

## 论著

## 参与 WHO-GFN EQAS 2009 实验室间比对的结果分析

朱小玲 胡 明 白 华 齐 静 刘玉庆

(山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 山东 济南 250100)

**摘要:**目的 为了正确认识和评估本实验室试验水平,更好地促进实验室试验能力建设,本实验室申请并参加了 WHO 的全球食源性感染网络(GFN)外部质量保证系统(EQAS)2009 评估。方法 分别用微量肉汤稀释法、玻片凝集法和 16S rDNA 鉴定法对 EQAS 邮寄的 17 株菌株盲样进行了药物敏感性测定、血清型分型鉴定和细菌种属鉴定。结果 部分药敏结果有偏差(偏高或偏低);ESBLs(Extended Spetrum  $\beta$ -Lactamase)检测及血清型鉴定结果完全正确;仅未知肠道细菌鉴定结果错误。结论 以上事实表明,本实验室在某些细菌的复苏、鉴定,磺胺药物的药敏结果判读方面仍有不足,需加强和完善检测技术。

**关键词:**全球食源性感染网络;外部质量保证系统;血清分型;菌种鉴定

中图分类号:TS207.7; R378 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)05-0407-04

**Analysis on the Results of Participating in an Inter-Laboratory Comparison of  
WHO-GFN EQAS in 2009**

ZHU Xiao-ling, HU Ming, BAI Hua, QI Jing, LIU Yu-qing

(Institute of Animal Science and Veterinary Medicine Shandong Academy of Agricultural  
Sciences, Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Disease Control & Breeding,  
Shandong Jinan 250100, China)

**Abstract: Objective** In order to assess the testing level and promote the capability of our laboratory, we participated in an evaluation test conducted by the External Quality Assurance System of Global Foodborne Infections Network (GFN EQAS) in 2009. **Method** Seventeen strains of blind samples were tested on antimicrobial susceptibility, serotyping and strain identification by micro-dilution, slide agglutination and 16S rDNA identification, respectively. **Results** There were partial deviations on the results of drug susceptibility. The detection on ESBLs (Extended Spetrum  $\beta$ -Lactamase) and serotyping were absolutely correct but the identification of unknown enteric bacteria was wrong. **Conclusion** The facts indicated that the recovery and identification of bacteria, and the interpretation on the susceptibility of individual drugs needed to be improved.

**Key words:** Global Foodborne Infections Network; External Quality Assurance System; Antimicrobial Susceptibility Test; Serotyping; Strain Identification

2009 年 7 月世界卫生组织建立了全球食源性感染网络(Global Foodborne Infections Network, GFN)。GFN 是一个全球协作性的网络,由各主要伙伴国家机构及世卫组织各区域和国家办事处合作开展各项活动。其前身是 2001 年建立的全球沙门菌监测网络(Global Salmonella Surveillance Network, GSS),其目标是加强食源性疾病监测工作,提高监测机构能力以及改进疾病暴发的检测和应对能力。GSS 是食源性疾病和专门知识培训的国际资源。其

监测范围已经由最初的沙门菌扩大到大肠杆菌和弯曲杆菌等。

外部质量保证系统(External Quality Assurance System, EQAS)是全世界最大的外部质量保证规划,GFN 每年通过其 EQAS 的有效运转,向国家参考实验室提供抗血清,对参与机构进行病原体的分离、鉴定、血清型分类和抗微生物敏感性试验的盲样考核,鼓励参与实验室取得最高质量的结果,促进参与机构的能力建设。GFN 组织者是丹麦国家食品研究所(FOOD-DTU)。其将菌株盲样发给参加的实验室进行血清型分类和敏感性试验。每年有 60 至 80 个国家的 100 至 150 个实验室参加。EQAS 鼓励获得不满意结果的实验室寻求协助以提高技术。

