中华人民共和国国家标准

GB [××××]—××××

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

（征求意见稿）

××××-××-××发布　　××××-××-××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 ℃±1 ℃、44 ℃±1 ℃。

2.2 冰箱：2 ℃~5 ℃。

2.3 天平：感量为 0.1 g。

2.4 均质器。

2.5 旋涡振荡器。

2.6 恒温水浴箱或恒温金属浴：99 ℃±1 ℃。

2.7 离心机：最大转速至少 13 000 r/min。

2.8 实时荧光 PCR 仪。

2.9 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。

2.10 无菌锥形瓶：容量 250 mL、500 mL、1 000 mL。

2.11 无菌培养皿：直径 90 mm。

2.12 无菌均质袋：带滤网。

2.13 八联排管或 96 孔 PCR 微孔板。

2.14 磁珠分离装置。

2.15 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。

2.16 无菌接种环。

2.17 微生物生化鉴定系统。

2.18 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪。

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（EC）：见 A.2。

3.3 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)：见 A.3。

3.4 缓冲蛋白胨水培养基（BPW）：见 A.4。

3.5 STEC 显色培养基：见 A.5。

3.6 麦康凯琼脂培养基（MAC）：见 A.6。

3.7 50 %甘油-脑心浸出液（BHI）肉汤：见 A.7。

3.8 0.85 %灭菌生理盐水。

3.9 1 mol/L 盐酸溶液。

3.10 5 % Chelex-100：见 A.8。

3.11 E-buffer：见 A.9。

3.12 实时荧光 PCR 反应体系配制用试剂。

3.13 引物和探针。

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（携带 *stx1* 和 *stx2*，如 CMCC（B）43207 或等效菌株）和 *stx* 阴性（不携带 *stx1* 和 *stx2*，如 CMCC（B）44102 或等效菌株）大肠埃希氏菌标准菌株。

