



中华人民共和国国家标准

GB 4789.4—2024

食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

2024-02-08 发布

2024-08-08 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

前　　言

本标准代替 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》。

本标准与 GB 4789.4—2016 相比,主要变化如下:

- 修改了设备和材料、培养基和试剂;
- 修改了检验程序和操作步骤;
- 修改了附录 A 和附录 B。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 沙门氏菌检验

1 范围

本标准规定了食品中沙门氏菌(*Salmonella*)的检验方法。

本标准适用于食品中沙门氏菌的检验。

2 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。

- 2.1 冰箱:2 ℃~8 ℃。
- 2.2 恒温培养箱:36 ℃±1 ℃,恒温装置:42 ℃±1 ℃、48 ℃±2 ℃。
- 2.3 均质器。
- 2.4 振荡器。
- 2.5 天平:感量0.1 g。
- 2.6 无菌锥形瓶:容量500 mL、250 mL。
- 2.7 无菌量筒:容量50 mL。
- 2.8 无菌均质杯、无菌均质袋。
- 2.9 无菌广口瓶:容量500 mL。
- 2.10 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。
- 2.11 无菌培养皿:直径60 mm、90 mm。
- 2.12 无菌试管:10 mm×75 mm、15 mm×150 mm、18 mm×180 mm或其他合适规格。
- 2.13 无菌小玻管:3 mm×50 mm。
- 2.14 无菌接种环:10 μL(直径约3 mm)、1 μL以及接种针。
- 2.15 pH计或精密pH试纸。
- 2.16 微生物生化鉴定系统。
- 2.17 生物安全柜。

3 培养基和试剂

- 3.1 缓冲蛋白胨水(BPW):见A.1。
- 3.2 四硫磺酸钠煌绿增菌液(TTB):见A.2。
- 3.3 氯化镁孔雀绿大豆胨(RVS)增菌液:见A.3。
- 3.4 亚硫酸铋(BS)琼脂:见A.4。
- 3.5 HE琼脂:见A.5。
- 3.6 木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂:见A.6。
- 3.7 三糖铁(TSI)琼脂:见A.7。
- 3.8 营养琼脂(NA):见A.8。

- 3.9 半固体琼脂:见 A.9。
- 3.10 蛋白胨水、靛基质试剂:见 A.10。
- 3.11 尿素琼脂(pH 7.2):见 A.11。
- 3.12 氰化钾(KCN)培养基:见 A.12。
- 3.13 赖氨酸脱羧酶试验培养基:见 A.13。
- 3.14 糖发酵培养基:见 A.14。
- 3.15 邻硝基酚 β -D 半乳糖苷(ONPG)培养基:见 A.15。
- 3.16 丙二酸钠培养基:见 A.16。
- 3.17 沙门氏菌显色培养基。
- 3.18 沙门氏菌诊断血清。
- 3.19 生化鉴定试剂盒。

