

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)20-0109-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.20.024



PCR 法快速鉴定小儿咳喘灵颗粒中大肠埃希菌*

金昊嵩, 赵中开, 胡 凤[△], 韩志双

(四川省自贡检验检测院, 四川 自贡 643000)

摘要:目的 建立快速鉴定药品中大肠埃希氏菌的聚合酶链反应(PCR)法。方法 以小儿咳喘灵颗粒为试验样本,选择22种(共24株)实验室常见菌株,提取样品增菌液中菌株DNA,采用PCR法对目标基因uidA、ipaH、invE进行检测,分析方法的可行性和可靠性,并通过与传统生化鉴定方法比较以考察其特异性。结果 PCR法通过3种基因检测结果的不同组合,能快速准确筛查出供试液中大肠埃希菌,特别是可有效区分大肠埃希菌及其同源性较高的志贺菌。结论 与传统微生物鉴定方法相比,PCR法在特异性和鉴定效率方面均有较大优势,可应用于采用直接接种法的药品微生物限度大肠埃希菌的快速鉴定。且单一基因检测无法区分时,可加入多种基因,一次检测即可获得满意效果。

关键词:基因检测;小儿咳喘灵颗粒;大肠埃希菌;聚合酶链反应;快速鉴定

Rapid Identification of *Escherichia Coli* in Xiaoer Kechuanling Granules by PCR Method

JIN Haosong, ZHAO Zhongkai, HU Feng, HAN Zhishuang

(Zigong Inspection and Testing Institute, Zigong, Sichuan, China 643000)

Abstract: Objective To establish a polymerase chain reaction (PCR) method for rapid identification of *Escherichia coli* in drugs. **Methods** With Xiaoer Kechuanling Granules as the test samples, 22 common laboratory strains (24 strains in total) were selected to extract DNA in the enrichment medium. The target genes uidA, ipaH and invE were tested by the PCR method, the feasibility and reliability of the method was analyzed, and its specificity was investigated by comparison with that of traditional biochemical identification method. **Results** Based on different combinations of testing results of the three genes, the PCR method could quickly and accurately screen for *Escherichia coli* in the test solution, especially distinguishing *Escherichia coli* and its highly homologous *Shigella* species effectively. **Conclusion** Compared with traditional microbial identification method, the PCR method is specific and efficient, which can be used to the rapid identification of *Escherichia coli* in the microbial limit test of drugs by direct inoculation. When a single gene testing cannot be distinguished, we can add multiple genes and obtain satisfactory results by a single testing.

Key words: gene testing; Xiaoer Kechuanling Granules; *Escherichia coli*; polymerase chain reaction; rapid identification

小儿咳喘灵颗粒常用于治疗儿童哮喘、支气管炎等疾病^[1],属《中国药典》规定的非无菌不含药材原粉的中药口服固体制剂。依据2020年版《中国药典(四部)》微生物限度规定,大肠埃希菌属该品种项下最基本的微生物控制菌检测项目。大肠埃希菌为革兰阴性兼性厌氧杆菌,是人和动物肠道中的正常栖居菌,同时也是一种条件致病菌,其某些血清型能产生肠毒素,具有致病性。该菌在临床的感染率和耐药性均较高,已成为威胁患者健康的常见病原菌^[2]。2015及2020年版《中国药典》均提到,分离纯化可疑菌后应使用适宜的鉴定试验确证是否为大肠埃希菌,但未具体规定选用何种鉴定方法。大肠埃希菌属常规鉴定主要采用生化反应法,如4-甲基伞形酮葡萄糖酸酐(MUG)试验、靛基质(吲哚)试验和IMViC试验^[3][为靛基质(I)试验、甲基红(MR)试验、乙酰甲基甲醇生成(VP)试验、枸橼酸盐利

