

- 4789.40—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [7] 骆海朋, 瞿洪仁, 申静云, 等. 阪崎克罗诺杆菌标准物质研制[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(1): 54-59.
- [8] HIMELRIGHT I, HARRIS E, LORCH V, et al. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant Formula-Tennessee, 2001 (Reprinted from MMWR, vol 51, pg 297-300, 2002) [J]. JAMA The Journal of the American Medical Association, 2002, 287(17): 2204-2205.
- [9] IVERSEN C, FORSYTHE S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula [J]. Trends in Food Science & Technology, 2003, 14 (11): 443-454.
- [10] VAN ACKER J, DE SMET F, MUYLDERMANS G, et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39 (1): 293-297.
- [11] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS CL03 A001: 2019 能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明[S]. 2019.
- [12] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS GL003: 2018 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S]. 2018.
- [13] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS GL017: 2018 标准物质/标准样品定值的一般原则和统计方法[S]. 2018.
- [14] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS GL002: 2018 能力验证结果的统计处理和评价指南[S]. 2018.
- [15] 王娜, 钱和. 阪崎肠杆菌能力验证样品均匀性和稳定性的研究[J]. 中国微生物学杂志, 2010, 22(7): 606-608.
- [16] 陈彬, 郑晶, 黄晓蓉, 等. 乳粉中阪崎肠杆菌标准物质的研制[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(12): 16-18.

实验技术与方法

食品检测用肠道侵袭性大肠埃希氏菌标准物质的研制

赵琳娜, 王学硕, 刘娜, 崔生辉, 路勇

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要:目的 为满足肠道侵袭性大肠埃希氏菌(EIEC)准确检测的实验室质量控制和能力验证需求, 研制具有我国自主知识产权、稳定性良好且具有清晰基因组信息背景的即用型 EIEC 标准物质。方法 利用二代高通量测序技术对 EIEC(CMCC 44840)进行全基因组测序, 明确 CMCC 44840 的种属、血清型、多位点序列分型(MLST)和毒力基因; 采用冷冻干燥技术制备活菌含量为 10^3 CFU 的 EIEC 冻干样品; 参照 CNAS-GL017-2018 进行均匀性检验, 并采用单因素方差分析对结果进行统计分析; 将样品分别于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保藏, 对其储藏稳定性和运输性进行评价; 利用 5 种食品基质样本进行标准物质的使用效果验证, 同时组织 3 家实验室进行协同标定。结果 CMCC 44840 基因组大小为 4.96 Mb, GC 含量为 50.7%, 编码基因 5 424 个, 种属鉴定结果为大肠埃希氏菌, 血清预测结果为 O28ac:H7, MLST 为 ST311 型, 携带 *ipaH*、*virB*、*virF* 等毒力基因; 制备的 EIEC 冻干样品均匀性检验结果 $F=1.79$, 符合标准物质均匀性要求; 冻干样品在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下保藏 7 d, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下保藏 60 d, 菌含量均保持在 10^3 CFU 水平, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下第 3 d 菌含量出现下降, 低于 10^3 CFU 水平; 添加 EIEC 冻干样品的 20 件不同食品基质样品经增菌后均检出 EIEC; 3 家协同标定实验室测定 EIEC 冻干样品菌含量均为 10^3 CFU, 且实验室内无显著性差异 ($F=0.59$)。结论 本研究所制备的 EIEC 标准物质所用菌株具有清晰的基因组序列信息, 均匀性和稳定性均符合要求, 适用性良好, 能够满足食品检测实验室的质量控制和能力验证的需求。

关键词: 致泻大肠埃希氏菌; 肠道侵袭性大肠埃希氏菌; 基因组 DNA; 标准物质; 全基因组测序; 毒力基因

中图分类号: R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2021)06-0807-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2021.06.029

Preparation of enteroinvasive *Escherichia coli* reference materials for food analysis

ZHAO Linna, WANG Xueshuo, LIU Na, CUI Shenghui, LU Yong

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To satisfy the demands of laboratory quality control and proficiency testing for the detection of

收稿日期: 2021-09-30

基金项目: 科技部“食品安全关键技术研发”重点专项项目(2018YFC1604303)

作者简介: 赵琳娜 女 高级工程师 研究方向为食品微生物 E-mail: jade_zhao@126.com

通信作者: 崔生辉 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: cuishenghui@aliyun.com

