

EHEC O157:H7 二重 PCR 的建立及应用

李 丽^{1,2} 张雪寒¹ 何孔旺¹ 姜 平² 赵攀登¹ 叶 青¹ 栾晓婷¹ 温立斌¹,
倪艳秀¹ 周俊明¹ 吕立新¹ 郭容利¹ 俞正玉¹ 茅爱华¹ 李 彬¹ 王小敏¹

(1. 江苏省农业科学院 兽医研究所 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 国家兽用生物制品
工程技术研究中心 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学 动物医学院 江苏 南京 210095)

摘要:建立用于从临床样品中检测 EHEC O157:H7 的二重 PCR 方法。根据 GenBank 登录 EHEC O157:H7 序列,通过对菌体和鞭毛抗原保守性核苷酸序列的比对和分析,分别设计编码 O 抗原 *rfbE* 基因和编码 H 抗原 *fliC* 基因各 1 对特异性引物,建立二重 PCR 检测方法,并以 EHEC O157:H7 纯培养和模拟制备的 3 种阳性样品为原材料,对方法的敏感性和特异性进行分析。运用成功建立的二重 PCR,从带菌率最高的牛粪便中检测 EHEC O157:H7,并进行菌株分离和鉴定。成功建立了 *rfbE* 与 *fliC* 的二重 PCR 方法, *rfbE* 与 *fliC* 引物比例为 2.5:1,PCR 循环参数中退火温度为 56℃,扩增片段长度 *rfbE* 为 812 bp, *fliC* 为 625 bp。检测阳性临床样品检测敏感性可以达到 10 cfu/g。检测 24 株非 EHEC O157:H7 大肠杆菌和 15 株非大肠杆菌,只有 EHEC O157:H7 能够扩增出特异性的 *rfbE* 条带, EHEC O157:H7 和 EPEC O55:H7 能够扩增出 *fliC*。只有 EHEC O157:H7 能够同时扩增出 *rfbE* 与 *fliC* 2 条目的条带。从 63 份牛粪便样品中分离到 4 株 EHEC O157:H7;生化试验表明 4 株 EHEC O157:H7 具有典型 EHEC O157:H7 的生化特性;药敏试验表明 4 株 EHEC O157:H7 具有较为广谱的耐药性; *rfbE* 序列分析与 GenBank 序列同源性介于 97.3%~99.2% 之间, *fliC* 序列与 GenBank 序列同源性介于 97.6%~100% 之间;4 株 EHEC O157:H7 对 Balb/c 小鼠的致病性有差异, EHEC O157:H728#和 EHEC O157:H738#致病性强, EHEC O157:H73#和 EHEC O157:H717#较弱。以 *rfbE* 和 *fliC* 为目的基因成功建立了二重 PCR,敏感性和特异性良好,可用于临床样品的检测,提高细菌分离率。

关键词: O157:H7; 二重 PCR; 方法建立; 细菌分离; 样品检测

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)06-0058-08

Duplex PCR Procedure for the Detection of EHEC O157:H7

LI Li^{1,2} ZHANG Xue-han¹ HE Kong-wang¹ JIANG Ping² ZHAO Pan-deng¹ YE Qing¹,
LUAN Xiao-ting¹ WEN Li-bin¹ NI Yan-xiu¹ ZHOU Jun-ming¹ LU Li-xin¹ GUO Rong-li¹,
YU Zheng-yu¹ MAO Ai-hua¹ LI Bin¹ WANG Xiao-min¹

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China; 2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Construct a duplex PCR for the detection of *E. coli* O157:H7 from clinical samples. Analyses of the available sequences of the two major virulence genes listed in GenBank allowed us to develop the two-gene multiplex PCR protocol that maintained the specificity of each primer pair. Sensitivity and specificity were verified by detection of *E. coli* O157:H7 culture and prepared *E. coli* O157:H7 positive samples. Applying the duplex PCR, we detect *E. coli* O157:H7 from bovine feces and isolate the positive samples. The resulting two bands for *rfbE* and *fliC* were even and distinct with product sizes of 812 and 625 bp, respectively. The proportion of *rfbE* and *fliC* of PCR amplification reaction was 2.5:1 (V/V) and the optimal PCR amplification temperature was 56℃. Sensitivity tests showed that the procedure amplified genes from a fecal sample spiked with a minimum of 10⁴ cfu/g. After a 6-h en-

收稿日期: 2011-06-20

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2007BAD40B01); 江苏省农业科技自主创新资金(cx(09)106); 江苏省农业科学院后备人才基金(6510804); 江苏省自然科学基金(BK2010068)

