

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.02.018

某屠宰场大肠杆菌 O26 的分离与鉴定

Isolation and identification of *Escherichia coli* O26 from a slaughter house

付文静¹ 董晨² 禹金龙¹ 胡洁¹ 江芸¹FU Wen-jing¹ DONG Chen² YU Jin-long¹ HU Jie¹ JIANG Yun¹

(1. 南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏 南京 210097; 2. 江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210097)
(1. School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210097, China; 2. Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210097, China)

摘要: 为了了解屠宰场大肠杆菌 O26 污染情况, 参考美国农业部 (United States Department of Agriculture, USDA) 的检测方法, 对样品进行选择性的增菌, 经免疫磁珠富集、选择性显色培养基 mRainbow Agar 分离纯化后, 挑选可疑菌株采用 PCR 方法鉴定 O 抗原, 进一步采用血清凝集试验进行验证, 并对确认的阳性菌株采用多重 PCR 方法进行毒力基因 (*stx1*、*stx2*、*eae*、*hly*) 检测。结果表明, 采集的 120 份样品中共分离到 1 株大肠杆菌 O26, 但上述 4 种毒力基因均为阴性。该屠宰场存在大肠杆菌 O26 的污染, 但分离出的大肠杆菌 O26 没有携带毒力基因。

关键词: 大肠杆菌 O26; 屠宰场; 污染; 毒力基因

Abstract: *Escherichia coli* O26 was isolated and identified from a slaughter plant in order to investigate its contamination of *E. coli* O26. According to USDA detection method, samples were enriched with immunomagnetic separation (IMS) after selective enrichment, and then isolated and purified with selective chromogenic mRainbow agar. Subsequently, the suspected colonies were screened and chose to test the O antigen by PCR and followed by the serum agglutination test. The virulence genes (*stx1*, *stx2*, *eae* and *hly*) of positive isolations were detected by multiplex PCR. The results showed that only one strain from 120 samples was identified as *E. coli* O26, however the four virulence genes were found negative. Our results indicated that the *E. coli* O26 contamination existed in this slaughter house, but these positive bacterium strains did not carry virulence genes.

Keywords: *Escherichia coli* O26; slaughter house; contamination; virulence genes

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 31671915); 江苏省“六大人才高峰”项目 (编号: NY-080)

作者简介: 付文静, 女, 南京师范大学在读硕士研究生。

通信作者: 江芸 (1971—), 女, 南京师范大学教授, 博士。

E-mail: jiangyun@njnu.edu.cn

收稿日期: 2018-10-09

与人类疾病相关的产志贺毒素大肠杆菌 (shiga toxin *Escherichia coli*, STEC) 最主要的血清型是大肠杆菌 O157:H7^[1-2]。然而, 近年来, 关于非 O157 STEC, 尤其是“big six” STEC (O26、O45、O103、O111、O121、O145) 暴发事件的报道逐渐增多, 国外尤其是发达国家对“big six” STEC 的关注度越来越高。由于其传染剂量低, 且相关的疾病暴发病例数量多, 自 2012 年美国农业部食品安全检验局 (USDA-FSIS) 宣布这 6 个主要血清型为生肉、绞碎牛肉和牛肉产品的必检病原体^[3]。向美国出口牛肉的设施必须符合 FSIS 制定的标准, 以防止产品掺入 STEC 细菌^[4-6]。因此, 了解非 O157 大肠杆菌的污染情况、采取有效防控措施是当下迫切需要解决的问题。

