

多重PCR在食品安全风险监测中致泻大肠埃希氏菌毒力基因的检测应用

广东省河源市疾病预防控制中心 (517000) 黄丰光

广东省河源出入境检验检疫局 (517000) 王旻

摘要: 目的 探讨多重PCR在食品安全风险监测中致泻大肠埃希氏菌毒力基因检测的应用价值。**方法** 从食品安全风险监测中分离大肠埃希氏菌, 采用多重PCR法检测其毒力基因, 并进行血清分型。**结果** 多重PCR对80株大肠埃希氏菌有效分型, 其中, EAEC型20株, EPEC型21株, ETEC型7株, EHEC型0株, EIEC型1株, 31株分不了型, 血清型主要以086K61、0157+ : H7-、044K74等为主。**结论** 食品安全风险监测中采用多重PCR检测致泻大肠埃希氏菌毒力基因能够辅助辨别其致病型, 具有良好的应用价值。

关键词: 食品安全; 致泻大肠埃希氏菌; 毒力基因; 多重PCR检测

中图分类号: S854.4 **文献标识码:** A

文章编号: 1005-8257 (2017) 04-0024-02

Application of multiplex PCR to detect diarrheogenil Escherichia coli virulence genes in the food safety risk monitoring
Huang Fengguang¹, Wang Yang²

¹Heyuan Municipal Center for Disease Control and prevention, 517000

²Heyuan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, 517000

Abstract: Objective To discuss the value of multiplex PCR to detect diarrheogenil Escherichia coli virulence genes in the food safety risk monitoring. **Methods** 80 strains of Escherichia coli were selected. The diarrheogenil Escherichia coli virulence genes were detected by multiple PCR. **Results** The distribution of virulence genes and serum type of 80 strains of Escherichia coli were more complicated. Among them, 20 strains were type

EAEC, 21 strains were type EPEC, 7 strains were type ETEC, 0 strains were type EHEC, 1 strain were type EIEC, 31 strains were unknown type. The main types of serum were 086K61, 0157+ : H7-, 044K74. **Conclusion** By using multiple PCR detection diarrheogenil Escherichia coli virulence genes can help identify the pathogenic type in the food safety risk monitoring. Has good application value.

Key words: food safety; diarrheogenil Escherichia coli; virulence gene; multiplex PCR detection

大肠埃希氏菌为埃希氏菌属, 在人体中与自然界均广泛分布, 大部分菌种均不会损害人类健康, 存在于人体中来保障正常的肠道功能^[1]。其中, 致泻性大肠埃希氏菌可诱发不同程度消化系统问题, 其致病过程较为复杂, 所引发的胃肠道症状也相对严重, 在上世纪90年代便被归为主要食品致病菌之一^[2]。根据致泻性大肠埃希氏菌的致病情况差异, 可将其分为肠出血性 (EHEC)、肠道侵袭性 (EIEC)、肠道致病性 (EPEC)、肠毒素性 (ETEC) 与肠聚集性黏附性 (EAEC) 等5种类型以及11种相关毒力基因^[3]。致泻性大肠埃希氏菌在食品中毒中占据显著地位^[4], 在食品安全风险中开展相关检测对维持安全饮食具有重要意义。本研究采用多重PCR法检测食品中致泻性大肠埃希氏菌及其毒力基因, 现报告如下。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料 选用本市食品安全风险监测中心提供

的80株大肠埃希氏菌, 均为食品致病因子安全风险检测所获得。

1.2 仪器与试剂 采用杭州大微DW-800多重PCR食品致病菌核酸检验系统, 英国Oxoid R8311002生化鉴定系统, 北京卓诚惠生生物科技有限公司提供的5种致泻性大肠埃希氏菌多重PCR试剂盒, 广州健仑生物科技有限公司提供的大肠埃希氏菌血清, 上海沪震实业有限公司提供的大肠埃希氏菌0157显色培养基, 上海古朵生物科技有限公司提供的营养琼脂斜面与EC肉汤, 北京兰伯瑞生物技术有限责任公司提供的革兰氏阴性杆菌鉴定卡。

