

**SN**

# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1059.5—2006

## 食品和动物饲料大肠杆菌 O157 的检测方法 免疫磁珠法

**Inspection method for the detection *Escherichia coli* O157 from food and animal feeding stuffs—Immunomagnetic separation**

(ISO 16654:2001, Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157, IDT)

2006-08-28 发布

2007-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国   发 布  
国家质量监督检验检疫总局

## 前　　言

本部分为 SN/T 1059 的第 5 部分。

本部分等同采用 ISO 16654:2001(E)《食品和动物饲料微生物学——大肠杆菌 O157 的检测方法》(英文版)。

为便于使用,本部分做了下列编辑性修改:

- a) ‘本国际标准’一词改为‘本部分’;
- b) 用小数点‘.’代替作为小数点的逗号‘,’;
- c) 删减国际标准的前言;
- d) 为了更符合中文习惯,本部分的名称稍做修改。

本部分附录 A 为资料性附录。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位:中华人民共和国河南出入境检验检疫局。

本部分主要起草人:苗丽、李志培、张巨洲、李苛、江志毅、杨向莹、乔晴。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

# 食品和动物饲料大肠杆菌 O157 的检测方法

## 免疫磁珠法

**警告:** 大肠杆菌 O157 是一种可以引起严重的危及生命的疾病, 并且很低的剂量就可以引起感染的致病菌。曾经有实验室获得感染的报道。

整个方法只能由那些采用良好实验室规范(GLP)、具有丰富经验的人员去实施, 并且最好在一个可控设施中进行, 以保护实验室人员的安全。必须遵守有关的健康和安全的法规。

传染性材料的处理必须谨慎。

### 1 范围

SN/T 1059 的本部分规定了检测大肠杆菌 O157 的免疫磁珠法。

本部分适用于人类消费的食品或用作动物饲料的产品。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 SN/T 1059 本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件, 其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分, 然而, 鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件, 其最新版本适用于本部分。

ISO 6887-1 食品和动物饲料微生物学——实验样品制备、初始悬液和稀释液的微生物学检测——第 1 部分: 制备初始悬液和稀释液的通用规则

ISO 7218 食品和动物饲料微生物学——微生物学检测通用规则

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于 SN/T 1059 的本部分。

#### 3.1

**大肠杆菌 O157**

*E. coli* O157

在本部分中使用的平板培养基表面上形成典型菌落, 产生吲哚并且与 O157 抗血清发生特异性凝集反应的细菌。

注 1: 山梨醇阳性的 *E. coli* O157 菌株在 CT-SMAC 培养基中观察不到。

注 2: 已发现有一些吲哚阴性的变异株。

### 4 原理

大肠杆菌 O157 的检测应有以下 4 个连续步骤(参见附录 A):

- a) 增菌: 测试部分样品在  $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  下, 用含新生霉素的改良胰蛋白胨大豆肉汤(mTSB+N)的样品均质液孵育 6 h, 之后再培养 12 h~18 h 进行增菌。
- b) 富集纯化: 使用包被有 *E. coli* O157 抗体的免疫磁珠分离并富集细菌。
- c) 分离: 将粘附有细菌的免疫磁珠转移到亚碲酸钾山梨醇麦康凯琼脂(CT-SMAC)和其他 *E. coli* O157 选择性分离培养基上进行分离培养。
- d) 确认: 对于 CT-SMAC 上的山梨醇反应阴性菌落和其他类型分离平板上的典型 *E. coli* O157 菌落, 通过是否产生吲哚以及是否与 *E. coli* O157 抗血清产生凝集反应进行确认。

注: 对阳性分离株的病原性特征的进一步鉴定, 可以送到有关参考实验室进行。

## 5 培养基、试剂和抗血清

### 5.1 增菌培养基[含新生霉素的改良胰蛋白胨大豆肉汤(mTSB+N)]

#### 5.1.1 改良胰蛋白胨大豆肉汤(mTSB)

##### 5.1.1.1 成分

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

##### 5.1.1.2 制备

将各成分或合成脱水培养基溶解于水中,如果需要则进行加热,必要时用 pH 计调整 pH 值,使灭菌后 25℃ 时 pH 值为 7.4±0.2。

将培养基适量分装到合适容量的三角烧瓶或其他瓶子中。

用高压灭菌锅 121℃ 灭菌 15 min。

### 5.1.2 新生霉素溶液

#### 5.1.2.1 成分

新生霉素	0.45 g
蒸馏水	100 mL

##### 5.1.2.2 制备

将新生霉素溶解在水中并用滤膜过滤除菌。

使用当天制备。

### 5.1.3 完全培养基的制备

使用前加 1 mL 或 4 mL 新生霉素溶液到 225 mL 或 900 mL 已冷却的 mTSB 中。新生霉素的最终浓度为每升 mTSB 中含新生霉素 20 mg。

