

## 研究报告

## 前增菌抗生素添加对产志贺毒素大肠埃希氏菌分离的影响

胡颖<sup>1,2</sup>, 赵琳娜<sup>2</sup>, 白莉<sup>3</sup>, 崔生辉<sup>2</sup>

(1. 遵义医科大学公共卫生学院, 贵州 遵义 543006; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100025; 3. 国家食品安全风险评估中心, 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 北京 100025)

**摘要:**目的 研究产志贺毒素大肠埃希氏菌(STEC)国际标准检测方法中前增菌肉汤中抗生素种类和浓度对 STEC 分离的影响。方法 利用 STEC 和其他非 STEC 菌株, 对国际现行检测 STEC 标准方法推荐的在前增菌步骤使用 3 种抗生素的最低抑菌浓度(MICs)进行测定。结果 不同抗生素对 STEC 抑制存在差异性。在推荐浓度下, 吡啶黄及头孢磺啶会抑制 *stx1a* 和 *stx2b* 亚型 STEC 的生长, 新生霉素则会抑制 *stx1a*、*stx1c*、*stx1d*、*stx2b*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f*、*stx2g* 等亚型菌株的生长。此外, STEC 与其他革兰氏阴性菌对吡啶黄、头孢磺啶、新生霉素的 MICs 无显著性差异( $P < 0.05$ )。而革兰氏阳性菌对这 3 种抗生素的 MIC 值显著低于革兰氏阴性菌( $P < 0.01$ )。结论 本文结果为 STEC 增菌方法的研发完善提供了有价值的证据。

**关键词:** 产志贺毒素的大肠杆菌; 前增菌; 抗生素

中图分类号: R155

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2022)03-0504-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2022.03.017

**Effect of antimicrobial addition in pre-enrichment broth for Shiga toxin-producing  
*Escherichia coli* isolation**HU Ying<sup>1,2</sup>, ZHAO Linna<sup>2</sup>, BAI Li<sup>3</sup>, CUI Shenghui<sup>2</sup>

(1. College of Public Health, Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 543006, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100025, China; 3. Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, National Health Commission of the People's Republic of China, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100025, China)

**Abstract: Objective** To study the effects of the kind and concentration of antibiotics in pre-enrichment for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in the current international standard method. **Methods** The minimal inhibitory concentrations (MICs) of three antimicrobials supplemented in an STEC enrichment broth of four official methods were measured through testing of a panel of STEC and non-STEC isolates. **Results** There were differences among different antibiotics for the inhibition of STEC. At the recommended concentration, acriflavine and cefsulodin inhibited the growth of *stx1a* and *stx2b* subtypes of STEC, while novobiocin inhibited the growth of *stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2b*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* and *stx2g* subtypes of STEC. In addition, there was no significant difference among MICs of STEC and other gram-negative bacteria to acriflavine, cefsulodin and novobiocin ( $P > 0.05$ ). MICs of gram-positive strains to three tested antimicrobials were significantly lower than those of gram-negative bacteria ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The data provided valuable evidence for the STEC enrichment method development and improvement.

**Key words:** Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; enrichment; antimicrobial

产志贺毒素大肠埃希氏菌 (Shiga toxin-

producing *Escherichia coli*, STEC) 是主要的食源性病原菌, 由于其黏附性及产志贺毒素能力, 可在世界范围引起出血性结肠炎 (Hemorrhagic colitis, HC) 和溶血性尿毒症综合征 (Haemolytic uraemic syndrome, HUS) 等危及生命的疾病<sup>[1]</sup>。这些危害与 STEC 志贺毒素产生及侵入能力相关<sup>[2-3]</sup>, STEC 分泌的志贺毒素 (Shiga toxin, Stx) 基因型分为 *stx1* 型和 *stx2* 型两大类<sup>[4]</sup>, 根据毒力基因序列的多态性 *stx1* 包括 *stx1a*、*stx1c*、*stx1d* 3 种亚型, 而 *stx2* 则包括 *stx2a*、

