

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0174—2011
代替 SN 0174—1992

出口食品小肠结肠炎耶尔森氏菌 检验方法

Determination of *Yersinia enterocolitica* in food for export

www.kingshent.cn
凯恒生物

2011-05-31 发布

2011-12-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN 0174—1992《出口食品小肠结肠炎耶尔森氏菌检验方法》。

本标准与 SN 0174—1992 相比,主要技术变化如下:

- 适用范围由出口冷冻和生鲜的猪肉、猪舌、鸡肉、虾和虾仁扩大至食品;
- 样品增菌培养方法:由改良磷酸盐缓冲液培养、氢氧化钾处理、改良酵母浸汁-孟加拉红肉汤培养改为蛋白胨-山梨醇胆盐肉汤及氯苯酚-替卡西林-氯酸钾肉汤分别培养;
- 分离培养:使用的培养基由含吐温-80 的亚硫酸铋琼脂平板及麦康凯琼脂平板改为头孢磺啉-氯苯酚-新生霉素琼脂和沙门氏菌-志贺氏菌琼脂(含脱氧胆盐氯化钠);
- 鉴定:对小肠结肠炎耶尔森氏菌鉴定的生化试验增加了吲哚、氧化酶、海藻糖、木糖及吐温酯酶试验,去除了山梨醇、L-阿拉伯糖试验;
- 在附录 B、C、D 中增加小肠结肠炎耶尔森氏菌与其他菌的生化区别、小肠结肠炎耶尔森菌生物型、致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌生化检测方法。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:张霞、张宏伟、张海英、刘培、吴冬雪、高旗利、郑文杰、曲鹏。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- ZB X04 003—1986, SN 0174—1992。

出口食品小肠结肠炎耶尔森氏菌 检验方法

1 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检验,动物饲料及食品生产和处理领域的环境样本可参照使用。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

- GB 4789.1 食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 总则
- GB 4789.2 食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定
- GB/T 4789.17 食品卫生微生物学检验 肉与肉制品检验
- GB 4789.18 食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 乳与乳制品检验
- GB/T 4789.19 食品卫生微生物学检验 蛋与蛋制品检验
- GB/T 4789.20 食品卫生微生物学检验 水产食品检验
- GB/T 4789.22 食品卫生微生物学检验 调味品检验
- GB/T 4789.24 食品卫生微生物学检验 糖果、糕点、蜜饯检验
- SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分:实验室培养基制备质量保证通则
- SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分:培养基性能测试实用指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

致病性小肠结肠炎耶尔森菌 presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*

按照本标准进行检测,在固体选择性培养基上形成典型菌落,并具有致病性的生化特性的嗜冷细菌推定为致病性小肠结肠炎耶尔森菌。

3.2

致病性小肠结肠炎耶尔森菌的检测 presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*

按照本标准对样品进行检测,以确定样品中是否存在致病性小肠结肠炎耶尔森菌的检测步骤。

4 设备和材料

- 4.1 培养箱:22℃±1℃,25℃±1℃,30℃±1℃,37℃±1℃。
- 4.2 水浴箱或培养箱:22℃±1℃,24℃±2℃,25℃±1℃,30℃±1℃最好有搅拌功能。
- 4.3 吸管:10 mL及1 mL,分刻度0.1 mL。

- 4.4 试管:18 mm×180 mm,9 mm×180 mm,12 mm×50 mm。
- 4.5 锥形瓶或烧瓶。
- 4.6 灭菌平皿:直径 90 mm~100 mm。
- 4.7 接种环:3 mm 直径。
- 4.8 pH 计:25 ℃精确度在±0.1pH 单位。
- 4.9 照明:斜射照明。
- 4.10 放大镜或立体显微镜。
- 4.11 蠕动搅拌机。

5 培养基和试剂

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水。为保证培养基的质量,应按 SN/T 1538.1 和 SN/T 1538.2 进行培养基的制备与性能测试。

