

大肠杆菌 O157:H7 及其在食品中的检测

刘江勋 黎锡流 唐清涛

(华南理工大学食品与生物学院 广州 510640)

摘 要 大肠杆菌 O157:H7 是一种感染剂量小(10 个活菌),危害性很大的致病菌。近年,在世界各地屡次发生大肠杆菌 O157:H7 的感染事件。因此,在食品卫生和安全领域,对大肠杆菌 O157:H7 致病机理、生物学特性、检测方法、预防和控制已成为研究热点。作者对大肠杆菌 O157:H7 的致病性、生化特性、检测方法及其在食品中出现的情况作了系统的介绍。

关键词 大肠杆菌 O157:H7 致病性 生化特性 检测方法 食品

大肠杆菌 O157:H7 属于肠出血性大肠埃希氏杆菌(*EHEC enterohemorrhagic Escherichia coli*)。感染后的病人会出现血样粪便、腹泻等症状,进一步发展会引起出血性结肠炎或死亡率(30%)极高的并发溶血性尿毒综合征^[1]。

在常规的大肠杆菌检测中,一般不能检测到此病原菌,而此病原菌的感染剂量极低,据报道,人若摄取 10 个活菌就有可能引起感染^[2]。因此在食品及医学机构中有人建议,为了确保食品的安全性,应增加对 EHEC O157:H7 的检测。本文系统地对此菌在食品中的存在情况、生物学特性及其在食品的检测作了综述。

1 *E. coli* O157:H7 的来源及其在食品中的存在情况

一般认为此菌的最初来源主要是出血性结肠炎病人及感染此菌人的排泄物和动物(特别是牛和羊)的粪便^[3]。这些带菌的排泄物在进入生态环境之前处理不当,便通过一定的渠道进入饮食链中,而当人们在摄取这些食物或水时,其加工手段又不足以杀灭其中所有的 *E. coli* O157:H7,从而引起感染。牛肉、牛奶及其制品、蔬菜、水果、饮料等都能成为该菌的载体,特别是牛肉及乳制品更是有利其富集^[4]。

大部分感染者都是由于食用肉类及乳制品所引起,所以一般只调查其在乳制品及肉类中的存在情况,在蔬菜、水果、饮料的存在情况尚未见报道。但随着最低加工食品(MP, minimally processed food)的出现,从蔬菜及水果方面可能引起的感染也需要引起注意。

2 *E. coli* O157:H7 的生物学特性及生化特征反应

2.1 *E. coli* O157:H7 的生物学特性

E. coli O157:H7 属革兰氏阴性、无芽孢、无荚膜杆菌。在 SMAC(用 1% 的山梨醇代替麦康凯培养基中的乳糖)平板上,37℃ 培养 18~24 h,菌落圆整,凸起湿润光滑,直径大小为 1~15 mm,无色半透明。而一般的大肠杆菌的菌落在此培养基上则呈粉红色。*E. coli* O157:H7 在培养过程中能产生 SLT-I 或 SLT-II 毒素,对各种内皮细胞、上皮细胞有特殊的亲和力。进入肠道会使肠道局部缺血、坏死,进入血液可损伤血管内皮细胞、血液系统、肾脏及神经系统而发生爆发性的出血性结肠炎及尿毒症。

不过,该病原菌对热极敏感,75℃,1 min 即可将其杀死,100℃ 可杀死所有病菌。但在 -20℃ 能够保持 9 个月而总数几乎不变。该菌对酸的抵抗力较强,即使在胃酸作用下也