我国也有一些实验室相继加入 GFN。本实验

收稿日期:2010-02-08

作者简介:朱小玲 女 助理研究员 硕士 研究方向为病原微生物及细菌抗药性 E-mail: zhuxl2001@sina.com

通信作者:刘玉庆 男 研究员 E-mail: liuyqing@163.com

室参与了 EQAS 2009 考核。本次考核主要有 3 方面的工作:①药物敏感性检测及 ESBLs 检测;②血清型鉴定;③菌种鉴定。本文对本实验室参与 EQAS 2009 考核工作的结果进行了分析并提出了改进措施。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 EQAS 2009 共向本实验室免费提供菌株 17 株,其中 8 株沙门菌(编号为 WHO-S-9.1~9.8),4 株志贺菌(编号为 WHO-SH-9.1~9.4),2 株弯曲杆菌(编号为 WHO-C-9.1~9.2),1 株未知肠道细菌(编号为 WHO-B-9.1),2 株参考菌株(*E. coli* ATCC 25922、*C. jejuni* ATCC 33560)。待检菌株有冻干粉和穿刺培养两种保藏形式。

1.1.2 抗生素原粉及药敏纸片 氨苄西林(AMP)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢曲松(CRO)、氯霉素(CHL)、萘啶酸(NAL)、链霉素(STR)、四环素(TET)、庆大霉素(GEN)、环丙沙星(CIP)、磺胺甲恶唑(SMX)、甲氧苄啶(TMP)、复方新诺明(SXT)购自中国兽医兽药监察所。头孢噻肟

(30 μg/片)、头孢噻肟/克拉维酸(CTX/CV,30 μg/10 μg/片)、头孢他啶(30 μg/片)、头孢他啶克拉维酸(CAZ/CV,30 μg/10 μg/片)购自英国 Oxoid 公司。

1.1.3 诊断血清 沙门菌属和志贺菌属诊断血清购自宁波天润生物药业有限公司。

1.1.4 主要培养基、耗材 营养琼脂、MH 肉汤、琼脂粉购自北京奥博星生物技术有限责任公司;哥伦比亚血琼脂购自北京陆桥技术有限责任公司;无菌脱纤维羊血购自山东省济南市医学科学研究所;无菌 96 孔细胞培养板和一次性无菌培养皿购自济南康悦医疗器械有限公司。

1.1.5 目的片段的合成 待鉴定弯曲杆菌和肠道未知细菌的引物序列和 PCR 反应程序见表 1。引物合成和目的基因测序由北京华大基因科技股份有限公司完成。

1.1.6 其他 《EQAS 2009 指导手册》、实验表格、文献及交互式网络数据库(<http://www.antimicrobialresistance.dk/233-169-215-eqas.htm>)。当数据上传结束后系统会自动出具参与 EQAS 2009 考核的检测结果评估报告,并就本次试验结果提出针对性建议和意见以供参考和采纳。

表 1 目的基因引物及相应 PCR 反应程序

目的基因	PCR 引物序列	反应程序	参考文献
16s rDNA	上游 5'-GGAGGCAGCAGTAGGGAATA-3' 下游 5'-TGACGGCGGTGACTACAAG-3'	94℃·6min; {94℃·50s,57℃·40s,72℃·50s} 35 个循环 72℃·3min	Persson S <sup>[1]</sup>
<i>hipO</i>	上游 5'-GACTTCGTGAGATATGGATGCTT-3' 下游 5'-GCTATAACTATCCGAAGAAGCCATCA-3'		
<i>asp</i>	上游 5'-GGTATGATTTCTACAAAGCGAG-3' 下游 5'-ATAAAAAGACTATCGTCGCGTG-3'		
16s rDNA	上游 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 下游 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'	94℃·6min; {94℃·50s,55℃·40s,72℃·50s} 35 个循环 72℃·3min	Weisburg W G <sup>[2]</sup>

### 1.2 方法

1.2.1 菌株复苏 根据《EQAS 2009 指导手册》提供的文献方法<sup>[3,4]</sup>进行菌株复苏。由于未知肠道菌培养条件未知,因而对其进行需氧和厌氧双重培养,培养基采用血琼脂平板和 LB (Luria-Bertani medium) 平板两种。