4 检验程序

沙门氏菌检验程序见图 1。

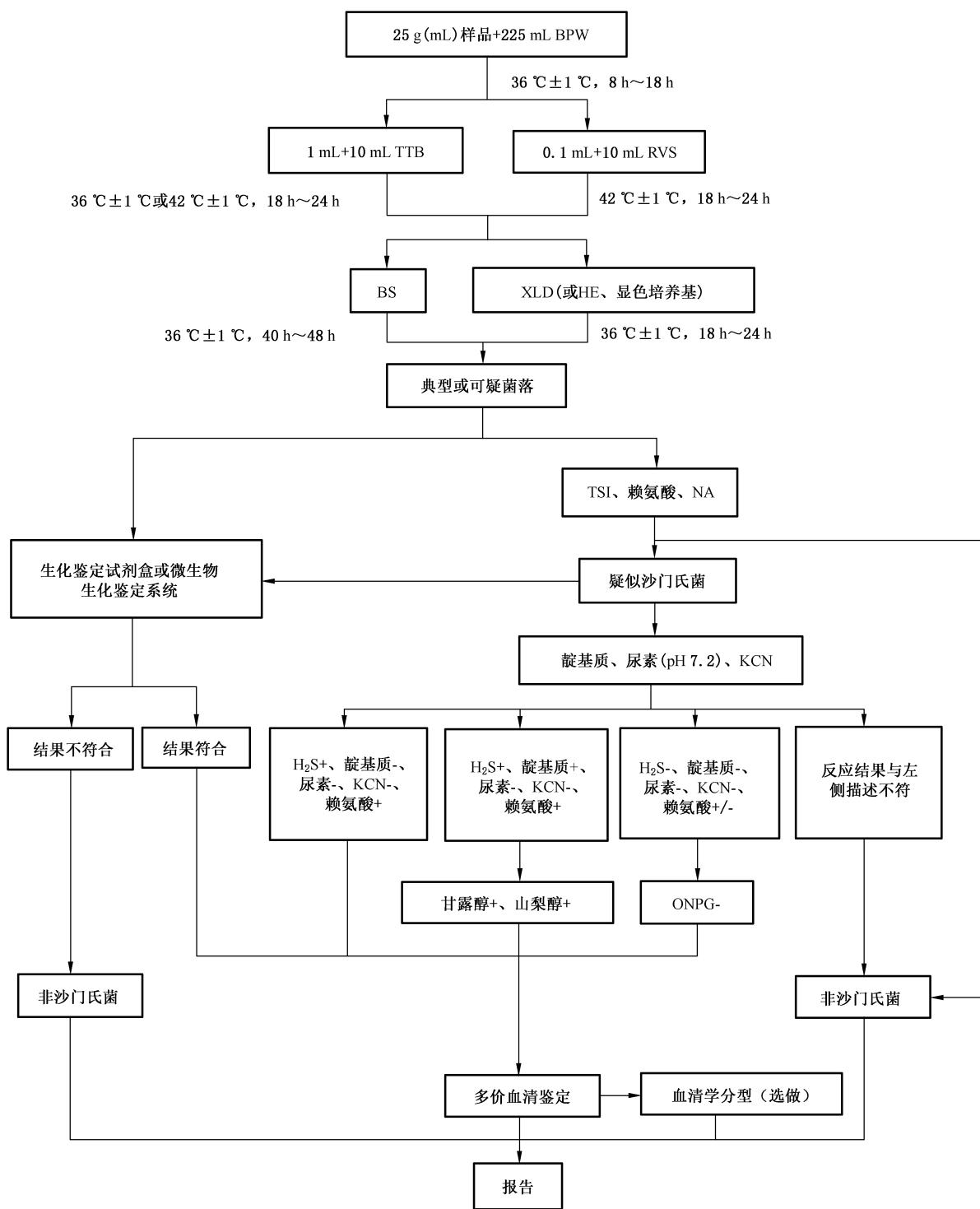


图 1 沙门氏菌检验程序

5 操作步骤

5.1 预增菌

无菌操作取 25 g(mL)样品, 置于盛有 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 的无菌均质袋内,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。对于液态样品,也可置于盛有 225 mL BPW 的无菌锥形瓶或其他合适容器中振荡混匀。如需调节 pH 时,用 1 mol/L NaOH 或 HCl 调 pH 至 6.8±0.2。无菌操作将样品转至 500 mL 锥形瓶或其他合适容器内(如均质杯本身具有无孔盖或使用均质袋时,可不转移样品),置于 36 °C±1 °C 培养 8 h~18 h。

对于乳粉,无菌操作称取 25 g 样品,缓缓倾倒在广口瓶或均质袋内 225 mL BPW 的液体表面,勿调节 pH,也暂不混匀,室温静置 60 min±5 min 再后混匀,置于 36 °C±1 °C 培养 16 h~18 h。

冷冻样品如需解冻,取样前在 40 °C~45 °C 的水浴中解冻不超过 15 min,或在 2 °C~8 °C 冰箱缓慢化冻不超过 18 h。

5.2 选择性增菌

轻轻摇动预增菌的培养物,移取 0.1 mL 转种于 10 mL RVS 中,混匀后于 42 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。同时,另取 1 mL 转种于 10 mL TTB 中后混匀,低背景菌的样品(如深加工的预包装食品等)置于 36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h,高背景菌的样品(如生鲜禽肉等)置于 42 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。

