

# 用三种基因探针对肠毒性大肠杆菌腹泻的初步分子流行病学研究

俞守义<sup>1</sup> 陈添弥<sup>6</sup> 陈义忠<sup>1</sup> 王锡琪<sup>2</sup> 姜丹<sup>3</sup> 陈清<sup>1</sup>  
杨芳娣<sup>4</sup> 吴益民<sup>5</sup> 周善国<sup>5</sup> 罗观堤<sup>2</sup> 黄君健<sup>2</sup>

**提要** 应用肠毒性大肠杆菌三种肠毒素(LT、ST-P、ST-H)基因探针对近年来从广州、武汉、四川、沈阳、湖南等部分省市搜集到的921株致急性腹泻的大肠杆菌进行DNA-DNA菌落原位杂交检测。LT198株占21.5%(198/921)、ST-H 131株占14.2%(131/921)、ST-P 54株占5.9%(54/921), ST+LT 19株占2.1%(19/921)。表明我国ETEC腹泻病原体中以LT<sup>+</sup>ETEC为主,其次为ST-H<sup>+</sup>。郊区农村ST-P<sup>+</sup>也占相当比例。为国内ETEC腹泻的分子流行病学研究提供了基本数据和较先进的诊检工具。

**关键词** ETEC腹泻 分子流行病学研究 基因探针

在发展中国家,肠产毒性大肠杆菌(ETEC)是急性感染性腹泻的主要病因,居腹泻病原谱前三位<sup>[1,2,10]</sup>。80年代以前检测它比较困难,主要靠生物学、免疫学方法,影响了对本病的深入研究。80年代出现了快速、简捷、特异性和灵敏度都较好的基因探针检测法,为本病的临床、流行病学、病原学等研究创造了有利条件<sup>[3,4]</sup>。ETEC主要以其肠毒素致病,根据其分子生物学特性分为两大类:热敏肠毒素(LT)和热稳定肠毒素(ST),它们都受质粒编码控制。ST根据其来源不同又可分为ST I、ST II(猪源),ST I又可分为ST I a(ST-P,猪源),ST I b(ST-H,人源)。国外近年来已应用这些基因制成特异性基因探针对本病进行了较深入的研究<sup>[2,4,5,7,9]</sup>。国内类似报道还未见到。本文亦用LT、ST I a(ST-P)、ST I b(ST-H)三种基因探针对1984~1989年从广东、湖南、湖北、辽宁、四川等省市的军队和地方的卫生、医疗科研单位自腹泻患者粪便中分离的致泻性大肠杆菌共921株进行初步的分子流行病学研究。

## 材料和方法

一、菌株:待检菌921株,均从急性腹泻患者(门诊或住院)粪便中分离到。先排除志贺氏菌属、沙门氏菌属、弯曲菌属、单胞菌属、轮状病毒等常见致泻病原体后分离出大肠杆菌,再经生化、血清学鉴定证实,接种20%甘油LB培养基, -70℃保存待检;或直接按常规<sup>[6]</sup>点种硝酸纤维素滤膜(北京化工学校, 0.45μ) 37℃培养、裂解、变性、固定等处理后4℃冰箱保存或邮寄待检。参照菌株来源及其遗传特性见表1。

二、试剂:溶菌酶(SERVA)、蛋白酶K(SIGMA)、Hind III(华美公司)、Hinf I、E.CoR I、HPa II(Boehringer Mannheim)、小牛胸腺DNA、牛血清白蛋白(华美公

- 1 第一军医大学流行病学教研室
- 2 广州军事医学研究所
- 3 沈阳军事医学研究所
- 4 广州市卫生防疫站
- 5 四川凉山地区卫生学校
- 6 军事医学科学院

表1 参 照 菌 株

菌 株	遗 传 型	来 源
EWD299	LT+	北京军事医学科 学院生物工程研 究所馈赠
PMM030	LT+	
PRIT10036	ST-P	
PSLM004	ST-H	
E. Coli C600	无质粒	
H10407	LT+ST-P+ST-H+	中山医科大学 馈赠
E2403	LT+	
T118	ST-P	
M421	ST-H	