## 5.2 第一种选择性分离培养基[亚碲酸钾山梨醇麦康凯琼脂(CT-SMAC)]

### 5.2.1 基础培养基

#### 5.2.1.1 成分

胰酪蛋白胨	17.0 g
动物组织蛋白胨	3.0 g
山梨醇	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	9 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

注: 琼脂量根据凝胶硬度酌情添加。

##### 5.2.1.2 制备

将基础培养基的各成分或合成脱水基础培养基溶解到水中并煮沸使其充分溶解,必要时,调整 pH 值使灭菌后 25℃ 时 pH 值为 7.1±0.2。

高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 15 min。

### 5.2.2 亚碲酸钾溶液

#### 5.2.2.1 成分

细菌学用途的亚碲酸钾	0.25 g
蒸馏水	100 mL

#### 5.2.2.2 制备

将亚碲酸钾溶解在水中并通过滤膜过滤除菌。

该溶液可以在室温下储存 1 个月,但如果白色沉淀物形成时就丢弃不用。

### 5.2.3 头孢克肟溶液

#### 5.2.3.1 成分

头孢克肟	5.0 mg
蒸馏水	100.0 mL

#### 5.2.3.2 制备

将头孢克肟溶解到水中并通过滤膜过滤除菌。

注: 头孢克肟可能需要在乙醇中溶解。

该溶液可以在 3℃±2℃ 环境中贮存 1 周。

### 5.2.4 完全培养基

#### 5.2.4.1 成分

基础培养基(5.2.1)	1 000 mL
亚碲酸钾溶液(5.2.2)	1.0 mL
头孢克肟溶液(5.2.3)	1.0 mL

#### 5.2.4.2 制备

将灭菌好的基础培养基(5.2.1)冷却至 44℃~47℃(6.5)或将以前灭过菌但已经凝固了的基础培养基通过热蒸汽使其融化后再冷却至 44℃~47℃。

每 1 000 mL 基础培养基中加 1 mL 亚碲酸钾溶液和 1 mL 头孢克肟溶液,混合均匀,每个灭菌平皿(6.15)中倾注约 15 mL,使其凝固。

最终亚碲酸钾浓度为 2.5 mg/L,头孢克肟浓度为 0.05 mg/L。

使用前干燥琼脂平板,最好是移开盖子,让琼脂面朝下,置于温度在 25℃~50℃ 的烘箱(6.2)中,直到培养基表面的水滴消失,此时就不需再继续干燥。琼脂平板也可以半开盖子放在层流安全柜中 30 min,或盖上盖子过夜使其干燥。

如果预先已制备,未干燥的琼脂平板可以放在黑塑料袋中或其他能保持湿度的容器中,在 3℃±2℃ 冰箱中可以贮存 2 周。

### 5.3 其他类型选择性分离培养基

实验室选用的任何其他的固体选择性培养基,都要与 CT-SMAC 琼脂互补并且适合于分离 *E. coli* O157。

使用前立即干燥琼脂平板,最好是移开盖子,让琼脂面朝下,置于温度在 25℃~50℃ 的烘箱(6.2)中,直到培养基表面的水滴消失,此时就不需再继续干燥,琼脂平板也可以半开盖子放在层流安全柜中 30 min,或盖上盖子过夜使其干燥。

### 5.4 营养琼脂

#### 5.4.1 成分

牛肉浸膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂	9 g~18 g

蒸馏水 1 000 mL

注：琼脂量根据凝胶硬度酌情添加。

#### 5.4.2 制备

将各成分或脱水合成培养基溶解到水中，如果需要的话进行加热，必要时调整 pH 值，使其灭菌后 25℃ 时 pH 值为 7.0±0.2。

将培养基适量分装到合适容量的三角烧瓶或其他瓶子(6.7)中。

高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 15 min。

#### 5.4.3 制备营养琼脂平板

每个平皿中倾注约 15 mL 熔化后又冷却至 44℃~47℃ 的培养基，并使其凝固。

使用前干燥琼脂平板，最好是移开盖子，让琼脂表面朝下，置于温度在 25℃~50℃ 的烘箱(6.2)中，直到培养基表面的水滴消失，此时就不需再继续干燥，琼脂平板也可以半开盖子放在层流安全柜中 30 min，或盖上盖子过夜使其干燥。

### 5.5 胰蛋白胨/色氨酸培养基

#### 5.5.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
DL-色氨酸	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### 5.5.2 制备

