

文章编号:1002-2694(2004)10-0897-03

免疫捕获 PCR 法快速检测大肠埃希氏 O157 H7 的研究

牛建军¹, 黄建炜¹, 李莉¹, 彭宣宪²

摘要:目的 建立两种免疫捕获 PCR 法快速检测 *E. coli* O157 H7,并探讨其灵敏度和特异性。方法 运用免疫磁珠集菌 (IMS) 和抗体包被扩增管 (mACT) 两种方法富集待测样品中 *E. coli* O157 H7,再应用巢式 PCR 法检测编码 *E. coli* O157 H7 O 抗原的 *rfbE* 基因,对 13 株 *E. coli* O157 菌和 10 株非 *E. coli* O157 菌进行检测。结果 应用两种 icPCR 检测,所有 *E. coli* O157 H7 和 *E. coli* O157:NM 菌株均为阳性结果,而其它包括与 O157 抗血清能交叉凝集的菌株检测结果均为阴性;对于含有 4.8×10^2 cfu/ml 以上浓度的 *E. coli* O157 H7 菌悬液,两种方法,所有试验管都能检测到特异性扩增;并证实了这两种方法可用于检测鲜牛奶中 *E. coli* O157 H7,样品中 *E. coli* O157 H7 的含量只要不少于 10^1 cfu/ml,经过 6 小时增菌均能检测出来。结论 IMS-icPCR 和 mACT-icPCR 用于检测 *E. coli* O157 H7,是快速、灵敏且高特异的方法。

关键词:快速微生物检测;免疫捕获 PCR;病原菌

中图分类号:R378.2 文献标识码:A

Rapid detection of *E. coli* O157 H7 by immunocaptured PCR

NIU Jian-jun¹, HUANG Jian-wei¹, LI Li¹, PENG Xuan-xian²

(Xiamen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Xiamen 361004, China)

ABSTRACT: To develop two methods for the rapid detection of *E. coli* O157 H7 by immunocapture PCR (icPCR) and to investigate their sensitivity and specificity, IMS and mACT were carried out to capture *E. coli* O157 H7 in test samples and the nest PCR was used to detect the *rfbE* gene encoding for the production of lipopolysaccharide O side chain of *E. coli* O157 H7 in 13 strains of *E. coli* O157 H7 and 10 strains of non-*E. coli* O157 H7. It was found that all the strains of *E. coli* O157 H7 and *E. coli* O157 NM showed positive results as determined by these two methods of immunocaptured PCR, whereas other strains, including those cross-reacting with the O157 antisera, showed negative results. Positive detection of *E. coli* O157 H7 was obtainable when the load of organism in the test samples was over 4.8×10^2 cfu/ml. In addition, these two methods could be used for the detection of *E. coli* O157 H7 in fresh milk with 6 hours enrichment, (within 6 hours), when the concentration of this organism was not as few as 10 cfu/ml. It is concluded that IMS-icPCR and mACT-icPCR appear to be the rapid, sensitive and specific methods for the detection of *E. coli* O157 H7 in test samples.

KEY WORDS: rapid microbial detection; immunocapture PCR; pathogens

肠出血性大肠杆菌 (EHEC) O157 H7 是引发出血性结肠炎和溶血性尿毒症的重要病原菌,可经水及食物引起传播、流行和爆发。世界上已发生多次大规模的爆发流行事件,涉及水、家禽家畜肉制品等多种污染源。1999 年我国苏皖两省发生了迄今为止规模最大、时间最长的流行事件。近年来的监测表明 EHEC 的感染多呈散发状态,但如果未及时控制,很可能转化为大规模流行。

对 *E. coli* O157 H7 的检测,传统的细菌分离培养费时费力且效率低下。徐建国、景怀其等通过快速诊断金卡筛选和免疫磁珠集菌 (IMS) 后作细菌

的分离培养,大幅度地降低工作量,提高效率。目前已知有多种细菌^[1~3]与 *E. coli* O157 存在抗原交叉现象,尤其是弗劳地氏枸橼酸杆菌 (*C. freundii*) 可与 O157 抗血清高度交叉凝集,在快诊金卡和 IMS 中无法区别。免疫学检测方法可检测 EHEC 病原菌产生的 SL Ts 等毒素,由于产 SL Ts 毒素的大肠杆菌有很多血清型别,因而无法鉴别是否源于 *E. coli* O157^[4]。PCR 方法快速、敏感,郭喜玲^[5]等应用其检测 *E. coli* O157 菌株的 *slt1*、*slt2*、*eaeA*、*hly*

