

# 肉类及蔬菜食品中 EHEC O157 污染分布及分型研究

赖则冰<sup>1,2</sup>, 张淑红<sup>1</sup>, 朱雪梅<sup>1</sup>, 吴清平<sup>1</sup>, 徐明芳<sup>2</sup>, 张菊梅<sup>1</sup>

(1. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东广州 510070) (2. 暨南大学生命科学技术学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 为深入了解肉类及蔬菜中肠出血性大肠埃希氏菌 (EHEC O157) 的污染分布规律和遗传多样性, 随机采集全国18个城市的食品样品, 参考GB/T 4789.36-2008方法进行样品处理, 并用*rfbE* / *fliC<sub>H7</sub>*双重PCR对菌株进行鉴定; 分别采用单重PCR和ERIC-PCR对菌株进行毒力基因 (*eae*, *hlyA*, *stx1*和*stx2*)检测 and 分子分型。结果表明, 414份样品中检出18份EHEC O157阳性样品, 总污染率4.35%, 其中生鲜肉12份, 速冻肉6份, 蔬菜未检出; 经过生化、血清鉴定和双重PCR检测, 鉴定出52株EHEC O157, 包括29株O157:H7, 3株O157:NM (*fliC<sub>H7</sub>*+, 无动力), 2株O157:NM (*fliC<sub>H7</sub>*-, 无动力)和18株O157:hund (未确定H型); 毒力基因检测结果发现, 52株菌株中有50株携带毒力基因, 其中40株 (76.92%) 携带*eae*, 31株 (59.62%) 携带*hlyA*, 20株 (38.46%) 携带*stx1*, 24株 (46.15%) 携带*stx2*。ERIC-PCR分型结果表明, 在相似系数为0.80时, 菌株可分为12个聚类簇, F型为其主要基因簇, 分离株的基因型呈现多样性。

**关键词:** 肉类; 蔬菜; 肠出血性大肠埃希氏菌O157; 分布; ERIC-PCR分型

文章编号: 1673-9078(2014)9-290-296

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.048

## Prevalence and ERIC-PCR Typing of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in Meat and Vegetables

LAI Ze-bing<sup>1,2</sup>, ZHANG Shu-hong<sup>1</sup>, ZHU Xue-mei<sup>1</sup>, WU Qing-ping<sup>1</sup>, XU Ming-fang<sup>2</sup>, ZHANG Ju-mei<sup>1</sup>

(1. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China) (2. School of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, 510006, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the prevalence and genotypic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 (EHEC O157) in meat and vegetables. Food samples were collected randomly from 18 cities in China and processed according to the GB/T 4789.36-2008 method with slight modifications. The isolates were identified by duplex PCR targeting the *rfbE* and *fliC<sub>H7</sub>* genes. The presence of four virulence genes (*eae*, *hlyA*, *stx1*, and *stx2*) in EHEC O157 was determined by single-PCR. Additionally, enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) was used for molecular typing of EHEC O157 isolates. The results showed that 18 (4.35%) of 414 samples were positive for EHEC O157, including 12 fresh meat samples and 6 frozen meat samples. None of the vegetable samples was positive. Furthermore, a total of 52 isolates were identified as EHEC O157 by serotyping, biochemical tests, and duplex-PCR, of which 29 strains were O157:H7, 3 strains were O157:NM (carried *fliC<sub>H7</sub>* gene, non-mobile), 2 strains were O157:NM (without *fliC<sub>H7</sub>* gene, non-mobile), and 18 strains were O157:hund (undetermined H type). The distribution of virulence genes indicated that 50 out of 52 EHEC O157 isolates carried at least one virulence gene, 40 (76.92%) isolates possessed *eae* gene, 31 (59.62%) isolates harbored *hlyA* gene, 20 (38.46%) isolates harbored *stx1* gene, while 24 (46.15%) isolates harbored *stx2* gene. ERIC-PCR molecular fingerprint clustering analysis showed that, when the similarity coefficient was 0.80, the strains could be divided into 12 types, and F type was the dominant gene type, indicating a high diversity of genes in these isolates.