将各成分溶解到水中，必要时进行加热煮沸，调整 pH 值使灭菌后 25℃ 时 pH 值为 7.5±0.2。

分装到合适容量的试管或瓶子中，每管 5 mL。

高压灭菌锅(6.1)中 121℃ 灭菌 15 min。

### 5.6 Kovac's 吲哚试剂

#### 5.6.1 成分

对-二甲氨基苯甲醛	5.0 g
戊醇	75.0 mL
盐酸( $\rho_{20}$ 为 1.18 g/mL~1.19 g/mL)	25.0 mL

#### 5.6.2 制备

将对-二甲氨基苯甲醛溶解到戊醇中，必要时水浴加热，水浴温度保持在 44℃~47℃，冷却至室温后加入盐酸，用棕色的玻璃瓶避光保存于 3℃±2℃ 的温度环境中，试剂将变为黄色或浅棕色，并且无沉淀物析出。

### 5.7 抗大肠杆菌 O157 免疫磁珠

这些免疫磁珠表面涂布有抗 *E. coli* O157 的特异性抗体，可以富集并分离这些微生物。

注：这些磁珠可以通过商业途径获得。应当准确地按照生产商的说明书进行磁珠使用前的制备。

### 5.8 缓冲洗涤液(改良磷酸盐缓冲液 0.01 mol/L, pH7.2)

#### 5.8.1 成分

氯化钠	8.0 g
氯化钾	0.2 g
无水磷酸氢二钠	1.44 g
无水磷酸二氢钾	0.24 g
吐温-20	0.2 mL
蒸馏水	1 000 mL

#### 5.8.2 制备

将各成分溶于水中，必要时调整 pH 值，使其在 25℃ 为 7.2±0.2。

分装到合适容量的瓶子或三角烧瓶(6.7)中备用。

高压灭菌锅中 121℃灭菌 15 min,溶液可能会出现混浊,但静置后会变得清澈。

通过商业途径获得的具有同等成分和同样性能的磷酸盐缓冲液可以使用。

## 5.9 标准盐水溶液

### 5.9.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

### 5.9.2 制备

将氯化钠溶解到水中,分装到合适容量的瓶子或三角烧瓶(6.7)中备用。

高压灭菌锅中 121℃灭菌 15 min。

## 5.10 *E. coli* O157 抗血清

既可以通过专业实验室获得,也可以通过商业途径获得以用于分离菌体“O157”抗原用。

抗血清在使用于未知的分离物前应先用阳性和阴性菌株进行质控测试。

## 6 仪器和玻璃器皿

常规的微生物设备(见 ISO 7218)和下列专用设备。

- 6.1 干热灭菌设备(干烤箱)和(或)湿热灭菌设备(高压锅);见 ISO 7218。
- 6.2 干燥箱或培养箱:温度能保持在 25℃~50℃。
- 6.3 培养箱:温度能保持在 37℃±1℃。
- 6.4 培养箱:温度能保持在 41.5℃±1℃。
- 6.5 水浴锅:温度能保持在 44℃~47℃。
- 6.6 pH 计:25℃时,刻度要精确到 0.01,测量结果能精确到 0.1。
- 6.7 合适容量的灭菌测试试管、三角烧瓶或其他容器:贮存培养基和孵育液体培养基用。
- 6.8 合适容量的量筒:制备稀释液和完全培养基用。
- 6.9 刻度移液管:容量 1 mL 和 10 mL,刻度 0.1 mL 和 0.5 mL。
- 6.10 接种环和接种线:由白金/铱或镍/铬制成。或经巴氏消毒过的吸管或一次性接种环。
- 6.11 移液器:灭菌,操作范围从 20 μL~200 μL,刻度 10 μL 或相当。
- 6.12 带有磁架的磁性分离器:聚集免疫磁珠,配合 Eppendorf 管使用。
- 6.13 Eppendorf 管:带帽,灭菌,一次性,可离心,容量 1.5 mL。适合磁架上使用,打开盖的时候要防止产生气溶胶。
- 6.14 旋转混合器(风车型,血样混合器):转速为 15 r/min~20 r/min。
- 6.15 培养皿:直径 90 mm 和 140 mm。
- 6.16 旋涡混合器。

