

中华人民共和国国家标准

GB 4789.12—2025

食品安全国家标准

食品微生物学检验

产肉毒毒素梭菌及肉毒毒素检验

2025-09-02 发布

2026-03-02 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.12—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》。

本标准与 GB 4789.12—2016 相比,主要变化如下:

- 增加了术语和定义;
- 增加了梭菌实时荧光 PCR 鉴定方法;
- 修改了标准名称;
- 修改了范围;
- 修改了设备和材料、培养基和试剂;
- 修改了检验程序、操作步骤、结果与报告及附录。

食品安全国家标准

食品微生物学检验

产肉毒毒素梭菌及肉毒毒素检验

1 范围

本标准规定了食品中产肉毒毒素梭菌及肉毒毒素(botulinum neurotoxin)的检验方法。
本标准适用于食品中产肉毒毒素梭菌及肉毒毒素的检验。

2 术语和定义

产肉毒毒素梭菌

革兰氏阳性厌氧杆菌,能形成卵圆形芽孢,一般芽孢会大于菌体、位于次端,在适宜培养条件下能产生肉毒毒素的一类细菌的统称。包含肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)等。

3 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。

- 3.1 冰箱:2℃~8℃、-18℃~-20℃、-80℃。
- 3.2 天平:感量0.1g、0.001g。
- 3.3 pH计、pH比色管或精密pH试纸。
- 3.4 无菌剪刀、镊子、试剂勺。
- 3.5 均质器或无菌乳钵。
- 3.6 离心机:3 000g、14 000g。
- 3.7 厌氧培养装置:厌氧培养箱、厌氧罐、厌氧袋或提供同等厌氧效果的装置。
- 3.8 恒温培养箱:36℃±1℃、28℃±1℃。
- 3.9 恒温装置:36℃±1℃、60℃±1℃、80℃±1℃、100℃±1℃。
- 3.10 显微镜:100×~1000×。
- 3.11 普通PCR仪和实时荧光PCR仪。
- 3.12 普通电泳仪或毛细管电泳仪。
- 3.13 凝胶成像系统或紫外检测仪。
- 3.14 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 3.15 微量移液器及配套灭菌吸头:2μL、10μL、20μL、100μL、200μL、1 000μL。
- 3.16 无菌吸管:1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)、25mL(具0.1mL刻度)。
- 3.17 无菌锥形瓶:100mL。
- 3.18 培养皿:直径90mm。
- 3.19 离心管:1.5mL、5mL、50mL。
- 3.20 无菌滤器:滤膜孔径0.45μm、0.22μm。

3.21 PCR 反应管。

3.22 无菌注射器:1 mL。

3.23 小鼠:体重 15 g~20 g,每一批次试验应使用同一品系单一性别的 KM(昆明)或 ICR 小鼠,同性别小鼠个体间体重相差不超过平均体重的 $\pm 20\%$,且如是雌性动物应未交配、未妊娠。

4 培养基和试剂

除另有规定外,PCR 试验所用试剂为分析纯或符合生化试剂标准,培养基制备用水应符合 GB 4789.28 中的要求。

4.1 生理盐水:见 A.1。

4.2 庖肉培养基:见 A.2。

4.3 胰蛋白酶胰蛋白胨葡萄糖酵母膏肉汤(TPGYT)培养基:见 A.3。

4.4 卵黄琼脂培养基:见 A.4。

4.5 哥伦比亚血琼脂培养基:见 A.5。

4.6 明胶磷酸盐缓冲液:见 A.6。

4.7 磷酸盐缓冲液(PBS):见 A.7。

4.8 革兰氏染色液:见 A.8。

4.9 胰蛋白酶:活力为 1:250 或 0.25%。

4.10 肉毒毒素诊断血清:混合型、A 型、B 型、E 型、F 型。

4.11 1 mol/L 氢氧化钠。

4.12 1 mol/L 盐酸。

4.13 无水乙醇和 95%乙醇。

4.14 10 mg/mL 溶菌酶溶液。

4.15 10 mg/mL 蛋白酶 K 溶液。

4.16 3 mol/L 乙酸钠溶液(pH 5.2)。

4.17 TE 缓冲液。

4.18 引物和探针:临用时用灭菌超纯水或 TE 缓冲液配制成浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