第一作者:硕士研究生。

收稿时间 2001-04-07,改回时间 2001-09-17

难将其杀死。另外 ,*E. coli* O157 :H7 对多种抗菌药物较敏感 ,特别是氯霉素、丁胺卡那霉素和菌必治等。

2.2 *E. coli* O157 :H7 的生化特征反应

典型的 *E. coli* O157 :H7 菌株的生化特征反应如表 1。

表 1 *E. coli* O157 :H7 菌株的生化特征

序号	试 验	反应结果	序号	试 验	反应结果
1	靛基质试验	+	12	KCN 试验	-
2	V-P 试验	-	13	葡萄糖发酵	-
3	柠檬酸(西蒙氏)	-	14	乳糖发酵	+
4	硫化氢(TSI)	-	15	蔗糖发酵	+
5	尿素酶	-	16	阿拉伯糖发酵	+
6	丙二酸盐	-	17	麦芽糖发酵	+
7	苯丙氨酸脱氨酶	-	18	棉子糖发酵	+
8	赖氨酸脱羧酶	+	19	木糖发酵	+
9	精氨酸双水解酶	+	20	海藻糖发酵	+
10	鸟氨酸脱羧酶	+	21	甘露醇发酵	+
11	明胶液化	-	22	山梨醇发酵	+

注 :+ 为阳性 ; - 为阴性。

3 *E. coli* O157 :H7 的检测

3.1 *E. coli* O157 :H7 培养及分离

由于食物中 *E. coli* O157 :H7 的含量一般比较少 ,为了提高检测率 ,需进行增菌试验。取一定量的样本 ,用 TSB 培养基在 37℃ 培养 24h ,培养过程中始终用 150 r/min 的速度搅动。之后 ,取增菌液 0.1 mL 均匀涂布于 SMAC 平板或在其上划线 ,37℃ 培养 18~24 h。菌落呈无色半透明的可初步认为是 *E. coli* O157 :H7。此方法简单 ,直观 ,但有些非 *E. coli* O157 :H7 菌及其他一些革兰氏阴性菌特别是变形杆菌属也会呈现无色菌落。头孢克肟可抑制变形杆菌的生长 ;另外 ,60% 的不发酵山梨醇的非 *E. coli* O157 :H7 菌都发酵鼠李糖 ,因此 SMAC 培养基加入 0.5% 的鼠李糖和 0.05 mg/L 的头孢克肟可减少 60% 的无色菌落^[9]。

3.2 快速检测 O157 菌株试纸法^[10]

用 MUG(四甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷)和 α(四甲基伞形酮-β-D-半乳糖苷)2 种试纸联合检测 O157 菌株及一般大肠杆

菌。O157 菌为 G 试纸阳性 ,MUG 试纸阴性。而一般大肠杆菌为 G 试纸阳性 ,但 MUG 试纸为阳性。这说明上述 2 种菌均属大肠杆菌。O157 株虽存在 *uid A* 基因 ,能编码翻译 β-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 2 种滤纸条 1~3 h 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。此方法快速 ,但灵敏度较差。

3.3 生化反应与血清检测结合法确证^[5]

从培养物中随机挑取 5 个菌落 ,采用法国生物-梅里埃 UITEK-AMS 全自动微生物鉴定系统革兰氏阴性菌鉴定卡 ,对其 22 种生化反应进行检测。如果检查结果与标准 *E. coli* O157 :H7 的生化反应相吻合或基本吻合就能进一步断定为 *E. coli* O157 :H7 菌株 ,再利用 *E. coli* O157 :H7 的单克隆抗体(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所可提供)及 O157 和 H7 血清(中国药品生物制品检查所可提供)作玻片凝集反应 ,出现凝集反应的就能认为 *E. coli* O157 :H7 为阳性。如果由于实际条件的限制 ,没有法国生物-梅里埃 UITEK-AMS 全自动微生物鉴定系统革兰氏阴性菌鉴定卡 ,可采取人工办法 ,对 *E. coli* O157 :H7 的典型生化反应进行测定再结合血清法进行确证。

3.4 PCR 法(polymerase chain reaction)

PCR 法是通过一定的手段来扩增细胞的特定基因 ,然后取 PCR 产物与示踪染料一起加入胶孔进行琼脂糖凝胶电泳 ,电泳 30min 左右 ,再在紫外光下观察荧光条带就能得到结果。目前对 *E. coli* O157 :H7 的 PCR 检测法较多(主要差别是扩增的基因数目和种类不同) ,以下介绍扩增 SLT-I、SLT-II 和 *eae A* 基因片断的 PCR 法^[11]。

