

## 大肠埃希菌 O157:H7 分离鉴定及毒素基因多重 PCR 检测

李刚山<sup>1</sup>, 王意银<sup>1</sup>, 邓波<sup>1</sup>, 古良琪<sup>1</sup>, 张超雄<sup>1</sup>, 王惠萱<sup>2</sup>, 张琳<sup>1</sup>, 张向容<sup>1</sup>, 杨川莉<sup>1</sup>, 王承珠<sup>1</sup>,  
周奕帆<sup>1</sup>, 张雪莲<sup>1</sup>, 朱妹媛<sup>3</sup>, 朱琼媛<sup>4</sup>, 侯敏<sup>5</sup>, 刘德华<sup>6</sup>, 周丽华<sup>7</sup>, 周卫国<sup>1</sup>, 覃敏<sup>1</sup>, 邱薇<sup>1</sup>, 范泉水<sup>1\*</sup>

**摘要** **目的** 了解大肠埃希菌 O157:H7(EHEC O157:H7)在云南战区感染性腹泻患者及猪粪便中检出情况。**方法** 将标本接种 mEC 增菌液中增菌, 免疫磁珠磁珠富集后, 分别接种科玛嘉显 O157 显色琼脂和山梨醇麦康凯 (S-MAC) 琼脂平板培养, MUG 初筛, 肠杆菌科细菌生化鉴定编码系列(API-20E)和 VITEK32 全自动微生物生化分析仪鉴定。应用多重 PCR 扩增检测志贺毒素 1、2(SLT1/SLT2)和侵袭相关基因。小白鼠腹腔注射法测定其毒力。K-B 法做抗生素药敏试验。**结果** 从腹泻患者和猪中均检出 EHEC O157:H7, 具有志贺毒素 SLT1/SLT2 和侵袭相关基因的三个毒素基因。毒力试验使小白鼠发病死亡。药敏试验对 14 种抗生素敏感。**结论** 云南战区存在 EHEC O157:H7 感染。建立和优化多重 PCR 方法, 能快速、敏感特异的检测 EHEC O157:H7 毒素基因, 为重大食源性疾病处理、诊治及流行病学调查提供了强有力的技术手段。

**关键词** 大肠埃希菌 O157:H7; 免疫磁珠; 多重 PCR; 毒素基因

**中图分类号** R378.21 **文献标识码** A **文章编号** 1009-9727(2011)12-1431-03

**Identification of O157:H7 of *Escherichia coli* and detection of toxin gene by multiple PCR.** LI Gang-shan, WANG Yi-gen, DENG Bo, et al. (Chengdu Military Garrison Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 650032, Sichuan P. R. China, Corresponding author: FAN Quan-shui, E-mail: fqs168@126.com)

**Abstract** **Objective** To identify the the existence of O157:H7 of *Escherichia coli* in infective diarrheal patients in Yunan area and detect the toxin gene and drug resistance of enteric hemorrhagic *E.coli* (EHEC). **Methods** The specimens were enriched in enrichment culture and inoculated with CHROM agar medium and orbital macConkey agar after enriched with immunomagnetic beads, screened with MUG, then identified by biochemical identification coding system(API-20E)and VITEK32 automatic microbiological biochemical analyzer. Three toxic genes including Shigella toxin I and II(SLT1/SLT2)and invasive relevant genes could be simultaneously detected after amplified by multiple PCR. The virulence was determined in mice by peritoneal injection. While the drug sensitivity test was completed using K-B method. **Results** EHEC O157:H7 possessing three toxic genes were detected from diarrheal patients and pigs. The mice died of virulence test. The results of drug sensitivity test showed that the pathogens were sensitive for 14 antibiotics. **Conclusion** There were EHECO157H7 and multiple PCR allowed rapid specific and sensitive detection of toxic genes of EHECO157H7 to have offered a powerful technique.

