

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0175—2010
代替 SN 0175—1992

进出口食品中弯曲菌的检测方法

Detection of *Campylobacter* spp. in food for import and export

2010-03-02 发布

2010-09-16 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

本标准代替 SN 0175—1992《出口食品中弯曲杆菌检验方法》。

本标准与 SN 0175—1992 相比,主要变化如下:

- 修改和规范了“设备和材料”;
- 增加了蛋及蛋制品等产品的样品制备方法;
- 修改及完善了增菌培养方法;
- 增加了红嘴鸥弯曲菌等四种弯曲菌种及亚种的生化图谱;
- 增加了 API 鉴定试验;
- 增加了选择性培养基改良 CCDA 培养基。

本标准的附录 A 为规范性附录。

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:中华人民共和国湖南出入境检验检疫局,中华人民共和国中山出入境检验检疫局,中华人民共和国广东出入境检验检疫局,中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:朱金国、莫瑾、蒋原、伍朝晖、唐连飞、朱中武、许龙岩、王志强、祝长青。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN 0175—1992。

进出口食品中弯曲菌的检测方法

1 范围

本标准规定了进出口食品中弯曲菌的检测方法。

本标准适用于进出口食品中弯曲菌的检测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

3 设备和材料

3.1 微需氧条件及相关设备:最佳微需氧条件为5%氧气、10%二氧化碳和85%氮气,选择合适大小的厌氧罐、密封效果好的密封盒中,或其他能保持微需氧条件的设备中放入微需氧产气袋(如:OXIOD公司生产BR0060A或者CN0035A及同类型产品¹⁾),也可在微需氧恒温工作站中进行培养。

