

前 言

本标准中第4章、5.1、5.4、5.5条为强制执行条文,其他为非强制执行条文。

本标准是对GBJ 48—1983《医疗机构污水排放标准》(试行)的修订。

为了贯彻执行《中华人民共和国传染病防治法》,控制医疗机构污水对环境的污染,预防、控制和消除传染病的发生和流行,保障人体健康,特此对《医疗机构污水排放标准(试行)》进行修订。

本标准对GBJ 48—1983的适用范围、标准值、卫生要求和检验方法作了较大修改,增加了标准监督执行内容。

本标准从实施之日起,代替GBJ 48—1983,同时代替GB 8978—1996《污水综合排放标准》中表2序号25和26以及表4中序号54和55中的标准值。

本标准从2002年3月1日起实施。

本标准的附录A、B、C、D、E、F、G都是标准的附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出。

本标准负责起草单位:中国预防医学科学院环境卫生监测所;参加起草单位:江苏省卫生监督所。

本标准主要起草人:潘长庆、李霞、张漱洁、周淑玉、陈昌杰。

本标准由卫生部委托中国预防医学科学院环境卫生监测所负责解释。

中华人民共和国国家标准

医疗机构污水排放要求

GB 18466—2001

Requirements for medical organization sewage discharge

1 范围

1.1 本标准规定了医疗机构污水和污泥的排放标准。

1.2 本标准适用于下列医疗机构：

- 1) 污水直接排入江、河、湖、海、池塘、水库、溪、沟等地表水体的医疗机构。
- 2) 污水直接排入终端无污水处理厂的下水管道的医疗机构。
- 3) 污水无组织排放的医疗机构。
- 4) 所有的传染病和结核病医疗机构。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB 3838—1988 地面水环境质量标准

GB 5084—1992 农田灌溉水质标准

GB 5749—1985 生活饮用水卫生标准

GB 7959—1987 粪便无害化卫生标准

GB 11607—1989 渔业水质标准

GB 12941—1991 景观娱乐用水水质标准

GB/T 14848—1993 地下水质量标准

3 定义

本标准采用下列定义。

3.1 医疗机构 medical organization

指依据《医疗机构管理条例》及《医疗机构管理条例实施细则》的规定,经登记取得《医疗机构执业许可证》的机构。

3.2 医疗机构污水 medical organization sewage

指医疗机构门诊、病房、手术室、治疗室、各类检验室、病理解剖室、放射室、洗衣房、太平间等处排出的医疗、生活及粪便污水。

3.3 医疗机构污泥 medical organization silt

指医疗机构污水处理构筑物中的沉淀物和被拦截的漂浮物。

4 标准值

经处理和消毒后的医疗机构污水以及经无害化处理后的污泥,应符合表 1 和表 2 的规定。

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 2001-10-22 批准

2002-03-01 实施

表 1 医疗机构污水排放标准值

医疗机构 类 别	粪大肠 菌 群 MPN/L	肠 道 致病菌	结 核 杆 菌	消毒接触时间 h		总余氯 mg/L	
				氯化法	二氧化氯法	氯化法	二氧化氯法
综合性医疗机构	≤900	不得检出	—	≥1.0	≥0.5	≥3.5	≥2.5
传染病医疗机构	≤900	不得检出	—	≥1.5	≥0.5	≥6.5	≥4.0
结核病医疗机构	≤900	—	不得检出	≥1.5	≥0.5	≥6.5	≥4.0
其他医疗机构	≤900	不得检出	—	≥1.0	≥0.5	≥3.5	≥2.5

表 2 医疗机构污泥排放标准值

医疗机构 类 别	粪大肠 菌 群	肠 道 致病菌	结 核 杆 菌	蛔虫卵 死亡率 %
综合性医疗机构	≥10 ⁻²	不得检出	—	>95
传染病医疗机构	≥10 ⁻²	不得检出	—	>95
结核病医疗机构	≥10 ⁻²	—	不得检出	>95
其他医疗机构	≥10 ⁻²	—	—	>95

5 卫生要求

5.1 医疗机构污水必须进行处理和消毒。医疗机构污水处理构筑物中的污泥必须经过无害化处理。未经消毒或无害化处理的污水、污泥,不准任意排放或用做农肥。

5.2 新建、扩建、改建医疗机构应同时进行污水处理设施建设,其污水及污泥排放应符合表 1 和表 2 的规定。

5.3 医疗机构污水和污泥经处理和消毒后排放时,所含有害物质的含量还应根据接纳水体和粪便无害化卫生标准的功能要求,符合 GB 5749、GB 3838、GB 5084、GB 11607、GB 7959、GB 12941、GB/T 14848 中的要求。

5.4 严禁各级各类医疗机构将污水、污泥排入生活饮用水水源卫生防护地带内。

5.5 严禁各级各类医疗机构采用渗井、渗坑排放污水、污泥。

5.6 医疗机构污水处理构筑物的位置,宜设在医疗机构建筑物当地夏季最小频率风向的上风侧,与周围建筑物之间宜设绿化防护地带。

5.7 医疗机构污水处理构筑物的设计,应满足下列要求:

