

俞正玉, 张碧成, 张 强, 等. 鲜奶中肠出血性大肠杆菌O157:H7的定量 PCR 检测[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1173-1178.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.036

## 鲜奶中肠出血性大肠杆菌O157:H7的定量 PCR 检测

俞正玉, 张碧成, 张 强, 汪 伟, 何孔旺, 倪艳秀, 温立斌, 李 彬, 周 萍, 张雪寒

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为建立鲜奶中肠出血性大肠杆菌(*Enterohaemorrhagic E. coli*, EHEC) O157:H7的特异性检测方法, 以 EHEC O157:H7独有的遗传标志性基因 Z0372 为靶序列设计引物和探针, 以梯度稀释的含有 Z0372 基因的重质粒作为标准品进行 Taqman 荧光定量 PCR 反应, 分析该方法的敏感性、特异性, 并检测鲜奶样品以验证 Taqman 荧光定量 PCR 实用性和可靠性。结果表明, 建立的定量 PCR 方法在  $1 \mu\text{l } 1 \times 10^1$  拷贝至  $1 \mu\text{l } 1 \times 10^6$  拷贝之间具有良好的线性关系, 相关系数达到 0.996, 扩增效率 112%。该方法的检测灵敏度为  $1 \mu\text{l } 70$  拷贝, 敏感性较高, 而且特异性良好, 与其他血清型大肠杆菌、沙门氏杆菌和志贺氏菌等易混淆菌株核酸之间没有交叉反应。批间和批内检测的变异系数(RSD)低于 2%, 表明该方法重复性良好。

**关键词:** 肠出血性大肠杆菌 O157:H7; 荧光定量 PCR; 鲜奶

中图分类号: S851.34+7.502 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)05-1173-06

## Development of a real-time PCR for detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in milk

YU Zheng-yu, ZHANG Bi-cheng, ZHANG Qiang, WANG Wei, HE Kong-wang, NI Yan-xiu, WEN Li-bin, LI Bin, ZHOU Ping, ZHANG Xue-han

(*Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Engineering Research of Veterinary Bio-products of Agricultural Ministry/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China*)

**Abstract:** To develop a real-time PCR (RT-PCR) technique for detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 in milk, primers and probes were designed according to the unique Z0372 gene sequence, a genetic marker of EHEC O157:H7, and the serially diluted recombinant plasmid pMD18-T-Z0372 was used as a standard template to develop RT-PCR assay. The concentration of standard plasmid exhibited a good linear relationship with Ct within the range of  $1 \times 10^1 - 1 \times 10^6$  copies per microlitre by developed RT-PCR, with the correlation coefficient being 0.996 and the amplification efficiency being 112%. The RT-PCR assay showed a detection limit as low as 70 copies per microlitre and no cross reaction with other *E. coli* serotypes, *Salmonella* and *Shigella*, indicative of good sensitivity and specificity. The coefficients of variation within and among batches were lower than 2%, suggestive of good repeatability.

**Key words:** enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7; real time fluorescence quantitative PCR; milk

收稿日期: 2015-04-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572503); 农业部 948 项目(2014-S17)

作者简介: 俞正玉(1978-), 男, 江苏南京人, 学士, 助理研究员, 从事人兽共患病研究。

通讯作者: 张雪寒, (E-mail) liuxuehan1996@hotmail.com

肠出血性大肠杆菌(*Enterohaemorrhagic E. coli*, EHEC) O157:H7 是常见的肠道致病菌, 感染该菌

可引起腹泻、出血性结肠炎、溶血性尿毒综合征及血栓形成性血小板减少性紫癜等严重并发症,甚至导致死亡,致死率达 5%~10%<sup>[1-2]</sup>。1982 年,Riley 等报道了由 EHEC O157:H7 引起的出血性结肠炎的暴发流行,这也是把 EHEC O157:H7 确认为严重致病菌的首次报道<sup>[3]</sup>。随后在加拿大、日本、英国、澳大利亚等地发生了多起该菌的感染流行<sup>[4]</sup>。1999 年,在中国安徽、江苏两省曾暴发流行 EHEC O157:H7 感染性腹泻,患者超过  $2.0 \times 10^4$  人,死亡 177 人,流行时间 7 个月,可能是迄今为止世界上流行规模最大的一次<sup>[5]</sup>。中国已将 EHEC O157:H7 列为 21 世纪可能对国人卫生健康有重大影响的 12 种病原微生物之一。