4 检验程序

产志贺毒素大肠埃希氏菌检验程序见图 1。

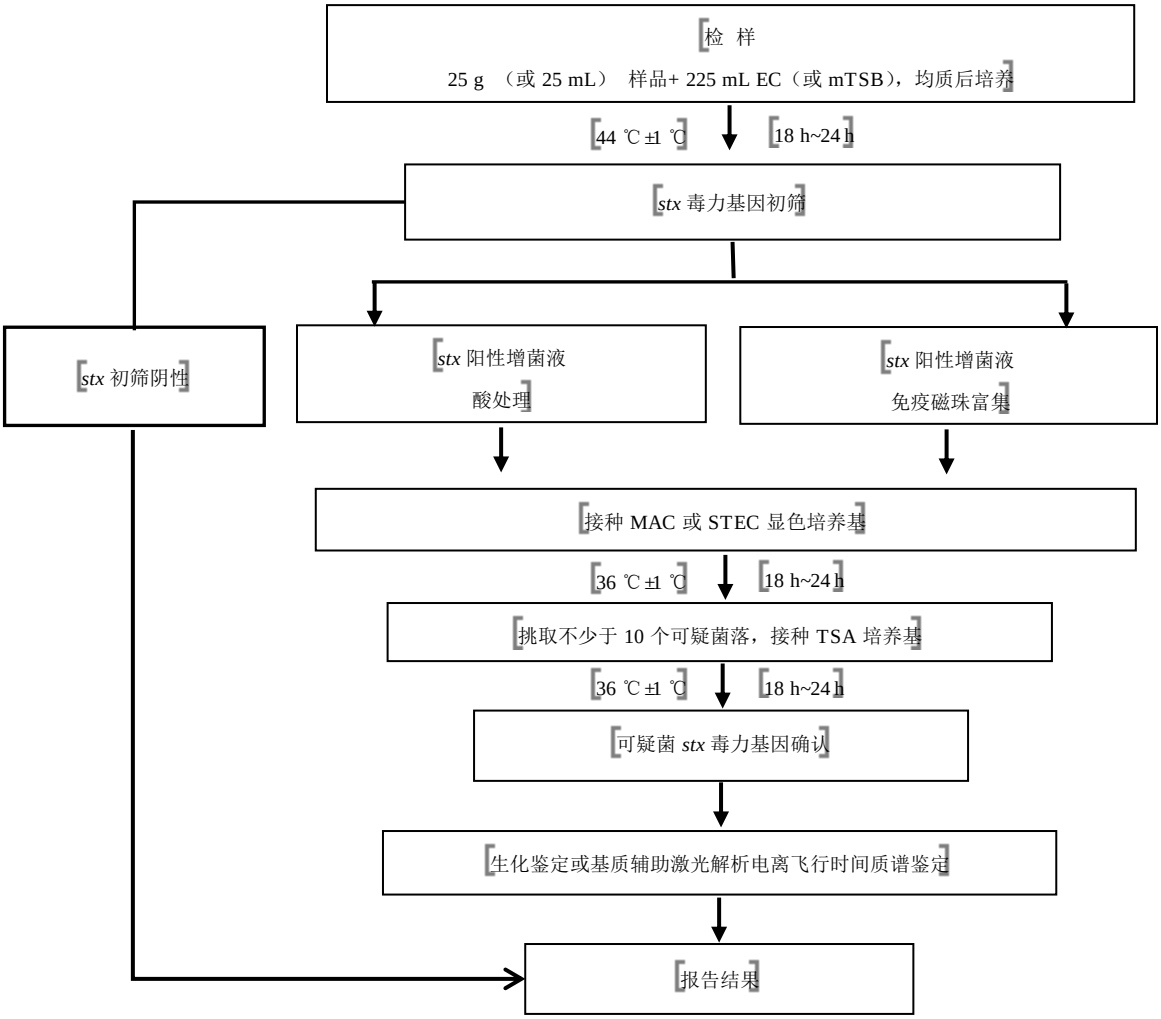

图 1 产志贺毒素大肠埃希氏菌检验程序

5 操作步骤

5.1 样品制备

5.1.1 样品保存

实验室接到样品时应尽快进行检测，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，应放置 2 ℃~5 ℃ 冰箱冷藏，24 h 内检验。

5.1.2 固态或半固态样品

以无菌操作取检样 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，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）的无菌均质袋或带玻璃珠的无菌三角瓶中，充分混匀。

5.2 增菌

将 5.1 制备的样品匀液于 44 ℃±1 ℃培养 18 h~24 h。同时进行对照培养，以携带 *stx1*、*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*、*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 总则

PCR 实验环境条件和过程控制应按 GB/T 27403 规定的要求执行。

5.3.2 DNA 模板制备

在距离液面下 1 cm 处吸取 1 mL 增菌液置于 1.5 mL EP 管中，2 000 r/min 离心 1 min。取上清液（避免带入底层沉淀物）至新的 EP 管中，10 000 r/min 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，10 000 r/min 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，13 000 r/min 离心 4 min，取上清液作为 DNA 模板。若不能及时分析则于-20 ℃保存备用（1 周以内）。

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 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 PCR 检测用引物及探针信息

基因	引物	引物和探针序列(5' - 3')[a]
stx1	*stx1*F	GCA GAT AAA TCG CCA TTC G
	*stx1*R	TGT TGT ACG AAA TCC CCT CTG
	*stx1*P	HEX-AGA GCG ATG TTA CGG TTT GTT ACT G-BHQ1
stx_2	*stx2*F	TTT GTY ACW GTS AYA GCW GAA GCY TTA CG
	*stx2*R	CCC CAG TTC ARH GTR AGR TCM ACD TC
	*stx2*P	FAM-YCG WCH GGC RCT GTC TGA RRC WKC TCC-BHQ1
16S rRNA	16S rRNA F	CCT CTT GCC ATC GGA TGT G
	16S rRNA R	GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC
	16S rRNA P	CY5-GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG AC-BHQ3

[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

对照设置按 5.2 的规定。

5.3.3.3 实时荧光 PCR 反应体系

见表 2，如用商品化实时荧光 PCR 试剂盒则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 PCR 检测反应体系

试剂	工作液浓度	反应体积/μL
10 ×buffer	10×	2.5
dNTPs	2.5 mmol/L	1.0
stx1 上游引物（*stx1*F）	50 μmol/L	0.2
stx1 下游引物（*stx1*R）	50 μmol/L	0.2
stx1 探针（*stx1*P）	50 μmol/L	0.1
stx2 上游引物（*stx2*F）	50 μmol/L	0.2
stx2 下游引物（*stx2*R）	50 μmol/L	0.2
stx2 探针（*stx2*P）	50 μmol/L	0.1
16S rRNA 上游引物（16S rRNA F）	20 μmol/L	0.2
16S rRNA 下游引物（16S rRNA R）	20 μmol/L	0.2
16S rRNA 探针（16S rRNA P）	5 μmol/L	0.5
Taq 酶	5 U/μL	0.4
DNA 模板	-	2.0
ddH_2O	-	17.2
总体积		25.0