3.2 离心机:≤20 000g。

3.3 灭菌离心瓶:250 mL。

3.4 具过滤网的无菌均质袋。

3.5 相差显微镜、暗视野显微镜或光学显微镜(10×,100×)。

3.6 载玻片和盖玻片。

3.7 恒温培养箱:25℃±1℃、30℃±1℃、36℃±1℃以及42℃±1℃。

3.8 灭菌培养皿:直径90 mm。

3.9 乙酸铅条。

3.10 麦氏单位标准浊度。

3.11 均质器:4 000g~8 000g。

4 培养基和试剂

4.1 培养基

4.1.1 Bolton 增菌肉汤:见第A.1章。

4.1.2 0.1%蛋白胨水:见A.1.4。

4.1.3 弯曲菌分离培养基:见第A.2章。

4.1.4 改良Skirrow氏培养基:见A.2.2。

4.1.5 改良CCDA培养基:见A.2.1。

4.1.6 哥伦比亚血琼脂平板:见第A.3章。

4.1.7 用于生化鉴定的改良半固体培养基:见第A.4章。

4.1.7.1 中性红。

4.1.7.2 甘氨酸。

4.1.7.3 半胱氨酸-HCl。

1) 给出这一信息是为了方便本标准的使用者,如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

4.1.7.4 硝酸钾。

4.1.8 三糖铁琼脂斜面:见第 A.5 章。

4.1.9 改良 O-F 葡萄糖培养基:见第 A.6 章。

4.1.10 半固体储存培养基:见第 A.7 章。

4.1.11 冷冻培养基:见第 A.8 章。

4.2 试剂

4.2.1 马尿酸盐和茚三酮反应试剂:见第 A.9 章。

4.2.2 萘啶酮酸和头孢菌素钠:见第 A.1 章。

4.2.3 3%过氧化氢。

4.2.4 冻融马(羊)血。

4.2.5 氧化酶试剂:见第 A.10 章。

4.2.6 革兰氏染色试剂:见第 A.11 章。

4.2.7 硝酸盐检测试剂 A 和 B:见第 A.12 章。

4.2.8 API CAMPY 鉴定条。

5 检测程序

弯曲菌检测程序见图 1。

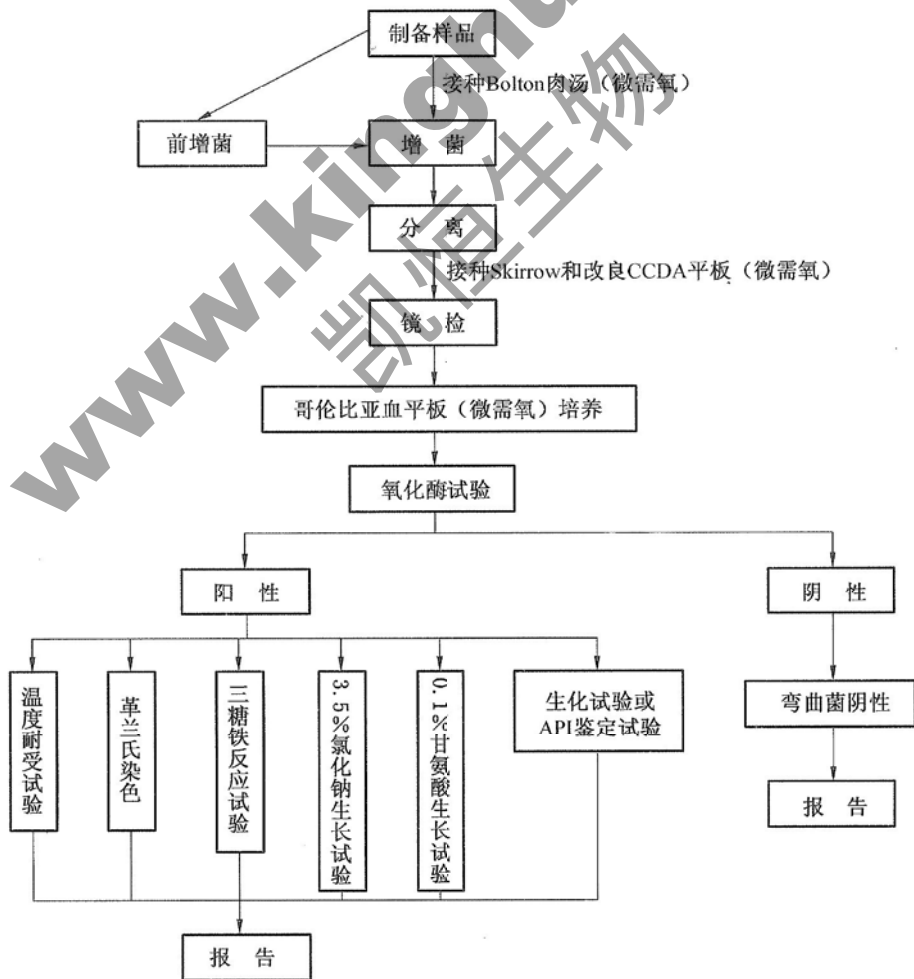


图 1 弯曲菌检测程序图

6 样品的运送和保存

在样品的运送及保存过程中不要将样品冷冻,应在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度条件下保存并尽快进行检测,同时注意不使样品干燥。

注:弯曲菌在低温下存活时间较长,但是冷冻状态下可能导致该菌的死亡。

7 样品制备

7.1 总则

所有样品的制备均应在无菌条件下操作,制样过程应尽快完成。

当存在大量其他菌群时,应使用样品的最初制备液以及 $1:10$ 的 Bolton 增菌肉汤稀释液进行增菌培养。

7.2 龙虾仁和蟹爪

称取 $50\text{ g}\sim 100\text{ g}$ 放入灭菌袋中,置于具过滤衬套的无菌均质袋中,再添入 100 mL Bolton 增菌肉汤,轻柔振荡 5 min 后,静置 5 min 。取出过滤衬套,滤干内容物,滤液放入培养袋或培养瓶中。若无过滤衬套,也可用灭菌纱布过滤。

7.3 净膛畜体或难以分割成 25 g 的样品

适量样品放入无菌均质袋中,加入 200 mL 0.1% 蛋白胨水。均质 $2\text{ min}\sim 3\text{ min}$,通过灭菌纱布过滤至 250 mL 的离心瓶中。 $16\text{ }000\text{g}$ 离心 15 min 。弃去上清液,用 10 mL 0.1% 的蛋白胨水悬浮沉淀。吸取 3 mL 于 100 mL Bolton 增菌肉汤中。

