



中华人民共和国国家标准

GB 4789.49—2024

食品安全国家标准 食品微生物学检验 产志贺毒素大肠埃希氏菌检验

2024-02-08 发布

2024-08-08 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

食品安全国家标准

食品微生物学检验

产志贺毒素大肠埃希氏菌检验

1 范围

本标准规定了食品中产志贺毒素大肠埃希氏菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)的检验方法。

本标准适用于食品中产志贺毒素大肠埃希氏菌的检验。

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。

- 2.1 恒温培养箱:36 °C±1 °C、44 °C±1 °C。
- 2.2 冰箱:2 °C~5 °C、-18 °C~-20 °C。
- 2.3 天平:感量为 0.001 g。
- 2.4 均质器。
- 2.5 旋涡振荡器。
- 2.6 恒温水浴箱 50 °C~55 °C、恒温金属浴 99 °C±1 °C。
- 2.7 离心机:最大转速至少 16 000g。
- 2.8 实时荧光定量 PCR 仪。
- 2.9 混匀仪。
- 2.10 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)。
- 2.11 电动移液枪或吸耳球。
- 2.12 无菌具塞锥形瓶:容量 250 mL、500 mL、1 000 mL。
- 2.13 无菌培养皿:直径 90 mm。
- 2.14 无菌均质袋:带滤网,无菌均质杯。
- 2.15 平盖八联排管或 96 孔 PCR 微孔板。
- 2.16 磁珠分离富集装置。
- 2.17 微量移液器及吸头:0.2 μL~2 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL。
- 2.18 10 μL 无菌接种环。
- 2.19 1.5 mL 无菌 EP 管,无菌微量离心管,无菌 15 mL 离心管。
- 2.20 0.22 μm 孔径无菌过滤膜。
- 2.21 全自动微生物生化鉴定系统。
- 2.22 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)。

3 培养基和试剂

- 3.1 改良胰蛋白胨大豆液体培养基(mTSB):见 A.1。
- 3.2 EC 肉汤培养基(EC):见 A.2。
- 3.3 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA):见 A.3。
- 3.4 STEC 显色培养基:见 A.4。

- 3.5 麦康凯琼脂培养基(MAC):见 A.5。
- 3.6 脑心浸出液肉汤(BHI)-50%甘油:见 A.6。
- 3.7 0.85%灭菌生理盐水。
- 3.8 5% Chelex-100 溶液:见 A.7。
- 3.9 E-buffer 溶液:见 A.8。
- 3.10 1 mol/L 盐酸溶液。
- 3.11 1×TE 缓冲液:见 A.9。
- 3.12 无菌 PBS 缓冲液:见 A.10。
- 3.13 实时荧光定量 PCR 反应体系配制用试剂(10×buffer、dNTPs、*Taq* 酶和 ddH₂O)。
- 3.14 STEC 免疫磁珠分离相关试剂或等效试剂盒。
- 3.15 生化鉴定试剂盒或生化鉴定相关试剂。
- 3.16 具有菌种保藏资质单位提供的志贺毒素基因(*Shiga toxin gene, stx*)阳性大肠埃希氏菌标准菌株,即携带 *stx1* 和/或 *stx2*,如 O157:H7[CMCC(B)44939,GDMCC1.2702 或等效菌株]和 *stx* 阴性大肠埃希氏菌标准菌株,即不携带 *stx1* 和 *stx2*,如 CMCC(B)44102,GDMCC1.223 或等效菌株。免疫磁珠富集处理的标准菌株:血清型 O26 型大肠埃希氏菌标准菌株,如 CMCC(B)43221、GDMCC1.3807 或等效菌株;血清型 O45,CMCC(B)43242,GDMCC1.3808 或等效菌株;血清型 O103,CMCC(B)43234,GDMCC1.3809 或等效菌株;血清型 O111,CMCC(B)43211,GDMCC1.3810 或等效菌株;血清型 O121,CMCC(B)43228,GDMCC1.3811 或等效菌株;血清型 O145,CMCC(B)43243,GDMCC1.3812 或等效菌株。

