

中华人民共和国国家标准

GB 4789.5—2012

食品安全国家标准

食品微生物学检验 志贺氏菌检验

2012-05-17 发布

2012-07-17 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替GB/T 4789.5-2003《食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.5-2003 相比，主要变化如下：

- 修改了标准名称；
- 修改了培养基和试剂；
- 修改了操作步骤中增菌部分和生化试验及附加生化试验部分；
- 修改了表2；
- 修改了表4。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 志贺氏菌检验

1 范围

本标准规定了食品中志贺氏菌(*Shigella*)的检验方法。

本标准适用于食品中志贺氏菌的检验。

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:

- a) 恒温培养箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- b) 冰箱: $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- c) 膜过滤系统;
- d) 厌氧培养装置: $41.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- e) 电子天平: 感量 0.1 g ;
- f) 显微镜: $10\times\sim 100\times$;
- g) 均质器;
- h) 振荡器;
- i) 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;
- j) 无菌均质杯或无菌均质袋: 容量 500 mL ;
- k) 无菌培养皿: 直径 90 mm ;
- l) pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸;
- m) 全自动微生物生化鉴定系统。

3 培养基和试剂

3.1 志贺氏菌增菌肉汤-新生霉素: 见附录 A 中 A.1。

3.2 麦康凯 (MAC) 琼脂: 见附录 A 中 A.2。

3.3 木糖赖氨酸脱氧胆酸盐 (XLD) 琼脂: 见附录 A 中 A.3。

3.4 志贺氏菌显色培养基。

3.5 三糖铁 (TSI) 琼脂: 见附录 A 中 A.4。

3.6 营养琼脂斜面: 见附录 A 中 A.5。

3.7 半固体琼脂: 见附录 A 中 A.6。

3.8 葡萄糖铵培养基: 见附录 A 中 A.7。

3.9 尿素琼脂: 见附录 A 中 A.8。

- 3.10 β -半乳糖苷酶培养基：见附录 A 中 A.9。
- 3.11 氨基酸脱羧酶试验培养基：见附录 A 中 A.10。
- 3.12 糖发酵管：见附录 A 中 A.11。
- 3.13 西蒙氏柠檬酸盐培养基：见附录 A 中 A.12。
- 3.14 粘液酸盐培养基：见附录 A 中 A.13。
- 3.15 蛋白胨水、靛基质试剂：见附录 A 中 A.14。
- 3.16 志贺氏菌属诊断血清。
- 3.17 生化鉴定试剂盒。

