

# 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

林秀敏, 蒋佳希, 梁美丹, 陈楷, 张彬彬, 尹玮璐, 肖剑\*

(广州市食品检验所, 广州 510410)

**摘要: 目的** 从食品分析能力评估计划能力验证样品沙拉中分离、鉴定大肠埃希氏菌 O157:H7, 判断 2 份样品是否有检出。**方法** 参照 GB 4789.36-2016《食品安全国家标准 食品微生物学 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM》进行检测, 将 VITEK 2 compact 生化结果符合的菌株进行 O157 和 H7 抗原血清学鉴定。**结果** 样品编号 M221d11B 检出大肠埃希氏菌 O157:H7, 样品编号 M221d11A 未检出大肠埃希氏菌 O157:H7。测试样品的背景干扰菌是成团泛菌和铜绿假单胞菌。**结论** 取得满意的能力验证结果需要注意以下因素: 培养基试剂的质量、样品之间的交叉污染、样品的正确复苏和制备、菌落特征的识别以及干扰菌株的排查等。

**关键词:** 食品分析能力评估计划; 能力验证; 大肠埃希氏菌 O157:H7; 菌株鉴定

## Isolation and detection of *Escherichia coli* O157:H7 and quality control in food analysis performance assessment scheme proficiency test

LIN Xiu-Min, JIANG Jia- Xi, LIANG Mei-Dan, CHEN Kai, ZHANG Bin-Bin, YIN Wei-Lu, XIAO Jian\*

(Guangzhou Institute of Food Inspection, Guangzhou 510410, China)

**ABSTRACT: Objective** To isolate and identify *Escherichia coli* O157:H7 in salad for food analysis performance assessment scheme (FAPAS) proficiency test. **Methods** According to GB 4789.36-2016 *National food safety standard-Food microbiological examination: Escherichia coli* O157:H7/NM, 2 samples were detected. Typical strains were tested with VITEK 2, and serological tests were proceeded afterwards. **Results** *Escherichia coli* O157:H7 was detected in the sample M221d11B, and not detected in the sample M221d11A. Organisms presented in FAPAS were *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas aeruginosa* as background flora. **Conclusion** The satisfactory result needs to pay attention to the following factors: quality of the culture medium, cross contamination, correct sample preparation, identification of colony characteristics, and screening of interfering strains, etc.

**KEY WORDS:** food analysis performance assessment scheme; proficiency test; *Escherichia coli* O157:H7; strain identification

## 1 引言

英国国家实验室组织的食品分析能力评估计划(food

analysis performance assessment scheme, FAPAS)是目前国际食品领域最权威的能力验证提供者之一。它通过发送统一制作的测试样品给各个实验室进行实际测试, 再将实验

\*通讯作者: 肖剑, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测技术。E-mail: xjqh521@163.com

\*Corresponding author: XIAO Jian, Master, Senior Engineer, Guangzhou Institute for Food Control, Guangzhou 510410, China. E-mail: gzsp2000@163.com

室的测试结果进行统计分析,通过各实验室结果的一致性来判定实验室对特定项目的检测能力<sup>[1]</sup>。2017年6月23号标准检验方法 GB4789.36-2016《食品安全国家标准 食品微生物学 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM》<sup>[2]</sup> 开始实施。本次能力验证既是对方法变更的确证,确保方法变更的检验结果准确有效,也是考核实验室质量管理是否达到受控状态,确保资质认定的有效性。

食源性致病菌引起的食品安全问题一直是全球头号食品安全问题。大肠埃希氏菌 O157:H7 因其感染剂量低<sup>[3]</sup>、致病力强、危险性大而受到全球关注,广泛分布于自然界中,主要来源于土壤、水源、昆虫、牲畜以及农产品<sup>[4]</sup>。在农产品中,大肠埃希氏菌 O157:H7 在植物叶的气孔、受损处或植物表面形成生物膜,或者内化到植物组织中<sup>[4]</sup>,通过动物性食物、水、水果蔬菜以及人与人接触等途径<sup>[5]</sup>传播,是一种高风险食源性致病菌。近年来人们更加注重食用新鲜蔬菜水果来均衡营养或预防疾病,由此兴起了蔬果沙拉的潮流。生菜、黄瓜等作为沙拉的原料,需要密切关注其是否受到大肠埃希氏菌 O157:H7 污染。

