



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4857—2017

国境口岸肠出血性大肠埃 希菌 O104:H4 检验方法

Method for detection of EHEC O104:H4 at frontier port

2017-07-21 发布

2018-03-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、中国疾病预防控制中心传染病控制所。

本标准主要起草人：涂承宁、赵俊华、冯子力、熊衍文、闫文莲、莫秋华、谭华、叶立青。

国境口岸肠出血性大肠埃希菌 O104:H4 检验方法

1 范围

本标准规定了国境口岸检验的检测流程、样品采集与运输、样品处理、检验和报告。
本标准适用于对国境口岸粪便及呕吐物、可疑食品和水样中志贺样毒素的筛查、EHEC O104:H4 筛查和分离培养。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则
GB/T 4789.6 食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验
GB/T 5750.2 生活饮用水标准检验方法 水样的采集和保存

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1
肠出血性大肠埃希菌 **Enterohemorrhagic escherichia coli;EHEC**
一种能产生志贺样毒素(Shiga toxin,又称维罗毒素,Veto 毒素,Verotoxin)的致泻性大肠埃希菌,可引起出血性肠炎(hemorrhagic colitis,HC)和溶血性尿毒症综合征(hemolytic uremic syndrome,HUS)。根据其菌体抗原(O)血清型和鞭毛抗原(H)血清型,可分为 O157:H7、O104:H4 等一百余种,详见附件 A。

4 对象

- 4.1 EHEC O104:H4 感染或疑似感染病例的排泄物、呕吐物。
- 4.2 被 EHEC O104:H4 污染或有 EHEC O104:H4 污染嫌疑的食品和水样。