1.2.2 抗生素溶液配制和药物敏感性试验 EQAS 建议实验室根据常规药物敏感性测定要求进行敏感性检测试验。故本实验室参照美国国家临床实验室标准委员会(NCCLS)和 2005 版中国药典<sup>[5]</sup>推荐的方法进行药物的配制。并依据 NCCLS,分别采用纸片法、微量肉汤稀释法和琼脂稀释法进行试验的操作和结果的判读。

1.2.3 血清学分型鉴定 EQAS 建议实验室采用常规方法进行沙门菌和志贺菌的血清学鉴定,并根据相关文献<sup>[6]</sup>确定分型结果。故本实验室参照

GB/T 4789.4—2003《食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验》<sup>[7]</sup>和 GB/T 4789.5—2003《食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验》<sup>[8]</sup>推荐的玻片凝集法进行血清分型试验。

1.2.4 模板 DNA 的提取 参照《EQAS 2009 指导手册》提供的文献方法<sup>[9]</sup>制备目的基因扩增模板。

1.2.5 菌种鉴定 EQAS 未制定未知细菌分离株的鉴定方法。故本实验室自行采用显微镜表型特征观察,结合分子生物学方法及细菌自动鉴定仪进行细菌鉴定。

## 2 结果

### 2.1 菌种复苏

WHO-C-9.2(弯曲杆菌)丢失,其余 16 株细菌均复苏成功。WHO-B-9.1(未知肠道菌)在有厌氧条件和血平板上均不生长,仅生长于需氧条件 LB

平板。所有复活细菌在相应培养条件下均生长良好。

怀疑 WHO-C-9.2 复苏失败是因为培养条件不正确,因为弯曲杆菌个别种仅在 37℃ 微需氧条件下生长,所以 42℃ 培养是造成菌株丢失的直接原因。但是,由 EQAS 提供的检测结果报告显示,WHO-C-9.2 为空肠弯曲杆菌(其生长条件为 42℃ 微需氧),由此判断菌株丢失有如下可能:①人为操作不当:在开启该菌株安瓿瓶时,由于敲击瓶颈的力量过猛,瓶内菌株冻干粉同标签条不慎掉在超净台面,部分细菌干粉损失,致剩余细菌干粉过少不能复活;②菌株本身活力很差已无法复活:复苏的整个过程均按照标准操作程序操作,在培养条件合适的情况下,只要有细菌存在,细菌就能被复活,所以推测该菌株因活力差而无法复活。

## 2.2 药物敏感性试验

### 2.2.1 *E. coli* ATCC 25922 和 *C. jejuni* ATCC 33560

质控试验 根据《EQAS 2009 指导手册》,采用微量肉汤稀释法和纸片法完成了 *E. coli* ATCC 25922 对 AMP、CTX、CAZ、CRO、CHL、CIP、GEN、NAL、STR、TMP、SXT、TET、SMX、CTX/CV 和 CAZ/CV 的药物敏感性试验;采用琼脂稀释法完成了 *C. jejuni* ATCC 33560 对 CHL、CIP、ERY、GEN、NAL 和 TET 的药物敏感性试验。药敏结果均在质量控制(Quality Control, QC)范围内。

2.2.2 沙门菌和志贺菌分离株的药物敏感性及 ESBLs 检测 根据《EQAS 2009 指导手册》,采用微量肉汤稀释法和纸片法完成了沙门菌和志贺菌对 AMP、CTX、CAZ、CRO、CHL、CIP、GEN、NAL、STR、TMP、SXT、TET、SMX、CTX/CV、CAZ/CV 的药物敏感性试验。ESBLs 检测试验结果显示,所有沙门菌和志贺菌的 ESBLs 检测均为阴性,说明它们都不产超广谱 β-内酰胺酶。药物敏感性检测结果中,除了下表所列结果,其余均为满意结果(见表 2)。

表 2 沙门菌和志贺菌药物敏感性试验判读结果

抗生素	菌株的误差判读									
	S-9.1	S-9.2	S-9.3	S-9.4	S-9.5	S-9.7	S-9.8	SH-9.2	SH-9.3	SH-9.4
GEN				Minor						
STR		Major	Major	Major	Major	Major	Major	Minor		
SMX		Major	Major	Major	Major			Major	Very major	
SXT	Major	Major	Major	Major	Major				Very major	Major
TET	Major	Minor	Minor	Minor	Minor			Minor		
TMP	Major	Major	Major	Major	Major			Major		Major

