

· 短篇论著 ·

鉴定大肠埃希菌 O157:H7 的表型特征探讨

马 爽¹, 何冬梅², 林 铿¹, 马 翔³

(1. 广州市花都区妇幼保健院检验科, 广东广州 510800; 2. 广东省疾病预防控制中心, 广东广州 511430; 3. 广州花都人爱医院, 广东广州 510800)

摘要:目的 探讨大肠埃希菌 O157:H7 特有的表型特征并应用于鉴定。方法 用 4-甲基伞型酮- β -D-葡萄糖醛酸苷(MUG)和山梨醇试验鉴别 3 株大肠埃希菌 O157:H7 标准菌株以及大肠埃希菌 ATCC 25922(ATCC 25922)、侵袭性大肠埃希菌(EIEC)、产肠毒素大肠埃希菌(ETEC)、肠致病性大肠埃希菌(EPEC)和肠聚集性大肠埃希菌(EAEC),并用全自动微生物鉴定系统 VITEK 2-compact 等自动化仪器及血清学做进一步鉴定,对健康体检者粪便中检出的大肠埃希菌也进行了鉴定。结果 3 株大肠埃希菌 O157:H7 的 MUG 和山梨醇均阴性,EPEC O111 的 MUG 阳性、山梨醇阴性,其他大肠埃希菌的 MUG 和山梨醇均阳性。来自粪便的 357 株大肠埃希菌中,检出 MUG 阴性或山梨醇阴性及 MUG 和山梨醇均为阴性的大肠埃希菌 95 株。大肠埃希菌 O157:H7 被 VITEK 2-Compact 明确筛查出来。仅大肠埃希菌 O157:H7 与 O157 血清凝集,试验的其他大肠埃希菌及粪便中的 95 株大肠埃希菌全部不与 O157 血清凝集。ATB 半自动微生物仪及基质辅助激光解吸-飞行时间质谱仪(VITEK MS)不能鉴定大肠埃希菌 O157:H7。结论 MUG 和山梨醇发酵试验联合应用,对大肠埃希菌 O157:H7 有较高的筛查准确率,效果优于其他方法,但必须经血清学鉴定。

关键词:致泻性大肠埃希菌; O157:H7; 表型特征

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.15.030

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2019)15-1908-04

文献标识码:B

致泻性大肠埃希菌包括产志贺毒素大肠埃希菌(STEC),侵袭性大肠埃希菌(EIEC),产肠毒素大肠埃希菌(ETEC),肠致病性大肠埃希菌(EPEC)和肠聚集性大肠埃希菌(EAEC)。其中,STEC 能导致血性腹泻、出血性肠炎,甚至严重的溶血性尿毒症综合征(HUS),国内外已有报道^[1-3]。但是,大肠埃希菌 O157:H7 为典型的大肠埃希菌特征,常规方法不能识别出来。笔者观察到粪便标本中的多数大肠埃希菌的 MUG 和山梨醇阳性,而大肠埃希菌 O157:H7 标准菌株的 MUG 和山梨醇均阴性。为此,通过对大肠埃希菌的 MUG 和山梨醇 2 项试验的单独和联合试验的结果分析,探讨大肠埃希菌 O157:H7 鉴定的实用方法,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基 哥伦比亚血平板、麦康凯平板、山梨醇麦康凯平板购自广州市迪景微生物科技有限公司,大肠埃希菌 O157 显色平板购自法国科玛嘉公司。诊断血清:大肠埃希菌诊断血清购自丹麦国家血清研究院。OK O Pool 1 血清(内含 O157 血清型)批号: P1Q1-2H1,有效期 2021-07-30; O157 单价血清批号: O157 K1-1H2,效期 2020-01-03; H7 单价血清批号:

H7E1-H15,有效期至 2021-06-06,均在有效期内。

1.1.2 生化管 MUG 和山梨醇生化管购自杭州滨河微生物试剂有限公司,均在有效期内。

1.1.3 试验菌株 大肠埃希菌 O157:H7(ATCC 43888)、大肠埃希菌 O157:H7(NCTC 12900)、大肠埃希菌 O157:H7(卫生部室间质评菌株 1708)3 株标准菌株以及大肠埃希菌 ATCC 25922、EIEC O143、ETEC、EPEC O111、EAEC 各 1 株,均为本室收藏质控菌株。

