

基于酸处理的产志贺毒素大肠埃希菌选择性增菌方法研究

李琼琼, 宋明辉, 蒋波, 范一灵, 秦峰, 刘浩, 杨美成*

(上海市食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 上海 201203)

摘要: 目的 开发一套基于酸处理的产志贺毒素大肠埃希菌(*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC)选择性增菌方法, 提高食品中 STEC 菌株的检出率。**方法** 选择 12 株不同血清型 STEC 菌株及 13 株常见干扰菌, 评价其对不同酸处理条件(pH=2.0、2.5、3.0)的耐受性; 考察筛选的酸处理条件对营养胁迫和冷冻胁迫状态 STEC 菌株生长活性的影响; 比较研究酸水解酪蛋白、酵母提取物和丙酮酸钠等成分对胁迫状态 STEC 菌株的促生长作用, 优化酸处理后中和/促生长培养基配方; 比较增菌前与增菌后 2 种酸处理方式对 STEC 菌株分离效果的影响; 最后通过人工污染样品, 评价本研究建立的 STEC 酸处理选择性增菌方法的检测效果。

结果 本研究建立了一种不依赖于抑菌成分的 STEC 选择性增菌方法, 样品在增菌前经酸处理培养基室温处理 2 h, 降低背景杂菌干扰, 再通过中和/促生长培养基[胰蛋白胨大豆肉汤培养基(tryptone soybean broth, TSB)-1.5% Tris-0.1%丙酮酸钠]进行目标菌的增菌培养; 人工污染试验结果表明, 本方法与我国现行 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》标准方法相比, 能够有效减少背景杂菌的干扰、获得更高的 STEC 分离效率。**结论** 本研究建立的基于酸处理的 STEC 选择性增菌方法能够有效提高食品中 STEC 菌株的检测效率和检测准确性。

关键词: 产志贺毒素大肠埃希菌; 酸处理; 选择性增菌; 胁迫状态

Study of a selective enrichment method for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* based on acid treatment

LI Qiong-Qiong, SONG Ming-Hui, JIANG Bo, FAN Yi-Ling, QIN Feng, LIU Hao, YANG Mei-Cheng*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Testing Technology of Pharmaceutical Microbiology, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: Objective To develop a selective enrichment method for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) based on acid treatment which can improve the detection rate of STEC strains in food samples. **Methods** Twelve STEC strains with different serotypes and 13 potential competing species were selected to evaluate their tolerance to different acid treatment conditions (pH=2.0, 2.5, 3.0). The growth of nutrition and freezing stressed STEC strains were evaluated under acid treatment conditions. The effects of acid hydrolyzed casein, yeast extract and sodium pyruvate on the growth promotion of stressed STEC strains were evaluated. After acid treatment, the formula

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1603900)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1603900)

*通信作者: 杨美成, 主任药师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析与微生物学检验。E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

*Corresponding author: YANG Mei-Cheng, Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, No.1500, Zhangheng Road, Pudong District, Shanghai 201203, China. E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

of neutralization / growth promoting medium was optimized. The effects of acid treatment timing (before or after enrichment) on the isolation of STEC strains were also compared. Finally, the established acid treatment selective enrichment method was evaluated through artificially contaminated samples. **Results** A kinds of STEC selective enrichment method was established in this study, which including procedures of acid treatment under room temperature for 2 h, and the enrichment by using the neutralization/growth-promoting medium [tryptone soybean broth (TSB)-1.5%Tris-0.1% sodium pyruvate]. Compared with the current GB 4789.36—2016 *National standard for food safety-Microbiological examination of food-Examination of Escherichia coli* O157:H7/NM standard method, this method could effectively reduce the interference of background miscellaneous bacteria and obtain higher STEC separation efficiency. **Conclusion** The established STEC selective enrichment method based on acid treatment in this study can improve the detection efficiency and accuracy of STEC strains.

KEY WORDS: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; acid treatment; selective enrichment; stressed strains

0 引言

产志贺毒素大肠埃希菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC) 是一类能够产生一种或一种以上志贺毒素的大肠埃希菌的总称, 可引起人类水样腹泻、出血性肠炎及高死亡率的溶血性尿毒综合症等^[1-2]。美国食源性疾病数据显示 STEC 已成为危害排名前 3 位的食源性致病菌^[3-4]。STEC 包括 O157、O26、O45、O103、O104、O111、O121、O145 等 400 多种血清型, 其中 O157:H7 是致病力最强且最为常见的引发食源性疾病的血清型^[5]。但近年来, 非 O157 STEC 血清型在世界范围内引起的散发感染和暴发流行呈递增趋势, 其感染率可达总 STEC 感染的 30%~60%^[6-8]。

