

实时荧光定量 PCR 结合培养法在细菌学室间质量评价中的应用

霍哲*, 任艳芳, 徐俊, 张晶波, 苗芳

(北京市西城区疾病预防控制中心, 北京 100120)

摘要: **目的** 评价培养法和实时荧光 PCR 法在细菌学质控样本中的检测应用。**方法** 采用培养法和实时荧光 PCR 法分离鉴定 30 件质控考核致病菌, 探讨快速、准确检测致病菌的理想方案。**结果** 从鉴定结果和检测完成时间方面具体分析了其中 5 件质控标本, 质控标本 1 号、2 号实时荧光 PCR 优于培养法, 质控标本 3 号、4 号培养法弥补了实时荧光 PCR 的局限性, 质控标本 5 号培养法和实时荧光 PCR 结合应用, 检出目标菌。**结论** 培养法结合实时荧光 PCR 法能够优势互补, 是快速准确检测致病菌的理想模式。**关键词:** 室间质量评价; 细菌鉴定; 盲样考核; 实时荧光 PCR 法

Application of real-time PCR methods and the culture methods in the bacteriology external quality assessment

HUO Zhe*, REN Yan-Fang, XU Jun, ZHANG Jing-Bo, MIAO Fang

(Xicheng Center of Disease Control and Prevention, Beijing 100120, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the application of culture method and real-time PCR method in the detection of multi-blind external quality assessment. **Methods** Thirty samples of pathogenic bacteria were isolated and identified by culture method and real-time fluorescence PCR method, and the ideal scheme of rapid and accurate detection of pathogenic bacteria was discussed. **Results** Five specimens were analyzed in detail from the identification results and the completion time of the test. For specimens No. 1 and No. 2, real-time PCR was better than culture method. The limitations of real-time fluorescent PCR were fulfilled by culture methods in specimen No. 3 and No. 4. The target bacteria were detected by the combination of quality control specimen No.5 culture method and real-time fluorescence PCR. **Conclusion** The culture method combined with real-time PCR is an ideal model for rapid and accurate detection of pathogenic bacteria.

KEY WORDS: external quality assessment; identification of bacteria; blind sample assessment; real-time PCR

0 引言

室间质量评价(external quality assessment, EQA), 是多家实验室分析同一样本, 由外部独立机构收集和反馈实验室测定结果, 并以此评价实验室对某类或某些检验项目

的检测能力^[1]。国内室间质量评价包括卫生部临床检验中心和省、市、以及地区的临床检验中心组织的 EQA, 还有一些国外机构组织的室间质量评价活动, 如美国病理学家学会(college of american pathologists, CAP)、英国食品分析实验室质量评估体系(food analytical laboratory quality

*通信作者: 霍哲, 主管检验技师, 主要研究方向为微生物致病菌检测及溯源分析。E-mail: rubyrain121118@hotmail.com

*Corresponding author: HUO Zhe, Chief Laboratory Technician, Xicheng Center of Disease Control and Prevention, No. 38, Deshengmenwai Road, Beijing 100120, China. E-mail: rubyrain121118@hotmail.com

assessment system, FAPAS)组织的能力验证活动等。室内质量评价也存在一些局限性, EQA 不能替代实验室全面的质量控制与管理体系。但是 EQA 观察各实验室结果的准确性、一致性, 并采取相应的整改措施, 为实验室执照评定或认可提供了客观依据。室内质量评价活动的基本类型有 3 种: 定量的、定性的以及解释性的^[2]。卫生部临床检验中心的细菌学项目室内质量评价活动计划是由组织者将质控品同时分发给参与质评计划的实验室, 实验室需要在规定时间内将结果返回组织机构, 组织结构确定实验室该项检测结果的满意度。本实验室定期参加卫生部临床检验中心的细菌学室内质量评价活动, 该活动的质控品多为从混合致病菌中寻找目标菌, 存在漏检、错检的风险, 这与处理食源性疾病事件和集中性腹泻事件很相似。实时荧光 PCR 法因其灵敏度高、快速的特点成为目前国际公认病原微生物检测最有效技术之一^[3-6]。此方法是在传统 PCR 技术的基础上, 加入荧光基团, 融合了传统 PCR 高灵敏度、光谱技术的准确定量以及 DNA 技术的高特异性等优点, 已被应用于医学、分子生物学、环境监测和食品检测等多个领域。单重 PCR 一次只能检测一种病原菌, 为了提高效率, 一次可检测多个基因的多重 PCR 技术孕育而生, 已被广泛应用于混合感染的检测中^[7-9]。本研究探讨了培养法和实时荧光 PCR 法在细菌学项目室内质量评价中的应用, 从而建立一套致病菌快速准确的检测方案, 以期提高应对突发公共卫生事件的应急检测能力和实验室体系建设。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 标本来源

