

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 550—2002

动物和动物产品沙门氏菌检测方法

**Defection methods of salmonella for animal
and animal products**

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

沙门氏菌是一种重要的人畜共患的肠道病原菌,也是引起食物中毒的重要病原菌,有重要的公共卫生意义。

本标准的生化初筛和签定同步进行,血清凝集试验直接使用三糖铁琼脂斜面上新鲜菌苔做抗原。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:厦门出入境检验检疫局、福建省卫生防疫站。

本标准主要起草人:李碧萍、孙福泉、谢一俊、林炳玲。

动物和动物产品沙门氏菌检测方法

1 范围

本标准规定了动物和动物产品沙门氏菌检测方法。

本标准适用于动物和动物产品的沙门氏菌检测。

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 4789.4—1994 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

GB 4789.28—1994 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

3 检测方法

3.1 器材

天平、均质器、乳钵、培养箱、广口瓶、试管、吸管、平皿、玻棒。

3.2 培养基和试剂

3.2.1 缓冲蛋白胨水(BP):配制方法见 GB 4789.28—1994 中 4.12。

3.2.2 氯化镁孔雀绿增菌液(MM):配制方法见 GB 4789.28—1994 中 4.13。

3.2.3 四硫磺酸钠煌绿增菌液(TTB):配制方法见 GB 4789.28—1994 中 4.14、4.15。

3.2.4 亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC):配制方法见 GB 4789.28—1994 中 4.16。

3.2.5 胆硫乳琼脂(deoxycholate hyadrogen sulfiale lactose agar, DHL):配制方法见 GB 4789.28—1994 中 4.20。

3.2.6 苏木素伊红(HE)琼脂(hektoen enteric agar):配制方法见 GB 4789.28—1994 中 4.21。

3.2.7 WS 琼脂:配制方法见 GB 4789.28—1994 中 4.23。

3.2.8 三糖铁琼脂(TSI):配制方法见 GB 4789.28—1994 中 4.26 或 4.27。

3.2.9 氨基酸脱羧酶试验培养基:配制方法见 GB 4789.28—1994 中 3.12。

3.2.10 邻硝基酚 β -D-半乳糖苷(ONPG)培养基:配制方法见 GB 4789.28—1994 中 3.3。

3.2.11 甘露醇糖发酵管培养基(MAN):配制方法见 GB 4789.28—1994 中 3.2。

3.2.12 沙门氏菌因子血清:26 种用于初步分型;163 种用于详细分型。

3.3 采样及制备检样

3.3.1 依检测需要采集样品或按相关规定采样。

3.3.2 检样的制备:冷冻样品、固体样品需用均质器以 8 000 r/min~10 000 r/min 打碎 1 min,或用乳钵研磨制成检样;液体样品、粉状样品用灭菌玻棒搅匀。