4 检验程序

志贺氏菌检验程序见图 1。

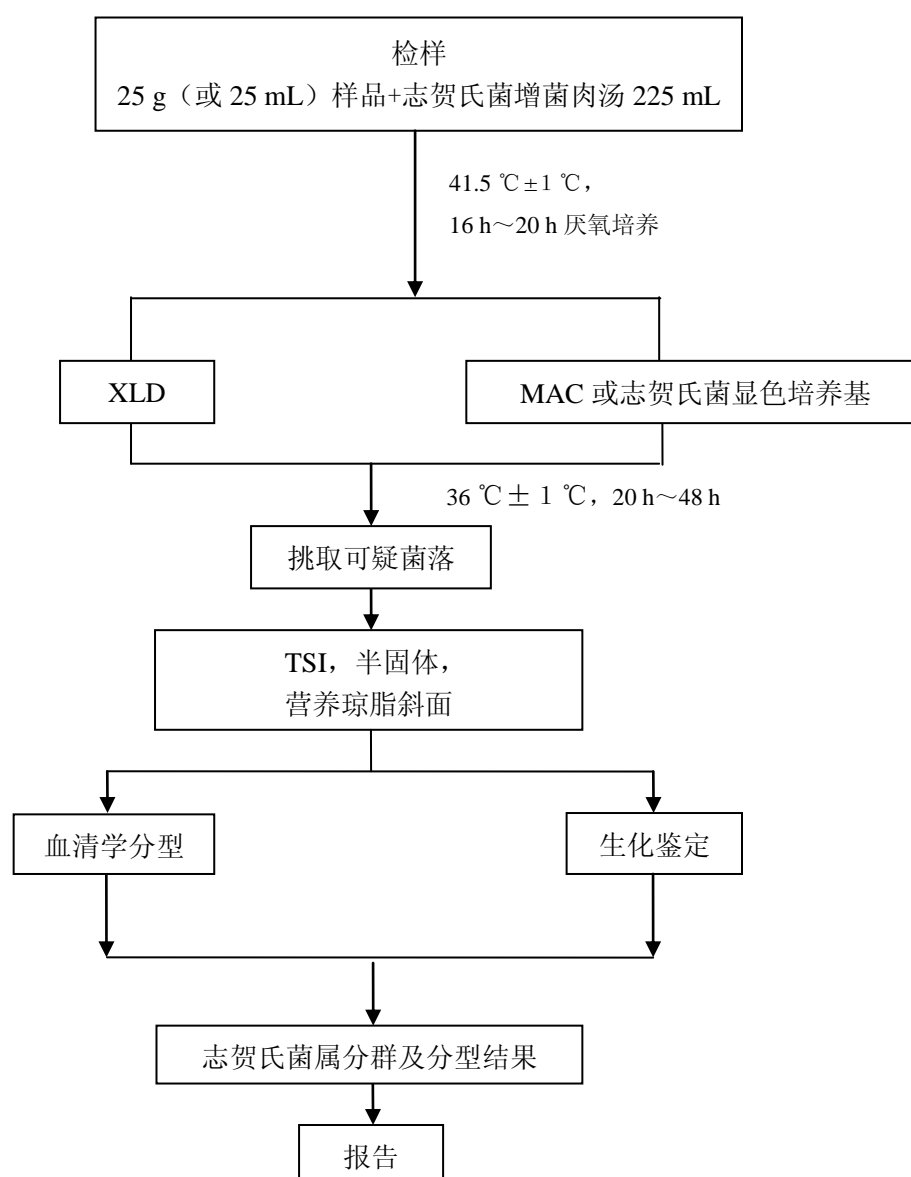


图 1 志贺氏菌检验程序

5 操作步骤

5.1 增菌

以无菌操作取检样 25 g (mL)，加入装有灭菌 225 mL 志贺氏菌增菌肉汤的均质杯，用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质；或加入装有 225 mL 志贺氏菌增菌肉汤的均质袋中，用拍击式均质器连续均质 1 min~2 min，液体样品振荡混匀即可。于 41.5 °C ± 1 °C，厌氧培养 16 h~20 h。

5.2 分离

取增菌后的志贺氏增菌液分别划线接种于 XLD 琼脂平板和 MAC 琼脂平板或志贺氏菌显色培养基平板上，于 36 °C ± 1 °C 培养 20 h~24 h，观察各个平板上生长的菌落形态。宋内氏志贺氏菌的单个菌落直径大于其他志贺氏菌。若出现的菌落不典型或菌落较小不易观察，则继续培养至 48 h 再进行观察。志贺氏菌在不同选择性琼脂平板上的菌落特征见表 1。

表 1 志贺氏菌在不同选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	志贺氏菌的菌落特征
MAC 琼脂	无色至浅粉红色，半透明、光滑、湿润、圆形、边缘整齐或不齐
XLD 琼脂	粉红色至无色，半透明、光滑、湿润、圆形、边缘整齐或不齐
志贺氏菌显色培养基	按照显色培养基的说明进行判定

5.3 初步生化试验

5.3.1 自选择性琼脂平板上分别挑取2个以上典型或可疑菌落，分别接种TSI、半固体和营养琼脂斜面各一管，置36℃±1℃培养20h~24h，分别观察结果。

5.3.2 凡是三糖铁琼脂中斜面产碱、底层产酸（发酵葡萄糖，不发酵乳糖，蔗糖）、不产气（福氏志贺氏菌6型可产生少量气体）、不产硫化氢、半固体管中无动力的菌株，挑取其5.3.1中已培养的营养琼脂斜面上生长的菌苔，进行生化试验和血清学分型。

