

# 3 种方法检测食品中致泻大肠埃希氏菌检测能力 验证结果分析

刘 莉, 魏海燕, 王紫薇, 魏咏新, 马 丹, 曾 静\*

(北京海关技术中心, 北京 100026)

**摘 要:** **目的** 提高食品中致泻大肠埃希氏菌的检测能力, 促进实验室检测能力的提高。**方法** 参照 GB 4789.6-2016《食品微生物学 致泻大肠埃希氏菌检验》方法进行检测, 采用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定系统进行生化鉴定、血清学鉴定, 对可疑菌落进行普通 PCR 确证试验。同时使用多重实时荧光 PCR 法以及基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)分析鉴定可疑菌落。**结果** 国标法和多重实时荧光 PCR 法能准确鉴定出目标菌, MALDI-TOF-MS 可以检测大肠埃希氏菌, 但无法区分致泻大肠埃希氏菌和肠出血性大肠埃希氏菌。**结论** 3 种方法各有优劣, 同时使用, 综合判断, 能确保试验结果准确快速。

**关键词:** GB 4789.6-2016; 多重实时荧光 PCR; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法; 致泻大肠埃希氏菌; 能力验证

## Capability verification results and analysis of 3 methods for detecting diarrheogenic *Escherichia coli* in food

LIU Li, WEI Hai-Yan, WANG Zi-Wei, WEI Yong-Xin, MA Dan, ZENG Jing\*

(Technical Center of Beijing Customs District People's Republic of China, Beijing 100026, China)

**ABSTRACT: Objective** To improve the ability for the detection of diarrheogenic *Escherichia coli* in food, and promote the improvement of laboratory testing capabilities. **Methods** According to GB 4789.6-2016 *Food microbiology-Detection of diarrheal Escherichia coli* for detection, biochemical identification and serological identification were carried out by VITEK 2 Compact automatic bacterial identification system, and common PCR confirmation test was carried out on suspicious colonies. At the same time, multiple real-time fluorescence PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) were used to analyze and identify suspicious colonies. **Results** The target bacteria could be accurately identified by national standard method and multi-real-time fluorescence PCR method. *Escherichia coli* could be detected by MALDI-TOF-MS, however, diarrheogenic *Escherichia coli* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* couldn't be distinguished. **Conclusion** The combination and synthetic judgment of the 3 methods can ensure the accuracy of the testing result while each has advantages and disadvantages.

基金项目: “法规差异性生物及物理有害物精准侦查技术研究 (2017YFC1601602)

**Fund:** Supported by Research on Accurate Detection Technology of Biological and Physical Pests with Different Laws and Regulations (2017YFC1601602)

\*通讯作者: 曾静, 教授, 主要研究方向为微生物学。E-mail: zengj@bjciq.gov.cn

\*Corresponding author: ZENG Jing, Professor, Technical Center of Beijing Customs District People's Republic of China, NO.6, Tianshuiyuan Road, Beijing 100026, China. E-mail: zengj@bjciq.gov.cn

**KEY WORDS:** GB 4789.6-2016; multiplex real-time PCR; matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; diarrheagenic *Escherichia coli*; proficiency testing

## 1 引言

实验室能力验证是指利用实验室间比对, 按照预先指定的准则评价参加者的能力。中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)将能力验证作为评价实验室技术能力的重要手段之一, 与现场评审构成互为补充的 2 种能力评价技术<sup>[1]</sup>。能力验证作为重要的外部质量评价活动, 寻求并参加能力验证是每个合格评定机构的责任和义务。实验室将能力验证用作有效的外部质量保证活动, 并将其作为内部质量控制程序的补充, 持续监控实验室检测能力<sup>[2]</sup>。