高效准确地实现食品样品中 STEC 的检测与分离, 对于有效预防和控制食源性疾病具有重要意义。然而, 目前我国的食品安全国家标准体系中尚无针对非 O157 STEC 的标准检测方法, 国际上也尚无统一有效的方法。现有的非 O157 STEC 标准检测方法中, 如 USDA MLG 5B、FDA/BAM Chapter 4A 和 ISO/TS 13136:2012 等, 均在增菌培养基中使用了不同种类和浓度的选择性抑菌成分以降低背景杂菌的干扰^[9-11]。但是, 由于 STEC 菌株污染量通常较低、遗传多样性丰富、血清型复杂多样, 不同的 STEC 菌株对选择性抑菌成分的耐受性存在较大差异^[12-13], 抑菌成分的添加可能会抑制部分 STEC 菌株的生长。多篇文献^[14-16]报道 STEC 菌株的实际分离率远低于样品中志贺毒素基因的阳性率, 存在严重的漏检风险, 现有 STEC 标准检测方法受到了严峻挑战。

研究发现大肠埃希氏菌具有天然的耐酸系统, 能够在低 pH 条件下生存^[17]。美国学者针对 STEC 中的肠出血性大肠杆菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) 研究发现, 酸处理可以显著降低背景杂菌的数量, 从而提高目标菌的检出率^[18-19], 但该研究主要针对 EHEC, 未涉及

其他 STEC 型别。因此本研究拟开发一套基于酸处理的、广泛适用于不同型别 STEC 菌株的选择性增菌方法, 以期提高食品中 STEC 的检出准确性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器设备

MIR254 恒温培养箱 (日本 SANYO 公司); LABGARD 型生物安全柜 (美国 Nuair 公司)。

胰蛋白胍大豆琼脂 (tryptone soy agar, TSA)、胰蛋白胍大豆肉汤培养基 (tryptone soybean broth, TSB) (美国 BD 公司); 大肠菌群/大肠埃希菌显色培养基 (美国 Bio-Rad 公司); mEC 培养基基础、新生霉素、酸水解酪蛋白、酵母提取物、丙酮酸钠 (高纯 99%) (广东环凯生物科技有限公司); Tris 生物碱 (纯度 >99%, 美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 试验菌株

STEC 菌株包括购自中国工业菌种保藏中心的标准菌株和食品样品分离株, 共计 12 株, 分别对 STEC 菌株血清型和 *stx* 基因型进行鉴定确认, 具体菌株信息见表 1。背景干扰菌株包括食品检测中与 STEC 分离株共存的背景菌, 以及 STEC 近缘的肠杆菌科代表菌, 共计 13 个种, 具体信息见表 2。

1.3 方法

1.3.1 STEC 酸处理培养条件的筛选

将 12 株 STEC 菌株及 13 株背景干扰菌, 分别接种于新鲜 TSB 中, 36 °C 过夜培养后, 分别将 STEC 菌株和背景干扰菌稀释成 10^2 CFU/mL 和 10^4 CFU/mL 的菌悬液备用。使用 1 mol/L HCl 溶液, 将 TSB 分别调节为 pH=2.0、2.5、3.0, 分装于试管, 每管 9 mL。将 1 mL 菌悬液分别加入到试管中, 混匀后室温放置 4 h。每隔 1 h 取 1 mL 混合液, 转接至 9 mL TSB 培养基中, 36 °C 培养 18~24 h。依据 GB 4789.28—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 培

培养基和试剂的质量要求》, 根据 TSB 培养基的浊度, 判断试验菌株酸处理后的存活性。

表 1 STEC 试验菌株信息
Table 1 Information of the tested STEC strains

序号	菌株编号/名称	血清型	stx 基因型
1	CICC21530	O157:H7	stx1+stx2
2	FC7819	O26:H11	stx1
3	FC7821	O45:H2	stx1c+stx2d
4	FC7823	O103:H18	stx1c
5	FC7825	O111:H8	stx1a
6	FC7829	O121:H19	stx2a
7	FC7827	O145:H12	stx1a
8	FC7811	O113:H4	stx1a+stx2d
9	FC7787	O139:H1	stx2e
10	FC7777	O16:H15	stx2d
11	FC7785	O118:H12	stx2b
12	FC7789	O128:H2	stx2f

表 2 非 STEC 试验菌株信息
Table 2 Information of the tested non-STEC strains

序号	菌种名称
1	神户肠杆菌 <i>Enterobacter kobei</i>
2	液化沙雷氏菌 <i>Serratia liquefaciens</i>
3	蜂房哈夫尼亚菌 <i>Hafnia alvei</i>
4	摩氏摩根菌 <i>Morganella morganii</i>
5	豪氏变形杆菌 <i>Proteus Hauser</i>
6	普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>
7	弗氏柠檬酸菌 <i>Citrobacter freundii</i>
8	布氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter braakii</i>
9	产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>
10	阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>
11	肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>
12	阪崎克罗诺菌 <i>Cronobactersakazakii</i>
13	奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i>