作者单位:1. 厦门市疾病预防控制中心,厦门 361004;

2. 厦门大学生命科学院

基因,以鉴定菌株的产毒能力。本文采用免疫捕获 PCR 法(Immunocaptured PCR, icPCR),即应用免疫磁珠捕获法和抗体包被微量 PCR 管免疫捕获法富集标本中的 *E. coli* O157 H7,再以 PCR 法快速检测 O157 抗原编码基因,以期更为快速且高灵敏度。

1 材料和方法

1.1 试验菌株 试验菌株均为本实验室近年分离保存,包括 *E. coli* O157 菌株 13 株,以及 *C. freundii* 等非 O157 菌株 10 株,见表 1。试验菌株均以小鼠灌胃进行复壮、分离回收。经复壮回收,具典型的菌落形态、染色特性及生化特征。

1.2 免疫捕获方法的选择与灵敏度检测

1.2.1 免疫磁珠(IMS)捕获 取 13 号菌株 *E. coli* O157 H7(XM02EC003)在营养琼脂 37 °C 18h 的培养物以灭菌 PBST 制成 10^7 cfu/ml 的菌悬液,并以灭菌 PBST 作 10 倍稀释系列至 10^0 cfu/ml,做活菌计数。取 0.1ml 菌悬液加入含 20 μ l 抗 *E. coli* O157 免疫磁珠(Dynal 产品)悬液的 0.2ml PCR 扩增管中,室温孵育 30min(每 5min 轻轻摇动 1 次)后置入 Dynal mpc-M 磁珠架上,待免疫磁珠附于管壁以后吸弃管中液体。以 PBST 洗 2 次后,加入 20 μ l ddH₂O。当免疫磁珠用于捕获标本增菌液时,取 1ml 标本液加入 20 μ l 免疫磁珠悬液于 Eppendorf 管中,经同样处理,最后加入 20 μ l ddH₂O。

1.2.2 抗体包被 PCR 扩增管(McAb-coated Microtube, mACT)作免疫捕获 *E. coli* O157 McAb(中国 CDC 传染病预防控制所,小鼠腹水)盐析法纯化后,配制成 20 μ g/ml 的浓度,取 100 μ l 于 0.2ml PCR 扩增管中 37 °C 3h,再放置 4 过夜,以 PBST 洗 3 次,分别加入 10 倍稀释系列的菌悬液,37 °C 孵育 1h,再同样以 PBST 洗 3 次,扣干残液,加入 20 μ l ddH₂O。

1.2.3 以两种免疫捕获方法对同一菌株重复试验 3 次,每次试验中,高浓度($10^7 \sim 10^4$ cfu/ml)每一稀释度做 5 管,低浓度($10^3 \sim 10^0$ cfu/ml)每一稀释度做 10 管。观察检验方法的灵敏度。

1.3 模板制备与引物 两种免疫捕获方法获得的 20 μ l 标本处理液可于 PE9600 PCR 仪上以 99.9 °C 裂解 10min 或沸水浴裂解 10min,再经 12,000r/min 离心后,以上清液作为 PCR 扩增模板。扩增引物引用 Nathalie Y^[6]文章中 O157 抗原编码基因(stx2e)的巢式扩增引物系列,外围引物 O157AF 5'-AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG-3' 和 O157AR 5'-CAATTGCGATCGTGTGGACAG-3',扩增片段为 497 bp;内侧引物 O157BF 5'-AAATATAAAGGTAAATATGTGGGAACATTTGG-3' 和 O157BR 5'-TGCCCTTTAAAA TGTAACAACGGTCAT-3',扩增片段为 149 bp。两对引物均由上海生工合成。

1.4 PCR 扩增

1.4.1 反应体系 总体积 30 μ l,含 Taq 酶 1u(Promega 公司产品), Mg²⁺ 2.5mmol/L, ddNTP 200 μ mol/L, 引物 0.25 μ mol/L,加入模板量为 20 μ l。

