



版本号
PCR-28-1CH

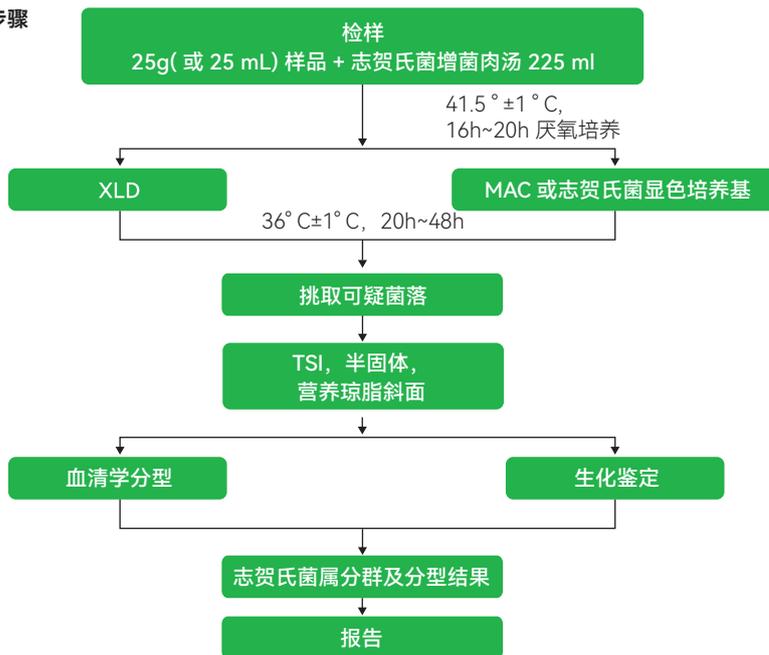
食品微生物检验志贺氏菌检验及 注意事项 GB 4789.5-2012

一、志贺氏菌的生物学特性

志贺菌属 (*Shigella*) 是人类细菌性痢疾最为常见的病原菌, 通称痢疾杆菌, 属肠杆菌科, 革兰阴性无芽孢杆菌, 无动力, 无荚膜、无鞭毛、有菌毛, 在营养培养基上生长良好。志贺菌常寄居在人及较高等猿类的肠道里, 根据宿主的健康状况和年龄, 一般只要 10 个菌体以上就能使人致病, 其致病因素主要是侵袭力 (菌毛) 菌体内毒素以及个别菌株产生的外毒素。食品接触人员个人卫生差、从事食品加工行业人员患病或带菌者污染食品、存放已污染的食品温度不适当等是食源性志贺菌流行的最主要原因。

志贺菌属共有 A、B、C、D 四个亚群, 分别是痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏志贺菌和宋氏志贺菌, 结合生化和血清上的各个特征可以区别四个亚群。A 群主要由不发酵甘露醇的菌组成 (有些菌株例外), 其他三个亚群的菌都发酵甘露醇。B 群中的菌在血清学上有内在联系, C 群中的菌彼此之间或与其他亚群血清上是无关的, D 群中的菌培养几天后一般能发酵乳糖和蔗糖。

二、检验步骤



流程图 7-1 志贺氏菌检验程序

三、样品处理及增菌

3.1 样品的处理

以无菌操作取样 25g (mL) 加入装有灭菌 225mL 志贺氏菌增菌肉汤的均质容器中, 常用均质容器有均质杯、锥形瓶、均质袋。

均质杯: 多用于不易溶解的固体样品均质, 可将固体样品切割搅拌均匀;

均质袋: 可置于拍击式均质器中均质固体, 常用于液体的均质;

锥形瓶: 可置于摇床中, 常用于液体的均质。

3.2 增菌

均质后的样品置于 41.5°C ± 1°C, 厌氧培养 16h-20h。厌氧培养可使用厌氧培养箱、厌氧培养盒和厌氧培养袋等, 志贺氏菌在志贺氏增菌肉汤中生长浑浊。