奶牛场是 EHEC O157:H7 主要存在场所之一,动物排泄物极易污染鲜奶。随着生活水平的提高和饮食结构的改变,国民对鲜奶和奶制品的需求量逐年增加,加强对奶制品中 EHEC O157:H7 监测势在必行。目前检测 EHEC O157:H7 的国标方法仍然以常规的平板培养和细菌分离为主。近年来,以不同基因为检测靶标的 PCR、定量 PCR 技术层出不穷,也不乏高通量的基因芯片技术、生物传感器技术、夹心 ELISA、乳胶凝集检测方法等,这些检测技术各有优势,同时也存在种种缺陷,诸如操作复杂、费时、仪器要求高、灵敏度或特异性不强等缺点<sup>[6-9]</sup>。PCR 是一种既简便又易于掌握的方法,也被广泛应用到 EHEC O157:H7 的快速诊断中,但假阳性和 PCR 污染等弊端仍然无法避免。而荧光定量 PCR 方法技术则是在普通 PCR 技术的基础上,在扩增反应体系中加入特异性引物的同时再加入一个特异性的荧光探针,使用实时监测的荧光 PCR 检测仪来检测靶标核苷酸。该技术除了具有普通 PCR 的优点外,还具有更多优点:特异性更高,灵敏性更高;全封闭反应,无需 PCR 产物的后处理,避免污染,保证了结果的可靠性;可实现单管双检或多检;不接触有毒试剂,操作简单;有利于规模化、自动化。

我们在前期研究中分析了 EHEC O157:H7 全基因组序列,发现 Z0372 基因只存在于 EHEC O157:H7 基因组中,为标签性基因。因此,本研究选用 EHEC O157:H7 参考菌株 EDL933、非 EHEC O157 菌株和肠道菌株沙门氏菌、志贺氏菌等,建立以 Z0372 基因为检测靶基因的定量 PCR,区分检测类似病原菌,并进一步用于鲜奶样品监测,为研制新

型 EHEC O157:H7 检测试剂盒奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

试验菌株有:EHEC O157:H7 EDL933 菌株,人源 EHEC O157:H7 菌株 882364、C118、C119、C120、C121、C122、C123、C159,其他大肠杆菌 O25、O26、O55、O78、O103、O111、O127、O145、O138、O139、O141、非致病性大肠杆菌 K12,以及沙门氏杆菌、巴氏杆菌、粪链球菌、葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、乳酸杆菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌、痢疾志贺氏菌、福氏志贺氏菌 2a、普罗威登斯菌。菌种均为江苏省农业科学院兽医研究所保存。

### 1.2 主要试剂和仪器

主要试剂和仪器有:2×Premix Ex Taq、DL-2000 DNA marker、pMD18-T 载体(TaKaRa 公司)、细菌 DNA 提取试剂盒(福际生物公司)、山梨醇麦康凯(Sorbitol macconkey, SMAC)培养基、肉汤培养基和新生霉素(南京助研生物公司)、anti-*E. coli* O157 免疫磁珠(Dynabeads 公司)、ABI 7500 定量 PCR 仪。

### 1.3 引物设计及合成

根据 GenBank 上发表的 EHEC O157:H7 EDL933(登录号:AE005174) Z0372 基因序列设计引物和探针,扩增片段为 119 bp。引物 Z0372-F(5'-GCCAGGCAAATATGTTTGTGA-3')、Z0372-R(5'-CATTTGGCATTTGAACGATGAA-3')和 Z0372-P(5'-CCTGGATACCGCTACTCAAATTCTGTCAAAAT-3'),由 TaKaRa 公司合成,稀释浓度 10 pmol/μl, -20℃ 保存备用。

