不具形成根状生长的特征。

7.2.3 蛋白质毒素结晶试验

取经 30℃ \pm 1℃培养 24 h \pm 2 h 并于室温放置 3 d~4 d 的营养琼脂培养物少许于载玻片上,滴加蒸馏水混匀并涂成薄膜。经自然干燥,微火固定后,加甲醇作用 30 s 后倾去,再通过火焰干燥,于载玻片上滴满 0.5%碱性复红,放火焰上加热(微见蒸气,勿使染液沸腾)持续 1 min~2 min,移去火焰,再更换染色液再次加温染色 30 s,倾去染液用洁净自来水彻底清洗、晾干后镜检。观察有无游离芽胞(浅红色)和染成深红色的菱形、正方形或其它形状的蛋白结晶体。如发现游离芽胞形成的不丰富,应再将培养物置室温 2 d~3 d 后进行检查。除苏云金芽胞杆菌外其它芽胞杆菌不产生蛋白结晶体。

7.2.4 溶菌酶耐性试验

用接种环取纯菌悬液一环，接种于溶菌酶肉汤中，36℃±1℃培养 24 h。蜡样芽胞杆菌在本培养基(含 0.001 %溶菌酶)中能生长。如出现阴性反应，应继续培养 24 h。巨大芽胞杆菌不生长。

表1 蜡样芽胞杆菌生化特征与其它芽胞杆菌的区别

项目	蜡样芽胞杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	苏云金芽胞杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	蕈状芽胞杆菌 <i>Bacillus mycoides</i>	炭疽芽胞杆菌 <i>Bacillus anthracis</i>	巨大芽胞杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>
革兰氏染色	+ ^a	+	+	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	+	+
动力	+/- ^b	+/-	- ^c	-	+/-
硝酸盐还原	+	+/-	+	+	-/+ ^d
酪蛋白分解	+	+	+/-	-/+	+/-
溶菌酶耐性	+	+	+	+	-
卵黄反应	+	+	+	+	-
葡萄糖利用 (厌氧)	+	+	+	+	-
V-P试验	+	+	+	+	-
甘露醇产酸	-	-	-	-	+
溶血 (羊红细胞)	+	+	+	-/+	-
根状生长	-	-	+	-	-
蛋白质毒素晶体	-	+	-	-	-
a: + 表示 90%~100%的菌株阳性; b: +/- 表示大多数的菌株阳性; c: - 表示 90%~100%的菌株阴性; d: -/+ 表示大多数的菌株阴性。					

7.3 生化分型(可选做)

根据对柠檬酸盐利用、硝酸盐还原、淀粉水解、V-P 试验反应、明胶液化试验，将蜡样芽胞杆菌分成不同生化型别，见表 2。

表 2 蜡样芽胞杆菌生化分型试验

型别	生化试验				
	柠檬酸盐	硝酸盐	淀粉	V-P	明胶
1	+a	+	+	+	+
2	- ^b	+	+	+	+
3	+	+	-	+	+
4	-	-	+	+	+
5	-	-	-	+	+
6	+	-	-	+	+
7	+	-	+	+	+
8	-	+	-	+	+
9	-	+	-	-	+
10	-	+	+	-	+
11	+	+	+	-	+
12	+	+	-	-	+
13	-	-	+	-	-
14	+	-	-	-	+
15	+	-	+	-	+

注：a：+表示 90%~100%的菌株阳性；b：-表示 90%~100%的菌株阴性。

8 结果计算

8.1 典型菌落计数和确认

8.1.1 选择有典型蜡样芽胞杆菌菌落的平板，且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 20CFU~200 CFU 之间的平板，计数典型菌落数。如果：

- a) 只有一个稀释度的平板菌落数在 20 CFU~200 CFU 之间且有典型菌落，计数该稀释度平板上的典型菌落；
- b) 所有稀释度的平板菌落数均小于 20 CFU 且有典型菌落，应计数最低稀释度平板上的典型菌落；
- c) 某一稀释度的平板菌落数大于 200 CFU 且有典型菌落，但下一稀释度平板上没有典型菌落，应计数该稀释度平板上的典型菌落；
- d) 若所有稀释度的平板菌落数大于 200 CFU 且有典型菌落，应计数最高稀释度平板上的典型菌落；
- e) 若所有稀释度的平板菌落数均不在 20 CFU~200 CFU 之间且有典型菌落，其中一部分小于 20 CFU 或大于 200CFU 时，应计数最接近 20 CFU 或 200 CFU 的稀释度平板上的典型菌落。

以上按公式（1）计算。

f) 若 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 20 CFU~200 CFU 之间，按公式（2）计算

8.1.2 从典型菌落中至少挑取 5 个典型菌落（小于 5 个全选），划线接种于营养琼脂平板做纯培养，30 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h。

8.2 结果计数

$$\text{公式 (1): } T = \frac{AB}{Cd} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- T——样品中蜡样芽胞杆菌菌落数；
- A——某一稀释度蜡样芽胞杆菌典型菌落的总数；
- B——鉴定结果为蜡样芽胞杆菌的菌落数；
- C——用于蜡样芽胞杆菌鉴定的菌落数；
- d——稀释因子。

$$\text{公式 (2): } T = \frac{A1B1/C1 + A2B2/C2}{1.1d} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- T——样品中蜡样芽胞杆菌菌落数；
- A1——第一稀释度（低稀释倍数）蜡样芽胞杆菌典型菌落的总数；
- A2——第二稀释度（高稀释倍数）蜡样芽胞杆菌典型菌落的总数；
- B1——第一稀释度（低稀释倍数）鉴定结果为蜡样芽胞杆菌的菌落数；
- B2——第二稀释度（高稀释倍数）鉴定结果为蜡样芽胞杆菌的菌落数；
- C1——第一稀释度（低稀释倍数）用于蜡样芽胞杆菌鉴定的菌落数；
- C2——第二稀释度（高稀释倍数）用于蜡样芽胞杆菌鉴定的菌落数；
- 1.1——计算系数（如果第二稀释度蜡样芽胞杆菌鉴定结果为 0，计算系数采用 1）；
- d——稀释因子（第一稀释度）。

9 结果与报告

9.1 根据 MYP 平板上蜡样芽胞杆菌的典型菌落数，按 8 中公式计算，报告每 g

(mL) 样品中蜡样芽胞杆菌菌数，以 CFU/g(mL) 表示；如 T 值为 0，则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

9.2 必要时报告蜡样芽胞杆菌生化分型结果。

第二法 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法

10 检验程序

蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法检验程序见图 2。

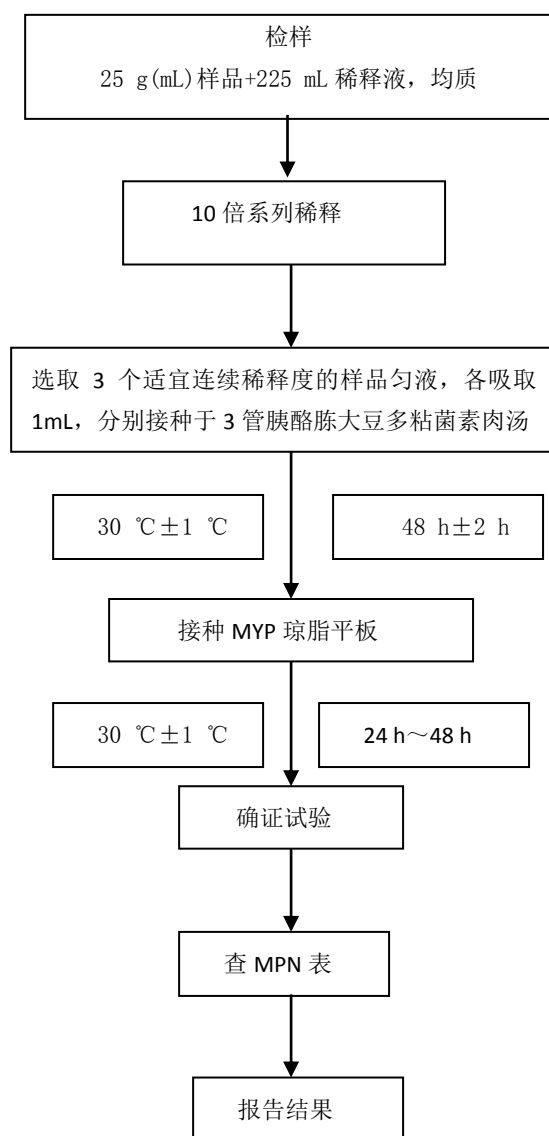


图 2 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法检验程序

11 操作步骤

11.1 样品处理

冷冻样品应在 45 °C 以下不超过 15 min 或在 2 °C~5 °C 不超过 18 h 解冻, 若不能及时检验, 应放于 -15 °C 左右保存; 非冷冻而易腐的样品应尽可能及时检验, 若不能及时检验, 应置于 2 °C~5 °C 冰箱保存, 24 h 内检验。

11.2 样品制备

称取样品 25 g, 放入盛有 225 mL PBS 或生理盐水的无菌均质杯内, 用旋转刀片式均质器以 8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min, 或放入盛有 225 mL PBS 或生理盐水的无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。若样品为液态, 吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL PBS 或生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)中, 振荡混匀, 作为 1:10 的样品匀液。

11.3 样品的稀释

吸取上述 1:10 的样品匀液 1 mL 加到装有 9 mL PBS 或生理盐水的稀释管中, 充分混匀制成 1:100 的样品匀液。根据对样品污染状况的估计, 按上述操作, 依次制成十倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次, 换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。

11.4 样品接种

取三个适宜连续稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液), 接种于 10 mL 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤中, 每一稀释度接种 3 管, 每管接种 1 mL (如果接种量需要超过 1 mL, 则用双料胰酪胨大豆多粘菌素肉汤)。于 30 °C ±1 °C 培养 48 h ±2 h。

11.5 培养

用接种环从各管中分别移取 1 环, 划线接种到 MYP 琼脂平板上, 30 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h。如果菌落不典型, 可继续培养 24 h ±2 h 再观察。

11.6 确证实验

从每个平板选取至少 5 个典型或可疑菌落, 划线接种于营养琼脂平板做纯培养, 30 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h, 进行确证实验, 见 6。

12 结果与报告

根据证实为蜡样芽胞杆菌阳性的试管管数, 查 MPN 检索表(见附录 B), 报告每 g (mL) 样品中蜡样芽胞杆菌的最可能数, 以 MPN/g (mL) 表示。

附录 A 培养基和试剂

A.1 磷酸盐缓冲液 (PBS)

A.1.1 成分

磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	34.0 g
蒸馏水	500.0 mL
pH 7.2	

A.1.2 制法

贮存液：称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中，用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2，用蒸馏水稀释至 1000 mL 后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液 1.25 mL，用蒸馏水稀释至 1000 mL，分装于适宜容器中，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 甘露醇卵黄多粘菌素(MYP)琼脂

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	1.0 g
甘露醇	10.0 g
氯化钠	10.0 g
琼脂	15.0 g
0.2 % 酚红溶液	13.0 mL
50 % 卵黄液	50.0 mL
多粘菌素B	100,000 IU
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.2±0.2	

A.2.2 制法

将前五种成分加入于蒸馏水中，加热溶解，校正 pH，加入酚红溶液。分装，每瓶 100 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂，冷却至 50 °C，每瓶加入 50% 卵黄液 5 mL 和浓度为 10000 IU 的多粘菌素 B 溶液 1 mL，混匀后倾注平板。

A.2.2.1 50 % 卵黄液

取鲜鸡蛋，用硬刷将蛋壳彻底洗净，沥干，于 70% 酒精溶液中浸泡 1 h。以无菌操作取

出卵黄，加入等量灭菌生理盐水，混匀后备用。

A.2.2.2 多粘菌素 B 溶液

在 50 mL 灭菌蒸馏水中溶解 500 000 IU 的无菌硫酸盐多粘菌素 B。

A.3 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤

A.3.1 成分

胰酪胨	17.0 g
植物胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
无水磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
多粘菌素B	100 IU/mL
蒸馏水	1 000.0 mL

pH 7.3±0.1

A.3.2 制法

将前五种成分加入于蒸馏水中，加热溶解，校正 pH，121℃ 高压灭菌 15 min。临用时加入多粘菌素 B 溶液混匀即可。多粘菌素 B 溶液制法同附录 A.2.2.2。

A.4 营养琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.4.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，用 15% 氢氧化钠溶液校正 pH 7.2±0.2。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装，121℃ 高压灭菌 15 min。

A.5 胰酪胨大豆羊血(TSSB)琼脂

A.5.1 成分

胰酪胨	15.0 g
-----	--------

大豆脲	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.2±0.2	

A.5.2 制法

将上述各成分于蒸馏水中加热溶解。校正 pH 后，分装烧瓶，每瓶 100 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。水浴中冷却至 45 °C~50 °C，加入 5 mL 无菌脱纤维羊血，混匀后倾注平板。

A.6 酪蛋白琼脂

A.6.1 成分

酪蛋白	10.0 g
牛肉粉	3.0 g
无水磷酸氢二钠	2.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1 000.0 mL
0.4 % 溴麝香草酚蓝溶液	12.5 mL
pH7.4±0.1	

A.6.2 制法

将除指示剂外的各成分于蒸馏水中加热溶解（但酪蛋白不会溶解）。校正 pH 后，加入指示剂，分装。121 °C 高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂，冷却至 45 °C~50 °C 后倾注平板。

A.6.3 试验方法

用接种环挑取可疑菌落，接种于酪蛋白琼脂培养基上，36 °C ±1 °C 培养 48 h ±2 h，阳性反应菌落周围培养基应出现澄清透明区（表示产生酪蛋白酶）。阴性反应时应继续培养 72 h 再观察。

A.7 动力培养基

A.7.1 成分

胰酪胨	10.0 g
-----	--------

酵母粉	2.5 g
葡萄糖	5.0 g
无水磷酸氢二钠	2.5 g
琼脂	3.0 g~5.0g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.0±0.2	

A.7.2 制法

将上述各成分于蒸馏水加热溶解并稀释至 1000 mL。校正 pH 后，分装，每管 2 mL~3 mL。115 °C 高压灭菌 20 min，备用。

A.7.3 试验方法

用接种针挑取培养物穿刺接种于动力培养基中，30 °C ±1 °C 培养 48 h ±2 h。蜡样芽胞杆菌应沿穿刺线呈扩散生长，而蕈状芽胞杆菌常常呈绒毛状生长，形成蜂巢状扩散。动力试验也可用悬滴法检查。蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌通常运动极为活泼，而炭疽杆菌则不运动。

A.8 V-P 培养基

A.8.1 成分

磷酸氢二钾	5.0 g
蛋白胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
氯化钠	5.0 g
pH 7.0±0.2	

A.8.2 制法

将上述各成分溶解于蒸馏水并稀释至 1000 mL。校正 pH 后分装试管，每管 1 mL。115 °C 高压灭菌 20 min，备用。

A.8.3 试验方法

用营养琼脂培养物接种于本培养基中，36 °C ±1 °C 培养 48 h~72 h。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，阳性反应立即或于数分钟内出现红色。如为阴性，应放在 36 °C ±1 °C 培养 4 h 再观察。

A.9 硝酸盐肉汤

A.9.1 成分

牛肉粉	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
硝酸钾	1.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.4	

A.9.2 制法

将上述各成分溶解于蒸馏水并稀释至 1000 mL。校正 pH 后分装试管，每管 5 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.9.3 硝酸盐还原试剂

甲液：将对氨基苯磺酸 0.8 g 溶解于 2.5 mol/L 乙酸溶液 100 mL 中。

乙液：将甲萘胺 0.5 g 溶解于 2.5 mol/L 乙酸溶液 100 mL 中。

A.9.4 试验方法

接种后在 36 °C ±1 °C 培养 24 h~72 h。加甲液和乙液各 1 滴，观察结果，阳性反应立即或数分钟内显红色。如为阴性，可再加入锌粉少许，如出现红色，表示硝酸盐未被还原，为阴性。反之，则表示硝酸盐已被还原，为阳性。

A.10 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.10.1 成分

氯化钠	5.0 g
硫酸镁 (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)	0.2 g
硫酸二氢钠	1.0 g
柠檬酸钠	1.0 g
琼脂	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
0.2 % 溴麝香草酚蓝溶液	40.0 mL
pH 7.1 ± 0.1	

A.10.2 制法

先将盐类溶解于蒸馏水内，校正 pH，再加琼脂，加热溶化。然后加入指示剂，混合均匀后分装试管，121 °C 高压灭菌 15 min。制成斜面。

A.10.3 试验方法

挑取少量琼脂培养物接种于西蒙氏柠檬酸盐培养基，36 °C ±1 °C 培养 72 h。每天观察结果，

阳性者斜面上有菌落生长，培养基从绿色转为蓝色。

A.11 明胶培养基

A.11.1 成分

蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	3.0 g
明胶	120.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.11.2 制法

将上述成分混合，置流动蒸汽灭菌器内，加热溶解，校正 pH 至 7.0~7.2，用绒布过滤。分装试管，121 °C 高压灭菌 15 min，备用。

A.11.3 试验方法

挑取可疑菌落接种于明胶培养基，36 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h，取出，2 °C ~8 °C 放置 30 min，取出，观察明胶液化情况。

A.12 糖发酵管

A.12.1 成分

牛肉粉	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	2.0 g
0.2 % 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.2 ±0.2	

A.12.2 制法

A.12.2.1 葡萄糖发酵管按上述成分配好后，按 0.5 % 加入葡萄糖，分装于一个有倒置小管的小试管内，115 °C 高压灭菌 15 min。

A.12.2.2 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 115 °C 高压灭菌 15 min。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。

注：蔗糖不纯，加热后会自行水解者，应采用过滤法除菌。

A.12.3 试验方法

挑取可疑菌落接种于葡萄糖发酵管中，厌氧条件下 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。培养基由红色变为黄色者表明该菌在厌氧条件下能发酵葡萄糖。

A.13 溶菌酶营养肉汤

A.13.1 成分

牛肉粉	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
0.1%溶菌酶溶液	10.0 mL
pH 6.8 ± 0.1	

A.13.2 制法

将上述成分（溶菌酶溶液除外）溶解于蒸馏水并稀释至 1000 mL。校准 pH 后，分装于，每瓶 99 mL。121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。每瓶加入 0.1 %溶菌酶溶液 1 mL，混匀后分装灭菌试管，每管 2.5 mL。

A.13.2.1 0.1%溶菌酶溶液配制

在 65mL 灭菌的 0.1 mol/L 盐酸中加入 0.1 g 溶菌酶，隔水煮沸 20 min 溶解后，再用灭菌的 0.1 mol/L 盐酸稀释至 100 mL。或者称取 0.1g 溶菌酶溶于 100mL 的无菌蒸馏水后，用孔径为 0.45 μm 硝酸纤维膜过滤。使用前测试是否无菌。

A.13.3 试验方法

用接种环取纯菌悬液一环，接种于溶菌酶肉汤中， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。蜡样芽胞杆菌在本培养基(含 0.001 %溶菌酶)中能生长。如出现阴性反应，应继续培养 24 h。

A.14 过氧化氢酶溶液

A.14.1 试剂

3%过氧化氢溶液：临用时配制，用 H_2O_2 配制。

A.14.2 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.14.3 结果

于半分钟内发生气泡者为阳性，不发生气泡者为阴性。

附录 B 最可能数 (MPN) 检索表

每g(mL)检样中蜡样芽胞杆菌最可能数 (MPN) 的检索见表B.1。

表B.1 蜡样芽胞杆菌最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95% 置信区间		阳性管数			MPN	95% 置信区间	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 0.001 g(mL)]、每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 g (mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)、0.0001 g(mL)时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

九、沙门氏菌检验标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.4-2016 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》

2 适用范围

本程序规定了食品中沙门氏菌 (*Salmonella*) 的检验方法。

本程序适用于食品中沙门氏菌的检验。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外, 其他设备和材料如下:

- 3.1 冰箱: 2 °C ~ 5 °C。
- 3.2 恒温培养箱: 36 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C。
- 3.3 均质器。
- 3.4 振荡器。
- 3.5 电子天平: 感量 0.1 g。
- 3.6 无菌锥形瓶: 容量 500 mL, 250 mL。
- 3.7 无菌吸管: 1 mL (具 0.01 mL 刻度)、10 mL (具 0.1 mL 刻度) 或微量移液器及吸头。
- 3.8 无菌培养皿: 直径 90 mm。
- 3.9 无菌试管: 3 mm × 50 mm、10 mm × 75 mm。
- 3.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 3.11 全自动微生物生化鉴定系统。
- 3.12 无菌毛细管。

4 培养基和试剂

- 4.1 缓冲蛋白胨水 (BPW): 见附录 A 中 A.1。
- 4.2 四硫磺酸钠煌绿 (TTB) 增菌液: 见附录 A 中 A.2。
- 4.3 亚硒酸盐胱氨酸 (SC) 增菌液: 见附录 A 中 A.3。
- 4.4 亚硫酸铋 (BS) 琼脂: 见附录 A 中 A.4。
- 4.5 HE 琼脂: 见附录 A 中 A.5。
- 4.6 木糖赖氨酸脱氧胆盐 (XLD) 琼脂: 见附录 A 中 A.6。
- 4.7 沙门氏菌属显色培养基。

- 4.8 三糖铁 (TSI) 琼脂: 见附录 A 中 A.7。
- 4.9 蛋白胨水、靛基质试剂: 见附录 A 中 A.8。
- 4.10 尿素琼脂 (pH 7.2): 见附录 A 中 A.9。
- 4.11 氰化钾 (KCN) 培养基: 见附录 A 中 A.10。
- 4.12 赖氨酸脱羧酶试验培养基: 见附录 A 中 A.11。
- 4.13 糖发酵管: 见附录 A 中 A.12。
- 4.14 邻硝基酚 β -D 半乳糖苷 (ONPG) 培养基: 见附录 A 中 A.13。
- 4.15 半固体琼脂: 见附录 A 中 A.14。
- 4.16 丙二酸钠培养基: 见附录 A 中 A.15。
- 4.17 沙门氏菌 O 和 H 诊断血清。
- 4.18 生化鉴定试剂盒。

第一法 定性检验

5 检验程序

沙门氏菌检验程序见图 1。

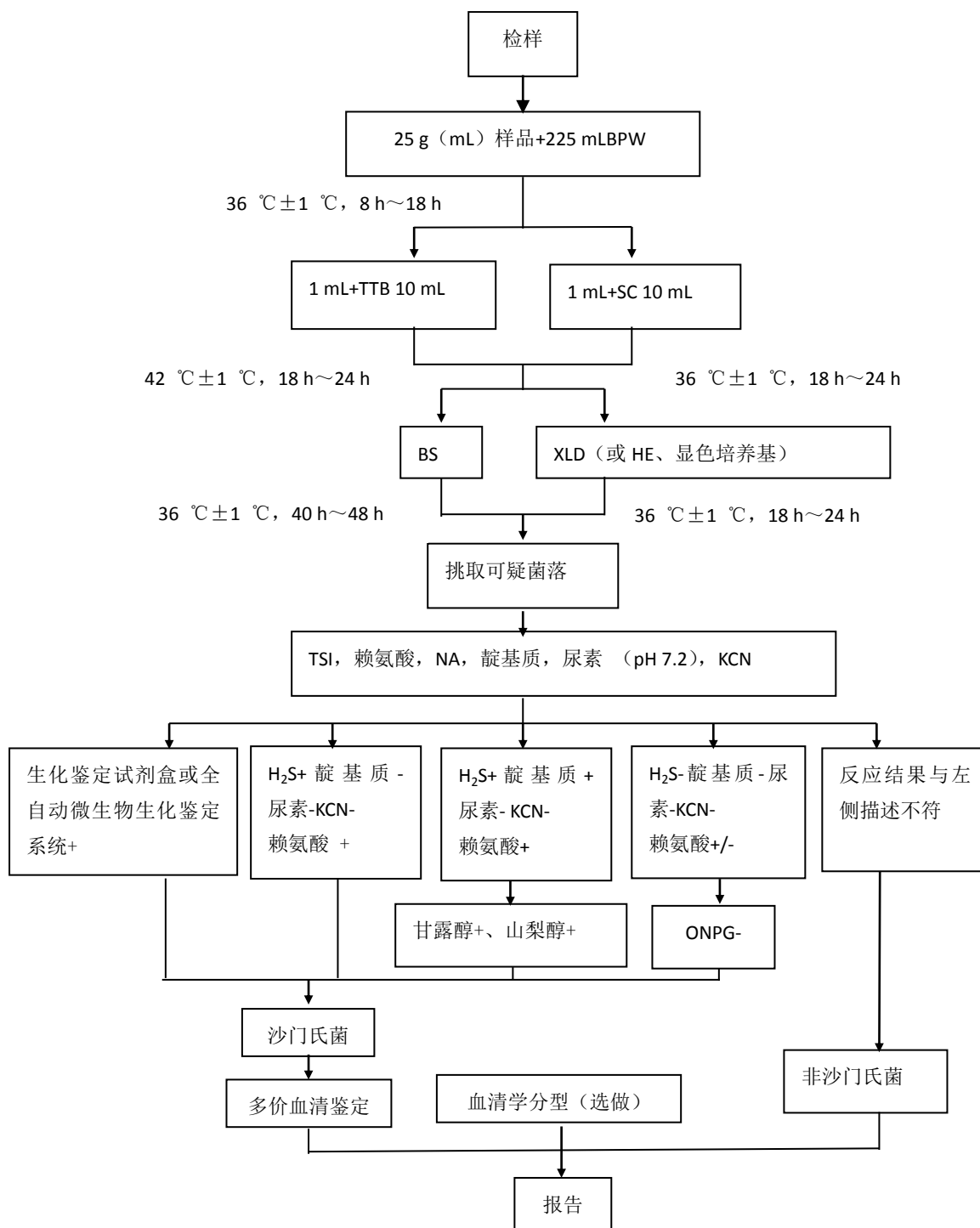


图 1 沙门氏菌检验程序

6 操作步骤

6.1 前增菌

称取 25 g(mL)样品放入盛有 225 mL BPW 的无菌均质杯中,以 8 000 r/min~

10 000 r/min 均质 1 min~2 min, 或置于盛有 225 mL BPW 的无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。若样品为液态, 不需要均质, 振荡混匀。如需要, 测定 pH 值, 用 1 mol/mL 无菌 NaOH 或 HCl 调 pH 至 6.8 ± 0.2 。无菌操作将样品转至 500 mL 锥形瓶中, 如使用均质袋, 可直接进行培养, 于 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 8 h~18h。

如为冷冻产品, 应在 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下不超过 15 min, 或 $2 \text{ }^\circ\text{C} \sim 5 \text{ }^\circ\text{C}$ 不超过 18 h 解冻。

6.2 增菌

轻轻摇动培养过的样品混合物, 移取 1 mL, 转种于 10 mL TTB 内, 于 $42 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 18 h~24 h。同时, 另取 1 mL, 转种于 10 mL SC 内, 于 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

6.3 分离

分别用接种环取增菌液 1 环, 划线接种于一个 BS 琼脂平板和一个 XLD 琼脂平板 (或 HE 琼脂平板或沙门氏菌属显色培养基平板)。于 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 分别培养 18 h~24 h (XLD 琼脂平板、HE 琼脂平板、沙门氏菌属显色培养基平板) 或 40 h~48 h (BS 琼脂平板), 观察各个平板上生长的菌落, 各个平板上的菌落特征见表 1。

表 1 沙门氏菌属在不同选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	沙门氏菌
BS 琼脂	菌落为黑色有金属光泽、棕褐色或灰色, 菌落周围培养基可呈黑色或棕色; 有些菌株形成灰绿色的菌落, 周围培养基不变。
HE 琼脂	蓝绿色或蓝色, 多数菌落中心黑色或几乎全黑色; 有些菌株为黄色, 中心黑色或几乎全黑色。
XLD 琼脂	菌落呈粉红色, 带或不带黑色中心, 有些菌株可呈现大的带光泽的黑色中心, 或呈现全部黑色的菌落; 有些菌株为黄色菌落, 带或不带黑色中心。
沙门氏菌属显色培养基	按照显色培养基的说明进行判定。

6.4 生化试验

6.4.1 自选择性琼脂平板上分别挑取 2 个以上典型或可疑菌落, 接种三糖铁琼脂, 先在斜面划线, 再于底层穿刺; 接种针不要灭菌, 直接接种赖氨酸脱羧酶试验培养基和营养琼脂平板, 于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{ h} \sim 24\text{ h}$, 必要时可延长至 48 h 。在三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基内, 沙门氏菌属的反应结果见表 2。

表 2 沙门氏菌属在三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基内的反应结果

三糖铁琼脂				赖氨酸脱羧酶试验培养基	初步判断
斜面	底层	产气	硫化氢		
K	A	+ (-)	+ (-)	+	可疑沙门氏菌属
K	A	+ (-)	+ (-)	-	可疑沙门氏菌属
A	A	+ (-)	+ (-)	+	可疑沙门氏菌属
A	A	+/-	+/-	-	非沙门氏菌
K	K	+/-	+/-	+/-	非沙门氏菌

注: K:产碱, A: 产酸; +: 阳性, -: 阴性; + (-): 多数阳性, 少数阴性; +/-: 阳性或阴性。

6.4.2 接种三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基的同时, 可直接接种蛋白胨水 (供做靛基质试验)、尿素琼脂 ($\text{pH}7.2$)、氰化钾 (KCN) 培养基, 也可在初步判断结果后从营养琼脂平板上挑取可疑菌落接种。于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{ h} \sim 24\text{ h}$, 必要时可延长至 48 h , 按表 3 判定结果。将已挑菌落的平板储存于 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或室温至少保留 24 h , 以备必要时复查。

表 3 沙门氏菌属生化反应初步鉴别表

反应序号	硫化氢 (H_2S)	靛基质	$\text{pH}7.2$ 尿素	氰化钾 (KCN)	赖氨酸脱羧酶
A1	+	-	-	-	+
A2	+	+	-	-	+
A3	-	-	-	-	+/-

注: + 阳性; - 阴性; +/- 阳性或阴性。

6.4.2.1 反应序号 A1: 典型反应判定为沙门氏菌属。如尿素、KCN 和赖氨酸脱羧酶 3 项中有 1 项异常, 按表 4 可判定为沙门氏菌。如有 2 项异常为非沙门氏菌。

表 4 沙门氏菌属生化反应初步鉴别表

pH 7.2 尿素	氰化钾 (KCN)	赖氨酸脱羧酶	判定结果
—	—	—	甲型副伤寒沙门氏菌 (要求血清学鉴定结果)
—	+	+	沙门氏菌 IV 或 V (要求符合本群生化特性)
+	—	+	沙门氏菌个别变体 (要求血清学鉴定结果)

注: + 表示阳性; — 表示阴性。

6.4.2.2 反应序号 A2: 补做甘露醇和山梨醇试验, 沙门氏菌靛基质阳性变体两项试验结果均为阳性, 但需要结合血清学鉴定结果进行判定。

6.4.2.3 反应序号 A3: 补做 ONPG。ONPG 阴性为沙门氏菌, 同时赖氨酸脱羧酶阳性, 甲型副伤寒沙门氏菌为赖氨酸脱羧酶阴性。

6.4.2.4 必要时按表 5 进行沙门氏菌生化群的鉴别。

表 5 沙门氏菌属各生化群的鉴别

项目	I	II	III	IV	V	VI
卫矛醇	+	+	—	—	+	—
山梨醇	+	+	+	+	+	—
水杨苷	—	—	—	+	—	—
ONPG	—	—	+	—	+	—
丙二酸盐	—	+	+	—	—	—
KCN	—	—	—	+	+	—

注: + 表示阳性; — 表示阴性。

6.4.3 如选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统, 可根据 6.4.1 的初步判断结果, 从营养琼脂平板上挑取可疑菌落, 用生理盐水制备成浊度适当的菌

悬液，使用生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。

6.5 血清学鉴定

6.5.1 检查培养物有无自凝性

一般采用 1.2%~1.5% 琼脂培养物作为玻片凝集试验用的抗原。

首先排除自凝集反应，在洁净的玻片上滴加一滴生理盐水，将待试培养物混合于生理盐水滴内，使成为均一性的混浊悬液，将玻片轻轻摇动 30s~60s，在黑色背景下观察反应(必要时用放大镜观察)，若出现可见的菌体凝集，即认为有自凝性，反之无自凝性。对无自凝的培养物参照下面方法进行血清学鉴定。

6.5.2 多价菌体抗原 (O) 鉴定

在玻片上划出 2 个约 1 cm×2 cm 的区域，挑取 1 环待测菌，各放 1/2 环于玻片上的每一区域上部，在其中一个区域下部加 1 滴多价菌体 (O) 抗血清，在另一区域下部加入 1 滴生理盐水，作为对照。再用无菌的接种环或针分别将两个区域内的菌落研成乳状液。将玻片倾斜摇动混合 1 min，并对着黑暗背景进行观察，任何程度的凝集现象皆为阳性反应。O 血清不凝集时，将菌株接种在琼脂量较高的 (如 2%~3%) 培养基上再检查；如果是由于 Vi 抗原的存在而阻止了 O 凝集反应时，可挑取菌苔于 1 mL 生理盐水中做成浓菌液，于酒精灯火焰上煮沸后再检查。

6.5.3 多价鞭毛抗原 (H) 鉴定

同 6.5.2。H 抗原发育不良时，将菌株接种在 0.55%~0.65% 半固体琼脂平板的中央，待菌落蔓延生长时，在其边缘部分取菌检查；或将菌株通过装有 0.3%~0.4% 半固体琼脂的小玻管 1 次~2 次，自远端取菌培养后再检查。

6.5.4 血清学分型 (选做项目)

6.5.4.1 O 抗原的鉴定

用 A~F 多价 O 血清做玻片凝集试验，同时用生理盐水做对照。在生理盐水中自凝者为粗糙形菌株，不能分型。

被 A~F 多价 O 血清凝集者，依次用 O4；O3、O10；O7；O8；O9；O2 和 O11 因子血清做凝集试验。根据试验结果，判定 O 群。被 O3、10 血清凝集的菌株，再用 O10、O15、O34、O19 单因子血清做凝集试验，判定 E1、E2、E3、E4 各亚群，每一个 O 抗原成分的最后确定均应根据 O 单因子血清的检查结果，没

有 O 单因子血清的要用两个 O 复合因子血清进行核对。

不被 A~F 多价 O 血清凝集者，先用 9 种多价 O 血清检查，如有其中一种血清凝集，则用这种血清所包括的 O 群血清逐一检查，以确定 O 群。每种多价 O 血清所包括的 O 因子如下：