福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572 金黄色葡萄球菌 ATCC653

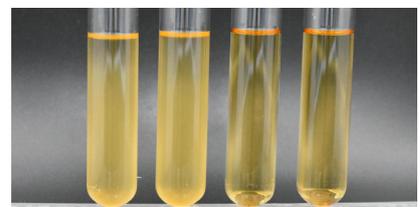


图 7-1

四、志贺氏菌的分离

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 琼脂平板或志贺氏显色培养基平板上，于 36℃ ±1℃需氧培养 20h-24h。若出现的菌落不典型或菌落较小不易观察，则继续培养至 48h 再进行观察。

4.1 XLD 琼脂平板

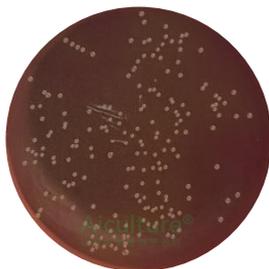
志贺氏菌在 XLD 琼脂平板上的菌落特征为粉色至无色，半透明、光滑、湿润、圆形、边缘整齐或不齐菌落。志贺氏菌大多不发酵木糖、乳糖和蔗糖，可与发酵此三种糖类的细菌（如大肠黄色菌落）区分；志贺氏菌不产硫化氢，可与产硫化氢的细菌（如大部分沙门等）区分。

4.2 MAC 或志贺显色培养基

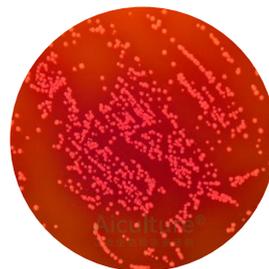
志贺氏菌在 MAC 琼脂平板上的菌落特征为无色至浅粉红色，半透明、光滑、湿润、圆形、边缘整齐或不齐菌落。志贺氏菌大多不发酵乳糖产碱，故菌落颜色为红色，可与发酵乳糖产酸（菌落颜色为黄色，或有胆盐沉淀环）的细菌区分。部分宋内志贺氏菌迟缓发酵乳糖，若培养时间过长会产生粉色菌落，混淆结果。



逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



MAC 逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



逗点显色培养基痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105

图 7-2

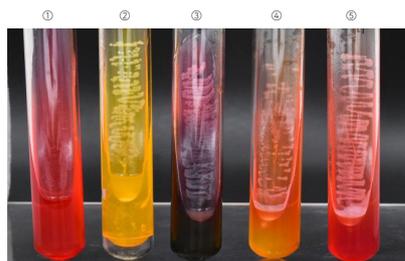
五、初步生化试验

自上述选择性平板上分别挑取 2 个以上典型或可疑菌落，分别接种三糖铁琼脂（TSI）、半固体和营养琼脂斜面一管，置于 36℃ ±1℃需氧培养 20h-24h。

5.1 三糖铁琼脂

志贺氏菌在三糖铁琼脂 TSI 中：

- ①斜面产碱呈红色且底层产酸呈黄色（发酵葡萄糖，不发酵乳糖、蔗糖）；
- ②不产气（福氏志贺氏菌 6 型可产生少量气体）；
- ③不产硫化氢。



逗点 TSI- ①空白 - ②大肠埃希氏菌 - ③肠炎沙门氏菌 - ④福氏志贺氏菌 - ⑤铜绿假单胞菌

图 7-3

附录 A

志贺氏菌增菌肉汤验证

- 产品用途：用于志贺氏菌的选择性分离和初步鉴别。
- 检验原理：胰蛋白胨提供氮源，葡萄糖提供碳源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；磷酸二氢钾和磷酸氢二钾是缓冲剂；吐温 80 是中和剂；新生霉素可抑制革兰氏阳性菌生长。

表 7-1：志贺氏菌增菌肉汤验证

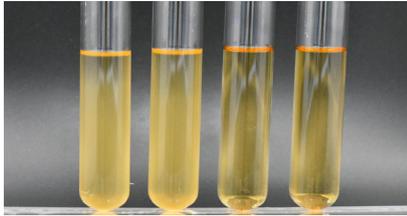


样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
志贺氏菌增菌肉汤	福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572 + 金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	134CFU(福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572) +1124CFU(金黄色葡萄球菌 ATCC6538)	在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落	在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落	符合
		L 品牌	/		在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落		符合
		H 品牌	/		在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落		符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	1124CFU	< 1CFU	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		L 品牌	/		< 1CFU		符合
		H 品牌	/		< 1CFU		符合

