



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4781—2017

出口食品和饲料中产志贺毒素大肠 埃希氏菌检测方法 实时荧光 PCR 法

Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food and
animal feed for exports—Real-time PCR method

2017-05-12 发布

2017-12-01 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：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：邵景东、申进玲、封振、王传现、薛峰、郭旻、吴福平、王毅谦、李晓红、祝长青、肖震、崔思宇。

出口食品和饲料中产志贺毒素大肠埃希氏菌检测方法 实时荧光 PCR 法

1 范围

本标准规定了出口食品和饲料中产志贺毒素大肠埃希氏菌的实时荧光 PCR 快速检测方法。

本标准适用于出口食品和饲料中产志贺毒素大肠埃希氏菌(O157、O104、O111、O26、O145 和 O103)的检测。

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/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

产志贺毒素大肠埃希氏菌 *Shiga toxin-producing Escherichia coli*;STEC

含有志贺毒素编码基因 *stx* 的大肠埃希氏菌。

3.2

肠出血性大肠埃希氏菌 *Shiga toxin-producing Escherichia coli* causing the attaching and effacing lesion

同时含有志贺毒素编码基因 *stx* 和紧密素编码基因 *eae* 的大肠埃希氏菌。

注:这种毒力基因组合常与 STEC 所引起的严重疾病相关。

3.3

实时荧光 PCR *real time PCR*

在 PCR 反应体系中加入荧光集团,利用荧光信号的积累实时监控整个 PCR 扩增过程。

3.4

Ct 值 *cycle threshold*

每个反应管内荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数。

4 方法提要

对样品中微生物进行增菌培养后提取核酸,采用实时荧光 PCR 方法对志贺毒素编码基因 *stx* 和紧密素编码基因 *eae* 进行检测。若样品中 *stx* 阳性,继续进行菌株分离;若 *stx* 和 *eae* 阳性,继续进行 O 血

清组编码基因 *rfbE* (O157)、*wzx* (O104)、*wbdL* (O111)、*wzx* (O26)、*ihp1* (O145) 和 *wzx* (O103) 的检测。若检测到以上某种 O 血清组阳性,可先对特异的 O 血清组菌株富集再进行菌株分离。

5 培养基和试剂

除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯;实验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

- 5.1 改良胰蛋白胨大豆肉汤(mTSB):见附录 A 中 A.1。
- 5.2 缓冲蛋白胨水(BPW):见 A.2。
- 5.3 CHROMagar STEC 显色培养基:见 A.3。
- 5.4 CHROMagar O157 显色培养基:见 A.4。
- 5.5 改良山梨醇麦康凯(CT-SMAC)琼脂:见 A.5。
- 5.6 三糖铁琼脂(TSI):见 A.6。
- 5.7 TE 溶液。
- 5.8 10% SDS。
- 5.9 蛋白酶 K(20 mg/mL)。
- 5.10 氯化钠(NaCl):5 mol/L 和 0.7 mol/L。
- 5.11 10% CTAB。
- 5.12 三氯甲烷。
- 5.13 异戊醇。
- 5.14 异丙醇。
- 5.15 70%乙醇。
- 5.16 核酸提取试剂盒。
- 5.17 PCR 预混液。
- 5.18 引物和探针:见附录 B。
- 5.19 诊断分型血清:O157、O104、O111、O26、O145 和 O103 混合多价或单因子血清。
- 5.20 API 20E 生化鉴定试剂条或同类产品。
- 5.21 GNI⁺卡或同类产品。
- 5.22 标记单抗磁珠:抗—O157/O104/O111/O26/O145/O103 免疫磁珠试剂或同类产品。

6 仪器和设备

- 6.1 恒温水浴或加热套装置:100 ℃。
- 6.2 恒温培养箱:36 ℃±1 ℃。
- 6.3 离心机:最大转速 13 000 r/min 以上。
- 6.4 天平:量程 2 kg,感量 0.1 g。
- 6.5 低温冰箱:−20 ℃~4 ℃。
- 6.6 均质器。
- 6.7 涂布棒:直径 3 mm~4 mm。
- 6.8 接种环:直径 3 mm。
- 6.9 灭菌样品处理器具:取样勺、剪刀、镊子。