4.19 10 \times PCR 缓冲液:0.5 mmol/L KCl、0.1 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)、0.015 mmol/L MgCl₂。

4.20 25 mmol/L MgCl₂。

4.21 dNTPs:dATP、dTTP、dCTP、dGTP 浓度均为 10 mmol/L。

4.22 *Taq* DNA 聚合酶:5 U/ μL 。

4.23 琼脂糖:电泳级。

4.24 溴化乙锭、Goldview 或其他核酸染料。

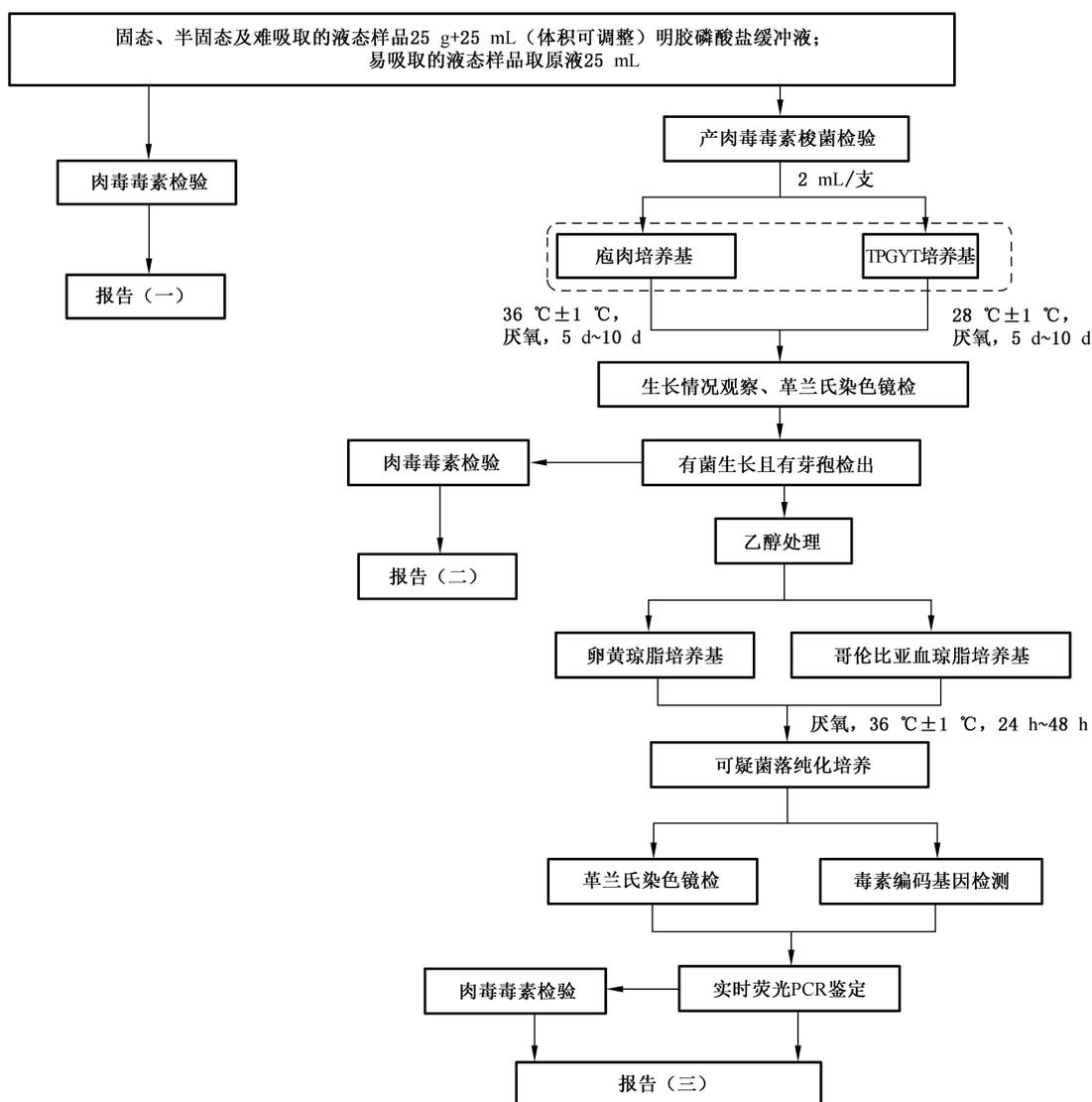
4.25 5 \times TBE 或 10 \times TAE 缓冲液。

4.26 6 \times 加样缓冲液。

4.27 DNA 分子质量标准:涵盖目标条带长度。

5 检验程序

产肉毒毒素梭菌及肉毒毒素检验程序见图 1。



注：报告（一）：样品中未检出或检出（某型别）肉毒素；报告（二）：样品中未检出或检出产（某型别）肉毒素梭菌；报告（三）：样品中未检出或检出产（某型别）肉毒素的某种梭菌。

图 1 产肉毒素梭菌及肉毒素检验程序

6 操作步骤

6.1 样品制备

固态、半固态及难吸取的液态食品，以无菌操作称取 25 g，放入无菌均质袋或无菌乳钵，块状食品以无菌操作切碎。含水量较高的食品加入 25 mL 明胶磷酸盐缓冲液，乳粉、牛肉干等含水量低的食物加入 50 mL（或更多，稀释液体积可根据样品水分含量酌情增减，一般稀释至可接种即可）明胶磷酸盐缓冲液，浸泡 30 min，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min 或用无菌研杵研磨制备样品匀液，收集备用。

易吸取的液态食品摇匀后取 25 mL 备用。

注：取样后的剩余样品放 2 °C~8 °C 冷藏保存，直至检验报告发出后，检出阳性的样品采用压力蒸汽灭菌方式进行无害化处理，建议 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min 以上。

6.2 肉毒毒素检验