卫生部临床检验中心 2015—2020 年下发的全国疾控中心细菌学考核盲样共 30 件, 均为西林瓶中真空冻干粉末状样品。

1.1.2 仪器

IGS 180 恒温培养箱(美国 Thermo Scientific 公司); VITEK 2-Compact 全自动微生物鉴定系统(法国梅里埃公司); DM1000 数码成像生物显微镜(德国莱卡公司); ABI 7500 荧光 PCR 分析仪(美国 ABI 公司)等。

1.1.3 培养基

沙门显色培养基、弧菌显色培养基、O157 显色培养基、大肠显色培养基、阪崎肠杆菌显色培养基、李斯特菌显色培养基(中国上海科玛嘉生物技术有限公司); 营养肉汤、Baird-Parker 琼脂平板、木糖赖氨酸脱氧胆盐(xylose lysine deoxycholine, XLD)琼脂平板、甘露醇卵黄多粘菌素琼脂平板(mannitol yolk polymyxin, MYP)琼脂平板、麦康凯琼脂平板、CIN 琼脂平板、曙红亚甲蓝琼脂培养基(eosin methylene blue, EMB)琼脂平板、硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂培养基(thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose,

TCBS)琼脂平板、三糖铁培养基、克氏双糖铁管、3%三糖铁琼脂(北京君利康生物技术有限公司); 庆大培养基、改良纤维二糖-多粘菌素 B-多粘菌素 E (mCPC)培养基、PALCAM 培养基、营养琼脂干粉、动力生化管、尿素生化管(中国青岛高科园海博生物技术有限公司); 血平板(英国 OXOID 公司); 沙门氏菌属诊断血清(丹麦 SSI 公司); 志贺氏菌属诊断血清和 O157:H7 诊断血清(宁波天润生物药业有限公司); 革兰阴性细菌鉴定卡、革兰阳性细菌鉴定卡、蜡样芽胞杆菌细菌鉴定卡(法国梅里埃公司)。

1.1.4 Real-time PCR 试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、食源性致病菌核酸多重实时荧光 PCR 检测试剂盒(包括金黄色葡萄球菌、沙门菌、O157 大肠埃希菌、单核细胞增生性李斯特菌、阪崎肠杆菌、小肠结肠炎耶尔森菌、弧菌属、志贺氏菌、蜡样芽胞杆菌、气单胞菌属、产气荚膜梭菌、弯曲菌属等常见的 12 种食源性致病菌)、5 种致泻大肠埃希氏菌核酸多重实时荧光 PCR 检测试剂盒(北京卓诚惠生生物科技股份有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 培养法检验依据

食源性病原细菌: GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[10]、GB 4789.11—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 β 型溶血性链球菌检验》^[11]、GB 4789.30—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》^[12]、GB 4789.10—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》^[13]、GB 4789.5—2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验》^[14]、GB 4789.4—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》^[15]、GB 4789.14—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》^[16]、WS/T 9—1996《变形杆菌食物中毒诊断标准及处理原则》^[17]、《预防医学微生物学及检验技术》, 肠道病原菌和健康体检规定肠道病原菌: WS 287—2008《细菌性和阿米巴性痢疾诊断标准》^[18]、WS 271—2007《感染性腹泻诊断标准》^[19]、WS 280—2008《伤寒和副伤寒诊断标准》^[20]、《预防医学微生物学及检验技术》。

1.2.2 核酸提取及荧光 PCR 法检测

按提取试剂盒说明书操作, 配制 0.5~4 麦氏单位的菌悬液, 离心弃上清, 与提取液混合, 热裂解 10 min 提取细菌基因组 DNA。依据食源性致病菌核酸多重实时荧光 PCR 检测试剂盒说明书分别配制 A、B、C 3 组扩增液分装于反应管(18 μ L/管), 分别加入处理好的待测样本核酸、阴性对照、阳性对照各 2 μ L, 终体积 20 μ L/管。依据 5 种致泻大肠埃希氏菌核酸多重实时荧光 PCR 检测试剂盒说明书分别配制 A、B 2 组扩增液分装于反应管(18 μ L/管), 分别加

