

肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的分子生物学检测及 PCR 检测

党苗苗, 李芳菲, 费楠, 夏秀芳*

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150080)

摘要: 大肠杆菌一些特殊的血清型具有致病性, 肠出血性大肠杆菌是大肠杆菌的一个亚型, 主要致病菌株为 O157:H7, 可引起感染性腹泻, 因能引起人类的出血性肠炎而得名。本文综述了分子生物学检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的研究进展。分子生物学检测是利用抗原抗体特异性结合反应检测各种物质的分析方法, 主要包括酶联免疫吸附法(ELISA)、胶体免疫金层析法以及免疫磁珠分离法(IMS)。PCR 技术检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7, 主要包括常规 PCR 检测、多重 PCR 检测以及实时荧光定量 PCR 检测。这两种方法灵敏度高、特异性强、操作简便、结果准确等优点, 是检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的常用方法。

关键词: 肠出血性大肠杆菌 O157:H7; 分子生物学; PCR

Molecular biology detection and PCR detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

DANG Miao-Miao, LI Fang-Fei, FEI Nan, XIA Xiu-Fang*

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

ABSTRACT: *Escherichia coli* serotypes have some special pathogenic. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a subtype of *E. coli*, the main pathogenic strains of O157:H7. It can cause infectious diarrhea, and named because humans hemorrhagic colitis. This paper reviews the determination of EHEC O157:H7 by molecular biology, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), colloidal gold immune chromatography and immunomagnetic separation (IMS). PCR detection of EHEC O157:H7, including conventional PCR assay, multiplex PCR and real-time quantitative PCR. Both methods have high sensitivity and specificity, and are simple, accurate, and commonly used methods for detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7.

KEY WORDS: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7; molecular biology; PCR

1 引言

大肠杆菌一些特殊的血清型具有致病性, 如肠出血

性大肠杆菌(Enterohemorrhage *Escherichia Coli*, EHEC)是大肠杆菌的一个亚型, EHEC 分为 157、26、111 血清型, 主要致病菌株为 O157:H7, 引起感染性腹泻, 并引起人类的

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD28B02)

Fund: Supported by the National Science & Technology Pillar Program during the 12th Five-year Plan Period (2012BAD28B02)

*通讯作者: 夏秀芳, 副教授, 主要研究方向为食品科学。E-mail: xxfang524@163.com

*Corresponding author: XIA Xiu-Fang, Associate Professor, College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China. E-mail: xxfang524@163.com

出血性肠炎而得名。1982年美国首次报道大肠杆菌 O157:H7 引起出血性肠炎^[1]。1996年日本报告一起学校儿童的暴发疫情^[2]。1999年我国苏皖等地发生了大肠杆菌 O157:H7 感染性腹泻的暴发。2006年美国暴发一起由污染的包装菠菜造成的肠出血大肠杆菌 O157:H7 的暴发^[3]。这些重大事件引起了世界的关注,肠出血大肠杆菌 O157:H7 的有关研究日益增多。

2 肠出血性大肠杆菌 O157:H7

2.1 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 生物学特性

肠出血性大肠杆菌 O157:H7 为革兰氏染色阴性的、有动力、两端钝圆的短杆菌。迟缓发酵山梨醇-麦康凯(SMAC)培养基可作为对 O157:H7 筛选培养基。肠出血性大肠杆菌 O157:H7 抵抗力较强,耐酸和耐低温。肠出血性大肠杆菌 O157:H7 不含有一般肠毒素基因密码,但能产生两种非常强的细胞毒素——志贺氏菌样毒素 Stx I 和 Stx II^[4,5],它能抑制真核细胞的蛋白合成、促进血小板聚集、损伤内皮细胞,与出血性肠炎、溶血性尿毒综合征^[6,7],和血小板减少性紫癜的发生有关^[8]。因此,我国已经将肠出血性大肠杆菌 O157:H7 列为 21 世纪对国人健康卫生有重大影响的 12 种病原微生物之一^[9]。

