

中华人民共和国国家标准

GB 4789. 31—2013

食品安全国家标准

食品微生物学检验

沙门氏菌、志贺氏菌和致泻大肠埃希氏菌
的肠杆菌科噬菌体诊断检验

2013-11-29 发布

2014-06-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会

发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.31-2003 《食品卫生微生物学检验 沙门氏菌、志贺氏菌和致泻大肠埃希氏菌的肠杆菌科噬菌体检验方法》。

本标准与 GB/T 4789.31-2003 相比, 主要变化如下:

- 修改了操作步骤;
- 增加了附录 B。

食品安全国家标准
食品微生物学检验
沙门氏菌、志贺氏菌和致泻大肠埃希氏菌的
肠杆菌科噬菌体诊断检验

1 范围

本标准规定了应用肠杆菌科噬菌体诊断方法检验食品中沙门氏菌、志贺氏菌和致泻大肠埃希氏菌。本标准适用于各类食品和食源性疾病事件样品中沙门氏菌、志贺氏菌和致泻大肠埃希氏菌的检验。本标准适用于食品行业从业人员肠道沙门氏菌和志贺氏菌带菌检验。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌、培养的设备外，其他设备和材料如下：

- a) 恒温培养箱：36 °C±1 °C, 42 °C±1 °C, 50 °C±1 °C；
- b) 厌氧培养装置：41.5 °C±0.5 °C；
- c) 显微镜：10 倍~100 倍；
- d) 水平仪：噬菌体试验的工作台面应调整至水平位置；
- e) 已灭菌 1 mL 一次性注射器（应为塑料材质），针头无编号，使用前测定每滴 5 μL~10 μL（每 mL 有 100~200 滴）可用；
- f) 微量移液器及吸头（10 μL 和 5 μL）；
- g) 定量移液器及吸头（100 μL 和 50 μL）；
- h) 无菌吸管：10 mL、5 mL、1 mL；
- i) 无菌毛细管；
- j) 无菌培养皿：90 mm；
- k) 无菌棉签；
- l) 带盖的灭菌小试管：8 mm×50 mm；
- m) 载物玻片。

3 培养基和试剂

- 3.1 亚硒酸盐胱氨酸（SC）增菌液：见附录 A 中的 A.1。
- 3.2 四硫磺酸钠煌绿（TTB）增菌液：见附录 A 中的 A.2。
- 3.3 志贺氏菌（BCT）增菌液：见附录 A 中的 A.3。
- 3.4 营养肉汤（NB）：见附录 A 中的 A.4。
- 3.5 营养琼脂（NA）：见附录 A 中的 A.5。
- 3.6 营养半固体琼脂（NSA）：见附录 A 中的 A.6。

3.7 三糖铁琼脂 (TSI): 见附录 A 中的 A.7。

3.8 葡萄糖铵琼脂: 见附录 A 中的 A.8。

3.9 肠杆菌科诊断用噬菌体, 7 种和 3 种。必要时可再购置大肠埃希氏菌分型噬菌体 (6 种) 一套。安瓿开启后用无菌毛细管吸出移入灭菌小试管内, 如果每次使用量很少, 可分装于 2~3 支试管内, 保存于 5 °C 冰箱备用。

