

ICS 07.100.30
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 4789.6—2003
代替 GB/T 4789.6—1994

GB/T 4789.6—2003

食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验

Microbiological examination of food hygiene—
Examination of diarrheogenic *Escherichia coli*

中华人民共和国
国家标准
食品卫生微生物学检验
致泻大肠埃希氏菌检验
GB/T 4789.6—2003

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.bzchs.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字

2004年8月第一版 2004年8月第一次印刷

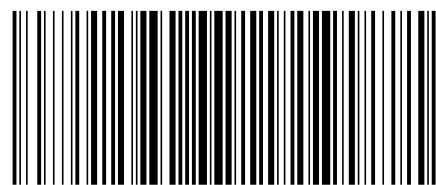
*

书号:155066·1-21340 定价 10.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 4789.6-2003

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

经薄膜滤器过滤,加热 60℃30 min,每 1 mL 滤液内加入 2%伊文思蓝溶液 0.02 mL。将此滤液用塑料小管注入 1 日~4 日龄的乳鼠胃内 0.1 mL,同时接种 3 只~4 只,禁食 3 h~4 h 后用三氯甲烷麻醉,取出全部肠管,称量肠管(包括积液)重量及剩余体重。肠管重量与剩余体重之比大于 0.09 为阳性,0.07~0.09 为可疑。

6.6 结果报告

综合以上生化试验、血清学试验、肠毒素试验作出报告。

前 言

本标准对 GB/T 4789.6—1994《食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》进行修订。

本标准与 GB/T 4789.6—1994 相比主要修改如下:

——按照 GB/T 1.1—2000 对标准文本的格式和文字进行修改。

——修改并规范原标准中的“设备和材料”。

本标准自实施之日起,GB/T 4789.6—1994 同时废止。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位:江西省卫生防疫站、中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准主要起草人:何晓青、冉陆、付萍、姚景会。

本标准于 1984 年首次发布,1994 年第一次修订,本次为第二次修订。

6 操作步骤

6.1 增菌

样品采集后应尽快检验。除了易腐食品在检验之前预冷藏外,一般不冷藏。以无菌操作取检样 25 g(mL),加在 225 mL 营养肉汤中,以均质器打碎 1 min 或用乳钵加灭菌砂磨碎。取出适量,接种乳糖胆盐培养基,以测定大肠菌群 MPN,其余的移入 500 mL 广口瓶内,于 36℃±1℃ 培养 6 h。挑取 1 环,接种于 1 管 30 mL 肠道菌增菌肉汤内,于 42℃ 培养 18 h。

6.2 分离

将乳糖发酵阳性的乳糖胆盐发酵管和增菌液分别划线接种麦康凯或伊红美蓝琼脂平板;污染严重的检样,可将检样匀液直接划线接种麦康凯或伊红美蓝平板,于 36℃±1℃ 培养 18 h~24 h,观察菌落。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。

6.3 生化试验

6.3.1 自鉴别平板上直接挑取数个菌落分别接种三糖铁琼脂(TSI)或克氏双糖铁琼脂(KI)。同时将上述培养物分别接种蛋白胨水、半固体、pH7.2 尿素琼脂、KCN 肉汤和赖氨酸脱羧酶试验培养基。以上培养物均在 36℃ 培养过夜。

6.3.2 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。

6.4 血清学试验

6.4.1 假定试验:挑取经生化试验证实为大肠埃希氏菌琼脂培养物,用致病性大肠埃希氏菌、侵袭性大肠埃希氏菌和产肠毒素大肠埃希氏菌多价 O 血清和出血性大肠埃希氏菌 O157 血清做玻片凝集试验。当与某一种多价 O 血清凝集时,再与该多价血清所包含的单价 O 血清做试验。致泻大肠埃希氏菌所包括的 O 抗原群见表 1。如与某一个单价 O 血清呈现强凝集反应,即为假定试验阳性。

表 1 致泻大肠埃希氏菌所包括的 O 抗原群

大肠埃希氏菌的种类	所包括的 O 抗原群
EPEC	O26 O55 O86 O111ab O114 O119 O125ac O127 O128ab O142 O158
EHEC	O157
EIEC	O28ac O29 O112ac O115 O124 O135 O136 O143 O144 O152 O164 O167
ETEC	O6 O11 O15 O20 O25 O27 O63 O78 O85 O114 O115 O126 O128ac O148 O149 O159 O166 O167

6.4.2 证实试验:制备 O 抗原悬液,稀释至与 Mac Farland 3 号比浊管相当的浓度。原效价为 (1:160)~(1:320)的 O 血清,用 0.5% 盐水稀释至 1:40。稀释血清与抗原悬液在 10 mm×75 mm 试管内等量混合,做单管凝集试验。混匀后放于 50℃ 水浴锅内,经 16 h 后观察结果。如出现凝集,可证实为该 O 抗原。

6.5 肠毒素试验

6.5.1 酶联免疫吸附试验检测 LT 和 ST

6.5.1.1 产毒培养:将试验菌株和阳性及阴性对照菌株分别接种于 0.6 mL LCAYE 培养基内,37℃ 振荡培养过夜。加入 20 000 IU/mL 的多粘菌素 B 0.05 mL,于 37℃ 1 h,离心 4 000 r/min 15 min,分离上清液,加入 0.1% 硫柳汞 0.05 mL,于 4℃ 保存待用。

6.5.1.2 LT 检测方法(双抗体夹心法):

a) 包被:先在产肠毒素大肠埃希氏菌 LT 和 ST 酶标诊断试剂盒中取出包被用 LT 抗体管,加入

食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验

1 范围

本标准规定了食品中致泻大肠埃希氏菌的检验方法。

本标准适用于食品和食物中毒样品中致泻大肠埃希氏菌的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.28—2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

3 设备和材料

3.1 冰箱:0℃~4℃。

3.2 恒温培养箱:36℃±1℃,42℃。

3.3 恒温水浴锅:100℃,65℃~68℃,50℃。

3.4 显微镜:10×~100×。

3.5 离心机:3 000 r/min。

3.6 酶标仪。

3.7 均质器或灭菌乳钵。

3.8 架盘药物天平:0 g~500 g,精确至 0.5 g。

3.9 细菌浓度比浊管:Mac Farland3 号。

3.10 灭菌广口瓶:500 mL。

3.11 灭菌锥形瓶:500 mL,250 mL。

3.12 灭菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、5 mL(具 0.1 mL 刻度)。

3.13 灭菌培养皿:直径 90 mm。

3.14 灭菌试管:10 mm×75 mm、16 mm×160 mm。

3.15 注射器:0.25 mL,连接内径为 1 mm 塑料小管一段。

3.16 灭菌的刀子、剪子、镊子等。

3.17 小白鼠:1 日~4 日龄。

3.18 硝酸纤维素滤膜 150 mm×50 mm,φ0.45 μm。临用时切成两张,每张 75 mm×50 mm,用铅笔划格,每格 6 mm×6 mm,每行 10 格,分 6 行。灭菌备用。