- 5.1 蛋白胨-山梨醇胆盐(PSB)肉汤:见 A.1。
- 5.2 氯苯酚-替卡西林-氯酸钾(ITC)肉汤:见 A.2。
- 5.3 头孢磺啉-氯苯酚-新生霉素(CIN)琼脂:见 A.3。
- 5.4 沙门氏菌-志贺氏菌琼脂(含脱氧胆盐氯化钠)(SSDC 琼脂):见 A.4。
- 5.5 营养琼脂:见 A.5。
- 5.6 尿素吡啶培养基:见 A.6。
- 5.7 科瓦奇试剂:见 A.7。
- 5.8 双糖铁琼脂:见 A.8。
- 5.9 氧化酶试剂:见 A.9。
- 5.10 赖氨酸脱羧培养基:见 A.10。
- 5.11 鸟氨酸脱羧培养基:见 A.11。
- 5.12 糖类发酵培养基:见 A.12。
- 5.13 西蒙氏柠檬酸盐培养基:见 A.13。
- 5.14 吐温酯酶培养基:见 A.14。
- 5.15 胆汁-七叶苷琼脂:见 A.15。
- 5.16 酪蛋白大豆琼脂:见 A.16。
- 5.17 吡嗪酰胺酶检测酪蛋白大豆琼脂:见 A.17。
- 5.18 硫酸铁铵溶液:见 A.18。
- 5.19 含镁和草酸的酪蛋白大豆琼脂:见 A.19。
- 5.20 盐水:见 A.20。
- 5.21 氢氧化钾盐溶液:见 A.21。
- 5.22 牛肉浸膏:见 A.22。
- 5.23 无菌甘油:见 A.23。

6 取样

保证实验室收到的样本真正具有代表性,在运输储存中没有损坏改变。虽然耶尔森氏菌是由冷冻产品中复活的,但是不建议在试验分析前冷冻样品。取样不是本标准规定方法的一部分,样品采集和处理见 GB 4789.1,样品采集后应尽快送检。

9 操作步骤

9.1 稀释液的制备

9.1.1 不同类食品初始悬液的制备参见 GB 4789. 2、GB/T 4789. 17、GB 4789. 18、GB/T 4789. 19、GB/T 4789. 20、GB/T 4789. 22、GB/T 4789. 24。

9.1.2 一般情况下按无菌操作称取 25 g(或 25 mL)样品加入 225 mL PSB 肉汤中,用蠕动搅拌器对悬液均质 2 min。

9.1.3 按照 9.1.2 方法制成 10 倍稀释 ITC 肉汤增菌悬液,再加该增菌悬液 10 mL 到 90 mL ITC 肉汤中,得到稀释 100 倍的增菌培养液。

9.2 增菌

将 PSB 培养基 22 ℃~25 ℃摇瓶培养 48 h~72 h,或静止培养 5 d。100 倍稀释 ITC 培养基 25 ℃培养 48 h。

9.3 分离培养

9.3.1 取 PSB 增菌液划线接种于 CIN 琼脂平板以获得单菌落,30 ℃倒置培养 24 h~48 h。

9.3.2 使用无菌吸管,吸取 0.5 mL PSB 增菌液加入到 4.5 mL 的氢氧化钾溶液中混匀。20 s±5 s 后,将混合液立即划线接种于 CIN 琼脂平板以获得单菌落,30 ℃倒置培养 24 h~48 h。

9.3.3 取 ITC 增菌液划线接种于 SSDC 琼脂平板以获得单菌落,30 ℃倒置培养 24 h~48 h。

9.3.4 培养 24 h 后,观察平板上有无典型菌落形态。CIN 琼脂平板上,典型的小肠结肠炎耶尔森菌菌落光滑,直径≤1 mm,红色中心,半透明边缘。用有斜透射光源的立体显微镜观察菌落无晕圈,呈细小颗粒状。在 SSDC 琼脂平板上,典型的小肠结肠炎耶尔森菌菌落,直径≤1 mm,灰白色,边缘模糊无晕圈,用有斜透射光源的立体显微镜观察菌落可看到呈精细颗粒状。