3.10 沙门氏菌因子血清, 志贺氏菌分型因子血清, 致泻大肠埃希氏菌分型因子血清。因子血清的种类视需要而定。

4 检验程序

4.1 沙门氏菌的检验程序

沙门氏菌的检验程序见图 1。

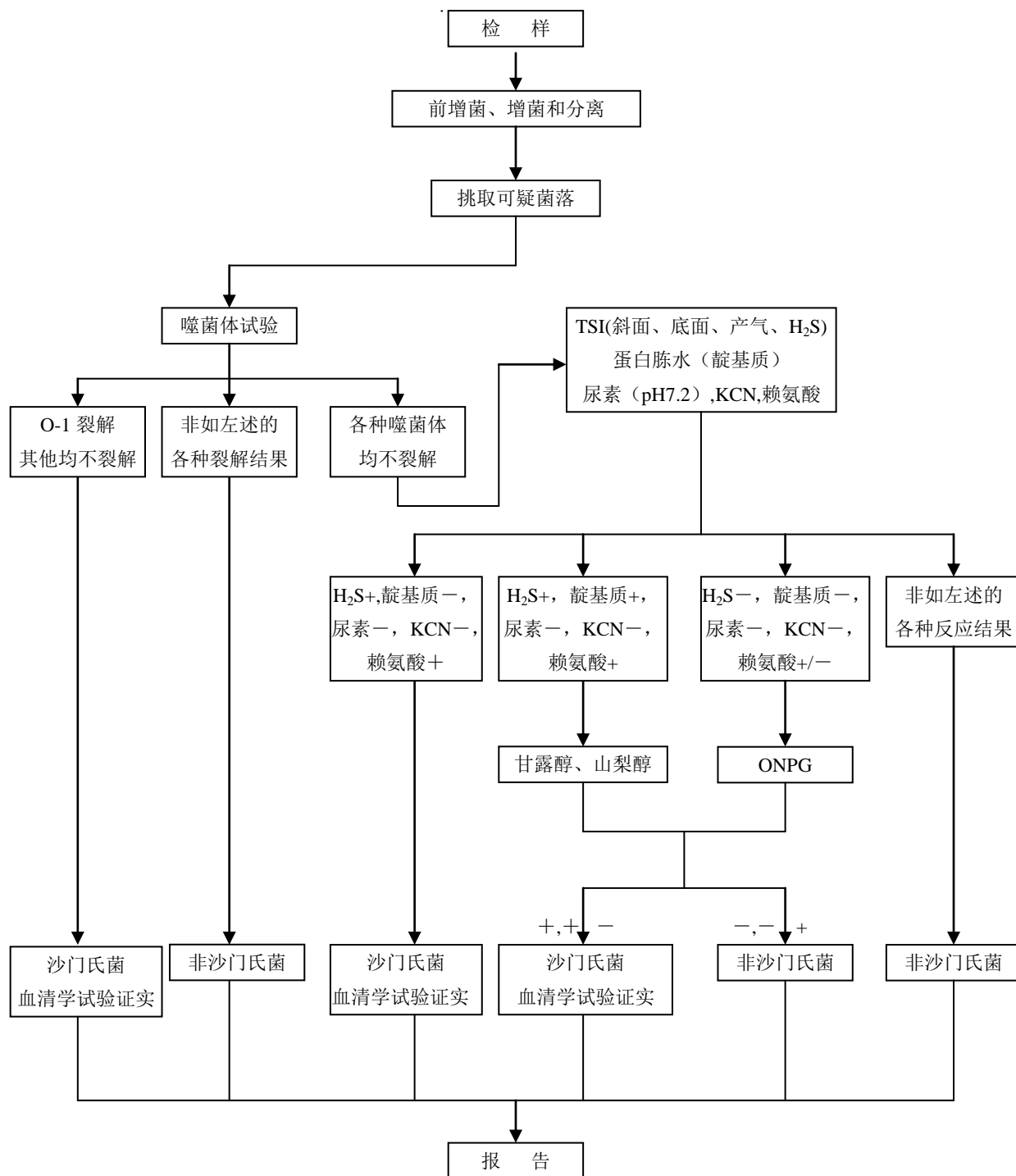


图1 沙门氏菌的检验程序

4.2 志贺氏菌的检验程序

志贺氏菌的检验程序见图2。

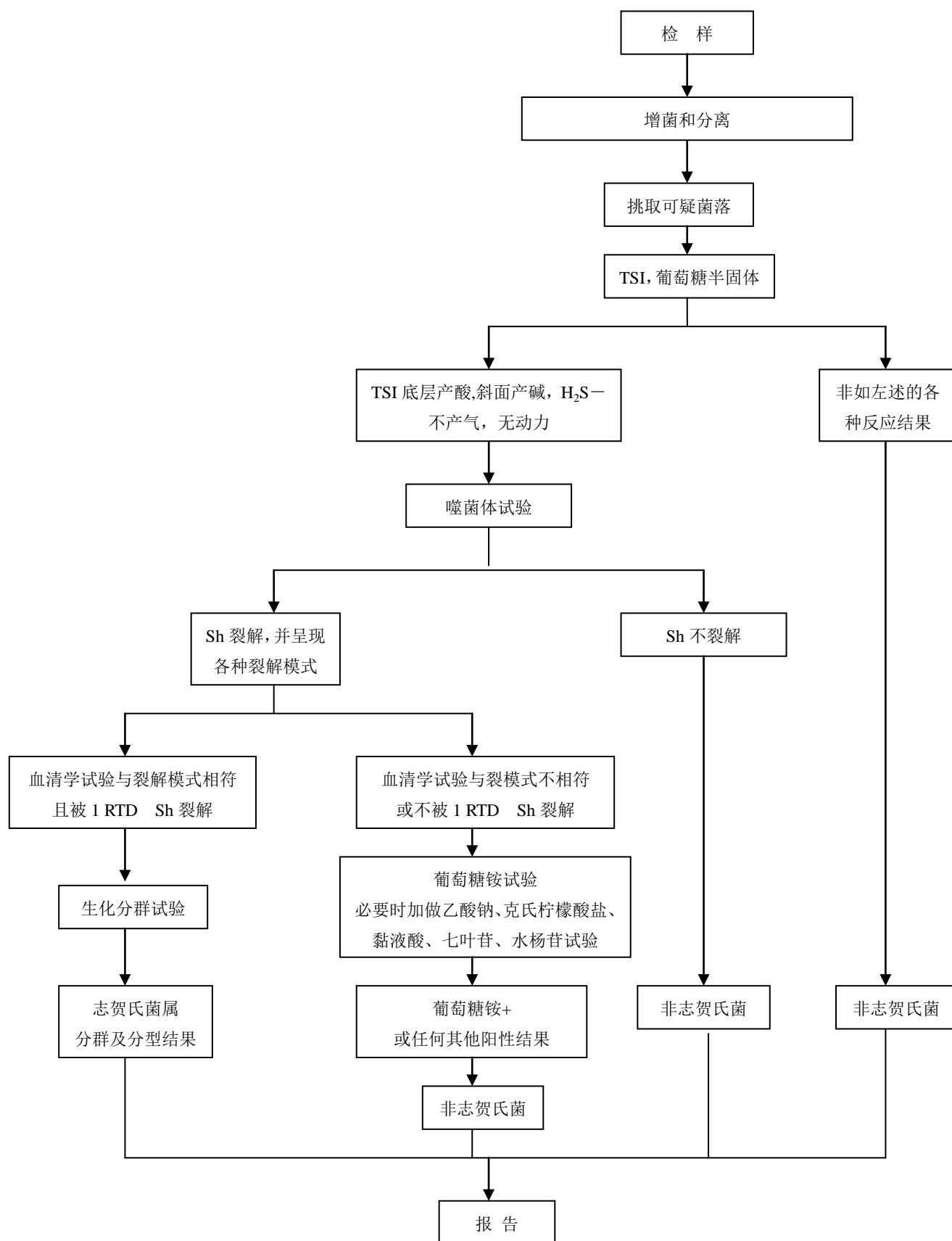


图2 志贺氏菌的检验程序

4.3 致泻大肠埃希氏菌的检验程序

致泻大肠埃希氏菌的检验程序见图 3。