### 1.4 PCR 扩增和定量用标准品的制备

用 Z0372-F/R 引物对 PCR 扩增 Z0372 片段,按照试剂盒说明书回收扩增产物,并将 PCR 产物克隆到 pMD-19-T 载体,转化感受态菌株 DH5a,酶切鉴定阳性质粒 pTZ372,作为定量标准品备用。用蛋白质核酸定量仪测定质粒浓度,根据每个阳性质粒大小为 2 799 bp 和每个阳性质粒质量为  $1.43 \times 10^{-18}$  g,制备 1 μl  $7 \times 10^7$  拷贝的质粒 DNA 溶液。由于 Z0372 基因在 EHEC O157:H7 基因组中是单拷贝,所以可以用质粒 pTZ372 作为标准样品制作标准曲线。

### 1.5 实时荧光定量 PCR 条件的优化

采用 Taqman 探针法,在荧光定量 PCR 仪上进

行扩增和数据分析。以最小的  $C_t$  值和最高的荧光值为标准,分别对退火温度、引物和探针浓度、延伸时间等进行优化。

### 1.6 重复性、特异性和敏感性试验

用同处理同浓度的 EHEC O157:H7 EDL933 菌株,以及 EHEC O157:H7 菌株 882364、C118、C119、C120、C121、C122、C123、C159,其他大肠杆菌 O25、O26、O55、O78、O103、O111、O127、O145、O138、O139、O141,非致病性大肠杆菌 K12,以及沙门氏杆菌、巴氏杆菌、痢疾志贺氏菌、福氏志贺氏菌 2a 的 DNA 模板进行实时定量 PCR 扩增,检验其稳定性、特异性。

将方法 1.4 中制备的 10 倍倍比稀释后的质粒 DNA 溶液( $1\ \mu\text{l}$   $7\times 10^6$  拷贝、 $7\times 10^5$  拷贝、 $7\times 10^4$  拷贝、 $7\times 10^3$  拷贝、 $7\times 10^2$  拷贝和  $7\times 10^1$  拷贝),进行荧光定量 PCR 扩增,以检验其灵敏性。

### 1.7 标准曲线的绘制

标准样品(质粒 pTZ372)10 倍倍比稀释成  $1\ \mu\text{l}$   $7\times 10^6$  拷贝、 $7\times 10^5$  拷贝、 $7\times 10^4$  拷贝、 $7\times 10^3$  拷贝、 $7\times 10^2$  拷贝和  $7\times 10^1$  拷贝的质粒 DNA 溶液,定量 PCR 扩增后,绘制标准曲线。

### 1.8 模拟阳性样品的制备

用接种环蘸取  $-70\ ^\circ\text{C}$  保存的 EHEC O157:H7 菌种,划线接种于山梨醇麦康凯平板,  $37\ ^\circ\text{C}$  培养 20 h。取单个菌落接种 5 ml LB 液体培养基(含新生霉素  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ),培养 20 h。取细菌培养液 1 ml,  $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心 5 min,沉淀用灭菌生理盐水洗涤 3 次,再用  $100\ \mu\text{l}$  TE 缓冲液重悬。用灭菌生理盐水将 EHEC O157:H7 培养物 10 倍比稀释,涂布山梨醇麦康凯琼脂平板,菌落计数。

从奶牛场采集鲜奶,用 TaqMan® EHEC O157:H7 检测试剂盒(Applied System 公司)进行检测,选用 EHEC O157:H7 阴性鲜奶。鲜奶分装每管 20 ml,依次加入不同浓度的 EHEC O157:H7 菌液,终浓度分别为  $3\times 10^6$  CFU/ml、 $3\times 10^5$  CFU/ml、 $3\times 10^4$  CFU/ml、 $3\times 10^3$  CFU/ml、 $3\times 10^2$  CFU/ml、 $3\times 10^1$  CFU/ml、 $3\times 10^0$  CFU/ml,震荡混匀后,取 1 ml 用细菌 DNA 提取试剂盒提取鲜奶中细菌 DNA。

### 1.9 鲜奶样品的检测

1.9.1 样品采集 在南京市选取 3 家奶牛场采集鲜奶样品,分 3 个批次采集:2014 年 6 月汤山某奶牛场采集鲜奶 22 份;2014 年 8 月江宁某奶牛场采

