

产志贺样毒素且具侵袭力的大肠杆菌的研究

徐建国¹ 程伯鯤¹ 吴艳萍¹ 黄力保¹ 邓庆东¹

赖心河¹ 刘秉阳¹ 罗兴祖² 李惠芬²

摘要 我国临床腹泻病人粪便标本中,约有60%检不出任何已知病原,而能分离出几乎纯培养的大肠杆菌。这些大肠杆菌过去被误认为是肠道正常菌群。我们对在北京西城区三个医院从腹泻病患者粪便标本中分离的172株所谓正常大肠杆菌,进行了质粒DNA、Hep-2细胞粘附试验,和10种DNA探针分析。结果发现这些所谓的肠道正常大肠杆菌并不正常,其中44%可鉴定为致泻性大肠杆菌,包括EHEC 16株,占所检查菌株的9.3%;EPEC 8株,占所检查菌株的4.7%;EAggEC 11株占6.4%。还有54株菌对Inv、SLT1或SLT2探针同时呈阳性反应,占所检查菌株的31.4%。我们认为对Inv、SLT1或SLT2探针同时呈阳性反应的菌株是一种尚未在国际上报道的致泻性大肠杆菌,将其命名为“产志贺样毒素且具侵袭力的大肠杆菌”(Enter-SLTs-producing and invasive E.coli ESIEC)。与EIEC不同,ESIEC虽能侵入Hep-2细胞,但不具有ipaB基因,编码侵袭力的基因与EIEC有所不同。该类菌株虽对Hep-2细胞呈现集聚性粘附现象,但不与肠集聚性大肠杆菌(EAggEC)探针起反应;产生肠毒素,细菌滤过液对Hep-2细胞有致死作用。ESIEC占所检查菌株的31.4%,在我国有可能是一种比ETEC、EIEC、EPEC、EHEC发病率都高的致泻性大肠杆菌。

关键词 大肠杆菌 志贺样毒素

根据对毒力、致病机理及其遗传控制的研究进展,已把致泻性大肠杆菌分为五类,包括肠致病性大肠杆菌(Enteropathogenic *E. coli* EPEC),肠产毒性大肠杆菌(Enterotoxigenic *E. coli* ETEC),肠侵袭性大肠杆菌(Enteroinvasive *E. coli* EIEC),肠出血性大肠杆菌(Enterohemorrhagic *E. coli* EHEC),和肠集聚性大肠杆菌(Enteraggregative *E. coli* EAggEC)。并根据其主要毒力因子的基因结构,发展了相应的DNA探针,作为鉴定和研究的手段^[1,2]。

我国的现实情况是,对致泻性大肠杆菌的试验室鉴定仍主要依靠“O”血清。虽然,EPEC、ETEC、EIEC菌株均含有优势血清型,但同一血清型的菌株并非都是致病性的。在腹泻病人粪便标本中,约有60%分离不出任何已知病原,却能分离到几乎呈纯培养的大肠杆菌。常把不与诊断血清凝集的菌株看作是肠

道正常大肠杆菌。我们认为在这一部分菌株中,可能有一部分是致泻性的,只不过是缺少必要的手段,无法将它们分离和鉴定。为了证实这一设想,我们对1989~1990年5~10月份从北京市西城区三个医院腹泻病人粪便标本中分离不出已知主要腹泻细菌病原,而能分离出几乎纯培养的大肠杆菌,用现有方法证明不属于ETEC、EIEC、EPEC者,进行了研究。现将结果报道如下。

材料与方 法

一、材料:

1. 菌株:本研究所用DNA探针及其来源见表1。
2. 试剂:本试验所用内切酶,地高辛标记

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

102206 北京;

2 北京市西城区卫生防疫站

表1 参考菌株及其特征

菌株	基因型及DNA探针特征	来源
pCVD 419	EHEC DNA探针	[3]
pCVD 432	EAggEC DNA探针	[4]
pCVD 434	eae探针	[5]
pCVD 403	LT探针 (热稳定毒素)	Jams B Kaper赠送
pCVD 402	ST探针 (热不稳定毒素)	Jams B Kaper赠送
pSLM 852	DA探针 (弥散性粘附)	Jams B Kaper赠送
pJPN 16	EAF探针 (EPEC粘附因子)	[6]
pJN 110-18	SLT2探针 (志贺样毒素2)	[7]
pJN 37-19	SLT1探针 (志贺样毒素1)	[7]
pSF 55	Inv探针 (侵袭性基因)	[8]
<i>E. coli</i> F171		本研究
<i>E. coli</i> 89/67		本研究