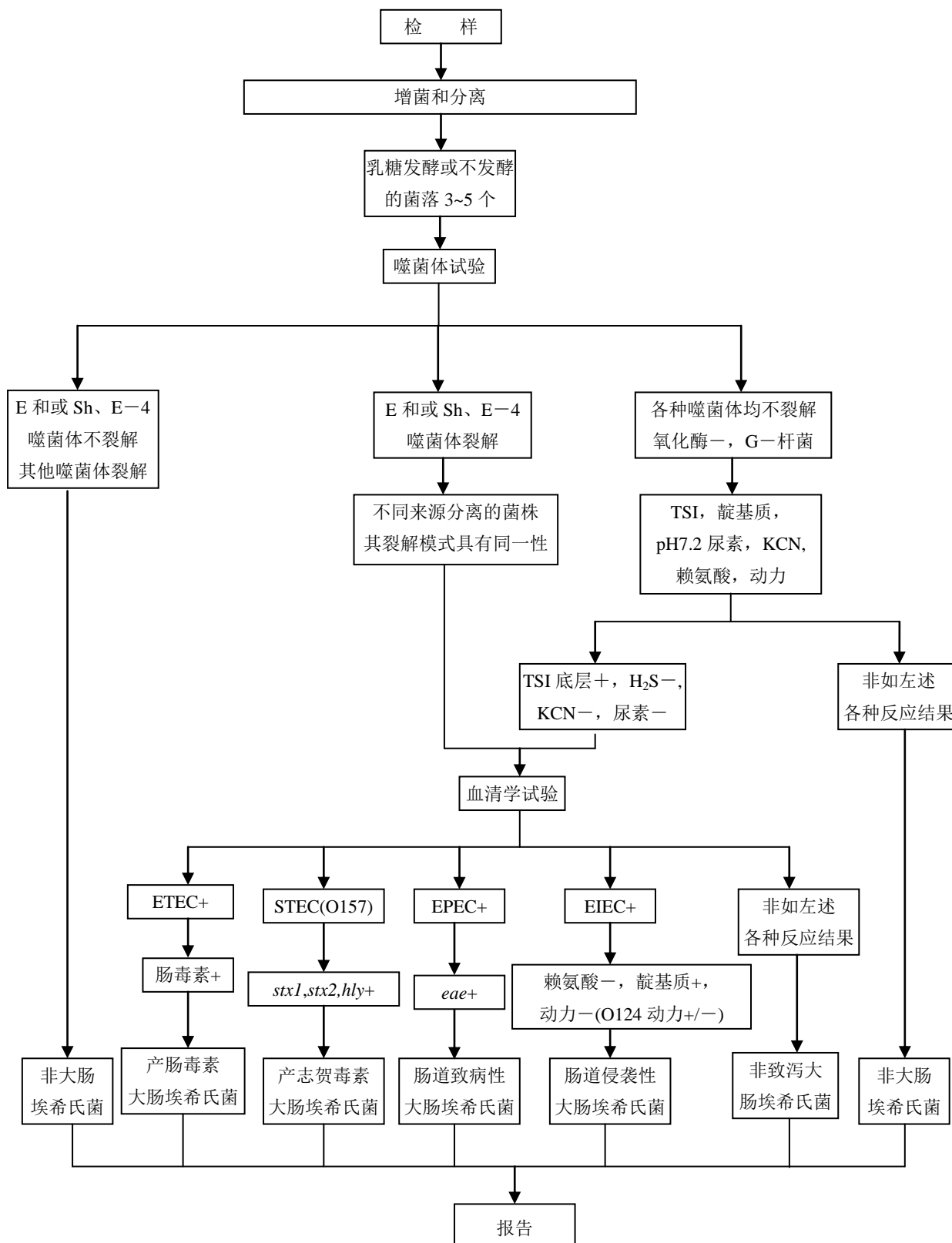


图 3 致泻大肠埃希氏菌的检验程序

5 操作步骤

5.1 前增菌、增菌和分离

5.1.1 沙门氏菌的前增菌、增菌和分离按 GB 4789.4 进行。沙门氏菌增菌液灵敏度的测定见附录 B。在食品行业从业人员的肠道沙门氏菌带菌检验时，采集的标本应增菌，不应前增菌。食物中毒标本不应前增菌，所采集的标本同时做增菌和不增菌步骤。

5.1.2 志贺氏菌的增菌和分离按 GB 4789.5 进行。没有厌氧培养条件的实验室可以采用附录 A 中的 BCT 增菌液。食物中毒患者的粪便标本同时做增菌和不增菌步骤。

