

中华人民共和国国家标准

GB 4789. 9—2014

食品安全国家标准

食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验

www.kinshent.cn
凯恒生物

2014-12-01 发布

2015-05-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会

发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.9-2008 《食品卫生微生物学检验 空肠弯曲菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.9-2008 相比，主要变化如下：

- 修改了标准的中文名称；
- 修改了范围；
- 修改了设备和材料；
- 修改了培养基和试剂；
- 修改了样品处理；
- 删除了药物敏感性试验；
- 删除了第二法 全自动酶联荧光免疫分析仪筛选法。

www.kinghunt.cn
凯恒生物

食品安全国家标准

食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验

1 范围

本标准规定了食品中空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 的检验方法。
本标准适用于食品中空肠弯曲菌的检验。

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: 25 °C ± 1 °C、36 °C ± 1 °C、42 °C ± 1 °C;
- b) 冰箱: 2 °C ~ 5 °C;
- c) 恒温振荡培养箱: 36 °C ± 1 °C、42 °C ± 1 °C;
- d) 天平: 感量 0.1 g;
- e) 均质器与配套均质袋;
- f) 振荡器;
- g) 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;
- h) 无菌锥形瓶: 容量 100 mL、200 mL、2 000 mL;
- i) 无菌培养皿: 直径 90 mm;
- j) pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸;
- k) 水浴装置: 36 °C ± 1 °C、100 °C;
- l) 微需氧培养装置: 提供微需氧条件 (5% 氧气、10% 二氧化碳和 85% 氮气);
- m) 过滤装置及滤膜 (0.22 μm、0.45 μm);
- n) 显微镜: 10 倍 ~ 100 倍, 有相差功能;
- o) 离心机: 离心速度 ≥ 20000 g;
- p) 比浊仪;
- q) 微生物生化鉴定系统。

3 培养基和试剂

- 3.1 Bolton 肉汤 (Bolton broth): 见附录 A 中 A.1。
- 3.2 改良 CCD 琼脂 (modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar, mCCDA): 见附录 A 中 A.2。
- 3.3 哥伦比亚血琼脂 (Columbia blood agar): 见附录 A 中 A.3。
- 3.4 布氏肉汤 (Brucella broth): 见附录 A 中 A.4。
- 3.5 氧化酶试剂: 见附录 A 中 A.5。
- 3.6 马尿酸钠水解试剂: 见附录 A 中 A.6。
- 3.7 Skirrow 血琼脂 (Skirrow blood agar): 见附录 A 中 A.7。
- 3.8 吡啶乙酸酯纸片: 见附录 A 中 A.8。
- 3.9 0.1% 蛋白胨水: 见附录 A 中 A.9。
- 3.10 1 mol/L 硫代硫酸钠 (Na₂S₂O₃) 溶液: 见附录 A 中 A.10。

