



食源性疾病系列丛书

食源性疾病监测实验室 操作规程

■ 李薇薇 韩海红 主编



中国质检出版社
中国标准出版社

食源性疾病系列丛书

食源性疾病监测实验室操作规程

李薇薇 韩海红 主编

中国质检出版社

中国标准出版社

北 京

图书在版编目(CIP)数据

食源性疾病预防实验室操作规程 / 李薇薇, 韩海红主编

—北京: 中国质检出版社, 2017. 12

ISBN 978-7-5026-4521-2

I. ①食… II. ①李…②韩… III. ①食源性疾病预防—卫生
监测—规程 IV. ①R155.3-65

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 296670 号

中国质检出版社 出版发行
中国标准出版社

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号 (100029)
北京市西城区三里河北街 16 号 (100045)

网址: www.spc.net.cn

总编室: (010) 68533533 发行中心: (010) 51780238

读者服务部: (010) 68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 787×1092 1/16 印张 9.25 字数 151 千字
2017 年 12 月第一版 2017 年 12 月第一次印刷

*

定价 39.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 68510107

编委会

主 编 李薇薇 国家食品安全风险评估中心

韩海红 国家食品安全风险评估中心

副主编 郭云昌 国家食品安全风险评估中心

李 宁 国家食品安全风险评估中心

刘继开 国家食品安全风险评估中心

白 莉 国家食品安全风险评估中心

付 萍 国家食品安全风险评估中心

编写人员(按姓氏笔画排列)

王丽丽 北京市疾病预防控制中心

马群飞 福建省疾病预防控制中心

马国柱 陕西省疾病预防控制中心

申志新 河北省疾病预防控制中心

毕振旺 山东省疾病预防控制中心

孙 永 安徽省疾病预防控制中心

刘成伟 江西省疾病预防控制中心

陈玉贞 山东省疾病预防控制中心

何树森 四川省疾病预防控制中心

李秀桂 广西壮族自治区疾病预防控制中心

陈 敏 上海市疾病预防控制中心

陈 倩 北京市疾病预防控制中心

李心朋	山东省疾病预防控制中心
杨小蓉	四川省疾病预防控制中心
张秀丽	河南省疾病预防控制中心
张 政	浙江省疾病预防控制中心
张晓媛	北京市疾病预防控制中心
赵 薇	吉林省疾病预防控制中心
柯碧霞	广东省疾病预防控制中心
柯昌文	广东省疾病预防控制中心
贾华云	湖南省疾病预防控制中心
顾其芳	上海市疾病预防控制中心
胡晓宁	甘肃省疾病预防控制中心
唐 震	江苏省疾病预防控制中心
梅玲玲	浙江省疾病预防控制中心
遇晓杰	黑龙江省疾病预防控制中心
裴晓燕	国家食品安全风险评估中心
甄世祺	江苏省疾病预防控制中心
廖兴广	河南省疾病预防控制中心

前 言

食源性疾病不仅是日益严重的全球性公共卫生问题之一，也是食品安全的首要问题。为进一步贯彻实施《中华人民共和国食品安全法》及其实施条例，切实落实《国务院关于加强食品安全工作的决定》（国发〔2012〕20号）和《国家食品安全监管体系“十二五”规划》（国发〔2012〕36号）的工作部署，落实好卫生计生部门在食源性疾病相关方面的职能，理顺食源性疾病预防、检验程序、操作步骤、结果和报告等方面的内容，国家食品安全风险评估中心组织人员编写食源性疾病预防系列丛书，其中，《食源性疾病预防实验室操作规程》对食源性疾病预防中实验室检验的标准操作程序进行了详细描述。