5 检测流程图

EHEC O104:H4 检测流程图见图 1。

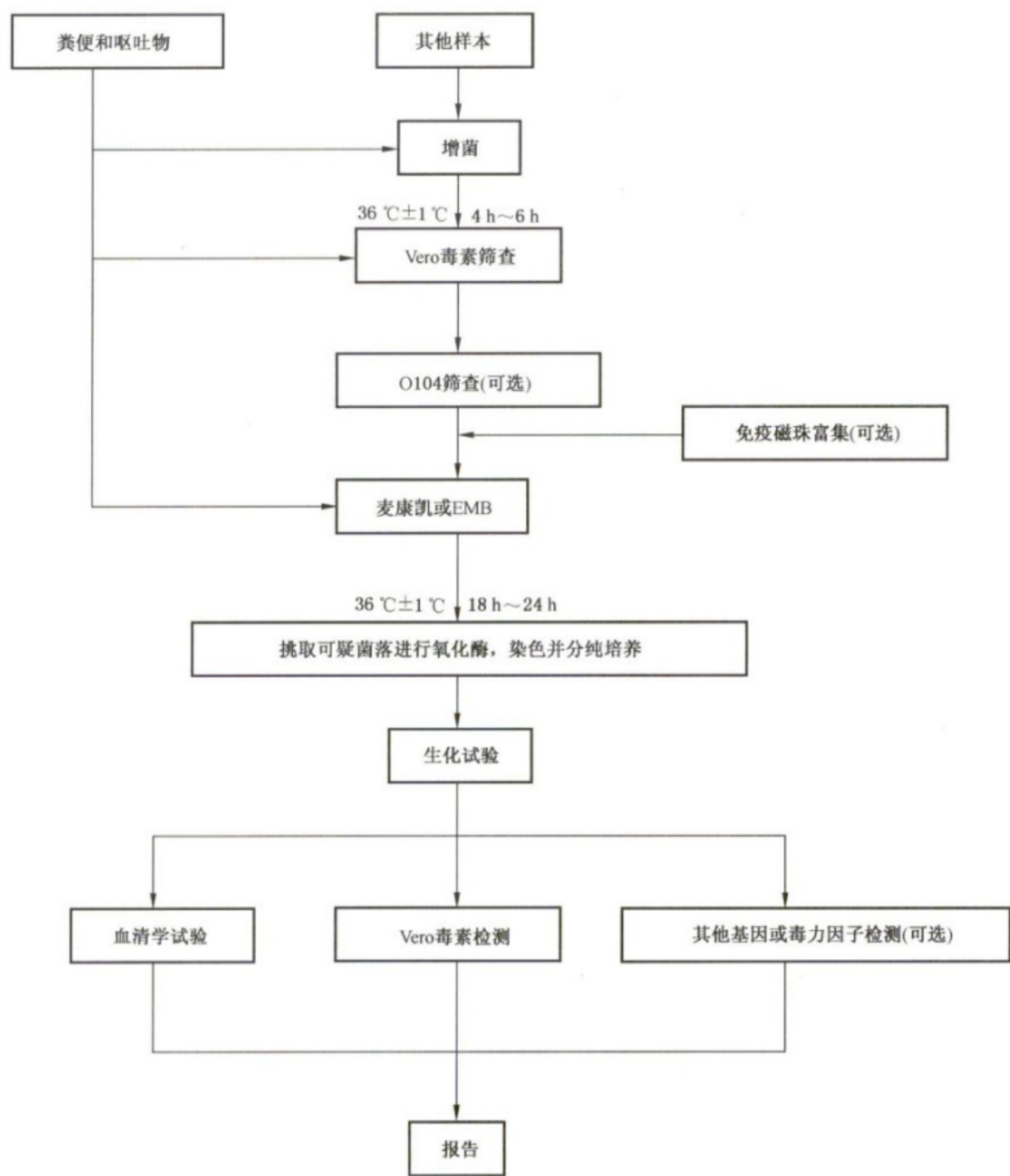


图 1 EHEC O104:H4 检测流程图

6 样本采集

6.1 样本采集原则

- 6.1.1 采集标本以病人粪便为主，粪便标本应争取在发病早期、服用抗菌药物之前采集，并尽快送到实验室。可同时采取可疑食品、水样和环境样本进行检测。
- 6.1.2 水样便采取 1 mL~3 mL，成形便采取指甲盖大小的粪便量。病人的呕吐物、沾染粪便的衣物和尸体的肠内容物亦可作为检材。
- 6.1.3 采集样本时应注意避免交叉污染。
- 6.1.4 采集样本时，应戴上乳胶手套和口罩。样本采集完毕，尽快消毒洗手。

6.2 粪便的采集

6.2.1 拭子采样法

用直肠棉拭或采便管由肛门插入直肠内 3 cm~5 cm 处采取。应注意棉拭大小适宜,避免采便量过少。

6.2.2 座厕采样法

6.2.2.1 戴上乳胶手套,取一螺旋式密封、已消毒、干燥的容器并做好唯一性标识;

6.2.2.2 使用座厕时,指导病人将经消毒的厨用塑料围裙挂在座厕后背上,将围裙体部置于座厕坐板上,使能更方便地获得粪便样本,但应避免尿液混和。尽可能多地将粪便样本采集到上述容器中(推荐采集到 10 mL 以上),置 2℃~8℃ 保存并于 2 h 内送检。

6.2.2.3 如果没有座厕,可使用搪瓷便盆。指导病人将围裙体部置于便盆上(如果便盆经过高压消毒,也可不用围裙),使能更方便地获得粪便样本,但应避免尿液混和。

6.2.2.4 如果是使用了纸尿布且不会使用座厕的婴幼儿,可将塑料围裙沿着纸尿布边缘放入纸尿布中,如果放置得当,可使粪便和尿液的混合减到最少,从而获得一个较好的样本。

6.3 呕吐物样本采集

采集自然呕吐的呕吐物于灭菌容器中,水样呕吐物采集 1 mL~3 mL,非水样呕吐物采集 1 g~3 g。

6.4 水样采集

按 GB/T 5750.2 要求进行。

6.5 可疑食品采集

按 GB 4789.1 要求进行。

7 运输与保存

采集的样本应按规定作好标识放专用送样箱中,2℃~8℃ 保存并于 2 h 内送检。采得的标本不能立即检查的,应接种于保存培养基内(如文腊氏保存液或 Cary-Blair 二氏半固体保存培养基)尽快送往实验室。送检标本时应填写送检单。