3.11 3%过氧化氢 (H_2O_2) 溶液：见附录 A 中 A.11。

3.12 空肠弯曲菌显色培养基。

3.13 生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡。

4 检验程序

空肠弯曲菌检验程序见图 1。

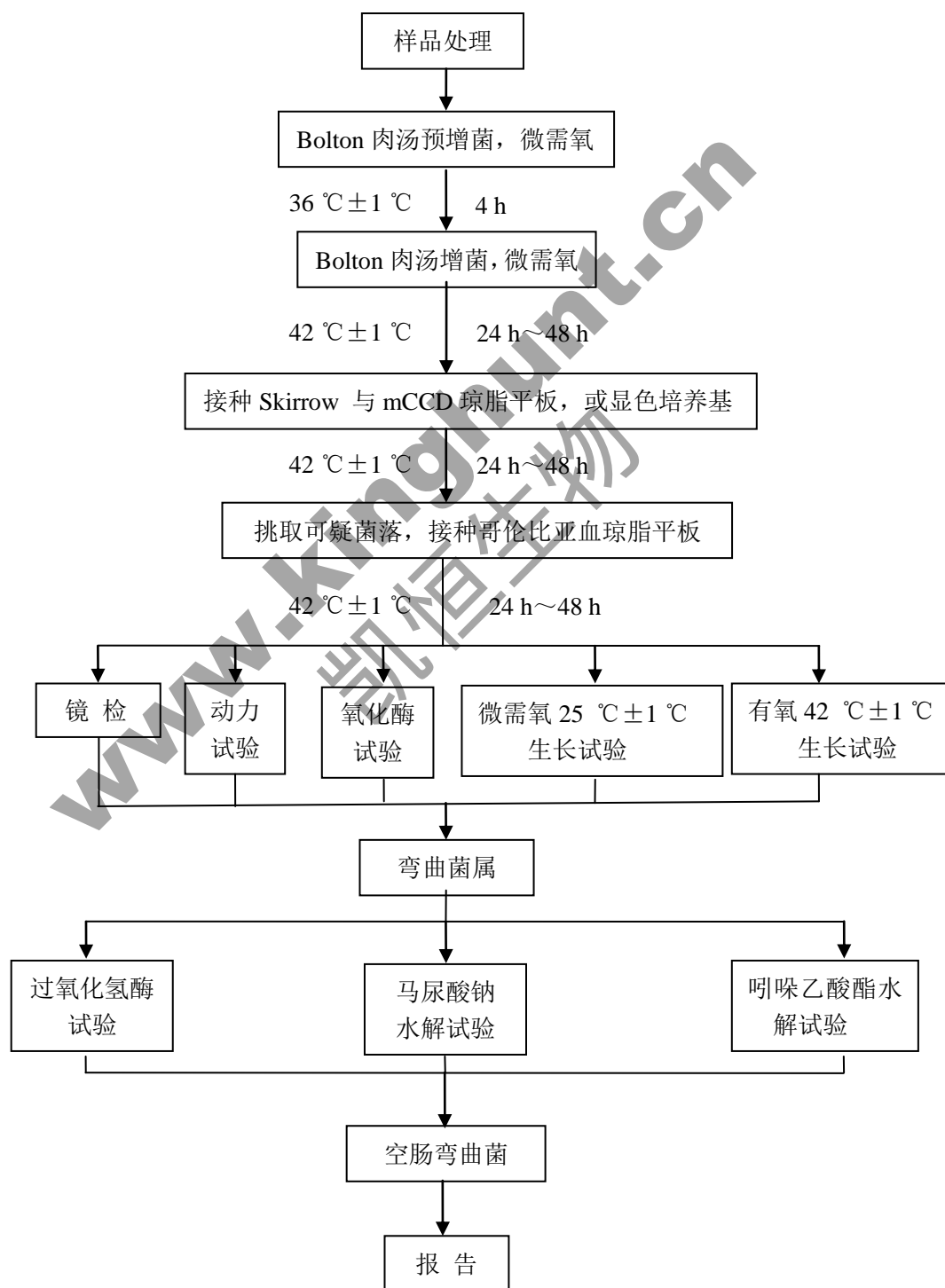


图 1 空肠弯曲菌检验程序

5 操作步骤

5.1 样品处理

5.1.1 一般样品

取 25 g (mL) 样品 (水果、蔬菜、水产品为 50 g) 加入盛有 225 mL Bolton 肉汤的有滤网的均质袋中 (若为无滤网均质袋可使用无菌纱布过滤), 用拍击式均质器均质 1 min~2 min, 经滤网或无菌纱布过滤, 将滤过液进行培养。

5.1.2 整禽等样品

用 200 mL 0.1% 的蛋白胨水中充分冲洗样品的内外部, 并振荡 2 min~3 min, 经无菌纱布过滤至 250 mL 离心管中, 16000 g 离心 15 min 后弃去上清, 用 10 mL 0.1% 蛋白胨水悬浮沉淀, 吸取 3 mL 于 100 mL Bolton 肉汤中进行培养。