**Key words:** meat; vegetables; enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157; prevalence; enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction typing

收稿日期: 2014-03-31

基金项目: 国家国际科技合作专项 (2013DFH30070); 广东省科技计划项目 (2012B090400017)

作者简介: 赖则冰 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向食品微生物安全; 张淑红, 并列第一作者

通讯作者: 张菊梅 (1968-), 女, 博士, 研究员, 研究方向为食品微生物安全检测与控制技术

肠出血性大肠埃希氏菌O157 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli* O157, EHEC O157)是一种严重威胁人类身体健康和公共安全的食源性致病菌,其感染人后经常导致严重的出血性腹泻和腹部绞痛,约有10%的患者发展为溶血性尿毒综合征及血栓性血小板减少性紫癜,死亡率高达30%<sup>[1~2]</sup>。已有的研究表明,牛、羊、猪、鸡、鸭等动物性食品和蔬菜等是重要的污染源<sup>[3]</sup>。近年来美国、英国、日本、澳大利亚、尼日利亚、泰国等地暴发了多起EHEC O157食物中毒事件,我国部分省市也已有该菌的检出和感染病例报告,局部暴发流行和散发病例时有发生<sup>[4]</sup>。由于EHEC O157对人具有很强的危害性,我国已将其列为21世纪可能对国人卫生健康有重大影响的12种病原微生物之一。

EHEC O157的致病性与其毒力因子密切相关,已知的致病因子主要有志贺毒素(Shiga toxins, Stx)、肠细胞脱落位点(locus of enterocyte effacement, LEE)毒力岛和溶血素(hemolysin)等<sup>[5~6]</sup>。Stx毒素在EHEC O157感染过程中导致出血性肠炎(HC)、溶血性尿毒综合征(HUS)等严重的临床症状,由stx基因调控表达;LEE毒力岛编码的蛋白(eae基因编码)负责粘附上皮细胞,激活寄主信号转导通路,引起肠道病变和炎症反应;另外,部分EHEC O157可产生溶血素(质粒携带基因hlyA编码),引起肠道出血。因此,对EHEC O157分离株进行毒力基因分析和分型研究有重要意义,可以追溯EHEC O157疾病暴发的源头。目前,许多分型方法如脉冲场凝胶电泳(PFGE)、肠杆菌科基因间重复一致序列PCR(ERIC-PCR)分型和随机扩增多态性(RAPD-PCR)等已建立并应用于EHEC O157疾病溯源和分子分型研究<sup>[7~8]</sup>。与其他分型方法相比,ERIC-PCR具有操作简便、重复性强、灵敏度高、鉴别能力强、所需仪器设备简单、成本低等优点。

在我国,尽管已有多个省份开展了EHEC O157污染和疾病的监控,但是这些数据多来源于临床样本或宿主动物调查,食品中EHEC O157污染状况的数据仍旧比较缺乏,系统的调查数据相对较少。为全面了解肉类和蔬菜等食品中的污染分布情况,本研究在全国18个城市随机采集了414份样品进行EHEC O157污染调查,采用单重PCR方法对分离株的eae、hlyA、stx1、stx2四个毒力基因进行了检测和分析,并运用ERIC-PCR分子分型分析了菌株的遗传多样性,旨在为流行病学调查分析、制定预防和控制对策提供一些参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

2012年5-12月采集国内18个城市(海口、三亚、北海、南宁、福州、厦门、上海、合肥、南昌、武汉、成都、昆明、兰州、哈尔滨、西安、太原、北京、济南)三类食品(生鲜肉类、速冻食品、蔬菜)共414份样品,按照GB 4789.1-2010<sup>[9]</sup>中样品的采集规则,在每个城市的超市和集贸市场随机采集23份样品,4℃冰盒保存送达实验室,2h内检验。

### 1.2 标准菌株

*E. coli* O157:H7 NCTC 12900 菌株,携带 eae 及 hlyA 两种毒力基因,由广东省微生物研究所菌种保藏中心提供。*E. coli* O157:H7 ATCC 35150,携带 eae、hlyA、stx1 和 stx2 四种毒力基因,购于美国菌种保藏中心。

### 1.3 培养基和试剂

改良 EC 肉汤(mEC+n)、改良科玛嘉(CHROMagar)大肠埃希氏菌O157显色培养基、营养琼脂平板、生理盐水、氧化酶试纸、三糖铁(TSI)琼脂、月桂基磺酸盐蛋白胨肉汤-MUG(MUG-LST)、半固体琼脂、琼脂糖、MID-64和MID-65生化鉴定试剂盒等购自广东环凯微生物科技有限公司。DynaBead® anti-*E. coli* O157 免疫磁珠购自挪威Dyna公司,API 20E生化鉴定试剂盒购自法国生物梅里埃公司,大肠埃希氏菌O157和H7诊断血清购自宁波天润生物药业有限公司,2×PCR Mix购自东盛生物科技有限公司,其他PCR试剂和电泳相关试剂购自TaKaRa公司,引物由华大基因合成。