- 1) 确保污水、污泥符合本排放标准;
- 2) 采取防腐蚀、防渗漏措施;
- 3) 备有发生故障时的临时消毒设施;
- 4) 使用液氯消毒,必须备有氯泄漏等事故发生时的应急处理设施,严禁直接以钢瓶向污水中投加氯气;
- 5) 安全耐用,操作方便,有利于操作人员的劳动保护。

5.8 医疗机构行政区和职工生活区的污水,应与病区的污水分流。

6 检测与监测

6.1 医疗机构污水、污泥处理的日常检测由各医疗机构负责。检测项目和频次应符合以下要求:

6.1.1 医疗机构污水中总余氯:经过连续处理装置的污水,每日至少检测 2 次;经过间隙式处理装置的

污水,每次排放前均应检测。

6.1.2 医疗机构污水中粪大肠菌群:每月检测不得少于1次。

6.1.3 医疗机构污水中致病菌:每年检测不得少于2次。主要检测沙门氏菌和志贺氏菌,结核病医疗机构检测结核杆菌。

6.1.4 医疗机构污泥的卫生指标:每批污泥排放前,均应按表2要求的项目检验。

6.2 各级卫生防疫机构,应对辖区内医疗机构污水、污泥处理情况进行经常性卫生监测。并做好辖区内新建、改建、扩建医疗机构污水处理设施的预防性卫生监督工作。

6.2.1 监测频次:传染病、结核病医疗机构污水每年监测至少6次;其他医疗机构污水每年监测至少4次。医疗机构污泥每次排放前监测。

6.2.2 污水监测项目:总余氯、粪大肠菌群、肠道致病菌;结核病医疗机构增测结核杆菌。

6.2.3 污泥监测项目:蛔虫卵死亡率、粪大肠菌值;传染病医疗机构增测肠道致病菌;结核病医疗机构增测结核杆菌。

7 检验方法

本标准检验方法按附录A、B、C、D、E、F、G执行。

附录 A

(标准的附录)

医疗机构污水中总余氯的检测方法

A1 仪器和设备

A1.1 天平。

A1.2 比色管。

A1.3 量筒。

A2 试剂

邻联甲苯胺溶液:称取 1 g 邻联甲苯胺,溶于 5 mL 20%(容积/容积)盐酸中,将其调成糊状,加入 150~200 mL 蒸馏水使其完全溶解,置于量筒中补加蒸馏水至 505 mL,最后加入 20%盐酸 495 mL,储于棕色瓶中。

A3 测定步骤

A3.1 被测样品温度宜为 15~20℃,如低于此温度,应先将样品浸入温水中使其温度升至 15~20℃后,再测定数值。

A3.2 在盛有 5 mL 样品的比色管内,滴加邻联甲苯胺溶液 2~3 滴,混匀。

A3.3 将样品置于黑暗处,静置 15 min 后,与永久性余氯标准比色溶液比色测定,其结果为样品总余氯含量(比色时,眼睛从管口向下观察或由前面观察)。

A3.4 如余氯浓度很高时,会产生桔黄色;当样品碱度过高以及余氯浓度低时,可能产生淡蓝绿色或淡蓝色。此时,可再加入 1 mL 1:2 盐酸或 1 mL 邻联甲苯胺溶液,即可产生正常的淡黄色,再进行测定。

A4 检验结果报告

检验结果以每升污水中含总余氯的毫克数(mg/L)报告。

附录 B

(标准的附录)

医疗机构污水中粪大肠菌群的检验方法

B1 仪器和设备

B1.1 高压蒸汽灭菌器。

B1.2 干燥灭菌箱。

B1.3 培养箱。

B1.4 电炉。

B1.5 天平。

B1.6 灭菌平皿。

B1.7 灭菌刻度吸管。

B2 培养基和试剂**B2.1 乳糖-胆盐培养液****B2.1.1 成分**

蛋白胨	20 g
猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5 g
乳糖	5 g
0.4%溴甲酚紫水溶液	2.5 mL
蒸馏水	1 000 mL

B2.1.2 制法

将蛋白胨、胆盐及乳糖溶解于1 000 mL蒸馏水中,调整pH为7.2~7.4。加入指示剂,充分混匀,分装于有倒管的试管中。置于高压蒸汽灭菌器中,于115℃灭菌20 min。贮存于冷暗处备用。

B2.2 伊红美兰培养基**B2.2.1 成分**

蛋白胨	10 g
乳糖	10 g
磷酸氢二钾	2 g
琼脂	20~30 g
蒸馏水	1 000 mL
2%伊红水溶液	20 mL
0.5%美兰水溶液	13 mL

B2.2.2 储备培养基的制法

B2.2.2.1 先将琼脂加到900 mL蒸馏水中,加热溶解,然后加入磷酸氢二钾及蛋白胨,混匀使溶解,再以蒸馏水补足至1 000 mL,调整pH为7.2~7.4。