5.1.3 贝类

取至少 12 个带壳样品, 除去外壳后将所有内容物放到均质袋中, 用拍击式均质器均质 1 min~2 min, 取 25g 样品至 225 mL Bolton 肉汤中 (1:10 稀释), 充分震荡后再转移 25 mL 于 225 mL Bolton 肉汤中 (1:100 稀释), 将 1:10 和 1:100 稀释的 Bolton 肉汤同时进行培养。

5.1.4 蛋黄液或蛋浆

取 25 g (mL) 样品于 125 mL Bolton 肉汤中并混匀 (1:6 稀释), 再转移 25 mL 于 100 mL Bolton 肉汤中并混匀 (1:30 稀释), 同时将 1:6 和 1:30 稀释的 Bolton 肉汤进行培养。

5.1.5 鲜乳、冰淇淋、奶酪等

若为液体乳制品取 50 g; 若为固体乳制品取 50 g 加入盛有 50 mL 0.1% 蛋白胨水的有滤网均质袋中, 用拍击式均质器均质 15 s~30 s, 保留过滤液。必要时调整 pH 值至 7.5 ± 0.2 , 将液体乳制品或滤过液以 20000 g 离心 30 min 后弃去上清, 用 10 mL Bolton 肉汤悬浮沉淀 (尽量避免带入油层), 再转移至 90 mL Bolton 肉汤进行培养。

5.1.6 需表面涂拭检测的样品

无菌棉签擦拭检测样品的表面 (面积至少 100 cm^2 以上), 将棉签头剪落到 100 mL Bolton 肉汤中进行培养。

5.1.7 水样

将 4 L 的水 (对于氯处理的水, 在过滤前每升水中加入 5 mL 1mol/L 硫代硫酸钠溶液) 经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 把滤膜浸没在 100 mL Bolton 肉汤中进行培养。

5.2 预增菌与增菌

在微需氧条件下, $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 4 h, 如条件允许配以 100 r/min 的速度进行振荡。必要时测定增菌液的 pH 值并调整至 7.4 ± 0.2 , $42 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 继续培养 24 h~48 h。

5.3 分离

将 24 h 增菌液、48 h 增菌液及对应的 1:50 稀释液分别划线接种于 Skirrow 血琼脂与 mCCDA 琼脂平板上, 微需氧条件下 $42 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h~48 h。另外可选择使用空肠弯曲菌显色平板作为补充。

观察 24 h 培养与 48 h 培养的琼脂平板上的菌落形态, mCCDA 琼脂平板上的可疑菌落通常为淡灰色, 有金属光泽、潮湿、扁平, 呈扩散生长的倾向。Skirrow 血琼脂平板上的第一型可疑菌落为灰色、扁平、湿润有光泽, 呈沿接种线向外扩散的倾向; 第二型可疑菌落常呈分散凸起的单个菌落, 边缘整齐、发亮。空肠弯曲菌显色培养基上的可疑菌落按照说明进行判定。

5.4 鉴定

5.4.1 弯曲菌属的鉴定

5.4.1.1 概述

挑取 5 个 (如少于 5 个则全部挑取) 或更多的可疑菌落接种到哥伦比亚血琼脂平板上, 微需氧条件下 $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h, 按照 5.4.1.1~5.4.1.5 进行鉴定, 结果符合表 1 的可疑菌落确定为弯曲菌属。

表 1 弯曲菌属的鉴定

项 目	弯曲菌属特性
形态观察	革兰氏阴性, 菌体弯曲如小逗点状, 两菌体的末端相接时呈 S 形、螺旋状或海鸥展翅状 ^a
动力观察	呈现螺旋状运动 ^b
氧化酶试验	阳 性
微需氧条件下 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生长试验	不生长
有氧条件下 $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生长试验	不生长
^a 有些菌株的形态不典型。	
^b 有些菌株的运动不明显。	