1.4.2 扩增参数 95 °C 变性 5min 后,以 94 °C 45s,54

45s,72 °C 45s 扩增 32 循环,最后以 72 °C 保温 10min。

1.4.3 巢式 PCR 内侧片段的扩增 以外围引物扩增产物作 1,000 倍稀释后作为模板,反应体系和扩增参数不变。

1.4.4 结果观察 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外透射仪观察和拍照电泳结果。

1.5 icPCR 方法特异性试验 取表 1 中 1~13 号 *E. coli* O157 菌株和 14~23 号非 *E. coli* O157 菌株制备 10^7 cfu/ml 菌悬液,分别作 IMS 和 mACT 免疫捕获 PCR 法检测。重复试验三次。

1.6 模拟标本的检测 表 1 中 1~13 号 *E. coli* O157 分别制备 10^5 cfu/ml ~ 10^1 cfu/ml 系列菌悬液,非 *E. coli* O157 菌株制备 10^5 cfu/ml 菌悬液,菌悬液再以鲜牛奶进行 10 倍稀释(V/V),加入菌液的样品再取 1ml 加入 9ml 的 mEC 增菌液中,37 °C 增菌 6h,增菌前后分别取 1ml 用于免疫磁珠捕获法检测和 0.1ml 用于抗体包被管免疫捕获法的检测。

2 结果

2.1 两种免疫捕获 PCR 法检测 *E. coli* O157 H7 的检测限 对于 13 号菌株 $10^0 \sim 10^7$ cfu/ml 的 PBST 菌悬液,以两种方法作免疫捕获后 PCR 检测结果见表 2、图 1、图 2。巢式 PCR 扩增条带长度与引物设计的靶基因片段长度符合,可以认为是特异性扩增。对于 4.8×10^2 cfu/ml 以上浓度的菌悬液,两种方法,所有试验管都能检测到特异性扩增。而对于 3.5×10^2 cfu/ml 的菌悬液,IMS 法 10 管均能检测到特异性扩增带,而 mACT 法只有 4 管检测到特异性扩增带。IMS 法对于 7.2×10^1 cfu/ml,仍有 2 管可检测到特异性扩增带,而 mACT 法则均未检测到。从本次试验来看,两种免疫捕获方法,检测限在 10^2 cfu/ml 左右。两种方法灵敏度略有差异,但尚需加大样本量进一步进行统计学论证。

2.2 方法特异性的检测 *C. freundii* 等 10 株非 *E. coli* O157 菌株用两种免疫捕获 PCR 法检测,结果均为阴性;而 13 株 *E. coli* O157 菌株,包括 O157 H7 和 O157 NM 均可检测到特异性扩增。结果见表 1。

2.3 模拟标本检测结果 非 *E. coli* O157 菌株模拟标本增菌前后,以两种方法检测结果均为阴性。*E. coli* O157 菌株模拟标本的检测结果见表 3。增菌前,终浓度含有 10^3 cfu/ml *E. coli* O157 的模拟标本均能检测出特异扩增,终浓度为 10^1 cfu/ml 的模拟标本中,IMS 法大部分可检出,mACT 法仅有部分可以检测出,IMS 法检出率明显高于 mACT 法(四格表确切概率法, $P < 0.05$),若经过 6h 的选择性增菌,含有 10^1 cfu/ml 的模拟标本均能检测特异扩增,而且 10^0 cfu/ml 的模拟标本以 IMS 法大部分可检出,而 mACT 法只有个别菌株可检出(四格表确切概率法, $P < 0.05$)。