路勇 教授级高级工程师 研究方向为食品安全 E-mail: luyong0560@126.com

enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), a stable EIEC reference material was developed with independent intellectual property rights, good stability and clear background genomic information. **Methods** NGS Technique was used to sequence the whole genome of enteroinvasive *Escherichia coli* (CMCC 44840), bioinformatics analysis was performed to identify the species, serotype, MLST type and virulence genes; EIEC lyophilized samples with 10^3 CFU were prepared by freeze-drying method; The homogeneity test was performed according to CNAS-GL017, and the result were statistically analyzed by one-way ANOVA; The samples were stored at -20 , 4 , 25 and 37 °C, respectively, and their storage stability and transport stability were evaluated; Five kinds of food matrix samples were used to verify the applicability of reference materials, and three laboratories were organized for collaborative calibration. **Results** The genome size of CMCC 44840 was 4.96 Mb, the GC content was 50.7%, and the genome contained 5424 coding genes. This strain was identified as the species of *Escherichia coli*, and the serotype and the MLST type were predicted to be O28ac; H7 and ST311, respectively, and it carried *ipaH*, *virB*, *virF* and other virulence genes. The homogeneity test result of the EIEC lyophilized sample was $F = 1.79$, which met the homogeneity requirements of reference materials. The EIEC samples were still 10^3 CFU when storing at -20 °C and 4 °C for 60 d and storing at 25 °C and 4 °C for 7 d, and decreased on the third day at 37 °C. EIEC were detected in 20 different food matrix samples with EIEC lyophilized samples after enrichment. The samples were 10^3 CFU determined by three collaborative calibration laboratories, and there were no significant differences among these laboratories ($F = 0.59$). **Conclusion** The EIEC reference material prepared in this study has clear genome sequence information. The homogeneity and stability meet the requirements and have good applicability, which can meet the requirements of quality control and capability verification in food testing laboratory.

Key words: Diarrheagenic *Escherichia coli*; enteroinvasive *Escherichia coli*; genomic DNA; reference material; whole genome sequencing; virulence gene

致泻性大肠埃希氏菌引起的腹泻是全球范围内的重大公共卫生问题之一^[1]。根据致病机制、流行病学特征和毒力因子,可将致泻性大肠埃希氏菌分为5类:肠道致病性大肠埃希氏菌(Enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)、肠道产毒性大肠埃希氏菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)、肠道出血性大肠埃希氏菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)、肠道侵袭性大肠埃希氏菌(Enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)以及肠道集聚性大肠埃希氏菌(Enteraggregative *Escherichia coli*, EAEC)^[2-3]。EIEC是一组较少见、不产生毒素的致泻性大肠埃希氏菌。EIEC含有pINV毒力质粒,编码Ipa毒力侵袭蛋白和转录调节因子InvE,与志贺氏菌携带侵袭性基因的大质粒高度同源,因此EIEC在表型、致病性和遗传上与志贺氏菌非常相似,具有致病侵袭力。当菌体进入大肠后,侵袭蛋白能够粘附于大肠黏膜的上皮细胞,继而侵入上皮细胞并大量繁殖,扩散至邻近细胞,导致组织破坏和炎症发生,产生痢疾样症状,引起腹泻^[4]。EIEC常见的血清型有14种,如O28ac、O112ac、O136、O143、O144、O152、O164和O167等^[5]。近些年由O136、O164等血清型EIEC感染禽畜肉引起的食物中毒事件时有发生^[6-8]。有研究者^[9]在对养猪场源致泻大肠埃希氏菌毒力基因和致病型研究中,从985株养猪场源大肠埃希氏菌中分离到9株EIEC(0.91%),说明在食品链条上游养殖环节存在EIEC污染。因此食品中EIEC快速准确的检测工作,对

预防和控制由其引起的细菌性食物中毒事件有着非常重要的作用。

目前我国食品中EIEC的检测依据主要为国家标准GB 4789.6—2016《食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》,对符合大肠埃希氏菌生化反应特征的菌落进行侵袭性质粒调节基因(Invasive plasmid regulator, *invE*)或侵袭性质粒抗原H基因(Invasive plasmid antigen H-gene, *ipaH*)的聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)鉴定,并且要求使用EIEC标准菌株作为阳性对照,以保证结果的准确性。目前国内关于EIEC标准物质研制的相关报道较少,国内仅有相关标准菌株的研究报道^[10],但菌株信息背景并不完善。实验室人员需要对购买的标准菌株进行活化、鉴定和保藏等一系列操作,才能将此作为阳性对照开展实验。整个过程对实验室环境、培养基、人员操作都具有一定要求。另外,如果标准菌株发生污染,由于缺少相应的全基因组信息,还会导致无法实现实验室的快速准确溯源。

随着基因测序技术的突破性进展^[11],基因测序获得的数据量、测序速度和费用都得到大幅度改观^[12]。通过二代全基因组测序,能够获得细菌90%以上的DNA信息,包括种属、耐药基因、毒力因子、可移动基因元件等信息。本研究目的是利用高通量测序技术对编号为CMCC 44840的EIEC进行全基因组测序,研制稳定性良好、基因组信息背景清晰的即用型肠道侵袭性大肠埃希氏菌标准物质,满