5.4.1.2 形态观察

挑取可疑菌落进行革兰氏染色, 镜检。

5.4.1.3 动力观察

挑取可疑菌落用 1 mL 布氏肉汤悬浮, 用相差显微镜观察运动状态。

5.4.1.4 氧化酶试验

用铂/铈接种环或玻璃棒挑取可疑菌落至氧化酶试剂润湿的滤纸上, 如果在 10 s 内出现紫红色、紫罗兰或深蓝色为阳性。

5.4.1.5 微需氧条件下 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生长试验

挑取可疑菌落, 接种到哥伦比亚血琼脂平板上, 微需氧条件下 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$, 观察细菌生长情况。

5.4.1.6 有氧条件下 $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生长试验

挑取可疑菌落, 接种到哥伦比亚血琼脂平板上, 有氧条件下 $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$, 观察细菌生长情况。

5.4.2 空肠弯曲菌的鉴定

5.4.2.1 过氧化氢酶试验

挑取菌落，加到干净玻片上的 3%过氧化氢溶液中，如果在 30 s 内出现气泡则判定结果为阳性。

5.4.2.2 马尿酸钠水解试验

挑取菌落，加到盛有 0.4 mL 1% 马尿酸钠的试管中制成菌悬液。混合均匀后在 36 °C ±1 °C 水浴中温育 2 h 或 36 °C ±1 °C 培养箱中温育 4 h。沿着试管壁缓缓加入 0.2 mL 茚三酮溶液，不要振荡，在 36 °C ±1 °C 的水浴或培养箱中再温育 10 min 后判读结果。若出现深紫色则为阳性；若出现淡紫色或没有颜色变化则为阴性。

5.4.2.3 吲哚乙酸酯水解试验

挑取菌落至吲哚乙酸酯纸片上，再滴加一滴灭菌水。如果吲哚乙酸酯水解，则在 5 min ~ 10 min 内出现深蓝色；若无颜色变化则表示没有发生水解。空肠弯曲菌的鉴定结果见表 2。

表 2 空肠弯曲菌的鉴定

特征	空肠弯曲菌 (<i>C. jejuni</i>)	结肠弯曲菌 (<i>C. coli</i>)	海鸥弯曲菌 (<i>C. lari</i>)	乌普萨拉弯曲菌 (<i>C. upsaliensis</i>)
过氧化氢酶试验	+	+	+	—或微弱
马尿酸盐水解试验	+	—	—	—
吲哚乙酸酯水解试验	+	+	—	+

注：+表示阳性；—表示阴性。

5.4.2.4 替代试验

对于确定为弯曲菌属的菌落，可使用生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡代替 5.4.2.1~5.4.2.3 进行鉴定。

5.5 结果报告

综合以上试验结果，报告检样单位中检出或未检出空肠弯曲菌。

附录 A

培养基与试剂

A.1 Bolton 肉汤 (Bolton broth)

A.1.1 基础培养基

A.1.1.1 成分

动物组织酶解物	10.0 g
乳白蛋白水解物	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
丙酮酸钠	0.5 g
偏亚硫酸氢钠	0.5 g
碳酸钠	0.6 g
α -酮戊二酸	1.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.1.2 制法

将 A.1.1.1 中各成分溶于蒸馏水中，121 °C 灭菌 15 min，备用。

A.1.2 无菌裂解脱纤维绵羊或马血

对无菌脱纤维绵羊或马血通过反复冻融进行裂解或使用皂角苷进行裂解。

A.1.3 抗生素溶液

A.1.3.1 成分

头孢哌酮 (cefoperazone)	0.02 g
万古霉素 (vancomycin)	0.02 g
三甲氧苄胺嘧啶乳酸盐 (trimethoprim lactate)	0.02 g
两性霉素 B (amphotericin B)	0.01 g
多粘菌素 B (polymyxin B)	0.01 g
乙醇 / 灭菌水 (50 / 50, 体积分数)	5.0 mL

A.1.3.2 制法

将 A.1.3.1 中各成分溶解于乙醇/灭菌水混合溶液中。

A.1.4 完全培养基

A.1.4.1 成分

基础培养基	1 000.0 mL
无菌裂解脱纤维绵羊或马血	50.0 mL
抗生素溶液	5.0 mL

A. 1. 4. 2 制法

当基础培养基的温度约为 45 ℃左右时，无菌加入绵羊或马血和抗生素溶液，混匀，校正 pH 至 7.4 ±0.2 (25 ℃)，常温下放置不得超过 4 h，或在 4 ℃左右避光保存不得超过 7 d。