作者简介: 李 丽(1970-), 女, 辽宁长春人, 硕士研究生, 主要从事 EHEC O157:H7 病原学研究。

通讯作者: 何孔旺(1963-), 男, 安徽枞阳人, 研究员, 主要从事人兽共患病原研究。

richment of *E. coli* O157-spiked samples a sensitivity level of 10 cfu/g was achieved. The procedure was validated with a total of 24 *E. coli* strains as well as 15 non-*E. coli* strains. Specificity of the O antigen was indicated by amplification of only *E. coli* O157 and not other *E. coli* serotypes and non-*E. coli* strains. Specificity of the H antigen was indicated by amplification of only *E. coli* O157 and *E. coli* O55 and not others. From 63 bovine feces we obtained 4 isolates of *E. coli* O157: H7. Biochemical feature tests showed that isolated *E. coli* O157: H7 have the representative feature of *E. coli* O157: H7. Susceptibility tests indicated that the four *E. coli* O157: H7 have broad-spectrum drug tolerance. Sequence analyses of *rfbE* and *fliC* suggested that the four isolates have homology of 97.3% - 100%. The four *E. coli* O157: H7 isolates showed different pathogenicity isolate 28# and 38# were high 3# and 17# low. We successfully developed the duplex PCR for O157: H7 for the detection of clinical samples.

Key words: EHEC O157: H7; Duplex PCR; *rfbE*; *fliC*; Detection samples

肠出血性大肠杆菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) 是一种重要的人兽共患病病原, O157: H7 是其主要血清型, 几乎可以感染所有的温血动物。任何年龄的人群都是易感者, 尤其是儿童和老人发病率高且症状较重, 容易并发严重的溶血性尿毒综合征 (HUS) 和血栓形成性血小板减少性紫癜 (TTP) [1-6]。除人类之外的动物只是带菌, 但一般不表现明显的临床症状。反刍动物, 尤其是牛, 是 EHEC O157: H7 的主要储存宿主 [7]。目前为止, 还没有市售的可用于人和动物的疫苗。因此对 EHEC O157: H7 的检测显得尤为重要。目前国内外常采用免疫磁珠分离法、酶联免疫技术、蛋白芯片技术等免疫学检测方法及时实荧光 PCR 技术、聚合酶链反应 (PCR) 技术、基因芯片技术等分子生物学检测。而聚合酶链反应 (PCR) 技术具有方便、快速、设备要求不高等优点, 更适合于大量临床样品的检测。国外学者 [8-13] 在运用 PCR 方法检测 O157: H7 方面做了大量的研究工作。Gannon 等建立了针对 *stx1* 和 *stx2* 两个基因的二重 PCR 方法; Fagan 等建立了包括 *stx1* 和 *stx2* 以及 *eae* 和 *hlyA* 的四重 PCR 方法; Frattamico 等和 Hu 等建立了包括 *fliC*、*stx1*、*stx2*、*eae*、*hlyA* 和 *rfbE* 不同组合的五重 PCR 方法。Chapman 等选取 *fliC*、*stx1*、*stx2*、*eae*、*rfbE* 和 *hlyA* 6 个基因建立了六重 PCR 方法; Jianfa Bai 等在前面学者研究的基础上, 同样选取 *fliC*、*stx1*、*stx2*、*eae*、*rfbE* 和 *hlyA* 6 个基因建立了六重 PCR 方法, 但对每个基因的扩增区域进行了调整 and 比较。国内学者 [14-16] 在多重 PCR 方面也做了很多的研究工作。这些方法虽然建立了, 但由于涉及到的基因太多, 用于临床样品时敏感性和特异性较差, 很难应用于临床样品的检测。本研究选取编码 *E. coli* O157: H7 菌体 O 抗原的 *rfbE* 基因和鞭毛 H 抗原的 *fliC* 基因作为靶标基因, 建立只包括 2 个基因的多重 PCR, 希望建立敏感性和特异性均良好的二重 PCR, 并运用其进行临床样

品检测。设计 2 对 *E. coli* O157: H7 的特异性引物, 成功检测二重 PCR 方法, 希望为成功研制用于检测 *E. coli* O157: H7 的 PCR 检测试剂盒奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株

出血性大肠杆菌 O157: H7 EDL933 菌株; 人源 O157: H7 菌株 882364、C118、C119、C120、C121、C122、C123、C159, 其他大肠杆菌 O25、O26、O55、O78、O103、O111、O127、O145、O138、O139、O141, APEC E058、EPEC SEC627、EPEC SEC689、BL21、K12-MG1655, 以及沙门氏杆菌、巴氏杆菌、粪链球菌、葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、乳酸杆菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌、普通变形杆菌、奇异变形杆菌、阴沟肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、痢疾志贺氏菌、福氏志贺氏菌 2a、普罗威登斯菌。菌种模板均为江苏省农业科学院兽医研究所保存。

1.2 主要试剂

ExTaq DNA 聚合酶 (5 U/μL)、dNTPs、10 × Loading Buffer (TaKaRa 公司); anti-*E. coli* O157 免疫磁珠 购自 Dynabeads; 科马嘉培养基、肉汤培养基和新生霉素 购自南京助研生物公司。

1.3 引物设计及合成

参考 Genbank 中发表的编码 O157 菌体抗原基因 *rfbE* 序列, 序列分别为 S83460.1 和 AF163327, 全长为 1 095 bp, 设计 1 对引物, 扩增片段分别为 812 bp。参考 Genbank 中发表的编码 H7 鞭毛抗原基因 *fliC* 序列, 序列号分别为 ECU47614 和 ECOFLICB, 全长为 1 756 bp, 设计了 1 对特异引物, 扩增片段 625 bp。引物序列见表 1。引物发送 TaKaRa 进行合成, 纯度级别为 PAGE。稀释为 50 pmol/μL, -20℃ 保存。