- 6.10 可调移液器:1 μL ~1 000 μL 。
 6.11 实时 PCR 反应管(0.2/0.5 mL),多孔 PCR 微孔板。
 6.12 荧光 PCR 仪。
 6.13 全自动细菌鉴定系统(VITEK 或同类仪器)。
 6.14 显微镜。
 6.15 磁极和混匀器。

7 检验程序

STEC 检验程序见图 1。

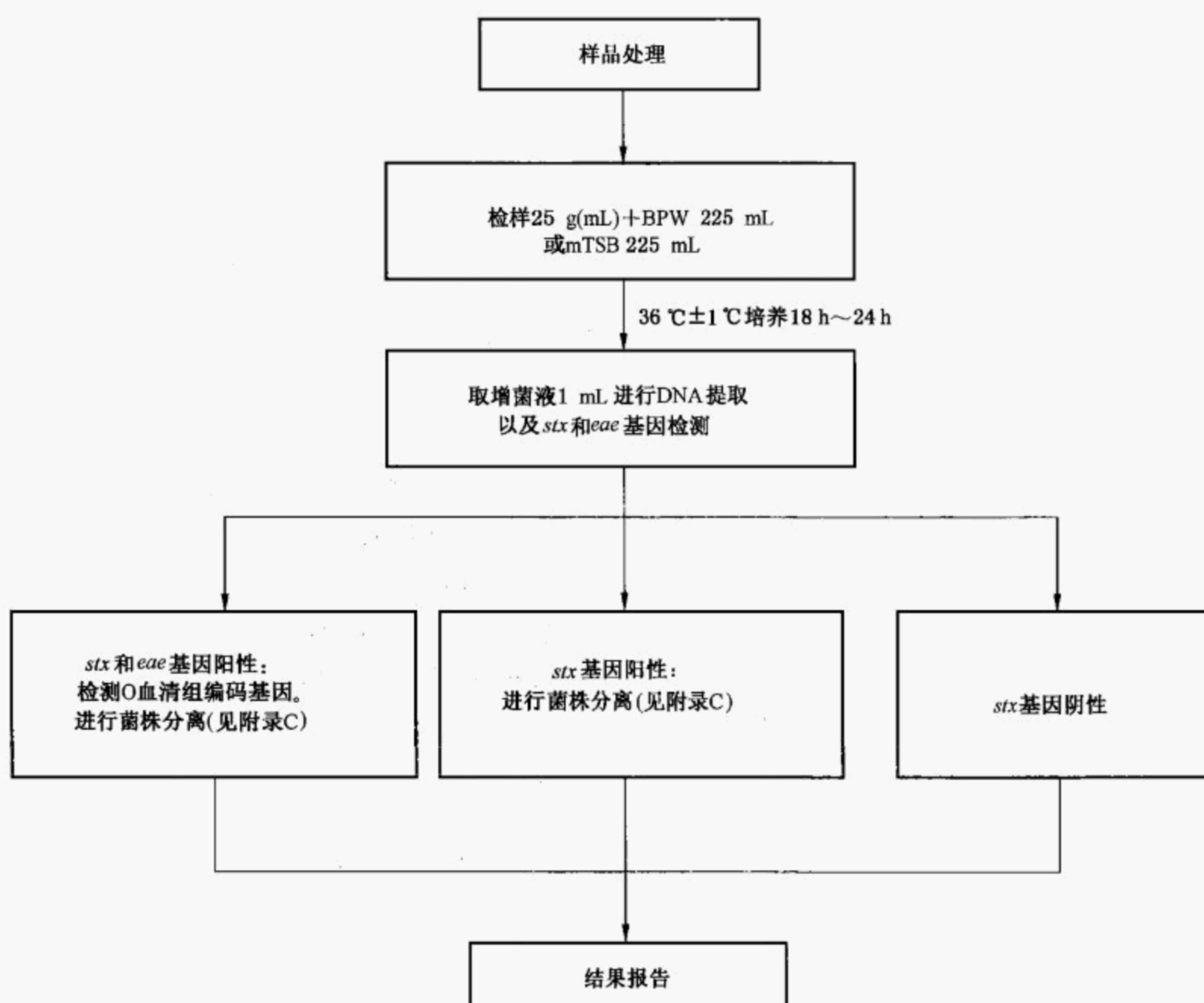


图 1 产志贺毒素大肠埃希氏菌检验程序

8 操作步骤

8.1 样品处理

冷冻样品应在 45 $^{\circ}\text{C}$ 以下不超过 15 min 或在 2 $^{\circ}\text{C}$ ~5 $^{\circ}\text{C}$ 解冻不超过 18 h 解冻;若不能及时检验,应置于-10 $^{\circ}\text{C}$ ~-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。非冷冻的易腐样品若不能及时检验,应置于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~5 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,在 24 h 内检验。