收稿日期: 2022-03-29

基金项目: 科技部“食品安全关键技术研发”重点专项项目 (2018YFC1604303); 国家自然科学基金面上项目 (31972168)

作者简介: 胡颖 女 讲师 研究方向为食品安全与食源致病菌防控 E-mail: 444719832@qq.com

通信作者: 崔生辉 男 研究员 研究方向为食品安全与食源性病原菌防控 E-mail: cuihenghui@aliyun.com

*stx2b*、*stx2c*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f*、*stx2g* 7 种亚型<sup>[5]</sup>。

研究者对来自世卫组织 10 个不同区域的 21 个国家的统计数据估计,STEC 每年在全球引起 280 万例病人感染,其中 HUS 等重症病例近 4 000 例<sup>[2]</sup>。美国疾控中心对 1 473 株来自病人的 STEC 分析显示:28% 为 O157 血清型,而余下 72% 的 STEC 则多为 O26、O45、O103、O111、O121、O145 这 6 种血清型<sup>[6]</sup>。这些常见血清型 STEC 引发的感染发生在世界各个国家,对民众健康造成了严重危害。鉴于其危害的严重性,不同国家和组织制定了检测食品样品中 STEC 的标准方法和产品限量标准<sup>[7-17]</sup>。在这些标准检测方法中,为了抑制非目标菌的生长,均建议在前增菌富集过程中添加如吡啶黄(Acridiflavine)、头孢磺啉(Cefsulodin)和新生霉素(Novobiocin)等抗生素。然而有研究指出,STEC 检测过程中使用抗生素存在争议<sup>[18]</sup>。

现行国际标准方法推荐使用抗生素及其使用浓度对不同亚型的 STEC 生长是否有影响,目前未见相关研究报道。因此,本研究利用携带不同亚型志贺毒素基因(*stx*)的 STEC 菌株、非产志贺毒素的普通大肠埃希氏菌以及非大肠埃希氏菌等不同菌株,对美国食药局(Food and Drug Administration, FDA)、美国农业部食品检查安全局(US Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service, USDA-FSIS)、欧盟及日本等国际现行检测 STEC 标准方法的前增菌肉汤培养基中使用抗生素的最低抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)进行测定,通过 MIC 值的对比分析探究 STEC 检测使用抗生素的合理性,为 STEC 增菌方法的研发完善提供数据支撑。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器与试剂

MIR-262 恒温培养箱(日本 Sanyo 公司), Thermo-1389 生物安全柜、超低温冰箱(美国 Thermo 公司),MALDI-TOF MS(德国 Bruker 公司),比浊仪(美国 Bio Mériex 公司),Lighting 2000 全自动加样仪(上海星佰)。

胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptone soy agar, TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(Tryptone soybean broth, TSB)、改良缓冲蛋白胨水培养基基础(Buffered peptone water, BPW)、改良 EC 肉汤培养基基础(EC)(美国 BD 公司),新生霉素、吡啶黄、头孢磺啉(Sigma 公司)。

### 1.2 试验菌株

MIC 值测定用菌株包括:*stx1* 或 *stx2* 各亚型基

因阴性、不同血清型 STEC 菌种 20 株,可能影响 STEC 分离的其他普通大肠埃希氏菌 20 株,非大肠埃希氏菌的其他种属菌种 20 株(革兰氏阴性菌 14 株,革兰氏阳性菌 6 株),具体信息详见表 1 和表 2。

表 1 产志贺毒素大肠埃希氏菌信息  
Table 1 The information of Shiga toxin-producing  
*Escherichia coli*