### 1.4 主要仪器设备

Biometra TProfessional PCR仪,德国Biometra公司;电泳仪,EP301、EP501、EP3501,瑞典安玛西亚公司;凝胶分析成像系统UVI,英国GE Healthcare公司。

### 1.5 方法

参照GB/T 4789.36-2008《食品卫生微生物学检验大肠埃希氏菌O157:H7/NM检验》<sup>[10]</sup>中的免疫磁珠富集法,略改动。称取25g样品置入225mL灭菌改良EC肉汤中42℃培养18~24h,取1mL增菌液及20μL

免疫磁珠置于 1.5 mL 灭菌离心管中,充分混匀;加入 100  $\mu$ L 1% PBS-Tween 20, 放于磁力架富集 30 min; 弃去悬浮液;用 PBS 缓冲溶液反复洗涤磁珠 3 次, 然后加入 100  $\mu$ L PBS 重新混匀。将磁珠悬浮液进行 10 倍递增稀释, 选择 0.1 g、0.01 g、0.001 g 三个稀释度, 各取 30  $\mu$ L 富集菌液涂布于 CHROMagar 大肠埃希氏菌 O157 显色平板, 37  $^{\circ}$ C 培养 18~24 h。

### 1.5.1 菌株生化鉴定

挑取 5~10 个紫色典型或可疑菌落, 分别接种 TSI 琼脂和 MUG-LST 肉汤, 于 (36 $\pm$ 1)  $^{\circ}$ C 培养 18~24 h。在营养琼脂平板纯化后, 按 API-20E、MID-64 和 MID-65 生化鉴定试剂盒说明书进行菌株鉴定。

血清学鉴定及动力实验: 将生化鉴定符合 EHEC O157 特征的菌株用玻片凝集法进行血清鉴定。生化和血清鉴定为 EHEC O157 的菌株继续进行动力实验。

### 1.5.2 菌株双重 PCR 鉴定

采用煮沸法提取菌株的基因组 DNA, 参考 Jeshveen et al<sup>[11]</sup>的方法扩增 *rfbE* (5' -CAGGTG AAG GTGGAATGGTTGTC-3', 5' -TTAGAATTGAGAC CATCCAATAAG-3, 扩增片段长度 296 bp) 和 *fliC<sub>H7</sub>* (5' -GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC-3', 5' -CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC3', 片段长度 625 bp) 基因。反应体系为 25  $\mu$ L, 其中包括 2 $\times$ PCR Mix 12.5  $\mu$ L, *rfbE* 和 *fliC<sub>H7</sub>* 引物各 400 nmol/L, ddH<sub>2</sub>O 6.5  $\mu$ L, DNA 模板 200 ng。扩增反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s; 59  $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共进行 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 扩增后产物于 4  $^{\circ}$ C 保存。阳性对照为 *E.coli* O157:H7 NCTC 12900, 阴性对照为 *E.coli* ATCC 25922, PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 凝胶成像分析系统 UVI 观察结果。

### 1.6 毒力基因检测

采用单重 PCR 方法检测毒力基因 *eae*<sup>[12]</sup>、*hlyA*<sup>[13]</sup>、*stxI*<sup>[11]</sup>、*stx2*<sup>[13]</sup>, 引物序列见表 1。PCR 的反应体系为 25  $\mu$ L, 其中 2 $\times$ PCR Mix 12.5  $\mu$ L, 引物 400 nmol/L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L, DNA 模板 100 ng。扩增反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s; 退火温度见表 1, 30 s; 72  $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共进行 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10min, 于 4  $^{\circ}$ C 条件下保存。以 EHEC O157:H7 ATCC 35150 为阳性对照, 无菌水为阴性对照, 扩增后 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像分析系统 UVI 观察结果并拍照。

### 1.7 ERIC-PCR 分子分型

表 1 毒力基因的 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	扩增片段大小/bp	退火温度/ $^{\circ}$ C
<i>eae</i>	TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT	482	60
	GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG		
<i>hlyA</i>	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	60
	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		
<i>stx1</i>	TGTAAGTGGAAAGGTGGAGTATA	210	64
	CAGCTATTCTGAGTCAACGAAAA		
<i>stx2</i>	ATGAAGTGTATATTTAAATGG	1200	49
	TCAGTCATTATTAACACTGCAC		