8.2 样品制备

8.2.1 固体和半固体样品

称取 25 g 样品,放入盛有 225 mL mTSB 的无菌均质杯内,8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min,制成 1:10 样品匀液,或放入盛有 225 mL mTSB 的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min,制成 1:10 的样品匀液。

8.2.2 液体样品

用无菌吸管吸取 25 mL 样品置于盛有 225 mL mTSB 的无菌锥形瓶(瓶内预置适当数量无菌玻璃珠)中,充分混匀,制成 1:10 的样品匀液。

8.2.3 冷冻样品

称取 25 g 或 25 mL 样品,分别放入盛有 225 mL BPW 的无菌均质杯(袋)或锥形瓶中,按照 8.2.1 或 8.2.2 步骤,充分混匀。

8.3 增菌

将 8.2 制备的样品放于 36 °C±1 °C 培养箱中培养 18 h~24 h。

8.4 核酸提取

取 8.3 增菌液 1 mL,加到 1.5 mL 无菌离心管中。12 000g 离心 1 min;吸弃上清,取沉淀,加 567 µL TE 溶液(pH8.0),悬浮,加 30 µL 10% SDS 和 3 µL 蛋白酶 K(20 mg/mL),混匀,37 °C 温浴 1 h;加 100 µL NaCl(5 mol/L),混匀,加 80 µL CTAB/NaCl 溶液(10% CTAB 和 0.7 mol/L NaCl),混匀,65 °C 温浴 10 min;加等体积三氯甲烷/异戊醇(体积比 24:1),混匀,12 000 g 离心 10 min;取上清液,加 0.6 倍体积异丙醇,轻轻混匀,12 000 g 离心 10 min;取沉淀,用 70%乙醇清洗 2 次。干燥,加 100 µL TE 溶液溶解,立即用于荧光 PCR 反应或贮存-20 °C 备用。

也可采用等效的商品化核酸提取试剂盒并按其说明提取核酸。

8.5 实时荧光 PCR

8.5.1 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应所用引物和探针见附录 B。PCR 反应体系见表 1。每个 DNA 样品做 2 个平行管。加样时应使样品 DNA 溶液完全落入反应液中,不要粘附于壁上,加样后尽快盖紧管盖。

表 1 PCR 反应体系

组分	工作液浓度	加样量/µL	终浓度
TaqMan Universal Master Mix	2×	10	1×
引物(上游)	20 µmol/L	0.5	0.5 µmol/L
引物(下游)	20 µmol/L	0.5	0.5 µmol/L
探针	10 µmol/L	0.5	0.25 µmol/L
DNA 模板	—	2	—
去离子水	—	补至 20	—

8.5.2 对照设置

每次检验分别设置含有 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 基因的大肠埃希氏菌为阳性对照,不含 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 的大肠埃希氏菌为阴性对照,以无菌水为试剂空白对照。可提前提取对照菌株的模板 DNA 并储存在 -20°C 冰箱中备用。

注:阳性对照株可使用大肠埃希氏菌 CICC 10670;阴性对照株可使用大肠埃希氏菌 ATCC 25922。

8.5.3 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应参数为: $50^{\circ}\text{C}/2\text{ min}$;预变性 $95^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$,45 个循环为 $95^{\circ}\text{C}/15\text{ s}$, $60^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$ 。

