SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0973—2010
代替 SN/T 0973—2000

进出口肉、肉制品及其他食品中肠出血性大肠杆菌O157:H7检测方法

Determination of entero-hemorrhagic *E. coli* O157:H7 in meats/meat product and other food for import and export

2010-11-01 发布　　2011-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前　　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 0973—2000《进出口肉及肉制品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 检测方法》。

本标准与 SN/T 0973—2000 相比,主要技术变化如下:

——补充了 ELISA 方法快速检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的内容;

——补充了微生物遗传分子特征性鉴定技术(基因分型)内容,便于对该危害性致病菌的溯源性调查和变异性研究。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、3M 中国有限公司、生物梅里埃(中国)公司。

本标准主要起草人:张树宏、顾鸣、韩伟、杨捷琳、范放、吕敬章、万志刚、吕雷、朱贻华、刘毅。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 0973—2000。

进出口肉、肉制品及其他食品 中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 检测方法

1 范围

本标准规定了进出口肉及肉制品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的检测方法。

本标准适用于进出口肉、肉制品及其他食品中的肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的定性检验。

2 定义和术语

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

肠出血性大肠杆菌 O157:H7　entero-hemorrhagic *E. Coli* O157:H7

本细菌为需氧或兼性厌氧、革兰氏阴性,有周鞭毛,并有菌毛,不产生芽孢,发酵乳糖,不发酵或迟缓发酵山梨醇,氧化酶阴性,β-葡萄糖苷酶阴性的杆菌。

3 方法原理

采用 Tecra 微孔板法大肠杆菌 O157:H7 快速检测试剂盒方法[1)]。样品增菌液煮沸裂解,裂解液与特异性抗体(一抗)包被的微孔板杂交后,用酶标抗体(二抗)再杂交,然后与特定底物反应生成有色化合物,利用肉眼或酶标仪进行检测。