参考文献 Versalovic J 等<sup>[14]</sup>所述的 ERIC-PCR 扩增引物序列, 合成引物 ERIC2: 5'-AAGTAAGTGAC TGGGGTG AGCG-3', 由华大基因公司合成。按照相关文献的组分和用量配置 PCR 反应体系<sup>[15]</sup>, PCR 的反应体系总体积 25  $\mu$ L, 其中 2 $\times$ PCR Mix 12.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L ERIC2 引物各 2  $\mu$ L, 模板 DNA 1.0  $\mu$ L, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L。PCR 循环参数为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s; 45  $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。ERIC-PCR 扩增后, 取 5  $\mu$ L PCR 产物上样于 1 $\times$ TAE 配制的 2% 琼脂糖凝胶 (含 Gold View 染料), 100 V 电压下电泳 35 min, 用凝胶成像系统进行分析图像。最后运用 Gel-pro Analyzer 4.0 和 NTSYS-pc 2.10e 软件对 EHEC O157 ERIC-PCR 指纹图谱进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 食品中 EHEC O157 污染情况

414 份食品样品中, 共检出阳性样品 18 份, 阳性率为 4.35% (如表 2)。按食品类型分析, 速冻肉类食品阳性率最高 (5.88%), 其次为生鲜肉类食品, 阳性率 5.38%, 蔬菜样品中未检出 EHEC O157。

表 2 不同类型食品中 EHEC O157 分布情况

Table 2 Prevalence of EHEC O157 in different food samples

样品种类	数量	阳性样品数量	阳性率	菌株数量
鲜肉	223	12	5.38%	26
冷冻肉	102	6	5.88%	26
蔬菜	89	0	0%	0
合计	414	18	4.35%	52

肉类食品总阳性率为 5.54% (见表 3)。按肉的种类进行分析, 羊肉的污染率最高 (13.33%), 其次为牛肉, 阳性率 9.76%, 鸡肉和鸭肉的阳性率分别为



5.13%和4.44%，猪肉阳性率最低（2.17%）。

表3 肉类样品中 EHEC O157 污染情况

Table 3 The distribution of EHEC O157 in meat samples

肉的种类	样品数量	阳性样品数量	阳性率/%
猪肉	92	2	2.17
鸡肉	117	6	5.13
鸭肉	45	2	4.44
牛肉	41	4	9.76
羊肉	30	4	13.33
合计	325	18	5.54

### 2.2 菌株鉴定结果

经生化鉴定、血清鉴定及 PCR 分子鉴定，共分离鉴定 52 株 EHEC O157 菌株。所有的 EHEC O157 菌株氧化酶结果均为阴性；在三糖铁斜面上均为上部黄色，下部黄色，产气；MUG-LST 肉汤培养阴性，无荧光；API 20E 和 MID 64+65 的生化鉴定结果均鉴定为大肠埃希菌。血清鉴定结果表明，52 株菌株均能与 EHEC O157 诊断血清发生凝集反应，其中 29 株 H7 抗原血清凝集为阳性。动力实验发现，47 株菌株具有动力。双重 PCR 鉴定结果表明，52 株菌株 *fbE* 基因扩增阳性，其中 32 株菌株 *fliC<sub>H7</sub>* 基因扩增阳性。

综合来看，52 株菌株中 O157:H7 (*fbE* 和 *fliC<sub>H7</sub>* 基因阳性，有动力)为 29 株，O157:NM (*fliC<sub>H7</sub>* 基因阳性，无动力)为 3 株，O157:NM (*fliC<sub>H7</sub>* 基因阴性，无动力)为 2 株，O157:hund (*fbE* 基因阳性，*fliC<sub>H7</sub>* 基因阴性，有动力但无法判断 H 型别)为 18 株。

### 2.3 毒力基因检测结果

经过特异性 PCR 检测，共有 50 株菌株携带毒力基因，携带率为 96.15%（见表 4）。其中有 40 株（76.92%）携带 *eae* 基因；31 株（59.62%）携带 *hlyA* 基因；20 株（38.46%）携带 *stx1* 基因；24 株（46.15%）携带 *stx2* 基因。

表4 不同类型 EHEC O157 菌株毒力基因的携带情况

Table 4 The distribution of virulence genes in EHEC O157 isolates

毒力基因	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
O157:H7	26	24	15	17
O157: NM ( <i>fliC<sub>H7</sub></i> +) )	3	3	2	3
O157:NM	2	1	0	0
O157:hund	9	3	3	4
总计	40 (76.92%)	31 (59.62%)	20 (38.46%)	24 (46.15%)