注:不同仪器可根据仪器要求将反应参数做适当调整。

9 结果分析

9.1 阈值设定

实时荧光 PCR 反应结束后,设置荧光信号阈值,阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

9.2 质控标准

阴性对照:各基因检测 Ct 值 ≥ 40 。

阳性对照:各基因检测 Ct 值 < 30 。

空白对照:各基因检测 Ct 值 ≥ 40 。

以上要求需在同一次实验中同时满足,否则,本次实验无效,需重新进行。

9.3 检测基因的选择

首先检测 *stx* (*stx1*、*stx2*) 基因和 *eae* 基因。对于 *stx* 基因阳性 [*stx1* 和 (或) *stx2* 阳性] 和 *eae* 基因阳性的样品继续进行 *rfbE* (O157)、*wzx* (O104)、*wbdl* (O111)、*wzx* (O26)、*ihp1* (O145) 和 *wzx* (O103) O 血清组编码基因的检测。

9.4 结果判定及表述

9.4.1 结果判定

在符合 9.2 的情况下,待检样品进行检测时,若:

基因 Ct 值 < 35 ,则判定为该基因阳性。

基因 Ct 值 ≥ 40 时,则判定为该基因阴性。

Ct 值在 35~40 之间,应重做实时荧光 PCR 扩增。

再次扩增后的结果 Ct 值仍小于 40,并有典型的扩增曲线,且对照结果均正常,则可判定该基因为阳性。

stx 基因阳性的样本按照附录 C 的步骤进行确证。

9.4.2 结果表述

结果表述见表 2。

表 2 结果表述

检测结果		结果表述
<i>stx</i> 阴性		25 g(mL)样品中未检出产志贺毒素大肠埃希氏菌
<i>stx</i> 阳性,但未分离到 STEC 菌株		
<i>stx</i> 阳性, 分离并确认 到 STEC 菌株	<i>eae</i> 和 O 血清组编码基因阴性	25 g(mL)样品中检出产志贺毒素大肠埃希氏菌
	<i>eae</i> 阳性,O 血清组编码基因阴性	25 g(mL)样品中检出肠出血性大肠埃希氏菌
	<i>eae</i> 和 O 血清组编码基因阳性	25 g(mL)样品中检出产志贺毒素大肠埃希氏菌相应 O 血清组

10 生物安全措施和防污染措施

10.1 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全,应由具备资格的工作人员进行操作,所有培养物和废弃物应参照 GB 19489中的有关规定执行。

10.2 防污染措施

防污染措施应符合 GB/T 27403 的规定。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 改良胰蛋白胨大豆肉汤(mTSB)

A.1.1 基础培养基

A.1.1.1 成分

胰酪蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
葡萄糖	2.5 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	4.0 g
三号胆盐	1.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.1.2 制法

将 A.1.1.1 中各成分溶于 1 000 mL 蒸馏水中,加热溶解,校正 pH 至 7.4 ± 0.2 , $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min,备用。

A.1.2 抗生素溶液

A.1.2.1 新生霉素溶液

称取 0.16 g 新生霉素于 10 mL 灭菌蒸馏水中,振摇混匀,充分溶解后过滤除菌。

A.1.2.2 吡啶黄素溶液

称取 0.12 g 吡啶黄素于 10 mL 灭菌蒸馏水中,振摇混匀,充分溶解后过滤除菌。

A.1.3 完全培养基的配制

将 1 mL 新生霉素溶液(A.1.2.1)加入 1 000 mL 冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的 mTSB(A.1.1)中,使新生霉素浓度达到 16 mg/L。

对于奶制品和乳制品的检测,将 1 mL 吡啶黄素溶液(A.1.2.2)加入 1 000 mL 冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的 mTSB(A.1.1)中,使吡啶黄素浓度达到 12 mg/L。

A.2 缓冲蛋白胨水(BPW)

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	3.5 g

磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.2 制法

将 A.2.1 中各成分溶于 1 000 mL 蒸馏水中,加热溶解,校正 pH 至 7.4 ± 0.2 , 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.3 CHROMagar STEC 显色培养基

A.3.1 成分

琼脂	15.0 g
蛋白胨和酵母粉	8.0 g
盐类	5.2 g
色素	2.6 g
增补剂	10 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