4 检验程序

产志贺毒素大肠埃希氏菌检验程序见图 1。

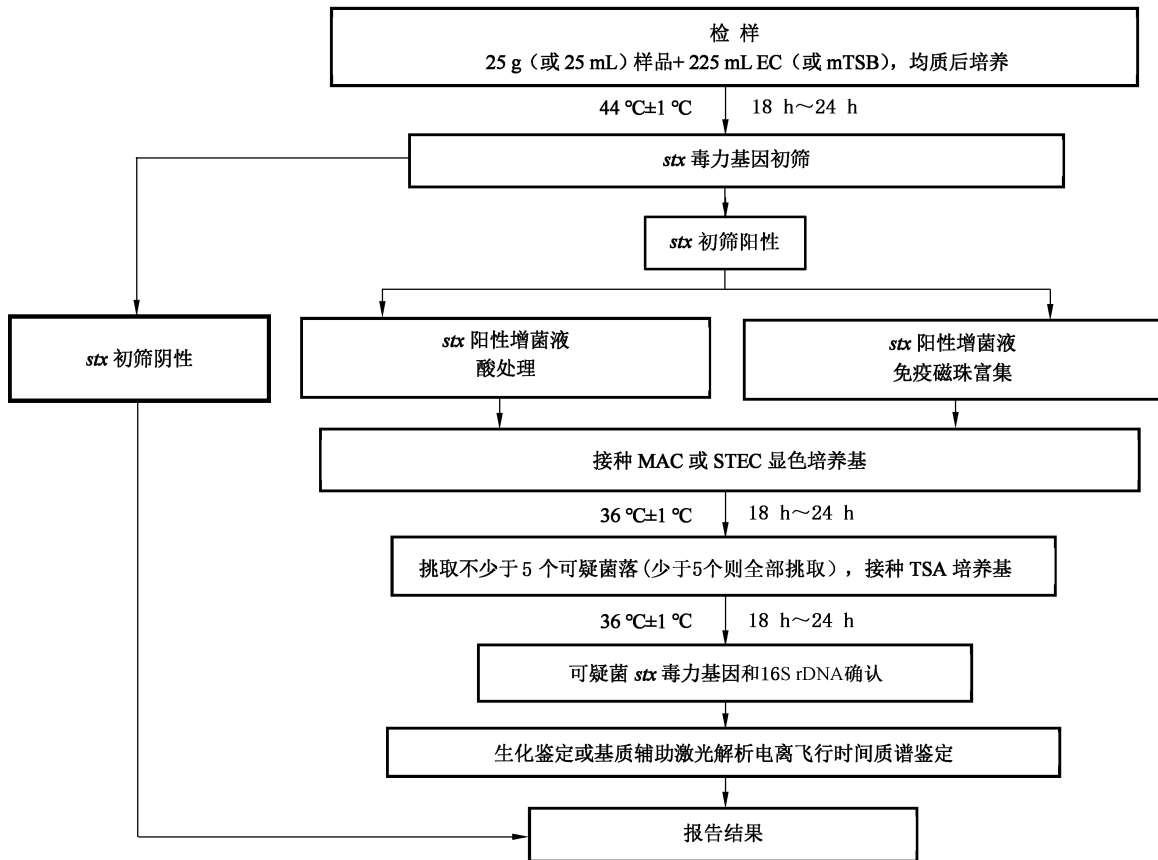


图 1 产志贺毒素大肠埃希氏菌检验程序

5 操作步骤

5.1 样品制备

5.1.1 样品保存

样品采集后应尽快送往实验室进行检测,如不能及时检测,应将待检样品根据样品贮存要求进行保存,无特殊要求的,应置于 2℃~5℃ 冰箱中冷藏,24 h 内完成检测。

5.1.2 固态或半固态样品

以无菌操作称取检样 25 g,加入装有 225 mL EC(或 mTSB)的无菌带滤网均质袋内,用拍击式均质器均质 1 min~2 min;或放入盛有 225 mL EC(或 mTSB)的无菌均质杯中,用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min,制成 1:10 的样品匀液。

5.1.3 液态样品

以无菌操作量取检样 25 mL,加入装有 225 mL EC(或 mTSB)的无菌均质袋或无菌锥形瓶中,充分混匀制成 1:10 的样品匀液。

5.2 增菌

将 5.1 制备的样品匀液 44℃±1℃ 下培养 18 h~24 h。同时设置对照试验,以携带 *stx1* 和/或 *stx2* 的大肠埃希氏菌标准菌株在 EC(或 mTSB)中培养为阳性对照,以不携带 *stx1* 和 *stx2* 的大肠埃希氏菌标准菌株在 EC(或 mTSB)中培养为阴性对照,并做培养基空白对照。