## 7 取样

确保实验室收到的样品真实、有代表性,并且在运输和贮存的过程中不得损害或改变,这一点非常重要。

建议:贮存前迅速冷却样品。

## 8 测试样品的制备

按照适合于相关产品的特定的国际标准制备实验样品,如果没有专门的国际标准,建议有关各方在制备样品问题上达成一致意见。

## 9 程序

### 9.1 测试部分样品和初悬液

见 ISO 6887-1 和其他适合于相关产品的特定的国际标准。

一般来说,制备初始悬液,要将( $\times$ )g 或( $\times$ )mL 的测试部分样品加到(9 $\times$ )mL 或(9 $\times$ )g 含新生霉素的改良胰蛋白胨大豆肉汤(mTSB+N)(5.1)中,mTSB+N 要先在温箱(6.4)中预热到 41.5℃,测试部分样品和 mTSB+N 的比例(质量体积比或体积体积比)为 1 : 10。建议使用带网丝的均质袋以减少食物微粒对免疫捕获的干扰。

### 9.2 增菌

按照 9.1 制备好的初悬液在 41.5℃ 培养箱(6.4)中培养 6 h,随后再继续培养 12 h~18 h(也就是说,总消耗时间为 18 h~24 h)。

样品增菌培养 6 h 后进行免疫磁珠分离,并转种到选择性琼脂平板上可以获得可疑的阳性结果,如果继续培养 18 h 后再转种,该结果可能会变成阴性。

### 9.3 免疫磁珠分离(IMS)

#### 9.3.1 通则

免疫磁珠分离应该在培养 6 h 后进行。必要时,也可以继续培养 12 h~18 h 后再分离一次。

下面的介绍为一般性的指导,可能不会在所有的细节上都描述得完整。因此,应当按照有关免疫捕获仪器和装置的程序及方法的说明进行操作。

#### 9.3.2 免疫捕获

**警告:** 使用无菌技术以防止任何外部的污染和产生气溶胶。必要时,戴上手套,在生物安全柜里进行操作。

用磁性分离器(6.12)和包被抗体的免疫磁珠(5.7),完成以下捕获/分离步骤。

混合增菌培养液(9.2),沉淀所有的粗糙食物残渣。室温下,在一个 Eppendorf 管里,加 20  $\mu$ L 准备好的免疫磁珠(5.7),从增菌培养液中移取 1 mL 上层液体加入 Eppendorf 管中,要尽可能避免移取到食物颗粒和脂肪颗粒。

在旋转混合器(6.14)上混合该悬液,以 12 r/min~20 r/min 的速度混合 10 min。

#### 9.3.3 分离

将每一个 Eppendorf 管都放到磁架(6.12)上,轻轻地 180°摆动磁架,使免疫磁珠聚集到磁极。小心地打开管盖,不要影响管壁上的磁珠,管子不离磁架,每一个样品使用一个新的巴氏灭菌吸管(6.10),从管底慢慢地吸取液体移走。加 1 mL 灭菌的洗液(5.8),并重新盖好盖子,将磁极从支架上移走,轻轻地将支架旋转 180°,使管内各成分混合,然后重新将磁极放回到支架上。

当加入新鲜洗液时要注意避免交叉污染。

继续以上操作,每个样品用一个新的无菌吸管移取洗液,重复该清洗步骤几次。

将离心管从磁性分离器上移开,并加 100  $\mu$ L 灭菌的洗液(5.8)到管中,重悬磁珠。

注: 如果检测脂肪类产品和新鲜奶酪时,该程序操作起来会有一定难度。

### 9.4 接种选择性培养基并鉴定 *E. coli* O157 菌落

#### 9.4.1 接种

用一个移液器(6.11),吸取 50  $\mu$ L 洗过并重悬的免疫磁珠加到一个预先干燥好的 CT-SMAC(5.2)平板上,另取 50  $\mu$ L 加到另一种预先干燥好的选择性培养基(5.3)上。

用一个无菌接种环(6.10)将磁珠液进行划线,以便在琼脂平板上得到大量分离很好的菌落。

将 CT-SMAC(5.2)平板在 37℃ 培养箱(6.3)中培养 18 h~24 h,另一种选择性培养基也要在其推荐的温度和指定的时间内进行培养。

由于食物样品种类和它的微生物菌丛不同,营养肉汤增菌液培养 20 h~24 h,会使杂菌在选择性琼

脂平板上过度增长而使得 *E. coli* O157 菌落很难辨认,用制备好的 IMS 稀释液接种选择性琼脂平板或每个平板接种量不超过 50 μL,可以增加获得 *E. coli* O157 分离菌落的机会。但要注意,这也相应地提高了检测限。

#### 9.4.2 辨认典型的 *E. coli* O157 菌落

在 CT-SMAC 琼脂板上,典型菌落呈透明状,很浅的似黄似褐的颜色,几乎无色,直径大约 1 mm。

按照产品说明书,检查接种的第二种选择性分离平板上的典型的 *E. coli* O157 菌落。

### 9.5 确认

注: 在用已知阳性和阴性菌种开展适当实验进行确认的情况下,可以使用商品化的微型生化鉴定试剂盒和 *E. coli* O157 乳胶试剂盒,它们都可以用来鉴定山梨醇阴性和吲哚阳性的大肠杆菌。