1.1.4 临床菌株 2018 年 4 月至 2019 年 2 月广州市花都区餐饮从业人员粪便(肛拭子)中随机检出的大肠埃希菌 357 株。

1.2 仪器与试剂 ATB 半自动微生物仪及 32E 鉴定条和吡啶试剂、VITEK 2-compact 全自动微生物仪及革兰阴性菌鉴定卡(GN 卡),法国生物梅里埃公司生产,鉴定条、鉴定卡及试剂均在有效期内。基质辅助激光解吸-飞行时间质谱仪(VITEK MS),法国梅里埃公司生产。DHP-9052 电热恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司生产。ZF-80 型暗箱四用紫外线分析仪,上海嘉鹏科技有限公司生产。

1.3 方法 通过实验菌株的菌落特征、MUG 和山梨醇发酵试验结果以及自动化仪器鉴定、血清学试验鉴

定大肠埃希菌 O157:H7, 找出该菌的鉴定特征。用哥伦比亚血平板复苏大肠埃希菌 O157:H7、ATCC 25922、EIEC O143、ETEC、EPEC O111、EAEC 六种菌, 同时接种 MUG 和山梨醇生化管, 并划线接种麦康凯平板、山梨醇麦康凯平板、大肠埃希菌 O157 显色平板观察菌落特征, 并做玻片法血清学凝集试验。健康体检人员的粪便拭子划线接种山梨醇麦康凯平板, 35 °C 孵育 18~24 h, 挑选无色透明(山梨醇阴性)、红色(山梨醇阳性)菌落转种哥伦比亚血平板经 35 °C 孵育 18~24 h, 取革兰阴性、氧化酶阴性的培养物, 用 ATB 进行生化鉴定, 鉴定出的大肠埃希菌(选择好的或者极好的鉴定菌株)接种 MUG 和山梨醇生化管。对 MUG 阴性或山梨醇阴性以及 2 项试验均阴性的大肠埃希菌划线接种麦康凯平板、大肠埃希菌 O157 显色平板, 观察菌落特征并做玻片法血清凝集试验。对 3 株大肠埃希菌 O157:H7 及 ATCC 25922、EIEC O143、ETEC、EPEC O111、EAEC 共 8 株菌全部用 ATB 半自动微生物仪、VITEK 2-compact、VITEK MS 鉴定。对粪便中检出的 MUG 和山梨醇 2 项试验均阴性的大肠埃希菌(已经 ATB 半自动微生物仪鉴定), 再用 VITEK 2-compact 鉴定。过夜的 MUG 培养液在紫外线下观察荧光, 阳性菌株为蓝绿色荧光; 山梨醇发酵, 培养基由紫变黄。每批试验用大肠埃希菌 ATCC 25922 做阳性对比, 大肠埃希菌 O157:H7 做阴性对比。用 3 株大肠埃希菌 O157:H7 标准菌株和 1 株大肠埃希菌 ATCC 25922 标准菌株质控实验条件。

2 结 果

质控菌株的 MUG 和山梨醇以及血清学试验质量控制合格, 3 株大肠埃希菌 O157:H7 的 MUG 和山梨醇均阴性、与大肠埃希菌 O157 多价、O157 单价及

H7 单价血清凝集。其他的大肠埃希菌结果明确。MUG 和山梨醇试验及大肠埃希菌 O157:H7 血清学试验的质量控制结果如下。MUG(+)山梨醇(+): 大肠埃希菌 ATCC 25922; MUG(-)山梨醇(-)为 O157:H7 ATCC 43888、O157:H7 NCTC 12900、O157:H7 卫生部质评菌 1807; O157:H7 血清学(+)为 O157:H7 ATCC 43888、O157:H7 NCTC 12900、O157:H7 卫生部质评菌 1807; O157:H7 血清学(-)为大肠埃希菌 ATCC 25922。