司) LB培养基、TE溶液均按文献配制<sup>[6]</sup>。

随机引物标记试剂(军事医科院生物工程所方继明教授赠送)。

三、质粒DNA分离纯化:工程菌PMM030(LT质粒)、PRIT10036(ST-P质粒)和PSLM004(ST-H质粒)分别接种LB培养基,37℃18~22小时,分离纯培养后转种斜面,按常规<sup>[6]</sup>:繁殖菌种、质粒扩增、细胞裂解、酚抽提、酒精沉淀质粒DNA、酶切消化、琼脂糖凝胶电泳、回收纯化后最终获得相对应的三种肠毒素基因DNA片段:500bp Hind III-LT、215bp Hpa II-ST-H和157bp Hinf I-ST-P溶于10:1 TE溶液(10mM Tris-HCl-1mM EDTA, pH8.0), -70℃保存待用。

四、肠毒素基因探针制备:按文献<sup>[8]</sup>用随机引物法标记。上述三种肠毒素基因各0.1μg(热变性)、dCTP、dGTP、dTTP各1μl、含六核苷酸的反应混合液2μl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP(6000Ci/mmol,Boehringer Mannheim)50μCi、Klenow酶1μl,补水至50μl,37℃水浴1小时,加0.5MEDTA(pH8.0)至终浓度20mM终止反应,过SephedexG-50柱,分别获得LT、ST-H、ST-P三种基因探针,其放射性比强分别为 $2.5 \times 10^8$ 、 $2.7 \times 10^8$ 和 $1.3 \times 10^8$ cpm/μg DNA,使用时每毫升杂交液中加至终浓度 $> \sim 10^6$ cpm/μg DNA。

五、DNA-DNA菌落原位杂交:按本实验室常规<sup>[6]</sup>,将消食干培养基虑膜上的待检菌落经

裂解变性、中和固定后于37℃预杂交4小时,再杂交24小时。洗膜:2SSC-0.1% SDS30' × 2,室温(22℃);0.1 SSC-0.1% SDS 65℃ 30' × 1;最后用2SSC室温漂洗二次,空气干燥,放射自显影,-70℃24小时,判断结果。每次杂交时一定设置标准LT、ST-P、ST-H阳性和阴性对照菌株作参比。

结 果

一、ETEC检测类别:1984~1989年从上述各地科研协作单位及我们在广州远郊农村一个腹泻病研究点上搜集到的致泻大肠杆菌共921株,用LT,ST-P和ST-H三种基因探针进行检测。其中LT+198株,21.5%(198/921)ST-P+54株,5.9%(54/921)、ST-H+131株,14.2%(131/921)LT+ST+19株,2.1%(19/921)。表明我国ETEC中以LT为主,其次为ST-H+、ST-P+,LT++ST+比较少。未发现ST-P和ST-H同时阳性的菌株。

二、城市中不同地区的检测率:我们在广州市中心、郊区、远郊农村三个不同地区搜集到的484个菌株作检测(表2),发现LT的检测率市中心区高于郊区;反之,ST-P的检测率郊区高于市区。

表2 广州市不同地区ETEC的分布

地 区	检 测 数	ST			LT+ST
		LT	ST-P	ST-H	
市 中 心	164	60(36.6)	1(0.6)	27(16.4)	3(1.8)
郊 区	152	22(14.5)	7(4.6)	22(14.5)	0(0)
远郊农村	168	34(20.2)	3(1.7)	10(5.9)	5(2.9)
合 计	484	116(24.0)	11(2.3)	59(12.2)	8(1.7)

注:括号内数字为百分率

三、不同城市的检测率:表3显示ETEC在不同地区的分布没有明显的规律。一般来说都以LT为主,约占20%左右,只有沈阳市以ST-H为主与其它地区不同。LT和ST同时阳性的ETEC所占比例较低(2%)。