6.2.1 毒素液制备

取 6.1 中制备的样品匀液约 30 mL 或均匀液体样品 25 mL 放入无菌离心管中,3 000 g 离心 10 min~20 min,收集上清液分为两份放入无菌试管中,一份直接用于毒素检测,另一份按 6.2.2 用胰蛋白酶处理后进行毒素检测。

6.2.2 胰蛋白酶处理上清液的制备

用 1 mol/L 氢氧化钠或 1 mol/L 盐酸调节上清液 pH 至 6.2 ± 0.2 ,按 9 份上清液加 1 份胰蛋白酶(活力 1:250)溶液,混匀, $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,期间间或轻轻摇动反应液。

6.2.3 毒素检出

用 1 mL 注射器分别取离心上清液和胰蛋白酶处理上清液分别腹腔注射小鼠各 3 只,每只 0.5 mL,观察和记录小鼠 48 h 内的中毒表现。典型肉毒毒素中毒症状通常在 24 h 内出现,多数在 6 h 内发病和死亡,其主要表现为竖毛,四肢瘫软,呼吸困难、呈现风箱式呼吸,腰腹部凹陷、宛如蜂腰,多因呼吸衰竭而死亡,可初步判定为肉毒毒素所致。若小鼠在 24 h 后发病或死亡,应仔细观察小鼠症状,必要时采用低温蒸发等方法浓缩上清液重复试验,以确认肉毒毒素中毒。若小鼠出现猝死(注射后 30 min 内)导致肉毒毒素中毒症状不明显时,应用明胶磷酸盐缓冲液对毒素上清液进行适当稀释,重复试验。

6.2.4 毒素确证

上清液或(和)胰蛋白酶处理上清液的毒素试验阳性者,取相应阳性试验液 3 份,每份 0.5 mL,其中第一份加等量混合型肉毒毒素诊断血清,混匀, $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min~45 min;第二份加等量明胶磷酸盐缓冲液,混匀后煮沸 10 min;第三份加等量明胶磷酸盐缓冲液,混匀。将 3 份混合液分别腹腔注射小鼠各 2 只,每只 0.5 mL,观察 96 h 内小鼠的中毒和死亡情况。

若注射第一份和第二份混合液的小鼠未死亡,而第三份混合液小鼠发病死亡,并出现肉毒毒素中毒的典型症状,则判定检测样品中检出肉毒毒素。

6.2.5 毒力测定(如需开展,可按以下条款执行)