A.3.2 制备

称取干粉 30.8 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中,充分搅拌混匀,加热至 100 °C,不停搅拌,使其完全溶解。切勿加热超过 100 °C,切勿 121 °C 高压灭菌。若使用微波炉加热,应将培养基加热沸腾,立即移出,轻轻摇匀,再放入微波炉加热,观察小气泡变为大气泡,直至完全溶解即可。切勿使培养基溢出。取增补剂两瓶[ST160(S)]各加入 5 mL 无菌水中搅拌混匀,或取增补剂一瓶[ST162(S)]加入 10 mL 无菌水中搅拌混匀。把混匀后的增补剂加入到冷却至 45 °C~50 °C 的基础培养基中,轻轻摇动使其充分混匀,倾注平皿,使其凝固,晾干备用。也可根据需要按照 30.8 g/L 的比例扩大或缩小制备培养基的量。

该成品平板在室温可保存一天或在冰箱内贮存 1 个月(2 °C~8 °C,避光)。未使用完的 STEC 增补剂在 2 °C~8 °C 环境中可保持 2 个月。

A.4 CHROMagar O157 显色培养基

A.4.1 成分

琼脂	15.0 g
蛋白胨和酵母粉	13.0 g
色素	1.2 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.4.2 制备

称取干粉 29.2 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中,充分搅拌混匀。加热至 100 °C,不停搅拌,使其完全溶解。切勿加热超过 100 °C,切勿 121 °C 高压灭菌。若使用微波炉加热,应将培养基加热沸腾,立即移出,轻轻摇匀,再放入微波炉加热,观察小气泡变为大气泡,直至完全溶解即可。切勿使培养基溢出。加热后的培养基冷却至 45 °C~50 °C,轻轻地摇动均匀,倾注平皿,使其凝固,晾干备用。也可根据需要按照 29.2 g/L 的比例扩大或缩小制备培养基的量。

该成品平板在室温可保存一天或在冰箱内贮存 2 周(2 °C~8 °C,避光)。

A.5 改良山梨醇麦康凯(CT-SMAC)琼脂

A.5.1 基础培养基(山梨醇麦康凯琼脂)

A.5.1.1 成分

蛋白胨	20.0 g
山梨醇	10.0 g
三号胆盐	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	1 000.0 mL

A.5.1.2 制法

将 A.5.1.1 各成分溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,加热煮沸,校正 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.5.2 亚碲酸钾溶液

A.5.2.1 成分

亚碲酸钾	0.5 g
蒸馏水	200.0 mL

A.5.2.2 制法

将亚碲酸钾溶于水,过滤法除菌。

A.5.3 头孢克肟溶液

A.5.3.1 成分

头孢克肟	1.0 mg
96%乙醇	200.0 mL

A.5.3.2 制法

将头孢克肟溶于酒精中,静置 1 h 待其充分溶解后过滤除菌。分装试管,储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,有效期一年。解冻后的头孢克肟溶液不应冻存,且在 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下有效期 14 d。

A.5.4 完全培养基的配制

将 1 mL 亚碲酸钾溶液(A.5.2)和 10 mL 头孢克肟溶液(A.5.3)加入 1 000 mL 冷却至 $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的山梨醇麦康凯琼脂(A.5.1),使亚碲酸钾浓度达到 2.5 mg/L,头孢克肟浓度达到 0.05 mg/L,混匀后倾注平板。

A.6 三糖铁琼脂(TSI)

A.6.1 成分

蛋白胨	15.0 g
牛肉粉	3.0 g
酵母粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
月示胨	5.0 g
乳糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
蔗糖	10.0 g
酚红	0.025 g
硫酸亚铁	0.2 g
硫代硫酸钠	0.3 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.6.2 制备

称取本品 64.5 g,加热溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,加热煮沸 1 min,校正 pH 至 7.4 ± 0.1 ,分装于 16 mm×150 mm 试管,121 ℃ 高压灭菌 15 min 制成斜面长 4 cm~5 cm,底部长 2 cm~3 cm。

附 录 B
(规范性附录)

Real time PCR 所用引物和探针

stx 和 *eae* 基因实时荧光检测体系所用引物和探针序列见表 B.1, O 血清组编码基因实时荧光检测体系所用引物和探针序列见表 B.2。探针 5'端均为 FAM 标记, 3'端可为 TAMRA 或 BHQ 标记。