7.4 液态蛋黄或全蛋混合物

将同一批两个样本混合制成混合样,每个样本 25 g 。称取 25 g 混合样品于 100 mL Bolton 增菌肉汤中。轻轻搅拌之后,再移取 25 mL 于另一瓶 100 mL Bolton 增菌肉汤中。分别制成两种稀释度的增菌液。

7.5 贝类(已去壳)

取 $100\text{ g}\sim 200\text{ g}$ 样品,放入灭菌搅拌机或其他合适的灭菌容器中混匀。将 25 g 样品混合物放入 500 mL 培养瓶中,加入 225 mL Bolton 增菌肉汤,充分混匀。取混匀后液体 25 mL 至另一瓶 225 mL Bolton 增菌肉汤中。制成 $1:10$ 和 $1:100$ 的增菌液。

在厌氧罐培养时,培养瓶或培养袋中增菌液的量应减少到 125 mL ,宜将增菌液分装成两份。

7.6 水

取 $2\text{ L}\sim 4\text{ L}$ 水样,若样品为添加过次氯酸钠等消毒剂的含氯水样时,应于每 1 L 水样加入 5 mL 1 mol/L 灭菌的硫代硫酸钠。

根据样品量选择各种直径大小的 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤样品。过滤后滤膜放入 100 mL Bolton 增菌肉汤中,操作过程中应保持滤膜湿润。

7.7 擦拭药签

将药签放入装有 10 mL Bolton 增菌肉汤的 50 mL 锥形烧瓶中,折断并弃去接触手棍子部分。重新盖上盖子,不要盖紧。将烧瓶放入厌氧罐中。

7.8 牛奶、冷冻乳制品

7.8.1 鲜牛奶

样品收集时,如果样品 pH 低于 7.6 ,应用灭菌的碳酸钠(Na_2CO_3)溶液调节样品 pH 到 7.2 ± 0.2 ,并立即送往实验室,再测试 pH ,调节到 7.5 ± 0.2 。称取 50 g 样品, $20\text{ }000\text{g}$ 离心 20 min ,弃上清液。用 10 mL Bolton 增菌肉汤溶解沉淀,再吸取至 90 mL Bolton 增菌肉汤中。

7.8.2 冰淇淋和其他乳制品

冰淇淋以及其他冷冻乳制品应先融化,称量时尽可能除去糖块或其他固体成分,同 7.8.1 步骤。

7.8.3 奶酪

称取 50 g 放入具过滤衬套的均质袋中,加入 50 mL 0.1% 蛋白胨水,均质器 8 000 g~10 000 g 均质 30 s。移开过滤衬套,排出液体 5 s。将滤液进行离心,如同 7.8.1 中鲜牛奶的离心操作,将沉淀溶于 Bolton 增菌肉汤中。

7.9 其他食品

称取 25 g 样品(如果是水果或蔬菜取 50 g)置于具过滤衬套的无菌均质袋中,再添入 100 mL Bolton 增菌肉汤,轻柔振荡 5 min 后,静置 5 min。取出过滤衬套,滤干内容物,滤液放入培养袋或培养瓶中。若无过滤衬套,可用灭菌纱布过滤。

7.10 前增菌和增菌

7.10.1 增菌条件

所有增菌过程均应在微需氧条件下进行。

7.10.2 前增菌

7.10.2.1 4 h 前增菌

对生产或加工时间为 10 d 之内的样品,或为乳制品的样品,将其放入 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中前增菌 4 h。

7.10.2.2 5 h 前增菌

对冷冻时间超过 10 d 的样品以及为水样和贝壳类的样品,使用 5 h 前增菌法。 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h 后转移到 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h。

7.10.3 增菌

前增菌后,再放入 $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养,培养 24 h~48 h,贝壳样品要培养 48 h。如需同时检测胎儿弯曲菌,制样时可设置重复,增菌温度保持在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,培养 52 h。