### 2.4 ERIC-PCR 分型结果

将分离得到的 EHEC O157 DNA 模板进行 ERIC-PCR 扩增、电泳，ERIC-PCR 指纹图谱结果见图 1。每个菌株产生的条带数量为 2~7 条，片段大小约为 200 bp~1500 bp。将电泳结果用聚类软件 Gel-Pro Analyzer 4.0 和 Ntsys 软件进行分析，其菌株遗传进化树状图如图 2 所示。由图 2 中可知，分离株的基因型呈现多态性分布，按照 80%的基因同源性，菌株可分为 12 个簇 (A~L)，其中有 27 株属于 F 簇，占菌株总数的 51.92%，为优势基因型；另外 E 簇包含菌株 6 株，I 簇 5 株，C 簇、G 簇和 J 簇各有 3 株，而 A、B、D、H、K 和 L 簇菌株各有 1 株。标准菌株 *E.coli* O157:H7 12900 单独成为 K 簇。

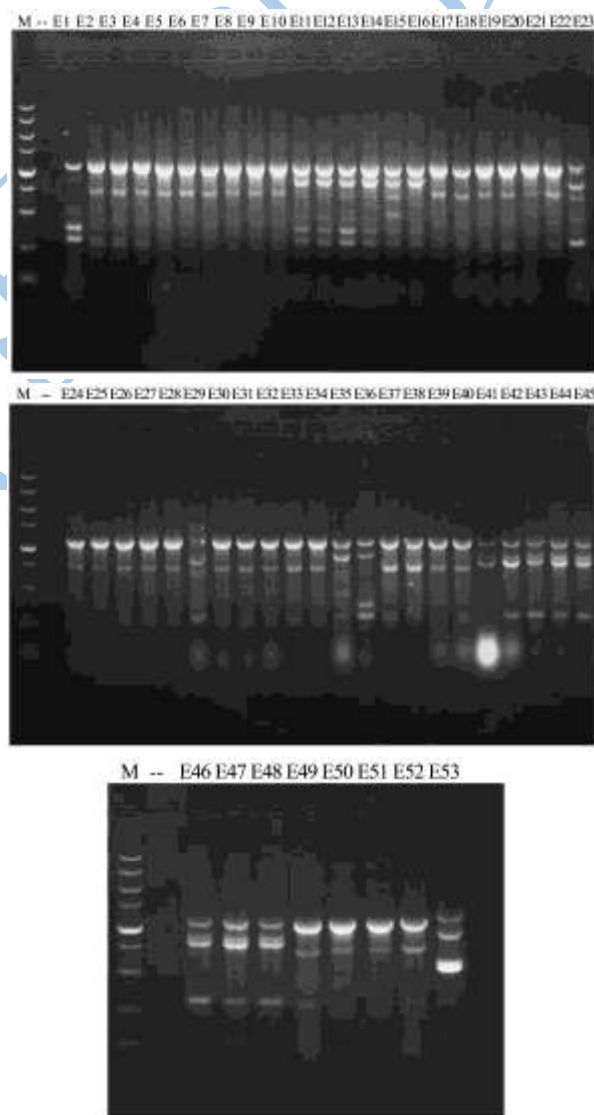


图1 EHEC O157 ERIC-PCR 扩增电泳图

Fig.1 ERIC-PCR electropherograms of EHEC O157

注：M 为 maker，DL5000，条带大小分别为 5000、3000、2000、1500、1000、750、500、250、100 bp；-：阴性对照；

E1-E52: EHEC O157 分离株; E53: 标准菌株 EHEC O157:H7 NCTC 12900。

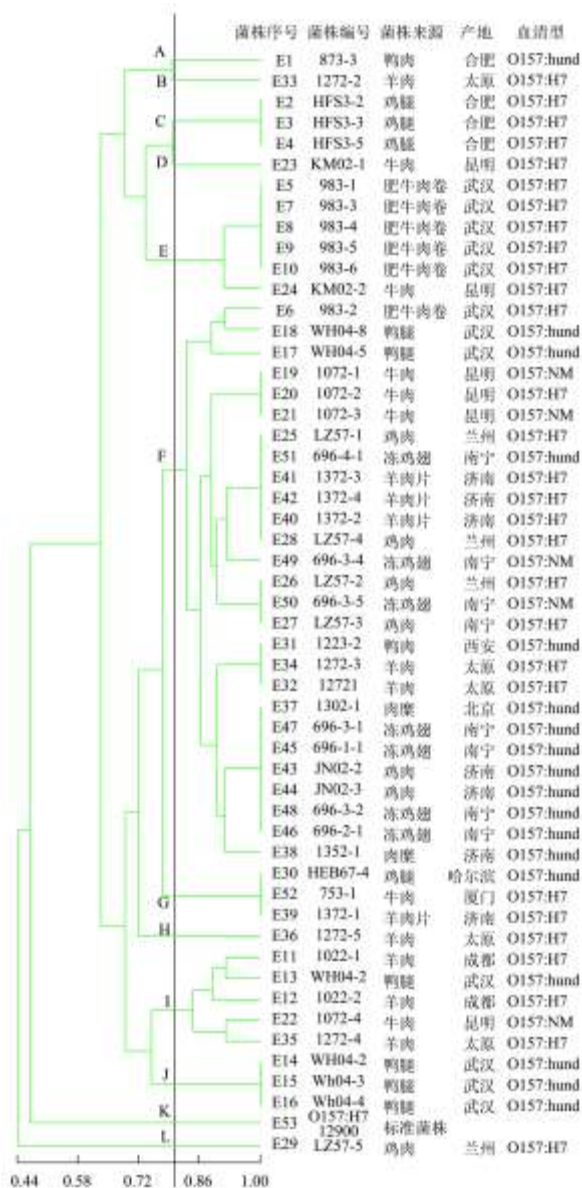


图2 EHEC O157 分离株的 ERIC-PCR 聚类图

Fig.2 The dendrogram of EHEC O157 isolates by ERIC-PCR

综合生化和分型结果, 29 株 O157:H7 菌株分布在 9 个簇中, 其中 13 株 (44.83%) 为 F 簇, 该簇为其主要基因型; 3 株 O157:NM (*ftiC<sub>H7</sub>*<sup>+</sup>, 无动力) 的 E19, E21, E22 分布于 F 和 I 两个簇; 2 株 O157:NM (*ftiC<sub>H7</sub>*<sup>-</sup>, 无动力) 菌株分在 F 簇; O157:hund 菌株分布在 5 个簇中, 其中 12 株 (66.67%) 为 F 簇。