



# 中华人民共和国国家标准

GB 4789.36—2016

---

食品安全国家标准  
食品微生物学检验  
大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 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 4789.36—2008《食品卫生微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验》。

本标准与 GB/T 4789.36—2008 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 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验”;
- 修改了标准的范围;
- 修改了设备和材料;
- 修改了培养基和生化反应的文字描述;
- 删除“第二法 免疫磁珠捕获法的原理”;
- 删除“第三法 全自动酶联荧光免疫分析仪筛选法”;
- 删除“第四法 全自动病原菌检测系统筛选法”。

# 食品安全国家标准

## 食品微生物学检验

### 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验

#### 1 范围

本标准规定了食品中大肠埃希氏菌 O157:H7/NM(*Escherichia coli* O157:H7/NM)的检验方法。本标准适用于食品中大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 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℃。
- 2.2 冰箱:2℃~5℃。
- 2.3 恒温水浴箱:46℃±1℃。
- 2.4 天平:感量 0.1 g、0.01 g。
- 2.5 均质器。
- 2.6 显微镜:10 倍~100 倍。
- 2.7 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)或移液器及吸头。
- 2.8 无菌均质杯或无菌均质袋:容量 500 mL。
- 2.9 无菌培养皿:直径 90 mm。
- 2.10 pH 计或精密 pH 试纸。
- 2.11 长波紫外光灯:365 nm,功率≤6 W。
- 2.12 微量离心管:1.5 mL 或 2.0 mL。
- 2.13 磁板、磁板架、样品混合器。
- 2.14 微生物鉴定系统。

#### 3 培养基和试剂

- 3.1 改良 EC 肉汤(mEC+n):见 A.1。
- 3.2 改良山梨醇麦康凯琼脂(CT-SMAC):见 A.2。
- 3.3 三糖铁琼脂(TSI):见 A.3。
- 3.4 营养琼脂:见 A.4。
- 3.5 半固体琼脂:见 A.5。
- 3.6 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-MUG(MUG-LST):见 A.6。
- 3.7 氧化酶试剂:见 A.7。
- 3.8 革兰氏染色液:见 A.8。
- 3.9 PBS-Tween 20 洗液:见 A.9。
- 3.10 亚硝酸钾(AR 级)。

- 3.11 头孢克肟(Cefixime)。  
 3.12 大肠埃希氏菌 O157 显色培养基。  
 3.13 大肠埃希氏菌 O157 和 H7 诊断血清或 O157 乳胶凝集试剂。  
 3.14 鉴定试剂盒。  
 3.15 抗-*E. coli* O157 免疫磁珠。