足微生物检验领域发展的需求。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

肠道侵袭性大肠埃希氏菌 CMCC 44840 来源于中国医学细菌保藏管理中心。

1.1.2 主要仪器与试剂

FreeZone12 L 冷冻干燥机(德国 LABCONCO 公司), PL2002 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司), Thermo1389 生物安全柜、205050GC 恒温培养箱、LEGEND Micro21R 冷冻离心机、NanoDrop 2000 微量核酸蛋白测定仪、Qubit 荧光定量测定仪(美国 ThermoFisher 公司), C1000 PCR 仪、紫外凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptic soy agar, TSA, 批号 236950)购自美国 BD 公司;生理盐水购自国药集团化学试剂有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)购自天根生化科技(北京)有限公司;TaqDNA 聚合酶和 dNTP 购自日本 Takara 公司;琼脂糖购自美国 Oxoid 公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

按照北京天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌基因组,利用核酸蛋白分析仪和 Qubit 荧光定量测定仪检测基因组 DNA 的纯度和浓度后,送北京诺禾致源科技股份有限公司进行全基因组测序。

1.2.2 细菌全基因组测序及生物信息学分析

本研究所有涉及测序部分均委托具有高通量大规模基因测序服务资质的北京诺禾致源科技股份有限公司开展细菌全基因组测序。

具体操作:利用超声波将电泳检测合格的 DNA 随机打断成 350 bp 短片段,进行末端修复、加 A 尾和测序接头、PCR 扩增和纯化等步骤完成文库制备。使用 Qubit2.0 和 Agilent2100 进行定量和插入片段大小检测。文库检测合格后在 Illumina NovaSeq 6000 测序系统进行全基因组测序。下机数据进行低质量过滤后获得高质量的有效数据(Clean Data)进行后续分析。使用 SOAP denovo 软件进行组装,用 RAST 对组装序列进行注释(<http://rast.nmpdr.org>)。

使用在线分析网站 CGE(Center for Genomic Epidemiology)中 KmerFinder 3.2、SeqSero 2.0 和 MLST 2.0 分别对组装序列进行细菌种类预测、血清分型和 MLST 分型(<http://www.genomicepidemiology.org>);

使用在线分析网站 PATRIC 3.6.11(Pathosystems Resource Integration Center)对基因组组成进行分析(<https://www.patricbrc.org/>);使用 PATRIC 3.6.11 和 CGE VirulenceFinder 2.0 在线数据库对毒力基因进行分析。

1.2.3 特征性基因 PCR 检测方法

将提取的 CMCC 44840 基因组 DNA 定量后,参照 GB 4789.6—2016 中引物序列和 PCR 检测方法,进行 *ipaH* 和 *invE* 特征性基因 PCR 扩增和灵敏度检测。

1.2.4 标准物质生产制备

用无菌棉签或接种环从 EIEC 新鲜 TSA 二代培养物平板上刮取菌落,加入到含有海藻糖和胎牛血清的冻干保护剂中涡旋混匀,吸取 20 μL /球,进行冷冻干燥。将冻干后的小球置于 2 mL 西林瓶中进行真空压盖密封。最终制备成含量为 10^3 CFU/样品的 EIEC 冻干样品。

1.2.5 标准物质均匀性测试

随机抽取 20 瓶 EIEC 冻干样品,分别用 1 mL 生理盐水充分溶解,利用螺旋涂布仪 E50 模式,在 TSA 平板上进行螺旋涂布,每个样品做 2 个平行实验,36 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,对平板进行菌落计数。计数结果依据 CNAS-GL003—2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》进行单因子方差分析,从而评价样品的均匀性。

1.2.6 标准物质稳定性测试

1.2.6.1 运输稳定性

将制备的 EIEC 冻干样品分别存放于室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 和高温 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,用来模拟运输过程中样品的稳定性。模拟实验周期为 7 d,分别于 1、3、5、7 d 抽取 3 个样品进行含菌量测定,根据 CNAS-GL003-2018 中 $|\bar{x}-\bar{y}| \leq 0.3\sigma$ 准则,考察样品的运输稳定性。

1.2.6.2 储藏稳定性

将制备的 EIEC 冻干样品分别存放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,用来模拟储藏稳定性。模拟实验周期为 -20 $^{\circ}\text{C}$ 存放 2 个月和 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 28 d,分别于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 28 和 60 d,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 7、14 和 28 d 抽取 3 个样品进行含菌量测定。根据 CNAS-GL003-2018 中 $|\bar{x}-\bar{y}| \leq 0.3\sigma$ 准则对 EIEC 标准物质进行稳定性评价。

1.2.7 标准物质协作标定

将上述制备的 EIEC 标准物质样品分别发给 3 家参加协作标定的实验室,每个实验室各分发 10 个。3 家实验室代码分别为 A、B 和 C,实验室参照协作验证作业指导书对标准物质样品进行菌落

计数和特征性基因检测。采用单因素方差分析对协作标定结果进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.2.8 标准物质使用效果验证