2.2 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 分布

肠出血性大肠杆菌 O157:H7 广泛分布于自然界中,主要来源可能是土壤、灌溉水、昆虫、牲畜等^[10]。常见于乳制品、肉制品、水果、蔬菜、饮料等食品污染^[11]。没有熟制的饼干面团^[12]、生菜^[13]均能引起该疾病,在猪肉、牛肉及其粪便中分离率较高,对公众健康构成威胁。一些研究表明^[14]大肠杆菌 O157:H7 可在土壤里存活。Haizhen 等^[15]研究发现大肠杆菌 O157:H7 存活时间还与土壤性质如酸碱性和微生物含量以及含氮量等有关。种在有大肠杆菌 O157:H7 的土壤上的一些植物如生菜^[17]会遭受污染。Girardin 等^[18]研究表明污染的土壤可以引起植物病变,当污染的灌溉水飞溅到植株上也会引起污染。

2.3 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 传播途径

肠出血性大肠杆菌的传播途径主要是消化道,感染病菌的牛、猪是主要传染源,还有致病菌污染的水体等。绝大部分患者是进食了污染动物的肉制品、奶制品或者食用动物排泄物污染的食物而被感染。主要临床症状表现为:腹部痉挛性疼痛和短时间的发热、呕吐,1 d~2 d 内出现非血性腹泻或者呈无症状感染等。75%的患者病情不再继续,并在 7 d 左右得到缓解,其余 25%患者在 2 d~3 d 后腹泻可变为血性(无粪质),其他症状有恶心、呕吐、发热等^[19]。主要并发症有血栓形成性血小板减少性紫癜和溶血性尿毒综合征(HUS)。其他少见并发症有窦性心动过缓及惊厥等^[8]。

3 分子生物学检测

分子生物学检测是利用抗原抗体特异性结合反应检测各种物质(药物、激素、蛋白质、微生物等)的分析方法,是食品检验检测中重要方法之一^[20]。主要包括酶联免疫吸附法(ELISA)、胶体免疫金层析法以及免疫磁珠分离法(IMS)。

3.1 酶联免疫吸附法(ELISA)

ELISA 是酶联接免疫吸附剂测定(enzyme-linked immunosorbent assay)的简称。它是以酶标记的抗体、抗原作为主要试剂,结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性,酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性,又保留酶的活性。在检测的时候,测定其中的抗体和抗原与固相载体表面的抗原或抗体起反应。加入酶标抗体或抗原,使抗原抗体特异性结合,形成酶标记的免疫复合物^[21]。经过洗涤,酶标记的免疫复合物不会被洗涤掉,然后加入酶的相应底物后显色,然后便可以定性或定量测定^[22]。吴大成等^[23]使用多克隆抗体作为捕获抗体,将其实验室的 O157 特异性单克隆抗体作为检测抗体,建立了双抗夹心 ELISA 方法。根据此方法得到对于大肠杆菌 O157 纯培养菌液的检测下限约为 1.2×10^5 CFU/mL。但其实际样本中 O157 的含量往往较少,无法达到检测限的要求,提高测试敏感性是必要手段。

3.2 胶体金免疫层析法

胶体金免疫层析技术是以胶体金为标记物的免疫层析方法^[24,25]。到目前为止,制备胶体金溶液已经有很多种,除了经典的 Frens 法,还有最为简单的化学还原法,基本原理是使 Au^{3+} 还原成金原子^[26]。当前的胶体金免疫层析技术是将胶体金标记物与待检物结合受体分别固定,当待测物与胶体金标记物特异结合,经过层析与检测线上的受体结合形成肉眼可见的红色条带,得到检测的目的^[27]。双抗体夹心法检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 为国内外普遍的方法,2006年王静等^[28]利用该方法采用胶体金标记肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的单克隆抗体为捕获抗体,然后与样品中的肠出血性大肠杆菌 O157:H7 结合,就可以形成双抗体夹心结构,呈现出肉眼可见的红色条带。这种方法灵敏度高、特异性强、操作简便、结果准确等优点,并且日趋成熟。

3.3 免疫磁珠分离法(IMS)