5.1.3 致泻大肠埃希氏菌的增菌和分离按 GB 4789.6 和 GB 4789.36 进行。食物中毒标本同时做增菌和不增菌步骤。

5.2 噬菌体试验

5.2.1 培养基的准备

营养琼脂平板(含琼脂 1%~1.5%，为防止变形杆菌的蔓延生长，可按 0.02% 量加入十二烷基硫酸钠)，营养琼脂加热溶化后，加入每个 9 cm 平皿中约 20 mL~25 mL，放在水平台面上待其凝固。翻转平板，在 36 °C±1 °C 培养箱内半开皿倒置约 1 h，或 50 °C±1 °C 培养箱内半开皿倒置约 30 min，以烘干培养基表面水分。

5.2.2 试验菌液的准备

5.2.2.1 自选择性琼脂平板上分别挑取 2 个以上典型或可疑菌落，检验沙门氏菌时，挑取乳糖阴性产 H₂S 或不产 H₂S 的菌落，和乳糖阳性产 H₂S 的菌落。检验大肠埃希氏菌时挑取乳糖阳性或乳糖阴性的菌落。检验志贺氏菌时挑取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 °C±1 °C 培养 20 h~24 h 后选取三糖铁底层产酸、斜面产碱，不产 H₂S，不产气无动力的菌落。下述两种方法可供制备试验菌液时选用。

5.2.2.2 方法一：将待检菌落接种于营养肉汤管内，于 36 °C±1 °C 培养 14 h~24 h。挑取此肉汤培养物 1 满环(约 5 μL)，稀释于盛有 1 mL~2 mL 的营养肉汤管内，使成为 1:200~1:400 稀释菌液，含菌量约为 1×10⁶ CFU/mL。

5.2.2.3 方法二：用接种针在鉴别平板上挑取可疑菌落，稀释于盛有 1 mL~2 mL 营养肉汤管内，含菌量约为 1×10⁶ CFU/mL。

5.2.3 涂抹试验菌液

5.2.3.1 斑点涂抹法：将营养琼脂表面自圆心起分为三等分或二等分，每等分可供涂抹 1 株细菌培养物。每挑取试验菌液 1 满环，涂抹直径约 1 cm 的菌斑一个。每株培养物涂抹菌斑 7 个，外圈 5 个，内圈 2 个。

5.2.3.2 棉签涂抹法：用无菌棉签蘸取试验菌液并略挤去过多液体，在如上琼脂平板表面三分之一的区域内涂抹。三个涂抹区之间保持适当距离，待菌液干燥。

5.2.4 滴加噬菌体

用定量为 1 mL 的一次性注射器(针头无编号，1 mL 约有 100~200 滴，每滴相当于 5 μL~10 μL)，在每一个菌斑上滴加噬菌体。或用定量为 10 μL 或 5 μL 的微量移液器在每一个菌斑上滴加噬菌体一滴，每滴加一种噬菌体应更换一副注射器或一个吸头，但是每副注射器或每一个吸头可以滴完各株细菌的同一种噬菌体。滴加的噬菌体依次为 O-I、C、Sh、E、CE、E-4 和 Ent。滴加噬菌体时应将琼脂平板放在水平台面上，液滴应悬空滴下，不要污染针头或滴头。待 7 种噬菌体均滴加完毕后，略等数分钟待噬菌

体液干燥。翻转平板，放在 36℃ 培养 5 h~6 h，和 14 h~24 h 各观察一次结果。

如果仅有少数几株细菌作噬菌体试验，可用直径为 3 mm 的接种环挑取噬菌体，每一满环相当于 5 μL，依次加在菌斑上，尽量减少在室温放置的时间。

5.2.5 试验结果的判定

必要时（例如不能测定到完整的血清型），可吸取少许剩余的蛋白胨水培养物作靛基质试验，大肠埃希氏菌一般为靛基质阳性，沙门氏菌为靛基质阴性。噬菌体试验的结果见表 1。

表 1 噬菌体试验结果

序号	噬菌体裂解模式							判定结果
	O-I	C	Sh	E	CE	E-4	Ent	
1	CL	-	-	-	-	-	-	沙门氏菌属
2	CL	-	-	-	-	CL	-	沙门氏菌属(靛基质-),大肠埃希氏菌(靛基质+)
3	-	CL	-	-	(-)	(-)	-	弗劳地氏柠檬酸杆菌群 ^a
4	-	-	CL	v	v	v	-	志贺氏菌属 ^b ,大肠埃希氏菌
5	CL	-	CL	v	v	v	-	大肠埃希氏菌
6	v	-	-	CL	v	v	-	大肠埃希氏菌
7	-	-	-	-	CL	v	-	弗劳地氏柠檬酸杆菌群 ^a ,大肠埃希氏菌
8	-	-	-	-	-	CL	-	大肠埃希氏菌
9	-	(-)	v	-	-	-	CL	阴沟肠杆菌
0	-	-	-	-	-	-	-	噬菌体不裂解培养物,用生化试验鉴定