O 多价 1 A, B, C, D, E, F, 群（并包括 6,14 群）

O 多价 2 13, 16, 17, 18, 21 群

O 多价 3 28, 30, 35, 38, 39 群

O 多价 4 40, 41, 42, 43 群

O 多价 5 44, 45, 47, 48 群

O 多价 6 50, 51, 52, 53 群

O 多价 7 55, 56, 57, 58 群

O 多价 8 59, 60, 61, 62 群

O 多价 9 63, 65, 66, 67 群

6.5.4.2 H 抗原的鉴定

属于 A~F 各 O 群的常见菌型，依次用表 6 所述 H 因子血清检查第 1 相和第 2 相的 H 抗原。

表 6 A~F 群常见菌型 H 抗原表

O 群	第 1 相	第 2 相
A	a	无
B	g,f,s	无
B	i,b,d	2
C1	k,v,r,c	5,Z15
C2	b,d,r	2,5
D（不产气的）	d	无
D（产气的）	g,m,p,q	无
E1	h,v	6,w,x
E4	g,s,t	无
E4	i	

不常见的菌型，先用 8 种多价 H 血清检查，如有其中一种或两种血清凝集，则再用这一种或两种血清所包括的各种 H 因子血清逐一检查，以第 1 相和第 2 项的 H 抗原。8 种多价 H 血清所包括的 H 因子如下：

H 多价 1 a, b, c, d, i

H 多价 2 eh, enx, enz₁₅, fg, gms, gpu, gp, gq, mt, gz₅₁

H 多价 3 k, r, y, z, z₁₀, lv, lw, lz₁₃, lz₂₈, lz₄₀

H 多价 4 1,2; 1,5; 1,6; 1,7; z₆

H 多价 5 z₄z₂₃, z₄z₂₄, z₄z₃₂, z₂₉, z₃₅, z₃₆, z₃₈

H 多价 6 z₃₉, z₄₁, z₄₂, z₄₄

H 多价 7 z₅₂, z₅₃, z₅₄, z₅₅

H 多价 8 z₅₆, z₅₇, z₆₀, z₆₁, z₆₂

每一个 H 抗原成分的最后确定均应根据 H 单因子血清的检查结果，没有 H 单因子血清的要用两个 H 复合因子血清进行核对。

检出第 1 相 H 抗原而未检出第 2 相 H 抗原的或检出第 2 相 H 抗原而未检出第 1 相 H 抗原的，可在琼脂斜面上移种 1~2 代后再检查。如仍只检出一个相的 H 抗原，要用位相变异的方法检查其另一个相。单相菌不必做位相变异检查。

位相变异试验方法如下：

小玻管法：将半固体管（每管约 1 mL~2 mL）在酒精灯上溶化并冷至 50 °C，取已知相的 H 因子血清 0.05 mL~0.1 mL，加入于溶化的半固体内，混匀后，用毛细吸管吸取分装于供位相变异试验的小玻管内，俟凝固后，用接种针挑取待检菌，接种于一端。将小玻管平放在平皿内，并在其旁放一团湿棉花，以防琼脂中水分蒸发而干缩，每天检查结果，待另一相细菌解离后，可以从另一端挑取细菌进行检查。培养基内血清的浓度应有适当的比例，过高时细菌不能生长，过低时同一相细菌的动力不能抑制。一般按原血清 1: 200~1: 800 的量加入。

小倒管法：将两端开口的小玻管（下端开口要留一个缺口，不要平齐）放在半固体管内，小玻管的上端应高出于培养基的表面，灭菌后备用。临用时在酒精灯上加热溶化，冷至 50 °C，挑取因子血清 1 环，加入小套管中的半固体内，略加搅动，使其混匀，俟凝固后，将待检菌株接种于小套管中的半固体表层内，每天检查结果，待另一相细菌解离后，可从套管外的半固体表面取菌检查，或转

种 1% 软琼脂斜面，于 37 °C 培养后再做凝集试验。

简易平板法：将 0.35~0.4% 半固体琼脂平板烘干表面水分，挑取因子血清 1 环，滴在半固体平板表面，放置片刻，待血清吸收到琼脂内，在血清部位的中央点种待检菌株，培养后，在形成蔓延生长的菌苔边缘取菌检查。

6.5.4.3 Vi 抗原的鉴定

用 Vi 因子血清检查。已知具有 Vi 抗原的菌型有：伤寒沙门氏菌，丙型副伤寒沙门氏菌，都柏林沙门氏菌。

6.5.4.4 菌型的判定

根据血清学分型鉴定的结果，按照附录 B 或有关沙门氏菌属抗原表判定菌型。

7 结果与报告

综合以上生化试验和血清学鉴定的结果，报告 25 g (mL) 样品中检出或未检出沙门氏菌。

第二法 MPN 计数法

8 定量检测

8.1 基于“三管”MPN 法，取检样 25g (mL) 加入装有 225mL 缓冲蛋白胨水中，均质制成 1:10 稀释液，用灭菌吸管吸取 1:10 稀释液 1 mL，注入含有 9 mLBPW 的试管内，振摇试管混匀，制备 1:100 的稀释液。

8.2 另取 1 mL 灭菌吸管，按上条操作依次制备 10 倍递增稀释液，每递增稀释一次，换用 1 支 1 mL 灭菌吸管。

8.3 根据对检样污染情况的估计，选择三个连续的适宜稀释度，每个稀释度接种 3 支含有 9mL BPW 的试管，每管接种 1 mL。置 36 °C ±1 °C 恒温箱内，培养 8 h~18 h。分别移取 1mL 转种于 10mLTTB，42°C ±1°C 培养 18h~24h。

8.4 分离、鉴定方法同第一法。

9 结果报告

根据证实为沙门氏菌阳性的试管管数，查 MPN 检索表（附录 C），报告每 g (mL) 样品中沙门氏菌的 MPN 值。

附录 A 培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水 (BPW)

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠 (含 12 个结晶水)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.2±0.2

A.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中, 搅混均匀, 静置约 10 min, 煮沸溶解, 调节 pH, 高压灭菌 121 °C, 15 min。

A.2 四硫磺酸钠煌绿 (TTB) 增菌液

A.2.1 基础液

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	3.0 g
碳酸钙	45.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.0±0.2

除碳酸钙外, 将各成分加入蒸馏水中, 煮沸溶解, 再加入碳酸钙, 调节 pH, 高压灭菌 121 °C, 20 min。

A.2.2 硫代硫酸钠溶液

硫代硫酸钠 (含 5 个结晶水)	50.0 g
蒸馏水	加至 100 mL

高压灭菌 121 °C, 20 min。

A.2.3 碘溶液

碘片	20.0 g
碘化钾	25.0 g

蒸馏水 加至 100 mL

将碘化钾充分溶解于少量的蒸馏水中，再投入碘片，振摇玻瓶至碘片全部溶解为止，然后加蒸馏水至规定的总量，贮存于棕色瓶内，塞紧瓶盖备用。

A.2.4 0.5% 煌绿水溶液

煌绿 0.5 g

蒸馏水 100 mL

溶解后，存放暗处，不少于 1d，使其自然灭菌。

A.2.5 牛胆盐溶液

牛胆盐 10.0 g

蒸馏水 100 mL

加热煮沸至完全溶解，高压灭菌 121 °C，20 min。

A.2.6 制法

基础液 900 mL

硫代硫酸钠溶液 100 mL

碘溶液 20.0 mL

煌绿水溶液 2.0 mL

牛胆盐溶液 50.0 mL

临用前，按上列顺序，以无菌操作依次加入基础液中，每加入一种成分，均应摇匀后再加入另一种成分。

A.3 亚硒酸盐胱氨酸（SC）增菌液

A.3.1 成分

蛋白胨 5.0 g

乳糖 4.0 g

磷酸氢二钠 10.0 g

亚硒酸氢钠 4.0 g

L-胱氨酸 0.01 g

蒸馏水 1 000 mL

pH 7.0±0.2

A.3.2 制法

除亚硒酸氢钠和 L-胱氨酸外，将各成分加入蒸馏水中，煮沸溶解，冷至 55 °C 以下，以

无菌操作加入亚硒酸氢钠和 1 g / L L-胱氨酸溶液 10 mL (称取 0.1 g L-胱氨酸, 加 1 mol / L 氢氧化钠溶液 15 mL, 使溶解, 再加无菌蒸馏水至 100 mL 即成, 如为 DL-胱氨酸, 用量应加倍)。摇匀, 调节 pH。

A.4 亚硫酸铋 (BS) 琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
硫酸亚铁	0.3 g
磷酸氢二钠	4.0 g
煌绿	0.025 g 或 5.0g / L 水溶液 5.0mL
柠檬酸铋铵	2.0 g
亚硫酸钠	6.0 g
琼脂	18.0 g~20g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.5±0.2

A.4.2 制法

将前三种成分加入 300 mL 蒸馏水 (制作基础液), 硫酸亚铁和磷酸氢二钠分别加入 20 mL 和 30 mL 蒸馏水中, 柠檬酸铋铵和亚硫酸钠分别加入另一 20 mL 和 30 mL 蒸馏水中, 琼脂加入 600 mL 蒸馏水中。然后分别搅拌均匀, 煮沸溶解。冷至 80 °C 左右时, 先将硫酸亚铁和磷酸氢二钠混匀, 倒入基础液中, 混匀。将柠檬酸铋铵和亚硫酸钠混匀, 倒入基础液中, 再混匀。调节 pH, 随即倾入琼脂液中, 混合均匀, 冷至 50 °C~55 °C。加入煌绿溶液, 充分混匀后立即倾注平皿。

注:本培养基不需要高压灭菌, 在制备过程中不宜过分加热, 避免降低其选择性, 贮于室温暗处, 超过 48 h 会降低其选择性, 本培养基宜于当天制备, 第二天使用。

A.5 HE 琼脂 (Hektoen Enteric Agar)

A.5.1 成分

蛋白胨	12.0 g
牛肉膏	3.0 g

乳糖	12.0 g
蔗糖	12.0 g
水杨素	2.0 g
胆盐	20.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	18.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL
0.4% 溴麝香草酚蓝溶液	16.0 mL
Andrade 指示剂	20.0 mL
甲液	20.0 mL
乙液	20.0 mL

pH 7.5±0.2

A.5.2 制法

将前面七种成分溶解于 400 mL 蒸馏水内作为基础液；将琼脂加入于 600 mL 蒸馏水内。然后分别搅拌均匀，煮沸溶解。加入甲液和乙液于基础液内，调节 pH。再加入指示剂，并与琼脂液合并，待冷至 50 °C~55 °C 倾注平皿。

注：①本培养基不需要高压灭菌，在制备过程中不宜过分加热，避免降低其选择性。

②甲液的配制

硫代硫酸钠	34.0 g
柠檬酸铁铵	4.0 g
蒸馏水	100 mL

③乙液的配制

去氧胆酸钠	10.0 g
蒸馏水	100 mL

④ Andrade 指示剂

酸性复红	0.5 g
1mol/L 氢氧化钠溶液	16.0 mL
蒸馏水	100 mL

将复红溶解于蒸馏水中，加入氢氧化钠溶液。数小时后如复红褪色不全，再加氢氧化钠溶液 1 mL~2 mL。

A.6 木糖赖氨酸脱氧胆盐（XLD）琼脂

A.6.1 成分

酵母膏	3.0 g
L-赖氨酸	5.0 g
木糖	3.75 g
乳糖	7.5 g
蔗糖	7.5 g
去氧胆酸钠	2.5 g
柠檬酸铁铵	0.8 g
硫代硫酸钠	6.8 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
酚红	0.08 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.4±0.2

A.6.2 制法

除酚红和琼脂外，将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中，煮沸溶解，调节 pH。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中，煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后，再加入指示剂，待冷至 50 °C~55 °C 倾注平皿。

注：本培养基不需要高压灭菌，在制备过程中不宜过分加热，避免降低其选择性，贮于室温暗处。本培养基宜于当天制备，第二天使用。

A.7 三糖铁（TSI）琼脂

A.7.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁铵（含 6 个结晶水）	0.2 g

酚 红	0.025 g 或 5.0 g / L 溶液 5.0 mL
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼 脂	12.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4±0.2	

A.7.2 制法

除酚红和琼脂外，将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中，煮沸溶解，调节 pH。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中，煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后，再加入指示剂，混匀，分装试管，每管约 2 mL~4 mL，高压灭菌 121 °C 10 min 或 115 °C 15 min，灭菌后置成高层斜面，呈桔红色。

A.8 蛋白胨水、靛基质试剂

A.8.1 蛋白胨水

蛋白胨（或胰蛋白胨）	20.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4±0.2	

将上述成分加入蒸馏水中，煮沸溶解，调节 pH，分装小试管，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.8.2 靛基质试剂

A.8.2.1 柯凡克试剂:将 5 g 对二甲氨基甲醛溶解于 75 mL 戊醇中，然后缓慢加入浓盐酸 25 mL。

A.8.2.2 欧-波试剂:将 1 g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 95 mL 95% 乙醇内。然后缓慢加入浓盐酸 20 mL。

A.8.3 试验方法

挑取少量培养物接种，在 36 °C ±1 °C 培养 1 d~2 d，必要时可培养 4 d~5 d。加入柯凡克试剂约 0.5 mL，轻摇试管，阳性者于试剂层呈深红色；或加入欧-波试剂约 0.5 mL，沿管壁流下，覆盖于培养液表面，阳性者于液面接触处呈玫瑰红色。

注:蛋白胨中应含有丰富的色氨酸。每批蛋白胨买来后，应先用已知菌种鉴定后方可使用。

A.9 尿素琼脂（pH 7.2）

A.9.1 成分

蛋白胨	1.0 g
氯化钠	5.0 g
葡萄糖	1.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
0.4%酚红	3.0 mL
琼脂	20.0 g
蒸馏水	900 mL
20%尿素溶液	100 mL
pH7.2±0.2	

A.9.2 制法

除酚红和尿素外的其它成分加热溶解，冷却至 25 ℃左右校正 pH 至 7.2±0.1，加入酚红指示剂，混匀，于 121 ℃灭菌 15 min。冷至约 55 ℃，加入用 0.22 μm 过滤膜除菌后的 20% 尿素水溶液 100 mL，混匀，以无菌操作分装灭菌试管，制成斜面后放冰箱备用。

A.9.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种，在 36 ℃±1 ℃培养 24 h，观察结果。尿素酶阳性者由于产碱而使培养基变为红色。

A.10 氰化钾（KCN）培养基

A.10.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	0.225 g
磷酸氢二钠	5.64 g
蒸馏水	1 000 mL
0.5%氰化钾	20.0 mL

A.10.2 制法

将除氰化钾以外的成分加入蒸馏水中，煮沸溶解，分装后 121 ℃高压灭菌 15 min。放在冰箱内使其充分冷却。每 100 mL 培养基加入 0.5%氰化钾溶液 2.0 mL（最后浓度为 1:10 000），分装于无菌试管内，每管约 4 mL，立刻用无菌橡皮塞塞紧，放在 4 ℃冰箱内，至少可保存两个月。同时，将不加氰化钾的培养基作为对照培养基，分装试管备用。

A.10.3 试验方法

将琼脂培养物接种于蛋白胨水内成为稀释菌液，挑取 1 环接种于氰化钾（KCN）培养基。并另挑取 1 环接种于对照培养基。在 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1 d~2 d，观察结果。如有细菌生长即为阳性（不抑制），经 2 d 细菌不生长为阴性（抑制）。

注：氰化钾是剧毒药，使用时应小心，切勿沾染，以免中毒。夏天分装培养基应在冰箱内进行。试验失败的主要原因是封口不严，氰化钾逐渐分解，产生氢氰酸气体逸出，以致药物浓度降低，细菌生长，因而造成假阳性反应。试验时对每一环节都要特别注意。

A.11 赖氨酸脱羧酶试验培养基

A.11.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
蒸馏水	1000 mL
1.6% 溴甲酚紫-乙醇溶液	1.0 mL
L-赖氨酸或 DL-赖氨酸	0.5 g/100 mL 或 1.0 g/100 mL
pH 6.8±0.2	

A.11.2 制法

除赖氨酸以外的成分加热溶解后，分装每瓶 100 mL，分别加入赖氨酸。L-赖氨酸按 0.5% 加入，DL-赖氨酸按 1% 加入。调节 pH。对照培养基不加赖氨酸。分装于无菌的小试管内，每管 0.5 mL，上面滴加一层液体石蜡， $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 10 min。

A.11.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种，于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h，观察结果。氨基酸脱羧酶阳性者由于产碱，培养基应呈紫色。阴性者无碱性产物，但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管应为黄色。

A.12 糖发酵管

A.12.1 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（含 12 个结晶水）	2.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4±0.2	

A.12.2 制法

A.12.2.1 葡萄糖发酵管按上述成分配好后，调节 pH。按 0.5% 加入葡萄糖，分装于有一个倒置小管的小试管内，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.12.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后，分装每瓶 100 mL，121 °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。

注：蔗糖不纯，加热后会自行水解者，应采用过滤法除菌。

A.12.3 试验方法：从琼脂斜面上挑取少量培养物接种，于 36 °C ±1 °C 培养，一般 2 d~3 d。迟缓反应需观察 14 d~30 d。

A.13 ONPG 培养基

A.13.1 成分

邻硝基酚 β-D 半乳糖苷（ONPG） （O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside）	60.0 mg
0.01mol/L 磷酸钠缓冲液（pH7.5）	10.0 mL
1% 蛋白胨水（pH7.5）	30.0 mL

A.13.2 制法

将 ONPG 溶于缓冲液内，加入蛋白胨水，以过滤法除菌，分装于无菌的小试管内，每管 0.5 mL，用橡皮塞塞紧。

A.13.3 试验方法

自琼脂斜面上挑取培养物 1 满环接种于 36 °C ±1 °C 培养 1 h~3 h 和 24 h 观察结果。如果 β-半乳糖苷酶产生，则于 1 h~3 h 变黄色，如无此酶则 24 h 不变色。

A.14 半固体琼脂

A.14.1 成分

牛肉膏	0.3 g
蛋白胨	1.0 g

氯化钠	0.5 g
琼脂	0.35g~0.4 g
蒸馏水	100 mL
pH 7.4±0.2	

A.14.2 制法

按以上成分配好，煮沸溶解，调节 pH。分装小试管。121 °C 高压灭菌 15 min。直立凝固备用。

注:供动力观察、菌种保存、H 抗原位相变异试验等用。

A.15 丙二酸钠培养基

A.15.1 成分

酵母浸膏	1.0 g
硫酸铵	2.0 g
磷酸氢二钾	0.6 g
磷酸二氢钾	0.4 g
氯化钠	2.0 g
丙二酸钠	3.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.8±0.2	

A.15.2 制法

除指示剂以外的成分溶解于水，调节 pH，再加入指示剂，分装试管，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.15.3 试验方法

用新鲜的琼脂培养物接种，于 36 °C ±1 °C 培养 48 h，观察结果。阳性者由绿色变为蓝色。

附录 B 常见沙门氏菌抗原

表 B.1 常见沙门氏菌抗原表

菌 名	拉丁菌名	O 抗 原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相

菌名	拉丁菌名	O 抗原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
A 群				
甲型副伤寒沙门氏菌	<i>S. paratyphi A</i>	1, 2, 12	a	[1,5]
B 群				
基桑加尼沙门氏菌	<i>S. kisingani</i>	1,4,[5],12	a	1,2
阿雷查瓦莱塔沙门氏菌	<i>S. arechavaleta</i>	4,[5],12	a	1,7
马流产沙门氏菌	<i>S. abortusequi</i>	4,12	-	e,n,x,
乙型副伤寒沙门氏菌	<i>S. paratyphi B</i>	1,4,[5],12	b	1,2
利密特沙门氏菌	<i>S. limete</i>	1,4,12,[27]	b	1,5
阿邦尼沙门氏菌	<i>S. abony</i>	1,4,[5],12,27	b	e,n,x
维也纳沙门氏菌	<i>S. wien</i>	1,4,12,[27]	b	1,w
伯里沙门氏菌	<i>S. bury</i>	4,12,[27]	c	z6
斯坦利沙门氏菌	<i>S. stanley</i>	1,4,[5],12,[27]	d	1,2
圣保罗沙门氏菌	<i>S. saintpaul</i>	1,4,[5],12	e,h	1,2
里定沙门氏菌	<i>S. reading</i>	1,4,[5],12	e,h	1,5
彻斯特沙门氏菌	<i>S. chester</i>	1,4,[5],12	e,h	e,n,x
德尔卑沙门氏菌	<i>S. derby</i>	1,4,[5],12	f,g	[1,2]
阿贡纳沙门氏菌	<i>S. agona</i>	1,4,[5],12	f,g,s	[1,2]
埃森沙门氏菌	<i>S. essen</i>	4,12	g,m	-
加利福尼亚沙门氏菌	<i>S. californica</i>	4,12	g,m,t	[z ₆₇]
金斯敦沙门氏菌	<i>S. kingston</i>	1,4,[5],12,[27]	g,s,t	[1,2]
布达佩斯沙门氏菌	<i>S. budapest</i>	1,4,12,[27]	g,t	-
鼠伤寒沙门氏菌	<i>S. typhimurium</i>	1,4,[5],12	i	1,2
拉古什沙门氏菌	<i>S. Lagos</i>	1,4,[5],12	i	1,5
布雷登尼沙门氏菌	<i>S. bredeney</i>	1,4,12,[27]	l,v	1,7
基尔瓦沙门氏菌 II	<i>S. kilwa II</i>	4,12	l,w	e,n,x
海德尔堡沙门氏菌	<i>S. heidelberg</i>	1,4,[15],12	r	1,2
印地安纳沙门氏菌	<i>S. indiana</i>	1,4,12	z	1,7
斯坦利维尔沙门氏菌	<i>S. stanleyville</i>	1,4,[5],12.[27]	z ₄ ,z ₂₃	[1,2]
伊图里沙门氏菌	<i>S. ituri</i>	1,4,12	z ₁₀	1,5
C1 群				
奥斯陆沙门氏菌	<i>S. oslo</i>	6,7,14	a	e,n,x
爱丁堡沙门氏菌	<i>S. edinburg</i>	6,7, 14	b	1,5
布隆方丹沙门氏菌 II	<i>S. bloemfontein II</i>	6,7	b	[e,n,x]: z ₄₂
丙型副伤寒沙门氏菌	<i>S. paratyphi C</i>	6,7,[Vi]	c	1,5

菌 名	拉丁菌名	O 抗 原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
猪霍乱沙门氏菌	<i>S.choleraesuis</i>	6,7	c	1,5
猪伤寒沙门氏菌	<i>S.typhisuis</i>	6,7	c	1,5
罗米他沙门氏菌	<i>S.lomita</i>	6,7	e,h	1,5
布伦登卢普沙门氏菌	<i>S.braenderup</i>	6,7, 14	e,h	e,n,z ₁₅
里森沙门氏菌	<i>S.rissen</i>	6,7, 14	f,g	-
蒙得维的亚沙门氏菌	<i>S.montevideo</i>	6,7, 14	g,m,[p],s	[1,2,7]
里吉尔沙门氏菌	<i>S.riggil</i>	6,7	g,[t]	-
奥雷宁堡沙门氏菌	<i>S.oranieburg</i>	6,7, 14	m,t	[2,5,7]
奥里塔蔓林沙门氏菌	<i>S.oritamerin</i>	6,7	i	1,5
汤卜逊沙门氏菌	<i>S.thompson</i>	6,7, 14	k	1,5
康科德沙门氏菌	<i>S.concord</i>	6,7	l,v	1,2
伊鲁木沙门氏菌	<i>S.irumu</i>	6,7	l,v	1,5
姆卡巴沙门氏菌	<i>S.mkamba</i>	6,7	l,v	1,6
波恩沙门氏菌	<i>S.bonn</i>	6,7	l,v	e,n,x
波茨坦沙门氏菌	<i>S.potsdam</i>	6,7, 14	l,v	e,n,z ₁₅
格但斯克沙门氏菌	<i>S.gdansk</i>	6,7, 14	l,v	z ₆
维尔肖沙门氏菌	<i>S.virchow</i>	6,7, 14	r	1,2
婴儿沙门氏菌	<i>S.infantis</i>	6,7, 14	r	1,5
巴布亚沙门氏菌	<i>S.papuana</i>	6,7	r	e,n,z ₁₅
巴累利沙门氏菌	<i>S.bareilly</i>	6,7, 14	y	1,5
哈特福德沙门氏菌	<i>S.hartford</i>	6,7	y	e,n,x
三河岛沙门氏菌	<i>S.mikawasima</i>	6,7, 14	y	e,n,z ₁₅
姆班达卡沙门氏菌	<i>S.mbandaka</i>	6,7, 14	z ₁₀	e,n,z ₁₅
田纳西沙门氏菌	<i>S.tennessee</i>	6,7, 14	z ₂₉	[1,2,7]
布伦登卢普沙门氏菌	<i>S.braenderup</i>	6,7, 14	e,h	e,n,z ₁₅
耶路撒冷沙门氏菌	<i>S.jerusalem</i>	6,7, 14	z ₁₀	l,w
C2 群				
习志野沙门氏菌	<i>S.narashino</i>	6,8	a	e,n,x
名古屋沙门氏菌	<i>S.nagoya</i>	6,8	b	1,5
加瓦尼沙门氏菌	<i>S.gatuni</i>	6,8	b	e,n,x
慕尼黑沙门氏菌	<i>S.muenchen</i>	6,8	d	1,2
曼哈顿沙门氏菌	<i>S.manhattan</i>	6,8	d	1,5
纽波特沙门氏菌	<i>S.newport</i>	6,8,20	e,h	1,2
科特布斯沙门氏菌	<i>S.kottbus</i>	6,8	e,h	1,5
茨昂威沙门氏菌	<i>S.tshiongwe</i>	6,8	e,h	e,n,z ₁₅

菌 名	拉丁菌名	O 抗 原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
林登堡沙门氏菌	<i>S.lindenburg</i>	6,8	i	1,2
塔科拉迪沙门氏菌	<i>S.takoradi</i>	6,8	i	1,5
波那雷恩沙门氏菌	<i>S.bonariensis</i>	6,8	i	e,n,x
利齐菲尔德沙门氏菌	<i>S.litchfield</i>	6,8	l,v	1,2
病牛沙门氏菌	<i>S.bovismorbificans</i>	6,8, 20	r,[i]	1,5
查理沙门氏菌	<i>S.chailey</i>	6,8	Z ₄ ,Z ₂₃	e,n,Z ₁₅
C3 群				
巴尔多沙门氏菌	<i>S.bardo</i>	8	e,h	1,2
依麦克沙门氏菌	<i>S.emek</i>	8,20	g,m,s	-
肯塔基沙门氏菌	<i>S.kentucky</i>	8, 20	i	Z ₆
D 群				
仙台沙门氏菌	<i>S.sendai</i>	1,9,12	a	1,5
伤寒沙门氏菌	<i>S.typhi</i>	9,12,[Vi]	d	-
塔西沙门氏菌	<i>S.tarshyne</i>	9,12	d	1,6
伊斯特本沙门氏菌	<i>S.eastbourne</i>	1,9,12	e,h	1,5
以色列沙门氏菌	<i>S.israel</i>	9,12	e,h	e,n,Z ₁₅
肠炎沙门氏菌	<i>S.enteritidis</i>	1,9,12	g,m	[1,7]
布利丹沙门氏菌	<i>S.blegdam</i>	9,12	g,m,q	-
沙门氏菌 II	<i>Salmonella II</i>	1,9,12	g,m,[s],t	[1,5,7]
都柏林沙门氏菌	<i>S.dublin</i>	1,9,12,[Vi]	g,p	-
芙蓉沙门氏菌	<i>S.seremban</i>	9,12	i	1,5
巴拿马沙门氏菌	<i>S.panama</i>	1,9,12	l,v	1,5
戈丁根沙门氏菌	<i>S.goettingen</i>	9,12	l,v	e,n,Z ₁₅
爪哇安纳沙门氏菌	<i>S.javiana</i>	1,9,12	L,Z ₂₈	1,5
鸡-雏沙门氏菌	<i>S.gallinarum-pullorum</i>	1,9,12	-	-
E1 群				
奥凯福科沙门氏菌	<i>S.okefoko</i>	3,10	c	Z ₆
瓦伊勒沙门氏菌	<i>S.vejle</i>	3,{10}, {15}	e,h	1,2
明斯特沙门氏菌	<i>S.muenster</i>	3,{10}{15}{15,34}	e,h	1, 5
鸭沙门氏菌	<i>S.anatum</i>	3, {10}{15}{15,34}	e,h	1,6
纽兰沙门氏菌	<i>S.newlands</i>	3,{10}, {15,34}	e,h	e,n,x
火鸡沙门氏菌	<i>S.meleagridis</i>	3, {10}{15}{15,34}	e,h	1,w
雷根特沙门氏菌	<i>S.regent</i>	3,10	f,g,[s]	[1,6]
西翰普顿沙门氏菌	<i>S.westhampton</i>	3,{10}{15}{15,34}	g,s,t	-
阿姆德尔尼斯沙门氏	<i>S.amounderness</i>	3,10	i	1,5

菌 名	拉丁菌名	O 抗 原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
菌				
新罗歇尔沙门氏菌	<i>S.new-rochelle</i>	3,10	k	1,w
恩昌加沙门氏菌	<i>S.nchanga</i>	3,{10}{15}	l,v	1,2
新斯托夫沙门氏菌	<i>S.sinstorf</i>	3,10	l,v	1,5
伦敦沙门氏菌	<i>S.london</i>	3,{10}{15}	l,v	1,6
吉韦沙门氏菌	<i>S.give</i>	3,{10}{15}{15,34}	l,v	1,7
鲁齐齐沙门氏菌	<i>S.ruzizi</i>	3,10	l,v	e,n,z ₁₅
乌干达沙门氏菌	<i>S.uganda</i>	3,{10}{15}	l,z ₁₃	1,5
乌盖利沙门氏菌	<i>S.ughelli</i>	3,10	r	1,5
韦太夫雷登沙门氏菌	<i>S.weltevreden</i>	3,{10}{15}	r	z ₆
克勒肯威尔沙门氏菌	<i>S.clerkenwell</i>	3,10	z	1,w
列克星敦沙门氏菌	<i>S.lexington</i>	3,{10}{15}{15,34}	z ₁₀	1,5
E4 群				
萨奥沙门氏菌	<i>S.sao</i>	1,3,19	e,h	e,n,z ₁₅
卡拉巴尔沙门氏菌	<i>S.calabar</i>	1,3,19	e,h	1,w
山夫登堡沙门氏菌	<i>S.senftenberg</i>	1,3,19	g,[s],t	-
斯特拉特福沙门氏菌	<i>S.stratford</i>	1,3,19	i	1,2
塔克松尼沙门氏菌	<i>S.taksony</i>	1,3,19	i	z ₆
索恩保沙门氏菌	<i>S.schoeneberg</i>	1,3,19	z	e,n,z ₁₅
F 群				
昌丹斯沙门氏菌	<i>S.chandans</i>	11	d	[e,n,x]
阿柏丁沙门氏菌	<i>S.aberdeen</i>	11	i	1,2
布里赫姆沙门氏菌	<i>S.brijbhumi</i>	11	i	1,5
威尼斯沙门氏菌	<i>S.veneziana</i>	11	i	e,n,x
阿巴特图巴沙门氏菌	<i>S.abaetetuba</i>	11	k	1,5
鲁比斯劳沙门氏菌	<i>S.rubislaw</i>	11	r	e,n,x
其他 群				
浦那沙门氏菌	<i>S.poona</i>	1,13,22	z	1,6
里特沙门氏菌	<i>S.ried</i>	1,13,22	z ₄ ,z ₂₃	[e,n,z ₁₅]
密西西比沙门氏菌	<i>S.mississippi</i>	1,13,23	b	1,5
古巴沙门氏菌	<i>S.cubana</i>	1,13,23	z ₂₉	-
苏拉特沙门氏菌	<i>S.surat</i>	[1],6,14,[25]	r,[i]	e,n,z ₁₅
松兹瓦尔沙门氏菌	<i>S.sundsvall</i>	[1],6,14,[25]	z	e,n,x
非丁伏斯沙门氏菌	<i>S.hvittingfoss</i>	16	b	e,n,x
威斯敦沙门氏菌	<i>S.weston</i>	16	e,h	z ₆

菌 名	拉丁菌名	O 抗 原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
上海沙门氏菌	<i>S.shanghai</i>	16	l,v	1,6
自贡沙门氏菌	<i>S.zigong</i>	16	l,w	1,5
巴圭达沙门氏菌	<i>S.baguida</i>	21	z ₄ ,z ₂₃	-
迪尤波尔沙门氏菌	<i>S.dieuoppeul</i>	28	i	1,7
卢肯瓦尔德沙门氏菌	<i>S.luckenwalde</i>	28	z ₁₀	e,n,z ₁₅
拉马特根沙门氏菌	<i>S.ramatgan</i>	30	k	1,5
阿德莱沙门氏菌	<i>S.adelaide</i>	35	f,g	-
旺兹沃思沙门氏菌	<i>S.wandsworth</i>	39	b	1,2
雷俄格伦德沙门氏菌	<i>S.riogrande</i>	40	b	1,5
莱瑟沙门氏菌	<i>S.lethe II</i>	41	g,t	-
达莱姆沙门氏菌	<i>S.dahlem</i>	48	k	e,n,z ₁₅
沙门氏菌 IIIb	<i>Salmonella IIIb</i>	61	l,v	1,5,7

附录 C 最可能数 (MPN) 检索表

表C.1 每g (mL) 检样中沙门氏菌最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1g (mL)、0.01g (mL) 和 0.001g (mL)], 每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1g (mL)、0.1g (mL) 和 0.01g (mL) 时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01g (mL)、0.001g (mL)、0.0001g (mL) 时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

十、铜绿假单胞菌检验标准操作程序

1 方法来源

GB/T 8538-2008 《饮用天然矿泉水检验方法》

2 适用范围

本程序规定了饮用天然矿泉水中铜绿假单胞菌的检验方法。

本程序适用于饮用天然矿泉水中铜绿假单胞菌的检验，其他食品可参照使用。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