1.4 样品处理

1.4.1 样品的筛选方法 下面所有模拟制备

O157: H7 阳性检测样品的粪便、蔬菜和牛肉都经过证实为 O157: H7 阴性才可以选用。
TaqMan 大肠杆菌 O157: H7 检测试剂盒进行检测,

表 1 引物序列

Tab. 1 All primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences	扩增长度/bp Fragment length	退火温度/℃ Melting temperature
<i>rfbE-F</i>	5'-atgtctggactcaacgtggattt-3'	812	54.1
<i>rfbE-R</i>	5'-tttctctgcggctcctagtaga-3'		
<i>fliC-F</i>	5'-gcgctgtcgagttctatcgagc-3'	625	54.4
<i>fliC-R</i>	5'-caacggtgactttatcgccattcc-3'		

1.4.2 粪便样品 采集粪便样品 1 g ,分别与 1 mL 10 倍系列稀释菌落(10⁴ ,10³ ,10² ,10¹ cfu) 和 8 mL 新生霉素肉汤培养基(mEC) 混匀 ,37℃ 富集 6 h ,过滤除杂质 ,吸取 1 mL ,离心收集沉淀重悬于 100 μL TE 缓冲液中 ,以煮沸裂解法制备模板 ,进行多重 PCR 扩增。

1.4.3 蔬菜样品 称取 1 g 即食蔬菜(生菜、黄瓜、混合盘菜) ,分别与 1 mL 10 倍系列稀释菌落(10⁴ ,10³ ,10² ,10¹ cfu) 和 8 mL 新生霉素肉汤培养基(mEC) 混匀 ,37℃ 富集 6 h ,过滤除杂质 ,吸取 1 mL ,离心收集沉淀重悬于 100 μL TE 缓冲液中 ,以煮沸裂解法制备模板 ,进行多重 PCR 扩增。

1.4.4 牛肉样品 称取 1 g 牛肉样品分别与 1 mL 10 倍系列稀释菌落(10⁴ ,10³ ,10² ,10¹ cfu) 和 8 mL 新生霉素肉汤培养基(mEC) 混匀 ,37℃ 富集 6 h ,过滤除杂质 ,吸取 1 mL ,离心收集沉淀重悬于 100 μL TE 缓冲液中 ,以煮沸裂解法制备模板 ,进行多重 PCR 扩增。

1.4.5 纯培养物 O157: H7 EDL933 菌株 ,37℃ 过夜培养 12 h ,次日吸取 1 mL 培养物 ,用灭菌生理盐水进行 10 系列稀释 ,各稀释度离心后用煮沸法制成模板 ,按上述方法进行 PCR 扩增。同时每个稀释度各取 100 μL 分别涂布于麦康凯琼脂平板上 ,进行菌落计数。

1.5 PCR 反应

1.5.1 二重 PCR 引物比例的确定 在确定了单重 PCR 反应条件和循环参数的前提下 ,进行多重 PCR 的扩增 ,主要是引物比例的摸索: *fliC*: *rfbE* = 1: 1; 1: 2; 1: 2. 5; 1: 4; 1: 5。

1.5.2 二重 PCR 各项指标的确定 根据单重 PCR 扩增条件 ,进行二重 PCR 扩增: 退火温度介于 54 ~ 65℃。

1.5.3 PCR 扩增 10 × Buffer 5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 4 μL、2. 5 mmol/L dNTPs 4 μL、*rfbE*-F/*rfbE*-R 和 *fliC*-F /*fliC*-R 按照确定的引物比例加入、DNA 聚合酶(5 U/μL) 0. 5 μL、待检 DNA 模板 DNA 聚合酶

(5 U/μL) 5 μL ,补 ddH₂O 到总体积 50 μL。按照 95℃ 4 min、94℃ 30 s; 56 ~ 65℃ 30 s; 72℃ 1 min。35 个循环。72℃ 10 min。

1.5.4 产物的鉴定 取 10 μL 或者全量 PCR 反应产物加于含溴化乙锭的 1. 0% 琼脂糖凝胶上 ,120 V 电泳 30 ~ 40 min ,紫外成像仪下观察并照相。

1.6 二重 PCR 的特异性试验

以 O157: H7 EDL933 菌株为阳性对照菌 ,选用人源 O157: H7 菌株 882364、C118、C119、C120、C121、C122、C123、C159 ,其他大肠杆菌 O25、O26、O55、O78、O103、O111、O127、O145、O138、O139、O141 ,APEC E058、EPEC SEC627、EPEC SEC689、BL21、K12-MG1655 ,以及沙门氏杆菌、巴氏杆菌、粪链球菌、葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、乳酸杆菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌、普通变形杆菌、奇异变形杆菌、阴沟肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、痢疾志贺氏菌、福氏志贺氏菌 2a、普罗威登斯菌作为参考菌株 ,对二重 PCR 进行特异性分析。设置各种试剂配制所用的 TE 缓冲液为空白对照。所有样品在同样条件下进行 PCR 扩增。

