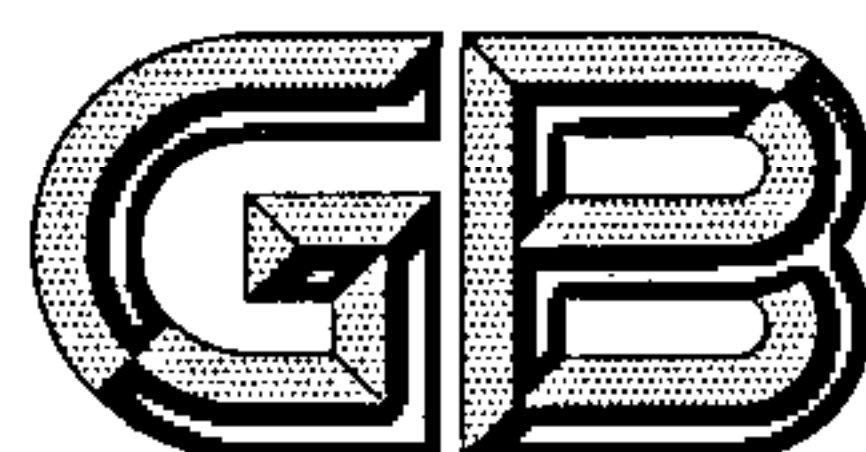




中华人民共和国国家标准

GB/T 4789.31—2003
代替 GB/T 4789.31—1994

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

Microbiological examination of food hygiene—
Examination of *Salmonellae*, *Shigellae*, and diarrhoea causative
Escherichia coli by means of the diagnostic typing phage set
for *enterobacteriaceae*

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准对 GB/T 4789.31—1994《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肠杆菌科噬菌体检验方法》进行修订。

本标准与 GB/T 4789.31—1994 相比主要修改如下：

——按照 GB/T 1.1—2000 对标准文本的格式和文字进行修改。

——规范原标准中的“设备和材料”。

本标准自实施之日起，GB/T 4789.31—1994 同时废止。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：江西省卫生防疫站、中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准主要起草人：何晓青、付萍、计融。

本标准于 1994 年首次发布，本次为第一次修订。

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

1 范围

本标准规定了应用肠杆菌科噬菌体诊断法检验食品中沙门氏菌、志贺氏菌和致泻大肠埃希氏菌的基本要求、操作程序和结果判定。

本标准适用于各种食品、食物中毒的检验,也适用于食品从业人员的肠道沙门氏菌和志贺氏菌带菌检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.4 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