注:斜角透镜的立体显微镜可将小肠结肠炎耶尔森菌与极相似的假单胞菌区别开。

9.3.5 如果没有形成典型菌落,可继续培养至 48 h,然后再进行鉴定。

9.4 鉴定

9.4.1 从每种选择性培养基中各选取一个平板,每个平板选择五个典型或可疑菌落(小于五个全选),接种到营养琼脂平板上,30 ℃培养 24 h。

9.4.2 质粒决定了耶尔森氏菌的毒力和致病性,温度高于 30 ℃或者温度低于 30 ℃,经过长时间的培养和运输,质粒都可能丢失。因此,应立即将纯菌进行亚培养(22 ℃~25 ℃培养 24 h~48 h),然后添加 10% 的无菌甘油,混匀,在冷冻条件下保存,最好保存于-70 ℃。

9.4.3 筛选试验:

9.4.3.1 尿素酶检测:将 9.3.1 培养物接种到尿素酶/吲哚的培养基液面下,30 ℃培养 24 h,最好放入水浴箱中培养。紫色或粉红色的颜色表示尿素酶反应为阳性。小肠结肠炎耶尔森菌的阳性尿素酶反应几乎在 1 min~5 min。橘黄色表示尿素酶反应为阴性。如果培养基没有接种到足够的菌体,可能出现假阴性反应。

9.4.3.2 吲哚检测:向 9.4.3.1 培养基试管中添加 0.1 mL~0.2 mL 的吲哚检测试剂,反应时间 15 min,培养基液面变红表示反应为阳性。

9.4.3.3 双糖铁琼脂检测:将 9.3.1 培养物穿刺接种和划线接种至双糖铁琼脂,30 ℃培养 24 h~48 h。观察培养结果:穿刺接种葡萄糖阳性为黄色、葡萄糖阴性为红色或不变、产生硫化氢为黑色、有气泡和裂缝为葡萄糖产气;斜面接种乳糖阳性为黄色、乳糖阴性为红色或不变。

9.4.3.4 氧化酶检测:用玻璃棒或铂铱接种环,不要使用镍铬合金接种环,将选取的典型菌落划线于浸有氧化酶试剂的滤纸上,10 s 内滤纸的颜色没有变为淡紫色、紫色或深蓝色表示反应为阴性。

9.4.4 生化确证试验

9.4.4.1 菌落的选择:选取尿素酶检测阳性、吲哚检测阳性或阴性、发酵葡萄糖阳性、葡萄糖产气阴性、发酵乳糖阴性、产生硫化氢阴性及氧化酶检测阴性的菌落。

9.4.4.2 生化确证试验:用接种环将根据 9.4.3.1 选择的经 9.3.1 培养的典型菌落,接种于下列培养基进行生化反应。

9.4.4.3 赖氨酸脱羧酶培养基:将菌体接种于培养基液体以下,用凡士林(加热,然后冷却以便形成液体状态)或无菌矿物油对接种试管进行覆盖。30 ℃培养 24 h,培养后紫色表示阳性反应,黄色表示阴性反应。

9.4.4.4 鸟氨酸脱羧酶培养基:将菌体接种于培养基液体以下,用凡士林(加热,然后冷却以便形成液体状态)或无菌矿物油对接种试管进行覆盖。30 ℃培养 24 h,培养后紫色表示阳性反应,黄色表示阴性反应。

9.4.4.5 蔗糖、鼠李糖、海藻糖和木糖发酵培养基:将菌体接种于培养基液体以下,30 ℃培养 24 h,培养后黄色表示阳性反应,红色表示阴性反应。

9.4.4.6 西蒙氏柠檬酸盐培养基:斜面划线接种于培养基上,不要盖紧塞子,使其有氧生长。30 ℃培养 24 h,蓝色表示阳性反应。

9.4.4.7 吐温酯酶试验:斜面划线接种培养基,25 ℃培养 5 d,如果出现钙油酸微晶沉淀不透明区域,表示阳性反应。

9.4.4.8 小肠结肠炎耶尔森氏菌的生化特性见表 1。小肠结肠炎耶尔森氏菌与其他菌的生化区别参见附录 B。

表 1 小肠结肠炎耶尔森氏菌生化特性

生化试验	试验结果
尿素酶	+
吲哚	-/+ ^a
葡萄糖	+
葡萄糖产气	-
乳糖	-
硫化氢	-
氧化酶	-
赖氨酸脱羧酶	-
鸟氨酸脱羧酶	+
蔗糖	+
海藻糖	+/- ^b
鼠李糖	+/- ^b
木糖	+/- ^b
柠檬酸	-
吐温酯酶	+/- ^b

