

**进出口肉及肉制品中肠出血性大肠杆菌O157:H7检验方法**

Method for the determination of entero-hemorrhagic  
E. coli O157:H7 in meats and meat products for import and export

SN/T 0973—2000

**前言**

本标准是按照GB/T 1.1—1993《标准化工作导则 第1单元：标准的起草与表述规则 第1部分：标准编写的基本规定》的要求编写的。

其中对于肠出血性大肠杆菌O157:H7的增菌培养基、培养温度、分离琼脂、生化确认和快速筛选等方法是参考美国FDA《细菌分析手册》1995(第6版)以及日本厚生省和法国的检验标准及有关文献资料,结合我国国情,进行实践研究,并通过试验和验证后,按规定格式制定。

本标准的附录A是标准的附录。

本标准由中华人民共和国国家出入境检验检疫局提出并归口。

本标准由中华人民共和国上海出入境检验检疫局负责起草。

本标准主要起草人:吴仲梁、陶军、张树宏。

本标准系首次发布的行业标准。

**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的检验方法。

本标准适用于进出口猪、牛、禽肉及其制品中的肠出血性大肠杆菌O157:H7的检验。

**2 引用标准**

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

SN 0330—1994 出口食品中微生物学检验通则

**3 定义**

本标准采用下列定义。

3.1 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,不产生芽胞的杆菌。发酵乳糖,不发酵或迟缓发酵山梨醇。氧化酶阴性。MUG阴性。

3.2 符号

m(EC)n 改良E.C新生霉素增菌肉汤

SMC 山梨醇麦康凯琼脂

LST-MUG肉汤 月桂基磷酸盐胰蛋白胨MUG肉汤

miniVIDAS 小型自动酶联免疫荧光仪

E. coli O157:H7 Latex Test E. coli O157:H7 乳胶凝集试剂盒

**4 抽样**

4.1 抽样数量及抽样方法按SN 0330进行

4.2 试样制备

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

4.3 试样保存

将试样于-18℃以下冷冻保存。

**5 测定方法**

5.1 方法提要

将25g试样放入m(EC)n增菌肉汤41℃±1℃培养18h~24h。然后再将此增菌液以不同的稀释度分别接种到山梨醇麦康凯平板,36℃±1℃培养18h~24h。然后挑取不发酵山梨醇的可疑菌落作生化及血清学鉴定。

此外,也可以上述增菌液用mini-VIDAS作检测45min即可获结果。此方法可作快速筛选。

5.2 设备和材料

5.2.1 恒温培养箱:(10℃~50℃)±1℃。

5.2.2 均质器:小于12 000r/min附均质杯。

5.2.3 高压灭菌锅。

5.2.4 mini-VIDAS法国梅利埃公司生产,或相当产品。

5.2.5 微生物实验室通用玻璃器皿、移液管、玻皿等。

5.2.6 铂铍或镍铬丝接种环,直径约3mm;玻璃L棒。

5.3 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。

5.3.1 m(EC)n增菌肉汤(配方见附录A)。

5.3.2 SMC分离琼脂平板(配方见附录A)。

5.3.3 0.1% MUG的LST肉汤(配方见附录A)。

5.3.4 VIDAS测试条(由厂方提供)。

5.3.5 EHEC O157:H7标准质控菌种,菌号:ATCC 43889。

5.3.6 O157:H7标准血清(由上海市卫生防疫站提供)或相当产品。

5.3.7 乳胶试剂O157:H7诊断试剂盒(美国Remel公司提供)或相当者。

5.4 试样制备与测定步骤

无菌操作称取试样25g放入500mL均质杯中,先加入少量m(EC)n增菌肉汤以8 000r/min均质2min,再加入余下的m(EC)n增菌肉汤总量为225mL,加盖后置41℃±1℃培养18h~24h。然后将上述增菌液取5mL单独存放,经100℃水浴15min灭活后,供自动酶联免疫测试用,将增菌肉汤则进行10倍递增稀释,从10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>,各取0.1 mL滴于SMC平板上以灭菌L棒进行涂布并置于36℃±1℃培养18h~24h,然后挑取可疑菌落。在SMC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2mm。每个SMC平板要求挑选不少于5~8个可疑菌落,然后将挑出的每个菌落接种到含有0.1% MUG的LST肉汤中,36℃±1℃培养24h,出现产气,并且无荧光者,于普通营养琼脂进行分离,并对纯菌落用O157:H7标准血清或EHEC O157:H7: H7。乳胶试剂做凝集试验,必要时可按表1作全套生化试验。