另外, 从图 2 可以看出, 来自同一样品的菌株的基因型基本相同, 但也存在来源于同一样品的菌株具有多个基因型的情况, 如 KM02 样品 2 株菌株被分为 D 和 E 两个簇, WH04 样品的菌株被分为 I、J 和 F 3 个簇, 而 1272 样品的 5 株菌株被分为 F、B、I 和 H 4 簇。对不同采样地点的菌株进行分析, 没有发现明显的规律性。以

上结果表明不同地区和样品来源的菌株在遗传基因方面存在多样性。

### 3 结论

3.1 EHEC O157 是一种人畜共患的重要食源性致病菌, 具有强致病性和高死亡率等特点。近年来, EHEC O157 导致的疾病已引起了全世界的普遍关注<sup>[16]</sup>。国内外报道动物及肉制品如牛、猪、羊、鸡、鸭等是其重要的污染源之一。除此之外, 蔬菜污染导致的疾病爆发时有发生, 本研究重点对这两类食品进行了调查。由于食品样品中的 EHEC O157 数量相对较低, 不同部门或研究者所用检测方法有一定差异, 因此, 国内外报道的食品中 EHEC O157 污染率差别较大。杨毓环等<sup>[17]</sup> 采用常规培养法与分子方法结合, 从福建省 1380 份食品中检出 4 份阳性样品, 检出率 0.29%。邢丽萍等<sup>[18]</sup> 采用国标法中的常规培养法从呼和浩特市 307 份 15 种食品中用国标法中的常规培养法检出 2 份 EHEC O157:H7 阳性样品。本次调查的污染率高于国内相关报道, 一方面, 分析可能与食品种类有关, 本研究重点针对国内外文献报道中污染率较高的生鲜肉类、速冻食品和蔬菜三类食品展开 EHEC O157 污染调查。另一方面, 高检出率可能与本研究采用国标中的免疫磁珠富集法和 *fbE/fliC-H7* 双重 PCR 鉴定方法, 并且调整了增菌温度有关。本研究通过前期实验, 证实在 42 °C 增菌时, 非目标菌的生长受到一定抑制, 有利于从显色平板分离 EHEC O157。另外, 我们的调查数据与国外报道的肉类样品污染率 (2.00%~4.80%)<sup>[5, 19]</sup> 相比, 也有一定差异, 分析与地域、样品类型、采样时间等因素有关。

