

大肠埃希菌的微生物检验方法及分析

田承莉

(四川省达州市大竹县中医院 四川 达州 635100)

【摘要】目的：总结大肠杆菌的微生物检验方法及临床意义。方法：选择医院在2020年9月-2021年9月送到微生物检验室的样本30例，按照《药典》规定进行微生物检验。结果：30例样本中，经过上述检测方式，检测出有18例有E.coli菌落，与实际检验结果一致。阳性对照组中明显存在E.coli，阴性对照组中没有E.coli生长。E.coli在MacA平板上的表现形态：菌落颜色呈鲜桃红色，少数呈微红色，菌落中心多数为深桃红色；形状圆形，较扁平；边缘齐整，表面光滑，湿润。结论：按照药典规定进行大肠埃希菌的微生物检验方法有较高的准确性，可以为临床治疗和用药提供参考。

【关键词】大肠埃希菌；微生物检验；方法

Microbiological test method and analysis of Escherichia coli

Chengli Tian

(Dazhu County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Dazhou, Sichuan, 635100)

[Abstract] Objective: To summarize the microbial test methods and clinical significance of E. coli. Methods: Select 30 samples sent to the microbial laboratory from September 2020 to September 2021, and conduct the microbial test according to the provisions of the Pharmacopoeia. Results: Among the 30 samples, 18 cases had E.coli colonies detected, which was consistent with the actual test results. E.coli was evident in the positive control group, and no E.coli growth occurred in the negative control group. E.coli on MacA plate: bright peach red, few slightly red, mostly dark peach red in colony center; round, flat; neat edges, smooth, moist surface. Conclusion: The microbial test method of Escherichia coli according to the Pharmacopoeia has high accuracy and can provide reference for temporary treatment and medication.

[Key words] Escherichia coli; microbiological test; method

引言

大肠埃希菌就是大肠杆菌(E.coli)，属于革兰氏阴性段杆菌，也是人和动物肠道内的正常栖息菌。但是E.coli本身具有致病性，或者会受环境变化的影响而产生致病性，导致个体出现感染，比如伤口感染、肠道感染等。或者在食物中，如果E.coli的浓度超标，也存在感染风险，因此需要进行微生物检验工作。微生物检验是一个复杂的工作，主要针对各项微生物指标进行检测，检验流程比较明确，标准也比较统一，可能影响检测结果准确性的因素也比较多，其中检验方法的选择是影响因素之一。也因此，如果能够在微生物检验过程中关注这些关键环节的质量控制工作，保证各个检验环节的顺利进行，就可以保证最终的检验质量，明确E.coli的含量。本次就对E.coli的微生物检验方法进行分析。

1 资料与方法

1.1 材料

选择医院在2020年9月-2021年9月送到微生物检验室的样本30例，大肠埃希菌菌株[CMCC(B)44102]由中国食品药品检定研究院提供。准备好恒温培养箱、全自动血培养仪、梅里埃药敏鉴定仪，培养基主要是血平板培养基、麦康凯琼脂培养基(MacA)以及麦康凯肉汤培养基(MacB)。

1.2 方法

按照《药典》要求进行E.coli的微生物检验。具体内容：首先是在无菌操作台，血平板称取培养基基础，加入蒸馏水或去离子水，搅拌煮沸到完全溶解，分装到三角瓶中，选择121℃高压灭菌15min。在培养基冷却到50℃左右后，按照无菌操作要求，每100mL培养基加入脱纤维羊血或兔血5-10mL，摇晃倾注到平板上，保证均匀。然后使用试管吸取10mL待检样品供试液划线或涂布到血平板培养基中，同时取中性的牛肉膏-蛋白胨缓冲液10mL接种到另一个血

平板培养基中，作为阴性对照组。另外取10mL样品供试液接种到第三个血平板培养基中，加入菌落数为10-100cfu的大肠杆菌菌悬液作为阳性对照组。将上述培养基置于恒温培养箱中，选择36±1℃的条件培养24h；再取培养物1mL，接种到MacB培养基中，选择42℃的条件恒温培养24h；在长出菌落后，使用接种环蘸取培养物接种到MacA培养基中，选择33℃的条件恒温倒置培养8h。检查培养基内菌落的类别，如果发现生长出菌落，就进行分离纯化和鉴定，检验得到阳性结果的认定为检测出E.coli，如果没有长出菌落或者鉴定结果为阴性，则认为没有检测出E.coli。