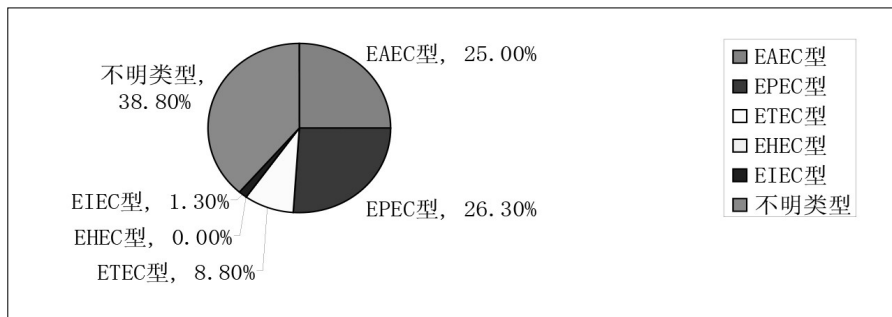
1.3 检测方法

1.3.1 细菌分离与血清反应 根据我国《食品安全风险监测手册》中致泻性大肠埃希氏菌检测方法, 对食品标本进行分离培养、血清凝集试验。

1.3.2 核酸DNA提取 按照北京卓诚惠生生物科技有限公司的指示说明书进行核酸提取与核酸检验。首先, 制备菌悬液 (0.5 ~ 4.0个麦氏浊度), 采用离心机对菌悬液进行离心处理 (13000rpm, 3min), 取其上清液再注入核酸提取液 50 μL, 使其均匀、充分混合后再行沸水

附表 80株大肠埃希氏菌的毒力基因与血清型检测结果

血清型	ETEC (n=7)	EHEC (n=0)	EIEC (n=1)	EAEC (n=20)	EPEC (n=21)	不明分型 (n=31)
086K61				1	9	
0157+ : H7-		0			3	1
044K74				2	1	
025K11	3					
026K60					1	
0114+ : K-	1					1
0128K67					1	
078K80	1			1		
02+						8
0126K71	1				1	1
018acK77						1
028K73			1		1	5
其他	1			16	4	14



附图 80株大肠埃希氏菌的致病型检测结果

浴与离心处理(13000rpm, 10min), 最后取其上清液为参考模板。

1.3.3 多重PCR扩增 根据北京卓诚惠生生物科技有限公司提供的5种致泻性大肠埃希氏菌多重PCR试剂盒说明书进行操作, 反应条件如下: 95℃ 4min, 95℃ 30s, 62℃ 30s, 72℃ 90s 30次, 72℃ 5min, 取2 μL大肠埃希氏菌DNA, 研究中阴性对照物为双蒸水, 阳性对照物为5种致泻性大肠埃希氏菌多重PCR试剂盒中阴性对照品, 均以标准株为准开展质控工作。

1.3.4 多重PCR产物分析 PCR产物采用毛细管电泳系统自动化分析, 大肠埃希氏菌均存在1条1480bp uidA扩增条带, 如出现则可判作为致泻性大肠埃希氏菌, 在评定毒力基因类型时参考毒力组合方式与扩增条带大小。其中, EPEC型毒力基因包括bfp8 (910bp)、escV (544bp), 阳性判定依据为escV (+)、bfpB (+)、stx1 (-)、stx2 (-)或escV (+)、bfpB (-)、stx1 (-)、stx2 (-); EHEC型毒力基因包括escV (544bp)、stx1 (244bp)、stx2 (324bp), 阳性判定依据为escV (+/-)、bfpB (-)、stx1 (+)、stx2 (-)或escV (+/-)、bfpB (-)、stx1 (-)、stx2 (+)或escV (+/-)、bfpB (-)、stx1 (+)、stx2 (+); ETEC型毒力基因包括elt (655bp)、estla (157bp)、estlb (171bp), 阳性判定依据为estla、estlb与elt中有1条及以上为阳性; EIEC型毒力基因包括invE (766bp), 阳性判定依据为invE (+); EAEC型毒力基因包括astA (102bp)、aggR (400bp)与pic (1111bp), 阳性判定依据为pic、aggR与