8 检验程序

8.1 准备

8.1.1 对检疫查验、卫生监督或疫情监测的记录进行整理。

8.1.2 对所采集的样本应进行唯一性标识。

8.1.3 将所采集的样本连同整理的记录一并送实验室。

8.1.4 检验设备和材料的准备按附录 B 的规定。

8.2 样品处理

8.2.1 粪便和呕吐物的处理

粪便和呕吐物应选择其中脓血粘液等病理成分进行检验,如无病理成分,可多部位取材。粪便和呕

吐物应直接取样划线接种 MAC 或 EMB 琼脂平板。同时进行增菌时,取检样 1 g/mL,加在 9 mL EC 肉汤中同时进行增菌培养。志贺样毒素筛查按附录 C 的 C.1 和附录 D 的 D.1 的要求进行。

8.2.2 可疑食品样本的处理

除了易腐食品在检验之前置 2℃~8℃预冷藏外,其余食品一般不冷藏。固体样品以乳钵加灭菌砂磨碎,或无菌操作取检样 25 g,加在 225 mL 营养肉汤中,以均质器打碎 1 min。液体样品取 25 mL,加在 225 mL EC 肉汤中直接进行检验。

8.2.3 水样的处理

污染严重的水样可取 25 mL,加在 225 mL EC 肉汤中直接进行检验。可取 300 mL 水样用过滤器和 0.22 μm 滤膜过滤,将滤膜剪碎与 50 mL 离心管中,用 25 mL 纯净水反复震荡 2 min 洗脱,加入 225 mL EC 肉汤中进行检验。

8.3 增菌

粪便样本取 1 g/mL 加入 9 mL EC 肉汤中,其他样本无菌操作取 25 g/mL 加入 225 mL EC 肉汤中,置 36℃±1℃温箱内培养 4 h~6 h。如采用 ELISA 进行 Vero 毒素筛查,加入丝裂霉素 C,使其浓度达到 0.5 μg/mL,并于 36℃±1℃温箱内继续培养 16 h~20 h。

8.4 Vero 毒素筛查

8.4.1 聚合酶链反应(PCR)法

按附录 C 进行。

8.4.2 酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测

无条件按附录 C 进行检测的实验室,可按附录 D 进行。

8.5 EHEC O104:H4 筛查

按附录 E 进行。

8.6 分离培养鉴定

8.6.1 分离培养

用增菌液接种 MAC 或 EMB 琼脂干板,腹泻便和呕吐物还应直接划线接种 MAC 或 EMB 琼脂平板,采用磁珠涂布划线接种时,将磁珠涂布在培养基一半区域,再用接种环划线其余区域。于 36℃±1℃温箱内培养 18 h~24 h,观察菌落。采用 MAC 分离时不但要注意乳糖发酵的菌落,同时也要注意乳糖不发酵和迟缓发酵的菌落。采用 EMB 分离时,大肠埃希菌表现为黑色菌落,带或不带金属光泽。

8.6.2 生化试验

于鉴别平板上挑取 5 个可疑菌落,接种三糖铁琼脂(TSI)。同时将这些培养物分别接种蛋白胨水、半固体、pH 7.2 尿素琼脂、KCN 肉汤和赖氨酸脱羧酶试验培养基,于 36℃±1℃温箱内培养 18 h~24 h。TSI 斜面产酸或不产酸,底层产酸,H₂S 阴性,KCN 阴性和尿素阴性的培养物为大肠埃希氏菌。TSI 底层不产酸,或 H₂S、KCN、尿素有任一项为阳性的培养物,均非大肠埃希氏菌。必要时做氧化酶试验和革兰氏染色。

8.6.3 血清学试验

挑取经生化试验符合大肠埃希氏菌的琼脂培养物,用出血性大肠埃希氏菌 O104 血清和 H4 血清进行玻片凝集试验。如均出现凝集,可证实为肠出血性大肠埃希氏菌 O104:H4。如果凝集效果不好,可进行液体培养后再进行血清学试验:用移液器取 20 μ L 菌液,接入 5 mL 增菌液中于 36 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 16 h,取 1 mL 培养后的菌液,9 200 g 离心,弃上清。取 20 μ L O104 血清滴加到洁净的玻片上,取上述菌体与血清进行凝集反应。

