



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX
代替 GB/T 14926. 47-2008

实验动物 志贺菌检测方法

Laboratory animal --Method for examination of Shigella spp

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2026-09-01）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 主要设备 1

6 培养基及试剂 1

7 检测程序 2

8 操作步骤 3

9 结果报告 4

附录 A（规范性） 培养基 5

附录 B（规范性） 志贺菌实时荧光 PCR 检测方法 6

图 1 志贺菌检测程序 3

表 1 志贺菌引物和探针序列 2

表 B.1 实时荧光 PCR 反应体系配制表 6

表 B.2 实时荧光 PCR 反应程序 6

前 言

GB/T 14926《实验动物》共 54 个部分，涉及不同微生物和病毒检测技术方法。

本文件自实施之日起代替 GB/T 14926.47-2008《实验动物 志贺菌检测方法》。

本文件与 GB/T 14926.47-2008 相比主要技术差异如下：

- a) 更改了规范性引用文件（见第 2 章，2008 版第 2 章），新增 GB 4789.5-2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验；
- b) 更改了原理（见第 4 章，2008 版第 3 章），新增核酸检测原理；
- c) 更改了主要设备（见第 5 章，2008 版第 4 章），新增微生物生化鉴定系统和实时荧光 PCR 仪。
- d) 更改了培养基和试剂（见第 6 章，2008 版第 5 章），新增 GN 增菌液、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐（XLD）琼脂、 β -半乳糖苷酶培养基、粘液酸盐培养基，生化鉴定试剂盒，删除克氏双糖铁琼脂。新增 6.2 实时荧光 PCR 检测试剂；
- e) 更改了检测程序（见第 7 章，2008 版第 6 章），新增核酸检测程序；
- f) 更改了操作步骤（见第 8 章，2008 版第 7 章），新增前增菌的保存（见第 8.2，2008 版 7.2），新增不典型菌落特征的培养时间（见第 8.3.2.1，2008 版 7.3.1），修改了生化特征（见第 8.3.2.3，2008 版 7.3.3-7.3.5）、血清玻片凝集试验（见 8.3.2.4，2008 版 7.3.6）。
- g) 更改了结果报告（见第 9 章，2008 版第 8 章），新增核酸检测的报告。
- h) 新增附录 A，新增 GN 增菌液成分及配制方法。
- i) 新增附录 B，志贺菌实时荧光 PCR 检测方法。

请注意本部分的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会（TC281）归口。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会组织起草。

本文件主要起草单位：

本文件主要起草人：

本文件所代替标准的历次版本发布情况为：

——2001 年首次发布；2008 年第一次修订。

——本次是第二次修订。

实验动物 志贺菌检测方法

1 范围

本文件规定了实验动物志贺菌（*Shigella spp.*）的检测方法。
本文件适用于猴志贺菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 4789.5-2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验

GB/T 14926.42-2001 实验动物 细菌学检测 标本采集

GB/T 14926.43-2002 实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

4.1 核酸检测：依据核酸体外扩增基本原理，对志贺菌特异性靶基因 ipaH 序列设计引物和荧光标记探针，进行实时荧光 PCR 扩增，通过 Ct 值及扩增曲线进行标本检出结果判定。