用(C)试验等的合称]。本研究中拟采用聚合酶链反应(PCR)法,优先选择大肠埃希菌的特征基因uidA进行检测。该基因参与编码 β -D-葡萄糖醛酸酶,有相对特异性,已用于检测大肠埃希菌的众多表型和分子分析^[4-5],但查阅文献^[6]和试验结果发现,部分志贺菌属的uidA基因检测结果也可能为阳性。侵袭性质粒抗原H基因(ipaH基因)为负责上皮细胞渗透和细胞间传播的关键,在志贺菌的染色体和质粒上存在多个拷贝^[7]。目前已将该基因作为检测靶点运用于志贺菌的快速检测^[8]。但其也是肠道侵袭性大肠埃希菌(EIEC)的特征基因,该基因检测无法准确区分志贺菌和EIEC^[9]。故又加入侵袭性质粒调节基因(invE),该基因在EIEC检验中与ipaH基因等效^[10],可作为EIEC特征基因进行检测。根据3种基因检测结果共同判定,为菌属的快速鉴定提供参考。现报道如下。

*基金项目:四川省药品监督管理局科技计划项目[2021006]。

第一作者:金昊嵩,男,大学本科,高级工程师,研究方向为微生物检测,(电子信箱)27945406@qq.com。

[△]通信作者:胡凤,女,硕士,高级工程师,研究方向为药品、化妆品及保健食品检验,(电子信箱)78717313@qq.com。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LightCycler96型PCR仪(瑞士Roche公司);EPS-600型电泳仪、Tanon-3500型数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

1.2 材料

药品:选用小儿咳喘灵颗粒^[11](相关信息见表1)。

表1 药品相关信息

Tab.1 Relevant information of drugs

厂家	批号	国药准字
太极集团四川南充制药有限公司	20210006	Z51022096
四川恩威制药有限公司	230504	Z20054893
太极集团四川绵阳制药有限公司	2103005	Z51020284
太极集团重庆中药二厂有限公司	2109003	Z50020437
四川旭阳药业有限公司	190501	Z51020308

试剂:Premix Ex Taq HS预混液(宝日医生物技术有
限公司,批号为AKG2211A)、10×Loading Buffer、Marker
DL500(宝日医生物技术有
限公司,批号为AJE1680A);
琼脂糖、50×TAE缓冲液、Marker DL2000(生工生物工
程股份有限公司,批号分别为H902BA0030,
G612KA5970,G701KA6075);4S GelRed 核酸染料(BBI
生命科学有限公司,批号为H809KA1140);胰酪大豆胨
液体培养基(TSB,批号为1114012)、肉桂基硫酸盐胰蛋
白胨(MUG)肉汤培养基(LST-MUG,批号为
1094511)、脑心浸出液肉汤(BHI,批号为1101561),均
购自广东环凯微生物科技有限公司;大肠杆菌IMViC生
化鉴定管(青岛海博生物技术有
限公司,批号为
20220225);水为无菌水。

菌株:22种(24株)试验菌株相关信息见表2。其中,
b,m菌株来源于中国食品药品检定研究院(m菌株为其
行沙门能力验证样品分离获得);o-s,u,x菌株来源于为
中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC);其余菌株均
来源于广东环凯微生物科技有限公司。ETEC为产肠毒素
大肠埃希菌;EHEC为肠道出血性大肠埃希菌;EIEC为
肠道侵袭性大肠埃希菌;EPEC为肠道致病性大肠埃希
菌;EAEC为肠道集聚性大肠埃希菌。志贺菌属根据其
生化和血清学特征分为痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏
志贺菌和宋内氏志贺菌。

引物:参考文献[10],确定uidA,ipaH,invE基因的
引物序列,委托宝日医生物技术有
限公司合成,用Tris-
EDTA(TE)缓冲液稀释至工作浓度(分别为5,5,
2.5 μmol/L)。引物序列信息见表3。