集鲜奶 44 份;2014 年 11 月浦口某奶牛场采集鲜奶 24 份。

1.9.2 样品处理 取 25 ml 鲜奶加入到 225 ml mEC 肉汤培养基(含新生霉素  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $42\ ^\circ\text{C}$  过夜培养(18~20 h)。次日,取 1 ml 培养物  $500\ \text{r}/\text{min}$  离心 10 min,取上清  $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心 5 min,沉淀用  $100\ \mu\text{l}$  TE 重悬。用细菌 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA,即为待检模板。同时吸取 1 ml 培养物,进行免疫磁珠富集,涂布 SMAC 平板,挑取在平板上圆形、光滑、湿润、边缘整齐、直径约 1~2 mm 的菌落,对颜色为无色半透明的可疑大肠杆菌 O157:H7 菌落,用定量 PCR 和 rfbE/fliC 双重 PCR<sup>[10]</sup>再鉴定。

1.9.3 测序分析 将定量 PCR 和 rfbE/fliC 双重 PCR 鉴定阳性扩增条带送金斯瑞生物有限公司测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 定量 PCR 扩增最佳条件

采用探针法,在 ABI 7500 定量 PCR 仪上建立  $25.0\ \mu\text{l}$  反应体系,以扩增效率 90%~115%、相关系数 0.990 以上、无模板对照不出现非特异性扩增产物为标准<sup>[11]</sup>。引物与探针浓度比例为 1:1 和 1:2 的扩增效率差异不明显,因此确定引物探针引物比例为 1:1。比较 3 种退火条件  $60\ ^\circ\text{C}$  30 s、 $62\ ^\circ\text{C}$  30 s 和  $63\ ^\circ\text{C}$  30 s,  $62\ ^\circ\text{C}$  30 s 时,无模板对照的  $C_t$  值最大( $\geq 35$ ),表明阴性对照成立,无非特异性扩增。根据上述结果确定定量 PCR 体系为:2×PCR 扩增预混合溶液  $12.5\ \mu\text{l}$ ,引物 Z0372-F、Z0372-R 和 Z0372-P 各  $1.0\ \mu\text{l}$  ( $10\ \text{pmol}/\mu\text{l}$ ),模板 DNA  $1.0\ \mu\text{l}$ ,补加  $\text{ddH}_2\text{O}$   $8.5\ \mu\text{l}$ ,总体积  $25.0\ \mu\text{l}$ 。PCR 扩增条件: $95\ ^\circ\text{C}$  预变性 10 min,  $95\ ^\circ\text{C}$  10 s,  $62\ ^\circ\text{C}$  30 s, 40 个循环。

### 2.2 Z0372 基因荧光定量 PCR 标准曲线

将 10 倍倍比稀释的阳性质粒 pTZ372 溶液进行定量 PCR 扩增,以模板拷贝数(模板浓度)为  $x$  轴,  $C_t$  值为  $Y$  轴,绘制标准曲线。标准曲线方程  $Y = -3.059x + 38.097$ ,相关系数 0.996,标准曲线中  $C_t$  值和标准质粒浓度间呈现良好的线性关系。

### 2.3 荧光定量 PCR 的敏感性、特异性和重复性

检测 10 倍倍比稀释的阳性质粒 pTZ372,  $1\ \mu\text{l}$  70 拷贝的质粒 DNA 溶液仍有扩增曲线( $C_t = 30.1$ ) (图 1)。检测模拟大肠杆菌 O157:H7 阳性鲜奶样品,300 CFU/ml 时仍有扩增曲线( $C_t = 33.5$ ),表明该定量 PCR 方法敏感性较高。