1.3.2 胁迫状态 STEC 菌株的耐酸性评价

将营养胁迫(TSB 过夜培养后室温放置 45 d)和冷冻胁迫(生理盐水菌悬液-20 °C 冷冻处理 7 d)状态的 12 株 STEC 菌株分别进行计数, 然后稀释成 10^2 CFU/mL 的菌悬液, 参照 1.3.1, 将菌悬液接种于 pH=2.0 的 TSB 培养基中, 混匀后室温放置 2 h。取 1 mL 混合液转接至 9 mL TSB 培养基中, 36 °C 培养 18~24 h 后判断其存活性。

1.3.3 增菌前与增菌后酸处理方式的比较

选择 CICC21530 (O157)、FC7819 (O26)和 FC7821 (O45) 共 3 株 STEC 菌株及 8 种常见背景干扰菌(表 2, 序号 1~8), 研究增菌前与增菌后 2 种不同酸处理方式对 STEC 菌株分离效果的影响。各取 1 mL 过夜培养的背景干扰菌液, 等比例混合后, 分别稀释到 10^2 、 10^3 和 10^4 CFU/mL 水平。取 10^2 CFU 的 STEC 菌液, 分别与背景菌液混合。

(1)增菌前酸处理: 将 1 mL 上述混合菌液接种至 9 mL

pH=2.0 的 TSB, 室温处理 2 h 后, 转移至 90 mL TSB 培养基, 36 °C 培养 18 h 后, 采用大肠菌群/大肠埃希菌显色培养基进行计数。

(2)增菌后酸处理: 将 1 mL 混合菌液接种至 90 mL TSB 培养基, 36 °C 培养 18 h 后, 吸取 1 mL 增菌液接种至 9 mL pH=2.0 的 TSB 培养基, 室温处理 2 h 后, 采用大肠菌群/大肠埃希菌显色培养基进行计数。

1.3.4 STEC 菌株酸处理后中和/促生长培养基的优化

3 种现行的国外 STEC 标准检测方法中的基础增菌培养基配方比较分析显示(表 3), 不同培养基的差异主要在于酸水解酪蛋白、酵母提取物、丙酮酸钠等添加成分。本研究以 TSB 为基础培养基, 以 Tris 生物碱作为 pH 调节剂, 分别评价了酸水解酪蛋白、酵母提取物和丙酮酸钠对酸处理后 STEC 生长的影响。本研究考察的中和/促生长培养基配方分别为: (1)TSB-1.5% Tris-1%酸水解酪蛋白(TSB-酪蛋白)、(2)TSB-1.5% Tris-0.6% 酵母提取物(TSB-酵母提取物)、(3)TSB-1.5% Tris-0.1%丙酮酸钠(TSB-丙酮酸钠)、(4)TSB-1.5% Tris-1%酸水解酪蛋白-0.6%酵母提取物-0.1%丙酮酸钠(TSB-复合)。其中 1.5% 的 Tris 生物碱可使酸处理培养基与中和/促生长培养基等比例混合后, pH 恢复至中性。

使用酸处理培养基, 将营养胁迫和冷冻胁迫状态的 6 株代表性 STEC 菌株稀释成 1~10 CFU/100 μ L, 加入到 96 孔板中, 室温处理 2 h 后, 分别加入 100 μ L 上述 4 种不同配方的中和/促生长培养基, 36 °C 培养 18~24 h, 使用酶标仪连续监测 STEC 目标菌的生长情况。

1.3.5 人工污染牛肉馅样品中 STEC 的检测

(1)制备人工污染样品

市购新鲜牛肉馅样品, 采用 USDA MLG 5B.05 方法进行 STEC 检测, 结果显示样品 STEC 阴性, 本底污染微生物数量为 4.2×10^5 CFU/g; 经 TSB 培养基过夜增菌、大肠菌群/大肠埃希菌显色培养基计数, 证实样品中大肠埃希氏菌为阴性。取新鲜培养的 STEC 菌株 CICC21530 (O157)、FC7819 (O26)和 FC7821 (O45)的菌悬液, 分别制备目标菌污染量约为 1 CFU/g 的人工污染样品。

(2)酸处理增菌方法检测

(a)取 25 g 人工污染样品, 加入 125 mL pH=2.0 的 TSB 酸处理培养基, 混匀后室温放置 2 h; (b)加入 125 mL 中和/促生长培养基 TSB-1.5% Tris-0.1%丙酮酸钠, 36 °C 培养 18~24 h; (c)分别使用大肠菌群/大肠埃希菌显色培养基进行目标菌 STEC 的计数。

(3)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》方法检测

(a)取 25 g 人工污染样品, 加入 225 mL mEC+n 肉汤, 混匀后 36 °C 培养 18~24 h; (b)取增菌后的 mEC+n 肉汤, 分别使用大肠菌群/大肠埃希菌显色培养基进行目标菌 STEC 的计数。

2 结果与分析

2.1 STEC 和常见干扰菌的耐酸性评价

12 株 STEC 及 13 株常见背景干扰菌对不同酸处理培养基(pH=2.0、2.5、3.0)的耐受性结果,如表 4 所示。结果显示,所有 STEC 试验菌株在 pH=2.0 培养基中酸处