取 6.2.4 中确证阳性的上清液,用明胶磷酸盐缓冲液制备一定稀释倍数的稀释液,如 10 倍、50 倍、100 倍、500 倍等,分别腹腔注射小鼠各 2 只,每只 0.5 mL,观察 96 h 内小鼠的中毒和死亡情况,计算最低致死剂量(minimum lethal dose,MLD),以 MLD/mL 或 MLD/g 表示,评估样品中肉毒毒素毒力,MLD 等于小鼠全部死亡的最高稀释倍数乘以样品稀释倍数。例如,样品稀释两倍制备的上清液,再稀释 100 倍组的小鼠全部死亡,而 500 倍稀释液组的存活,则该样品毒力为 200 MLD/g 或 200 MLD/mL。

6.2.6 毒素定型(如需开展,可按以下条款执行)

根据毒力测定结果,用明胶磷酸盐缓冲液将上清液稀释至 10 MLD/mL~1 000 MLD/mL 用于定型试验,分别与各单型肉毒毒素诊断血清等量混合(国产诊断血清一般为冻干血清,用 1 mL 生理盐水溶解), $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min~45 min,分别腹腔注射小鼠 2 只,每只 0.5 mL,观察 96 h 内小鼠的中毒和死亡情况。同时,用明胶磷酸盐缓冲液代替诊断血清,与上清液等量混合作为小鼠试验对照。当某一单型诊断血清组动物未发病且正常存活,而对照组和其他单型诊断血清组动物发病死亡,则判定样品

中所含肉毒毒素为该型肉毒毒素。

注：未经胰蛋白酶激活处理的样品上清液的毒素检出或确证试验为阳性者，则毒力测定和定型试验可省略胰蛋白酶处理试验。

6.3 产肉毒毒素梭菌检验

6.3.1 增菌培养

6.3.1.1 取庖肉培养基 4 支和 TPGY 培养基 2 支，隔水煮沸 15 min，排除溶解氧，迅速冷却，切勿摇动，在 TPGY 培养基中缓慢加入胰蛋白酶溶液至液面下肉汤中，每支 1 mL，制备成 TPGYT 培养基。

6.3.1.2 吸取 6.1 制备的样品匀液接种至庖肉培养基和 TPGYT 培养基，每管接种 2 mL。每份样品接种 4 支庖肉培养基，其中 2 支直接放置 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 5 d，另 2 支放置 $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min，再放置 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 5 d；接种 2 支 TPGYT 培养基， $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 5 d。

注：接种时，用无菌吸管轻轻吸取样品匀液或离心沉淀悬浮液，将吸管口小心插入肉汤管底部，缓缓放出样液至肉汤中，切勿搅动或吹气。

6.3.1.3 检查记录增菌培养物的浊度、产气、肉渣颗粒消化情况，并注意气味。部分产肉毒毒素梭菌培养物为肉汤混浊、产气、消化肉粒、有异臭味。

6.3.1.4 取增菌培养物进行革兰氏染色镜检，观察菌体形态，注意是否有芽孢、芽孢的相对比例、芽孢在细胞内的位置。

6.3.1.5 若增菌培养物 5 d 无菌生长，应延长培养至 10 d，观察生长情况。

6.3.1.6 取有菌生长且有芽孢的阳性管上清液，按 6.2 的方法进行毒素检出和确证试验，必要时进行毒素定型试验，阳性结果可证明样品中有产肉毒毒素梭菌存在。

6.3.2 分离与纯化培养

6.3.2.1 吸取 1 mL 有菌生长且有芽孢的阳性管增菌液至无菌管中，加入 1 mL 无水乙醇，混匀，在室温下放置 1 h。

6.3.2.2 取经乙醇处理的增菌液分别划线接种至卵黄琼脂平板和哥伦比亚血琼脂平板， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 24 h~48 h。

6.3.2.3 观察平板培养基上菌落形态。在卵黄琼脂平板上，产肉毒毒素梭菌菌落呈隆起或扁平、光滑或粗糙，易蔓延生长，边缘不规则，在菌落周围形成乳色沉淀晕圈，在斜射光下观察，菌落表面呈现珍珠样虹彩，这种光泽区可随蔓延生长扩散到不规则边缘区外的晕圈，部分型别菌株周围形成的乳色沉淀晕圈、珍珠样虹彩光泽不明显。在哥伦比亚血琼脂平板上，产肉毒毒素梭菌呈圆形、半透明扁平菌落，边缘整齐或不整齐，易蔓延生长，部分型别菌株也可形成白色隆起、不蔓延生长菌落。