S. flexneri 2a.301, *E. coli* 8401 (EIEC), *E. coli* HB101为本室分离和保存的参考菌株。

试剂盒购自华美公司。致泻性大肠杆菌“O”诊断血清,从成都生物制品研究所获得。

二、方法:

1.菌株的来源和分离:对1989~1990年5~10月份送检的腹泻病人粪便标本,按常规进行霍乱弧菌、志贺氏菌、沙门氏菌、铜绿假单胞菌、类志贺氏邻单胞菌、ETEC、EPEC、EIEC的分离鉴定,未进行与腹泻病有关的病毒分离工作。凡是上述肠道病原菌分离、鉴定为阴性的腹泻病人粪便标本,在伊红美蓝培养基上呈纯的大肠杆菌菌落者,收集菌株,进一步作生化反应鉴定和其它研究工作。所用的大肠杆菌O特异性诊断血清包括:O86、O127、O26、O126、O44、O125、O55、O146、O119、O6、O8、O25、O20、O1、O78、O148、O149、O27、O128、O124、O28、O136、O43、O144、O158、O152、O159、O63、O111、O142。

2.质粒提取:采用本试验室改良的质粒DNA提取方法[9]。

3.HEp-2细胞粘附试验:将待测菌接种到

5ml LB肉汤中,培养过夜,转种到新鲜LB培养液内培养4小时,HEp-2细胞培养于RPMI 1640培养液中,并加1.0%新生牛血清,0.03%谷胺酰胺,100单位/ml青霉素,100μg/ml链霉素。做粘附试验时,首先将培养单层细胞用0.02% EDTA液消化,然后加入预先放置盖玻片(约0.8×0.8cm)的青霉素小瓶中,37℃孵育24小时后,用Hanks液洗3次,加入0.1ml待测菌(浓度约1×10⁸/ml)和0.9ml RPMI 1640液,含10%新生牛血清,0.03%谷胺酰胺,1%甘露糖,不含抗生素。2000转/分钟垂直离心10分钟。然后37℃孵育3小时,取出盖玻片,Hanks液洗3次,甲醇固定,吉姆萨液染色,镜下观察。显微镜照相记录结果[10]。

4.HEp-2细胞侵袭试验:HEp-2细胞侵袭试验的基本步骤同上述粘附试验,不同之处是,根据庆大霉素不进入细胞的原理,在细胞与细胞作用一段时间后,加入高浓度庆大霉素(100μg/ml),培养30分钟,然后冲洗三次。在显微镜下,可观察到侵入细胞内的细菌[11]。

6.PCR技术:PCR采用 Rychlik 等的方法进行,参照ipaB基因的DNA序列,我们设计了一对引物[12]:

A:5'-TGG AGC TCG TAT CAA GCA
GTA GTT TG-3'
B:5'-CCT CT A GAC GTA ATT CAA
CAC AGC-3'

7.DNA杂交:DNA杂交分别采用α-³²P标记和地高辛标记方法进行。α-³²P标记采用缺刻翻译法进行。地高辛标记采用 Boehringer Mannheim公司的DIG试剂盒说明书进行。

8.临床资料取自医院腹泻病人肠道病原学检验原始记录表。

9.毒素的提取及对Vero细胞毒的检测,采用 Beery 等介绍的方法进行[13]。

结 果

一、菌株的分离和鉴定:我们于1989年5~10月份从北京西城区三个医院送检的腹泻病

人粪便中
肠杆菌,
盐、山梨
生化反

二、

粒DNA

粒的数

A、B、

60MD

于60M

质粒。

三、

菌株中

性粘附

32.7%

株菌表

粘附。

四、

对1989

通用的

EAggI

见表2。

探针的

五、

对照福

可产生

六、

七、

八、

九、

十、

十一、

十二、

十三、

十四、

十五、

十六、

十七、

十八、

十九、

二十、

人粪便标本中共分离了200余株所谓的正常大肠杆菌,经挑选单个菌落,用双糖铁、柠檬酸盐、山梨醇、V-P、甲基红、靛基质、吲哚等生化反应鉴定为大肠杆菌者有172株。

二、质粒分析:对110株大肠杆菌作了质粒DNA分析,有77株含有大质粒。根据其质粒的数目和分子量的不同,将其中的61株分为A、B、C、D、E 5个组别。质粒分子量多在60MDa左右。部分菌株含有分子量小于或大于60MDa的大质粒,少数菌株含有2~3个大质粒。

