



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4656.9—2023

进出口纺织品生物安全检验方法 第9部分：肠出血性大肠杆菌 O157:H7

Biosafety testing methods of the textiles for import and export—
part 9: Enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7

2023-05-05 发布

2023-12-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件为 SN/T 4656《进出口纺织品生物安全检验方法》的第 9 部分，SN/T 4656 已经发布了如下几个部分：

- 第 1 部分：白假丝酵母菌；
- 第 2 部分：大肠埃希氏菌；
- 第 3 部分：大肠菌群；
- 第 4 部分：金黄色葡萄球菌；
- 第 5 部分：菌落总数；
- 第 6 部分：沙门氏菌；
- 第 7 部分：铜绿假单胞菌；
- 第 8 部分：通则；
- 第 9 部分：肠出血性大肠杆菌 O157:H7。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中华人民共和国郑州海关、中检集团中原农食产品检测(河南)有限公司、中华人民共和国宁波海关、中华人民共和国深圳海关。

本文件主要起草人：李轲、郭会清、禹建鹰、李传民、张亚斌、宗珊盈、谢堂堂、傅科杰、张卫理。

进出口纺织品生物安全检验方法

第9部分：肠出血性大肠杆菌 O157:H7

1 范围

本文件规定了进出口纺织品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的检验方法。
本文件适用于进出口纺织品肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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试验方法

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分：实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分：培养基性能测试实用指南

SN/T 4656.8 进出口纺织品生物安全检验方法 第8部分：通则

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

纺织品生物安全 biosafety of textiles

一般是指纺织品中携带的有害生物本身或其代谢产物对生态环境和人体健康产生的潜在威胁，及其所采取的一系列有效预防和控制措施。

3.1.2

肠出血性大肠杆菌 O157:H7 Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7

肠出血性大肠杆菌 O157:H7 是肠出血性大肠杆菌的主要致病菌株，是与公共卫生有关的最重要的出血性大肠杆菌的血清类型，是一种可引起人或牲畜肠出血性腹泻等疾病的细菌性病原体。此病原细菌为革兰氏染色阴性、两端钝圆的短杆菌，最适生长温度为 37 °C，不发酵或迟缓发酵山梨醇，不能分解 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷(MUG)产生荧光。

3.1.3

实时荧光 PCR real time PCR

在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光化学物质的积累实时监测 PCR 扩增产物总量的方法。

3.1.4

Ct 值 Cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

MUG(4-Methylumbellifery- β -D-Glucuronide):4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷。

PCR(polymerase chain reaction):聚合酶链式反应。

DNA (deoxyribonucleic acid):脱氧核糖核酸。

Taq(*Thermus aquaticus*):水生栖热菌。

dNTP(deoxyribonucleoside triphosphate):脱氧核苷酸三磷酸。

4 材料和设备

- 4.1 无菌剪刀、镊子。
- 4.2 电子天平:感量 0.01 g。
- 4.3 无菌均质袋。
- 4.4 拍击式均质器:400 mL。
- 4.5 无菌规格板:20 cm²。
- 4.6 无菌干燥棉拭子。
- 4.7 微量移液器:量程 0.5 μ L~20 μ L,量程 100 μ L~1 000 μ L,量程 1 mL~10 mL。
- 4.8 恒温培养箱:36 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C。
- 4.9 接种环。
- 4.10 长波紫外光灯:365 nm,功率 \leq 6 W。
- 4.11 全自动微生物生化鉴定系统。
- 4.12 载玻片。
- 4.13 灭菌离心管:1.5 mL。
- 4.14 PCR 反应管。
- 4.15 高速冷冻离心机:2 000 r/min~13 000 r/min。
- 4.16 荧光 PCR 仪。

5 培养基和试剂

除有特殊说明,所有实验用试剂均为分析纯;分子检测实验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

- 5.1 改良胰蛋白胨大豆肉汤(mTSB):符合附录 A 中 A. 2。
- 5.2 改良山梨醇麦康凯(CT-SMAC)琼脂:符合附录 A 中 A. 3。
- 5.3 营养琼脂:符合附录 A 中 A. 4。
- 5.4 吡啶培养基:符合附录 A 中 A. 5。
- 5.5 柯凡克试剂:符合附录 A 中 A. 6。
- 5.6 MR-VP 培养基:符合附录 A 中 A. 7。
- 5.7 甲基红试剂:符合附录 A 中 A. 8。
- 5.8 V-P 甲、乙液:符合附录 A 中 A. 9。
- 5.9 西蒙氏柠檬酸盐培养基:符合附录 A 中 A. 10。
- 5.10 月桂基硫酸盐胰蛋白胨-MUG(LST-MUG):符合附录 A 中 A. 11。
- 5.11 山梨醇发酵管:符合附录 A 中 A. 12。
- 5.12 生化鉴定试剂盒。