8 分离、鉴定及确证

8.1 分离培养

所有培养过程均应在微需氧条件下进行,同时设置阳性对照菌株和阴性对照菌株作为质控菌株。

分别挑取培养 24 h 和 48 h 的增菌液划线接种于表面晾干的改良 CCDA 或改良 Skirrow 氏平板上,最好同时接种两种平板;同时将增菌液使用 0.1% 的蛋白胨水稀释 100 倍,划线接种于上述平板培养基中。贝类、鸡蛋或者其他的已经进行了稀释增菌的培养液则直接接种增菌液。

接种后的平板倒置于 $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h。24 h 观察生长情况。若检验胎儿弯曲菌应于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h~72 h。

弯曲菌菌落在改良 CCDA 平板上呈现两种形态:

- 第一种:弯曲菌菌落为粘稠、突起、边缘光滑、较规则的白色圆形菌落;
- 第二种:弯曲菌菌落为粘稠、扁平透明、沿接种线向外扩散、边缘光滑、不规则的透明至半透明或白色菌落。

在 Skirrow 氏平板上生长呈现透明、白色或者棕黄色(可能呈浅红色)突起,边缘不整齐,有时沿接种线向外扩散的菌落。

每个平板选取 3 个~5 个生长典型或疑似菌落制湿片观察。

8.2 初步鉴定

8.2.1 形态观察

对生长典型或疑似菌落涂湿片进行形态观察并重新接种哥伦比亚血琼脂平板微需氧环境下 $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (胎儿弯曲菌 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) 培养 24 h~48 h,进行氧化酶试验、革兰氏染色试验等其他生化试验。

可使用暗视野显微镜、相差显微镜进行观察,也可将湿片进行结晶紫染色后使用光学显微镜进行观

察。弯曲菌的细胞应为弯曲状、长 1.5 mm~5 mm、常连成长短不一的类似锯齿状的链状结构。大部分刚从平板上接种的菌细胞具有运动性,并且呈螺旋状运动,不过也有将近 10% 的菌不具有运动性。较老的菌落细胞运动性降低并呈球状。

8.2.2 氧化酶试验

用铂丝接种环选取血平板上生长的菌落进行氧化酶试验,所有的弯曲菌均应呈现氧化酶阳性结果。

注:改良 CCDA 平板上生长的弯曲菌菌落进行氧化酶试验,可能会出现假阴性结果。

8.2.3 革兰氏染色

挑取血平板上的生长菌落进行革兰氏染色,使用 0.5% 石炭酸品红作为复染剂。弯曲菌为革兰氏染色阴性菌。

8.3 确定鉴定

8.3.1 过氧化氢酶试验

挑取血平板上的生长菌落于洁净载玻片上,滴加一滴 3% 的过氧化氢溶液,30 s 内产生气泡者为阳性。

注意:挑取菌落时不要挑到培养基琼脂。

8.3.2 三糖铁(TSI)高层斜面反应

挑取血平板上菌落 3 个~5 个穿刺并划线接种 TSI 高层斜面。微需氧环境下 35 °C~37 °C 培养 3 d。80% 的大肠弯曲菌和少量的红嘴鸥弯曲菌在斜面下层产硫化氢;空肠弯曲菌不产硫化氢。所有的弯曲菌均产碱。

8.3.3 应用稀释培养物进行的试验

8.3.3.1 试验前准备

挑取生长菌落接种至 5 mL 0.1% 的蛋白胨水混合均匀,调节菌浓度至 1 个麦氏单位标准浊度。使用该菌液进行以下 8.3.3.2~8.3.3.7 试验。

8.3.3.2 温度耐受试验

划线接种稀释培养物至血平板上,接种三个平板。于 25 °C、35 °C~37 °C 和 42 °C 下微需氧环境培养 3 d。有菌落生长表明耐温阳性。

8.3.3.3 改良半固体培养基中生长情况

在添加有以下生化试剂培养基表面接种 0.1 mL 菌悬液,微需氧下 36 °C±1 °C 培养 3 d,硝酸盐培养基培养 5 d。若有生长,应是仅在培养基表面以下形成狭窄条带状生长,反应情况如下:

- 1% 甘氨酸:有菌落生长为阳性;
- 3.5% 氯化钠:有菌落生长为阳性;
- 半胱氨酸产硫化氢:接种半胱氨酸培养基,并在培养基上方悬挂一根乙酸铅条,不要盖紧盖子,乙酸铅条若出现黑色或微弱的黑色为阳性反应;
- 硝酸盐还原试验:培养 5 d 后向培养基中加入硝酸盐试剂 A 和 B,呈现红色为阳性反应。

8.3.3.4 抗生素抑制试验

将已制备的菌液涂布接种哥伦比亚血琼脂平板。并在同一平板中不同位置(分两边)各放置一片分别浸有萘啶酮酸和先锋霉素溶液的 5 mm~6 mm 直径的药纸片。微需氧环境下 36 °C±1 °C 培养 24 h~48 h。纸片边缘只要未有菌落生长,说明对该抗生素敏感。

8.3.3.5 葡萄糖利用试验

挑取菌液穿刺接种含有 O-F 培养基的小管中,接种两管,一管为添加有葡萄糖的培养基,另一管为只有基础成分的培养基。微需氧环境下 35 °C~37 °C 培养 4 d。弯曲菌不利用葡萄糖或者其他糖,管内应无变化。

8.3.3.6 1% 马尿酸钠水解试验

平板上用接种环挑取较多的菌落置含 0.4 mL 1% 马尿酸钠盐的试管中,注意不要挑取到琼脂。摇

动混匀。37℃水浴2 h或37℃温箱4 h。在液面小心加入0.2 mL水合茚三酮溶液。不要摇动。37℃水浴或37℃温箱10 min,观察结果:深紫色为阳性;淡紫色或无颜色变化为阴性。

8.3.3.7 API 鉴定试验

使用API鉴定试验可代替8.3.3.3c)~8.3.3.6试验,进行弯曲菌的检测。

9 结果报告

9.1 弯曲菌生化鉴别见表1。

表1 弯曲菌属各个种的生化性状

种 类	空肠 弯曲菌	空肠 弯曲菌 德莱亚种	大肠 弯曲菌	红嘴鸥 弯曲菌	胎儿 弯曲菌 胎儿亚种	豚肠 弯曲菌	乌普萨拉 弯曲菌
25℃生长	—	±	—	—	+	D	—
35℃~37℃生长	+	+	+	+	+	+	+
42℃生长	+	±	+	+	D	+	+
硝酸盐还原	+	—	+	+	+	+	+
3.5%氯化钠	—	—	—	—	—	—	—
H ₂ S试验(乙酸铅试剂条)	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S, TSI斜面	—	—	D	—	—	+ ^a	—
过氧化氢酶试验	+	+	+	+	+	+	—
氧化酶试验	+	+	+	+	+	+	+
运动性(涂片法)	+(81%)	+	+	+	+	+	+
1%甘氨酸生长试验	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖利用试验	—	—	—	—	—	—	—
马尿酸钠水解试验	+	+	—	—	—	—	—
抗萘啶酮酸盐试验	S ^b	S	S	R	R	R	S
先锋霉素抗性试验	R	R	R	R	S ^c	S	S
注:“+”,90%或者更多的菌落呈阳性反应;“—”,90%或者更多的菌落呈阴性反应;“D”,11%~89%菌落呈阳性反应;“R”,具有抗性;“S”,具敏感性。							
^a 在新鲜配制的TSI斜面(3 d)上产生少量的硫化氢。							
^b 有报道空肠弯曲菌对萘啶酮酸具抵抗性。							
^c 有报道胎儿弯曲菌胎儿亚种对先锋霉素具抵抗性。							