6.3.2.4 在分离培养平板上选择 5 个梭菌可疑菌落（少于 5 个时则全选），划线接种卵黄琼脂平板或哥伦比亚血琼脂平板， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 24 h~48 h，按 6.3.2.3 观察菌落形态及其纯度。

6.3.3 鉴定试验

6.3.3.1 染色镜检

挑取可疑单个菌落进行涂片、革兰氏染色和镜检。产肉毒毒素梭菌菌体形态为革兰氏阳性杆菌、芽孢卵圆形、一般芽孢会大于菌体且位于次端，菌体呈网球拍状。

6.3.3.2 毒素编码基因检测

挑取 6.3.3.1 中典型菌落进行毒素编码基因检测。

a) 菌株培养：挑取可疑菌落或待鉴定菌株接种 TPGY 培养基， $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 20 h~24 h。

b) DNA 模板制备:吸取 TPGY 培养液 1.4 mL 至无菌离心管中,14 000 g 离心 2 min,弃上清,加入 1.0 mL PBS 悬浮菌体,14 000 g 离心 2 min,弃上清,用 400 μL PBS 重悬沉淀,加入 10 mg/mL 溶菌酶溶液 100 μL,摇匀,36 °C ± 1 °C 恒温装置中放置 15 min,加入 10 mg/mL 蛋白酶 K 溶液 10 μL,摇匀,60 °C ± 1 °C 恒温装置 1 h,在 100 °C 恒温装置中放置 10 min 后经 14 000 g 离心 2 min,上清液转移至无菌小离心管中,加入 3 mol/L 乙酸钠溶液 50 μL 和 95% 乙醇 1.0 mL,摇匀,-80 °C 或 -20 °C 放置 30 min,14 000 g 离心 10 min,弃去上清液,沉淀干燥后溶于 200 μL TE 缓冲液,作为 DNA 模板使用。

注:根据实验室实际情况,也可采用商品化试剂盒制备 DNA 模板。

c) 核酸浓度测定(必要时):取 5 μL DNA 模板溶液,加超纯水稀释至 1 mL,用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测 260 nm 和 280 nm 波段的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。按式(1)计算 DNA 质量浓度。当质量浓度在 0.34 μg/mL ~ 340 μg/mL 或 A_{260}/A_{280} 在 1.7~1.9 之间时,适宜于 PCR 扩增。

$$C = A_{260} \times N \times 50 \dots\dots\dots(1)$$

式中:

C ——DNA 质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

A_{260} ——260 nm 处的吸光值;

N ——核酸稀释倍数。

d) PCR 扩增:

1) 分别采用针对各型肉毒毒素编码基因设计的特异性引物(见表 1)进行 PCR 扩增,包括 A 型肉毒毒素(botulinum neurotoxin A, BoNT/A)、B 型肉毒毒素(botulinum neurotoxin B, BoNT/B)、E 型肉毒毒素(botulinum neurotoxin E, BoNT/E)和 F 型肉毒毒素(botulinum neurotoxin F, BoNT/F)共计四型肉毒毒素编码基因,每个 PCR 反应管检测一种型的肉毒毒素编码基因。

表 1 肉毒毒素编码基因 PCR 检测的引物序列及其产物

肉毒毒素编码基因型别	引物	序列(5'-3')	扩增长度/ bp	序列位置
A 型	上游引物	GTG ATA CAA CCA GAT GGT AGT TAT AG	983	GenBank 号:CP046450.1 位置:1 596 654-1 597 636
	下游引物	AAA AAA CAA GTC CCA ATT ATT AAC TTT		
B 型	上游引物	GAG ATG TTT GTG AAT ATT ATG ATC CAG	492	GenBank 号:CP014219.1 位置:927 932-928 423
	下游引物	GTT CAT GCA TTA ATA TCA AGG CTG G		
E 型	上游引物	CCA GGC GGT TGT CAA GAA TTT TAT	410	GenBank 号:CP010521.1 位置:1 165 510-1 165 919
	下游引物	TCA AAT AAA TCA GGC TCT GCT CCC		
F 型	上游引物	GCT TCA TTA AAG AAC GGA AGC AGT GCT	1137	GenBank 号:CP022400.1 位置:2 177 283-2 178 419
	下游引物	GTG GCG CCT TTG TAC CTT TTC TAG G		