4.2 细菌培养：志贺菌是革兰阴性短杆菌，在三糖铁或双糖铁等培养基上具有特定的生长和生化特征。因此，可通过选择性培养基培养、生化和血清试验鉴定志贺菌。

5 主要设备

5.1 普通恒温培养箱。

5.2 微生物生化鉴定系统。

5.3 实时荧光 PCR 仪。

6 培养基及试剂

6.1 培养法试剂

6.1.1 Cary-Blair 运送培养基：成分及配制方法见 GB/T 14926.43 中 4.12。

6.1.2 GN 增菌液：成分及配制方法见附录 1。

6.1.3 营养琼脂斜面：成分及配制方法见 GB/T 14926.43 中 4.3。

6.1.4 半固体琼脂：成分及配制方法见 GB/T 14926.43 中 4.5。

- 6.1.5 麦康凯琼脂：成分及配制方法见 GB/T 14926.43 中 4.8。
- 6.1.6 糖醇发酵培养基：成分及配制方法见 GB/T 14926.43 中 5.1。
- 6.1.7 氨基酸脱羧酶试验培养基：成分及配制方法见 GB/T 14926.43 中 5.2。
- 6.1.8 蛋白胨水、靛基质试剂：成分及配制方法见 GB/T 14926.43 中 5.4。
- 6.1.9 尿素培养基：成分及配制方法见 GB/T 14926.43 中 5.6。
- 6.1.10 三糖铁（TSI）琼脂：成分及配制方法见 GB/T 14926.43 中 5.11。
- 6.1.11 西蒙氏柠檬酸盐培养基：成分及配制方法见 GB/T 14926.43 中 5.16。
- 6.1.12 葡萄糖铵培养基：成分及配制方法见 GB/T 14926.43 中 5.22。
- 6.1.13 木糖赖氨酸脱氧胆酸盐（XLD）琼脂：成分及配制方法见 GB4789.5 附录 A.3。
- 6.1.14 β -半乳糖苷酶培养基：成分及配制方法见 GB4789.5-2012 附录 A.9。
- 6.1.15 粘液酸盐培养基：成分及配制方法见 GB4789.5-2012 附录 A.13。
- 6.1.16 生化鉴定试剂盒。
- 6.1.17 志贺菌属诊断血清。

6.2 核酸检测法试剂

6.2.1 经 DEPC 处理的无核酸酶水。除特别说明外，PCR 所用化学试剂为分析纯，均用无 DNA 酶污染的容器分装。

6.2.2 细菌基因组核酸提取试剂或试剂盒。

6.2.3 实时荧光 PCR 检测试剂。

6.2.4 引物和探针：根据表 1 的序列合成引物和探针，一般配制成储备液浓度 20 $\mu\text{mol/L}$ ，-20℃ 以下保存。

表 1 志贺菌引物和探针序列

鉴定靶标	引物和探针名称	引物和探针序列（5' →3' ）	靶基因	产物大小（bp）
志贺菌	SH-174F	TGGTCCATCAGGCATCAGAAG	ipaH	174
	SH-174R	CTGCGAGCATGGTCTGGAA		
	SH-174P	FAM-TAATGATACCGGCGCTCTGCTCTCCC-BHQ1		

