

中华人民共和国国家标准

GB 4789.6—2016

食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局发布

前　　言

本标准代替 GB/T 4789.6—2003《食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.6—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验”;
- 增加了术语和定义、缩略语;
- 增加了血清学试验中 H 抗原鉴定;
- 增加了 PCR 确认试验;
- 增加了附录 A;
- 修改了设备和材料;
- 修改了培养基和试剂;
- 修改了检验程序;
- 修改了血清学试验中致泻大肠埃希氏菌所包括的 O 抗原群;
- 删除了肠毒素试验。

食品安全国家标准

食品微生物学检验

致泻大肠埃希氏菌检验

1 范围

本标准规定了食品中致泻大肠埃希氏菌(*diarrheagenic Escherichia coli*)的检验方法。本标准适用于食品中致泻大肠埃希氏菌的检验。

2 术语和定义、缩略语

2.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1.1 致泻大肠埃希氏菌 *Diarrheagenic Escherichia coli*

一类能引起人体以腹泻症状为主的大肠埃希氏菌,可经过污染食物引起人类发病。常见的致泻大肠埃希氏菌主要包括肠道致病性大肠埃希氏菌、肠道侵袭性大肠埃希氏菌、产肠毒素大肠埃希氏菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌(包括肠道出血性大肠埃希氏菌)和肠道集聚性大肠埃希氏菌。

2.1.2 肠道致病性大肠埃希氏菌 *Enteropathogenic Escherichia coli*

能够引起宿主肠黏膜上皮细胞黏附及擦拭性损伤,且不产生志贺毒素的大肠埃希氏菌。该菌是婴幼儿腹泻的主要病原菌,有高度传染性,严重者可致死。

2.1.3 肠道侵袭性大肠埃希氏菌 *Enteroinvasive Escherichia coli*

能够侵入肠道上皮细胞而引起痢疾样腹泻的大肠埃希氏菌。该菌无动力、不发生赖氨酸脱羧反应、不发酵乳糖,生化反应和抗原结构均近似痢疾志贺氏菌。侵入上皮细胞的关键基因是侵袭性质粒上的抗原编码基因及其调控基因,如*ipaH* 基因、*ipaR* 基因(又称为*invE* 基因)。

2.1.4 产肠毒素大肠埃希氏菌 *Enterotoxigenic Escherichia coli*

能够分泌热稳定性肠毒素或/和热不稳定性肠毒素的大肠埃希氏菌。该菌可引起婴幼儿和旅游者腹泻,一般呈轻度水样腹泻,也可呈严重的霍乱样症状,低热或不发热。腹泻常为自限性,一般 2 d~3 d 即自愈。

2.1.5 产志贺毒素大肠埃希氏菌 *Shiga toxin-producing Escherichia coli*(肠道出血性大肠埃希氏菌 *Enterohemorrhagic Escherichia coli*)

能够分泌志贺毒素、引起宿主肠黏膜上皮细胞黏附及擦拭性损伤的大肠埃希氏菌。有些产志贺毒素大肠埃希氏菌在临幊上引起人类出血性结肠炎(HC)或血性腹泻,并可进一步发展为溶血性尿毒综合征(HUS),这类产志贺毒素大肠埃希氏菌为肠道出血性大肠埃希氏菌。

2.1.6 肠道集聚性大肠埃希氏菌 *Enteropathogenic Escherichia coli*

肠道集聚性大肠埃希氏菌不侵入肠道上皮细胞,但能引起肠道液体蓄积。不产生热稳定性肠毒素或热不稳定性肠毒素,也不产生志贺毒素。唯一特征是能对 Hep-2 细胞形成集聚性黏附,也称 Hep-2 细胞黏附性大肠埃希氏菌。

