

江苏省地方标准

DB32/T 4644.4—2025

从业人员健康检查 第4部分： 伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱 弧菌、志贺氏菌和痢疾阿米巴检验方法

Health examination of employees—

Part 4: Detection methods of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella*
paratyphi, *Vibrio cholerae*, *Shigella* and *Entamoeba histolytica*

2025-02-21 发布

2025-03-21 实施

江苏省市场监督管理局 发布
中国标准出版社 出版

目 次

前言Ⅲ

引言Ⅳ

1 范围1

2 规范性引用文件1

3 术语和定义1

4 缩略语1

5 方法原理2

6 设备与材料2

7 培养基和试剂3

8 检验程序4

9 操作步骤4

10 生物安全.....8

附录A(资料性) 培养基和试剂9

附录B(规范性) 实时荧光PCR检测反应体系及注意事项19

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是 DB32/T 4644《从业人员健康检查》的第4部分。DB32/T 4644已经发布了以下部分：

- 第1部分：检查机构管理规范；
- 第2部分：健康检查技术规范；
- 第3部分：质量控制规范；
- 第4部分：伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱弧菌、志贺氏菌和痢疾阿米巴检验方法；
- 第5部分：信息系统基本数据集。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省卫生健康委员会提出并组织实施。

本文件由江苏省卫生健康标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：江苏省疾病预防控制中心、南京市疾病预防控制中心、徐州市疾病预防控制中心、深圳市职业病防治院、赤峰众康生物科技有限公司。

本文件主要起草人：霍翔、乔昕、王燕梅、马恺、朱宝立、王雨潇、李晔、徐光、韩磊、李亚波、郭宝福、苗升浩。

引 言

从业人员健康检查是根据《中华人民共和国传染病防治法》《中华人民共和国食品安全法》《中华人民共和国药品管理法》《公共场所卫生管理条例》《生活饮用水卫生监督管理办法》《化妆品卫生管理条例》等法律法规所进行的从业前、从业期间的健康检查。

DB32/T 4644《从业人员健康检查》分为以下 5 个部分：

- 第 1 部分：检查机构管理规范；
- 第 2 部分：健康检查技术规范；
- 第 3 部分：质量控制规范；
- 第 4 部分：伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱弧菌、志贺氏菌和痢疾阿米巴检验方法；
- 第 5 部分：信息系统基本数据集。

DB32/T 4644 的制定是对从业人员健康检查工作相关国家标准、行业标准的有力补充，对贯彻落实《“健康中国 2030”规划纲要》、推进健康中国建设、提高人民健康水平、保障公众健康和公共卫生安全具有重要意义。

从业人员健康检查 第4部分：
伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱
弧菌、志贺氏菌和痢疾阿米巴检验方法

1 范围

本文件描述了从业人员健康检查粪便标本(肛拭子)中伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱弧菌、志贺氏菌和痢疾阿米巴的检验方法。

本文件适用于公共场所从业人员、食品生产和加工人员、食品流通和餐饮服务人员、饮用水生产、经营人员健康检查项目中粪便标本(肛拭子)的伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱弧菌、志贺氏菌和痢疾阿米巴的检验,医疗卫生用品、化妆品等相关行业从业人员的健康检查可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- WS 280 伤寒和副伤寒诊断标准
- WS 287 细菌性和阿米巴性痢疾诊断标准
- WS 289 霍乱诊断标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实时荧光PCR real-time PCR

实时荧光聚合酶链式反应。

3.2

Ct值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

4 缩略语

- BS:亚硫酸铋琼脂(Bismuth Sulfite Agar)
- CY5:磺酸基-CY5羧酸(Cyanine 5)
- DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)
- FAM:6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein)

LDC:赖氨酸脱羧酶(Lysine Decarboxylase)

MAC:麦康凯琼脂(MacConkey Agar)

NB:营养肉汤(Nutrient Broth)

NP-40:乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40)

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

TCBS:硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂(TCBS Agar)

TSI:三糖铁琼脂(Triple Sugar Iron Agar)

UNG 酶:尿嘧啶DNA糖基酶(Uracil DNA glycosylase)

VIC:琥珀酰亚胺酯(Fluorescein Amidite)

XLD:木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基(Xylose-Lysine Desoxycholate Agar)