B2.2.2.2 趁热用脱脂棉或绒布过滤,再加入乳糖,混匀后,定量分装于烧瓶内,置于高压蒸汽灭菌器中,以115℃灭菌20 min。贮存于冷暗处备用。

B2.2.3 平皿培养基的制法

B2.2.3.1 将已制备的培养基加热融化。

B2.2.3.2 根据烧瓶内培养基的容量,用灭菌吸管按比例吸取一定量的已灭菌的2%伊红水溶液及一定量已灭菌的0.5%美兰水溶液加入已融化的储备培养基内,并充分混匀(防止产生气泡)。立即将此种培养基适量倾入已灭菌的空平皿内,待其冷凝后,备用。

B2.3 乳糖蛋白胨培养液**B2.3.1 成分**

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
乳糖	5 g
氯化钠	5 g
1.6%溴甲酚紫乙醇溶液	1 mL
蒸馏水	1 000 mL

B2.3.2 制法

将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠加热溶解于1 000 mL蒸馏水中,调整pH为7.2~7.4。加入1.6%溴甲酚紫乙醇溶液1 mL,充分混匀,分装于有倒管的试管中。置于高压蒸汽灭菌器中,以115℃灭菌20 min。贮存于冷暗处备用。

B2.4 革兰氏染色液**B2.4.1 结晶紫染色液**

结晶紫	1 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

将结晶紫溶于乙醇中,然后与草酸铵水溶液混合。

B2.4.2 革兰氏碘液

碘	1 g
碘化钾	2 g
蒸馏水	300 mL

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,待完全溶解,再加入蒸馏水至 300 mL。

B2.4.3 脱色液:95%乙醇。**B2.4.4 沙黄复染液**

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

将沙黄溶于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

B2.5 染色法

B2.5.1 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染色 1 min,水洗。

B2.5.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

B2.5.3 滴加 95%乙醇脱色,约 30 s,水洗。

B2.5.4 滴加复染液,复染 1 min,水洗,待干,镜检。

B2.6 染色结果

革兰氏阳性菌呈紫色,革兰氏阴性菌呈红色。

注:亦可用 1:10 稀释的石炭酸复红染色液作复染液,复染时间为 10 s。

B3 检验程序**B3.1 采样方法**

用采水器或其他灭菌容器采取污水样 1 000 mL,放入灭菌瓶内,如果是经过加氯消毒处理的污水,需加 1.5%硫代硫酸钠溶液 5 mL 中和余氯。

B3.2 多管发酵法

B3.2.1 初发酵实验:将原液作 1:10、1:100、1:1 000 稀释。依次吸取 1:1 000、1:100、1:10 及原液各 1 mL,分别注入装有 10 mL 乳糖胆盐培养液内装小发酵管的试管中,将已接种的四支发酵管置于 44℃ 恒温培养箱内培养 24 h。

注:接种量为 10 mL 时,可用与接种量相等的双料乳糖胆盐培养液。

B3.2.2 平板分离:取经培养 24 h 后产酸产气,以及只产酸不产气的发酵管中培养液,分别划线接种伊红美蓝培养基上,置 37℃ 恒温培养箱内培养 18~24 h,挑选符合下列特征的菌落,进行涂片,革兰氏染色,镜检。

伊红美蓝培养基上的菌落色泽:深紫黑色,具有金属光泽的菌落;紫黑色,不带或略带金属光泽的菌落;淡紫红色,中心色较深的菌落。

B3.2.3 复发酵实验:上述涂片镜检的菌落,如为革兰氏阴性无芽孢杆菌,再挑取该菌落接种于乳糖发酵管中(内有倒管),置于 44℃ 恒温培养箱中培养 24 h,有产酸产气者即证实有粪大肠菌群存在,按阳性管数查表。

视其水质污染程度,决定稀释度和接种量。例如,污染较轻可接种总量 11.11 mL,如污染严重可接种总量 0.111 1 mL。

表 B1 粪大肠菌群检索表
(接种总量 1.111 mL)

接种样品量,mL				粪大肠菌群,MPN/L
1	0.1	0.01	0.001	
—	—	—	—	<900
—	—	—	+	900
—	—	+	—	900
—	+	—	—	950
—	—	+	+	1 800
—	+	—	+	1 900
—	+	+	—	2 200
+	—	—	—	2 300
—	+	+	+	2 800
+	—	—	+	9 200
+	—	+	—	9 400
+	—	+	+	18 000
+	+	—	—	23 000
+	+	—	+	96 000
+	+	+	—	238 000
+	+	+	+	>238 000

B4 检验结果报告

接种水样总量同表 B1,检验结果可直接查表,得出粪大肠菌群数(MPN 值);如接种水样总量比表 1 大 10 倍(11.11 mL),检验结果为查表所得 MPN 值除以 10。

