

水中大肠埃希菌多管发酵法测定方法探讨

许琰, 孙双福, 崔琳 (上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

世界卫生组织的调查表明,在发展中国家,各类疾病有 8% 是因为饮用了不安全、不卫生的水而传播的,每年大约有 2 000 万人死于饮用不卫生的水。饮水安全问题严重威胁着人类生命,成为全球健康危害之一。

饮用水细菌污染是饮水安全中最主要的威胁因素之一。我国《生活饮用水标准检验方法》GB5750.12—2006 中是以菌落总数、总大肠菌群、耐热大肠菌群和大肠埃希菌 4 项作为细菌检测的指标^[1]。大肠埃希菌是评价水体受人畜粪便污染的重要指示菌^[2],它是一种条件致病菌,当它的数量超过一定限度时,就容易在人体肠道内繁殖,导致肠道的正常菌群紊乱,从而引起腹泻等疾病^[3-4]。截至 2003 年,美国已有 19 个洲采用大肠埃希菌作为评价水质好坏的指标^[5]。2006 年,欧盟强制将大肠埃希菌作为水质微生物的检测指标^[6]。

目前,大肠埃希菌的主要检测方法有多管发酵法、滤膜法和酶底物法等。其中最为常用的是多管发酵法。我国《生活饮用水标准检验方法》GB5750.12—2006 中,多管发酵法使用 EC-MUG 培养基进行大肠埃希菌检验。在实际应用中,由于荧光显色不明显而造成一定比例的漏检。为了减少假阴性的发生,我们将在优化 EC-MUG 培养基配方的基础上,用大肠埃希菌多管发酵法将其与 MUG 培养基进行比对实验。

1 材料与方法

1.1 材料

EC-MUG 培养基;MUG 培养基;EMB 平板;15% NaOH 溶液;1 mol/L HCL 溶液;pH 试纸。以上材料均购于中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心。

50 株大肠埃希菌菌株(用 VITEK2 全自动生化鉴定仪鉴定均为大肠埃希菌);质控菌株为大肠杆菌 ATCC 25922。

1.2 仪器

所用仪器有 (36 ± 1) °C 恒温培养箱; (44.5 ±

0.5) °C 恒温培养箱;紫外光灯 (6W、波长 366 nm)

1.3 方法

1.3.1 实验菌制备 将大肠杆菌 ATCC 25922 和 50 株大肠埃希菌菌株分别接种于 EMB 平板进行纯培养,置于 36 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后取出备用。

1.3.2 EC-MUG 培养基中乳糖、胰蛋白胨品牌比对实验 从 EMB 平板上挑取大肠杆菌 ATCC 25922 接种于 (0.0% ~ 0.5%) 乳糖、胰蛋白胨 (分别生产于汇合、OXOID、淄博启迪) 配制而成的 EC-MUG 培养基中,置于 44.5 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后取出,在暗处用紫外光灯 (6W、波长 366 nm) 照射,观察结果并做空白对照。

1.3.3 不同 pH 条件下的比对实验 从 EMB 平板上挑取大肠杆菌 ATCC 25922 接种于 EC-MUG 培养基 (0.2% 乳糖、OXOID 胰蛋白胨) 中,置于 44.5 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后,用 15% NaOH 和 1 mol/L HCl 将培养液 pH 分别调至 5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5,再用紫外光灯 (6W、波长 366 nm) 进行照射,观察结果并做空白对照。

1.3.4 两种比对实验 从 50 块 EMB 平板上挑取大肠埃希菌分别接种于以上两种不同培养基中,置于 44.5 °C 恒温培养箱中培养 24 h,取出后用 15% NaOH 溶液对 EC-MUG 培养基 (0.2% 乳糖、OXOID 胰蛋白胨) 的 pH 进行调整,使其在 7 ~ 7.5 左右,再用紫外光灯 (6W、波长 366 nm) 分别对两种培养基进行照射,观察其结果并做空白对照。

2 结果

2.1 比对实验

实验结果显示,用 0.2% 乳糖含量配制的 EC-MUG 培养基经培养后,其荧光强度略高于其他 5 组;用 OXOID 胰蛋白胨配制的 EC-MUG 培养基经培养后其荧光强度略高于其他 2 组。其中,EC-MUG 培养基 (0.2% 乳糖、OXOID 胰蛋白胨) 经培养后其荧光效果较好 (表 1)。

表 1 EC - MUG 培养基中乳糖、胰蛋白胍品牌比对结果

乳糖含量 (%)	荧光强度		
	汇合	OXOID	淄博启迪
0.0	± ~ +	± ~ +	± ~ +
0.1	± ~ +	± ~ +	± ~ +
0.2	+	+ ~ + +	+
0.3	± ~ +	± ~ +	± ~ +
0.4	± ~ +	± ~ +	± ~ +
0.5	± ~ +	± ~ +	± ~ +