国外相关报道^[6-8]表明 O26 是非 O157 大肠杆菌中最主要的血清型, 已成为美国、亚洲、欧洲等 STEC 食源性感染的第二大常见原因。据美国疾病预防控制中心 2010 年报告^[9], 在非 O157 STEC 感染事件中, 患病率从高到低依次为 22% O26、16% O111、12% O103、8% O121、7% O45 和 5% O145。O26 STEC 可导致人类的广泛感染, 从轻度腹泻到出血性结肠炎 (HC), 在某些情况下导致溶血性尿毒症综合征 (HUS)^[10]。O26 感染暴发可发生在牛肉、与牛接触的农产品和人对人传播^[11-12]。反刍动物, 尤其是牛, 是 O157 和非 O157 STEC 的主要污染源^[13], 通过粪便排泄到环境, 进而可污染水、新鲜农产品、牛肉及其制品。牛的屠宰加工与分割是牛肉质量最初的保证环节, 决定着储藏前分割牛肉的产品质量, 也是后续加工的基础。然而牛肉在屠宰加工中会受到来自于空气、水、粪便、皮毛、内脏、淋巴结、工具、容器和屠宰操作者等各个方面带来的微生物的污染, 污染的方式和程度主要取决于加工和处理方法的卫生控制措施及储藏和配给环境等。目前中国对非 O157 的研究尚较少^[14]。本试验拟以非 O157 大肠杆菌中最主要的血清型 O26 为对象, 选择某规范化牛屠宰场, 对屠宰过程中牛胴体及环境

样品进行大肠杆菌 O26 的分离与鉴定,以了解其污染状况,以期为非 O157 大肠杆菌的食品安全和风险评估提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 材料与amp;试剂

大肠杆菌 O157:H7(编号 CICC21530):中国工业微生物菌种保藏管理中心;

大肠杆菌 DH5 α ,1 株大肠杆菌 O26 阳性菌 DNA 全基因组:江苏省疾病预防控制中心;

改良胰蛋白胨大豆肉汤(modified tryptic soy broth, mTSB)、胰蛋白胨大豆琼脂(tryptone soya agar, TSA)、酵母浸粉(yeast extract)、亚碲酸钾、头孢克肟、P-10A 新生霉素、P-10B 新生霉素:北京路桥技术有限公司;

TaqTM (with Mg²⁺ free buffer)、100 bp DNA Marker:大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司;

Qiagen multiplex PCR kit:德国 Qiagen 公司;

琼脂糖:北京天根生化科技有限公司;

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、4S Red 染料:上海生工生物科技有限公司;

Rainbow agar 培养基:美国 BIOLOG 公司;

免疫磁珠试剂盒:美国 Romer labs[®]公司;

O26 抗原血清:日本生研公司;

所有引物均由上海生工生物科技有限公司合成。

1.1.2 主要仪器设备

PCR 仪:Mastercycler personal 型,德国 Eppendorf 公司;

凝胶成像仪:GelDoc 2000 system 型,美国 BioRad 公司;

高速离心机:TCL-16G 型,上海安亭仪器厂;

琼脂糖凝胶电泳仪:DYY-2C 型,上海天能科技有限公司;

生物安全柜:SG403A Sterile GDRD 型,美国 Baker 公司;

生化培养箱:SHP-150 型,上海新苗医疗器械制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 采样方法 选择安徽省某规范化牛屠宰场,对屠宰过程中牛胴体及环境样品进行大肠杆菌 O26 的分离与鉴定,不同部位采样均采用无菌棉签涂抹方法。

(1) 牛胴体表面采样:本次共屠宰 15 头牛,试验随机选择其中 5 头牛胴体进行表面采样。对胴体内外表面分散在 8~10 个不同部位采样,均匀揩抹 3 次,迅速剪断棉签头落入装有 25 mL 已灭菌生理盐水的采样管中,每个部位用 3~5 支棉签。

(2) 刀具采样:用灭菌棉签蘸灭菌生理盐水后在刀的两面从刀尖涂抹到刀把,分别用 6 只棉签涂抹到整个刀片,迅速剪断棉签头,使之落入装有 25 mL 生理盐水的采样管中。

(3) 工人手采样:工人五指并拢,用 3 支蘸湿灭菌生理盐水的棉签在左右手,往返涂擦,剪去棉签头,装入含 25 mL 灭菌生理盐水的采样管内。

(4) 污水及血水采样:用一次性无菌吸管吸取 30 mL 污水(血水)样品放入灭菌 50 mL 采样管中。

1.2.2 样品前增菌 采集的样品在 24 h 内进行增菌处理,参考美国农业部方法及 Svoboda 等^[15-16]的方法,稍作调整,进行增菌培养:将采集的样品及生理盐水放入均质袋中,均质 2~3 min,取 10 mL 均质液加入到含有 40 mL mTSB 的均质袋中,于 37 °C,220 r/min 摇床中培养 22 h。

