

大肠杆菌变种的两种分子生物学检测方法分析

曾 婷 马 丽 谢逸欣 郝 丽 金 星

(广东省广州军区疾病预防控制中心 广东 广州 510507)

摘要 目的:对大肠杆菌的一种重要的变种--肠出血性大肠杆菌 O157-H7 的几种检测方法进行比较研究。方法:以自动免疫磁珠收集系统(AIMS)、自动酶标免疫测试系统(VIDAS)与传统常规的分离方法进行对比分析。结果:运用自动免疫磁珠收集系统(AIMS)方法对 80 份可能含有肠出血性大肠杆菌 O157-H7 的实样进行检测,检出份数为 6 份,检出率为 7.5%,而且在一周之内可以全部对上述检出实样进行鉴定。AIMS 法能够检出浓度在 10cfu/mL 模拟实样之中的肠出血性大肠杆菌 O157-H7,然后将此法与 CHROMagar 0157 琼脂板相结合,其效果则更为明显。而自动酶标免疫测试系统(VIDAS)与传统与的分离方法则检测的效果不佳,检出率为 0。自动免疫磁珠收集系统(AIMS)检测方法自动酶标免疫测试系统(VIDAS)、传统与的分离方法在检出率方面存在显著的统计学差异, $P < 0.01$ 。结论:运用自动免疫磁珠收集系统(AIMS)结合 CHROMagar 0157 琼脂板对出血性大肠杆菌 O157-H7 进行检测,检出率较高、灵敏度较高且快速便捷,可以用于 O157-H7 外环境检测与食品污染源的调查之中,应该对其加以广泛地推广并应用。

关键词 肠出血性大肠杆菌 O157-H7;自动免疫磁珠收集系统;自动酶标免疫测试系统

中图分类号:R378 R446.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)27-5238-03

Analysis of Escherichia Coli Variants of the Molecular Biology Detection Methods

ZENG Ting, MA Li, XIE Yi-xin, HAO Li, JIN Xing

(Center for Disease Control and Prevention in Guangzhou Military Region, Guangzhou, Guangdong, 510507, China)

ABSTRACT Objective: Escherichia coli is a kind of important variants -- enterohemorrhagic Escherichia coli O157-H7 several detection methods are comparative study. **Methods:** The automated immunomagnetic beads collection system (AIMS), automatic enzyme immunoassay test system (VIDAS) and traditional and separation method for comparative analysis. **Results:** The use of automated immunomagnetic beads collection system (AIMS) on 80 may contain enterohemorrhagic Escherichia coli O157-H7 samples for detection, detection of copy number is 6, the detection rate was 7.5%, and within a week to all of the above can be detected samples for identification. AIMS method can detect concentration at 10cfu / mL simulation samples of enterohemorrhagic Escherichia coli O157-H7, then this method and CHROMagar 0157 agar plate combination, the effect is more obvious. Automatic enzyme immunoassay test system (VIDAS) and traditional and separation method detection effect is poor, the detection rate is 0. **Conclusion:** The use of automated immunomagnetic beads collection system (AIMS) combined with CHROMagar 0157 agar plates for hemorrhagic Escherichia coli O157-H7 were detected, the detection rate is higher, higher sensitivity and fast and convenient, can be used in O157-H7 environment detection and food contamination sources of practical investigation, should be widely promoted and applied.

Key words: Enterohemorrhagic Escherichia coli O157-H7; AIMS; VIDAS

Chinese Library Classification: R378, R446.1 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)27-5238-03

引言

肠出血性大肠杆菌 (Enterohemorrhagic Escherichia coli, O157-H7) 为最新出现的一种肠道致病菌。在上个世纪 90 年代美国的 Riley 在美国密西根州所出现的一起出血性肠炎爆发之中,第一次分离出了肠出血性大肠杆菌 O157-H7,这种病菌为大肠杆菌的一个常见的变种,它会使得患者产生出血性肠炎、肾功能不全、溶血性尿毒症以及血栓性血小板减少性紫癜等方面的症状^[1-3],对于发病严重的患者则很有可能会出现死亡。据相关研究报道^[2-5],该致病菌的出现主要是由于环境因素的变化,