如有需要,可将预增菌的培养物在 2 °C~8 °C 冰箱保存不超过 72 h,再进行选择性增菌。

5.3 分离

振荡混匀选择性增菌的培养物后,用直径 3 mm 的接种环取每种选择性增菌的培养物各一环,分别划线接种于一个 BS 琼脂平板和一个 XLD 琼脂平板(也可使用 HE 琼脂平板、沙门氏菌显色培养基平板或其他合适的分离琼脂平板),于 36 °C±1 °C 分别培养 40 h~48 h(BS 琼脂平板)或 18 h~24 h(XLD 琼脂平板、HE 琼脂平板、沙门氏菌显色培养基平板),观察各个平板上生长的菌落,是否符合表 1 的菌落特征。

如有需要,可将选择性增菌的培养物在 2 °C~8 °C 冰箱保存不超过 72 h,再进行分离。

表 1 不同分离琼脂平板上沙门氏菌的菌落特征

分离琼脂平板	菌落特征
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
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
沙门氏菌显色培养基	符合相应产品说明书的描述

5.4 生化试验

5.4.1 挑取 4 个以上典型或可疑菌落进行生化试验,这些菌落宜分别来自不同选择性增菌液的不同分离琼脂;也可先选其中一个典型或可疑菌落进行试验,若鉴定为非沙门氏菌,再取余下菌落进行鉴定。将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;同时接种赖氨酸脱羧酶试验培养基和营养琼脂(或其他合适的非选择性固体培养基)平板,于 36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。三糖铁和赖氨酸脱羧酶试验的结果及初步判断见表 2。将已挑菌落的分离琼脂平板于 2 °C~8 °C 保存,以备必要时复查。

5.4.2 初步判断为非沙门氏菌者,直接报告结果。对疑似沙门氏菌者,从营养琼脂平板上挑取其纯培

养物接种蛋白胨水(供做靛基质试验)、尿素琼脂(pH7.2)、氯化钾(KCN)培养基,也可在接种三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基的同时,接种以上3种生化试验培养基,于36℃±1℃培养18 h~24 h,按表3判定结果。

表2 三糖铁和赖氨酸脱羧酶试验结果及初步判断

三糖铁				赖氨酸脱羧酶	初步判断
斜面	底层	产气	硫化氢		
K	A	+(-)	+(-)	+	疑似沙门氏菌
K	A	+(-)	+(-)	-	疑似沙门氏菌
A	A	+(-)	+(-)	+	疑似沙门氏菌
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。

表3 生化试验结果鉴别表(一)

序号	硫化氢	靛基质	尿素(pH 7.2)	氯化钾	赖氨酸脱羧酶
A1	+	-	-	-	+
A2	+	+	-	-	+
A3	-	-	-	-	+/-

注: +:阳性; -:阴性; +/-:阳性或阴性。

5.4.2.1 符合表3中A1者,为沙门氏菌典型的生化反应,进行血清学鉴定后报告结果。尿素、氯化钾和赖氨酸脱羧酶中如有1项不符合A1,按表4进行结果判断;尿素、氯化钾和赖氨酸脱羧酶中如有2项不符合A1,判断为非沙门氏菌并报告结果。

表4 生化试验结果鉴别表(二)

尿素(pH 7.2)	氯化钾	赖氨酸脱羧酶	判断结果
-	-	-	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(符合该亚种生化特性并要求血清学鉴定结果)
+	-	+	沙门氏菌个别变体(要求血清学鉴定结果)

注: +:阳性; -:阴性。

5.4.2.2 生化试验结果符合表3中A2者,补做甘露醇和山梨醇试验,沙门氏菌(靛基质阳性变体)的甘露醇和山梨醇试验结果均为阳性,其结果报告还需进行血清学鉴定。

5.4.2.3 生化试验结果符合表3中A3者,补做ONPG试验。沙门氏菌的ONPG试验结果为阴性,且赖氨酸脱羧酶试验结果为阳性,但甲型副伤寒沙门氏菌的赖氨酸脱羧酶试验结果为阴性。生化试验结果符合沙门氏菌者,进行血清学鉴定。

5.4.2.4 必要时,按表5进行沙门氏菌种和亚种的生化鉴定。

5.4.3 如选择生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统,用分离平板上典型或可疑菌落的纯培养物,或者根据表2初步判断为疑似沙门氏菌的纯培养物,按生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统的操作说

明进行鉴定。

5.5 血清学鉴定

5.5.1 培养物自凝性检查

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。首先进行自凝性检查, 在洁净的玻片上滴加一滴生理盐水, 取适量待测菌培养物与之混合, 成为均一性的浑浊悬液, 将玻片轻轻摇动 30 s~60 s, 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。