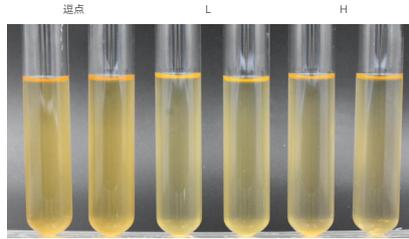
1. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在志贺氏菌增菌肉汤上的菌落特征：在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落；

2. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在志贺氏菌增菌肉汤上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

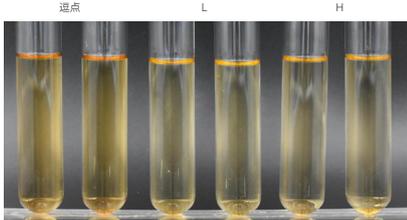
3、典型特征图片：



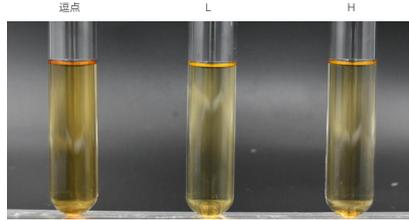
逗点志贺氏菌增菌肉汤增菌后现象



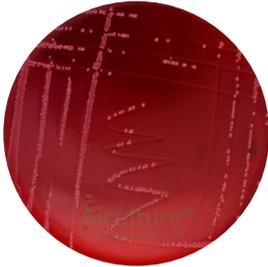
福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572+ 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 志贺氏菌增菌肉汤竞品比对



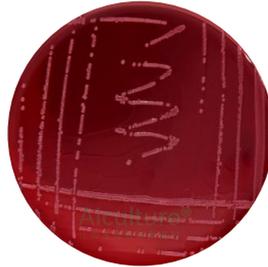
金黄色葡萄球菌 ATCC6538 志贺氏菌增菌肉汤竞品比对



志贺氏菌增菌肉汤空白竞品比对



逗点志贺氏菌增菌肉汤混菌划线 XLD



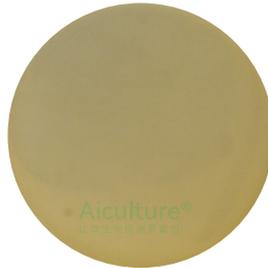
L 品牌志贺氏菌增菌肉汤混菌划线 XLD



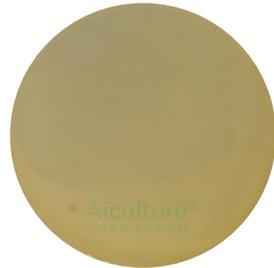
H 品牌志贺氏菌增菌肉汤混菌划线 XLD



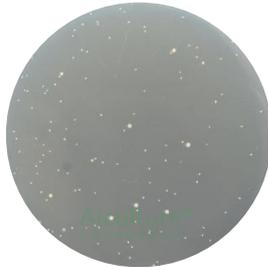
逗点 金黄色葡萄球菌倾注 TSA



L 品牌金黄色葡萄球菌倾注 TSA



H 品牌金黄色葡萄球菌倾注 TSA



福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572 计数 TSA



金黄色葡萄球菌 ATCC6538 计数 TSA

图 7-4

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572+ 金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 XLD 上 > 10CFU，无色至粉红色，半透明菌落的要求；
- 4.2 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均符合国标在 TSA 上 < 100CFU 要求；
- 4.3 感官：感官：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

附录 B

木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证



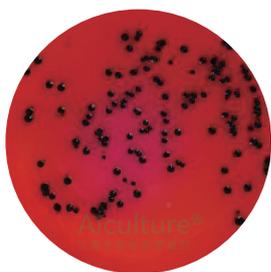
1. 产品用途：用于沙门氏菌、志贺氏菌的分离培养。
2. 检验原理：酵母膏粉提供氮源、维生素、生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；木糖、乳糖、蔗糖为可发酵糖类，产酸使酚红指示剂变黄；去氧胆酸钠抑制革兰氏阳性菌，但不影响沙门氏菌的生长；硫代硫酸钠可被某些细菌还原硫化氢，与柠檬酸铁铵中的铁盐生成黑色硫化铁；琼脂是培养基的凝固剂；酚红为 pH 指示剂。

