

大肠埃希氏菌 O157 和 O111 能力验证样品的研制

晚观生¹, 倪长鹏², 那 晗², 吴远高³, 郑秋月², 曹际娟^{2*}

(1. 大连工业大学, 大连 116034; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001;
3. 新疆塔城出入境检验检疫局, 塔城 834700)

摘要: **目的** 研制植物源性成分绿豆基质中 O157 和 O111 检测能力验证样品, 建立有效的样品制备流程来考核实验室检测致泻大肠埃希氏菌 O157 和 O111 的能力, 根据参加实验室检测结果是否准确及可靠来评价实验室检测水平, 并促进实验室检测体系进一步完善。**方法** 选用 O157 和 O111 的 ATCC 标准菌株制备样品, 以绿豆粉为基质, 真空冷冻干燥技术制备样品。采用显色培养基、荧光定量 PCR、全自动细菌生化鉴定仪、VIDAS 全自动免疫荧光分析仪和血清型鉴定进行定性检测, 并进行菌落计数。**结果** 随机选取每一批阳性样品中的 30 个样品, 每个样品中目标菌数在 21~60 CFU 之间, 并且 A 组与 B 组阳性样品中均检测出目标菌, 而阴性样品中均没有出现目标菌。**结论** 表明采用本方法制备的能力验证样品均一稳定, 能较好地评价实验室致泻大肠埃希氏菌 O157 和 O111 的检测能力。

关键词: 致泻大肠埃希氏菌 O157、O111; 能力验证; 样品制备

Preparation of *Escherichia coli* O157 and O111 samples for proficiency test

WAN Guan-Sheng¹, NI Chang-Peng², NA Han², WU Yuan-Gao³,
ZHENG Qiu-Yue², CAO Ji-Juan^{2*}

(1. Dalian Polytechnic University, Dalian, 116034, China; 2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian, 116001, China; 3. Xinjiang Tacheng Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tacheng, 834700, China)

ABSTRACT: Objective To develop O157 and O111 proficiency testing samples of plant-derived ingredients of mung matrix, and an effective sample preparation process was established to assess the ability of the laboratories to detect diarrheogenic *Escherichia coli* O157 and O111. According to the accuracy and reliability of test results of laboratories participate in the test to evaluate the detectable levels of laboratories, and to promote the laboratory testing system to get a further improvement. **Methods** The O157 and O111 ATCC standard strain were used for sample preparation, with mung bean powder as matrix, the samples were made by using vacuum freeze drying technology. The chromogenic medium, fluorescence quantitative PCR, full automatic bacterial biochemical identification instrument, VIDAS automatic immune fluorescence analyzer and serotype identification were used for qualitative detection, and the number of colonies were counted. **Results** Totally 30 samples were selected randomly in each batch of positive samples, the target bacteria number of each sample should be between the 21~60 CFU. Target bacteria was detected in the positive samples

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201210043)

Fund: Supported by the Public Welfare Industry Scientific Research Projects of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (201210043)

*通讯作者: 曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物安全检验检疫。E-mail: caojijuanlnciq@163.com

*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Doctor, Researcher, Technical Center of Liaoning Entry-Exit Inspection & Quarantine, No.60, Changjiang Road, Zhongshan District, Dalian 116001, China. E-mail: caojijuanlnciq@163.com.

of both group A and group B, while no target bacteria were detected in the negative samples. **Conclusion** Proficiency testing samples were uniform and stable, and the ability of laboratories to detect diarrheogenic *Escherichia coli* O157 and O111 got a better evaluation.

KEY WORDS: *Escherichia coli*O157, O111; proficiency test; sample preparation

1 引言

产志贺毒素大肠杆菌(*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC)是一类危害严重的食源性病原菌,能引起人类严重疾病,如出血性结肠炎(HC)、溶血性尿毒症(HUS)等,甚至引起死亡,已成为威胁人类健康的重要公共卫生问题^[1-2]。根据血清型的不同可将 STEC 分为 O157STEC 和非 O157STEC。除了致病型 O157 型 STEC 外,非 O157 型 STEC 中如 O26、O45、O103、O111、O121 和 O145 一些高致病力菌株对人类的健康也存在严重威胁。人类往往通过食用被污染的食物和饮水而感染此类病原^[3-4]。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌种

大肠埃希氏菌 O157(*Escherichia coli*, CICC 21530)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心;大肠埃希氏菌 O111(*Escherichia coli*, ATCC 43887)购自美国标准生物品收藏中心,干扰菌:弗氏枸橼酸杆菌(*Citrobacter freundii*, ATCC 43864)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*, CMCC(B) 49005)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*, ATCC 63301),其他菌株为本实验室分离鉴定获得的分离株。