免疫磁珠分离法(immunomagnetic separation, IMS)是用特异性抗体包被在磁珠表面上,捕获待检样品中的目标菌后,在外加磁场的吸引下可做定向移动,吸附沉淀与其他杂菌分离,从而达到分离、检测的目的^[29,30]。侯楠楠等^[31]制备一种表面包被肠出血性大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体的纳米级免疫磁颗粒,用于样品中菌体的富集和分离。制备一种表面分别标记有大肠杆菌 O157:H7 多克隆抗

体和生物素化核酸探针的胶体金颗粒, 利用生物素-亲和素-酶系统信号放大作用, 达到对目标菌的快速、灵敏检测。该方法可在 1 h 内完成菌体的分离和检测, 检测限为 10 CFU/mL。王涛等^[32]根据 O157 免疫磁珠特异性捕获样品菌液中大肠杆菌 O157:H7。结合 Real-time PCR 对磁珠捕获菌细胞的 DNA 进行检测分析。Real-time PCR 检测结果显示, 大肠杆菌 O157:H7 可产生荧光信号, 而其他常见致病菌均未见明显荧光信号, 采用 IMS-real-time PCR 方法检测标本, 菌液含菌量为 3.3×10^2 CFU/mL 时即可被检出, 检测全过程需时约 4 h。这种方法快速灵敏, 能提高大肠杆菌 O157:H7 的检出率和准确性, 可应用于食源性疾病的检测。

4 PCR

聚合酶链反应(polymerase chain reaction)简称为 PCR 技术。PCR 技术是指在体外条件下, 以一条单链 DNA 为模板, 在 DNA 聚合酶的作用下, 特异性扩增 DNA 片段的技术, 故又称基因体外扩增法^[33]。主要包括常规 PCR 检测、多重 PCR 检测以及实时荧光定量 PCR 检测。

4.1 常规 PCR 检测

已知肠出血性大肠杆菌 O157:H7 致病性有关的主要基因有志贺毒素基因(*stx*)^[34]、大毒力质粒 Po157 和 LEE 毒力岛等^[35,36]。常规的 PCR 检测法只需设计某个特异性基因片段的一对引物, 扩增后做凝胶电泳, 方法操作复杂, 同时扩增产物易受污染引起结果误差。单一 PCR 检测技术虽然可以对肠出血性大肠杆菌 O157:H7 进行快速检测, 但不能区分细菌的死活, 为了解决这一难题, 常规 PCR 发展到多重 PCR 乃至实时荧光定量 PCR。

4.2 多重 PCR 检测

多重 PCR 检测技术是指同一个反应体系中加入两对或两对以上的引物, 同时扩增多个目的基因或 DNA 序列。多重 PCR 可以扩增一个物种的一个片段也可以同时扩增多个物种的不同片段^[37]。所以很多学者采用多重 PCR 技术, 以志贺毒素基因 *stx1*、*stx2*^[38]、紧密素基因 *eae*^[39]、溶血素基因 *hlyA*、鞭毛基因 *fliCH7*^[40]、脂多糖基因 *rfbO157*^[41]等为目的基因检测肠出血性大肠杆菌^[42]。2009 年吴家林等^[43]建立了能快速、特异检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的多重 PCR 技术。选用针对大肠杆菌 O157 志贺毒素基因 *stx1* 和 *stx2*、溶血素基因 *hlyA* 和 O157 特异性基因(*rfbE*)的 4 对引物, 在同一扩增体系中进行 PCR, 目的是扩增基因片段 348、584、250 和 497 bp。猪肉模拟样品 37 °C 预增菌 4 h 后检测灵敏度能达到 100 CFU/mL。徐义刚等^[44]利用双启动寡核苷酸引物聚合酶链式反应技术检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7, 建立了肠出血性大肠杆菌 O157:H7 DPO-PCR 检测方法, 其检测灵敏度约为 94 CFU/mL。