### 第一法 常规培养法

#### 4 检验程序

大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 常规培养法检验程序见图 1。

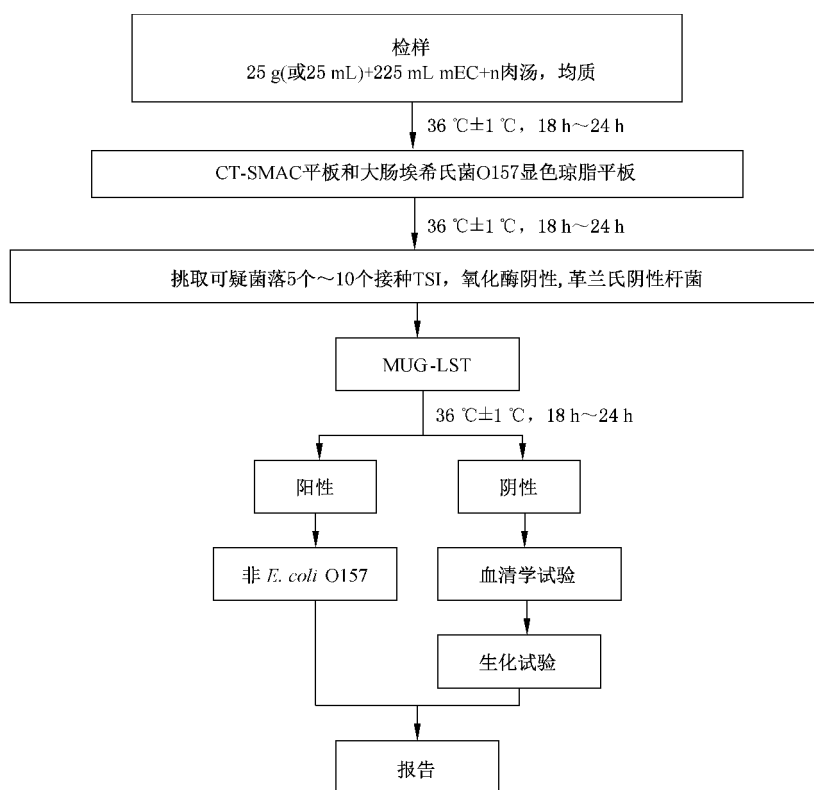


图 1 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 常规培养法检验程序

#### 5 操作步骤

##### 5.1 增菌

以无菌操作取检样 25 g(或 25 mL)加入到含有 225 mL mEC+n 肉汤的均质袋中,在拍击式均质器上连续均质 1 min~2 min;或放入盛有 225 mL mEC+n 肉汤的均质杯中,8 000 r/min~10 000 r/min均质 1 min~2 min。36 °C±1 °C培养 18 h~24 h。

## 5.2 分离

取增菌后的 mEC+n 肉汤,划线接种于 CT-SMAC 平板和大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板上,36 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h,观察菌落形态。在 CT-SMAC 平板上,典型菌落为圆形、光滑、较小的无色菌落,中心呈现较暗的灰褐色;在大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板上的菌落特征按产品说明书进行判定。

## 5.3 初步生化试验

在 CT-SMAC 和大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板上分别挑取 5 个~10 个可疑菌落,分别接种 TSI 琼脂,同时接种 MUG-LST 肉汤,并用大肠埃希氏菌株(ATCC25922 或等效标准菌株)做阳性对照和大肠埃希氏菌 O157:H7(NCTC12900 或等效标准菌株)做阴性对照,于 36 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h。必要时进行氧化酶试验和革兰氏染色。在 TSI 琼脂中,典型菌株为斜面与底层均呈黄色,产气或不产气,不产生硫化氢(H<sub>2</sub>S)。置 MUG-LST 肉汤管于长波紫外灯下观察,MUG 阳性的大肠埃希氏菌株应有荧光产生,MUG 阴性的应无荧光产生,大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 为 MUG 试验阴性,无荧光。挑取可疑菌落,在营养琼脂平板上分纯,于 36 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h,并进行下列鉴定。

## 5.4 鉴定

### 5.4.1 血清学试验

在营养琼脂平板上挑取分纯的菌落,用 O157 和 H7 诊断血清或 O157 乳胶凝集试剂作玻片凝集试验。对于 H7 因子血清不凝集者,应穿刺接种半固体琼脂,检查动力,经连续传代 3 次,动力试验均阴性,确定为无动力株。如使用不同公司生产的诊断血清或乳胶凝集试剂,应按照产品说明书进行。

### 5.4.2 生化试验

5.4.2.1 自营养琼脂平板上挑取菌落,进行生化试验。大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 生化反应特征见表 1。

表 1 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 生化反应特征

生化试验	特征反应
三糖铁琼脂	底层及斜面呈黄色,H <sub>2</sub> S 阴性
山梨醇	阴性或迟缓发酵
靛基质	阳性
甲基红-伏普试验(MR-VP)	MR 阳性,VP 阴性
氧化酶	阴性
西蒙氏柠檬酸盐	阴性
赖氨酸脱羧酶	阳性(紫色)
鸟氨酸脱羧酶	阳性(紫色)
纤维二糖发酵	阴性
棉子糖发酵	阳性
MUG 试验	阴性(无荧光)
动力试验	有动力或无动力