1.7 二重 PCR 的敏感性试验

以 1. 4 中制备的不同浓度、不同来源的 DNA 为模板 ,按照既定的 PCR 反应条件的体系进行 PCR 扩增。

1.8 临床样品的检测

1.8.1 PCR 扩增 自奶牛养殖户采集粪便 63 份 ,每个粪便样品取 10 g 加入到 90 mL 的 mEC 中 ,37℃ 富集 6 h ,过滤除杂质 ,吸取 1 mL ,离心收集沉淀重悬于 100 μL TE 缓冲液中 ,以煮沸裂解法制备模板。PCR 结束后取全量 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳 ,紫外透射仪中观察菌株含有特异性抗原 *rfbE* 和 *fliC* 情况。对 PCR 扩增阳性的样品进行细菌分离。

1.8.2 细菌分离 将 PCR 扩增阳性的样品 ,用免疫磁珠方法进行富集 ,富集后涂布科马嘉显色培养基 ,37℃ 温箱培养 12 ~ 16 h。待长成单菌落后 ,挑取

可疑粉色菌落于 LB 液体中培养,吸取 1 mL 过夜培养物煮沸法制备模板。以 1.5.3 所建立的 PCR 体系进行扩增,PCR 结束后取 10 μ L PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳,观察结果。

1.8.3 生化试验 将 PCR 扩增 *rfbE* 和 *fliC* 阳性的纯菌培养物,按照生化试剂盒的操作方法,进行操作,置于 37℃ 温箱培养 24 ~ 72 h,观察其产酸产气情况。

1.8.4 药敏试验 取 PCR 扩增 *rfbE* 和 *fliC* 阳性的纯菌培养物 100 μ L 涂布于 LB 琼脂培养基中,再将药敏片均匀粘贴培养基上,置于 37℃ 温箱培养 24 h,观察抑菌环的大小。

1.8.5 测序鉴定 将 PCR 扩增 *rfbE* 和 *fliC* 阳性的纯菌培养物,煮沸法制备模板,PCR 扩增 *rfbE* 和 *fliC* 条带,切胶纯化,送至南京基天生物公司进行测序。

1.9 致病性试验

1.9.1 试验前动物处理 离乳小鼠对 *E. coli* O157: H7 不易感,本试验参考文献 [17],在攻毒前所有组均给予 5 g/L 链霉素溶液饮用 3 d,灌胃攻菌后全部给予 0.5 g/L 的链霉素溶液饮用。以排除肠道正常菌群,为 *E. coli* O157: H7 在小鼠体内驯化一个定居和生长的环境,在肠道中成为优势菌群,增加小鼠的易感性。并在攻毒前断水断食 12 h,攻毒后 6 h 恢复饮水饮食,防止攻毒后细菌快速排出动物肠道,延长在其体内作用时间。

1.9.2 小鼠攻毒 将 40 只 BALB/c 小鼠随机分为 5 个组,口服灌胃 10^9 cfu /只,攻毒后,连续 14 d 采集小鼠粪便检测排菌量和排菌时间的变化。

2 结果与分析

2.1 二重 PCR 扩增

根据单重 PCR 扩增条件,进行二重 PCR 扩增, Mg^{2+} 浓度 4 μ L,在 54 ~ 65℃ 所有温度都能够扩增出目的条带,但是高于 56℃ 会有非特异性条带出现。*rfbE* 引物浓度一定要高于 *fliC*,确定比例为 *fliC* : *rfbE* = 1 : 2.5,在 50 μ L PCR 反应体系中 *rfbE* 加入 0.5 μ L *fliC* 加入 0.2 μ L。二重 PCR 在退火温度最终确定为 56℃ (图 1)。

2.2 二重 PCR 敏感性

2.2.1 纯菌培养物 *rfbE* 和 *fliC* 二重 PCR 检测 *E. coli* O157: H7 纯培养物的敏感性为 1 cfu/mL。低于 1 cfu/mL 检测不出 (图 2)。

2.2.2 模拟阳性粪样检测 *rfbE* 和 *fliC* 二重 PCR 检测 *E. coli* O157: H7 污染粪样,可以检测到 10 cfu/g。低于 10 cfu/g 检测不出 (图 3)。

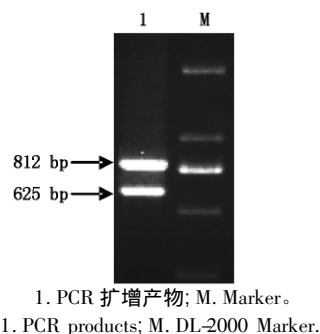
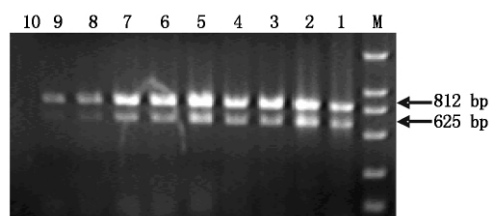


图 1 PCR 扩增

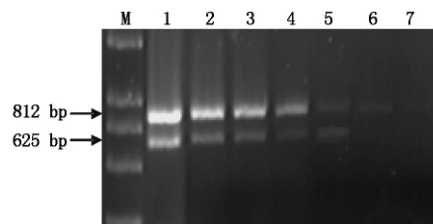
Fig. 1 PCR amplification of *rfbE* and *fliC* genes



M. DL2000 Marker; 1 ~ 9. 系列稀释 O157: H7 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 ; 10. 空白对照。
M. DL2000 Marker; 1 ~ 9. Diluted serially O157: H7 cultures 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 and 1; 10. Negative control.