菌株	<i>stx</i> 亚型基因	血清型	来源
FC7815	<i>stx1a/2a</i>	O157:H7	WHO 考核菌株
FC7659	<i>stx1a</i>	O84:H2	生牛肉
FC7658	<i>stx1a</i>	O21:H25	生羊肉
FC7813	<i>stx1c</i>	O103:H2	WHO 考核菌株
FC7779	<i>stx1c</i>	O128:H2	WHO 考核菌株
FC7811	<i>stx1c/2b</i>	O174:H8	WHO 考核菌株
FC7799	<i>stx1d</i>	O41:H26	WHO 考核菌株
FC7783	<i>stx1d</i>	O8:K85	WHO 考核菌株
FC7671	<i>stx2a</i>	O81:H3	牛肛肠拭子
FC7795	<i>stx2a</i>	O121:H9	WHO 考核菌株
FC7805	<i>stx2a/stx2c</i>	O157:H7	WHO 考核菌株
FC7785	<i>stx2b</i>	O118:H12	WHO 考核菌株
FC7791	<i>stx2c</i>	O157:H7	WHO 考核菌株
FC7801	<i>stx2d</i>	O146:H21	WHO 考核菌株
FC7807	<i>stx2d</i>	O66:H15	WHO 考核菌株
FC7665	<i>stx2e</i>	O20:H27	生猪肉
FC7664	<i>stx2e</i>	O77:H30	生猪肉
FC7787	<i>stx2e</i>	O139:H1:K12	WHO 考核菌株
FC7789	<i>Stx2f</i>	O128:H2	WHO 考核菌株
FC7793	<i>Stx2g</i>	O2:H25	WHO 考核菌株

表 2 非产志贺毒素大肠埃希氏菌及非大肠埃希氏菌信息

Table 2 The information of non Shiga toxin-producing  
*Escherichia coli* and non-*Escherichia coli*

菌株	血清型	来源	菌株	来源
FC7495	O157:H7	生羊肉	产气肠杆菌	CMCC45108
FC7497	O157:H7	生猪肉	阪崎杆菌	CMCC45401
FC7499	O157:H7	生羊肉	费氏柠檬酸杆菌	CMCC48098
FC7503	O157:H7	生羊肉	肺炎克雷伯菌	CMCC46124
FC7505	O157:H7	豆子	铜绿假单胞杆菌	CMCC10901
FC7507	O157:H7	鲑鱼	奇异变形杆菌	CMCC49266
FC7509	O157:H7	生羊肉	福氏志贺氏菌	CMCC51660
FC7511	O157:H7	生牛肉	宋内志贺氏菌	CICC21679
FC7513	O157:H42	猪肉	鼠伤寒沙门氏菌	CMCC50970
FC7515	O157:H44	牛肉	肠炎沙门氏菌	CMCC50957
FC7517	O157:H4	鸡肉	副溶血性弧菌	CMCC20031
FC7519	O157:H12	生猪肉	创伤弧菌	CMCC17242
FC7521	O157:H42	猪肉	小肠结肠炎耶尔森氏菌	CMCC52264
FC7523	O157:H12	鸡肉	阴沟肠杆菌	CMCC45303
FC7525	O157:H34	猪肉	蜡样芽孢杆菌	CMCC63312
FC7527	O157:H42	猪肉	英诺克李斯特氏菌	CMCC54103
FC7529	O157:H44	羊肉	单核增生李斯特菌	CMCC54009
FC7531	O157:H4	羊肉	金黄色葡萄球菌	CMCC26303
FC7533	O157:H42	羊肉	表皮葡萄球菌	CMCC26609
FC17862	O83:H42	鸡肉	枯草芽孢杆菌	CMCC63542

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 菌种传代与确认

取-80℃保存于体积比为 1:1 BHI-甘油中的菌种一环,在 TSA 平板上分区划线,于 36℃培养 20~24 h 后,取单个菌落在 TSA 平板上再次分区划线纯

培养,取单菌落用MALDI-TOF MS和VITEK COMPACT 2进行菌种的种属鉴定。20株STEC的*stx*基因亚型基因均通过SCHEUTZ等<sup>[5]</sup>报道方法进行确认。

### 1.3.2 测试菌株对前增菌推荐抗生素在不同培养基中MIC的测定

采用美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的肉汤稀释法<sup>[19]</sup>对表1和表2所列菌株,对STEC检测方法前增菌肉汤中使用的抗生素吡啶黄、头孢磺啶及新生霉素在不同培养基中的MIC值进行测定。