5.3 *stx* 毒力基因初筛

5.3.1 试验环境与过程控制

实时荧光定量 PCR 试验环境条件和过程控制应按 GB/T 27403—2008 规定的要求执行。

5.3.2 DNA 模板制备

混匀后吸取 1 mL 增菌液(油脂含量高的样品不混匀,在距离液面下 1 cm 处吸取)置于 1.5 mL EP 管中,500g 离心 1 min。取上清液(避免带入底层沉淀物)至新的 EP 管中,10 000g 离心 5 min,弃去上清液。向沉淀中加入 500 μL 无菌生理盐水,重悬,10 000g 离心 3 min,弃去上清液。向沉淀中加入 100 μL 的 1×TE 缓冲液,重悬(若样本为生肉制品,则用 5%的 Chelex-100 溶液替代 TE)。99℃±1℃ 加热 15 min,室温冷却 2 min,10 000g 离心 4 min,取上清液作为 DNA 模板。4 h 内完成分析,若不能及时分析则于-20℃ 短暂保存。

注:也可用商品化 DNA 提取试剂盒按其说明书要求提取制备 DNA 模板。

5.3.3 实时荧光定量 PCR 初筛

5.3.3.1 引物及探针

见表 1。

表 1 产志贺毒素大肠埃希氏菌实时荧光定量 PCR 引物及探针信息

基因	引物	引物和探针序列(5'-3') ^a
<i>stx1</i>	<i>stx1</i> F	GCA GAT AAA TCG CCA TTC G
	<i>stx1</i> R	TGT TGT ACG AAA TCC CCT CTG
	<i>stx1</i> P	HEX-AGA GCG ATG TTA CGG TTT GTT ACT G-BHQ1
<i>stx2</i>	<i>stx2</i> F	TTT GTY ACW GTS AYA GCW GAA GCY TTA CG
	<i>stx2</i> R	CCC CAG TTC ARH GTR AGR TCM ACD TC
	<i>stx2</i> P	FAM-YCG WCH GGC RCT GTC TGA RRC WKC TCC-BHQ1
16S rDNA	16S rDNA F	CCT CTT GCC ATC GGA TGT G
	16S rDNA R	GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC
	16S rDNA P	CY5-GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG AC-BHQ2
^a 序列中 Y 为(C, T), W 为(A, T), R 为(A, G), S 为(G, C), D 为(A, G, T), M 为(A, C), H 为(A, T, C), K 为(G, T)。		

5.3.3.2 对照设置

按照 5.2 的规定进行对照设置。

5.3.3.3 实时荧光定量 PCR 反应体系

见表 2, 如选择商品化实时荧光定量 PCR 试剂盒时, 可按照试剂盒说明书进行操作。

表 2 产志贺毒素大肠埃希氏菌实时荧光定量 PCR 反应体系

试剂	工作液浓度	反应体积/ μ L
10 \times buffer	10 \times	2.5
dNTPs	2.5 mmol/L	1.0
<i>stx1</i> 上游引物(<i>stx1</i> F)	50 μ mol/L	0.2
<i>stx1</i> 下游引物(<i>stx1</i> R)	50 μ mol/L	0.2
<i>stx1</i> 探针(<i>stx1</i> P)	50 μ mol/L	0.1
<i>stx2</i> 上游引物(<i>stx2</i> F)	50 μ mol/L	0.2
<i>stx2</i> 下游引物(<i>stx2</i> R)	50 μ mol/L	0.2
<i>stx2</i> 探针(<i>stx2</i> P)	50 μ mol/L	0.1
16S rDNA 上游引物(16S rDNA F) [*]	20 μ mol/L	0.2
16S rDNA 下游引物(16S rDNA R) [*]	20 μ mol/L	0.2
16S rDNA 探针(16S rDNA P) [*]	5 μ mol/L	0.5
<i>Taq</i> 酶	5 U/ μ L	0.4
DNA 模板	—	2.0
ddH ₂ O	—	17.2
总体积	—	25.0
[*] <i>stx</i> 毒力基因初筛时, 引物体系中不加入 16S rDNA 引物和探针, 同时 ddH ₂ O 体积增加 0.4 μ L, 增至 17.6 μ L。在有效性原则和结果判定中, 也无需考虑 16S rDNA 指标。		