5 方法原理

5.1 筛查试验

5.1.1 依据核酸体外扩增基本原理,针对伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱弧菌、志贺氏菌和痢疾阿米巴特异靶基因序列设计引物和荧光标记探针,在实时荧光PCR反应过程中,当荧光信号达到并超过所设定的阈值时,利用荧光信号强度与PCR产物量的正相关关系,即可对实时荧光PCR结果进行分析和判定。

5.1.2 对标本的模板

DNA进行实时荧光PCR扩增,根据其Ct值及扩增曲线进行标本结果报告,当实时荧光PCR结果呈阴性时直接报告阴性结果;当实时荧光PCR结果呈阳性时,进一步对阳性标本做确证试验。从而实现对从业人员健康检查粪便标本(肛拭子)中的伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱弧菌、志贺氏菌和痢疾阿米巴的快速筛查。

5.2 确证试验

通过增菌、分离、生化和血清学鉴定等方法,从实时荧光PCR阳性标本中分离得到目标病原体。结果为阳性时报告阳性(检出),结果为阴性时报告阴性(未检出)。

6 设备与材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,包括但不限于以下设备和材料。

- 6.1 II级生物安全柜。
- 6.2 冰箱:2℃~8℃和-20℃。
- 6.3 恒温培养箱:36℃±1℃、37℃±1℃、42℃±1℃。
- 6.4 电子天平:分度值为0.1g和0.01g。
- 6.5 离心机:离心力≥12 000×g。
- 6.6 pH计或pH比色管或精密pH试纸。
- 6.7 涡旋混匀器。
- 6.8 恒温金属浴/水浴锅:25℃~100℃。
- 6.9 实时荧光PCR仪。

- 6.10 全自动微生物生化鉴定系统。
- 6.11 微生物飞行质谱鉴定系统。
- 6.12 无菌锥形瓶:容量 500 mL、250 mL。
- 6.13 无菌试管:10 mm×75 mm、15 mm×150 mm 或其他合适规格。
- 6.14 无菌小玻管:3 mm×50 mm。
- 6.15 无菌培养皿:直径 90 mm。
- 6.16 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)。
- 6.17 微量可调移液器和配套带滤芯吸头:2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL。
- 6.18 采样管:密闭式。
- 6.19 采样拭子:长度≥10 cm。
- 6.20 PCR 反应管。

7 培养基和试剂

- 7.1 营养肉汤(NB)增菌液:见 A.1。
- 7.2 四硫磺酸钠煌绿(TTB)增菌液:见 A.2。
- 7.3 氯化镁孔雀绿大豆胨(RVS)增菌液:见 A.3。
- 7.4 碱性蛋白胨水培养基:见 A.4。
- 7.5 亚硫酸铋(BS)琼脂:见 A.5。
- 7.6 HE 琼脂:见 A.6。
- 7.7 木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂:见 A.7。
- 7.8 麦康凯(MAC)琼脂:见 A.8。
- 7.9 庆大霉素琼脂:见 A.9。
- 7.10 硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖(TCBS)琼脂:见 A.10。
- 7.11 四号琼脂:见 A.11。
- 7.12 碱性营养琼脂:见 A.12。
- 7.13 三糖铁(TSI)琼脂:见 A.13。
- 7.14 克氏双糖铁(KIA)琼脂:见 A.14。
- 7.15 糖发酵培养基:见 A.15。
- 7.16 氧化酶试剂:见 A.16。
- 7.17 赖氨酸脱羧酶(LDC)试验培养基:见 A.17。
- 7.18 动力-靛基质-尿素半固体(MIU)琼脂:见 A.18。
- 7.19 沙门氏菌显色培养基。
- 7.20 沙门氏菌诊断血清。
- 7.21 志贺氏菌诊断血清。
- 7.22 霍乱弧菌诊断血清。
- 7.23 除特别说明外,PCR 所用化学试剂为分析纯。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。
- 7.24 DNA 提取液:Tris-EDTA 缓冲液(0.01 mol/L,pH 8.0)、0.01% NP 40。
- 7.25 实时荧光 PCR 检测试剂:伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱弧菌、志贺氏菌和痢疾阿米巴荧光 PCR 检测靶基因、反应体系及注意事项应符合附录 B。