1.2.3 免疫磁珠法分离大肠杆菌 O26 增菌后取 1 mL 的样品于 1.5 mL 离心管中,同时加入 50 μ L 免疫磁珠。短暂涡旋混合,在室温下摇动样品 15 min 后,将样品管放置在磁分离架上 5 min,使得磁珠吸在管壁上,弃去悬浮液;加入已灭菌的 0.05% Tween20 PBS 溶液 1 mL 重悬,重复上述步骤 3 次;最后用 1 mL 洗涤缓冲液重建样品,涡旋混合。处理后的样品取 100 μ L 涂布于改良 Rainbow agar 培养基(modified rainbow agar, mRBA,添加 0.05 mg/L 头孢克肟,0.15 mg/L 亚碲酸钾,5.0 mg/L 新生霉素),在 37 °C 培养 24~36 h,按照 mRBA 说明书及美国农业部指导说明,挑取特征颜色的菌落,在 mRBA 培养基上继续划线,经 3 次分离纯化,挑取单菌落划线于非选择性培养基 TSA-YE 上保存,以待进一步鉴定。

1.2.4 细菌基因组 DNA 提取 采用煮沸法提取细菌基因组 DNA^[17]。将可疑菌株挑一环于 150 μ L 灭菌双蒸水中,涡旋,充分混匀。99 °C 水浴处理 10 min,冰浴 2 min,12 000 $\times g$ 离心 2 min,吸取上清即为细菌基因组 DNA, -20 °C 冻存备用。

1.2.5 PCR 检测 O26 及血清凝集试验 O26 血清型鉴定用引物参考 Machado 等^[18](表 1)。PCR 反应体系为 25 μ L,包括 1 μ L 模板,PCR Master Mix 12.5 μ L,O26 上、下游引物(浓度均为 10 μ mol/L)各 0.8 μ L,不足部分用水补齐。PCR 反应条件:95 °C 预变性 15 min;94 °C 变性 30 s,61 °C 退火 1.5 min,72 °C 延伸 1.5 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增后的 PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。对 PCR 阳性的菌株,采用 O 血清凝集试验进行验证。

1.2.6 多重 PCR 毒力基因检测 大肠杆菌 O26 血清型阳性的菌株采用多重 PCR 进行 *stx1*、*stx2*、*eae*、*hly* 4 种毒力基因携带情况检测。引物序列如表 1 所示。PCR 反应体系为 25 μ L:10 \times PCR buffer 5 μ L,dNTP 4 μ L,MgCl 5 μ L,4 对引物(10 μ mol/L)mix 9.4 μ L,Taq 酶 0.25 μ L,

表 1 PCR 引物序列及扩增长度

Table 1 The PCR primer sequence and amplification length

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段长度/bp	参考文献
O26-F	CAATGGGCGGAAATTTTAGA	155	[18]
O26-R	ATAATTTTCTCTGCCGTCGC		
stx2-F	CCATGACAACGGACAGCAGTT	779	[18]
stx2-R	CCTGTCAACTGAGCACTTTG		
stx1-F	ACACTGGATGATCTCAGTGG	614	[19]
stx1-R	CTGAATCCCCCTCCATTATG		
eae-F	AAGCGACTGAGGTCCT	450	[20]
eae-R	ACGCTGCTCACTAGATGT		
hly-F	CACACGGAGCTTATAATATTCTGTCA	340	[20]
hly-R	AATGTTATCCCATTCGACATCATTGACT		

DNA 模板 1 μL, 不足部分用水补齐。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 7 min; 94 °C 变性 40 s, 56 °C 退火 40 s, 72 °C 退火 40 s, 25 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 数据处理

采用 Excel 进行数据处理, 进一步计算污染率。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌 O26 的检出率