3.2 本研究中肉类食品 (包括生鲜肉类及冷冻肉类) 的检出率为 5.54%, 表明肉类食品是潜在的 EHEC O157 高危污染食品。而速冻肉类的检出率高达 5.88%, 表明 EHEC O157 具有耐冷性, 应加强对该菌在冷藏或冷冻食品中的监控力度。本次调查中蔬菜样品并未检测到 EHEC O157, 说明蔬菜类食品 EHEC O157 污染程度相对较低, 这与以往报道有共同之处。但是由于本次调查的蔬菜样品数量有限, 下一步研究中检验更多的蔬菜样品是必要的。

3.3 另外, 实验过程中发现, 尽管免疫磁珠富集分离法是目前国际公认的高效富集 EHEC O157 的方法, 该方法在检测过程中存在一定的杂菌干扰问题, 主要表现在: EHEC O157 本身菌落形态较小, 而实际样品中的菌群复杂, 目标菌相对于其他杂菌竞争力较弱, 造成分离困难; 其次, 免疫磁珠的特异性不够高, 富集过程中会富集一些非目标菌, 干扰了 EHEC O157

的在显色培养基上的显色和分离。为进一步验证结果,我们对收集到的假阳性菌株进行了 16S rDNA 基因鉴定,证实主要为大肠杆菌 O111、大肠杆菌 O26、志贺氏菌、阴沟肠杆菌和鲍曼不动杆菌等,这些菌株在显色培养基平板上生长良好,与目标菌形态、颜色上十分相似,增加了目标菌分离的难度。通过摸索,我们发现将免疫磁珠富集菌液稀释后再涂布显色平板有利于目标菌的分离。由于免疫磁珠富集方法也存在一定缺陷,检测过程中应尽可能多挑取菌株进行鉴定,减少漏检的几率。

3.4 迄今为止,人们对 EHEC O157 的致病机理尚未完全明了,但是粘附、侵袭和毒素的产生已被公认为是 EHEC O157 致病的重要因素。本研究对 EHEC O157 分离株毒力基因的携带情况进行了调查分析,发现分离的 52 株 EHEC O157 菌株中有 50 株菌株携带毒力基因,携带率 96.15%。对于食品样品中分离的 EHEC O157 菌株携带不同毒力基因情况,以往的研究中也有报道<sup>[13, 19]</sup>。尽管携带有毒力基因的菌株并不一定会表达毒力而引起宿主发病,但是仍然存在一定风险。因此,掌握菌株的毒力携带情况仍然必要,这对于预防和控制 EHEC O157 的感染流行具有重要意义。

3.5 国内外研究显示,ERIC-PCR 作为一种分子分型手段有着不逊于 RAPD-PCR、RFLP、PFGE、MLST 等其他分型技术的分辨力,可以满足对 EHEC O157 及其他致病菌鉴定分型的要求。近年来本研究室先后建立了蜡芽孢杆菌、空肠弯曲菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌等多种致病菌 ERIC-PCR 分型方法<sup>[20]</sup>。本研究利用 ERIC-PCR 对 53 株 EHEC O157 进行分型发现,相似系数为 0.80 时,可分为 12 个大簇(A-L),F 型为其优势基因型,分型效果良好。分离株的基因型呈现多态性分布。从聚类结果来看,来自同一样品的菌株的基因型基本相同,但也存在来源于同一样品的菌株具有多个基因型的情况,不同地域来源的菌株分型情况并没有的规律性,这些结果充分说明了实际样品中菌群分布的复杂性和菌株进化上的多样性。因此,建议研究者在检测过程中应尽可能多挑取菌株进行鉴定和分型,以便更客观、真实的反映样品的污染情况。

3.6 综上所述,肉类食品存在不同程度的 EHEC O157 污染,分离株大部分均携带毒力基因,且 EHEC O157 基因型呈现多样性。肉类为 EHEC O157 的重要污染源,存在一定感染风险,应该引起相关部门和消费者的重视。

## 参考文献

[1] 孟祥升,辛崇兴,邵晞.肠出血性大肠杆菌 O157:H7 研究

进展[J].中国动物检疫,2011,28(11):69-72

MENG Xiang-sheng, XIN Chong-xing, SHAO Xi. Advances in the study of enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7 [J]. Chinese Journal of Animal Health Inspection, 2011, 28(11): 69-72