9.2 通过生化鉴定符合×××弯曲菌的生理及生化特征的,报告阳性结果:检出×××弯曲菌/××g(mL)(针对不同样品取样量)。

9.3 通过生化鉴定不符合×××弯曲菌的生理及生化特征的,报告阴性结果:未检出×××弯曲菌/××g(mL)(针对不同样品取样量)。

10 菌种保存

10.1 如果需要经常使用,可将弯曲菌接种半固体储存培养基中4℃保存。长期保存则使用冷冻培养基,−70℃储存;也可使用冻干法对菌种进行长期保存。

10.2 半固体储存培养基保存:接种菌株于半固体培养基表面,稍微松开试管盖子,微需氧条件下培养

24 h 后,旋紧盖子,避免光线直接照射,4 ℃ 保存。菌株可保存 2 个月,此后再进行转接。

10.3 冷冻培养基保存:将弯曲菌接种于不含抗生素的 Skirrow 氏培养基上,42 ℃ 微需氧中培养 24 h,胎儿弯曲菌在 37 ℃ 培养 48 h。每个平板倒入 1 mL 冷冻培养基,轻轻刮下菌苔,所得菌悬液转移到灭菌试管,−70 ℃ 保存。

11 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全,应由具备资格的工作人员检测致病菌,所有培养物应小心处置,并按 GB 19489 中的有关规定执行。

12 废弃物处理和防治污染措施

检测过程中的废弃物应经 121 ℃ 高压灭菌处理至少 30 min 后再弃置。

www.kinghunt.cn
凯恒生物

附录 A

(规范性附录)

弯曲菌鉴定用试剂、培养基及配制方法

A.1 Bolton 增菌培养基

A.1.1 基础增菌肉汤培养基及配制

A.1.1.1 培养基

肉胨	10.0 g
水解乳蛋白	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
氯化血红素	0.01 g
丙酮酸钠	0.5 g
α -酮戊二酸	1.0 g
重亚硫酸钠	0.5 g
无水碳酸钠	0.6 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.1.2 配制

将培养基充分溶解,调 pH 值至 7.4 ± 0.2 ,分装至螺口瓶中 121°C 灭菌 15 min。待培养基冷却后盖紧瓶盖。在使用前添加 50 mL 马(羊)血和 4 mL A.1.3 中的四种抗生素溶液(每种抗生素分开配制)。

注:可使用两性霉素 B 替代放线菌酮。

培养基干粉存放于盖紧盖子的容器内,并放置于阴凉干燥处,以防止氧气的进入和过氧化物的形成,能抑制微需氧微生物的生长。配制好的培养基保存期为 1 个月。

A.1.2 冻融去纤维马(羊)血配制

新鲜去纤维血冷冻保存。轻轻的再悬浮血细胞,无菌取 40 mL 至灭菌的一次性 50 mL 离心管中。 -20°C 保存,反复冻融 3 次即可使用。保存期不应超过 6 个月。溶解后没有使用过的血可以进行反复冻融。

A.1.3 弯曲菌增菌培养肉汤添加剂配制

A.1.3.1 头孢菌素钠

将 0.5 g 头孢菌素钠充分溶解于灭菌蒸馏水中定容至 100 mL,使用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的过滤器过滤除菌。使用无菌的塑料管或塑料瓶保存,每 1 L 培养基中添加 4 mL 抗生素溶液,其终浓度为 20 mg/L。各种温度条件下的保存期为:

- 4°C : 5 d;
- -20°C : 14 d;
- -70°C : 5 个月。

A.1.3.2 甲氧苄氨嘧啶乳酸盐

100 mL 蒸馏水中溶解 0.5 g 甲氧苄氨嘧啶乳酸盐,过滤除菌。 4°C 保存期为 1 年。每 1 L 培养基中添加 4 mL 抗生素溶液,其终浓度为 20 mg/L。

或者可使用甲氧苄氨嘧啶盐酸盐替代:

在 0.05 mol/L HCl 中加入 0.5 g 甲氧苄氨嘧啶 50°C 下搅拌溶解,用蒸馏水定容至 100 mL。每

1 L培养基中添加4 mL抗生素溶液,其终浓度为20 mg/L。

A.1.3.3 万古霉素

0.5 g溶解到100 mL蒸馏水中过滤除菌,4℃保存期为2个月。每1 L培养基中添加4 mL抗生素溶液,其终浓度为20 mg/L。

A.1.3.4 放线菌酮

1.25 g溶解至20 mL~30 mL无水乙醇中并加水定容至100 mL,过滤除菌。4℃保存期为1年。每1 L培养基中添加4 mL抗生素溶液,其终浓度为50 mg/L。可用两性霉素B代替放线菌酮。