表 5 沙门氏菌种和亚种的生化鉴定

种	肠道沙门氏菌						邦戈尔 沙门菌
亚种	肠道亚种	萨拉姆亚种	亚利桑那 亚种	双相亚利桑 那亚种	豪顿亚种	印度亚种	
项目	I	II	III a	III b	IV	VI	V
卫矛醇	+	+	-	-	-	d	+
ONPG(2 h)	-	-	+	+	-	d	+
丙二酸盐	-	+	+	+	-	-	-
明胶酶	-	+	+	+	+	+	-
山梨醇	+	+	+	+	+	-	+
氰化钾	-	-	-	-	+	-	+
L(+) - 酒石酸盐	+	-	-	-	-	-	-
半乳糖醛酸	-	+	-	+	+	+	+
γ-谷氨酰转肽酶	+	+	-	+	+	+	+
β-葡萄糖醛酸苷酶	d	d	-	+	-	d	-
黏液酸	+	+	+	- (70%)	-	+	+
水杨苷	-	-	-	-	+	-	-
乳糖	-	-	- (75%)	+ (75%)	-	d	-
O1 噬菌体裂解	+	+	-	+	-	+	d

注: +: 阳性; -: 阴性; d: 不定。

5.5.2 多价菌体抗原(O)鉴定

在玻片上划出两个约 1 cm×2 cm 的区域, 挑取待测菌培养物, 各放约一环于玻片上的每一区域上部, 在其中一个区域下部加一滴多价菌体(O)血清, 在另一区域下部加入一滴生理盐水, 作为对照。再用无菌的接种环或针将两个区域内的待测菌培养物, 分别与血清和生理盐水研成乳状液。将玻片倾斜摇动混合 1 min, 并对着黑暗背景进行观察, 与对照相比, 出现可见的菌体凝集者为阳性反应。O 血清不凝集时, 将菌株接种在琼脂含量较高(如 2%~3%) 的培养基上培养后再鉴定, 如果是由于 Vi 抗原的存在而阻止了 O 血清的凝集反应时, 可挑取待测菌培养物在 1 mL 生理盐水中制成浓菌液, 在沸水中水浴 20 min~30 min, 冷却后再进行鉴定。

注: 不同厂商沙门氏菌诊断血清的组成、鉴定操作及结果判断, 可能存在差异。使用商品化的沙门氏菌诊断血清进行血清学鉴定时, 应遵循其产品说明。

5.5.3 多价鞭毛抗原(H)鉴定

按 5.5.2 的操作,将多价菌体(O)血清换成多价鞭毛(H)血清,进行多价鞭毛抗原(H)鉴定。H 抗原发育不良时,将菌株接种在半固体琼脂平板的中央,待菌落蔓延生长时,在其边缘部分取菌鉴定;或将菌株接种在装有半固体琼脂的小玻管培养 1 代~2 代,自远端取菌再进行鉴定。

5.6 血清学分型(选做项目)

5.6.1 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型菌株,不能分型。

被 A~F 多价 O 血清凝集者,依次用 O4、O3、10、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、E4 各亚群。根据 O 单因子血清的鉴定结果,确定每个 O 抗原成分。没有 O 单因子血清的,用两个 O 复合因子血清进行鉴定。

不被 A~F 多价 O 血清凝集者,先用 9 种多价 O 血清鉴定,如有其中一种血清凝集,则用这种血清所包括的 O 群血清逐一进行鉴定,以确定 O 群。每种多价 O 血清所包括的 O 群血清如下:

O 多价 1: A、B、C、D、E、F 群(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

5.6.2 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 因子血清鉴定第 1 相和第 2 相的 H 抗原。

表 6 A~F 各 O 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,z ₁₅
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	无

不常见的菌型,先用8种多价H血清鉴定,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因子血清逐一进行鉴定,以确定第1相和第2相的H抗原。8种多价H血清所包括的H因子血清如下:

H多价1:a、b、c、d、i

H多价2:e、h、e、n、x、e、n、z₁₅、f、g、g、m、s、g、p、u、g、p、g、q、m、t、g、z₅₁

H多价3:k、r、y、z、z₁₀、l、v、l、w、l、z₁₃、l、z₂₈、l、z₄₀

H多价4:1、2、1、5、1、6、1、7、z₆

H多价5:z₄、z₂₃、z₄、z₂₄、z₄、z₃₂、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

每个H抗原成分的最后确定均应根据H单因子血清的鉴定结果,没有H单因子血清的要用两个H复合因子血清进行鉴定。

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,要用以下位相变异的方法鉴定其另一相。单相菌不必做位相变异鉴定。