- 5.13 肠出血性大肠杆菌 O157 和 H7 诊断血清。
- 5.14 灭菌双蒸水。
- 5.15 DNA 提取液:20 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, 1.2% Triton X-100(pH 8.0), 也可使用商业化的 DNA 提取试剂盒。
- 5.16 10×PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl(pH8.4), 200 mmol/L 氯化钾, 15 mmol/L 氯化镁。
- 5.17 dNTP 混合液(10 mmol/L):每种核苷酸浓度 10 mmol/L。
- 5.18 引物和探针:引物和探针序列符合附录 B。
- 5.19 Taq DNA 聚合酶(5U/μL)。
- 5.20 标准菌株:大肠杆菌标准菌株(CICC10389 或等效标准菌株), 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 标准菌株(CICC21530 或等效标准菌株)。

6 样品制备

6.1 样品制备方法

6.1.1 称量法

无菌方法打开送检样品,用无菌剪刀(4.1)均匀剪样,在电子天平(4.2)上准确称取剪下的样品 25 g,剪碎后加入到盛有 225 mL mTSB(5.1)的无菌均质袋(4.3)中,用拍击式均质器(4.4)拍打 1 min~2 min,充分混匀。

6.1.2 多点采样洗脱法

无菌方法打开送检样品,在样品四周和中间均匀布控 5 个采样点,用无菌规格板(4.5)比照每个采样点按 4 cm×5 cm(20 cm²)面积范围剪裁,每 20 cm² 采样面积为 1 份检样,每件样品共采集 5 份检样,采样面积为 100 cm²。将上述采集好的 5 份检样放入盛有 200 mL mTSB(5.1)的无菌均质袋(4.3)中,用拍击式均质器(4.4)拍打 1 min~2 min,充分混匀,得到一个样品洗脱液。

6.1.3 棉拭子涂抹法

无菌方法打开送检样品,用 mTSB(5.1)湿润无菌干燥棉拭子(4.6),在样品四周和中间均匀布控 5 个采样点,用无菌规格板(4.5)比照按每个采样点 20 cm² 面积范围均匀涂抹,每个采样点用 1 个无菌干燥棉拭子(4.6),在 4 cm×5 cm(20 cm²)面积范围均匀涂抹,立即用无菌剪刀(4.1)剪去棉拭子手接触部分,将涂抹部分一起放入盛有 50 mL mTSB(5.1)的无菌均质袋(4.3)中混匀。

6.2 样品制备方法选择原则

- 6.2.1 样品制备一般依 6.1.1 方法为基准方法;
- 6.2.2 当样品为面积较大或较厚实或多孔时,样品制备应采用 6.1.2 方法。采用 6.1.2 方法时如果被检样品面积过大或过小,采样点可按比例增加或减少。
- 6.2.3 当样品质地致密不容易剪碎制备;或样品较贵重,客户要求无损检测的,样品制备应采用 6.1.3 方法。
- 6.2.4 采用 6.1.1、6.1.2 方法时如果被检样品大量吸水而导致不能吸出足够样品匀液转种时,稀释液可适当增加直至足够吸出转种。

7 方法一 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 传统检验方法

7.1 原理

利用肠出血性大肠杆菌 O157:H7 不能发酵或迟缓发酵山梨醇的特性,接种含山梨醇的 CT-SMAC 琼脂平板进行初筛分离;利用肠出血性大肠杆菌 O157:H7 不能分解 4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷 (MUG)产生荧光(MUG 试验阴性)的特性,结合血清学实验,准确判定肠出血性大肠杆菌 O157:H7。