表 B.1 *stx* 和 *eae* 基因检测所用简并引物和探针

目标基因	上游引物、下游引物和探针序列(5'-3') ^a
<i>stx1</i>	上游引物: TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG
	下游引物: CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC
	探针: CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTAA
<i>stx2^b</i>	上游引物: TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG
	下游引物: CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC
	探针: TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC
<i>eae</i>	上游引物: CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA
	下游引物: CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA
	探针: ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC
^a 序列中 Y 为(C,T), S 为(C,G), W 为(A,T), R 为(A,G), M 为(A,C)。 ^b 此引物和探针组合可扩增除了 <i>stx2f</i> 外的所有 <i>stx2</i> 变体。	

表 B.2 O 血清组编码基因检测所用引物和探针

目标基因	上游引物、下游引物和探针序列(5'-3')
<i>rfbE</i> (O157)	上游引物: TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCAA
	下游引物: CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT
	探针: AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG
<i>wzx</i> (O104)	上游引物: GCA AAT AAT TAC AAT GTA TGG CTC ACA
	下游引物: GAA ATT CTT TGC GCG ACA ATA A
	探针: TTT TTT CGG TCA AAG CAG ATA TCG CAG G
<i>wbdI</i> (O111)	上游引物: CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GCT TT
	下游引物: TTT TTG AAT AGT TAT GAA CAT CTT GTT TAGC
	探针: TTG AAT CTC CCA GAT GAT CAA CAT CGT GAA
<i>wzx</i> (O26)	上游引物: CGC GAC GGC AGA GAA AATT
	下游引物: AGC AGG CTT TTA TAT TCT CCA ACT TT
	探针: CCC CGT TAA ATC AAT ACT ATT TCA CGA GGT TGA

表 B.2(续)

目标基因	上游引物、下游引物和探针序列(5'-3')
<i>ihp1</i> (O145)	上游引物:CGA TAA TAT TTA CCC CAC CAG TAC AG
	下游引物:GCC GCC GCA ATG CTT
	探针:CCG CCA TTC AGA ATG CAC ACA ATA TCG
<i>wzx</i> (O103)	上游引物:CAA GGT GAT TAC GAA AAT GCA TGT
	下游引物:GAA AAA AGC ACC CCC GTA CTT AT
	探针:CAT AGC CTG TTG TTT TAT

