

河南省2009—2010年出血性大肠埃希菌O157毒力基因分布与脉冲场凝胶电泳分型研究

赵嘉咏 穆玉姣 张白帆 李孟磊 苏佳 夏胜利 黄学勇 许汴利

【关键词】 出血性大肠埃希菌O157; 脉冲场凝胶电泳

Distribution of virulence genes and PFGE molecular typing of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in Henan from 2009 to 2010 Zhao Jiayong, Mu Yujiao, Zhang Baifan, Li Menglei, Su Jia, Xia Shengli, Huang Xueyong, Xu Bianli. Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China

Corresponding author: Xu Bianli, Email: xubl@hncdc.com.cn

This work was supported by grants from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2012ZX10004201, No. 2012ZX10004203).

【Key words】 Enterohemorrhagic *E. coli* O157; Pulsed field gel electrophoresis

肠出血性大肠埃希菌(EHEC)是致泻性大肠埃希菌的一个亚型,主要致病菌株为O157:H7。本研究对分离自河南省病例、家禽家畜粪便及食品等外环境的EHEC O157进行病原学与分子生物学检测、分型,了解其病原学特点,为相关疾病的监测、暴发预警与溯源提供数据。

1. 菌株来源:2009—2010年河南省腹泻病多病原监测系统中郑州(登封、荥阳)与商丘市睢县2个监测哨点疾病预防控制中心(CDC)收集并分离自病例、家禽家畜粪便及食品的62株EHEC O157,其中患者粪便来源8株,食品来源8株,家禽家畜粪便来源46株。

2. 研究方法:

(1)分离培养与鉴定:5 g病例或动物粪便标本接种于45 ml mEC肉汤中,食品标本取25 g磨碎,接种于225 ml mEC肉汤中,37℃增菌培养6 h;EHEC O157免疫磁珠富集后接种Chromagar O157平板,37℃培养16~18 h;挑取疑似EHEC菌落(紫红色或蓝心无色半透明、突起、光滑、湿润),API20E系统生化鉴定后转营养琼脂平板37℃过夜培养后进行O157、H7两种单克隆抗体玻片凝集试验,阳性菌株进行PCR鉴定与毒力基因检测。

(2)多重PCR检测:采用热裂解法制备模板,引物5'对针对EHEC O157保守与毒力基因设计。扩增产物进行1.5%琼

脂糖凝胶电泳分析^[1]。

(3)PFGE分型:PCR产物经限制性内切酶Xba I (75 U) 37℃酶切2 h后进行电泳。电泳参数:分子质量30~600 kb,脉冲时间2.16~54.17 s,电场角度120°,电泳时间19 h(1×TBE, 14℃)。胶块用GelRed染料染色后凝胶成像仪去过饱和和成像。BioNumerics 6.0软件分析(UPGMA, PT 1.5%)。

3. 结果:

(1)EHEC的鉴定:64株EHEC经血清学凝集试验鉴定均为EHEC O157(+);H7(-)。2株携带志贺毒素1型(*stx1*)毒力基因,11株携带黏附素(*eaeA*)与溶血素(*hlyA*)毒力基因,其余49株为非产毒菌株。2株产*stx1*毒力基因菌株分离自牛粪;3株产*eaeA*+*hlyA*毒力基因菌株分离自病例,其中2株分离自男性(0.5~1岁),1株分离自女性(25岁);另外8株产*eaeA*+*hlyA*毒力基因菌株分离自家禽家畜粪便;非产毒型O157菌株分离自病例(3株)、食品(8株)、家禽家畜粪便(38株),见表1。