5.3.3.4 实时荧光 PCR 反应程序

预变性：95 ℃、10 min；变性：95 ℃、15 s；退火延伸：60 ℃、40 s；40 个循环；延伸：72 ℃、1 min。分别以荧光基团 HEX、FAM 和 CY5 标记 *stx1*、*stx2* 和 16S rRNA 探针，在延伸阶段采集荧光信号。

5.3.3.5 结果有效性原则

若同一次实验中同时满足下列要求，则实时荧光 PCR 实验结果有效；否则实时荧光 PCR 实验结果无效，需重新进行试验。

a. 空白对照：*stx* 和 16S rRNA 基因均无荧光对数增长（16S rRNA 基因可能在 Ct 值＞35.0 后出现较弱的荧光信号增长）；

b. 阴性对照：*stx1* 和 *stx2* 均无荧光对数增长；16S rRNA 基因有荧光对数增长，相应的 Ct 值＜30.0；

c. 阳性对照：*stx1*、*stx2* 和 16S rRNA 基因均有荧光对数增长，相应的 Ct 值＜30.0。

5.3.3.6 实时荧光 PCR 结果判定

在符合 5.3.3.5“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≥40.0，则判定为 *stx* 阴性；

b. *stx1* 或 *stx2* 的 Ct 值＜35.0，16S rRNA 基因的 Ct 值＜35.0，则判定为 *stx* 阳性；

c. *stx1* 和 *stx2* 的 Ct 值均≥35.0 且＜40.0，应重新进行实时荧光 PCR 扩增实验。再次扩增后 *stx1* 或 *stx2* 的 Ct 值＜40.0，16S rRNA 基因的 Ct 值＜35.0，判定为 *stx* 阳性；若 *stx1* 和 *stx2* 的 Ct 值≥40.0，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 实时荧光 PCR 初筛 *stx* 阳性增菌液，10 000 r/min 离心 2 min，弃上清，菌体沉淀重悬于 450 μL 的 E-buffer，加入 25 μL 的 1 mol/L 盐酸（pH 约 2.0~2.5），室温条件振荡 1 h，用无菌接种环划线于 STEC 显色培养基或麦康凯平板，36 ℃±1 ℃培养 18 h~24 h。

吸取上述酸处理液 0.1 mL 至 0.9 mL E-buffer 进行稀释，涡旋混匀后用无菌接种环划线于 STEC 显色培养基或麦康凯平板，36 ℃±1 ℃培养 18 h~24 h。

5.5 Top 7 STEC 血清型免疫磁珠富集处理

5.5.1 实时荧光PCR初筛结果判定为*stx*阳性的增菌液除进行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富集7种重要血清型（O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157）的STEC，并设置质控菌株作为阳性对照组。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，每个样品换用1支吸管避免交叉污染。

5.5.2 将微量离心管按样品和质控菌株编号，每个样品使用7只微量离心管（7种免疫磁珠各1管），置于磁板架上。7种STEC免疫磁珠悬液轻轻震荡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 加入到 15 mL 离心管中，10 000 r/min 离心 3 min，去上清，加入 8 mL 无菌 PBS 重悬沉淀并涡旋混匀，10 000 r/min 离心 3 min，PBS 洗菌步骤重复 2 遍~3 遍，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，质控菌株必须与样品分开进行，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：颠倒旋转数次混匀。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浓缩磁珠，在3min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，在微量离心管壁中间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，从免疫磁珠聚集物对侧轻轻移取上清液。当吸到液面通过免疫磁珠聚集物时，应放慢速度，确保免疫磁珠不被吸走。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：去除液体后的离心管中加入1 mL无菌PBS溶液，涡旋混匀，按5.5.6和5.5.7的要求回收磁珠。

5.5.9 重复步骤 5.5.8 一次。

5.5.10 免疫磁珠悬浮：移走磁板，将免疫磁珠重新悬浮在 100 μL 无菌 PBS 溶液。

5.5.11 重悬混匀后的免疫磁珠悬液涂布或划线于STEC显色培养基或麦康凯平板，36 ℃±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；在麦康凯琼脂平板上，典型大肠埃希氏菌为桃红色菌落。分别挑取经酸处理或磁珠富集处理的典型或可疑菌落（各不少于 10 个），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 μL 无菌水中，充分混匀制成菌悬液，99 ℃±1 ℃加热 15 min，室温冷却 2 min，13 000 r/min 离心 4 min，取上清液作为 DNA 模板。