3.4 检测程序

沙门氏菌检测程序见图 1。

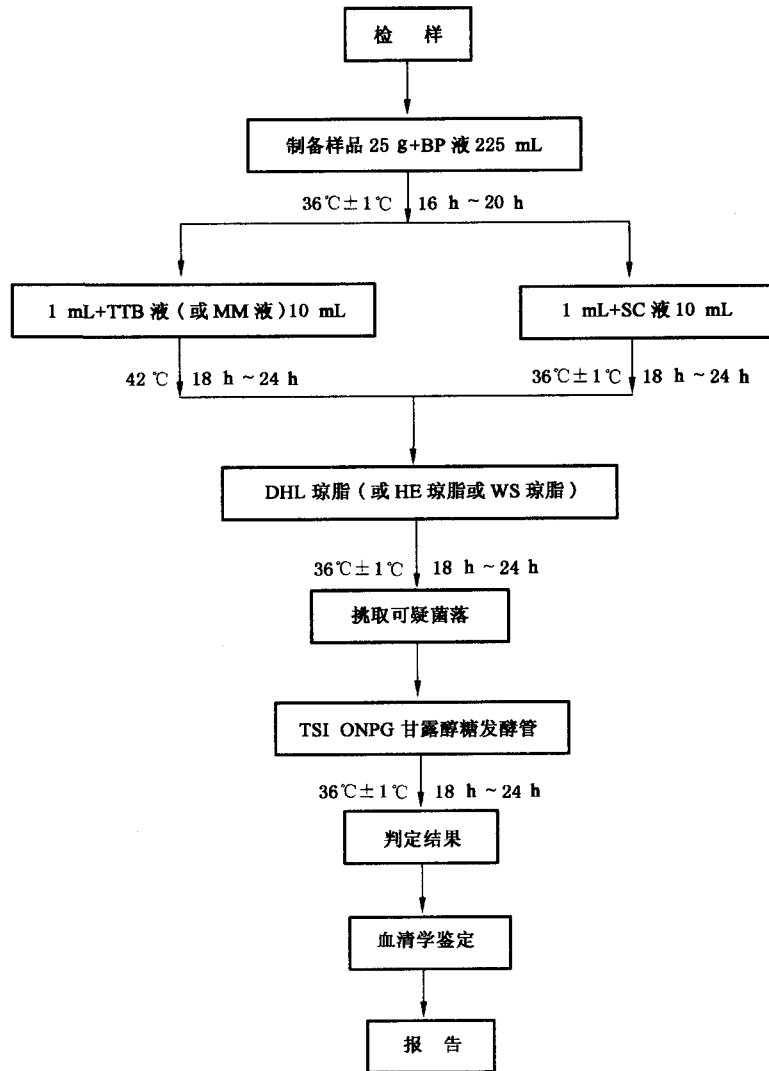


图 1 沙门氏菌检测程序

3.5 操作步骤

3.5.1 前增菌和增菌

3.5.1.1 冻品、蛋品、乳制品、鱼粉及其他经加工的动物产品均应经过前增菌。称取制备样品 25 g,加入装有 225 mL BP 液的广口瓶中,用无菌玻棒搅匀,36°C ± 1°C 培养 16 h ~ 20 h 前增菌。移取 1 mL 转种于 10 mL TTB 或 MM 增菌液中,42°C 培养 18 h ~ 24 h。另取 1 mL 转种于 10 mL SC 增菌液中,36°C ± 1°C 培养 18 h ~ 24 h。

3.5.1.2 鲜肉、鲜蛋、鲜乳及其他未经加工的动物产品或动物新鲜病料不必经过前增菌。称取检样,以 1 : 10 比例加入 TTB(或 MM)增菌液和 SC 增菌液,分别用 42°C 和 36°C 两种温度培养。

3.5.1.3 采集粪便、禽肠内容物的棉拭子可直接投入 10 mL 上述增菌液中培养。

3.5.2 分离培养

取一接种环增菌液划线接种于 DHL[或 HE 琼脂或 WS 琼脂]琼脂平板上。36°C ± 1°C 培养 18 h ~ 24 h。观察平板上菌落生长形态。沙门氏菌各亚种在选择性平板上菌落特征见表 1。

表 1 沙门氏菌属在选择性平板上菌落特征

选择性琼脂平板	沙门氏菌亚种 I、II、IV、V、VI 亚种 III (乳糖阴性或迟缓阳性)	沙门氏菌亚种 III (乳糖阳性菌株)
DHL	无色半透明;产硫化氢(H ₂ S),菌落中心黑色或几乎全黑色	粉红色,产硫化氢,菌落中心黑色或几乎全黑色
HE WS	半透明蓝绿色或蓝色;产硫化氢(H ₂ S),菌落中心黑色或几乎全黑色	黄色,产硫化氢,菌落中心黑色或几乎全黑色

3.5.3 生化鉴定

挑取 DHL(或 HE 或 WS)平板上可疑菌落 3 个~5 个,每个菌落先洗入 TSI 培养基冷凝水中,继而在斜面上划线接种并高层穿刺接种。再挑取同一菌落依次接种氨基酸脱羧酶发酵试验(LD)和 ONPG,甘露醇糖发酵管三支生化管(可用微量管代替),若菌落偏小,二次挑取菌落有困难,可用接种环蘸取 TSI 培养基中冷凝水接种其余生化管,36℃±1℃培养 18 h~24 h(挑取菌落后的平板,应置于 4℃冰箱保留 48 h 以备复查)。按表 2 记录反应结果。并对照表 3 进行判定。