理 4 h 后均能存活,而 13 株背景干扰菌,则表现出了明显的耐酸性差异。其中 *Morganella morganii*、*Proteus vulgaris*、*Proteus mirabilis* 尽管比其他背景菌具有更强的耐酸性,但 pH=2.0 处理 2 h 后也丧失了存活能力。综上,pH=2.0 室温处理 2 h,可作为 STEC 菌株酸处理的有效筛选条件。

表 3 3 种基础培养基配方组分的比较
Table 3 Comparison of components of 3 kinds of basic medium formulations

改良胰蛋白胨大豆肉汤 mTSB (ISO/TS 13136:2012)	改良胰蛋白胨大豆肉汤 mTSB (USDA MLG 5B.05)	改良缓冲蛋白胨水培养基 mBPWp (FDA/BAM Chapter 4A)
胰酪胨 17.0 g	胰酪胨 17.0 g	蛋白胨 10.0 g
大豆酶解物 3.0 g	大豆酶解物 3.0 g	/
3 号胆盐 1.5 g	3 号胆盐 1.5 g	乳糖 10.0 g
葡萄糖 2.5 g	葡萄糖 2.5 g	酸水解酪蛋白 5.0 g
/	酸水解酪蛋白 10.0 g	酵母提取物 6.0 g
/	/	丙酮酸钠 1.0 g
/	/	NaCl 5.0 g
NaCl 5.0 g	NaCl 5.0 g	Na ₂ HPO ₄ 3.6 g
K ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 4.0 g	K ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 4.0 g	KH ₂ PO ₄ 1.5 g
/	/	

注:“/”表示无此项。

表 4 STEC 及背景干扰菌株在不同酸处理条件下的生长情况
Table 4 Growth of STEC and background interfering strains under different acid treatment conditions

菌株	pH=3.0				pH=2.5				pH=2.0			
	1 h	2 h	3 h	4 h	1 h	2 h	3 h	4 h	1 h	2 h	3 h	4 h
目标菌												
CICC 21530 (O157)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC7819 (O26)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC7821 (O45)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC7823 (O103)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC7825 (O111)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC7829 (O121)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC7827 (O145)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC7811 (O113)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC7787 (O139)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC7777 (O16)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC7785 (O118)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC7789 (O128)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter kobei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Proteus hauser</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
非目标菌												
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter braakii</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cronobactersakazakii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

注:“+”表示耐受,“-”表示不耐受。

2.2 胁迫状态 STEC 菌株的耐酸性结果

营养胁迫和冷冻胁迫状态的 12 株 STEC, 在酸处理培养基(pH=2.0)室温处理 2 h 后, 均显示出了较好的生长特性(图 1)。研究结果显示, 低 pH 处理不会明显影响胁迫状态 STEC 菌株的生长。

2.3 增菌前和增菌后酸处理方式对 STEC 分离效果的影响

增菌前和增菌后 2 种不同的酸处理方式下, 目标菌 STEC 和背景菌的定量检测结果表明(表 5): 对于不同接种量的背景菌, 增菌前进行酸处理, 显色培养基上均未检出背景菌, 而 3 株 STEC 的检出数量均在 $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL 之间; 增菌后进行酸处理, 3 株 STEC 的检出数量在 $10^5 \sim 10^7$ CFU/mL 之间, 当背景菌接种量为 10^4 CFU 时, 背景菌检出量明显高于 STEC 菌株, 严重干扰 STEC 的检出。因此, 在试验的污染菌量条件下, 增菌前进行酸处理能够更有效地降低背景菌对 STEC 检测的干扰。

2.4 中和/促生长培养基中不同添加成分对 STEC 生长效果的影响

图 2 显示了酸水解酪蛋白、酵母提取物和丙酮酸钠等不同添加成分, 对营养胁迫状态 STEC 菌株生长的影响, 结

果表明不同添加成分对于 STEC 试验菌株, 均未表现出明显差异。图 3 显示了不同添加成分对冷冻胁迫状态 STEC 菌株生长的影响, 结果表明丙酮酸钠相比于其他成分具有一定的促生长作用, 特别是对于血清型 O111、O145 的 STEC 菌株。因此, 本研究选择 TSB-1.5% Tris-0.1%丙酮酸钠(TSB-丙酮酸钠)作为 STEC 酸处理后的中和/促生长培养基。