5.4.2.2 如选择生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统,应从营养琼脂平板上挑取菌落,用稀释液制备成浊度适当的菌悬液,使用生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统进行鉴定。

#### 5.4.3 毒力基因测定(可选项目)

样品中检出大肠埃希氏菌 O157:H7 或 O157:NM 时,如需要进一步检测 Vero 细胞毒素基因的存在,可通过接种 Vero 细胞或 HeLa 细胞,观察细胞病变进行判定;也可使用基因探针检测或聚合酶链反应(PCR)方法进行志贺毒素基因(*stx1*、*stx2*)、*eae*、*hly* 等基因的检测。如使用试剂盒检测上述基因,应按照产品的说明书进行。

## 6 结果报告

综合生化和血清学试验结果,报告 25 g(或 25 mL)样品中检出或未检出大肠埃希氏菌 O157:H7 或大肠埃希氏菌 O157:NM。

### 第二法 免疫磁珠捕获法

## 7 检验程序

大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 免疫磁珠捕获法检验程序见图 2。

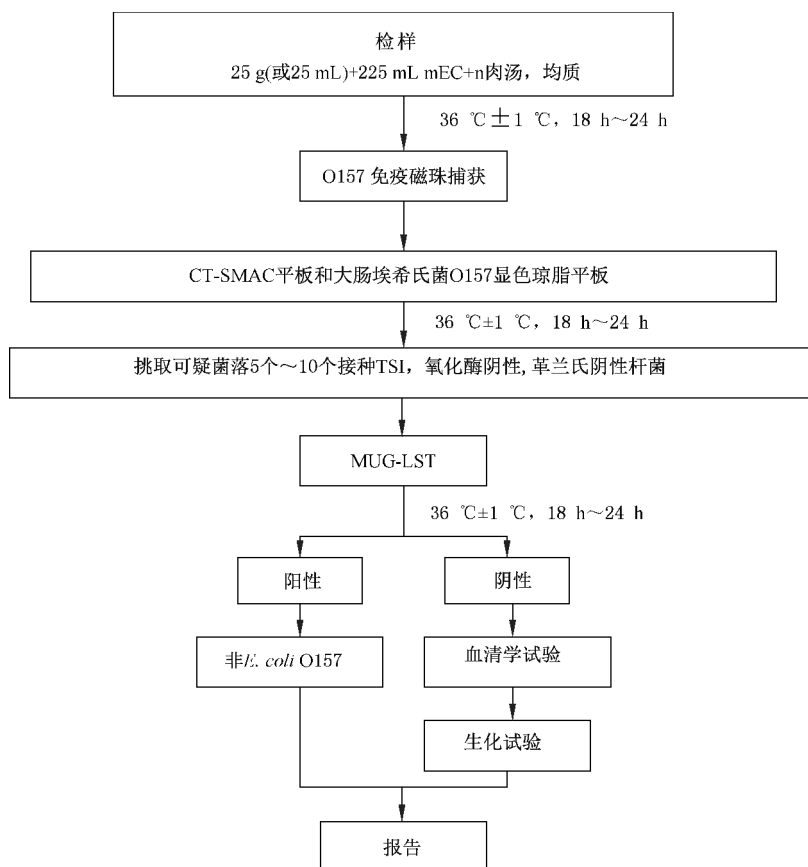


图 2 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 免疫磁珠捕获法检验程序

## 8 操作步骤

### 8.1 增菌

同 5.1。

### 8.2 免疫磁珠捕获与分离

8.2.1 应按照生产商提供的使用说明进行免疫磁珠捕获与分离。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。

8.2.2 将微量离心管按样品和质控菌株进行编号,每个样品使用 1 只微量离心管,然后插入到磁板架上。在漩涡混合器上轻轻振荡 *E. coli* O157 免疫磁珠混悬液后,用开盖器打开每个微量离心管的盖子,每管加入 20  $\mu\text{L}$  *E. coli* O157 免疫磁珠悬液。