5.6.2.1 简易平板法

将半固体琼脂平板烘干表面水分,挑取已知相的H因子血清1环,滴在半固体平板表面,正置平板片刻待血清吸收,在滴加血清部位的中央点种待测菌株,翻转平板置于36℃±1℃培养后,在形成蔓延生长的菌苔边缘取菌鉴定。

5.6.2.2 小玻管法

将1mL~2mL半固体琼脂熔化后冷却至48℃左右,加入已知相的H因子血清0.05mL~0.1mL,混匀后装入3mm×50mm两端开口的小玻管内。待琼脂凝固后,用接种针挑取待测菌,接种于小玻管一端的琼脂内。将小玻管平放在平皿内,置于36℃±1℃培养,并采取保湿措施以防琼脂中水分蒸发而干缩。每天观察结果,待另一相细菌解离后,从小玻管另一端挑取细菌进行鉴定。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:(200~800)的量加入。

5.6.2.3 小套管法

在装有大约10mL半固体琼脂培养基的试管中,插入3mm×50mm两端开口的小玻管(下端开口要留一个缺口,不要平齐),小玻管的上端应高出子培养基的表面,121℃高压灭菌15min后备用。临用时加热熔化,并冷却至48℃左右,挑取已知相的H因子血清1环,加入小玻管中的培养基内,略加搅动使其混匀。待琼脂凝固后,在小玻管中的半固体表层内接种待测菌,于36℃±1℃培养,每天观察结果,待另一相细菌解离后,从小玻管外的半固体表面取菌鉴定,或将所取的菌转种1%琼脂斜面,于36℃±1℃培养后再进行鉴定。

5.6.3 Vi抗原的鉴定

用Vi因子血清进行鉴定。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。

5.6.4 血清型的判定

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血清型。

6 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。

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

A.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水(或其他符合要求的实验用水,下同)中,搅匀后加热溶解,必要时调节 pH, 121 ℃高压灭菌 15 min。灭菌后的培养基在 25 ℃的 pH 为 7.2±0.2。

A.2 四硫磺酸盐煌绿增菌液(TTB)**A.2.1 基础液**

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

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.2.2 碘溶液

碘化钾	25.0 g
碘	20.0 g
蒸馏水	100 mL

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.2.3 煌绿溶液

煌绿	0.5 g
蒸馏水	100 mL

将煌绿在蒸馏水中溶解后,存放在冷暗处不少于 1 d。

A.2.4 制法

基础液	1 000 mL
-----	----------

煌绿溶液	2.0 mL
碘溶液	20.0 mL
使用的当天,在冷却后的基础液中以无菌操作加入煌绿溶液摇匀,加入碘溶液,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,且不能再次加热。	

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 亚硫酸铋(BS)琼脂

A.4.1 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.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。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 7.5±0.2。

注: 本培养基应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.5 HE 琼脂

A.5.1 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.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 ℃±2 ℃倾注平皿,煮沸后的培养基在 25 ℃的 pH 为 7.5±0.2。

A.6 木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂

A.6.1 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.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 ℃±2 ℃倾注平皿,煮沸后的培养基在 25 ℃的 pH 为 7.4±0.2。

A.7 三糖铁(TSI)琼脂

A.7.1 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.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。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.8 营养琼脂(NA)

A.8.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15 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。灭菌后的培养基在 25 ℃的 pH 为 7.3±0.2。

A.9 半固体琼脂

A.9.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	3.0 g~6.5 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,121 ℃高压灭菌 15 min。冷却至 48 ℃±2 ℃倾注平皿,或分装小玻管。灭菌后的培养基在 25 ℃的 pH 为 7.4±0.2。

A.10 蛋白胨水、靛基质试剂

A.10.1 蛋白胨水

A.10.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g

DL-色氨酸	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.10.1.2 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。分装小试管,121 ℃高压灭菌 15 min。灭菌后的培养基在 25 ℃的 pH 为 7.4±0.2。