表3 不同地区ETEC的分布

地区	菌株数	LT	ST		LT+ST
			ST-P	ST-H	
广州	484	116(24.0)	11(2.3)	59(12.2)	8(1.7)
武汉	88	22(25.0)	5(5.6)	18(20.4)	3(3.5)
凉山	52	11(21.1)	6(11.5)	6(11.5)	1(1.9)
沈阳	177	32(18.1)	27(15.3)	43(24.3)	5(2.8)
长沙	120	17(14.1)	5(4.2)	15(12.5)	2(1.6)
合计	921	198(21.5)	54(5.9)	131(14.2)	19(2.1)

注：括号内数字为百分率

### 讨 论

检测ETEC-LT目前有二类探针：LT-A探针，是800bp Hinc II-LT片段，含A亚单位毒素基因；LT-B探针，是850bp Hind III-LT片段，含全部B亚单位和部分A亚单位毒素基因，它们对产生LT的 ETEC 都具有同源性<sup>[9]</sup>。本文采用陈锦光同志克隆的 LT-B 探针，500bp Hind III-LT片段，含B亚单位和部分A亚单位，已证实它具有高度的特异性和敏感性<sup>[3,6]</sup>。ST-Is也有二种遗传学特性不同的肠毒素基因：含ST-P (ST Ia) 的菌株来源于猪，常于猪、羊、牛等动物中分离到；含ST-H (ST Ib) 的菌株来源于人，常于患者中分离到，两者不发生相互交叉，在人群中分离到的比例常因时、因地而不同<sup>[5,9]</sup>。本文也类似，ST-P多见于郊区农村，和泰国情况相同，但在孟加拉国则在城市也有较高的检测率，可能与生活条件和卫生习惯等有关系。

梁玉裕 (1986年) 在广西用平板免疫溶血试验和乳鼠灌胃试验测定81株致泻大肠杆菌，除LT+ST菌株检测率高于本文外，其余项目均类似。

同时应用三种肠毒素基因探针对ETEC腹泻进行分子流行病学调查，在国外已有报道。美国著名腹泻病专家 Moseley (1982)<sup>[7]</sup> 在孟加拉国国际腹泻病研究中心对108名腹泻患者粪便中分离的标本用LT、ST-P和ST-H三种基因探针作检测，其LT、ST-P检测率与本

文近似，ST-H和ST+LT都显著高于本文资料，原因有待进一步研究。

近年来对ETEC-LT的检测，国内已建立了一些较为简便的方法，但对STs的检测仍只能用经典的生物学方法，耗资费时、操作繁杂，本文采用三种基因探针基本上解决了对ETEC-LT/ST的快速、正确、简便的诊检问题，同时作了初步的分子流行病学调查，为进一步研究ETEC腹泻创造了条件。

#### A Primary Study on Molecular Epidemiology of Diarrhea Caused by Enterotoxigenic Escherichia Coli by DNA Colony Hybridization Using Three Enterotoxigenic Gene-probes Yu Shouyi, et al., Dept. of Epidemiology, the First Military Medical College

921 isolates of acute-diarrhea-inducing E. Coli strains from several provinces and cities, including Guangzhou, Wuhan, Sichuan, Shenyang and Hunan, have been collected during 1984~1989 and were identified in 1989 for detecting genes coding for these enterotoxins-LT, ST-P, ST-H by DNA colony hybridization using three enterotoxigenic gene probes. Of all the isolates homologous to these genes encoding LT, ST-P, ST-H and both LT and ST were 198 (21.5%), 131 (14.2%), 54 (5.9%) and 18 (2.1%), respectively. It was showed that in our country pathogenic agents of acute infectious diarrheal disease with ETEC strains first might be ETEC-LT strains, secondary ETEC-ST-H strains, Whereas, in rural districts ETEC-ST-P posses higher proportion of ETEC strains. These results provided some essential data and advanced methods for researching further molecular epidemiology of the ETEC diarrheal disease.

Key words ETEC-diarrhea Gene-probe Molecular epidemiology

#### 参 考 文 献

1. Black RC, et al. J Infect Dis 1980; 142: 660.
2. Qralk C, et al. J Clin Microbiol 1987; 25(8): 1572.
3. 陈锦光, 等. 微生物学报 1985; 25: 119.