表1 EHEC O157 PCR检测毒力基因

菌株来源	毒力基因型	菌株数
牛粪	<i>stx1</i>	2
病例粪便	<i>eaeA</i> + <i>hlyA</i>	3
牛粪	<i>eaeA</i> + <i>hlyA</i>	5
猪粪	<i>eaeA</i> + <i>hlyA</i>	2
鸳鸯粪	<i>eaeA</i> + <i>hlyA</i>	1
病例粪便	非产毒型O157(+)	3
生猪肉	非产毒型O157(+)	6
熟猪肉	非产毒型O157(+)	1
生羊肉	非产毒型O157(+)	1
家禽粪便	非产毒型O157(+)	10
家畜粪便	非产毒型O157(+)	28

(2)PFGE鉴定:62株菌PFGE分为49种带型,命名为EH1~EH49,相似度为62.3%~100.0%,带型内包含菌株数为1~4株。EH3与EH27两种带型毒力基因型别均为*eaeA*+*hlyA*;EH4/EH6/EH7/EH23/EH24/EH40/EH47带型菌株分离自家禽家畜粪便,均为非产毒型EHEC O157;EH22内1株携带*eaeA*+*hlyA*基因,1株为非产毒型EHEC O157;EH41带型毒力谱较复杂:2株菌携带Stx1志贺毒素,1株菌携带*eaeA*与*hlyA*毒力基因,1株菌未携带毒力基因。从整体看,EHEC O157的核酸序列多态性更多,带型聚集性更分散,分离自不同监测点与不同样本类型的菌株带型相似度较低(<80%),人与食品、环境源菌株从宏、微观角度看均未呈

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.11.028

基金项目:国家科技重大专项(2012ZX10004201, 2012ZX10004203)

作者单位:450016 郑州,河南省疾病预防控制中心

通信作者:许汴利, Email: xubl@hncdc.com.cn

现聚集性,与毒力基因的关联性也不强(图1)。

3. 讨论:近年来,由EHEC引起的腹泻暴发逐步受到全球许多国家公共卫生机构的重视。研究表明,牛、鸡、羊、犬、猪等动物及其制品作为传染源的作用尤其重要^[2]。从本研究结果看,河南省家禽家畜的带菌率相当高,动物粪便分离株的比重约占77.4%;2株产志贺毒素 *stx1* 的菌株来自牛粪,11株产 *eaeA/hlyA* 的菌株则分布在病例、动物粪便和肉类制品中。同河南省和周边省份历史监测数据相比,河南省EHEC O157仍然是以家禽家畜为主要感染宿主,带菌率最高的宿主动物由羊变为牛,菌株携带的志贺样毒力基因由 *stx2*

变为 *stx1*^[3-4]。以EHEC为代表的食源性疾病预防重点仍是在畜牧业/养殖业的饲养、屠宰和食品加工等环节。从病例看,<10岁低龄儿童是EHEC感染高发人群,需要予以重点关注。

从PFGE带型看,大多数带型间既未呈现较高的相似度,也未发现有优势带型与聚集现象。人源菌株带型各自独立分布,未发现与动物源和食品分离菌株一致或高度相似带型。同河南省历史菌株分型结果相比,带型种类由9种增加到49种,多态性大大增加。考虑到食源性疾病传播模式的特点,对动物源和人源菌株关联度及疾病传播链的追溯还需