我国在近年来就有很多关于肠出血性大肠杆菌感染病例的报道,尤其是在我国的东南沿海出现的例数呈现出逐年增多的发展趋势,但是还没有出现暴发的现象。因此,对于肠出血性大肠杆菌 O157-H7 进行准确检测,能够对该病起到预防与抑制之作用,现将几种关于肠出血性大肠杆菌 O157-H7 检测的方法进行对比,现报道如下。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 培养基与试剂 三糖铁琼脂斜面、SMAC 琼脂培养基(购自于美国 Barnstead / Therndyne 公司)以及浓度为 1% 的 n-mEC 肉汤、CHROMagar 0157 琼脂平板、IMViC 生化鉴定试剂(购自于美国 Bio-Rad 公司)、PCR 试剂盒、VT1/VT2 酶标试

作者简介:曾婷(1977-),女,硕士研究生,助理研究员,研究方向:

从事药理学、分子诊断学的研究

(收稿日期:2012-03-30 接受日期:2012-04-25)

剂盒 ;AIMS 自动磁珠收集与抗 O157 磁珠试剂等^[1 6]。

1.1.2 菌株 肠出血性大肠杆菌 O157-H7、O157-H7 大肠杆菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、副溶血性弧菌、丹增李斯特菌以及变形杆菌等 ,上述菌株均在本实验室进行保存^[7]。

1.1.3 模拟样品制备 在 10 份经过消毒 (即去除其他菌种)的牛奶样品之中分别加入上述几种菌株 ,使得最终浓度在 104cfu/25g 以上 ;另外准备同样一组牛奶样品(体积为 25mL 每份)加以备用^[8]。

1.1.4 实样来源 本研究所采用的实样来源主要包括 :养鸡场、养猪场以及养鸭场。随机地采集 12 份、鸡粪 8 份以及鸭粪 10 份 ;在某超市及自行加工禽畜肉制品 50 份 ,实样样品数共计为

80 份。

1.2 方法

1.2.1 检测方法 以自动免疫磁珠收集系统(AIMS)、自动酶标免疫测试系统 (VIDAS) 与传统与的分离方法进行对比分析 : (1)AIMS 法 如下图 1 所示。(2)VIDAS 法 如下图 1 所示。(3)常规分离方法 :主要参考国标 GB4789-1994 中规定的标准方法进行的操作^[9-11]。

1.2.2 灵敏度试验 取出血性大肠杆菌 O157-H7 肉汤培养物进行梯度稀释之后加入一组牛奶样品之中 ,与此同时对不同稀释程度的菌液采用 CHROMagar O157 琼脂糖平板计数所含的细菌量 ,加样之后按照如图 1 所示的操作流程进行。

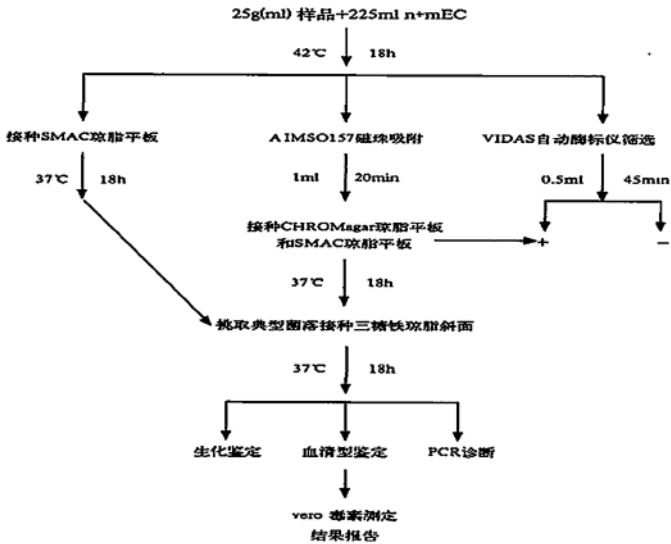


图 1 实样检测流程图

Fig. 1 Flow chart of sample detection

1.2.3 统计学方法 本研究中所出现的一切数据均由 Microsoft Excel 以及 SPSS13.0 两个软件加以统计、处理及分析 ,所出现的平均值均以 " " 的形式加以表示 ,运用 检验 组间以 $P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