根据 GB 29921—2013《食品安全国家标准 食品中致病菌限量》中致病菌检验相应的食品类别,选择熟肉制品、乳粉、腐乳、饼干和薯片 5 种食品基质共 20 件样品对 EIEC 标准物质的使用效果进行验证,样品信息见表 1。先将 EIEC 冻干样品用 1 mL 生理盐水完全溶解,然后称取样品,每件样品称取 2 份,25 g/份,一份加入 100 μ L EIEC 冻干样品生理盐水溶解溶液,一份不加作为对照。根据 GB 4789.6—2016 进行增菌培养和鉴定,将增菌肉汤划线于分离平板,观察是否有典型菌落生长,同时对典型菌落进行 *ipaH* 和 *invE* 基因 PCR 确认。

表 1 标准物质验证实验用食品样品信息表

Table 1 Information table of food samples for certified reference materials

序号	名称	序号	名称
1	呀土豆蜂蜜黄油薯片	11	老布特麦麸饼干
2	呀土豆番茄薯片	12	老布特南瓜饼干
3	呀土豆烤鸡薯片	13	老绥远手撕风干牛肉
4	九日蜂蜜薯片	14	内蒙古保牛乳业风干牛肉
5	香老太五香腐乳	15	大牧场手撕风干牛肉
6	香老太秘制白腐乳	16	草原心意手撕牛肉
7	香老太秘制辣腐乳	17	爱优诺优益力特殊婴儿配方奶粉
8	香老太桂林腐乳	18	萌臻婴儿配方羊奶粉
9	乐之饼干	19	宝素力幼儿配方奶粉
10	太平饼干	20	贝因美特殊医学用途婴儿配方奶粉

1.3 数据统计分析

采用单因素方差分析对协作标定结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

结果显示,CMCC 44840 基因组 DNA 的 $A_{260/280}$ 和 $A_{260/230}$ 分别为 1.70 和 2.37,浓度为 65 ng/ μ L,所提取 DNA 的纯度和浓度满足全基因组测序和标准物质制备要求。

2.2 全基因组测序分析结果

CMCC 44840 基因组大小为 4.96 Mb,其 N50 重叠大小为 31 405 bp,共有 357 个拼接序列,长度从 523 bp 到 138 778 bp 不等,基因组 GC 含量为 50.7%,编码基因 5 424 个。KmerFinder 鉴定结果显示 CMCC 44840 为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*),具体鉴定结果如表 2 所示;血清型预测结果为 O28ac:H7,MLST 型为 ST311 型;PATRIC Victors 数据库预测到包含 *ipaH* 基因在内的 279 个毒力相关基因,CGE 毒力基因分析显示含有 *virF*、*ipaD*、*senB*、*sepA* 等毒力因子(表 3)。

两个数据库中均未预测到 *invE* 基因,PATRIC 预测到 *virB* 基因。*virB* 基因位于 CMCC 44840 基因组测序数据 Scaffold30 中,将 GB 4789.6 中的 *invE* 基因上下游引物序列和其进行比对,分别能比对上测序数据 Scaffold30 中 10835-10861 和 11573-11600 位置,序列同源性 100%。DNAMAN 4.0 数据比对

表 2 利用 KmerFinder 对 CMCC 44840 菌种属鉴定结果

Table 2 the results of identification of CMCC 44840 with kmerfinder

拼接序列	得分	模板长度/bp	模板覆盖率/%	q 值*	种属	NCBI 序列号
GCF_012221365.1	143 990	163 054	93.46	143 974.88	<i>E. coli</i>	NZ_CP050862.1
GCF_016026375.1	6 957	164 345	4.55	6 813.18	<i>E. coli</i>	NZ_CP065624.1
GCF_015277555.1	1 889	167 526	1.08	1 730.36	<i>E. coli</i>	NZ_CP063774.1

* q 值代表皮尔森卡方检验分位数

表 3 利用 VirulenceFinder2.0 对 CMCC 44840 毒力基因预测结果

Table 3 virulence gene prediction results of CMCC 44840 using CGE

毒力因子	一致性/%	拼接序列片段	位置/bp	蛋白功能
<i>capU</i>	99.91	Scaffold128_1	2 261.334 9	己糖基转移酶同系物
<i>cib</i>	100	Scaffold2_1	21 411.232 91	大肠杆菌素
<i>iha</i>	100	Scaffold172_1	1 747.383 7	黏附蛋白
<i>ipaD</i>	98.8	Scaffold30_1	14 114.151 12	福氏志贺氏菌侵袭蛋白
<i>iucC</i>	100	Scaffold30_1	5 079.682 1	产气菌素合成酶
<i>senB</i>	99.83	Scaffold153_1	7 272.844 7	质粒编码肠毒素
<i>sepA</i>	99.82	Scaffold205_1	1 368.485 0	志贺菌胞外蛋白 A
<i>sigA</i>	99.95	Scaffold129_1	7 124.109 81	志贺菌 IgA 样蛋白酶同系物
<i>virF</i>	99.88	Scaffold223_1	1 286.209 5	病毒因子转录激活因子 r

分析结果显示,根据 GB 4789.6 中引物扩增出的 *invE* 序列(GenBank: MN088823.1)与预测到的 *virB* 基因序列同源性 100%。通过 NCBI BLAST 比对,结