4.3 实时荧光定量 PCR 检测

实时荧光定量 PCR 检测^[45]是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[46]。陈苏红等^[47]以 *rfbE* 基因作为待检靶基因, 根据复合探针荧光定量分析原理设计检测引物和探针, 建立检测大肠杆菌 O157:H7 的实时荧光定量 PCR 方法。该方法检测的灵敏度可达 10 CFU/mL, 能快速准确、特异、敏感地对大肠杆菌 O157:H7 进行定量分析。李洁莉等^[48]采用荧光定量 PCR 法检测牛奶中肠道致病菌。胡慧等^[49]针对大肠杆菌 O157:H7 的特异基因 *rfbE* 设计一对特异引物, 建立 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法, 并进行灵敏度、重复性和特异性实验, 结果显示所建立的 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法可以快速、特异地检测出大肠杆菌 O157:H7, 细菌纯培养物中其灵敏度可达 2×10^1 CFU/mL, 临床模拟污染肉样中能最低能检测到 1×10^2 CFU/mL 的大肠杆菌 O157:H7。Prithiviraj^[50]等采用荧光定量 PCR 法对饮用水中大肠杆菌 O157:H7 专门识别脂多糖基因(RFBE)进行快速测试。

5 展望

分子生物学检测和 PCR 法是检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 主要应用方法。经过多年的发展研究, 分子生物学检测检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 灵敏度高、特异性强、操作简便、结果准确等优点, 在临床上也有一定的应用, 检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 有很强的优势。PCR 法快速、敏感性和特异性高, 同时需要特异性基因。随着靶基因研究的不断深入和多重 PCR 的应用以及实时荧光定量 PCR 的不断完善, PCR 技术也在检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 方面有很好的应用前景。

参考文献

- [1] Tarr PI. *Escherichia coli* O157:H7 clinical diagnosis and epidemiological aspects of human [J]. Infection, 1995, 20 (1): 1-10.
- [2] Haruo W, Akihito W, Yoshishige I, et al. Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan, 1996 [J]. The Lancet. 1996 (9030).
- [3] Arthur MW, Diep HJ, Umid S, et al. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August-September 2006: the Wisconsin investigation [J]. Clin Infect Dis, 2009, 48 (8): 1079-1086.
- [4] Rowaida KSK, Mohamed AEG, Mahmoud IK. Detection of Shiga-toxin Producing *E.coli* (STEC) in Leafy Greens Sold at Local Retail Markets in Alexandria, Egypt [J]. Int J Food Microbiol, 2014, 197: 58-64.
- [5] 黄明明, 曾晓燕, 史凤娟, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 志贺毒素 I 型 A 亚基的表达与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 2: 121-124. Huang MM, Zeng XY, Shi FJ, et al. expression and identification of enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7 Shiga toxin type A subunit I [J]. J Cell Mol Immunol, 2014, 2: 121-124.