8 检验程序

伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱弧菌、志贺氏菌和痢疾阿米巴检验程序见图 1。

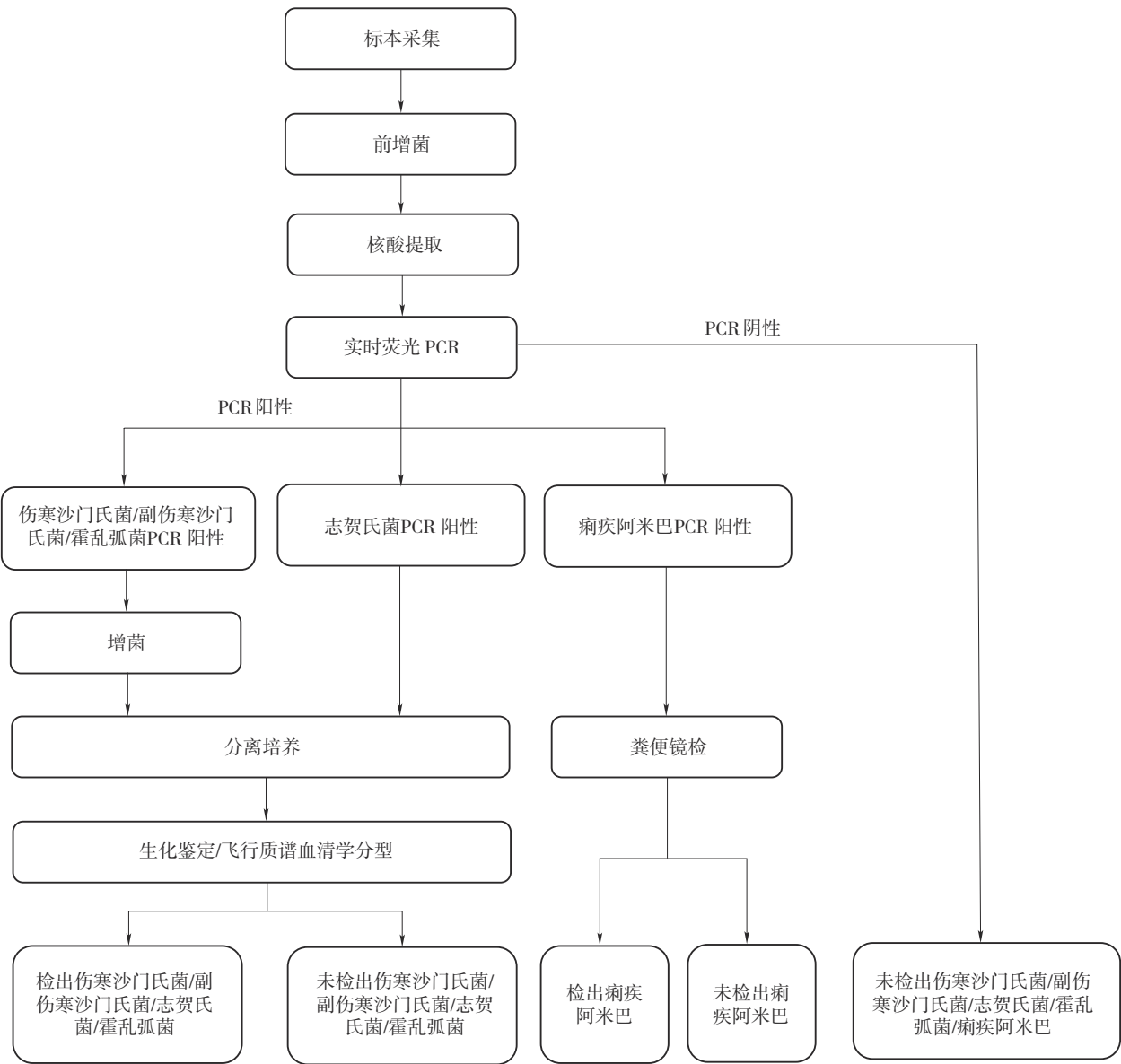


图 1 伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱弧菌、志贺氏菌和痢疾阿米巴检验程序

9 操作步骤

9.1 标本采集、保存及运输

9.1.1 标本采集

用灭菌的采样拭子，由肛门插入直肠内 3 cm~5 cm 处，旋转 360°采集，或用采样拭子蘸取适量粪便，

放入盛有 1 mL~3 mL 生理盐水的采样管内,旋紧管盖,编号备用。

9.1.2 标本的保存和运输

采集的标本尽快运送到实验室进行检测,如不能立即送检,在 2℃~8℃条件下保存不超过 24 h。

9.2 标本的前处理

9.2.1 前增菌

将标本充分混匀,吸取匀液 1 mL 加入到 4 mL 营养肉汤中,置于 36℃±1℃增菌培养 3 h~6 h。

9.2.2 标本混合

9.2.2.1 根据样本数量,取 n 个无菌的 1.5 mL 离心管或合适容量筛选管作为混合管,分别编号。

9.2.2.2 每份标本取增菌液 100 μ L,分别依次加入到混合管中。根据实际情况,将 5~10 份标本混合成 1 份混合标本。

9.2.2.3 标本混合时,应防止操作人员和环境污染。混合完成后,使用涡旋振荡器进行混匀,再进行实时荧光 PCR 检测。

9.2.2.4 如混合标本 PCR 检测为阴性,判定混合标本所代表的全部标本为阴性。如混合标本 PCR 检测为某种致病微生物阳性,则再对混合标本中的每一份标本按 9.4 进行确证试验,以确定具体阳性标本。

9.3 筛查试验

9.3.1 DNA 模板的制备

标本 12 000 $\times g$ 离心 5 min,弃上清;加入 50 μ L~100 μ L DNA 取液,重悬沉淀并充分混合后 100℃加热处理 5 min,12 000 $\times g$ 离心 2 min,取 5 μ L 上清液,作为模板 DNA 用于实时荧光 PCR 检测。若不能及时检测,应存放于 -20℃以下保存,并尽快完成检测。根据实验室实际情况,也可使用商品化试剂盒制备 DNA 模板。

9.3.2 PCR 反应体系