7.2 检验程序

检验程序见图 1。

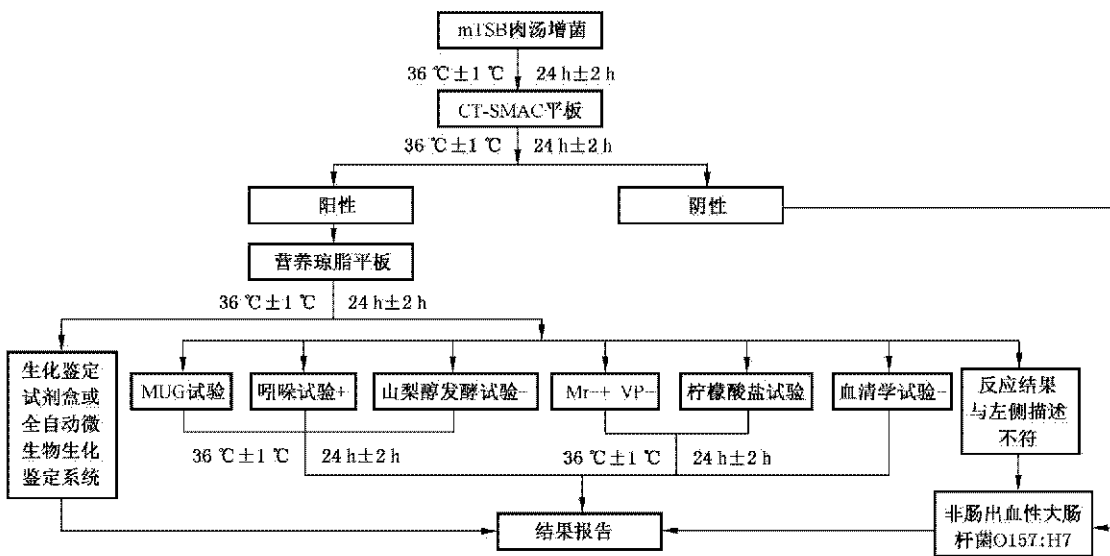


图 1 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 传统检验方法程序

7.3 操作步骤

7.3.1 增菌

将按 6.1 制备好的样品匀液放入 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱(4.8)中,增菌培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

7.3.2 分离

用无菌接种环(4.9)挑取 7.3.1 增菌液接种于两个 CT-SMAC (5.2)平板。放置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱(4.8)培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。培养结束后观察各个平板上菌落生长情况,如无可疑或典型菌落生长,可直接报告样品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 未检出;如有可疑或典型菌落长出,则挑取可疑或典型菌落纯化后进行生化试验和血清学试验确认。CT-SMAC 平板上肠出血性大肠杆菌 O157:H7 典型菌落特征淡褐色中心、扁平透明、边缘光滑。

7.3.3 纯化菌落

分别挑取 CT-SMAC 选择性平板上 5 个以上可疑或典型菌落,接种营养琼脂(5.3)平板,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 纯化,挑取纯化后的菌落同时做如下确证实验。

7.3.4 生化试验

7.3.4.1 吲哚试验

挑取 7.3.3 纯化后的单个菌落接种吲哚培养基(5.4),置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后滴加柯凡克试剂(5.5)0.1 mL,阳性反应出现红色环,阴性为黄棕色环。肠出血性大肠杆菌 O157:H7 能分解色氨酸产生吲哚,试验阳性。

7.3.4.2 MR-VP 试验

挑取 7.3.3 纯化后的菌落分别接种两管 MR-VP 培养基(5.6), $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后,一管滴加甲基红试剂(5.7)2 滴~3 滴,立即观察结果;一管按 6:2 的比例依次滴加 V-P 甲、乙液(5.8)后 30 min 内观察结果。变红色为阳性,不变色为阴性。肠出血性大肠杆菌 O157:H7 能分解葡萄糖,加入甲基红指示剂立即显红色,即 MR 试验阳性,滴加 V-P 甲、乙液后颜色不变,即 VP 试验阴性。

7.3.4.3 柠檬酸盐试验

挑取 7.3.3 纯化后的单个菌落接种西蒙氏柠檬酸盐培养基(5.9)后 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,观察其颜色变化情况。肠出血性大肠杆菌 O157:H7 不能利用柠檬酸盐为碳源,柠檬酸盐试验阴性。培养基颜色不变。

7.3.4.4 MUG 试验

挑取 7.3.3 纯化后的单个菌落接种 LST-MUG 肉汤管(5.9),同时取大肠埃希氏标准菌株(CICC10389 或等效标准菌株)(5.20)菌液接种 LST-MUG 肉汤管做阳性对照,取肠出血性大肠杆菌 O157:H7 标准菌株(CICC21530 或等效标准菌株)(5.20)菌液接种 LST-MUG 肉汤管(5.9)做阴性对照。于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。培养结束后将 LST-MUG 肉汤管置长波紫外灯(4.10)下观察,大肠埃希氏菌株 MUG 阳性,有荧光产生;肠出血性大肠杆菌 O157:H7 MUG 阴性,无荧光产生。