注:Major 为耐药值;Minor 为中介值与敏感值或中介值与耐药值之间的偏离;Very major 为敏感值。

从表 2 可以看出,大多数判读错误都是将敏感值判定为耐药值(Major),而少数判读错误是中介值与敏感值或中介值与耐药值之间的偏离(Minor),仅有两处结果是将耐药值判定为敏感值(Very major)。结合本次实验实际操作情况及 EQAS 2009 提出的建议,一般药物的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值过高,可能是由于接种量过高或污染等因素导致;磺胺类药物的 MIC 值偏高可能是由于判读不准,其终点判断应以 80% 生长抑制作为判断指标;MIC 值偏低可能是由于接种量过少。

### 2.2.3 弯曲杆菌分离株的药物敏感性检测

弯曲杆菌的药物敏感性试验结果显示(结果略),所有弯曲杆菌药敏结果均在 EQAS 2009 提供的检验值范围内。这说明,本实验室具备出具准确结果的能力。

## 2.3 血清学分型鉴定

所有沙门菌和志贺菌的血清学分型鉴定结果均为满意,结果见表 3。

## 2.4 菌种鉴定

2.4.1 弯曲杆菌的结果 由于弯曲杆菌 WHO-C-9.2 丢失,因而在此仅做弯曲杆菌 WHO-C-9.1 的鉴定。WHO-C-9.1 在 42℃、10% CO<sub>2</sub> 条件下的哥伦比亚血琼脂平板上生长良好,形成 1~2 mm、微凸、半透明、湿润、边缘整齐或不整齐、不溶血的菌落。镜检为 G<sup>-</sup>杆菌,菌体细长,弯曲呈逗号状、海鸥状或螺旋状,无荚膜、无芽孢。

表 3 沙门菌和志贺菌血清分型结果

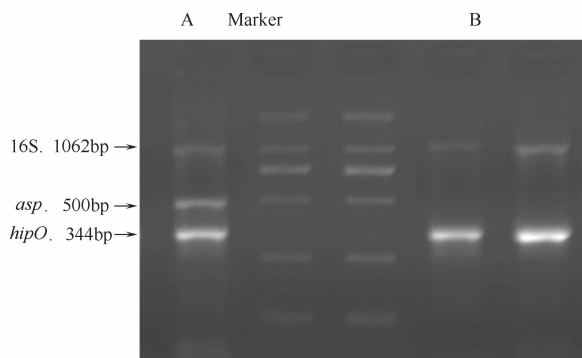
菌株	抗原式	血清群	血清型
WHO S-9.1	9,12:g,m:-	O:9 (D1)	Enteritidis
WHO S-9.2	4,12:l,v:e,n,z15	O:4 (B)	Brandenburg
WHO S-9.3	3,10:e,h:1,5	O:3,10 (E1)	Muenster
WHO S-9.4	1,4,12:l,v:1,7	O:4 (B)	Bredeney
WHO S-9.5	4,5,12:e,h:e,n,z15	O:4 (B)	Sandiego
WHO S-9.6	1,13,23:z:l,w	O:13 (G)	Worthington
WHO S-9.7	8,20:z4,z24	O:8 (C2-C3)	Albany
WHO S-9.8	4,5,12:d:1,2	O:4 (B)	Stanley
WHO SH-9.1		sonnei	
WHO SH-9.2		flexneri	6
WHO SH-9.3		flexneri	2a
WHO SH-9.4		boydii	2

同时,以 *C. jejuni* ATCC 33560 为标准菌株,利用空肠弯曲菌特异性基因马尿酸酶基因(*hipO*)、大肠弯曲菌特异性基因天冬氨酸激酶基因(*asp*)及二者通用保守基因(16S rDNA)进行多重 PCR 鉴定。鉴定结果为大肠弯曲杆菌(*Campylobacter coli*)。该结果为满意结果。