具体方法如下:将吡啶黄配制成9.6 mg/mL浓度溶液,再依次倍比稀释成4.8、2.4、1.2、0.6、0.3、0.15 mg/mL不同浓度;将头孢磺啶配制成8 mg/mL浓度溶液,再依次倍比稀释制备为4、2、1、0.5、0.25、0.125 mg/mL不同浓度;将新生霉素配制成8和3.2 mg/mL浓度溶液,梯度稀释成4、2、1.6、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.3125 mg/mL浓度。取

上述不同浓度抗生素溶液100 μL分别加入到10 mL各肉汤培养基(TSB、EC和BPW)中,充分混匀后各取100 μL,分别加入96孔板中备用,最终96孔板中吡啶黄浓度为96、48、24、12、6、3和1.5 mg/L;头孢磺啶浓度为80、40、20、12、5、2.5和1.25 mg/L;新生霉素浓度为80、40、32、20、16、10、5、2.5、1.25、0.625和0.3125 mg/L。

用无菌棉签取新鲜TSA平板试验菌株二代培养物,加入无菌生理盐水中,制备1.5~2.0麦氏浊度的菌悬液。将上述菌悬液在生理盐水中进行1:100倍稀释,分别取5 μL加入上述不同浓度抗生素溶液的96孔板中。将96孔板用封口膜进行封口后,于36℃培养20~24 h,取出肉眼观察肉汤是否浑浊。逐个记录每个菌株对这3种抗生素的MIC值。MIC测定中,大肠埃希氏菌ATCC 25922被作为质控菌株。

吡啶黄、头孢磺啶及新生霉素在各标准方法中的推荐浓度如表3所示。

表3 标准方法中抗生素使用浓度及增菌培养基

Table 3 Antimicrobial concentration and medium in standard methods

抗生素	浓度/(mg/L)	增菌培养基	方法
吡啶黄	10	BPW	FDA/BAM: Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> <sup>[11]</sup>
	12	TSB	ISO/TS 13136:2012 <sup>[10]</sup>
头孢磺啶	10	BPW	FDA/BAM: Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> <sup>[11]</sup>
	16	TSB	ISO/TS 13136:2012 <sup>[10]</sup>
新生霉素	20	TSB	FSIS Directive 10,010.1 <sup>[8]</sup>
	20	EC	日本/食安监第1120第1号 <sup>[9]</sup>

## 1.4 统计学分析

运用Excel 2019统计验证数据,使用SPSS 19.0软件通过*t*检验,该试验需进行3次重复,每次试验中每株菌需进行2次平行测定。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 前增菌抗生素种类和浓度对不同亚型STEC生长的影响

各标准推荐使用培养基及抗生素均有差异,FDA推荐在BPW肉汤培养基中使用吡啶黄(10 mg/L)和头孢磺啶(10 mg/L),USDA-FSIS推荐在TSB中使用新生霉素(20 mg/L),ISO推荐在TSB中使用吡啶黄(12 mg/L)和新生霉素(16 mg/L),而日本推荐在EC中使用新生霉素(20 mg/L)。测定结果显示STEC在不同培养基中对同一种抗生素具有不同的MIC值,结果见表4。对于吡啶黄,ISO在TSB中浓度为12 mg/L,该浓度会造成某些*stx1a*亚型菌株和*stx2b*亚型菌株的漏检。头孢磺啶在FDA推荐的BPW浓度为10 mg/L时会造成*stx2b*亚型

菌株漏检。新生霉素在两种推荐培养基不同浓度(16或20 mg/L)下对多种亚型菌株存在漏检风险,包括*stx1a*、*stx1c*、*stx1d*、*stx2b*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f*、*stx2g*(表4)。整体而言,FDA推荐BPW中10 mg/L浓度的吡啶黄对表4所列亚型STEC不存在漏检风险。