**Key words:** O157:H7 of *Escherichia coli*; Immunomagnetic bead; Multiple PCR; Toxin gene

大肠埃希菌 O157:H7(entero-hemorrhagic *E.coli* O157H7, EHEC O157:H7)是 1982 年被发现并认识的一种新的病原菌<sup>[1]</sup>, 感染剂量低, 食入小于 5 个就能引起人体发病<sup>[2,3]</sup>。在美洲、欧洲和亚洲的日本等地均发生过起由 EHEC O157:H7 引起重大食源性疾病暴发事件<sup>[4]</sup>, 该菌除引起出血性结肠炎等肠道疾病外, 还能引起溶血性尿毒综合征及脑症等并发症, 死亡率高, 世界卫生组织将其列为人类新出现的传染病之一。EHEC O157:H7 的感染已成为全球性的公共卫生问题, 无论在发达国家还是在发展中的国家, 都受到广泛关注。国内自 1987 年以来, 在新疆、北京、江苏、山东、河南、安徽等地均发生了 EHEC

O157:H7 的散发病例<sup>[5]</sup>, 目前, 虽尚无暴发流行的报道, 但不排除小型暴发或潜在暴发流行的可能性, 为了解 EHEC O157:H7 在云南战区的感染情况, 近年来, 我们对在该战区采集的 1040 份腹泻患者以及 160 份猪粪便进行多种病原微生物检测时, 从 1 例腹泻患者和 2 份猪粪便中分离出 EHEC O157:H7 3 株(编号: 菌 1 是人源株, 菌 2、菌 3 是猪源株), 对其进行了鉴定, 并做毒素基因检测及毒力试验和药敏试验分析。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集云南战区腹泻病人粪便 1040 份及屠宰

基金项目: 国家“十一五”科技重大专项研究课题(No.2009ZX10004-205), 成都军区“十一五”计划课题面上 B 类项目(No.MB09034)

作者单位: 1.成都军区疾病预防控制中心, 云南 昆明 650032; 2.成都军区昆明总医院, 云南 昆明 650032; 3.成都军区第三门诊部, 云南 昆明 650032; 4.云南省第二人民医院, 云南 昆明 650031; 5.昆明市疾病预防控制中心, 云南 昆明 650034; 6.昆明市第一人民医院, 云南 昆明 650000; 7.云南省林业医院, 云南 昆明 650224

作者简介: 李刚山(1953~), 男, 副主任医师, 主要从事腹泻病原菌研究。

\* 通讯作者: E-mail: fqs168@126.com

场猪粪便 160 份。

1.1.2 试剂及仪器 科玛嘉显 O157 显色培养基购自郑州博赛生物技术股份有限公司,mEC 肉汤、山梨醇麦康凯(S-MAC)、克氏双糖铁和 MUG 培养基购自广东环凯生物科技有限公司;肠杆菌科细菌生化鉴定编码系列(API-20E)系法国生物梅里埃公司产品;免疫磁珠购自宁波新芝生物技术股份有限公司;大肠埃希菌 O157 诊断血清和 H7 诊断血清均购自宁波天润生物药业有限公司。系统生化鉴定采用法国生物梅里埃肠杆菌科细菌生化鉴定编码系列(API-20E)和 VITEK32 全自动微生物生化分析仪 GNI+卡。

1.2 方法

1.2.1 增菌培养及免疫磁珠富集 取粪便标本置于 mEC 增菌液中,37℃增菌 14h 左右,取 1ml 增菌液和 20μl 大肠埃希菌 O157 免疫磁珠磁珠混合 30min,捕获靶细菌,沉淀,用 PBS 缓冲液洗涤 2 次。

1.2.2 分离培养 用免疫磁珠磁珠富集了细菌的 100μl PSB 免疫磁珠复合物,涂布于 O157 显色琼脂平板和 S-MAC 琼脂平板上,37℃培养 18~24h。