8.6.4 Vero 毒素检测

按附录 C 或附录 D 进行。

8.7 其他基因和毒力因子检测

参照附录 F 进行。

9 报告

9.1 Vero 毒素筛查、O104 筛查结果为阴性,均可报告为“未检出肠出血性大肠埃希氏菌 O104:H4”;

9.2 如果未进行 Vero 毒素筛查或 O104 筛查,直接进行分离培养鉴定,生化试验或血清学试验结果不符,报告为“未检出肠出血性大肠埃希氏菌 O104:H4”。

9.3 Vero 毒素筛查、O104 筛查结果为阳性,分离培养鉴定未检出肠出血性大肠埃希氏菌 O104:H4,需重复检测。如仍未检出,报告为“未检出肠出血性大肠埃希氏菌 O104:H4”。

9.4 生化试验、血清学试验、Vero 毒素检测均符合肠出血性大肠埃希氏菌 O104:H4 特征,食品样品报告为“25 g/mL 样品中检出肠出血性大肠埃希氏菌 O104:H4”,检样不足 25 g/mL,按实际样本量报告,其余样品报告为“检出肠出血性大肠埃希氏菌 O104:H4”。

附 录 A
(资料性附录)

引起腹泻及肠道感染的肠出血性大肠埃希氏菌血清型

引起腹泻及肠道感染的肠出血性大肠埃希菌血清型见表 A.1。

表 A.1 引起腹泻及肠道感染的肠出血性大肠埃希氏菌血清型

O1;NM	O50;H7	O113;H21	O157;NM
O1;H1	O52;H25	O113;H53	O157;H7
O1;H7	O55;NM	O114;H4	O163;H19
O2;H1	O55; H7	O114;H48	O165;NM
O2;H5	O55;H10	O115;H10	O165;H10
O2;H6	O73;H34	O115;H18	O165;H19
O2;H7	O75;H5	O117;H4	O165;H25
O4;NM	O82;H8	O118;H12	O166;H12
O4;H10	O84;H2M	O118;H30	O166;H15
O5;NM	O85;NM	O119;H5	OX3;H21
O5;H16	O86;H10	O119;H6	Orough;H20
O6;NM	O88;NM	O120;H19	ONT;NM
O6;H1	O91;NM	O121;NM	ONT;H1
O6;H28	O91;H14	O121;H8	ONT;H28
O18;NM	O91;H21	O121;H19	
O18;H7	O100;H32	O125;NM	
O22;H8	O101;H19	O125;H8	
O22;H16	O103;H2	O126;H21	
O23;H7	O103;H16	O126;H8	
O23;H16	O104;NM	O126;NM	
O25;NM	O104;H4	O128;NM	
O26;NM	O104;H21	O128;H2	
O26;H2	O105;H18	O128;H8	
O26;H8	O110;H19	O128;H12	
O26;H11	O111;NM	O128;H25	
O26;H32	O111;H2	O132;HM	
O38;H21	O111;H7	O133;H53	
O39;H4	O111;H8	O141;NM	
O45;NM	O111;H30	O145;NM	
O45;H2	O111;H34	O145;H25	
O48;H21	O111;HNT	O146;NM	
O50;NM	O112;H21	O146;H21	
O113;H7	O113;H2	O153;H25	

附 录 B
(规范性附录)
仪器设备和试剂

B.1 仪器设备

- B.1.1 天平
- B.1.2 均质器或乳钵、灭菌砂
- B.1.3 温箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $41\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- B.1.4 500 mL 灭菌广口瓶
- B.1.5 显微镜
- B.1.6 载玻片
- B.1.7 酒精灯
- B.1.8 接种环和棒
- B.1.9 灭菌的剪刀、镊子、勺子。
- B.1.10 菌浓度比浊管: Mac Farland3 号。
- B.1.11 各种量程移液器一套
- B.1.12 生物安全柜
- B.1.13 扩增仪
- B.1.14 电泳仪
- B.1.15 凝胶成像分析系统
- B.1.16 酶标仪
- B.1.17 洗板机
- B.1.18 过滤器及 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜
- B.1.19 普通冰箱
- B.1.20 $200\text{ }\mu\text{L}$ 、 2 mL 离心管
- B.1.21 25 mL 试管
- B.1.22 1 mL 、 10 mL 吸管
- B.1.23 高速离心机
- B.1.24 磁力架
- B.1.25 恒温振荡器