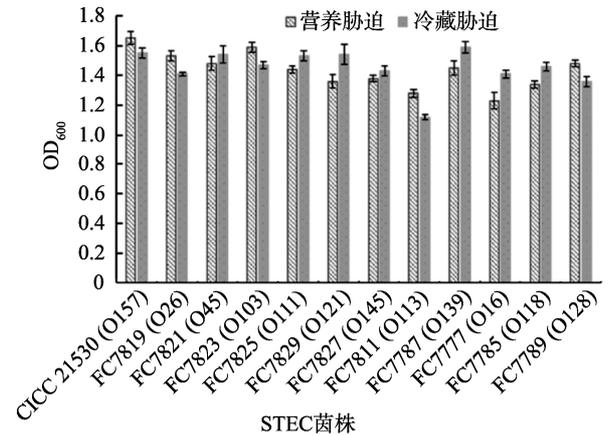


图 1 胁迫状态 STEC 菌株酸处理后的生长情况(n=3)
Fig.1 Growth of STEC strains under stress state after acid treatment (n=3)

表 5 增菌前和增菌后酸处理 STEC 和背景菌菌落计数结果
Table 5 Counting results of STEC and background bacteria colony under acid treatment before or after enrichment

酸处理	背景菌添加量/CFU	计数结果/(CFU/mL)					
		CICC21530 (O157)	背景菌	FC7819 (O26)	背景菌	FC7821 (O45)	背景菌
增菌前	10^2	8.3×10^8	<10	1.0×10^9	<10	9.5×10^8	<10
	10^3	7.6×10^8	<10	1.1×10^9	<10	1.1×10^9	<10
	10^4	9.2×10^8	<10	1.2×10^9	<10	1.3×10^9	<10
增菌后	10^2	1.8×10^6	<10	1.0×10^7	<10	1.2×10^7	<10
	10^3	1.0×10^6	5.0×10^5	3.2×10^6	6.0×10^5	2.4×10^6	8.0×10^5
	10^4	3.0×10^5	8.0×10^5	6.1×10^6	5.3×10^6	5.4×10^6	1.9×10^7

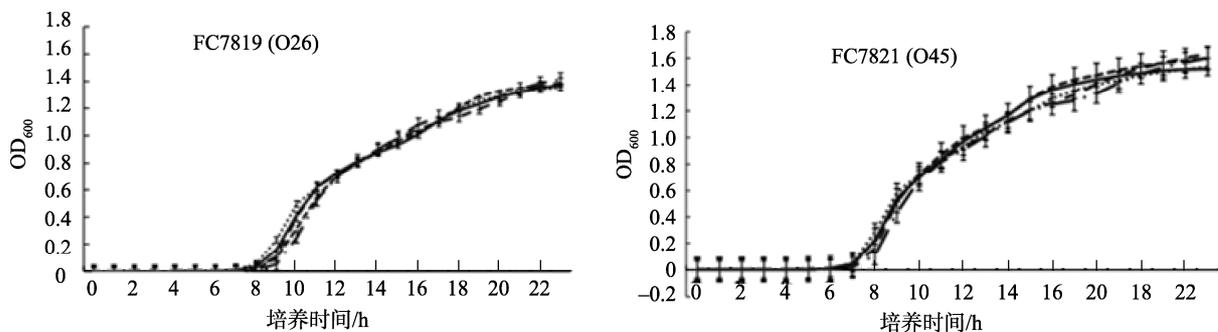


图 2 中和/促生长培养基中不同添加成分对营养胁迫状态 STEC 生长的影响(n=3)
Fig.2 Effects of different additives in the neutralization/growth promotion medium on the growth of nutrition stressed STEC strains (n=3)