A.1.3.5 配制要求

每种添加成分应独立配制。头孢菌素钠、万古霉素保存时间较短,应在使用前适量配制。少量体积的溶液可使用0.22 μm滤膜的注射器式过滤器进行过滤除菌。

A.1.4 0.1%蛋白胨水培养基及配制

A.1.4.1 培养基

蛋白胨	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.4.2 配制

溶解蛋白胨于蒸馏水中,校正pH至7.0,121℃灭菌20 min。

A.2 分离培养基

A.2.1 改良CCDA培养基及配制

A.2.1.1 培养基

牛肉浸膏	10.0 g
动物组织酶解物	10.0 g
氯化钠	5.0 g
细菌碳	4.0 g
水解酪蛋白	3.0 g
脱氧胆酸钠	1.0 g
硫酸亚铁	0.25 g
丙酮酸钠	0.25 g
琼脂粉	18.0 g
酵母膏	2.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.1.2 配制

调pH7.4±0.2,121℃高压灭菌20 min。冷却培养基后添加以下抗生素:

- 头孢菌素钠:称取0.8 g溶解至100 mL蒸馏水中过滤除菌。每1 L琼脂培养基中添加4 mL抗生素溶液,其终浓度为32 mg/L。
- 利福平:称取0.25 g缓慢加入到60.0 mL~80.0 mL无水乙醇中,振荡使其充分溶解后蒸馏水定容至100.0 mL,-20℃保存期为1年。每1 L培养基中添加4.0 mL抗生素溶液,其终浓度为10.0 mg/L。
- 两性霉素B:称取0.05 g溶解至100 mL蒸馏水中过滤除菌;-20℃保存期为1年。每1 L培养基中添加4 mL抗生素溶液,其终浓度为2.0 mg/L。

A.2.2 改良Skirrow氏培养基及配制

A.2.2.1 培养基及配制

蛋白胨	15.0 g
-----	--------

胰蛋白酶	2.5 g
酵母浸膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
甲氧苄氨嘧啶	5.0 mg
万古霉素	10.0 mg
多粘菌素 B	2 500.0(国际单位)
无菌冻融去纤维羊(马)血	70.0 mL

A.2.2.2 配制

除甲氧苄氨嘧啶、抗生素和无菌冻融去纤维羊(马)血之外,其他成分混合溶解,调 pH 值至 7.4 ± 0.2 ,将培养基充分溶解。分装至螺口瓶中 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。临用前加入除菌的甲氧苄氨嘧啶、抗生素和无菌冻融去纤维羊(马)血,摇匀倾注平板备用。

A.3 哥伦比亚血琼脂平板

A.3.1 基本成分

动物组织酶消化物	23.0 g
淀粉	1.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂粉	16.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.3.2 配制

加热溶解,调 $\text{pH}7.2 \pm 0.2$,分装, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min。培养基冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右后,每 1 000.0 mL 基本成分中加入除菌去纤维绵羊血 50.0 mL,混匀。每平板倒入 15.0 mL。

在使用前,使平板表面干燥,直至平板表面没有可见的水份为止。平板在室温下可最多保存 4 h,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存期为 7 d。

A.4 用于生化鉴定的半固体培养基

A.4.1 基础培养基成分

无血和抗生素的弯曲菌增菌肉汤成分(Bolton)	27.6 g
琼脂	1.8 g
蒸馏水	1 000.0 mL

生化试剂:

- 中性红溶液(0.2%):溶解 0.2 g 中性红于 10 mL 乙醇;
- 硝酸钾(1%):于无中性红的 250 mL 半固体培养基中加入 2.5 g;
- 甘氨酸(1%):于含有中性红的 250 mL 半固体培养基中加入 2.5 g;
- 氯化钠(3.5%):于含有中性红的 250 mL 半固体培养基中加入 7.5 g;
- 半胱氨酸-HCl(0.02%):于含有中性红的 250 mL 半固体培养基中加入 0.05 g。