1.2.3 生化试验和血清学鉴定 挑取 O157 显色琼脂平板上浅红色至浅紫色、中心灰褐色及 S-MAC 琼脂平板上的不发酵山梨醇、无色透明之菌落,与 O157 诊断血清和 H7 诊断血清做玻片试验,阳性者转种于克氏双糖铁琼脂斜面上,进行纯培养和初步生化鉴定,如符合大肠埃希菌反应,再用 O157 和 H7 诊断血清做凝集反应,并转种 MUG 培养基,37℃培养 8h 左右,于 365nm 紫外灯光下观察有无靛蓝色荧光,如无靛蓝色荧光者则为 MUG 阴性反应,疑为 EHEC O157:H7,先用肠杆菌科细菌生化鉴定编码系列(API-20E)进行鉴定,再用 VITEK32 全自动微生物生化分析仪复核鉴定。

1.2.4 毒素基因多重 PCR 检测 生化反应和血清学试验确定为 EHEC O157:H7 的菌株,接种于 L-B 肉汤中,37℃振荡培养 6h,取肉汤培养物 200μl 于 1.5ml 离心管中,用玻璃粉吸附法提取 DNA 模板。分别根据针对大肠埃希菌 O157 的基因毒素(SLT1、SLT2 和侵袭相关基因)设计了三对引物,采用多重 PCR 扩增法,于反应体系 95℃预变性 5min,94℃变性 20s,58℃退火 20s,72℃延伸 20s,35 个循环,最后 72℃延伸 5min,反应体积 30μl,电泳检测。

1.2.5 毒力试验 取 15~18g 健康小白鼠(购自昆明医学院实验动物中心)雌雄兼用,随机分成试验组和对照组,每组 5 只,试验组注射分离菌肉汤培养物,每只 0.5ml,观察小白鼠发病死亡情况,对照组同法注射无菌肉汤,观察 7d。

1.2.6 药敏试验 采用 WHO 推荐的改良 K-B 纸片法。药敏纸片系北京天坛生物技术公司产品,在有效期内使用。

2 结果

2.1 菌株形态 分离的 3 株菌株均为革兰阴性杆菌,无芽胞,无荚膜。在科玛嘉 O157 显色培养基上,经 37℃培养 18~24h,菌落呈浅紫色、中心灰褐色、圆形、直径 1.5~2mm,在 S-MAC 上,光滑湿润、扁平、透明、大小约 2mm。

2.2 生化反应 在双糖铁琼脂斜面上,能迅速分解葡萄糖产酸产气,靛基质、甲基红阳性,V-P、枸橼酸盐阴性,有动力,MUG 阴性。VITEK32 全自动微生物生化分析仪系统鉴定,97%的鉴

定值为 EHEC O157:H7。

2.3 血清学 3 株菌均与大肠埃希菌诊断 O157 血清和 H7 诊断血清发生凝集反应,生理盐水对照阴性。

2.4 毒力基因检测 分离的 3 株(菌 1、菌 2、菌 3)EHEC O157:H7,均检出 3 个毒素基因,即志贺毒素 1、2(SLT1/SLT2)和侵袭相关基因,扩增片段大小分别为 321bp、571bp、1089bp,见图 1。

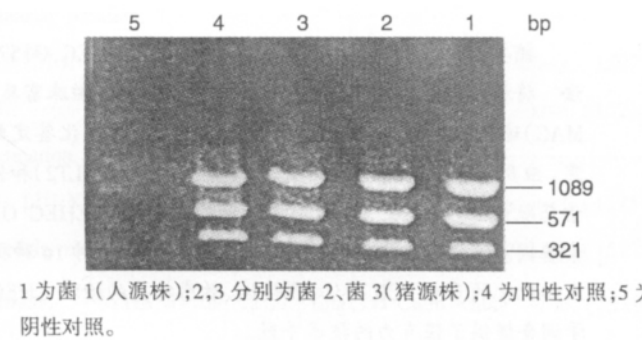


图 1 分离菌 EHEC O157:H7 多重 PCR 检测结果

2.5 毒力试验 实验组感染小白鼠后,13h 左右开始发病,其症状为双眼半闭、耸毛、食欲不振、呼吸急促、运动迟缓,48h 之内相继死亡。解剖死亡的小白鼠,发现肠腔内有大量积液,取积液和肠内容物做细菌培养,经鉴定仍获原感染菌。对照组小白鼠观察 7d 仍非常活跃。