表 2 生化反应结果判定

生化管	TSI			氨基酸脱羧酶发酵试验	ONPG	MAN
	底 ^a	斜面 ^b	硫化氢(H ₂ S)			
第一次颜色 记录符号	黄 +	黄 +	黑 +	紫 +	深黄 +	黄 +
第二次颜色 记录符号	红 —	红 —	无黑色 —	黄 —	无色或淡黄 —	紫 —

^a “底”观察葡萄糖反应。
^b “斜面”观察乳糖和蔗糖反应。

表 3 生化检测沙门氏菌属判定表

序号	TSI			LD	ONPG	甘露醇糖发酵管	判定
	底	斜面	硫化氢				
A	+	—	+	+	—	+	沙门氏菌亚种 I、II、IV、VI
B ^a	+	+	+	+	+	+	沙门氏菌亚种 III b、15% III a
C	+	—	+	+	+	+	沙门氏菌亚种 III a、V、15% III b、15% II
D ^b	+	—	+	—	—	+	少数沙门氏菌亚种 I
E ^c	+	—	—	+	—	+	少数沙门氏菌亚种 I
F ^d	+	—	—	—	—	+	甲型副伤寒沙门氏菌
G	—	+-	—	+-	+	+-	非沙门氏菌

^a 含 1% 硫化氢阳性的大肠艾希氏菌,可加试靛基质加以鉴别,其中大肠菌阳性,沙门氏菌阴性。
^b 赖氨酸阴性的沙门氏菌主要有:甲型副伤寒、伤寒、猪霍乱、鸡等。
^c 硫化氢阴性的沙门氏菌主要有:甲型副伤寒、伤寒、猪伤寒、猪霍乱、仙台、贝塔、巴布亚、鸡、马流产、山夫登堡、都柏林等。
^d 可直接用(O₂)单因子血清证实,以排除雷极氏普罗菲登斯菌等。

3.5.4 血清学鉴定

3.5.4.1 O 抗原检查

凡生化结果符合表 3 沙门氏菌反应模式的菌株,用抗血清玻片凝集法加以证实。即在洁净的玻璃片上

(或平皿)滴加 A~F 多价 O 血清—接种环,挑取 TSI 斜面新鲜菌苔在血清中散开,轻摇玻片,在黑色背景下观察凝集颗粒。同时设生理盐水对照。在生理盐水中自凝者不能分群。

被 A~F 多价 O 血清凝集者,依次用 O₄;O_{3,10};O₇;O₈;O₉;O₂ 和 O₁₁ 因子血清作凝集试验。根据试验结果,判定 O 群。被 O_{3,10} 血清凝集的菌株,要用 O_{3,15} 复核,亦发生凝集,核对了 O₃ 的存在。再用 O₁₀、O₁₅、O₃₄、O₁₉ 单因子血清作凝集试验,判定 E₁、E₂、E₃、E₄ 各亚群。每一个 O 抗原成分的最后确定均应根据 O 单因子血清的检查结果,没有 O 单因子血清的要两个 O 复合因子血清进行核对。如用 O_{4,12} 和 O_{9,12} 核对 O₁₂,用 O_{13,22} 和 O_{13,23} 核对 O₁₃。

不被 A~F 多价 O 血清凝集者,用 163 种沙门氏菌因子血清中其他多价 O 血清检查,如有其中一种血清凝集,则用这种血清所包括的 O 群血清逐一检查,以确定 O 群。所有多价 O 血清不凝集者要考虑 Vi 抗原的存在,可加热消除后再作 O 抗原检查。即将菌株接种在琼脂量较高的(如 2.5%~30%)培养基上再培养,挑取菌苔于 1 mL 生理盐水中,做成浓菌液,在火焰上加热煮沸后检查,或送有条件单位进一步证实。

3.5.4.2 血清学分型鉴定

可按 GB 4789.4—1994 中 6.4 执行。

3.6 结果报告

3.6.1 凡符合表 3 沙门氏菌反应模式又能以血清学分群的菌株,则报告:从送检样品中检出 O 某群沙门氏菌。

3.6.2 鉴别培养基上未生长可疑沙门氏菌落或生化反应不符合表 3 沙门氏菌反应模式的菌株,报告:从送检样品中未发现沙门氏菌。