#### 9.5.1 挑选菌落

每个平板上挑选 5 个 9.4 中的典型菌落,如果一个平板上不足 5 个典型菌落,那么所有的典型菌落都应该鉴定。

将挑选的每一个菌落分别划线接种到一个营养琼脂平板上(5.4),以便使分离的菌落很好地生长。

将平板置于 37℃ 温箱(6.3)中培养 18 h~24 h。

只能用从营养琼脂平板上获得的纯培养物做以下 9.5.2 和 9.5.3 描述的试验。

#### 9.5.2 生化鉴定: 吲哚形成

从营养琼脂(9.5.1)上的纯培养物中挑选一个菌落接种到一管蛋白胨/色氨酸培养基(5.5)中,置于 37℃ 培养箱(6.3)中培养 24 h。

加入 1 mL Kovac 氏试剂(5.6),并在室温下放置 10 min。

出现红色代表阳性反应,黄/褐色代表阴性反应。

#### 9.5.3 血清学鉴定

##### 9.5.3.1 通则

仅对吲哚阳性的菌落进行 *E. coli* O157 抗血清的血清学鉴定。

##### 9.5.3.2 排除自身凝集反应

在一块洁净的玻璃板上加一滴盐水(5.9)。

用一个接种环(6.10)从营养琼脂平板上挑取一个菌落,同盐水搅拌,使成为均一性的混浊悬液。

轻轻地振动玻璃板 30 s~60 s,在黑色背景下观察结果,必要时,可以用放大镜观察。

如果悬液形成明显可见的凝集块时,则认为该菌有自凝现象,试验不再往后进行,因为该菌与专门的抗血清的反应是不被认可的。

##### 9.5.3.3 与 *E. coli* O157 抗血清的反应

从营养琼脂上(9.5.1)挑选一个纯菌落,如 9.5.3.2 那样在一滴新鲜盐水中制成悬液,然后加一小滴 *E. coli* O157 抗血清(5.10)。

如果 1 min 内出现凝集,则该反应为阳性。

##### 9.5.3.4 阳性鉴定

那些吲哚阳性、能与 O157 或 O157 : H7 抗血清发生反应的分离物,可以作为阳性分离物。

### 9.6 进一步鉴定

为了进一步鉴定阳性菌落的鞭毛抗原和致病性,应将培养物送往参考实验室。

## 10 质量保证

### 10.1 用作质量保证目的的实验菌株

不携带有致病性毒力因子的 *E. coli* O157 菌株可通过国家或国际的菌种收藏机构获得。建议这些菌种作为检查培养基和抗血清的质量保证。

### 10.2 培养方法

使用本标准描述的方法验证实验室和培养基检测食品检样中含少量大肠杆菌 O157 的能力时,要

接种少量无致病性的 *E. coli* O157 的参考样品和大量其他 *E. coli* 的参考样品做平行试验。

## 11 结果表示

根据结果的解释,报告检测样品中检出或未检出 *E. coli* O157,要用质量克数或容积毫升数为单位来确切说明测试样品的数量。

## 12 试验报告

试验报告应明确表述以下内容:

- a) 完成样品鉴定的所有信息;
- b) 使用的取样方法(如果知道);
- c) 使用的试验方法;
- d) 培养的温度;
- e) 本部分中未作规定的所有操作细节,或认为是可选择的细节,连同任何可能会影响结果的细节;
- f) 测试结果,如果进一步的试验是由参考实验室完成的,这个实验结果也应在报告中说明。

**附录 A**  
**(资料性附录)**  
**程 序 图 解**



图 A.1 程序图

中华人民共和国出入境检验检疫  
行业标准

食品和动物饲料大肠杆菌 O157 的检测方法

免疫磁珠法

SN/T 1059.5—2006

\*

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](http://www.spc.net.cn)

电话：68523946 68517548

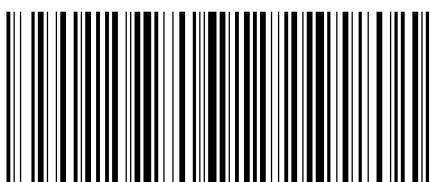
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 18 千字  
2006 年 11 月第一版 2006 年 11 月第一次印刷  
印数 1—2 000

\*

书号：155066·2-17273 定价 10.00 元



SN/T 1059.5-2006