2.6 药敏试验 对分离菌所试的 16 种抗菌药物中,对 14 种敏感,2 种耐药,见表 1。

表 1 分离的 EHEC O157:H7 药敏试验结果

抗 生 素	纸片含量 (μg)	敏 感 度	抗 菌 素	纸片含量 (μg)	敏 感 度
头孢唑啉	30	S	复方新诺明	25	S
头孢噻吩	30	S	庆大霉素	10	S
头孢氨苄	30	S	妥布霉素	10	S
头孢曲松	30	S	呋喃唑酮	300	S
诺氟沙星	10	S	多粘菌素 B	300	S
环丙沙星	5	S	呋喃妥因	300	S
氧氟沙星	5	S	氨苄西林	10	R
卡那霉素	30	S	乙酰螺旋霉素	15	R

注 R 耐药 S 敏感

3 讨论

新发现的病原微生物和重新抬头的病原微生物,是当今医学界面临的一个新课题,EHEC O157:H7 就是其中之一。此菌在世界范围内发生过多次暴发,造成严重危害。虽然我国未发生 EHEC O157:H7 暴发流行,但国内已有十多个省市从腹泻患者及猪、牛等动物粪便标本和食品、蔬菜中分离到此菌,存在潜在暴发流行的可能性。本次监测,分离到 3 株 EHEC O157:H7,其中 1 株自腹泻患者粪便中分离,另 2 株分离自猪粪便。追踪调查,患者在发病的前一天,在农贸市场买了猪肉卤制品,就餐前未加热,食后发生腹泻,先是水样便,后呈血样便。研究结果表明,我们从腹泻病人检出的 EHEC O157:H7 与猪粪便中检出的是同污染源株,故分析认为,导致该患者腹泻的原因是进食了被 EHEC O157:H7 污染的猪肉卤制品。

本次分离的 EHEC O157:H7 采用较先进的免疫磁珠富集法,将富集了细菌的免疫磁珠复合物,同时接种于 O157 显色琼

Mmp-1 和 Hif-1 $\alpha$  在喉癌组织中的表达刘春丽<sup>1</sup>, 张圣林<sup>1</sup>, 刘吉娜<sup>1</sup>, 石新华<sup>1</sup>, 刘双<sup>1</sup>, 王淑萍<sup>1</sup>, 胡俊兰<sup>2\*</sup>

**摘要** **目的** 研究基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, Mmp-1)和缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (Hypoxia inducible factor-1  $\alpha$ , Hif-1 $\alpha$ )蛋白在喉癌组织中的表达,探讨二者在喉癌发生发展中的作用及两者的相关性。**方法** 应用免疫组化法(SP法)检测 34 例喉癌组织、癌旁正常组织、15 例声带息肉组织中 Mmp-1、Hif-1 $\alpha$  的表达。**结果** ① Mmp-1、Hif-1 $\alpha$  蛋白在喉癌组织中的表达明显高于癌旁组织和息肉组织( $P<0.01$ )。癌旁组织和息肉组织间的表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。② Mmp-1、Hif-1 $\alpha$  的表达与肿瘤病理分级、临床分期、淋巴结转移有关( $P<0.05$ ),与患者的性别、年龄、吸烟量、肿瘤大小、临床分型无关( $P>0.05$ )。③ Mmp-1、Hif-1 $\alpha$  在喉癌中的表达水平呈正相关。**结论** Mmp-1 和 Hif-1 $\alpha$  在喉癌组织中的高表达与喉癌的发生、发展有关,对判断喉癌的恶性程度、病情进展有重要价值。