表1 icPCR法菌株及特异性的试验

Tab. 1 Strains tested for the specificity of icPCR and the results

序号 NO.	菌株号 strain ID	血清型别 serotype	基因型 genotype	icPCR result	
				IMS	mACT
1	<i>E. coli</i> L Y1999 - 23	O157 NM	—	+	+
2	<i>E. coli</i> L Y1999 - 25	O157 H7	—	+	+
3	<i>E. coli</i> L Y1999 - 27	O157 H7	—	+	+
4	<i>E. coli</i> L Y1999 - 13	O157 H7	eae, hly	+	+
5	<i>E. coli</i> L Y1999 - 18	O157 H7	hly	+	+
6	<i>E. coli</i> L Y1999 - 20	O157 H7	eae, hly	+	+
7	<i>E. coli</i> L Y01 - 004	O157 NM	—	+	+
8	<i>E. coli</i> L Y E23	O157 NM	—	+	+
9	<i>E. coli</i> L Y E201	O157 H7	—	+	+
10	<i>E. coli</i> XM01 EC001	O157 H7	—	+	+
11	<i>E. coli</i> XM02 EC001	O157 H7	eae, hly	+	+
12	<i>E. coli</i> XM02 EC002	O157 H7	eae, hly	+	+
13	<i>E. coli</i> XM02 EC003	O157 H7	slt1, slt2, eae, hly	+	+
14	<i>Kluyvera</i> XM02066	—	未知(unkown)	-	-
15	<i>S. ariaonal</i> L Y E208	—	未知	-	-
16	<i>C. freundii</i> XM02CF001	—	未知	-	-
17	<i>C. freundii</i> XM02CF002	—	未知	-	-
18	<i>C. freundii</i> XM02CF003	—	未知	-	-
19	<i>S. typhi</i> murium	O2	未知	-	-
20	<i>Y. enterocolitica</i>	O9	未知	-	-
21	<i>S. flexneri</i>	—	未知	-	-
22	EIEC	O4	未知	-	-
23	EPEC	—	未知	-	-

表2 两种 icPCR法检测结果比较

Tab. 2 Detection limit of two icPCR methods

试验次别 Test NO.	菌悬液浓度 Conc. (cfu/ml)	试验管数 (tubes)	icPCR 法检测结果 (icPCR results)			
			IMS 法检出数 (%) Positive tubes (%)		mACT 法检出数 (%) Positive tubes (%)	
	3.5×10^1	20	0	0	0	0
	3.5×10^2	10	10	100	4	40
	3.5×10^3	30	30	100	30	100
	4.8×10^1	20	0	0	0	0
	4.8×10^2	10	10	100	10	100
	4.8×10^3	30	30	100	30	100
	7.1×10^1	20	2	10	0	0
	7.1×10^2	10	10	100	10	100
	7.1×10^3	30	30	100	30	100

表3 两种 icPCR法对 *E. coli* O157 H7 模拟标本检测结果比较Tab. 3 Results of detecting *E. coli* O157 H7 in raw milk by two icPCR methods

模拟标本 含菌终浓度 Conc. (cfu/ml)	检测菌株数 numbers	IMS - icPCR		mACT - icPCR	
		增菌前检出 n (%)	增菌后检出 n (%)	增菌前检出 n (%)	增菌后检出 n (%)
10^4	13	13(100%)	13(100%)	13(100%)	13(100%)
10^3	13	13(100%)	13(100%)	13(100%)	13(100%)
10^2	13	13(100%)	13(100%)	8(61.5%)	13(100%)
10^1	13	11(84.61%)	13(100%)	1(7.69%)	13(100%)
10^0	13	2(15.38%)	12(92.31%)	0(0%)	2(15.38%)

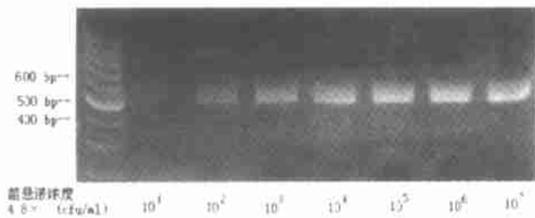


图1 IMS-icPCR外侧引物PCR扩增电泳结果

Fig.1 IMS-icPCR results with outer set of primers

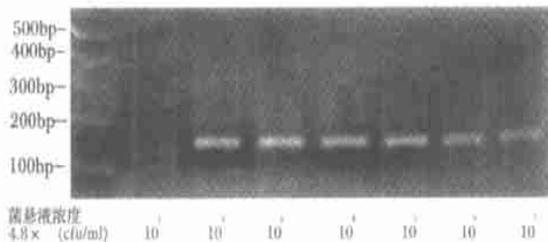


图2 IMS-icPCR内侧引物PCR扩增电泳结果

Fig.2 IMS-icPCR results with inner set of primers

3 讨论

3.1 免疫捕获 PCR 法是一种快速的病原菌检测方法^[7,8]。根据特异性抗体与病原菌菌体抗原特异性结合的免疫学原理,将特异性抗体包被于磁珠或 PCR 管壁上,富集或捕获菌悬液和标本中的病原菌,再进行 PCR 反应,即可检测目标病原菌。捕获所得病原菌,加入适量的 ddH₂O 经过 PCR 仪上 99.9 裂解 10min 或沸水浴裂解 10min,即可作为模板直接进行 PCR 扩增,省却了提取标本细菌总 DNA 的繁琐步骤,操作快捷简便。O157 病原菌检测,基于生化特性的传统培养法约需 72h,而本方法,只需 4~5h,如有必要,亦只需前增菌 6h 以提高灵敏度,故不失为一种快速简便的方法。