7.3.4.5 山梨醇发酵试验

挑取 7.3.3 纯化后的单个菌落接种山梨醇发酵管(5.11),置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后观察是否发酵。肠出血性大肠杆菌 O157:H7 不能发酵或迟缓发酵山梨醇,发酵管蓝绿色或不变色。

注:如选择商品化生化鉴定试剂盒(5.12)或全自动微生物生化鉴定系统(4.11),可选择 7.3.3 纯化后的菌落,按其对应操作说明书进行试验。

7.3.5 血清学试验

7.3.5.1 肠出血性大肠杆菌 O 抗原鉴定

取出肠出血性大肠杆菌 O157 诊断血清(5.13),恢复室温;取出干净载玻片(4.12),做好标记;用微量移液器(4.7)吸取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 肠出血性大肠杆菌 O157 诊断血清(5.18)滴加于载玻片中央;用接种环(4.9)挑取营养琼脂平板上分纯单个菌落于血清中,慢慢磨开使其混匀成乳状液,静置,1min 后观察凝集情况。将载玻片倾斜摇动混合 1 min,并对着黑暗背景进行观察,任何程度的凝集现象皆为阳性反应。

7.3.5.2 肠出血性大肠杆菌 H 抗原鉴定

用肠出血性大肠杆菌 H7 诊断血清(5.13)代替肠出血性大肠杆菌 O157 诊断血清(5.13),方法同 7.3.5.1。

7.4 结果报告

综合以上生化试验和血清学试验结果,报告样品中检出或未检出肠出血性大肠杆菌 O157:H7。

8 方法二 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 实时荧光 PCR 法

8.1 原理

根据肠出血性大肠杆菌 O157:H7 特有的 rfbE 保守序列,设计一组 PCR 特异性引物和荧光双标记探针(两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团)。PCR 扩增时,反应体系中加入 DNA 模板、引物、探针、4 种脱氧核苷酸、Taq 酶。目标菌不存在时,探针完整,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收,没有荧光信号产生;目标菌存在时,探针被 Taq 酶酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,达到荧光信号的累积与 PCR 产物的形成完全同步,从而准确判定目标菌存在与否。

8.2 检测程序

检测程序见图 2。

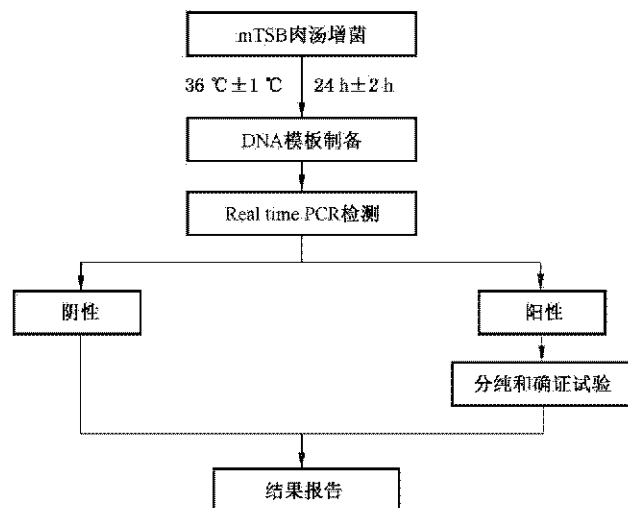


图 2 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 实时荧光 PCR 法检测程序

8.3 操作步骤

8.3.1 样品 DNA 模板的提取

样品增菌参照 7.3.1,取 1 mL 增菌液,放入 1.5 mL 灭菌离心管(4.13)内,置高速冷冻离心机(4.15)内 10 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清;加入 1mL 灭菌双蒸水(5.14)混匀,高速冷冻离心机(4.15)内 10 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清;然后加灭菌双蒸水(5.14)100 μ L 混匀,置 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,高速冷冻离心机(4.15)内 10 000 r/min 离心 2 min,取上清作为 DNA 模板,可 -20 $^{\circ}$ C 存放备用。也可使用等效的商品化 DNA 提取试剂盒(5.15)并按其说明操作。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/997125121153006054>