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)为人和动物肠道中正常的栖息菌<sup>[3]</sup>。在相当长的一段时间内, 人们才认识到一些特殊血清型的大肠杆菌对人和动物具有病原性。通常将能引起腹泻症状的特殊血清型大肠埃希氏菌称为致泻大肠埃希氏菌(diarrheagenic *E.coli*, DEC)。根据其流行病学特征、发病机制及临床特征等, 可将致泻大肠埃希氏菌分为肠致病大肠埃希氏菌(enteropathogenic *E.coli*, EPEC)、肠出血性大肠埃希氏菌(enterohemorrhagic *E.coli*, EHEC)、肠产毒大肠埃希氏菌(enterotoxigenic *E.coli*, ETEC)、肠侵袭大肠埃希氏菌(enteroinvasive *E.coli*, EIEC)、肠道集聚性大肠埃希氏菌(enteroaggregative *E.coli*, EAEC)、产志贺毒素大肠埃希氏菌(Shiga toxin-producing *E.coli*, STEC)<sup>[4]</sup>。致泻大肠埃希氏菌生存于人和动物的肠道中, 人群普遍易感, 会引起急性胃炎、急性菌痢、出血性肠炎等多种疾病, 传播方式多种多样, 包括饮用水、食物、日常生活用品、蚊蝇昆虫等<sup>[5]</sup>。由 DEC 导致的食源性疾病屡见不鲜, 2016 年江苏省食源性疾病 3566 例患儿中, 共检出致泻大肠埃希氏菌 104 株, 总检出率为 2.9%。5 种毒力基因型致泻大肠埃希氏菌中, 肠聚集性大肠埃希氏菌、肠致病性大肠埃希氏菌是主要的毒力基因型, 分别占 61.5%、26.9%<sup>[6]</sup>。2011 年德国 16 个联邦州均爆发了 EHEC 的疫情, 全国有 3816 名 EHEC 的感染者, 有 48 名病人发展为溶血性尿毒症综合征(hemolytic uremic syndrome, HUS), 最终造成 54 人死亡<sup>[7]</sup>。

随着国家标准 GB 29921-2013《食品安全国家标准 食品中致病菌限量标准》<sup>[8]</sup>的发布与实施, 大肠埃希氏菌 O157:H7 要求 5 份平行样品中不得检出, 食品中致泻大肠埃希氏菌的检测技术成为 DEC 引起的食源性疾病预防与控制的关键。目前, 致泻大肠埃希氏菌的检测主要采用传统培养生化鉴定后使用普通 PCR 进行确证实验的鉴定方法, 该方法检验周期长, 实验操作较为繁琐, 且对实验员

进行普通 PCR 实验的经验要求较高, 不适合快速检验。随着分子生物学的发展, 荧光定量 PCR 技术以其灵敏度高、特异性强、检测周期短等优点被广泛应用于微生物检测中。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)是近年来发展起来的一种全新的微生物检测技术。其具体原理是细菌样品与基质溶液形成的共晶体在激光照射下发生电荷转移, 使得样品分子电离, 同质荷比( $m/z$ )的离子在电场作用下加速飞过飞行管道, 根据到达飞行时间检测器时所用时间的不同而被分离和检测, 测得的蛋白质及多肽质量指纹图谱与标准数据库比对, 得到鉴定结果, 具有操作简便快捷、高通量、快速等优点, 被广泛的应用于微生物检测中。本研究在参加由中国检验检疫科学研究院测试评价中心组织的《食品中致病菌的检测能力验证》中采用 GB 4789.6-2016《食品微生物学 致泻大肠埃希氏菌检验》<sup>[9]</sup>方法、实时荧光 PCR 法、MALDI-TOF MS 法 3 种方法对测试样品进行检测, 并对结果进行比较分析, 旨在为实验室致泻大肠埃希氏菌的日常检测提供快速、便捷、高效、可靠的检验方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

食品中致病菌的检测能力验证样品 2 个, 标记为 CNCA-19-H492 和 CNCA-19-L677。

产志贺毒素大肠埃希氏菌(STEC CICC24187)、产志贺毒素大肠埃希氏菌(STEC CICC10668)、肠道出血性大肠埃希氏菌(EHEC CICC25130)、肠出血性大肠埃希氏菌(ATCC43888)、大肠埃希氏菌 ATCC25922[中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Center of Industrial Culture Collection, CICC)]。