附 录 C

(标准的附录)

医疗机构污泥中粪大肠菌值的检验方法

C1 仪器和设备

- C1.1 高压蒸汽灭菌器。
- C1.2 干燥灭菌箱。
- C1.3 培养箱:37℃。
- C1.4 恒温水浴箱。
- C1.5 电炉。
- C1.6 天平。
- C1.7 灭菌平皿。
- C1.8 灭菌刻度吸管。

C2 培养基和试剂

C2.1 乳糖-胆盐培养基:同附录 B2.1。

C2.2 伊红美兰培养基:同附录 B2.2。

C2.3 乳糖蛋白胨培养液:同附录 B2.3。

C2.4 革兰氏染色液:同附录 B2.4。

C3 检验程序

C3.1 初发酵试验:按图 C1 所示将污泥稀释,分别将污泥样品接种于盛有 10 mL 乳糖胆盐培养液的试管中(内有小倒管)。再将已接种的四支试管置于 44℃ 恒温培养箱中,培养 24 h。

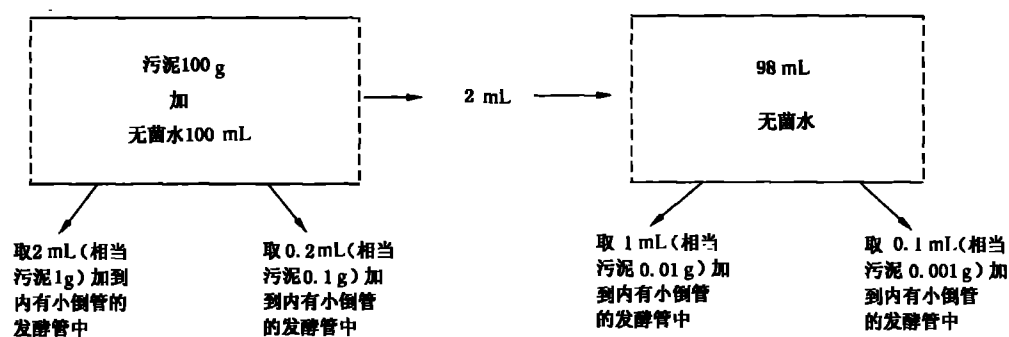


图 C1 污泥的稀释和接种示意图

C3.2 平板分离:经 24 h 培养后,将产酸产气及只产酸不产气的发酵管培养液分别划线接种于伊红美兰培养基上。置于 37℃ 恒温培养箱中培养 18~24 h。挑选符合下列特征的菌落,进行涂片,革兰氏染色,镜检。

伊红美兰培养基上的菌落色泽:深紫黑色,具有金属光泽的菌落;紫黑色,不带或略带金属光泽的菌落;淡紫红色,中心色较深的菌落。

C3.3 复发酵试验:上述涂片镜检的菌落如为革兰氏阴性无芽孢杆菌,则挑取该菌落的另一部分再接种于内有倒管的乳糖发酵管中,置于 44℃ 恒温箱培养 24 h。有产酸产气者即证实有粪大肠菌群存在。

表 C2 粪大肠菌值检索表

(接种总量 1.111 g)

接种总量, g				粪 大 肠 菌 值
1	0.1	0.01	0.001	
—	—	—	—	>1.11
—	—	—	+	1.11
—	—	+	—	1.11
—	+	—	—	1.05
—	—	+	+	0.56
—	+	—	+	0.53
—	+	+	—	0.46
+	—	—	—	0.43
—	+	+	+	0.36

表 C2(完)

接种总量, g				粪 大 肠 菌 值
1	0.1	0.01	0.001	
+	—	—	+	0.11
+	—	+	—	0.10
+	—	+	+	0.06
+	+	—	—	0.04
+	+	—	+	0.01
+	+	+	—	0.004
+	+	+	+	<0.004

C4 检验结果报告

根据经证实的粪大肠菌群阳性管数,按表 C2 报告粪大肠菌值。

附 录 D

(标准的附录)

医疗机构污水及污泥中沙门氏菌的检验**D1 仪器和设备**

D1.1 高压蒸汽灭菌器。

D1.2 干燥灭菌箱。

D1.3 培养箱。

D1.4 恒温水浴箱。

D1.5 电炉。

D1.6 天平。

D1.7 灭菌平皿。

D1.8 灭菌刻度吸管。

D2 培养基和试剂**D2.1 亚硝酸盐(SF)增菌液****D2.1.1 成分**

胰蛋白胨(或多价胨)	10 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	16 g
磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)	2.5 g
乳 糖	4 g
亚硒酸氢钠	4 g
蒸馏水	1 000 mL

D2.1.2 制法

除亚硒酸氢钠外,将以上各成分放于蒸馏水中,加热溶化。再加入亚硒酸氢钠,待完全溶解后,调整 pH 为 7.0~7.1。分装,于流通蒸汽灭菌器中灭菌 15 min 备用。