表 7-2：木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD)	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	125	102	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	84		PR=0.8		符合
		H 品牌	139		PR=1.4		符合
	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	逗点	209	203	PR=1.1	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	172		PR=0.8		符合
		H 品牌	193		PR=0.9		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC 25922	逗点	/	/	G=3.5	G < 5	符合
		L 品牌	/	/	G=1		符合
		H 品牌	/	/	G=5.5		不符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G=0		符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合

1. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在 XLD 板上的菌落特征：黑色菌落；
 2. 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572 在 XLD 板上的菌落特征：无色菌落，无黑心；
 3. 大肠埃希氏菌 ATCC 25922 在 XLD 板上的菌落特征：黄色菌落，选择性 G < 5
 4. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在 XLD 上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

3、典型特征图片：



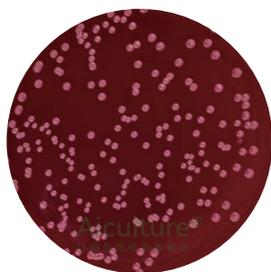
逗点鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



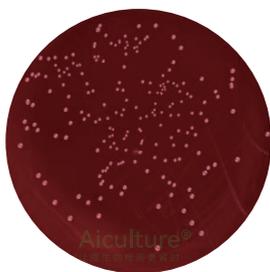
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



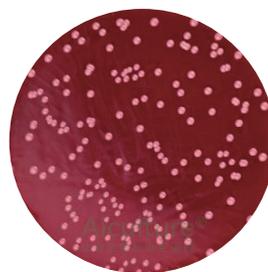
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