三、HEp-2细胞粘附试验:在71株含质粒菌株中,64株有粘附现象,其中36株表现出集聚性粘附,占含质粒菌株的50.7%,占有所有菌株的32.7%(附图),8株菌表现出局灶性粘附,5株菌表现出弥散性粘附,15株菌表现出散点状粘附。



附图 大肠杆菌对HEp-2细胞的集聚性粘附

四、DNA探针研究:使用 α - 32 P标记技术,对1989和1990年分离的共172株菌株,用国际上通用的检测ETEC、EPEC、EIEC、EHEC、EAggEC的10种DNA探针进行了检测。结果见表2。在172株菌中,有76株菌与这10种DNA探针的至少一种发生阳性反应。

五、ipaB基因检测:PCR结果表明阳性对照福氏2a志贺氏菌301菌株和EIEC8401菌株可产生一个分子量为1.9kb的ipaB基因DNA

表2 10种DNA探针检查结果*

类别	探针	阳性菌株数	占检测菌株(%)
ETEC	ST或LT	3	1.7
EPEC	eae、EAF	8	4.7
EIEC	Inv	3	1.7
EHEC	EHEC	16	9.3
EAggEC	EAggEC	11	6.4
ESIEC	Inv、SLT ¹ 或SLT ²	54	31.4

*由于有一部分菌株对多种DNA探针表现出阳性反应,所以合计数超过76株。

带,和根据DNA序列估计的分子量一致。而Inv、SITs探针阳性菌株89/67菌株则不含ipaB基因,将PCR合成的ipaB基因DNA带经纯化、收集后,用地高辛标记DNA斑点杂交结果表明,Inv、SITs探针阳性菌株89/67等,不与ipaB基因探针发生阳性反应。

六、Hep-2细胞侵袭性试验:使用豚鼠角膜试验检查了20株Inv、SITs探针阳性菌株,未发现明显阳性反应。使用Hep-2细胞侵袭试验,对3株Inv、SITs探针阳性菌株进行了检测。结果发现,E.coli 89/67、F171、R145菌株能侵入Hep-2细胞。

七、细菌菌毛的研究:通过电子显微镜观察,我们发现Inv、SITs探针阳性菌株E.coli F171产生菌毛。经提纯菌毛蛋白,制备菌毛特异性抗血清,Western blot结果表明,该菌毛亚单位的分子量为19KDa。菌落免疫酶斑表明,在所检查的54株菌中,有14株菌出现阳性反应,占Inv+SLTs+菌株的26%。

八、SLTs毒素检测:使用柱层析技术,我们提取了E.coli 89/67菌株的毒素。结果表明细菌滤过液和提取的毒素都能使Vero细胞变形、坏死、脱落,有Vero细胞毒作用。

九、Inv、SITs探针阳性菌株感染患者的临床资料分析:对已确定Inv、SLTs探针阳性菌株,根据菌株号,查患者的临床资料。根据有限的原始记录表,获得的资料见表3。从表3可看到,在10名患者中,有4例诊断为痢疾,1例诊断为肠炎,5例诊断为消化不良。有3例每日

表3 部分Inv、SLTs探针阳性菌株感染患者的临床资料

患者	菌株	性别	年龄	大便形状	临床症状	镜 检	临床诊断
1	F77	男	63	粘液便	腹泻6次/日, 腹痛	WBC、RBC满视野	痢疾
2	F99	女	32	粘液便	腹泻10次/日, 腹痛	WBC 25~35	痢疾
3	F98	女	24	稀 便	腹泻20次/日, 腹痛	WBC、RBC满视野	痢疾
4	F171	女	61	稀 便	腹泻3次/日, 腹痛	阴性	消化不良
5	E1074	男	28	软 便	腹泻4次/日	阴性	消化不良
6	E1073	男	39	稀 便	腹泻6~7次/日	阴性	消化不良
7	E1353	男	35	稀 便	腹泻3次/日	阴性	消化不良
8	E1091	男	58	软 便	腹泻3~4次/日, 腹痛	阴性	消化不良
9	E1098	女	24	稀 便	腹泻4~5次/日	WBC 0~3	痢疾
10	E1109	女	52	水样便	腹泻10次/日	WBC 2~3	肠炎

腹泻次数超过10次, 1例每日腹泻次数超过20次。

讨 论

对ETEC、EPEC、EIEC、EHEC EAggEC而言, 是否含有大质粒和具有对上皮细胞粘附现象被公认为是肠道病原菌的毒力因子之一, 判断待检菌株是否有毒力的重要指标。我们首先对110株菌进行了质粒DNA分析, 发现其中有77株菌含有1~3个大质粒, 分子量为60MDa左右^[1,2]。对77株含大质粒的菌株中的71株进行了细胞粘附试验^[10]。结果发现, 有36株表现出对Hep-2细胞的集聚性粘附, 8株局灶性粘附(LA), 5株弥散性粘附。还有15株菌对上述三种粘附类型不同, 表现出对Hep-2细胞分散的点状粘附, 我们称其为散点状(Scanty and Spotted Adherence SSA)。