2.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- 2.2.1 DEC:致泻大肠埃希氏菌 Diarrheagenic *Escherichia coli*
- 2.2.2 EPEC:肠道致病性大肠埃希氏菌 Enteropathogenic *Escherichia coli*
- 2.2.3 EIEC:肠道侵袭性大肠埃希氏菌 Enteroinvasive *Escherichia coli*
- 2.2.4 ETEC:产肠毒素大肠埃希氏菌 Enterotoxigenic *Escherichia coli*
- 2.2.5 STEC:产志贺毒素大肠埃希氏菌 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*
- 2.2.6 EHEC:肠道出血性大肠埃希氏菌 Enterohemorrhagic *Escherichia coli*
- 2.2.7 EAEC:肠道集聚性大肠埃希氏菌 Enteropathogenic *Escherichia coli*
- 2.2.8 *escV*:蛋白分泌物调节基因, gene encoding LEE-encoded type III secretion system factor
- 2.2.9 *eae*:紧密素基因, gene encoding intimin for *Escherichia coli* attaching and effacing
- 2.2.10 *bfpB*:束状菌毛 B 基因, bundle-forming pilus B;
- 2.2.11 *stx1*:志贺毒素 I 基因, Shiga toxin one
- 2.2.12 *stx2*:志贺毒素 II 基因, Shiga toxin two
- 2.2.13 *lt*:热不稳定性肠毒素基因, heat-labile enterotoxin
- 2.2.14 *st*:热稳定性肠毒素基因, heat-stable enterotoxin
- 2.2.15 *stp (stIa)*:猪源热稳定性肠毒素基因, heat-stable enterotoxins initially discovered in the isolates from pigs
- 2.2.16 *sth (stIb)*:人源热稳定性肠毒素基因, heat-stable enterotoxins initially discovered in the isolates from human
- 2.2.17 *invE*:侵袭性质粒调节基因, invasive plasmid regulator
- 2.2.18 *ipaH*:侵袭性质粒抗原 H 基因, invasive plasmid antigen H-gene
- 2.2.19 *aggR*:集聚黏附菌毛调节基因, aggregative adhesive fimbriae regulator
- 2.2.20 *uidA*: β -葡萄糖苷酶基因, β -glucuronidase gene
- 2.2.21 *astA*:集聚热稳定性毒素 A 基因, enteroaggregative heat-stable enterotoxin A
- 2.2.22 *pic*:肠定植因子基因, protein involved in intestinal colonization
- 2.2.23 *LEE*:肠细胞损伤基因座, Locus of enterocyte effacement
- 2.2.24 *EAF*:EPEC 黏附因子, EPEC adhesive factor

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 恒温培养箱: 36 ℃±1 ℃, 42 ℃±1 ℃。
- 3.2 冰箱: 2 ℃~5 ℃。
- 3.3 恒温水浴箱: 50 ℃±1 ℃, 100 ℃或适配 1.5 mL 或 2.0 mL 金属浴(95 ℃~100 ℃)。
- 3.4 电子天平: 感量为 0.1 g 和 0.01 g。
- 3.5 显微镜: 10×~100×。

- 3.6 均质器。
- 3.7 振荡器。
- 3.8 无菌吸管:1 mL(具0.01 mL刻度),10 mL(具0.1 mL刻度)或微量移液器及吸头。
- 3.9 无菌均质杯或无菌均质袋:容量500 mL。
- 3.10 无菌培养皿:直径90 mm。
- 3.11 pH计或精密pH试纸。
- 3.12 微量离心管:1.5 mL或2.0 mL。
- 3.13 接种环:1 μ L。
- 3.14 低温高速离心机:转速 $\geq 13\,000$ r/min,控温4 ℃~8 ℃。
- 3.15 微生物鉴定系统。
- 3.16 PCR仪。
- 3.17 微量移液器及吸头:0.5 μ L~2 μ L,2 μ L~20 μ L,20 μ L~200 μ L,200 μ L~1 000 μ L。
- 3.18 水平电泳仪:包括电源、电泳槽、制胶槽(长度 >10 cm)和梳子。
- 3.19 8联排管和8联排盖(平盖/凸盖)。
- 3.20 凝胶成像仪。

4 培养基和试剂

- 4.1 营养肉汤:见A.1。
- 4.2 肠道菌增菌肉汤:见A.2。
- 4.3 麦康凯琼脂(MAC):见A.3。
- 4.4 伊红美蓝琼脂(EMB):见A.4。
- 4.5 三糖铁(TSI)琼脂:见A.5。
- 4.6 蛋白胨水、凝基质试剂:见A.6。
- 4.7 半固体琼脂:见A.7。
- 4.8 尿素琼脂(pH7.2):见A.8。
- 4.9 氰化钾(KCN)培养基:见A.9。
- 4.10 氧化酶试剂:见A.10。
- 4.11 革兰氏染色液:见A.11。
- 4.12 BHI肉汤:见A.12。
- 4.13 福尔马林(含38%~40%甲醛)。
- 4.14 鉴定试剂盒。
- 4.15 大肠埃希氏菌诊断血清。
- 4.16 灭菌去离子水。
- 4.17 0.85%灭菌生理盐水。
- 4.18 TE(pH8.0):见A.13。
- 4.19 10×PCR反应缓冲液:见A.14。
- 4.20 25 mmol/L MgCl₂。
- 4.21 dNTPs:dATP、dTTP、dGTP、dCTP每种浓度为2.5 mmol/L。
- 4.22 5 U/L Taq酶。
- 4.23 引物。
- 4.24 50×TAE电泳缓冲液:见A.15。
- 4.25 琼脂糖。

4.26 溴化乙锭(EB)或其他核酸染料。

4.27 6×上样缓冲液:见 A.16。

4.28 Marker:分子量包含 100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、600 bp、700 bp、800 bp、900 bp、1 000 bp、1 500 bp 条带。