A. 2 改良 CCD 琼脂 (modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar, mCCDA)

A. 2. 1 基础培养基

A. 2. 1. 1 成分

肉浸液	10.0 g
动物组织酶解物	10.0 g
氯化钠	5.0 g
木炭	4.0 g
酪蛋白酶解物	3.0 g
去氧胆酸钠	1.0 g
硫酸亚铁	0.25 g
丙酮酸钠	0.25 g
琼脂	8.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 2. 1. 2 制法

将 A.2.1.1 中各成分溶于蒸馏水中，121 ℃ 灭菌 15 min，备用。

A. 2. 2 抗生素溶液

A. 2. 2. 1 成分

头孢哌酮 (cefoperazone)	0.032 g
两性霉素 B (amphotericin B)	0.01 g
利福平 (rifampicin)	0.01 g
乙醇 / 灭菌水 (50 / 50, 体积分数)	5.0 mL

A. 2. 2. 2 制法

将 A.2.2.1 中各成分溶解于乙醇/灭菌水混合溶液中。

A. 2. 3 完全培养基

A. 2. 3. 1 成分

基础培养基	1 000.0 mL
抗生素溶液	5.0 mL

A. 2. 3. 2 制法

当基础培养基的温度约为 45 ℃左右时，加入抗生素溶液，混匀。校正 pH 至 7.4±0.2 (25 ℃)。倾注 15 mL 于无菌平皿中，静置至培养基凝固。使用前需预先干燥平板。制备的平板未干燥时在室温放置不得超过 4 h，或在 4 ℃左右冷藏不得超过 7 d。

A. 3 哥伦比亚血琼脂 (Columbia blood agar)

A.3.1 基础培养基

A.3.1.1 成分

动物组织酶解物	23.0 g
淀粉	1.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	8.0g~18.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.3.1.2 制法

将 A.3.1.1 成分溶于蒸馏水中，121 °C 灭菌 15 min，备用。

A.3.2 无菌脱纤维绵羊血

无菌操作条件下，将绵羊血倒入盛有灭菌玻璃珠的容器中，振摇约 10 min，静置后除去附有血纤维的玻璃珠即可。

A.3.3 完全培养基

A.3.3.1 成分

基础培养基	1 000.0 mL
无菌脱纤维绵羊血	50.0 mL

A.3.3.2 制法

当基础培养基的温度为 45 °C 左右时，无菌加入绵羊血，混匀。校正 pH 至 7.3 ± 0.2 (25 °C)。倾注 15 mL 完全培养基于无菌平皿中，静置至培养基凝固。制备的平板未干燥时在室温放置不得超过 4 h，或在 4 °C 左右冷藏不得超过 7 d。

A.4 布氏肉汤 (Brucella broth)

A.4.1 成分

酪蛋白酶解物	10.0 g
动物组织酶解物	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
酵母浸膏	2.0 g
氯化钠	5.0 g
亚硫酸氢钠	0.1 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.4.2 制法

将 A.4.1 中各成分溶于蒸馏水中，校正 pH 至 7.0 ± 0.2 (25 °C)，121 °C 灭菌 15 min，备用。

A.5 氧化酶试剂

A.5.1 成分

四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
------------	-------

蒸馏水	100.0 mL
-----	----------

A. 5.2 制法

使用前将 A. 5.1 中各成分溶于蒸馏水中。

A. 6 马尿酸钠水解试剂

A. 6.1 马尿酸钠溶液

A. 6.1.1 成分

马尿酸钠	10.0 g
磷酸盐缓冲液 (PBS) 组分:	
氯化钠	8.5 g
磷酸氢二钠	8.98 g
磷酸二氢钠	2.71 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 6.1.2 制法