### 2.2 前增菌抗生素种类和浓度对STEC检测的影响

检测过程中抗生素的添加应不影响目标菌生长,同时对非目标菌起到良好的抑制作用。本研究测定不同抗生素及浓度对其他非目标菌生长的影响结果见表5。试验菌株在3种被测试的培养基中对每种抗生素表现出不同的MIC。对于革兰氏阴性菌,TSB中各抗生素的MIC均显著高于BPW和EC培养基( $P < 0.01$ )。与非STEC大肠埃希氏菌和其他革兰氏阴性菌相比,STEC的MIC没有显著性差异( $P > 0.05$ )。3种培养基中革兰氏阳性菌对3种抗生素的MIC均显著低于革兰氏阴性菌( $P < 0.01$ )。

对比分析与各标准方法中推荐使用的抗生素浓度条件发现,吡啶黄、头孢磺啶和新生霉素不仅对某些亚型STEC存在抑制作用,而且对其他革兰

表 4 不同亚型 STEC 在标准检测方法推荐培养基中对抗生素的 MICs

Table 4 Antimicrobial MICs for different subtypes STEC in medium recommended by standard methods

菌株	基因亚型	吡啶黄		头孢磺啶	新生霉素	
		TSB(12 mg/L)	BPW(10 mg/L)	BPW(10 mg/L)	TSB(16或20 mg/L)	EC(20 mg/L)
FC7815	<i>stx1a/2a</i>	24	12	40	80	32
FC7659	<i>stx1a</i>	24	12	40	80	40
FC7658	<i>stx1a</i>	12	12	40	20	16
FC7813	<i>stx1c</i>	24	12	40	32	16
FC7779	<i>stx1c</i>	24	24	40	80	32
FC7811	<i>stx1c/2b</i>	12	12	10	20	10
FC7799	<i>stx1d</i>	24	12	40	80	40
FC7783	<i>stx1d</i>	24	12	40	16	5
FC7671	<i>stx2a</i>	24	12	40	80	32
FC7795	<i>stx2a</i>	24	24	>80	>80	80
FC7805	<i>stx2a/stx2c</i>	24	24	40	>80	40
FC7785	<i>stx2b</i>	12	12	10	80	20
FC7791	<i>stx2c</i>	24	12	20	80	80
FC7801	<i>stx2d</i>	24	12	20	16	16
FC7807	<i>stx2d</i>	24	24	>80	20	16
FC7665	<i>stx2e</i>	24	12	20	32	32
FC7664	<i>stx2e</i>	24	12	40	16	16
FC7787	<i>stx2e</i>	24	12	40	32	20
FC7789	<i>Stx2f</i>	24	12	40	10	10
FC7793	<i>Stx2g</i>	24	12	80	10	10

表 5 不同菌株对 3 种抗生素的 MIC 分析

Table 5 Antimicrobial MIC of different bacterial strains

菌株 <sup>a</sup>	浓度/(mg/L)	吡啶黄			浓度/(mg/L)	头孢磺啶			浓度/(mg/L)	新生霉素		
		菌株数/n				菌株数/n				菌株数/n		
		BPW	EC	TSB		BPW	EC	TSB		BPW	EC	TSB
A	≤3	—	2	—	10	2	1	—	≤10	4	4	2
	6	—	1	—	20	3	1	—	16	4	5	3
	12	16	13	3	40	12	16	9	20	2	2	3
	24	4	4	17	>40	3	2	11	>20	10	9	12
B	12	10	16	—	20	—	—	—	16	1	1	—
	24	8	4	20	40	16	16	9	20	6	1	—
C	>24	2	—	—	>40	4	4	11	>20	13	18	20
	≤3	1	3	1	≤5	1	1	1	≤10	6	6	5
	6	2	2	3	20	3	5	2	16	—	—	1
	12	3	3	1	40	2	3	6	20	—	—	—
D	≥24	8	6	9	>40	8	5	5	>20	8	8	8
	≤3	2	6	6	<1.25	3	4	4	≤0.3125	3	6	1
	6	1	—	—	1.25	2	1	1	0.625	3	—	3
	12	3	—	—	40	1	1	1	1.25	—	—	2