7 检测程序

检测程序见图 1。

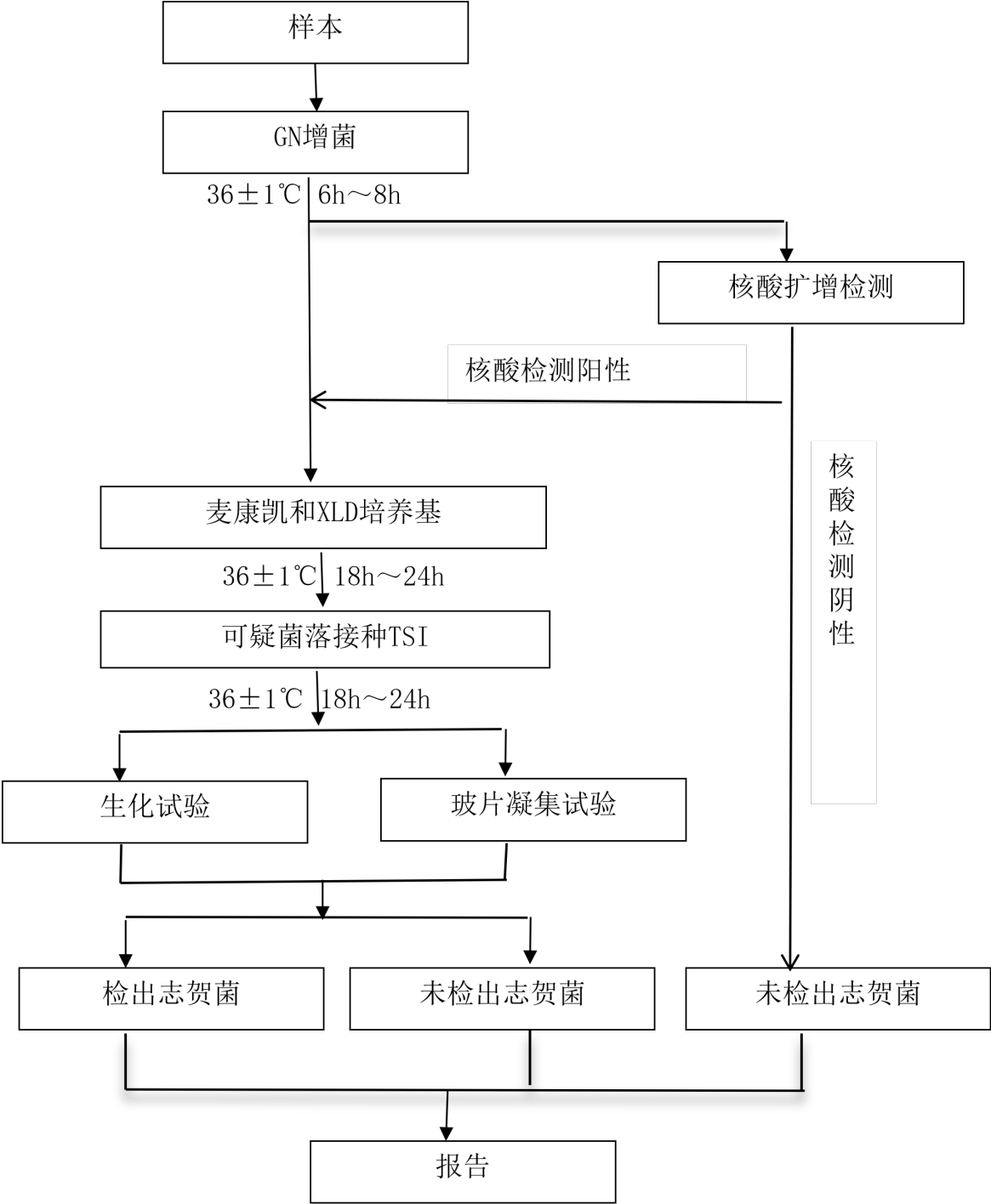


图 1 志贺菌检测程序

8 操作步骤

8.1 采样

采集粪便或肛拭子标本，采样方法见 GB/T 14926.42，放入 Cary-Blair 运送培养基进行保存和运输。

8.2 前增菌

将运送培养基的样品接种 GN 增菌液置 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 6~8h，增菌液保存不超过 48h。

8.3 培养法

8.3.1 分离培养

取增菌后菌液分别接种麦康凯琼脂和 XLD 琼脂平皿，置 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h。

8.3.2 鉴定

8.3.2.1 菌落特征

志贺菌在麦康凯琼脂平皿上形成无色、凸起、直径 2~3mm 的菌落。在 XLD 琼脂平皿上形成红色、光滑、直径 1~2mm 的菌落。若出现的菌落不典型或菌落较小不易观察，则继续培养至 48 h 再进行观察。

8.3.2.2 菌体特征

革兰阴性小杆菌，无鞭毛，无芽孢。

8.3.2.3 生化特征

按照 GB 4789.5-2012 中 5.3~5.4 进行初步生化试验、生化试验和附加生化试验。也可选择生化鉴定试剂盒、微生物生化鉴定系统进行鉴定。

8.3.2.4 血清玻片凝集试验

按照 GB 4789.5-2012 中 5.5.2 凝集试验进行判定。

8.4 核酸扩增检测

对增菌后的菌液可采用核酸扩增方法进行检测。

9 结果报告

9.1 符合培养法鉴定结果的作出志贺菌检测阳性报告；不符合的作出志贺菌检测阴性报告。生化反应不符合的菌株，即使能与某种志贺菌分型血清发生凝集，仍不得判定为志贺菌属的培养物。