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、营养肉汤、肠道菌增菌肉汤、麦康凯琼脂(mac conkey agar, MAC)、伊红美蓝琼脂(eosin methylene blue agar, EMB)、Swarm 琼脂(北京陆桥检测技术有限公司); VITEK 2 鉴定卡(法国梅里埃公司)、大肠埃希氏菌诊断血清(宁波天润有限公司)、5 种致泻大肠埃希氏菌荧光 PCR 检测试剂盒(北京良润生物公司); 甲酸(formic acid, FA)、乙腈(acetonitrile, ACN)、无水乙醇(分析纯, 德国 Fisher 公司); 三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)(德国默克公司); 校准蛋白干粉(protein calibration standard)、基质  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸( $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, HCCA)(德国 Bruker 公司)。

## 2.2 仪器与设备

Friocell 222L 恒温培养箱(俄罗斯 MMM 公司); VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定分析系统(法国生物梅里埃公司); Veriti 热循环 PCR 仪(美国 AB 公司); Chemi Doc MP 凝胶成像系统(美国伯乐公司); Light Cycler 480 II 荧光 PCR 仪(罗氏诊断公司); MALDI biotypersystem 基质解吸飞行时间质谱(德国布鲁克公司)。

## 2.3 实验方法

《参试指导书》要求参加测试的实验室人员在接受样品后需确认样品是否完好,未检测前需放置在 2~8 °C 冷藏,并且要求使用日常检测方法进行检测。本次能力验证采用 GB 4789.6-2016《食品微生物学 致泻大肠埃希氏菌检验》<sup>[9]</sup> 方法进行检验,使用普通 PCR 法对可疑菌落进行确证实验,同时使用荧光 PCR 试剂盒以及 MALDI-TOF MS 对可疑菌落进行检验。

### 2.3.1 样品前处理

按照无菌操作方法在生物安全柜内开启样品瓶,样品是由脱脂奶粉作为基质,人工污染的食品样品,呈白色冻干块状,采用 10 mL 真空西林瓶包装。每个样品各取 10 mL BPW 对样品进行复苏并充分混匀,然后放至室温(30 min ± 2 min)。此样本作为一个整体,相当于 25 g 检样量。

### 2.3.2 前增菌

将 2.3.1 制备的样品加入装有 225 mL 营养肉汤的锥形瓶中(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠),振荡混匀,置于(36 ± 1) °C 培养 6 h。取 10 μL,接种于 30 mL 肠道菌增菌肉汤管内,于(42 ± 1) °C 培养 18 h。

### 2.3.3 分离

用接种环沾取增菌液,分别划线于 EMB 和 MAC 琼脂(36 ± 1) °C 培养 24 h,观察平板上的菌落形态,选取菌落形态符合要求的进行生化鉴定。

### 2.3.4 生化鉴定

选取分离平板上的可疑菌落于营养琼脂上纯化,然后进行 VITEK 2 compact 生化鉴定。

### 2.3.5 血清学鉴定

将生化鉴定结果符合大肠埃希氏菌 O157 的菌落进行

O157 和 H7 抗原鉴定。如遇 H7 因子血清不凝集者,需接种到 swarm 琼脂上多次传代进行 H 抗原鉴定。

### 2.3.6 普通 PCR 确证实验

将样品 CNCA-19-H492 与 CNCA-19-L677 接种于营养琼脂上,挑取经 VITEK 2 compact 鉴定为大肠埃希氏菌的可疑菌落作为研究对象,检测过程中按标准 GB 4789.6-2016<sup>[9]</sup> 中普通 PCR 确证实验的部分进行试验,使用 2.1 的菌株作为阳性对照和阴性对照,同时以灭菌去离子水作为空白对照。

### 2.3.7 实时荧光 PCR 试剂盒法

按照荧光 PCR 试剂盒的公司提供的《致泻大肠埃希氏菌(DEC)核酸检测试剂盒操作 SOP》取营养琼脂上纯化的单菌落作为模板进行 DNA 制备,然后按照仪器使用规程及试剂盒说明书进行上机操作和判读结果。阳性、阴性和空白对照设置参照 2.3.6。