入处理好的待测样本核酸、阴性对照、阳性对照各 2 μL, 终体积 20 μL/管。PCR 扩增检测: 依据说明书进行循环参数设定, 实时荧光定量 PCR 扩增仪 API7500 进行扩增检测, 依据试剂盒说明书判定结果。

2 结果与分析

2.1 培养结果

本研究采用实时荧光定量 PCR 法和传统培养法对 30 件盲样进行检验, 结果涉及沙门菌属、志贺菌属、耶尔森菌属、埃希菌属、变形杆菌属、弧菌属、气单胞菌属、李斯特氏菌属、葡萄球菌属和链球菌属等菌属, 针对其中 5

件质控标本进行了具体分析, 结果见表 1。

2.2 实时荧光 PCR 结果

1 号的小肠结肠耶尔森菌的核酸阳性, 3 号的沙门菌核酸阳性和 5 号的创伤弧菌核酸阳性, 2 号和 4 号所有菌的核酸检测结果均为阴性, 具体 Ct 值见表 2。

2.3 培养法与实时荧光 PCR 法检测时间比较

质控标本 3 号是沙门菌, 需要进行血清学鉴定, 因为涉及到鞭毛抗原的凝集, 需要利用菌体抗原进行诱导, 所以实验完成时间比较长, 培养法可以鉴定到血清型。5 件质控标本实时荧光 PCR 法检测时间基本一致, 可以鉴定到种属, 见表 3。

表 1 5 件质控标本培养法检测结果
Table 1 Culture results of 5 EQA samples

标本名称	分离培养	生化鉴定	血清学实验	结果
1 号	CIN 平板上菌落中心呈深玫瑰红色, 凸起较尖锐, 周围有明显透明环, 称“公牛眼”	改良克氏双糖斜面 and 底层产酸, 不产 H ₂ S	/	检出小肠结肠炎耶尔森菌
2 号	MAC 平板上为粉红色或红色菌落, 大肠显色平板上为蓝绿色菌落	三糖铁培养基上底层和斜面均为黄色, 产气	/	检出非致泻大肠埃希氏菌(非目标菌)
3 号	XLD 平板上为粉红色, 带黑色中心菌落, 沙门显色平板上为紫色菌落	三塘铁琼脂斜面产碱, 底层产酸, 产硫化氢, 不产气	4,12: i: 1,2	检出鼠伤寒沙门菌
4 号	血平板上为灰白色、半透明、β 溶血环的圆形菌落	/	/	检出无乳链球菌
5 号	mCPC 平板上为中心不透明边缘透明的黄色菌落	3% 三糖铁琼脂分解表现为底层标黄不变黑, 斜面不变或红色加深, 不产气	/	检出创伤弧菌

表 2 5 件质控标本实时荧光 PCR Ct 值检测结果
Table 2 Real-time PCR Ct detection results of 5 EQA samples

标本名称	样本(Ct)	阳性对照(Ct)	阴性对照(Ct)	结果判定
1 号	28.1 (B 组 ROX 通道)	23.5 (B 组 ROX 通道)	undet	小肠结肠炎耶尔森菌阳性
2 号	undet	A、B 2 组 4 个通道均有 S 型扩增曲线, 且 Ct 值 ≤ 35	undet	阴性
3 号	27.3 (A 组 VIC 通道)	22.1 (A 组 VIC 通道)	undet	沙门菌阳性
4 号	undet	A、B、C 3 组四个通道均有 S 型扩增曲线, 且 Ct 值 ≤ 35	undet	阴性
5 号	24.8 (B 组 FAM 通道)	22.3 (B 组 FAM 通道)	undet	弧菌属阳性

注: undet 为 Ct 值未检出, 判断为阴性结果。

表 3 培养法与实时荧光 PCR 检测时间比较
Table 3 Detection time comparison of real-time PCR and culture method

标本名称	培养法					实时荧光 PCR			
	分离培养/h	生化鉴定/h	VITEK 鉴定/h	血清学/h	完成时间/h	培养/h	DNA 提取/h	PCR 扩增/h	完成时间/h
1 号	24	24	8		56	24	0.5	2	26.5
2 号	24	24	8	24	80	24	0.5	2	26.5
3 号	24	24	8	48	104	24	0.5	2	26.5
4 号	24	24	10		58	24	0.5	2	26.5
5 号	24	24	8		56	24	0.5	2	26.5

3 结 论

室间质量评价是一条科学的学习途径^[21],北京市西城区疾病预防控制中心每年参加全国疾病预防控制中心细菌学项目室间质量评价活动,考核合格率为100%。细菌学室间质量评价作为验证实验室能力的一种手段,不仅可以发现问题、促进规范化、提高实验人员的专业水平,还可以通过室间质评考核的检测方案探索一种较理想的应对公共卫生突发事件的思路。