总反应体系体积为 25 μ L:PCR 反应液 20 μ L(含有特异性引物、dNTP、探针及反应所需各种离子 19.64 μ L,1 U/ μ L UNG 酶 0.06 μ L,5 U/ μ L Taq 酶 0.3 μ L),模板 DNA 5 μ L。反应体系按照附录 B 执行。

9.3.3 实时荧光 PCR 检测

9.3.3.1 将 9.3.2 中瞬时离心后的 PCR 反应管放入实时荧光 PCR 仪内,记录标本摆放顺序,进行核酸扩增和检测。

9.3.3.2 实时荧光 PCR 反应条件:50℃预热 2 min;95℃预变性 2 min;95℃变性 5 s、60℃退火延伸 30 s(同时采集 FAM、VIC 和 CY 5 荧光信号),进行 40 个循环。

9.3.4 对照设置

检测过程(包括 DNA 提取)中,每个反应均应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。其中阳性对照模板为扩增片段的阳性克隆分子 DNA 或标准菌株 DNA,阴性对照模板为大肠埃希氏菌标准菌株 DNA,空白对照为灭菌去离子水。

9.3.5 结果判读

9.3.5.1 对照的结果判读

阳性对照出现典型扩增曲线,Ct值 ≤ 30 ;阴性对照无典型扩增曲线或Ct值 ≥ 40 ;空白对照无典型扩增曲线或Ct值 ≥ 40 。否则,此次实验结果视为无效。

9.3.5.2 样品的结果判定和报告

9.3.5.2.1 FAM通道Ct值 > 40 或无Ct值,可判定标本检测结果为伤寒沙门氏菌(A管)和(或)痢疾阿米巴(B管)阴性,可直接报告未检出伤寒沙门氏菌和(或)痢疾阿米巴;VIC通道Ct值 > 40 或无Ct值,可判定标本检测结果为副伤寒沙门氏菌(A管)阴性,可直接报告未检出副伤寒沙门氏菌;CY5通道Ct值 > 40 或无Ct值,可判定标本检测结果为霍乱弧菌(A管)和(或)志贺氏菌(B管)阴性,可直接报告未检出霍乱弧菌和(或)志贺氏菌。

9.3.5.2.2 FAM通道Ct值 < 35 ,有明显指数增长期,可判定该标本检测结果为伤寒沙门氏菌(A管)和(或)痢疾阿米巴(B管)阳性;VIC通道Ct值 < 35 ,有明显指数增长期,可判定该标本检测结果为副伤寒沙门氏菌(A管)阳性;CY5通道Ct值 < 35 ,有明显指数增长期,可判定该标本检测结果为霍乱弧菌(A管)和(或)志贺氏菌(B管)阳性。见表1。