果显示与大肠埃希氏菌血清型 O164(EIEC)的 *virB* 基因和宋内志贺氏菌 *invE* 基因序列同源性均为 100%。CMCC 44840 全基因组测序数据已上传至

NCBI GenBank 数据库,序列号为 SRR12282621。

2.3 特征性基因 PCR 扩增结果

按照 GB 4789.6—2016 的方法对 CMCC 44840 分别进行了 *ipaH* 和 *invE* 特征性基因检测,用去离子水作为 PCR 反应体系负对照。PCR 扩增结果显示在 647 bp(*invE*) 和 766 bp(*ipaH*) 目的基因片段附近检测到 CMCC 44840 DNA 相应的扩增条带(图 1)。

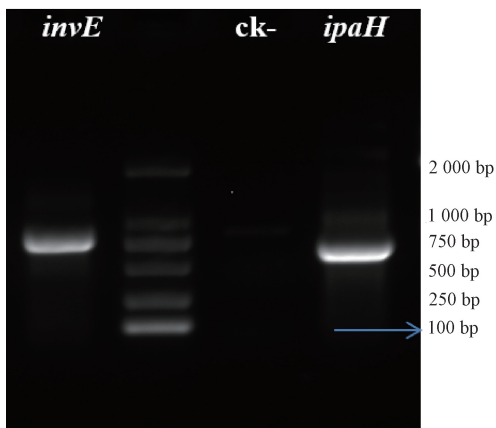


图 1 *ipaH* 和 *invE* 基因 PCR 产物电泳结果
Figure 1 Electrophoresis results of PCR products of different concentrations of *ipaH* and *invE* gene

2.4 标准物质的均匀性检验结果

随机抽取的 20 瓶 EIEC 冻干样品平板计数结果如表 4 所示,所有样品菌落数均在 10^3 CFU 数量级,数值符合正态分布,最大值为 4 780 CFU/样品,最小值为 3 560 CFU/样品,平均值为 4 322 CFU/样品,中位数为 4 310 CFU/样品。单因子方差分析结果显示制备的 EIEC 冻干样品组内和组间无显著性差异,即样品符合标准物质均匀性要求($F = 1.79 < F$ 临界值 = 2.137, $P > 0.05$)。

表 4 EIEC 标准物质计数结果

Table 4 Count results of EIEC reference material

样品编号	样品中 EIEC 含量/(CFU/样品)	
	A	B
1	4 680	4 480
2	4 700	4 640
3	4 500	4 460
4	4 480	4 300
5	4 240	4 120
6	4 600	4 260
7	4 540	4 780
8	4 120	3 740
9	4 520	3 560
10	4 680	4 200
11	4 320	3 980
12	4 260	4 220
13	4 260	4 020
14	4 620	4 100
15	4 780	4 220
16	4 780	4 360
17	3 960	4 000
18	3 660	4 060
19	4 500	4 560
20	4 220	4 420

2.5 标准物质稳定性检测结果

2.5.1 运输稳定性

计数结果如表 5 所示,EIEC 冻干样品在 4 °C 和 25 °C 条件下保存 7 d 稳定性良好,在 37 °C 环境下第 3 天活菌数量下降出现不稳定现象,活菌含量为 10^2 CFU/样品。

表 5 EIEC 标准物质运输稳定性结果

Table 5 Results of transport stability of reference material

时间/d	4 °C 含菌量 /(CFU/样品)	25 °C 含菌量 /(CFU/样品)	37 °C 含菌量 /(CFU/样品)
0	4 300	4 300	4 300
1	4 000	3 000	1 000
3	4 000	2 900	800
5	4 000	2 600	700
7	3 900	2 000	400

2.5.2 储藏稳定性结果

通过与 0 d 时的数据进行比较,由表 6 数据可以看出,EIEC 冻干样品在 -20 °C 保存 60 d,复苏率为 100%。4 °C 条件下,保存 7 d 复苏率为 90.7%,保存 14 d 复苏率为 83.7%,虽然保存 28 d 复苏率为 30.0%,但样品中活菌含量保持在 10^3 CFU/样品水平,仍然稳定。

表 6 EIEC 标准物质储藏稳定性试验结果

Table 6 Storage stability test results of EIEC reference materials

时间/d	-20 °C		4 °C	
	活菌含量 CFU/样品	复苏率 /%	活菌含量 /(CFU/样品)	复苏率 /%
0	4 300	/	4 300	/
7	/	/	3 900	90.7
14	/	/	3 600	83.7
28	4 300	100	1 300	30.0
60	4 300	100	/	/

注:/代表未进行计数

2.6 协作标定结果

3 家协作标定实验室结果如表 7 所示,EIEC 标准样品的菌含量均为 10^3 CFU/样品,与研制的目标值结果一致。单因子方法分析结果显示 3 家实验室的菌含量数值无显著性差异($F = 0.59 < F$ 临界值 = 3.35, $P > 0.05$)。特征基因经 PCR 反应有相应条带扩增,条带大小结果与目标值一致。