附录 C
(规范性附录)
STEC 分离和确认流程

C.1 流程

STEC 分离和确认流程见图 C.1。

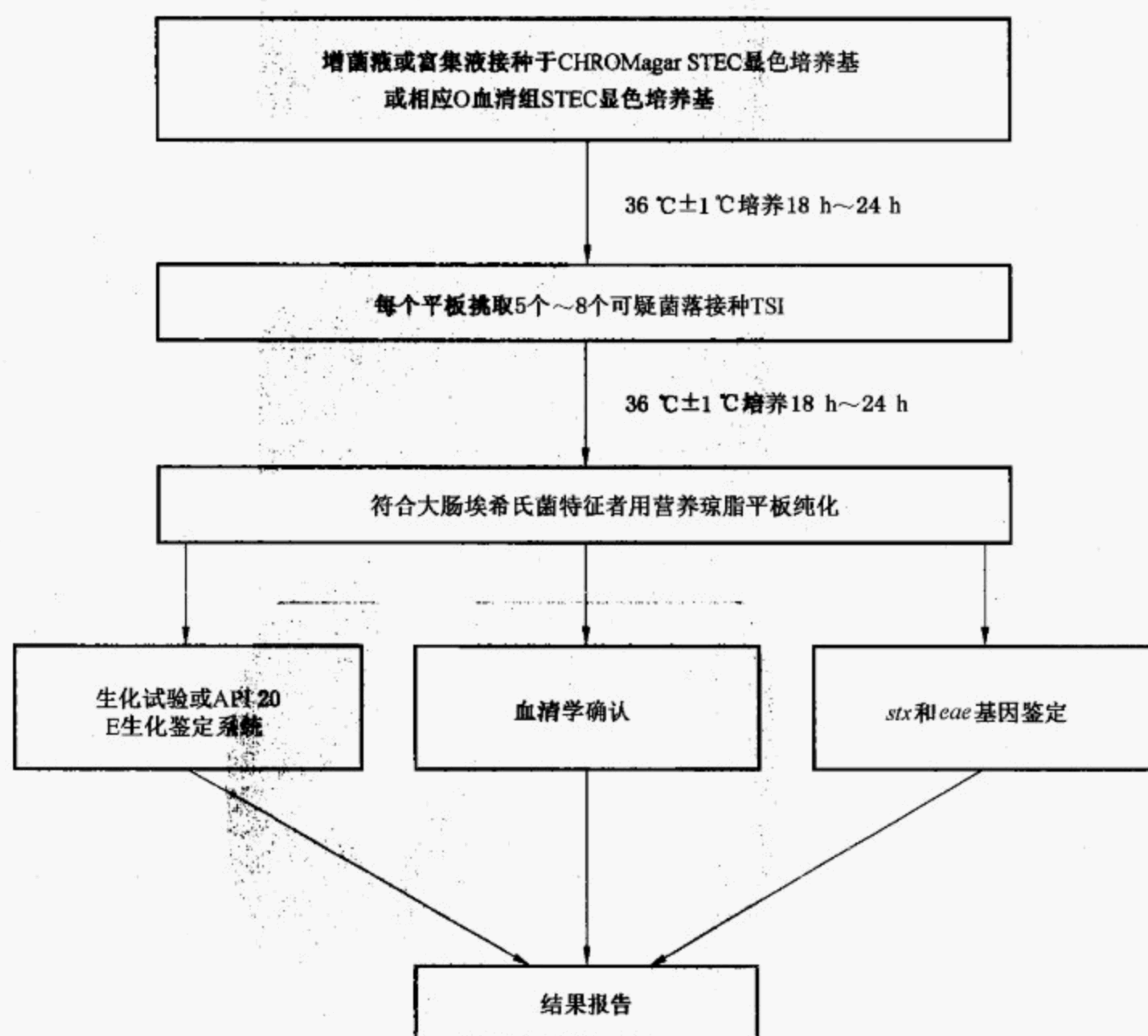


图 C.1 STEC 分离和确认流程图

C.2 分离

若样品为 *stx* 阳性,将增菌液划线接种于 CHROMagar STEC 显色培养基,36℃±1℃培养 18 h~24 h。挑取 5 个~8 个可疑菌落。

若样品含有本标准提到的某种 O 血清组,吸取增菌液 1 mL,用抗相应 O 抗原磁珠进行富集后将磁珠涂布于 STEC 相应 O 血清组显色培养基。同时将增菌液 10 倍梯度稀释,分别取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释液各 100 μ L 分别涂布于 CHROMagar STEC 显色培养基或 STEC 相应 O 血清组显色培养基,36℃±1℃培养 18 h~24 h。挑取 5 个~8 个可疑菌落。

注: STEC 相应 O 血清组显色培养基可选用商品化 CHROMagar 系列培养基。对于 O157,可选用 CHROMagar O157 显色培养基或其他同类产品如 CT-SMAC 等。

C.3 确认

C.3.1 生化确认

将可疑菌落接种于 TSI 琼脂斜面, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。大肠埃希氏菌在 TSI 琼脂斜面上的典型结果为斜面和底层均呈黄色, 产气或不产气, H_2S 阴性, 革兰氏染色阴性。对符合上述情况的菌株, 接种于普通营养琼脂平板进行分离纯化, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。必要时, 可用 API 20E 或全自动细菌鉴定系统(VITEK-GNI⁺ 或同类仪器)做全套生化试验。

C.3.2 血清学确认

在营养琼脂平板上挑取分离纯化的菌落, 分别用 O157、O104、O111、O26、O145 和 O103 混合多价血清和单因子血清做玻片凝集试验。血清凝集试验应做生理盐水对照。

C.3.3 毒力基因确认

用实时荧光 PCR 法来对分离到的 STEC 菌株进行 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 基因确认。

参 考 文 献

[1] ISO/TS 13136:2012 Microbiology of food and animal feed—Real-time polymerase chain reaction(PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens—Horizontal method for the detection of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.

[2] Jinneman K C, Waite-Cusic J G, Yoshitomi K J. Evaluation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) method for the detection and identification of STEC O104 strains from sprouts [J]. Food microbiology, 2012, 30(1): 321-328.

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
出口食品和饲料中产志贺毒素大肠
埃希氏菌检测方法 实时荧光 PCR 法
SN/T 4781—2017

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 32 千字
2018 年 3 月第一版 2018 年 3 月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 · 2-32784 定价 21.00 元



SN/T 4781—2017