注:荧光强度由弱至强分别为:一、±、+、++、+++、++++
实验空白:阴性

2.2 不同 pH 条件下比对实验

在 pH 7 ~ 7.5 时,实验结果的荧光最强。pH 在 8.5 时荧光强度明显减弱,pH < 6.5 时荧光强度缓慢下降;荧光强度与溶液 pH 有显著相关性。见表 2。

表 2 不同 pH 显色结果

pH 值	荧光强度	pH 值	荧光强度
5.0	±	7.0	++++
5.5	+	7.5	++++
6.0	++	8.0	+++
6.5	+++	8.5	±

实验空白:阴性

2.3 两种培养基比对实验

用 MUG 培养基与用 EC - MUG 培养基(0.2% 乳糖、OXOID 胰蛋白胍)(pH 7 ~ 7.5)产生的荧光强度相近。见表 3。

表 3 EC - MUG 培养基和 MUG 培养基比对结果

荧光强度	EC - MUG 产荧光管数	MUG 产荧光管数
++	2	1
+++	13	11
++++	35	38
合计	50	50

实验空白:阴性

3 讨论

EC - MUG 培养基和 MUG 培养基中含有 4 - 甲基伞形酮 - β - D - 葡萄糖醛酸苷。大肠埃希菌含有的葡萄糖醛酸苷酶,在碱性条件下作用于培养基中 4 - 甲基伞形酮 - β - D 葡萄糖醛酸苷(4 - Methylumbelliferyl - β - D - Glucuronide, MUG)的 β 糖醛酸苷键,使其水解,所释放的 4 - 甲基伞形酮在 366 nm 紫外灯下产生蓝白色荧光,根据有无荧光来判断样品中是否含有大肠埃希菌。97% 的大肠埃希菌、10% 的沙门菌(亚利桑那亚种)^[7]、少量的志贺菌(宋内)以及少数革兰阳性球菌具有葡萄糖醛酸苷酶^[8]。培养基中含有的选择性抑菌剂可以抑制革兰阳性菌;从而排

除了革兰阳性球菌对大肠埃希菌检测的干扰。国家标准中,大肠埃希菌的检验是在总大肠菌群初发酵产酸或产气的情况下进行的,而沙门菌(亚利桑那亚种)和宋内、志贺菌在(24 ± 2) h 内初发酵不产酸或产气,继而也排除了这 2 种菌对大肠埃希菌检测的干扰。

实验表明,《生活饮用水标准检验方法》GB5750.12—2006 中,多管发酵法使用的培养基经过一定改良后,采用 EC - MUG 培养基(0.2% 乳糖、OXOID 胰蛋白胍)可使荧光强度增加;调节培养后溶液 pH 可显著提高荧光强度,pH 在 7.0 ~ 7.5 时荧光效果最好。因此,采用多管发酵法检测大肠埃希菌时,培养基的 pH 条件是影响实验荧光强度的主要因素,调节培养后溶液的 pH 可有效减少假阴性的发生。

2010 年版《中华人民共和国药典》中,大肠埃希菌检验使用的是 MUG 培养基^[9]。我们将该培养基与改良后 EC - MUG 培养基进行比对实验,证实两者的实验结果相近。由于使用 EC - MUG 培养基时,为提高荧光强度可能需要每次调节培养后溶液 pH,操作较繁琐,故可以用 MUG 培养基替代 EC - MUG 培养基进行大肠埃希菌多管发酵法的检测。

由于大肠埃希菌各菌株间酶活性不完全相同,对底物和底物浓度反应的差异、培养基中选择因子的影响、培养时间、温度、pH 的改变、大量竞争菌和样品本身物质成分的干扰等因素对结果的判断均可能造成影响。在实验操作过程中需要注意的是,配制 EC - MUG 培养基时,务必校正灭菌后 pH,根据国家标准要求使其控制在 6.9 ± 0.1。在日常使用前也需要测试一下 EC - MUG 培养基的 pH,以避免由于其放置一段时间后其中的水分蒸发等因素改变其 pH 值,从而影响实验结果的观察。另外,分装 EC - MUG 培养基的试管应作挑选,试管和蛋白胍不得显荧光。在观察实验结果时,可将各管调换位置(阴性管居中),适当倾斜试管;如阳性管荧光强烈,影响到其余结果的观察,亦可移去阳性管后观察实验结果。

4 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5750.12 - 2006 生活饮用水标准检验方法. 微生物指标[S]. 2006.
- [2] 阮国洪. 水环境中微生物的分析进展[J]. 中国人兽共患病杂志,2003,19(5):119 - 121.
- [3] 丁程成. 欧美水质大肠菌群相关检验标准探究[J]. 环境科技,2010,23(1):67 - 69.
- [4] 张倩华. 农村生活饮用水水质检测结果分析[J]. 当代医学,2012,18(12):161 - 162.
- [5] Michael P D, Marilyn C E. The fecal coliform assay, the re-