### 2.3.8 MALDI-TOF MS 法

将 2.3.4 分离的纯培养可疑菌落使用 MALDI-TOF MS 进行鉴定,样品制备选择甲酸提取法。挑取适量(约 5~10 mg)菌落样品于 1.5 mL 离心管中,加入 300 μL 纯水,混匀,再加入 900 μL 无水乙醇,混匀;12 000 r/min 离心 2 min,弃去上清液;加入 50 μL 70% 甲酸,仔细混匀,再加入 50 μL 乙腈,仔细混匀,12000 r/min 离心 2 min,吸取 1 μL 上清液点在靶板上,同时点 1 μL 标准品溶液(校准),自然晾干后再点 1 μL 基质覆盖,晾干后进行质谱分析。

用 Biotyper 数据库获得鉴定分值,鉴定结果以对数值 0~3 作为评判分数,分值在 2.000~3.000 之间,表示可确认菌种鉴定结果;分值在 1.700~1.999 之间,表示可能的菌属鉴定或该菌种鉴定为不确定结果;分值在 0.000~1.699 之间,表示不可信的鉴定结果。

## 3 结果与分析

### 3.1 分离平板与生化鉴定结果

根据平板划线分离的结果和生化鉴定结果, CNCA-19-H492 检出大肠埃希氏菌, CNCA-19-L677 检出大肠埃希氏菌 O157, 具体详见表 1。

表 1 样品的菌落特征和生化鉴定结果

Table 1 Colony characteristics and biochemical identification results of the samples

样品编号	EMB 培养基	MAC 培养基	纯培养形态	VITEK 生化鉴定结果	生化结果可信度
CNCA-19-H492	菌落中心紫黑色带金属光泽	菌落为紫红色到砖红色	黄色菌落,产黄色素	<i>Escherichia coli</i>	99%
CNCA-19-L677	菌落中心紫黑色带金属光泽	菌落为桃红色到砖红色	黄色菌落,产黄色素	<i>Escherichia coli</i> O157	97%
空白对照	不生长	不生长	不生长	/	/

注:“/”表示未进行试验或结果报告。

### 3.2 血清学实验结果

将样品 CNCA-19-L677 生化结果符合大肠埃希氏菌 O157 的可疑菌株纯化后进行血清学实验。结果显示, O157 和 H7 结果均凝集, 样品 CNCA-19-H492 血清型实验结果未见凝集, 生理盐水对照未见凝集。

### 3.3 PCR 确证实验

PCR 确证实验结果显示检出 CNCA-19-H492 为大肠埃希氏菌, CNCA-19-L677 为肠道出血性大肠埃希氏菌。PCR 确证实验结果见表 2。

### 3.4 荧光 PCR 结果

荧光 PCR 试剂盒法的结果显示 H492 为大肠埃希氏菌, L677 为 STEC/EHEC, 详见表 3。

### 3.5 MALDI-TOF MS 法结果

CNCA-19-H492 与 CNCA-19-L677 经 MALDI-TOF

MS 鉴定结果显示均为 *E.coli*, Biotyper 数据库获得鉴定分值分别为 2.314 和 2.479, 表示菌株鉴定结果准确可信。

## 4 结论与讨论

### 4.1 正确按照《参试指导书》进行操作

根据《参试指导书》的要求, 该能力验证的样品为常温运输, 收到样品后应立即开始检验, 如不能立即检测, 需放置于 2~8 °C 冷藏保存, 本实验室收到样品后第一时间进行检验, 为了避免菌体在运输过程中发生死亡对结果造成影响, 对样品进行了复苏并将样品的温度静止至室温, 样品未至室温可能因温度迅速上升导致细胞破裂降低目标菌的检出率。冻干的状态下细菌需要恢复活力<sup>[10]</sup>, 菌体恢复活力后应尽快开始检测, 避免在放置过程中由于贮存不当造成菌体大量死亡, 从而影响最终检验结果<sup>[11,12]</sup>。

表 2 样品分离菌株 PCR 结果  
Table 2 PCR detection results of the samples

菌株编号	PCR 实验结果			
	<i>uidA</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
CNCA-19-H492	+	—	—	—
CNCA-19-L677	+	+	+	+
ATCC43888	+	+	—	—
CICC24187	+	+	+	+
CICC10668	+	—	+	+
CICC21530	+	+	+	+
NC	—	—	—	—