GB/T 4789.5—2003 食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验

GB/T 4789.6 食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验

GB/T 4789.28—2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

3 设备和材料

3.1 恒温培养箱:36℃±1℃。

3.2 水平仪。

3.3 灭菌培养皿:直径 90 mm。

3.4 定量滴管:每滴约 10 μL。输液用的灭菌玻璃接管配 4 $\frac{1}{2}$ 号针头。

3.5 灭菌棉签。

4 培养基和试剂

4.1 营养琼脂、营养肉汤:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.7 和 3.8 进行。

4.2 蛋白胨水、胨基质试剂:按 GB/T 4789.28—2003 中 2.13 进行。

4.3 三糖铁琼脂:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.24 和 3.25 进行。

4.4 肠杆菌科诊断用噬菌体,7 种和 3 种。安瓿启开后用无菌毛细吸管吸出移入灭菌小试管内,用无菌胶塞塞紧,放于 4℃ 冰箱备用。

5 检验程序

5.1 肠杆菌科诊断用噬菌体检验沙门氏菌的程序见图 1。

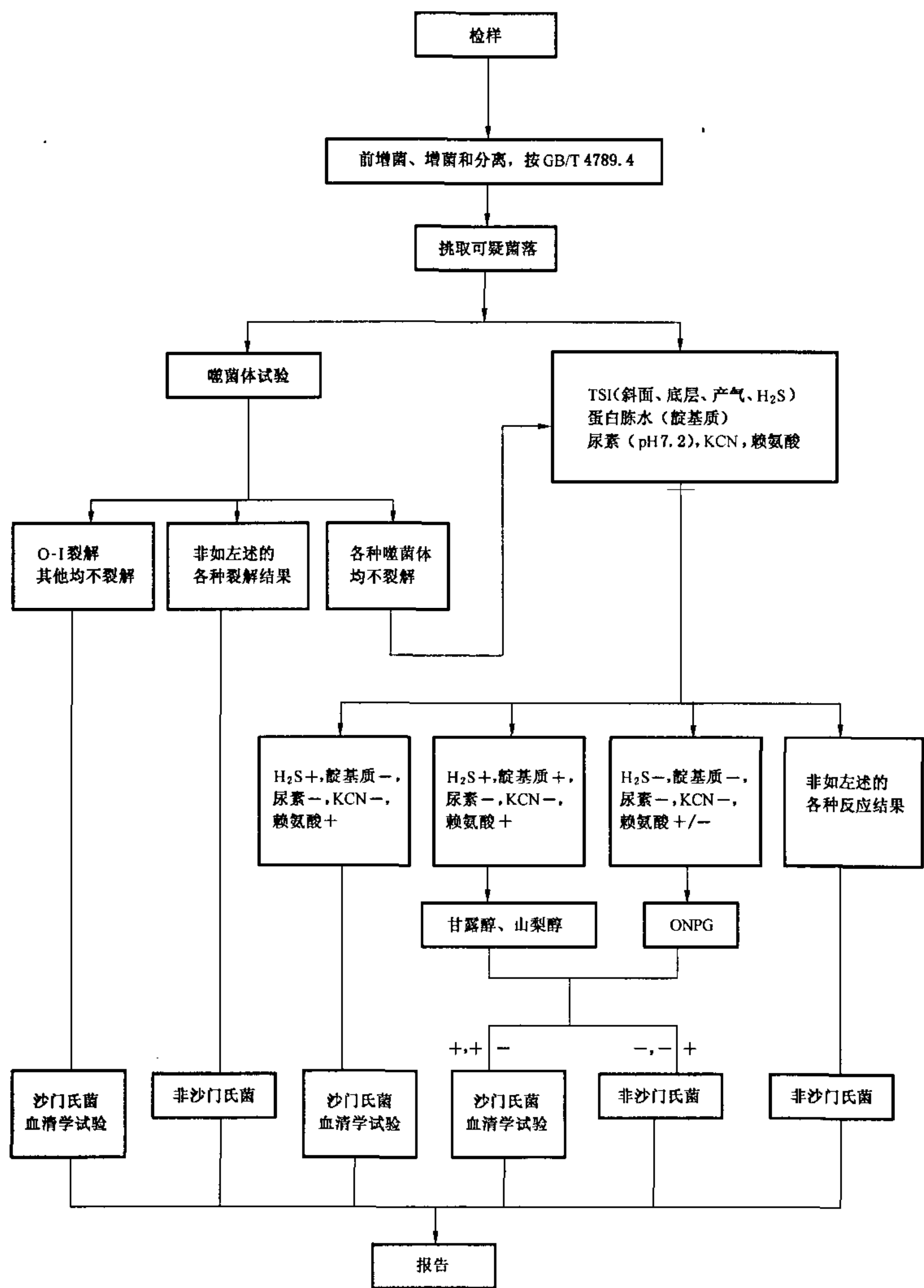


图 1 肠杆菌科诊断用噬菌体检验沙门氏菌的程序

5.2 肠杆菌科诊断用噬菌体检验志贺氏菌的程序见图 2。

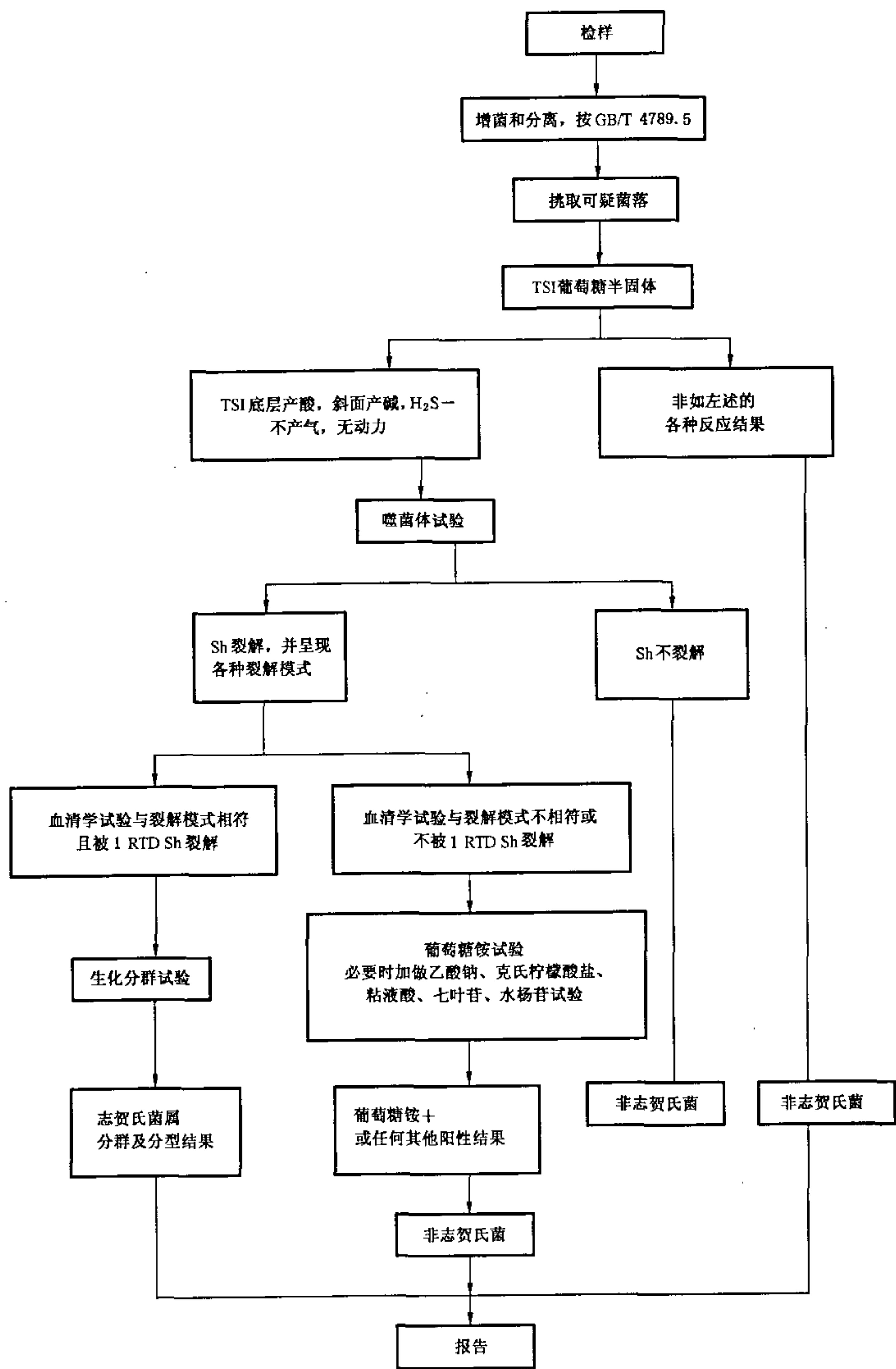


图 2 肠杆菌科诊断用噬菌体检验志贺氏菌的程序

5.3 肠杆菌科诊断用噬菌体检验致泻大肠埃希氏菌的程序见图 3。

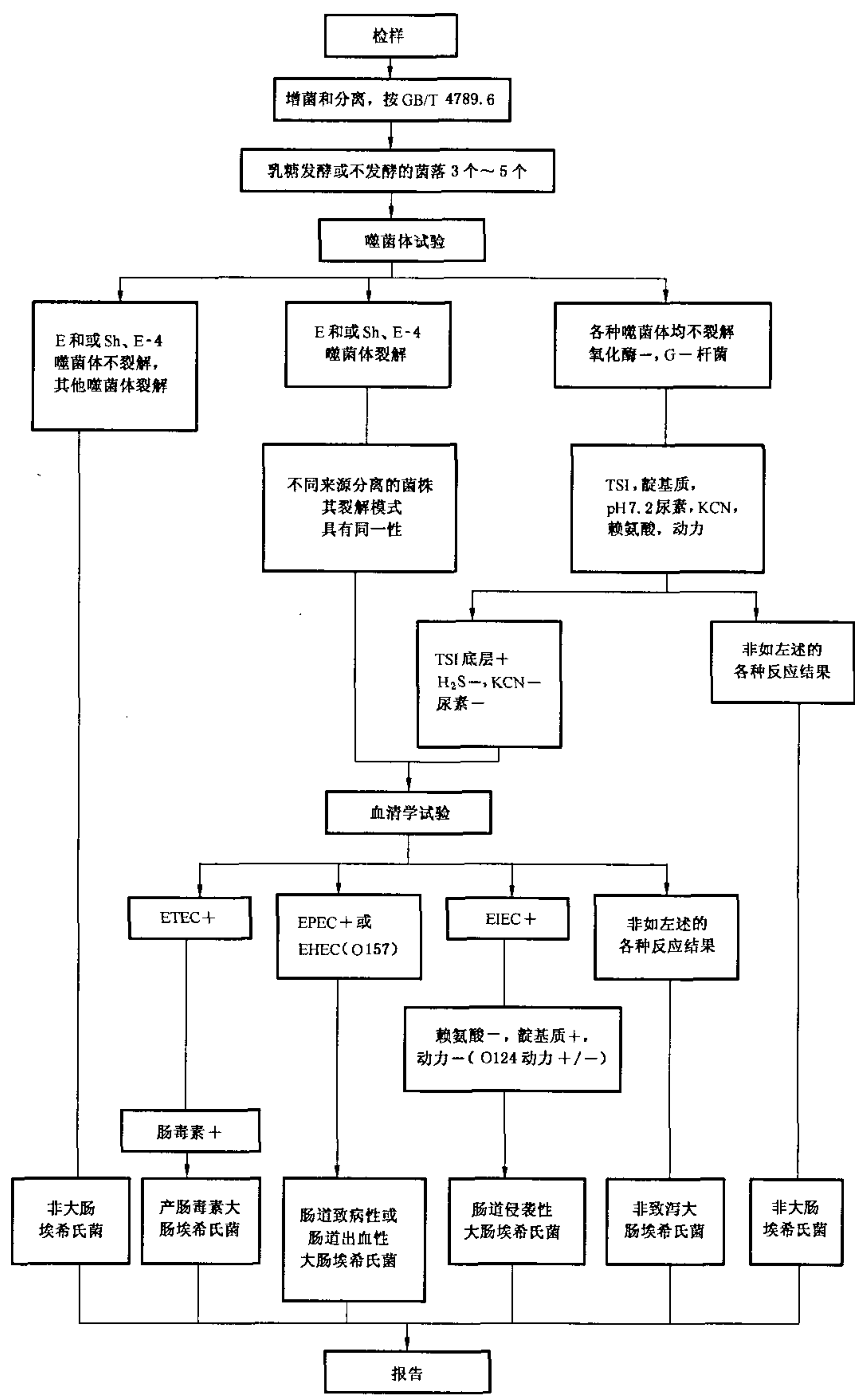


图 3 肠杆菌科诊断用噬菌体检验致泻大肠埃希氏菌的程序

6 检验步骤

6.1 前增菌、增菌和分离