5.4 生化试验及附加生化试验

5.4.1 生化试验

用5.3.1中已培养的营养琼脂斜面上生长的菌苔，进行生化试验，即β-半乳糖苷酶、尿素、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶以及水杨苷和七叶苷的分解试验。除宋内氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌13型的鸟氨酸阳性；宋内氏菌和痢疾志贺氏菌1型，鲍氏志贺氏菌13型的β-半乳糖苷酶为阳性以外，其余生化试验志贺氏菌属的培养物均为阴性结果。另外由于福氏志贺氏菌6型的生化特性和痢疾志贺氏菌或鲍氏志贺氏菌相似，必要时还需加做靛基质、甘露醇、棉子糖、甘油试验，也可做革兰氏染色检查和氧化酶试验，应为氧化酶阴性的革兰氏阴性杆菌。生化反应不符合的菌株，即使能与某种志贺氏菌分型血清发生凝集，仍不得判定为志贺氏菌属。志贺氏菌属生化特性见表2。

表 2 志贺氏菌属四个群的生化特征

生化反应	A 群：痢疾志贺氏菌	B 群：福氏志贺氏菌	C 群：鲍氏志贺氏菌	D 群：宋内氏志贺氏菌
β-半乳糖苷酶	— ^a	—	— ^a	+
尿素	—	—	—	—
赖氨酸脱羧酶	—	—	—	—
鸟氨酸脱羧酶	—	—	— ^b	+
水杨苷	—	—	—	—
七叶苷	—	—	—	—
靛基质	-/+	(+)	-/+	—
甘露醇	—	+ ^c	+	+
棉子糖	—	+	—	+
甘油	(+)	—	(+)	d

注：+表示阳性；-表示阴性；-/+表示多数阴性；+/-表示多数阳性；(+)表示迟缓阳性；d表示有不同生化型。

^a 痢疾志贺1型和鲍氏13型为阳性。

^b 鲍氏13型为鸟氨酸阳性。

^c 福氏4型和6型常见甘露醇阴性变种。

5.4.2 附加生化实验

由于某些不活泼的大肠埃希氏菌（anaerogenic E.coli）、A-D（Alkaescens-D isparbiotypes 碱性-异型）菌的部分生化特征与志贺氏菌相似，并能与某种志贺氏菌分型血清发生凝集；因此前面生化实验符合志贺氏菌属生化特性的培养物还需另加葡萄糖胺、西蒙氏柠檬酸盐、粘液酸盐试验（36℃培养24h~48h）。志贺氏菌属和不活泼大肠埃希氏菌、A-D菌的生化特性区别见表3。

表 3 志贺氏菌属和不活泼大肠埃希氏菌、A-D 菌的生化特性区别

生化反应	A 群：痢疾志贺氏菌	B 群：福氏志贺氏菌	C 群：鲍氏志贺氏菌	D 群：宋内氏志贺氏菌	大肠埃希氏菌	A-D 菌
葡萄糖铵	—	—	—	—	+	+
西蒙氏柠檬酸盐	—	—	—	—	d	d
粘液酸盐	—	—	—	d	+	d

注 1：+表示阳性；-表示阴性；d 表示有不同生化型。

注 2：在葡萄糖铵、西蒙氏柠檬酸盐、粘液酸盐试验三项反应中志贺氏菌一般为阴性，而不活泼的大肠埃希氏菌、A-D（碱性-异型）菌至少有一项反应为阳性。

5.4.3 如选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统，可根据5.3.2的初步判断结果，用5.3.1中已培养的营养琼脂斜面上生长的菌苔，使用生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。