^a 生物 1 型和生物 2 型的一部分血清型吲哚阳性。生物 3、4、5 型和生物 2 型的一部分血清型吲哚阴性。
^b 决定于小肠结肠炎耶尔森菌生物型(参见附录 C)。

10 致病性小肠结肠炎耶尔森菌的检测

小肠结肠炎耶尔森氏菌如需进一步进行致病性检测可参照附录 D 进行。

11 结果报告

根据生化鉴定结果报告每 25 g(或 25 mL)样品中检出或未检出小肠结肠炎耶尔森氏菌。

www.kinghunt.cn
凯恒生物

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 蛋白胨山梨醇胆盐(PSB)肉汤

A.1.1 成分

酪蛋白(酶消化)	5.0 g
山梨醇	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	8.23 g
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.2 g
胆盐	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将上述各成分溶于蒸馏水中,加热使之完全溶解,灭菌后 25℃调整 pH 值到 7.6 ± 0.2 ,将培养基分装于试管或锥形瓶中 121℃高压灭菌 15 min 备用。

A.2 氯苯酚-替卡西林-氯酸钾(ITC)肉汤

A.2.1 基础培养基

A.2.1.1 成分

酪蛋白(酶消化)	10.0 g
酵母提取物	1.0 g
六水氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	60.0 g
氯化钠	5.0 g
孔雀石绿,0.2%水溶液	5.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.2.1.2 制法

将上述各成分溶于蒸馏水中,加热使之完全溶解,灭菌后 25℃调整 pH 值到 6.9 ± 0.2 ,将基础培养基分装于锥形瓶中,121℃高压灭菌 15 min 备用。

A.2.2 替卡西林溶液(1 mg/mL)

A.2.2.1 成分

替卡西林	10.0 mg
蒸馏水	10 mL

A.2.2.2 制法

将替卡西林溶解于水中,过滤灭菌。

A.2.3 氯苯酚TM[5-氯-2-(2,4-二氯苯氧基)苯酚],乙醇溶液(1 mg/mL)

A.2.3.1 成分

氯苯酚 TM	10.0 mg
95%乙醇	10.0 mL

A.2.3.2 制备

将氯苯酚溶于乙醇。在-20℃左右存放,但不超过4周。

A.2.4 氯酸钾溶液(100 mg/mL)

A.2.4.1 成分

氯酸钾(KClO ₃)	10.0 g
蒸馏水	100 mL

A.2.4.2 制备

将氯酸钾溶解于水中。过滤灭菌。

A.2.5 完全培养基

A.2.5.1 成分

基础培养基	988 mL
替卡西林溶液	1 mL
氯苯酚溶液 TM	1 mL
氯酸钾溶液	10 mL

A.2.5.2 制备

无菌操作将替卡西林-氯苯酚-氯酸钾溶液添加到基础培养基(冷却到47℃)中并混匀。将培养基无菌操作分装于试管中,每管10 mL,或者分装于锥形瓶中,每瓶100 mL,以获得最小面积/体积比率(相对厌氧)。

A.3 头孢磺啉-氯苯酚-新生霉素(CIN)琼脂

A.3.1 基础培养基

A.3.1.1 成分

蛋白胨 G	17.0 g
酪动物蛋白胨(酶消化)	3.0 g
酵母浸膏	2.0 g
甘露醇	20.0 g

丙酮酸钠	2.0 g
氯化钠	1.0 g
七水合硫酸镁(MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.01 g
脱氧胆盐钠	0.5 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.001 g
琼脂	9 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.1.2 制备

将各组分及脱水基础培养基溶解于水中并煮沸。灭菌后 25 ℃调整 pH 值到 7.4±0.2 将培养基分装,121 ℃高压灭菌 15 min。

A.3.2 头孢磺啉溶液(15 mg/mL)

A.3.2.1 成分

头孢磺啉	1.5 g
蒸馏水	100 mL

A.3.2.2 制备

将头孢磺啉溶解于水中。过滤灭菌。

A.3.3 氯苯酚TM[5-氯-2-(2,4-二氯苯氧基)苯酚],乙醇溶液(4 mg/mL)