- sults of which have led to numerous misinterpretations over the years, may have outlived its usefulness[J]. Am Soc Microbiol, 2006, 32: 123 - 126.
- [6] Garcia A T, Prats J, Servais P. Comparison of culturable fecal coliform and E. coli enumeration in freshwaters[J]. Can J Microbiol, 2007, 53: 798 - 801.
- [7] 陈汝仪, 许杏春. 一例亚利桑那沙门菌引起化脓性脑膜炎的报道[J]. 临床检验杂志, 1992, 10(3): 116.
- [8] 苏德模, 徐维洁, 许华玉, 等. MUG - EMB 快速检定大肠杆菌的方法研究[J]. 卫生研究, 1994, 23(6): 343 - 347.
- [9] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 2010 年版. 附录 XIII C 微生物限度检查法[S]. 2010.
- (收稿日期: 2013 - 03 - 07)

文章编号: 1004 - 9231(2013)06 - 0342 - 03

· 临床检验 ·

四种血清标志物在小细胞肺癌诊治中的意义

李奕萍¹, 诸葛飞²

(1. 浙江省淳安县第一人民医院检验科, 浙江 淳安 311700; 2. 浙江省老年关怀医院检验科, 浙江 杭州 310014)

肺癌在我国肿瘤发病率中位居首位, 近年来呈现增高趋势。小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 约占肺癌的 20% ~ 25%, 恶性程度高, 生长迅速, 转移发生早, 5 年总体生存率不足 10%。肿瘤标志物检测在肺癌的早期诊断、病理分型、疗效评估及复发监测中发挥重要作用。但是单一肿瘤标志物在临床检测中存在敏感度和特异度不足的缺点, 我们通过对胃泌素释放肽前体 (pro - gastrin releasing peptide, Pro GRP)、组织多肽特异性抗原 (tissue polypeptide specific antigen, TPS)、神经元特异烯醇化酶 (neuron - specific enolase, NSE) 和癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 的联合检测, 探讨不同组合在 SCLC 中的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

SCLC 组: 选取 2010 年 1 月—2012 年 1 月我院经病理确诊的 SCLC 初诊患者 94 例, 男 61 例, 女 33 例, 年龄 (56.2 ± 5.8) 岁。按美国退伍军人管理局系统医院 SCLC 分期方法, 局限期 (limited disease, LD, 病变局限于一侧胸腔, 且能被纳入 1 个放射治疗野) 60 例; 广泛期 (extensive disease, ED, 病变超出一侧胸腔, 包括恶性胸腔、心包积液或血性转移, 及同一肺叶或不同肺叶多个病灶) 34 例。治疗后患者 205 例, 分为完全缓解 (CR)、部分缓解 (PR)、稳定 (SD)、进展 (PD)。肺良性疾病组: 同期本院肺良性疾病患者

120 例, 男 60 例, 女 60 例, 年龄 (51.6 ± 10.7) 岁; 包括肺炎 60 例、慢性阻塞性肺病 30 例、肺结核 30 例, 均无其他疾病。健康对照组: 同期本院健康体检者 200 例, 男 100 例, 女 100 例, 年龄 (45.9 ± 5.1) 岁, 肝、肾功能正常, 胸部 X 线排除肺部病变。

1.2 标本采集

应用带有惰性分离胶的进口真空采血管分别抽取待检者空腹静脉血 4 mL, 其中治疗前 SCLC 患者标本 94 份, 治疗后患者 205 份 (CR 33 份、PR 86 份、SD 41 份、PD 46 份)。所有样品均自然凝集 30 min, 8℃ 4 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, -80℃ 保存待测。肺良性疾病组和健康对照组用同样方法处理标本。

1.3 实验检测与质量控制

应用 ARCHITECT i2000SR 化学发光免疫分析仪及其配套试剂盒检测 Pro GRP。应用瑞士 Roche 公司 E - 170 电化学发光免疫分析仪及原装进口配套试剂检测 NSE、CEA。应用瑞典 IDL Biotech AB 公司的试剂盒, 在瑞士澳斯邦公司的 FAME 自动板式免疫分析仪上检测 TPS。所有操作按说明书严格进行, 质控品采用原装进口配套试剂, 室内质控和室间质控均合格。我院 Pro GRP、TPS、NSE、和 CEA 的临界参考值分别为 50 ng/L、80 U/L、18 × 10³ ng/L 和 5 × 10³ ng/L。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 19 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 ± 标准差表示, 计数资料以率表示, 采用秩和检验或 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

作者简介: 李奕萍 (1968—), 女, 副主任技师。