为了掌握中国主要食源性疾病预防单病种的发病基线，确定其发生率和严重程度，发现新的细菌、病毒等食源性病原，2011年国家卫生计生委启动了基于哨点医院的症候群报告和实验室监测的食源性疾病预防病例监测系统的建设。该监测系统由国家食品安全风险评估中心组建。地方各级CDC负责辖区内数据的审核和阳性菌株的复核确认，同时对监测数据进行及时分析和隐患识别，并通过监测系统将监测数据上报至国家级数据库；国家食品安全风险评估中心负责全国数据的审核分析，并识别跨省的严重食源性疾病预防暴发线索。截至2016年年底，在31个省（自治区、直辖市）和新疆生产建设兵团内，共设置8481家哨点医院，覆盖每个县区级行政区域的所有与食源性疾病预防诊疗有关的二级及以上医院，其中703家哨点医院进行生物标本采集。

本书就是针对2017年食源性疾病预防风险监测的工作而配套的操作规程，主要内容首先是病人粪便标本的操作程序，具体包括沙门氏菌、志贺氏菌、副溶血性弧菌、致泻大肠埃希氏菌、阪崎肠杆菌等九种食源性病菌，以及腹泻病毒的实验室监测规程；其次是针对分离菌株的PFGE标准操作程序，具体包括非伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、阪崎肠杆菌、志贺氏菌、副溶血性弧菌、单核细

胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌和空肠弯曲菌的操作程序；最后是针对食源性致病菌药敏试验标准操作程序，包括抗生素的选择和检测方法。

在此感谢国家食品安全风险评估中心的各位专家、感谢中国疾病预防控制中心、吉林省疾病预防控制中心、山东省疾病预防控制中心、浙江省疾病预防控制中心、北京市疾病预防控制中心、广东省疾病预防控制中心、上海市疾病预防控制中心、四川省疾病预防控制中心、湖南省疾病预防控制中心、广西疾病预防控制中心、甘肃省疾病预防控制中心、河南省疾病预防控制中心、云南省疾病预防控制中心、湖北省疾病预防控制中心、安徽省疾病预防控制中心、江苏省疾病预防控制中心、山西省疾病预防控制中心和黑龙江省疾病预防控制中心的大力支持和帮助。在编写过程中，对未能一一注明的资料和论著的原作者也表示诚挚的感谢。

由于编者的精力和水平有限，对本书的疏漏和错误之处恳请广大读者批评指正。

编 者
2017 年 11 月

目 录

第一章 粪便标本检验标准操作程序	1
(一) 沙门氏菌	4
(二) 志贺氏菌	11
(三) 副溶血性弧菌	14
(四) 致泻大肠埃希氏菌	20
(五) 大肠埃希氏菌 O157: H7	28
(六) 小肠结肠炎耶尔森氏菌	33
(七) 弯曲菌	38
(八) 单核细胞增生李斯特氏菌	41
(九) 阪崎肠杆菌	45
(十) 腹泻病毒	48
第二章 食源性致病菌 PFGE 标准操作程序	53
(一) 非伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、阪崎肠杆菌和志贺氏菌	53
(二) 副溶血性弧菌	64
(三) 单核细胞增生李斯特氏菌	73
(四) 金黄色葡萄球菌	83
(五) 小肠结肠炎耶尔森氏菌	92
(六) 空肠弯曲菌	100
第三章 食源性致病菌药敏试验标准操作程序	108
(一) 抗生素的选择	108
(二) 检测方法	111

附 录	125
附录一 手工血培养瓶的制备	125
附录二 PFGE 试剂储存液的配制	126
附录三 PFGE 实验试剂	130
附录四 GEL DOC 2000 使用说明	133
附录五 PFGE 器材	135
附录六 PFGE 耗材	136
附录七 Braenderup 沙门氏菌 H9812 酶切混合液	137
附录八 质控（标准）菌株的传代和保存	138

第一章 粪便标本检验标准操作程序

粪便标本检验标准操作程序如下：

1. 标本采集要求

(1) 标本应为新鲜的或转移至 Cary - Blair 运送培养基的粪便拭子或肛拭子。最优标本是转移至 Cary - Blair 运送培养基的粪便拭子。肛拭子不是最佳标本，仅在病人无粪便标本时采用。