注: “+”“—”分别表示 PCR 结果为阳性和阴性。

表 3 样品分离菌株荧光 PCR 结果  
Table 3 Real-time PCR detection results of the samples

菌株编号	<i>aggR</i>	<i>eae</i>	<i>escV</i>	<i>stx1</i>	<i>bfpB</i>	<i>stx2</i>	判定
CNCA-19-H492	-	+	-	-	-	-	大肠埃希氏菌
CNCA-19-L677	-	+	-	+	-	+	STEC/EHEC/ <i>stx1</i> (+)/ <i>stx2</i> (+)
ATCC43888	-	+	-	-	-	-	大肠埃希氏菌
CICC24187	-	+	-	+	-	+	STEC/EHEC/ <i>stx1</i> (+)/ <i>stx2</i> (+)
CICC10668	-	+	-	+	-	-	STEC/EHEC/ <i>stx1</i> (+)
CICC21530	-	+	-	+	-	+	STEC/EHEC/ <i>stx1</i> (+)/ <i>stx2</i> (+)
NC	-	-	-	-	-	-	/

注: “/”表示未进行试验或结果报告。

#### 4.2 使用多种分离鉴定培养基排除背景菌干扰

能力验证通常会添加与目标菌的生化反应较为相似的背景菌对目标菌的检测进行干扰<sup>[13]</sup>, 本次能力验证两个样品均添加了肺炎克雷伯菌<sup>[14]</sup>, 由于大肠埃希氏菌与肺炎克雷伯菌在 EMB 和 MAC 上菌落形态不尽相同, 实验员应熟练掌握目标菌在选择性平板上的特征性菌落<sup>[15]</sup>, 纯化分离目标菌与干扰菌, 以便进行生化鉴定与 PCR 确证实验, 仅凭经验可能会发生漏检或错检。

#### 4.3 使用多种方法进行验证以保证结果的准确性

本次能力验证通过 VITEK 2 compact 生化检测和血清学实验, 普通 PCR 方法对可疑菌落进行确证实验, 同时使用多重荧光 PCR 方法以及 MALDI-TOF MS 法对可疑菌落进行检测, 各种方法相互验证使得结果准确可靠。

目前从分子水平进行细菌的鉴定鉴别是食源性细菌鉴定分型的趋势<sup>[16]</sup>, 致泻大肠埃希氏菌的传统检测方法如分离培养、生化鉴定、血清学鉴定等耗时耗力, 并且不能有效的区分致泻大肠埃希氏菌和非致泻大肠埃希氏菌。因此很有必要进行致泻大肠埃希氏菌的毒力基因检测, 以避免漏检和提高检出率。尤其是根据 GB 4789.6-2016 的相关要求, 大肠埃希氏菌的鉴定必须使用普通 PCR 方法进行确证, 这要求实验人员有丰富的经验, 同时掌握传统生化检测和分子生物学检测两方面的技能。本次实验中 CNCA-19-H492 和 CNCA-19-L677 的普通 PCR 的 *uidA* 基因阳性显示这两株菌均为大肠埃希氏菌, 结果与 VITEK 生化结果保持一致; 而 CNCA-19-L677 通过毒力基因判定为 STEC/EHEC, CNCA-19-H492 为大肠埃希氏菌, 这和血清型鉴定结果一致, 国标法的 3 个检测方向互相验证, 结果一致, 证明检测结果准确可靠。

在实际的检测工作中, 由于普通 PCR 实验操作步骤繁琐, 方法灵敏度较低, 结果会受到实验员操作的影响等多重因素导致普通 PCR 方法应用受限, 尤其对于尚未建立分子生物学实验室的基层实验室来说难度较大。多重实时荧光 PCR 可用于 5 种致泻大肠埃希氏菌检测和致病型别的判定, 该方法具有操作简单, 灵敏度高, 省时省力的优点。本次实验中多重荧光 PCR 试剂盒法是通过检测 14 个毒力基因的检测, 显示 CNCA-19-H492 为大肠埃希氏菌、CNCA-19-L677 为 STEC/EHEC, 与国标法一致, 证明可以在实际工作中使用实时荧光 PCR 法对致泻大肠埃希氏菌进行检测。