2.4.2 未知肠道菌的鉴定 未知肠道细菌 WHO-B-9.1 在 LB 琼脂培养基上生长良好,形成 2 mm、微凸、橙(黄)色、边缘整齐、不溶血的菌落。镜检为 G<sup>+</sup> 球菌,成堆团排列,一般 4 个在一起,无芽孢,无荚膜,不运动。

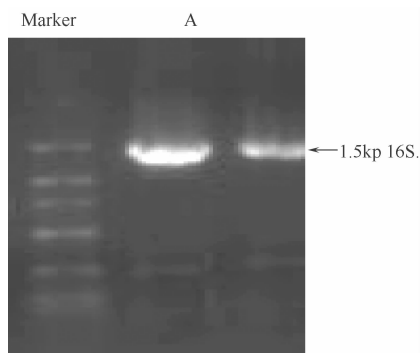
同时,利用细菌通用引物进行 16S rDNA 序列的扩增,目的条带与预期片段大小相符(1 540 bp),测序表明该菌同动性杆菌属细菌同源性最高。进一步采用法国生物梅里埃公司的 VITEK 全自动细菌分析仪对其鉴定,经鉴定,该菌为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)。对照 EQAS 出具的检测结果评估报告得知,未知肠道细菌 WHO-B-9.1 应为拟态弧菌(*Vibrio mimicus*),表明实验室鉴定结果错误。

经查文献[10],拟态弧菌的生长条件不是很苛刻,普通营养琼脂,28℃,24 h 即可。因此推测,37℃ 培养条件是导致该菌没有复活的原因。



注:A: *C. jejuni* ATCC 33560&WHO-C-9.1; Marker: DL2000;  
B: *C. jejuni* ATCC 33560。

图1 WHO-C-9.1 的多重 PCR 鉴定



注:A: WHO-B-9.1; Marker: DL2000。

图2 WHO-B-9.1 的 16S 鉴定

### 3 讨论

本次试验检测结果显示,17 株盲样菌株,有 15 株复苏成功;血清学分型试验结果均为满意;ESBLs 检测结果均为满意;部分药敏数据有误,主要集中在 SMX、TMP、SXT、STR 和 TET 几个药物,几乎都是将敏感值判定为耐药值;3 株需鉴定菌株,仅 1 株鉴定成功。

以上结果表明,本实验室检测工作存在的主要问题有:①缺少未知细菌的培养、鉴定手段和能力;②微量肉汤稀释法药敏试验仍存在不稳定因素。

通过参与由 WHO-GFN 组织的 EQAS 2009 检测,暴露了本实验室检测工作的诸多不足之处,使我们正确认识和评估了自身水平,为进一步加强实验室检测能力提出了警示。因此,在今后的工作中,就上述存在问题,应多做、多练,必须巩固现有检测技术;就其它实验室检测技术而言,应走出去多学习、多交流,尽快完善实验室检测能力。

### 参考文献

- [1] PERSSON S, OLSEN K E. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples [J]. *J Med Microbiol*, 2005, 54 (11): 1043-1047.
- [2] WEISBURG W G, BARNS S M, PELETTIE R D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(2): 697-703.
- [3] Instructions for Opening and Reviving Lyophilised Cultures [EB/OL]. (2008-10-31) [2009-12-16]. <http://www.antimicrobialresistance.dk/233-169-215-eqas.htm>.
- [4] Subculture and Maintenance of Quality Strains [EB/OL]. (2008-10-31) [2009-12-16]. <http://www.antimicrobialresistance.dk/233-169-215-eqas.htm>.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 年版(第二部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [6] GRIMONT P A D, WEILL F X. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars [M]. 9th revision. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Pasteur Institute, Paris, France. 2007.
- [7] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.4—2003 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [8] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.5—2003 食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [9] Multiplex PCR for differentiation of *C. coli* and *C. jejuni* [EB/OL]. (2003-02) [2009-12-16]. <http://www.antimicrobialresistance.dk/232-169-215-protocols.htm>.
- [10] 李權年, 李玉英, 胡守奎, 等. 中华绒螯蟹腹水病原分析 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12(3): 267-274.