(2) 最好采集发病早期，使用抗生素治疗之前的病人粪便标本。

(3) 需采集符合监测病例定义的病人新鲜粪便标本。

(4) 注意生物安全防护，彻底清洗双手，防止污染、传播和自身感染。

(5) 标本应按手册要求进行标记编号或贴标签。

(6) 及时通过“食源性疾病监测报告系统”填报。

(7) 标本应按要求尽快送至实验室检测。

2. 标本采集方法

粪便标本的采集应由受过专门培训的人员来进行，标本采集人员由哨点医院和疾病预防控制中心结合实际情况自行决定。

(1) 粪便标本：应采集自然排出的新鲜粪便，盛于清洁、干燥、无吸水性的无菌容器，避免混入尿液、水和其他物质。

① 细菌检测：用 5 支无菌棉拭子多点（表面、深处及粪端）采集新鲜粪便标本，如有脓血或黏液等应注意挑取含有脓血、黏液或血液部分的大便，液体粪便应取絮状物，使棉拭子表面蘸满粪便，至少 5 g(mL)（似蚕豆大小或拇指末端大小），插入 Cary - Blair 运送培养基。

② 病毒检测：采集粪便 1 份，约 5 g(mL) ~ 10 g(mL)，置于无菌粪便采样杯（盒）（不加任何培养基和试剂）。

(2) 肛拭标本：若无法获得粪便（如排便困难或婴幼儿），也可采用肛拭

子，即无菌棉拭子用生理盐水湿润后，插入肛门内 4 cm~5 cm 处（儿童约 2 cm~3 cm）轻轻转动后取出，肛拭子采集后应当目测，需要在拭子上明显见到粪便，插入 Cary-Blair 运送培养基。

3. 标本的保存

（1）用于细菌检测的标本：标本采集后立即置于 4℃ 送至实验室进行检测，若室温保存，不能超过 1 h；如不能立即送检，应放入 Cary-Blair 运送培养基中冷藏条件下 24 h 内送检。

（2）用于病毒检测的标本：标本采集后 30 min 内立即将标本放置在一 20℃ 冰箱中，如有特殊情况未能及时放入 -20℃ 的冰箱，标本可在 4℃ 储存，不能超过 2 天，保存期内避免标本发生反复冻融。