逗点福氏志贺氏菌
CMCC(B)51572



L 品牌 - 福氏志贺氏菌
CMCC(B)51572



H 品牌 - 福氏志贺氏菌
CMCC(B)51572

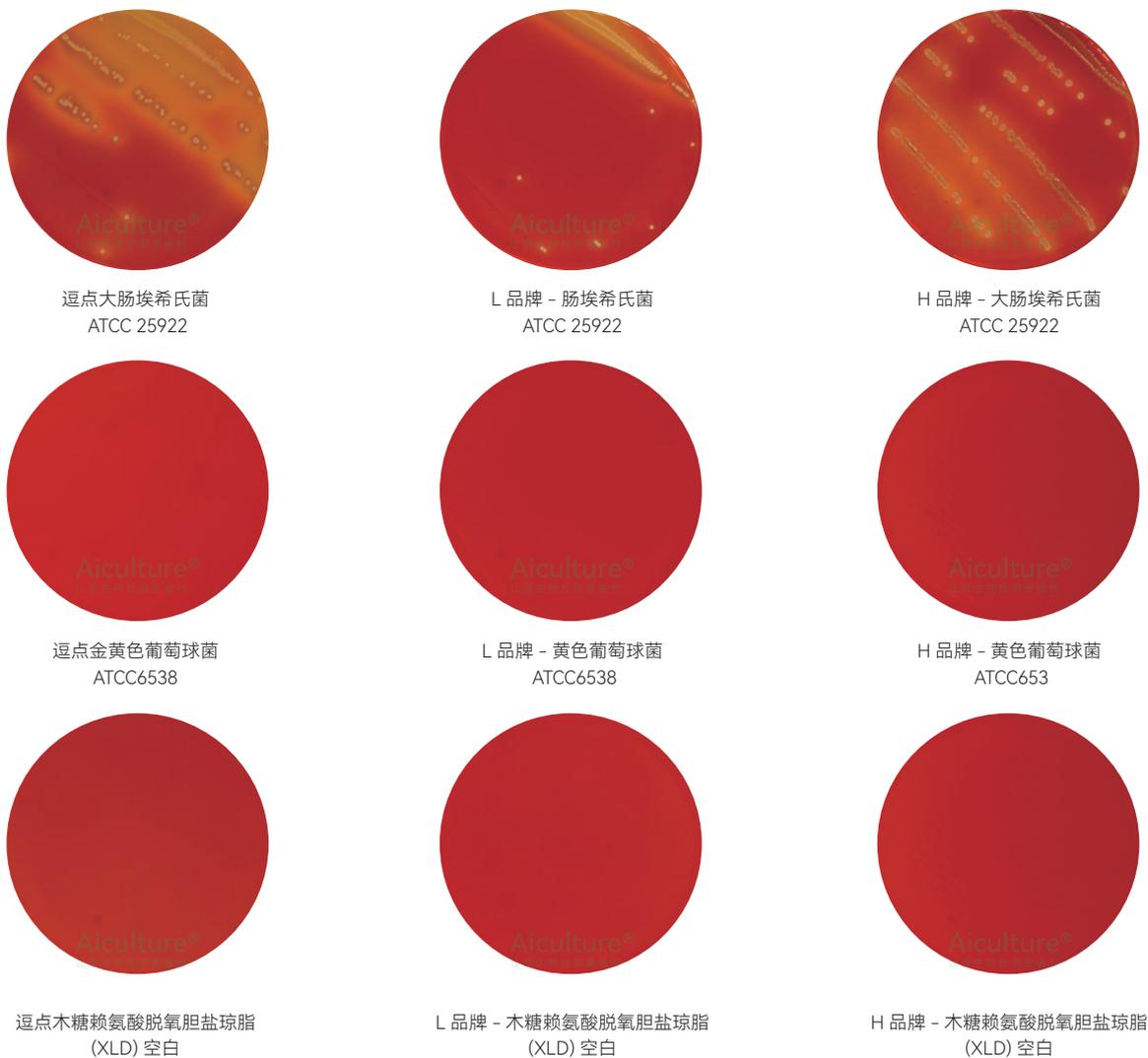


图 7-5

4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 $PR \geq 0.7$ 的要求。H 品牌菌落生长速度更快，菌落特征更明显，L 品牌生长速度较缓慢；

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC 25922，逗点、L 品牌均满足国标 $G < 5$ 的要求，H 品牌 $G=5.5$ ，不满足国标要求；金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 $G \leq 1$ 的要求；

4.3 感观：三家平板颜色无显著差异。

4.4 生长性能，逗点和 H 品牌优于 L 品牌。特异性上（特别是对大肠的抑制）L 品牌更好。

附录 C

麦康凯琼脂 (MAC) 验证



1. 产品用途：用于志贺氏菌的选择性分离

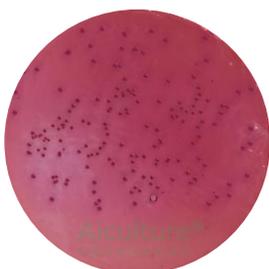
2. 检验原理：蛋白胨提供碳氮源；乳糖为可发酵的糖类；3号胆盐和结晶紫可抑制革兰氏阳性菌的生长；氯化钠维持均衡的渗透压；中性红是 pH 指示剂，细菌发酵乳糖产酸时菌落呈粉红色，并在菌落周围出现胆盐沉淀的浑浊圈。琼脂是培养基的凝固剂。

表 7-3：麦康凯琼脂 (MAC) 验证

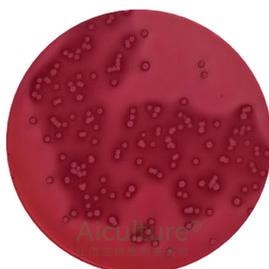
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
麦康凯琼脂 (MAC)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	170	142	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	158		PR=1.1		符合
		H 品牌	111		PR=0.8		符合
	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	逗点	216	203	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	265		PR=1.3		符合
		H 品牌	234		PR=1.1		符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G=0		符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合

1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 MAC 板上的菌落特征：鲜桃红色或粉红色，可有胆酸沉淀；
2. 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572 在 MAC 板上的菌落特征：无色至浅粉红色，半透明棕色或绿色菌落；
3. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在 MAC 板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

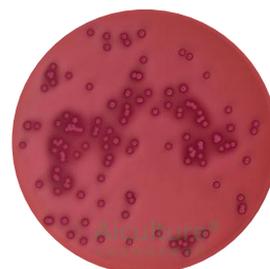
3、典型特征图片：



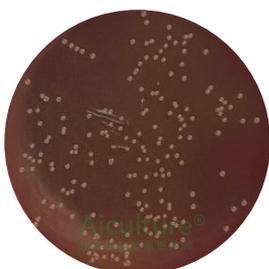
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