2.7 标准物质使用效果验证

选择熟肉制品、乳粉、腐乳、饼干和薯片 5 种食品基质共 20 件样品对 EIEC 冻干样品的使用效果进行验证,结果显示,20 件正常检验的样品,其分离平板上未见可疑菌落生长,而加入 EIEC 冻干样品的食品基质,均有可疑菌落在分离平板上生长(图 2),并通过 PCR 检测扩增得到相应的特征基因条带(图 3 和图 4)。结果表明,研制的 EIEC 标准物质适用于食品中 EIEC 检验的质控需求。

表7 EIEC 协作标定结果

Table 7 Result of collaborative calibration for EIEC reference material

协作标定 单位代码	A		B		C	
样品序号	活菌含量 /(CFU/样品)	鉴定结果*	活菌含量 /(CFU/样品)	鉴定结果	活菌含量 /(CFU/样品)	鉴定结果
CODE:1	3 800	阳性	3 800	是	3 800	阳性
CODE:2	3 400	阳性	3 700	是	3 800	阳性
CODE:3	3 900	阳性	3 300	是	3 600	阳性
CODE:4	3 600	阳性	3 700	是	2 800	阳性
CODE:5	3 100	阳性	3 300	是	4 300	阳性
CODE:6	3 200	阳性	3 800	是	4 200	阳性
CODE:7	3 900	阳性	4 100	是	4 000	阳性
CODE:8	3 200	阳性	3 800	是	3 500	阳性
CODE:9	4 300	阳性	3 700	是	3 800	阳性
CODE:10	3 900	阳性	3 800	是	4 300	阳性
平均值	3 600				3 800	
总平均值			3 700			

注：* 鉴定结果为典型菌落特征性基因 PCR 结果

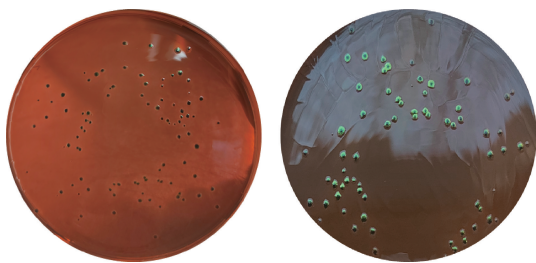
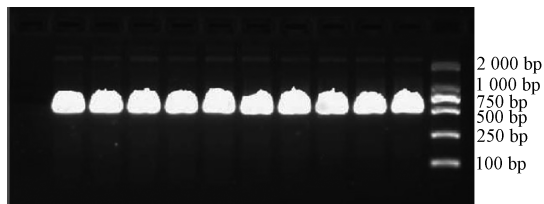
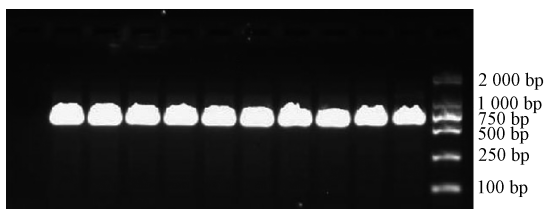


图2 EIEC 在 EMB 平板上的菌落形态

Figure 2 Colony morphology of EIEC on EMB medium plate

图3 其中 10 件添加 EIEC 冻干样品的食品样本 *ipaH* 基因 PCR 产物电泳结果Figure 3 Electrophoresis results of *ipaH* gene PCR products of ten food samples with EIEC图4 其中 10 件添加 EIEC 冻干样品的食品样本 *invE* 基因 PCR 产物电泳结果Figure 4 Electrophoresis results of *invE* gene PCR products of ten food samples with EIEC

3 讨论

目前食品和腹泻患者中致泻大肠埃希氏菌的

检测越来越受到关注和重视^[13-15]。致泻大肠埃希氏菌种类繁多的血清群/型,给检验工作带来很多挑战^[16]。准确快速的检测技术是及时有效控制和预防由病原菌引起的食源性疾病的重要手段,该工作不仅依赖于基于不同技术的检验方法,还需要科学使用标准物质来保证实验结果的准确性。实验室主要采用标准菌株作为阳性对照来控制实验结果的准确性,但标准菌株操作繁琐,同时还存在实验室污染的风险。目前有市售法国生物梅里埃公司生产的定量质控菌株能够解决这些问题,但购买价格昂贵,周期长。近些年国内针对这些问题,在微生物标准物质的研制上已有较大发展,包括菌落总数、单核细胞增生李斯特氏菌、阪崎肠杆菌、金黄色葡萄球菌和肠炎沙门氏菌等食品安全领域相关标准物质研制^[17-20],但这些标准物质的研制多采用来自美国菌种保藏中心(ATCC)的标准菌株,缺少使用基因组信息背景清晰的具有我国特色的标准菌株。本研究采用的 EIEC 标准菌株来源于中国医学细菌保藏管理中心(CMCC),分离自我国腹泻病人,并利用全基因组测序技术对菌株进行测序,研制出具有我国自主知识产权而且基因组信息清晰的标准物质。