D2.2 SS 培养基**D2.2.1 基础培养基****D2.2.1.1 成分**

牛肉膏	5 g
示胨	5 g
三号胆盐	3.5 g
琼脂	17 g
蒸馏水	1 000 mL

D2.2.1.2 制法

将牛肉膏、示胨和胆盐溶解于 400 mL 蒸馏水中,将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中,煮沸使其溶解,再将二者混合,121℃ 高压灭菌 15 min,保存备用。

D2.2.2 完全培养基**D2.2.2.1 成分**

基础培养基	1 000 mL
乳糖	10 g
柠檬酸钠	8.5 g
硫代硫酸钠	8.5 g
10%柠檬酸铁溶液	10 mL
1%中性红溶液	2.5 mL
0.1%煌绿溶液	0.33 mL

D2.2.2.2 制法

加热溶化基础培养基,按比例加入上述染色液以外的各成分,充分混合均匀,调整 pH 为 7.0,加入中性红和煌绿溶液,倾注平板。

注:制好的培养基宜当日使用,或保存于冰箱内于 18 h 内使用。煌绿溶液配好后应在 10 天以内使用。

D2.3 亚硫酸铋琼脂(BS)**D2.3.1 成分**

蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
葡萄糖	5 g
硫酸亚铁	0.3 g
磷酸氢二钠	4 g
煌绿	0.025 g
柠檬酸铋铵	2 g
亚硫酸钠	6 g
琼脂	18~20 g
蒸馏水	1 000 mL

D2.3.2 制法

将前面 5 种成分溶解于 300 mL 蒸馏水中;将柠檬酸铋铵和亚硫酸钠另用 50 mL 蒸馏水溶解;将琼脂于 600 mL 蒸馏水中煮沸溶解,冷至 80℃。将前三种溶液混合,补充蒸馏水至 1 000 mL,调整 pH 为 7.5,加 0.5%煌绿水溶液 5 mL,摇匀。冷至 50~55℃,倾注平皿。

注:此培养基不需高压灭菌。应在临用前一天制备,贮存于室温暗处,超过 48 h 不宜使用。

D2.4 三糖铁琼脂(TSI)**D2.4.1 成分**

蛋白胨	20 g
牛肉膏	5 g
乳糖	10 g
蔗糖	10 g
葡萄糖	1 g
氯化钠	5 g
硫酸亚铁铵	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	12 g
酚红	0.025 g
蒸馏水	1 000 mL

D2.4.2 制法

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中,调 pH 为 7.4。加入琼脂,加热煮沸,再加入 0.2% 酚红水溶液 12.5 mL,摇匀。分装试管,装量宜多些,以便得到较高的底层。121℃ 高压灭菌 15 min。放置高层斜面备用。

D2.4.3 沙门氏菌属诊断血清**D3 检测程序****D3.1 样品处理和增菌**

污水:取 250 mL 污水,用无菌纱布或脱脂棉进行初滤,然后再用滤膜进行抽滤。将初滤后的纱布或脱脂棉和滤膜,放入到盛有 100 mL 左右的单倍 SF 增菌液的三角烧瓶中进行增菌培养。置于 37℃ 恒温培养箱,培养 24 h。

污泥:用灭菌匙称取污泥 30 g,放入灭菌容器内,加入 300 mL 灭菌水,充分混匀制成 1:10 混悬液。吸取上述 1:10 混悬液 100 mL,加于 100 mL 双料亚硒酸盐(SF)增菌液内,置于 37℃ 恒温培养箱,培养 24 h。

D3.2 平板分离

取上述增菌培养液,分别接种 SS 平板和 BS 平板,置于 37℃ 恒温培养箱培养 24~48 h。观察各平板上生长的菌落特征。

D3.3 挑选菌落

挑取在 SS 平板上呈无色透明或中间有黑心,直径 1~2 mm 的菌落;挑取在 BS 平板上呈黑色有金属光泽的菌落或灰绿色的菌落。

每个平板最少挑取 5 个以上可疑肠道病原菌菌落,转种三糖铁培养基中,置于 37℃ 恒温培养箱中,培养 18~24 h。

D3.4 生化试验及血清学检验

在三糖铁培养基中,如不发酵乳糖,发酵葡萄糖产酸产气或只产酸不产气,一般产生硫化氢,有动力者,先与沙门氏 A-F 群 O 多价血清作玻片凝集,凡与多价 O 血清凝集者,再与 O 因子血清凝集,以确定其所属群别,然后用 H 因子血清,确定血清型。双向菌株应证实两相的 H 抗原,有 Vi 抗原的菌型(伤寒和丙型副伤寒沙门氏菌)应用 Vi 因子血清检查。