图 2 纯菌二重 PCR 敏感性

Fig. 2 Sensitivity of dup-PCR to *E. coli* O157: H7 culture

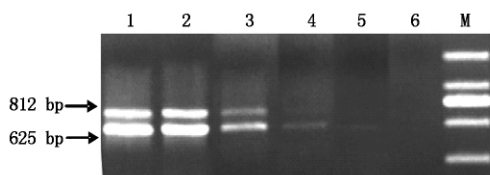


M. DL2000 Marker; 1. 阳性样品; 2 ~ 6. 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ; 7. 空白对照。
M. DL2000 Marker; 1. Positive control; 2 ~ 6. 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ; 7. Negative control.

图 3 模拟阳性粪便二重 PCR 敏感性检测

Fig. 3 Sensitivity of dup-PCR to feces inoculated *E. coli* O157: H7

2.2.3 模拟肉样检测 *rfbE* 和 *fliC* 二重 PCR 检测 *E. coli* O157: H7 污染肉样,可以检测到 10 cfu/g。低于 10 cfu/g 不能清晰的扩增 2 条特异性条带,只是隐约可见 (图 4)。



M. DL2000 Marker; 1 ~ 5. 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 ; 6. 空白对照。
M. DL2000 Marker; 1 ~ 5. 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 ; 6. Negative control.

图 4 模拟阳性牛肉二重 PCR 敏感性检测

Fig. 4 Sensitivity of dup-PCR to beef inoculated *E. coli* O157: H7

2.2.4 模拟阳性蔬菜样品 *rfbE* 和 *fliC* 二重 PCR 检测 *E. coli* O157: H7 污染菜样,可以检测到 1 cfu/g, 但 *rfbE* 条带不清晰,只是隐约可见(图 5)。

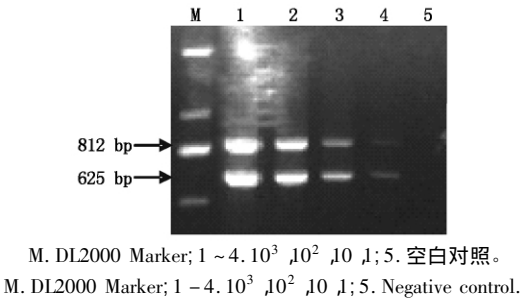


图 5 模拟阳性蔬菜二重 PCR 敏感性检测

Fig.5 Sensitivity of dup-PCR to beef inoculated O157: H7

2.3 二重 PCR 的特异性

只有 *E. coli* O157 能够扩增相应大小的 *rfbE* 基因,而其他血清型大肠杆菌和其他种属的细菌均无相应大小特异性条带。包括 *E. coli* O157: H7 在内,多株具有 H7 鞭毛的大肠杆菌能够扩增出相应大小的 *fliC* 片段,本研究中的 *E. coli* O55: H7 能够扩增出同等大小的 *fliC* 基因片段。所以,需要用 *rfbE* 和 *fliC* 2 个基因共同来检测,能够同时扩增出 2 个目的条带的单菌落,才能判为 *E. coli* O157: H7。

表 2 四株 *E. coli* O157: H7 分离株生化试验

Tabl.2 Biochemical parameters of the four positive *E. coli* O157: H7 isolates

分离株 Isolations	3#	17#	28#	38#
氰化钾 Potassium cyanide	-	-	-	-
尿素酶 Urease	-	-	-	-
山梨醇 Sorbitol	-	-	-	-
纤维二糖 Cellobiose	-	-	-	-
胰蛋白胨肉汤(吲哚) Peptone water (indole)	-	+	-	+
MR-VP methyl red-Voges-Proskauer	MR + VP -	MR + VP -	MR + VP -	MR + VP -
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	+	+	+
棉子糖 Raffinose	+	+	+	+
氧化酶 Oxidase	-	-	-	-
七叶苷 Esculin	-	-	-	-

注: + 表示生化反应阳性,变色; - . 表示生化反应阴性,不变色。
Note: + Positive ,change colour; - . Negative ,Non change colour.