2.1.2 试剂和培养基

试剂:绿豆粉;TSB 胰蛋白胨大豆肉汤;营养肉汤;普通营养琼脂;TSI 三糖铁琼脂;EMB 培养基;科玛嘉 O157 显色培养基;麦康凯培养基;特异诊断血清等。

2.2 仪器设备

YRH-150F 恒温培养箱(上海姚氏仪器有限公司);DYYB-18 压盖型真空冷冻干燥机(上海德洋意邦仪器有限公司);TH-86-500-LA 超低温冰箱(北京天地精仪科技有限公司);7500 荧光定量 PCR(美国 ABI 仪器公司);全自动细菌鉴定系统 PHOENIX-100 生化鉴定仪(美国 BD 仪器公司);VIDAS 全自动免疫荧光分析仪(法国生物梅里埃公司);VITEK2-30 全自动微生物

鉴定仪(法国生物梅里埃公司);3M Petrifilm 菌落总数纸片(美国 3M 公司)等。

2.3 实验方法

2.3.1 标准菌株的复苏与鉴定

2.3.1.1 标准菌株的复苏

利用 TSB 胰蛋白胨大豆肉汤复苏标准菌株 O157 和 O111 冻干粉,接种于营养肉汤内,(36 ± 1) °C 下过夜培养。

2.3.1.2 标准菌的鉴定

将过夜培养营养肉汤中的菌液分别接种于 EMB、麦康凯、科玛嘉 O157 显色培养基 37 °C 下过夜培养,后取可疑菌落接种于 TSI 三糖铁琼脂,37 °C 过夜培养^[5-6]。取特征性菌落接种于营养琼脂斜面,进行血清以及 VIDAS 全自动免疫荧光分析仪鉴定,取营养琼脂斜面的细菌进行 PHOENIX-100 生化仪进行生化鉴定同时利用特异性引物、探针(Stx1、Stx2b、rfbE O157、wbI O111)进行荧光定量 PCR^[7-9]。

2.3.2 能力验证样品制备

本次实验以绿豆粉为能力样品的基质。具体配制过程:用适量去离子水进行溶解,用去离子水定容至所需的量。将标准菌液进行梯度稀释,通过菌落计数选用适合的菌液浓度。将调整好浓度的细菌/基质混合液分装至安瓶,每瓶 1 mL;安瓶放于零下 80 °C 超低温冰箱预冻干 12 h 左右;在干燥设备中真空冷冻干燥,9 h 后抽真空封管、压盖、贴签,并于 4 °C 冰箱贮存^[10]。

2.3.3 能力验证样品的分析

2.3.3.1 均匀性检验

样品均匀性检验方法:针对定性项目样品,分别随机选取每一批样品中的至少 30 个样品(取样量占该批样品数 10%),在重复条件下,即在同一实验室中由相同的人员采用相同的测试方法和仪器进行测试,结果与指定值相比较^[11-12]。

2.3.3.2 稳定性检验

模拟样品保存条件和运输状况,设计了两种类型的稳定性试验:一种是在贮存温度(4 °C)下的稳定性试验,随机取每组阳性和阴性样品各 10 份,每 6 d

检测 1 份, 共计 60 d; 另一种是在模拟样品运输条件下的稳定性试验, 每组阳性和阴性样品中, 分别选取三组样品, 一组 12 个样品先后放置在 25 °C, 6 d; 4 °C, 6 d。一组 12 个样品先后放置在 37 °C, 6 d; 4 °C, 6 d。一组 12 个样品先后放置在 45 °C, 6 d; 4 °C, 6 d。从稳定性检测开始计算, 分别在第 3, 6, 9 和 12 d, 每天选取 3 个样品检测^[13-15]。

3 结果

3.1 标准菌株鉴定结果

EMB 培养基上菌落具有金属光泽; 麦康凯培养基上特征为圆形、光滑、较小无色菌落; 科玛嘉 O157 显色培养基特征为圆形、较小、中心淡紫色的菌落; TSI 三糖铁琼脂的斜面和底层出现黄色、有气泡、不产硫化氢的现象; 荧光定量 PCR 均出现扩增曲线; 血清发生凝集现象; VIDAS 结果为阳性; PHOENIX-100 鉴定结果为大肠埃希氏菌。

3.2 样品均匀性测试结果

本文能力验证样品制备过程中, 采用在基体中添加目标菌和干扰菌形成大样, 然后充分混匀并分装成测试样品的方法制备 500 份阳性样品。根据以往的研究结果, 在充分混匀的大样中目标菌服从泊松分布, 大样中目标菌添加量为 2.0×10^4 CFU, 平均每份样品中含有 40 CFU 目标菌。按照泊松分布计算, 每个样品中含有 21~60 CFU 目标菌的概率为 99.81%。即在 500 瓶样品中只有少于 1 瓶样品会出现含有 21 CFU 以下或 60 CFU 以上目标菌的情况。每瓶样品中的目标菌量被控制在 21~60 CFU 之间, 样品的均匀性得以保证。