生化试验:应进行葡萄糖、甘露醇、麦芽糖、乳糖、蔗糖、胨基质、硫化氢、动力、尿素试验。沙门氏菌属中除伤寒沙门氏菌和鸡沙门氏菌不产气外,通过发酵葡萄糖、产气、均发酵甘露醇和麦芽糖(但猪沙门氏菌、雏沙门氏菌不发酵麦芽糖),不分解乳糖、蔗糖,尿素酶和胨基质为阴性,通常产生硫化氢。除鸡、雏沙门氏菌和伤寒沙门氏菌的O型菌株无动力外,通常均有动力。

如遇多价O血清不凝集而一般生化反应符合上述情况时,可加做侧金盏花醇、水杨素和氰化钾试验,沙门氏菌均为阴性。

D4 检验结果报告

根据以上鉴别培养、生化试验和血清学检验结果报告结果。

附录 E

(标准的附录)

医疗机构污水及污泥中志贺氏菌的检验方法

E1 仪器和设备

- E1.1 高压蒸汽灭菌器。
- E1.2 干燥灭菌箱。
- E1.3 培养箱。
- E1.4 恒温水浴箱。
- E1.5 电炉。
- E1.6 天平。
- E1.7 灭菌平皿。
- E1.8 灭菌刻度吸管。

E2 培养基和试剂

E2.1 革兰氏阴性(GN)增菌液

E2.1.1 成分

胰蛋白胨(或多价胨)	20 g
葡萄糖	1 g
甘露醇	2 g
枸橼酸钠	5 g
去氧胆酸钠	0.5 g
磷酸氢二钾	16 g
磷酸二氢钾	2.5 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL

E2.1.2 制法

将以上各成分加入蒸馏水中溶化,调整pH至7.0,煮沸过滤,高压115℃灭菌20 min。贮存于冷暗处备用。

双料GN增菌液配制:除蒸馏水改为500 mL外,其它成分不变。

E2.2 SS培养基:同附录D2.2。

E2.3 伊红美兰琼脂(EMB):同附录B2.2。

E2.4 三糖铁琼脂(TSI):同附录 D2.4。

E2.5 志贺氏菌诊断血清

E3 检验程序

E3.1 样品处理和增菌

污水:取污水 250 mL,用无菌纱布或脱脂棉进行初滤,然后再用滤膜进行抽滤。将初滤后的纱布或脱脂棉和滤膜,放入到盛有 100 mL 左右的单倍 GN 增菌液的三角烧瓶中进行增菌培养。置于 37℃ 恒温培养箱,培养 6~8 h。

污泥:用灭菌匙称取污泥 30 g,放入灭菌容器内,加入 300 mL 灭菌水,充分混匀制成 1:10 混悬液。吸取上述 1:10 混悬液 100 mL,加到 100 mL 双料革兰氏阴性(GN)增菌液内,置于 37℃ 恒温培养箱,培养 6~8 h。

E3.2 分离

取上述增菌培养液,分别接种 SS 平板和 E. M. B. 平板,置于 37℃ 恒温培养箱中,培养 24 h。

挑取在 SS 和 E. M. B. 平板上呈无色透明,直径 1~1.5 mm 的菌落。

每个平板最少挑取 5 个以上可疑肠道病原菌菌落,转种三糖铁培养基中,置于 37℃ 恒温培养箱中,培养 18~24 h。

挑取在三糖铁培养基中,葡萄糖产酸不产气,无动力,不产生硫化氢,上层斜面乳糖不分解的菌株,可做血清学和生化试验。

E3.3 血清学检查:志贺氏菌属分为四个群,先与多价血清作玻璃片凝集试验,如为阳性,再分别与 A、B、C、D 群血清凝集,并进一步与分型血清做玻璃片凝集,最后确定其血清型。

E3.4 生化试验:应进行葡萄糖、甘露醇、麦芽糖、乳糖、蔗糖、胨基质、硫化氢、动力、尿素试验。志贺氏菌属能分解葡萄糖,但不产气(福氏志贺氏菌 6 型有时产生少量气体),一般不能分解乳糖和蔗糖,宋内氏志贺氏菌对乳糖和蔗糖迟缓发酵产酸。志贺氏菌属均不产生硫化氢,不分解尿素,无动力。对甘露醇、麦芽糖的发酵及胨基质的产生,则因菌株不同而异。

如遇多价血清玻璃片凝集试验为阴性,而生化反应符合上述情况时,可加做肌醇、水杨素、V-P、柠檬酸盐、氰化钾等试验。志贺氏菌属均为阴性反应。

附 录 F

(标准的附录)

医疗机构污泥中蛔虫卵的检验方法

F1 仪器和设备

F1.1 离心机。

F1.2 金属筛:60 目。

F1.3 显微镜。

F1.4 恒温培养箱。

F1.5 高压蒸汽灭菌器。

F1.6 冰箱。

F1.7 振荡器。

F2 培养基和试剂

F2.1 3%~5%福尔马林或3%盐酸溶液。

F2.2 饱和氯化钠溶液。

F2.3 30%次氯酸钠溶液。

F3 检验程序

F3.1 污泥样品的采集

先把泥堆划分为四等份,而后在每份的中间,用铁锹或小铲各采污泥约500 g。同时,在泥堆的中间也采500 g一并放在塑料桶或陶瓷桶中。搅拌均匀,并除去固体杂物,再从中取出500 g置于塑料袋或其他容器中,带回实验室。