B.2 试剂**B.2.1 EC 肉汤****B.2.1.1 成分**

蛋白胨 10 g 、3 号胆盐(或混合胆盐) 1.5 g 、乳糖 5 g 、磷酸氢二钾 9 g 、磷酸二氢钾 1.5 g 、氯化钠 5 g 、蒸馏水 $1\text{ }000\text{ mL}$ 。

B.2.1.2 制法

将上述成分混合,溶解后,分装有发酵倒管的试管中, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min ,使最终 $\text{pH } 6.9 \pm 0.2$ 。

B.2.2 麦康凯琼脂(Mac)

B.2.2.1 成分

蛋白胨 17 g、胨 3 g、猪胆盐(或牛、羊胆盐)5 g、氯化钠 5 g、琼脂 17 g、蒸馏水 1 000 mL、乳糖 10 g、0.01%结晶紫水溶液 10 mL、0.5%中性红水溶液 5 mL。

B.2.2.2 制法

将蛋白胨、胨、胆盐和氯化钠溶解于 400 mL 蒸馏水中,校正 pH 7.2,将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中,加热溶解。将两液合并,121 ℃灭菌 15 min 备用。

临用时加热溶化琼脂,趁热加入乳糖,冷至 50 ℃~55 ℃时,加入结晶紫和中性红水溶液,摇匀后倾注平板。

B.2.3 伊红美蓝琼脂(EMB)

B.2.3.1 成分

蛋白胨 10 g、乳糖 10 g、磷酸氢二钾 2 g、琼脂 17 g、2%伊红 Y 溶液 20 mL、0.65%美兰溶液 10 mL 蒸馏水 1 000 mL。

B.2.3.2 制法

将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于蒸馏水中,校正 pH 7.1,121 ℃灭菌 15 min 备用。

临用时加入乳糖并加热溶化琼脂,冷至 50 ℃~55 ℃时,加入伊红和美兰溶液,摇匀后倾注平板。

B.2.4 三糖铁琼脂(TSI)

B.2.4.1 成分

蛋白胨 20 g、牛肉膏 5 g、乳糖 10 g、蔗糖 10 g、葡萄糖 1 g、氯化钠 5 g、硫酸亚铁铵 0.2 g、硫代硫酸钠 0.2 g、琼脂 12 g、酚红 0.025 g、蒸馏水 1 000 mL。

B.2.4.2 制法

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中,校正 pH 7.4,加入琼脂,加热煮沸,以溶化琼脂,加入 0.2%酚红水溶液 12.5 mL,摇匀,分装试管。121 ℃灭菌 15 min,放置高层斜面备用。

B.2.5 氧化酶试剂

B.2.6 革兰氏染色液

B.2.7 肠出血性大肠埃希氏菌 O104 和 H4 诊断血清

B.2.8 赖氨酸脱羧酶试验培养基

B.2.9 尿素琼脂(pH7.2)

B.2.10 氰化钾(KCN)培养基

B.2.11 蛋白陈水、靛基质试剂

B.2.12 半固体琼脂

B.2.12.1 成分

蛋白胨 1 g、牛肉膏 0.3 g、氯化钠 0.5 g、琼脂 0.35 g、蒸馏水 100 mL。

B.2.12.2 制法

按以上成分配好,煮沸使溶解,校正 pH 7.4,分装小试管,121 ℃灭菌 15 min,直立凝固备用。

- B.2.13 DNA 提取试剂盒
- B.2.14 人大肠杆菌 vero 毒素 PCR 检测试剂盒
- B.2.15 人大肠杆菌 vero 毒素 ELISA 检测试剂盒
- B.2.16 大肠杆菌 O104 免疫磁珠分离检测试剂盒
- B.2.17 丝裂霉素 C
- B.2.18 琼脂糖
- B.2.19 TE(pH8.0)
- B.2.20 SDS
- B.2.21 RNase
- B.2.22 酚/氯仿(1 : 1)
- B.2.23 70%乙醇
- B.2.24 冰无水乙醇
- B.2.25 NaAc