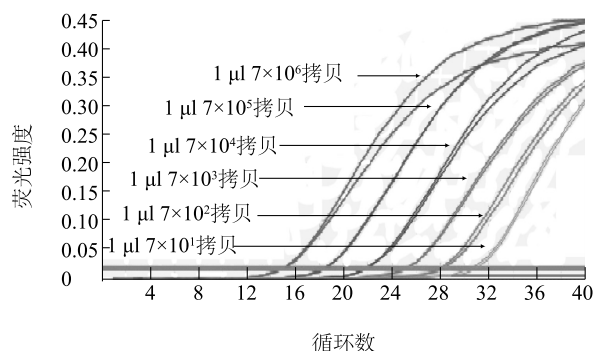


图1 Z0372 基因荧光定量 PCR 的扩增曲线

Fig. 1 Amplification curves of Z0372 gene by real-time PCR

以大肠杆菌 O157 : H7 EDL933 为阳性对照,检测本研究所选其他菌株,所有样品在同样条件下进行 PCR 扩增。结果显示所有大肠杆菌 O157 : H7 菌株均有特异性扩增曲线,而其他大肠杆菌 O25 ( $Ct \geq 35.1$ )、O26 ( $Ct \geq 35.6$ )、O55 ( $Ct \geq 34.1$ )、O78 ( $Ct \geq 36.1$ )、O103 ( $Ct \geq 36.5$ )、O111 ( $Ct \geq 36.8$ )、O127 ( $Ct \geq 36.0$ )、O145 ( $Ct \geq 34.5$ )、O138 ( $Ct \geq 37.1$ )、O139 ( $Ct \geq 37.7$ )、O141 ( $Ct \geq 37.2$ )、非致病性大肠杆菌 K12 ( $Ct \geq 38.6$ ),以及沙门氏杆菌 ( $Ct \geq 37.5$ )、巴氏杆菌 ( $Ct \geq 37.8$ )、痢疾志贺氏菌 ( $Ct \geq 38.0$ )、福氏志贺氏菌 2a ( $Ct \geq 37.3$ ) 均为阴性。说明该方法具有较好的特异性。

组内重复测定的变异系数 (RSD) 为 0.27% ~ 1.16%,组间重复测定的变异系数 (RSD) 为 0.31% ~ 1.89%,均在可接受的合理范围内,说明本研究建立的 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法的稳定性良好。

#### 2.4 奶牛场鲜奶样品大肠杆菌 O157 : H7 的检测

90 份鲜奶样品中,定量 PCR 检测阳性样品有 2 个,分别为 13 号 ( $Ct$  值 = 18.78) 和 79 号 ( $Ct$  值 = 23.98)。将阳性 PCR 产物回收并送金斯瑞生物有限公司测序,结果显示 PCR 产物与 GenBank Z0372 序列同源性为 100%。

按照方法 1.9.2 分离鲜奶样品中的细菌,只有 79 号样分离到大肠杆菌 O157 : H7,单菌落 Z0372 定量 PCR 和 *rfbE*/*fliC* 双重 PCR 鉴定均为阳性,扩增条带序列与 GenBank Z0372 序列同源性为 100%。

### 3 讨论

牛、羊、猪、鸡等家畜家禽感染 EHEC O157 : H7 后,可引起腹泻,并污染畜禽的肉奶蛋制品以及水源和农作物等,给农牧业生产造成巨大损失,对人们的健康构成巨大威胁。EHEC O157 : H7 在反刍动物的流行率要显著高于其他驯养动物<sup>[12]</sup>,牛已被确认为 EHEC O157 : H7 的主要宿主和传染源头,据报道母牛的感染率为 27.3%,夏季有时高达 35%<sup>[13]</sup>。因此,随着国民饮食结构改变,对鲜奶和奶制品的食入量逐年增加,加强对奶制品中 EHEC O157 : H7 监测势在必行。

许多检测技术选用 EHEC O157 : H7 毒力相关基因,例如志贺毒素基因 (*stx1* 和 *stx2*)<sup>[14-15]</sup>、紧密素基因 (*eae*)<sup>[16]</sup> 以及共同具有的表面基因 *uidA*<sup>[17]</sup>、*fliA*<sup>[18]</sup>、*rfbE* (O 抗原) 和 *fliC* (H 抗原)<sup>[11,19]</sup>,这些基因在检测靶标的检测技术中发挥着重要作用,但也具有一定的局限性。许多致病原携带有 *stx* 和 *eae* 基因,以这些基因建立的检测技术不能直接用于 EHEC O157 : H7 的鉴定;另外,选用表面基因的检测技术需要同时检测至少 2 个基因才能够确定是否为 EHEC O157 : H7。随着生物信息学的快速发展,筛选病原菌特有基因建立快速检测技术有着重要的意义。Z0372 基因是我们前期通过大量的基因序列分析和比对而发现的,它唯一存在于 EHEC O157 : H7 基因组中,是 EHEC O157 : H7 遗传标志性基因,建立基于该基因的检测方法将克服已有检测技术的局限性。