表1 检测结果判定表

	FAM	VIC	CY5
A管	伤寒沙门氏菌	副伤寒沙门氏菌	霍乱弧菌
B管	痢疾阿米巴	—	志贺氏菌

9.3.5.2.3 FAM通道、VIC通道和(或)CY5通道 $35 \leq \text{Ct值} \leq 40$,重新做实时荧光PCR检测。若重新检测结果的Ct值 ≥ 40 ,则判定为相应病原体阴性,否则判定为阳性。

9.3.5.2.4 如用商品化实时荧光PCR试剂盒,应按照试剂盒说明书进行检测和结果判定。

9.3.5.3 PCR阳性混合标本确认

对PCR结果为阳性的混合标本,依据9.4确证试验做进一步的确认。

9.4 确证试验

9.4.1 增菌

9.4.1.1 混合标本实时荧光PCR检测结果为伤寒沙门氏菌或副伤寒沙门氏菌阳性时,将混合前的所有个标本分别接种于RVS增菌液中 $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养18 h~24 h,同时接种TTB增菌液中 $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养18 h~24 h。

9.4.1.2 混合标本实时荧光PCR检测结果为志贺氏菌阳性时,无须增菌,将混合前的所有单个标本直接分别分离培养。

9.4.1.3 混合标本实时荧光PCR检测结果为霍乱弧菌阳性时,将混合前的所有单个标本分别接种于碱性蛋白胨水培养基中 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 增菌培养6 h~8 h。

9.4.2 分离培养

- 9.4.2.1 伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌:按照 GB 4789.4 进行检测。
- 9.4.2.2 志贺氏菌:取前增菌液 1 环,划线接种于 MAC 或 XLD 琼脂平板,于 36℃±1℃培养 18 h~24 h,志贺氏菌呈现不发酵乳糖的菌落,见表 2。

表 2 志贺菌属在 MAC 和 XLD 琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	志贺氏菌
MAC 琼脂	形成圆形、隆起、无色、透明、直径 2 mm~3 mm、表面光滑、湿润、边缘整齐的菌落。宋内氏志贺菌菌落较大,不透明,培养时间稍长易形成淡粉红色、扁平的粗糙菌落
XLD 琼脂	红色透明状、表面光滑、湿润、隆起、边缘整齐的菌落

- 9.4.2.3 霍乱弧菌:取增菌液 1 环,划线接种于强、弱选择性培养基各一块置 37℃培养 18 h~24 h。强选择性培养基包括庆大霉素琼脂、TCBS 琼脂和四号琼脂,弱选择性培养基一般使用碱性营养琼脂。霍乱弧菌在选择性培养基上的菌落特征见表 3。

表 3 霍乱弧菌在选择性培养基上的菌落特征

选择性琼脂平板	霍乱弧菌
碱性营养琼脂	无色、圆形、透明或半透明、表面光滑、润湿、扁平或稍凸起、边缘整齐,菌落直径一般约为 2 mm
庆大霉素琼脂和四号琼脂	与碱性营养琼脂上生长的菌落相似,但透明性略差,多呈半透明状,由于这类培养基均含有亚碲酸盐成分,菌落中央常呈灰色或灰黑色,并随培养时间的延长而加深
TCBS 琼脂	黄色发亮、表面光滑、润湿、稍凸起、边缘整齐

9.4.3 菌株鉴定

9.4.3.1 伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌

按照 WS 280 进行检测。可选择生化鉴定试剂盒、全自动微生物生化鉴定系统或微生物飞行质谱鉴定系统进行鉴定。

9.4.3.2 志贺氏菌

按照 WS 287 进行检测。可选择生化鉴定试剂盒、全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。

9.4.3.3 霍乱弧菌

9.4.3.3.1 菌株初筛

按照 WS 289 进行检测。包括玻片凝集试验和氧化酶试验。

9.4.3.3.2 菌株复核

- 9.4.3.3.2.1 经初筛阳性或可疑阳性的菌株,应该进行复核鉴定。按照 WS 289 进行检测。可选择生化鉴定试剂盒、全自动微生物生化鉴定系统或微生物飞行质谱鉴定系统。

9.4.3.3.2.2 复核结果符合 O1 群或 O139 群霍乱弧菌的菌株,按菌株管理的要求保存与上送;如复核结果出现疑问,应尽快将菌株上送参比实验室进行确认分析。

9.4.4 血清学分型

9.4.4.1 自凝性检查

伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、志贺氏菌采用玻片凝集试验。一般采用琼脂含量为 1.2%~1.5% 的纯培养物进行玻片凝集试验。首先用生理盐水进行自凝性检测。若菌体在生理盐水中凝集,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。