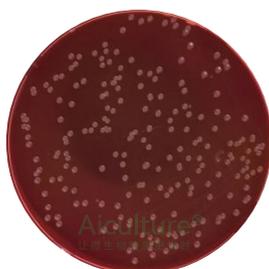
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



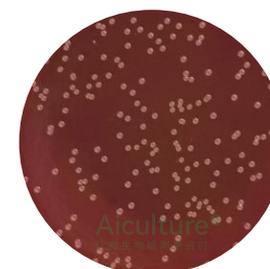
H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



L 品牌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



H 品牌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC6538



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点麦康凯琼脂 (MAC) 空白



L 品牌麦康凯琼脂 (MAC) 空白



H 品牌麦康凯琼脂 (MAC) 空白

图 7-6

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 $PR \geq 0.5$ 的要求，H 品牌、L 品牌有明显胆酸盐沉淀，目标菌落较大，逗点无胆酸盐沉淀，标菌落较小；福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572，逗点、品牌、H 品牌均满足国标 $PR \geq 0.5$ 的要求。
- 4.2 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、品牌、H 品牌均满足国标 $G \leq 1$ 的要求。
- 4.3 感观：三家平板颜色无显著差异。

附录 D

志贺氏菌显色培养基验证

1. 产品用途：用于志贺氏菌的选择性分离和初步鉴别。
2. 检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供碳氮源和微量元素；氯化钠可维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；抑制剂抑制杂菌的生长；酚红是 pH 指示剂，发酵糖产酸的菌呈黄色；混合色素对应的酶发生特异性反应，水解底物，释放出显色基团。



表 7-4：志贺氏菌显色培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
志贺氏菌显色培养基	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	逗点	32	67	PR=0.5	$PR \geq 0.5$	符合
		H 品牌	136		PR=2.0	$PR \geq 0.5$	符合
	痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105	逗点	264	233	PR=1.3	$PR \geq 0.5$	符合
		H 品牌	431		PR=1.8	$PR \geq 0.5$	符合
	产气肠杆菌 ATCC13048	逗点	/	/	蓝绿色菌落，周围培养基变黄	蓝绿色菌落，周围培养基变黄	符合
		H 品牌	/	/	绿色菌落，无环和沉淀圈	绿色菌落，无环和沉淀圈	符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	蓝绿色菌落，周围培养基变黄	蓝绿色菌落，周围培养基变黄	符合
		H 品牌	/	/	黄色菌落，有清晰环，无色素沉淀圈	黄色菌落，有清晰环，无色素沉淀圈	符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC 6538	逗点	/	/	G=0	$G \leq 1$	符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合

1. 生长率：逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572、痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：白色菌落，周围培养基紫红色；H 品牌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572、痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：白色至粉红色的菌落，周围培养基变为红色；
2. 特异性：逗点产气肠杆菌 ATCC13048、大肠埃希氏菌 ATCC25922 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：蓝绿色菌落，周围培养基变黄；H 品牌产气肠杆菌 ATCC13048 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：绿色菌落，无环和沉淀圈；H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922 在志贺氏菌显色板上的菌落特征黄色菌落，有清晰环，无色素沉淀圈；
3. 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：选择性 $G \leq 1$ ；