4 设备和材料

4.1 恒温培养箱:(10 ℃～50 ℃)±1 ℃。

4.2 均质器:小于 12 000 r/min。

4.3 高压灭菌锅。

4.4 科玛嘉大肠杆菌 O157:H7 显色琼脂平板[2)]。

4.5 VIDAS 自动酶联免疫检测仪,法国梅利埃公司产品或其他等效产品[3)]。

4.6 VITEK 自动微生物生化鉴定仪或其他等效产品[3)]。

4.7 微生物实验室通用玻璃器皿、移液管、玻皿等。

4.8 铂铱或镍铬丝接种环,直径约 3 mm;玻璃 L 棒。

---

1)、2) 分别为由美国 3M 公司和法国科玛嘉公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

3) 由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

4.9 电子天平:精确值 0.001 g。

4.10 移液枪及枪头:1 mL、0.2 mL。

4.11 洗板机。

4.12 酶标仪(波长 450 nm)。

5 培养基和试剂

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水(Tecra 法试剂的配制使用重蒸水)。

5.1 改良 E.C 新生霉素增菌肉汤[m(EC)n]:见附录 A 中 A.1。

5.2 山梨醇麦康凯琼脂(SMAC):见附录 A 中 A.2。

5.3 月桂基磷酸盐胰蛋白胨 MUG 肉汤(LST-MUG):见附录 A 中 A.3。

5.4 Tecra™微孔板法大肠杆菌 O157 快速检测试剂盒、VIDAS 或 VIDASUP O157:H7 测试条或其他等效产品。

5.5 含新生霉素的缓冲胰蛋白胨大豆肉汤(BTSB+N):见附录 A 中 A.4。

5.6 Imbentin 补充液:见附录 A 中 A.5。

6 试样制备与保存

6.1 制备

从混合样品中取出代表性样品,将可食用部分(去掉可见脂肪)充分均质。用四分法所分出不少于 500 g 作为试样,装入灭菌容器内,加封后标明标记。

6.2 保存

试样于−18 ℃以下冷冻保存。

7 检测流程

检测流程见图 1。

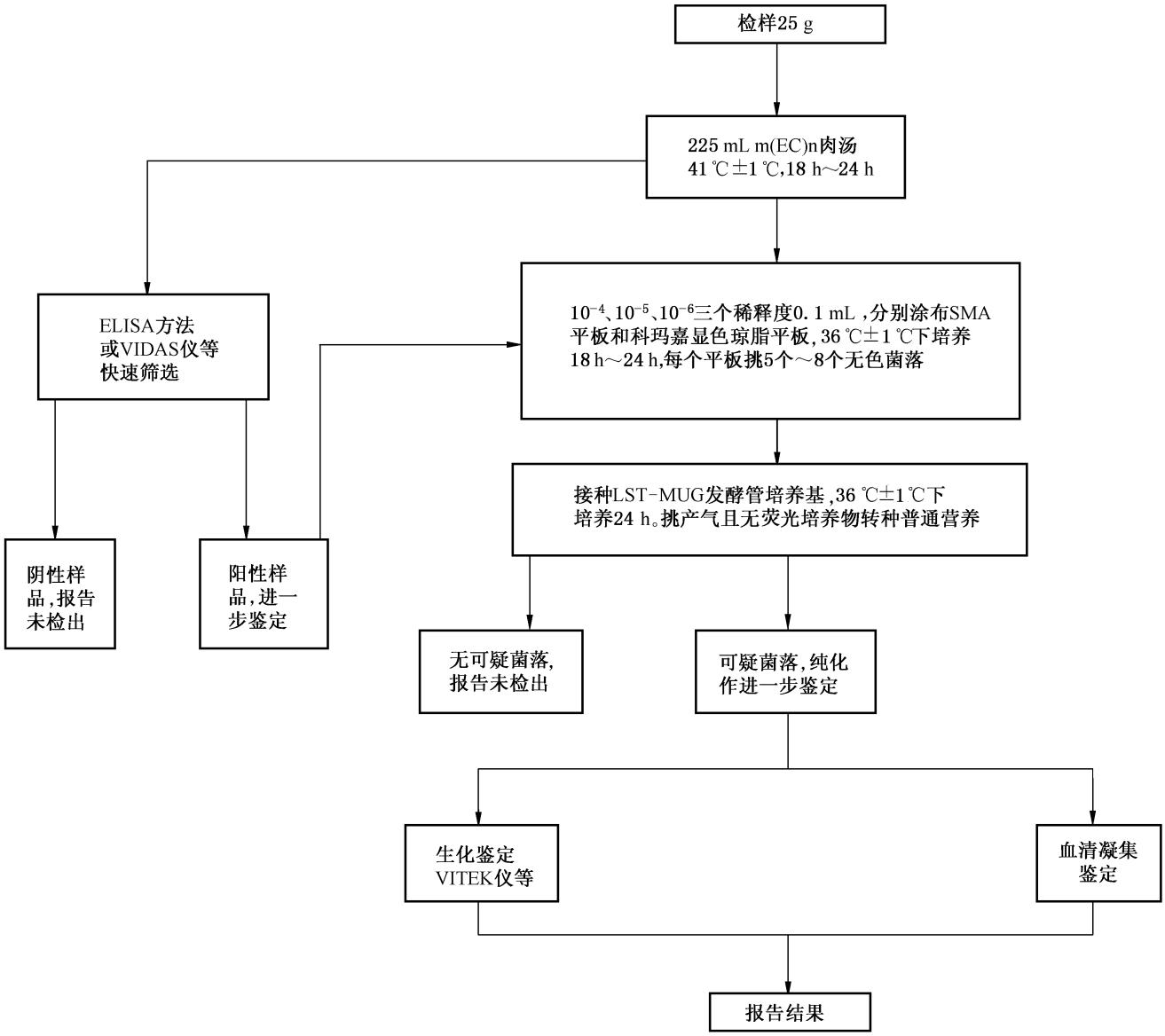

图 1　大肠杆菌 O157:H7 的检测流程

8　检测步骤

8.1　常规方法

8.1.1　增菌

无菌操作称取 6.1 的试样 25 g 放入含 225 mL m(EC)n 增菌肉汤的均质容器中，置 41 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。

8.1.2　分离

对 8.1.1 增菌肉汤进行 10 倍递增稀释，从 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} 稀释液中各取 0.1 mL 滴加于 SMAC 平板或(和)科玛嘉大肠杆菌显色琼脂平板上，以灭菌 L 棒进行涂布并置于 36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。在 SMAC 平板上可疑 EHEC 菌落呈淡褐色中心，扁平透明，边缘光滑，直径约 2 mm。在科玛嘉大肠杆菌显色琼脂平板上可疑 EHEC 菌落呈紫红色。

8.1.3　生化试验和血清学鉴定

每个 SMAC 平板或科玛嘉大肠杆菌显色琼脂平板上要求挑选不少于 5 个～8 个可疑菌落，然后将

挑出的每个菌落接种到 LST-MUG 肉汤中，36 ℃±1 ℃培养 24 h，出现产气，并且无荧光者，于普通营养琼脂进行纯化，并对单菌落参见附录 B 进行生化鉴定，或采用 VITEK 或等效的自动微生物生化鉴定仪进行鉴定，然后用 O157：H7 标准血清做凝集试验。最后，也可见附录 C 采用遗传分子特征性鉴定试验进行鉴定。