2) 反应体系配制见表 2,反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行相应调整。

表 2 肉毒毒素编码基因 PCR 检测的反应体系

试剂	终浓度	加入体积/ μL
10 \times PCR 缓冲液	1 \times	5.0
25 mmol/L MgCl_2	2.5 mmol/L	5.0
10 mmol/L dNTPs	0.2 mmol/L	1.0
10 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物	0.5 $\mu\text{mol/L}$	2.5
10 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物	0.5 $\mu\text{mol/L}$	2.5
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.05 U/ μL	0.5
DNA 模板	—	1.0
ddH ₂ O	—	32.5
总体积	—	50.0

注：也能使用商品化试剂盒进行反应体系配制。

- 3) 反应程序：预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min；循环参数 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min；循环数 40；后延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。
- 4) PCR 扩增体系应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。用含有已知产肉毒毒素梭菌菌株 DNA 或含肉毒毒素编码基因的质控品作阳性对照，非产肉毒毒素梭菌基因组 DNA 作阴性对照，无菌水作空白对照。
- e) 凝胶电泳检测 PCR 扩增产物：用 0.5 \times TBE 或 1 \times TAE 缓冲液配制 1.2%~1.5% 的琼脂糖凝胶，凝胶加热融化后冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右加入相应体积的核酸染料（溴化乙锭 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、Goldview 5 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ 或其他核酸染料）制备胶块，取 10 μL PCR 扩增产物与 2.0 μL 6 \times 加样缓冲液混合，点样，其中一孔加入 DNA 分子质量标准。0.5 \times TBE 或 1 \times TAE 电泳缓冲液，10 V/cm 恒压电泳，根据溴麝香草酚蓝的移动位置确定电泳时间，用紫外检测仪或凝胶成像系统观察和记录结果。PCR 扩增产物也可采用毛细管电泳仪进行检测。
- f) 结果判定：阴性对照和空白对照均未出现条带，阳性对照出现预期大小的扩增条带（表 1），判定本次 PCR 检测成立；待测样品出现预期大小的扩增条带，判定为 PCR 结果阳性，根据表 1 判定产肉毒毒素梭菌菌株型别，待测样品未出现预期大小的扩增条带，判定 PCR 结果为阴性。

注：PCR 试验环境条件和过程控制参照 GB/T 27403 的规定执行。

6.3.3.3 实时荧光 PCR 鉴定

挑取 6.3.3.2 中肉毒毒素编码基因检测阳性的菌株进行实时荧光 PCR 鉴定：

- a) DNA 模板制备：见 6.3.3.2 的 b) 部分。
- b) PCR 反应体系：总反应体系体积为 25 μL ，10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL 、上/下游引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）各 0.8 μL 、探针（10 $\mu\text{mol/L}$ ）0.5 μL 、dNTPs（2.5 $\mu\text{mol/L}$ ）3 μL 、*Taq* DNA 聚合酶（5U/ μL ）0.5 μL 、DNA 模板 1 μL 、灭菌去离子水补足至 25 μL 。每个反应均应设置至少 2 个平行。

注：反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。也能选用含有 PCR 缓冲液、 MgCl_2 、dNTP 和 *Taq* DNA 聚合酶等成分基于 Taqman 探针的实时荧光 PCR 预混液。

- c) PCR 反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min（可根据不同厂家的聚合酶要求调整），1 个循环；95 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s（FAM 荧光采集），45 个循环。