F3.2 污泥样品的处理

将现场带回的样品,倒于烧杯中,如遇样品变干且有结块时,可将其倒入搪瓷盘中,再行搅拌,同时用大镊子,一面搅拌,一面将硬块夹碎,去掉肉眼能看出的夹杂物,如腐烂的布条、草梗、小石块等。然后,将样品装入广口瓶中,贴上标签,标明样品号码、医疗机构名称、采样日期等情况。

F3.3 污泥样品的检验

上述样品经处理后,应立即进行检验,如不能立即检验时,可加入5~10 mL 3%~5%福尔马林或3%盐酸溶液,用平皿盖住广口瓶瓶口。然后放于冰箱内,以防微生物的繁殖和蛔虫卵的发育。

F3.3.1 水洗

从已经处理过的500 g污泥样品中,称取100 g置于500 mL锥形瓶中,加水约500 mL。用玻璃棒搅拌后,静置,使其自然沉淀,经1~2 h后,倒去污泥上面的水,另换清水搅拌后,再让其自然沉淀,经30 min后,再倒去上面的清水,另换清水,反复进行3~4次,直到污泥上面的水接近无色为止。

F3.3.2 过滤

倒去沉淀上面的清水,用金属筛过滤于另一500 mL锥形瓶中,弃去阻留在筛子上的泥渣。沉淀20~30 min后,倒去沉淀上面的液体,另加新水,如此反复水洗2~3次,最后倒去上清液,将沉淀物倒入10 mL离心管中。经2 500转/min离心3 min后,倒去上清液。

F3.3.3 离心漂浮

管内注入饱和氯化钠溶液,用玻璃棒搅匀后,离心3 min,由于蛔虫卵的相对密度小于饱和氯化钠溶液的相对密度,所以管内绝大多数的蛔虫卵均浮聚在液面(注意:加入氯化钠溶液量不得少于沉淀物的20倍)。

F3.3.4 离心沉淀

用毛细吸管反复吸取管中斜面上的浮膜于另一离心管中。加入清水,经搅匀后,再行离心,蛔虫卵比水的相对密度大,因而下沉于管底。然后小心倒去上清液。

F3.3.5 培养

注入2~3 mL清水于管中,加几滴5%福尔马林溶液,置于24~26℃恒温箱中,培养15~20天。在培养过程中,清水不得少于2 mL。

F3.3.6 镜检

样品经培养15~20天后取出,用毛细吸管吸去上面的清水,余下含虫卵的沉淀物。在一张干净的载玻片的中央滴一滴清水,用毛细吸管吸一小滴沉淀物于水中,涂匀后盖以盖玻片,在低倍镜下检查,必要时,再换以高倍镜。记录500个以上死、活虫卵数。查完一张片子而虫卵数不及500个时,依同法作第二张涂片检查。涂片不宜太厚,否则视野模糊不清,影响观察,一般涂片厚度能以透过涂片尚能辨认报纸上的字迹为宜。因为在适宜的温度和湿度下,经过15~20天的培养,活虫卵就会逐渐发育到幼虫期,而死虫卵则在同一条件下仍然保持单细胞期或停留于某一发育阶段,故易于区别。

镜检时为达到较为快速而明显地辨认幼虫起见,可在载玻片上滴一滴预先配好避光保存的 30%次氯酸钠溶液〔商品名为安替福明(antiformin)〕以代替清水作成涂片,置于显微镜下观察,可以看见被包在卵的最外层的蛋白质壳逐渐溶解,使卵内的幼虫一目了然。如遇沉淀物中沉渣较多、卵数较少时,可以直接注入几滴此脱壳液于离心管中,与沉淀物混合并搅匀之,而后吸一滴混合液于载玻片上,盖以盖玻片,直接镜检即可。此时视野格外清晰。在培养第 15~20 天未查见幼虫时,应继续培养 30 天(注意:加过 30%次氯酸钠溶液,不能再继续培养)后再观察。

F4 检验结果报告

根据 500 个以上的蛔虫卵数,求出死卵的百分数,见式(F1)。

$$A = \frac{m}{m+n} \times 100 \quad \dots\dots\dots (F1)$$

式中: A——蛔虫卵死亡率, %;

m——死亡蛔虫卵数;

n——存活蛔虫卵数。

附 录 G

(标准的附录)

医疗机构污水和污泥中结核杆菌的检验方法

G1 仪器和设备

- G1.1 电炉。
- G1.2 恒温水浴箱。
- G1.3 高压蒸汽灭菌器。
- G1.4 滤菌器。
- G1.5 离心机。
- G1.6 恒温培养箱。
- G1.7 乙酸纤维膜:孔径为 0.3~0.7 μm
- G1.8 玻璃漏斗 G2:孔径为 10~15 μm
- G1.9 玻璃漏斗 G4:孔径为 3~4 μm