- [6] Thomas B. Haemolytic uraemic syndrome during *Shigellosis* [J]. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, 2012, 106(7): 395–399
- [7] Bidet P, Mariani KP, Grimont F, *et al*. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France [J]. *J Med Microbiol*, 2005, 54(1): 71–75.
- [8] 王培育, 周梅. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 检测技术进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 19: 2570–2572.
Wang PY, Zhou M. Detection Technology Progress of enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7 [J]. *Int J Lab Med*, 2013, 19: 2570–2572.
- [9] 陈雅君, 王亚宾, 张莉娟, 等. 动物源性肠出血性大肠杆菌 O157:H7 及其 3 个毒力基因的多重 PCR 快速检测研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 07: 686–691.
Chen YJ, Wang YB, Zhang LJ, *et al*. Multiplex PCR for rapid detection of animal *EHEC O157:H7* and three virulence genes [J]. *Chin J Zoonoses*, 2013, 07: 686–691.
- [10] 山珊, 赖卫华, 陈明慧, 等. 农产品中大肠杆菌 O157:H7 的来源及分布研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 1: 289–293.
Shan S, Lai WH, Chen MH, *et al*. Agricultural products in *E.coli* O157:H7 in the source and distribution of research progress [J]. *Food Sci*, 2014, 1: 289–293.
- [11] 刘程, 刘芳, 刘菁, 等. 出血性大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体制备及免疫胶体金试纸条的研制[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 5: 199–205.
Liu C, Liu F, Liu Q, *et al*. Enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7 monoclonal antibody preparation and development of immune colloidal gold test strip [J]. *Food Ferment Ind*, 2014, 5: 199–205.
- [12] Neil KP, Biggerstaff G, MacDonald JK, *et al*. A novel vehicle for transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to humans: multistate outbreak of *E.coli* O157:H7 infections associated with consumption of ready-to-bake commercial prepackaged cookie dough--United States, 2009 [J]. *Clin Infect Dis*. 2012, 54(4): 511–518.
- [13] Slayton RB, Turabelidze G, Bennett SD, *et al*. Out break of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 associated with romaine lettuce consumption, 2011 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55300.
- [14] Erickson MC, Webb CC, Diazperez JC, *et al*. Infrequent internalization of *Escherichia coli* O157:H7 into field grown leafy greens [J]. *J Food Protect*, 2010, 73 (3): 500–506.
- [15] Wang HZ, Ibekwe AM, Jincai M, *et al*. A glimpse of *Escherichia coli* O157:H7 survival in soils from eastern China [J]. *Sci Total Environ*, 2014, 47(6): 49–56.
- [16] Wang HZ, Gang W, Yao ZY, *et al*. Response of *Escherichia coli* O157:H7 survival to pH of cultivated soils [J]. *J Soil Sediment*, 2014, 14(11): 1841–1849.
- [17] Linden IV, Cottyn B, Uyttendaele M, *et al*. Long-term survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on butterhead lettuce seeds, and their subsequent survival and growth on the seedlings [J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 161 (3): 214–219.
- [18] Girardin H, Morris CE, Albagnac C, *et al*. Behavior of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 54(2): 287–295.