注：PCR 反应参数能根据基因扩增仪型号进行适当调整。

- d) 引物和探针序列见表 3。

表 3 产肉毒毒素梭菌荧光 PCR 检测引物和探针序列

菌种名称	基因名称	引物和探针	序列(5'-3')	序列位置
梭菌属	16S rRNA	上游引物	GCT CGT GTC GTG AGA TGT T	GenBank 号:MT279666.1 位置:1 036-1 123
		下游引物	CTC RYT AGA GTS CTC AAC YWA A	
		探针	FAM-AAY AAY AAG GGT TGC GCT CGT TGC-BHQ1	
肉毒梭菌	hydA	上游引物	GTG GYA CTA CAA GTA TAG TAG ATC AT	GenBank 号:CP046450.1 位置:3 318 645-3 318 779
		下游引物	GTT GTA TAA CAC CAT GAA AMC CAT AG	
		探针	FAM-TCG GAC CTA AAG GAT GTG ATT TAC ACC A-BHQ1	
丁酸梭菌	hydA	上游引物	ATG GGT TAG GCA AGC AGA AA	GenBank 号:CP033249.1 位置:3 318 645-3 318 779
		下游引物	TCC TTC CAC TGT AGG GTA ATA TG	
		探针	FAM-CAC CAC AAC AAA TAT TTG GAG CAG CAA GT-BHQ1	

e) 对照设置:检测过程(包括 DNA 提取)中,每个反应均应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。其中阳性对照模板为扩增片段的阳性克隆分子 DNA 或阳性菌株 DNA,阴性对照模板为非梭菌菌株 DNA,空白对照模板为无菌水。

f) 结果判读:阳性对照出现典型扩增曲线,Ct 值 <30 ;阴性对照无典型扩增曲线或 Ct 值 ≥ 40 ;空白对照无典型扩增曲线或 Ct 值 ≥ 40 。否则,结果视为无效。

当待测菌株检测 Ct 值 ≥ 40 时,判定检测结果为梭菌属或某种梭菌阴性;当待测菌株 Ct 值 <30 时,可判定检测结果为梭菌属或某种梭菌阳性;当待测菌株 Ct 值为 $30 \leq Ct < 40$ 时,应重复试验,若重复试验结果 Ct 值 ≥ 40 则判定为梭菌属或某种梭菌阴性,否则,判定为梭菌属或某种梭菌阳性。

注:若肉毒毒素检测结果为阳性,实时荧光 PCR 鉴定结果为梭菌属阳性,肉毒梭菌和丁酸梭菌均为阴性,可进一步检测菌株是否为其他某种产肉毒毒素梭菌。

6.3.3.4 菌株产毒试验

将 6.3.3.2 或 6.3.3.3 检出的可疑产肉毒毒素梭菌阳性菌株接种庖肉培养基或 TPGYT 培养基,按 6.3.1.2 条件厌氧培养 5 d,按 6.2 的方法进行肉毒毒素检验。毒素确证试验阳性者,判定为产肉毒毒素梭菌。也可根据毒素定型试验结果判定梭菌型别。

注:根据 PCR 阳性菌株型别,可直接用相应型别的肉毒毒素诊断血清进行毒素确证试验。

7 结果与报告

7.1 肉毒毒素检验结果报告

根据 6.2.3 和 6.2.4 试验结果,报告样品中检出或未检出肉毒毒素。

根据 6.2.6 定型试验结果,报告样品中检出某型别肉毒毒素。

7.2 产肉毒毒素梭菌检验结果报告

根据 6.3 各项试验结果,报告样品中未检出或检出产某型肉毒毒素的某种梭菌。

附录 A 培养基和试剂

A.1 生理盐水

A.1.1 成分

NaCl	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将 NaCl 加入至 1 000 mL 蒸馏水中,溶解分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 庖肉培养基

A.2.1 成分

蛋白胨	30.0 g
牛肉浸粉	3.0 g
酵母浸粉	5.0 g
磷酸二氢钠	5.0 g
葡萄糖	3.0 g
可溶性淀粉	2.0 g
蒸馏水	1 000 mL
碎肉渣	适量

A.2.2 制法

将除碎肉渣外的各成分加入蒸馏水中,搅匀后加热溶解,备用。

在 20 mm×150 mm 试管中先加入碎肉渣高 1 cm~2 cm,每管加入还原铁粉 0.1 g~0.2 g 或少许铁屑,再加入配制肉汤 15 mL,如厌氧装置较简易,且在有氧环境中操作时间较长,可向管内加入液体石蜡覆盖培养基 0.3 cm~0.4 cm,121 °C 高压灭菌 15 min,灭菌后的培养基在 25 °C 的 pH 为 7.4±0.1。

A.3 胰蛋白酶胰蛋白胨葡萄糖酵母膏肉汤(TPGYT)培养基

A.3.1 基础成分(TPGY)