质粒DNA分析和Hep-2细胞粘附试验提示, 这些菌株可能是具有毒力的。我们继而对1989~1990两年分离的所有172株大肠杆菌, 用致泻性大肠杆菌10种DNA探针进行了基因型的研究, 结果发现, 有16株菌与EHEC探针发生阳性反应, 11株菌与EAggEC探针发生反应, 8株菌与eae或EAF探针发生阳性反应, 54株菌对Inv、SLTs探针同时发生阳性反应。Inv、SLTs探针阳性菌株占分离菌株的31.4%, 占DNA探针阳性致泻性大肠杆菌的71%。结果

说明, 我们过去认为是肠道正常大肠杆菌中有44%属于致泻性大肠杆菌。

Inv是基于志贺氏菌和EIEC菌株的侵袭性基因发展的DNA探针, 被广泛用于诊断EIEC、志贺氏菌^[8]。我们发现, 与EIEC、志贺氏菌相似, Inv、SLTs探针阳性菌株也能侵入Hep-2细胞。为了研究Inv、SLTs探针阳性菌株与EIEC在侵袭性基因上的区别, 根据已发表的志贺氏菌侵袭性基因之一的ipaB基因的DNA序列, 设计了两个引物。使用PCR技术, 发现与志贺氏菌、EIEC不同, Inv、SLTs探针阳性菌株不具有ipaB基因。将PCR合成的ipaB基因收集, 用地高辛标记后, 用提纯质粒DNA用斑点杂交试验证实, Inv、SLTs探针阳性菌株不与ipaB探针发生反应。结果提示Inv、SLTs探针阳性菌株与EIEC在基因结构上有所不同。

除痢疾I型志贺氏菌外, 福氏、宋内氏志贺氏菌均未见产生志贺氏毒素的报道。Cleary等和Smith等分别用vero细胞和DNA探针证实EIEC不产生志贺样毒素^[14,15]。我们用滤过菌液和柱层析技术提取了*E. coli* 89/67株的毒素。结果发现, 滤过菌液和提取的毒素均能使vero细胞变性坏死。Inv、SLTs探针阳性菌株能产生分泌性毒素。

虽然所检查的大部分Inv、SLTs探针阳性菌株表现出对HEp-2细胞的集聚性粘附, 但也

有一部分菌株表现出局灶性粘附(LA)或散点状粘附(SSA)。况且,Inv、SLTs探针阳性菌株不与EAggEC探针发生反应,说明不只一种菌毛能介导集聚性粘附现象。这种现象与国外报道相似,EAggEC DNA探针并不能检出所有对Hep-2细胞呈集聚性粘附的菌株^[4]。使用电子显微镜,我们发现ESIEC F171菌株产生菌毛。该菌毛亚单位的分子量为19KD。在所检查的54株菌中,有14株与菌毛的特异性抗体起阳性反应。

试验结果说明,我们发现了一种国际上尚未报道的致泻性大肠杆菌,将其命名为产志贺样毒素且具侵袭力的大肠杆菌(entero-SLTs-Producing and invasive *E. coli* ESIEC)。ESIEC的典型特征是与INV、SLTs探针同时发生反应,这在其他致泻性大肠杆菌中是没有的。与EIEC不同,ESIEC虽能侵入Hep-2细胞,但不具有ipaB基因,编码侵袭力的基因有所不同。ESIEC的多数菌株能表现出对Hep-2细胞的集聚性粘附,但不与EAggEC探针发生反应。ESIEC的滤过菌液能使Vero细胞变性、坏死,产生毒素。ESIEC占所检查菌株的31.4%,有可能是一种比ETEC、EIEC、EPEC、EHEC发病率都高的致泻性大肠杆菌。李云圃等对我国四省腹泻病的研究提示,由大肠杆菌引起的腹泻,其发病率高于痢疾。如果我们关于ESIEC的研究资料是一种普遍现象,关于大肠杆菌性腹泻的许多问题有重新认识的必要^[16]。

A new diarrhea pathogen: Entero-SLTs-producing and invasive *Escherichia coli* was over-looked as normal flora *E. coli* Xu Jianguo, Cheng Bokun, Wu Yanping, et al. Department of Microbiology, Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing P R China.