5.3.3.4 实时荧光定量 PCR 反应程序

预变性:95 °C 10 min;变性:95 °C 15 s;退火:60 °C 40 s;延伸:72 °C 1 min 40 个循环。在延伸阶段于 3 条荧光检测通道中,分别采集已标记的荧光信号。

5.3.3.5 结果有效性原则

若同一批次实验中同时满足下列要求,则实时荧光定量 PCR 实验结果有效;否则实时荧光定量 PCR 实验结果无效,需重新进行实验。

- a) 空白对照:*stx1*、*stx2* 和 16S rDNA 基因均无荧光对数增长(16S rDNA 基因可能在 35 个循环后出现较弱的荧光对数增长);
- b) 阴性对照:*stx1* 和 *stx2* 均无荧光对数增长;16S rDNA 基因有荧光对数增长,相应的 Ct 值 < 30;
- c) 阳性对照:*stx1*、*stx2* 和 16S rDNA 基因均有荧光对数增长,相应的 Ct 值 < 30。

5.3.3.6 实时荧光定量 PCR 结果判定

在符合 5.3.3.5 结果有效性原则的情况下,待检样品进行检测时,若:

- a) *stx1* 和 *stx2* 的 Ct 值 ≥ 40 ,则判定为 *stx* 阴性;
- b) *stx1* 或 *stx2* 的 Ct 值 < 35,16S rDNA 基因的 Ct 值 < 35,则判定为 *stx* 阳性;
- c) *stx1* 和 *stx2* 的 Ct 值均 ≥ 35 且 < 40,应重新进行实时荧光定量 PCR 扩增实验。再次扩增后 *stx1* 或 *stx2* 的 Ct 值 < 40,16S rDNA 基因的 Ct 值 < 35,判定为 *stx* 阳性;若 *stx1* 和 *stx2* 的 Ct 值 ≥ 40 ,则判定为 *stx* 阴性。

判定为 *stx* 阴性的样品,按流程报告结果为“25 g(mL)样品中未检出产志贺毒素大肠埃希氏菌”。

判定为 *stx* 阳性的样品增菌液按 5.4.5.5 的规定分别进行酸处理及免疫磁珠富集处理。

5.4 增菌液酸处理

吸取 450 μ L 5.3 中 *stx* 阳性的样品增菌液至 1.5 mL 无菌 EP 管,10 000 g 离心 2 min,弃上清,菌体沉淀重悬于 450 μ L 的 E-buffer 溶液中,加入 25 μ L 的 1 mol/L 盐酸(pH 2.0~2.5),室温条件振荡 1 h,用 10 μ L 无菌接种环划线接种于 STEC 显色培养基或麦康凯琼脂培养基平板,36 °C \pm 1 °C 培养 18 h~24 h。

吸取上述酸处理液 100 μ L 至 900 μ L E-buffer 溶液进行稀释,涡旋混匀后用 10 μ L 无菌接种环划线接种于 STEC 显色培养基或麦康凯琼脂培养基平板,36 °C \pm 1 °C 培养 18 h~24 h。

5.5 7 种重要血清型 STEC 免疫磁珠富集处理

5.5.1 5.3 中判定为 *stx* 阳性的样品增菌液除进行 5.4 酸处理外,还需同时进行免疫磁珠富集,按生产商提供的使用说明对 7 种重要血清型(O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157)的 STEC 进行了富集处理,并设置具有相应血清型的标准菌株作为阳性对照组。当生产商使用说明与下面的描述存在偏差时,按生产商使用说明进行操作,每个样品换用 1 根吸管避免交叉污染。

5.5.2 将微量离心管按样品和标准菌株编号,每个样品使用 7 个微量离心管(7 种免疫磁珠各 1 管),置于磁板架上。将 7 种 STEC 免疫磁珠悬液试剂轻柔振荡混匀后,分别加至相应编号的微量离心管中。

5.5.3 吸取 *stx* 阳性增菌液 8 mL 加入 15 mL 离心管中,10 000 g 离心 3 min,弃去上清液,加入 3 mL 无菌 PBS 重悬沉淀并涡旋混匀,10 000 g 离心 3 min,PBS 洗菌步骤重复 2~3 遍后弃去上清液,菌体沉淀备用。