8.2.3 取 mEC+n 肉汤增菌培养物 1 mL,加入到微量离心管中,盖上盖子,然后轻微振荡 10 s。每个样品更换 1 只加样吸头,质控菌株必须与样品分开进行,避免交叉污染。

8.2.4 结合:在 18  $^{\circ}\text{C}$ ~30  $^{\circ}\text{C}$  环境中,将上述微量离心管连同磁板架放在样品混合器上转动或用手轻微转动 10 min,使 *E. coli* O157 与免疫磁珠充分接触。

8.2.5 捕获:将磁板插入到磁板架中浓缩磁珠。在 3 min 内不断地倾斜磁板架,确保悬液中与盖子上的免疫磁珠全部被收集起来。此时,在微量离心管壁中间明显可见圆形或椭圆形棕色聚集物。

8.2.6 吸取上清液:取 1 支无菌加长吸管,从免疫磁珠聚集物对侧深入液面,轻轻吸走上清液。当吸到液面通过免疫磁珠聚集物时,应放慢速度,以确保免疫磁珠不被吸走。如吸取的上清液内含有磁珠,则应将其放回到微量离心管中,并重复 8.2.5 步骤。每个样品换用 1 支无菌加长吸管。

免疫磁珠的滑落:某些样品特别是那些富含脂肪的样品,其磁珠聚集物易于滑落到管底。在吸取上清液时,很难做到不丢失磁珠,在这种情况下,可保留 50  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$  上清液于微量离心管中。如果在后续的洗涤过程中也这样做的话,脂肪的影响将减小,也可达到充分捕获的目的。

8.2.7 洗涤:从磁板架上移走磁板,在每个微量离心管中加入 1 mL PBS-Tween20 洗液,放在样品混合器上转动或用手轻微转动 3 min,洗涤免疫磁珠混合物。重复上述步骤 8.2.5~8.2.7。

8.2.8 重复上述步骤 8.2.5~8.2.6。

8.2.9 免疫磁珠悬浮:移走磁板,将免疫磁珠重新悬浮在 100  $\mu\text{L}$  PBS-Tween20 洗液中。

8.2.10 涂布平板:将免疫磁珠混匀,各取 50  $\mu\text{L}$  免疫磁珠悬液分别转移至 CT-SMAC 平板和大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板一侧,然后用无菌涂布棒将免疫磁珠涂布平板的一半,再用接种环划线接种平板的另一半。待琼脂表面水分完全吸收后,翻转平板,于 36  $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  1  $^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h。

注:若 CT-SMAC 平板和大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板表面水分过多时,应在 36  $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  1  $^{\circ}\text{C}$  下干燥 10 min~20 min,涂布时避免将免疫磁珠涂布到平板的边缘。

### 8.3 菌落识别

大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 在 CT-SMAC 平板和大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板上的菌落特征同 5.2。

### 8.4 初步生化试验

同 5.3。

### 8.5 鉴定

同 5.4。

## 9 结果报告

同第 6 章。



## 附录 A 培养基和试剂

### A.1 改良 EC 肉汤 (mEC+n)

#### A.1.1 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
新生霉素钠盐溶液 (20 mg/mL)	1.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

#### A.1.2 制法

除新生霉素外,所有成分溶解在水中,加热煮沸,在 20 °C~25 °C 下校正 pH 至  $6.9 \pm 0.1$ ,分装。于 121 °C 高压灭菌 15 min,备用。制备浓度为 20 mg/mL 的新生霉素储备溶液,过滤法除菌。待培养基温度冷至 50 °C 以下时,按 1 000 mL 培养基内加 1 mL 新生霉素储备液,使最终浓度为 20 mg/L。

### A.2 改良山梨醇麦康凯 (CT-SMAC) 琼脂

#### A.2.1 山梨醇麦康凯 (SMAC) 琼脂

##### A.2.1.1 成分

蛋白胨	20.0 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	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

##### A.2.1.2 制法

除琼脂、结晶紫和中性红外,所有成分溶解在蒸馏水中,加热煮沸,在 20 °C~25 °C 下校正 pH 至  $7.2 \pm 0.2$ ,加入琼脂、结晶紫和中性红,煮沸溶解,分装。于 121 °C 高压灭菌 15 min。