3.2 icPCR 方法检测灵敏度取决于抗体捕获效率和 PCR 扩增效率。单克隆抗体的亲和力及纯化程度直接影响微量管壁包被后和免疫磁珠的捕获效率。本文应用免疫捕获 PCR 法检测 *E. coli* O157 H7,其检测限可达 10²cfu/ml,而且通过模拟标本检测试验发现其检测限基本不受加入的模拟标本的干扰,经过 6h 的选择性增菌,其可靠检测限可达 10¹cfu/ml 甚至更低,也就是说只要每 ml 标本中含有数个 *E. coli* O157 H7,就有可能经增菌后检出。

3.3 抗 *E. coli* O157 的 McAb 的特异性以及 PCR 引物的特异性是决定本方法高度特异检测能力的根本因素。近年来编码 *E. coli* O157 H7 O 抗原的 rf-bE 基因已被阐明并被应用于 PCR 法特异地检测

E. coli O157^[9,10],Nathalie. Y^[6]的研究中成熟应用分子信标荧光探针检测 rf-bE 基因,并证实其特异性。本研究引用其巢式 PCR 引物,应用 ic PCR 对 23 株已知细菌进行检测,其中 *E. coli* O157 菌株检测均为阳性结果,而对于非 *E. coli* O157 细菌的检测结果均为阴性。有报告表明,*E. coli* O157 金标快诊卡检测下限可达 100 菌以下,但无法鉴别有交叉菌体抗原的细菌。本研究中部分非 *E. coli* O157 菌株的 O 抗原与 O157 具有交叉反应,尤其是 *C. freundii* 在玻片凝集试验中与 *E. coli* O157 基本无法鉴别,其检测结果也未出现假阳性,显示了本法特异性。

3.4 本文采用的免疫磁珠捕获 (IMS) 和抗体包被 PCR 管 (mACT) 两种免疫捕获方式,前者为均相免疫反应体系,后者为固相免疫反应体系,结果显示两种 icPCR 法的检测限均在 10²cfu/ml 左右,前者检测效率略高于后者,有待加大样本量进一步验证。在模拟标本的检测中发现,两种方法检出率有明显差异,原因可能 IMS 法标本处理量为 1ml,是 mACT 法 (100ul) 的 10 倍,捕获所得的细菌数量更多,利于检测。因此,IMS 法较 mACT 法更适合运用于检测病人标本或食品标本。但 mACT 法,价格低廉,不必具备免疫磁珠与磁珠架。

参考文献:

- [1]Chart H., Jenkins C., Smith H. R., and Rowe B. Strains of *Escherichia coli* belonging to serogroups O157 and O55 express lipopolysaccharides that are structurally distinct and do not share common epitopes. *J. Infect. Dis.* 1998, 178:920 - 921.
- [2]Bettelheim K. A., Evangelidis H., Pearce J. L., Sowers E., and Strockbine N. A. Isolation of *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31:760 - 761.
- [3]Chart H., Cheasty T., Cope D., Gross R. J., and Rowe B. The serological relationship between *Yersinia enterocolitica* O9 and *Escherichia coli* O157 using sera from patients with yersiniosis and haemolytic uraemic syndrome. *Epidemiol Infect.* 1991 Oct; 107(2): 349 - 356.
- [4]Karmali M. A. Infection by verocytotoxin - producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1989, 2:15 - 38.
- [5]郭喜玲, 史智扬, 顾玲, 等. 应用多重引物 PCR 技术检测 O157 H & 毒力基因. *中华流行病学杂志*, 2000, 6(21):
- [6]Nathalie Y. Fortin, Ashok Mulchandani, and Wilfred Chen. Use of real - time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157 H7. *Analytical Biochemistry.* 2001, 289:281 - 288.
- [7]Xuanxian Peng, Wen Luo, Jianying Zhang, etc. Rapid detection of *Shigella* species in environmental sewage by an immunocapture PCR with universal primers. *Applied and Environmental Microbiology.* 2002, May, :2580 - 2583.