4. 标本的运送

（1）运送过程中注意避免交叉污染。

（2）将标本置于冷藏箱（配备冰袋），由标本运输人员运输至实验室。

（3）防止容器破碎、洒漏、颠倒，注意生物安全防护。

5. 标本的接收

承担检验任务的实验室接收到标本后，立即核查记录表格和粪便标本，确保一一对应，准确无误，且粪便标本完好，采样容器无损伤，标本采集、运送和保存符合要求。

6. 检验流程

粪便标本部分病原体检验流程如图 1-1 所示。

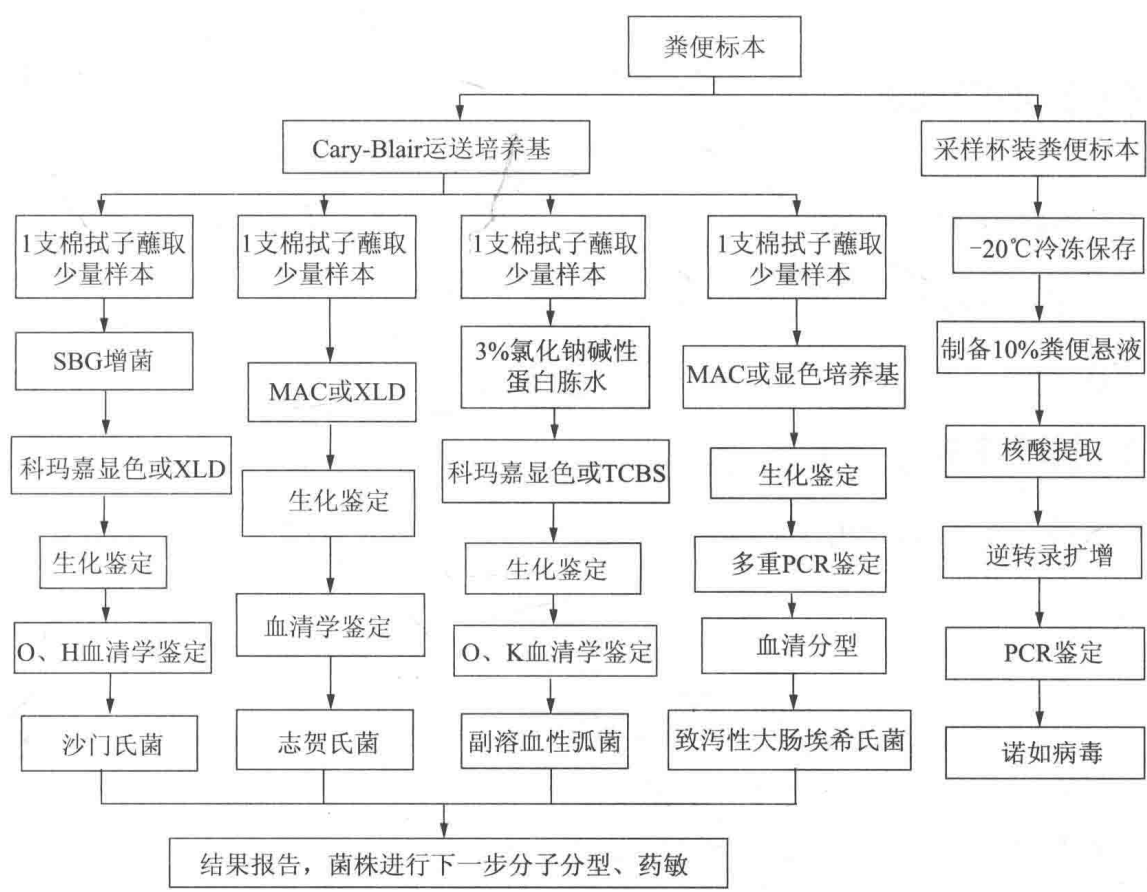


图 1-1 粪便标本部分病原体检验流程示例

粪便标本部分病原体检验培养条件如表 1-1 所示。

表 1-1 粪便标本部分病原体检验培养条件

培养条件	培养基	病原体	温度/℃
增菌液	1. SBG 增菌液	沙门氏菌	36
	2. 3%氯化钠碱性蛋白胨水	弧菌	36
选择性分离平板	1. 科玛嘉沙门氏菌显色平板	沙门氏菌	36
	2. XLD 平板	沙门氏菌、志贺氏菌	36
	3. MAC 平板	志贺氏菌、致泻性大肠埃希氏菌	36
	4. 科玛嘉弧菌显色平板 TCBS 平板	弧菌	36
	5. 大肠杆菌显色平板	致泻性大肠埃希氏菌	36