运用自动免疫磁珠收集系统(AIMS)方法对 80 份可能含有肠出血性大肠杆菌 O157-H7 的实样进行检测 检出一份数为 6

份 ,检出率为 7.5% ,而且在一周之内可以全部对上述检出实样进行鉴定。AIMS 法能够检出浓度在 10cfu/mL 模拟实样之中的肠出血性大肠杆菌 O157-H7 ,然后将此法与 CHROMagar 0157 琼脂板相结合 ,其效果则更为明显。而自动酶标免疫测试系统 (VIDAS) 与传统与的分离方法则检测的效果不佳 ,检出率为 0。自动免疫磁珠收集系统(AIMS)检测方法与自动酶标免疫测试系统(VIDAS)^[12-13]、传统与的分离方法在检出率方面存在显著的统计学差异 $P<0.01$ 。具体而言 ,如下表 1 所示 :

表 1 本实验检测结果

Table 1 Results of sample detection

Method	Sample number	Masceline number	Detection rate(%)
Rule separation method+SMAC*	80(10)	0(1)	0
AIMS+CHROMagar &	80(10)	0(1)	0
VIDAS+SMAC	80(10)	6(1)	7.5
AIMS+SMAC**	80(10)	0(1)	0

Note: *,&,** compared to the detection rate of VIDAS+SMAC group, * $P<0.05$,& $P<0.05$,** $P<0.05$.

对此 ,还对该 80 份检测的准确率与常规的检测进行了对比 ,具体如下表 2 所示 :

3 结论

随着外界环境的不断变化 ,近年来全国食物中毒事件频频发生。从分子生物学的角度来看 ,均是由一些微生物或是真菌而引起的 ,严重地影响了人们的生产与生活学习情况。在各种

表 2 分子生物学检测方法与常规检测方法对比
Table 2 Comparison of Molecular biology test method and rule test method

Group	Case number(n)	Detection number(n)	Detection rate(%)
Rule group	80	3	3.75
Biology detection group	80	6	7.50
x ² value	--	3.222	4.3332
P value	--	<0.01	<0.01

微生物引起的食物中毒事件中,以细菌性的病原体为主要影响细菌。在 2010 年 3-6 月份我们对两起食物中毒的事件进行了观察,并运用分子生物学的方法(如 PCR 法)对导致腹泻、中毒的微生物细菌进行检测,选择一部分患者的粪便作为标本来进行观察和分析,最后发现可疑的病原菌主要为肠致泻性大肠杆菌所引起的;如果仅仅按照传统的血清与生化实验的分析方法,不结合现有的分子生物学检测技术,并不能很清楚地弄明白这些致病菌如何引起食物中毒的。因此,选择现代分子生物学检测技术具有十分重要的作用与意义^[14-15]。

由上文所述可以得知,肠出血性大肠杆菌 O157-H7 是一种新型的肠道致病菌,它所产生的毒素会对人体产生严重的危害及影响,这种毒素与志贺氏菌毒素是非常相似的,无论在形态方面,还是在性质、结构等方面均保持着相似性,人体感染了这种毒素之后,会发生严重的死亡,而且还会导致一些传染性疾病的产生,如霍乱、痢疾等传染性疾病。对于霍乱感染者而言,他们如果携带了 CTX 毒力单元以及 VPI 致病岛,那么就很有可能会引起霍乱腹泻症状的发生,如果患者没有携带上述两种毒力单元,那么就不会引起霍乱腹泻症状的出现与发生。与之相反的是,对于那些非 O1、非 O139 产毒株等,也可以通过基因的转译或是转录而产生致病菌蛋白体,从而最终引起霍乱腹泻症状。传统的分离方法不能很好地将这些致病菌进行有效地分离,而仅仅是可以将出血性大肠杆菌 O157-H7 大肠杆菌山梨醇不发酵等进行分离培养。CHROMagar 0157 琼脂平板自 1998 年被文献报道以来已经得到了较为广泛的应用^[16-19],本次实验笔者认为其内含特殊的显色底物原理可以保证高敏感性和特异性,并且可以避免目前部分产毒菌株的生化型变异(山梨醇、尿素以及耐亚硫酸钾等)而造成的漏检。综上所述可以得知,运用自动免疫磁珠收集系统(AIMS)结合 CHROMagar 0157 琼脂板对出血性大肠杆菌 O157-H7 进行检测,检出率较高、灵敏度较高且快速便捷,可以用于 O157-H7 外环境检测与食品污染源的调查之中,应该对其加以广泛地推广并应用。

参 考 文 献(References)