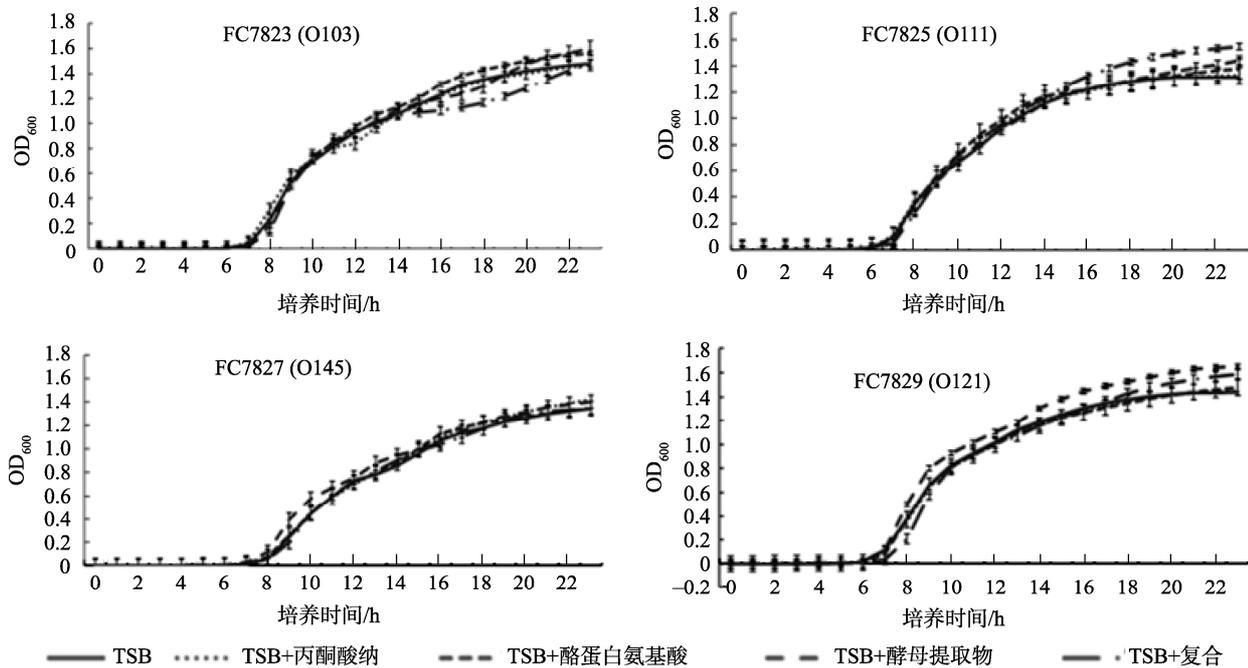


图 2(续) 中和/促生长培养基中不同添加成分对营养胁迫状态 STEC 生长的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of different additives in the neutralization/growth promotion medium on the growth of nutrition stressed STEC strains ($n=3$)

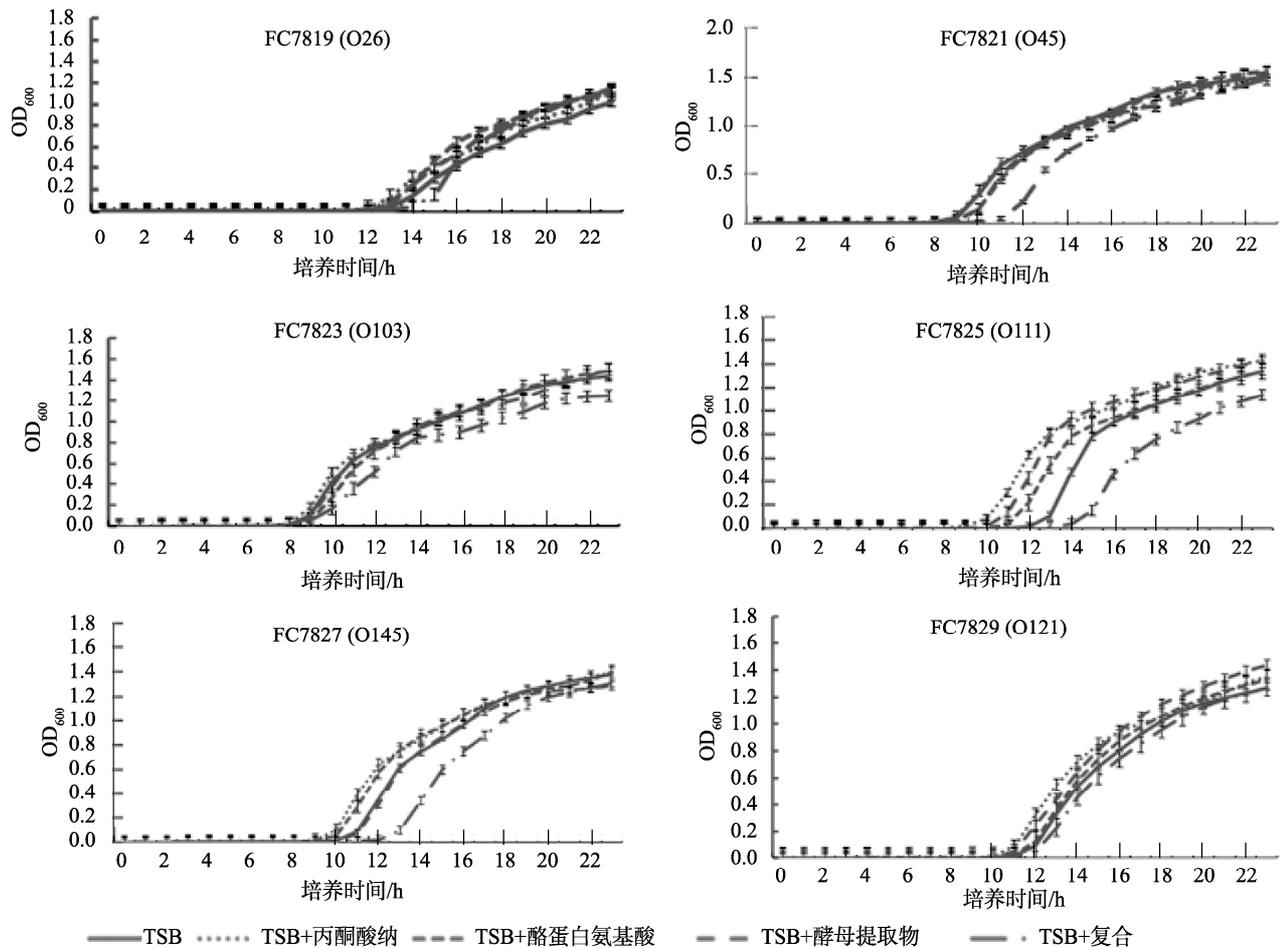
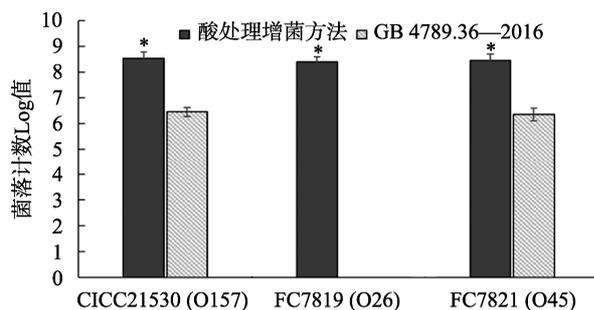