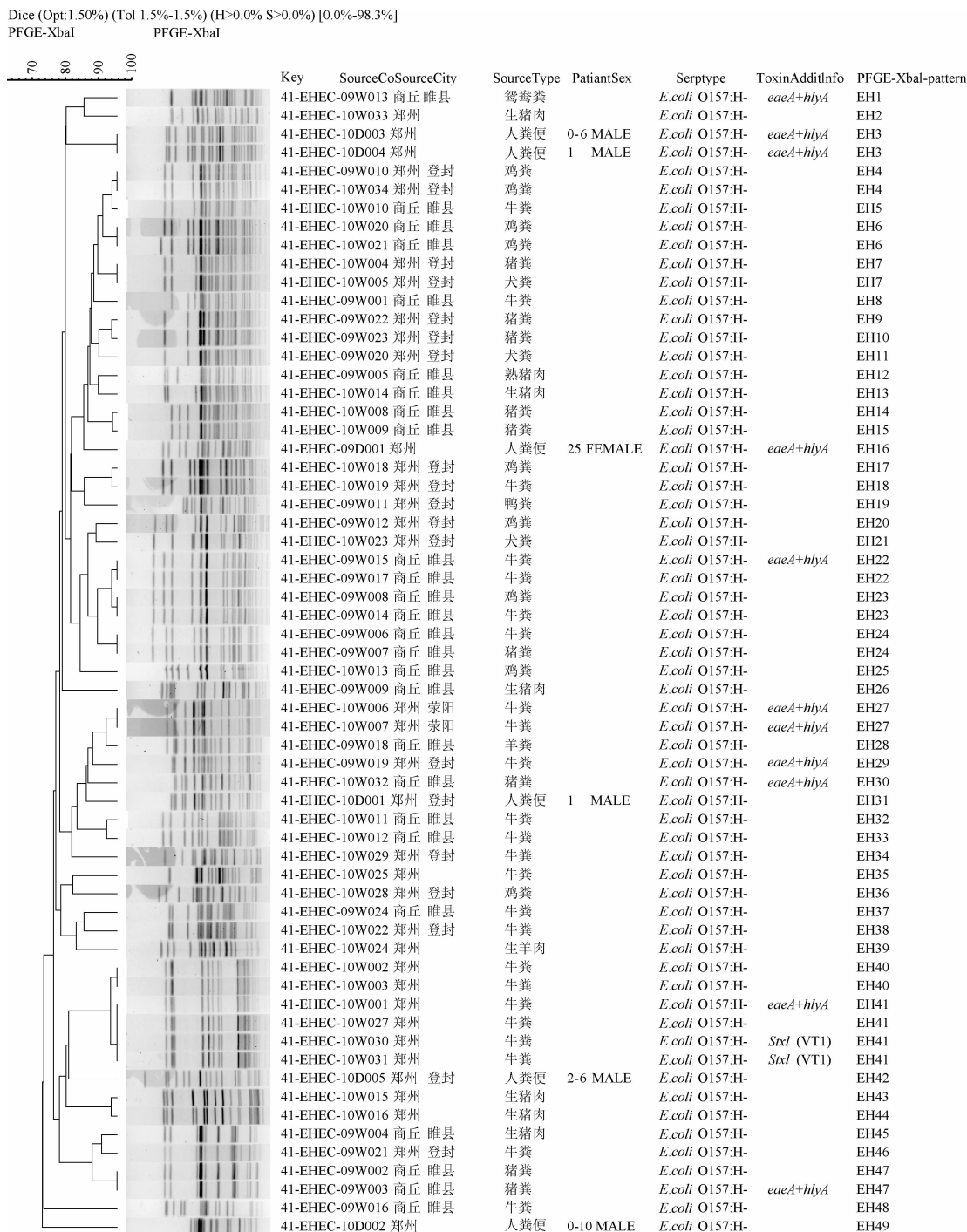


图1 EHEC O157的PFGE聚类分析

通过优化PFGE参数、变更限制性多态位点或结合其他分子分型技术进一步验证和研究。

参 考 文 献

- [1] Beutin L, Jahn S, Fach P. Evaluation of the 'GeneDisc' real-time PCR system for detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes[J]. J Appl Microbiol, 2009, 106(4): 1122-1132.
- [2] Kim Y, Oh S, Park S, et al. Interactive transcriptome analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 and intestinal epithelial HT-29 cells after bacterial attachment[J]. Int

J Food Microbiol, 2009, 131(2/3):224-232.