9.4.4.2 伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌血清分型

按照 WS 280 进行检测。

9.4.4.3 志贺氏菌血清分型

按照 WS 287—2008 中 A.1 进行检测。

9.4.5 痢疾阿米巴检验

PCR 检测结果为痢疾阿米巴阳性时,需重新采集病人粪便,按照 WS 287—2008 中 A.2 进行检测。

9.5 结果报告

根据确证试验结果对实时荧光 PCR 阳性标本作出最终结果判定和菌型判定。

10 生物安全

标本采集、转运、保存和检验等活动,按照 GB 19489 相关规定执行。

附 录 A
(资料性)
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	1 000 mL

A.1.2 制法

将以上成分混合加热溶解,冷却至 25℃左右校正 pH 至 7.4 ± 0.2 ,分装适当的容器。121℃灭菌 15 min。

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

A.2.1.1.1 成分

蛋白胨	9.0 g
牛肉浸粉	4.5 g
氯化钠	2.7 g
碳酸钙	40.5 g
硫代硫酸钠(含 5 个结晶水)	50.0 g
牛胆盐	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.1.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解。煮沸,无须高压灭菌。煮沸后的培养基在 25℃的 pH 为 7.6 ± 0.2 。

A.2.1.2 碘溶液

A.2.1.2.1 成分

碘化钾	25.0 g
碘	20.0 g
蒸馏水	1 00 mL

A.2.1.2.2 制法

将碘化钾溶解于少量的蒸馏水中,再加入碘,振摇至碘全部溶解。加蒸馏水至100 mL,转入棕色瓶内,塞紧瓶塞冷藏贮存。

A.2.1.3 煌绿溶液

A.2.1.3.1 成分

煌绿	0.5 g
蒸馏水	1 00 mL

A.2.1.3.2 制法

将煌绿在蒸馏水中溶解后,存放在冷暗处不少于1 d。

A.2.2 制法

使用的当天,在冷却后的1 000 mL基础液中以无菌操作加入煌绿溶液2.0 mL摇匀,加入碘溶液20.0 mL,再摇匀,分装到无菌试管中。加入煌绿和碘液的培养基当天使用,且不应再次加热。

A.3 氯化镁孔雀绿大豆胨(RVS)增菌液

A.3.1 成分

大豆蛋白胨	4.5 g
氯化钠	7.2 g
磷酸二氢钾	1.26 g
磷酸氢二钾	0.18 g
氯化镁(含6个结晶水)	28.6 g
孔雀绿	0.036 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,必要时调节pH,定量分装于试管中,115℃高压灭菌15 min。灭菌后的培养基在25℃的pH为 5.2 ± 0.2 。

A.4 碱性蛋白胨水培养基

A.4.1 成分

蛋白胨	20.0 g
氯化钠	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,必要时调节pH。分装,121℃高压灭菌15 min。灭菌后的培养基在25℃的pH为 8.6 ± 0.2 。

A.5 亚硫酸铋(BS)琼脂

A.5.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	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
柠檬酸铋铵	2.0 g
亚硫酸钠	6.0 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,必要时调节pH。煮沸,勿过度加热,勿高压灭菌。冷却至 $48\text{℃}\pm2\text{℃}$ 倾注平皿,煮沸后的培养基在25℃的pH为 7.5 ± 0.2 。

注：本培养基于临用前一天制备并倾注平皿,在室温暗处保存,第二天使用。制备完成的培养基保存时间超过48 h会降低其选择性。

A.6 HE 琼脂**A.6.1 成分**

蛋白胨	12.0 g
牛肉浸粉	3.0 g
乳糖	12.0 g
蔗糖	12.0 g
水杨苷	2.0 g
胆盐	20.0 g
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	6.8 g
柠檬酸铁铵	0.8 g
脱氧胆酸钠	2.0 g
酸性品红	0.1 g
溴麝香草酚蓝	0.064 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,必要时调节 pH。煮沸,勿过度加热,勿高压灭菌。冷却至 $48\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倾注平皿,煮沸后的培养基在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 pH 为 7.5 ± 0.2 。

A.7 木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂**A.7.1 成分**

酵母浸粉	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	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
酚红	0.08 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,必要时调节pH。煮沸,勿过度加热,勿高压灭菌。冷却至48℃±2℃倾注平皿,煮沸后的培养基在25℃的pH为7.4±0.2。

A.8 麦康凯(MAC)琼脂

A.8.1 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 mL

A.8.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,必要时调节pH,121℃高压灭菌15 min。冷却至48℃±2℃,倾注平板,灭菌后的培养基在25℃的pH为7.2±0.2。