A.3.3.1 成分

氯苯酚 TM	0.4 g
95%乙醇	10.0 mL

A.3.3.2 制备

将氯苯酚溶于乙醇。在-20 ℃左右存放,但不超过 4 周。

A.3.4 新生霉素溶液(2.5 mg/mL)

A.3.4.1 成分

新生霉素	0.25 g
蒸馏水	100 mL

A.3.4.2 制备

将新生霉素溶解于水中,过滤灭菌。

A.3.5 完全培养基

A.3.5.1 成分

基础培养基	997 mL
头孢磺啉溶液	1 mL

氯苯酚™溶液	1 mL
新生霉素溶液	1 mL

A.3.5.2 制备

无菌操作将抗生素溶液添加到基础培养基(冷却到 47 °C)中并混匀,将大约 15 mL 的完全培养基倒入无菌平板中,静置。

A.4 沙门氏菌-志贺氏菌琼脂(含脱氧胆盐氯化钠)(SSDC 琼脂)

A.4.1 成分

酵母提取物	5.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
动物蛋白胨(酶消化)	5.0 g
乳糖	10.0 g
胆盐	8.5 g
脱氧胆盐钠	10.0 g
氯化钙	1.0 g
柠檬酸钠	10 g
五水合硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	8.5 g
柠檬酸铁铵	1.0 g
煌绿	0.000 3 g
中性红	0.025 g
琼脂	9 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将各组分或脱水完全培养基溶解于水中并煮沸。25 °C 调整 pH 值到 7.4 ± 0.2 不用灭菌。将培养基冷却到 45 °C 左右,向无菌平板倒入约 20 mL,静置。如果提前制备,琼脂平板应放于塑料袋中, $8 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ 黑暗保存 1 周。不要在 $3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ 冷藏,否则将会有沉淀形成,影响使用。

A.5 营养琼脂

A.5.1 成分

牛肉浸膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂	9 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

将各组分或脱水完全培养基溶解于水中并煮沸。灭菌后 25 °C 调整 pH 值到 7.0 ± 0.2 , 121 °C 高压灭菌 15 min,将培养基冷却到 45 °C 左右,向无菌平板倒入约 15 mL,静置。

A.6 尿素吡啶培养基

A.6.1 成分

L-色氨酸	3.0 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.0 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	1.0 g
氯化钠	5.0 g
尿素	20.0 g
95%乙醇	10 mL
酚红	0.025 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制备

将L-色氨酸溶解于60℃的蒸馏水中,冷却,然后将其他成分边搅拌边溶于蒸馏水中。或者将干粉完全培养基溶解于水中并不断搅拌。25℃调整pH值到 6.9 ± 0.2 过滤灭菌。将培养基无菌操作分装于12 mm×50 mm的试管中,每管0.5 mL。在 $3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。

A.7 科瓦奇试剂

A.7.1 成分

4-二甲胺基苯甲醛	5.0 g
盐酸($\rho=1.18 \text{ g/mL} \sim 1.19 \text{ g/mL}$)	25 mL
2-甲基-2-丁醇	75 mL

A.7.2 制备

60℃水浴中将5.0 g的4-二甲胺基苯甲醛溶于2-甲基-2-丁醇,冷却至室温,将烧瓶置于冰浴中,小心添加盐酸,缓慢混匀。 $3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 储存于琥珀瓶中。避免使用橡胶瓶盖,以防破坏试剂。

A.8 双糖铁琼脂

A.8.1 成分

牛肉浸膏	3.0 g
酵母浸膏	3.0 g
胰酪蛋白胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸铁	0.2 g
五水合亚硫酸钠(Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O)	0.3 g
酚红	0.025 g
琼脂	9 g~18 g

蒸馏水	1 000 mL
-----	----------

A.8.2 制备

将各组分或脱水完全培养基溶解于水中并煮沸。25℃调整 pH 值到 7.4 ± 0.2 分装于试管中,每管 10 mL。121℃高压灭菌 15 min 将试管倾斜放置,以便获得大约 3 cm 深,坡度 5 cm 长的琼脂斜面。