通过室间质控考核发现传统的培养法用时比较长,并且检测多种未知细菌需要准备大量的培养基,实时荧光PCR法具有快速、灵敏度高的特点,并且方法模块化,多重荧光定量PCR法在优化好的多重扩增的体系中加入拟检测的病原体特异引物,实现一次性检测多个病原体,提高了检测效率。质控标本1号,培养法和实时荧光PCR均检出小肠结肠炎耶尔森菌,前者用了56h,后者只需要26.5h。正常标本中小肠结肠炎耶尔森菌需要4℃冷增菌10~20d,无法满足应急检测的要求,所以实时荧光PCR更具有意义。培养法中,通过血清的凝集区分致泻性大肠埃希氏菌与非致泻性大肠埃希氏菌^[15],这种方法主观因素影响较大,质检标本2号中非致泻性大肠埃希氏菌作为干扰菌,增加了鉴定难度,上报非目标菌会影响考核的成绩。采用5种致泻大肠埃希氏菌核酸多重实时荧光PCR检测试剂盒可以准确的发现致泻性大肠埃希氏菌,避免了漏报错报。

实时荧光PCR法虽然准确、快速,但是该方法具有一定的局限性,不能从标本中分离得到目标菌株,因此不能完成生化、血清分型、药敏和分子分型等进一步的鉴定和研究。质控标本3号实时荧光PCR法鉴定结果为沙门菌属,因为需要确定血清型别,所以还需要培养出目标菌。实时荧光PCR法检测试剂使用的病原体特异引物也有局限性,质控标本4号是无乳链球菌,核酸试剂不覆盖此病原体,检测结果为阴性。

质控标本5号采用实时荧光PCR法检测出弧菌属,用培养法继续进行鉴定,最终确定是创伤弧菌。这个检测方案表明,可以利用实时荧光PCR法特异性强、检测周期短、灵敏度高的特点进行常见致病菌的初筛,明确标本的检测方向,后采用培养法进行检测,既培养出致病菌,又缩短了检测时间,对于实时荧光PCR阴性的标本,采取培养法进行未覆盖致病菌的检测。

综上所述,无论是在细菌学室间质评还是在突发公共卫生事件的应急处理中,培养法依然是必要的鉴定技术和手段。实时荧光PCR法因其快速、高效越来越多的运用到食源性疾病事件的处理中,2种方法均存在优势和局限性。因此,通过培养法和实时荧光PCR法2种方法的结合

应用,能够优势互补、减少漏检、提高检测效率,是快速准确检测致病菌的理想模式,为突发公共卫生事件的处理提供科学依据。

参考文献

- [1] 裴世静,刘金萍,马斌国. 山西省细菌鉴定室间质量评价结果回顾分析[J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2018, 6(4): 234-239.
PEI SJ, LIU JP, MA BG. Retrospective analysis on external quality assessment of bacterial identification items in Shanxi province [J]. Chin J Clin Lab Manag (Electron Ed), 2018, 6(4): 234-239.
- [2] GB/T 27043—2012/ISO/IEC 17043:2010 合格评定 能力验证的通用要求[S].
GB/T 27043—2012/ISO/IEC 17043:2010 Conformity assessment—General requirements for proficiency testing [S].
- [3] 韦婕,郭欣欣,梁君瑜,等. NC膜富集法、实时荧光PCR法、培养法检测志贺菌的比较研究[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2016, 38(3): 271-274.
WEI J, GUO XX, LIANG JY, et al. Comparative study on the detection of *Shigella* with NC membrane enrichment method, real-time PCR method and culture method [J]. J Hubei Univ (Nat Sci Ed), 2016, 38(3): 271-274.
- [4] 刘芳,罗臻,黄静敏,等. 致病性蜡样芽胞杆菌的研究进展[J]. 检验检疫学刊, 2016, 26(1): 68-71.
LIU F, LUO Z, HUANG JM, et al. Research progress of pathogenic *Bacillus cereus* [J]. J Inspect Quarant, 2016, 26(1): 68-71.
- [5] 李柏生,柯昌文,张永慧. 全基因组测序在食源性疾病监控和暴发调查中的应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(2): 269-272.
LI BS, KE CW, ZHANG YH. Application of whole genome sequencing for the foodborne disease surveillance and outbreak investigation [J]. Chin J Food Hyg, 2016, 28(2): 269-272.
- [6] 唐廷廷,韩国全,王利娜,等. 分子生物学技术在食源性致病菌检测中的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9): 3497-3502.
TANG TT, HAN GQ, WANG LN, et al. Research progress of molecular biology techniques on detecting foodborne pathogens [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(9): 3497-3502.
- [7] MOLINA F, LÓPEZ-ACEDO E, TABLA R, et al. Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR [J]. BMC Biotechnol, 2015, 15(1): 48.
- [8] YAMADA K, IBATA A, SUZUKI M, et al. Designing multiplex PCR system of *Campylobacter jejuni* for efficient typing by improving monoplex PCR binary typing method [J]. J Infect Chemother, 2015, 21(1): 50-54.
- [9] WEI S, ZHAO H, XIAN YY, et al. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 79(2): 115-118.
- [10] GB 4789.7—2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验[S].
GB 4789.7—2013 National food safety standard—Food microbiological examination test—*Vibrio parahaemolyticus* [S].
- [11] GB 4789.11—2014 食品安全国家标准 食品微生物学检验 β型溶血性链球菌检验[S].
GB 4789.11—2014 National food safety standard—Food microbiological examination test—β-hemolytic streptococcus [S].