- [19] 朱蓓. 肠出血性大肠杆菌感染的流行病学及临床医学资料概述[J]. *解放军预防医学杂志*, 2011, 4: 309–311.
Zhu B. Enterohemorrhagic *E.coli* infection epidemiology and clinical data overview [J]. *J Pre Med Chin PLA*, 2011, 4: 309–311.
- [20] 赵杰文, 孙永海. 现代食品检测技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008.
Zhao JW, Sun YH. Modern food testing technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2008.
- [21] 曾亮明, 徐磊, 王玉玲, 等. 猪血清中牛病毒性腹泻病毒抗体 ELISA 检测方法的建立与应用[J]. *中国兽医科学*, 2014, 9: 944–950.
Zeng ML, Xu L, Wang YL, *et al*. The establishment and application of bovine viral diarrhea virus antibody ELISA for detection of porcine serum [J]. *Chin J Vet Sci*, 2014, 9: 944–950.
- [22] 张也, 刘以祥. 酶联免疫技术与食品安全快速检测[J]. *食品科学*, 2008, 24 (8): 200–204.
Zhang Y, Liu YX. ELISA technology and food safety rapid detection [J]. *Food Sci*, 2008, 24 (8): 200–204.
- [23] 吴大成, 孙洋, 袁洁, 等. 双抗夹心 ELISA 检测肠出血性大肠杆菌 O157 方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2011, 12: 1745–1748.
Wu DC, Sun Y, Yuan J, *et al*. Double-antibody sandwich ELISA for the detection of EHEC O157 established methods [J]. *Chin J Vet Sci*, 2011, 12: 1745–1748.
- [24] 樊淑华, 王永立. 胶体金免疫层析技术应用研究进展[J]. *动物医学进展*, 2014, 10: 99–103.
Fan SH, Wang YL. Research Progress Immunochromatography colloidal gold [J]. *Prog Vet Med*, 2014, 10: 99–103.
- [25] 徐超莲, 赖卫华, 刘道峰. 胶体金免疫层析法检测食品中天然存在的危害物质的研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 5: 257–261.
Xun CL, Lai WH, Liu DF. Advances in food naturally occurring hazardous substances detection GICA method of food [J]. *Food Sci*, 2014, 5: 257–261.
- [26] 任娟. 胶体金免疫层析技术研究现状及进展[J]. *新疆畜牧业*, 2011, 12: 22–24.
Ren J. colloidal gold immune chromatography technology status and research progress [J]. *Xinjiang Anim Husbandry*, 2011, 12: 22–24.
- [27] 谢世琦. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 胶体金检测试纸条的研制及其应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
Xie SQ. EHEC O157: H7 colloidal gold test strip of research and its application [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013.
- [28] 王静, 陈维娜, 胡孔新, 等. 大肠杆菌 O157 胶体金免疫层析快速筛查方法的建立[J]. *卫生研究*, 2006, 4: 439–441.
Wang J, Chen WN, Hu KX, *et al*. *E.coli* O157 establish GICA rapid screening method [J]. *Health Res*, 2006, 4: 439–441.
- [29] Yang H, Qu LW, Adrienne NW, *et al*. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* to genes by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR [J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 118: 132–138.
- [30] 崔希, 熊齐荣, 熊勇华, 等. 免疫磁分离结合胶体金免疫层析法快速检测大肠杆菌 O157:H7[J]. *分析化学*, 2013, 12: 1812–1816.
Cu X, Xiong QR, Xiong YH, *et al*. Combined immune magnetic separation GICA rapid detection of *E. coli* O157:H7 [J]. *Anal Chem*, 2013, 12: 1812–1816.
- [31] 侯楠楠, 谏志强, 金敏, 等. 基于功能化纳米粒子的大肠杆菌 O157:H7 检测技术研究[J]. *环境与健康杂志*, 2010, 5: 410–412.
Hou NN, Zhan ZQ, Jin M, *et al*. Detection Technology study of *E.coli* O157:H7 based on functional nanoparticles [J]. *J Environ Health*, 2010, 5: 410–412.