注：CL 表示融合性裂解；- 表示不裂解；(-) 表示少量菌株裂解；v 表示裂解或不裂解。

^a 含弗劳地氏柠檬酸杆菌、杨氏柠檬酸杆菌、布雷克氏柠檬酸杆菌、沃克曼氏柠檬酸杆菌和吉伦氏柠檬酸杆菌。

^b 按表 3 检索并做血清学分型试验。

5.2.6 供快速检验沙门氏菌的噬菌体简化诊断法

采用如下 3 种噬菌体：沙门氏菌 O-I 噬菌体；E 多价噬菌体，内含 E 和 Sh；C 多价噬菌体，内含 C、CE 和 Ent。培养基和试验菌液的准备均同前法。

涂抹试验菌液：斑点涂抹法将琼脂平板表面分为 4 等分或 6 等分，每等分可供涂抹一株细菌培养物，每株培养物涂抹 3 个菌斑，外圈 2 个，内圈 1 个。棉签涂抹法可将试验菌液在琼脂平板上涂抹成带状，每个平板约可涂抹 5 条菌带，置数分钟，待菌斑干燥。

依次滴加上述 3 种噬菌体。斑点涂抹法，一般可把 O-I 噬菌体滴加在内圈的菌斑上。带状涂抹法，可将 O-I 噬菌体滴加在菌带的左边。待噬菌体液滴干燥后，翻转平板，在 36℃ 培养 5 h~6 h，和 14 h~24 h 各观察一次结果。按表 2 判定结果。

表 2 噬菌体试验简化诊断法

O-I	E 多价	C 多价	判定结果
CL	-	-	沙门氏菌属
v	CL	v	大肠埃希氏菌
-	-	CL	弗劳地氏柠檬酸杆菌群 ^a
-	-	-	噬菌体不裂解培养物

注：CL 表示融合性裂解；- 表示不裂解；v 表示裂解或不裂解。

^a 除表 1 的注中所述外，并含阴沟肠杆菌和少数大肠埃希氏菌。

5.3 噬菌体不裂解培养物的补充生化试验

少数沙门氏菌培养物不被 O-I 噬菌体裂解，少数大肠埃希氏菌培养物不被相应噬菌体裂解，不被各种噬菌体裂解的培养物接种三糖铁琼脂，按 GB 4789.4 做 5 项生化试验，血清学分型鉴定后判定结果。

5.4 血清学分型鉴定及其他补充试验

5.4.1 沙门氏菌分型鉴定

按 GB 4789.4 进行。如果判定为沙门氏菌时，应得出完整的血清学分型鉴定的结果。

5.4.2 致泻大肠埃希氏菌鉴定

5.4.2.1 按 GB 4789.6 和 GB 4789.36 进行。分离的菌株应该同时被同样的几个噬菌体裂解后，用大肠埃希氏菌分型噬菌体试验，这些菌株应该具有相同的裂解模式，同时测定 1 RTD 噬菌体的裂解情况。

5.4.2.2 产肠毒素大肠埃希氏菌，应有肠毒素试验的证实。

5.4.2.3 侵袭性大肠埃希氏菌，典型的生化特性为：赖氨酸脱羧酶试验阴性、无动力、产气或不产气（O124 血清型亦可以为有动力、不产气），靛基质试验阳性。可进一步做豚鼠角膜试验，结果应该为阳性，质粒电泳应证明具有 120~140 Mdal 大质粒，PCR 试验证明具有 *ipaC* 或 *ipaH* 基因。

5.4.2.4 产志贺毒素大肠埃希氏菌 O157:H7，典型的生化特性为：乳糖、蔗糖产酸，葡萄糖产酸并多数产气，硫化氢阴性，靛基质阳性，山梨醇迟缓发酵。PCR 试验证明具有产志贺毒素基因 *stx1*、*stx2* 和溶血毒素基因 *hly*。1RTD 的 E-2 噬菌体裂解试验，能被 1RTD 的 E-2 噬菌体裂解（裂解程度包括从 CL 到少数几个噬斑）。对于产志贺毒素和溶血毒素其他血清型的大肠埃希氏菌，按照 5.4.2.3 的程序进行鉴定。

5.4.2.5 肠道致病性大肠埃希氏菌 具有大肠埃希氏菌的典型生化特性，*eae* 基因（黏附屏蔽基因）的 PCR 试验为阳性。产志贺毒素大肠埃希氏菌 *eae* 试验也可为阳性。*EAF*（黏附因子质粒基因）或 *bfp*（菌毛捆绑形成基因）的 PCR 试验可进一步证实。

5.4.3 志贺氏菌分型鉴定

5.4.3.1 挑取三糖铁琼脂上的培养物，按噬菌体裂解模式，选用相应的志贺氏菌分型因子血清，做玻片凝集试验。血清学分型鉴定结果见表 3。

表 3 噬菌体试验的结果和志贺氏菌血清学分型鉴定的结果

序号	噬菌体裂解模式							志贺氏菌血清学分型鉴定的结果
	O-I	C	Sh	E	CE	E-4	Ent	
1	-	-	CL	CL	CL	CL	-	福氏 1-5,(鲍氏 11)
2	-	-	CL	CL	CL	-	-	福氏 1,4,痢疾 2,鲍氏 5,7,11,16,17,(宋内氏 D)
3	-	-	CL	CL	-	-	-	宋内氏 I,痢疾 2,福氏 4,鲍氏 5,16
4	-	-	CL	CL	-	CL	-	宋内氏 II,福氏 3
5	-	-	CL	-	-	-	-	福氏 6,鲍氏 1~4,偶数型 6~18(除 16 外),痢疾 3~12
6	-	-	CL	-	CL	-	-	鲍氏 9,15
7	-	-	CL	-	-	CL	-	痢疾 1,(宋内氏 II)
8	CL	-	CL	-	-	-	-	鲍氏 13 ^a