本研究建立的 Z0372 定量 PCR 检测方法可特异地检测出鲜奶中污染的 EHEC O157 : H7,灵敏度高,特异性好,可以检测到 70 个拷贝的 Z0372 基因片段,病原菌最低检测浓度为 300 CFU/ml。Shen 等<sup>[20]</sup>建立了以免疫磁珠和标记纳米颗粒为载体的 ELISA 方法,食物中病原菌的检测敏感性介于  $6.8 \times 10^2$  CFU/ml 和  $6.8 \times 10^3$  CFU/ml 之间。Ibekwe 等<sup>[21]</sup>建立了 *stx1*、*stx2*、*eae* 基因和 16S rRNA 定量 PCR,环境样品的最低检测限为  $6.8 \times 10^3$  CFU/ml,敏感性低,并且不能直接明确是 EHEC O157 : H7。EHEC O157 : H7 在环境和食品中含量较低,但是致病力极

强,几十个细菌就能够导致人类发病甚至死亡。当前 EHEC O157:H7 检测技术,均需增菌后再行检测。因牛奶中蛋白质和脂肪含量过高,为提高牛奶中病原菌的检测率,本研究以 42℃ 培养选择性增菌,减少温度敏感菌的增长;同时,选用试剂盒提取细菌 DNA,以代替普通煮沸方法,避免牛奶中蛋白质和脂肪对 DNA 聚合酶的抑制。本研究中,非 EHEC O157:H7 菌株均未检测出阳性;在 90 份奶场鲜奶样品中,检测到 2 个阳性样品,其中只有 1 个鲜奶样品被成功分离到 EHEC O157:H7。Karns 等用多重 PCR、定量 PCR 和细菌分离法同时检测 36 份牛奶,定量 PCR 检出阳性 5 份,多重 PCR 检出阳性 2 份,而细菌分离法只检出 1 份阳性<sup>[22]</sup>。所有研究结果表明,定量 PCR 较传统细菌分离方法的敏感性高,并且可定量检测,对于评估携带病原菌样品的风险有一定的指导意义。

Z0372 基因是 EHEC O157:H7 的遗传标志性基因,是人兽共患病原菌检测的优选基因,建立快速、特异和高通量的检测技术将对防控提供有力的帮助。Wu 等通过基因芯片筛选致病性大肠杆菌 K-12 和大肠杆菌 O157:H7 的差异基因,以期寻找大肠杆菌 O157:H7 的独有致病因子,但未能得到预期结果<sup>[23]</sup>。Jin 等运用基因芯片检测和鉴定大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139, *stx1*、*stx2* 和 *uidA* 基因被确定为大肠杆菌 O157:H7 的代表性基因<sup>[24]</sup>。Wolter 等建立流通式化学发光芯片同时检测大肠杆菌 O157:H7、沙门氏杆菌和嗜肺军团菌,检测敏感性分别为  $3 \times 10^3$  CFU/ml、 $3 \times 10^6$  CFU/ml、 $1 \times 10^5$  CFU/ml<sup>[25]</sup>。由此可见,选用病原菌独有的遗传标志性基因对于提高检测的灵敏度和通量具有重要意义。Z0372 基因是 EHEC O157:H7 遗传标志基因,以其为靶标的定量 PCR 可以应用于临床样品 EHEC O157:H7 的检测,尤其可以作为鲜奶样品监测的有力工具。