随着国家食品安全法 GB 29921-2013《食品安全国家标准 食品中致病菌限量标准》<sup>[6]</sup>以及 DBS 44/006-2016《广东省食品安全地方标准 非预包装即食食品微生物限量》<sup>[7]</sup>的实施,对于产品质量安全的监督抽检和风险监测的检验需求增加,对承检机构的检测能力水平要求也越来越高。因此,为了进一步提高实验室对大肠埃希氏菌 O157:H7 的检验鉴定水平,确保检验结果的准确性,积极参与本次能力验证,验证从沙拉样品中分离大肠埃希氏菌 O157:H7 的能力。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

FAPAS 机构提供 2 份样品,样品基质为沙拉,每份样品为 5 g,编号分别为 M221d11A 和 M221d11B。

### 2.2 试剂与仪器

阴性对照菌 ATCC25922 大肠埃希氏菌;阳性对照菌 NCTC12900 大肠埃希氏菌 O157:H7。

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、改良 EC 肉汤(mEC+n)、改良山梨醇麦康凯琼脂(cefixime tellurite-sorbitol macconkey agar, CT-SMAC)、月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-MUG(MUG-LST)、营养琼脂(环凯公司);Swarm 琼脂(丹麦 SSI 公司);显色培养基(法国科玛嘉公司);VITEK 2 鉴定卡(法国梅里埃公司);诊断血清(泰国 S&A 公司)。

生化培养箱(广州环凯公司);VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定仪器(法国梅里埃公司);拍打式均质器(INTERSCIENCE 公司);三用紫外分析仪(上海康乐光电

仪器有限公司)。

### 2.3 实验方法

FAPAS 组织的作业指导书要求参加测试的实验室人员在接收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,并且要求使用缓冲蛋白胨水复苏,不限制检验方法,需在规定时间内完成实验及结果的填报。本次能力验证采用 GB4789.36-2016《食品安全国家标准 食品微生物学 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM》方法进行检测。

#### 2.3.1 样品前处理

按照无菌操作方式在生物安全柜内开启样品瓶,瓶内含有沙拉样品,每个样品各取 20 mL BPW 对样品进行复苏并充分混匀,然后放至室温(30±2) min。此样本将作为一个整体,相当于 25 g 检样量。

#### 2.3.2 前增菌

将 25 g 样品加入改良 EC 肉汤中,用拍打式均质器混匀,于(36±1) °C 中培养 24 h。同时做空白对照和阴性对照。

#### 2.3.3 分离

用接种环沾取增菌液,分别划线于显色培养基和 CT-SMAC 琼脂,于(36±1) °C 培养 24 h,观察平板上的菌落形态。在 CT-SMAC 平板上,典型菌落为圆形、光滑、较小的无色菌落,中心呈现较暗的灰褐色;在科玛嘉大肠埃希氏菌 O157 显色平板上的菌落为淡紫色菌落。

#### 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。对于 H7 因子血清不凝集者,点种于 Swarm 培养基平板,看是否有动力,经连续传代 3 次,动力实验均为阴性,才确定为无动力株。

## 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,编号 M221d11A 未检出大肠埃希氏菌 O157, M221d11B 检出大肠埃希氏菌 O157,具体详见表 1。

### 3.2 血清学实验结果

将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。O157 和 H7 结果均凝集,生理盐水对照未见凝集。

### 3.3 结果与报告

综合以上生化实验和血清学鉴定结果,在 25 g 样品中编号为 M221d11A 未检出大肠埃希氏菌 O157:H7,编号 M221d11B 检出大肠埃希氏菌 O157:H7。

表 1 样品的菌落特征及生化鉴定结果  
Table 1 Colony characteristics and biochemical identification results of the samples