注：CL 表示融合性裂解；- 表示不裂解。

^a 鲍氏 13 型 DNA 同源性测定不符合志贺氏菌。

5.4.3.2 如按噬菌体裂解模式结果为福氏志贺氏菌 1~5 型，先用福氏多价血清做凝集试验。如呈现凝集，再分别用各型和群因子血清检查，以确定所属血清型和亚型（见 GB 4789.5）。

5.4.3.3 如按噬菌体裂解模式结果为福氏 6 型，鲍氏各型或痢疾 3~12 型，先用福氏 6 型血清做凝集试

验。福氏 6 型血清不凝集者，用鲍氏多价血清或痢疾 3~12 型多价血清做凝集试验，如果呈现凝集，再分别用各型因子血清检查。

5.4.3.4 如按噬菌体裂解模式结果为宋内氏 II 相菌而不被宋内氏血清凝集时，可直接按噬菌体裂解模式和粗糙型菌落特征判定之。

5.4.3.5 按噬菌体裂解模式结果做血清学试验不凝集者，或虽发现其被某一个分型因子血清凝集而与噬菌体裂解模式不相符者，或虽与噬菌体裂解模式相符但不被 1 RTD 的 Sh 噬菌体裂解者，均应做葡萄糖铵试验以与大肠埃希氏菌相鉴别。葡萄糖铵试验阳性者为大肠埃希氏菌。必要时可做如下生化试验：醋酸盐、克氏柠檬酸盐和粘液酸的利用试验，赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶试验，七叶苷分解试验。除宋内氏菌鲍氏 13 型为鸟氨酸脱羧酶阳性，并有少数宋内氏菌菌株可利用黏液酸外，志贺氏菌属的培养物均为阴性结果。上述试验任何阳性结果均提示为大肠埃希氏菌（按 GB 4789.5）。

5.4.3.6 检出的志贺氏菌培养物应符合该群的生化特性。福氏志贺氏菌 6 型符合鲍氏志贺氏菌的特性。靛基质阳性的志贺氏菌血清型有痢疾 2 型、7 型和 8 型，鲍氏 5、7、9、11、13、15、16 和 17 型。福氏志贺氏菌 1~5 型的靛基质反应较弱。靛基质阴性的志贺氏菌血清型为痢疾 1 型、3~6 型、9~12 型、福氏 6 型、鲍氏 1~4、6、8、10、12、14 和 18 型、宋内氏菌。

5.4.3.7 鲍氏志贺氏菌 13 型是唯一可被沙门氏菌 O-I 裂解的菌株，该菌株只被高效价的 Sh 噬菌体裂解。

5.5 结果报告

5.5.1 沙门氏菌检验的结果报告

5.5.1.1 O-I 噬菌体裂解，其他噬菌体均不裂解者，经沙门氏菌血清分型后报告。

5.5.1.2 各种噬菌体不裂解，生化试验结果为沙门氏菌，经沙门氏菌血清分型后报告，不可报告为未定型。

5.5.2 志贺氏菌检验的结果报告

5.5.2.1 Sh 噬菌体裂解，呈现各种裂解模式，血清学试验与裂解模式相符者，可报告志贺氏菌血清型。罕见血清型要求被 1 RTD Sh 噬菌体裂解，并符合志贺氏菌生化分群结果。

5.5.2.2 非如 5.5.2.1 的试验结果均报告非志贺氏菌。

5.5.3 致泻大肠埃希氏菌检验的结果报告

5.5.3.1 E 和或 Sh、E-4 噬菌体裂解，不同来源菌株的裂解模式具有同一性，或各种噬菌体均不裂解，经血清学分型确定者可分别报告为产肠毒素大肠埃希氏菌（肠毒素试验结果阳性），侵袭性大肠埃希氏菌（赖氨酸阴性、动力阴性，O124 可为动力阳性），产志贺毒素大肠埃希氏菌（O157:H7 和 O157:NM，*stx1*, *stx2*, *hly* 试验阳性）或肠道致病性大肠埃希氏菌（*eae* 试验阳性）。

5.5.3.2 非如 5.5.3.1 的结果均报告为非大肠埃希氏菌或非致泻大肠埃希氏菌。

附录 A

培养基及试剂

A.1 亚硒酸盐胱氨酸 (SC) 增菌液

A.1.1 成分

蛋白胨	5.0 g
乳糖	4.0 g
亚硒酸氢钠	4.0 g
1% L-胱氨酸溶液	1.0 mL
磷酸氢二钠 (无水)	4.5 g
磷酸二氢钠 (无水)	5.5 g
蒸馏水	加至1 000.0mL

A.1.2 制法

称取 L-胱氨酸 0.1 g (或 DL-胱氨酸 0.2 g), 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1.5 mL, 使胱氨酸溶解, 再加入蒸馏水 8.5 mL, 即为 1% L-胱氨酸溶液。