#### A.2.2 亚硝酸钾溶液

##### A.2.2.1 成分

亚硝酸钾	0.5 g
------	-------

蒸馏水	200 mL
-----	--------

#### A.2.2.2 制法

将亚硝酸钾溶于水,过滤法除菌。

#### A.2.3 头孢克肟(Cefixime)溶液

##### A.2.3.1 成分

头孢克肟	1.0 mg
95%乙醇	200 mL

##### A.2.3.2 制法

将头孢克肟溶解于95%乙醇中,静置1 h待其充分溶解后过滤除菌。分装试管,储存于-20℃,有效期1年。解冻后的头孢克肟溶液不应再冻存,且在2℃~8℃下有效期14 d。

#### A.2.4 CT-SMAC 制法

取1 000 mL灭菌融化并冷却至46℃±1℃的山梨醇麦康凯(SMAC)琼脂,加入1 mL亚硝酸钾溶液和10 mL头孢克肟溶液,使亚硝酸钾浓度达到2.5 mg/L,头孢克肟浓度达到0.05 mg/L,混匀后倾注平板。

#### A.3 三糖铁琼脂(TSI)

##### A.3.1 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 $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$	0.2 g
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	0.2 g
酚红	0.025 g 或 5.0 g/L 溶液 5.0 mL
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000 mL

##### A.3.2 制法

除酚红和琼脂外,将其他成分加于400 mL蒸馏水中,煮沸溶解,在20℃~25℃下校正pH至7.4±0.2。另将琼脂加于600 mL蒸馏水中,煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后,加入5%酚红水溶液5 mL,混匀,分装小号试管,每管约2 mL~4 mL。于121℃ 10 min或115℃ 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.4 营养琼脂

## A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

## A.4.2 制法

将各成分溶解于蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,校正 pH 至  $7.4 \pm 0.2$ ,分装。于  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 15 min。

## A.5 半固体琼脂

## A.5.1 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~0.4 g
蒸馏水	100 mL

## A.5.2 制法

将各成分溶解于蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,校正 pH 至  $7.4 \pm 0.2$ ,分装小试管,于  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 15 min。直立凝固备用。

## A.6 月桂基硫酸盐蛋白胨肉汤-MUG (LST-MUG)

## A.6.1 成分

胰蛋白胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	2.75 g
磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2.75 g
十二烷基硫酸钠	0.1 g
4-甲基伞形酮- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 (MUG)	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

## A.6.2 制法

将各成分溶解于蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,于  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  下校正 pH 至  $6.8 \pm 0.2$ ,分装到带有倒管的试管中,每管 10 mL,于  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 15 min。

## A.7 氧化酶试剂

### A.7.1 成分

<i>N,N'</i> -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.7.2 制法

少量新鲜配制,于冰箱内避光保存,在 7 d 内使用。

### A.7.3 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.8 革兰氏染色液

### A.8.1 结晶紫染色液

#### A.8.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

#### A.8.1.2 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.8.2 革兰氏碘液

#### A.8.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

#### A.8.2.2 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.8.3 沙黄复染液

#### A.8.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

### A.8.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

### A.8.4 染色法

A.8.4.1 涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染液,染 1 min,水洗。

A.8.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A.8.4.3 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.8.4.4 滴加复染液,复染 1 min,水洗、待干、镜检。

### A.9 PBS-Tween 20 洗液

按照商品用 *E. coli* O157 免疫磁珠的洗液配方进行制备,或按照下列配方制备。

#### A.9.1 成分

氯化钠	8.0 g
氯化钾	0.2 g
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.15 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.2 g
Tween 20	0.5 g
蒸馏水	1 000 mL

#### A.9.2 制法

将上述成分溶解于水中,于 20 °C~25 °C 下校正 pH 至  $7.3 \pm 0.2$ ,分装锥形瓶。121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

---