3.1 玻璃器具：所有玻璃器皿使用前需 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。

3.2 恒温培养箱：36℃ ±1℃。

3.3 紫外灯：波长应为 (360±20) nm。

3.4 滤膜：直径 47 mm，微孔径为 0.45 μm。处理方法：如滤膜未经灭菌，则使用前需先将滤膜放入烧杯中，加入蒸馏水，置于沸水浴中煮沸灭菌 3 次，每次 15 min。前两次煮沸后需更换水，用蒸馏水洗涤 2 次~3 次，以除去残留溶剂。建议使用一次性无菌滤膜。

3.5 显微镜：10×~100×。

3.6 冰箱：0℃~8℃。

4 培养基和试剂

4.1 假单胞菌琼脂基础培养基/CN 琼脂：见附录 A 中的 A.1。

4.2 金氏 B (King's B) 培养基：见附录 A 中的 A.2。

4.3 乙酰胺肉汤：见附录 A 中的 A.3。

4.4 营养琼脂：见附录 A 中的 A.4。

4.5 氧化酶试剂：见附录 A 中的 A.5。

4.6 纳氏试剂：见附录 A 中的 A.6。

5 检验程序

检验程序见图 1。

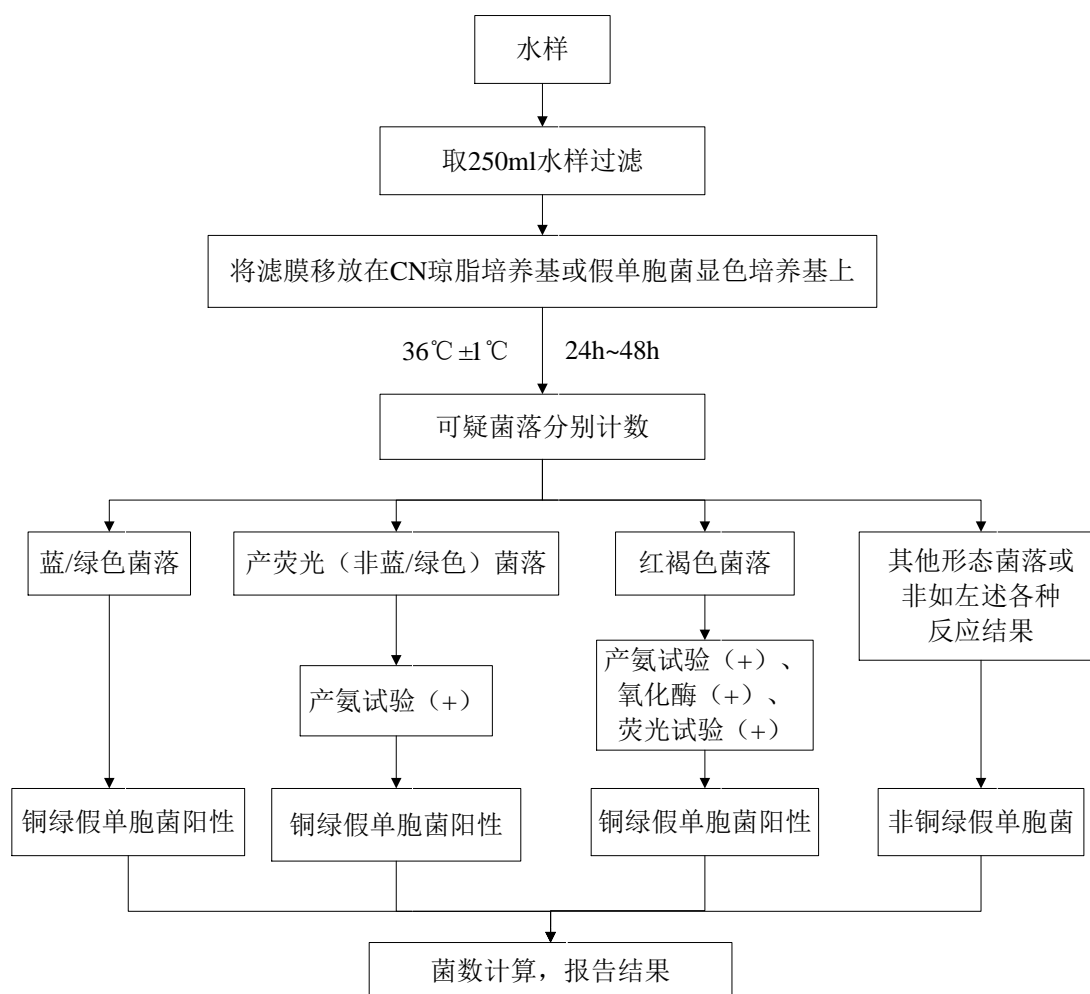


图 1 铜绿假单胞菌检验程序

6 操作步骤

6.1 水样过滤

在 100 级的洁净工作台进行过滤操作。首先用无菌镊子夹取灭菌滤膜边缘部分，将粗糙面向上，贴放在已灭菌的滤床上，固定好滤器，将 250 mL 水样或稀释液通过孔径 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤，然后将过滤后的滤膜贴在已制备好的 CN 琼脂平板（或假单胞菌显色培养基）上，平铺并避免在滤膜和培养基之间夹流着气泡。

6.2 培养

将平板置于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 40h~48h，并防止干燥。

6.3 结果观察

在培养 20h~24h 和 40h~48h 后观察滤膜上菌落的生长情况并计数。

计数所有显蓝色或绿色（绿脓色素）的菌落，判定为铜绿假单胞菌。

在紫外线下检查滤膜时，应避免长时间在紫外灯下照射，否则可能会将平板上的菌落杀灭，而导致无法在证实培养基上生长。计数滤膜上所有发荧光不产绿脓色素疑似铜绿假单胞菌菌落，并进行乙酰胺肉汤确证性试验。

将其他所有红褐色不发荧光的菌落进行氧化酶测试、乙酰胺肉汤、金氏 B 培养基确证性试验，培养 20h~24h 观察结果，防止因为培养 40h~48h 导致菌落过分生长而出现菌落融合。

最终的铜绿假单胞菌菌落计数应按式（1）进行计算。

在 CN 琼脂上生长的菌落选择和验证步骤见表 1。

表 1 在 CN 琼脂上生长的菌落选择和验证步骤

CN 琼脂上生长的菌落形态	乙酰胺肉汤	氧化酶试验	在金氏 B 培养基上产生荧光	判定为铜绿假单胞菌
蓝色/绿色	NT ^a	NT	NT	是
产荧光(非蓝/绿)	+	NT	NT	是
红褐色	+	+	+	是
其他形态	NT	NT	NT	否
^a 备注：NT 表示不用测试				

6.4 确证性试验

6.4.1 营养琼脂

尽可能将所有经滤膜过滤后，在 36℃ ±1℃ 培养了 20h~24h，将需验证的可疑菌落划线接种营养琼脂培养基，于 36℃ ±1℃ 培养 20h~24h。检查再次纯化的菌落，并将最初显红褐色的菌落进行氧化酶试验。

6.4.2 氧化酶试验

取 2 滴~3 滴新鲜配制的氧化酶试剂滴到放于平皿里的洁净滤纸上。用铂金丝接种环或玻璃棒，将适量的纯种培养物涂布在预备好的滤纸上。在 10s 内显深蓝紫色的视为阳性反应。也可以按照商品化氧化酶测试产品的说明书进行该项测

试。

6.4.3 金氏 B (King's B) 培养基

将上述呈红褐色的且氧化酶反应呈阳性的培养物接种于金氏 B 培养基上，于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养 1d~5d。每天需取出在紫外灯下检查其是否产生荧光性，将 5d 内产生荧光的菌落记录为阳性。

6.4.4 乙酰胺肉汤

将 5.4.1 中的纯培养物接种到装有乙酰胺肉汤的试管中，在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 20h~24h。然后向每支试管培养物加入 1 滴~2 滴钠氏试剂，检查各试管的产氨情况，如表现出从深黄色到砖红色的颜色变化，则为阳性结果，否则为阴性。

6.5 计数

将产生绿脓色（蓝色/绿色）或氧化酶反应呈阳性，在紫外灯下产生荧光（5.3 或 5.4.3），且在乙酰胺肉汤中产氨的所有菌落证实为铜绿假单胞菌，并进行计数。通过计数培养后的滤膜上的菌落以获得铜绿假单胞菌的数量。其他产生荧光或者呈红棕色的菌落需要进一步验证。

注：最初滤膜上显荧光的菌落经氧化酶反应均呈阳性，因此不需在这个测试中计数（见表 1）

7 结果说明

滤膜上的特征菌落可证实为铜绿假单胞菌的菌落。计算菌落数时应考虑到验证试验的比例及特定的水量，如矿泉水、泉水和其他瓶装水，水样的体积应为 250mL。

菌落计数按式（1）计算。

$$N=P+F(C_F/n_f)+R(C_R/n_r)\dots\dots\dots(1)$$

式中：

P——呈蓝/绿色的菌落数（所有证实为铜绿假单胞菌的菌落）；

F——显荧光的菌落数；

R——呈红褐色的菌落数；

n_f ——进行产氨测试的显荧光菌落数；

C_f ——产氨阳性的显荧光菌落数；

n_r ——进行产氨、氧化酶、金氏 B 培养基上显荧光测试的红褐色菌落数；

C_R ——产氨、氧化酶、金氏 B 培养基上显荧光测试均呈阳性的红褐色菌落数。

8 报告

根据蓝色或绿色菌落数的计数（5.3）和确证性试验的结果（5.4），计算每 250mL 水样中的铜绿假单胞菌数量，结果以 CFU/250mL 计。

9 干扰因素

当铜绿假单胞菌受到严重污染或培养时间过长时，菌落会产生融合而可能影响计数的精确度。

10 质量保证

检验及计数过程中应以铜绿假单胞菌 ATCC27853 作为阳性对照菌株，以大肠埃希氏菌 ATCC25922 作为阴性对照菌株。

附录 A 培养基和试剂

注意：除非特别说明，培养基和稀释剂预处理过程均使用分析纯试剂。按以下说明准备培养基和添加给定浓度的选择性底物作为补充。或者使用商业化的培养基。使用不含抑制性底物的蒸馏水。

A.1 假单胞菌琼脂基础培养基/CN 琼脂

A.1.1 成分

明胶胨	16.0 g
胰蛋白胨	10.0 g
K_2SO_4	10.0 g
$MgCl_2$	1.4 g
甘油	10 mL
琼脂	15g~20 g
蒸馏水	1000 mL
CN 补充成分	
溴化十六烷基三甲胺	0.2 g
萘啶酮酸	0.015 g

A.1.2 制法

将明胶胨、胰蛋白胨、 K_2SO_4 、 $MgCl_2$ 、琼脂溶解于 1000 mL 蒸馏水中。然后加入 10 mL 甘油，加热煮沸并高压蒸汽灭菌（121℃，15 min）。灭菌后，待培养基冷却至 45℃~50℃ 时，加入溶于 2 mL 灭菌蒸馏水的 CN 补充成分，与尚处于融溶状态的基础培养基混合，倾注到灭菌平板上，培养基厚度至少高 5 mm，培养基的最终 pH 应在 7.1±0.2 范围内（温度为 25℃ 时）。将制备好的平板置于黑暗处，于 2℃~8℃ 保存，同时防止干燥，在一个月使用。不要使培养基保持融溶状态超过 4 h。不得再次煮沸培养基。

A.2 金氏 B (King's B) 培养基

A.2.1 成分

蛋白胨	20.0 g
甘油	10 mL
K_2HPO_4	1.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL

A.2.2 制法

加热溶解以上各组分，然后冷却至 45℃~50℃，用 HCl 或 NaOH 调节 pH 到 7.2±0.2 范围内（温度为 25℃ 时）。最后将培养基分装到试管中，每管 5 mL，盖好试管帽后，高压蒸汽灭菌（121℃，15 min）。灭菌后，取出，冷却培养基，制成斜面。于低温 2℃~8℃ 黑暗条件下保存，三个月内使用。

A.3 乙酰胺肉汤

A.3.1 成分

a) 溶液 A

KH_2PO_4	1.0 g
$MgSO_4$	0.2 g
乙酰胺	2.0 g
NaCl	0.2 g
蒸馏水	900 mL

b) 溶液 B

Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g
水	100 mL

A.3.2 制法

加热溶解 A 组分, 用 HCl 或 NaOH 调节 pH 到 7.0±0.5 范围内 (温度为 25℃ 时)。然后将 1 mL 溶液 B 加入到 900 mL 新鲜制备的溶液 A 中, 用水定容到 1000 mL。分装到试管中, 每管 5 mL, 盖好试管帽后, 高压蒸汽灭菌 (121℃, 15 min)。灭菌后, 取出, 于低温 2℃~8℃ 黑暗条件下保存, 三个月内使用。

注: 乙酰胺具有刺激性且能够致癌, 在称量、使用和丢弃培养基时应适当注意。

A.4 营养琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15g~20 g
蒸馏水	1000 mL

A.4.2 制法

加热溶解以上各成分, 高压蒸汽灭菌 (121℃, 15 min)。制备好的培养基 pH 到 7.4±0.2 范围内 (温度为 25℃ 时)。使用前可干燥, 去除培养基表面多余的水分。灭菌后可放置于低温 2℃~8℃ 黑暗条件下保存, 防止干燥, 一个月内使用。

A.5 氧化酶试剂

A.5.1 1% 盐酸二甲基对苯二胺溶液: 少量新鲜配制, 于冰箱内避光保存。

A.5.2 1% α-萘酚-乙醇溶液。

A.6 纳氏试剂

A.6.1 成分

氯化汞 (HgCl ₂)	10.0 g
碘化钾 (KI)	7.0 g

氢氧化钠 (NaOH) 16.0 g

A.6.2 制法

称取 16 g 的 NaOH 溶于 50 mL 无氨水中, 冷却。称取 10 g HgCl₂ 和 7 g 的 KI 溶于少量的无氨水中, 然后将此溶液在搅拌下, 缓慢加入氢氧化钠溶液中, 用无氨水定容至 100 mL。盛在棕色试剂瓶内, 存于黑暗处。有效期大一年。

警告——HgCl₂有毒, 请避免摄入。

十一、 弯曲菌检验标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.9-2014《中华人民共和国国家标准 食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验》, PCR 内容来源于 2013 年卫生部食品安全优先评估项目《鸡肉中弯曲菌定量评估》和相关文献。

2 适用范围

本程序规定了食品中弯曲菌[空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)、结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*)、海鸥弯曲菌(*Campylobacter lari*)和乌普萨拉弯曲菌(*C. upsaliensis*)]的检验方法。

本程序适用于生禽肉中弯曲菌的检验。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外, 其他设备和材料如下:

- 3.1 冰箱: 2 °C~8 °C, -20 °C, -80 °C。
- 3.2 恒温振荡培养箱: 42 °C ±1 °C。
- 3.3 水浴装置: 36 °C ±1 °C, 100 °C ±1 °C。
- 3.4 微需氧培养装置: 能够提供微需氧条件 (5% O₂、10% CO₂ 和 85% N₂), 如三气培养箱、使用产气剂的厌氧罐/袋或其它可代用的装置等。
- 3.5 电子天平: 感量 0.001 g。
- 3.6 无菌培养皿: 直径为 90 mm。
- 3.7 显微镜: 10×~100×, 有相差功能。

- 3.8 离心机：离心力 $\geq 20\ 000\times g$ 。
- 3.9 全自动微生物鉴定系统。
- 3.10 漩涡混匀仪。
- 3.11 基因扩增仪。
- 3.12 电泳仪。
- 3.13 凝胶成像系统。
- 3.14 具塞试剂瓶（或三角瓶）：500mL，1000mL；玻璃试管：15mL；L 玻璃棒。
- 3.15 无菌枪头：10 μL ，200 μL ，1000 μL 。
- 3.16 无菌 EP 管：1.5 mL；无菌冻存管：2 mL。
- 3.17 孔径 0.45 μm ~0.6 μm ，直径 47mm 左右的无菌滤膜。

4 培养基和试剂

- 4.1 Preston 肉汤：见附录 A 中 A.1。
- 4.2 缓冲蛋白胨水（BPW）：见附录 A 中 A.2。
- 4.3 mCCD 琼脂：见附录 A 中 A.3。
- 4.4 Skirrow 琼脂：见附录 A 中 A.4。
- 4.5 Karmali 琼脂：见附录 A 中 A.5。
- 4.6 Preston 琼脂：见附录 A 中 A.6。
- 4.7 哥伦比亚琼脂：见附录 A 中 A.7。
- 4.8 布氏肉汤：见附录 A 中 A.8。
- 4.9 氧化酶试剂：见附录 A 中 A.9。
- 4.10 马尿酸钠水解的检测试剂：见附录 A 中 A.10。
- 4.11 吲哚乙酸酯纸片：见附录 A 中 A.11。
- 4.12 弯曲菌保存培养基：见附录 A 中 A.12。
- 4.13 弯曲菌运输半固体培养基：见附录 A 中 A.13。
- 4.14 1 mol/L NaOH 溶液。
- 4.15 3% 过氧化氢溶液。
- 4.16 生化鉴定试剂盒。
- 4.17 全自动微生物鉴定系统生化鉴定卡。
- 4.18 弯曲菌 PCR 检测试剂。

4.19 Tris-乙酸 (TAE)、琼脂糖、LoadingBuffer、溴化乙锭 (EB)。

4.20 超纯水。

4.21 无菌脱纤维羊血。

4.22 抗生素：头孢哌酮、多粘菌素 B 硫酸盐、利福平、两性霉素 B、万古霉素、甲氧苄啶。

5 检验程序

检验程序见图 1。

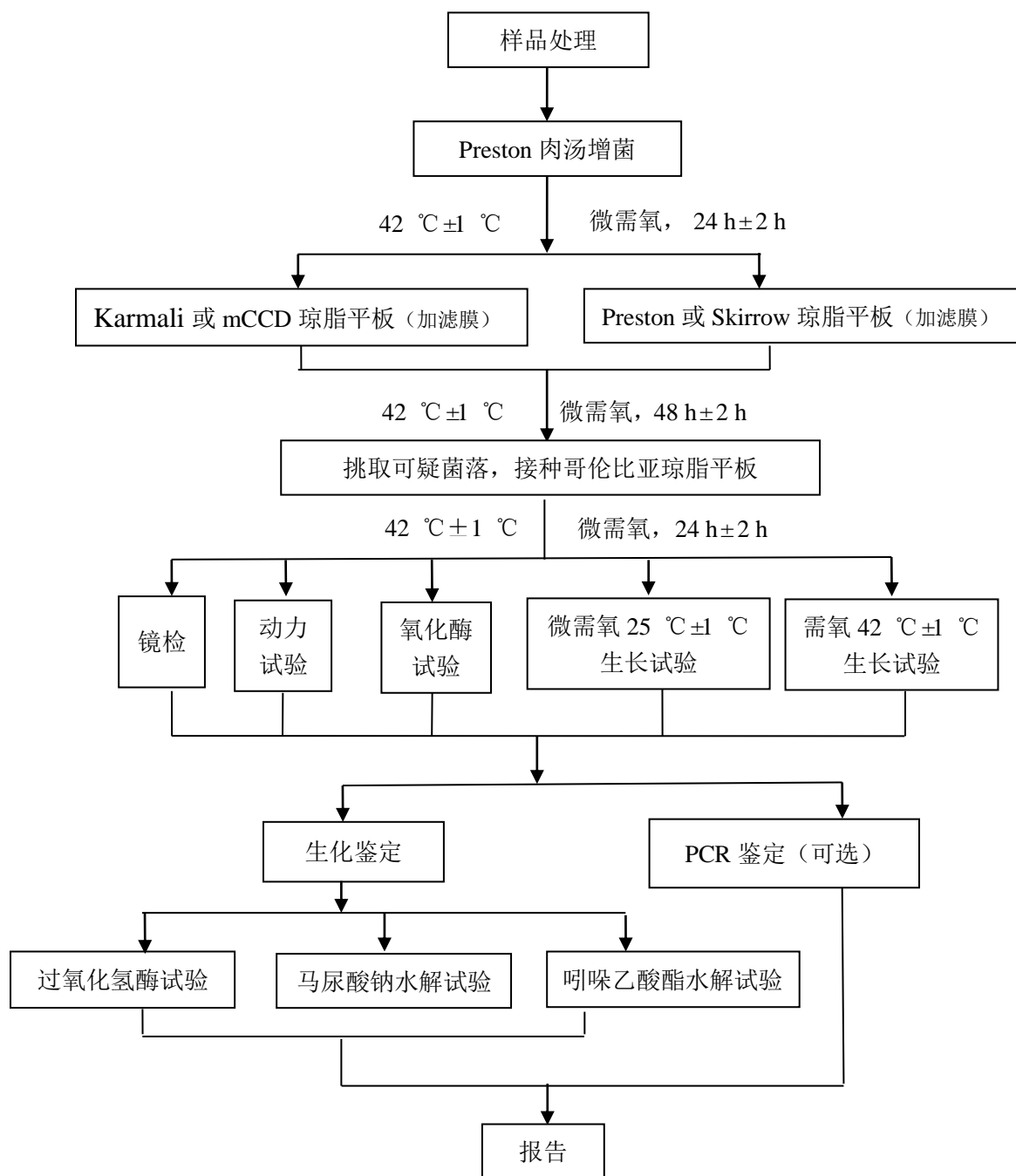


图 1 弯曲菌常规增菌培养法检验程序

6 操作步骤

6.1 样品处理²

禽胴体：无菌条件下，将禽胴体放入合适容积的无菌自封袋中，加入Preston肉汤淹没样品（一般每1 kg样品加入500mL Preston肉汤），置于振荡器上，以100

²采集的样品最好现场接种；如不能实现应将样品低温保存（4-7℃），但避免直接接触冰块。样品应尽快送达实验室检测，以避免弯曲菌的损伤/死亡。

r/min的速度震荡15min, 或反复揉搓禽胴体 5min (注意各个部位均要揉到)。无菌操作取出禽胴体, 漂洗液进行检测。如果同时做多个检验项目, 可以从禽胴体不同部位(脖子、胸、腿和肛门)处剪取检验需要量肉和皮, 均质2min, 取该混合样进行检验; 剩余的禽胴体依照上法用Preston肉汤漂洗后进行弯曲菌检验。

分割禽肉:取分割禽肉 1 块(大于 100g)放入无菌自封袋中, 加入适量 Preston 肉汤淹没样品(一般每 1 kg 样品加入 500mL Preston 肉汤), 以 100 r/min 的速度震荡 15min, 无菌操作取出禽肉, 漂洗液进行检测。如果同时做多个检验项目, 可以将多块分割禽肉一起揉搓, 从不同禽块上剪取检验需要量肉和皮, 均质 2min, 取该混合样进行检验; 剩余的分割禽肉(大于 100g)依照上法用 Preston 肉汤漂洗后进行弯曲菌检验。

6.2 增菌

6.2.1 微需氧环境的建立:

抽气换气法(含有 5% O₂、10% CO₂ 和 85% N₂ 的混合气体): 将无菌吸管一端连接混合气体钢瓶, 另一端插入含有样品漂洗液的无菌自封袋中, 密封袋口, 打开混合气体钢瓶开关充气至无菌袋鼓起, 轻轻晃动, 使袋内的液体与混合气体充分接触, 然后停止充气, 双手按压排出袋内混合气体。以此法充气排气 3 次后再充入混合气体, 拔出吸管, 立即密封袋口。

微需氧产气袋法:将漂洗液倒入无菌瓶子内(将瓶子的盖子旋松或以无菌牛皮纸包扎瓶口, 以利于气体的交换), 将瓶子放入适当容积的微需氧培养装置(厌氧盒里放置微需氧产气袋, 注意微需氧产气袋产生气体的量一定和厌氧盒子的容积相当)。

三气培养箱等仪器法:按仪器说明书调节温度和气体含量, 待稳定后, 放入含有漂洗液的瓶子(将瓶子的盖子旋松或以无菌牛皮纸包扎瓶口, 以利于气体的交换)。

6.2.2 在微需氧条件下, 42 °C ±1 °C 震荡(25~100 r/min) 或静止培养 24 h ± 2 h。

6.3 分离培养

6.3.1 增菌液接种

将Karmali或mCCD琼脂平板和Preston或Skirrow琼脂平板在42 °C ±1 °C烘干表面水分, 将0.45µm~0.6µm无菌滤膜轻轻贴在平板的中间, 不要产生空隙; 取

24 h 增菌液 200 μ L~250 μ L 滴加在滤膜上，室温静置 45 min~60min，待液体全部透过滤膜后，用无菌镊子将滤膜轻轻揭下，弃去，翻转平板，微需氧条件下 42 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 48 h \pm 2 h。

6.3.2 可疑菌落的筛选

弯曲菌属在 Karmali 选择性平板上典型菌落形态一般有两种，一种呈浅灰或灰白色、半透明而中心颜色较暗，圆形，光滑，中间凸起、针尖状或小水珠状，直径 1 mm ~3 mm，边缘整齐、有光泽的单个菌落；另一种呈浅灰白色、半透明、扁平或稍突起、水滴状，形状常呈不规则圆盘状，直径 2 mm~5mm 的单个菌落。禽漂洗液中以第一种菌落形态较为常见。

mCCD 琼脂平板上的可疑菌落通常有光泽、潮湿、扁平，呈扩散生长的倾向，直径约为 1 mm~2 mm。

Skirrow 琼脂平板上的第一型可疑菌落为灰色、扁平、湿润有光泽，呈沿接种线向外扩散的倾向；第二型可疑菌落常呈分散凸起的单个菌落，直径约为 1 mm~2 mm，边缘整齐、发亮。禽漂洗液中以第一种菌落形态较为常见。

Preston 琼脂平板上的典型菌落形态一般也有两种，一种呈浅灰白色或略显浅粉白色，半透明、扁平或稍突起、湿润、水滴状，直径 2 mm ~9mm 不等的单个菌落；另一种呈浅灰色、半透明、圆形、光滑、隆起，针尖状或小水珠状，直径 1 mm~3mm，边缘整齐、有光泽的单个菌落。两种菌落形态均常见。

经过滤膜过滤培养后，一般平板上菌落都是纯的弯曲菌菌落。

6.4 鉴定

6.4.1 弯曲菌属的鉴定

挑取可疑菌落 2~3 个接种到哥伦比亚琼脂平板上，微需氧条件下 42 $^{\circ}$ C 培养 24 h \pm 2 h，按照 6.4.1.1~6.4.1.5 进行鉴定，结果符合表 1 的可疑菌落确定为弯曲菌属。

表 1 弯曲菌属的鉴定

项目	弯曲菌属特性
形态观察	革兰氏阴性，菌体弯曲如小逗点状，两菌体的末端相接时呈S形、螺旋状或海鸥展翅状 ^a
动力观察	呈现螺旋状运动 ^b
氧化酶试验	阳性
微需氧条件下25℃±1℃生长试验	不生长
有氧条件下42℃±1℃生长试验	不生长
^a 有些菌株的形态不典型。	
^b 有些菌株的运动不明显。	

6.4.1.1 形态观察

对可疑菌落进行革兰氏染色，复染时使用 0.5% 的苯酚品红溶液。弯曲菌为革兰氏阴性，菌体弯曲如小逗点状，两菌体的末端相接时呈 S 形、螺旋状或海鸥展翅状。

6.4.1.2 动力观察

挑取可疑菌落用 1mL 布氏肉汤悬浮，用相差显微镜观察运动状态。弯曲菌属呈现螺旋状运动。

6.4.1.3 氧化酶试验

使用无菌棉签蘸取可疑菌落，将氧化酶试剂直接滴加到沾有菌的棉签上，如果在 10 s 内出现紫红色、紫罗兰或深蓝色为阳性。弯曲菌属为阳性。

6.4.1.4 微需氧条件下 25℃±1℃生长试验

挑取可疑菌落，接种到哥伦比亚血琼脂平板上，微需氧条件下 25℃±1℃培养 44 h±4 h，观察细菌生长情况。弯曲菌属不生长。

6.4.1.5 有氧条件下 42℃±1℃生长试验

挑取可疑菌落，接种到哥伦比亚血琼脂平板上，有氧条件下 42℃±1℃培养 44 h±4 h，观察细菌生长情况。弯曲菌属不生长。

6.4.2 空肠弯曲菌、结肠弯曲菌、海鸥弯曲菌和乌普萨拉弯曲菌的鉴定

6.4.2.1 过氧化氢酶试验

挑取菌落，加到干净玻片上的 3% 过氧化氢溶液中，如果在 30 s 内出现气泡则判定结果为阳性。空肠弯曲菌、结肠弯曲菌和海鸥弯曲菌为阳性。

6.4.2.2 马尿酸盐水解试验

挑取菌落(菌量要大)，加到盛有 0.4 mL 1% 马尿酸钠的试管中制成菌悬液。

混合均匀后在 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中温育 2 h 或 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中温育 4 h。加入 0.2 mL 茚三酮溶液，在 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴或培养箱中再温育 10 min 后判读结果。若出现深紫色则为阳性；若出现淡紫色或没有颜色变化则为阴性。

6.4.2.3 吡啶乙酸酯水解试验³

挑取菌落（菌量要大）至羟基吡啶醋酸盐纸片上，再滴加一滴灭菌蒸馏水。如果吡啶乙酸酯水解，则在 5 min~10 min 内出现深蓝色；若无颜色变化则表示没有发生水解。空肠弯曲菌、结肠弯曲菌、海鸥弯曲菌和乌普萨拉弯曲菌的鉴定结果见表 2。

表 2 空肠弯曲菌、结肠弯曲菌、海鸥弯曲菌和乌普萨拉弯曲菌的鉴定

特征	空肠弯曲菌 (<i>C. jejuni</i>)	结肠弯曲菌 (<i>C. coli</i>)	海鸥弯曲菌 (<i>C. lari</i>)	乌普萨拉弯曲菌 (<i>C. upsaliensis</i>)
过氧化氢酶试验	+	+	+	-或微弱
马尿酸盐水解试验	+	-	-	-
吡啶乙酸酯水解试验	+	+	-	+

6.4.2.4 替代实验

对于确定为弯曲菌属的菌落，可以使用生化鉴定试剂盒或全自动微生物鉴定系统来替代 6.4.2.1~6.4.2.3 的鉴定。

6.4.3 弯曲菌的 PCR 鉴定（可选项目）

按下列方法进行 PCR 鉴定。也可以使用商品化的试剂盒对可疑弯曲菌纯培养物进行鉴定，试剂盒使用前需经过验证合格，具体操作见产品说明书。

6.4.3.1 模板 DNA 的制备

无菌接种环挑取少量菌苔，在 200 μL 无菌超纯水中混匀（菌悬液呈肉眼可见的微混浊状即可，不宜过度混浊），于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 10 min 后， $13\ 000\times g$ 离心 2 min，上清液即为制备好的 DNA 模板，将其转于另一无菌离心管中备用。

6.4.3.2 引物序列和目的基因片段

见表 3。

表 3 四种弯曲菌特征基因序列和 PCR 片段大小

检测基因	引物序列	片段大小 (bp)
23S rRNA (弯曲菌)	23S-F: 5'-TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG-3' 23S-R: 5'-ATCAATTAACCTTCGAGCACCG-3'	650
<i>hipO</i>	CJ-F: 5'-ACTTCTTTATTGCTTGCTGC-3'	323

³吡啶乙酸酯水解试验要注意观察时间，不能超过 10min，否则会出现假阳性结果。

(空肠弯曲菌)	CJ-R: 5'-GCCACAACAAGTAAAGAAGC-3'	
<i>glyA</i>	CC-F: 5'-GTAAAACCAAAGCTTATCGTG-3'	126
(结肠弯曲菌)	CC-R: 5'-TCCAGCAATGTGTGCAATG-3'	
<i>glyA</i>	CL-F: 5'-TAGAGAGATAGCAAAAAGAGA-3'	251
(海鸥弯曲菌)	CL-R: 5'-TACACATAATAATCCCACCC-3'	
<i>glyA</i>	CU-F: 5'-AATTGAAACTCTTGCTATCC-3'	204
(乌普萨拉弯曲菌)	CU-R: 5'-TCATACATTTTACCCGAGCT-3'	

6.4.3.3 反应体系

见表 4。

表 4 PCR 反应体系组成

试剂	使用量
10×Buffer	2.5μL
MgCl ₂	20 mM
KCl	100 mM
[NH ₄] ₂ SO ₄	50mM
dNTPs	200 μM
23S-F	0.2 μM
23S-R	0.2 μM
CJ-F	0.5 μM
CJ-R	0.5 μM
CC-F	1 μM
CC-R	1 μM
CL-F	0.5 μM
CL-R	0.5 μM
CU-F	0.5 μM
CU-R	0.5 μM
Taq 酶	1.25 U
DNA	2.5μL
总体积	补充超纯水至 25μL

6.4.3.4 PCR 反应条件

95 °C 预变性 6 min 后, 按照 95 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s 进行 30 个循环, 然后 72 °C 延伸 7 min。产物当时不能检测时 4 °C 保存。

6.4.3.5 PCR 检测

分别取 10 uL PCR 产物, 与 2 uL 6×loading buffer 混匀后, 加样于点样孔中。5 v/cm, 电泳 30 min~40 min。与对照相比, 若出现目的条带则为阳性。

7 结果报告

综合以上试验结果，报告样品中检出空肠弯曲菌或/和结肠弯曲菌或/和海鸥弯曲菌或/和乌普萨拉弯曲菌。

如果没有可疑菌落、或可疑菌落鉴定后不是空肠弯曲菌或/和结肠弯曲菌或/和海鸥弯曲菌或/和乌普萨拉弯曲菌者，报告样品中未检出空肠弯曲菌或/和结肠弯曲菌或/和海鸥弯曲菌或/和乌普萨拉弯曲菌。

8 菌种的保存和运输

8.1 菌种保存

将经过鉴定的菌株纯化于哥伦比亚琼脂平板上， $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 微需氧环境中培养 18 h~24 h 后，无菌棉拭子将哥伦比亚琼脂平板上的所有菌苔全部擦拭后（相当于用 10 μL 的取菌环取 5 整环），均匀悬浮于盛有弯曲菌保存培养基的冻存管中于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 30 min，然后贮于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

8.2 菌种运输

运送前，将冻存管从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出，用接种环挑取少许菌液，划线接种于 1 块哥伦比亚琼脂平板上， $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 微需氧环境中培养 48 h 后，用无菌接种环将所有菌苔全部刮下，转种于含 5% 裂解羊血的弯曲菌运输半固体培养基中，拧紧管盖后，置于装有冰块的保温装置中，运输时间不宜超过 48 h。