5.5.4 向 5.5.3 菌体沉淀中加入 800 μ L 无菌 PBS 缓冲液重悬,涡旋混匀后分别吸取 100 μ L 菌悬液至

5.5.2 加有免疫磁珠的 7 个微量离心管中,并盖好离心管盖。每个样品更换加样吸头,标准菌株必须与样品分开进行实验,以避免交叉污染。每个样品均需进行 7 种血清型免疫磁珠富集。

5.5.5 结合:颠倒混匀数次。37 °C 条件下,在混匀仪上孵育 60 min,速度设置宜轻柔,使目标菌体与免疫磁珠充分接触。

5.5.6 捕获:孵育结束后,将磁板插入磁板架中捕获磁珠,在 3 min 内不断倾斜磁板架,确保悬液中与盖子上的免疫磁珠全部被收集,在微量离心管管壁中间位置可见圆形或椭圆形棕色聚集物。

5.5.7 磁珠纯化:小心将离心管盖打开,从免疫磁珠聚集物的对侧轻轻移取上清液。当液面接近免疫磁珠聚集物附近时,应缓慢吸液直至液面远离聚集物附近,确保免疫磁珠聚集物不被吸走。如吸取的上清液内含有磁珠,则将其放回微量离心管,并重复 5.5.6 步骤。此步骤为纯化关键步骤,需要谨慎完成。

5.5.8 洗涤:向去除液体后的微量离心管中加入 1 mL 无菌 PBS 缓冲液,涡旋混匀,重复 5.5.6 和 5.5.7 步骤的要求回收磁珠。

5.5.9 重复步骤 5.5.8 一次。

5.5.10 免疫磁珠重悬:移去磁板,将免疫磁珠聚集物重新悬浮于 100 μ L 无菌 PBS 缓冲液。

5.5.11 重悬混匀后的免疫磁珠悬液涂布或划线接种于 STEC 显色培养基或麦康凯琼脂培养基平板,36 °C \pm 1 °C 培养 18 h~24 h。

5.6 STEC 菌株的分离和复核鉴定

5.6.1 分离

观察 STEC 显色培养基或麦康凯平板上的菌落生长情况及菌落形态。在 STEC 显色培养基上的菌落特征按产品说明书进行判定;在麦康凯琼脂培养基平板上,典型大肠埃希氏菌为桃红色菌落和无色或淡粉色菌落。分别挑取经酸处理或磁珠富集处理的典型菌落(均不少于 5 个,少于 5 个全部挑取),划线接种于 TSA 琼脂平板进行再次分离纯化。

5.6.2 *stx* 毒力基因鉴定

5.6.2.1 DNA 提取

使用接种环挑取 TSA 琼脂上培养 18 h~24 h 的可疑单菌落,悬浮于 50 μ L 无菌水中,充分混匀制成菌悬液,99 °C \pm 1 °C 加热 15 min,室温冷却 2 min,16 000 g 离心 4 min,取上清液作为 DNA 模板。

5.6.2.2 *stx* 毒力基因和 16S rDNA 检测

stx 毒力基因和 16S rDNA 的检测及结果判定按 5.3.3 的要求进行。

5.6.2.3 菌株生化鉴定

stx 毒力基因和 16S rDNA 检测为阳性的菌株,进行大肠埃希氏菌典型生化鉴定。三糖铁斜面产酸或不产酸,底层产酸,靛基质阳性,H₂S 阴性和尿素酶阴性的培养物为大肠埃希氏菌。三糖铁斜面底层不产酸,或 H₂S、KCN、尿素酶有任一项为阳性的培养物,均非大肠埃希氏菌。

菌株鉴定可选择全自动微生物生化鉴定系统、微生物生化鉴定试剂条(盒)或基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪进行鉴定,按仪器或试剂盒的使用说明进行操作及判定。

5.7 血清学试验(选做项目)