[12] GB 4789.30—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验[S].
GB 4789.30—2016 National food safety standard—Food microbiology icalexamination test of *Listeria monocytogenes* [S].

[13] GB 4789.10—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S].
GB 4789.10—2016 National food safety standard—Food microbiological examination—Test of *Staphylococcus aureus* [S].

[14] GB 4789.5—2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验[S].
GB 4789.5—2012 National food safety standard—Food microbiologica lexamination—Test of *Shigellas* [S].

[15] GB 4789.4—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4—2016 National food safety standard—Food microbiologica lexamination—Test of *Salmonella* [S].

[16] GB 4789.14—2014 食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验[S].
GB 4789.14—2014 National food safety standard—Food microbiological examination—Test of *Bacillus cereus* [S].

[17] WS/T 9—1996 变形杆菌食物中毒诊断标准及处理原则[S].
WS/T 9—1996 Diagnostic criteria and principle of management for food poisoning of *proteus* [S].

[18] WS 287—2008 细菌性和阿米巴性痢疾诊断标准[S].
WS 287—2008 Diagnostic criteria for bacillary amoebic dysentery [S].

[19] WS 271—2007 感染性腹泻诊断标准[S].
WS 271—2007 Diagnostic criteria for infectious diarrhea [S].

[20] WS 280—2008 伤寒和副伤寒诊断标准[S].
WS 280—2008 Diagnostic criteria for typhoid fever and paratyphoid fever [S].

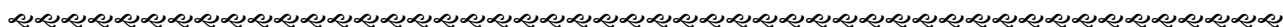
[21] 夏晓华, 朱建国. 浙江省临床少见细菌及真菌鉴定的室间质评分析[J]. 江西医学检验, 2000, 18(4): 260—261.
XIA XH, ZHU JG. External quality evaluation analysis of identification of clinically rare bacteria and fungi in Zhejiang province [J]. Jiangxi J Med Lab Sci, 2000, 18(4): 260—261.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



霍 哲, 硕士, 主管检验技师, 主要研究方向为微生物致病菌检测及溯源分析。
E-mail: rubyrain121118@hotmail.com



食品安全风险评估与风险监测

食品安全问题是“食物中有毒、有害物质对人体健康影响的公共卫生问题”。食品安全要求食品对人体健康造成急性或慢性损害的所有危险都不存在, 是一个绝对的概念, 降低疾病隐患, 防范食物中毒的一个跨学科领域。食品安全中的风险评估是根据各个国家的具体条件来进行判定的, 其中, 人与动物的健康安全情况均在考量范围内。食品安全不仅关系人类与动物的生命健康, 也会关系整个社会经济的可持续发展, 与国家的国际形象和政府形象也有所关联, 更是衡量一个政府执政能力的重要判断指标。

鉴于此, 本刊特别策划了“**食品安全风险评估与风险监测**”专题, 专题将围绕**(1)危害识别、(2)危害特征描述、(3)暴露评估、(4)风险特征描述、(5)区域性风险监测、(6)风险管理**等方面。或您认为本领域有意义的问题综述及研究论文均可, 专题计划在 2021 年 4,5 月出版。

本刊主编国家食品安全风险评估中心**吴永宁技术总师**邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 综述、研究论文和研究简报均可。请在 2021 年 2 月 9 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

投稿方式(注明专题):

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsqa@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部