(下转第 896 页)

列,结合计算机软件分析,设计了3条以SSUrRNA为扩增靶基因的引物,为了保证引物的特异性,在设计中排除了引物与其它相近原虫和人类基因组相应片段的同源性,并且,在同一个反应体系中,能同时扩增出间日疟原虫和恶性疟原虫感染,以及两者的混合感染,这无疑提高了工作效率,降低了检测成本。为了使3条引物能有效地在同一反应体系中扩增恶性疟原虫和间日疟原虫的两种DNA模板,合理的引物设计很重要。除尽量遵守引物设计的基本原则外,本研究设计了把疟原虫属特异性引物作为间日疟原虫和恶性疟原虫共同的上游引物,以3条引物扩增两个靶片段,降低引物间的相互影响,实验结果表明,此3条引物特异性强,扩增效果满意,减少了引物间的竞争抑制或互补从而降低了检测成本。

许多学者认为在同一个体系中同时扩增两条靶片大段,分子量较小的链比分子量较大的链优先得到扩增,产物间分子量差别愈大这种趋势愈明显^[6]。若产物间分子量差别过小,则难以通过普通的琼脂糖凝胶电泳区分。为有效地解决这一矛盾,本研究分别以分子量差别适中的359bp和449bp的两条链作为恶性疟原虫和间日疟原虫阳性扩增产物,既通过琼脂糖电泳可准确判定原虫种类,又可减少小分子量产物对大分子量产物的竞争抑制。为了进一步证实扩增产物的准确性,还采用限制性内切酶谱分析方法,对扩增产物作了鉴定。在相同的反应条件下,我们分别采用RT-PCR和PCR方法对提取的恶性疟原虫RNA和DNA进行检测,结果发现以RNA为检测对象的RT-PCR产物电泳肉眼可见区带检测水平明显较以DNA为检测对象的PCR高,这与Engstrand等^[7]报道用rRNA基因引

物对螺旋杆菌16srRNA RT-PCR扩增比PCR扩增检测敏感性提高50倍的结果相类似,表明PT-PCR方法检测敏感性高于PCR方法。

本研究在国内首次报道了用PT-PCR方法检测疟疾流行区现场采集的疟患者血样,通过对方法的改进和完善,进一步缩短了反应时间,简化了操作步骤。从检测的结果来看,RT-PCR方法和常规镜检阳性符合率达96.09%,而阳性检出率较后者高。综上所述,本研究所建立的RT-PCR检测疟疾体系具有特异性强,敏感性高,对疟疾诊断、镜检质量控制和流行病学调查研究具有较大的实用价值。

参考文献:

- [1] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989: 9~20.
- [2] Water AP, Mccutchan TF. Rapid, sensitive diagnosis malaria based on ribosomal RNA [J]. *Lancet*, 1989, 1343: 1346.
- [3] Chomeyuski. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples [J]. *BioTechniques*, 1993, 15(3): 532-536.
- [4] Mc Cutchan TF, Cruz VF, Lal AA et al. Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1988, 28: 63-68.
- [5] Goman M, Mons B, Scaife J, et al. The complete sequence of *Plasmodium malariae* SSUrRNA gene and its comparison to other *Plasmodium* SSUrRNA genes [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1991, 45: 281-288.
- [6] Cohman H, Ajioka JW, Garza D, et al. Inverse polymerase chain reaction [J]. *Biotechnology* 1990, 8: 759-762.
- [7] Engstrand L, et al. Reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of rRNA for detection of *Helicobacterium* species [J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(2): 2295-3301.

收稿日期:2003-12-01;修回日期:2004-01-28

(上接第900页)

- [8] Harper G, G. Dahal, G. Thottappilly, etc. Detection of episomal banana streak badnavirus by IC-PCR. *J. Virol. Methods*. 1999, 79: 1-8.
- [9] Desmarchelier P. M., Bilge S. S., Fagan N., etc. A PCR specific for

Escherichia coli O157 based on the rfb locus encoding O157 lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36: 1801-1804.

- [10] Nagano I., Kunishima M., Itoh Y., etc. Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 H7 by multiplex polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 1998, 42: 371-376.

收稿日期:2004-04-17;修回日期:2004-07-20