

· 新技术 · 新方法 ·

# 快速检测大肠杆菌 O157 菌株在流行病学上的应用

俞顺章 卢林耿 张幼辰 卫国荣

O157 大肠杆菌是致泻性大肠杆菌的一种主要血清型,能引起人类出血性腹泻,在儿童和老年患者中可能并发溶血性尿毒症和紫癜而受到重视。自从1982年首次从食用牛肉汉堡包而导致出血性腹泻患者粪便和汉堡包中分离到此菌后,相继在美国、英国、加拿大、德国和日本发生多次由 O157 菌株引起腹泻的爆发和流行。如美国每年有 2 万多人感染,30 多起爆发;1996 年日本发生上万儿童感染,19 人死亡。我国 1988 年首次报告 O157 感染的病例。为进一步搞清我国 O157 菌株的流行情况,必须建立一套快速、灵敏、特异的检测方法。

一、快速筛检 O157 菌株试纸:用自行研制的 MUG(四甲基伞形酮- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷)和 G(四甲基伞形酮- $\beta$ -D-半乳糖苷)两种试纸联合检测 O157 菌株及一般大肠杆菌(E. coli ATCC35218)。O157 菌为 G 试纸阳性, MUG 试纸阴性。而一般大肠杆菌 G 试纸阳性,但 MUG 试纸为阳性。这说明上述两种菌均属大肠杆菌,但 O157 株虽存在 uidA 基因,能编码翻译 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶,但无活性,所以不能水解 MUG 产生荧光。用上述两种滤纸条 1~3 小时即可见结果,并可代替吲哚试验。其他非大肠杆菌如鸡沙门氏菌、鼠伤寒杆菌、绿脓假单胞菌、白色念珠菌和金黄色葡萄球菌均不能分解 G 和 MUG。

二、用 PCR 技术检测 O157 菌株志贺样毒素(VT):用 MK1(5'-TTTACGATAGACTTCTCTGAC3')和 MK2(5'-CACATATAATTAATTCGCTC3')在 DNA 扩增仪上循环 35 次。O157 产毒株可扩增出 224bp 的特异条带,而 O157 非产毒株、一般大肠菌、沙门氏菌和白色念珠菌均为阴性。

三、免疫磁珠(IMS)分离 O157 菌:由于粪便中含有不同种属大肠杆菌,增菌或山梨醇-麦康凯琼脂(SMAC)上均有相当多的杂菌,应用包裹在磁珠

上的大肠杆菌 O157 株特异性抗体与增菌液中 O157 菌株作用,然后用磁板将免疫磁珠沉淀,使 O157 菌株分离。我们曾用此方法检测牛肉 103 份、猪肉 103 份、羊肉 73 份和腹泻标本 133 份,结果在牛肉中检出 4 份 O157 菌,而传统方法只查到 2 份。

四、应用 Chromagar<sup>®</sup> 琼脂检出 O157 菌:该琼脂是一种商品。凡 O157 菌培养后呈紫红色,一般大肠杆菌呈蓝色,鸡沙门氏菌呈浅紫红色,鼠伤寒杆菌、白色念珠菌、绿脓假单胞菌呈无色集落。菌落颜色持久,4℃冰箱中数月不变。

五、用脉冲场电泳(PFGE)进行基因分析:用低熔点琼脂糖对 6 株大肠菌 O157 菌株进行包埋、蛋白酶 K 消化、xbaI 酶切后,进行 PFGE 分析。结果显示从上海牛肉中分离的 4 株 O157 散发株和 2 株 O157 产毒和不产毒标准株的 PFGE 图谱有明显差别,不同条带数超过 4~6 条以上。提示各受试菌株相互独立,并非同一来源。

六、大肠杆菌 O157 菌株快速检测流程的建立:检样为每克含 25ml 食品样品或 5~10g 粪便,置于含有新生霉素的增菌液中(37g 增菌培养基加 1 000ml 重蒸水),摇匀后,121℃高压灭菌 15 分钟,冷却后加 10% 新生霉素 PBS 溶液 200 $\mu$ l,摇匀分装。

37℃温浴 6 小时后用免疫磁珠捕获,接种到含先锋霉素(1mg/ml, 50 $\mu$ l)和亚硫酸钾(50mg/ml, 50 $\mu$ l)混匀后制成的山梨醇-麦康凯培养基(CT-SMAC)平板上,培养 37℃ 18~24 小时。挑选可疑菌落接种到下述两个对象上:一部分可疑集落接种到含 MUG 和 G 试条的试管中(内含灭菌的 PBS 2ml),37℃ 3 小时后在 365nm 紫外光灯下观察有无荧光;另一部分集落接种到 Chromagar<sup>®</sup> 琼脂平板上 37℃ 24 小时挑选可疑集落作 O157 特异抗血清凝集,作聚合酶链反应(PCR)扩增,看有无志贺类毒素(VT),最后可用 Vitek 机器测各种生化试验,查出菌株用 PFGE 分类。

作者单位:200032 上海医科大学预防医学研究所(俞顺章、张幼辰、卫国荣);上海中医药大学(卢林耿)

(收稿:1999-03-10 修回:1999-06-07)