- 6.1.1 沙门氏菌的前增菌、增菌和分离,按 GB/T 4789.4 进行。
 6.1.2 志贺氏菌的增菌和分离,按 GB/T 4789.5 进行。
 6.1.3 致泻大肠埃希氏菌的增菌和分离,按 GB/T 4789.6 进行。

6.2 噬菌体试验

6.2.1 培养基准备

营养琼脂平板(含琼脂 1%~1.5%,琼脂量视其凝固性而定,约为一般用量的四分之三),每个 90 mm 培养皿中约 25 mL,放在水平台面上俟其凝固,翻转平板,在 36℃ 半开皿倒置约 1 h,以烘干培养基表面水分,并使琼脂具有显著的吸水性。

6.2.2 试验菌液的准备

从选择性鉴别平板上挑取菌落,一般应多挑几个菌落,以防遗漏。检验沙门氏菌时,不但应挑取乳糖阴性产 H_2S 和不产 H_2S 的菌落,还应挑取乳糖阳性产 H_2S 的菌落。检验大肠埃希氏菌时应挑取乳糖阳性或阴性的菌落 3 个~5 个。检验志贺氏菌时应挑取可疑菌落接种三糖铁琼脂和葡萄糖半固体管,于 36℃ 培养过夜,次日选取三糖铁底层产酸、斜面产碱,不产 H_2S ,不产气无动力的培养物。下述两种方法可供选用。