2.4.3 分离株的药敏试验 4 株 *E. coli* O157: H7 菌株药敏试验显示: 新霉素、链霉素、卡那霉素、庆大霉素和淋必治氨基糖苷类抗生素具有一定的抑菌作用,红霉素耐药。新生霉素是香豆素类抗生素,对所有革兰氏阴性菌都没有抑制作用。阿奇霉素和四环素属于大环内酯抗生素,具有一定的抑菌作用。复方新诺明和磺胺异恶唑为磺胺类抗菌药,磺胺异

2.4 样品检测与细菌分离

2.4.1 临床样品检测 自奶牛养殖户采集牛粪便 63 份,PCR 扩增有 4 份阳性。4 份阳性样品,经过免疫磁珠富集,科马嘉平板培养,分离到 4 株 *E. coli* O157: H7(图 6)。

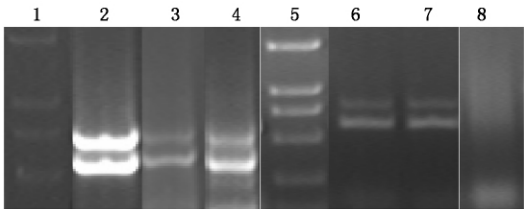


图 6 临床样品二重 PCR 检测

Fig.6 Duplex PCR to test the clinic samples

2.4.2 分离株的生化试验 4 株 PCR 扩增阳性的可疑 *E. coli* O157: H7 菌株在 SMAC 平板上形成圆形、光滑、湿润、边缘整齐、直径约 1 ~ 2 mm 的菌落,颜色为无色半透明,有的菌落略带粉色。经细菌生化反应鉴定,均符合大肠杆菌基本生化特性,不利用 VP、七叶苷、氰化钾、氧化酶阴性。通过玻板凝集反应进行血清型鉴定,各分离株均为 O157: H7 血清型大肠杆菌(表 2)。

恶唑有较为明显的抑菌作用。为氨基糖苷抗菌素。青霉素类抗生素没有任何的抑菌作用,而头孢类抗生素还有一定的抑菌作用(表 3)。

2.4.4 分离株测序分析 分离菌株的 *rfbE* 与 Gen-Bank 登录标准菌株大肠杆菌 O157: H7 序列同源性介于 97.3% ~ 99.2% 之间(图 6)。分离株 *fliC* 与标准菌株同源性介于 97.6% ~ 100% 之间(图 7)。

表3 四株 *E. coli* O157:H7 分离株药敏试验

Tabl.3 Susceptibility test of the four positive *E. coli* O157:H7 isolates

分离株 Isolations	3#	17#	28#	38#
试剂 Reagents				
青霉素 Penicilin	-	-	-	-
氨苄青霉素 Penbritin	-	-	-	-
羧苄青霉素 Carbenicillin	-	-	-	-
先锋霉素Ⅳ CephalosporinⅣ	++	+	+	+
先锋霉素Ⅴ CephalosporinⅤ	++	+	+	+
先锋霉素Ⅳ CephalosporinⅣ	+	+	+	+
菌必治 Ceftriaxone	++	+	+	+
链霉素 Streptomycin	+	+	+	+
四环素 Tetracycline	+	+	-	+
红霉素 Erythrocin	-	-	-	-
新霉素 Neomycin	+	-	+	+
卡那霉素 Kanamycin	+	+	+	+
丁胺卡那霉素 Amikacin	-	-	+	+
阿奇霉素 Azithromycin	+	+	+	+
庆大霉素 Gentamycin	+	+	+	+
复方新诺明 TMP-SMZ	-	-	-	-
磺胺异恶唑 Sulfisoxazole	++	++	++	++
淋必治 Trobicin	++	+	+	+
杆菌肽 Ayfivin	+	+	-	+
新生霉素 Novobiocin	-	-	-	-
丙氟哌酸 Ciprofloxacin	+	+	+	+
两性霉素 Amphotericin	++	++	++	++
制霉菌素 Fungicidin	+	++	++	+

注: - . 表示无抑菌环; + . 表示抑菌环直径在 1 cm 左右; ++ . 表示抑菌环直径在 2 cm 左右。
Note: - . No curb-bacterium ring; + . The diameter of the curb-bacterium ring is 1 cm; ++ . The diameter of the curb-bacterium ring is 2 cm.