附录 A 培养基和试剂

A.1 Preston 肉汤

A.1.1 基础培养基

A.1.1.1 成分

牛肉提取物 (Lab-Lemco powder)	10.0 g
蛋白胨 (Peptone)	10.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1000 mL

pH 7.2±0.2

A.1.1.2 制法

将 A.1.1.1 各成分溶解于蒸馏水中，校正 pH 值，121 °C 灭菌 15 min，备用。

A.1.2 无菌裂解脱纤维绵羊或马血⁴

通过反复冻融进行裂解，或使用皂角苷进行裂解。

A.1.3 抗生素溶液⁵

A.1.3.1 成分

多粘菌素 B (polymyxin B)	5000 IU
利福平	10.0 mg
甲氧苄啶	10.0 mg
两性霉素 B (amphotericin B)	10.0 mg
乙醇 / 灭菌水 (50 / 50, V/V)	4 mL

A.1.3.2 制法

将上述成分溶解于乙醇/灭菌水混合溶液中。

A.1.4 生长添加剂

A.1.4.1 成分

丙酮酸钠 (Sodium pyruvate)	0.25 g
焦亚硫酸钠 (Sodium metabisulphite)	0.25 g

⁴羊血需要在-20°C反复冻融至少2次，冻融好的羊血可以在-20°C保存6个月。一次未使用完的羊血可以反复冻融，但在试验过程中要避免污染。

⁵抗生素溶液的加入是为了抑制其他杂菌的生长，其中利福平：抑制需氧G⁺菌和部分G⁻菌；甲氧苄啶：抑制G⁻菌；两性霉素B：抑制霉菌、酵母菌；多粘菌素B：抑制G⁻菌，主要是绿脓杆菌。配置好的抗生素溶液可以分装后-80°C或-20°C保存，但保存时间不宜过久，最好按使用量现配现用。

硫酸亚铁（水合盐）（Ferrous sulphate (hydrated salt)	0.25 g
灭菌水	4 mL

A.1.4.2 制法

将上述成分溶解于灭菌水中。

A.1.5 完全培养基

A.1.5.1 成分

基础培养基（A.1.1）	1000 mL
无菌裂解脱纤维绵羊或马血（A.1.2）	50~70 mL
抗生素溶液（A.1.3）	4 mL
生长添加剂溶液（A.1.4）	4 mL

A.1.4.2 制法

当基础培养基的温度约为 45 °C 左右时，无菌手续加入裂解的绵羊或马血、抗生素溶液和生长添加剂溶液，混匀，将完全培养基的 pH 值调至 7.2±0.2（25 °C），将培养基无菌分装至合适的试管或锥形瓶中备用。配制的增菌液在常温下放置不得超过 4 h，或在 2 °C~8 °C 避光保存不得超过 14 天。

A.2 缓冲蛋白胨水（BPW）

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.2±0.2

A.2.2 制法

将 A.2.1 各成分溶解于蒸馏水中，校正 pH 值，121 °C 灭菌 15 min，备用。A.3 改良 CCD 琼脂（Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar, mCCDA）

A.3.1 基础培养基

A.3.1.1 成分

肉浸液	10.0 g
动物组织酶解物	10.0 g
氯化钠	5.0 g
木炭	4.0 g
酪蛋白酶解物	3.0 g
去氧胆酸钠	1.0 g
硫酸亚铁	0.25 g
丙酮酸钠	0.25 g
琼脂	8.0 g~18.0 g
蒸馏水	1000 mL

pH 7.2 ±0.2

A.3.1.2 制法

将 A.3.1.1 各成分溶解于蒸馏水中，校正 pH 值，121 °C 灭菌 15 min，备用。A.3.2 抗生素溶液

A.3.2.1 成分

头孢哌酮（cefoperazone）	0.032 g
两性霉素 B（amphotericin B）	0.01 g
利福平（rifampicin） ⁶	0.01 g
乙醇 / 灭菌蒸馏水（50 / 50，V/V）	5 mL

A.3.2.2 制法

将上述各成分溶解于乙醇/灭菌蒸馏水混合溶液中。

A.3.3 完全培养基

A.3.3.1 成分

基础培养基（A.3.1）	1000 mL
抗生素溶液（A.3.2）	5 mL

A.3.3.2 制法⁷

当基础培养基的温度约为 45 °C 左右时，加入抗生素溶液，混匀。校正 pH 值至 7.2±0.2（25 °C）。倾注约 15 mL 完全培养基于无菌平皿中，静置至培养基凝固。使用前需预先干

⁶利福平主要用于抗结核杆菌；有些商品化的添加剂中不含利福平。

⁷mCCDA 中不添加 5% 的羊血，而 Skirrow 中除抗生素添加剂还要加羊血。

燥平板。可将平皿盖打开，使培养基面朝下，置于干燥箱中约 30 min，直到琼脂表面没有可见潮湿。预先制备的平板未干燥时在室温放置不得超过 4 h，或在 2℃~8℃冷藏不得超过 14 天。

A.4 Skirrow 琼脂 (Skirrow agar)

A.4.1 基础培养基

A.4.1.1 成分

蛋白胨	15.0 g
胰蛋白胨	2.5 g
酵母浸膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL

pH 7.4 ±0.2

A.4.1.2 制法

将 A.4.1.1 各成分溶解于蒸馏水中，校正 pH 值，121℃灭菌 15 min，备用。A.4.2 FBP 溶液⁸

A.4.2.1 成分

丙酮酸钠	0.25 g
焦亚硫酸钠	0.25 g
硫酸亚铁	0.25 g
蒸馏水	5 mL

A.4.2.2 制法

将 A.4.2.1 各成分溶于 4 mL 蒸馏水中，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌。FBP 根据需要量现用现配，在 -70℃ 储存不超过 3 个月或 -20℃ 储存不超过 1 个月。

A.4.3 抗生素溶液

A.4.3.1 成分

头孢哌酮 (cefoperazone)	0.032 g
---------------------	---------

⁸FBP 的保存时间非常短，而且对光敏感，最好现配现用，如保存要避光冷冻保存。FBP 中成分可以促进弯曲菌生长，中和培养基中的氧，有利于微需氧环境的建立。

两性霉素 B (amphotericin B)	0.01 g
利福平 (rifampicin)	0.01 g
乙醇 / 灭菌蒸馏水 (50 / 50, V/V)	5 mL

A.4.3.2 制法

将上述各成分溶解于乙醇/灭菌蒸馏水混合溶液中。

A.4.4 无菌脱纤维绵羊血

羊血在-20 °C 反复冻融至少 2 次。

A.4.5 完全培养基

A.4.5.1 成分

基础培养基 (A.4.1)	1000 mL
FBP 溶液 (A.4.2)	5 mL
抗生素溶液 (A.4.3)	5 mL
冻融无菌脱纤维绵羊血 (A.4.4)	50 mL~100 mL

A.4.5.2 制法

当基础培养基的温度约为 45 °C 左右时, 加入 FBP 溶液、抗生素溶液与冻融的无菌脱纤维绵羊血, 混匀。将完全培养基的 pH 值调至 7.2 ± 0.2 (25 °C)。倾注约 15 mL 合成培养基于无菌平皿中, 静置至培养基凝固。使用前需预先干燥平板。可将平皿盖打开, 使培养基面朝下, 置于干燥箱中约 30 min, 直到琼脂表面没有可见潮湿。预先制备的平板未干燥时在室温放置不得超过 4 h, 或在 2 °C~8 °C 冷藏不得超过 14 天。

A.5 Karmali 琼脂

A.5.1 基础培养基

A.5.1.1 成分

哥伦比亚琼脂基础	39.0 g
活性炭	4.0 g
氯化血红素	0.032 g
蒸馏水	1000 mL
pH 7.4 ± 0.2	

A.5.1.2 制法

将 A.5.1.1 各成分溶解于蒸馏水中, 校正 pH 值, 121 °C 灭菌 15 min, 备用。

A.5.2 选择添加剂溶液

A.5.2.1 成分

丙酮酸钠 (Sodium pyruvate)	100.0 mg
头孢哌酮 (cefoperazone)	32.0 mg
万古霉素 (Vancomycin)	20.0 mg
两性霉素 B (amphotericin B)	10.0 mg
乙醇 / 灭菌蒸馏水 (50 /50, V/V)	4 mL

A.5.2.2 制法

将各成分加入 2 mL 无菌超纯水和 2 mL 无水乙醇，充分溶解并涡旋混匀后备用。

A.5.3 多粘菌素 B 溶液

准确称取多粘菌素 B 硫酸盐干粉 100 mg，溶于 10 mL 无菌超纯水中，配成浓度为 10 mg/mL 的多粘菌素 B 溶液，分装于 1.5 mL 的 EP 管中，每支 0.5 mL，于 -20 °C 保存。每次使用前于室温下融化后，取适量体积，加到在 55 °C 水浴中至少平衡 30 min 的培养基中备用（使培养基中多粘菌素 B 的最终浓度达 10 mg/L）。

A.5.4 利福平溶液

准确称取利福平干粉 100 mg，用 5 mL 二甲基亚砜 (DMSO) 溶解，配成 20 mg/mL 的母液，分装于 1.5 mL 的 EP 管中，每支 0.5 mL，于 -20 °C 保存。每次使用前于室温下融化后，取适量体积，用无菌超纯水稀释成 5 mg/mL 的工作液，加到在 55 °C 水浴中至少平衡 30 min 的培养基中备用（使培养基中利福平的最终浓度达 6.25 mg/L）。

A.5.5 完全培养基

A.5.5.1 成分

基础培养基 (A.5.1)	1000 mL
选择性添加剂溶液 (A.5.2)	4 mL
多粘菌素 B 溶液 (A.5.3)	1 mL
利福平溶液 (A.5.4)	1.25 mL

A.5.5.2 制法

当基础培养基的温度约为 45 °C 左右时，加入选择性添加剂溶液、多粘菌素 B 溶液和利福平溶液，混匀。将完全培养基的 pH 值调至 7.2±0.2 (25 °C)。倾注约 15 mL 合成培养基于无菌平皿中，静置至培养基凝固。使用前需预先干燥平板。可将平皿盖打开，使培养基面朝下，置于干燥箱中约 30 min，直到琼脂表面没有可见潮湿。预先制备的平板未干燥时在室温放置不得超过 4 h，或在 2 °C~8 °C 冷藏不得超过 14 天。

A.6 Preston 琼脂

A.6.1 基础培养基

A.6.1.1 成分

牛肉提取物 (Lab-Lemco powder)	10.0 g
蛋白胨 (Peptone)	10.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1000 mL
pH 7.5 ±0.2	

A.6.1.2 制法

将 A.6.1.1 各成分溶解于蒸馏水中, 校正 pH 值, 121 °C 灭菌 15 min, 备用。A.6.2 无菌裂解脱纤维绵羊或马血⁹

通过反复冻融进行裂解, 或使用皂角苷进行裂解。

A.6.3 混合抗生素溶液¹⁰

A.6.3.1 成分

多粘菌素 B (polymyxin B)	5000IU
利福平	10.0mg
甲氧苄啶	10.0mg
两性霉素 B (amphotercin B)	10.0mg
乙醇 / 灭菌水 (50 / 50, V/V)	4mL

A.6.3.2 制法

将上述成分溶解于乙醇/灭菌水混合溶液中。

A.6.4 头孢哌酮溶液

头孢哌酮溶液的配制: 准确称取头孢哌酮干粉 200 mg, 置于盛有 3 mL 无菌超纯水的具刻度 15 mL 无菌离心管中, 涡旋混匀后, 边振摇边加入 1 mol/L 的氢氧化钠溶液(约 3 mL ~ 5 mL), 至头孢哌酮溶液呈浅黄色澄清透明状(无肉眼可见颗粒或粉末)为止, 用无菌超纯

⁹羊血需要在-20°C反复冻融至少2次, 冻融好的羊血可以在-20°C保存6个月。一次未使用完的羊血可以反复冻融, 但在试验过程中要避免污染。

¹⁰抗生素溶液的加入是为了抑制其他杂菌的生长, 其中利福平: 抑制需氧 G⁺菌和部分 G⁻菌; 甲氧苄啶: 抑制 G⁻菌; 两性霉素 B: 抑制霉菌、酵母菌; 多粘菌素 B: 抑制 G⁻菌, 主要是绿脓杆菌。配置好的抗生素溶液可以分装后-80°C或-20°C保存, 但保存时间不宜过久, 最好按使用量现配现用。

水定容至 10 mL, 即配成 20 mg/mL 的头孢哌酮溶液。分装于 1.5 mL 的 EP 管中, 每支 1 mL, 于 -20 °C 保存。每次使用前于室温下融化后, 取适量体积, 加到在 55 °C 水浴中至少平衡 30 min 的培养基中备用 (使培养基中头孢哌酮的最终浓度为 32 mg/L)。

A.6.5 生长添加剂

A.6.5.1 成分

丙酮酸钠 (Sodium pyruvate)	0.25 g
焦亚硫酸钠 (Sodium metabisulphite)	0.25 g
硫酸亚铁 (水合盐) (Ferrous sulphate (hydrated salt))	0.25 g
灭菌水	4 mL

A.6.5.2 制法

将上述成分溶解于灭菌水中。

A.6.6 完全培养基

A.6.6.1 成分

基础培养基 (A.6.1)	1000 mL
无菌裂解脱纤维绵羊或马血 (A.6.2)	50~70 mL
混合抗生素溶液 (A.6.3)	4 mL
头孢哌酮溶液 (A.6.4)	1.6 mL
生长添加剂溶液 (A.6.5)	4 mL

A.6.6.2 制法

当基础培养基的温度约为 45 °C 左右时, 无菌手续加入裂解的绵羊或马血、混合抗生素溶液、头孢哌酮溶液和生长添加剂溶液, 混匀, 倾注于直径 9 cm 的无菌平皿中, 凝固后备用。制备好的平板在常温下放置不得超过 4 h, 或在 2 °C~8 °C 左右避光保存不得超过 14 天。

A.7 哥伦比亚琼脂 (Columbia blood agar)

A.7.1 基础培养基

A.7.1.1 成分

动物组织酶解物	23.0 g
淀粉	1.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	8.0g~18.0 g

蒸馏水	1000 mL
-----	---------

pH 7.2 ±0.2

A.7.1.2 制法

将 A.7.1.1 各成分溶解于蒸馏水中，校正 pH 值，121 °C 灭菌 15 min，备用。A.7.2 无菌脱纤维绵羊血

A.7.3 完全培养基

A.7.3.1 组分

基础培养基 (A.3.1)	1000 mL
---------------	---------

无菌脱纤维绵羊血 (A.3.2)	50 mL~100mL
------------------	-------------

A.7.3.2 制法

当基础培养基的温度为 45 °C 左右时，无菌加入绵羊血，混匀。倾注 15 mL 完全培养基于无菌平皿中，静置至培养基凝固。使用前需预先干燥平板。可将平皿盖打开，使培养基面朝下，置于干燥箱中约 30 min，直到琼脂表面没有可见潮湿。

A.8 布氏肉汤 (Brucella broth)

A.8.1 成分

酪蛋白酶解物	10.0 g
--------	--------

动物组织酶解物	10.0 g
---------	--------

葡萄糖	1.0 g
-----	-------

酵母浸膏	2.0 g
------	-------

氯化钠	5.0 g
-----	-------

亚硫酸氢钠	0.1 g
-------	-------

蒸馏水	1000 mL
-----	---------

pH 7.0 ±0.2

A.8.2 制法

将 A.8.1 各成分溶解于蒸馏水中，校正 pH 值，121 °C 灭菌 15 min，备用。A.9 氧化酶检测试剂 (Reagent for the detection of oxidase)

A.9.1 成分

四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
------------	-------

(N,N,N',N'- Tetramethyl-1,4-phenylenediaminedihydrochloride)

蒸馏水 100 mL

A.9.2 制法

使用前将上述成分溶于水中。

A.10 马尿酸水解的检测试剂 (Reagents for the detection of hydrolysis of hippurate)

A.10.1 马尿酸钠溶液

A.10.1.1 成分

马尿酸钠 10.0 g

磷酸盐缓冲液 (PBS) 组分:

NaCl 8.5 g

Na₂HPO₄·2H₂O 8.98 g

NaH₂PO₄·H₂O 2.71 g

加蒸馏水至终体积为 1000 mL。

A.10.1.2 制法

将马尿酸钠溶于磷酸盐缓冲溶液中, 过滤除菌。用合适的试管进行无菌分装, 每管 0.4 mL, 储存于-20 °C。

A.10.2 3.5% (水合) 茚三酮溶液 (质量/ 体积)

A.10.2.1 成分

(水合) 茚三酮 (nin hydrin) 1.75 g

丙酮 25 mL

丁醇 25 mL

A.10.2.2 制备

将(水合)茚三酮溶解于丙酮/丁醇混合液中。该溶液在避光冷藏时可保存半年。

A.11 吲哚乙酸酯纸片 (Indoxyl acetate disc)

A.11.1 成分

吲哚乙酸酯 0.1 g

丙酮 1 mL

A.11.2 制法

将吡啶乙酸脂溶于丙酮中，吸取 25 μL ~50 μL 溶液于空白纸片上（直径为 0.6 cm~1.2 cm）。室温干燥，用带有硅胶塞的棕色试管(瓶)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

A.12 弯曲菌保存培养基

A.12.1 成分

布氏肉汤（或 BHI 肉汤）	按照生产商说明书称量
甘油	80 mL
蒸馏水	320 mL

A.12.2 制法

准确称取肉汤干粉于蒸馏水中，加热溶解后加入甘油，混匀后，调 pH 值至 7.2~7.4，121 $^{\circ}\text{C}$ 高压 15 min。冷却至室温分装于 2 mL 冻存管中，每管 1.5 mL，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。每次使用前于室温下平衡至少 30 min。

A.13 弯曲菌运输半固体培养基

A.13.1 成分

布氏肉汤	11.2 g
琼脂粉	1.6 g
无菌脱纤维裂解羊血	20 mL
蒸馏水	380 mL

A.13.2 制法

准确称取布氏肉汤干粉和琼脂粉于蒸馏水中，搅拌并加热溶解后，调 pH 值至 7.2~7.4，121 $^{\circ}\text{C}$ 高压 15 min 后取出，室温下冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右，于 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴平衡 30 min 后，无菌操作边搅拌边缓缓加入无菌脱纤维裂解羊血，混匀后分装于 2 mL 冻存管中，每管 1.8 mL，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

十二、 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.8 尔 2016 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验》

2 适用范围

本标准规定了食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌的检验方法。

本标准适用于食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌的检验。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

3.1 冰箱：0℃～4℃。

3.2 恒温培养箱：26℃±1℃、37℃±1℃

3.3 显微镜：10 倍～100 倍。。

3.4 均质器。

3.5 天平：感量 0.1g。

3.6 灭菌试管：16 mm×160 mm.、15mm×100mm。

3.7 灭菌吸管：1mL (具 0.01mL 刻度)、10mL (具 0.1mL 刻度)。

3.8 锥形瓶：200 mL、500 mL。

3.9 灭菌平皿：直径 90 mm。

3.10 微生物生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统

4 培养基和试剂

4.1 改良磷酸盐缓冲液：见第 A.1 章。

4.2 CIN-1 培养基：见第 A.2 章。

4.3 改良 Y 培养基：见第 A.3 章。

4.4 改良克氏双糖培养基：见第 A.4 章。

4.5 糖发酵管：见第 A.5 章。

4.6 鸟氨酸脱羧酶试验培养基：见第 A.6 章。

4.7 半固体琼脂：见第 A.7 章。

4.8 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红（MR）和 V-P 试验用]：见第 A.8 章。

4.9 碱处理液：见第 A.9 章。

4.10 尿素培养基：见第 A.10 章。

4.11 微生物生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统所需配套试剂。

5 检验程序

小肠结肠炎耶尔森氏菌检验程序见图 1。

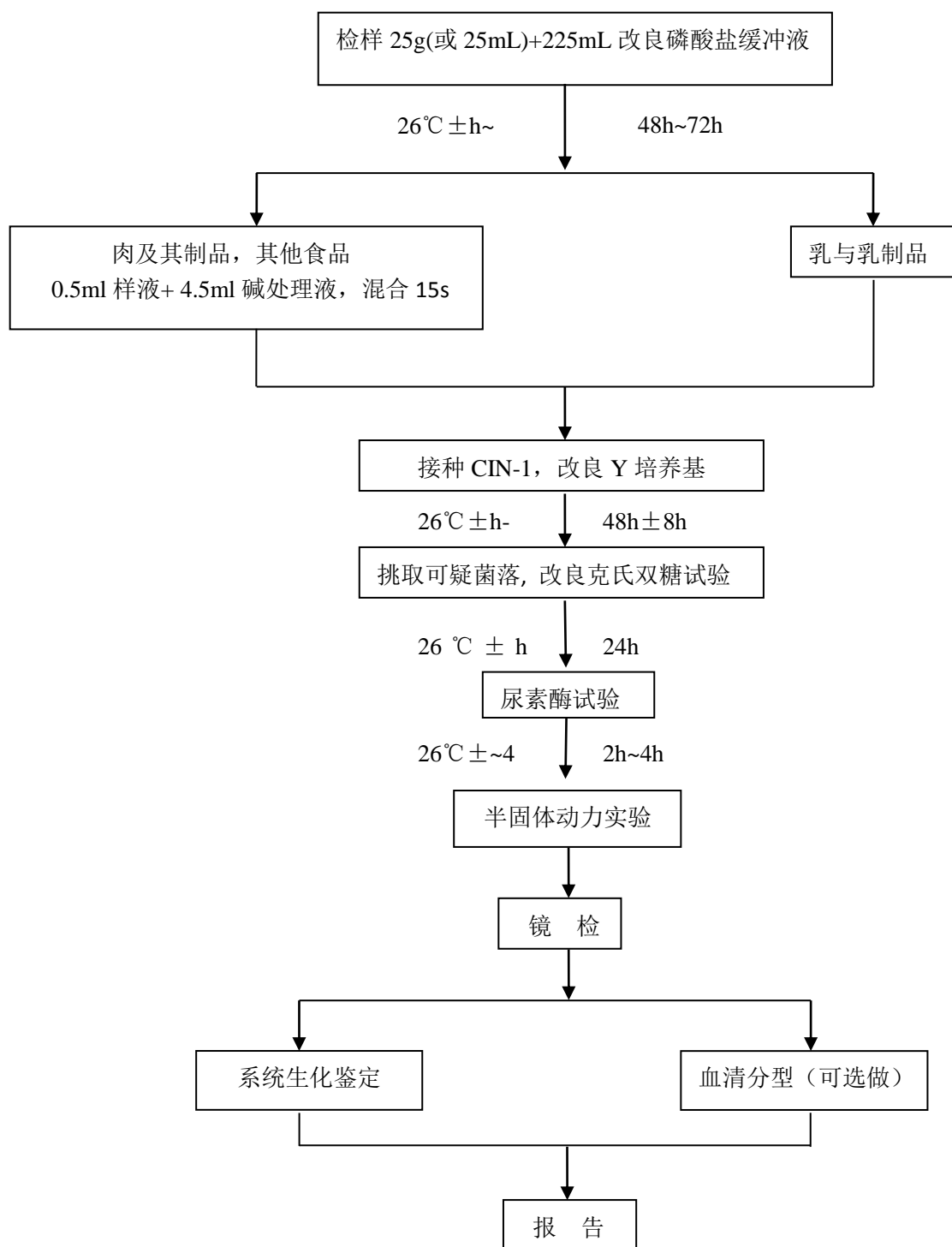


图 1 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验程序

6 操作步骤

6.1 增菌

以无菌操作取检样 25g（或 25mL）样品放入含有 225mL 改良磷酸盐缓冲液

增菌液的无菌均质杯或均质袋中，以 8000r/min 均质 1 min 或拍击式均质器均质 1 min。液体样品或粉末状样品，应振荡混匀。均质后于 26℃ ±1℃ 增菌 48h~72h。增菌时间长短可根据对样品污染程度的估计来确定。如样品杂菌多、背景值高，建议使用 4℃ ±1℃ 冷增菌 21d。

6.2 碱处理

除乳与乳制品外，其他食品的增菌液 0.5mL 与碱处理液 4.5mL 充分混合 15s。

6.3 分离

将乳与乳制品增菌液或经过碱处理的其他食品增菌液分别接种 CIN-I 琼脂平板和改良 Y 琼脂平板，26±1℃ 培养 48h±2h，典型菌落在 CIN-I 上为深红色中心，周围具有无色透明圈（红色牛眼状菌落），菌落大小为 1 mm~2mm，在改良 Y 琼脂平板上为无色透明、不粘稠的菌落。

6.4 改良克氏双糖试验

分别挑取 6.3 中的可疑菌落 3 个~5 个，接种改良克氏双糖铁琼脂，接种时先在斜面划线，再于底层穿刺；26±1℃ 培养 24h，将斜面和底部皆变黄不产气的培养物做进一步的生化鉴定。

6.5 尿素酶试验和动力观察

用接种环挑取一满环 6.4 得到的可疑培养物，接种到尿素培养基上，接种量应足够大，振摇几秒钟，26±1℃ 培养 2h~4h。将尿素酶试验阳性菌落分别接种于两管半固体培养基中，于 26℃ ±1℃ 和 36℃ ±1℃ 培养 24h。将在 26℃ 有动力而 36℃ 无动力的可疑菌培养物划线接种营养琼脂平板，进行纯化培养，用纯化物进行革兰氏染色镜检和生化试验。

6.6 革兰氏染色镜检

将纯化的可疑菌进行革兰染色。小肠结肠炎耶尔森氏菌呈革兰氏阴性球杆菌，有时呈椭圆或杆状，大小为 (0.8μm~3.0μm) × 0.8μm。

6.7 生化鉴定

6.7.1 从 6.5 中的营养琼脂平板上挑取单个菌落接种生化反应管，生化反应在 26℃ ±1℃ 进行。小肠结肠炎耶尔森氏菌的主要生化特征以及与其他相似菌的区别见表 1。

表 1 小肠结肠炎耶尔森氏菌与其他相似菌的生化性状鉴别表

项目	小肠结肠炎	中间型耶	弗氏耶	克氏耶	假结核耶尔森	鼠疫耶尔
----	-------	------	-----	-----	--------	------

	耶尔森氏菌 <i>Yersinia enterocolitica</i> a	尔森氏菌 <i>Yersinia intermedia</i>	尔森氏菌 <i>Yersinia frederiksenii</i>	尔森氏菌 <i>Yersinia kirstensenii</i>	氏菌 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	森氏菌 <i>Yersinia pestis</i>
动力 (26℃)	+	+	+	+	+	-
尿素酶	+	+	+	+	+	-
V-P 试验(26℃)	+	+	+	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	+	-	-
蔗糖	d	+	+	-	-	-
棉子糖	-	+	-	-	-	d
山梨醇	+	+	+	+	-	-
甘露醇	+	+	+	+	+	+
鼠李糖	-	+	+	-	-	+

注：+阳性；-阴性；d 有不同生化型

6.7.2 如选择微生物生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统，可根据 6.6 镜检结果，选择革兰阴性球杆菌菌落作为可疑菌落，从 6.5 所接种的营养琼脂平板上挑取单菌落，使用微生物生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统进行鉴定。

6.8 血清型鉴定（选做项目）

除进行生化鉴定外，可选择做血清型鉴定。在洁净的载玻片上加一滴 O 因子血清，将待试培养物混入其内，使成为均一性混浊悬液，将玻片轻轻摇动 0.5min~1min,在黑色背景下观察反应。如在 2min 内出现比较明显的小颗粒状凝集者，即为阳性反应，反之则为阴性，另用生理盐水作对照试验，以检查有无自凝现象；具体操作方法按 GB 4789.4 中沙门氏菌 O 因子血清分型方法进行。

7 结果报告

综合以上及生化特征报告结果，报告 25g（或 25ml）样品中检出或未检出小肠结肠炎耶尔森氏菌。

附录 A 培养基和试剂

A.1 改良磷酸盐缓冲液

A.1.1 成分

磷酸氢二钠	8.23g
磷酸二氢钠	1.2g
氯化钠	5.0g

三号胆盐	1.5g
山梨醇	20g

A.1.2 制法

将磷酸盐及氯化钠溶于蒸馏水中，再加入三号胆盐及山梨醇，溶解后校正 pH 为 7.6，分装试管，于 121℃ 高压灭菌 15 min，备用。

A.2 CIN-1 培养基

A.2.1 基础培养基：

胰胨	20.0g
酵母浸膏	2.0g
甘露醇	20.0g
氯化钠	1.0g
去氧胆酸钠	2.0g
硫酸镁	0.01g
琼脂	12.0g
蒸馏水	950 mL
pH 7.5±0.1	

将基础培养基于 121℃ 高压灭菌 15 min，备用。

A.2.2 Irgasan：以 95% 的乙醇作溶剂，溶解二苯醚，配成 0.4% 的溶液，待基础培养基冷至 80℃ 时，加入 1 mL 混匀。

A.2.3 冷至 50℃ 时，加入：

中性红(3 mg / mL)	10.0 mL
结晶紫(0.1 mg / mL)	10.0 mL
头孢菌素(1.5 mg / mL)	10.0 mL
新生霉素(0.25 mg / mL)	10.0 mL

最后不断搅拌加入 10.0 mL 的 10% 氯化铯，倾注平皿。

A.3 改良 Y 培养基

A.3.1 成分

蛋白胨	15.0g
氯化钠	5.0g

乳糖	10.0g
草酸钠	2.0g
去氧胆酸钠	6.0g
三号胆盐	5.0g
丙酮酸钠	2.0g
孟加拉红	40 mg
水解酪蛋白	5.0g
琼脂	17g
蒸馏水	1000 mL

A.3.2 制法

将上述成分混合，校正 pH7.4±0.1。于 121℃ 高压灭菌 15min，待冷至 45℃ 左右时，倾注平皿。

A.4 改良克氏双糖培养基

A.4.1 成分

蛋白胨	20g
牛肉膏	3g
酵母膏	3g
山梨醇	20g
葡萄糖	1g
氯化钠	5g
柠檬酸铁铵	0.5g
硫代硫酸钠	0.5g
琼脂	12g
酚红	0.025g
蒸馏水	1000mL

pH 7.4

A.4.2 制法

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中，校正 pH。加入 0.2% 的酚红(溶液 12.5 mL，摇匀，分装试管，装量宜多些，以便得到比较高的底层。121℃ 高压灭菌 15 min，放置高层

斜面备用。

A.5 糖发酵管

A.5.1 成分

牛肉膏	5g
蛋白胨	10g
氯化钠	3g
磷酸氢二钠	2g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12 mL
蒸馏水	1000 mL
pH 7.4	

A.5.2 制法

A.5.2.1 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，121℃ 高压灭菌 15 min。

A.5.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后，分装每瓶 100 mL，121℃ 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 100 mL 培养基内，以无菌操作分装小试管。

注：蔗糖不纯，加热后会自行水解者，应采用过滤法除菌。

A.5.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取少量培养物接种于 26℃ ± 1℃ 培养，一般观察 2 d~3 d。迟缓反应需观察 14 d~30 d。

A.6 鸟氨酸脱羧酶试验培养基

A.6.1 成分

蛋白胨	5g
酵母浸膏	3g
葡萄糖	1g
蒸馏水	1 000 mL
1.6% 溴甲酚紫-乙醇溶液	1 mL
L-鸟氨酸或 DL-鸟氨酸	0.5g / 100 mL 或 1g / 100 mL
pH 6.8	

A.6.2 制法

除鸟氨酸以外的成分加热溶解后，分装，每瓶 100 mL，分别加入鸟氨酸。L-鸟氨酸按 0.5% 加入，DL-鸟氨酸按 1% 加入。再校正 pH 至 6.8。对照培养基不加鸟氨酸。分装于无菌的小试管内，每管 0.5 mL，上面滴加一层液体石蜡，115℃ 高压灭菌 10 min。

A.6.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种，于 26℃ ± 1℃ 培养 18 h ~ 24 h，观察结果。鸟氨酸脱羧酶阳性者由于产碱，培养基呈紫色。阴性者无碱性产物，但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管为黄色。

A.7 半固体琼脂

A.7.1 成分

蛋白胨	1g
牛肉膏	0.3g
氯化钠	0.5g
琼脂	0.35g~0.4g
蒸馏水	100mL
pH 7.4	

A.7.2 制法

按以上成分配好，煮沸使溶解，并校正 pH。分装小试管，121℃ 高压灭菌 15 min，直立凝固备用。

注：供动力观察、菌种保存、H 抗原位相变异试验等用。

A.8 缓冲葡萄糖蛋白胨水(MR 和 V—P 试验用)

A.8.1 成分

磷酸氢二钾	5g
多胨	7g
葡萄糖	5g
蒸馏水	1000 mL
pH 7.0	

A.8.2 制法

溶化后校正 pH，分装试管，每管 1mL，121℃ 高压灭菌 15 min。

A.8.3 甲基红(MR)试验

自琼脂斜面挑取少量培养物接种本培养基中，于 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d~5 d，哈夫尼亚菌则应在 $22^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 培养。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。

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

A.8.4 V-P 试验

用琼脂培养物接种本培养基中，于 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d~4 d。哈夫尼亚菌则应在 $22^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 培养。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 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h 再进行观察。

A.9 碱处理液

A.9.1 0.5% 氯化钠溶液

氯化钠	0.5g
蒸馏水	100 mL
121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌	15 min

A.9.2 0.5% 氢氧化钾溶液

氢氧化钾	0.5g
蒸馏水	100 mL
121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌	15 min

A.9.3 制法

将 0.5% 氯化钠及 0.5% 氢氧化钾等量混合。

A.10 尿素培养基

A.10.1 成分

尿素	20.0g
酵母浸膏	0.1g
磷酸二氢钾	0.091g
磷酸氢二钠	0.095g
酚红	0.01g
蒸馏水	1000 mL

A.10.2 制法

将上述成分于蒸馏水中溶解，校正 pH 为 6.8 ± 0.2 。不要加热，过滤除菌，无菌分装于灭菌小试管中，每管为约 3 mL。

A.10.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种在尿素培养基， $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。尿素酶阳性者由于产碱而使培养基变为红色。

十三、志贺氏菌检验标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.5-2012 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验》