5.5 血清学鉴定

5.5.1 抗原的准备

志贺氏菌属没有动力，所以没有鞭毛抗原。志贺氏菌属主要有菌体（O）抗原。菌体 O 抗原又可分为型和群的特异性抗原。

一般采用 1.2%~1.5% 琼脂培养物作为玻片凝集试验用的抗原。

注 1：一些志贺氏菌如果因为 K 抗原的存在而不出现凝集反应时，可挑取菌苔于 1 mL 生理盐水做成浓菌液，100 °C 煮沸 15 min~60 min 去除 K 抗原后再检查。

注 2：D 群志贺氏菌既可能是光滑型菌株也可能是粗糙型菌株，与其他志贺氏菌群抗原不存在交叉反应。与肠杆菌科不同，宋内氏志贺氏菌粗糙型菌株不一定会自凝。宋内氏志贺氏菌没有 K 抗原。

5.5.2 凝集反应

在玻片上划出 2 个约 1cm×2cm 的区域，挑取一环待测菌，各放 1/2 环于玻片上的每一区域上部，在其中一个区域下部加 1 滴抗血清，在另一区域下部加入 1 滴生理盐水，作为对照。再用无菌的接种环或针分别将两个区域内的菌落研成乳状液。将玻片倾斜摇动混合 1 min，并对着黑色背景进行观察，如果抗血清中出现凝结成块的颗粒，而且生理盐水中没有发生自凝现象，那么凝集反应为阳性。如果生理盐水中出现凝集，视作为自凝。这时，应挑取同一培养基上的其他菌落继续进行试验。

如果待测菌的生化特征符合志贺氏菌属生化特征，而其血清学试验为阴性的话，则按 5.5.1 注 1 进行试验。

5.5.3 血清学分型（选做项目）

先用四种志贺氏菌多价血清检查，如果呈现凝集，则再用相应各群多价血清分别试验。先用 B 群福氏志贺氏菌多价血清进行实验，如呈现凝集，再用其群和型因子血清分别检查。如果 B 群多价血清不凝集，则用 D 群宋内氏志贺氏菌血清进行实验，如呈现凝集，则用其 I 相和 II 相血清检查；如果 B、D 群多价血清都不凝集，则用 A 群痢疾志贺氏菌多价血清及 1~12 各型因子血清检查，如果上述三种多价血清都不凝集，可用 C 群鲍氏志贺氏菌多价检查，并进一步用 1~18 各型因子血清检查。福氏志贺氏菌各型和亚型的型抗原和群抗原鉴别见表 4。

表 4 福氏志贺氏菌各型和亚型的型抗原和群抗原的鉴别表

型和亚型	型抗原	群抗原	在群因子血清中的凝集		
			3,4	6	7,8
1a	I	4	+	-	-
1b	I	(4), 6	(+)	+	-
2a	II	3,4	+	-	-
2b	II	7,8	-	-	+

表 4 (续) 福氏志贺氏菌各型和亚型的型抗原和群抗原的鉴别表

型和亚型	型抗原	群抗原	在群因子血清中的凝集		
			3,4	6	7,8
3a	III	(3, 4) ,6,7,8	(+)	+	+
3b	III	(3,4) ,6	(+)	+	-
4a	IV	3,4	+	-	-
4b	IV	6	-	+	-
4c	IV	7,8	-	-	+
5a	V	(3,4)	(+)	-	-
5b	V	7,8	-	-	+
6	VI	4	+	-	-
X	-	7,8	-	-	+
Y	-	3,4	+	-	-

注：+表示凝集；-表示不凝集；（）表示有或无。

5.6 结果报告

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志贺氏菌。

附录A

培养基和试剂

A.1 志贺氏菌增菌肉汤-新生霉素 (*Shigella* broth)

A.1.1 志贺氏菌增菌肉汤

A.1.1.1 成分

胰蛋白胨	20.0 g
葡萄糖	1.0 g
磷酸氢二钾	2.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
氯化钠	5.0 g
吐温 80 (Tween 80)	1.5 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.1.2 制法