8.1.4 结果报告

根据选择性分离平板、生化试验和血清学鉴定结果，分别报告 25 g 样品中检出或未检出肠出血性大肠杆菌 O157：H7。

8.2 Tecra™微孔板法大肠杆菌 O157：H7 快速检测试剂盒方法

8.2.1 增菌

8.2.1.1 熟肉制品

同 8.1.1

8.2.1.2 生肉制品

无菌操作称取 6.1 的试样 25 g 放入含 225 mL m(EC)n 增菌肉汤的 500 mL 灭菌光口瓶中，然后再添加 2.25 mL 的 Imbentin 补充液，置 41 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。

8.2.1.3 其他食品

无菌操作称取 6.1 的试样 25 g 放入含 225 mL BTSB 增菌肉汤的 500 mL 灭菌光口瓶中，置 41 ℃±1 ℃ 培养 18 h～24 h。

8.2.2 Tecra 试剂盒检测

8.2.2.1 检测前，将 Tecra ELISA 试剂盒置室温(20 ℃～25 ℃)10 min。

8.2.2.2 将前述增菌液样品热处理，添加 50 μL 的样品添加物到合适的试管中，然后再加入 1 mL 增菌到同一试管内，充分混合。

8.2.2.3 进行热处理，在沸水浴中将试管加热 15 min 后，将试管冷却到室温。

8.2.2.4 每个微孔加入 200 μL 的阳性/阴性对照液或 200 μL 热处理过的样品，于 36 ℃±1 ℃反应 30 min。吸取每个样品时需换用新的移液器吸头。

8.2.2.5 倾除检测板微孔中的溶液，用洗液充满每个微孔，注意不要将气泡滞留于孔板底部、洗涤检板 3 次。

8.2.2.6 每个微孔加入 200 μL 的标记结合物，用塑料薄膜封住微孔后，于 36 ℃±1 ℃反应 30 min。

8.2.2.7 按 8.2.2.5 冲洗检测板微孔 4 次。

8.2.2.8 每个微孔加入 200 μL 的底物，置于室温 20 ℃～25 ℃，放置 15 min。

8.2.2.9 每个微孔添加 20 μL 终止液。轻敲孔板边缘以混合内容物，然后在 30 min 内判读结果。

8.2.2.10 结果可依据试剂盒说明用肉眼判读或用酶标仪判读。酶标仪判读时，阴性对照孔 OD 值应<0.2，阳性对照孔 OD 值应>1.0。如果阳性对照 OD 值<1.0 时，需要延长显色时间；30 min 后，如果阳性对照孔 OD 值仍然<1.0，即本次检测结果无效。样品孔 OD 值<0.2 时判为阴性，≥0.2 时判为阳性。

8.2.3 阳性结果的鉴定

出现阳性结果时，在 SMAC 平板和科玛嘉大肠杆菌显色琼脂平板上对原增菌肉汤进行培养分离，

若有可疑菌落生长，依据 8.1.3 进行鉴定。

8.2.4 结果报告

8.2.4.1 若试剂盒检测结果为阴性，报告 25 g 样品中未检出肠出血性大肠杆菌 O157：H7。

8.2.4.2 若试剂盒检测结果为阳性，则根据分离纯化及生化试验和血清学鉴定结果，分别报告 25 g 样品中检出或未检出肠出血性大肠杆菌 O157：H7。

8.3 VIDAS 仪器法大肠杆菌 O157：H7 的快速筛选检测方法

8.3.1 增菌

同 8.1.1

8.3.2 自动酶联免疫检测

8.3.2.1 取 1 mL 增菌液到灭菌小试管中，于沸水中加热 15 min。剩余的菌液于 40 ℃保存，以便用于阳性确认。

8.3.2.2 取肠出血性大肠埃希氏菌 O157：H7 的荧光免疫试剂盒，室温放置至少 30 min，使试剂温度平衡至环境温度。

8.3.2.3 取适量加热处理并冷却后的增菌液到试剂盒测试孔中，通过自动或手动操作免疫反应过程后，检测反应强度（荧光强度或吸光度），与参照值比较，得出检验结果。详细操作需根据所用仪器及试剂盒的说明进行。