- [32] 王涛, 刘凯, 王艳, 等. 应用免疫磁珠分离法及荧光定量 PCR 技术快速检测肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 [J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 4: 291-293+315.
Wang T, Liu K, Wang Y, *et al.* Application of immunomagnetic separation and quantitative PCR for rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Chin J Zoonoses*, 2011, 4: 291-293+315.
- [33] 方平. PCR 技术在食源性致病微生物快速检测中的应用[J]. 中国食品工业, 2006, 11: 44-46.
Fang P. PCR technology for rapid detection of foodborne pathogenic microorganisms in the application [J]. *Chin Food Ind*, 2006, 11: 44-46.
- [34] Hassan M, Farhad SD, Ebrahim R, *et al.* Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in ruminant's meat [J]. *Meat Sci*, 2013, 9(5): 381-388.
- [35] Hermos CR, Janineh M, Han LL, *et al.* Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in children: diagnosis and clinical manifestations of O157:H7 and Non-O157:H7 infection [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 4(9): 955-959.
- [36] Wang P, Xiong YW, Lan R, *et al.* O157-sal, a novel conjugative plasmid detected in out break isolates of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(4): 1594-1597.
- [37] 邓紫筠. 多重 PCR 检测技术在食品微生物检测中的应用[J]. 生物技术世界, 2013, 1: 69-70.
Deng ZJ. Multiplex PCR technique for detection of microbes in food [J]. *Bio Tech world*, 2013, 1: 69-70.
- [38] 白向宁, 王红, 赵爱兰, 等. 食源性产志贺毒素大肠杆菌的分离及菌株特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 4: 312-317.
Bai XN, Wang H, Zhao AL, *et al.* Isolated and strains characterized analysis of foodborne *E. coli* Shiga toxin [J]. *Chin J Food Hyg*, 2014, 4: 312-317.
- [39] 罗玲, 苟妙, 罗青平, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 *eae* 基因原核表达及间接 ELISA 的初步建立[J]. 湖北农业科学, 2014, 14: 3423-3426.
Luo L, Gou M, Luo QP, *et al.* Initially established EHEC O157:H7 *eae* prokaryotic expression and indirect ELISA [J]. *Hubei Agric Sci*, 2014, 14: 3423-3426.
- [40] 陈道利, 许彦梅, 罗霞, 等. PCR 方法检测 EHEC O157:H7 的 *rfb*_{O157}, *fliC*_{H7}, *hlyA*, *eaeA*, *stx2* 及其变种基因[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 10: 1197-1200.
Chen DL, Xu YM, Luo X, *et al.* PCR method to detect *rfb*_{O157}, *fliC*_{H7}, *hlyA*, *eaeA*, *stx2* gene and its variants of EHEC O157:H7 [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2005, 10: 1197-1200.
- [41] 林杰, 郭维植, 徐海滨, 等. 福建省 O157 大肠杆菌的 *rfb* 及 *fliC* 基因的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 3: 244-246.
Lin J, Guo WZ, Xu HB, *et al.* The study of *E. coli* O157 *rfb* and *fliC* gene in Fujian Province [J]. *Chin J Zoonoses*, 2004, 3: 244-246.
- [42] 陈诺, 唐善虎, 岑璐伽, 等. 多重 PCR 技术在食品微生物检测中的应用进展[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 10: 72-75.
Chen N, Tang SH, Cen LJ, *et al.* Progress multiplex PCR technique for detection of microbes in food [J]. *China Anim Husb Vet*, 2010, 10: 72-75.
- [43] 吴家林, 肖勇, 凌霞, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 多重 PCR 快速检测研究[J]. 现代预防医学, 2009, 1: 117-119.
Wu JL, Xiao Y, Ling X, *et al.* Multiplex PCR rapid detection of EHEC O157:H7 [J]. *Mod Pre Med*, 2009, 1: 117-119.
- [44] 徐义刚, 李丹丹, 崔丽春, 等. 应用 DPO-PCR 技术检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7[J]. 食品科学, 2014, 8: 160-164.
Xu YG, Li DD, Cui LC, *et al.* Application of DPO-PCR technique to detect EHEC O157:H7 [J]. *Food Sci*, 2014, 8: 160-164.
- [45] Rovai M, Caja G, Salama AAK, *et al.* Identifying the major bacteria causing intramammary infections in individual milk samples of sheep and goats using traditional bacteria culturing and real-time polymerase chain reaction[J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(9): 5395-5400.
- [46] 徐志勇, 龙荣, 杨勇, 等. 实时荧光定量 PCR 检测幼儿腹泻腺病毒[J]. 微循环杂志, 2014, 01: 30-31+34.
Xu ZL, Long R, Yang Y, *et al.* Real-time PCR detection of early childhood diarrhea adenovirus [J]. *J Micro*, 2014, 01: 30-31+34.
- [47] 陈苏红, 张敏丽, 张政, 等. 复合探针实时荧光 PCR 检测大肠杆菌 O157:H7[J]. 解放军预防医学杂志, 2005, 6: 403-405.
Chen SH, Zhang ML, Zhang Z, *et al.* Composite probe real-time PCR detection of *E. coli* O157: H7 [J]. *J Pre Med Chin PLA*, 2005, 6: 403-405.
- [48] 李洁莉, 钱凯, 周晓薇, 等. 荧光定量 PCR 法与常规 PCR 法检测牛奶中肠道致病菌的比较[J]. 食品科技, 2009, 10: 273-277.
Li JL, Qian K, Zhou XW, *et al.* Fluorescence quantitative PCR method with conventional PCR method to detect the intestinal pathogenic bacteria in milk [J]. *Food Sci Technol*, 2009, 10: 273-277.
- [49] 胡慧, 陈雅君, 段志刚, 等. 大肠杆菌 O157:H7 特异基因的实时荧光定量 PCR 检测[J]. 食品科学, 2011, 12: 278-282.
Hu H, Chen YJ, Duan ZG, *et al.* Real-time quantitative PCR detection of *E. coli* O157:H7 specific genes [J]. *Food Sci*, 2011, 12: 278-282.
- [50] Prithiviraj J, Jothikumar N, Vincent RH. Visual endpoint detection of *Escherichia coli* O157:H7 using isothermal Genome Exponential Amplification Reaction (GEAR) assay and malachite green [J]. *J Microbiol Meth*, 2014, 9(8): 122-127.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



党苗苗, 硕士, 主要研究方向为畜产品加工。

E-mail: 1053250106@qq.com



夏秀芳, 副教授, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: xxfang524@163.com