MALDI-TOF MS 无法区分大肠埃希氏菌和致泻大肠埃希氏菌<sup>[17]</sup>, 赵红阳<sup>[18]</sup>也认为在使用 MALDI-TOF-MS 鉴定细菌时, 会受到很多因素的影响, 如样品制备方式、培养基的种类和样品纯度等影响标记靶分子的出现而导致质谱分析偏差的情况。分析本次实验结果, MALDI-TOF MS 检测对象是蛋白质及多肽质量指纹图谱, 将荷质比与标准

数据库比对, 得到鉴定结果, 由于致泻大肠埃希氏菌和大肠埃希氏菌的指纹图谱高度相似导致无法区别这两种细菌, 可以将 MALDI-TOF MS 作为辅助的快检手段。

#### 4.4 PCR 确证实验需要注意不同 PCR 实验的灵敏度和检出限

多重荧光 PCR 法具有操作简单, 灵敏度高, 特异性好, 检测快速等优点, 近年来广泛应用于食源性致病菌的检测<sup>[19,20]</sup>。但多重荧光 PCR 法有一定的灵敏度和检出限, 胡安妥等<sup>[21]</sup>建立 5 类致泻大肠埃希氏菌多重荧光 PCR 灵敏度 $(2.2\sim 2.6)\times 10^4$  copies/反应, 张红宇等<sup>[22]</sup>建立 3 重致泻大肠埃希氏菌实时荧光 PCR 的检出范围在  $1.41 \times 10^2\sim 2.81 \times 10^8$  CFU/mL, 菌含量越高荧光信号越强, *Ct* 值也更靠前。分析本次实验结果, 致泻大肠埃希氏菌的 DNA 含量低于  $10^6$  CFU/mL 时会出现假阴性的结果, 因此使用多重荧光 PCR 试剂盒法时应注意菌体 DNA 含量, 在较低的 DNA 含量时, 荧光 PCR 无法检出阳性结果, 应在进行能力验证以前对试剂盒进行实验室内部验证, 优化实验流程, 减少因菌体 DNA 含量过低导致的假阴性同时也避免 DNA 含量过高对反应体系产生的抑制效应<sup>[23]</sup>。

本次能力验证采用了两种鉴定方法与国标法进行比对, 国标法规定可以使用 VITEK 2 Compact 作为传统生化鉴定方法的替代, 优点是快速准确, 也减少了人为因素的干扰<sup>[24]</sup>; 普通 PCR 法是国标规定的方法, 优点是结果准确, 但也存在着操作复杂, 对实验员要求较高, 在实验过程中可能出现假阴性的结果; 荧光 PCR 方法优点是操作简便, 检测周期短, 特异性和准确度高, 但是可能会出现假阴性的结果; MALDI-TOF-MS 具有操作简单、所需试剂较少, 高通量, 检测时间短等优点, 大大减少了检验工作量, 但是仪器昂贵, 维护成本较高, 数据库范围有限等使得其短时间无法普及<sup>[25]</sup>。

综上所述, 此次食品中致泻大肠埃希氏菌的能力验证主要考察了实验室是否能有效区分致泻大肠埃希氏菌和大肠埃希氏菌, 这也是在日常检验检测中需要关注的重点。此次能力验证不但提高了实验室市场竞争力, 更进一步加强了实验人员对致泻大肠埃希氏菌的检验技能, 促进实验室检验能力的不断提升, 同时也是对实验室内部质量控制程序的一种补充。

#### 参考文献

- [1] CNAS-RI01: 2019 能力验证规则[S]. CNAS-RI01: 2019 Rules for the accreditation of inspection bodies [S].
- [2] 邓宁妍, 周姬, 蒋卫东. 乳粉中大肠菌群测定能力验证的结果与分析[J]. 现代食品, 2019, (14): 120-122. Deng NY, Zhou J, Jiang WD. Results and analysis of coliform group determination in milk powder [J]. Mod Food, 2019, (14): 120-122.
- [3] 杨承霖, 舒刚, 赵小玲, 等. 2010—2016 年四川省食品动物源大肠杆菌