A.10.2 靛基质试剂

A.10.2.1 柯凡克试剂:将 5.0 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.10.2.2 欧-波试剂:将 1.0 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.10.3 试验方法

挑取少量培养物接种在蛋白胨水中,36 ℃±1 ℃培养 24 h~48 h。加入柯凡克试剂约 0.5 mL,轻摇试管,试剂层呈深红色者为阳性。或取欧-波试剂约 0.5 mL,沿管壁流下,覆盖于培养液表面,液面接触处呈玫瑰红色者为阳性。

A.11 尿素琼脂(pH 7.2)

A.11.1 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
酚红	0.012 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	900 mL
20%尿素溶液	100 mL

A.11.2 制法

除尿素外,将其他成分加入 900 mL 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 ℃,加入 100 mL 经过滤除菌的 20% 尿素溶液,分装于无菌试管内制成斜面。灭菌后的培养基在 25 ℃的 pH 为 7.2±0.2。

A.11.3 试验方法

挑取培养物接种在尿素琼脂斜面上,36 ℃±1 ℃培养 24 h,观察结果。尿素琼脂斜面变为玫瑰红色者为尿素酶阳性。

注:也可采用不含琼脂的尿素培养基。

A.12 氰化钾(KCN)培养基

A.12.1 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.12.2 制法

将除氰化钾以外的成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,121 °C高压灭菌 15 min。充分冷却后,在每 100 mL 培养基加入 2.0 mL 新制备的 0.5% 氰化钾溶液(最后浓度为 1 : 10 000),分装于无菌试管内,立刻用无菌管塞塞紧。同时,将不加氰化钾的培养基作为对照培养基,分装后备用。

A.12.3 试验方法

将待测菌的纯培养物用生理盐水配制成 0.5 麦氏浊度的菌悬液,滴加 2 滴~3 滴菌悬液于氰化钾(KCN)培养基,混匀后滴加一层无菌液体石蜡进行密封。另外滴加 2 滴~3 滴菌悬液于对照培养基。在 36 °C±1 °C 培养 24 h~48 h,观察结果。氰化钾(KCN)培养基内有细菌生长者为阳性(不抑制),培养 48 h 无细菌生长者为阴性(抑制)。

注: 氰化钾是剧毒药,操作时应戴手套,避免沾染。试验失败的主要原因是密封不严而造成假阳性反应。

A.13 赖氨酸脱羧酶试验培养基

A.13.1 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
L-赖氨酸或 DL-赖氨酸	5.0 g 或 10.0 g

A.13.2 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 °C 高压灭菌 15 min。灭菌后的培养基在 25 °C 的 pH 为 6.8±0.2。

A.13.3 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 °C±1 °C 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.14 糖发酵培养基

A.14.1 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	0.025 g
蒸馏水	1 000 mL

A.14.2 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% 的无菌糖溶液,分装。灭菌后的培养基在 25 ℃的 pH 为 7.4±0.2。

A.14.3 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.15 邻硝基酚 β -D 半乳糖苷(ONPG)培养基

A.15.1 成分

邻硝基酚 β -D 半乳糖苷(ONPG)	60.0 mg
0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.5)	10.0 mL
1%蛋白胨水(pH 7.5)	30.0 mL

A.15.2 制法

将 ONPG 溶于缓冲液内,加入蛋白胨水,过滤除菌后分装于无菌的小试管内,塞紧管塞。

A.15.3 试验方法

挑取培养物接种于 ONPG 培养基,36 ℃±1 ℃培养 3 h 观察结果,培养基变为黄色者,为 β -半乳糖苷酶阳性。若培养基不变色,继续培养至 24 h,培养基变黄者,为 β -半乳糖苷酶阳性,否则为阴性。

A.16 丙二酸钠培养基

A.16.1 成分

酵母浸粉	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
溴麝香草酚蓝	0.025 g
蒸馏水	1 000 mL

A.16.2 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,分装后 121 ℃高压灭菌 15 min。灭菌后的培养基在 25 ℃的 pH 为 6.8±0.2。