In clinical laboratories of Beijing, China, no known entero-pathogen but almost pure *E.*

coli strains could be isolated from more than 60% fecal samples of diarrheal patients, which had been recognized as normal flora *E. coli* and dismissed. We suspected that some of the so-called normal flora *E. coli* strains might be virulent. To prove our idea, We collected 172 strains of *E. coli* isolated from diarrheal patients from whom no other enteric bacterial pathogens had been identified, including EPEC, EIEC, ETEC. With plasmid DNA analysis,

Hep-2 cell adherence assay and 10 DNA probe hybridization, we found that the so-called normal flora *E. coli* was abnormal, 44% of them were virulent, of which 16 (9.3) were EHEC, 8 EPEC (4.7%), 11 EAggEC (6.8%). Fifty-four of 172 strains were hybridized with INV and SLT1 or SLT2 probes, which had never been reported. These strains could invade Hep-2 cells, but were lack of ipaB gene, a key gene of invasiveness gene cluster of *Shigella* species and EIEC. The aggregative adherence to Hep-2 cells was observed, but the strains were not hybridized with EAggEC specific DNA probe. The purified toxin protein and cell filtrate were toxic to vero cells. Based on the data obtained, we believed that this is a new category of diarrhea-genic *E. coli*, named as entero-SLTs-producing and invasive *E. coli* (ESIEC). ESIEC occupied 31.4% of the strains tested, the isolation of it was probably higher than those of ETEC, EPEC in P R China.

Key words *Escherichia coli* Shiga-like-toxin

参 考 文 献

- 1 Levine M M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 1987, 155: 377.
- 2 徐建国. 一种新的腹泻病原—肠集聚性粘附大肠杆菌. *中华流行病学杂志*, 1990, 11(特刊8号): 272
- 3 Levine M M, Xu Jian-Guo, Kaper J B, et al. A DNA Probe to Identify Enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* 1987, 156: 175.
- 4 Baudry B, Savarino S J, Vial P, et al. A

- Sensitive and Specific DNA Probe to identify Enteroaggregative *Escherichia coli*, a Recently Discovered Diarrheal Pathogen. *J Infect. Dis* 1990, 161: 1249.
- 5 Jerse A E, Yu J, Tall B D, et al. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87: 7839.
 - 6 Nataro J P, Baldini M M, Kaper J B, et al. Detection of an Adherence Factor of Enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA Probe. *J. Infect. Dis*, 1985, 152: 560.
 - 7 Newland J W and Neill R J. DNA probes for shiga-like toxins I and II and for toxin converting bacteriophages. *J Clin Microbiol*, 1988, 26: 1292.
 - 8 Small P L C and Falkow S. Development of a DNA probe for the Virulence Plasmid of *Shigella* spp. and Enteroinvasive *Escherichia coli*. In: *Microbiology-1986*. (editors: Lieve L, Bonventre P F, Morello L A, et al.), American Society of Microbiology, 1986. 121~125.
 - 9 徐建国, 刘志齐, 刘汉明. 一种简单、适用于大小质粒 DNA 的提取方法. *微生物学报*. 1990, 48(1): 44.
 - 10 Cravioto A, Gross R J, Scotland S M, et al. An Adhesive Factor Found in Strains of *Escherichia coli* Belonging to the Traditional Infantile Enteropathogenic Serotypes. *Curr Microbiol*, 1979, 3: 95.
 - 11 Donnenberg M S, Donohue-Rolfe A and Keusch G T. Epithelial Cell Invasion: An Overlooked Property of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Associated with the EPEC Adherence Factor. *J. Infect. Dis*, 1989, 160: 452.
 - 12 Rychlik W, Spencer W J and Rhoads R E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acid Res*, 1990, 18: 6409.
 - 13 Beery J T, Doyle M P and Higley N A. Cytotoxic activity of *Escherichia coli* O157, H7 culture filtrate on the mouse colon and kidney. *Curr Microbiol*. 1984, 11: 335.
 - 14 Cleary T G and Murray B E. Lack of Shiga-Like Cytotoxin Production by Enteroinvasive *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 1988, 26: 2177.
 - 15 Smith H R, Scotland S M, Willshaw G A, et al. Vero Cytotoxin Production and Presence of VT Genes in *Escherichia coli* Strains of Animal Origin. *J Gen. Microbiol*, 1988, 134: 829.
 - 16 李云圃, 薛堂渠, 刘齐家, 等. 我国四省市腹泻病监测研究. *中华流行病学杂志*, 1989, 10(特刊11号): 1.

(收稿: 1994-02-15)