将蛋白胨、乳糖、胱氨酸加入于蒸馏水 800 mL 中, 为基础液。

将亚硒酸氢钠加入于 100 mL 蒸馏水中, 为 A 液。

将磷酸氢二钠和磷酸二氢钠加入于 100 mL 蒸馏水中, 为 B 液。

取基础液 4.0 mL, A 液 0.5 mL, B 液 0.5 mL 混合, 测定 pH。校正 pH 至 7.0~7.1, 将此 3 份溶液分别包装, 在 121℃ 高压灭菌 15 min (从高压灭菌器开始加热到取出不超过 1 h), 待其冷却至常温后放入 5℃ 冰箱内保存。临用前将 3 份溶液按比例混合, 分装试管。3 份溶液混合后, 其 pH 值小于 7.0, 则应调整磷酸氢二钠、磷酸二氢钠的用量和亚硒酸氢钠的用量。使用前应测定其增菌灵敏度, 方法见附录 B。不同亚硒酸盐和磷酸盐的用量见表 A.1。

表 A.1 不同亚硒酸盐和磷酸盐的用量

亚硒酸盐的种类和用量		磷酸盐的种类和用量	
g		g	
主要种类	用量	NaH ₂ PO ₄ (无水)	Na ₂ HPO ₄ (无水)
亚硒酸钠·H ₂ O(100%)	5.0	8.6	0.8
亚硒酸钠·H ₂ O (75%)	4.75	7.8	1.25
亚硒酸钠·H ₂ O (50%)	4.5	7.0	2.65
亚硒酸氢钠(75%)	4.25	6.25	3.58
亚硒酸氢钠(100%)	4.0	5.5	4.5
亚硒酸氢钠(75%)	3.85	4.7	5.4
亚硒酸氢钠(50%)	3.7	3.9	6.35
亚硒酸(75%)	3.55	3.1	7.28
亚硒酸(100%)	3.4	2.3	8.2

注: 表中所列均为在 1000mL 增菌液中的用量。

A.2 四硫磺酸钠煌绿（TTB）增菌液

A.2.1 成分

A.2.1.1 基础液

多价胨或初蛋白胨	3.0 g
胆盐	1.0 g
碳酸钙	10.0 g
硫代硫酸钠	30.0 g
0.1%煌绿水溶液	10.0 mL
蒸馏水	加至1 000.0 mL

A.2.1.2 碘液

碘	6.0 g
碘化钾	5.0 g
蒸馏水	20.0 mL

A.2.2 制法

A.2.2.1 基础液的配制：将基础液的成分依次加到 800mL 蒸馏水中，成分溶解后加蒸馏水至 1000mL，校正 pH 至 7.0 ± 0.1 ，经高压灭菌 121°C ，15 min。冷却后保存备用。

A.2.2.2 碘液的配制：先将碘化钾溶解于蒸馏水中，再加入碘片，振摇至碘片完全溶解。贮于棕色瓶内，密塞备用。临用前将基础液与碘液混合，分装试管。使用前应测定其增菌灵敏度，方法见附录 B。

注：为了防止变形杆菌的过度生长，可以在 1000 mL 中加入磺胺噻唑 1.25 mg。

A.3 志贺氏菌（BCT）增菌液

A.3.1 成分

蛋白胨	20.0 g
复合氨基酸	2.0 g
牛肉膏	5.0 g
三号胆盐	4.5 g
柠檬酸钠	4.5 g
硫代硫酸钠	4.5 g
蒸馏水	加至1 000.0 mL

A.3.2 制法

将 A.3.1 成分混合加热溶解，冷却至 25°C 校正 pH 至 7.2 ± 0.1 ，高压灭菌 121°C ，15 min，冷却后分装试管备用。

A.4 营养肉汤（NB）

A.4.1 成分

蛋白胨	15.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	加至1 000.0 mL

A.4.2 制法

将 A.4.1 成分混合加热溶解，冷却至 25℃校正 pH 至 7.2±0.2，高压灭菌 121℃，15 min，备用。

A.5 营养琼脂 (NA)

成分和制法：在 1000 mL 营养肉汤 (NB) 内加入琼脂 15 g (如用作噬菌体试验，只加琼脂 10 g)，高压灭菌 120℃，15 min，备用。

A.6 营养半固体琼脂 (NSA)

成分和制法：在 1000 mL 营养肉汤 (NB) 内加入琼脂 3 g，高压灭菌 120℃，15 min，备用。

A.7 三糖铁琼脂 (TSI)

A.7.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	3.0 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)	0.5 g
酚红	0.025 g或5 g / L溶液5 mL
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	0.5 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	加至1 000.0 mL

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，搅拌均匀，静置约 10 min，加热煮沸至完全溶解，校正 pH 至 7.4±0.1。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中，搅拌均匀，静置约 10 min，加热煮沸至完全溶解。将上述两溶液混合均匀后，再加入酚红指示剂，混匀，分装试管 (12 mm×100 mm)，每管约 2 mL~4 mL，高压灭菌 120℃ 10 min 或 115℃ 15 min，灭菌后置成高层斜面，呈桔红色。

A.8 葡萄糖铵琼脂

A.8.1 成分

氯化钠	5.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0 g
磷酸氢二钾（无水）	1.0 g
葡萄糖	5.0 g
琼脂	20.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝	40.0 mL
蒸馏水	加至 1 000.0 mL