- 的耐药性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, (9): 1-8.
- Yang CL, Shu G, Zhao XL, *et al.* Drug resistance of *Escherichia coli* isolates from food-animals obtained from 2010 to 2016 in Sichuan [J]. J Northwest A F Univ (Nat Sci Ed), 2020, (9): 1-8.
- [4] 王蒋丽, 刘淑晨, 马合金, 等. 食品中致泻性大肠埃希氏菌污染状况及耐药分析[J]. 医学动物防制, 2018, 34(3): 228-230.
- Wang JL, Liu SC, Ma HJ, *et al.* Analysis for food diarrhea *Escherichia coli* pollution and medicine resistance [J]. J Med Pest Control, 2018, 34(3): 228-230.
- [5] 王利, 洪润, 陈谨, 等. 安徽省马鞍山市 2014-2018 年腹泻患者中致泻性大肠埃希菌病原学及流行特征分析[J]. 疾病监测, 2019, 34(11): 1010-1016.
- Wang L, Hong Y, Chen J, *et al.* Etiologic and epidemiologic characteristics of diarrheogenic *Escherichia coli* in diarrhea patients in Maanshan, Anhui, 2014-2018 [J]. Dis Surv, 2019, 34(11): 1010-1016.
- [6] 秦思, 沈贻, 周翌婧, 等. 2016 年江苏省食源性疾病患儿中致泻大肠埃希氏菌毒力基因分布与耐药性特征[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(6): 2019-2024.
- Qin S, Shen Y, Zhou YJ, *et al.* Virulence genotype distribution and drug resistance characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with foodborne diseases in Jiangsu province in 2016 [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(6): 2019-2024.
- [7] Kampmeier S, Berger M, Mellmann A, *et al.* The 2011 German enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O104: H4 outbreak—the danger is still out there [J]. Curr Topics Microbiol Immunol, 2018, 416: 117-148.
- [8] GB 29921-2013 食品安全国家标准 食品中致病菌限量标准[S].
- GB 29921-2013 National food safety standard-Limits for pathogenic bacteria in food [S].
- [9] GB 4789. 6-2016 食品微生物学 致泻大肠埃希氏菌检验[S].
- GB4789.6-2016 Microbiological examination of food hygiene-Examination of diarrheagenic *Escherichia coli* [S].
- [10] 张晓宁, 陈境, 麻丽丽, 等. 优化培养基对冷冻干燥后植物乳杆菌 LIP-1 活性的影响[J]. 食品科技, 2019, 44(7): 1-9.
- Zhang XN, Chen J, Ma LL, *et al.* The effect of optimized medium components on the activity of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 after freeze-drying [J]. Food Sci Technol, 2019, 44(7): 1-9.
- [11] 林秀敏, 蒋佳希, 梁美丹, 等. 食品分析能力评估计划能力验证样品中大肠埃希氏菌 O157: H7 的分离鉴定及质量控制[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(8): 3213-3217.
- Lin XM, Jiang JX, Liang MD, *et al.* Isolation and detection of *Escherichia coli* O157: H7 and quality control in food analysis performance assessment scheme proficiency test [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(8): 3213-3217.
- [12] 陈婉娃, 智丽, 林贵鸿. 食品中微生物检测能力验证结果与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(19): 6503-6507.
- Chen WW, Zhi L, Lin GH. Validation results and analysis of microbial testing capability in food [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(19): 6503-6507.
- [13] 钟瑜, 张增峰, 周卓为, 等. 副溶血性弧菌水产品能力验证样品的制备[J]. 食品安全导刊, 2016, (2X): 126-128.
- Zhong Y, Zhang ZF, Zhou ZW, *et al.* Preparation of *Vibrio parahaemolyticus* water product proficiency testing samples [J]. China Food Saf Magaz, 2016, (2X): 126-128.
- [14] 冯育芳, 邢进, 岳秉飞. 实验动物肺炎克雷伯杆菌的实验室检测能力验证结果评价[C]// 中国药学会第四届药物检测质量管理学术研讨会资料汇编, 2017.
- Feng YF, Xing J, Yue BF. Evaluation of the detection ability of testing *Klebsiellapneumonia* in laboratory animals [C]// Data compilation of the 4th Symposium on quality control of drug testing of the Chinese pharmaceutical society, 2017.
- [15] 孙晓霞, 胡连霞, 王建昌, 等. 单核细胞增生李斯特氏菌能力验证样品的制备与验证[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, (2): 198-203.
- Sun XX, Hu LX, Wang JC, Fu Q, *et al.* Preparation and verification of *Listeria monocytogenes* samples for proficiency testing [J]. J Food Saf Qual, 2017, (2): 198-203.
- [16] 章海通, 邢家溧, 傅晓, 等. 食品能力验证中沙门氏菌的分离鉴定和分型[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(20): 166-171.
- Zhang HT, Xing JL, Fu X, *et al.* Isolation and identification of salmonella in the proficiency testing [J]. Food Res Dev, 2018, 39(20): 166-171.
- [17] 刘学文, 高裕锋, 李汴生. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在常见食源性致病菌检测中的应用进展[C]// “健康中国 2030·健康食品的创新与发展”暨 2019 年广东省食品学会学术年会论文集, 2019.
- Liu XW, Gao YF, Li BS. Application of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in the detection of common foodborne pathogens [C]// "healthy China 2030 Innovation and development of healthy food" and 2019 annual symposium of Guangdong Society of Food Sciences, 2019.
- [18] 赵红阳. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定阪崎肠杆菌及其药物敏感性分析[D]. 大连: 大连工业大学, 2013.
- Zhao HY. Identification of *Enterobacter sakazakii* by matrix-assisted Laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and drug sensitivity analysis [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2013.
- [19] Thompson CM, Gao QY, Lu ZF, *et al.* Development of a differential multiplex PCR assay for the supplemental identification of different sources of proteins [J]. J AOAC Int, 2020, 103: 205-209.
- [20] 王晓. 多重实时荧光定量 PCR 同时检测冷冻蔬菜中 4 种食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(22): 5917-5921.
- Wang X. Simultaneous determination of 4 kinds of foodborne pathogens