3.3 样品稳定性测试结果

在所有 A 组阴性样品中没有检测到大肠杆菌 O111; 在 A 组的阳性样品中全部检出大肠杆菌 O111。在所有 B 组阴性样品中没有检测到大肠杆菌 O157; 在 B 组的阳性样品中全部检出大肠杆菌 O157。结果见表 1, 结果表明, 本文所制备的能力验证样品是足够稳定的。

表 1 稳定性试验结果
Table 1 Stability experiment results

检测项目	样品	温度/天数	试验结果	试验方法
大肠杆菌 O111	阳性样品	4 °C/60 d	检出	GB/T4789.6-2003; ISO/TS 13136-2012
		25 °C/6 d	检出	
		4 °C/6 d	检出	
		37 °C/6 d	检出	
		4 °C/6 d	检出	
	阴性样品	45 °C/6 d	检出	
		4 °C/6 d	未检出	
		25 °C/6 d	未检出	
		4 °C/6 d	未检出	
		37 °C/6 d	未检出	
大肠杆菌 O157	阳性样品	4 °C/60 d	检出	GB/T4789.6-2003; GB/T 4789.36-2008 ISO/TS 13136-2012
		25 °C/6 d	检出	
		4 °C/6 d	检出	
		37 °C/6 d	检出	
		4 °C/6 d	检出	
	阴性样品	45 °C/6 d	检出	
		4 °C/6 d	未检出	
		25 °C/6 d	未检出	
		4 °C/6 d	未检出	
		37 °C/6 d	未检出	
		45 °C/6 d	未检出	
		4 °C/6 d	未检出	

4 讨论

食品安全检测实验室在监测食品安全方面起着重要作用,能力验证是中国实验室国家认可委员会评价实验室技术能力的重要依据之一,是判断和监控实验室能力的有效手段。2011年德国绿豆及豆芽污染大肠杆菌疫情造成了严重的人体健康以及经济损失,已成为全世界关注的重大公共卫生医疗问题。组织实验室间检测微生物方面的能力验证计划,随机抽取次级样品,同时分发给参加检测的实验室共同进行检测。完成检测后,将结果返回协调机构与指定值比对,以表明各个实验室和整体组的性能;必须保证样品有良好的均匀性和稳定性^[16-17]。以往食品微生物能力验证采用基质多为肉制品或乳制品,很少有采用植物源性产品作为基质。本次能力验证的样品制备,以绿豆粉为基质,进行肠出血性大肠杆菌 O157、肠致病性大肠杆菌的定性检测。此次能力验证所选用被测物品或材料在性质上与参加者的日常检测物品或材料更为类似,保证活动结果能更好体现各实验室真实检测水平。是实验室对绿豆中肠出血性大肠杆菌 O157、肠致病性大肠杆菌检测能力的一种客观反映。

本文在制备能力验证样品时,首先考虑菌种来源的均匀性和稳定性,选择了标准菌株作为样品来源。应用全自动微生物检测鉴定系统,一般样品中含有 300 CFU/mL 的细菌即可检出,能力验证样品中高浓度的细菌含量显然不能达到考核实验室检测能力的目的。为了考核参试实验室检测致病菌的能力,本文对标准菌株培养液进行了不同浓度的稀释和检测,拟在良好的检出率和最佳的菌液浓度间寻找一个平衡点。最终确定发放的样品中含有的细菌浓度,要求在稀释度确认试验中能 100% 检测出,但又是相对较低的浓度。由于对其他实验室发放样品,考虑路途环境的变化及时间的问题,对能力验证样品的发放形式进行了探讨,最终确定发放冻干样品,稳定性好,不易受运输环境的影响。冻干条件的选择,经过多次尝试最终选择零下 80 °C 预冻干 12 h 左右,在干燥设备中真空冷冻干燥,9 h 后抽真空封管,更有利于样品保存。