2 方法与结果

2.1 PCR 试验

2.1.1 方法

供试液制备:取菌株样品各适量,分别接种至BHI

表2 试验菌株

Tab.2 Test bacterial strains

代号	菌株名称	菌株编号	代号	菌株名称	菌株编号
a	大肠埃希菌	CMCC(B) 44103	m	奇异变形杆菌	
b	大肠埃希菌	ATCC 25922-F ₃ -7	n	大肠埃希菌 O157:H7	NCTC 12900
c	乙型副伤寒沙门菌	CMCC(B) 50094	o	ETEC	CICC 24190
d	铜绿假单胞菌	CMCC(B) 10104	p	EHEC	CICC 24187
e	金黄色葡萄球菌	CMCC(B) 26003	q	EIEC	CICC 24188
f	产气肠杆菌	ATCC 13048	r	EPEC	CICC 24189
g	单核细胞增生李斯特菌	CMCC(B) 54002	s	EAEC	CICC 24186
h	小肠结肠炎耶尔森菌	CMCC(B) 52204	t	福氏志贺菌	CMCC(B) 51572
i	粪肠球菌	ATCC 29212	u	福氏志贺菌	CICC 21534
j	弗氏柠檬酸杆菌	ATCC 43864	v	宋内氏志贺菌	CMCC(B) 51592
k	蜡样芽孢杆菌	CMCC(B) 63303	w	痢疾志贺菌	CMCC(B) 51105
l	乙型溶血性链球菌	ATCC 21059	x	鲍氏志贺菌	CICC 21680

表3 引物序列

Tab.3 Primer sequences

引物 名称	引物序列	终浓度 (μmol/L)	产物长度 (bp)
uidA-F	5'-ATGCCAGTCCAGCGTTTTTTC-3'	0.2	1487
uidA-R	5'-AAAGTGTGGTCAATAATCAGGAAGTG-3'		
ipaH-F	5'-TTGACCGCCTTCCGATACC-3'	0.1	647
ipaH-R	5'-ATCCGCATCACCCTCAGAC-3'		
invE-F	5'-CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG-3'	0.2	766
invE-R	5'-CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAG-3'		

培养基,36℃培养24h得增菌液,用生理盐水稀释成含
菌量约100 cfu/mL的菌悬液。称取样品10g,置100 mL
TSB中充分溶解,制成1:10(m/V)的供试品溶液,再分
别加入菌悬液1 mL,36℃培养24h。

DNA提取:取培养后的TSB培养基增菌液1 mL,
15 000 r/min离心5 min,弃上清液;加入1 mL无菌水振
荡悬浮沉淀,15 000 r/min离心5 min,弃上清液;再向
沉淀中加入500 μL无菌水,振荡使其充分悬浮;100℃
水浴加热15 min,12 000 r/min离心5 min,取上清液,
即得DNA模板溶液。

PCR反应体系配制:反应总体积25 μL,分别加入
Premix Ex Taq HS预混液12.5 μL,上下游引物各1 μL,
无菌水8.5 μL,DNA模板2 μL。

PCR扩增条件:预变性95℃5 min;变性95℃30 s,退
火63℃30 s,延伸72℃90 s,循环30次;延伸72℃5 min。

电泳:用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,电压
5 V/cm,时间45 min。以凝胶成像结果条带位于1 000~
2 000,500~750,750 bp分别为uidA,ipaH,invE基因阳性。