注:<sup>a</sup>表示 MIC 值为当前浓度的菌株数量。A:STEC (n=20);B:Non-STEC (n=20);C:其他种属革兰氏阴性菌(n=14);D:其他种属革兰氏阳性菌(n=6)

氏阴性菌的鉴别抑制能力较差,仅对革兰氏阳性菌具有良好的抑制性。说明标准方法推荐使用抗生素及其使用浓度并不利于所有 STEC 的检出,可能会造成日常检测工作中 STEC 的漏检。

### 3 结论与讨论

吡啶黄、头孢磺啶和新生霉素是国际现行检测 STEC 标准检测方法中推荐使用的抑菌抗生素,促进 STEC 生长的同时抑制革兰氏阳性细菌的生长<sup>[7-110]</sup>。本研究数据表明,不同官方方法推荐的抗生素添加浓度对 STEC 均有不同程度的抑制性,这种抑制性的强弱出现在不同亚型菌株和相同亚型的不同菌株之间。结果显示抑制作用最强的是新生霉素,对测

定的某些亚型(*stx1a*、*stx1c*、*stx1d*、*stx2b*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f*、*stx2g*)STEC 全部或部分菌株存在一定的漏检风险,而吡啶黄和头孢磺啶则对 *stx1a*、*stx2b* 亚型 STEC 存在漏检风险。此外,数据显示标准推荐的抗生素添加浓度下均对 *stx2b* 亚型 STEC 菌株存在抑制性,该亚型菌株或可作为未来 STEC 前增菌抗生素添加条件摸索的模式菌株,但由于测定的 *stx2b* 亚型菌株数量少,这个推论还需扩大菌株数量进一步验证。其中 FDA 推荐在 BPW 中添加浓度为 10 mg/L 吡啶黄时虽未见 STEC 漏检风险,但标准方法推荐的抗生素及其浓度显示对其他革兰氏阴性细菌的抑制能力较弱。随着研究不断深入,由于 STEC 的志贺毒素编码基因位于噬菌体或前噬菌体上,这些噬菌体

并未携带统一的耐药基因<sup>[20-21]</sup>,致使 STEC 与普通大肠杆菌对抗生素敏感性没有特征性差别,选择性抗生素的使用可能会增加某些耐药 STEC 检出,但对抗生素敏感的 STEC,反而会降低其检出率<sup>[22-23]</sup>,与本研究结果一致。

这 3 种抗生素之所以在 STEC 和其他革兰氏阴性菌之间的辨别力差,是因为 STEC 和其他革兰氏阴性菌缺乏对这些抗生素的特异性抑制机制<sup>[16]</sup>。某些食品样品中 STEC 菌细胞的污染水平低于 1 MPN/g 样品<sup>[24-25]</sup>。研究表明,补充了抗生素的选择性富集培养基不能支持某些 STEC 菌株的生长,尤其是在少量 STEC 菌株的情况下<sup>[26-27]</sup>。试验数据表明,3 种抗生素的细菌 MIC 值取决于培养基组成,大多数细菌在 TSB 中显示出更高的 MICs,但官方方法给定的抗生素添加浓度接近或高于某些 STEC 的 MIC,这可能会导致生长抑制和假阴性结果。此外,由于 *stx* 基因通常位于噬菌体或噬菌体上<sup>[20]</sup>,它们不携带特定的抗菌选择标记,并且多重耐药性革兰氏阴性菌广泛分布于食品样品中<sup>[21]</sup>,因此,吡啶黄、头孢磺啶和新生霉素对食品样品中 STEC 的富集适用性不强,在 STEC 增菌肉汤中添加这 3 种抗生素并未比其他常见的革兰氏阳性细菌抑制剂显示出更大的优势。此外,菌株如对某种药物存在抗性,则对其他药物更易表现出抗性或易感性,称为交叉耐药或超敏感性现象,抗生素的联合使用往往起到增效作用<sup>[28]</sup>。FDA 推荐在增菌液中联合使用吡啶黄、头孢磺啶及万古霉素,试验数据表明标准推荐浓度下吡啶黄和头孢磺啶均能抑制某些亚型 STEC 的生长,这种抑制性在两者联合使用时可能更强,研究报道也证实了头孢磺啶联合万古霉素相较三者联用更利于 STEC 的检测<sup>[29]</sup>。因此,按照其他研究建议<sup>[30]</sup>,在 STEC 增菌肉汤中添加其他革兰氏阳性菌抑制剂(如万古霉素或胆汁盐)替代标准检测方法推荐使用的这 3 种抗生素可能会减少假阴性结果。