附 录 C
(规范性附录)
PCR 法筛查 vero 毒素

C.1 样本处理

- C.1.1 取粪便样本或培养后 EC 肉汤适量使用专用 DNA 提取试剂盒提取核酸。如未配备专用 DNA 提取试剂盒,可按 C.1.2~C.1.12 进行 DNA 提取。
- C.1.2 取 1.5 mL 菌液于 1.5 mL 离心管,6 000 g 离心 3 min,弃上清。
- C.1.3 用 0.6 mL TE 悬菌,振荡打开沉淀。
- C.1.4 加入 80 μ L 10%SDS,颠倒数次混匀后,68 $^{\circ}$ C 水浴 5 min~8 min,至清亮。
- C.1.5 加入 RNase 使终浓度为 50 μ g/mL~100 μ g/mL,混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴作用 0.5 h~1 h。
- C.1.6 加入等体积饱和酚,上下颠倒混匀,使其完全乳化,9 200 g 离心 10 min。
- C.1.7 将上层液体移入另一离心管,然后加入等体积酚/氯仿(1:1),上下颠倒混匀,至完全乳化后,9 200 g 离心 10 min。
- C.1.8 重复步骤 C.1.6,直到不见蛋白层为止。
- C.1.9 加入等体积氯仿,轻轻混匀后,9 200 g 离心 5 min。
- C.1.10 将上清液移入另一离心管,加 1/10 体积 NaAc 和 2 倍体积冰无水乙醇,混匀后,-20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min。
- C.1.11 9 200 g 离心 10 min,弃去管中液体,用 1mL 70%乙醇洗 DNA 沉淀,9 200 g 离心 10 min,再重复一次,尽量弃去管中液体,于室温或 37 $^{\circ}$ C 烤箱干燥。
- C.1.12 溶于适量 TE(pH 8.0),可室温或 37 $^{\circ}$ C 溶解,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

C.2 聚合酶链反应(PCR)法筛查 vero 毒素

C.2.1 实验原理

在 DNA 聚合酶催化下,以母链 DNA 为模板,以特定引物为延伸起点,通过变性、退火、延伸等步骤,体外复制出与母链模板 DNA 互补的子链 DNA 的过程。是一项 DNA 体外合成放大技术,能快速特异地在体外扩增任何目的 DNA。

C.2.2 PCR 引物序列和产物

slt-1-a	CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG	348 bp
slt-1-b	CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG	
slt-2-a	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G	584 bp
slt-2-b	GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C	

C.2.3 25 μ L 反应体系

在反应管中依次加入模板 2 μ L、引物(10 μ m)各 1 μ L、dNTP(2.5 μ m)2 μ L、MgCl₂ 1 μ L、10 \times buffer 2.5 μ L、Taq 酶 0.5 μ L、ddH₂O 补充至 25 μ L。

C.2.4 PCR 扩增程序

94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃延伸 5 min。

C.2.5 电泳

用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物, 并用凝胶成像及分析系统保存结果。

C.2.6 结果判断

出现特异性的核酸区带为阳性, 未出现特异性的核酸区带为阴性。

附 录 D
(规范性附录)

酶联免疫吸附法筛查 vero 毒素

D.1 样本处理

D.1.1 粪便样本采集后尽早按试剂盒说明书进行处理。以加拿大 GBD 公司的 Human E coli verotoxin ELISA Kit 为例。成形粪便样本取 1 g 到 3 mL 1×洗涤液中,混匀,待重颗粒沉淀下来(即澄清),取上清进行 veto 毒素检测。腹泻便样本取 1 mL 到 2 mL 1×洗涤液中同上操作。注意不能检测含 NaN_3 的样品,因 NaN_3 抑制 HRP 活性。试剂盒如未提供粪便样本处理方法,可按 D.1.2 处理。