1.3 观察指标

观察培养基中出现菌落的情况。

2 结果

2.1 检验效果

30例样本中，经过上述检测方式，检测出有18例有E.coli菌落，与实际检验结果一致。阳性对照组中明显存在E.coli，阴性对照组中没有E.coli生长。

2.2 E.coli在MacA平板上的生长形态

菌落颜色呈鲜桃红色，少数呈微红色，菌落中心多数为深桃红色；形状圆形，较扁平；边缘齐整，表面光滑，湿润。

3 讨论

质量是所有医疗单位赖以生存与发展的保证，其与群众的身体健康息息相关。21世纪，医疗领域单位应对行业内外环境变化，不断调整发展战略，紧抓机会，不断改进创新，才能在竞争激烈的医药行业中应对挑战，提升个体竞争力，适应时代需求。所以关注病原学诊断，是临床医学的关键内容。^[1]这需要遵守规定进行微生物检验工作，保证检验结果全面、准确和合理。

微生物检验是临床上的重要工作内容，可以帮助工作人员发现样本中是否存在微生物，是否具有致病性，这是保证

生物安全, 预防感染性疾病出现的合理操作。近年来随着医学技术的不断进步, 微生物检验工作需求和 workload 也不断提升, 检验方法逐渐丰富, 检验技术的便捷程度也逐渐升高。^[2]

目前来说, 微生物检验主要有两方面的内容: 指示菌检测, 主要是按照判断是否合格的指标进行的, 比如菌落数量; 具体来讲有细菌总数以及大肠杆菌检验两个方面, 主要用于判断是否被污染。^[3] 致病菌检测, 相应标准中对于大部分微生物含量有明确规定, 其中部分是致病菌, 如果致病菌含量超标, 就表示已被污染, 比如蜡样芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌等。开展这项工作, 需要了解微生物学与医学微生物学, 明确实验室生物安全、消毒灭菌技术、医院感染内容, 掌握微生物检验标本的采集、处理原则和方法, 包括血液、脑脊液、脓液、痰液、粪便等多种类型。在实验室中, 进行微生物检验的方法主要是微生物分离法, 即采集可疑样本或血液、痰液、粪便等, 进行细菌培养、纯化, 然后分离出其中的致病菌进行分别鉴定。^[4] 具体的鉴定方法有很多, 血清学分型、噬菌体分型、细菌素分析、分子分型、质粒图分析等都可以达成鉴别目标。

大肠杆菌作为人体正常的肠道菌群, 有一定的致病性, 特别是血浆凝固酶, 致病水平较高。而致病性的 *E. coli*, 主要分为产肠毒素性、肠道侵袭性、肠道致病性、肠集聚性黏附性以及出血性大肠杆菌五种。大部分情况下 *E. coli* 感染带来的问题, 主要是腹泻和食物中毒, 比如熟肉制品、牛肉、生牛奶等食物中, 就可能含有超标的 *E. coli*, 人如果没有彻底加热就直接进食这些受污染的食物, 就可能出现食物中毒问题, 而且多出现在 3 月份和 9 月份。从医学临床经验分析, 在泌尿系统、呼吸系统等疾病个体的被感染部位, 都可以分离到 *E. coli*, 如果不能对其的感染进行合理控制, 就可能出现超广谱 β -内酰胺酶, 会导致医院感染问题的出现和爆发。^[5] 因此临床上进行 *E. coli* 的微生物检验有积极意义, 准确性也较高, 帮助医生结合检验结果提供高效药物, 避免出现耐药性以及滥用抗生素的问题。

E. coli 的微生物检验方法有很多, 比如发酵法、滤膜法、平板计数法等。(1) 发酵法: 该方法是在 44.5℃ 下的培养基上进行培养, 选择的这个培养基有荧光底物, 培养 24h 之后利用葡萄糖醛酸释放荧光底物, 让培养基可以在紫外线照射下发出荧光。同时该方法也可以用于统计原来样品中的菌落。(2) 滤膜法: 该方法的具体操作首先是在清洁干净滤器的内壁, 然后加入 10mL 无菌水再进行过滤, 将滤膜放在 M-FC 培养基中, 禁止出现气泡, 之后进行密封, 44.5℃ 条件下放置 24h, 直到菌群变成蓝色或蓝绿色。变色就说明存在 *E. coli*。(3) 平板培养法: 使用无菌吸管吸取稀释样品 1mL, 放入无菌培养皿中, 再加入 45℃ 下的 CDLJJD 显色培养基中 10mL 的量, 然后快速转动培养皿使溶液充分混匀, 在溶液凝固后加入 5mL 左右样品, 继续快速摇晃培养基, 使其均匀覆盖平板表面, 然后凝固后翻转培养基, 选择 37℃ 条件培养 24h 左右, 然后观察其形态, 颜色等变化。该方法还可用于 *E. coli* 的计数。(4) 免疫磁珠法: 该方法主要是可以分离 *E. coli*, 原理是以磁珠为载体和抗体, 进行抗体和磁珠的结合, 然后通过磁力技术完成力学的移动, 进而分离 *E. coli*。相比其他分离方法来说, 该方法有一定的优势, 主要是可以提升样本中病原性弧菌的检测成功率, 而且该技术支持在不同菌种中对不同微生物进行处理, 从而