综上,本研究通过对国际现行检测 STEC 标准方法推荐用抗生素进行不同亚型 STEC、非 STEC 大肠埃希氏菌及其他可能影响 STEC 检测的非大肠埃希氏菌 MIC 值测定发现,抗生素的添加在 STEC 检测过程中对非目标菌的抑制性差的同时,对某些亚型 STEC 具有漏检风险,研究结果为我国 STEC 检测方法建立及完善提供了丰富的数据支撑,尤其对 STEC 增菌方法的开发具有重要价值。

## 参考文献

[1] ZUMBRUN S D, MELTON-CELSA A R, SMITH M A, et al.

Dietary choice affects Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 colonization and disease[J]. PNAS, 2013, 110(23): E2126-E2133.

[2] MAJOWICZ S E, SCALLAN E, JONES-BITTON A, et al. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: A systematic review and knowledge synthesis[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(6): 447-455.

[3] COINTE A, BIZOT E, DELANNOY S, et al. Emergence of New ST301 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Clones Harboring Extra-Intestinal Virulence Traits in Europe. Toxins (Basel), 2021, 26;13(10):686.

[4] DE RAUW K, JACOBS S, PIÉRARD D. Twenty-seven years of screening for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a university hospital. Brussels, Belgium, 1987-2014 [J]. PLoS One, 2018, 13(7): e0199968.

[5] SCHEUTZ F, TEEL L D, BEUTIN L, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(9): 2951-2963.

[6] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National enteric disease surveillance: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) annual report, 2014[R/OL]. (2017-02-08)[2022-03-29]. [https://www.cdc.gov/national-surveillance/pdfs/STEC-2014-REPORT\\_508c.pdf](https://www.cdc.gov/national-surveillance/pdfs/STEC-2014-REPORT_508c.pdf).

[7] US Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service. Sampling verification activities for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in raw beef products - Revision 4 [EB/OL]. WASHINGTON, DC: FSIS Directive 10,010.1, 2015.

[8] 厚生省医药食品局安全对策科. 肠道出血性大肠杆菌关于 O26、O103、O111、O121、O145 及 O157 的检查法: 食安监发 1120 第 1 号 [S]. 东京: 日本厚生劳动省, 2014.

Department of safety countermeasures, Ministry of health, pharmaceutical and Food Administration. Inspection method for intestinal hemorrhagic *Escherichia coli* O26, O103, o111, o121, o145 and O157: food safety supervision and development 1120 No.1 [S]. Tokyo, Japan: Ministry of Health, Labour and Welfare, 2014.

[9] International Organization for Standardization (ISO). 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: ISO/TS 13136: 2012 (en) [S]. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2012.

[10] FENG P, WEAGANT S D, KAREN J. BAM Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli* [M]. United States Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 2020.

[11] The Federal Meat Inspection Act. 21 Code chapter U.S. 12-Meat inspection [EB/OL]. (2019-12-20)[2022-03-29]. <https://www.law.cornell.edu/uscode/text/21/chapter-12>.