3、典型特征图片：

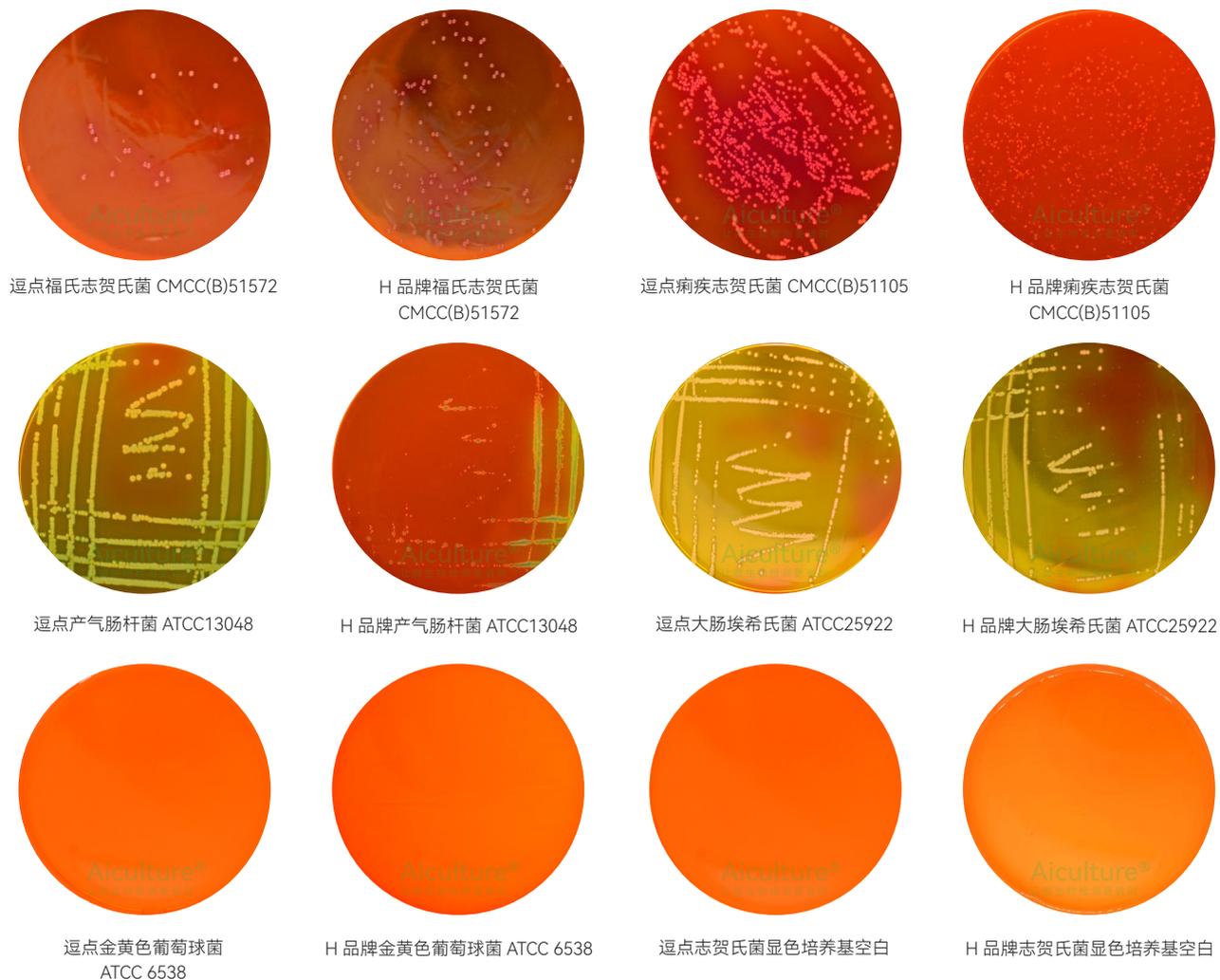


图 7-7

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572、痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105 逗点、H 品牌均满足国标 $PR \geq 0.5$ 的要求。H 品牌菌落生长速度更快；
- 4.2 选择性：逗点、H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538，逗点、H 品牌均满足国标 $G \leq 1$ 的要求；
- 4.3 特异性：产气肠杆菌 ATCC13048、痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105 逗点、H 品牌均满足菌落颜色特征要求。
- 4.4 感观：两家平板颜色无显著差异。
- 4.5 2 家产品无明显差异，都满足国标。

附录 E

三糖铁琼脂 (TSI) 验证

- 1、产品用途：用于鉴别肠道菌发酵蔗糖、乳糖、葡萄糖及产生硫化氢的生化反应。
- 2、检验原理：胨、牛肉浸出粉提供氮源、维生素、矿物质；乳糖、葡萄糖、蔗糖为可发酵糖类，其产酸时通过酚磺酞指示剂测出，酸性呈黄色，碱性呈红色；硫代硫酸钠可被某些细菌还原为硫化氢，与硫酸亚铁中的铁盐生成黑色硫化铁；氯化钠维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂。