2 适用范围

本程序规定了食品中志贺氏菌 (*Shigella*) 的检验方法。

本程序适用于食品中志贺氏菌的检验。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

3.1 恒温培养箱： $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

3.2 冰箱： $2^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 。

3.3 膜过滤系统。

3.4 厌氧培养装置： $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

3.5 电子天平：感量 0.1 g。

3.6 显微镜： $10\times \sim 100\times$ 。

3.7 均质器。

3.8 振荡器。

3.9 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。

3.10 无菌锥形瓶：容量 100 mL、200 mL、500 mL、2000 mL 或无菌均质袋：容量 500 mL。

3.11 无菌培养皿：直径 90 mm。

3.12 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

3.13 全自动微生物生化鉴定系统。

4 培养基和试剂

4.1 志贺氏菌增菌肉汤：见附录 A 中 A.1。

4.2 麦康凯（MAC）琼脂：见附录 A 中 A.2。

4.3 木糖赖氨酸脱氧胆酸盐（XLD）琼脂：见附录 A 中 A.3。

4.4 三糖铁（TSI）琼脂：见附录 A 中 A.4。

4.5 营养琼脂斜面：见附录 A 中 A.5。

4.6 半固体管：见附录 A 中 A.6。

4.7 葡萄糖铵培养基：见附录 A 中 A.7。

4.8 尿素琼脂：见附录 A 中 A.8。

4.9 β -半乳糖苷酶培养基：见附录 A 中 A.9。

4.10 氨基酸脱羧酶试验培养基：见附录 A 中 A.10。

4.11 糖发酵管：见附录 A 中 A.11。

4.12 西蒙氏柠檬酸盐琼脂：见附录 A 中 A.12。

4.13 粘液酸盐培养基：见附录 A 中 A.13。

4.14 蛋白胨水、靛基质试剂：见附录 A 中 A.14。

4.15 志贺氏菌属诊断血清。

4.16 生化鉴定试剂盒。

5 检验程序

志贺氏菌检验程序见图 1。

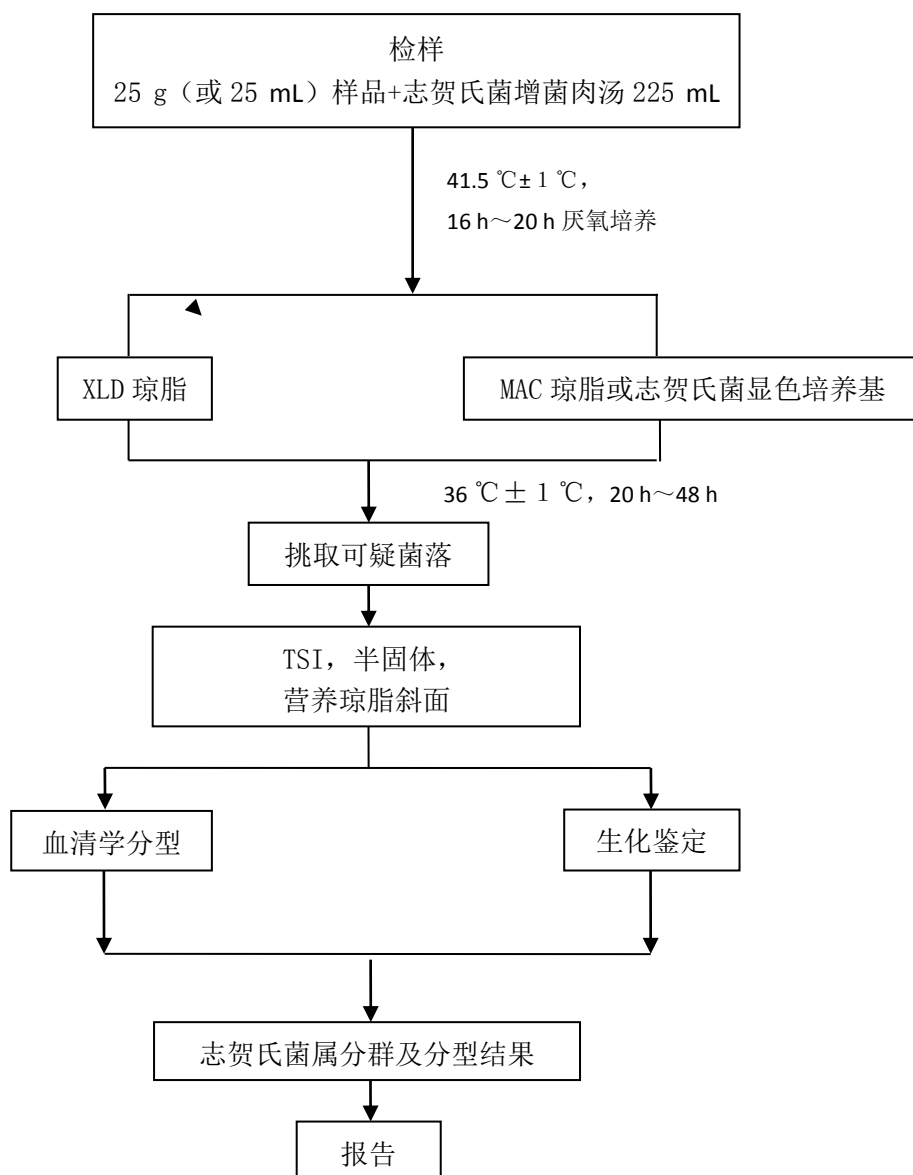


图 1 志贺氏菌检验程序

6 操作步骤

6.1 增菌

以无菌操作取检样 25g (或 25 mL)，加入装有灭菌 225 mL 志贺氏菌增菌肉汤的均质杯，用旋转刀片式均质器以 8 000~10 000 r/min 均质；或加入装有 225 mL 志贺氏菌增菌肉汤的均质袋中，用拍击式均质器连续均质 1 min~2 min。液体样品振荡混匀即可。于 41.5 °C ± 1 °C，16 h~20 h 厌氧培养。

6.2 分离

取增菌后的志贺氏增菌液分别划线接种于 XLD 琼脂平板和 MAC 琼脂平板或志贺氏菌显色培养基平板上，于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h~24 h，观察各个平板上生长的菌落形态，志贺氏菌在不同选择性琼脂平板上的菌落特征见表 1。宋内氏志贺氏菌的单个菌落直径大于其它志贺氏菌。若出现的菌落不典型或菌落较小不易观察，则继续培养至 48 h 再进行观察。

表 1 志贺氏菌在不同选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	志贺氏菌的菌落特征
MAC 琼脂	无色至浅粉红色，半透明、光滑、湿润、圆形、边缘整齐或不齐。
XLD 琼脂	粉红色至无色，半透明、光滑、湿润、圆形、边缘整齐或不齐。
志贺氏菌显色培养基	按照显色培养基的说明进行判定。

6.3 初步生化试验

6.3.1 自选择性琼脂平板上分别挑取 2 个以上典型或可疑菌落，分别接种 TSI、半固体和营养琼脂斜面各一管，置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h~24 h，分别观察结果。

6.3.2 凡是三糖铁琼脂中斜面产碱、底层产酸（发酵葡萄糖，不发酵乳糖，蔗糖）、不产气（福氏志贺氏菌 6 型可产生少量气体）、不产硫化氢、半固体管中无动力的菌株，挑取用 6.3.1 中已培养的营养琼脂斜面上生长的菌苔，进行生化试验和血清学分型。

6.4 生化试验及附加生化试验

6.4.1 生化试验

用 6.3.1 中已培养的营养琼脂斜面上生长的菌苔，进行生化试验，即 β -半乳糖苷酶，尿素，赖氨酸脱羧酶，鸟氨酸脱羧酶以及水杨苷和七叶苷的分解试验。除宋内氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌 13 型的鸟氨酸阳性；宋内氏菌和痢疾志贺氏菌 1 型，鲍氏志贺氏菌 13 型的 β -半乳糖苷酶为阳性以外，其余生化试验志贺氏菌属的培养物均为阴性结果。另外由于福氏志贺氏菌 6 型的生化特性和痢疾志贺氏菌或鲍氏志贺氏菌相似，必要时还需加做靛基质、甘露醇、棉子糖、甘油试验，也可做革兰氏染色检查和氧化酶试验，应为氧化酶阴性的革兰氏阴性杆菌。生化反应不符合的菌株，即使能与某种志贺氏菌分型血清发生凝集，仍不得判定为志贺氏菌属。志贺氏菌生化特性见表 2。

表 2 志贺氏菌属四个群的生化特征

生化反应	A 群: 痢疾志贺氏菌	B 群: 福氏志贺氏菌	C 群: 鲍氏志贺氏菌	D 群: 宋内氏志贺氏菌
β-半乳糖苷酶	-c	-	-c	+
尿素	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	-	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-	-a	+
水杨苷	-	-	-	-
七叶苷	-	-	-	-
靛基质	-/+	(+)	-/+	-
甘露醇	-	+b	+	+
棉子糖	-	+	-	+
甘油	(+)	-	(+)	d

注: +阳性; -阴性; -/+多数阴性; +/-多数阳性; (+) 迟缓阳性; d 有不同生化型

a 鲍氏 13 型为鸟氨酸阳性

b 福氏 4 型和 6 型常见甘露醇阴性变种

c 痢疾志贺 1 型和鲍氏 13 型为阳性

6.4.2 附加生化实验

由于某些不活泼的大肠埃希氏菌 (anaerogenic *E.coil.*)、A-D (Alkalescens-D isparbiotypes 碱性-异型) 菌的部分生化特征与志贺氏菌相似, 并能与某种志贺氏菌分型血清发生凝集; 因此前面生化实验符合志贺氏菌属生化特性的培养物还需另加葡萄糖胺、西蒙氏柠檬酸盐、粘液酸盐试验(36 °C 培养 24 h~48 h)。志贺氏菌属和大肠埃希氏菌的生化特性区别见表 3。

表 3 志贺氏菌属和不活泼大肠埃希氏菌、A-D 菌的生化特性区别

生化反应	A 群: 痢疾志贺氏菌	B 群: 福氏志贺氏菌	C 群: 鲍氏志贺氏菌	D 群: 宋内氏志贺氏菌	大肠埃希氏菌	A-D 菌
葡萄糖胺	-	-	-	-	+	+
西蒙氏柠檬酸盐	-	-	-	-	d	d

粘液酸盐	—	—	—	d	+	d
<p>注 1: +阳性; -阴性; d 有不同生化型</p> <p>注 2: 在葡萄糖铵、西蒙氏柠檬酸盐、粘液酸盐试验三项反应中志贺氏菌一般为阴性, 而不活泼的大肠埃希氏菌、A-D (碱性-异型) 菌至少有一项反应为阳性。</p>						

6.4.3 如选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统, 可根据 6.3.2 的初步判断结果, 用 6.3.1 中已培养的营养琼脂斜面上生长的菌苔, 使用生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。

6.5 血清学鉴定

6.5.1 抗原的准备

志贺氏菌属没有动力, 所以没有鞭毛抗原。志贺氏菌属主要有菌体 (O) 抗原。菌体 O 抗原又可分为型和群的特异性抗原。

一般采用 1.2%~1.5% 琼脂培养物作为玻片凝集试验用的抗原。

备注 1: 一些志贺氏菌如果因为 K 抗原的存在而不出现凝集反应时, 可挑取菌苔于 1 mL 生理盐水做成浓菌液, 100℃ 煮沸 15 min~60 min 去除 K 抗原后再检查。

备注 2: D 群志贺氏菌既可能是光滑型菌株也可能是粗糙型菌株, 与其他志贺氏菌群抗原不存在交叉反应。与肠杆菌科不同, 宋内氏志贺氏菌粗糙型菌株不一定会自凝。宋内氏志贺氏菌没有 K 抗原。

6.5.2 凝集反应

在玻片上划出 2 个约 1cm×2cm 的区域, 挑取一环待测菌, 各放 1/2 环于玻片上的每一区域上部, 在其中一个区域下部加 1 滴抗血清, 在另一区域下部加入 1 滴生理盐水, 作为对照。再用无菌的接种环或针分别将两个区域内的菌落研成乳状液。将玻片倾斜摇动混合 1 min, 并对着黑色背景进行观察, 如果抗血清中出现凝结成块的颗粒, 而且生理盐水中没有发生自凝现象, 那么凝集反应为阳性。如果生理盐水中出现凝集, 视作为自凝。这时, 应挑取同一培养基上的其他菌落继续进行试验。

如果待测菌的生化特征符合志贺氏菌属生化特征, 而其血清学试验为阴性的话, 则按 5.5.1 备注 1 进行试验。

6.5.3 血清学分型 (选做项目)

先用四种志贺氏菌多价血清检查, 如果呈现凝集, 则再用相应各群多价血清

分别试验。先用 B 群福氏志贺氏菌多价血清进行实验，如呈现凝集，再用其群和型因子血清分别检查，福氏志贺氏菌各型和亚型的型和群抗原鉴别见表 4。如果 B 群多价血清不凝集，则用 D 群宋内氏志贺氏菌血清进行实验，如呈现凝集，则用其 I 相和 II 相血清检查；如果 B、D 群多价血清都不凝集，则用 A 群痢疾志贺氏菌多价血清及 1~12 各型因子血清检查，如果上述三种多价血清都不凝集，可用 C 群鲍氏志贺氏菌多价检查，并进一步用 1~18 各型因子血清检查。

表 4 福氏志贺氏菌各型和亚型的型抗原和群抗原的鉴别表

型和亚型	型抗原	群抗原	在群因子血清中的凝集		
			3,4	6	7,8
1a	I	4	+	-	-
1b	I	(4), 6	(+)	+	-
2a	II	3,4	+	-	-
2b	II	7,8	-	-	+
3a	III	(3, 4) ,6,7,8	(+)	+	+
3b	III	(3,4) ,6	(+)	+	-
4a	IV	3,4	(+)	-	-
4b	IV	6	-	+	-
4c	IV	7,8	-	-	+
5a	V	3,4	(+)	-	-
5b	V	7,8	-	-	+
6	VI	4	+	-	-
X	-	7,8	-	-	+
Y	-	3,4	+	-	-

注：+凝集；-不凝集；（）有或无

6.6 结果报告

综合以上生化试验和血清学鉴定的结果，报告 25 g (mL) 样品中检出或未检出志贺氏菌。

附录 A 培养基和试剂

A.1 志贺氏菌增菌肉汤-新生霉素 (*Shigella* broth)

A.1.1 志贺氏菌增菌肉汤

A.1.1.1 成分

胰蛋白胨	20.0 g
葡萄糖	1.0 g
磷酸氢二钾	2.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
氯化钠	5.0 g
Tween 80	1.5 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

pH7.0±0.2

A.1.1.2 制法

将以上成分混合加热溶解,冷却至 25 °C 左右校正 pH 至 7.0±0.2,分装适当的容器,121 °C 灭菌 15 min。取出后冷却至 50 ~55 °C,加入除菌过滤的新生霉素溶液 (0.5 µg/mL),分装 225 mL 备用。(注:如不立即使用,在 2~8 °C 条件下可储存一个月。)

A.1.2 新生霉素溶液

A.1.2.1 成分

新生霉素	25.0 mg
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2.2 制法

将新生霉素溶解于蒸馏水中,用 0.22 µm 过滤膜除菌,如不立即使用,在 2~8 °C 条件下可储存一个月。

A.1.3 临用时每 225 mL 志贺氏菌增菌肉汤 (A1.1) 加入 5 mL 新生霉素溶液 (A1.2),混匀。

A.2 麦康凯琼脂 (MAC)

A.2.1 成分

蛋白胨	20.0 g
乳糖	10.0 g
3 号胆盐	1.5 g

氯化钠	5.0 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.001 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

pH7.2±0.2

A.2.2 制法

将以上成分混合加热溶解，冷却至 25 °C 左右校正 pH 至 7.2±0.2，分装，121 °C 高压灭菌 15min。冷却至 45 °C~50 °C，倾注平板。（注：如不立即使用，在 2 °C ~8 °C 条件下可储存二周。）

A.3 木糖赖氨酸脱氧胆盐（XLD）琼脂

A3.1 成分

酵母膏	3.0 g
L-赖氨酸	5.0 g
木糖	3.75 g
乳糖	7.5 g
蔗糖	7.5 g
脱氧胆酸钠	1.0 g
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	6.8 g
柠檬酸铁铵	0.8 g
酚红	0.08 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

pH7.4±0.2

A3.2 制法

除酚红和琼脂外，将其他成分加入 400mL 蒸馏水中，煮沸溶解，调节 pH。另将琼脂加入 600mL 蒸馏水中，煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后，再加入指示剂，待冷至 50 °C~55 °C 倾注平皿。

注：本培养基不需要高压灭菌，在制备过程中不宜过分加热，避免降低其选择性，贮于

室温暗处。本培养基宜于当天制备，第二天使用。使用前必须去除平板表面上的水珠，在 37~55 °C 温度下，琼脂面向下、平板盖亦向下烘干。另外如配制好的培养基不立即使用，在 2~8 °C 条件下可储存二周。

A4 三糖铁琼脂 (TSI)

A4.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁铵 $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	0.2 g
酚红	0.025 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

pH 7.4±0.2

A4.2 制法

除酚红和琼脂外，将其它成分加于 400 mL 蒸馏水中，搅拌均匀，静置约 10 min，加热使完全溶化，冷却至 25 °C 左右校正 pH 至 7.4±0.2。另将琼脂加于 600 mL 蒸馏水中，静置约 10 min，加热使完全溶化。将两溶液混合均匀，加入 5% 酚红水溶液 5 mL，混匀，分装小号试管，每管约 3 mL。于 121 °C 灭菌 15 min，制成高层斜面。冷却后呈桔红色。如不立即使用，在 2~8 °C 条件下可储存一个月。

A5 营养琼脂斜面

A5.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g

蒸馏水 1 000.0 mL

pH 7.0±0.2

A.5.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，加入 15%氢氧化钠溶液约 2 mL，冷却至 25 ℃左右校正 pH 至 7.0±0.2。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装小号试管，每管约 3 mL。于 121 ℃ 灭菌 15 min，制成斜面。（注：如不立即使用，在 2~8 ℃条件下可储存二周。）

A.6 半固体琼脂

A.6.1 成分

蛋白胨 1.0 g

牛肉膏 0.3 g

氯化钠 0.5 g

琼脂 0.3g~0.7g

蒸馏水 100.0 mL

pH7.4±0.2

A.6.2 制法

制法：按以上成分配好，加热溶解，并校正PH，分装小试管，灭菌121℃ 15min，直立凝固备用。

A.7 葡萄糖铵培养基

A.7.1 成分

氯化钠 5.0 g

硫酸镁 (MgSO₄·7H₂O) 0.2 g

磷酸二氢铵 1.0 g

磷酸氢二钾 1.0 g

葡萄糖 2.0 g

琼脂 20.0 g

0.2%溴麝香草酚蓝水溶液 40 mL

蒸馏水 1 000.0 mL

pH 6.8±0.2

A.7.2 制法

先将盐类和糖溶解于水内，校正pH，再加琼脂加热溶解，然后加入指示剂。混合均匀

后分装试管，121 ℃ 高压灭菌15 min。制成斜面备用。

A.7.3 试验方法

用接种针轻轻触及培养物的表面，在盐水管内做成极稀的悬液，肉眼观察不到混浊，以每一接种环内含菌数在 20~100 之间为宜。将接种环灭菌后挑取菌液接种，同时再以同法接种普通斜面一支作为对照。于 36 ℃±1 ℃ 培养 24 h。阳性者葡萄糖铵斜面上有正常大小的菌落生长；阴性者不生长，但在对照培养基上生长良好。如在葡萄糖铵斜面生长极微小的菌落可视为阴性结果。

注：容器使用前应用清洁液浸泡。再用清水、蒸馏水冲洗干净，并用新棉花做成棉塞，干热灭菌后使用。如果操作时不注意，有杂质污染时，易造成假阳性的结果。

A.8 尿素琼脂

A8.1 成分

蛋白胨	1.0 g
氯化钠	5.0 g
葡萄糖	1.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
0.4%酚红溶液	3 mL
琼脂	20.0 g
20%尿素溶液	100 mL
蒸馏水	900.0 mL

pH 7.2±0.1

A8.2 制法

除酚红和尿素外的其它成分加热溶解，冷却至25 ℃左右校正pH至7.2±0.1，加入酚红指示剂，混匀，于121 ℃灭菌15 min。冷至约55 ℃，加入用0.22 μm过滤膜除菌后的20%尿素水溶液100 mL，混匀，以无菌操作分装灭菌试管，每管约3~4 mL，制成斜面后放冰箱备用。

A8.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种，在 36 ℃±1 ℃ 培养 24 h，观察结果。尿素酶阳性者由于产碱而使培养基变为红色。

A9 β-半乳糖苷酶试验

A9.1 液体法（ONPG法）

A9.1.1 成分

邻硝基苯 β -D-半乳糖苷(ONPG)	60.0 mg
0.01mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.5)	10.0 mL
1%蛋白胨水(pH7.5)	30.0 mL

A9.1.2 制法

将ONPG溶于缓冲液内，加入蛋白胨水，以过滤法除菌，分装于10mm×75mm试管内，每管0.5mL，用橡皮塞塞紧。

A9.1.3 试验方法

自琼脂斜面挑取培养物一满环接种，于36 $^{\circ}\text{C}$ ±1 $^{\circ}\text{C}$ 培养1 h~3 h和24 h观察结果。如果 β -D-半乳糖苷酶产生，则于1 h~3 h变黄色，如无此酶则24 h不变色。

A.9.2 平板法 (X-Gal法)

A.9.2.1 成分

蛋白胨	20.0 g
氯化钠	3.0 g
5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-Gal)	200.0 mg
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.2±0.1	

A.9.2.2 制法

将上述各成分加热煮沸于1L水中，冷却至25 $^{\circ}\text{C}$ 左右校正pH至7.2±0.1，115 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌10 min。倾注平板避光冷藏备用。

A.9.2.3 试验方法

挑取琼脂斜面培养物接种于平板，划线和点种均可，于36 $^{\circ}\text{C}$ ±1 $^{\circ}\text{C}$ 培养18 h~24 h观察结果。如果 β -D-半乳糖苷酶产生，则平板上培养物颜色变蓝色，如无此酶则培养物为无色或不透明色，培养48 h~72 h后有部分转为淡粉红色。

A.10 氨基酸脱羧酶试验培养基

A.10.1 成分

蛋白胨	5.0g
酵母浸膏	3.0g
葡萄糖	1.0g

1.6% 溴甲酚紫-乙醇溶液	1.0mL
L-氨基酸或 DL-氨基酸	0.5g/100 mL 或 1.0g/100 mL
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 6.8±0.1	

A.10.2 制法

除氨基酸以外的成分加热溶解后，分装每瓶 100mL，分别加入各种氨基酸：赖氨酸和鸟氨酸。L-氨基酸按 0.5% 加入，DL-氨基酸按 1% 加入。再校正 pH 至 6.8±0.1。对照培养基不加氨基酸。分装于灭菌的小试管内，每管 0.5mL，上面滴加一层石蜡油，115℃ 高压灭菌 10min。

A.10.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种，于 36℃±1℃ 培养 18h~24h，观察结果。氨基酸脱羧酶阳性者由于产碱，培养基应呈紫色。阴性者无碱性产物，但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。阴性对照管应为黄色，空白对照管为紫色。

A.11 糖发酵管

A.11.1 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 (NA ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	2.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

pH 7.4±0.1

A.11.2 制法

A.11.2.1 葡萄糖发酵管按上述成分配好后，按 0.5% 加入葡萄糖，25℃ 左右校正 pH 至 7.4±0.1，分装于有一个倒置小管的小试管内，121℃ 高压灭菌 15min。

A.11.2.2 其它各种糖发酵管可按上述成分配好后，分装每瓶 100mL，121℃ 高压灭菌 15min。另将各种糖类分别配好 10% 溶液，同时高压灭菌。将 5mL 糖溶液加入于 100mL 培养基内，以无菌操作分装小试管。

注：蔗糖不纯，加热后会自行水解者，应采用过滤法除菌。

A.11.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取少量培养物接种，于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养，一般观察2d~3d。迟缓反应需观察14d~30d。

A.12 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.12.1 成分

氯化钠	5.0 g
硫酸镁 ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
磷酸二氢铵	1.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
柠檬酸钠	5.0 g
琼脂	20 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	40 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

pH 6.8 ± 0.2

A.12.2 制法

先将盐类溶解于水内，调至pH 6.8 ± 0.2 ，加入琼脂，加热溶化。然后加入指示剂，混合均匀后分装试管， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌15 min。制成斜面备用。

A.12.3 试验方法

挑取少量琼脂培养物接种，于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养4 d，每天观察结果。阳性者斜面上有菌落生长，培养基从绿色转为蓝色。

A.13 粘液酸盐培养基

A.13.1 测试肉汤

A.13.1.1 成分

酪蛋白胨	10.0 g
溴麝香草酚蓝溶液	0.024 g
蒸馏水	1 000.0 mL
粘液酸	10.0 g

A.13.1.2 制法

慢慢加入5N氢氧化钠以溶解粘液酸，混匀。

其余成分加热溶解，加入上述粘液酸，冷却至 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右校正pH至 7.4 ± 0.2 ，分装试管，每管

约5 mL, 于121 °C 高压灭菌10 min。

A.13.2 质控肉汤

A.13.2.1 成分

酪蛋白胨	10.0 g
溴麝香草酚蓝溶液	0.024 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.13.2.2 制法

所有成分加热溶解, 冷却至25 °C左右校正pH至7.4±0.2, 分装试管, 每管约5 mL, 于121 °C 高压灭菌10 min。

A 13.3 试验方法

将待测新鲜培养物接种测试肉汤 (A.13.1) 和质控肉汤 (A.13.2), 于36 °C±1 °C培养48 h观察结果, 肉汤颜色蓝色不变则为阴性结果, 黄色或稻草黄色为阳性结果。

A.14 蛋白胨水 (靛基质试验用)

A.14.1成分

蛋白胨(或胰蛋白胨)	20.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH7.4	

A.14.2 制法

按上述成分配制, 分装小试管, 121°C高压灭菌 15min。(注: 此试剂在 2 ~8 °C条件下可储存一个月。)

A.14.3 靛基质试剂

A.14.3.1 柯凡克试剂: 将 5g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 75 mL 戊醇中。然后缓慢加入浓盐酸 25 mL。

A.14.3.2 欧一波试剂: 将 1g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 95 mL 95%乙醇内。然后缓慢加入浓盐酸 20 mL。

A.14.4 试验方法

挑取少量培养物接种, 在 36±1 °C培养 1~2d, 必要时可培养 4d~5d。加入柯凡克试剂约 0.5 mL, 轻摇试管, 阳性者于试剂层呈深红色; 或加入欧一波试剂约 0.5 mL, 沿管壁流下, 覆盖于培养液表面, 阳性者于液面接触处呈玫瑰红色。

注：蛋白胨中应含有丰富的色氨酸。每批蛋白胨买来后，应先用已知菌种鉴定后方可使用，

此试剂在 2 ~8 °C 条件下可储存一个月。

十四、致泻大肠埃希氏菌检验标准操作程序

1 方法来源

GB4789.6-2016 《食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》

2 适用范围

本程序规定了食品中致泻大肠埃希氏菌的检验方法。

本程序适用于食品中致泻大肠埃希菌的检验。

3 术语和定义、缩略语

3.1 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- 3.1.1 DHEC: 致泻大肠埃希氏菌 *Diarrheagenic Escherichia coli*
- 3.1.2 EPEC: 肠道致病性大肠埃希氏菌 *Enteropathogenic Escherichia coli*
- 3.1.3 EIEC: 肠道侵袭性大肠埃希氏菌 *Enteroinvasive Escherichia coli*
- 3.1.4 ETEC: 产肠毒素大肠埃希氏菌 *Enterotoxigenic Escherichia coli*
- 3.1.5 STEC: 产志贺毒素大肠埃希氏菌 *Shiga toxin-producing Escherichia coli*
- 3.1.6 EHEC: 肠道出血性大肠埃希氏菌 *Enterohemorrhagic Escherichia coli*
- 3.1.7 EAEC: 肠道集聚性大肠埃希氏菌 *Enterocaggregative Escherichia coli*
- 3.1.8 *escV*: 蛋白分泌物调节基因, gene encoding LEE-encoded type III secretion system factor
- 3.1.9 *eae*: 紧密素基因, gene encoding intimin for *Escherichia coli* attaching and effacing
- 3.1.10 *bfpB*: 束状菌毛B基因, bundle-forming pilus B
- 3.1.11 *stxI*: 志贺毒素 I 基因, Shiga toxin one
- 3.1.12 *stx2*: 志贺毒素 II 基因, Shiga toxin two

- 3.1.13 *lt*: 热不稳定性肠毒素基因, heat-labile enterotoxin
- 3.1.14 *st*: 热稳定性肠毒素基因, heat-stable enterotoxin
- 3.1.15 *stp* (*stIa*): 猪源热稳定性肠毒素基因, heat-stable enterotoxins initially discovered in the isolates from pigs
- 3.1.16 *sth* (*stIb*): 人源热稳定性肠毒素基因, heat-stable enterotoxins initially discovered in the isolates from human
- 3.1.18 *ipaH*: 侵袭性质粒抗原H基因, invasive plasmid antigen H-gene
- 3.1.19 *aggR*: 集聚粘附菌毛调节基因, aggregative adhesive fimbriae regulator
- 3.1.20 *uidA*: β -葡萄糖苷酶基因, β -glucuronidase gene
- 3.1.21 *astA*: 集聚热稳定性毒素A基因, enteroaggregative heat-stable enterotoxin A
- 3.1.23 *LEE*: 肠细胞损伤基因座, Locus of enterocyte effacement
- 3.1.24 *EAF*: EPEC黏附因子, EPEC adhesive factor

3.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.2.1 致泻大肠埃希氏菌 *Diarrheagenic Escherichia coli*

一类能引起人体以腹泻症状为主的大肠埃希氏菌,可经过污染食物引起人类发病。常见的致泻大肠埃希氏菌主要包括肠道致病性大肠埃希氏菌、肠道侵袭性大肠埃希氏菌、产肠毒素大肠埃希氏菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌(包括肠道出血性大肠埃希氏菌)和肠道集聚性大肠埃希氏菌。

3.1.2 肠道致病性大肠埃希氏菌 *Enteropathogenic Escherichia coli*

能够引起宿主肠粘膜上皮细胞黏附及擦拭性损伤,且不产生志贺毒素的大肠埃希氏菌。该菌是婴幼儿腹泻的主要病原菌,有高度传染性,严重者可致死。EPEC的致病机制包括局限性粘附、信号传导和紧密粘附。其中,局限性粘附由存在于EAF质粒上的束状菌毛基因*bfp*介导,位于LEE毒力岛上的III型分泌系统编码基因*esc*参与信号传导,引起微绒毛结构消失;而紧密粘附由外膜蛋白紧密素介导,紧密素由*eae*基因编码。

3.1.3 肠道侵袭性大肠埃希氏菌 *Enteroinvasive Escherichia coli*

能够侵入肠道上皮细胞而引起痢疾样腹泻的大肠埃希氏菌。该菌不像典型的大肠埃希氏菌,无动力、不发生赖氨酸脱羧反应、不发酵乳糖,生化反应和抗原

结构均近似痢疾志贺氏菌。侵入上皮细胞的关键基因是侵袭性质粒上的抗原编码基因及其调控基因，如*ipaH*基因、*ipaR*基因（又称为*invE*基因）。

3.1.4 产肠毒素大肠埃希氏菌 *Enterotoxigenic Escherichia coli*

能够分泌热稳定性肠毒素或/和热不稳定性肠毒素的大肠埃希氏菌。热稳定性肠毒素按照来源不同分为猪源热稳定性肠毒素和人源热稳定性肠毒素，编码基因分别为*stp*（又称为*stIa*）和*sth*（又称为*stIb*）；热不稳定性肠毒素编码基因为*lt*。两种肠毒素基因在产肠毒素大肠埃希氏菌中可以单独存在，也可以同时存在。该菌可引起婴幼儿和旅游者腹泻，一般呈轻度水样腹泻，也可呈严重的霍乱样症状，低热或不发热。腹泻常为自限性，一般2~3天即自愈。

3.1.5 产志贺毒素大肠埃希氏菌 *Shiga toxin-producing Escherichia coli*（肠道出血性大肠埃希氏菌 *Enterohemorrhagic Escherichia coli*）

能够分泌志贺毒素、引起宿主肠粘膜上皮细胞黏附及擦拭性损伤的大肠埃希氏菌。志贺毒素的编码基因为*stx*，志贺毒素分为两种类型，其编码基因分别为*stx1*和*stx2*，相互间无免疫交叉反应。*stx1*和*stx2*在产志贺毒素大肠埃希氏菌中可以单独存在，也可以同时存在。宿主肠粘膜上皮细胞黏附及擦拭性损伤表现为微绒毛结构消失和紧密粘附，分别由*esc*编码的III型分泌系统和*eae*编码的紧密素介导。另外，有些产志贺毒素大肠埃希氏菌在临床上引起人类出血性结肠炎（HC）或血性腹泻，并可进一步发展为溶血性尿毒综合征（HUS），这类产志贺毒素大肠埃希氏菌为肠道出血性大肠埃希氏菌。

3.1.6 肠道集聚性大肠埃希氏菌 *Enteroaggregative Escherichia coli*

肠道集聚性大肠埃希氏菌不侵入肠道上皮细胞，但能引起肠道液体蓄积。不产生热稳定性肠毒素或热不稳定性肠毒素，也不产生志贺毒素。唯一特征是能对Hep-2细胞形成集聚性粘附，也称Hep-2细胞粘附性大肠埃希氏菌。

4 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

4.1 恒温培养箱：36℃±1℃，42℃±1℃；

4.2 冰箱：2℃~5℃；

4.3 恒温水浴箱：50℃±1℃，100℃或适配1.5mL或2.0mL金属浴（95℃~100℃）；

4.4 电子天平：感量0.1g，感量0.01g；

- 4.5 显微镜：10×~100×；
- 4.6 均质器；
- 4.7 振荡器；
- 4.8 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度），10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头；
- 4.9 无菌均质杯或无菌均质袋：容量 500 mL；
- 4.10 无菌培养皿：直径 90 mm；
- 4.11 pH 计或精密 pH 试纸；
- 4.12 微量离心管：1.5 mL 或 2.0 mL；
- 4.13 接种环：1 μ L；
- 4.14 低温高速离心机：转速 \geq 13000 rpm，控温 4℃~8℃；
- 4.15 微生物鉴定系统；
- 4.16 PCR 仪；
- 4.17 微量移液器及吸头：0.5 μ L~2 μ L，2 μ L~20 μ L，20 μ L~200 μ L，200 μ L~1000 μ L；
- 4.18 水平电泳仪：包括电源、电泳槽、制胶槽（长度 $>$ 10 cm）和梳子；
- 4.19 8 联排管和 8 联排盖（平盖/凸盖）；
- 4.20 凝胶成像仪。