图 3 中和/促生长培养基中不同添加成分对冷冻胁迫状态 STEC 菌株生长的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of different additives in neutralization/growth-promoting medium on the growth of freezing stressed STEC strains ($n=3$)

2.5 STEC 检测方法的比较评价

采用本研究建立的 STEC 酸处理增菌方法和 GB 4789.36—2016 方法分别对牛肉馅食品样品中人工污染的 STEC 菌株进行检测, 结果如图 4 所示。检测结果表明, 在样品本底污染量为 4.2×10^5 CFU/g 时, 采用 STEC 酸处理增菌方法, 对于 CICC21530 (O157)、FC7819 (O26) 和 FC7821 (O45) 3 株菌, 均能获得 10^8 CFU/mL 以上的生长量。采用 GB 4789.36—2016 方法, 对于 CICC21530 (O157) 和 FC7821 (O45) 仅能够获得 10^6 CFU/mL 的生长量, 而 FC7819 (O26) 则无法有效检出。显著性差异分析表明 STEC 酸处理增菌方法明显优于 GB 4789.36—2016 方法 ($P < 0.05$)。



注: * $P < 0.05$ 表示两种方法具有显著性差异。

图 4 STEC 酸处理增菌方法与 GB 4789.36—2016 对人工污染样品定量检测结果 ($n=3$)

Fig.4 Quantitative detection results of STEC in artificially contaminated samples by acid treatment enrichment method and GB 4789.36—2016 method ($n=3$)

3 结论与讨论

食源性致病菌检测的关键策略是通过提高目标菌的数量或降低背景干扰菌的数量, 来实现对目标菌的有效分离。现有标准中 STEC 的选择性增菌培养基, 主要通过添加一定浓度的亚硝酸钾、新生霉素、头孢菌素、吡啶黄等选择性抑菌成分来降低背景杂菌的干扰, 然而不同血清型的 STEC 菌株对抑菌成分的耐受性存在较大差异^[12-13], 选择性抑菌成分的使用可能会导致“假阴性”检测结果。因此, 本研究利用大肠埃希菌天然耐酸的特性, 首先通过酸处理培养基使背景干扰菌失活, 从而使得目标菌 STEC 成为优势菌, 再通过中和/促生长培养基对 STEC 进行增菌培养, 在不使用选择性抑菌剂的情况下实现对 STEC 的选择性增菌。与 LAMPARTER 等^[19]建立的针对 EHEC 的方法相比, 本研究涉及了更广泛的 STEC 型别, 评价了包括欧美主要 6 种致病血清型在内的 12 种不同血清型 STEC 菌株, 以及常见干扰菌的耐酸性特征。结果表明所有 STEC 试验菌株在 pH=2.0 培养基中酸处理 4 h 后均能存活, 与前期报道一

致^[18]。13 种背景干扰菌表现出了明显的耐酸性差异, 但 pH=2.0 处理 2 h 后都丧失了存活能力。进一步表明, 开发基于酸处理的 STEC 选择性增菌培养基, 可以通过抑制背景干扰菌的生长, 实现对目标菌 STEC 的有效分离。

食源性致病微生物在食品加工、运输和储存过程中可能会受到一定程度的损伤, 本研究模拟了营养胁迫和冷冻胁迫 2 种常见的损伤状态, 对 STEC 菌株的耐酸性及酸处理选择性增菌方法进一步评价。研究结果表明 2 种胁迫状态的 STEC 菌株, 经过 pH=2.0 酸处理 2 h 仍具有较好的活性, 建立的基于酸处理的 STEC 选择性增菌方法对于胁迫状态的 STEC 菌株亦具有较好的适用性。本研究也对中和/促生长培养基的配方进行了优化, 配方 TSB-1.5% Tris-0.1% 丙酮酸钠对冷冻胁迫 STEC 菌株的恢复生长优于其他配方, 与文献报道的丙酮酸钠对于受损伤菌株具有恢复作用结果一致^[20]。