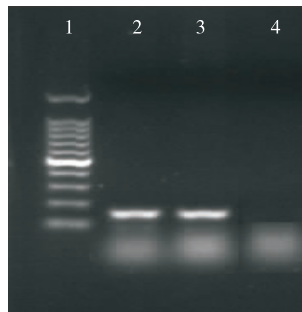
共收集了该屠宰场 120 份样品, 包括地面样品 3 份、血水样品 4 份、污水样品 8 份、工具样品 17 份、工人手样品 7 份、红内脏样品 16 份、白内脏样品 16 份、胃内容物样品 2 份、胴体样品 45 份、肉品残渣样品中 2 份(表 2)。各样品经前增菌、免疫磁珠富集、选择性培养基 mRBA 分离纯化后, 挑取可疑菌落采用煮沸法提取 DNA, 进行 O26 血清型的 PCR 检测(图 1), 结果仅扩增到 1 株阳性菌株。进一步对该菌株进行 O 血清凝集试验, 结果如图 2 所示, 阳性对照菌与标准 O26 抗原血清发生了显著凝集, 阴性对照菌未发生凝集, 而待测菌株发生了显著凝集, 表明该菌株确证为 O26。结果显示, 屠宰场 120 份样品中仅鉴定出 1 株 O26, 该菌株分离自胴体样品, 其他样品均未检测到 O26。进一步计算胴体中污染率为 2.22%(1/45), 总污染率为 0.83%(1/120)(表 2)。

目前国际上关于非 O157 污染调查已有较多报道。Bosilevac 等^[21]调查发现 5 个牛肉加工厂 O26 STEC 的检出率为 23.4%。Molini 等^[22]对纳米比亚屠宰场调查结果显示, O26 STEC 的检出率为 10.43%。Svoboda 等^[16]调查美国 7 个小型和超小型牛肉加工厂, 在胴体样本中的大肠杆菌 O26 的检出率为 4.9%。在伊朗, 340 份零售牛肉中 O26 STEC 的检出率为 3.23%^[23]。然而, Arthur 等^[24]调查了美国牛肉加工厂, 发现从牛胴体没有分离到大肠杆菌 O26。Thomas 等^[25]关于爱尔兰牛中非 O157

调查, 亦未从胴体样品中检出大肠杆菌 O26。近期, 本课题组^[26]还从 49 份零售牛肉中分离出 2 株大肠杆菌 O26, 阳性率为 4.1%。上述报道结果并不完全一致, 本试验阳性检出率亦较低, 这可能与环境、饲养、管理、屠宰工艺等多种因素有关。

2.2 多重 PCR 检测毒力基因

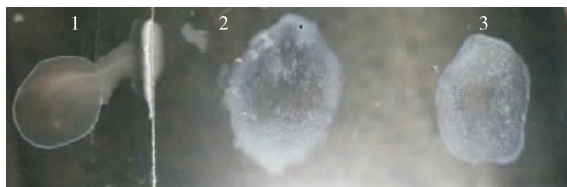
大肠杆菌导致人类疾病与其携带的毒力基因密切相关, 如 *stx*、*eae*、*hly* 等^[27], 其致病机理往往是多种毒力因子共同作用的结果。其中最主要的毒力因子是志贺毒素



1. 100 bp ladder Marker 2. 阳性对照 3. 阳性分离株 4. 空白对照

图 1 阳性分离株 O26 血清型的 PCR 鉴定结果

Figure 1 PCR amplification for *E. coli* O26 antigen of one positive isolate



1. 阴性对照 2. 阳性分离株 3. 阳性对照

图 2 阳性分离株 O26 型的血清凝集试验

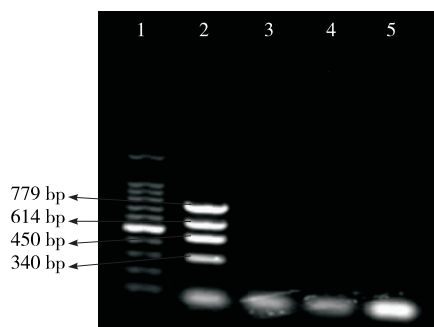
Figure 2 Serum agglutination test of O26-serotype of one positive isolate