样品编号	分离平板	菌落形态	纯培养形态	VITEK 2 compact 生化鉴定结果	生化结果可信度
M221d11A	显色培养基	蓝绿色菌落圆形	黄色菌落, 产黄色素	成团泛菌	98%
	显色培养基	无色圆形大菌落, 部分中心点凹陷, 边缘不整齐	绿色菌落, 产色素	铜绿假单胞菌	99%
M221d11A	CT-SMAC	无色圆形, 中心呈灰褐色, 边缘不整齐, 半透明或不透明	绿色菌落, 产色素	铜绿假单胞菌	99%
M221d11B	显色培养基	淡紫色圆形大菌落, 部分边缘不整齐	白色菌落	大肠埃希氏菌 O157	97%
	显色培养基	蓝绿色圆形菌落	黄色菌落, 产黄色素	成团泛菌	98%
M221d11B	CT-SMAC	无色菌落, 中心呈现灰褐色, 圆形光滑, 边缘整齐不透明	白色菌落	大肠埃希氏菌 O157	97%
	CT-SMAC	无色菌落, 中心暗红色圆形光滑, 边缘整齐不透明	白色菌落	大肠埃希氏菌 O157	97%
阴性对照菌 ATCC 25922 大肠埃希氏菌	显色培养基	蓝色圆形菌落	白色菌落	大肠埃希氏菌	98%
	CT-SMAC	粉红色, 圆形菌落, 边缘整齐不透明	白色菌落	大肠埃希氏菌	98%
阳性对照菌 NCTC12900 大肠埃希氏菌 O157: H7	显色培养基	淡紫色圆形大菌落, 边缘整齐, 不透明	白色菌落	大肠埃希氏菌 O157	97%
	CT-SMAC	无色菌落, 中心呈现灰褐色, 圆形光滑, 边缘整齐不透明	白色菌落	大肠埃希氏菌 O157	97%
空白对照	显色培养基	不生长	不生长	——*	——*
	CT-SMAC	不生长	不生长	——*	——*

注: \*为未鉴定

本次能力验证是大肠埃希氏菌 O157:H7 的考核, 在 FAPAS 官网填报结果时需要考虑是否检出大肠埃希氏菌 O157, 且该菌株是否为有动力菌株 H7, 2 个条件都满足才符合预期结果。而采用 GB4789.36-2016<sup>[2]</sup> 检验方法检出大肠埃希氏菌 O157 的结果有 2 种可能, 一种是有动力株 O157:H7, 另一种是无动力株 O157:NM, 在结果报送时需要注意。

## 4 讨论

### 4.1 确保能力验证的培养基试剂、菌株的质量

由 FAPAS 组织的水平测试被全球从事食品检验的实验室广泛采纳, 能力验证结果具有世界可比性。做好检测过程中内部质量控制是保障检测结果准确性重要手段, 按照 GB4789.28-2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求》<sup>[8]</sup>, 确保所用培养基和试剂

质量可靠, 标准菌株(含阴阳性对照菌株)的活力和性状稳定。使用的培养基质量或鉴定试剂质量有问题或灭菌不彻底都可能造成测试结果的偏离。

### 4.2 避免交叉污染

为了防止样品与样品之间的交叉污染, 在参加能力验证试验中, 避免同时操作 2 个样品。建议在不同生物安全柜之间操作或者是同一个生物安全柜不同时间检测, 一个样品试验完毕, 开启紫外线消毒后再开始另一个样品的检测。此外, 环境与样品之间的污染也可能引起交叉污染。据有关资料显示<sup>[9]</sup>, 如果在实验室比对实验结果中样品检出预期结果以外的其他细菌, 可能是环境与样品之间的污染引起, 需要加强无菌操作意识。

### 4.3 正确按照组织方的作业指导书复苏样本是开展能力验证的良好前提

样本的复苏不彻底或不均匀都会影响实验结果。在组

织方的作业指导书中明确要求复苏样本时需要混匀,且添加 BPW 后需放置室温(30±2) min 后才可以开始后续检测方法。经过休眠的微生物需要时间恢复其生物学特性。冷藏条件对于细菌菌体会发生应激损伤<sup>[10,11]</sup>,在选择性培养基上的生长能力变弱或者受到抑制<sup>[12]</sup>,受损菌体在一定条件下能够修复才能具备正常生理特性。复苏后的样品应开始检测,避免在放置过程中由于环境和其他条件的影响而使菌体大量死亡,从而影响最终检验结果<sup>[13]</sup>。转移后的样本需要使用拍打式均质器均质样品,保证样品中的微生物均匀分散在选择性菌液中,有利于目标菌检验。

#### 4.4 注意菌落特征,避免漏检的同时提高检验效率

显色培养基特异性高、灵敏度好,通过直接观察菌落颜色快速筛选可疑目标菌而被实验室广泛采用。O157 显色培养基的原理主要是利用大肠埃希氏菌 O157 产生  $\beta$ -半乳糖苷酶、不产生  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶的特点实现快速筛查<sup>[14]</sup>,培养基中的色素与大肠埃希氏菌 O157:H7 所具有的酶发生特异性反应,水解底物释放显色基团,通过观察菌落颜色进行筛选目标菌。在本次实验室比对考核中,编号 M221d11A 和编号 M221d11B 在显色培养基上能够快速识别,提高了效率。

