



# 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 ddH<sub>2</sub>O)。
- 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。

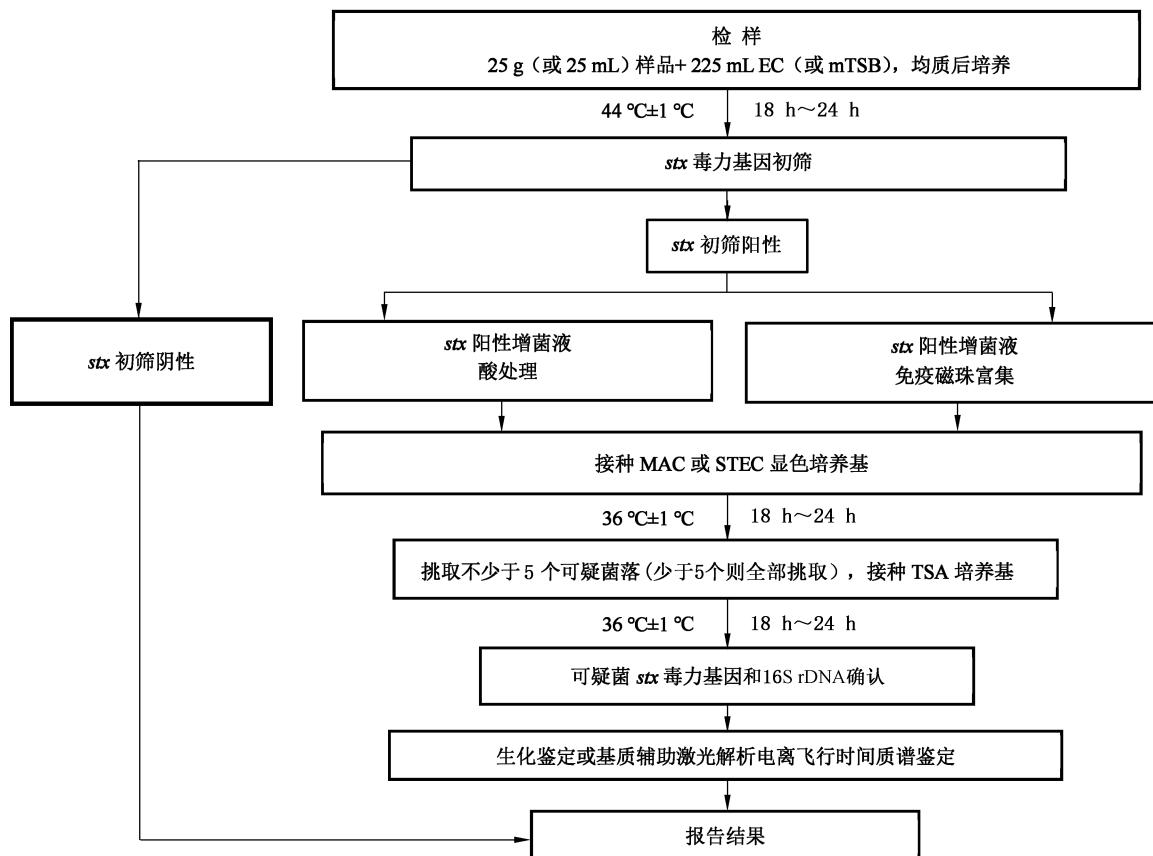


图 1 产志贺毒素大肠埃希氏菌检验程序

## 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℃短暂停存。

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') <sup>a</sup>
<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

<sup>a</sup> 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/ $\mu$ L
10× buffer	10×	2.5
dNTPs	2.5 mmol/L	1.0
<i>stx1</i> 上游引物( <i>stx1</i> F)	50 $\mu$ mol/L	0.2
<i>stx1</i> 下游引物( <i>stx1</i> R)	50 $\mu$ mol/L	0.2
<i>stx1</i> 探针( <i>stx1</i> P)	50 $\mu$ mol/L	0.1
<i>stx2</i> 上游引物( <i>stx2</i> F)	50 $\mu$ mol/L	0.2
<i>stx2</i> 下游引物( <i>stx2</i> R)	50 $\mu$ mol/L	0.2
<i>stx2</i> 探针( <i>stx2</i> P)	50 $\mu$ mol/L	0.1
16S rDNA 上游引物(16S rDNA F)*	20 $\mu$ mol/L	0.2
16S rDNA 下游引物(16S rDNA R)*	20 $\mu$ mol/L	0.2
16S rDNA 探针(16S rDNA P)*	5 $\mu$ mol/L	0.5
<i>Taq</i> 酶	5 U/ $\mu$ L	0.4
DNA 模板	—	2.0
ddH <sub>2</sub> O	—	17.2
总体积	—	25.0

\* *stx* 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<sub>2</sub>O 体积增加 0.4  $\mu$ L,增至 17.6  $\mu$ 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 ℃ 10 min;变性:95 ℃ 15 s;退火:60 ℃ 40 s;延伸:72 ℃ 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。

- 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);
- 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;
- 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:

- stx1* 和 *stx2* 的 Ct 值≥40,则判定为 *stx* 阴性;
- stx1* 或 *stx2* 的 Ct 值<35,16S rDNA 基因的 Ct 值<35,则判定为 *stx* 阳性;
- 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 μL 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 μL 的 E-buffer 溶液中,加入 25 μL 的 1 mol/L 盐酸(pH 2.0~2.5),室温条件振荡 1 h,用 10 μL 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 ℃±1 ℃ 培养 18 h~24 h。

吸取上述酸处理液 100 μL 至 900 μL E-buffer 溶液进行稀释,涡旋混匀后用 10 μL 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 ℃±1 ℃ 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 μL 无菌 PBS 缓冲液重悬,涡旋混匀后分别吸取 100 μL 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 ℃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  $\mu\text{L}$  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 ℃ $\pm$ 1 ℃ 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  $\mu\text{L}$  无菌水中，充分混匀制成菌悬液，99 ℃ $\pm$ 1 ℃ 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，H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S、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  $7.4 \pm 0.2$ , 121 °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  $6.9 \pm 0.2$ , 121 °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  $7.3 \pm 0.2$ , 121 °C 高压灭菌 15 min。冷却至 45 °C~50 °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 °C 使其完全溶解后, 冷却至 45 °C~50 °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  $6.9 \pm 0.2$ 。

## 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  $7.2 \pm 0.2$ , 121 °C 高压灭菌 15 min。冷却至 45 °C~50 °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
-------	--------

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  $7.4 \pm 0.2$ 。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)。

---