表 2 大肠杆菌 O26 在各个取样点的污染情况

采样点	阳性样品/总样本	污染率/%
地面	0/3	0.00
血水	0/4	0.00
污水	0/8	0.00
工具	0/17	0.00
工人手	0/7	0.00
红内脏	0/16	0.00
白内脏	0/16	0.00
胃内容物	0/2	0.00
胴体	1/45	2.22
肉品残渣	0/2	0.00
总计	1/120	0.83

Stx, 包括 Stx1 和 Stx2, 研究^[28]发现只产 Stx2 的菌株相对于只产 Stx1 和既产 Stx2 又产 Stx1 的菌株具有更强的致病性。由 *eae* 基因编码的紧密素, 可引起肠粘膜的“粘附和消除”(attaching and effacing) 损伤^[29]。*hly* 基因编码的肠溶血素能够在宿主靶细胞膜上形成孔道, 进而杀死宿主靶细胞。由 *eae* 编码的紧密素和 *hly* 编码的肠溶血素已被用作致病性 STEC 的可能流行病学标志物^[30-31]。

本试验采用多重 PCR 方法对上述大肠杆菌 O26 阳性分离株检测其毒力基因 (*stx1*、*stx2*、*eae*、*hly*), 其中以大肠杆菌 O157:H7 CICC21530 为阳性对照, 以大肠杆菌 DH5 α 为阴性对照, 结果如图 3 所示。阳性菌株 CICC21530 成功扩增出了 4 条阳性条带, 而该阳性分离株未扩增出阳性条带, 即它不携带上述 4 种毒力基因。



1. 100 bp ladder Marker 2. 阳性对照 3. 阴性对照 4. 阳性分离株 5. 空白对照

图 3 大肠杆菌 O26 阳性菌株 4 种毒力基因多重 PCR 电泳图

Figure 3 Multiplex PCR amplification of four virulence genes of the positive *E. coli* O26 isolate

3 结论

本试验调查了某牛屠宰场大肠杆菌 O26 的污染情况, 采集的 120 份样品仅从牛胴体样品中分离到 1 株大肠杆菌 O26, 阳性率为 0.83%, 其中胴体检出率为 2.22%。毒力基因的多重 PCR 结果显示该株大肠杆菌 O26 不携带 *stx1*、*stx2*、*eae*、*hly* 基因。本试验表明该牛屠宰场大肠杆菌 O26 的污染水平较低。本次调查检出率低且未分离到有毒菌株, 可能与调查样本小有较大关系, 为了更全面反映中国 O26 等非 O157 大肠杆菌污染情况, 应加强和加大对该类致病菌的调查研究, 进而为中国今后相关标准的制订和非 O157 大肠杆菌的有效监控提供科学依据。

参考文献

- [1] CHAVES B D, MILLER M F, MARADIAGA M, et al. Evaluation of process control to prevent contamination of beef with non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in U. S. export abattoirs in Honduras and Nicaragua [J]. Food Protection Trends, 2013, 33(4): 224-230.
- [2] USDA-FSIS. Compliance guidelines for establishments on the FSIS microbiological testing program and other verification activities for *Escherichia coli* O157: H7 [S]. Washington, DC: United States Department of Agriculture Food Safety Inspection Service, 2004: 1-16.
- [3] USDA-FSIS. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in certain raw beef products [S]. Washington, DC: United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service, 2012: 31 975-31 981.
- [4] USDA-FSIS. Process for evaluating the equivalence of foreign meat, poultry, and egg products food regulatory systems [S]. [S. l.]: United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service, 2011: 1-16.
- [5] USDA-FSIS. Ongoing equivalence verifications of foreign food regulatory systems [S]. [S. l.]: United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service, 2015: 26 524-26 527.
- [6] ETHELBERG S, SMITH B, TORPDAHL M, et al. Outbreak of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection from consumption of beef sausage [J]. Clinical Infectious Diseases, 2009, 48(8): 78-81.
- [7] CHASE-TOPPING M E, ROSSER T, ALLISON L J, et al. Pathogenic potential to humans of bovine *Escherichia coli* O26, Scotland [J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18: 439-448.
- [8] JIANGIANG Y, YIN S, DUDLEY E G, et al. Diversity of CRISPR loci and virulence genes in pathogenic *Escherichia coli* isolates from various sources [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 204(1): 41-46.