astA中有1条及以上为阳性。

2 结果

2.1 80株大肠埃希氏菌的致病型检测结果 如附图所示, 20株(25.0%)为EAEC型, 21株(26.3%)为EPEC型, 7株(8.8%)为ETEC型, 0株为EHEC型, 1株(1.3%)为EIEC型, 31株(38.8%)为不明类型。

2.2 80株大肠埃希氏菌的毒力基因与血清型检测结果 如附表所示, 7株ETEC样本的血清型包括025K11、0114+ : K-、078K80、0126K71, 1株EIEC样本的血清型为028K73, 20株EAEC样本的血清型包括086K61、044K74、078K80, 21株EPEC样本的血清型包括086K61、0157+ : H7-、044K74、026K60、0128K67、0126K71、028K73。

3 讨论

大肠埃希氏菌广泛存在于人体与自然界中, 其中大部分菌株均不会对人体造成明显危害, 但部分携带毒力基因菌株则会严重影响人类消化系统健康, 感染后便会出现不同程度的胃肠道症状, 严重时甚至会诱发地区性腹泻爆发。本次研究选择食品安全风险监测中心提供的80株大肠埃希氏菌, 分别进行多重PCR监测。结果表现EAEC型20株(25.0%), EPEC型21株(26.3%), ETEC型7株(8.8%), EHEC型0株, EIEC型1株(1.3%), 不明类型31株(38.8%), 主要以EAEC型与EPEC型最为多见。同时, ETEC样本的血清型包括025K11、0114+ : K-、078K80、0126K71, EIEC样本的血清型为028K73, EAEC样本的血清型包括086K61、044K74、078K80, EPEC样本的血清型

包括086K61、0157+ : H7-、044K74、026K60、0128K67、0126K71、028K73。根据结果分析大肠埃希氏菌的血清型与毒力基因存在一定程度差异, 进而单纯依赖血清检验对食品污染缺乏准确性, 也表现出食品安全风险监测中大肠埃希氏菌具有一定特异性, 在常规血清检验基础上开展毒力基因检测更有利于细菌致病型的辨别。目前, 临床已知的大肠埃希氏菌毒力基因有十余种, 而不同致病型可对其噬菌体与质粒进行传播, 进而全面开展相关毒力基因检测才能准确评估细菌致病性。以往单重PCR法并不适合应用于大样本量检测中, 多重PCR检验法可同时进行多基因测定, 在明确细菌菌种的基础上全面检测多毒力基因, 保证了食品检验的高效性与便捷性, 可作为食品安全风险监测的重要手段。

综上所述, 食品安全风险监测中采用多重PCR检测致泻大肠埃希氏菌毒力基因能够辅助辨别其致病型, 具有良好应用价值。

参考文献

- Oosterik LH, Tuntufye HN, Tsonos J, *et al.* Bioluminescent avian pathogenic *Escherichia coli* for monitoring colibacillosis in experimentally infected chickens[J]. *Vet J*, 2016, 79 (216): 87 ~ 92
- 谢润欣, 张崇淼, 王晓昌, 等. 城市污水中病原性大肠埃希氏菌毒力基因eaeA和rfbE的实时荧光定量PCR检测[J]. *环境科学研究*, 2012, 25 (8): 922 ~ 926
- 赵雪涛, 沈小婷. 聚集性大肠埃希菌生物膜形成及毒力基因型研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22 (7): 1487 ~ 1490
- Gao Q, Xia L, Liu J, *et al.* DNA microarray-mediated transcriptional profiling of avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058 during its infection of chicken[J]. *Microb Pathog*, 2016, 26 (100): 1 ~ 9

(20161117收稿)