5 培养基和试剂

- 5.1 营养肉汤：见附录 A 中 A.1。
- 5.2 肠道菌增菌肉汤：见附录 A 中 A.2。
- 5.3 麦康凯琼脂（MAC）：见附录 A 中 A.3。
- 5.4 伊红美蓝琼脂（EMB）：见附录 A 中 A.4。
- 5.5 三糖铁（TSI）琼脂：见附录 A 中 A.5。
- 5.6 蛋白胨水、靛基质试剂：见附录 A 中 A.6。
- 5.7 半固体琼脂：见附录 A 中 A.7。
- 5.8 尿素琼脂（pH 7.2）：见附录 A 中 A.8。
- 5.9 氰化钾（KCN）培养基：见附录 A 中 A.9。
- 5.10 氧化酶试剂：见附录 A 中 A.10。

- 5.11 革兰氏染色液：见附录 A 中 A.11。
- 5.12 BHI 肉汤：见附录 A 中 A.12。
- 5.13 福尔马林（含 38%~40% 甲醛）。
- 5.14 鉴定试剂盒。
- 5.15 灭菌去离子水。
- 5.16 0.85% 灭菌生理盐水。
- 5.17 TE(pH 8.0)：见附录 A 中 A.13。
- 5.18 10×PCR 反应缓冲液：见附录 A 中 A.14。
- 5.19 25 mmol/L MgCl₂。
- 5.20 dNTPs：dATP、dTTP、dGTP、dCTP 每种浓度为 2.5 mmol/L。
- 5.21 5 U/L Taq 酶。
- 5.22 引物。
- 5.23 50×TAE 电泳缓冲液：见附录 A 中 A.15。
- 5.24 琼脂糖。
- 5.25 溴化乙锭（EB）或其他核酸染料。
- 5.26 6×上样缓冲液：见附录 A 中 A.16。
- 5.27 Marker：分子量包含 100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1000bp、1500bp 条带。
- 5.28 致泻大肠埃希氏菌 PCR 试剂盒。

6 检验程序

致泻大肠埃希氏菌检验程序见图 1。

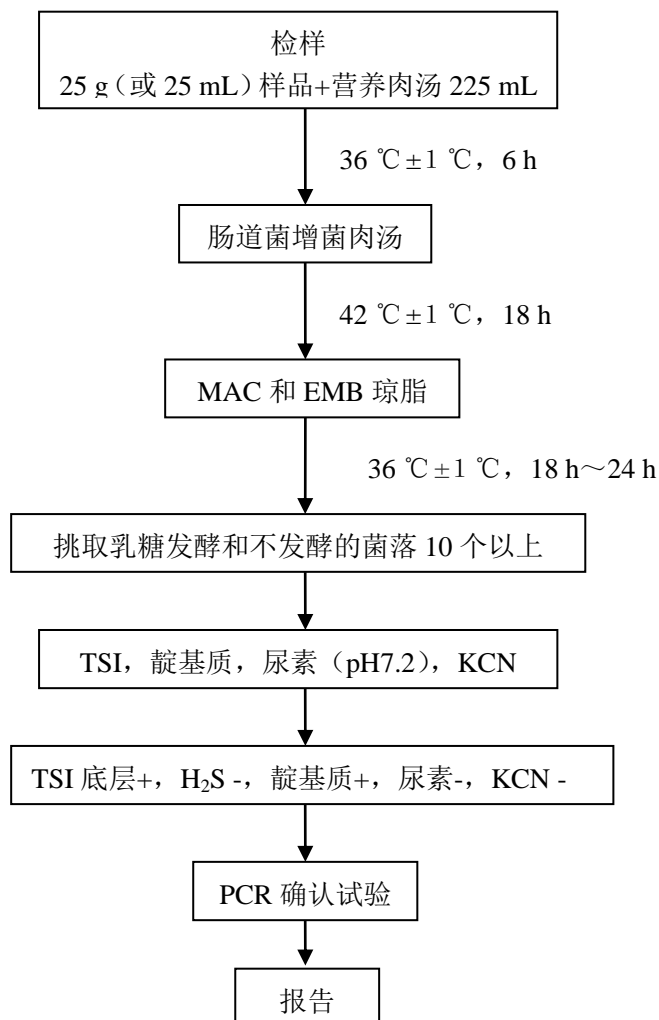


图 1 致泻大肠埃希氏菌检验程序

7 操作步骤

7.1 样品制备

7.1.1 固态或半固态样品

固体或半固态样品，以无菌操作称取检样 25 g，加入装有 225 mL 营养肉汤的均质杯中，用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min；或加入装有 225 mL 营养肉汤的均质袋中，用拍击式均质器均质 1 min~2 min。

7.1.2 液态样品

以无菌操作量取检样 25mL，加入装有 225 mL 营养肉汤的无菌锥形瓶(瓶内

可预置适当数量的无菌玻璃珠), 振荡混匀。

7.2 增菌

将 7.1 制备的样品匀液于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h。取 $10\text{ }\mu\text{L}$, 接种于 30 mL 肠道菌增菌肉汤管内, 于 $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h。

7.3 分离

将增菌液划线接种 MAC 和 EMB 琼脂平板, 于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h, 观察菌落特征。

在 MAC 琼脂平板上, 分解乳糖的典型菌落为砖红色至桃红色, 不分解乳糖的菌落为无色或淡粉色; 在 EMB 琼脂平板上, 分解乳糖的典型菌落为中心紫黑色带或不带金属光泽, 不分解乳糖的菌落为无色或淡粉色。

7.4 生化试验

7.4.1 选取平板上可疑菌落 10 个~20 个 (10 个以下全选), 应挑取乳糖发酵, 以及乳糖不发酵和迟缓发酵的菌落, 分别接种 TSI 斜面。同时将这些培养物分别接种蛋白胨水、尿素琼脂 (pH 7.2) 和 KCN 肉汤。于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

7.4.2 TSI 斜面产酸或不产酸, 底层产酸, 靛基质阳性, H_2S 阴性和尿素酶阴性的培养物为大肠埃希氏菌。TSI 斜面底层不产酸, 或 H_2S 、KCN、尿素有任一项为阳性的培养物, 均非大肠埃希氏菌。必要时做革兰氏染色和氧化酶试验。大肠埃希氏菌为革兰氏阴性杆菌, 氧化酶阴性。

7.4.3 如选择生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统, 可从营养琼脂平板上挑取经纯化的可疑菌落用无菌稀释液制备成浊度适当的菌悬液, 使用生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统进行鉴定。

7.5 PCR 确认试验

7.5.1 取生化反应符合大肠埃希氏菌特征的菌落进行 PCR 确认试验。

注: PCR 实验室区域设计、工作基本原则及注意事项应参照《疾病预防控制中心建设标准》(建标 127-2009) 和卫生部 (2010)《医疗机构临床基因扩增管理办法》附录 (医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则)。

7.5.2 DNA 模板准备

使用 $1\text{ }\mu\text{L}$ 接种环刮取营养琼脂平板或斜面上培养 18 h~24 h 的菌落, 悬浮在 $200\text{ }\mu\text{L}$ 0.85% 灭菌生理盐水中, 充分打散制成菌悬液, 于 13000 rpm 离心 3 min,

弃掉上清液。加入 1mL 灭菌去离子水充分混匀菌体，于 100℃ 水浴或者金属浴维持 10 min；冰浴冷却后，13000 rpm 离心 3 min，收集上清液；按 1:10 的比例用灭菌去离子水稀释上清液，取 2 μL 作为 PCR 检测的模板；所有处理后的 DNA 模板直接用于 PCR 反应或暂存于 4℃ 并当天进行 PCR 反应；否则，应在 -20℃ 以下保存备用（1 周内）。也可用细菌基因组提取试剂盒提取细菌 DNA，操作方法按照细菌基因组提取试剂盒说明书进行。

7.5.3 PCR 对照

每次 PCR 反应使用 EPEC、EIEC、ETEC、STEC/EHEC、EAEC 标准菌株作为阳性对照。同时，使用大肠埃希氏菌 ATCC 25922 或等效标准菌株作为阴性对照，以灭菌去离子水作为空白对照，控制 PCR 体系污染。致泻大肠埃希氏菌特征性基因见表 1。

表 1 五种致泻大肠埃希氏菌特征基因

致泻大肠埃希氏菌类别	特征性基因	
EPEC	<i>escV</i> 或 <i>eae</i> 、 <i>bfpB</i>	<i>uidA</i>
STEC/EHEC	<i>escV</i> 或 <i>eae</i> 、 <i>stx1</i> 、 <i>stx2</i>	
EIEC	<i>ipaH</i>	
ETEC	<i>lt</i> 、 <i>stp</i> 、 <i>sth</i>	
EAEC	<i>astA</i> 、 <i>aggR</i>	

7.5.4 PCR 反应体系配制

每个样品初筛需配置 12 个 PCR 扩增反应体系，对应检测 12 个目标基因，具体操作如下：使用 TE 溶液（pH 8.0）将合成的引物干粉稀释成 100 μmol/L 储存液。根据表 2 中每种目标基因对应 PCR 体系内引物的终浓度，使用灭菌去离子水配制 12 种目标基因扩增所需的 10×引物工作液（以 *uidA* 基因为例，如表 3）。将 10×引物工作液、10×PCR 反应缓冲液、25 mmol/L MgCl₂、2.5 mmol/L dNTPs、灭菌去离子水从 -20℃ 冰箱中取出，融化并平衡至室温，使用前混匀；5 U/μL Taq 酶在加样前从 -20℃ 冰箱中取出。每个样品按照表 4 的加液量配制 12 个 25 μL 反应体系，分别使用 12 种目标基因对应的 10×引物工作液。

表 2 五种致泻大肠埃希氏菌目标基因引物序列及每个 PCR 体系内的终浓度^b

引物名称	引物序列 ^c	菌株编号及对应 Genbank 编码	引物所在位置	终浓度 n ($\mu\text{mol/L}$)	PCR 产物 长度(bp)
<i>uidA-F</i>	5'-ATG CCA GTC CAG CGT TTT TGC-3'	<i>Escherichia coli</i> DH1Ec169 (accession no. CP012127.1)	1673870 - 1673890	0.2	1487
<i>uidA-R</i>	5'-AAA GTG TGG GTC AAT AAT CAG GAA GTG-3'		1675356 - 1675330	0.2	
<i>escV-F</i>	5'-ATT CTG GCT CTC TTC TTC TTT ATG GCT G-3'	<i>Escherichia coli</i> E2348/69 (accession no. FM180568.1)	4122765-4122738	0.4	544
<i>escV-R</i>	5'-CGT CCC CTT TTA CAA ACT TCA TCG C-3'		4122222-4122246	0.4	
<i>eae-F^a</i>	5'-ATT ACC ATC CAC ACA GAC GGT-3'	EHEC (accession no. Z11541.1)	2651-2671	0.2	397
<i>eae-R^a</i>	5'-ACA GCG TGG TTG GAT CAA CCT-3'		3047-3027	0.2	
<i>bfpB-F</i>	5'-GAC ACC TCA TTG CTG AAG TCG-3'	<i>Escherichia coli</i> E2348/69 (accession no. FM180569.1)	3796-3816	0.1	910
<i>bfpB-R</i>	5'-CCA GAA CAC CTC CGT TAT GC-3'		4702-4683	0.1	
<i>stx1-F</i>	5'-CGA TGT TAC GGT TTG TTA CTG TGA CAG C-3'	<i>Escherichia coli</i> EDL933 (accession no. AE005174.2)	2996445-2996418	0.2	244
<i>stx1-R</i>	5'-AAT GCC ACG CTT CCC AGA ATT G-3'		2996202-2996223	0.2	
<i>stx2-F</i>	5'-GTT TTG ACC ATC TTC GTC TGA TTA TTG AG-3'	<i>Escherichia coli</i> EDL933 (accession no. AE005174.2)	1352543-1352571	0.4	324
<i>stx2-R</i>	5'-AGC GTA AGG CTT CTG CTG TGA C-3'		1352866-1352845	0.4	
<i>lt-F</i>	5'-GAA CAG GAG GTT TCT GCG TTA GGT G-3'	<i>Escherichia coli</i> E24377A (accession no. CP000795.1)	17030-17054	0.1	655
<i>lt-R</i>	5'-CTT TCA ATG GCT TTT TTT TGG GAG TC-3'		17684-17659	0.1	
<i>stp-F</i>	5'-CCT CTT TTA GYC AGA CAR CTG AAT CAS TTG-3'	<i>Escherichia coli</i> EC2173 (accession no. AJ555214.1)///	1979-1950///14-43	0.4	157
<i>stp-R</i>	5'-CAG GCA GGA TTA CAA CAA AGT TCA CAG-3'	<i>Escherichia coli</i> F7682 (accession no. AY342057.1)	1823-1849///170-144	0.4	
<i>sth-F</i>	5'-TGT CTT TTT CAC CTT TCG CTC-3'	<i>Escherichia coli</i> E24377A (accession no. CP000795.1)	11389-11409	0.2	171
<i>sth-R</i>	5'-CGG TAC AAG CAG GAT TAC AAC AC-3'		11559-11537	0.2	
<i>ipaH-F</i>	5'-TTG ACC GCC TTT CCG ATA CC-3'	<i>Escherichia coli</i> 53638 (accession no. CP001064.1)	11471-11490	0.1	647
<i>ipaH-R</i>	5'-ATC CGC ATC ACC GCT CAG AC-3'		12117-12098	0.1	
<i>aggR-F</i>	5'-ACG CAG AGT TGC CTG ATA AAG-3'	<i>Escherichia coli</i> enteroaggregative 17-2	59-79	0.2	400

引物名称	引物序列 ^c	菌株编号及对应 Genbank 编码	引物所在位置	终浓度 n ($\mu\text{mol/L}$)	PCR 产物 长度(bp)
<i>aggR-R</i>	5'-AAT ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC-3'	(accession no. Z18751.1)	458-436	0.2	
<i>astA-F</i>	5'-TGC CAT CAA CAC AGT ATA TCC G-3'	<i>Escherichia coli</i> ECOR 33 (accession no. AF161001.1)	2--23	0.4	102
<i>astA-R</i>	5'-ACG GCT TTG TAG TCC TTC CAT-3'		103-83	0.4	
<i>16S</i>	5'-GGA GGC AGC AGT GGG	<i>Escherichia coli</i> strain ST2747 (accession no. CP007394.1)	149585-149603	0.25	
<i>rDNA-F</i>	AAT A-3'				1062
<i>16S</i>	5'-TGA CGG GCG GTG TGT		150645-150626	0.25	
<i>rDNA-R</i>	ACA AG-3'				

注： a: *escV* 和 *eae* 基因选作其中一个； b: 表中不同基因的引物序列可采用可靠性验证的其他序列代替。

表 3 每种目标基因扩增所需 10 \times 引物工作液配制表

引物名称	体积 (μL)
100 $\mu\text{mol/L}$ <i>uidA-F</i>	10 \times n
100 $\mu\text{mol/L}$ <i>uidA-R</i>	10 \times n
灭菌去离子水	100 - 2 \times (10 \times n)
总体积	100

注： n: 每条引物在反应体系内的终浓度（详见表 2）。

表 4 五种致泻大肠埃希氏菌目标基因扩增体系配制表

试剂名称	加样体积 (μL)
灭菌去离子水	12.1
10 \times PCR 反应缓冲液	2.5
25 mmol/L MgCl_2	2.5
2.5 mmol/L dNTPs	3.0
10 \times 引物工作液	2.5
5 U/ μL Taq 酶	0.4
DNA 模板	2.0
总体积	25

7.5.5 PCR 循环条件

预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 复性 63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min,

30 个循环；72 °C 延伸 5 min。将配制完成的 PCR 反应管放入 PCR 仪中，核查 PCR 反应条件正确后，启动反应程序。

7.5.6 电泳

称量 4.0 g 琼脂糖粉，加入至 200 mL 的 1×TAE 电泳缓冲液中，充分混匀。使用微波炉反复加热至沸腾，直到琼脂糖粉完全融化形成清亮透明的溶液。待琼脂糖溶液冷却至 60 °C 左右时，加入溴化乙锭（EB）至终浓度为 0.5 μg/mL，充分混匀后，轻轻倒入已放置好梳子的模具中，凝胶长度要大于 10 cm，厚度宜为 3 mm~5 mm。检查梳齿下或梳齿间有无气泡，用一次性吸头小心排掉琼脂糖凝胶中的气泡。

当琼脂糖凝胶完全凝结硬化后，轻轻拔出梳子，小心将胶块和胶床放入电泳槽中，样品孔放置在阴极端。向电泳槽中加入 1×TAE 电泳缓冲液，液面高于胶面 1 mm~2 mm。将 5 μL PCR 产物与 1 μL 6×上样缓冲液混匀后，用微量移液器吸取混合液垂直伸入液面下胶孔，小心上样于孔中；阳性对照的 PCR 反应产物加入到最后一个泳道；第一个泳道中加入 2 μL 分子量 Marker。

接通电泳仪电源，根据公式：电压=电泳槽正负极间的距离（cm）×5 V/cm 计算并设定电泳仪电压数值；启动电压开关，电泳开始以正负极铂金丝出现气泡为准。电泳 30 min~45 min 后，切断电源。取出凝胶放入凝胶成像仪中观察结果，拍照并记录数据。

7.5.7 结果判定

电泳结果中空白对照应无条带出现，阴性对照仅有 *uidA* 条带扩增，阳性对照中出现所有目标条带，PCR 试验结果成立。根据电泳图中目标条带大小，判断目标条带的种类，记录每个泳道中目标条带的种类，在表 5 中查找不同目标条带种类及组合所对应的致泻大肠埃希氏菌类别。

表 5 五种致泻大肠埃希氏菌目标条带与型别对照表

致泻大肠埃希氏菌类别	目标条带的种类组合	
EAEC	<i>aggR</i> , <i>astA</i> 中一条或一条以上阳性	
EPEC	<i>bfpB</i> (+/-), <i>escV</i> ^a (+), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (-)	

STEC/EHEC	<i>escV</i> ^a (+/-), <i>stx1</i> (+), <i>stx2</i> (-), <i>bfpB</i> (-) <i>escV</i> ^a (+/-), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (+), <i>bfpB</i> (-) <i>escV</i> ^a (+/-), <i>stx1</i> (+), <i>stx2</i> (+), <i>bfpB</i> (-)	<i>uidA</i> ^b (+/-)
ETEC	<i>lt</i> , <i>stp</i> , <i>sth</i> 中一条或一条以上阳性	
EIEC	<i>ipaH</i> (+)	

注：a：在判定 EPEC 或 SETC/EHEC 时，*escV* 与 *eae* 基因等效；b：97% 以上大肠埃希氏菌为 *uidA* 阳性。

7.5.8 如用商品化 PCR 试剂盒或多重聚合酶链反应 (MPCR) 试剂盒，应按照试剂盒说明书进行操作和结果判定。

8 结果与报告

根据生化试验、PCR 确认试验的结果，报告 25 g (或 25 mL) 样品中检出或未检出某类致泻大肠埃希氏菌。

附录 A 培养基和试剂

A.1 营养肉汤

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1000 mL
pH7.4±0.2	

A.1.2 制法

将以上成分混合加热溶解, 冷却至 25 °C 左右校正 pH 至 7.4±0.2, 分装适当的容器。

121 °C 灭菌 15 min。

A.1 肠道菌增菌肉汤

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	5.0 g
牛胆盐	20.0 g
磷酸氢二钠	8.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
煌绿	0.015 g
蒸馏水	1000 mL
pH7.2±0.2	

A.1.2 制法

将以上成分混合加热溶解, 冷却至 25 °C 左右校正 pH 至 7.2±0.2, 分装每瓶 30 mL。

115 °C 灭菌 20 min。

A.3 麦康凯琼脂 (MAC)

A.3.1 成分

蛋白胨	20.0 g
-----	--------

乳糖	10.0 g
3 号胆盐	1.5 g
氯化钠	5.0 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.001 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL
pH7.2±0.2	

A.3.2 制法

将以上成分混合加热溶解，冷却至 25 °C 左右校正 pH 至 7.2±0.2，分装。121°C 高压灭菌 15min。冷却至 45 °C~50 °C，倾注平板。

注：如不立即使用，在 2 °C~8 °C 条件下可储存二周。

A.4 伊红美蓝（EMB）琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
磷酸氢二钾（K ₂ HPO ₄ ）	2.0 g
琼脂	15.0 g
2%伊红 Y 水溶液	20.0 mL
0.5%美蓝水溶液	13.0 mL
蒸馏水	1000 mL
pH7.1±0.2	

A.4.2 制法

在1 000 mL蒸馏水中煮沸溶解蛋白胨、磷酸盐和乳糖，加水补足，冷却至25 °C左右校正pH至7.1±0.2。再加入琼脂， 121 °C高压灭菌15 min。冷至45 °C~50 °C，加入2%伊红Y水溶液和0.5%美蓝水溶液，摇匀，倾注平皿。

A.5 三糖铁琼脂（TSI）

A.5.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁铵	0.2 g
$[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$	
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	0.2 g
酚红	0.025 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1000 mL

pH 7.4±0.2

A.5.2 制法

除酚红和琼脂外，将其它成分加于 400 mL 水中，搅拌均匀，静置约 10 min，加热使完全溶化，冷却至 25 °C 左右校正 pH 至 7.4±0.2。另将琼脂加于 600 mL 水中，静置约 10 min，加热使完全溶化。将两溶液混合均匀，加入 5% 酚红水溶液 5 mL，混匀，分装小号试管，每管约 3 mL。于 121 °C 灭菌 15 min，制成高层斜面。冷却后呈桔红色。如不立即使用，在 2 °C ~8 °C 条件下可储存一个月。

A.6 蛋白胨水、靛基质试剂

A.6.1 成分

胰蛋白胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1000 mL

pH 7.4±0.2

A.6.2 制法

将以上成分混合加热溶解，冷却至 25 °C 左右校正 pH 至 7.4±0.2，分装小试管，121 °C 高压灭菌 15 min。

注：此试剂在 2 °C~8 °C 条件下可储存一个月。

A.6.3 靛基质试剂

A.6.3.1 柯凡克试剂：将 5 g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 75 mL 戊醇中。然后缓慢加入浓盐酸 25 mL。

A.6.3.2 欧一波试剂：将 1 g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 95 mL 95%乙醇内。然后缓慢加入浓盐酸 20 mL。

A.6.4 试验方法

挑取少量培养物接种，在 36 °C ±1 °C 培养 1 d~2 d，必要时可培养 4 d~5 d。加入柯凡克试剂约 0.5 mL，轻摇试管，阳性者于试剂层呈深红色；或加入欧一波试剂约 0.5 mL，沿管壁流下，覆盖于培养液表面，阳性者于液面接触处呈玫瑰红色。

A.7 半固体琼脂

A.7.1 成分

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	0.3g~0.5g
蒸馏水	100.0 mL
pH 7.4±0.2	

A.7.2 制法

按以上成分配好，加热溶解，冷却至25 °C左右校正pH至 7.4 ± 0.2，分装小试管。121 °C 灭菌 15 min，直立凝固备用。

A.8 尿素琼脂 (pH 7.2)

A.8.1 成分

蛋白胨	1.0 g
氯化钠	5.0 g
葡萄糖	1.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
0.4%酚红	3.0 mL

琼脂	20.0 g
20%尿素溶液	100.0 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH7.2±0.2	

A.8.2 制法

除酚红和尿素外的其他成分加热溶解，冷却至25℃左右校正pH至7.2±0.2，加入酚红指示剂，混匀，于121℃灭菌15 min。冷至约55℃，加入用0.22 μm过滤膜除菌后的20%尿素水溶液100 mL，混匀，以无菌操作分装灭菌试管，每管约3 mL~4 mL，制成斜面后放冰箱备用。

A.8.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种，在36℃±1℃培养24 h，观察结果。尿素酶阳性者由于产碱而使培养基变为红色。

A.9 氰化钾（KCN）培养基

A.9.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	0.225 g
磷酸氢二钠	5.64 g
0.5%氰化钾	20.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

将除氰化钾以外的成分加入蒸馏水中，煮沸溶解，分装后121℃高压灭菌15 min。放在冰箱内使其充分冷却。每100 mL培养基加入0.5%氰化钾溶液2.0 mL（最后浓度为1:10 000），分装于无菌试管内，每管约4 mL，立刻用无菌橡皮塞塞紧，放在4℃冰箱内，至少可保存两个月。同时，将不加氰化钾的培养基作为对照培养基，分装试管备用。

A.9.3 试验方法

将琼脂培养物接种于蛋白胨水内成为稀释菌液，挑取 1 环接种于氰化钾（KCN）培养基。并另挑取 1 环接种于对照培养基。在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1 d~2 d，观察结果。如有细菌生长即为阳性（不抑制），经 2 d 细菌不生长为阴性（抑制）。

注:氰化钾是剧毒药，使用时应小心，切勿沾染，以免中毒。夏天分装培养基应在冰箱内进行。试验失败的主要原因是封口不严，氰化钾逐渐分解，产生氢氰酸气体逸出，以致药物浓度降低，细菌生长，因而造成假阳性反应。试验时对每一环节都要特别注意。

A.10 氧化酶试剂

A.10.1 成分

N,N'-二甲基对苯二胺盐酸盐或	1.0 g
N,N,N',N'-四甲基对苯二胺盐酸盐	
蒸馏水	100 mL

A.10.2 制法

少量新鲜配制，于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内避光保存，在 7d 内使用。

A.10.3 试验方法

用无菌棉拭子取单个菌落，滴加氧化酶试剂，10s内呈现粉红或紫红色即为氧化酶试验阳性，不变色者为氧化酶试验阴性。

A.11 革兰氏染色液

A.11.1 结晶紫染色液

A.11.1.1 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.11.1.2 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.11.2 革兰氏碘液

A.11.2.1 成分

碘	1.0 g
---	-------

碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.11.2.2 制法

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

A.11.3 沙黄复染液

A.7.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10mL
蒸馏水	90mL

A.11.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.11.4 染色法

A.11.4.1 涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染液,染 1min,水洗。

A.11.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1min,水洗。

A.11.4.3 滴加 95%乙醇脱色约 15s~30s,直至染色液被洗掉,不要过分脱色,水洗。

A.11.4.4 滴加复染液,复染 1min,水洗、待干、镜检。

A.12 BHI 肉汤

A.12.1 成分

小牛脑浸液	200 g
牛心浸液	250 g
蛋白胨	10.0 g
NaCl	5.0 g
葡萄糖	2.0 g
磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄)	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4±0.2	

A.12.2 制法

按以上成分配好,加热溶解,冷却至25℃左右校正pH至 7.4±0.2,分装小试管。121℃灭菌 15 min。

A.13 TE(pH 8.0)

A.13.1 成分

1 mol/L Tris-HCl (pH8.0)	10 mL
0.5 mol/L EDTA (pH8.0)	2 mL
灭菌去离子水	988 mL

A.13.2 制法

将1 mol/L Tris-HCl缓冲液 (pH 8.0)、0.5 mol/L EDTA溶液 (pH 8.0) 加入约 800 mL 灭菌去离子水均匀, 再定容至1000 mL, 121 °C 高压灭菌15 min, 4 °C 保存。

A.14 10×PCR 反应缓冲液

A.14.1 成分

1 mol/L Tris-HCl (pH8.5)	840 mL
氯化钾 (KCl)	37.25 g
灭菌去离子水	160 mL

A.14.2 制法

将氯化钾溶于1 mol/L Tris-HCl (pH8.5), 定容至1000 mL, 121 °C 高压灭菌15 min, 分装后-20°C 保存。

A.15 50×TAE 电泳缓冲液

A.15.1 成分

Tris	242.0 g
EDTA-2Na (Na ₂ EDTA 2H ₂ O)	37.2 g
冰乙酸 (CH ₃ COOH)	57.1 mL
灭菌去离子水	942.9 mL

A.15.2 制法

Tris和EDTA-2Na溶于800mL灭菌去离子水, 充分搅拌均匀; 加入冰乙酸, 充分溶解; 用NaOH调pH至8.3, 定容至1 L后, 室温保存。使用时稀释50倍即为1×TAE电泳缓冲液。

A.16 6×上样缓冲液

A.16.1 成分

溴酚蓝	0.5 g
二甲苯氰 FF	0.5 g
0.5 mol/L EDTA (pH8.0)	0.06 mL
甘油	360 mL
灭菌去离子水	640 mL

A.16.2 制法

0.5 mol/L EDTA (pH8.0)溶于500 mL灭菌去离子水中,加入溴酚蓝和二甲苯氰FF溶解,与甘油混合,定容至1000 mL,分装后4℃保存。

十五、产气荚膜梭菌检验标准操作程序

1 方法来源

GB 4789.13-2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验》

2 适用范围

本程序规定了食品中产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 的检验方法。

本程序适用于食品中产气荚膜梭菌的检验。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 3.1 恒温培养箱: 36℃±1℃。
- 3.2 冰箱: 2℃~5℃。
- 3.3 恒温水浴箱: 50℃±1℃, 46℃±0.5℃。
- 3.4 天平: 感量 0.1 g。
- 3.5 均质器。
- 3.6 显微镜: 10×~100×。
- 3.7 无菌吸管: 1 mL (具 0.01 mL 刻度)、10 mL (具 0.1 mL 刻度) 或微量移液器及吸头。

- 3.8 无菌试管：18mm×180mm。
- 3.9 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 3.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 3.11 厌氧培养装置。

4 培养基和试剂

- 4.1 胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸（TSC）琼脂：见附录 A 中 A.1。
- 4.2 液体硫乙醇酸盐培养基（FTG）：见附录 A 中 A.2。
- 4.3 缓冲动力-硝酸盐培养基：见附录 A 中 A.3。
- 4.4 乳糖-明胶培养基：见附录 A 中 A.4。
- 4.5 含铁牛乳培养基：见附录 A 中 A.5。
- 4.6 0.1%蛋白胨水：见附录 A 中 A.6。
- 4.7 革兰氏染色液：见附录 A 中 A.7。
- 4.8 硝酸盐还原试剂：见附录 A 中 A.8。
- 4.9 缓冲甘油-氯化钠溶液：见附录 A 中 A.9。

5 检验程序

产气荚膜梭菌检验程序见图 1。

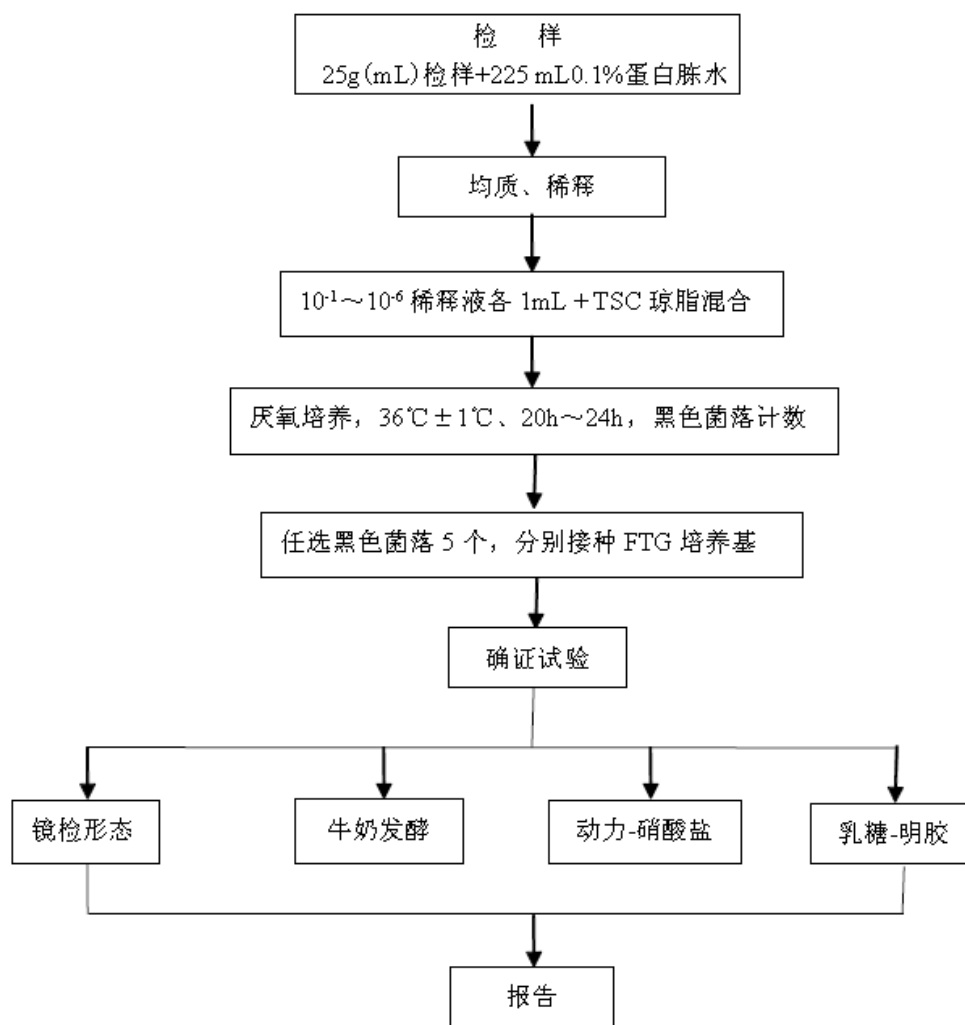


图 1 产气荚膜梭菌检验程序

6 操作步骤

6.1 样品制备

6.1.1 样品采集后应尽快检验，若不能及时检验，可在 2℃~5℃ 保存；如 8h 内不能进行检验，应以无菌操作称取 25 g (mL) 样品加入等量缓冲甘油-氯化钠溶液（液体样品应加双料），并尽快至于 -60℃ 低温冰箱中冷冻保存或加干冰保存。

6.1.2 以无菌操作称取 25 g (mL) 样品放入含有 225 mL 0.1% 蛋白胨水（如为 6.1.1 中冷冻保存样品，室温解冻后，加入 200 mL 0.1% 蛋白胨水）的均质袋中，在拍击式均质器上连续均质 1 min~2 min；或置于盛有 225 mL 0.1% 蛋白胨水的均质杯中，8000 r/min~10000 r/min 均质 1min~2 min，作为 1:10 稀释液。