A.9 庆大霉素琼脂

A.9.1 成分

蛋白胨	14.8 g
牛肉粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
蔗糖	10.0 g
枸橼酸钠	10.0 g
亚硫酸钠	3.0 g
多黏菌素B	6 000 IU
庆大霉素	500 IU
亚碲酸钾	0.01 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,必要时调节pH。煮沸,勿过度加热,勿高压灭菌,冷却至 $55\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倾注平皿,煮沸后的培养基在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的pH为 8.4 ± 0.2 。

A.10 硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖(TCBS)琼脂

A.10.1 成分

蛋白胨	10.0 g
酵母浸膏	5.0 g
柠檬酸钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	10.0 g
硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	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
蒸馏水	1 000 mL

A.10.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,必要时调节pH。煮沸,勿过度加热,勿高压灭菌,冷却至 $48\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倾注平皿,煮沸后的培养基在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的pH为 8.6 ± 0.2 。

A.11 四号琼脂

A.11.1 成分

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	500 U
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.11.2 制法

将各成分溶于蒸馏水中,校正pH至 8.5 ± 0.2 ,加热煮沸至完全溶解。冷至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,每100 mL加入0.1 mL通过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 孔径滤膜进行过滤除菌的1%亚碲酸钾溶液,摇匀,倾注平板。

A.12 碱性营养琼脂

A.12.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	13.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.12.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,必要时调节pH。分装后 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌15 min。灭菌后的培养基在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的pH为 8.4 ± 0.2 。

A.13 三糖铁(TSI)琼脂

A.13.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉浸粉	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
酚红	0.025 g
氯化钠	5.0 g
硫酸亚铁铵(含6个结晶水)	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 13.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,必要时调节pH。定量分装于试管中,115℃高压灭菌15 min。灭菌后制成斜面,底层深度不小于2.5 cm。灭菌后的培养基在25℃的pH为7.4±0.2。

A. 14 克氏双糖铁(KIA)琼脂**A. 14.1 成分**

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	3.0 g
酵母膏	3.0 g
山梨醇	20.0 g
葡萄糖	1.0 g
氯化钠	5.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
硫代硫酸钠	0.5 g
琼脂	12.0 g
酚红	0.025 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 14.2 制法

将酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中,搅匀后加热溶解,校正pH至7.4±0.2,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. 15 糖发酵培养基**A. 15.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	5.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠(含12个结晶水)	2.0 g
溴麝香草酚蓝溶液	0.025 g
蒸馏水	1 000 mL

A.15.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,必要时调节pH,121℃高压灭菌15 min。冷却后加入终浓度为0.5%~1%的无水糖溶液,分装。灭菌后的培养基在25℃的pH为7.4±0.2。

A.15.3 试验方法

挑取少量培养物接种于糖发酵管36℃±1℃培养24 h~48 h,观察结果。培养基变为黄色者为阳性。对于培养48 h后,怀疑为乳糖迟缓发酵者,可继续培养至3 d~5 d再观察结果。

A.16 氧化酶试剂

A.16.1 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.16.2 制法

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

A.16.3 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.17 赖氨酸脱羧酶试验培养基

A.17.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母浸粉	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.02 g
蒸馏水	1 000 mL
<i>L</i> -赖氨酸或 <i>DL</i> -赖氨酸	5.0 g或10.0 g

A.17.2 制法

除赖氨酸以外的成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,加入*L*-赖氨酸或*DL*-赖氨酸,对照培养基不加赖氨酸。必要时调节pH。分装后115℃高压灭菌15 min。灭菌后的培养基在25℃的pH为6.8±0.2。

A.17.3 试验方法

挑取培养物接种于赖氨酸脱羧酶试验培养基,混匀后滴加一层无菌液体石蜡进行密封。36℃±1℃

培养 18 h~24 h, 观察结果。培养基呈紫色者为赖氨酸脱羧酶阳性, 培养基呈黄色者为赖氨酸脱羧酶阴性。对照管应为黄色。

A. 18 动力-靛基质-尿素半固体(MIU)琼脂

A. 18.1 成分

蛋白胨	28.0 g
酪朊	2.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
氯化钠	5.0 g
酚红	0.005 g
琼脂	4.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 18.2 制法