(一) 沙门氏菌

1 范围

本程序规定了粪便拭子或肛拭子标本中沙门氏菌（*Salmonella*）的检验方法。

2 检验程序

沙门氏菌检验程序见图 1-2。

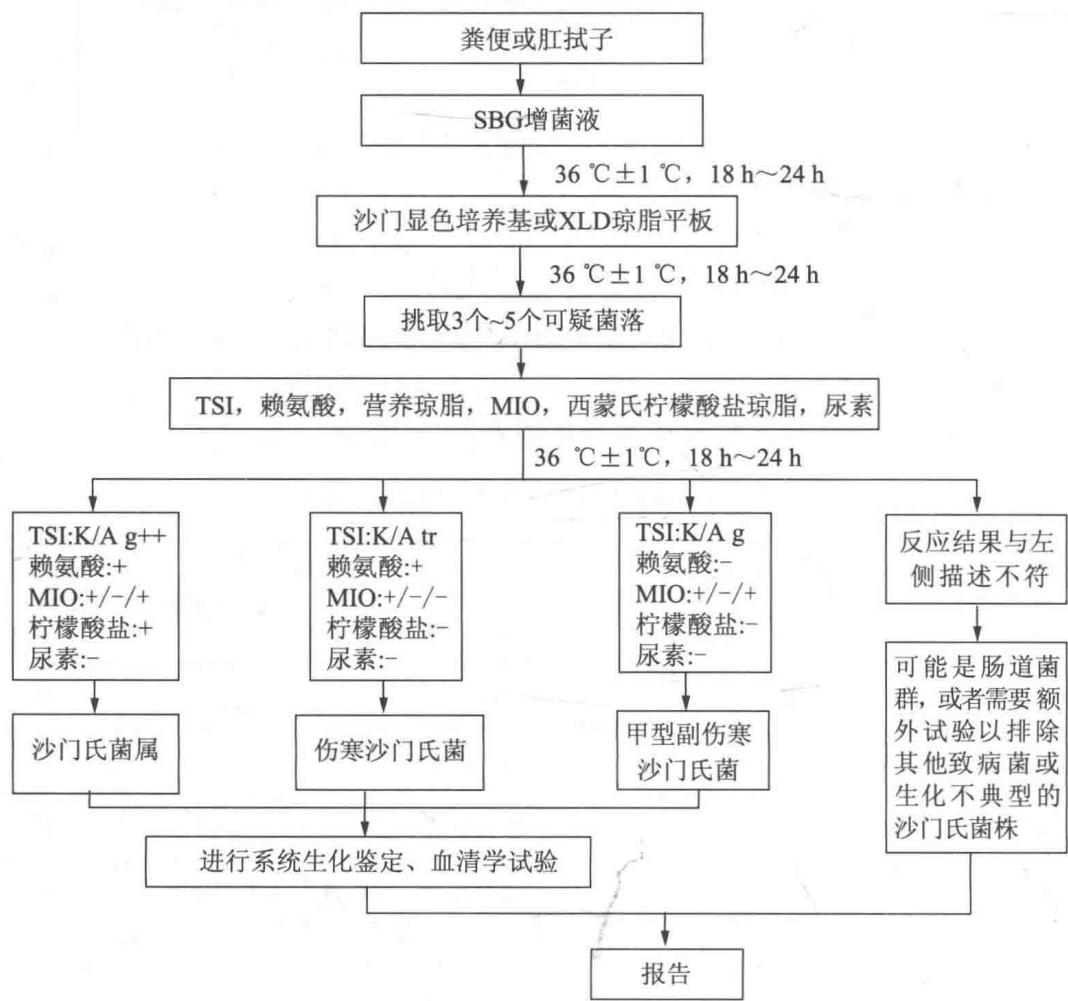


图 1-2 沙门氏菌检验程序

注:K/A:斜面产碱(红色),底层产酸(黄色);g:产气;++:产较多硫化氢;tr:产微量硫化氢

3 操作步骤

3.1 标本采集

标本包括新鲜的、或转移至 Cary - Blair 运送培养基的粪便或肛拭子。最优标本是粪便标本，肛拭子不是最佳标本，仅在病人无粪便标本时采用。肛拭子采集后应目测试子上明显见到粪便。

所采集的标本尽快检验，放入 Cary - Blair 运送培养基中的标本应在冷藏条件下 24 h 内送检。新鲜的粪便标本置于清洁、干燥、无肥皂或消毒液残留的容器中，冷藏条件下 8 h 内送检。

3.2 增菌培养

新鲜粪便：无菌拭子采集少量粪便，尽量从可见血或黏液的部位采集，将拭子放入 SBG 增菌液，轻拧管盖。

肛拭子：直接放入 SBG 增菌液管中。

转移至 Cary - Blair 运送培养基的粪便拭子：轻搅混合标本，将拭子放入 SBG 增菌液管中，轻拧管盖。

注：拭子表面有一层标本即可，不可将过量的标本放入 SBG 增菌液。

将上述增菌液置于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h。

3.3 分离培养

轻摇上述增菌液管，取 1 环划线于沙门氏菌显色培养基或 XLD 琼脂平板， $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。选择性平板上可疑菌落的特征见表 1-2。