#### 参考文献:

- [1] MEAD P S. Food-related illness and death in the United States [J]. *Emerging Infectious Disease*, 1999, 5: 607-625.
- [2] 张雪寒, 栾晓婷, 何孔旺, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 *toxB* 基因的分片段克隆和表达 [J]. *江苏农业学报*, 2014, 30(6): 1392-1395.
- [3] RILEY L W, REMIS R S, HELGERSON S D, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype [J]. *The New England Journal of Medicine*, 1983, 308: 510-681.
- [4] SHINAGAWA K, KANEHIRA M, OMOE K, et al. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle at a breeding farm and at a slaughterhouse in Japan [J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 76(3): 305-309.
- [5] 汪 华. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 流行特征和控制对策研究 [J]. *医学研究通讯*, 2005, 34(5): 24-25.
- [6] MARCH S B, RATNAM S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1986, 23: 869-872.
- [7] ZADIK P M, CHAPMAN P A, SIDDONS C A. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 [J]. *J Med Microbiology*, 1993, 39: 155-158.
- [8] GANNON V P, KING R K, KIM J Y, et al. Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58: 3809-3815.
- [9] CEBULA T A, PAYNE W L, FENG P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33: 248-250.
- [10] 李 丽, 张雪寒, 何孔旺, 等. EHEC O157:H7 二重 PCR 的建立及应用 [J]. *华北农学报*, 2011, 26(6): 1-8.
- [11] TEVFIK D M. Real-time PCR [M]. UK: Taylor & Francis Group, 2006: 1-18.
- [12] BACH S J, MCALLISTER T A, VEIRA D M, et al. Transmission and control of *Escherichia coli* O157:H7-A review [J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2002, 8(2): 475-490.
- [13] GANNON V P J, GRAHAM T A, KING I T, et al. *Escherichia coli* O157:H7 infection in cows and calves in a beef cattle herd in Alberta, Canada [J]. *Epidemiology and Infection*, 2002, 29(1): 163-172.
- [14] DEISINGH A K, THOMPSON M. Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods [J]. *Journal Applied Microbiology*, 2004, 96: 419-429.
- [15] GANNON V P, KING R K, KIM J Y, et al. Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58: 3809-3815.
- [16] BARLETTA F. Validation of five-colony pool analysis using multiplex real-time PCR for detection of diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. *Journal Clinical Microbiology*, 2009, 47: 1915-1917.

- [17] LI Y, MUSTAPHA A. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157 : H7, *Salmonella*, and *Shigella* in apple cider and produce by a multiplex PCR [J]. *Journal of Food Protection*, 2004, 67: 27-33.
- [18] LI B, KOCH W H, CEBULA T A. Detection and characterization of the *fimA* gene of *Escherichia coli* O157 : H7 [J]. *Molecular Cellular Probes*, 1997, 1: 397-406.
- [19] DESMARCHELIER P M, BILGE S S, FEGAN N, et al. A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the *rfb* locus encoding O157 lipopolysaccharide [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36:1801-1804.
- [20] SHEN Z, HOU N, JIN M, et al. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* O157 : H7 using immunomagnetic and beacon gold nanoparticles [J]. *Journal of Food Protection*, 2012, 75(8):1373-1381.
- [21] IBEKWE A M, WATT P, GRIEVE C M, et al. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157 : H7 in dairy wastewater wetlands [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002,68:4853-4862.
- [22] KARNS J S, VAN KESSE J S, MCCLUSKY B J, et al. Incidence of *Escherichia coli* O157 : H7 and *E. coli* virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90 (7):3212-3219.
- [23] WU C F, VALDES J J, BENTLEY W E, et al. DNA microarray for discrimination between pathogenic O157 : H7 EDL933 and non-pathogenic *Escherichia coli* strains [J]. *Biosens Bioelectron*, 2003, 19(1):1-8.
- [24] JIN D Z, XU X J, CHEN S H, et al. Detection and identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 and *Vibrio cholera* O139 using oligonucleotide microarray [J]. *Infectious Agent Cancer*, 2007,23(2):1-10.
- [25] WOLTER A, NIESSNER R, SEIDEL M. Detection of *Escherichia coli* O157 : H7, *Salmonella typhimurium*, and *Legionella pneumophila* in water using a flow-through chemiluminescence microarray readout system [J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80 (15):5854-5863.

(责任编辑:张震林)