将以上成分混合加热溶解,冷却至 25 °C 左右校正 pH 至 7.0±0.2,分装适当的容器,121 °C 灭菌 15 min。取出后冷却至 50 °C~55 °C,加入除菌过滤的新生霉素溶液 (0.5 µg/mL),分装 225 mL 备用。

注:如不立即使用,在 2 °C~8 °C 条件下可储存一个月。

A.1.2 新生霉素溶液

A.1.2.1 成分

新生霉素	25.0 mg
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2.2 制法

将新生霉素溶解于蒸馏水中,用 0.22 µm 过滤膜除菌,如不立即使用,在 2 °C~8 °C 条件下可储存一个月。

A.1.3 临用时每 225 mL 志贺氏菌增菌肉汤 (A.1.1) 加入 5 mL 新生霉素溶液 (A.1.2),混匀。

A.2 麦康凯 (MAC) 琼脂

A.2.1 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	1 000.0 mL

A.2.2 制法

将以上成分混合加热溶解,冷却至 25 °C 左右校正 pH 至 7.2±0.2,分装,121 °C 高压灭菌 15 min。冷却至 45 °C~50 °C,倾注平板。

注:如不立即使用,在 2 °C~8 °C 条件下可储存二周。

A.3 木糖赖氨酸脱氧胆盐 (XLD) 琼脂

A.3.1 成分

酵母膏	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	1.0 g
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	6.8 g
柠檬酸铁铵	0.8 g
酚红	0.08 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 3.2 制法

除酚红和琼脂外，将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中，煮沸溶解，校正 pH 至 7.4 ± 0.2 。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中，煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后，再加入指示剂，待冷至 $50\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倾注平皿。

注：本培养基不需要高压灭菌，在制备过程中不宜过分加热，避免降低其选择性，贮于室温暗处。本培养基宜于当天制备，第二天使用。使用前必须去除平板表面上的水珠，在 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度下，琼脂面向下、平板盖亦向下烘干。另外如配制好的培养基不立即使用，在 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下可储存二周。

A. 4 三糖铁（TSI）琼脂

A. 4.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁铵 $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	0.2 g
酚红	0.025 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 4.2 制法

除酚红和琼脂外，将其他成分加于 400 mL 蒸馏水中，搅拌均匀，静置约 10 min，加热使完全溶化，冷却至 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右校正 pH 至 7.4 ± 0.2 。另将琼脂加于 600 mL 蒸馏水中，静置约 10 min，加热使完全溶化。将两溶液混合均匀，加入 5% 酚红水溶液 5 mL，混匀，分装小号试管，每管约 3 mL。于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min，制成高层斜面。冷却后呈桔红色。如不立即使用，在 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下可储存一个月。

A. 5 营养琼脂斜面

A. 5.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g

蒸馏水 1 000.0 mL

A. 5.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，加入 15% 氢氧化钠溶液约 2 mL，冷却至 25 ℃ 左右校正 pH 至 7.0±0.2。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装小号试管，每管约 3 mL。于 121 ℃ 灭菌 15 min，制成斜面。

注：如不立即使用，在 2℃ ~8 ℃ 条件下可储存二周。

A. 6 半固体琼脂

A. 6.1 成分

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	0.3g~0.7g
蒸馏水	100.0 mL

A. 6.2 制法

按以上成分配好，加热溶解，并校正 pH 至 7.4±0.2，分装小试管，121 ℃ 灭菌 15 min，直立凝固备用。

A. 7 葡萄糖铵培养基

A. 7.1 成分

氯化钠	5.0 g
硫酸镁 (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.2 g
磷酸二氢铵	1.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
葡萄糖	2.0 g
琼脂	20.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝水溶液	40.0 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 7.2 制法