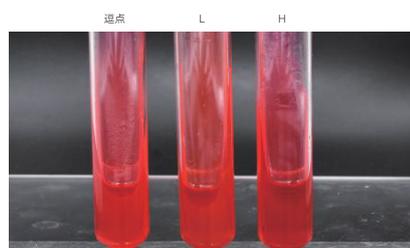


表 7-5：三糖铁琼脂 (TSI) 验证

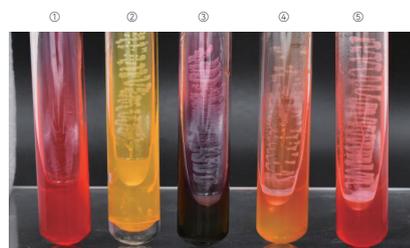
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
麦康凯琼脂 (MAC)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
	肠炎沙门氏菌 CMCC (B) 50335	逗点	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢		符合
	福氏志贺氏菌 ATCC12022	逗点	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢		符合
	铜绿假单胞菌 ATCC27853	逗点	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢		符合

1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在三糖铁琼脂 (TSI) 上生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢;
 2. 肠炎沙门氏菌 CMCC (B) 50335 生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢;
 3. 福氏志贺氏菌 ATCC12022 生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢;
 4. 铜绿假单胞菌 ATCC27853 生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢;

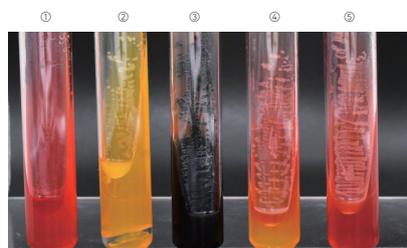
3、典型特征图片：



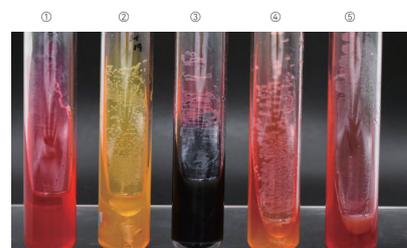
空白



逗点 TSI- ①空白 - ②大肠埃希氏菌 - ③肠炎沙门氏菌 - ④福氏志贺氏菌 - ⑤铜绿假单胞菌



L 品牌 TSI- ①空白 - ②大肠埃希氏菌 - ③肠炎沙门氏菌 - ④福氏志贺氏菌 - ⑤铜绿假单胞菌



H 品牌 TSI- ①空白 - ②大肠埃希氏菌 - ③肠炎沙门氏菌 - ④福氏志贺氏菌 - ⑤铜绿假单胞菌

图 7-8

4、验证结果小结：

- 4.1 生化特性：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、肠炎沙门氏菌 CMCC (B) 50335、福氏志贺氏菌 ATCC12022、铜绿假单胞菌 ATCC27853 生长特性均符合国标要求；
- 4.2 感官：逗点、L 品牌、H 品牌空白管无明显差异。
- 4.3 三家产品无明显差别，在肠炎沙门氏菌上，L 品牌更优秀 - 黑色菌更明显。

COMPANY PROFILE

企业简介

逗点生物 (Biocomma) 成立于 2006 年, 总部位于深圳, 主营生命科学和医疗健康产品的研发、生产和销售, 业务遍布五十多个国家和地区。

公司为食品和临床检测提供样本前处理解决方案, 包括过滤耗材、色谱耗材和微生物培养基。同时为生命科学研发和生产型厂家提供滤芯、拭子、试剂瓶、无菌液体和培养基等产品。努力让世界更健康, 更美好。



逗点生物公众号



逗点商城



逗点 1688



逗点锐竞



逗点喀斯玛

WSW-01-002CH

深圳逗点生物技术有限公司
Biocomma Limited

地址: 深圳市龙岗区吉华街道甘坑社区甘李六路 12 号中海信创新产业城 12 栋 14 楼 1401-1406

TEL: 400-878-7248 WEB: www.biocomma.cn EMAIL: info@biocomma.com