2.1.2 结果

大肠埃希菌和主要致病菌uidA基因检测结果见图1。
其中marker1为marker DL500,marker2为marker

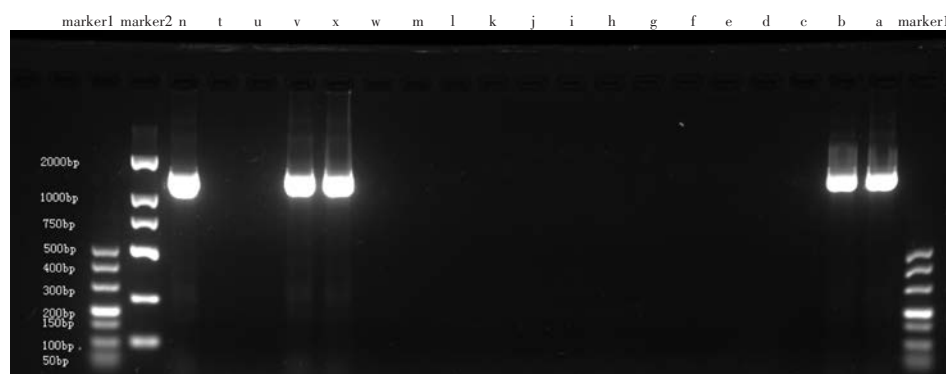


图1 大肠埃希菌和主要致病菌uidA基因检测结果

Fig. 1 Results of uidA gene testing of *Escherichia coli* and major pathogenic bacteria

DL2000。uidA基因PCR检测可区分大肠埃希菌与大部分常见致病菌,但无法区分某些志贺菌(如宋内氏志贺菌)与大肠埃希菌。志贺菌与大肠埃希菌在基因层面上同源性较高^[12],在NCBI的GenBank中搜索发现,宋内氏志贺菌、鲍氏志贺菌的染色体上也存在uidA基因序列(如CP064376.1,1428190-1429696,CP068090.1,103038-104513)。为有效区分志贺菌和大肠埃希菌,本研究中先后加入了志贺菌属的特征基因ipaH和invE基因。

3种基因检测结果见图2、图3及表4。图2中,条带1-7为ipaH基因,8-14为invE基因;每组从左至右依次为a,s,r,p,o,q,t;条带15为marker DL2000。图3中,条带1-8为ipaH基因,10-17为invE基因,18-25为uidA基因;每组从左到右依次为空白,x,w,v,u,q,p,b;条带9为DL2000。

由表4可知,大肠埃希菌和志贺菌均约有2种结果组合,其中前者除EIEC外,其余结果均一致;且2种菌的结果组合均无重叠,故能通过本方法区分^[13]。但本试验结果显示,EIEC除能检出ipaH基因外,还能检出invE基因,而4种志贺菌均不能检出invE基因,因此invE基因可进一步区分EIEC和志贺菌属,得以下判定规则。当结果为uidA基因阴性时可判定为大肠埃希菌未检出(但uidA,ipaH,invE基因结果为+- -时可判定为大肠埃希菌,为+++时可判定为EIEC,其余结果则为非大肠埃希菌。

2.2 生化试验

方法:将2.1.1项下供试液分别划线接种于LST-MUG中,36℃培养24h;同时取2.1.1项下供试液分别进行IMViC试验:I试验36℃下培养24h,MR试验36℃下培养96h,VP试验36℃下培养48h,C试验36℃下培养24h。取培养后的LST-MUG置366nm波长紫外光下观察;将培养后的IMViC试管分别滴加I试剂、MR-VP试剂,并观察。

结果:结果见表4(IMViC项结果分别采自I,MR,VP,C试验)。

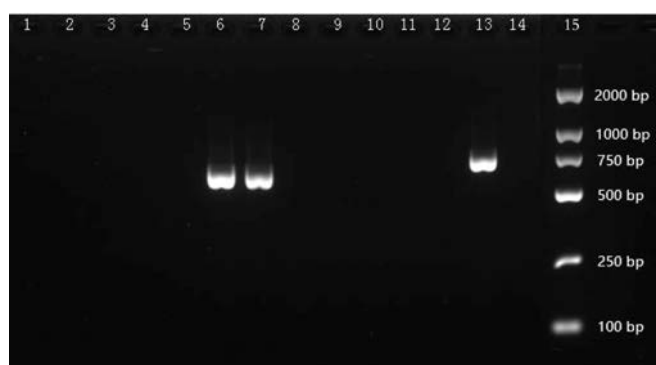


图2 大肠埃希菌与福氏志贺菌的2种基因检测结果

Fig. 2 Results of two gene testing of *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*