- [9] KARMALI M A, GANNON V, SARGEANT J M, et al. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC)[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(3/4): 360-370.
- [10] BIELASZEWSKA M, PRAGER R, KCK R, et al. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2007, 73(10): 3 144-3 150.
- [11] BIELASZEWSKA M, MIDDENDORF B, KOCK R, et al. Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, 47(2): 208-217.
- [12] SUBELZU N, BARTESAGHI S, BEM A D, et al. Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 based on single-nucleotide polymorphisms[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2013, 5(10): 1 807-1 816.
- [13] ERICKSON M C, DOYLE M P. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*[J]. *Journal of Food Protection*, 2007, 70: 2 426-2 449.
- [14] 夏诗琪, 赖卫华, 刘道峰, 等. O26 等产志贺毒素的 6 种血清型大肠杆菌的暴发流行情况及检测研究现状[J]. *食品科学*, 2014, 35(17): 301-305.
- [15] LQAS/FSIS. Detection and isolation of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from meat products and carcass and environmental sponges; MLG 5B. 04[S]. Washington, DC: United States Department of Agriculture Food Safety Inspection Service, 2013: 1-16.
- [16] SVOBODA A L, DUDLEY E G, DEBROY C, et al. Presence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O-groups in small and very-small beef-processing plants and resulting ground beef detected by a multiplex polymerase chain reaction assay[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2013, 10(9): 789-795.
- [17] DEBROY C, ROBERTS E, VALADEZ A M, et al. Detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O45, O103, O111, O113, O121, O145, and O157 Serogroups by multiplex polymerase chain reaction of the *wzx* gene of the O-antigen gene cluster[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2011, 8(5): 651-653.
- [18] MACHADO J, GRIMONT F, GRIMONT P A. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene[J]. *Research in Microbiology*, 2000, 151(7): 535-546.
- [19] WANG Y, AMETAJ B N, AMBROSE D J, et al. Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*[J]. *Biomed Central Microbiology*, 2013, 13(1): 1-11.
- [20] 郭喜玲, 史智扬, 顾玲, 等. 应用多重引物 PCR 技术检测 O157:H7 毒力基因[J]. *中华流行病学杂志*, 2000, 21(6): 410-412.
- [21] BOSILEVAC J M, WANG R, LUEDTKE B E, et al. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* on veal hides and carcasses[J]. *Journal of Food Protection*, 2017, 80(1): 136-145.
- [22] MOLINI U, KAMWI S K, KHAISEBB S, et al. Detection of non O157:H7 shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serogroups O26, O45, O103, O111, O121 and O145 from beef trim in Namibia [J]. *Biological and Chemical Research*, 2016, 7: 288-294.
- [23] MOMTAZ H, SAFARPOOR D F, RAHIMI E, et al. Incidence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in ruminant's meat [J]. *Meat Science*. 2013, 95(2): 381-388.
- [24] ARTHUR T M, BARKOCY-GALLAGHER G A, RIVERA-BETANCOURT M, et al. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 4 847-4 852.
- [25] THOMAS K M, MCCANN M S, COLLERY M M, et al. Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 153(3): 288-296.
- [26] 禹金龙, 董晨, 王娴静, 等. 牛源性非 O157 大肠杆菌的分离与鉴定[J]. *食品科学*, 2018, DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201904000.
- [27] SON I, BINET R, LIN A, et al. Identification of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* genes by Luminex microbead-based suspension array [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 111: 108-110.
- [28] BOERLIN P, MCEWEN S A, BOERLIN-PETZOLD F, et al. Associations between virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(3): 497-503.
- [29] MCKEE M L, O'BRIEN A D. Investigation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal *E. coli*[J]. *Infection and Immunity*, 1995, 63(5): 2 070-2 074.
- [30] OSWALD E, SCHMIDT H, MORABITO S, et al. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68: 64-71.
- [31] LAW D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other shiga toxin-producing *E. coli*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(5): 729-745.