本研究制备的 EIEC 标准物质活菌含量在 $3 \times 10^3 \sim 4 \times 10^3$ CFU,能够满足微生物的定量质控,而且不同于大部分冻干粉状的标准物质,该标准物质为紧致的冻干球形,打开时不会产生粉末的气溶胶,从而减少了实验室污染,也保护了实验人员。同时由于该标准物质极易溶于水,使其操作便捷,可以作为实验室日常检验频繁使用的质控品。

有研究表明含有基质的标准物质在室温条件下的短期稳定性显著下降^[21-22]。本研究制备 EIEC

标准物质不含基质,直接使用冻干保护剂进行制备,使菌株能够被冻干保护剂全方位包裹,从而增强菌株的稳定性。该标准物质在 4 ℃ 和 25 ℃ 条件下保存 7 d 稳定性良好,在气温低的季节可以选择常温运输;该标准物质在 37 ℃ 环境下第 3 d 活菌数量下降到 10^2 CFU/样品,在气温高的季节可以采用加冰袋或干冰的方式进行低温运输,从而保障标准物质的活菌数量。

来自少数病原体分离菌株无法代表所有基因型的病原,本研究制备的 EIEC 标准物质使用的菌株血清型为 O28ac,虽然不能满足不同血清型 EIEC 的分型对照需求,但本研究第一次将全基因组测序技术应用到标准物质的研制上,为后续不同血清型标准物质的研制奠定了科学准确的基础。全基因组测序技术在微生物领域如细菌鉴定、耐药机制和溯源等研究中发挥着越来越重要的作用^[23]。随着二代测序数据分析软件日趋完善,非生物信息学专业研究人员可以使用网页类型分析工具对微生物基因组测序数据完成微生物遗传特征、溯源等信息分析。Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST, <http://rast.nmpdr.org>)^[24]能够快速注释基因组信息、Center for Genomic Epidemiology (CGE, <https://cge.cbs.dtu.dk/>)网站拥有方便快捷的独立数据分析工具,可以进行种属鉴定、耐药基因、毒力因子、质粒分型以及菌株分子分型等特征分析^[25]。这些免费的网页类型分析工具可提供更为直观的用户界面和简便的操作环境^[26]。这对于提高实验室菌株种属鉴定、血清分型和毒力基因分析能力具有很大的帮助,可以促进更多基因型标准物质的研制,为检验工作提供丰富的阳性对照。

综上所述,本研究研制的即用型 EIEC 标准物质,具有自主知识产权和清晰的全基因组信息背景,且均匀性和稳定性良好。通过即用型标准物质的使用,将极大减少由于实验室人员操作、培养基和试剂等因素带来的结果不确定性,从而保证检测数据的准确性和有效性。同时食品检测机构可以利用即用型标准物质开展新方法确认、实验室比对等活动,促进我国食品检验机构技术水平的提高,及时发现食品中存在的微生物安全隐患。

参考文献

[1] KAUR P, CHAKRABORTI A, ASEA A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric food borne pathogen [J]. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2010, 2010:1-10.

[2] 徐建国, 阚飙, 张建中. 现场细菌学[M]. 北京: 科学出版社, 2011.

[3] NATARO J P, KAPER J B. Diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998, 11(1): 142-201.

[4] 弓红梅. 山西部分地区腹泻病原菌的分布和致泻大肠埃希菌的相关毒力基因研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2012.

[5] 孔海深. 致泻大肠埃希氏菌的分子分型和流行病学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.

[6] 夏文, 薛琳, 周显凤, 等. 一起由肠侵袭性大肠埃希菌 O136 :K78 引起的聚集性腹泻暴发[J]. *疾病监测*, 2012, 27(9): 726-728.

[7] 杨梦, 熊长辉, 王鹏, 等. 一起侵袭性大肠埃希菌食物中毒事件的溯源分析[J]. *现代预防医学*, 2015, 42(5): 810-813.

[8] 燕勇, 沈志英, 王恒辉. 食物中毒标本中检出一例罕见的侵袭性大肠埃希菌 O164: K? [J] *中国卫生检验杂志*, 2006, 16(3): 364-365.

[9] 马金晶, 李凤琴, 白瑶, 等. 养猪场源致泻大肠埃希菌毒力基因和致病型研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2021, 33(2): 127-131.

[10] 张彩文, 李金霞, 陈怡文, 等. 致泻大肠埃希氏菌检验用标准菌株的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(23): 68-73.

[11] SCHUSTER SC. Next-generation sequencing transforms today's biology [J]. *Nature Methods*, 2008, 5:16-18.

[12] MARSHALL D A, MACDONALD K V, ROBINSON J O, et al. The price of whole-genome sequencing may be decreasing, but who will be sequenced? [J]. *Personalized Medicine*, 2017, 14(3): 203-211.