可以在很大程度上提高检测效率。(5) 自动化仪器检测法: 该方法是使用免疫自动化分析仪, 目前来说应用十分广泛, 而且操作也比较简单, 一次性支持对大批量样品的处理, 可以有效节约时间和资源, 同时该方法受干扰的程度较小, 所以可以提高检测的精确度。在当前来说, 自动酶的免疫检测体系的应用非常广泛。(7) ATP 生物发光法: 该方法可以快速检测出微生物的存在。ATP 是活性细胞中常见的能量代谢产物, 可以为细胞提供生理活动所需的能量, 而且该技术可以在生物体内的一定范围内保持一定含量。进行 *E. coli* 检测就可以选择荧光光度法, 因为生物体内存在荧光素酶, 其可以发光, 其来源于北美的萤火虫体内, 可以催化荧光素的氧化作用, 但缺陷是性质不稳定, 可以快速分解荧光。另外, 该方法的效率很高, 可以快速给出结果, 相关设备携带也比较便利, 因此比较适用于现场检测。这些方法都可以在临床进行 *E. coli* 的检测, 并且都有良好的检测准确率。但常用的还是细菌分离、纯化和培养的一套操作, 缺陷是速度很慢, 一次只能处理一个样品, 十分耗时间, 做研究可以, 应用于临床检验存在很大不足。

另外要注意的是, 在选择合适的微生物检验方法之后, 要想保证 *E. coli* 的检验准确性, 还需要采取科学的质控方法, 控制检验过程质量。一是优化检验室建设。需要按微生物检验技术的应用要求将检验室进行分区建设, 划分为试剂储存和准备区、标本制备区、实验分析区等工作区, 并保证各个工作区相互独立, 特别是空气要求分隔开。内部设置严格的消毒处理程序, 做好生物安全体系构建, 严格无菌操作要求。实验室需要将全面质量管理融入内部管理范畴, 关注质量管理, 将质控关口前移; 要结合所开展的项目以及个体化诊疗的实际需求, 在整合资源的基础上, 合理规划流程布局, 优化资源配置。二是控制标本质量。检测样本的采集对于微生物检验技术的应用结果有直接影响, 所以需要工作人员良好控制标本质量。严格按标准进行标本的采集, 根据不同检测项目和样本的要求分别处理, 并妥善规范好采集、转运、储存及处置检验样本的制度要求。

本次研究结果表明, 30 例样本中, 经过上述检测方式, 检测出有 18 例有 *E. coli* 菌落, 与实际检验结果一致。阳性对照组中明显存在 *E. coli*, 阴性对照组中没有 *E. coli* 生长。*E. coli* 在 MacA 平板上的表现形态: 菌落颜色呈鲜桃红色, 少数呈微红色, 菌落中心多数为深桃红色; 形状圆形, 较扁平; 边缘齐整, 表面光滑, 湿润。所以, 按照药典规定进行大肠埃希菌的微生物检验, 所使用方法有较高的准确性, 可以为临诊治疗和用药提供参考。

参考文献:

- [1] 林高平, 肖勃, 邹立新. 大肠埃希菌的微生物检验方法及临床意义 [J]. 基层医学论坛, 2017, 21(11): 1369-1370.
- [2] 刘庆红, 杨铭. 大肠杆菌检验方法的探究与分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2021, 21(82): 256-257.
- [3] 王春玲, 张圣颖. 大肠埃希菌的微生物检验分析 [J]. 医药前沿, 2016, 6(14): 376-377.
- [4] 徐峰. 大肠埃希菌的微生物检验 [J]. 母婴世界, 2016, (24): 51.
- [5] 锁忠萍, 锁玉萍. 大肠杆菌检验方法的探究与分析 [J]. 家庭医药, 2017, (2): 90.