EHEC O157:H7检测程序见图1。

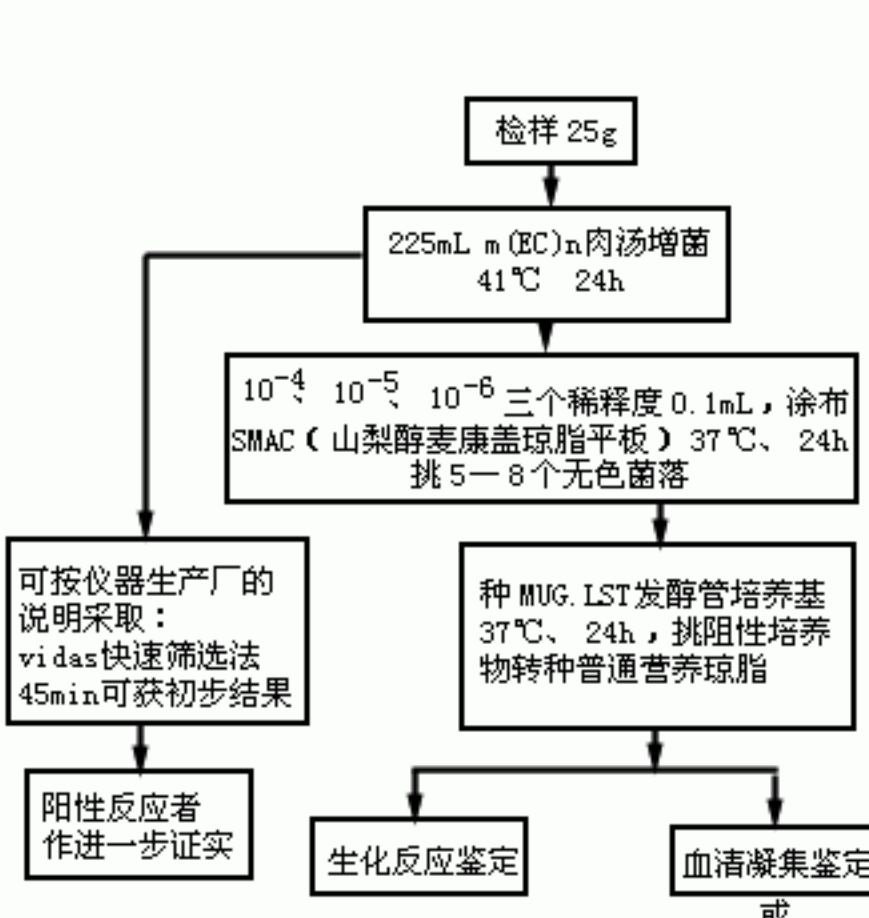


图1 大肠杆菌 O157:H7 检测程序

表1 EHEC O157:H7生化特性

三糖铁培养基	底及斜面呈黄色H <sub>2</sub> S阴性
山梨醇发酵	阴性或迟缓
纤维二糖发酵	阴性
胰蛋白胨肉汤	靛基质阳性
MR-VP	MR阳性 VP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)
动力试验培养基	有动力或无动力
棉籽糖发酵	阳性

5.5 结果报告

凡用于上述方法在被检食品中分离获得的纯菌落,经用抗E. coli O157:H7标准血清或EHEC O157:H7。乳胶凝集试剂测试,呈阳性结果者即可报告为该食品试样中检出肠出血性大肠杆菌 O157:H7。

**附 录 A**

(标准的附录)

**培养基和试剂**

A1 改良E.C新生霉素增菌肉汤m(EC)n

胰蛋白胨	20.0g
3号胆盐	1.12g
乳糖	5.0g
无水磷酸氢二钾	4.0g
无水磷酸二氢钾	1.5g
氯化钠	5.0g
水	1000.0mL

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15min,取出后冷却至室温,以过滤灭菌的新生霉素溶液20mg/L加入,使最终浓度为20 μg/mL。

A2 山梨醇麦康凯平板(SMAC)

蛋白胨	17.0g
豚胆	3.0g
猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5.0g
氯化钠	5.0g
琼脂	17.0g
水	1000.0mL
山梨醇	10.0g
0.01% 结晶紫水溶液	10.0mL
0.5% 中性红水溶液	5.0mL
1% 亚硝酸钾溶液(最终量为)	2.5mL

制法:

a)将蛋白胨、豚胆、胆盐和氯化钠溶解于400mL蒸馏水中。校正pH至7.2,将琼脂加入于600mL蒸馏水中加热溶解,将二液合并,分装于锥形瓶内高压灭菌(121℃、15min备用)。

b)临用时加热熔化琼脂,趁热加入山梨醇,冷却至50~55℃时加入结晶紫和中性红水溶液并加入过滤除菌的亚硝酸钾溶液,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。

A3 月桂基磷酸盐胰蛋白胨(LST)MUG肉汤

胰蛋白胨或胰酪胨(Trypticase)	20g
氯化钠	5.0g
乳糖	5.0g
磷酸氢二钾(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.75g
磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.75g
月桂基磷酸钾	0.1g
四甲基伞形酮D-葡萄糖醛苷酸(MUG)	0.1g
水	1000.0mL

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10mL,于121℃高压灭菌15min,最终pH:6.8±0.2。