4.29 致泻大肠埃希氏菌 PCR 试剂盒。

5 检验程序

致泻大肠埃希氏菌检验程序见图 1。

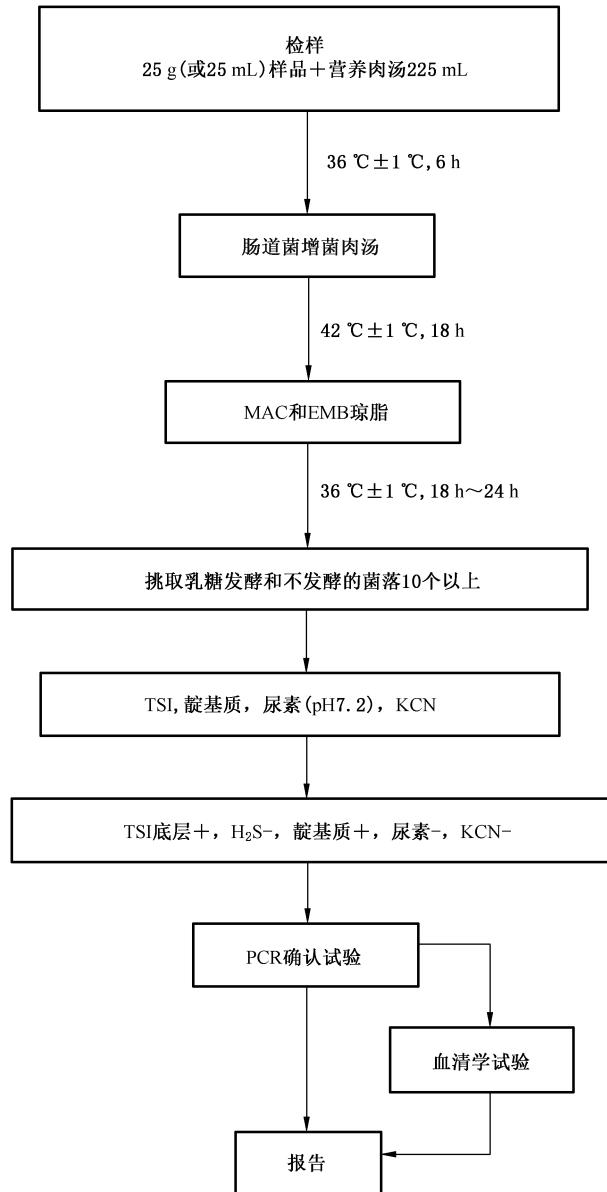


图 1 致泻大肠埃希氏菌检验程序

6 操作步骤

6.1 样品制备

6.1.1 固态或半固态样品

固体或半固态样品,以无菌操作称取检样 25 g,加入装有 225 mL 营养肉汤的均质杯中,用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min;或加入装有 225 mL 营养肉汤的均质袋中,用拍击式均质器均质 1 min~2 min。

6.1.2 液态样品

以无菌操作量取检样 25 mL,加入装有 225 mL 营养肉汤的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠),振荡混匀。

6.2 增菌

将 6.1 制备的样品匀液于 36 ℃±1 ℃ 培养 6 h。取 10 μL,接种于 30 mL 肠道菌增菌肉汤管内,于 42 ℃±1 ℃ 培养 18 h。

6.3 分离

将增菌液划线接种 MAC 和 EMB 琼脂平板,于 36 ℃±1 ℃ 培养 18 h~24 h,观察菌落特征。在 MAC 琼脂平板上,分解乳糖的典型菌落为砖红色至桃红色,不分解乳糖的菌落为无色或淡粉色;在 EMB 琼脂平板上,分解乳糖的典型菌落为中心紫黑色带或不带金属光泽,不分解乳糖的菌落为无色或淡粉色。

6.4 生化试验

6.4.1 选取平板上可疑菌落 10 个~20 个(10 个以下全选),应挑取乳糖发酵,以及乳糖不发酵和迟缓发酵的菌落,分别接种 TSI 斜面。同时将这些培养物分别接种蛋白胨水、尿素琼脂(pH7.2)和 KCN 肉汤。于 36 ℃±1 ℃ 培养 18 h~24 h。

6.4.2 TSI 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。TSI 斜面底层不产酸,或 H₂S、KCN、尿素有任一项为阳性的培养物,均非大肠埃希氏菌。必要时做革兰氏染色和氧化酶试验。大肠埃希氏菌为革兰氏阴性杆菌,氧化酶阴性。

6.4.3 如选择生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统,可从营养琼脂平板上挑取经纯化的可疑菌落用无菌稀释液制备成浓度适当的菌悬液,使用生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统进行鉴定。

6.5 PCR 确认试验

6.5.1 取生化反应符合大肠埃希氏菌特征的菌落进行 PCR 确认试验。

注:PCR 实验室区域设计、工作基本原则及注意事项应参照《疾病预防控制中心建设标准》(建标 127—2009)和国家卫生和计划生育委员会(原卫生部)(2010)《医疗机构临床基因扩增管理办法》附录(医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则)。

6.5.2 使用 1 μL 接种环刮取营养琼脂平板或斜面上培养 18 h~24 h 的菌落,悬浮在 200 μL 0.85% 灭菌生理盐水中,充分打散制成菌悬液,于 13 000 r/min 离心 3 min,弃掉上清液。加入 1 mL 灭菌去离子水充分混匀菌体,于 100 ℃ 水浴或者金属浴维持 10 min;冰浴冷却后,13 000 r/min 离心 3 min,收集上清液;按 1:10 的比例用灭菌去离子水稀释上清液,取 2 μL 作为 PCR 检测的模板;所有处理后的 DNA