条件允许的实验室,可对分离到的 *stx* 阳性大肠埃希氏菌进行血清学试验。按照生产商提供的使用说明进行 O 抗原和 H 抗原鉴定。

6 结果与报告

初筛 *stx* 阴性,报告“25 g(mL)样品中未检出产志贺毒素大肠埃希氏菌”。

初筛 *stx* 阳性,但未分离到 *stx* 阳性大肠埃希氏菌,报告“25 g(mL)样品中未检出产志贺毒素大肠埃希氏菌”。

初筛 *stx* 阳性,且分离到 *stx* 阳性菌株,经鉴定为大肠埃希氏菌,报告“25 g(mL)样品中检出产志贺毒素大肠埃希氏菌”。

附录 A
培养基和试剂

A.1 改良胰蛋白胨大豆液体培养基(mTSB)

A.1.1 成分

胰酪蛋白胨	17.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	4.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
葡萄糖	2.5 g
3号胆盐	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将 A.1.1 中的各种成分混匀,加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 , $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.2 EC 肉汤培养基(EC)

A.2.1 成分

胰酪蛋白胨	20.0 g
3号胆盐	1.5 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾	4.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将 A.2.1 中的各种成分混匀,加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 6.9 ± 0.2 , $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.3 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)

A.3.1 成分

胰酪蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

将 A.3.1 中的各种成分混匀,加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 7.3 ± 0.2 , $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。冷却至 $45\text{ }^\circ\text{C} \sim 50\text{ }^\circ\text{C}$,倾注平板。

A.4 STEC 显色培养基

A.4.1 基础培养基成分

牛肉蛋白胨+酵母粉	8.0 g
盐类	5.2 g
色素	2.6 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	990 mL

A.4.2 增补剂成分

增补剂	10.0 mL
-----	---------

A.4.3 制法

将 A.4.1 中成分混匀,加热至 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 使其完全溶解后,冷却至 $45\text{ }^\circ\text{C} \sim 50\text{ }^\circ\text{C}$,制成基础培养基。将 A.4.2 中增补剂成分加入制好的基础培养基中(如增补剂为粉末状,则一瓶加入 10 mL 无菌水搅拌均匀),轻轻摇动使其充分混匀,制作平板。培养基的 pH 为 6.9 ± 0.2 。

A.5 麦康凯琼脂培养基(MAC)

A.5.1 成分

牛肉蛋白胨	20.0 g
乳糖	10.0 g
3 号胆盐	1.5 g
氯化钠	5.0 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.001 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

将 A.5.1 中的各种成分混匀,加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 , $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。冷却至 $45\text{ }^\circ\text{C} \sim 50\text{ }^\circ\text{C}$,倾注平板。

A.6 脑心浸出液肉汤(BHI)-50%甘油

A.6.1 成分

胰酪蛋白胨	10.0 g
-------	--------

GB 4789.49—2024

葡萄糖	2.0 g
牛脑心粉	5.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	2.5 g
蒸馏水	500 mL

A.6.2 制法

将 A.6.1 中的各种成分混匀,加热煮沸至完全溶解,加入 500 mL 甘油,按每管 1 mL 分装于冻存管中,121 °C 高压灭菌 15 min(可依据实际用量按比例缩放配制)。

A.7 5% Chelex-100 溶液

无菌称取 5 g Chelex-100 干粉,加 100 mL 灭菌纯水溶解,依据说明书置于 2 °C~5 °C 保存。

A.8 E-buffer 溶液

A.8.1 成分

牛血清白蛋白	5.0 g
吐温 20	0.5 mL
牛肉蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二钠	3.5 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.8.2 制法

将 A.8.1 中各种成分充分溶解混匀,再用 0.22 μm 孔径的无菌滤膜过滤除菌(可依据实际用量按比例缩放配制),依据说明书置于 2 °C~5 °C 冷藏备用。

A.9 TE-buffer 溶液

A.9.1 成分

1 mol/L Tris pH 7.5	100 μL
0.05 mol/L EDTA	20 μL
PCR 级水(无 DNA 酶/RNA 酶)	9.88 mL

A.9.2 制法

将 A.9.1 中各种成分混匀,高温高压灭菌后,室温保存(可依据实际用量按比例缩放配制)。

A.10 PBS 缓冲液

A.10.1 成分

氯化钠	7.65 g
-----	--------

磷酸氢二钠	0.724 g
磷酸二氢钾	0.21 g
蒸馏水	1 000 mL

A.10.2 制法

将 A.10.1 中各种成分混匀。调节 pH 为 7.4 ± 0.2 。121 °C 高压灭菌 15 min, 室温保存(可依据实际用量按比例缩放配制)。