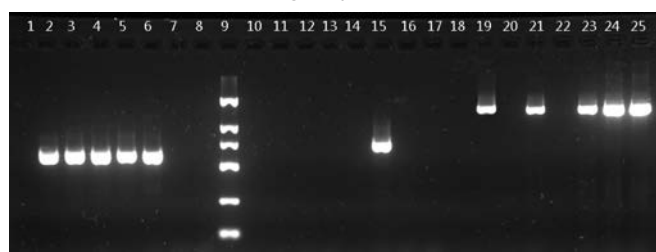


图3 大肠埃希氏菌与志贺菌的3种基因检测结果

Fig. 3 Results of three gene testing of *Escherichia coli* and *Shigella* species

表4 3种基因的检测及判定结果

Tab. 4 Results of testing and identification of three genes

菌种	uidA	ipaH	invE	结果	菌种	uidA	ipaH	invE	结果
大肠埃希菌	+	-	-	检出	EAEC	+	-	-	检出
EIEC	+	+	+	检出	福氏志贺菌	-	+	-	未检出
EHEC	+	-	-	检出	宋内氏志贺菌	+	+	-	未检出
ETEC	+	-	-	检出	痢疾志贺菌	-	+	-	未检出
EPEC	+	-	-	检出	鲍氏志贺菌	+	+	-	未检出

3 讨论

3.1 特异(专属)性

本研究中选择PCR方法的目的是为检测目标基因的特异性,故选择的22种(24株)病原微生物均为食品药品检验实验室常见品种。本研究结果显示,uidA基因在

表4 常见病原微生物的生化试验和PCR试验结果

Tab. 4 Results of biochemical test and PCR of common pathogenic microorganisms

菌种	LST - MUG	IMViC	PCR
乙型副伤寒沙门氏菌	-	- + - +	未检出
铜绿假单胞菌	-	/	未检出
金黄色葡萄球菌	-	- - + -	未检出
产气肠杆菌	产气荧光	- - + +	未检出
单核细胞增生李斯特菌	-	- + + -	未检出
小肠结肠炎耶尔森	-	+ + - -	未检出
粪肠球菌	-	- + + -	未检出
弗氏柠檬酸杆菌	产气无荧光	- + - +	未检出
蜡样芽孢杆菌	-	- - - -	未检出
乙型溶血链球菌	-	- + + -	未检出
奇异变形杆菌	-	- + + -	未检出
大肠埃希菌	产气荧光	+ + - -	检出
致泻大肠埃希菌 EHEC	产气无荧光	+ + - -	检出
福氏志贺菌	-	- + - -	未检出
宋内氏志贺菌	-	- + - -	未检出
痢疾志贺菌	-	- + - -	未检出
鲍氏志贺菌	-	- + - -	未检出

大部分情况下具备大肠埃希菌检测的特异性,但志贺菌和EIEC的特殊性使ipaH和invE基因的加入成为必要,运用3种基因组合判断,只需1次PCR检测即可判定大肠埃希菌;而在生化试验中,MUG试验的产气肠杆菌和大肠埃希菌同为产气荧光,弗氏柠檬酸杆菌和EHEC同为产气无荧光,证明单用该方法无法准确区分产气肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌,且EHEC可能存在漏检。少部分非典型大肠埃希菌IMViC试验结果为- + - - [14],与大部分志贺菌反应相同,且爱德华氏菌、小肠结肠炎耶尔森菌和部分志贺菌试验结果可能为+ + - - [15]。可见,在实际鉴定工作中单用任何一种生化试验方法均存在不确定性,需联用多种试验保证结果的准确性。