6.1.3 以上述 1:10 稀释液按 1 mL 加 0.1% 蛋白胨水 9 mL 制备 10^{-2} ~ 10^{-6} 的系列

稀释液。

6.2 培养

6.2.1 吸取各稀释液 1 mL 加入无菌平皿内，每个稀释度做两个平行。每个平皿倾注冷却至 50℃ 的 TSC 琼脂（可放置于 50℃ ±1℃ 恒温水浴箱中保温）15 mL，缓慢旋转平皿，使稀释液和琼脂充分混匀。

6.2.2 上述琼脂平板凝固后，再加 10 mL 冷却至 50℃ 的 TSC 琼脂（可放置于 50℃ ±1℃ 恒温水浴箱中保温）均匀覆盖平板表层。

6.2.3 待琼脂凝固后，正置于厌氧培养装置内，36℃ ±1℃ 培养 20h~24h。

6.2.4 典型的产气荚膜梭菌在 TSC 琼脂平板上为黑色菌落。

6.3 确证试验

6.3.1 从单个平板上任选 5 个（小于 5 个全选）黑色菌落，分别接种到 FTG 培养基，36℃ ±1℃ 培养 18h~24h。

6.3.2 用上述培养液涂片，革兰氏染色镜检并观察其纯度。产气荚膜梭菌为革兰氏阳性粗短的杆菌，有时可见芽孢体。如果培养液不纯，应划线接种 TSC 琼脂平板进行分纯，36℃ ±1℃ 厌氧培养 20h~24h，挑取单个典型黑色菌落接种到 FTG 培养基，36℃ ±1℃ 培养 18h~24h，用于后续的确证试验。

6.3.3 取生长旺盛的 FTG 培养液 1 mL 接种于含铁牛乳培养基，在 46℃ ±0.5℃ 水浴中培养 2h 后，每小时观察一次有无“暴烈发酵”现象，该现象的特点是乳凝结物破碎后快速形成海绵样物质，通常会上升到培养基表面。5h 内不发酵者为阴性。产气荚膜梭菌发酵乳糖，凝固酪蛋白并大量产气，呈“暴烈发酵”现象，但培养基不变黑。

6.3.4 用接种环（针）取 FTG 培养液穿刺接种缓冲动力-硝酸盐培养基，于 36℃ ±1℃ 培养 24h。在透射光下检查细菌沿穿刺线的生长情况，判定有无动力。有动力的菌株沿穿刺线呈扩散生长，无动力的菌株只沿穿刺线生长。然后滴加 0.5 mL 试剂甲和 0.2 mL 试剂乙以检查亚硝酸盐的存在。15 min 内出现红色者，表明硝酸盐被还原为亚硝酸盐；如果不出现颜色变化，则加少许锌粉，放置 10 min，出现红色者，表明该菌株不能还原硝酸盐。产气荚膜梭菌无动力，能将硝酸盐还原为亚硝酸盐。

6.3.5 用接种环（针）取 FTG 培养液穿刺接种乳糖-明胶培养基，于 36℃ ±1℃

培养 24h，观察结果。如发现产气和培养基由红变黄，表明乳糖被发酵并产酸。将试管于 5℃ 左右放置 1h，检查明胶液化情况。如果培养基是固态，于 36℃ ±1℃ 再培养 24h，重复检查明胶是否液化。产气荚膜梭菌能发酵乳糖，使明胶液化。

7 结果与报告

7.1 典型菌落计数

选取典型菌落数在 20 CFU~200 CFU 之间的平板，计数典型菌落数。如果：

a) 只有一个稀释度平板的典型菌落数在 20 CFU~200 CFU 之间，计数该稀释度平板上的典型菌落；

b) 最低稀释度平板的典型菌落数均小于 20 CFU，计数该稀释度平板上的典型菌落；

c) 某一稀释度平板的典型菌落数均大于 200 CFU，但下一稀释度平板上没有典型菌落，应计数该稀释度平板上的典型菌落；

d) 某一稀释度平板的典型菌落数均大于 200 CFU，且下一稀释度平板上有典型菌落，但其平板上的典型菌落数不在 20 CFU~200 CFU 之间，应计数该稀释度平板上的典型菌落；

e) 2 个连续稀释度平板的典型菌落数均在 20 CFU~200 CFU 之间，分别计数 2 个稀释度平板上的典型菌落。

7.2 结果计算

6.1 计数结果按公式（1）计算：

$$T = \frac{\sum \left(A \frac{B}{C} \right)}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

T — 样品中产气荚膜梭菌的菌落数；

A — 单个平板上典型菌落数；

B — 单个平板上经确证试验为产气荚膜梭菌的菌落数；

C — 单个平板上用于确证试验的菌落数；

n₁ — 第一稀释度（低稀释倍数）经确证试验有产气荚膜梭菌的平板个数；

n_2 —第二稀释度（高稀释倍数）经确证试验有产气荚膜梭菌的平板个数；

0.1—稀释系数；

d —稀释因子（第一稀释度）。

7.3 报告

根据 TSC 琼脂平板上产气荚膜梭菌的典型菌落数，按照 6.2 中公式计算，报告每 g（mL）样品中产气荚膜梭菌数，报告单位以 CFU/g（mL）表示；如 T 值为 0，则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

附录 A 培养基和试剂

A.1 胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸 (TSC) 琼脂

A.1.1 基础成分

胰胨	15.0 g
大豆胨	5.0 g
酵母粉	5.0 g
焦亚硫酸钠	1.0 g
柠檬酸铁铵	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	900.0 mL

pH7.6±0.2

A.1.2 D-环丝氨酸溶液

溶解 1 g D-环丝氨酸于 200 mL 蒸馏水，膜过滤除菌后，于 4 °C 冷藏保存备用。

A.1.3 制法

将基础成分加热煮沸至完全溶解，调节 pH，分装到 500 mL 烧瓶中，每瓶 250 mL，121 °C 高压灭菌 15 min，于 50 °C ±1 °C 保温备用。临用前每 250 mL 基础溶液中加入 20 mL D-环丝氨酸溶液，混匀，倾注平皿。

A.2 液体硫乙醇酸盐培养基 (FTG)

A.2.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
L-胱氨酸	0.5 g
酵母粉	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
氯化钠	2.5 g
硫乙醇酸钠	0.5 g
刃天青	0.001 g
琼脂	0.75 g
蒸馏水	1 000.0 mL

pH7.1±0.2

A.2.2 制法

将以上成分加热煮沸至完全溶解，冷却后调节 pH，分装试管，每管 10 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。临用前煮沸或流动蒸汽加热 15 min，迅速冷却至接种温度。

A.3 缓冲动力-硝酸盐培养基

A3.1 成分

蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	3.0 g
硝酸钾	5.0 g
磷酸氢二钠	2.5 g
半乳糖	5.0 g
甘油	5.0 mL
琼脂	3.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH7.3±0.2	

A3.2 制法

将以上成分加热煮沸至完全溶解，调节 pH，分装试管，每管 10 mL，121°C 高压灭菌 15 min。如果当天不用，置 4°C 左右冷藏保存。临用前煮沸或流动蒸汽加热 15 min，迅速冷却至接种温度。

A4 乳糖-明胶培养基

A4.1 成分

蛋白胨	15.0 g
酵母粉	10.0 g
乳糖	10.0 g
酚红	0.05 g
明胶	120.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.5±0.2	

A4.2 制法

加热溶解蛋白胨、酵母粉和明胶于 1000 mL 蒸馏水中，调节 pH，加入乳糖和酚红。分装试管，每管 10 mL，121°C 高压灭菌 10 min。如果当天不用，置 4°C 左右冷藏保存。临用

前煮沸或流动蒸汽加热 15 min，迅速冷却至接种温度。

A5 含铁牛乳培养基

A5.1 成分

新鲜全脂牛奶	1 000.0 mL
硫酸亚铁 (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	1.0 g
蒸馏水	50.0 mL

A.5.2 制法

将硫酸亚铁溶于蒸馏水中，不断搅拌，缓慢加入 1000 mL 牛奶中，混匀。分装大试管，每管 10 mL，118℃ 高压灭菌 12 min。本培养基必须新鲜配制

A.6 0.1% 蛋白胨水

A.6.1 成分

蛋白胨	1.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

pH7.0±0.2

A.6.2 制法

加热溶解，调节pH，121℃ 高压灭菌15 min。

A.7 革兰氏染色液

A.7.1 结晶紫染色液

A.7.1.1 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.7.1.2 制法

将结晶紫完全溶于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.7.2 革兰氏碘液

A.7.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

A.7.2.2 制法

将碘与碘化钾先混合，加入蒸馏水少许振摇，待完全溶解后，再加入蒸馏水至300 mL。

A.7.3 沙黄复染液

A.7.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.7.3.2 制法

将沙黄溶解于95%乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.7.4 染色方法

涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染液，染色1 min，水洗。滴加革兰氏碘液，作用1 min，水洗。滴加95%乙醇脱色约15s~30s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗。滴加沙黄复染液，复染1 min，水洗、待干、镜检。

A.8 硝酸盐还原试剂

A.8.1 甲液（对氨基苯磺酸溶液）

在1 000 mL 5 mol/L乙酸中溶解8 g对氨基苯磺酸。

A.8.2 乙液（ α -萘酚乙酸溶液）

在1 000 mL 5 mol/L 乙酸中溶解5 g α -萘酚。

A.9 缓冲甘油-氯化钠溶液

A.9.1 成分

甘油	100.0 mL
氯化钠	4.2 g
磷酸氢二钾	12.4 g
磷酸二氢钾	4.0 g
蒸馏水	900.0 mL

pH7.2±0.1

A.9.2 制法

将以上成分加热至完全溶解，调节pH，121℃高压灭菌15 min。配制双料缓冲甘油溶液时，用甘油200 mL和蒸馏水800 mL。

第四节 病毒检验标准操作程序

诺如病毒检验标准操作程序

1 方法来源

ISO/TS 15216-2 Microbiology of food and animal feed-Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR

2 适用范围

本程序规定了双壳贝类中诺如病毒的检测方法。

本程序适用于双壳贝类中诺如病毒的检测。

3 术语和定义

诺如病毒（Norovirus, NV）是引起全世界所有年龄组人群急性胃肠炎暴发流行的重要病原之一。属杯状病毒科，诺如病毒属单股正链RNA病毒，其基因组长度为7 kb~7.5 kb，病毒直径约为26 nm~35 nm，无包膜，表面粗糙，球形，呈二十面体对称；电镜下缺乏显著的形态学特征，负染色电镜照片显示，NV是具有典型的羽状外缘，表面有凹痕的小圆状结构病毒。

4 方法原理

双壳贝类中的诺如病毒，经蛋白酶K消化和病毒RNA提取纯化，获得诺如病毒RNA，应用荧光RT-PCR方法进行检测。

5 设备和材料

5.1 无菌平皿

5.2 50mL 离心管

5.3 15mL 离心管

5.4 各种规格的带滤芯的枪头

5.5 剪刀

5.6 镊子

5.7 研磨棒

5.8 荧光 PCR 仪（CFX96）

5.9 高压灭菌器

5.10 恒温振荡器（培英 THZ-C-1）

5.11 电热恒温水浴箱（Julabo EC-5）

5.12 普通离心机（KUBOTA8410）

5.13 台式高速离心机（Eppendorf 5415D）

5.14 震荡混匀器 (IKA MS-1)。

6 试剂

除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯,并不含RNA酶。

6.1 无水乙醇 (分析纯)

6.2 蛋白酶 K (配制方法:取 100mg/瓶的蛋白酶 K (30U/mg) 粉剂,加入 2.5ml 20mM/L CaCl₂ 溶解,加入 2.5ml 甘油,混匀,终浓度为 20mg/mL, -20℃ 长期储存。)

6.3 PBS 缓冲液 (pH7.2)

6.4 门果病毒或噬菌体 MS2 试剂盒

6.5 RNA 提取试剂盒

6.6 RNA Ultrasense One-step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen)

6.7 诺如病毒检测引物及探针

GG1

GG1F: CGC TGG ATG CGN TTC CAT

GG1R: CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC

FAM-TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT-TAMRA

GG2

GG2F: ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA

GG2R: TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA

FAM-AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG-TAMRA

7 操作步骤

7.1 采样

建议于实验当日清晨采集新鲜的贝类样品。

7.2 样品的运输与保存

储存和运输过程中保持样品温度在 0℃~5℃ 或常温迅速运送到实验室。实验室接到样品后应尽快进行检测。如果暂时不能检测应将样品保存于 -80℃ 冰箱中。

7.3 贝类样品的前处理

7.3.1 取 5-10 个独立贝类样本消化腺体,置于无菌平皿内,将消化腺剪碎后放入 50mL 离心管,研磨杵仔细研磨至均质;

- 7.3.2 称取其中2g消化腺，置于另一个干净的15mL离心管中；
- 7.3.3 加入10 μ L门果病毒或（噬菌体MS2）（过程控制对照）；
- 7.3.4 离心管中加入2mL的PBS溶液，加入10 μ L 20mg/mL的蛋白酶K溶液；
- 7.3.5 37 $^{\circ}$ C，280 rpm剧烈震荡60min；
- 7.3.6 60 $^{\circ}$ C水浴15min；
- 7.3.7 室温3000rpm离心5min，取上清1mL于EP管中，放入-20 $^{\circ}$ C冻存，等待提取其中的病毒RNA。

7.4 诺如病毒RNA的提取方法

RNA 提取试剂盒（QIAamp Viral RNA Mini kit 52904）（按照试剂盒的操作说明进行操作）

7.4.1 打开试剂盒，取1mL Buffer AVL加入到装有Carrier RNA的试管中，充分溶解后，全部转移至装有Buffer AVL的瓶中，充分混匀后，分装于1.5mL的EP管中，560 μ L/管，4 $^{\circ}$ C存放备用。

7.4.2 提取病毒RNA时，每个样品取1支装有560 μ L Carrier RNA的EP管，于75 $^{\circ}$ C-80 $^{\circ}$ C水浴加热2~5分钟，边加热边震荡EP管，使EP管中的结晶全部溶解，置于室温下放置2~5分钟，使EP管中的液体降至室温。继而加入150 μ L样品提取液，涡旋震荡30秒，使样品提取液与EP管中的Carrier RNA充分混合，然后放置室温静置10分钟。

7.4.3 在上述EP管中加入560 μ L无水乙醇，涡旋混匀30秒后，8000rpm瞬时离心30秒，将管壁上部的液体合并于底部。此时管内液体为1270 μ L。

7.4.4 将上述管内液体分两次（每次约为635 μ L）转入QIAamp离心柱中，每次转入液体后盖上离心柱盖子，8000rpm离心1分钟。每次离心完成后，更换新的废液收集管，以便进行下次液体的离心。

7.4.5 小心打开QIAamp离心柱的盖子，加入500 μ L Buffer AW1洗液（已按说明书要求向Buffer AW1瓶中加入合适比例的乙醇），盖上盖子，8000rpm离心1分钟，离心完成后，更换新的废液收集管。

7.4.6 小心打开QIAamp离心柱的盖子，加入500 μ L Buffer AW2洗液（已按说明书要求向Buffer AW2瓶中加入合适比例的乙醇），盖上盖子，13000rpm离心3分钟，离心完成后，更换新的废液收集管。

7.4.7 将空的QIAamp离心柱再次13000rpm离心1分钟，彻底除去管内残存的液体。

7.4.8 将QIAamp离心柱置于干净的1.5mLEP管中，小心打开QIAamp离心柱的盖子，小心加入50 μ L BUFFER AVE，盖上盖子，在室温孵育5分钟，8000rpm离心1分钟，滤液于-80 $^{\circ}$ C冰箱冻存，用于RT-PCR的检测。

备注：

(1) 将溶有 Carrier RNA 的 Buffer AVL 分装 (560 μ L/EP tube) 后，储存于 2~8 $^{\circ}$ C，Buffer AVL/Carrier RNA 溶液中形成结晶，可在 75 $^{\circ}$ C-80 $^{\circ}$ C 重新溶解，注意加热时间不能超过 5min，用前冷却至室温。Buffer AVL/Carrier RNA 溶液不能加热超过 6 次。

(2) 按照试剂盒的要求，加入合适比例的无水乙醇至 Buffer AW1 中，19ml 的 Buffer AW1 加入 25ml 无水乙醇，并在 AW1 瓶上做标记，表示已经加入了乙醇。

(3) 按照试剂盒的要求，加入合适比例的无水乙醇至 Buffer AW2 中，13ml 的 Buffer AW2 加入 30ml 乙醇，并在 AW2 瓶上做标记，表示已经加入了乙醇。

(4) 将混合液体加入到 QIAamp 离心柱中时，注意不要弄湿柱子边缘。

(5) 病毒 RNA 样品提取液应存放于-80 $^{\circ}$ C冰箱，并在一周内完成检测。

7.5 诺如病毒的检测

Real-time RT-PCR 采用 RNA Ultrasense One-step Quantitative RT-PCR System(invitrogen) Cat NO. 11732-927

7.5.1 样品预混液的制备 (20 μ L/样品)

试剂	终浓度 (in 25 μ L)	每个反应的体积 (μ L)	5 个反应的体积 (μ L)
5 \times Ultrasense reaction mix	1 \times	5	25
上游引物(10 μ M)	0.5pmol/ μ L	1.25	6.25
下游引物(10 μ M)	0.9 pmol/ μ L	2.25	11.25
荧光探针(10 μ M)	0.25 pmol/ μ L	0.625	3.125
RNA Ultrasense enzyme mix	---	1.25	6.25

Water	---	9.625	48.125
Total volume		20	100

7.5.2 样品的检测体系

(1) 诺如病毒的检测体系（引物和探针为诺如病毒引物 GG I 和 GG II）

5 μ L 样品原液+20 μ L 样品预混液（样品检测）

5 μ L 样品原液+1 μ L 诺如病毒 RNA+20 μ L 样品预混液（阳性对照）

5 μ L 纯水+20 μ L 样品预混液（空白对照检测）

5 μ L PBS +20 μ L 样品预混液（阴性对照检测）

(2) 门果病毒（或噬菌体 MS2）的检测体系

5 μ L 样品原液+20 μ L 样品预混液（样品检测）

5 μ L 纯水+20 μ L 样品预混液（空白对照检测）

5 μ L PBS +20 μ L 样品预混液（阴性对照检测）

(3) 门果病毒（或噬菌体 MS2）标准曲线的制备

取 10 μ L 门果病毒（或噬菌体 MS2），95 $^{\circ}$ C 加热 5min，随后置于冰上迅速冷却至少 1min，10 000rpm 离心 30 秒。然后按照 1:9 的比例用无 RNase 纯水 10 倍梯度稀释，最终形成门果病毒（或噬菌体 MS2）的原液，10 \times 、100 \times 、1000 \times 标准系列，共 4 个点。制备门果病毒（或噬菌体 MS2）的标准曲线：

5 μ L 门果病毒（或噬菌体 MS2）RNA 提取原液+20 μ L 样品预混液

5 μ L 门果病毒（或噬菌体 MS2）RNA 10 \times 稀释液+20 μ L 样品预混液

5 μ L 门果病毒（或噬菌体 MS2）RNA 100 \times 稀释液+20 μ L 样品预混液

5 μ L 门果病毒（或噬菌体 MS2）RNA 1000 \times 稀释液+20 μ L 样品预混液

注：20 μ L 样品预混液按照试剂盒提供的方法及试剂进行操作

7.5.3 RT-PCR参数

步骤描述	温度和时间	循环数
反转录	55 $^{\circ}$ C for 1 hr	1
预加热	95 $^{\circ}$ C for 5 min	1

扩增	变性	95°C for 15 s	45
	退火-延伸	60°C for 1 min	
		65°C for 1 min	

7.6 相关说明

7.6.1 样品采集后必须在24小时内进行前处理及RNA的提取。

7.6.2 样品检测过程中必须有阳性对照、阴性对照（PBS）和空白对照（水）。

阴性对照：取 PBS 溶液，按照 RNA 提取试剂盒的方法，与样品同时进行提取，阴性对照反应了在 RNA 提取过程中是否存在环境的污染。

空白对照：在诺如病毒检测过程中，以纯水作为样品，检测其中的诺如病毒，空白对照反应了加样系统中是否存在污染状况。

阳性对照：从腹泻病人粪便样本中提取的诺如病毒 RNA。

过程控制对照：门果病毒或噬菌体 MS2

7.6.3 每份样品检测时，需要同时添加门果病毒（或噬菌体MS2）进行过程控制。

7.6.4 阳性样品：阳性样品的病毒提取液和病毒RNA提取液送至国家食品安全风险评估中心微生物实验室，进行结果复核。

第五节 寄生虫检验标准操作程序

一、并殖吸虫检验标准操作程序

1 方法来源

《食品卫生检验方法注解 微生物部分》，孟昭赫主编，人民出版社，1990。

《食源性寄生虫病图释》林金祥，李友松，周宪民，等主编，人民卫生出版社，2009。

2 范围

本方法适用于淡水蟹、喇蛄等类感染并殖吸虫的检测。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本程序。

并殖吸虫囊蚴 *Paragonimus metacercaria*

并殖吸虫又称肺吸虫，其囊蚴主要寄生在第二中间宿主溪蟹、蝾蛄的肌肉；人食入含囊蚴的淡水溪蟹、蝾蛄，引发并殖吸虫病。

4 设备和材料

显微镜、目镜测微尺、解剖镜、37℃水浴箱或温箱、搅拌机或均质器、方盘、手术刀、手术剪、眼科镊、培养皿、80目网筛、20目网筛、载玻片、分液漏斗、解剖针（或1ml注射器）、标本瓶、滴管、吸头及乳胶吸头、搅拌棒、三角烧瓶、三角烧杯、废物盘。

5 试剂

人工消化液（见附录A3）、

6 操作原理与方法

6.1 捣碎沉淀法

6.1.1 原理

根据并殖吸虫囊蚴的大小，用不同孔径的铜筛过滤，先用粗筛将粗渣滤除，再用孔径小于并殖吸虫囊蚴的细筛过滤，囊蚴大，不能通过细筛，全部留在网筛上，直接将网筛上残渣洗下，在解剖镜/显微镜下检查囊蚴，方法简单，检出率高。

6.1.2 样品处理

将蟹、蝾蛄等标本去壳后，称取50g，直接用石臼捣碎，用水将捣碎的样品洗入烧杯。

6.1.3 过滤及漂洗

将捣碎液用20目/吋铜筛过滤，并用清水冲洗网筛，使囊蚴随滤液全部通过铜筛，去粗渣；将滤液再用80目/吋铜筛过滤，弃滤液，将留在铜筛上的滤渣用清水全部洗入500mL三角烧杯内，静置15min~20min弃去上清液，再加入适量清水混匀沉淀，如此反复清洗3次以上，至上清液透明为止。

6.1.4 镜检

将全部沉渣分次倒入培养皿，置解剖镜下检查，发现囊蚴将其吸出，置载玻片上，在显微镜下鉴定，并根据形态特征确定虫种，计算囊蚴数，以确定其感染程度。

6.2 消化法

6.2.1 原理

根据人体消化液的成份，配制人工消化液对样品进行消化，消化后的样品，经水洗沉淀后，在解剖镜/显微镜下检查沉渣中的囊蚴。

6.2.2 样品处理

将淡水蟹、喇蛄等去壳，取其肌肉和内脏，用搅拌机或均质器低速搅碎，也可用石臼直接捣碎。

6.2.3 消化

称取搅碎后的样品 50 g，置于三角烧瓶中，按 1:10 比例加入人工消化液（每 10g 样品加入 100ml 消化液），充分搅拌，置 35℃~37℃ 温箱中约 12 h 或过夜，使样品充分消化。

6.2.4 过滤及漂洗

将消化后的样品悬液用 200 目/时铜筛过滤，弃去滤液，将留在网筛上的滤渣全部洗入 500 mL 三角烧杯内，加清洁水至 500 mL，混匀后静置沉淀 15 min~20 min，弃去上清液，如此反复清洗 3 次以上，至上清液透明为止。

6.2.5 镜检

弃去上清液，将全部沉渣分次倒入培养皿，在解剖镜下检查，发现囊蚴后，将其吸出，置载玻片上，在显微镜下鉴定，根据其形态特征确定虫种，计算囊蚴数，以确定感染程度。

7 常见致病性囊蚴形态

7.1 卫氏并殖吸虫囊蚴形态：圆形，囊壁两层。二倍体型，直径一般在 300 μ m 左右；三倍体型多在 400 μ m 左右。囊内后尾蚴可见黑色排泄囊和两边白色扭转的肠管。

7.2 斯氏并殖吸虫囊蚴形态：呈球形。大小平均为 430.2 μ m × 420.2 μ m。与卫氏并殖吸虫二倍体型囊蚴不同点，在于个体大，囊壁薄，囊内后尾蚴比较模糊。

活囊蚴：囊内蚴体及口、腹吸盘轮廓清晰，可见蚴体蠕动。死囊蚴：颜色发黑，囊壁有破损，囊壁包裹的蚴体及口、腹吸盘发黑，轮廓模糊，无蚴体蠕动。

8 结果与报告

- a. 如发现囊蚴，经鉴定，符合其特征者，可报告并殖吸虫阳性；
- b. 未检出囊蚴则报告：未检出（或阴性）。

9 注意事项

- a. 配制人工消化液时，注意盐酸的使用安全；
- b. 每次使用显微镜后，需用擦镜纸擦拭物镜。

二、 东方次睾吸虫检验标准操作程序

1 方法来源

《食源性寄生虫病》，周晓农、陈家旭主编，人民出版社，2009。

2 范围

本程序适用于淡水鱼类感染东方次睾吸虫的检测。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本程序。

东方次睾吸虫囊蚴 *Metorchis orientalis metacercaria*

东方次睾吸虫的囊蚴主要寄生在第二中间宿主淡水鱼的背部及肛区至尾鳍肌肉；人食入含东方次睾吸虫囊蚴的淡水鱼，引发东方次睾吸虫病。

4 设备和材料

显微镜、目镜测微尺、解剖镜、37℃水浴箱或温箱、搅拌机或均质器、方盘、手术刀、手术剪、小眼科镊、培养皿、载玻片、分液漏斗、解剖针（或 1ml 注射器）、标本瓶、滴管、吸头及乳胶吸头、搅拌棒、三角烧瓶、三角烧杯、废物盘。

5 试剂

人工消化液（见附录 A3）

6 操作原理与方法

6.1 压片法

6.1.1 原理

根据东方次睾吸虫可寄生在鱼体的肌肉、皮、头、鳃、鳍及鳞等部位的特点，取不同部位样品直接用玻片压薄后在解剖镜下查找囊蚴，方法简单，可用于现场检测。

6.1.2 方法

将鱼剖杀后，刮去鳞和皮，剪取鱼背部及肛区至尾鳍的基部各取 2 g 肌肉，用 2 张载玻片用力压薄，置解剖镜下直接检查，检查淡水虾时，应去除头及壳，取软体部分压片镜检。每条鱼取 5 个样点，每个样点压 3 片以上，发现囊蚴，置

显微镜下鉴定，根据其形态特征确定虫种。

6.2 消化法

6.2.1 原理

根据人体消化液的成份，配制人工消化液对样品进行消化。消化后的样品，经水洗沉淀后，在解剖镜/显微镜下检查囊蚴。

6.2.2 样品处理

将鱼剖杀后，刮去鳞片及皮，取其肌肉和内脏，用搅拌机或均质器低速搅碎，也可用研钵手工捣碎。

6.2.3 消化

称取搅碎后的样品 50 g，置于三角烧瓶中，按 1: 10 比例加入人工消化液，（每 10 g 样品加入 100 mL 消化液），充分搅拌，置 35 °C~37 °C 温箱中约 12 h 或过夜，使样品充分消化。

6.2.4 过滤与漂洗

将消化后的样品悬液用 20 目/吋的铜筛过滤，滤液倒入 500 mL 三角烧杯，静置沉淀 20 min~30 min，缓慢弃去上清液，加清洁水至 500 mL，搅拌后再沉淀 20 min~30 min，弃去上清液，如此反复清洗 3 次以上，至上清液透明为止。

6.2.5 镜检

弃去上清液，将全部沉渣分次倒入培养皿，用解剖镜检查，发现囊蚴，将其吸出，置载玻片上，在显微镜下鉴定，根据其形态特征确定虫种。

7 囊蚴形态

圆形或椭圆形，大小为 (121~150) μm 。(85~140) μm 。，囊壁分两层，外层较厚，内层较薄，囊内蚴体及口、腹吸盘轮廓清晰，可见蚴体蠕动。排泄囊大，囊内含黑色颗粒。活囊蚴：囊壁折光性强且富有弹性，囊内蚴体及口、腹吸盘轮廓清晰，可见蚴体蠕动。死囊蚴：显微镜下，囊蚴颜色发黑，囊壁有破损，囊蚴包裹的蚴体及口、腹吸盘发黑，轮廓模糊，无蚴体蠕动。

8 结果与报告

- a. 如检出囊蚴，经鉴定，符合其特征者，可报告东方次睾吸虫阳性；
- b. 未检出囊蚴则报告：未检出（或阴性）。

9 注意事项

- a. 配制人工消化液时，注意盐酸的使用安全；
- b. 每次使用显微镜后，需用擦镜纸擦拭物镜。

三、 颚口线虫检验标准操作程序

1 方法来源

《食源性寄生虫病》，周晓农、陈家旭主编，人民出版社，2009。

2 范围

本程序适用于淡水鱼类颚口线虫的检测。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本程序。

颚口线虫 III 期幼虫 *Gnathostoma spinigerum* larva 3

颚口线虫的第 III 期幼虫主要寄生在第二中间宿主淡水鱼（鳊鱼、泥鳅等）的肝脏（肌肉少见）；人食入含有颚口线虫第 III 期幼虫的淡水鱼类等，可引发颚口线虫病。

4 设备和材料

显微镜、解剖镜、目镜测微尺、37 °C 水浴箱或温箱、搅拌机或均质器、方盘、手术刀、手术剪、眼科镊、培养皿、载玻片、解剖针（或 1mL 注射器）、标本瓶、滴管、吸头及乳胶吸头、搅拌棒、三角烧瓶、三角烧杯（锥形量杯）、废物盘。

5 试剂

人工消化液（见附录 A3），蒸馏水。

6 操作原理与方法

6.1 直接剖检法

6.1.1 原理

颚口线虫的第 III 期幼虫主要在淡水鱼的肝脏表面或肌肉内结囊，肝脏表面的囊包肉眼可见，可直接分离囊包幼虫，用玻片压薄后在解剖镜下鉴定。

6.1.2 方法

将鱼剖杀后，分离出肝脏，洗净，置小方盘，用手术刀和镊子对肝脏进行解剖，发现囊包后，用解剖针将幼虫挑出，置二张载玻片中间压薄，在显微镜下鉴

定。

6.2 消化法

6.2.1 原理

根据人体消化液的成份，配制人工消化液对样品进行消化。消化后的样品，经水洗沉淀后，在解剖镜/显微镜下检查沉渣中的 III 期幼虫。

6.2.2 样品处理

将鱼剖杀后，分离出内脏，洗净，将鱼肉和内脏剪成小块，用搅拌机或均质器低速搅碎，也可用手工剁碎。

6.2.3 消化

称取 50g 搅碎的样品置于三角烧瓶中，按 1:5 比例加入人工消化液（每 10 g 样品加入 50 mL 消化液），充分搅拌，鲢鱼和鳙鱼的肌肉及鲢鱼的肝脏消化约 12 h 或过夜，鳙鱼、泥鳅的肝脏消化 2 h~3 h，充分消化。

6.2.4 过滤与漂洗

将消化后的样品用 20 目/吋的铜筛过滤，滤液倒入 500 mL 三角烧杯，静置沉淀 20 min~30 min，缓慢弃去上清液，加清洁水至 500 mL，搅拌后再沉淀 20~30 min，弃去上清液，如此反复清洗 3 次以上，至上清液透明为止。

6.2.5 镜检

弃去上清液，将全部沉渣分次倒入培养皿，在解剖镜下检查，发现幼虫，将其吸出，置载玻片上，在显微镜下鉴定，根据形态特征，确定虫种。

7 致病性颚口线虫第 III 期幼虫形态特征

肝脏内囊包圆形，第 III 期幼虫盘曲在内呈“6”字形，直径为 0.5mm~4mm，头部有 4 环小钩。

7.1 棘颚口线虫

幼虫大小 $2.59 \pm 0.01 \text{ mm} \times 0.314 \pm 0.169 \text{ mm}$ ；全身和头球表面具环列小棘，体棘环列数为 257.5 ± 30.5 ，体前部棘长 $10 \mu\text{m}$ ，排列紧密，往后逐渐变小、变稀；头球为类长方型，大小 $0.094 \pm 0.032 \text{ mm} \times 0.187 \pm 0.060 \text{ mm}$ ，具有 4 环小钩，平均环钩数在 40 以上，自前向后逐渐增多。

7.2 刚刺颚口线虫

幼虫大小 $2.58 \pm 0.703 \text{ mm} \times 0.284 \pm 0.031 \text{ mm}$ ，全身布满单尖棘，体前部棘数

密而明显，体后部棘小而稀疏，体棘环列数为 210 ± 35 ；头球为不规则哑铃形，大小 $0.113 \pm 0.051 \text{ mm} \times 0.176 \pm 0.05 \text{ mm}$ ，具有 4 环小钩，平均环钩数在 40 左右。

7.3 杜氏顎口线虫

幼虫大小 $2.195 \pm 0.693 \text{ mm} \times 0.275 \pm 0.058 \text{ mm}$ ，体棘环列数为 205 ± 20 ；头球为不规则梅花形，大小 $0.062 \pm 0.011 \text{ mm} \times 0.150 \pm 0.029 \text{ mm}$ ；具有 4 环小钩，平均环钩数不超过 40 个。

8 结果与报告

- a. 如发现囊包或幼虫，经鉴定，符合上述任何一种形态特征者，可报告顎口线虫阳性；
- b. 未检出囊包或幼虫则报告：未检出（或阴性）。

9 注意事项

- a. 配制人工消化液时，注意盐酸的使用安全；
- b. 每次使用显微镜后，需用擦镜纸擦拭物镜。

四、广州管圆线虫检验标准操作程序

1 方法来源

《食源性寄生虫病》，周晓农、陈家旭主编，人民出版社，2009。

2 范围

本方法适用于各种淡水螺类等软体动物（福寿螺、褐云马脑螺、铜锈环棱螺等）感染广州管圆线虫的检测。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本程序。