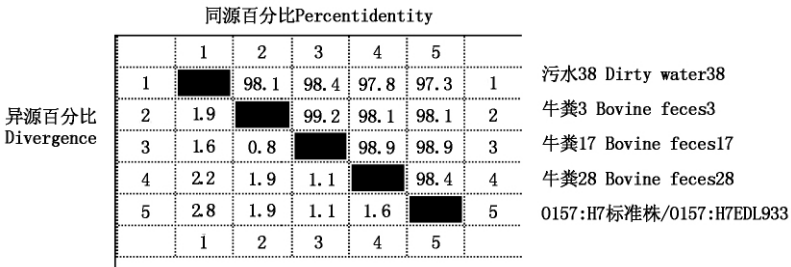


图6 *rfbE* 同源性分析

Fig.6 Analysis homology of the *rfbE* gene

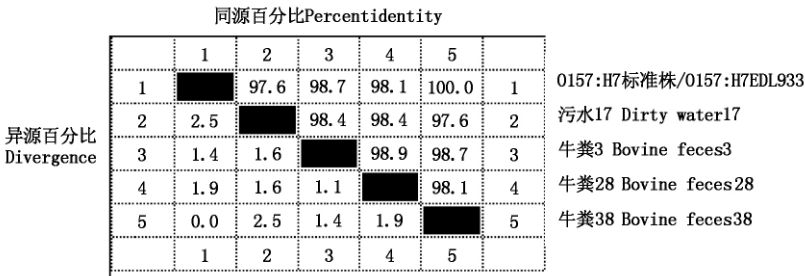


图7 *fliC* 同源性分析

Fig.7 Analysis homology of the *fliC* gene

2.4.5 致病性试验 攻毒后 72 h ,小鼠开始出现死亡(表4)。4 个分离菌株 O157: H7 在小鼠肠道内都有一定的定植能力 ,攻毒后整个监测期都有排菌。其中 28#和 38#分离株直到第 14 天排菌仍然维持在 10⁴ cfu/0.1g ,3#和 17 分离株排菌相对少 ,第 14 天排菌在 10³ cfu/0.1g(图8)。

表 4 大肠杆菌 O157:H7 分离株对小鼠的致病性

Tab. 4 Isolate O157:H7 pathogenicity to Balb/c mice

菌株 Strain	3#	17#	28#	38#
数量 No. amount	10	10	10	10
死亡数/总数 The dead/Total	2	2	6	4

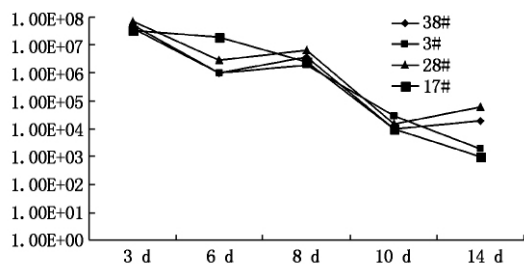


图 8 分离株 O157:H7 排菌监测

Fig. 8 Isolate O157:H7 shedding in feces

3 讨论

PCR 扩增技术从它诞生开始,就成为检测的常用手段。从单重 PCR 发展到多重 PCR,以致定量 PCR 技术。其中多重 PCR 的应用更加广泛和实用,国内外学者对于大肠杆菌的检测尝试研制了多种 PCR 方法^[18-22],但都没有后续报道和产品面世。

本研究本着实用的角度考虑,选择 *rfbE* 和 *fliC* 两个高度保守、O157:H7 特征性的基因片段设计特异性引物,成功建立了二重 PCR 方法,避免了单重 PCR 的片面性和定量 PCR 敏感性太高易于出现假阳性的不足。为了更加客观和真实的考量二重 PCR 的敏感性,选择易于被 O157:H7 污染的临床样品,模拟制备 O157:H7 阳性样,进行敏感性检测,可以检测到 10 cfu/g。虽然 EHEC O157:H7 具有很广的感染谱,但临床样品的带菌率不是很高。牛是 O157:H7 的主要储存宿主,但不同地区和不同时间的带菌率有着较大的差异,一般介于 0.1%~16% 之间^[22-24]。因此,对于临床样品的检测,都需要首先对待检样品进行增菌,37℃ 培养 6~12 h 后,煮沸方法制备模板检测。

在成功建立二重 PCR 方法的基础上,我们运用其对临床 60 多份牛粪样品进行检测,并对阳性样品进行细菌分离。63 份牛粪样,增菌后检测 4 份阳性,借助于免疫磁珠和筛选培养基进行快速而特异性的 O157:H7 菌体分离,得到纯化的 4 株 O157:H7。生化实验验证具有典型大肠杆菌 O157:H7 的生化特性。药敏试验结果显示:青霉素类和大环内酯类抗生素的抑菌效果几乎已经丧失,可能与牛用饲料中抗生素添加有关,尤其是奶牛乳房炎的治疗后副作用。从分离菌株的耐药性推测,牛源食品同样可能存在令人担忧的药物残留。

对于 O157:H7 致病性的评价,没有理想的动物模型。抗生素处理后的小鼠是目前比较公认动物感染模型^[17]。4 株大肠杆菌 O157:H7 在小鼠肠道内的定植能力有着一定的不同,可能与其所携带的毒力表型有关,在后续试验中将进行详尽的研究。

本研究运用自行研制的二重 PCR 方法对临床样品进行检测,并对阳性样品进行细菌分离,一方面证实我们研制的二重 PCR 方法具有可用性,另一方面证实大肠杆菌 O157:H7 对于人类的危害时刻存在。有前面研究的基础,会将二重 PCR 的研制工作继续开展下去,继续分离不同来源的 O157:H7,并对分离株携带的毒力因子表型进行深入的分析,希望为大肠杆菌 O157:H7 的流行和防控预警提供可靠的依据。

4 结论

本研究选择编码大肠杆菌 O157:H7 菌体 O 抗原的 *rfbE* 基因和鞭毛 H 抗原的 *fliC* 基因,设计特异性引物成功建立了二重 PCR 方法。该方法对于大肠杆菌 O157:H7 纯菌培养的敏感性可以达到 1 cfu/mL,对于模拟制备的阳性样品,敏感性可以达到 10 cfu/g。建立的二重 PCR 能够成功用于临床样品检测,并有利于提高大肠杆菌 O157:H7 的细菌分离率。