模板直接用于 PCR 反应或暂存于 4 ℃并当天进行 PCR 反应;否则,应在 -20 ℃以下保存备用(1 周内)。也可用细菌基因组提取试剂盒提取细菌 DNA,操作方法按照细菌基因组提取试剂盒说明书进行。

6.5.3 每次 PCR 反应使用 EPEC、EIEC、ETEC、STEC/EHEC、EAEC 标准菌株作为阳性对照。同时,使用大肠埃希氏菌 ATCC 25922 或等效标准菌株作为阴性对照,以灭菌去离子水作为空白对照,控制 PCR 体系污染。致泻大肠埃希氏菌特征性基因见表 1。

表 1 五种致泻大肠埃希氏菌特征基因

致泻大肠埃希氏菌类别	特征性基因	
EPEC	<i>escV</i> 或 <i>eae</i> 、 <i>bfpB</i>	<i>uidA</i>
STEC/EHEC	<i>escV</i> 或 <i>eae</i> 、 <i>stx1</i> 、 <i>stx2</i>	
EIEC	<i>invE</i> 或 <i>ipaH</i>	
ETEC	<i>lt</i> 、 <i>stp</i> 、 <i>sth</i>	
EAEC	<i>astA</i> 、 <i>aggR</i> 、 <i>pic</i>	

6.5.4 PCR 反应体系配制。每个样品初筛需配置 12 个 PCR 扩增反应体系,对应检测 12 个目标基因,具体操作如下:使用 TE 溶液(pH8.0)将合成的引物干粉稀释成 100 μmol/L 储存液。根据表 2 中每种目标基因对应 PCR 体系内引物的终浓度,使用灭菌去离子水配制 12 种目标基因扩增所需的 10×引物工作液(以 *uidA* 基因为例,如表 3)。将 10×引物工作液、10×PCR 反应缓冲液、25 mmol/L MgCl₂、2.5 mmol/L dNTPs、灭菌去离子水从 -20 ℃冰箱中取出,融化并平衡至室温,使用前混匀;5 U/μL Taq 酶在加样前从 -20 ℃冰箱中取出。每个样品按照表 4 的加液量配制 12 个 25 μL 反应体系,分别使用 12 种目标基因对应的 10×引物工作液。

表 2 五种致泻大肠埃希氏菌目标基因引物序列及每个 PCR 体系内的终浓度^c

引物名称	引物序列 ^c	菌株编号及对应 Genbank 编码	引物所在位置	终浓度 n (μmol/L)	PCR 产物长度(bp)
<i>uidA</i> -F	5'-ATG CCA GTC CAG CGT TTT TGC-3'	Escherichia coli DH1Ec169 (accession no. CP012127.1)	1673870 - 1673890	0.2	1 487
<i>uidA</i> -R	5'-AAA GTG TGG GTC AAT AAT CAG GAA GTG-3'		1675356-1675330	0.2	
<i>escV</i> -F	5'-ATT CTG GCT CTC TTC TTC TTT ATG GCT G-3'	Escherichia coli E2348/69 (accession no. FM180568.1)	4122765-4122738	0.4	544
<i>escV</i> -R	5'-CGT CCC CTT TTA CAA ACT TCA TCG C-3'		4122222-4122246	0.4	
<i>eae</i> -F ^a	5'-ATT ACC ATC CAC ACA GAC GGT-3'	EHEC (accession no. Z11541.1)	2651-2671	0.2	397
<i>eae</i> -R ^a	5'-ACA GCG TGG TTG GAT CAA CCT-3'		3047-3027	0.2	
<i>bfpB</i> -F	5'-GAC ACC TCA TTG CTG AAG TCG-3'	Escherichia coli E2348/69 (accession no. FM180569.1)	3796-3816	0.1	910

表 2 (续)