6.2.2.1 一法:将待试菌落接种于营养肉汤管内,于 36℃ 培养过夜。挑取此肉汤培养物一满环,稀释于盛有 1 mL~2 mL 蛋白胨水的试管内,使成为(1:200)~(1:400)稀释菌液,含菌量约为 1×10^6 /mL。

6.2.2.2 二法:用接种针在鉴别平板上轻轻蘸取可疑菌落,挑取菌量不宜过多,稀释于盛有 1 mL~2 mL 蛋白胨水的试管内,使其含菌量约与一法相似。

6.2.3 涂抹试验菌液

6.2.3.1 斑点涂抹法:将营养琼脂平板表面自圆心起分为三等份,每等份可供涂抹一株细菌培养物,每挑取试验菌液一满环,涂抹直径约 1 cm 的菌斑一个。每株培养物涂抹七个菌斑,外圈四个,内圈三个。

6.2.3.2 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。略等数分钟,待菌液干燥。

6.2.4 滴加噬菌体

用定量乳头滴管在一个菌斑上滴加噬菌体一滴,依次为 O-I、C、Sh、E、CE、E-4 和 Ent。滴管上安装 4 号针头,每毫升约为 100 滴。每支滴管只滴加一种噬菌体,针尖绝对不能接触平板表面,严格防止交叉污染。每用一支滴管,可把全部待试菌应滴加噬菌体的菌斑部位全部滴加完毕。滴加噬菌体时必须将琼脂平板放在水平台面上。7 种噬菌体滴加完毕后,略等数分钟,待噬菌体液干燥。翻转平板,放 36℃ 培养 5 h~6 h,并过夜各观察一次结果。

如果仅有一两株培养物作噬菌体试验,则可用直径为 3 mm 的接种环挑取噬菌体,依次滴加在菌斑上。灼热的接种环必须完全冷却以后方可挑取噬菌体。

6.2.5 试验结果的判定

按表 1 判定噬菌体试验的结果。必要时吸取少许剩余的蛋白胨水培养物作靛基质试验,大肠埃希氏菌培养物一般为靛基质阳性。

表 1 肠杆菌科噬菌体诊断表

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—)
3	—	CL	—	—	(—)	(—)	—	大肠埃希氏菌(靛基质+)
								弗劳地氏柠檬酸杆菌
4	—	—	CL	•	•	•	—	志贺氏菌属 ^a 、大肠埃希氏菌
5	CL	—	CL	•	•	•	—	大肠埃希氏菌
6	•	—	—	CL	•	•	—	大肠埃希氏菌
7	—	—	—	—	CL	•	—	弗劳地氏柠檬酸杆菌、大肠埃希氏菌
8	—	—	—	—	—	CL	—	大肠埃希氏菌
9	—	(—)	•	—	—	—	CL	阴沟肠杆菌
0	—	—	—	—	—	—	—	噬菌体阴性菌株(用生化试验鉴定)
注：CL 融合性裂解；— 不裂解；• 裂解或不裂解；(—) 很少菌株裂解。								
^a 结合菌型预测，见表 3。								

6.2.6 供快速检验沙门氏菌的噬菌体简化诊断法

采用如下三种噬菌体：

- a) 沙门氏菌 C-I 噬菌体；
- b) E 多价噬菌体，包括 E 和 Sh；
- c) C 多价噬菌体，包括 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四等份，每等份可供涂抹一株细菌培养物。每株培养物涂抹三个菌斑，外圈两个，内圈一个。棉签涂抹法可将试验菌液在琼脂平板上涂抹成带状，每个平板约可涂抹五条菌带。略等数分钟，待菌斑干燥。

依次滴加上述三种噬菌体，在 36℃ 培养 5 h~6 h 和过夜，各观察一次结果。按表 2 判定简化诊断法的结果。

表 2 三滴法噬菌体试验简化诊断表

O-I	E 多价	C 多价	判定结果
CL	—	—	沙门氏菌属
•	CL	•	大肠埃希氏菌
—	—	CL	弗劳地氏柠檬酸杆菌 ^a
—	—	—	噬菌体阴性培养物
注：CL 融合性裂解；— 不裂解；• 裂解或不裂解。			
^a 包括阴沟肠杆菌和少数大肠埃希氏菌。			