胰酪胨	50.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母浸粉	20.0 g
葡萄糖	4.0 g
硫乙醇酸钠	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 胰蛋白酶溶液

称取胰蛋白酶(活力 1 : 250)1.5 g,加入 100 mL 蒸馏水中溶解,使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,

2℃~8℃保存备用。

A.3.3 制法

将 A.3.1 中成分溶于蒸馏水中,分装 20 mm×150 mm 试管,每管 15 mL,加入液体石蜡覆盖培养基 0.3 cm~0.4 cm,121℃高压灭菌 10 min,灭菌后的培养基在 25℃的 pH 为 7.2±0.1。2℃~8℃冷藏,两周内使用。临用接种样品时,每管加入胰蛋白酶溶液 1.0 mL。

A.4 卵黄琼脂培养基

A.4.1 基础培养基成分

酵母浸粉	5.0 g
豚豚	20.0 g
胰豚	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 卵黄乳液

用硬刷清洗鸡蛋 2 个~3 个,沥干,杀菌消毒表面,无菌打开,取出内容物,弃去蛋白,用无菌注射器吸取蛋黄,放入无菌容器中,加等量无菌生理盐水,充分混匀,2℃~8℃保存备用。

A.4.3 制法

将 A.4.1 中成分溶于蒸馏水中,分装,121℃高压灭菌 15 min,灭菌后的培养基在 25℃的 pH 为 7.0±0.2,冷却至 50℃左右,按每 100 mL 基础培养基加入 15 mL 卵黄乳液,充分混匀,倾注平板,36℃±1℃培养 24 h 进行无菌检查后,2℃~8℃保存备用。

A.5 哥伦比亚血琼脂培养基

A.5.1 基础培养基成分

胰酪豚	10.0 g
肉胃蛋白酶水解物	5.0 g
酵母浸粉	5.0 g
氯化钠	5.0 g
心胰酶消化物	3.0 g
淀粉	1.0 g
琼脂	13.0~15.0 g

A.5.2 无菌脱纤维羊血

无菌操作条件下,将绵羊血倒入盛有灭菌玻璃珠的容器中,沿同一方向连续振摇约 10 min,静置后除去附有血纤维的玻璃珠即可。

A.5.3 制法

将 A.5.1 中成分溶于 1 000 mL 蒸馏水中,分装,121℃高压灭菌 15 min,灭菌后的培养基在 25℃的 pH 为 7.3±0.2,冷却至 45℃左右,加入 5%无菌脱纤维羊血,充分混匀,倾注平板,备用。

A.6 明胶磷酸盐缓冲液**A.6.1 成分**

明胶	2.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	4.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

将 A.6.1 中成分溶于蒸馏水中,121 °C 高压灭菌 15 min,灭菌后在 25 °C 的 pH 为 6.2。

A.7 磷酸盐缓冲液(PBS)**A.7.1 成分**

氯化钠	7.650 g
磷酸氢二钠	0.724 g
磷酸二氢钾	0.210 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

将 A.7.1 中成分溶于蒸馏水中,121 °C 高压灭菌 15 min,灭菌后在 25 °C 的 pH 为 7.4。

A.8 革兰氏染色液**A.8.1 结晶紫染色液****A.8.1.1 成分**

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20.0 mL
1%草酸铵水溶液	80.0 mL

A.8.1.2 制法

将结晶紫完全溶于乙醇中,再与草酸铵水溶液混合。

A.8.2 革兰氏碘液**A.8.2.1 成分**

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.8.2.2 制法

将碘和碘化钾混合,加入少许蒸馏水充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

A.8.3 沙黄复染液

A.8.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90 mL

A.8.3.2 制法

将沙黄溶于乙醇中,再加蒸馏水至 100 mL。

A.8.4 染色方法

涂片在酒精灯火焰上固定,滴加结晶紫染色液覆盖,染色 1 min,水洗;滴加革兰氏碘液覆盖,作用 1 min,水洗;滴加 95%乙醇脱色 15 s~30 s(可将乙醇覆盖整个涂片,立即倾去,再用乙醇覆盖涂片,作用约 10 s,倾去脱色液,滴加乙醇从涂片流下至出现无色为止),水洗;滴加沙黄复染液覆盖,染色 1 min,水洗,待干、镜检。