将各成分加入蒸馏水中, 搅匀后加热溶解, 必要时调节 pH。121 °C 高压灭菌 15 min, 冷却至 55 °C, 无菌加入 40% 的尿素溶液 50 mL, 混匀后分装试管备用。

A. 18.3 试验方法

挑取培养物穿刺接种 MIU 半固体 2/3 深度, 36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h, 观察结果。在 MIU 管内, 细菌沿穿刺线扩散生长为动力阳性, 仅沿穿刺线生长为动力阴性; 穿刺部分呈红色为尿素酶阳性, 否则为阴性; 加入 0.5 mL 靛基质试剂于 MIU 表面, 数分钟后上层呈深红色或玫瑰红色为阳性, 否则为阴性。

附 录 B

(规范性)

实时荧光PCR检测反应体系及注意事项

B.1 荧光PCR

检测靶基因分别针对伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、霍乱弧菌、志贺氏菌和痢疾阿米巴的特异基因设计引物和探针,引物和探针序列见表B.1。

表 B.1 伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌等病原体特异性引物和探针

致病菌名称	引物名称	引物序列	探针名称	探针序列
伤寒沙门氏菌	1	5'-GGAAGTCGAAAGTTCACCTACC-3'	P1	FAM-AGAATCGAAAGCCCTGTCATGCCC-BHQ1
	2	5'-CGTTGTTGGAAATTTATTGGCTATA-3'		
副伤寒沙门氏菌	3	5'-ATCTGGCATTGTTGGTTGT-3'	P2	VIC-CAACCGAACCTGGCAACATACCAT-BHQ1
	4	5'-AATGTCGAAGCTATTAGTGTTTAG-3'		
	5	5'-GCACTTTTAGGAAGCGCTG-3'	P2-1	VIC-TGCTATTCCGCCAACCCGTAAGG-BHQ1
	6	5'-CCATCTTTAACCCTCGAACG-3'		
	7	5'-CCTTCATTGATGTCGGGATG-3'	P2-2	VIC-AATGCCACCAAGACTACCGTTCACT-BHQ1
	8	5'-TCGCGTTTGTCCGTAGTA-3'		
霍乱弧菌	9	5'-GGAAGTAAGACCGCTATCAGA-3'	P3	CY5-CCGCAGCCAGCCAATGTCGT-BHQ3
	10	5'-GCAGTGTGCCTTCATCAG-3'		
痢疾阿米巴	11	5'-CCTGAAACAGTAGATTGGAGAAA-3'	P4	FAM-ACACCCTCCACACTCTGCTTGA TCTCT-BHQ1-BHQ2
	12	5'-CTTCCTTCAAGTGCTGCAA-3'		
志贺氏菌	13	5'-TGTGGATGAGATAGAAGTCTAC-3'	P5	CY5-CTTCCAGACCATGCTCGCAGA-BHQ3
	14	5'-CCGACACGCCATAGAA-3'		

B.2 反应体系

荧光PCR检测反应体系见表B.2。

表 B.2 伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌等病原体荧光PCR检测反应体系

反应液组分	体积/μL
超纯水	7.14
10×PCR buffer	2.50
MgCl ₂ (25 mmol/L)	4.00
dNTPs(2.5 mmol/L each dNTP)	1.00

表 B.2 伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌等病原体荧光 PCR 检测反应体系（续）

反应液组分	体积/ μL
1(10 $\mu\text{mol/L}$)-A 7-B	0.40
2(10 $\mu\text{mol/L}$)-A 8-B	0.40
P1(10 $\mu\text{mol/L}$)-A P 4-B	0.20
3-1/3-3/3-5(10 $\mu\text{mol/L}$)-A 9-B	各 0.40
3-2/3-4/3-6(10 $\mu\text{mol/L}$)-A 10-B	各 0.40
P2/p2-1/p2-2(10 $\mu\text{mol/L}$)-A P 5-B	各 0.20
5(10 $\mu\text{mol/L}$)-A	0.40
6(10 $\mu\text{mol/L}$)-A	0.40
P3(10 $\mu\text{mol/L}$)-A	0.20
Taq 酶(5 U/ μL)	0.30
UNG 酶(1 U/ μL)	0.06
模板 DNA	5.00
合计	25.00

B.3 使用注意事项

- B.3.1** 为防止荧光干扰,应使用无粉手套进行操作。避免用手直接接触 PCR 反应管,勿在反应管上进行标记。
- B.3.2** 试验后 PCR 反应管应按照医疗废弃物进行处理,防止污染。
-