- [3] Xia SL, Shen GJ, Jin HJ, et al. Study on emerging infectious diseases of EHEC O157:H7 in Henan province[J]. Mod Prev Med, 2008, 35(23):4691-4694. (in Chinese)
夏胜利, 沈刚健, 靳会娟, 等. 河南省新发传染病EHEC O157:H7监测研究[J]. 现代预防医学, 2008, 35(23):4691-4694.
- [4] Ye JL, Zhan L, Lu QY, et al. Surveillance and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 in Zhejiang province[J]. Chin J Zoonoses, 2008, 24(3):247-251. (in Chinese)
叶菊莲, 占利, 陆群英, 等. 浙江省O157大肠杆菌监测及其分子生物学特性[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(3):247-251.

(收稿日期:2015-04-26)

(本文编辑:万玉立)

贵州省空肠弯曲菌临床分离株的多位点序列分型分析

韦小瑜 游旅 田克诚 李世军 唐光鹏 王定明

【关键词】 空肠弯曲菌; 多位点序列分型

Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* clinical isolates from Guizhou province Wei Xiaoyu, You Lyu, Tian Kecheng, Li Shijun, Tang Guangpeng, Wang Dingming. Institute of Infections Disease Control and Prevention, Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China

Corresponding author: Wei Xiaoyu, Email: weixyuse@foxmail.com

This work was supported by grants from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2012ZX10004-212) and Science and Technology Foundation of Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention (No. 2013-E2-2).

【Key words】 *Campylobacter jejuni*; Multilocus sequence typing

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)是引起人类急性腹泻常见的人兽共患病原菌。贵州省从2010年开始对感染性腹泻病例中空肠弯曲菌感染进行监测,结果显示,其检出率仅次于沙门菌^[1],提示空肠弯曲菌也是贵州省引起腹泻的主要病原菌之一,2012年贵州省首次从菌血症患儿血液标本中检出空肠弯曲菌^[2]。因此加强空肠弯曲菌的监测及了解其病

原特征,对贵州省空肠弯曲菌病的预防控制具有重要意义。本研究采用PCR方法对空肠弯曲菌分离株进行种型及亚种鉴定,并应用多位点序列分型(MLST)方法进行分析。

1. 材料与方法:

(1)菌株来源:10株空肠弯曲菌疑似菌株中9株分离自2010—2013年贵州省腹泻症候群监测病例粪便、1株分离自菌血症患儿全血培养物。

(2)细菌基因组DNA提取:将菌株接种至哥伦比亚血平板,42℃微需氧培养箱(85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂)培养48 h后,按试剂盒说明书提取细菌基因组DNA。

(3)空肠弯曲菌的多重PCR鉴定:采用文献[3]提供的空肠弯曲菌16S rRNA、*mapA*引物序列和参数对分离株进行种型鉴定,采用文献[4]提供的空肠弯曲菌*nap*基因引物序列及扩增程序进行亚种鉴定。

(4)空肠弯曲菌管家基因PCR扩增:根据空肠弯曲菌MLST数据库提供的空肠弯曲菌7个管家基因*aspA*、*gltA*、*glnA*、*glyA*、*pgm*、*tkl*、*uncA*引物及PCR扩增参数进行扩增。

(5)MLST分型分析:PCR扩增产物经纯化后,用测序引物进行双向测序,将测序序列与相应基因的标准序列进行比对并截为标准长度,在空肠弯曲菌MLST数据库中进行比对,获得各菌株的等位基因谱及序列型(sequence type, ST)。采用Bionumerics 6.6软件对贵州省菌株的各管家基因数据与我国北方地区空肠弯曲菌菌株的MLST等位基因数据进行聚类分析^[5]。

2. 结果:

(1)多重PCR方法鉴定空肠弯曲菌:种型鉴定多重PCR显示,10株分离株均获得857 bp(16S rRNA)及589 bp(*mapA*)特异性扩增片断;亚种*nap*基因扩增显示,10株菌均扩增出

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.11.029

基金项目:国家科技重大专项(2012ZX10004-212);贵州省疾病预防控制中心科学技术基金(2013-E2-2)

作者单位:550004 贵阳,贵州省疾病预防控制中心传染病预防控制所
通信作者:韦小瑜, Email: weixyuse@foxmail.com