表 1-2 沙门氏菌属在不同选择性平板上的菌落特征

选择性平板	沙门氏菌 (大多数)	伤寒沙门氏菌
显色培养基	紫红色或酒红色	紫红色或酒红色
XLD 琼脂	粉红色，带或不带黑心，许多菌落产生大的有光泽的黑色中心或几乎全黑色	粉红色，带或不带黑心

3.4 初步鉴定

挑取 3 个~5 个可疑菌落，接种 TSI 琼脂、营养琼脂平板、赖氨酸脱羧酶

培养基、动力-靛基质-鸟氨酸琼脂（MIO）、西蒙氏柠檬酸盐琼脂和尿素琼脂， $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。沙门氏菌属生化反应初步鉴别见表 1-3。

表 1-3 沙门氏菌属生化反应初步鉴别表

项目	沙门氏菌（大多数）	伤寒沙门氏菌	甲型副伤寒沙门氏菌
TSI（斜面）	K	K	K
TSI（底层）	A	A	A
TSI（产气）	+	-	+
TSI（硫化氢）	+	微量	-
赖氨酸	+	+	-
MIO（动力）	+	+	+
MIO（靛基质）	-	-	-
MIO（鸟氨酸）	+	+	+
柠檬酸盐（西蒙氏）	+	-	-
尿素	-	-	-

3.5 确定鉴定

刮取营养琼脂平板上的单个菌落，进行系统生化鉴定。可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。

3.6 血清学鉴定（选作）

3.6.1 抗原的准备

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。

O 血清不凝集时，将菌株接种在琼脂量较高的（如 2%~3%）培养基上再检查；如果是由于 Vi 抗原的存在而阻止了 O 凝集反应时，可挑取菌苔于 1 mL 生理盐水中做成浓菌液，于酒精灯火焰上煮沸后再检查。H 抗原发育不良时，将菌株接种在 0.55%~0.65%半固体琼脂平板的中央，俟菌落蔓延生长时，在其边缘部分取菌检查；或将菌株通过装有 0.3%~0.4%半固体琼脂的小玻管 1 次~2 次，自远端取菌培养后再检查。

3.6.2 多价菌体抗原（O）鉴定

在玻片上划出 2 个约 1 cm×2 cm 的区域，挑取 1 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 滴多价菌体（O）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，并对着黑暗背景进行观察，任何程度的凝集现象皆为阳性反应。

3.6.3 多价鞭毛抗原（H） 鉴定

同 3.6.2。

3.6.4 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形菌株，不能分型。

被 A~F 多价 O 血清凝集者，依次用 O₄；O₃、O₁₀；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、O₁₀ 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、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。

不被 A~F 多价 O 血清凝集者，先用 9 种多价 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。每种多价 O 血清所包括的 O 因子如下：

O 多价 1 A, B, C, D, E, F, 群（并包括 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

3.6.5 H 抗原的鉴定

属于 A~F 各 O 群的常见菌型，依次用表 1-4 所述 H 因子血清检查第 1 相

和第 2 相的 H 抗原。

表 1-4 A~F 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, Z15
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	

不常见的菌型，先用 8 种多价 H 血清检查，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 因子血清逐一检查，以第 1 相和第 2 项的 H 抗原。8 种多价 H 血清所包括的 H 因子如下：

- H 多价 1 a, b, c, d, i
- H 多价 2 eh, enx, enz15, fg, gms, gpu, gp, gq, mt, gz51
- H 多价 3 k, r, y, z, z10, lv, lw, lz13, lz28, lz40
- H 多价 4 1, 2; 1, 5; 1, 6; 1, 7; z6
- H 多价 5 z4z23, z4z24, z4z32, 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

每一个 H 抗原成分的最后确定均应根据 H 单因子血清的检查结果，没有 H 单因子血清的要两个 H 复合因子血清进行核对。

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，可在琼脂斜面上移种 1~2 代后再检查。如仍只检出一个相的 H 抗原，要用位相变异的方法检查其另一个相。单相菌不必做位相变异检查。