3 株大肠埃希菌 O157:H7 菌在麦康凯平板上为红色菌落(乳糖阳性), 在山梨醇麦康凯平板上为无色透明菌落(山梨醇阴性), 在大肠埃希菌 O157 显色平板为紫红色菌落, 见图 1。EPEC O111 发酵乳糖, 不发酵山梨醇, 在麦康凯平板和山梨醇麦康凯平板上的菌落特征与大肠埃希菌 O157:H7 相似, 但在 O157 显色平板上的绿色菌落可区别; ATCC 25922、EIEC O143、ETEC、EAEC 因发酵乳糖和山梨醇, 在麦康凯平板和山梨醇麦康凯平板上均为红色菌落, 在大肠埃希菌 O157 显色平板为蓝色、绿色菌落, 这些大肠埃希菌的菌落特征相同, 见表 1。

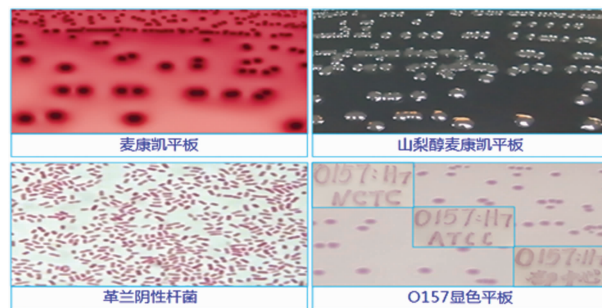


图 1 大肠埃希菌 O157:H7 菌落及菌体特征

表 1 大肠埃希菌 O157:H7 及其他大肠埃希菌的表型特征

项目	MUG(+) 山梨醇(+)	MUG(+) 山梨醇(-)	MUG(-) 山梨醇(-)
菌株	ATCC25922、EIEC、ETEC、EAEC	EPEC O111	O157:H7
麦康凯平板菌落	红色	红色	红色
山梨醇麦康凯平板菌落	红色	无色透明	无色透明
O157 显色平板菌落	蓝色、绿色	绿色	紫红色
ATB 鉴定	大肠埃希菌	大肠埃希菌	大肠埃希菌
VITEK 2-compact	大肠埃希菌	大肠埃希菌	O157
VITEK MS 鉴定	大肠埃希菌	大肠埃希菌	大肠埃希菌

三株大肠埃希菌 O157:H7 的 MUG 和山梨醇试验均阴性; EPEC O111 的 MUG 阳性, 山梨醇阴性; 其他的菌株 2 项试验均阳性, 见图 2, 图 3; 山梨醇试验

结果与山梨醇麦康凯平板菌落特征吻合。

试验的菌株中, 3 株大肠埃希菌 O157:H7 均与大肠埃希菌 O157、大肠埃希菌 H7 血清凝集, 其他的 5

株大肠埃希菌血清学试验阴性。

三株大肠埃希菌 O157:H7 经 ATB 半自动微生物仪鉴定为大肠埃希菌(好的或者极好的鉴定), VITEK MS 鉴定也是大肠埃希菌,因此,这两种仪器均不能明确鉴定大肠埃希菌 O157:H7。但是 VITEK 2-compact 鉴定为大肠埃希菌 O157,提示高致病微生物,需进行血清学确认。其他 5 株大肠埃希菌均被 3 种自动化仪器鉴定为大肠埃希菌。

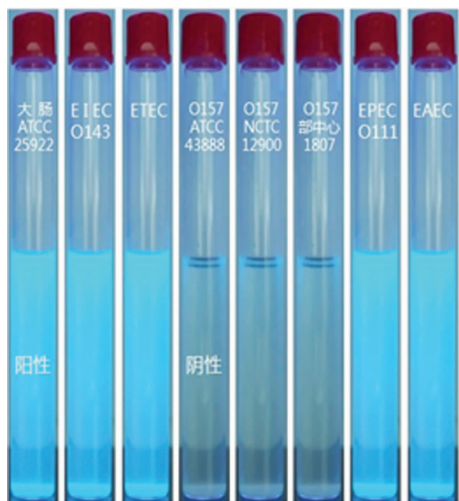


图 2 普通大肠埃希菌和致泻大肠埃希菌的 MUG 试验

粪便中的 357 株大肠埃希菌经 ATB 半自动微生物仪鉴定,均为好的或极好的鉴定。山梨醇试验结果与山梨醇麦康凯平板上的菌落特征吻合, MUG 和山梨醇试验结果及在这几种平板上的菌落特征见表 2。此外,筛选出的 MUG 阴性或山梨醇阴性及 2 项试验均阴性的 95 株大肠埃希菌与 O157 血清不发生凝集,从健康体检者粪便中没有检出大肠埃希菌 O157:H7。