D.1.2 进行增菌时,粪便样本取 1 g/mL 加入 9 mL EC 肉汤中,其他样本无菌操作取 25 g/mL 加入 225 mL EC 肉汤中,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱内培养 4 h~6 h 后,加入丝裂霉素 C,使其浓度达到 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$,并于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱内继续培养 16 h~20 h。9 200 g $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,取上清液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌后分装保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

D.2 酶联免疫吸附法(ELISA 法)筛查 vero 毒素

D.2.1 实验原理

用纯化的人大肠杆菌 veto 毒素抗体包被微孔板,加入标准或样本,如果样本中有 vero 毒素,将被结合到固相抗体上,再与 HRP 标记 vero 毒素抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),定性或定量判断样本中有无 vero 毒素或其浓度。

D.2.2 标准品的稀释

有的试剂盒直接用 OD 值进行定性检测,有的试剂盒使用标准曲线进行定量检测。使用定量检测试剂盒时,按照说明书进行标准品的稀释,如某试剂盒用 $150\text{ }\mu\text{L}$ 的原倍标准品加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ 标准品稀释液制成 5 号标准品(3.2 Eu/L),再分别用 $150\text{ }\mu\text{L}$ 标准品稀释液作倍比稀释,分别配成 4 号标准品(1.6 Eu/L)、3 号标准品(0.8 Eu/L)、2 号标准品(0.4 Eu/L)和 1 号标准品(0.2 Eu/L)。

D.2.3 加样

严格按说明书要求设空白孔、标准孔(或阴阳性对照孔)、样品孔和进行加样操作。以下检测操作和流程均以某定量试剂为例。空白孔不加样品和稀释液,标准孔依次加入各浓度标准品 $50\text{ }\mu\text{L}$,待测样品孔中先加样品稀释液 $40\text{ }\mu\text{L}$,然后再加待测样品 $10\text{ }\mu\text{L}$ (样品最终稀释度为 5 倍)。

D.2.4 温育

用封板膜封板后置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。

D.2.5 洗涤

将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用,弃去液体,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干。

D.2.6 加酶

每孔加入酶标试剂 50 μL ,空白孔除外。

D.2.7 温育

操作同 D.2.4。

D.2.8 洗涤

操作同 D.2.5。

D.2.9 显色

每孔先加入显色剂 A 50 μL ,再加入显色剂 B 50 μL ,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 min。

D.2.10 终止

每孔加终止液 50 μL ,终止反应。

D.2.11 测定

加终止液后 15 min 以内以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。

D.2.12 计算

以标准物的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,在坐标纸上绘出标准曲线,根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度;再乘以稀释倍数 5;或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式,将样品的 OD 值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数 5,即为样品的实际浓度。

D.2.13 结果判断

定性时 OD 值 ≥ 0.15 为有反应性,OD 值 < 0.15 为无反应性。定量时按实际浓度报告。

附 录 E
(规范性附录)
PCR 法筛查 EHEC O104:H4

E.1 免疫磁珠富集

E.1.1 实验原理

免疫磁珠表面偶联大肠杆菌 O104 的特异抗体,与样本中相应抗原进行特异性结合,磁珠在磁场作用下与样本中的其他物质快速分离,从而达到分离检测大肠杆菌的目的。

E.1.2 方法

E.1.2.1 将样品于 36℃±1℃温箱内增菌 6 h。

E.1.2.2 用漩式振荡器震荡 10 s 悬浮磁珠。

E.1.2.3 如果用自动磁珠分选仪严格按照说明书操作,如果用磁力架进行手工操作,吸取 20 μL 磁珠加入到含 1 mL 曾菌液的离心管中,颠倒混合后将离心管固定在微量混合器上,旋转混合 15 min。

E.1.2.4 取下离心管,放入磁力架的孔中,静置 3 min,小心吸走管中液体。

E.1.2.5 取 1 mL 洗脱缓冲液重悬磁珠并将其转移到新的离心管中。

E.1.2.6 将离心管颠倒混匀 5 次~8 次,再置于磁力架中,静置 3 min,小心吸走管中液体;重复洗涤一次,最后加入 50 μL~100 μL 洗脱液重悬磁珠备用。