此外, 选择性增菌的效果往往会因为背景菌数量过高及构成的复杂性而受到影响。USDA MLG 5B 方法中使用增菌后酸处理的方式对 STEC 菌株进行检测。因此, 本研究也比较研究了“增菌前酸处理”和“增菌后酸处理”2 种不同的酸处理方式对 STEC 菌株的实际分离效果。结果表明, 在试验条件下, 2 种不同的酸处理方均可以实现对目标菌 STEC 的分离。但是, 当背景干扰菌污染量较大程度高于 STEC 菌株时, “增菌前酸处理”能够更有效地抑制背景杂菌, 获得更高的目标菌生长量, 从而更易于实现对目标菌的分离。人工污染试验结果也表明, 相较于 GB 4789.36—2016 方法, “增菌前酸处理”的方式可以更高效准确地实现对试验菌株的检测。

综上, 本研究通过酸处理条件的筛选、胁迫状态 STEC 菌株对酸处理条件耐受性的评价、增菌前和增菌后不同酸处理方式的比较和酸处理后中和/促生长培养基配方的优化, 建立了基于酸处理的 STEC 选择性增菌方法, 人工污染试验表明, 相较于 GB 4789.36—2016 方法, 本研究建立的基于酸处理的 STEC 选择性增菌方法, 能够更有效减少背景杂菌的干扰、具有更高的检测效率和检测准确性。

参考文献

- [1] BRYAN A, YOUNGSTER I, MCADAM AJ. Shiga toxin producing *Escherichia coli* [J]. Clin Lab Med, 2015, 35(2): 247-272.
- [2] BRURAND M, MARIANI-KURKDJIAN P, GOUALI M, et al. Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection [J]. Med Mal Infect, 2018, 48(3): 167-174.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2017 Annual Report [Z].
- [4] KIM JS, LEE MS, KIM JH. Recent updates on outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its potential reservoirs [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 273.
- [5] CROXEN MA, FINLAY BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity [J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(2): 26-38.

- [6] LUNA-GIERKE RE, GRIFFIN PM, GOULD LH, *et al.* Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA [J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142(11): 2270–2280.
- [7] PROJAHN M, LAMPARTER MC, GANAS P, *et al.* Genetic diversity and pathogenic potential of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) derived from German flour [J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 347(11): 109197.
- [8] BLANKENSHIP HM, MOSCI RE, DIETRICH S, *et al.* Population structure and genetic diversity of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) clinical isolates from Michigan [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1). DOI: 10.1038/s41598-021-83775-z
- [9] LQAS/FSIS. MLG 5B.04-Detection and isolation of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from meat products and carcass and environmental sponges [Z]. 2013.
- [10] FDA BAM Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli* [Z].
- [11] International Organization for Standardization (ISO). ISO/TS 13136: 2012-Microbiology of food and animal feed: Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens-Horizontal method for the detection of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups [Z].
- [12] HIRVONEN JJ, SIITONEN A, KAUKORANTA SS. Usability and performance of chromagar STEC medium in detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50: 3586–3590.
- [13] 巴鹏斌, 孟琼, 白向宁, 等. 非 O157 产志贺毒素大肠埃希菌研究进展 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2017, 33(2): 156–162.
BA PB, MENG Q, BAI XN, *et al.* Research progress on non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. *Chin J Zoono*, 2017, 33(2): 156–162.
- [14] 白向宁, 王红, 赵爱兰, 等. 食源性产志贺毒素大肠杆菌的分离及菌株特征分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(4): 312–317.
BAI XN, WANG H, ZHAO AL, *et al.* Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates in foods [J]. *Chin J Food Hyg*, 2014, 26(4): 312–317
- [15] BOSILEV AC, KOOHMARAIE JM. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(6): 2103–2112.
- [16] COBBOLD RN, DAVIS MA, RICE DH, *et al.* Associations between bovine, human, and raw milk, and beef isolates of non-O157 Shiga toxigenic *Escherichia coli* within a restricted geographic area of the United States [J]. *J Food Prot*, 2008, 71(5): 1023–1027.
- [17] VIDOVIC S, KORBER DR. *Escherichia coli* O157: Insights into the adaptive stress physiology and the influence of stressors on epidemiology and ecology of this human pathogen [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2016, 42(1): 83–93
- [18] GRANT MA. Improved laboratory enrichment for enterohemorrhagic *Escherichia coli* by exposure to extremely acidic conditions [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 1226–1230.
- [19] LAMPARTER MC, SEEMANN A, HOBE C, *et al.* Using hydrochloric acid and bile resistance for optimized detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from sprouts [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 322: 108562.
- [20] KNABELSJ, THIELEN SA. Enhanced recovery of severely heat injured, thermo tolerant *Listeria monocytogenes* from USDA and FDA primary enrichment media using a novel, simple, strictly anaerobic method [J]. *J Food Prot*, 1994, 58: 29–34.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



李琼琼, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品微生物学检验与质量控制。
E-mail: lqq1986228@126.com



杨美成, 主任药师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析与微生物学检验。
E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com