[2] 赖卫华,冯贻泽,白熙安 克罗泽道森.大肠杆菌 O157:H7 快速培养的初步研究[J].食品科学,2009,30(7):145-147

LAI Wei-hua, FENG Yi-ze, Beth Ann Crozier-Dodson. Preliminary study on rapid culture of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Food science, 2009, 30(7): 45-147

[3] <http://health.msn.com.cn/tag/30622.shtml>

[4] 王燕,谢贵林,杜琳.大肠杆菌 O157:H7 感染流行概况[J].微生物学免疫学进展,2008,36(1):51-58

WANG Yan, XIE Gui-lin, DU Lin. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2008, 36(1): 51-58

[5] Cadirci O, Siriken B, Inat G, et al. The prevalence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in ground beef and raw meatball by immunomagnetic separation and the detection of virulence genes using multiplex PCR [J]. Meat Science, 2010, 84(3): 553-556

[6] Blanco J E, Blanco M, Alonso M P, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999 [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(1): 311-319

[7] Currie A, MacDonald J, Ellis A, et al. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of beef donair [J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(6): 1483-1488

[8] Vidal M, Escobar P, Prado V, et al. Distribution of putative adhesins in shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from different sources in Chile [J]. Epidemiology and Infection, 2007, 135(4): 688-694

[9] GB 4789.1-2010 食品安全国家标准食品微生物学检验总则[S]

GB 4789.1-2010 National food safety standard Food microbiological examination:General guidelines [S]

[10] GB/T 4789.36-2008 食品安全国家标准食品微生物学检验大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验[S]

GB/T 4789.36-2008 Microbiological examination of food hygiene-examination of *Escherichia coli* O157:H7/NM [S]

[11] Jeshveen S S, Chai L C, Pui C F, et al. Optimization of



- multiplex PCR conditions for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes [J]. International Food Research Journal, 2012, 19(2): 461-466
- [12] Kagambega A, Martikainen O, Lienemann T, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in raw meat and beef intestines sold at local markets in Ouagadougou, Burkina Faso [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(1-2): 154-158
- [13] 白莉,刘秀梅,付萍,等.2005~2007年中国食品中疑似O157大肠埃希菌的鉴定及毒素基因的检测[J].卫生研究,2010,39(3):335-339
- BAI Li, LIU Xiu-mei, FU Ping, et al. Serotyping and virulence genes of suspected *Escherichia coli* O157 strains in food from 2005 to 2007 [J]. Journal of Hygiene Research, 2010, 39(3): 335-339
- [14] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes [J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(24): 6823-6831
- [15] Lodh C, Rahaman H, Bhattacharya D, et al. Characterization of shiga toxin producing (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in raw yak (*Poephagus grunniens*) milk and milk products [J]. Research in Veterinary Science, 2012, 93(2): 604-610
- [16] Bavaro M F. *E. coli* O157:H7 and other toxigenic strains: the curse of global food distribution [J]. Current Gastroenterology Reports, 2012, 14(4): 317-323
- [17] 杨毓环,林杰.福建省食品污染物监测O157:H7大肠杆菌的调查与分析[J].中国卫生检验杂志,2006,16(1):75-76
- YANG Yu-huan, LIN Jie. The investigation and analysis of *Escherichia coli* O157:H7 in food in Fujian Province [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2006, 16(1): 75-76
- [18] 邢丽萍,杨月清,李萍,等.呼和浩特市食品中大肠埃希氏菌O157:H7污染状况调查[J].疾病监测与控制,2013,7(1): 14-15
- XING Li-ping, YANG Yue-qing, LI Ping, et al. Hohhot city of *Escherichia coli* O157:H7 pollution investigation [J]. Journal of Diseases Monitor and Control, 2013, 7(1): 14-15
- [19] Hiko A, Asrat D, Zewde G. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in retail raw meat products in Ethiopia [J]. The Journal of Infection in Developing Countries, 2008, 2(5): 389-393
- [20] 王君,吴清平,吴克刚,等.蜡样芽孢杆菌ERIC-PCR分子分型方法的建立[J].现代食品科技,2013,29(7): 1696-1701
- WANG Jun, WU Qing-ping, WU Ke-gang, et al. Establishment of ERIC-PCR molecular typing method for *Bacillus cereus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1696-1701