- in frozen vegetables by multiplex quantitative real-time PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(22): 5917–5921.
- [21] 胡安妥, 王娉, 张彩霞, 等. 5 类致泻性大肠埃希氏菌多重荧光 PCR 检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2018, 39(22): 249–255.
- Hu AT, Wang P, Zhang CX, *et al*. Establishment of multiplex real-time PCR assay to detect five strains of diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. *Food Sci*, 2018, 39(22): 249–255.
- [22] 张红宇, 孟祥晨, 姜博, 等. Taqman 三重实时 PCR 快速检测原料乳中致泻性大肠埃希氏菌[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(10): 108–115.
- Zhang HY, Meng XC, Jiang B, *et al*. Taqman triplex real-time PCR assays for rapid detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in raw milk [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2010, 41(10): 108–115.
- [23] 纪冬, 辛绍杰. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(4): 598–600.
- Ji D, Xin SJ. Development and data analysis of real-time fluorescent quantitative PCR [J]. *Lett Biotechnol*, 2009, 20(4): 598–600.
- [24] 叶桦秀, 李丽丽, 江莉莉. VITEK 2 Compact 微生物全自动分析系统的应用及鉴定结果分析[J]. *中国医疗器械信息*, 2017, 23(24): 152–153, 156.
- Ye HX, Li LL, Jiang LL. Application of VITEK 2 Compact automatic microbial analysis system and analysis of identification results [J]. *China Med Device Inform*, 2017, 23(24): 152–153, 156.
- [25] 陈信忠, 龚艳清, 郭书林. MALDI-TOF-MS 在病原微生物鉴定中的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2012, (6): 43–48.
- Chen XZ, Gong YQ, Guo SL. Research progress of MALDI-TOF-MS in pathogenic microorganism identification [J]. *Biotechnol Bull*, 2012, (6): 43–48.

(责任编辑: 王 欣)

## 作者简介



刘 莉, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物学。  
E-mail: 603520938@qq.com



曾 静, 教授, 主要研究方向为微生物学。  
E-mail: 603520938@qq.com