6.3 噬菌体不裂解培养物的补充生化试验

有少数的沙门氏菌培养物不被 O-I 噬菌体裂解，并有少数的大肠埃希氏菌培养物不被相应噬菌体

裂解。故应将不被各种噬菌体裂解的培养物接种三糖铁琼脂。以下分别按 GB/T 4789. 4 和 GB/T 4789.6进行。

6.4 血清学分型鉴定

6.4.1 沙门氏菌

按 GB/T 4789.4 进行。

6.4.2 致泻大肠埃希氏菌

按 GB/T 4789.6 进行。

6.4.3 志贺氏菌

6.4.3.1 记录噬菌体试验的结果,并按表 3 判定血清学分型鉴定的方向。Sh 噬菌体不裂解的培养物不属于志贺氏菌。已知全部志贺氏菌培养物均能被 Sh 噬菌体裂解,且将其稀释至 1 RTD 时,有 99% 的志贺氏菌培养物仍应被裂解。

表 3 噬菌体试验的结果和志贺氏菌血清学分型鉴定的方向

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

注: CL 融合性裂解;—不裂解;()内为罕见的结果。

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。如果由于 K 抗原的存在而不出现凝集,应将菌液煮沸后再检查。

6.4.3.2 如按噬菌体裂解模式提示为福氏志贺氏菌 1 型~5 型,可先用福氏多价血清做凝集试验。如果呈现凝集,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/T 4789. 5—2003 表 2)。

6.4.3.3 如按噬菌体裂解模式提示为福氏 6 型,鲍氏各型或痢疾 3 型~12 型,可先用福氏 6 型血清做凝集试验。福氏 6 型血清不凝集者,可用鲍氏多价血清或痢疾 3~12 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。

6.4.3.4 如按噬菌体裂解模式提示为宋内氏 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形菌落特征判定之。

6.4.3.5 按噬菌体裂解模式所提示的方向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 1RTD 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。必要时还可以做如下的生化试验,即:乙酸钠、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、七叶苷的

分解试验,除宋内氏菌和鲍氏 13 型为鸟氨酸阳性、宋内氏菌的少数菌株可利用粘液酸,福氏 4a 型的少数菌株可利用乙酸钠外,志贺氏菌属的培养物均为阴性结果。这些试验中任何阳性结果均提示为大肠埃希氏菌。

6.4.3.6 检出的志贺氏菌培养物应符合该群的生化特性(见 GB/T 4789.5—2003 表 3),但福氏 6 型与 A 群或 C 群相似。靛基质阳性的志贺氏菌血清型为痢疾 2 型、7 型和 8 型,鲍氏 5、7、9、11、13、15、16 和 17 型,但福氏 1 型~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 型~6 型、9 型~12 型、福氏 6 型、鲍氏 1 型~4 型、6 型、8 型、10 型、12 型、14 型和 18 型及宋内氏菌。

6.5 大肠埃希氏菌肠毒素试验

按 GB/T 4789.6 进行。

6.6 结果报告

6.6.1 沙门氏菌检验的结果报告

6.6.1.1 O-I 噬菌体裂解,其他均不裂解者,经沙门氏菌血清分型后报告;或符合上述裂解结果,但尚未做血清分型试验者,可报告为沙门氏菌未分型。

6.6.1.2 各种噬菌体均不裂解,但生化试验确定为沙门氏菌,经沙门氏菌血清分型后报告;或符合上述生化试验结果,但尚未做血清分型试验者,可报告为沙门氏菌未分型。

6.6.1.3 非如上述的裂解结果,或生化试验否定为沙门氏菌者,可报告为非沙门氏菌。

6.6.2 志贺氏菌检验的结果报告

6.6.2.1 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,可报告志贺氏菌分型结果。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。

6.6.2.2 非如上述的试验结果均报告为非志贺氏菌。

6.6.3 致泻大肠埃希氏菌检验的结果报告

6.6.3.1 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,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(要求有肠毒素试验结果),侵袭性大肠埃希氏菌(要求赖氨酸阴性、动力阴性,但 O124 亦可为动力阳性),肠道出血性大肠埃希氏菌(限于 O157)或肠道致病性大肠埃希氏菌。

6.6.3.2 各种噬菌体均不裂解,经生化试验符合大肠埃希氏菌,并经血清学分型确定者,亦可分别报告各类致泻大肠埃希氏菌,其要求与 6.6.3.1 相同。

6.6.3.3 非如 6.6.3.1 和 6.6.3.2 结果均报告为非大肠埃希氏菌或非致泻大肠埃希氏菌。