绝大部分大肠埃希氏菌 O157 的特征是不发酵山梨醇,少数是迟缓发酵山梨醇<sup>[5]</sup>。因此,利用这一特性可以在 CT-SMAC 琼脂初步分离出大肠埃希氏菌 O157。与显色培养基相比,CT-SMAC 特异性较差。例如样品 M221d11A 在 CT-SMAC 上筛选出来的可疑菌均是不发酵山梨醇,经过确证是成团泛菌和铜绿假单胞菌。在 M221d11B 分离出的 O157,菌落中心呈灰褐色或暗红色。这可能是由于不同菌落产生的酸量不同,影响了培养基指示剂颜色变化。

有文献指出<sup>[5]</sup>,迟缓发酵山梨醇的菌落在山梨醇麦康凯琼脂上无色半透明菌落。菌落大,发酵山梨醇产生的酸量足够影响培养基的指示剂变色,菌落变红色;小菌落产生酸量小,达不到指示剂变色的 pH 值,形成肉眼可见的不透明形态。目前,国内都曾检出过发酵山梨醇的大肠埃希氏菌 O157 菌株<sup>[14-16]</sup>。为此,像弗氏柠檬酸杆菌这类的干扰菌能发酵山梨醇,且与大肠埃希氏菌 O157:H7 的血清发生交叉凝集,会造成干扰,需要进一步采用 VITEK 2 compact 生化鉴定系统排查<sup>[14]</sup>。

大肠埃希氏菌和大肠埃希氏菌 O157 同时在 CT-SMAC 培养时,由于 CT-SMAC 平板中添加的亚硝酸钾能够抑制非 O157 的大肠埃希氏菌,所以大肠埃希氏菌 O157 是优势菌群。但是当平板中的亚硝酸钾无法完全抑制非 O157 的大肠埃希氏菌生长,则会使非 O157 的大肠埃希氏菌发酵山梨醇产酸变粉红色菌落,在鉴定时要仔细分辨。

菌落产生色素可作为筛选目标菌辅助手段之一。在 M221d11A 样本中挑取的可疑菌落在营养琼脂纯化培养时

分别产生黄色色素或者绿色色素,则可以进行初筛。

Swarm 软琼脂对鞭毛抗原进行诱导培养,其原理为细菌鞭毛适合在 0.4% 软琼脂游动,进而使发育不良或暂时缺失的鞭毛抗原得以恢复<sup>[17]</sup>。本次采用 Swarm 软琼脂制成的平板主要考虑到 Swarm 软琼脂在日常实践中鉴定沙门氏菌血清分型 H 抗原有很好的鞭毛诱导效果,且容易挑取培养物,可操作性强;另一方面是因为在半固体制备的平板上很难挑取培养物进行玻片凝集实验。

综上所述,取得满意的能力验证结果需要注意以下因素:培养基试剂的质量、样品之间的交叉污染、样品的正确复苏和制备、菌落特征的认识以及干扰菌株的排查等。

#### 参考文献

- 王立平,蔡雪凤. 微生物实验室参加 FEPAS 能力验证计划的质量控制及对策[J]. 食品科技, 2011, (7): 256-260.  
Wang LP, Cai XF. Quality control and measures of FEPAS examining microbial lab's performance assessments [J]. Food Sci Technol, 2011, (7): 256-260.
- GB 4789.36-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验[S].  
GB 4789.36-2016 National food safety standard-Food microbiological examination: *Escherichia coli* O157:H7/NM [S].
- 孟祥升,辛崇兴,邵晔. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 研究进展[J]. 中国动物检疫, 2011, (11): 69-71.  
Meng XS, Xin CX, Shao X. Research progress in *Escherichia coli* O157:H7 [J]. China Anim Heal Inspect, 2011, (11): 69-71.
- 山珊,赖卫华,陈明慧,等. 农产品中大肠杆菌 O157:H7 的来源及分布研究进展[J]. 食品科学, 2014, (1): 289-293.  
Shan S, Lai WH, Chen MH, et al. Research progress in sources and distribution of *Escherichia coli* O157:H7 in agricultural products [J]. Food Sci, 2014, (1): 289-293.
- 林彩华,蔡颖,曾梅锦,等. 能力验证试验中大肠杆菌 O157:H7 的分离与鉴定[J]. 检验检疫科学, 2008, (5): 57-58.  
Lin CH, Cai Y, Zeng MJ, et al. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in proficiency test [J]. Inspect Quarant Sci, 2008, (5): 57-58.
- GB 29921-2013 食品安全国家标准 食品中致病微生物限量[S].  
GB 29921-2013 National food safety standard-The pathogenic microbiological limits in food [S].
- DBS 44/006-2016 广东省食品安全地方标准 非预包装即食食品微生物限量[S].  
DBS 44/006-2016 Guangdong province food safety local standard-The microbiological limits for non pre packaged ready-to-eat food [S].
- GB 4789.28-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求[S].  
GB 4789.28-2013 National food safety standard-Food microbiological examination-Quality requirements for culture media and reagents [S].
- 罗建波,陈文胜. 微生物检验实验室质量管理体系工作指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2014.  
Luo JB, Chen WS. Guidelines for quality management of microbiological laboratory [M]. Beijing: Standards Press of China,