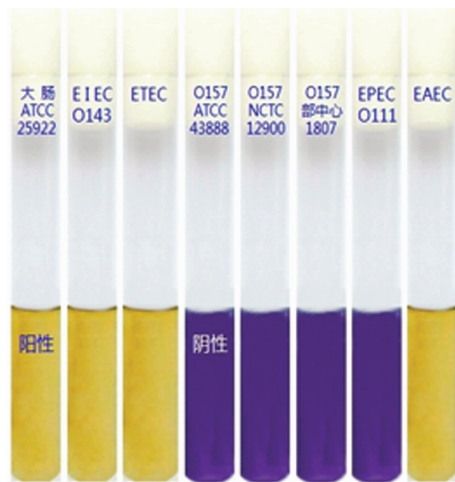


图 3 普通大肠埃希菌和致泻大肠埃希菌的山梨醇试验

表 2 357 株健康体检者粪便大肠埃希菌的表型特征

试验组合	MUG(-)山梨醇(-)	MUG(-)山梨醇(+)	MUG+山梨醇(-)	MUG(+)山梨醇(+)
构成[n(%)]	8(2.2)	56(15.7)	31(8.7)	262(73.4)
麦康凯平板菌落	红色	红色	红色	红色
山梨醇麦康凯平板菌落	无色透明	红色	无色透明	红色
O157 显色平板菌落	蓝、绿色	蓝、绿色	蓝、绿色	蓝、绿色
ATB 鉴定	大肠埃希菌	大肠埃希菌	大肠埃希菌	大肠埃希菌
VITEK 2-compact	大肠埃希菌	未做	未做	未做
VITEK MS 鉴定	大肠埃希菌	未做	未做	未做
O157 血清	不凝集	不凝集	不凝集	未做

3 讨 论

大肠埃希菌 O157:H7 的 MUG 阴性,山梨醇阴性^[1,3-5],有两个血清型,85%为 O157:H7(有动力),12%为 O157:HNM(无动力),3%是 H7 以外的 H 型。由于临床微生物室通常不将其作为目的菌,且此菌在麦康凯平板上是红色菌落,可能作为非致病菌排除。

来自粪便中的 357 株大肠埃希菌,未检出 O157:H7,可能与健康人群带菌率低有关。虽然,根据 MUG 或山梨醇单一试验可以筛查 O157^[6-8],但有较高的假阳性,因 MUG 和山梨醇均阴性的大肠埃希菌只有 2.2%,故选择“双阴”菌株作进一步鉴定,特别在大批量标本筛查时省时省力、且节省血清。单独的山

梨醇麦康凯平板、大肠埃希菌 O157 显色平板筛查不及 MUG 和山梨醇 2 项试验联合应用^[9-12],使用 VITEK 2-compact 成本昂贵,不适合大批量筛查。

大肠埃希菌 O157:H7 的 MUG 和山梨醇均阴性,直接用于可疑菌筛查简便易行,此特征是其他的致泻性大肠埃希菌所没有的,在各种致泻性大肠埃希菌筛查中有明确的鉴别作用。有报道极少的 MUG 阳性的大肠埃希菌 O157 菌株检出^[5],此种情况下表型特征不适合其鉴别。此外,应注意粪便中常见的摩根摩根菌 MUG 和山梨醇均阴性,少见的蜂房哈夫尼亚菌也是阴性。粪便中的铜绿假单胞菌(常见)和恶臭假单胞菌的 MUG 阳性(这 2 种菌自身也产生荧光),二者都不发酵山梨醇。

MUG 快速法可在 4 h 出结果,应注意阴性的大肠埃希菌在延长培养后阳性。不要盲目加快速度,对可疑菌株延长观察时间,以保证结果的准确。

大肠埃希菌 O157:H7 在 O157 显色平板上为紫红色菌落,着色明显,而非大肠埃希菌 O157:H7 的菌落为蓝色、绿色,有良好筛查作用,其平板成本较高。来自粪便的 357 株大肠埃希菌在 O157 显色平板上为蓝色、绿色菌落。同时应排除其他细菌在 O157 显色平板上的紫红色菌落^[13]。此外,笔者在试验中观察到沙门菌属中的某些血清型,如肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌在 O157 显色平板上也是紫红色菌落,需引起重视。大肠埃希菌 O157:H7 在山梨醇麦康凯平板上为无色透明菌落,且价廉,与 MUG 组合筛查为佳。麦康凯平板及 ATB 半自动微生物仪和 VITEK MS 均不适合大肠埃希菌 O157:H7 的筛查。