3.2 鉴定效率

本研究使用的PCR法全过程耗时短,提取扩增时间可在半天内完成,且样本基因组DNA模板采用直接热裂解提取法,过程较简单,经裂解后的菌悬液样本无生物活性,后续操作过程中安全性较高;而使用生化鉴定法时,通常需培养24h以上,特别是甲基红试验产酸培养需3~5d,耗时较长,试验项目多操作较烦琐。另外,生化试验中的样本多为新鲜培养物,生物安全风险较大。

3.3 小结

综上所述,本研究中建立了快速检测鉴定小儿哮喘灵颗粒中大肠埃希菌的PCR法,其专属性和工作效率等方面相比传统微生物检测鉴定方法有较大优势,在大肠埃希菌的快速筛查鉴定工作中,使用该方法直接从供试品增菌液中提取DNA进行检测可作为初期污

染调查和溯源的优选工作手段之一。需注意的是,在TSB增菌液中提取DNA时,为保证增菌液生长浓度和提取效率,仍需考虑供试品的抑菌特性,之前应先进行方法适用性试验,确认该药品不会对大肠埃希菌产生抑菌性或采用适宜方法消除抑菌性^[16]后方可进行试验。

参考文献

- [1] 姜毅,宋显相,章晓静,等. 小儿哮喘灵颗粒口服联合布地奈德吸入治疗儿童轻度支气管哮喘疗效及对FeNO影响[J]. 中国现代医生,2019,57(13):14-17.
- [2] 赵明琴,栗珊,汪明群,等. 大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌耐药率与抗菌药物使用强度相关性分析[J]. 中国药业,2020,29(24):29-32.
- [3] 曾世祥. 非菌药品大肠埃希菌检测生化鉴定的相关性分析[J]. 轻工科技,2022,38(6):89-91.
- [4] 陈樑. 水环境中大肠杆菌PCR快速检测体系的研究[J]. 环境科技,2010,23(2):52-54.
- [5] 张彩文,李金霞,陈怡文,等. 致泻大肠埃希氏菌检验用标准菌株的研究[J]. 食品与发酵工业,2020,46(23):68-73.
- [6] 胡朝友,傅春玲,陆巧荣,等. TaqMan探针荧光PCR定量检测大肠埃希菌方法研究[J]. 现代预防医学,2014,41(6):1070-1073.
- [7] MOHEBI S, NAVE HH, JAVADI K, et al. Evaluate the distribution of virulence genes and to investigate antibiotic resistance pattern among Shigella species isolated from children with shigellosis in Iran[J]. Gene Reports, 2021, 23: 1-6.
- [8] SN/T 1869-2007, 食品中多种致病菌快速检测方法PCR法[S].
- [9] 董阳. 志贺氏菌51种血清型分子鉴定系统的研发及应用[D]. 厦门:厦门大学,2020.
- [10] GB4789.6-2016, 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验[S].
- [11] 刘靖华,刘艳平,张秀花,等. 小儿哮喘灵颗粒微生物污染状况分析[J]. 药物研究,2022,17(6):97-100.
- [12] BERNASCONI C, VOLPONI G, PICOZZI C, et al. Use of the tna Operon as a New Molecular Target for Escherichia coli Detection [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(19):6321-6325.
- [13] KINGOMBE, CIB, CERQUEIRA - CAMPOS ML, FARBER JM. Molecular Strategies for the Detection, Identification, and Differentiation between Enteroinvasive Escherichia coli and Shigella spp [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(2): 239-245.
- [14] GB4789.38-2012, 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数[S].
- [15] BUCHANAN RE. 伯杰细菌鉴定手册:第八版[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 北京:科学出版社,1984:388,443,460.
- [16] 冯璐,曹敏,钮晓淑,等. 甲硝唑凝胶微生物限度检查方法适用性研究[J]. 中国药业,2022,31(18):69-72.

(收稿日期:2022-12-02;修回日期:2023-03-15)