8.3.3 阳性结果的鉴定

出现阳性结果时，在 SMAC 平板和科玛嘉大肠杆菌显色琼脂平板上对原增菌肉汤进行分离培养，若有可疑菌落生长，依据 8.1.3 进行鉴定。

8.3.4 结果报告

8.3.4.1 若 VIDAS 检测结果为阴性，报告 25 g 样品中未检出肠出血性大肠杆菌 O157：H7。

8.3.4.2 若 VIDAS 检测结果为阳性，则根据分离纯化及生化试验和血清学鉴定结果，分别报告 25 g 样品中检出或未检出肠出血性大肠杆菌 O157：H7。

附　录　A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1　改良 E.C 新生霉素增菌肉汤 m(EC)n

胰蛋白胨	20.0 g
3 号胆盐	1.12 g
乳糖	5.0 g
无水磷酸氢二钾	4.0 g
无水磷酸二氢钾	1.5 g
氯化钠	5.0 g
水	1 000.0 mL

将上述成分溶于水后校正 pH 至 6.9±1，分装后置 121 ℃高压灭菌 15 min，取出滤灭菌的新生霉素溶液 20 mg/L 加入，使最终浓度为 20 μg/L。

A.2　山梨醇麦康凯平板(SMAC)

蛋白胨	17.0 g
月示胨	3.0 g
猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	17.0 g
水	1 000.0 mL
山梨醇	10.0 g
0.01%结晶紫水溶液	10.0 mL
0.5%中性红水溶液	5.0 mL
1%亚碲酸钾溶液(最终量为)	2.5 mL

将蛋白胨、月示胨、胆盐和氯化钠溶解于 400 mL 蒸馏水中，校正 pH 至 7.2 将琼脂加入于 600 mL 蒸馏水中加热溶解，将两液合并，分装于锥形瓶内高压灭菌(121 ℃、15 min 备用)。临用前加热融化琼脂，趁热加入山梨醇，冷却至 50 ℃～55 ℃时加入结晶紫和中性红溶液并加入过滤出 8 菌的亚碲酸钾溶液，使最终浓度为 2.5 mg/L，并加入头孢克肟(Cefixime)，使最终浓度为 0.05 mg/L。

A.3　月桂基磷酸盐胰蛋白胨(LST)MUG 肉汤(LST-MUG)

胰蛋白胨或胰酪胨(Tryticase)	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾	2.75 g
磷酸二氢钾	2.75 g
月桂基磷酸钠	0.1 g

四甲基伞形酮 B 葡萄糖醛苷酸(MUG)	0.1 g
水	1 000.0 mL

将上述成分溶解于蒸馏水中,分装到有倒立发酵管的试管中,每管 10 mL,于 121 ℃高压灭菌 15 min,最终 pH6.8±0.2。

A.4 含新生霉素的缓冲胰蛋白胨大豆肉汤(BTSB+N)

胰蛋白胨	17 g
大豆蛋白胨	3 g
磷酸氢二钾	4 g
氯化钠	5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL
或采用以下配方:	
胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)	30 g
磷酸氢二钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

检查 pH 为 7.2～7.6。如有必要,用 1 mol/L 盐酸或 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH。然后高压灭菌 121 ℃,15 min。冷却到室温后,添加 5 mL 过滤灭菌好的新生霉素(4 mg/mL,水溶液)到 1 L 的培养基。新生霉素的终浓度为 20 mg/L。新生霉素应在培养基灭菌后添加。

A.5 Imbentin 补充液

试剂瓶中盛有 50 mL 的 Imbentin 补充液:在沸水浴中加热或 100 ℃蒸汽处理 15 min,过程中保持瓶口微微松开,试剂瓶直立。然后,取出试剂瓶,冷却至室温(20 ℃～25 ℃)。注意:Imbentin 在受蒸汽处理后会分两层,等回复到室温后,盖紧瓶盖,翻转数次以使溶液混合。标上灭菌日期后,于 10 ℃以上保存。使用时,按规定添加到增菌肉汤中。