[12] Official Journal of the European Union. Commission Regulation (EU) No 209/2013 of 11 March 2013 amending regulation (EC) No 2073/2005 as regards microbiological criteria for

- sprouts and the sampling rules for poultry carcasses and fresh poultry meat [S/OL]. Official Journal of the European Union, 2013. [https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg209\\_2013.pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg209_2013.pdf).
- [13] BENNETT S D, SODHA S V, AYERS T L, et al. Produce-associated foodborne disease outbreaks, USA, 1998-2013 [J]. *Epidemiology and Infection*, 2018, 146(11): 1397-1406.
- [14] FSANZ. Compendium of microbiological criteria for food[S/OL]. Australia and New Zealand; Food Standards Australia New Zealand, 2018. [https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Compedium%20of%20Microbiological%20Criteria/Compendium\\_revised-Sep%202018.pdf](https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Compedium%20of%20Microbiological%20Criteria/Compendium_revised-Sep%202018.pdf).
- [15] AFDS. Food code: NO. 2021-54 [S/OL]. Chungcheongbuk-do, Republic of Korea; Administration of Food and Drug Safety, 2021. [https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m\\_15/view.do?seq=69982](https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_15/view.do?seq=69982).
- [16] 食品安全中心. 即食食品微生物指南[Z/OL]. 香港特别行政区: 食品环境卫生署, 2002.  
Center for Food Safety. Microbiological guidelines for ready-to-eat food[Z/OL]. Hong Kong: Food and Environmental Hygiene Department, 2002. [https://www.cfs.gov.hk/english/food\\_leg/files/ready-to-eat-food.pdf](https://www.cfs.gov.hk/english/food_leg/files/ready-to-eat-food.pdf).
- [17] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量: GB 29921—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.  
National Health and Family Planning Commission. Food safety national standard limit of pathogenic bacteria in prepackage food: GB 29921—2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021.
- [18] WASILENKO J L, FRATAMICO P M, NARANG N, et al. Influence of primer sequences and DNA extraction method on detection of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef by real-time PCR targeting the *eae*, *stx*, and serogroup-specific genes [J]. *Journal of Food Protection*, 2012, 75(11): 1939-1950.
- [19] WAYNE P. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement [J]. CLSI document M100-S20, 2010.
- [20] NAKAMURA K, OGURA Y, GOTOH Y, et al. Prophages integrating into prophages: A mechanism to accumulate type III secretion effector genes and duplicate Shiga toxin-encoding prophages in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*, 2021, 17 (4): e1009073.
- [21] KRÜGER A, LUCCHESI P M A. Shiga toxins and *stx* phages: Highly diverse entities [J]. *Microbiology: Reading, England*, 2015, 161(P3): 451-462.
- [22] AMAGLIANI G, ROTUNDO L, CARLONI E, et al. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in ground beef and bean sprouts: Evaluation of culture enrichment conditions [J]. *Food Research International*, 2018, 103: 398-405.
- [23] CUI S, MENG J, BHAGWAT A A. Availability of glutamate and arginine during acid challenge determines cell density-dependent survival phenotype of *Escherichia coli* strains [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (10): 4914-4918.
- [24] GILL A, CARRILLO C, HADLEY M, et al. Bacteriological analysis of wheat flour associated with an outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O121 [J]. *Food Microbiology*, 2019, 82: 474-481.
- [25] KHAN S B, ZOU G, XIAO R, et al. Prevalence, quantification and isolation of pathogenic Shiga toxin *Escherichia coli* O157: H7 along the production and supply chain of pork around Hubei Province of China [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 115: 93-99.
- [26] 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). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2016, 85(3):302-308
- [27] STROMBERG ZR, LEWIS GL, MARX DB, et al. Comparison of Enrichment Broths for Supporting Growth of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*. 2015, 71(2):214-9.
- [28] Lázár V, PAL SINGH G, SPOHN R, et al. Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. *Mol Syst Biol*, 2013, 9:700.
- [29] AMAGLIANI G, ROTUNDO L, CARLONI E, et al. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in ground beef and bean sprouts: evaluation of culture enrichment conditions [J]. *Food Research International*, 2018, 103: 398-405.
- [30] FRATAMICO P M, BHAGWAT A A, INJAIAN L, et al. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from swine feces [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2008, 5(6): 827-838.