将马尿酸钠溶于磷酸盐缓冲溶液中，过滤除菌。无菌分装，每管 0.4 mL，储存于 -20 ℃。

A. 6.2 3.5% (水合) 茚三酮溶液 (质量/体积)

A. 6.2.1 成分

(水合) 茚三酮 (ninhydrin)	1.75 g
丙酮	25.0 mL
丁醇	25.0 mL

A. 6.2.2 制备

将 (水合) 茚三酮溶解于丙酮/丁醇混合液中。该溶液在避光冷藏时不超过 7 d。

A. 7 Skirrow 血琼脂 (Skirrow blood agar)

A. 7.1 基础培养基

A. 7.1.1 成分

蛋白胨	15.0 g
胰蛋白胨	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

A. 7.1.2 制法

将 A.7.1.1 中各成分溶于蒸馏水中，121 ℃ 灭菌 15 min，备用。

A. 7.2 FBP 溶液

A. 7.2.1 成分

丙酮酸钠	0.25 g
焦亚硫酸钠	0.25 g
硫酸亚铁	0.25 g
蒸馏水	100.0 mL

A. 7.2.2 制法

将 A.7.2.1 中各成分溶于蒸馏水中，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌。FBP 根据需要量现用现配，在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 储存不超过 3 个月或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存不超过 1 个月。

A. 7.3 抗生素溶液

A. 7.3.1 成分

头孢哌酮 (cefoperazone)	0.032 g
两性霉素 B (amphotericin B)	0.01 g
利福平 (rifampicin)	0.01 g
乙醇 / 灭菌水 (50 / 50, 体积分数)	5.0 mL

A. 7.3.2 制法

将 A.7.3.1 中各成分溶解于乙醇/灭菌水混合溶液中。

A. 7.4 无菌脱纤维绵羊血

无菌操作条件下，将绵羊血倒入盛有灭菌玻璃珠的容器中，振摇约 10 min，静置后除去附有血纤维的玻璃珠即可。

A. 7.5 完全培养基

A. 7.5.1 成分

基础培养基	1 000.0 mL
FBP 溶液	5.0 mL
抗生素溶液	5.0 mL
无菌脱纤维绵羊血	50.0 mL

A. 7.5.2 制法

当基础培养基的温度约为 45 $^{\circ}\text{C}$ 左右时，加入 FBP 溶液、抗生素溶液与冻融的无菌脱纤维绵羊血，混匀。校正 pH 至 7.4 ± 0.2 (25 $^{\circ}\text{C}$)。倾注 15 mL 于无菌平皿中，静置至培养基凝固。预先制备的平板未干燥时在室温放置不得超过 4 h，或在 4 $^{\circ}\text{C}$ 左右冷藏不得超过 7 d。

A. 8 吡啶乙酸酯纸片

A. 8.1 成分

吡啶乙酸酯	0.1 g
丙酮	1.0 mL

A. 8.2 制法

将吡啶乙酸脂溶于丙酮中，吸取 25 μL ~50 μL 溶液于空白纸片上（直径为 0.6 cm~1.2 cm）。室温干燥，用带有硅胶塞的棕色试管/瓶于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

A.9 0.1%蛋白胨水

A.9.1 成分

蛋白胨	1.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.9.2 制法

将蛋白胨溶解于蒸馏水中，校正 pH 至 7.0 ± 0.2 (25 $^{\circ}\text{C}$)，121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.10 1 mol/L 硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 溶液

A.10.1 成分

硫代硫酸钠（无水）	160.0 g
碳酸钠（无水）	2.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.10.2 制法

称取 160 g 无水硫代硫酸钠，加入 2g 无水碳酸钠，溶于 1000 mL 水中，缓缓煮沸 10min，冷却。

A.11 3%过氧化氢 (H_2O_2) 溶液

A.11.1 成分

30%过氧化氢(H_2O_2)溶液	100.0 mL
蒸馏水	900.0 mL

A.11.2 制法

吸取100mL30%过氧化氢(H_2O_2)溶液，溶于900mL蒸馏水中，混匀，分装备用。