先将盐类和糖溶解于水内，校正 pH 至 6.8±0.2，再加琼脂加热溶解，然后加入指示剂。混合均匀后分装试管，121 ℃ 高压灭菌 15 min。制成斜面备用。

A. 7.3 试验方法

用接种针轻轻触及培养物的表面，在盐水管内做成极稀的悬液，肉眼观察不到混浊，以每一接种环内含菌数在 20~100 之间为宜。将接种环灭菌后挑取菌液接种，同时再以同法接种普通斜面一支作为对照。于 36 ℃ ±1 ℃ 培养 24 h。阳性者葡萄糖铵斜面上有正常大小的菌落生长；阴性者不生长，但在对照培养基上生长良好。如在葡萄糖铵斜面生长极微小的菌落可视为阴性结果。

注：容器使用前应用清洁液浸泡。再用清水、蒸馏水冲洗干净，并用新棉花做成棉塞，干热灭菌后使用。如果操作时不注意，有杂质污染时，易造成假阳性的结果。

A. 8 尿素琼脂

A. 8.1 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
0.4% 酚红溶液	3.0 mL

琼脂	20.0 g
20% 尿素溶液	100.0 mL
蒸馏水	900.0 mL

A. 8.2 制法

除酚红和尿素外的其他成分加热溶解，冷却至25℃左右校正pH至7.2±0.2，加入酚红指示剂，混匀，于121℃灭菌15 min。冷至约55℃，加入用0.22 μm过滤膜除菌后的20%尿素水溶液100 mL，混匀，以无菌操作分装灭菌试管，每管约3 mL~4 mL，制成斜面后放冰箱备用。

A. 8.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种，在36℃±1℃培养24 h，观察结果。尿素酶阳性者由于产碱而使培养基变为红色。

A. 9 β-半乳糖苷酶培养基

A. 9.1 液体法（ONPG法）

A. 9.1.1 成分

邻硝基苯 β-D-半乳糖苷 (ONPG)	60.0 mg
0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.5±0.2)	10.0 mL
1% 蛋白胨水 (pH7.5±0.2)	30.0 mL

A. 9.1.2 制法

将ONPG溶于缓冲液内，加入蛋白胨水，以过滤法除菌，分装于10 mm×75 mm试管内，每管0.5 mL，用橡皮塞塞紧。

A. 9.1.3 试验方法

自琼脂斜面挑取培养物一满环接种，于36℃±1℃培养1 h~3 h和24 h观察结果。如果β-D-半乳糖苷酶产生，则于1 h~3 h变黄色，如无此酶则24 h不变色。

A. 9.2 平板法（X-Gal法）

A. 9.2.1 成分

蛋白胨	20.0 g
氯化钠	3.0 g
5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(X-Gal)	200.0 mg
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 9.2.2 制法

将各成分(A.9.2.1)加热煮沸于1 L水中，冷却至25℃左右校正pH至7.2±0.2，115℃高压灭菌10 min。倾注平板避光冷藏备用。

A. 9.2.3 试验方法

挑取琼脂斜面培养物接种于平板，划线和点种均可，于36℃±1℃培养18 h~24 h观察结果。如果β-D-半乳糖苷酶产生，则平板上培养物颜色变蓝色，如无此酶则培养物为无色或不透明色，培养48 h~72 h后有部分转为淡粉红色。

A. 10 氨基酸脱羧酶试验培养基

A. 10.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
1.6% 溴甲酚紫-乙醇溶液	1.0 mL
L型或DL型赖氨酸和鸟氨酸	0.5 g/100 mL 或 1.0 g/100 mL

蒸馏水	1 000.0 mL
-----	------------

A. 10.2 制法

除氨基酸以外的成分加热溶解后，分装每瓶 100 mL，分别加入赖氨酸和鸟氨酸。L-氨基酸按 0.5% 加入，DL-氨基酸按 1% 加入，再校正 pH 至 6.8 ± 0.2 。对照培养基不加氨基酸。分装于灭菌的小试管内，每管 0.5 mL，上面滴加一层石蜡油，115 °C 高压灭菌 10 min。