A.4.2 配制

煮沸基础培养基,250.0 mL 分装成 4 份。3 份培养基中加入 2.5 mL 中性红,再加入甘氨酸,氯化钠和半胱氨酸-HCl。没有加入中性红的培养基中加入硝酸钾。每份培养基调节 pH 为 7.4 ± 0.2 。分装带螺旋帽的试管,每支 10.0 mL。 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌 20 min。

A.5 三糖铁琼脂(TSI)

A.5.1 基础培养基成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
氯化钠	5.0 g
六水合硫酸亚铁铵	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	12.0 g
酚红	0.025 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.5.2 配制

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中,调 pH7.4。加入琼脂,加热煮沸,以溶化琼脂。加入 0.2% 酚红水溶液 12.5 mL,摇匀。分装试管,装量宜多些,以便得到较高的底层。121 °C 高压灭菌 15 min,放置高层斜面备用。

A.6 OF 葡萄糖利用培养基及配制

A.6.1 培养基

蛋白胨	2.7 g
氯化钠	5.0 g
0.2% 溴麝香酚蓝	0.03 g
琼脂	3 g
磷酸二氢钾	0.3 g
葡萄糖	10.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.6.2 配制

以上成分除糖外,溶解调 pH7.0,121 °C 高温灭菌 20 min 后备用。

A.7 半固体储存培养基

A.7.1 培养基

弯曲菌增菌肉汤(Bolton)	27.6 g
琼脂	1.8 g
柠檬酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.7.2 配制

调节 pH 为 7.4 ± 0.2 ,煮沸,分装具螺旋帽试管,每支 10.0 mL。121 °C 灭菌 15 min。储存过程中,螺旋帽要旋紧,不应添加抗生素和马血。

A.8 冷冻培养基

灭菌 Bolton 基础肉汤	9.5 mL
----------------	--------

胎牛血清	1.0 mL(0.22 μ m 滤膜过滤)
10%甘氨酸	1.0 mL(0.22 μ m 滤膜过滤)

使用前混合均匀。

A.9 马尿酸钠水解试验试剂

A.9.1 1%马尿酸钠

马尿酸钠	1.0 g
蒸馏水	100.0 mL

A.9.2 水合茚三酮

茚三酮	3.5 g
丙酮	50.0 mL
丁酮	50 mL

A.10 氧化酶试验试剂

A.10.1 1%盐酸二甲基对苯二胺溶液:少量新鲜配制,于冰箱内避光保存。

A.10.2 1% α -萘酚-乙醇溶液。

A.11 革兰氏染色试剂

A.11.1 结晶紫染色液

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	30.0 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

将结晶紫溶解于乙醇中,后与草酸铵溶液混合。

A.11.2 革兰氏碘液

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL。

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,待完全溶解后,加蒸馏水至 300.0 mL。

A.11.3 沙黄复染液

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

将沙黄溶解于乙醇中,用蒸馏水稀释。

A.12 硝酸盐试剂及配制

A.12.1 试剂

试剂 A:0.6%二甲基- α -萘胺。

试剂 B:0.8%对氨基苯磺酸。

A.12.2 配制

将试剂 A 和 B 溶于 5 mol/L 乙酸中。

参 考 文 献

- [1] ISO 10272-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for detection and enumeration of *campylobacter* spp. —Part 1:Detection method
- [2] FDA. Bacteriological Analytical Manual Online Chapter 7;*Campylobacter* [S],2001.
-

www.kinghunt.cn
凯恒生物

www.kinghunt.cn
凯恒生物

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
进出口食品中弯曲菌的检测方法
SN/T 0175—2010

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

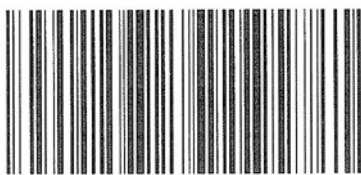
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 25 千字
2010年5月第一版 2010年5月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066 · 2-20832



SN/T 0175-2010