A.16.3 试验方法

用新鲜培养物接种于丙二酸钠培养基,36 ℃±1 ℃培养 48 h,观察结果。培养基变蓝色者为阳性。

附录 B
常见沙门氏菌抗原表

常见沙门氏菌抗原见表 B.1。

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
A 群				
甲型副伤寒沙门氏菌	S.Paratyphi A	1,2,12	a	[1,5]
B 群				
基桑加尼沙门氏菌	S.Kisangani	1,4,[5],12	a	1,2
阿雷查瓦莱塔沙门氏菌	S.Arechavaleta	4,[5],12	a	1,7
马流产沙门氏菌	SAbortusequi	4,12	—	e,n,x
乙型副伤寒沙门氏菌 ^a	S.Paratyphi B	1,4,[5],12	b	1,2
利密特沙门氏菌	S.Limete	1,4,12,[27]	b	1,5
阿邦尼沙门氏菌	S.Abony	1,4,[5],12,[27]	b	e,n,x
维也纳沙门氏菌	S.Wien	1,4,12,[27]	b	1,w
伯里沙门氏菌	S.Bury	4,12,27	c	z6
斯坦利沙门氏菌	S.Stanley	1,4,[5],12,[27]	d	1,2
圣保罗沙门氏菌	S.Saintpaul	1,4,[5],12	e,h	1,2
里定沙门氏菌	S.Reading	1,4,[5],12	e,h	1,5
彻斯特沙门氏菌	S.Chester	1,4,[5],12	e,h	e,n,x
德尔卑沙门氏菌	S.Derby	1,4,[5],12	f,g	[1,2]
阿贡纳沙门氏菌	S.Agona	1,4,[5],12	f,g,s	[1,2]
埃森沙门氏菌	S.Essen	4,12	g,m	—
加利福尼亚沙门氏菌	S.California	4,12	g,m,t	[z ₆₇]
金斯敦沙门氏菌	S.Kingston	1,4,[5],12,[27]	g,s,t	[1,2]
布达佩斯沙门氏菌	S.Budapest	1,4,12,[27]	g,t	—
鼠伤寒沙门氏菌	S.Typhimurium	1,4,[5],12	i	1,2
拉古什沙门氏菌	S.Lagos	1,4,[5],12	i	1,5
布雷登尼沙门氏菌	S.Bredeney	1,4,12,27	l,v	1,7
基尔瓦沙门氏菌Ⅱ	S.Kilwa Ⅱ	4,12	l,w	e,n,x
海德尔堡沙门氏菌	S.Heidelberg	1,4,[5],12	r	1,2
印地安纳沙门氏菌	S.Iniana	1,4,12	z	1,7
斯坦利维尔沙门氏菌	S.Stanleyville	1,4,[5],12,[27]	z ₄ ,z ₂₃	[1,2]
伊图里沙门氏菌	S.Ituri	1,4,12	z ₁₀	1,5

表 B.1 常见沙门氏菌抗原表 (续)

菌名	拉丁菌名	O 抗原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
C1 群				
奥斯陆沙门氏菌	<i>S.Oslo</i>	6,7, <u>14</u>	a	e,n,x
爱丁堡沙门氏菌	<i>S.Edinburg</i>	6,7, <u>14</u>	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
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, <u>14</u>	e,h	e,n,z ₁₅
里森沙门氏菌	<i>S.Rissen</i>	6,7, <u>14</u>	f,g	—
蒙得维的亚沙门氏菌	<i>S.Montevideo</i>	6,7, <u>14</u>	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.Oranienburg</i>	6,7, <u>14</u>	m,t	[z ₅₇]
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, <u>14</u>	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, <u>14</u>	l,v	e,n,z ₁₅
格但斯克沙门氏菌	<i>S.Gdansk</i>	6,7, <u>14</u>	l,v	z ₆
维尔肖沙门氏菌	<i>S.Virchow</i>	6,7, <u>14</u>	r	1,2
婴儿沙门氏菌	<i>S.Infantis</i>	6,7, <u>14</u>	r	1,5
巴布亚沙门氏菌	<i>S.Papuana</i>	6,7	r	e,n,z ₁₅
巴雷利沙门氏菌	<i>S.Bareilly</i>	6,7, <u>14</u>	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, <u>14</u>	y	e,n,z ₁₅
姆班达卡沙门氏菌	<i>S.Mbandaka</i>	6,7, <u>14</u>	z ₁₀	e,n,z ₁₅
耶路撒冷沙门氏菌	<i>S.Jerusalem</i>	6,7, <u>14</u>	z ₁₀	l,w
田纳西沙门氏菌	<i>S.Tennessee</i>	6,7, <u>14</u>	z ₂₉	[1,2,7]
C2 群				
习志野沙门氏菌	<i>S.Narashino</i>	6,8	a	e,n,x