引物 名称	引物序列 ^c	菌株编号及对应 Genbank 编码	引物所在位置	终浓度 n (μ mol/L)	PCR 产物 长度(bp)
<i>bfpB</i> -R	5'-CCA GAA CAC CTC CGT TAT GC-3'		4702-4683	0.1	
<i>stx1</i> -F	5'-CGA TGT TAC GGT TTG TTA CTG TGA CAG C-3'	Escherichia coli EDL933 (accession no. AE005174.2)	2996445-2996418	0.2	244
<i>stx1</i> -R	5'-AAT GCC ACG CTT CCC AGA ATT G-3'		2996202-2996223	0.2	
<i>stx2</i> -F	5'-GTT TTG ACC ATC TTC GTC TGA TTA TTG AG-3'	Escherichia coli EDL933 (accession no. AE005174.2)	1352543-1352571	0.4	324
<i>stx2</i> -R	5'-AGC GTA AGG CTT CTG CTG TGA C-3'		1352866-1352845	0.4	
<i>lt</i> -F	5'-GAA CAG GAG GTT TCT GCG TTA GGT G-3'	Escherichia coli E24377A (accession no. CP000795.1)	17030-17054	0.1	655
<i>lt</i> -R	5'-CTT TCA ATG GCT TTT TTT TGG GAG TC-3'		17684-17659	0.1	
<i>stp</i> -F	5'-CCT CTT TTA GYC AGA CAR CTG AAT CAS TTG-3'	Escherichia coli EC2173 (accession no. AJ555214.1)/// Escherichia coli F7682 (accession no. AY342057.1)	1979-1950///14-43	0.4	157
<i>stp</i> -R	5'-CAG GCA GGA TTA CAA CAA AGT TCA CAG-3'		1823-1849///170-144	0.4	
<i>sth</i> -F	5'-TGT CTT TTT CAC CTT TCG CTC-3'	Escherichia coli E24377A (accession no. CP000795.1)	11389-11409	0.2	171
<i>sth</i> -R	5'-CGG TAC AAG CAG GAT TAC AAC AC-3'		11559-11537	0.2	
<i>invE</i> -F	5'-CGA TAG ATG GCG AGA AAT TAT ATC CCG-3'	Escherichia coli serotype O164 (accession no. AF283289.1)	921-895	0.2	766
<i>invE</i> -R	5'-CGA TCA AGA ATC CCT AAC AGA AGA ATC AC-3'		156-184	0.2	
<i>ipaH</i> -F ^b	5'-TTG ACC GCC TTT CCG ATA CC-3'	Escherichia coli 53638 (accession no. CP001064.1)	11471-11490	0.1	647

表 2 (续)

引物 名称	引物序列 ^c	菌株编号及对应 Genbank 编码	引物所在位置	终浓度 n ($\mu\text{mol/L}$)	PCR 产物 长度(bp)
<i>ipaH</i> -R ^b	5'-ATC CGC ATC ACC GCT CAG AC-3'		12117-12098	0.1	
<i>aggR</i> -F	5'-ACG CAG AGT TGC CTG ATA AAG-3'	Escherichia coli enteroaggregative 17-2 (accession no. Z18751.1)	59-79	0.2	400
<i>aggR</i> -R	5'-AAT ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC-3'		458-436	0.2	
<i>pic</i> -F	5'-AGC CGT TTC CGC AGA AGC C-3'	Escherichia coli 042 (accession no. AF097644.1)	3700-3682	0.2	1111
<i>pic</i> -R	5'-AAA TGT CAG TGA ACC GAC GAT TGG-3'		2590-2613	0.2	
<i>astA</i> -F	5'-TGC CAT CAA CAC AGT ATA TCC G-3'	Escherichia coli ECOR 33 (accession no. AF161001.1)	2-23	0.4	102
<i>astA</i> -R	5'-ACG GCT TTG TAG TCC TTC CAT-3'		103-83	0.4	
16S <i>rDNA</i> -F	5'-GGA GGC AGC AGT GGG AAT A-3'	Escherichia coli strain ST2747 (accession no. CP007394.1)	149585-149603	0.25	1062
16S <i>rDNA</i> -R	5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AG-3'		150645-150626	0.25	
^a <i>escV</i> 和 <i>eae</i> 基因选作其中一个； ^b <i>invE</i> 和 <i>ipaH</i> 基因选作其中一个； ^c 表中不同基因的引物序列可采用可靠性验证的其他序列代替。					

表 3 每种目标基因扩增所需 10×引物工作液配制表

引物名称	体积/ μL
100 $\mu\text{mol/L}$ <i>uidA</i> -F	10×n
100 $\mu\text{mol/L}$ <i>uidA</i> -R	10×n
灭菌去离子水	100-2×(10×n)
总体积	100

注：n——每条引物在反应体系内的终浓度(详见表 2)。

表 4 五种致泻大肠埃希氏菌目标基因扩增体系配制表

试剂名称	加样体积/ μL
灭菌去离子水	12.1
10×PCR 反应缓冲液	2.5
25 mmol/L MgCl ₂	2.5
2.5 mmol/L dNTPs	3.0
10×引物工作液	2.5
5 U/ μL Taq 酶	0.4
DNA 模板	2.0
总体积	25

6.5.5 PCR 循环条件。预变性 94 ℃ 5 min; 变性 94 ℃ 30 s, 复性 63 ℃ 30 s, 延伸 72 ℃ 1.5 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。将配制完成的 PCR 反应管放入 PCR 仪中, 核查 PCR 反应条件正确后, 启动反应程序。