广州管圆线虫 III 期幼虫 *Angiostrongylus cantonensis* larva 3

广州管圆线虫第 III 期幼虫主要寄生在中间宿主淡水螺蛳等软体动物的肺部及肌肉；人食入含

广州管圆线虫 III 期幼虫的螺蛳等软体动物，可引发广州管圆线虫病。

4 设备和材料

显微镜、目镜测微尺、解剖镜、37 °C 水浴箱或温箱、搅拌机或均质器、方盘、手术刀、手术剪、眼科镊、培养皿、玻璃盘、载玻片、分液漏斗、解剖针（或

1ml 注射器)、标本瓶、滴管、吸头及乳胶吸头、搅拌棒、三角烧瓶、三角烧杯、废物盘。

5 试剂

人工消化液(见附录 A3)、去氯水(自来水放置 24h 后,即可)

6 操作原理与方法

6.1 肺检法(适用于淡水螺)

将螺用石臼轻敲碎、剔壳,取出软体,用清水冲洗软体以去除螺壳碎片及黏液,沿外套膜的左侧至后侧的基部剪开,将外套膜向右翻开,取出外套膜后半部分的一个大小约为 24 mm×16 mm 椭圆形的囊状结构——“肺囊”,将囊袋(双层)沿两边缘剪开,翻开囊袋呈单层后铺平,若囊袋层壁较厚,尽量拉平,用 2 个注射器针头拨动,在解剖镜下检查囊壁组织有无幼虫结节。发现结节,用注射器针头慢慢挑出幼虫,置载玻片上,在显微镜下鉴定虫种。

6.2 组织匀浆法

6.2.1 原理

广州管圆线虫 III 期幼虫寄生于螺类等软体动物体内,将螺捣碎后,通过水洗沉淀,使幼虫沉于底部,在解剖镜/显微镜下检查沉渣中的 III 期幼虫。

6.2.2 样品处理

将螺用石臼轻敲碎、剔壳、洗净,将软体剪成小块置搅拌机或均质器内,加入少量清水搅拌成匀浆,用 90 目/吋铜筛过滤去渣,将滤液置 1000 mL 三角烧杯内,加入去氯水混匀,沉淀 20 min~30 min,再弃去上清液,如此反复清洗 3 次以上,至上清液透明为止。

6.2.3 镜检

弃去上清液,将全部沉渣分次倒入培养皿,在解剖镜下检查,发现可疑幼虫,应将其吸出,置载玻片上,在显微镜下鉴定,根据其形态特征确定虫种。

6.3 消化法

6.3.1 样品处理

将螺用石臼轻敲碎、剔壳、洗净,将软体剪成小块放入搅拌机或均质器内,加入少量清水,低速搅拌 15~20 S。

6.3.2 消化

将打碎后的样品置于三角烧瓶中，按 1: 25 比例加入人工消化液（每 10 g 样品加消化液 250 mL），充分搅拌，置 35 °C~37 °C 温箱 1.5 h~2 h，使样品充分消化。

6.3.3 过滤与漂洗

将消化后的样品用 90 目/吋的铜筛过滤，滤液倒入 500 mL 三角烧杯，静置沉淀 20 min~30 min，缓慢弃去上清液，再加清洁水至 500 mL，混匀后沉淀 20 min~30 min，弃去上清液，如此反复清洗 3 次以上，至上清液透明为止。

6.3.4 镜检

弃去上清液，将全部沉渣分次倒入培养皿，加少量清水稀释后，用解剖镜检查。发现可疑幼虫应将其吸出，置载玻片上，在显微镜鉴定，根据其形态特征确定虫种，

7 III期幼虫形态特征

虫体表面具有两层外鞘，头部钝圆，尾部末段骤然变细，大小为（462~526） μm 。 \times （22~27） μm 。食管、肠管、排泄孔、肛孔及生殖原基清晰可见；活幼虫运动活泼，呈 S 型摆动；死幼虫颜色发黑，轮廓模糊，无蚴体蠕动。

8 结果与报告

- a. 如发现幼虫，经鉴定，符合其特征者，可报告广州管圆线虫阳性；
- b. 未检出幼虫则报告：未检出（或阴性）。

9 注意事项

- a. 配制人工消化液时，注意盐酸的使用安全；
- b. 每次使用显微镜后，需用擦镜纸擦拭物镜；
- c. 肺检法仅适用于福寿螺和褐云玛瑙螺检测。

五、 华支睾吸虫检验标准操作程序

1 方法来源

SN/T 2579-2011 《华支睾吸虫囊蚴鉴定方法》

《食品卫生检验方法注解 微生物部分》，孟昭赫主编，人民出版社出版，1990。

2 范围

本方法适用于淡水鱼（青鱼、草鱼、鲤鱼等）虾类感染华支睾吸虫的检测。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本程序。

华支睾吸虫囊蚴 *Clonorchis sinensis* metacercaria

华支睾吸虫又称肝吸虫，其囊蚴主要寄生在第二中间宿主淡水鱼的背部及肛区至尾鳍的肌肉；

人食入含华支睾吸虫囊蚴的淡水鱼，可引发华支睾吸虫病。

4 设备和材料

显微镜、目镜测微尺、解剖镜、37℃水浴箱或温箱、搅拌机或均质器、方盘、手术刀、手术剪、眼科镊、培养皿、载玻片、解剖针（或 1 mL 注射器）、标本瓶、滴管、吸头及乳胶吸头、搅拌棒、三角烧瓶、三角烧杯、废物盘。

5 试剂

人工消化液（见附录 A3）、蒸馏水。

6 操作原理与方法

6.1 压片法

6.1.1 原理

根据华支睾吸虫可寄生在鱼体的肌肉、皮、头、鳃、鳍及鳞等部位的特点，取不同部位样品直接用玻片压薄后在解剖镜下查找囊蚴，方法简单，可用于现场检测。

6.1.2 方法

将鱼剖杀后，刮去鳞片和皮，剪取鱼背部及肛区至尾鳍的基部各取 2g 肌肉，用 2 张载玻片用力压薄，置解剖镜下直接检查，检查淡水虾时，应去除头及壳，取软体部分压片，置解剖镜下进行检查，每条鱼取 5 个样点，每个样点压 3 片以上。发现囊蚴，用显微镜鉴定虫种。

6.2 消化法

6.2.1 原理

根据人体消化液的成份，配制人工消化液对样品进行消化。消化后的样品，经水洗沉淀后，在解剖镜/显微镜下检查沉渣中的囊蚴。

6.2.2 样品处理

将鱼剖杀后，刮去鳞片和皮，虾去壳，取其肌肉，用剪刀将鱼肉剪成小块，

置搅拌器或均质器低速搅碎。

6.2.3 消化

称取搅碎后的鱼肉或虾肉 50 g，置于三角烧瓶中，按 1:10 比例加入人工消化液（10 g 样品加 100 mL 消化液），充分搅拌，置 35 °C~37 °C 温箱中约 12 h 或过夜，使鱼（虾）肉充分消化。

6.2.4 过滤与漂洗

将消化后的样品用 20 目/吋的铜筛过滤，滤液倒入 500 mL 三角烧杯，静置沉淀 20 min~30 min，缓慢弃去上清液，加清洁水至 500 mL，搅拌后再沉淀 20 min~30 min，弃去上清液，如此法反复清洗 3 次以上，至上清液透明为止。

6.2.5 镜检

弃去上清液，将全部沉渣分次倒入培养皿，用解剖镜检查，发现囊蚴，将其吸出，置载玻片上，在显微镜下鉴定，根据其形态特征确定虫种。

7 囊蚴形态

圆形或椭圆形，大小为（121~150） μm ×（85~140） μm 。囊壁分两层，外层较厚，内层较薄，囊内蚴体可见口、腹吸盘，排泄囊大，内含黑色颗粒。活囊蚴：囊壁折光性强，且富有弹性。囊内蚴体及口、腹吸盘轮廓清晰，可见蚴体蠕动；死囊蚴：颜色发黑，囊壁有破损，囊蚴包裹的蚴体及口、腹吸盘发黑，轮廓模糊，无蚴体蠕动。

8 结果与报告

- a. 如发现囊蚴，经鉴定符合其特征者，可报告华支睾吸虫阳性；
- b. 未检出囊蚴则报告：未检出（或阴性）。

9 注意事项

- a. 配制人工消化液时，注意浓盐酸的使用安全；
- b. 每次使用显微镜后，需用擦镜纸擦拭物镜。

六、棘口吸虫检验标准操作程序

1 方法来源

《食源性寄生虫病》，周晓农、陈家旭主编，人民出版社，2009。

2 范围

本程序适用于淡水鱼类感染棘口吸虫的检测。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本程序。

棘口吸虫囊蚴 *Echinostomatidae metacercaria*

棘口吸虫的囊蚴常寄生在第二中间宿主淡水鱼的鳃和内脏；人食入含棘口吸虫囊蚴的淡水鱼，可引发棘口吸虫病。

4 设备和材料

显微镜、目镜测微尺、解剖镜、37 °C 水浴箱或温箱、搅拌机或均质器、方盘、手术刀、手术剪、眼科镊、培养皿、酒精灯、载玻片、解剖针（或 1 毫升注射器）、标本瓶、滴管、吸头及乳胶吸头、搅拌棒、三角烧瓶、三角烧杯（锥形量杯）、研钵、废物盘。

5 试剂

人工消化液（见附录 A3）、蒸馏水。

6 操作原理与方法

6.1 压片法

6.1.1 原理

棘口吸虫囊蚴主要寄生在鱼的鳃和内脏，将其直接压片，在解剖镜/显微镜下检查囊蚴，方法简便，检出率高。

6.1.2 方法

将淡水鱼置方盘剖杀后，取出鳃和内脏。取不同部位样品约 2 g，用 2 张载玻片用力挤压成薄膜，置解剖镜下检查（每条鱼检查 5 个样点，每个样点压 3 片以上）。

6.2 消化法

6.2.1 原理

根据人体消化液的成份，配制人工消化液对样品进行消化。消化后的样品，经水洗沉淀后，在解剖镜/显微镜下检查囊蚴。

6.2.2 样品处理

剖杀淡水鱼，取出鳃、内脏和肌肉，用搅拌机或均质器低速搅碎，也可用研钵人工捣碎。

6.2.3 消化

称取 50 g 搅碎的样品，置于三角烧瓶中，按 1:5 比例加入人工消化液（每 10 g 样品加入 500 mL 消化液），充分搅拌，鲢鱼和鳙鱼、泥鳅的肌肉及鲢鱼的肝脏消化约 12 h 或过夜消化，鳙鱼、泥鳅的肝脏消化 2 h~3 h，充分消化。

6.2.4 过滤与漂洗

将消化后的样品用 20 目/吋的铜筛过滤，滤液倒入 500 mL 三角烧杯，静置沉淀 20 min~30 min，缓慢弃去上清液，加清洁水至 500 mL，搅拌后，再静置沉淀 20 min~30 min，弃去上清液，如此反复清洗 3 次以上，至上清液透明为止。

6.2.5 镜检

弃去上清液，将全部沉渣分次倒入培养皿，在解剖镜下检查，发现囊蚴，将其吸出，置载玻片上，在显微镜下鉴定，根据其形态特征确定虫种。

7 囊蚴形态

圆或类圆形，可见口、腹两个吸盘，棘口吸虫囊蚴头棘清晰可见，一般为 30 个以上，围绕口吸盘排成一圈，排列紧密；棘隙吸虫囊蚴头棘不清晰，一般为 30 个以下，围绕口吸盘排列稀疏，中间有间隙。

8 结果与报告

- a. 如发现囊蚴，经鉴定符合其特征者，可报告棘口吸虫阳性；
- b. 未检出囊蚴则报告：未检出（或阴性）。

9 注意事项

- a. 配制人工消化液时，注意盐酸的使用安全；
- b. 每次使用显微镜后，需用擦镜纸擦拭物镜。

七、牛带绦虫囊尾蚴检验标准操作程序

1 方法来源

《食源性寄生虫病》，周晓农、陈家旭主编，人民出版社，2009。

2 范围

本方法适用于黄牛、水牛、牦牛、犏牛等动物感染牛带绦虫的检测。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本程序。

牛带绦虫囊尾蚴 *Taenia saginata cysticercus*

牛带绦虫又称肥胖带绦虫、牛肉绦虫、无钩绦虫，其囊尾蚴主要寄生在中间宿主牛的全身肌肉，最常见的部位是肩胛外侧肌、咀嚼肌、心肌、臀部肌。

人食入含牛带绦虫囊尾蚴的牛肉，可致牛带绦虫病。

4 设备和材料

显微镜、解剖镜、方盘、手术刀、手术剪、镊子、培养皿、废物盘。

5 试剂

生理盐水、牛胆汁。

6 操作原理与方法

6.1 原理

根据牛带绦虫寄生于牛的肌肉，主要包括头、躯干、四肢、心脏等部位，对不同部位肌肉进行剖检查找囊尾蚴，囊尾蚴在 50% 牛胆汁生理盐水中孵育 30min，头节外翻。显微镜下观察头节结构特征。

6.2 方法

6.2.1 采样

对宰后去皮的胴体按照下列顺序进行检查：头部、躯干、颈部、四肢、心脏。检查时需对各部位的肌肉进行纵剖，包括面肌、咀嚼肌和舌肌，脊柱肌，颈腹侧肌，后肢肌和前肢肌，查找有无囊尾蚴寄生。若未发现病灶组织，则采集舌肌和脊柱肌肉各 500g，用解剖刀每隔 8~10mm 横断切开肌肉纤维，查看有无椭圆形乳白色半透明的囊泡或疑似囊尾蚴。

6.2.2 镜检

将囊泡或疑似囊尾蚴切下，置于载玻片上，滴一滴生理盐水，盖上另一张载玻片轻轻下压，在低倍显微镜下观察头节结构，并鉴定虫种。

7 囊蚴形态

卵圆形，约 7~10 mm × 4~6 mm，乳白色，半透明，囊内充满液体。囊壁两层，外为皮层，内为间质层。间质层有一处增厚，向囊腔凹入，是翻转的头节。肉眼隔囊壁即可见头节为白色小点。镜下观头节上有 4 个吸盘，但无顶突和小钩。

8 结果与报告

- a. 如发现囊尾蚴，经鉴定符合其特征者，可报告查见牛带绦虫囊尾蚴；

b. 未检出囊尾蚴，则报告：未检出。

9 注意事项

- a. 载玻片使用前必须清洁处理，做到无灰尘，无油腻，无霉点。
- b. 对检出囊尾蚴的样品（牛肉等）须作无害化处理。

八、旋毛虫检验标准操作程序

1 方法来源

GB/T18642-2002 猪旋毛虫病诊断技术。

《食源性寄生虫病》，周晓农、陈家旭主编，人民出版社，2009。

2 范围

本程序适用于猪肉或其他动物肉类感染旋毛虫的检测。

3 术语和定义

3.1 旋毛形线虫 *Trichineia spiralis* Owen,1835

简称旋毛虫，寄生于猪、野猪、犬、鼠、熊等多种动物的小肠和肌肉细胞内。人生食或半生食含有旋毛虫幼虫囊包的猪肉或其他动物肉类，可引发旋毛虫病。

3.2 消化

用一定浓度的胃蛋白酶溶液在一定温度和 pH 值条件下，使肌细胞溶解。

3.3 虫体

旋毛虫幼虫。

4 设备和材料

显微镜（具目镜测微尺）、解剖镜、电子天平（感量为 0.1g）、烧杯 2000ml、锥形量杯（1000ml）、组织捣碎器、温度计（1℃~100℃）、加热磁力搅拌器和磁棒、40 目(425 μm 孔径)铜筛、手术刀、手术剪、眼科镊、方盘、平皿。

5 试剂

5.1 甘油透明液：甘油 20 ml，加蒸馏水至 100 ml。

5.2 盐酸水溶液：盐酸 20 ml，加蒸馏水至 100 ml。

5.3 消化液：胃蛋白酶(3000IU/g) 10 g，盐酸(密度 1.19 g/ml,浓度 37%) 10ml 加蒸馏水至 1000mL，加温 40℃搅拌溶解，现用现配。

6 操作原理与方法

6.1 压片镜检法

6.1.1 原理

旋毛虫的幼虫寄生在小肠和肌肉细胞内，成熟幼虫卷缩或盘旋在肌纤维间隙，周边形成囊包，通过肉眼可直接查见囊包；在解剖镜/显微镜下可见虫体，再以盐酸透明，虫体结构清晰，易于鉴别。

6.1.2 采样

采取横膈膜肌的左右肌脚 50~100g，作为检验肉样。

6.1.3 制片

取清洁载玻片 1 块放于检验台上。在肌纤维表面看到稍有凸出的卵圆形、灰白色、针头大小或灰白色、浅白色的小白点即为可疑。可按不同部位用剪刀顺着肌纤维剪取似米粒状的小白点，依次附贴于载玻片上，每块 12 粒，2 块 24 粒以供镜检。如果无可疑小点，则应均匀地从不同部位顺肌纤维剪取同样大小和数量的肉粒。然后，盖上一清洁载玻片，轻轻加压，把肉粒压成薄的肉片，以能通过肉片标本看清下面报纸的字迹为准。

6.1.4 镜检

把压片标本放在低倍镜下，从压片一端的边沿开始观察，直到另一端为止。

6.1.5 判定标准

6.1.5.1 没有形成包囊期的旋毛虫：在肌纤维之间呈直杆状或逐渐蜷曲状态，或虫体被挤于压出的肌浆中。

6.1.5.2 包囊形成期的旋毛虫：成熟的包囊位于相邻肌细胞所形成的梭形肌腔内，呈发光透明的圆形或椭圆形物，囊中央是蜷曲的虫体。

6.1.5.3 钙化的旋毛虫：在包囊内可见数量不等、浓淡不均的黑色钙化物或模糊不清的虫体，此时掀开上玻片，向肉片稍加 10% 盐酸溶液，待 1 min-2 min 后，再行观察。

6.1.5.4 冷冻过的肌肉组织压片须用盐酸透明法（方法同 6.1.5.3），可见肌纤维呈淡灰色且透明，包囊膨大具有明显轮廓，虫体清晰。

6.1.5.5 机化的旋毛虫：掀开上玻片，滴加数滴甘油透明液，待肉片透明时再覆上玻片，置低倍镜下观察。虫体被肉芽组织包围、变大，形成纺锤形、椭圆形或圆形的肉芽肿，虫体结构完整或破碎、消失。

6.2 集样消化法

6.2.1 原理

用物理和生物化学的方法,在适宜温度和酸碱度条件下,用酶消化肌肉组织,使有坚韧角质层和抗消化酶的旋毛虫体和包囊从肌肉组织内分离出来,经水洗沉淀后,在解剖镜/显微镜下检查。

6.2.2 采样

6.2.2.1 部位:采集猪的横膈肌脚和舌肌。

6.2.2.2 方法:去除脂肪肌膜或腱膜。

6.2.2.3 数量:每头猪取 1 个肉样(100 g),从中剪取 1 g 小样,集中 100 个小样(即 100 头猪,旋毛虫病高发地区以 15-20 个小样为一组)进行检验。

6.2.3 绞碎肉样

将 100 个小样(共 100g)放入组织捣碎机内,加入 300ml 消化液,以 2 000r /min 转速捣碎 30s -60s , 以无肉眼看见细碎肉块为度。

6.2.4 消化

将已绞碎的肉样放入烧杯中,按 1:20 比例加入消化液,置加热磁力搅拌器上,于 40℃-43℃液温之间,加温搅拌 2 h,以无肉眼可见沉淀物为度。

6.2.5 过滤

取 40 目的铜筛,置于锥形量杯上,将消化过的样品进行过滤,弃去铜筛上的残渣。

6.2.6 沉淀

锥形量杯内的滤液沉淀 20 min,轻轻倒去上清液,保留少量沉淀物。

6.2.7 漂洗

加入蒸馏水至满,沉淀 20 min. 轻轻倒去上清液(此过程可反复多次直至液体澄清),最后保留沉淀物约 20 ml 待检。

6.2.8 镜检

将 20 ml 沉淀物倒入平皿内,置解剖镜下检查,发现疑似虫体、包囊,吸出置低倍显微镜鉴别。确诊时再采用分组消化法(或压片镜检法)进一步复检,直到确定病猪为止。

6.2.9 判定标准

6.2.9.1 成熟幼虫

即感染性幼虫，是未蜕皮的第一期幼虫（L1），呈淡橙色，大小约为 1.0mm×0.03mm。卷曲于横纹肌内的梭形囊包中。囊包大小为（0.25~0.5）mm×（0.21~0.42）mm，其长轴与横纹肌纤维平行排列。一个囊包内含有 1~2 条卷曲的幼虫，多时可达 6~7 条。

7 结果判定

发现有虫体、包囊、不完整虫体或空包囊均为阳性，否则为阴性。

8 注意事项

8.1 配制人工消化液时，注意盐酸的使用安全；

8.2 发现阳性样品后，该样品以及直接接触的器具及阳性液体（包括消化液，上清液等）在至少 80℃ 温度下加热净化数分钟。

九、异尖线虫检验标准操作程序

1 方法来源

SN/T1509—2005《异尖线虫病诊断规程》。

《实用医学寄生虫学》孙新、李朝品，张进顺主编，人民出版社，2005。

2 范围

本程序适用于鱼类等水生动物感染异尖线虫的检测。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本程序。

异尖线虫第 III 期幼虫 *Anisakis larva 3*

异尖线虫第 III 期幼虫常寄生在中间宿主磷虾和转续宿主海洋鱼类的内脏和肌肉中，人食入感染异尖线虫 III 期幼虫的鱼，可引发异尖线虫病。

4 设备和材料

显微镜（具目镜测微尺）、解剖镜、手术刀、手术剪、眼科镊、方盘、培养皿、酒精灯、载玻片、解剖针（或 1mL 注射器）、标本瓶、废物盘。

5 试剂

5%福尔马林固定液（见附录 A.1）、70%乙醇、0.85%生理盐水、甘油透明液（见附录 A.2）。

6 操作原理与方法

6.1 原理

异尖线虫寄生在鱼体各脏器表面和肌肉内，形成囊包或游离状态，通过肉眼可直接查见囊包；用解剖针挑出虫体，再以甘油透明，在解剖镜/显微镜下，虫体结构清晰，易于鉴别。

6.2 解剖鱼体

将鱼置方盘内剖杀后，用手术剪和眼科镊解剖腹腔、胃、肠、肠系膜、肝、生殖腺及肌肉组织等，可用肉眼检查或将鱼内脏置培养皿内，在解剖镜下，用 2 把眼科镊子慢慢撕碎，发现虫体或囊包，轻轻拨离，用解剖针将虫体挑出，置加入生理盐水的培养皿内；或摘取内脏，放入盛水的容器中，大多线虫幼虫会游离于水中，粘附在内脏表面的用镊子夹取。

6.3 虫体固定

将分离出的虫体置于 0.85 % 生理盐水培养皿中，清除粘附在虫体周围的杂质碎片，用 5 % 福尔马林或用 70 % 乙醇加热至 70 °C 左右固定，待虫体伸直固定后，将其置甘油透明液中透明（以能透视为度）。

6.4 镜检

将透明后虫体取出，置 2 张载玻片中间，轻轻压平，在解剖镜/显微镜下观察虫体结构，鉴定虫种。计数查获虫体数，以判定样品被异尖线虫感染的情况。

7 常见致病性异尖线虫三期幼虫形态

异尖线虫幼虫常包被于海鱼类的肌肉和内脏中，形成包囊，虫体盘旋于囊内。异尖线虫种类很多，常见致病性异尖线虫有以下四种。

7.1 简单异尖线虫 *A.simplex*（异尖线虫 I 型）

幼虫黄白色，腺胃部呈乳白色，活幼虫在水中蠕动似蚯蚓状，大小（19.1~36.0）mm×（0.26~0.58）mm，前端腹侧有一明显的角样钻齿，虫体表面有细横纹，尾短略圆，（0.09~0.15 mm），尾端有角质膜性小棘，称尾突。无胃盲囊和肠盲囊。体侧线均呈小双叶状，顶端分开，有茎，连接至皮下，肠细胞数 70 个。

7.2 抹香鲸异尖线虫 *A.physeteris*（异尖线虫 II 型）

幼虫形态基本与简单异尖线虫相似，不同点为：大小（25.5~32.9）mm×（0.50~0.68）mm，尾端呈圆锥形，较细，尾长 0.18~0.32 mm，末端变尖，无

尾突，无胃盲囊和肠盲囊。体侧线呈小叶状，肠细胞数 85 个。

7.3 伪新地蛔线虫 A 型 *Pseudoterranova* (海豹线虫)

幼虫黄褐色，运动活泼，体前端较粗钝，有钻齿但不明显，大小 (11.0~37.2) mm×(0.31~0.95) mm，尾短，钝圆，可见尾突。无胃盲囊,但有肠盲囊，体侧线呈大蝴蝶状，顶端不分开，无茎，与角质皮连接处较宽。肠细胞数 115 个。

7.4 对盲肠线虫 A 型 *Contraecaecum*

幼虫黄白色，较小，大小 (8.4~22.6) mm×(0.29~0.67) mm，虫体前端较细，有钻齿，尾端无尾突，但有 18~20 个微刺，有胃盲囊和肠盲囊，胃盲囊显著长，与肠盲囊长度比例为 5.45:1，体侧线呈大蝴蝶状，在表皮有一对小突起，肠细胞数 40 个。

8 结果与报告

a. 剖检发现包囊或虫体，经鉴定，符合上述任何一种形态特征者，即可报告异尖线虫阳性；

b. 未检出包囊或幼虫者则报告：未检出（或阴性）。

9 注意事项

a. 每次使用显微镜后，需用擦镜纸擦拭物镜。

b. 70 %乙醇不能直接加热，应隔水加热至 70 ℃。

十、猪带绦虫囊尾蚴检验标准操作程序

(一) 镜检法

1 方法来源

《食源性寄生虫病》，周晓农、陈家旭主编，人民出版社，2009。

2 范围

本程序适用于猪肉类感染猪带绦虫囊尾蚴的检测。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本程序。

猪囊尾蚴 *Cysticercus cellulosae*

猪囊尾蚴是猪带绦虫 (*Taenia solium*) 的幼虫，在猪体内寄生的主要部位肌肉、舌、心脏、大脑等。其中，肌肉以运动较多的股内侧肌最多，其次为深腰肌、

肩胛肌、咬肌、腹内斜肌、膈肌。人若食入生的或未煮熟的有囊尾蚴的猪肉，可引发并猪带绦虫病。

4 设备和材料

显微镜、解剖镜、方盘、手术刀、手术剪、镊子、培养皿、废物盘。

5 试剂

生理盐水。

6 操作原理与方法

6.1 镜检法

6.1.1 原理

猪囊尾蚴寄生在猪运动较多的肌肉，以股内侧肌最多，其后依次为深腰肌、肩胛肌、咬肌、腹内斜肌、膈肌和心肌。通过肉眼可直接查看到肌肉有许多米粒大至豌豆大的白色半透明的囊泡。用镊子取出囊泡，在显微镜下观察可见头节结构特征。钙化后的囊尾蚴呈白色圆点状。

6.1.2 采样

采集猪的深腰肌、肩胛肌、咬肌、腹内斜肌、膈肌和心肌等部位。取需检测部位的肌肉 1kg,以手术刀每隔 8~10mm 横断切开肌肉纤维，观察有无乳白色透明石榴籽样物的囊泡或疑似囊尾蚴。

6.1.3 镜检

将囊泡或疑似囊尾蚴切下，置于载玻片上，滴一滴生理盐水，盖上另一块载玻片，轻轻下压后低倍显微镜下镜检。

7 猪囊尾蚴形态

呈卵圆形白色半透明的囊泡状，大小约 20mm~10mm。囊壁薄，充满囊液，内有一小米粒大的小白点，为翻卷其内的头节。头节具有吸盘、顶突和小钩，典型的吸盘数为 4 个，有时亦可 2~7 个，可具有双顶突，小钩数也有很大差异。

8 结果与报告

8.1 如发现囊尾蚴，经鉴定，符合其特征者，可报告查见猪带绦虫囊尾蚴；

8.2 未检出囊尾蚴则报告：未检出。

9 注意事项

9.1 载玻片使用前必须清洁处理，做到无灰尘，无油腻，无霉点。

9.2 对检出囊尾蚴的样品（猪肉等）须作无害化处理。

附录 A 试剂

A.1 5%福尔马林固定液

氯化钠 0.85 g

甲醛溶液（37%~40% 甲醛）5 mL

去离子水 95 mL

将氯化钠溶于水后，加甲醛溶液室温保存。

A.2 甘油透明液

甘油 2 份

苯酚 1 份

乳酸 1 份

蒸馏水 1 份

混匀备用。

A3 人工消化液

胃蛋白酶（3000IU/g） 10.0 g

盐酸（密度 1.19 g/ml，浓度 37%） 10 mL

蒸馏水 1000 mL

注意：顺序为蒸馏水，然后是盐酸，最后加胃蛋白酶，以免失活，加温 40℃ 搅拌溶解，现用现配。

（二）多重 PCR

1 方法来源

Yamasaki H, Allan JC, Sato MO, 等. DNA differential diagnosis of taeniasis and cysticercosis by multiplex PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology 2004; 42: 548-553.

2 范围

本程序适用于猪肉类感染猪带绦虫囊尾蚴的检测。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本程序。

猪囊尾蚴 *Cysticercus cellulosae*

猪囊尾蚴是猪带绦虫 (*Taenia solium*) 的幼虫, 在猪体内主要寄生在肌肉、舌、大脑、心脏等。其中, 肌肉以运动较多的股内侧肌最多, 其次为深腰肌、肩胛肌、咬肌、腹内斜肌、膈肌。人若食入生的或未煮熟的含有囊尾蚴的猪肉, 可引发猪带绦虫病。

4 设备和材料

方盘、菜刀、砧板、镊子、手术剪、标本瓶、恒温震荡孵箱、低温高速离心机、微型离心机、PCR 管快速旋转器、PCR 仪、凝胶电泳仪、凝胶成像仪、微量移液器 (1ml、200ul、20ul、10ul)、枪头 (1ml、200ul、10ul)

5 试剂

无水乙醇、组织 DNA 提取试剂盒 (QIAGEN)、PCR Green Master Mix (Promega)、PCR 水、琼脂糖、100bp DNA Ladder、核酸染料 GELVIEW、10×TBE 电泳缓冲液、上游和下游引物 (见附件 1)

6 操作原理与方法

6.1 猪囊尾蚴的采集

猪囊尾蚴寄生在猪运动较多的肌肉, 以股内侧肌最多, 其后依次为深腰肌、肩胛肌、咬肌、腹内斜肌、膈肌和心肌。通过肉眼可直接查看肌肉中有无米粒大至豌豆大的白色半透明的囊泡。猪囊尾蚴呈卵圆形白色半透明的囊泡状, 大小约 10mm~20mm。囊壁薄, 充满囊液, 内有一小米粒大的小白点, 为翻卷其内的头节。用镊子取出囊泡, 观察有无头节结构。钙化后的囊尾蚴呈白色圆点状。

6.2 猪囊尾蚴的多重 PCR 虫种鉴定

6.2.1 原理

在同一反应管中同时加入猪带绦虫、牛带绦虫、亚洲带绦虫的特异性正向引物, 以及通用的反向引物, 对线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (COX 1) 基因进

行 PCR 扩增，根据扩增产物的有无及片段长度的不同，进行阴阳性结果判定和虫种的鉴定。

6.2.2 操作

6.2.2.1 DNA 提取。

采用商品化的组织 DNA 提取试剂盒，按照说明书操作步骤提取样本基因组 DNA。

所提取的 DNA 直接用于 PCR 扩增，或于-20℃冷冻备用。

6.2.2.2 PCR 扩增。

将样品 DNA 加入到制备好的 PCR 反应混合液中，同时设置阳性对照和无模板空白对照，瞬时离心后，放入 PCR 仪中进行扩增。

反应体系：2× PCR Green Master Mix 10μL，上游引物：猪带绦虫1.0μL、牛带绦虫0.5μL、亚洲带绦虫1.0μL，下游引物2.0μL，DNA模板1.0μL，ddH₂O 4.5uL，总反应体积20μL。

反应条件：95℃ 4min；95℃ 30s，55℃ 30s，72℃ 90s，35个循环；72℃ 5min。

PCR扩增产物直接用于电泳，或于-20℃冷冻备用。

6.2.2.3 电泳检测。

根据所需胶块大小称取定量琼脂糖于三角瓶中，按 2%浓度加入 0.5×TBE 电泳缓冲液（如 2.0g 琼脂糖加入 100mL TBE），加热至完全溶解，待冷却片刻后，按 1:10000 比例加入 GELVIEW 核酸染料(如 100mL 溶液加入 10uL GELVIEW)，混匀后倒入制胶板中，插上梳子，室温放置 30~40min，待凝胶冷却凝固后小心拔出梳子，将制好的胶块放入电泳槽中，加入电泳缓冲液使其淹没凝胶。根据加样孔大小，吸取 5~10uL PCR 产物加入孔中，同时加入 DNA 标准分子量，用以确定核酸片段大小，80~120 V 恒压电泳 20~40min。电泳结束后，取出凝胶块置于凝胶成像系统下观察结果。

6.2.4 结果

PCR 产物经电泳后，在 984bp 位置出现特异性条带，同时阳性对照在其对应位置出现条带、无模板空白对照没有条带，则实验有效，结果判定为猪带绦虫检测阳性。

PCR 产物经电泳后，没有条带、或出现非特异性条带（条带位置不在 984bp 处），同时阳性对照在其对应位置出现条带、无模板空白对照没有条带，则实验有效，结果判定为猪带绦虫阴性。

阳性对照或无模板空白对照任一电泳结果有异，则实验结果无效。

6.3 报告

8.1 如发现囊尾蚴，经鉴定，符合其特征者，可报告查见猪带绦虫囊尾蚴；

8.2 未检出囊尾蚴则报告：未检出。

7 注意事项

7.1 样本采集、处理过程中，应注意防止不同样本间的交叉污染。

7.2 DNA 提取、反应体系配置、PCR 扩增、电泳检测等操作应注意分区进行，不同区域配置独立的实验工具。

7.3 将混匀的凝胶溶液倒入制胶槽中时，应注意不要产生气泡。若产生气泡，可用移液枪头将其移除。