参考文献

- [1] 宋定州,于学辉,汤承,等. 牦牛产志贺毒素大肠杆菌主要粘附因子相关基因分子流行病学调查[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(1): 153-157.
- [2] 周勇,陈守义. 产志贺毒素大肠杆菌流行病学和 *stx* 基因研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(12): 1130-1133.
- [3] 白向宁,赵爱兰,夏胜利. 非 O157 产志贺毒素大肠杆菌分离株的多位点序列分型研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, (06): 544-548.
- [4] Hedican EB, Medus C, Besser JM, et al. Characteristics of O157 versus non-O157 *Shiga* toxin-producing *Escherichia coli* infections in Minnesota, 2000-2006 [J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(3): 358-364.
- [5] 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 食品卫生微生物学检验. 致泻大肠埃希氏菌检验[S]. GB/T4789.6-2003. Microbiological examination of food hygiene. Diarrhea caused by *Escherichia coli* Microbiological examination of food hygiene inspection. Diarrhea caused by *Escherichia coli* testing[S].
- [6] GB/T 4789.36-2008. 食品卫生微生物学检验. 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验[S]. GB/T 4789.36-2008. Microbiological examination of food hygiene. *Escherichia coli* O157: H7/NM test[S].
- [7] CEN ISO/TS 13136-2012. 食品和动物食品微生物学检测食源性病原菌. 产志贺毒素大肠杆菌(STEC)O157、O111、O26、O103和 O145 血清型实时聚合酶链反应(PCR)方法[S]. CEN ISO/TS 13136-2012. Food and animal food microbiology detection of foodborne pathogens. *Shiga* toxin-producing *E. coli* (STEC)O157, O111, O26, O103 and O145 serotype Real-time polymerase chain reaction (PCR) method [S].
- [8] 李晓虹,许学斌,蒋琴娣,等. 产志贺毒素大肠杆菌的分子生物学检测方法研究[J]. 检验检疫科学, 2006, 16(1): 61-63.
- [9] Li XH, Xu XB, Jiang QD, et al. Study on biomolecular testing method for STEC [J]. Inspect Quar Sci, 2006, 16(1): 61-63.
- [10] Beutin L, Jahn S, Fach P. Evaluation of the 'Gene Disc' real-time PCR system for detection of enter hemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes[J]. J Appl Microbiol 2009, 106: 1122-1132.
- [11] 周向阳,王淑娜,沈颀,等. 微生物能力验证样品制备工艺及水产品企业水平测试结果评价[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版, 2011, 30(4): 322-325.

Zhou XY, Wang SN, Shen B, *et al.* Preparation technology of microbiological proficiency testing samples and evaluation of the level test results of aquatic enterprises [J]. *J Zhejiang Ocean Univ (Nat Sci Edit)*, 2011, 30(4): 322-325.

[11] CNAS-GL03:2006. 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S]. CNAS-GL03:2006. Proficiency testing sample homogeneity and stability assessment guidelines [S].

[12] 卢行安, 郑江, 曹志军, 等. 微生物能力验证样品均匀性试验的研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2003, 15(1): 33-34.
Lu XA, Zheng J, Cao ZJ, *et al.* The study of homogeneity of microbiological proficiency testing matrix [J]. *Chin J Microecol*, 2003, 15(1): 33-34.

[13] 芦云, 薛晓晶, 王芳, 等. 多靶标微生物能力验证样品的均匀性研究[J]. *检验检疫学刊*, 2013,(4): 46-49.
Lu Y, Xue XJ, Wang F, *et al.* Homogeneity of proficiency testing samples of multi-target microbiology [J]. *J Inspect Quar*, 2013, (4): 46-49.

[14] 甄珍. 微生物能力验证实验结果分析[J]. *黑龙江农业科学*, 2011, (6): 86-89.
Zhen Z. Microbe ability test results and analysis [J]. *HeiLongjiang Agric Sci*, 2011,(6): 86-89.

[15] 金献忠, 郑曙昭, 丘寅. 能力验证样品均匀性和稳定性检验的统计方法[J]. *现代测量与实验室管理*, 2003, 4: 35-36.
Jin XZ, Zhneg SZ, Qiu Y. Statistical methods of homogeneity

and stability testing for samples of proficiency testing [J]. *Adv Meas Lab Manage*, 2003, 4: 35-36.

[16] GB 15483.1-1999. 利用实验室间比对的能力验证第一部分:能力验证计划的建立和运作[S].
GB 15483.1-1999. The use of inter-laboratory ability validation of the first part: the establishment and operation of proficiency testing schemes [S].

[17] ISO/IEC 17043:2000 Conformity assessment-General requirements for proficiency testing [S].

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



晚观生, 硕士研究生, 主要研究方向-生物安全检验检疫。
E-mail: wanguansheng@126.com.



曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向生物安全检验检疫。
E-mail: caojijuanlnciq@163.com.



补充说明

本刊 2014 年第 12 期 (2014, 5(12): 3823-3827)王英超等作者“NASBA 技术在其检验检疫中的应用”一文中的脚注基金项目信息修改为“基金项目: 山东省科技专项(2011SDH204)、国家质检总局科研专项(2012IK281、2013IK293、2013IK173、2009IK254)

Fund: Supported by Scientific Research Projects of Shandong Province (2011SDH204) and the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People’s Republic of China (2012IK281, 2013IK293, 2013IK173, 2009IK254)”

《食品安全质量检测学报》编辑部