6.5.6 称量 4.0 g 琼脂糖粉, 加入至 200 mL 的 1×TAE 电泳缓冲液中, 充分混匀。使用微波炉反复加热至沸腾, 直到琼脂糖粉完全融化形成清亮透明的溶液。待琼脂糖溶液冷却至 60 ℃ 左右时, 加入溴化乙锭(EB)至终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 充分混匀后, 轻轻倒入已放置好梳子的模具中, 凝胶长度要大于 10 cm, 厚度宜为 3 mm~5 mm。检查梳齿下或梳齿间有无气泡, 用一次性吸头小心排掉琼脂糖凝胶中的气泡。当琼脂糖凝胶完全凝结硬化后, 轻轻拔出梳子, 小心将胶块和胶床放入电泳槽中, 样品孔放置在阴极端。向电泳槽中加入 1×TAE 电泳缓冲液, 液面高于胶面 1 mm~2 mm。将 5 μL PCR 产物与 1 μL 6×上样缓冲液混匀后, 用微量移液器吸取混合液垂直伸入液面下胶孔, 小心上样于孔中; 阳性对照的 PCR 反应产物加入到最后一个泳道; 第一个泳道中加入 2 μL 分子量 Marker。接通电泳仪电源, 根据公式: 电压=电泳槽正负极间的距离(cm)×5 V/cm 计算并设定电泳仪电压数值; 启动电压开关, 电泳开始以正负极铂金丝出现气泡为准。电泳 30 min~45 min 后, 切断电源。取出凝胶放入凝胶成像仪中观察结果, 拍照并记录数据。

6.5.7 结果判定。电泳结果中空白对照应无条带出现, 阴性对照仅有 uidA 条带扩增, 阳性对照中出现所有目标条带, PCR 试验结果成立。根据电泳图中目标条带大小, 判断目标条带的种类, 记录每个泳道中目标条带的种类, 在表 5 中查找不同目标条带种类及组合所对应的致泻大肠埃希氏菌类别。

表 5 五种致泻大肠埃希氏菌目标条带与型别对照表

致泻大肠埃希氏菌类别	目标条带的种类组合	
EAEC	aggR, astA, pic 中一条或一条以上阳性	
EPEC	bfpB(+/-), escV ^a (+), stx1(-), stx2(-)	
STEC/EHEC	escV ^a (+/-), stx1(+), stx2(-), bfpB(-) escV ^a (+/-), stx1(-), stx2(+), bfpB(-) escV ^a (+/-), stx1(+), stx2(+), bfpB(-)	uidA ^c (+/-)
ETEC	lt, stp, sth 中一条或一条以上阳性	
EIEC	invE ^b (+)	

^a 在判定 EPEC 或 STEC/EHEC 时, escV 与 eae 基因等效;

^b 在判定 EIEC 时, invE 与 ipaH 基因等效。

^c 97% 以上大肠埃希氏菌为 uidA 阳性。

6.5.8 如用商品化 PCR 试剂盒或多重聚合酶链反应(MPCR)试剂盒,应按照试剂盒说明书进行操作和结果判定。

6.6 血清学试验(选做项目)

6.6.1 取 PCR 试验确认为致泻大肠埃希氏菌的菌株进行血清学试验。

注: 应按照生产商提供的使用说明进行 O 抗原和 H 抗原的鉴定。当生产商的使用说明与下面的描述可能有偏差时,按生产商提供的使用说明进行。

6.6.2 O 抗原鉴定

6.6.2.1 假定试验:挑取经生化试验和 PCR 试验证实为致泻大肠埃希氏菌的营养琼脂平板上的菌落,根据致泻大肠埃希氏菌的类别,选用大肠埃希氏菌单价或多价 OK 血清做玻片凝集试验。当与某一种多价 OK 血清凝集时,再与该多价血清所包含的单价 OK 血清做凝集试验。致泻大肠埃希氏菌所包括的 O 抗原群见表 6。如与某一单价 OK 血清呈现凝集反应,即为假定试验阳性。

6.6.2.2 证实试验:用 0.85% 灭菌生理盐水制备 O 抗原悬液,稀释至与 Mac Farland 3 号比浊管相当的浓度。原效价为 1:160~1:320 的 O 血清,用 0.5% 盐水稀释至 1:40。将稀释血清与抗原悬液于 10 mm×75 mm 试管内等量混合,做单管凝集试验。混匀后放于 50 ℃±1 ℃ 水浴箱内,经 16 h 后观察结果。如出现凝集,可证实为该 O 抗原。

表 6 致泻大肠埃希氏菌主要的 O 抗原

DEC 类别	DEC 主要的 O 抗原
EPEC	O26 O55 O86 O111ab O114 O119 O125ac O127 O128ab O142 O158 等
STEC/EHEC	O4 O26 O45 O91 O103 O104 O111 O113 O121 O128 O157 等
EIEC	O28ac O29 O112ac O115 O124 O135 O136 O143 O144 O152 O164 O167 等
ETEC	O6 O11 O15 O20 O25 O26 O27 O63 O78 O85 O114 O115 O128ac O148 O149 O159 O166 O167 等
EAEC	O9 O62 O73 O101 O134 等

6.6.3 H 抗原鉴定

6.6.3.1 取菌株穿刺接种半固体琼脂管,36 ℃±1 ℃ 培养 18 h~24 h,取顶部培养物 1 环接种至 BHI 液体培养基中,于 36 ℃±1 ℃ 培养 18 h~24 h。加入福尔马林至终浓度为 0.5%,做玻片凝集或试管凝集试验。