A.8.2 制法

将 A.8.1 成分混合加热溶解，冷却至 25℃校正 pH 至 6.8±0.1，高压灭菌 121℃，15 min，放置成斜面，冷却后备用。

A.8.3 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 CFU~100 CFU 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。

附录 B

增菌液灵敏度测定方法

B.1 沙门氏菌增菌液灵敏度测定方法

B.1.1 试验菌株为沙门氏菌鼠伤寒血清型，沙门氏菌肠炎血清型。

B.1.2 干扰菌株为大肠埃希氏菌。

B.1.3 将试验菌株和干扰菌株接种营养肉汤管，在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。菌液浓度约为 10^9 CFU/mL 。大肠埃希氏菌菌液浓度不需测定，应测定沙门氏菌鼠伤寒血清型和肠炎血清型的菌液浓度。

B.1.4 每组 8 支 15 mm×150 mm 试管，编号，单号试管内每管加入灭菌生理盐水 4.5 mL，双号试管内每管加入灭菌生理盐水 5.0 mL。

B.1.5 在 1 号管内加入沙门氏菌营养肉汤培养液 0.5 mL，在 2 号管内加入沙门氏菌培养液 0.05 mL。再从 2 号管内吸取沙门氏菌稀释菌液，加入到 3 号管内 0.5 mL，加入到 4 号管内 0.05 mL。按此法继续稀释到 8 号管。每次稀释应更换一支吸管。

B.1.6 吸取 6 号管内的稀释菌液各 0.1 mL，分别点加在 2 个营养琼脂平板上，用弯曲的接种环将菌液均匀涂布，待平板表面的菌液干燥后，于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 14 h~24 h。计算平板上生长的沙门氏菌菌落数，取其平均数，约为 100 CFU。

B.1.7 接 B.1.5，排好若干组每组 10 支需要测定的增菌液，第 8 管到第 10 管都加入 8 号稀释管的稀释菌液各 0.1 mL；第 7 管到第 1 管逆序加入该稀释度的稀释菌液各 0.1 mL。

B.1.8 逆序向每管内加入未稀释的大肠埃希氏菌菌液 0.1 mL。振摇各管，使加入的菌液混合均匀。在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

B.1.9 振摇各管，使培养物混合均匀。挑取培养物，划线接种到鉴别培养基上，使能够出现单个菌落。在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

B.1.10 观察在鉴别培养基上沙门氏菌和大肠埃希氏菌菌落的生长情况。按照表 B.1 记录增菌培养的结果。

表 B.1 增菌培养的结果

增菌培养的结果	记录
沙门氏菌菌落数在 90% 以上，大肠埃希氏菌的菌落少见	++++
沙门氏菌菌落数约占 80%	+++
沙门氏菌和大肠埃希氏菌的菌落数分别占 50%	++
平板上大肠埃希氏菌的菌落为主，可见少数几个沙门氏菌的菌落	+
平板上生长的是大肠埃希氏菌的菌落，未见沙门氏菌的菌落	-
注：判定增菌液的灵敏度，是以++++和+++的结果为准。8~10 号管 3 管中有 1 管或 1 管以上达到++++，或+++的增菌效果，就可以判定已经达到这一管的灵敏度（约 1 CFU）。++和+的结果可检出，也可能被疏忽。	

B.2 沙门氏菌增菌液灵敏度简易测定方法

B.2.1 用于核对已经过测定的增菌液的灵敏度。

B.2.2 试验菌株、干扰菌株，及将菌株接种到营养肉汤和培养的方法均同 B.1.1~B.1.3。

B.2.3 准备 15 mm×150 mm 灭菌试管 2 支，分别加入灭菌生理盐水 5 mL。用直径为 3 mm 的接种环挑取试验菌株的营养肉汤培养物 1 满环（5 μL ），稀释到 5 mL 生理盐水中，此时相当于 $1:10^3$ 稀释。再

挑取此稀释液 1 满环, 稀释到另一支 5 mL 生理盐水管中, 此时相当于 $1:10^6$ 稀释。吸取此稀释液 0.1 mL, 涂布接种于一个营养琼脂平板上, 用于菌落计数, 菌落数约为 80 CFU ~100 CFU。再将此稀释液做成 1:10 和 1:100 稀释。

B.2.4 在 2~4 支增菌液管内, 各加入未稀释的大肠埃希氏菌肉汤培养物 0.1 mL, 再在其中一管内加入 1:10 稀释的试验菌液 (B.2.3) 0.1 mL, 另外的 1~3 支增菌液管内各加入 1:100 稀释的试验菌液 (B.2.3) 0.1 mL, 将试管内液体振摇使其均匀。在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 14 h~24 h。划线接种鉴别培养基, 在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 14 h~24 h 后观察结果。接种 1:10 稀释的试验菌液 (B.2.3) 的管相当于 B.1 试验方法中的第 7 管, 后面各管相当于第 8 管~第 10 管。

B.3 志贺氏菌增菌液灵敏度测定方法

B.3.1 试验菌株 福氏志贺氏菌 2a 型, 鲍氏志贺氏菌 4 型, 痢疾志贺氏菌 2 型, 宋内氏志贺氏菌各 1 株。

B.3.2 干扰菌株 大肠埃希氏菌 10 株。

B.3.3 对比增菌液, 以 GN 肉汤作为对比增菌液, 以判定所测定的增菌液是否优于 GN 肉汤。