4. Seriwatana J, et al. J Clin Microbiol 1987; 25: 1438.  
 5. Sommerfelt H, et al. J Clin Microbiol 1988; 26(3): 530.  
 6. 俞守义, 等. 中华流行病学杂志 1986; 7(3): 170.  
 7. Moseley SL, et al. Infect and Immun 1983; 39

(3): 1167.

8. Feinberg A P, et al. Anal Biochem 1983; 132: 6.  
 9. Moseley SL, et al. J Infect Dis 1982; 145 (6): 863.

(1989年4月2日收稿, 同年8月2日修回)

## 被动血凝试验和血凝抑制试验检测麻疹抗体比较

武隆县卫生防疫站 刘家熬 肖娣华 高 瞻 陈先红

麻疹抗体的检测, 目前常规使用血球凝集抑制试验(简称HI), 该试验具有特异、快速的优点, 但又必须使用猴血球, 因而不便推广应用。近年来随着麻疹疫苗的广泛使用, 为了解人群中的免疫水平, 以便能正确使用疫苗, 因而迫切需要一个简便、特异、敏感的测定麻疹抗体的方法。最近中国预防医学科学院流研所张荣珍等和四川省卫生防疫站共同研制成功了被动血凝试验(简称PHA)测定麻疹抗体的方法, 我们从四川省卫生防疫站引进了全套试剂和测定方法, 同时用PHA和HI试验两法对188份血清用PHA试验和HI试验两法进行比较测定。现将测定结果报告如下:

一、血清标本: 于1989年在本县采集的健康儿童血清共188份, 经56℃30分钟灭活后放-20℃冰箱待用。

二、试剂: 由四川省卫生防疫站计划免疫科实验室提供PHA试验用麻疹抗原致敏血球, 正常细胞致敏血球, 10%醛化血球, 麻疹阳性参考血清; HI试验用麻疹血凝素。猴血球在本站饲养的实验猴中采取。

三、方法: 将已灭活的血清分成二份, 一份用压积猴血球吸收, 另一份用10%醛化血球吸收, 分别用

下述两法测定麻疹抗体。

1. HI试验方法: 按国家标准微量血凝抑制试验方法进行。

2. PHA试验方法: 按2滴已灭活血清, 加入10%醛化血球2滴, 在4℃条件下放置过夜, 其上清液为1:2稀释血清, 在微量V型板中倍比稀释至1:1024。稀释完毕后, 每孔加入混合均匀的致敏血球各一滴(0.025ml), 振摇1分钟, 放37℃温箱静置1小时后观察结果。以“++”凝集的血清最高稀释度为该份血清抗体滴度。同时设血清、阳性血清、致敏血球对照。

### 四、结果与讨论

用PHA试验和HI试验同时比较测定188份血清, 从附表的结果可以看出, PHA试验比HI试验的结果敏感。从总的GMT来看, PHA试验总GMT为25.37, HI试验总GMT为12.22, PHA比HI敏感1.07倍。从188份血清中分析, 有117份PHA试验结果的麻疹抗体比HI试验结果的麻疹抗体高1~31倍。上述结果经统计学处理, 两法具有密切相关性, 相关系数为0.66,  $P < 0.01$ , 说明PHA法能替代HI法。

附表

PHA和HI试验检测麻疹抗体比较

试验方法	人数	血清滴度 (1:)										
		<2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
PHA	188	15	6	13	25	28	30	30	15	16	5	5
HI	188	11	9	20	37	58	34	16	3	0	0	0

$r=0.66 P < 0.01$

上述结果表明, PHA试验在测定麻疹抗体时, 不仅具有与HI试验相同的特异性, 而且比HI试验敏感、简便, 加之可以制备冻干致敏血球, 更具有能够

长期保存, 易于运输和使用方便的特点。因此, 有利于基层, 特别是边远山区进行大规模的麻疹流行病学调查和麻疹疫苗效果评价等工作。值得推广。