6.6.3.2 若待测抗原与血清均无明显凝集,应从首次穿刺培养管中挑取培养物,再进行 2 次~3 次半固体管穿刺培养,按照 6.6.3.1 进行试验。

7 结果报告

7.1 根据生化试验、PCR 确认试验的结果,报告 25 g(或 25 mL)样品中检出或未检出某类致泻大肠埃希氏菌。

7.2 如果进行血清学试验,根据血清学试验的结果,报告 25 g(或 25 mL)样品中检出的某类致泻大肠埃希氏菌血清型别。

附录 A
培养基和试剂

A.1 营养肉汤**A.1.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 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 7.4±0.2, 分装适当的容器。121 ℃灭菌 15 min。

A.2 肠道菌增菌肉汤**A.2.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	5.0 g
牛胆盐	20.0 g
磷酸氢二钠	8.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
煌绿	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将以上成分混合加热溶解,冷却至 25 ℃左右校正 pH 至 7.2±0.2, 分装每瓶 30 mL。115 ℃灭菌 20 min。

A.3 麦康凯琼脂(MAC)**A.3.1 成分**

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.3.2 制法

将以上成分混合加热溶解,校正 pH 至 7.2 ± 0.2 。121 ℃高压灭菌 15 min。冷却至 45 ℃~50 ℃,倾注平板。

注: 如不立即使用,在 2 ℃~8 ℃条件下可储存两周。

A.4 伊红美蓝(EMB)琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	2.0 g
琼脂	15.0 g
2%伊红 Y 水溶液	20.0 mL
0.5%美蓝水溶液	13.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

在 1 000 mL 蒸馏水中煮沸溶解蛋白胨、磷酸盐和乳糖,加水补足,冷却至 25 ℃左右校正 pH 至 7.1 ± 0.2 。再加入琼脂,121 ℃高压灭菌 15 min。冷至 45 ℃~50 ℃,加入 2%伊红 Y 水溶液和 0.5%美蓝水溶液,摇匀,倾注平皿。

A.5 三糖铁琼脂(TSI)

A.5.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁铵[(NH_4) ₂ Fe(SO ₄) ₂ · 6H ₂ O]	0.2 g
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	0.2 g
酚红	0.025 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

除酚红和琼脂外,将其他成分加于 400 mL 水中,搅拌均匀,静置约 10 min,加热使完全溶化,冷却至 25 ℃左右校正 pH 至 7.4 ± 0.2 。另将琼脂加于 600 mL 水中,静置约 10 min,加热使完全溶化。将两溶液混合均匀,加入 5%酚红水溶液 5 mL,混匀,分装小号试管,每管约 3 mL。于 121 ℃灭菌

15 min, 制成高层斜面。冷却后呈桔红色。如不立即使用, 在 2 ℃~8 ℃条件下可储存一个月。

A.6 蛋白胨水、靛基质试剂

A.6.1 成分

胰蛋白胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

将以上成分混合加热溶解, 冷却至 25 ℃左右校正 pH 至 7.4±0.2, 分装小试管, 121 ℃高压灭菌 15 min。

注: 此试剂在 2 ℃~8 ℃条件下可储存一个月。

A.6.3 靛基质试剂

A.6.3.1 柯凡克试剂: 将 5 g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 75 mL 戊醇中。然后缓慢加入浓盐酸 25 mL。

A.6.3.2 欧-波试剂: 将 1 g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 95 mL 95% 乙醇内。然后缓慢加入浓盐酸 20 mL。

A.6.4 试验方法

挑取少量培养物接种, 在 36 ℃±1 ℃培养 1 d~2 d, 必要时可培养 4 d~5 d。加入柯凡克试剂约 0.5 mL, 轻摇试管, 阳性者于试剂层呈深红色; 或加入欧-波试剂约 0.5 mL, 沿管壁流下, 覆盖于培养液表面, 阳性者于液面接触处呈玫瑰红色。

A.7 半固体琼脂

A.7.1 成分

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	0.3 g~0.5 g
蒸馏水	100.0 mL

A.7.2 制法

按以上成分配好, 加热溶解, 冷却至 25 ℃左右校正 pH 至 7.4±0.2, 分装小试管。121 ℃灭菌 15 min, 直立凝固备用。

A.8 尿素琼脂(pH7.2)

A.8.1 成分

蛋白胨	1.0 g
氯化钠	5.0 g

葡萄糖	1.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
0.4% 酚红	3.0 mL
琼脂	20.0 g
20% 尿素溶液	100.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.8.2 制法

除酚红、尿素和琼脂外的其他成分加热溶解,冷却至 25 ℃左右校正 pH 至 7.2±0.2,加入酚红指示剂,混匀,于 121 ℃灭菌 15 min。冷至约 55 ℃,加入用 0.22 μm 过滤膜除菌后的 20% 尿素水溶液 100 mL,混匀,以无菌操作分装灭菌试管,每管约 3 mL~4 mL,制成斜面后放冰箱备用。