[1] 朱海,杨泽,李小燕,等. 生果、蔬菜中大肠杆菌 O157 m 荧光定量 PCR 检测方法的评估及改进 [J]. 现代预防医,2006,33(8): 1434-1439
Zhu Hai, Yang Ze, Li Xiao-yan, et al. E. coli 0157: fruit, vegetables, and the assessment and improvement of the m fluorescent quantitative PCR method for detection [J]. Journal of Preventive Medicine, 2006, 33(8):1434-1439
[2] 黄衍强. 大肠杆菌变种的分子生物学检测方法研究进展[J]. 右江民族医学院学报,2008,30(1):113-115

Huang Yan-qiang. Molecular biology detection methods for E. coli variants [J] Youjiang Medical Technology,2008,30 (1):113-115
[3] 李晓虹,许学斌,蒋琴娣,等. 产志贺毒素大肠杆菌的分子生物学检测方法研究[J]. 检验检疫科学,2006 (1) :61-63
Li Xiao-hong, Xu Xue-bin, Jiang Qin-di, et al. Shiga toxin-producing E. coli molecular biology detection methods [J]. Inspection and Quarantine,2006,(1):61-63
[4] 陈纯,许学斌,顾宝柯.肠出血性大肠杆菌 O157:H7 几种检测方法的比较研究[J].中国预防医学杂志,2004,5(2):107-109
Chen Chun, Xu Xue-bin, Gu Bao-ke. Enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7, several detection methods [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine,2004,5(2):107-109
[5] 金慧英,陈华标,陶开华,等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌的多重 PCR 检测[J]. 解放军预防医学杂志,2003,21(4):252-253
Jin Hui-ying, Chen Hua-biao, Tao Kai-hua, et al. Multiplex PCR for detection of EHEC O157: H7 and Vibrio cholerae [J]. People's Liberation Army of Preventive Medicine,2003,21(4):252-253
[6] 郭喜玲,史智扬,顾玲,等. 应用多重引物 PCR 技术检测 O157:H7 毒力基因[J]. 中华流行病学杂志,2000,21(6):1
Guo Xi-ling, Shi Zhi-yang, Gu Ling, et al. Multiplex primer PCR detection of O157: H7, virulence genes [J]. Chinese Journal of Epidemiology,2000,21 (6):1
[7] 陈爱平,陈建辉,杨劲. 分子生物学技术在肠致泻性大肠杆菌诊断中的应用[J].中国人兽共患病学报,2011,27(9):808-809
Chen Ai-ping, Chen Jian-hui, Yang Jin. Application of molecular biology techniques in diagnosis of diarrheagenic Escherichia coli[J]. Chinese Journal of Zoonoses,2011,27(9):808-809
[8] 蔡军,毛金良.多重 PCR 和基因芯片检验致病性大肠埃希菌[J].现代检验医学杂志,2005,20:87-88
Cai Jun, Mao Jin-liang. Multiplex PCR and microarray testing of pathogenic E. coli [J]. Modern Laboratory Medicine,2005,20:87-88
[9] 卫生部. 中华人民共和国卫生行业标准(WS271-2007)《感染性腹泻诊断标准》[S]
Ministry of Health. Health of the People's Republic of China industry standards (WS271-2007) "infectious Diarrhea diagnostic criteria "[S]
[10] 苏建忠,国文,汤芳. 2007-2008 年全国食物中毒发生情况分析[J]. 武警医学院学报,2010,19(7):568-570
Su Jian-zhong, Guo Wen. Tang Fang. 2007-2008 nationwide food poisoning occurrence analysis [J]. Armed Police Medical College,2010,19 (7):568-570
[11] 张昕,王子军,冉陆. 2008 年会国突发公共卫生事件网络报告食物中毒事件分析[J]. 疾病监测,2010,25(5):406-409
Zhang Xin. Wang Zi-jun, Ran Lu. 2008 will be a public health emergency event network reported food Poisoning incident analysis [J]. Disease surveillance,2010,25(5):406-409 (下转第 5400 页)