G2 培养基和试剂

G2.1 改良罗氏培养基

G2.1.1 成分

磷酸二氢钾	2.4 g
硫酸镁	0.24 g
枸橼酸镁	0.6 g
谷氨酸钠	1.2 g
甘 油	12 mL
淀 粉	30 g
蒸馏水	600 mL
鸡蛋(包括蛋清和蛋黄)	1 000 mL
20%孔雀绿	20 mL

G2.1.2 制法

将磷酸二氢钾、枸橼酸钠、味精、甘油及蒸馏水混合于烧杯内,放在沸水浴中加热溶解。加入淀粉继续加热 1 h,摇动使其溶解,待冷却至 50℃加入蛋液及孔雀绿,溶解,充分混匀。制成斜面,保持温度 90℃,灭菌 1 h。

G2.2 小川氏培养基

G2.2.1 成分

甲液: 无水磷酸二氢钾	1 g
味精	1 g
蒸馏水	100 mL
乙液: 全蛋液	200 mL
甘油	6 mL
2%孔雀绿	6 mL

G2.2.2 制法

甲、乙两液混合分装试管内。制成斜面,保持温度 90℃灭菌 1 h。

G2.3 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液(M/15)。

G2.4 10%吐温(Tween)80 水溶液加等量 30%过氧化氢溶液。

G2.5 4%硫酸溶液。

G3 检验程序

G3.1 污水中结核杆菌的检验程序

G3.1.1 集菌

根据检验室条件,可以选用滤膜集菌法和离心集菌法。

滤膜集菌法:采用经煮沸消毒的乙酸纤维膜(孔径 0.3~0.7 μm)和特制的金属滤器,安装严密后,取污水样 500 mL 抽滤,根据悬浮物的多少,一份水样需更换数张滤膜,将同一份水样滤膜集中于小烧杯内,用 4%硫酸溶液反复冲洗,静置 30 min 后,收集洗液于离心管中,3 000 转/min,离心 30 min,弃去上清液,沉淀物中加 1 mL 灭菌生理盐水混合均匀后,供接种用。

离心集菌法:水样 500 mL,分装于 50 mL 或 200 mL 灭菌离心管中,3 000 转/min,离心 30 min。同一份水样的沉淀物集中于试管内,加等量 4%硫酸处理 30 min,供接种用。如体积过大,再次离心浓缩后接种。

G3.1.2 接种

上述集菌液全部接种于改良罗氏培养基或接种于小川氏培养基上,每支培养管接种 0.1 mL。

G3.1.3 培养

置 37℃恒温培养箱内,培养 8 周,2 周后开始观察结果,每周观察 2 次。

分离菌株:在罗氏培养基上呈淡黄色或无色的粗糙型菌落,作抗酸染色,阳性者作分离传代。分离传代菌株如生长速度在两周以上,则需作菌型鉴别;应用耐热触酶试验和传代培养于 28℃培养 2~4 周观察是否生长,用此方法即可进行初步鉴别。

G3.1.4 致病力试验

耐热触酶反应阴性,28℃不生长之菌落为可疑结核杆菌。于小白鼠尾静脉接种 1 mg 菌量(5 mg/mL 菌液,每只动物接种 0.2 mL),死亡时观察病变或 8 周后解剖脏器发现典型结核病变者可确认为检出结核杆菌。其耐热触酶试验方法如下:

取菌落 3~5 mg 分散于 0.5 mL 磷酸盐缓冲液中,置 68℃水浴中 20 min 后取出,冷却后加吐温 80 和过氧化氢溶液混合液 0.5 mL。

发生气泡为阳性,30 min 不产生气泡者为阴性。人型、牛型结核杆菌,胃分枝杆菌和海鱼分枝杆菌为阴性,其他非典型抗酸菌和非致病抗酸菌为阳性。人型、牛型结核杆菌在 28℃ 培养不生长,胃分枝杆菌和海鱼分枝杆菌在 28℃ 培养能生长。

G3.2 污泥中结核杆菌的检验程序

G3.2.1 样品处理

取污泥 10 g 加 100 mL 蒸馏水冲洗过滤(滤纸漏斗),再经玻璃漏斗 G2(孔径 10~15 μm)和 G4(孔径 3~4 μm)抽滤,最后再经滤膜(孔径 0.45~0.7 μm)抽滤。取下滤膜,用 4% 硫酸 3 mL,充分振摇冲洗 30 min。

G3.2.2 取上述酸性菌液各 0.1 mL,分别接种于改良罗氏培养基或小川氏培养基上。

以下操作步骤同“污水中结核杆菌的检验程序”。

G4 检验结果报告

综上所述,试验结果确证为结核杆菌者,可报告“结核杆菌阳性”。