参考文献:

- [1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 states, 2008 [J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2009, 57(14): 366–370.
- [2] Reinstein S, Fox J T, Shi X *et al.* Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in the American bison (*Bison bison*) [J]. Journal Food Protection, 2007, 70(11): 2555–2560.
- [3] Doyle M P, Erickson M C. Summer meeting 2007—the problems with fresh produce: an overview [J]. Journal Applied Microbiology, 2008, 105(2): 317–330.
- [4] 唐中伟,周志江.产志贺毒素 EHEC 国内分离株 Stx2 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 山西农业科学, 2011, 39(2): 167–159.
- [5] 张雪寒,何孔旺,卢维彩,等.出血性大肠杆菌 O157:H7 Stx2B-Tir-Stx1B 多价融合蛋白表达及免疫性研究 [J]. 华北农学报, 2010, 25(4): 180–185.
- [6] 张雪寒,何孔旺,卢维彩,等.出血性大肠杆菌 O157:H7 的 Tir 与 Stx1/2 融合基因的构建和表达 [J]. 内蒙古农业科学, 2009(3): 59–61.

- [7] Marcus R. New information about pediatric foodborne infections: the view from FoodNet [J]. *Journal Food Protection*. 2008 20(1) : 79 – 84.
- [8] Gannon V P ,King R K ,Kim J Y *et al.* Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction [J]. *Applied and Environment Microbiology* ,1992 58: 3809 – 3815.
- [9] Fagan P K ,Hornitzky M A ,Bettelheim K A *et al.* Detection of Shigalike toxin(stx1 and stx2) ,intimin(eaeA) , and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin(EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR [J]. *Applied and Environment Microbiology* ,1999 65: 868 – 872.
- [10] Frataamio P M ,Bagi L K ,Pepe T. A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157: H7 in foods and bovine feces [J]. *Journal Food Protection* ,2000 63: 1032 – 1037.
- [11] Hu Y ,Zhang Q ,Meitzler J C. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157: H7 in bovine faeces by a multiplex PCR [J]. *Journal Applied Microbiology* ,1999 87: 867 – 876.
- [12] Chapman P A. Methods available for the detection of *Escherichia coli* O157 in clinical food and environmental samples [J]. *World Journal Microbiology Biotechnology* 2000 16: 733 – 740.
- [13] Jianfa Bai ,Xiaorong Shi T G ,Nagaraja. A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Journal of Microbiological Methods* 2010 82: 85 – 89.
- [14] 梅明珠 杨亚贤 陆承平 等. 多重 PCR 快速鉴定大肠杆菌 O157 [J]. *中国人畜共患病杂志* ,2007 3(4) : 351 – 354.
- [15] 朱文冠 薛余强 洪洁心 等. 多重 PCR 检测大肠杆菌 O157: H7 的初步研究 [J]. *中国人兽共患病学报* , 2006 22(5) : 428 – 432.
- [16] 徐晓可 吴清平 周艳红 等. 肉类中大肠杆菌 O157: H7 多重 PCR 检测方法的建立 [J]. *微生物学通报* , 2008 35(4) : 619 – 622.
- [17] Fujii J ,Kita T ,Yoshida S *et al.* Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in mitomycin-treated mice [J]. *Infect Immun* ,1994 62(8) : 3447 – 3453.
- [18] Belgin Sarimehmetoglu ,Mihriban Hatun Aksoy ,Naim Denia Ayaz. Detection of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR [J]. *Food Control* 2009 20: 357 – 361.
- [19] Mekillip J L ,Jaykus L A. A comparison of methods for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 from artificially contaminated dairy products using PeR [J]. *Journal of Applied Microbiology* 2000 89: 49 – 55.
- [20] Naylor S W ,Low J C ,Besser T E *et al.* Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in the bovine host [J]. *Infection Immunity* , 2003 71: 1505 – 1512.
- [21] Pearce C ,Fenlon d ,Low J C. Distribution of *Escherichia coli* O157 in swine fecal pats and its impact on estimates of the prevalence of fecal shedding [J]. *Applied and Environment Microbiology* ,2004 70(10) : 5737 – 5743.
- [22] Ozgur Cadirci ,Belgin Siriken ,Gokhan Inat *et al.* The prevalence of *Escherichia coli* O157 and O157: H7 in ground beef and raw meat ball by immunomagnetic separation and the detection of virulence genes using multiplex PCR [J]. *Meat Science* 2010 84: 553 – 556.
- [23] 于风泰 赵志武 陈继永 等. 天津市首次在羊粪便中检出 O157: H7 大肠杆菌 [J]. *医学动物防制* 2003 19(5) : 268 – 270.
- [24] Yukiko Hara-Kudo ,Jiro Nemoto ,Kayoko Ohtsuka *et al.* Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification [J]. *Journal of Medical Microbiology* ,2007 56: 398 – 406.