附　录　B
（资料性附录）
EHECO157:H7 生化特性

B.1　三糖铁培养基:底及斜面呈黄色 H_2S 阴性。

B.2　山梨醇发酵:阴性或迟缓。

B.3　纤维二糖发酵:阴性。

B.4　胰蛋白胨肉汤:靛基质阳性。

B.5　MR-VP:MR 阳性 VP 阴性。

B.6　西蒙氏柠檬酸盐:阴性。

B.7　赖氨酸脱羧酶:阳性(紫色)。

B.8　鸟氨酸脱羧酶:阳性(紫色)。

B.9　动力试验培养基:有动力或无动力。

B.10　棉籽糖发酵:阳性。

附　录　C
（规范性附录）
大肠杆菌 O157:H7 遗传分子特征鉴定（基因分型）方法

C.1　材料、试剂与设备

C.1.1　EHECO157:H7 标准质控菌种，菌号：ATCC43889。

C.1.2　*E. coli* O157:H7 标准血清或其他等效产品。

C.1.3　自动微生物遗传分子特征鉴定仪配套试剂。

C.1.4　RIBOPRITER 或 DAL 自动微生物遗传分子特征鉴定仪或其他等效产品。

C.2　方法原理

C.2.1　细菌核糖体基因分型

利用细菌核糖体 16S 和 23S RNA 高度保守区域的稳定性及不同菌种及亚种间可变区位置和数目的差异性，设计针对该区段的探针，杂交后用一定的限制性内切酶进行酶切，获得的图谱进一步采用数学模型进行分析比较，将相同的菌株进行归类，建立种及亚种的图谱数据库。利用库存标准图谱可快速确定污染源，可以对微生物环境进行管理，可以用不同的酶（EcoRI、PstI 或 PvuII 及除此以外的酶）来分型，区分致病菌和非致病菌，可将历史信息和地域信息和基因信息联系起来，8 h 内获得结果，获得数据以图谱形式输出。

C.2.2　Rep-PCR 重复序列聚合酶扩增技术

不同类型的大肠埃希氏菌（包括：肠出血性大肠杆菌 O157:H7 等）菌株或克隆，在基因水平所得到的分型图谱都是特定的，基因指纹图谱的特殊性，显示不同微生物菌株的特殊性。该技术人工合成引物与许多分布在大肠埃希氏菌整个基因组上的、特异性的重复序列进行配对：经过 PCR 扩增形成多个不同长短的片段；这些扩增获得的片段根据其质量差异，经微流电泳 DNA LabChip 芯片精细分离扩增片段，可获得由多条电泳带组成的、强弱不一的、专一性 rep-PCR DNA 指纹图谱，即形成每个菌种特有的 DNA 指纹图谱。可通过独立的安全的互联网使用专业分析软件，实时地自动分析和处理数据，并得到相应报告，建立客户数据库等。技术特点：有些被选择的引物，在很多细菌中是保守的序列，因此，仅使用单一的引物对，即可对不同的大肠埃希氏菌进行指纹图谱分析。

C.2.3　检测程序

C.2.3.1　肠出血性大肠埃希氏菌 O157:H7 核糖体分型步骤：

a）　选择配套的专用鉴定试剂盒，置室温平衡 30 min；

b）　开启鉴定仪器，打开控制软件，输入相关信息、指令等；

c）　按仪器操作说明，放置试剂盒内容和相关器具；

d）　培养皿上选择单个（疑似）纯菌落，接种入样品架内；

e）　启动仪器运行检测程序；

f）　仪器自动完成测定、鉴定、报告和建议等内容。

C.2.3.2　肠出血性大肠埃希氏菌 O157:H7 基因 rep-PCR 鉴定步骤：

a) 选择配套的专用鉴定试剂盒，置室温平衡 30 min。按仪器操作说明，开启鉴定仪器和控制软件，输入相关信息、指令等；
b) 选择单个(疑似)纯菌落或增菌液 1 μL～10 μL 使用 UltraClean 试剂盒提纯细菌 DNA；
c) 将纯化的 DNA，采用特定的 DNA 指纹图谱试剂盒，在 PCR 仪器上进行 rep-PCR 扩增反应；
d) 使用 Agilent2100 Bioanalyzer 或等同仪器经微流电泳 DNA LabChip 芯片，进行扩增片段的分离；
e) 使用 DiversiLab 软件或同效分析软件比较指纹图谱，获得鉴定结果和建立数据库等。

C.2.4 质控要求

C.2.4.1 选用新批号试剂盒时，应验证试剂盒的质量指标；使用时应严格按照试剂盒的要求设立实验对照。

C.2.4.2 选用试剂盒检验不同目标菌的期间，应不定期选用相应的可溯源标准菌株进行过程控制。

C.2.4.3 所涉及检验结果准确性的仪器设备按有关要求需要定期进行计量检定/校正和期间核查。

SN/T 0973—2010

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
进出口肉、肉制品及其他食品
中肠出血性大肠杆菌
O157:H7 检测方法
SN/T 0973—2010
*
中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045
网址 www.spc.net.cn
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
*
开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 19 千字
2011年4月第一版 2011年4月第一次印刷
印数 1—1 600
*
书号:155066·2-21744 定价 18.00 元

SN/T 0973-2010