表 B.1 常见沙门氏菌抗原表 (续)

菌名	拉丁菌名	O 抗原	H 抗原	
			第1相	第2相
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]
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
利奇菲尔德沙门氏菌	<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]
哈达尔沙门氏菌	<i>S.Hadar</i>	6,8	Z ₁₀	e,n,x
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
科瓦利斯沙门氏菌	<i>S.Corrallis</i>	8,20	z ₄ ,z ₂₃	[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</i> Ⅱ	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

表 B.1 常见沙门氏菌抗原表 (续)

菌名	拉丁菌名	O 抗原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
鸡沙门氏菌	<i>S.Gallinarum</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	l,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菌	<i>S.Amounderness</i>	3,10	i	1,5
新罗歇尔沙门氏菌	<i>S.Newrochelle</i>	3,10	k	l,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	l,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	l,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
索恩堡沙门氏菌	<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

表 B.1 常见沙门氏菌抗原表 (续)

菌名	拉丁菌名	O 抗原	H 抗原	
			第1相	第2相
威尼斯沙门氏菌	S.Veneziana	11	i	e,n,x
阿巴特图巴沙门氏菌	S.Abaetetuba	11	k	1,5
鲁比斯劳沙门氏菌	S.Rubislaw	11	r	e,n,x
其他群				
密西西比沙门氏菌	S.Mississippi	<u>1</u> ,13,23	b	1,5
浦那沙门氏菌	S.Poona	<u>1</u> ,13,22	z	1,6
里特沙门氏菌	S.Ried	<u>1</u> ,13,22	z_4, z_{23}	[e,n, z_{15}]
古巴沙门氏菌	S.Cubana	<u>1</u> ,13,23	z_{29}	—
苏拉特沙门氏菌	S.Surat	[1],6,14,[25]	r,[i]	e,n, z_{15}
松兹瓦尔沙门氏菌	S.Sundsvall	[1],6,14,[25]	z	e,n,x
非丁伏斯沙门氏菌	S.Hvittingfoss	16	b	e,n,x
威斯敦沙门氏菌	S.Weston	16	e,h	z_6
上海沙门氏菌	S.Shanghai	16	l,v	1,6
自贡沙门氏菌	S.Zigong	16	l,w	1,5
巴圭达沙门氏菌	S.Baguida	21	z_4, z_{23}	—
迪尤波尔沙门氏菌	S.Dieuppeul	28	i	1,7
卢肯瓦尔德沙门氏菌	S.Luckenwalde	28	z_{10}	e,n, z_{15}
拉马特根沙门氏菌	S.Ramatgan	30	k	1,5
阿德莱德沙门氏菌	S.Adelaide	35	f,g	—
旺兹沃思沙门氏菌	S.Wandsworth	39	b	1,2
里奥格兰德沙门氏菌	S.Riogrande	40	b	1,5
莱瑟沙门氏菌Ⅱ	S.Lethe Ⅱ	41	g,t	—
达莱姆沙门氏菌	S.Dahlem	48	k	e,n, z_{15}
沙门氏菌Ⅲ b	Salmonella Ⅲ b	61	l,v	1,5,7
注：抗原表中符号的说明如下。				
—:带下划线的 O 因子是由噬菌体溶原化产生的(如 <u>1</u> ,2,12),只有菌株被相应的噬菌体溶原化时,带下划线的因子才会出现。				
[]:中括号内的 O 因子(无下划线)或 H 因子可能存在,也可能不存在,且与噬菌体溶原化无关。例如,大多数甲型副伤寒沙门氏菌 H 抗原只有一个位相 H:a,罕见第2相 H:1,5,其抗原式为: <u>1</u> ,2,12:a:[1,5]。				
{ }:大括号内的 O 因子是排他性的。在一个血清型中,大括号内的因子不能与另一大括号内其他因子共存。例如在 O:3,10 群中,若存在 O: <u>15</u> 或 O: <u>15</u> , <u>34</u> 因子,则取代 O:10,其 O 抗原表示为:3,{10}{ <u>15</u> }{ <u>15</u> , <u>34</u> }。				
^a 酒石酸盐(<i>d</i> -tartrate)阳性者为爪哇沙门氏菌(S.Java)。				