(1)引物的合成

根据大肠杆菌 O157 :H7 的 SLT-I、SLT-II 毒素基因和 *eae A* 基因片断设计 3 对

引物,序列如下:

SLT-I P1 5'-TTTACCTTAGACTTCTCGAC-3'
P2 5'-CACCAGACAATGTAACCGCTG-3'

扩增片段为 325bp,用 Hinf I 酶切成 37bp、288bp。

SLT-II P3 5'-TTTACGATAGACTTTTCGAC-3'
P4 5'-GCGTCATCGTATACACAAGAAC-3'

扩增片段为 571bp,用 Hae III 酶切成 228bp、343bp。

eeA P5 5'-CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA-3'
P6 5'-ACAGCGTGGTTGGATCAACCT-3'

扩增片段为 1 089bp,用 Hinf I 酶切成 730bp、359bp。

(2) DNA 模板提取

从山梨醇琼脂平板上挑取菌种少许于 100 μ L 生理盐水中,加 2 \times PCR 缓冲液 100 μ L (1 \times PCR 为 10 mmol/L Tris-HCl pH8.3, 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.01% 明胶, 0.5% 吐温-20, 0.5% Triton X-100), 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min,离心沉淀,取上清液做 PCR 试验。

(3) PCR 程序

于 10 μ L PCR 反应混合液中(在 1 \times PCR 反应缓冲液中含引物各 5 μ mol/L, 1 μ L; 2 mmol/L 4 \times NTP, 1 μ L; Taq DNA 聚合酶 1U 1 μ L 加 DNA 模板提取液 15 μ L,置 PCR 扩增仪中(PTC-100, MJ Research Inc.)。93 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,进入循环,93 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 共 30 个周期,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,SLT-I、SLT-II 和 eeA 阳性扩增产物分别为 325、571 和 1 089bp。再分别用 Hinf I、Hae III 和 Hinf I 核酸内切酶对扩增产物进一步做酶切鉴定。

另外,Kasthuri 等人^[6]利用复合 PCR 法成功地从牛肉中检测到了 *E. coli* O157:H7。取均质后的样品 25 g 加入 225 mL TSB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养 18~24 h,之后取 400 μ L,用孔径为 5 μ m 的 Ultrafree 过滤器离心(10 000

g 4 $^{\circ}$ C, 10 min)过滤,再把滤液用孔径为 0.2 μ m 的 Ultrafree 过滤器离心(10 000 g 4 $^{\circ}$ C, 10 min)过滤,用 400 μ L 无菌 PBS 把过滤器上的微生物洗下来,取 10 μ L 作为复合 PCR 的模板物。PCR 扩增的 4 个基因为:uid A 基因(147bp,为大肠埃希氏菌普遍的基因)、O157:H7 的特异性基因(252bp)、SLT-I 基因(348bp)和 SLT-II 基因(584bp)。然后取扩增的产物进行琼脂糖凝胶电泳即可得结果。其灵敏度可达检样 1cfu/g。

4 结 语

1994 年,在英国一个小镇上发生 *E. coli* O157:H7 的感染,导致 71 个受到感染。其中 10 个人之后患上尿毒综合症。根据 Roberts 等人^[12]对其费用的调查,每个尿毒综合症病人的平均治疗费用是 62 353 英镑;每个非尿毒综合症感染者的费用为 1 030 英镑;用于调查和控制感染的费用为 171 848 英镑,而由于处理后遗的相关问题,在 30 年后其总费用可达 11.9 百万英镑。因此,为了预防和控制 *E. coli* O157:H7 的感染,加强食品和饮料中 *E. coli* O157:H7 的检测很有必要。