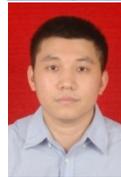
- 2014.
- [10] 姬赛赛, 王娴静, 马晶晶, 等. 大肠杆菌 O157:H7 冷冻损伤及解冻存活的研究 [EB/OL]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20170519.1044.080.html>. 2017-05-19.
- Ji SS, Wang XJ, Ma JJ, *et al.* The survival of frozen-*Escherichia coli* O157:H7 after thawing treatment [EB/OL]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20170519.1044.080.html>. 2017-05-19.
- [11] Jasson V, Uyttendaele M, Rajkovic A, *et al.* Establishment of procedures provoking sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157 to serve method performance testing [J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 118(3): 241-249.
- [12] 水新云, 王虎虎, 高峰, 等. 4 株 *E.coli*O157:H7 毒力基因检测及其冷应激损伤[J]. *食品科学*, 2016, (4): 176-180.
- Shui XY, Wang HH, Gao F, *et al.* Detection of virulence genes of four *Escherichia coli* O157:H7 strains and cold stress injury in the bacteria [J]. *Food Sci*, 2016, (4): 176-180.
- [13] 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.
- Zeng Z. Analysis of microbiological proficiency testing results [J]. *Heilongjiang Agric Sci*, 2011, (6): 86-89.
- [14] 刘桂荣, 刘园, 严寒秋. 弗氏柠檬酸杆菌与 EHECO157:H7 的抗原交叉反应及生化鉴别的实验[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, (7): 875-876.
- Liu GR, Liu Y, Yan HQ. Cross reactivity of antigen and biochemical identification in *Citrobacterfreundii* and *EHEC* O157:H7 [J]. *Chin Health Lab Technol*, 2005, (7): 875-876.
- [15] 范放, 司徒翠华, 黄李华, 等. 检出山梨醇阳性肠出血性大肠杆菌 O157:H7 一例及特征分析[J]. *医学动物防制*, 2006, (2): 88-90.
- Fan F, Situ CH, Huang LH, *et al.* Detection of entero-hemorrhagic *E. coli* O157:H7 with sorbitol positive and analysis [J]. *J Med Pest Control*, 2006, (2): 88-90.
- [16] 顾宝柯, 许学斌, 金汇明, 等. 上海地区家畜、家禽及肉制品大肠杆菌 O157:H7 监测[J]. *疾病监测*, 2003, (1): 5-7.
- Gu BK, Xu XB, Jin HM, *et al.* Surveillance of *Escherichia coli* O157:H7 in domestic animals, poultry and meat products in Shanghai [J]. *Dis Surveil*, 2003, (1): 5-7.
- [17] 张新, 严寒秋, 曲梅, 等. 肠出血性大肠杆菌 O26:H11 鞭毛抗原的诱导及鉴定研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, (1): 8-10, 26.
- Zhang X, Yan HQ, Qu M, *et al.* Induction and identification of flagellum antigen of EHEC O26:H11 [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, (1): 8-10, 26.

(责任编辑: 杨翠娜)

## 作者简介



林秀敏, 助理工程师, 主要研究方向为食品微生物检测技术。  
E-mail: 736967031@qq.com



肖剑, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测技术。  
E-mail: xjqh521@163.com