A.9 氧化酶检测试剂

A.9.1 成分

盐酸二甲基对苯二胺	1.0 g
蒸馏水	100 mL

A.9.2 制备

使用前溶解试剂, $3\text{℃} \pm 2\text{℃}$ 暗处保存不超过 1 周。

A.10 赖氨酸脱羧酶培养基

A.10.1 成分

L-赖氨酸盐酸盐	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

A.10.2 制备

将组分加热溶解于水中,25℃调整 pH 值到 6.8 ± 0.2 ,将培养基分装于规格为 9 mm×180 mm 的试管中,每管 5 mL。121℃高压灭菌 15 min 备用。

A.11 鸟氨酸脱羧酶培养基

A.11.1 成分

L-鸟氨酸盐酸盐	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

A.11.2 制备

将组分加热溶解于水中,25℃调整 pH 值到 6.8 ± 0.2 ,将培养基分装于规格为 9 mm×180 mm 的试管中,每管 5 mL。121℃高压灭菌 15 min 备用。

A. 12 糖类的发酵培养基(含有酚红的蛋白胨水,鼠李糖、蔗糖、海藻糖和木糖)

A. 12.1 基础培养基

A. 12.1.1 组成

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
酚红	0.02 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 12.1.2 制备

将组分加热溶解于水中,25℃调整 pH 值到 6.8 ± 0.2 ,培养基分装于烧瓶中 121℃ 高压灭菌 10 min。

A. 12.2 糖类溶液(鼠李糖、蔗糖、海藻糖和木糖,100 mg/mL)

A. 12.2.1 组成

糖类(鼠李糖、蔗糖、海藻糖或木糖)	10.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 12.2.2 制备

每种糖单独加入到蒸馏水中过滤灭菌。

A. 12.3 完全培养基

A. 12.3.1 组成

基础培养基(A. 12.1)	900 mL
糖溶液(A. 12.2)	100 mL

A. 12.3.2 制备

将基础培养基冷却到 45℃,再将各种糖溶液无菌操作添加其中。将完全培养基无菌操作分装于试管中,每管 10 mL。

A. 13 西蒙氏柠檬酸盐

A. 13.1 成分

柠檬酸钠	2.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	1.0 g
溴麝香草酚蓝	0.08 g
磷酸二氢铵($NH_4H_2PO_4$)	1.0 g
硫酸镁	0.2 g
琼脂	9 g~18 g

蒸馏水	1 000 mL
-----	----------

A. 13.2 制备

将培养基各组分溶解于水中。25 ℃调整 pH 值到 6.8 ± 0.2 ，将培养基分装于试管中，每管 10 mL。试管在使用前需要先进行清洗，应保证其对试验无干扰。121 ℃高压灭菌 10 min，将试管倾斜放置，以便获得 2.5 cm 深的琼脂斜面。

A. 14 吐温酯酶试验

A. 14.1 基础培养基

A. 14.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
氯化钙(CaCl ₂)	0.1 g
琼脂	9 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 14.1.2 制备

将组分加热溶解于水中。25 ℃调整 pH 值到 7.4 ± 0.2 ，121 ℃高压灭菌 30 min。

A. 14.2 完全培养基

A. 14.2.1 成分

基本培养基	990 mL
吐温-80(山梨醇单油酸酯)	10 mL

A. 14.2.2 制备

添加吐温-80 于液体基础培养基中，均质。110 ℃灭菌 30 min。将培养基分装于试管中，每管 2.5 mL。将试管倾斜放置制成斜面。

A. 15 胆汁七叶苷琼脂

A. 15.1 成分

牛肉浸膏	3.0 g
牛肉胨	5.0 g
七叶苷	1.0 g
胆盐	40.0 g
柠檬酸铁	0.5 g
琼脂	9 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 15.2 制备

将组分溶解于水中，微微煮沸。25 ℃调整 pH 值到 6.6 ± 0.2 将培养基分装于试管中，每管 10 mL。

121 °C 高压灭菌 15 min, 将试管倾斜放置, 以便获得 2.5 cm 深的琼脂斜面。

A. 16 酪蛋白大豆琼脂

A. 16.1 成分

酪蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	9 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 16.2 制备