参 考 文 献

- 1 Riley L W, Remis R S et al. New Eng. J. Med., 1983, 308: 681
- 2 Kasthuri Venkateswaran. Appl. Environ. Microbio., 1997, 63(10): 4127~4131
- 3 于恩庶. 中华流行病学杂志, 1997, 18: 47
- 4 黄志诚等. 中国公共卫生学报, 1999, 18(4): 246~248
- 5 赵志晶. 国外医学(卫生学分册), 1999, 26(2): 110~114
- 6 Pennington. Food Science and Technology Today, 2000, 14(3): 121~122
- 7 施世锋等. 中国公共卫生, 1999, 15(4): 348~349
- 8 Nisha V. Appl. Environ. Microbio., 1991, 57(9): 2693~2697
- 9 Chapman P A et al. J. Med. Microbiol., 1991, 35:

107~110

11 朱庆义,李连青等.中华医学检验杂志,1999,22

10 俞顺章等.中华流行病学杂志,1999,20(4):237

(5):287~289

~240

Escherichia Coli O157:H7 and Its Detection in Foods

Liu Jiangxun Li Xiliu Tang Qingtao

(College of Food & Biology, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

ABSTRACT *Escherichia coli* O157:H7 is a cause of serious foodborne illness and is viewed as a significant public health concern. It has a very small infectious dose and so it is vital to detect and eliminate this pathogen from food. This paper aims to review the current knowledge on this pathogen and to highlight the ongoing research. Four areas are covered in the paper, including its pathogenic and virulence traits, biochemical characteristics, occurrence in food, methods of detection.

Key words *Escherichia coli* O157:H7, pathogenic, biochemical characteristic, detection, food

大剂量叶酸可防胃癌

上海市消化疾病研究所萧树东教授领衔的一项研究发现,每天服用大剂量的叶酸可降低胃癌发生的危险性。关于这项研究的论文在最新出版的世界著名的权威性胃肠病学杂志《Gut》上发表。

叶酸是一种存在于柑橘类和绿叶植物中的维生素B,公认缺乏叶酸可增加肿瘤发生的危险性,但人们尚不清楚大剂量的叶酸可否预防肿瘤的发生。为此,研究人员在对16只犬进行了长达8个月的化学方法诱导胃癌的实验,同时对其中8只犬连续15个月每天给予20mg大剂量的叶酸,并通过胃镜了解实验犬的胃粘膜是否出现癌变现象。在实验结束时发现,8只仅接受化学致癌剂的犬全部发生了胃癌,而另8只同时接受叶酸治疗的犬中只有3只发生胃癌,同时还发现血清和胃粘膜中的叶酸水平在叶酸治疗组中明显增高,表明大剂量的叶酸对致癌剂所引起的胃癌有明显的干预作用。

据萧树东介绍说,叶酸防癌机理是预防致癌性的突变,因为叶酸为DNA合成、甲基化和修复所必需。他认为该实验结果很可能与人类相同,为此建议市民多吃一些含有高浓度叶酸的新鲜蔬菜,甚至可口服叶酸补充,以减少胃肠道肿瘤发生的危险。

德国发明延长绿色食品保鲜期的薄膜

德国科学家最近发明了一种经过叶绿素“染色”的塑料薄膜,可以防止绿色食品中的叶绿素发生氧化作用而导致食品腐烂,大大延长了绿色食品的保存时间。

绿色食品中大都含有大量的叶绿素,而这种色素在光照射下会发生感光氧化反应,导致食品腐烂。因此,为了延长食品保鲜期,传统包装材料采用不透明的包装材料或用塑料包装并加以真空处理以使食品与氧气绝缘。前者无法使顾客直观挑选,后者则较为复杂而且成本相对较高。

德国弗劳恩霍夫处理与包装技术研究所的科学家戈尔德汉将塑料薄膜用叶绿素以特殊方法进行“染色”,经过这种处理后的薄膜用来包装食品就可以有效“截获”致使食品腐烂的光线,从而大大延长了食品保鲜期。新方法不仅简便易行,而且成本低廉。