MUG 和山梨醇发酵试验简便易行,成本低廉,不受试验条件限制,适合各级实验室;山梨醇麦康凯平板及大肠埃希菌 O157 显色平板也有较好的筛查作用。VITEK 2-compact 能明确筛查大肠埃希菌 O157,并提示为高致病微生物,但是成本昂贵,不适合大批量标本的筛查,可用于筛查出菌株的补充鉴定。对筛查出的菌株必须用血清学试验鉴定。包括无动力或 H7 抗原阴性的菌株应送上级实验室进行毒素或毒素基因的检测和确认。

通过分析大肠埃希菌 O157:H7 三株标准菌株以及 ATCC 25922、EIEC O143、ETEC、EPEC O111、EAEC、临床标本中的大肠埃希菌在 VITEK 2-compact GN 卡中的 48 项试验结果,发现其中的山梨醇和 β-葡萄糖醛酸酶 2 项试验是区别大肠埃希菌 O157 与其他大肠埃希菌的关键特征,而 MUG 可以鉴定产 β-葡萄糖醛酸酶的细菌^[14]。因此,MUG 和山梨醇试验作为鉴定大肠埃希菌 O157:H7 的首选试验。

MUG 和山梨醇发酵试验联合应用,对大肠埃希菌 O157:H7 有较高的筛查准确率,效果优于其他方法,但必须经血清学鉴定。

参考文献

[1] 任冰,王金良,陈民钧. O157:H7 型大肠埃希菌的流行和病原学诊断[J]. 中华医学检验杂志,1997,20(3):184-

187.

- [2] 孔令娜,黎健,马飞飞,等. 上海市由腹泻综合监测系统发现的 1 例 O157:H7 感染性腹泻病例的确认及流行病学调查[J]. 职业与健康,2018,34(1):120-122.
- [3] 龚甫哲,龚震宇. 2017 年 6—7 月美国亚利桑那州和犹他州农村社区与动物粪便接触有关的大肠埃希菌 O157:H7 暴发疫情调查[J]. 疾病监测,2018,33(10):883-884.
- [4] 周雯,陈雨欣,苏粉良,等. 大肠埃希菌 O157:H7 三种标准中的检测方法比较[J]. 农产品加工,2016,11(1):40-42.
- [5] 王辉,马筱玲,钱渊,等. 临床微生物学手册[M]. 11 版. 北京:中华医学电子音像出版社,2017:865-889.
- [6] 薛力刚,王丹. 出血性大肠杆菌 O157:H7 的诊断与防治[J]. 吉林畜牧兽医,2018(2):15-15.
- [7] 罗玲,罗青平,温国元,等. 乳胶凝集试验快速检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的研究[J]. 中国家禽,2017,39(6):49-52.
- [8] 石瑞智,范龙兴,田赛,等. 食源性大肠杆菌 O157:H7 检测方法的研究进展[J]. 职业与健康,2018,34(3):425-428,432.
- [9] 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,2016,37(4):176-180.
- [10] 陈玲,王少辉,汤芳,等. 江苏地区动物粪便及食品中大肠杆菌 O157 的生物学特性分析[J]. 畜牧与兽医,2016,48(5):1-6.
- [11] 张婧,王利刚,张磊,等. 3 种大肠埃希氏菌 O157:H7 筛检方法的比较[J]. 食品研究与开发,2017,38(19):112-115.
- [12] 阚志斌,黄裕,王明明. 1 株与大肠埃希菌 O157 生化结果相似的志贺氏菌的鉴定[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(6):2258-2262.
- [13] ZELYAS N, POON A, PATTERSON-FORTIN L, et al. Assessment of commercial chromogenic solid media for the detection of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli(STEC)[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2016, 85(3):302-308.
- [14] 吴尚为,黄彬,陈茶,等. 诊断微生物学新技术[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2015:64-64.

(收稿日期:2019-01-21 修回日期:2019-04-22)