E.2 聚合酶链反应(PCR)法筛查 EHEC O104:H4

E.2.1 实验原理

在 DNA 聚合酶催化下,以母链 DNA 为模板,以特定引物为延伸起点,通过变性、退火、延伸等步骤,体外复制出与母链模板 DNAX 补的子链 DNA 的过程。是一项 DNA 体外合成放大技术,能快速特异地在体外扩增任何目的 DNA。

E.2.2 常用 PCR 引物序列和产物

104rfbO-f	TGA ACT GAT TTT TAG GAT GG	351 bp
104rfbO-r	AGA ACC TCA CTC AAA TTA TG	
fliCH4-a	GGC GAA ACT GAC GGC TGC TG	201 bp
fliCH4-b	GCA CCA ACA GTT ACC GCC GC	

E.2.3 20 μL 反应体系

在反应管中依次加入模板 2 μL、引物各 1 μL、dNTP 1.5 μL、MgCl₂ 2 μL、10×buffer 2 μL、ddH₂O 8 μL、Taq 酶 0.5 μL。

E.2.4 PCR 扩增程序

95℃预变性 2 min;95℃变性 1 min,55℃退火 2 min,72℃延伸 2 min,30 个循环;72℃延伸 5 min。

E.2.5 电泳

用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物,并用凝胶成像及分析系统保存结果。

E.2.6 结果判断

出现特异性的核酸区带为阳性,未出现特异性的核酸区带为阴性。

附 录 F
(资料性附录)

PCR 法检测 EHEC O104:H4 其他相关基因和毒力因子

F.1 实验原理

在 DNA 聚合酶催化下,以母链 DNA 为模板,以特定引物为延伸起点,通过变性、退火、延伸等步骤,体外复制出与母链模板 DNA 互补的子链 DNA 的过程。是一项 DNA 体外合成放大技术,能快速特异地在体外扩增任何目的 DNA。

F.2 PCR 法检测 EHEC O104:H4 其他相关基因和毒力因子

F.2.1 EHEC 经典毒力基因粘附素 *eaeA* 和肠溶血素 *ehxA* 检测引物序列和产物大小

<i>eaeA</i> -a	GGC ATC GGT CGG TAT TCC	397 bp
<i>eaeA</i> -b	TGC GCT AAT CGC GTC TAC	
MFS-1Fb	AGT TCA TTA GAT CGA GGT T	369 bp
MFS-1R	CTC CTT GCA AAT GTG CAA	

F.2.2 EaggEC 毒力基因 *aggR*、*aatA*、*aap*、*aagC* 检测引物序列和产物

F.2.2.1 *aggR*

<i>aggR</i> -F	GTA TAC ACA AAA GAA GGA AGC	254 bp
<i>aggR</i> -R	ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC	

F.2.2.2 *aatA*

<i>aatA</i> -F	TAT ATT GAA ATG CTT AGT GAG AG	510 bp
<i>aatA</i> -R	CTG ATA CCC AGA CTA GCA CT	

F.2.2.3 *aap*

<i>aap</i> -F	ATG AAA AAA ATT AAG TTT GTT ATC TT	356 bp
<i>aap</i> -R	TTA TTT AAC CCA TTC GGT TAG AGC	

F.2.2.4 *aagC*

AFF-I-2-1	CAG TCA GGA AAG TGG GAA AGC	358 bp
AFF-I-2-2	AGG TCT GTA TAG TGC CGT CTG	

F.2.3 20 μ L 反应体系

在反应管中依次加入模板 2 μ L、引物各 1 μ L、dNTP 1.5 μ L、MgCl₂ 2 μ L、10 \times buffer 2 μ L、Taq 酶 0.5 μ L、ddH₂O 补充至 20 μ L。

F.2.4 PCR 扩增程序为

94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

F.2.5 电泳

用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物,并用凝胶成像及分析系统保存结果。

F.2.6 结果判断

出现特异性的核酸区带为阳性,未出现特异性的核酸区带为阴性。