9.2 符合实时荧光 PCR 检测阴性结果的作出志贺菌检测阴性报告。

附 录 A
(规范性)
培养基

A.1 GN 增菌液 (Gram Negative Enrichment Broth)

A.1.1 成分

胰蛋白胨	20.0 g
葡萄糖	1.0 g
磷酸氢二钾	1.5 g
磷酸二氢钾	4.0 g
甘露醇	2.0 g
枸橼酸钠	5.0 g
去氧胆酸钠	0.5 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1000.0 mL

A.1.2 制法

将以上成分混合加热溶解，冷却至 25 ℃左右，校正 pH 至 7.0 ± 0.2 ，分装到适当的容器中，115 ℃灭菌 15 min。取出后冷却至 50 ℃~55 ℃，分装备用。

附 录 B
(规范性)
志贺菌实时荧光 PCR 检测方法

B.1 材料和试剂

按照 6.2 进行材料和试剂的准备。

B.2 检测方法

B.2.1 标本中细菌基因组 DNA 核酸制备及保存

使用 8.2 前增菌液，按照核酸提取技术方法的要求或商品化 DNA 提取试剂盒的要求进行核酸提取。制备的 DNA 核酸若不能及时检测，应存放于-20 ℃以下保存，并尽快完成检测。

B.2.2 对照设置

检测过程应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

阳性对照：为扩增片段的阳性克隆分子 DNA 或标准菌株 DNA；

阴性对照：为大肠埃希氏菌标准菌株 DNA；

空白对照：为无核酸酶水。

B.2.3 PCR 反应体系

根据表 B.1 表在冰上配制反应体系。

表 B.1 实时荧光 PCR 反应体系配制表

反应组分	用量/ μL	终浓度
2×Premix Ex Taq Mix	10	1×
SH-174F (20 μmol/L)	0.2	0.2 μmol/L
SH-174R (20 μmol/L)	0.2	0.2 μmol/L
SH-174P (20 μmol/L)	0.2	0.2 μmol/L
ROX(50X)	0.4	1×
DNA 模板	5	/
灭菌去离子水	4	/
总体积	20	/
注：可使用其他等效的 PCR 检测试剂盒进行，反应体系和反应参数根据试剂盒要求可做相应调整。		

B.2.4 扩增检测

将提取的 DNA 核酸加入实时荧光 PCR 反应体系中，瞬时离心后，按照表 B.2 进行检测。

表 B.2 实时荧光 PCR 反应程序

步骤	温度/ ℃	时间/s	采集荧光信号	循环数
预变性	95	30	否	1
变性	95	5		40
退火，延伸	60	34	是	

B.3 检测结果判定

B.3.1 质控标准

阴性对照和空白对照无 Ct 值，无荧光扩增曲线。

阳性对照 Ct 值 ≤ 35 ，有典型的荧光扩增曲线。

满足上述条件的，可进行样品结果判定。

B.3.2 结果判定

阳性结果：样品有典型的荧光扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 35 ，判为志贺菌核酸检测阳性。

阴性结果：样品无荧光扩增曲线，或 Ct 值 ≥ 40 ，判定为志贺菌核酸检测阴性。

可疑结果：样品 $35 < \text{Ct 值} < 40$ ，应重新进行实时荧光 PCR 检测。重新检测后，若 Ct 值 ≥ 40 ，则判定为志贺菌核酸检测阴性，否则判定为志贺菌核酸检测阳性。

B.3.3 志贺菌核酸检测阴性时，判定为志贺菌检测阴性；志贺菌核酸检测阳性时，应对保存增菌液进行分离培养确认。