ne,2009,11(6):145-147

- [16] 王上增,孙永强.关节镜下膝后交叉韧带重建的研究进展[J].中医正骨,2005,12(15):112-114
Wang Shang-zeng, Sun Yong-qiang. Arthroscopic knee posterior the research progress of the cruciate ligament reconstruction[J]. The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology,2005,12(15):112-114
- [17] Lee YS, Han SH, Kim JH, et al. A biomechanical comparison of tibial back side fixation between suspensory and expansion mechanisms in trans-tibial posterior cruciate ligament reconstruction[J]. Knee,2012,19(1):55-59
- [18] 黄华扬,张余,曹正霖,等.关节镜下双股半腱肌腱重建后十字韧带及相问题的探讨[J].中华骨科杂志,2003,23(7):19-21
Huang Hua-yang, Zhang Yu, Cao Zheng-lin, et al. Arthroscopic reconstruction of posterior cruciate ligament using hamstring tendons transfer and evaluation of its clinical evaluation[J]. Chinese Journal of Orthopaedics,2003,23(7):19-21
- [19] M.Ettinger T, Wehrhahn M, Petri, et al. The fixation strength of tibial PCL press-fit reconstructions [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc,2012,20(2):308-314
- [20] 张晖,刘晓民,王润生,等.同种异体骨-中1/3髌腱-骨-骨-跟腱移植重建羊膝关节后交叉韧带的比较研究[J].中华创伤杂志,2004,20(2):77-82
Zhang Hui, Liu Xiao-min, Wang Run-sheng, et al. Allografts stored in patellar tendon third-bone, bone-Achilles tendon graft reconstruction

the sheep knee the comparative study of the posterior cruciate ligament[J]. Chinese Journal of Trauma,2004,20(2):77-82

- [21] 王昆,朱蕾.生物型人工韧带的体外检测和体内组织相容性的实验研究[J].中国病理生理杂志,2010,26(12):2394-2399
Wang Kun, Zhu Lei. Experimental study on structure, mechanical properties and biocompatibility of artificial biological ligament in vitro and in vivo[J]. Chin J Pathophysiology,2010,26(12):2394-2399
- [22] Aníbal Debandi, Akira Maeyama, Songcen Lu, et al. Biomechanical comparison of three anatomic ACL reconstructions in a porcine model [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc,2011,19:728-735
- [23] Peng L, Lu W. Experimental study on fixed angle adjustment in simultaneous reconstruction of anterior and posterior cruciate ligament [J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery,2011,25(8):980-983
- [24] Zielinski JR, Rudnicka A. Tensile strength and Young's modulus of the posterior cruciate ligament in the dog[J]. Folia Morphol (Warsz),1975,34(3):249-257
- [25] Meller R, Schiborra F. Postnatal maturation of tendon, cruciate ligament, meniscus and articular cartilage: a histological study in sheep[J]. Ann Anat,2009,191(6):575-585
- [26] Jaber FM, Abbasi H. A modification of tibial inlay fixation in posterior cruciate ligament reconstruction by interference screw: a biomedical study on calf tibial bone model [J]. Arch Orthop Trauma Surg,2010,130(9):1065-1069

(上接第 5240 页)

- [12] 丁红雷.肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的分子生物学检测方法研究进展[J].国外临床生物化学与检验学分册,2005,26(8):523-526
Ding Hong-lei. O157:H7 molecular biology Method [J]. Foreign Clinical Biochemistry and Laboratory volumes,2005,26(8):523-526
- [13] Hayashi T, Maki no K, Ohnishi M, et al. Complete genome sequence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12 [J]. DNA Res,2001,8(1):11-22
- [14] Klevyt ska AM, Price LB, Schupp JM, et al. Identification and characterization of variable number tandem repeats in the Yersinia pestis genome [J]. J Clin Microbiol,2001,39(9):3179-3185
- [15] Keim P, Price LB, KleVytska AM, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within Bacillus anthracis [J]. J Bacteriol,2000,182(10):2928-2936

- [16] Zhao S, Mitchell SE, Meng J, et al. Genomic typing of Escherichia coli O157:H7 by semi-automated fluorescent AFLP analysis [J]. Microbes Infect,2000,2(2):107-113
- [17] Iyoda S, Wada A, Weller J, et al. Evaluation of AFLP analysis on DNA fingerprinting method as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 isolates [J]. Microbiol Immunol,1999,43(8):803-806
- [18] Zhang W, Bielaszewska M, Kuczius T, et al. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx1c) in Escherichia coli strains isolated from humans [J]. J Clin Microbiol,2002,40(4):1441-1446
- [19] Fey PD, Wickert RS, Rupp ME, et al. Prevalence of non-O157:H7 shiga toxin-producing Escherichia coli in diarrheal stool samples from Nebraska [J]. Emerg Infect Dis,2000,6(5):530-533