[13] BARLETTA F, OCHOA T J, CLEARY T G. Multiplex realtime PCR (MRT-PCR) for diarrheagenic PCR detection of microbial pathogens[J]. 2016, 943:307-314.

[14] ZHANG J Y, XU Y, LING X, et al. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* by a new multiplex PCR assay and capillary electrophoresis [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, 49: 101477.

[15] 黄昭鸿, 黄运红, 黄艳梅, 等. 分型检测致泻性大肠埃希氏菌 PCR 技术研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40(7): 82-90.

[16] 余晓丰, 杨勇, 占利, 等. 食源性致泻大肠杆菌血清型及毒力基因的研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(9):124-127.

[17] 薛蕾, 隋志伟, 张玲, 等. 金黄色葡萄球菌标准物质的研制[J]. *食品科学*, 2015, 36(8): 44-48.

[18] 骆海朋, 瞿洪仁, 申静云, 等. 阪崎克罗诺杆菌标准物质研制[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(1): 54-59.

[19] 瞿洪仁, 骆海朋, 申静云, 等. 食品检测用单核细胞增生李斯特氏菌标准物质的研制[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(1): 65-70.

[20] 刘思渊, 王梓权, 甄啸啸, 等. 用于培养基生长率评价的大肠杆菌标准物质研制[J]. *中国测试*, 2020, 46(10): 48-53.

[21] 吴谦, 黄晓蓉, 王晶, 等. 鸡肉中单核细胞增生李斯特氏菌标准物质的研制[J]. *计量学报*, 2010, 31(z1): 9-13.

[22] 陈彬, 郑晶, 黄晓蓉, 等. 乳粉中阪崎肠杆菌标准物质的研制[J]. *中国乳品工业*, 2012, 40(12): 16-18.

[23] BERTELLI C, GREUB G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2013, 19(9): 803-813.

[24] Aziz R K, Bartels D, Best A A, et al. The RAST Server: Rapid

annotations using subsystems technology [J]. BMC Genomics, 2008, 9: 75.

[25] CARRICO JA, ROSSI M, MORAN-GILAD J, et al. A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians [J]. Clin microbiology infec; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2018(24):342-349.

[25] CARRIÇO J A, ROSSI M, MORAN-GILAD J, et al. A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2018, 24 (4): 342-349.

[26] 沈应博, 史晓敏, 沈建忠, 等. 全基因组测序与生物信息学分析在细菌耐药性研究中的应用[J]. 生物工程学报, 2019, 35(4): 541-557.

(上接第 672 页)

- (一)成分分析报告:包括主要成分和可能的有害成分监测结果及检测方法;
- (二)卫生学检验报告:3 批有代表性样品的污染物和微生物的检测方法及方法;
- (三)毒理学评价报告:至少包括急性经口毒性试验、3 项遗传毒性试验、90 天经口毒性试验和致畸试验;其中,在古代医籍中有两部以上食疗本草记载无毒性、无服用禁忌(包括不宜久食)的品种,可以只提供本条第(一)、(二)项试验资料;
- (四)药理作用的特殊针对性指标的试验资料,包括对主要药理成分的风险评估报告。

第八条 国家卫生健康委委托技术机构负责食药物质目录修订的技术审查等工作。委托的技术机构负责组织相关领域的专家,开展食药物质食品安全风险评估、社会稳定风险评估等工作,形成综合评估意见。市场监管部门根据工作需要,可指派专家参与开展食药物质食品安全风险评估、社会稳定风险评估工作。

根据工作需要,委托的技术机构可以组织专家现场调研、核查,也可以采取招标、委托等方式选择具有技术能力的单位承担相关研究论证工作。

第九条 国家卫生健康委对技术机构报送的综合评估意见进行审核,将符合本规定要求的物质纳入食药物质目录,会同市场监管总局予以公布。

公布的食药物质目录应当包括中文名、拉丁学名、所属科名、可食用部位等信息。

第十条 有下列情形之一的,应当研究修订目录:

- (一)食品安全风险监测和监督管理中有新的科学证据表明存在食品安全问题;
- (二)需要对食药物质的基本信息等进行调整;
- (三)其他需要修订的情形。

委托的技术机构根据最新研究进展,可以向国家卫生健康委提出修订食药物质目录的建议和风险监测方案。

第十一条 对新纳入食药物质目录的物质,提出建议的省级卫生健康行政部门应当将其列入食品安全风险监测方案。根据风险监测和风险评估结果,适时提出制定或指定适用食品安全国家标准的建议。

第十二条 食品生产经营者使用食药物质应当符合国家法律、法规、食品安全标准和食药物质目录的相关规定,产品标签标识和经营中不得声称具有保健功能、不得涉及疾病预防治疗功能。

第十三条 本规定自发布之日起实施。

相关链接:关于《按照传统既是食品又是中药材的物质目录管理规定》的解读

食品安全标准与监测评估司
二〇二一年十一月五日

(相关链接:<http://www.nhc.gov.cn/sps/s7892/202111/1b3e18ba75f142f99a4a15ce0d1660f3.shtml>)