5.6.2.2 *stx* 毒力基因检测

stx 毒力基因的检测及结果判定按 5.3.3 的要求进行。

5.6.2.3 鉴定

stx 毒力基因检测为阳性的菌株，需进行大肠埃希氏菌的鉴定。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（MALDI-TOF MS）进行鉴定，按仪器或试剂盒的使用说明进行操作及判定。

若无法满足上述鉴定所需仪器要求，可按 GB 4789.6 中相关操作，进行大肠埃希氏菌典型生化反应鉴定。三糖铁斜面产酸或不产酸，底层产酸，靛基质阳性，H_2S 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_2S、KCN、尿素有任一项为阳性的培养物，均非大肠埃希氏菌。

5.6.2.4 菌株保存

将毒力基因 *stx* 阳性，且鉴定为大肠埃希氏菌的菌落分别接种于 TSA 琼脂平板，36 ℃±1 ℃培养 18 h~24 h，用无菌棉签将菌落转于 50 %甘油-脑心浸出液肉汤中，-80 ℃保存备用，其他菌株保存方法同样适用。

5.7 血清学试验（选做项目）

条件满足的实验室，取分离到的 *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，报告为 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，报告为 25 g（mL）样品中检出产志贺毒素大肠埃希氏菌。

7 生物安全措施

生物安全措施按 GB 19489 规定的要求严格执行。

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

酶解酪蛋白	17.0 g
酶解大豆	3.0 g
D-葡萄糖	2.5 g
NaCl	5.0 g
K_2HPO_4	4.0 g
3 号胆汁盐	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.4 ±0.2

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，121 ℃高压 15 min 备用。

A.2 EC肉汤(EC)

A.2.1 成分

胰蛋白胨	20.0 g
3 号胆盐	1.12 g
乳糖	5.0 g
$K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	4.0 g
KH_2PO_4	1.5 g
NaCl	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，121 ℃高压 15 min 备用。

A.3 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)

A.3.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
植物蛋白胨	5.0 g
NaCl	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，121 ℃高压15 min备用。

A.4 缓冲蛋白胨水培养基（BPW）

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
NaCl	5.0 g

Na_2HPO_4	9.0 g
KH_2PO_4	1.5 g
蒸馏水	1000 mL

A.4.2 制法

将A.4.1中的各种成分混匀，加热煮沸至完全溶解，121 ℃高压灭菌15 min备用。

A.5 STEC显色培养基

A.5.1 成分

琼脂	15.0 g
蛋白胨	8.0 g
酵母粉	8.0 g
盐类	5.2 g
色素	2.6 g
增补剂	10.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

将A.5.1中除增补剂外成分混匀，加热至100 ℃使其完全溶解后，冷却至45 ℃~50 ℃，取增补剂一瓶加入10 mL无菌水搅拌均匀，加入到基础培养基中，轻轻摇动使其充分混匀，制作平板。

A.6 麦康凯琼脂培养基(MAC)

A.6.1 成分

蛋白胨	20.0 g
乳糖	10.0 g
NaCl	5.0 g
牛胆盐	5.0 g
中性红	0.025 g
琼脂	15.0 g
结晶紫	0.001 g
蒸馏水	1 000 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，115 ℃高压灭菌 20 min备用。

A.7 50 %甘油-脑心浸出液（BHI）肉汤

A.7.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	2.0 g
牛心粉	5.0 g
NaCl	5.0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

将A.7.1中的各种成分混匀，加热煮沸至完全溶解，加入1 000 mL甘油，按每管1 mL分装于冻存管中，121 ℃高压15 min备用（可依据实际用量按比例缩放配制）。

A.8 5 % Chelex-100

无菌称取5 g Chelex-100，加100 mL灭菌纯水，放4 ℃保存。

A.9 E-buffer具体配方

A.9.1 成分

牛血清白蛋白	5.0 g
吐温 20	0.5 mL
BPW	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

将 BPW 溶解于蒸馏水后灭菌，加入牛血清白蛋白及吐温 20，再利用 0.2 μm 的无菌滤膜过滤除菌（也可所有组分充分溶解混匀后过滤除菌，可依据实际用量按比例缩放配制），置于 2 ℃~5 ℃冷藏备用。

]