将组分溶解于水中并加热煮沸。25 °C 调整 pH 值到 7.3 ± 0.2 将培养基分装于锥形瓶中, 每瓶 830 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min 备用。该培养基用于 A. 16 中。

A. 17 吡嗪酰胺酶检测酪蛋白大豆琼脂

A. 17.1 成分

酪蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
吡嗪酰胺($C_5H_5N_3O$)	1.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	9 g~18 g
Tris-马来酸缓冲液(0.2 mol/L, pH6)	1 000 mL

A. 17.2 制备

将组分溶解于水中并加热煮沸。25 °C 调整 pH 值到 7.3 ± 0.2 将培养基分装于试管中, 每管 10 mL。121 °C 高压灭菌 15 min 灭菌后, 将试管倾斜放置, 以便获得琼脂斜面。

A. 18 硫酸铁铵溶液

A. 18.1 成分

硫酸铁铵	1.0 g
蒸馏水	100 mL

A. 18.2 制备

使用前, 将硫酸铁铵溶解于水中。

A. 19 酪蛋白大豆琼脂(含有镁和草酸)

A. 19.1 基础培养基

见 A. 13。

A. 19.2 氯化镁溶液

A. 19.2.1 成分

六水合氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)(0.25 mol/L)	5.09 g
蒸馏水	100 mL

A. 19.2.2 制备

将氯化镁溶解于水中。过滤灭菌。

A. 19.3 草酸钠溶液

A. 19.3.1 成分

草酸钠	3.35 g
蒸馏水	100 mL

A. 19.3.2 制备

将草酸钠溶解于水中。过滤灭菌。

A. 19.4 葡萄糖溶液

A. 19.4.1 成分

葡萄糖	18.0 g
蒸馏水	100 mL

A. 19.4.2 制备

将葡萄糖溶解于水中。过滤灭菌。

A. 19.5 完全培养基

A. 19.5.1 成分

基础培养基	830 mL
氯化镁溶液	80 mL
草酸钠溶液	80 mL
葡萄糖溶液	10 mL

A. 19.5.2 制备

基础培养基冷却至 47 °C 左右, 无菌条件下, 将氯化镁、草酸钠和葡萄糖添加其中并混匀。向无菌平皿中倒入大约 15 mL 完全培养基, 备用。

A. 20 盐水

A. 20.1 组成

氯化钠	5 g
-----	-----

蒸馏水	1 000 mL
-----	----------

A. 20.2 制备

将氯化钠溶解于水中,分装,121 °C 高压灭菌 15 min。

A. 21 氢氧化钾溶液

A. 21.1 成分

氢氧化钾(KOH)	0.5 g
盐溶液(0.5%)	100 mL

A. 21.2 制备

将氢氧化钾溶解于盐溶液中,分装。121 °C 高压灭菌 15 min,备用。储存液为 40% 氢氧化钾,配制好后保存于 3 °C ± 2 °C。用 0.5% 氯化钠溶液做 1 : 80 稀释形成 0.5% 氢氧化钾使用液。

A. 22 牛肉浸膏

A. 22.1 组成

小牛肉浸出液(脱水)	500 g
酶消化酪蛋白	10 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 22.2 制备

将各组分溶解于水中,加热溶解,调节 pH 值,使灭菌后 25 °C 时 pH 值至 7.4 ± 0.2。将培养基分装于试管中,每管 10 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。

A. 23 无菌甘油

将甘油分装于瓶中,每瓶 100 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。

附 录 B
(资料性附录)

假结核耶尔森氏菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌及其他相似菌 30 ℃ 培养生化特性

表 B.1 30 ℃ 时耶尔森氏菌生化特性^a

试 验	假结核耶尔森氏菌	小肠结肠炎耶尔森氏菌	相近型
葡萄糖	+	+	+
葡萄糖产气	-	-(或少数气泡)	-(或少数气泡)
乳糖	-	-	-
邻硝基酚半乳糖甙	+	+/-	+/-
阿东醇	-	-	-
纤维二糖	-	+	
半乳糖醇	-		-
甘露醇	+	+	+
蜜二糖	+/-		D
鼠李糖	+		D
蔗糖	-	+	D
山梨醇	-	+/-	D
海藻糖	+	+/-	+
木糖	+	D	+
七叶苷	+	D	D
水杨甙	+	D	D
尿素	+	+	+
吲哚	-	D	D
VP	-	+*/-	D
硫化氢	-	-	-
脱氨酶(APP)	-	-	-
赖氨酸	-	-	-
鸟氨酸	-	+/-	+
柠檬酸(西蒙氏)	-	-	D
脂肪酶(吐温-80)	-	D	D
粘酸盐	-	-	D