A. 10.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种，于 $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ 培养 18 h~24 h，观察结果。氨基酸脱羧酶阳性者由于产碱，培养基应呈紫色。阴性者无碱性产物，但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。阴性对照管应为黄色，空白对照管为紫色。

A. 11 糖发酵管

A. 11.1 成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 11.2 制法

A. 11.2.1 葡萄糖发酵管按上述成分配好后，按 0.5% 加入葡萄糖，25 °C 左右校正 pH 至 7.4 ± 0.2 ，分装于有一个倒置小管的小试管内，121 °C 高压灭菌 15 min。

A. 11.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后，分装每瓶 100 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。另将各种糖类分别配好 10% 溶液，同时高压灭菌。将 5 mL 糖溶液加入于 100 mL 培养基内，以无菌操作分装小试管。

注：蔗糖不纯，加热后会自行水解者，应采用过滤法除菌。

A. 11.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取少量培养物接种，于 $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ 培养，一般观察 2 d~3 d。迟缓反应需观察 14 d~30 d。

A. 12 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A. 12.1 成分

氯化钠	5.0 g
硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
磷酸二氢铵	1.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
柠檬酸钠	5.0 g
琼脂	20 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	40.0 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 12.2 制法

先将盐类溶解于水内，调至 pH 6.8 ± 0.2 ，加入琼脂，加热溶化。然后加入指示剂，混合均匀后分装试管，121 °C 灭菌 15 min。制成斜面备用。

A. 12.3 试验方法

挑取少量琼脂培养物接种，于 $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ 培养 4 d，每天观察结果。阳性者斜面上有菌落生长，培养基从绿色转为蓝色。

A. 13 粘液酸盐培养基

A. 13.1 测试肉汤

A. 13. 1. 1 成分

酪蛋白胨	10.0 g
溴麝香草酚蓝溶液	0.024 g
蒸馏水	1 000.0 mL
粘液酸	10.0 g

A. 13. 1. 2 制法

慢慢加入5 N氢氧化钠以溶解粘液酸，混匀。

其余成分加热溶解，加入上述粘液酸，冷却至25℃左右校正pH至7.4±0.2，分装试管，每管约5 mL，于121℃高压灭菌10 min。

A. 13. 2 质控肉汤

A. 13. 2. 1 成分

酪蛋白胨	10.0 g
溴麝香草酚蓝溶液	0.024 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 13. 2. 2 制法

所有成分加热溶解，冷却至25℃左右校正pH至7.4±0.2，分装试管，每管约5 mL，于121℃高压灭菌10 min。

A. 13. 3 试验方法

将待测新鲜培养物接种测试肉汤（A.13.1）和质控肉汤（A.13.2），于36℃±1℃培养48 h观察结果，肉汤颜色蓝色不变则为阴性结果，黄色或稻草黄色为阳性结果。

A. 14 蛋白胨水、靛基质试剂

A. 14. 1 成分

蛋白胨(或胰蛋白胨)	20.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH7.4	

A. 14. 2 制法

按上述成分配制，分装小试管，121℃高压灭菌15 min。

注：此试剂在2℃~8℃条件下可储存一个月。

A. 14. 3 靛基质试剂

A. 14. 3. 1 柯凡克试剂：将5 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. 14. 3. 2 欧一波试剂：将1 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. 14. 4 试验方法

挑取少量培养物接种，在36℃±1℃培养1 d~2 d，必要时可培养4 d~5 d。加入柯凡克试剂约0.5 mL，轻摇试管，阳性者于试剂层呈深红色；或加入欧一波试剂约0.5 mL，沿管壁流下，覆盖于培养液表面，阳性者于液面接触处呈玫瑰红色。

注：蛋白胨中应含有丰富的色氨酸。每批蛋白胨买来后，应先用已知菌种鉴定后方可使用，此试剂在2℃~8℃条件下可储存一个月。