**关键词** 喉肿瘤; Mmp-1; Hif-1 $\alpha$ ; 免疫组化

**中图分类号** R739.65 **文献标识码** A **文章编号** 1009-9727(2011)12-1433-03

**Expression of matrix metalloproteinase-1 and hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  in laryngeal carcinoma tissue and the clinical significance.** LIU Chun-li, ZHANG Sheng-lin, LIU Ji-na et al. (1. Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, 067000, Hebei, P. R. China; Corresponding author: Hu Junlan, E-mail: lchl9245@sina.com)

**Abstract** **Objective** To investigate the expression of matrix metalloproteinase-1 (Mmp-1) and hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ ) in laryngeal carcinoma and discuss their relevance and the roles in carcinogenesis and development of laryngeal carcinoma. **Methods** Immunohistochemical technique was used to detect the expression of Mmp-1 and Hif-1 $\alpha$  protein in 34 tissues of laryngeal carcinoma and 34 para-carcinoma normal tissues, 15 cases of vocal cord polyps. **Results** The expression of Mmp-1 and Hif-1 $\alpha$  protein in laryngeal carcinoma tissues is obviously higher than that in para-carcinoma and in vocal cord polyps respectively ( $P<0.01$ ). There was no significant difference between the expression of para-carcinoma and vocal cord polyps ( $P>0.05$ ). The expression of Mmp-1 and Hif-1 $\alpha$  protein was not related to patients' age and sex, smoking history, tumor size, clinical classification ( $P>0.05$ ), but to the pathological grade, clinical stage and lymph nodes metastasis ( $P<0.05$ ). There was a positive correlation between the expression of Mmp-1 and Hif-1 $\alpha$  in laryngeal

基金项目 承德市科委课题(No.201121131)

作者单位 1. 河北承德医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 河北 承德 067000; 2. 河北医科大学第四医院耳鼻咽喉头颈外科, 河北 石家庄 050011

作者简介 刘春丽(1977~)女, 主治医师, 主要从事耳鼻咽喉科学的临床与教学。

\* 通讯作者 E-mail: lchl9245@sina.com

脂平板和 S-MAC 琼脂平板进行分离, 用快速 MUG 试验进行筛查, 并用先进的 VITEK32 全自动微生物生化分析仪鉴定, 极大的提高了该菌鉴定的准确性。据资料<sup>[4]</sup>报道, MUG 试验阴性的菌株, 能产生 Vero 毒素(志贺毒素)。我们使用自己建立并优化的多重 PCR, 对该分离菌进行毒素基因检测, 结果均检出 SLT1、SLT2 和侵袭相关基因, 与资料报道一致。本研究建立的 EHEC O157:H7 多重 PCR 检测方法, 具有快速、简便、耗时短、特异和敏感性高等优点, 为重大食物中毒疫情处理、诊治及流行病学调查提供了具有实际应用价值和广阔应用前景的技术手段。

为验证我们分离的 EHEC O157:H7 是否为有毒力的菌株, 我们做了小白鼠毒力试验, 结果能使小白鼠发病死亡, 说明该分离菌具有较强的毒力。所做的药敏试验可为军队和地方治疗 EHEC O157:H7 的感染提供重要依据。

## 参考文献:

- [1] Riley L W, Remis R S, Helgerson S D et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype [J]. N Engl J Med, 1993, 308: 681-685.
- [2] 吴家林, 肖勇, 凌俊, 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, 36(1): 117-119.
- [3] Feng P. Escherichia coli serotype O157:H7 [J]. Emerging Infect Dis, 1995, 2: 47.
- [4] 聂青和. 感染性腹泻 [M]. 第 1 版, 北京: 人民卫生出版社, 2000, 323-339.
- [5] 于恩庶. 肠出血性大肠杆菌感染 [M]. 新发现的传染病. 福州: 福建教育出版社, 1997, 6-19.

收稿日期 2011-06-24 编辑 符式刚