^a + 阳性；- 阴性；+/- 主要为阳性；D 有分歧的生化型；* 37 ℃ 时几乎全部为阴性。

附录 C

(资料性附录)

小肠结肠炎耶尔森氏菌生物型

表 C.1 小肠结肠炎耶尔森氏菌的生物型生化试验

生物型	吐温酯酶	七叶苷	吡嗪酰胺酶	吡啶	木糖	海藻糖
1A ^a	+	+	+	+	+	+
1A	+	-	-	+	+	+
2	-	-	-	(+) ^b	+	+
3	-	-	-	-	+	+
4	-	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	D ^b	-

^a 非致病性。

^b 通常现象很弱或延时。

附录 D

(资料性附录)

致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌检测方法

D.1 菌落的选择

D.1.1 在 9.4.4.2 生化确证试验基础上,选择赖氨酸脱羧酶阴性;鸟氨酸脱羧酶阳性;鼠李糖发酵阴性;蔗糖发酵阳性及柠檬酸水解阴性的菌落进行致病性检测。

D.1.2 用接种环将根据 D.1.1 选择的经 9.4.1 培养的典型菌落,按照 D.2~D.4 的培养基进行生化反应。

D.2 七叶苷发酵试验

D.2.1 斜面划线接种培养基 30℃ 培养 24 h。

D.2.2 菌落边缘带有黑环的表示阳性反应。

注:此七叶苷发酵试验相当于水杨苷的发酵试验。

D.3 吡嗪酰胺酶检测

D.3.1 大面积斜面划线接种于吡嗪酰胺酶检测酪蛋白大豆琼脂 30℃ 培养 48 h。

D.3.2 加 1% 的硫酸铵铁溶液 1 mL,15 min 后出现粉红棕色表示阳性反应。

D.4 37℃ 钙需求试验

D.4.1 醋酸钠利用实验可代替 37℃ 钙需求试验。在 37℃ 培养可能导致该特性的丢失,因为该特性基因编码是在质粒上进行的。

D.4.2 用氯化钠溶液将营养琼脂上分离的纯培养物,制成浓度大约为 1 000 CFU/mL 的菌悬液。接种 0.1 mL 菌悬液到两个酪蛋白大豆琼脂平板及两个添加镁和草酸的酪蛋白大豆琼脂平板。每种培养基中,一个平板 25℃ 培养 48 h,另一个平板 37℃ 培养 48 h。

D.4.3 如果 25℃ 培养的菌落大小均一,而 37℃ 添加镁和草酸的培养基菌生长受到抑制,20% 以上的菌落较小,直径 0.1 mm。其余培养基上菌落直径在 0.5 mm~1 mm 之间,认为是阳性反应。这些被抑制菌落的生长需要添加钙,并可能具有致病性。

D.5 确定小肠结肠炎耶尔森菌致病性

D.5.1 七叶苷和(或)吡嗪酰胺酶试验阳性,37℃ 钙需求试验阴性的菌株是非致病的。七叶苷和吡嗪酰胺酶阴性、37℃ 钙需求试验阳性的菌株为致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌。

D.5.2 为了确定小肠结肠炎耶尔森菌的致病性,对小肠结肠炎耶尔森菌的生物型进行测定,生化反应参见附录 C。小肠结肠炎耶尔森菌生物型 1A、2、3、4 和 5 均已知具有致病性。

D.5.3 小肠结肠炎耶尔森菌 O 抗原对于流行病学有很重要的意义。通过抗血清对致病性小肠耶尔森氏菌进行血清分型,通常为 O:3,O:8,O:9 和 O:5,27。

www.kinghunt.cn
凯恒生物