A.8.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种,在 36 ℃±1 ℃培养 24 h,观察结果。尿素酶阳性者由于产碱而使培养基变为红色。

A.9 氰化钾(KCN)培养基

A.9.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	0.225 g
磷酸氢二钠	5.64 g
0.5% 氰化钾	20.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

将除氰化钾以外的成分加入蒸馏水中,煮沸溶解,分装后 121 ℃高压灭菌 15 min。放在冰箱内使其充分冷却。每 100 mL 培养基加入 0.5% 氰化钾溶液 2.0 mL(最后浓度为 1:10 000),分装于无菌试管内,每管约 4 mL,立刻用无菌橡皮塞塞紧,放在 4 ℃冰箱内,至少可保存两个月。同时,将不加氰化钾的培养基作为对照培养基,分装试管备用。

A.9.3 试验方法

将琼脂培养物接种于蛋白胨水内成为稀释菌液,挑取 1 环接种于氰化钾(KCN)培养基。并另挑取 1 环接种于对照培养基。在 36 ℃±1 ℃培养 1 d~2 d,观察结果。如有细菌生长即为阳性(不抑制),经 2 d 细菌不生长为阴性(抑制)。

注: 氰化钾是剧毒药,使用时应小心,切勿沾染,以免中毒。夏天分装培养基应在冰箱内进行。试验失败的主要原因是封口不严,氰化钾逐渐分解,产生氢氰酸气体逸出,以致药物浓度降低,细菌生长,因而造成假阳性反应。试验时对每一环节都要特别注意。

A.10 氧化酶试剂

A.10.1 成分

N,N'-二甲基对苯二胺盐酸盐或

<i>N,N,N',N'</i> -四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100 mL

A.10.2 制法

少量新鲜配制,于2℃~8℃冰箱内避光保存,在7d内使用。

A.10.3 试验方法

用无菌棉拭子取单个菌落,滴加氧化酶试剂,10 s内呈现粉红或紫红色即为氧化酶试验阳性,不变色者为氧化酶试验阴性。

A.11 革兰氏染色液

A.11.1 结晶紫染色液

A.11.1.1 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.11.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.11.2 革兰氏碘液

A.11.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.11.2.2 制法

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

A.11.3 沙黄复染液

A.11.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.11.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.11.4 染色法

A.11.4.1 涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染液,染1 min,水洗。

A.11.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A.11.4.3 滴加 95% 乙醇脱色约 15 s~30 s,直至染色液被洗掉,不要过分脱色,水洗。

A.11.4.4 滴加复染液,复染 1 min,水洗、待干、镜检。

A.12 BHI 肉汤

A.12.1 成分

小牛脑浸液	200 g
牛心浸液	250 g
蛋白胨	10.0 g
NaCl	5.0 g
葡萄糖	2.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.12.2 制法

按以上成分配好,加热溶解,冷却至 25 ℃左右校正 pH 至 7.4±0.2,分装小试管。121 ℃灭菌 15 min。

A.13 TE(pH8.0)

A.13.1 成分

1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)	10 .0 mL
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	2.0 mL
灭菌去离子水	988 mL

A.13.2 制法

将 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)、0.5 mol/L EDTA 溶液(pH8.0)加入约 800 mL 灭菌去离子水均匀,再定容至 1 000 mL,121 ℃高压灭菌 15 min,4 ℃保存。

A.14 10×PCR 反应缓冲液

A.14.1 成分

1 mol/L Tris-HCl(pH8.5)	840 mL
氯化钾(KCl)	37.25 g
灭菌去离子水	160 mL

A.14.2 制法

将氯化钾溶于 1 mol/L Tris-HCl(pH8.5),定容至 1 000 mL,121 ℃高压灭菌 15 min,分装后-20 ℃保存。

A.15 50×TAE 电泳缓冲液

A.15.1 成分

Tris	242.0 g
EDTA-2Na(Na ₂ EDTA • 2H ₂ O)	37.2 g
冰乙酸(CH ₃ COOH)	57.1 mL
灭菌去离子水	942.9 mL

A.15.2 制法

Tris 和 EDTA-2Na 溶于 800 mL 灭菌去离子水,充分搅拌均匀;加入冰乙酸,充分溶解;用 1 mol/l NaOH 调 pH 至 8.3,定容至 1 L 后,室温保存。使用时稀释 50 倍即为 1×TAE 电泳缓冲液。

A.16 6×上样缓冲液

A.16.1 成分

溴酚蓝	0.5 g
二甲苯氰 FF	0.5 g
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	0.06 mL
甘油	360 mL
灭菌去离子水	640 mL

A.16.2 制法

0.5 mol/L EDTA(pH8.0)溶于 500 mL 灭菌去离子水中,加入溴酚蓝和二甲苯氰 FF 溶解,与甘油混合,定容至 1 000 mL,分装后 4 ℃保存。
