

应用多重引物 PCR 技术检测 O157:H7 毒力基因

郭喜玲 史智扬 顾玲 庄菱 潘浩

【摘要】 目的 对江苏省 6 个不同地区不同宿主动物中分离的 O157:H7 菌株进行毒力基因的检测分析。方法 应用肠出血性大肠杆菌(EHEC)的多重引物聚合酶链反应(PCR)方法,以志贺样毒素(SLT₂和SLT₁)基因、“粘附抹平”因子 eaeA 基因和溶血素(hly)基因为靶基因进行检测。结果 江苏省分离的 O157:H7 菌株毒力基因携带率为 56.5%,不同地区的分离株携带率有所不同,个别地区高达 90%以上,有的地区则未检测到带毒力基因的菌株,这一结果与不同地区发病率的高低有平行的关系。疾病高发地区,菌株毒力基因携带率达 85.7%(36/42),低发或散发地区为 52.6%(10/19),非流行地区为 8.3%(2/24)。不同的宿主动物分离株其毒力基因携带阳性率从高到低依次为羊>牛>猪>鸡。仅有的一份兔粪便标本分离株也检出毒力基因。菌株毒力基因图谱以 SLT₂+eaeA+hly 为主,占 79.2%,其次为 SLT₂+SLT₁+eaeA+hly 和 SLT₂+hly,分别占 16.6%和 4.2%;有毒力基因的菌株均有 hly 和 SLT₂,绝大多数菌株有 eaeA 基因,携带 SLT₁ 的菌株则较少,这与国外一些报道有所不同。结论

O157:H7 毒力基因图谱是一个重要的分子流行病学标志,应用多重引物 PCR 方法检测 O157:H7 毒力基因,简便、快速、特异、敏感,对流行病学调查分析、制定预防和控制对策有重要的参考价值。

【关键词】 肠出血性大肠杆菌;基因;聚合酶链反应

Using multiplex PCR for the detection of virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7 GUO Xiling, SHI Zhiyang, GU Ling, et al. Antiepidemic Station of Jiangsu Province, Nanjing 210009, China

【Abstract】 Objective To detect and characterize the virulence genes in *E. coli* O157:H7 isolated from various reservoir in six areas of Jiangsu province. **Method** The virulence genes of Shiga-like toxin(SLT₁ and SLT₂), intimin(eaeA) and hemolysin(hlyA) were chosen as the target genes and amplified in multiplex PCR assays. **Results** Of the eighty-five *E. coli* O157:H7 strains, the overall virulence gene prevalence was found to be 56.5%(48/85). The prevalence rates virulence genes of isolates from various areas were different from 0% up to 90.5%. It seemed to exist a relationship between the virulence gene prevalence and the level of incidence. In the areas where rates of incidence were divided into high, low, sporadic or zero, the prevalence rates were 85.7%(36/42), 52.6%(10/19) and 8.3%(2/24), respectively. The prevalence rates of isolates were also different from various reservoirs, decreasing by sheep, cattle, pig and poultry. One isolate from a rabbit was positive for SLT₂, eaeA and hly genes. Of forty-eight isolates carrying virulence genes, 38(79.2%) had SLT₂, eaeA and hly genes, taking the dominate virulence gene pattern, 8(16.6%) had all of the four virulence genes 4(4.2%) had both SLT₂ and hly genes respectively. In addition, SLT₁ gene showed a lower prevalence, which was different from some findings abroad. **Conclusion** Since virulence gene pattern of *E. coli* O157:H7 is an important molecular epidemiological marker, it can provide an useful information for epidemiologic studies, and helpful to the design of prevention and control strategies. For virulence gene detection, multiplex PCR seems to be a simple, rapid, specific and sensitive method.

【Key words】 Enterohemorrhagic *E. coli*(EHEC); Gene; Polymerase chain reaction

大肠杆菌 O157:H7 是肠出血性大肠杆菌(EHEC)的一种主要血清型,可引起人类腹泻、出血

性结肠炎(HC),在儿童和老年患者中易并发溶血性尿毒综合症(HUS)^[1]。1982年O157:H7大肠杆菌首次在美国引起了出血性结肠炎的暴发^[2]。1996年在日本发生了O157:H7大肠杆菌的暴发流行,9000多名儿童感染,死亡12例^[3]。目前世界上许多发达国家和一部分发展中国家都发生了O157:H7大肠杆

菌的暴发流行,成为全球性的公共卫生问题。出血性大肠杆菌的致病作用主要是通过细菌对肠道上皮细胞粘附和产生毒素两个过程。其主要毒力基因有志贺样毒素(SLT₁和SLT₂)基因、“粘附抹平”因子eaeA基因和溶血素(hly)基因^[4]。本研究应用一种能同时检测这4种基因的多重引物聚合酶链反应(MPCR)方法,对分离自江苏省6个不同地区不同宿主动物的O157:H7菌株进行了毒力基因测定,现将结果报告如下。

材料与方法

1. 参考菌株 :E. coli O157:H7 882364 菌株,由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所惠赠;普通大肠杆菌 ATCC25922,由本站菌种室提供。

2. 试验菌株 :1999 年度从江苏省 6 个监测点分离的经生化和血清学鉴定为 O157:H7 的菌株 85 株。

3. 试剂 :TaqDNA 聚合酶、dNTPs、Buffer、PCR Marker 等购自上海复华和华美公司。

4. 引物 :引物序列见表 1,由上海生工生物工程公司合成。

表1 引物序列及扩增片段长度

引物	引物序列	扩增片段长度(bp)
SLT ₂ -F ^[5]	5'-CCATGACAACGGACAGCAGTT	779
SLT ₂ -R	5'-CCTGTCAACTGAGCACITTTG	
SLT ₁ -F ^[5]	5'-ACACTGGATGATCTCAGTGG	614
SLT ₁ -R	5'-CTGAATCCCCCTCCATTATG	
eaeA-F ^[5]	5'-AAGCGACTGAGGTCACT	450
eaeA-R	5'-ACGCTGCTCACTAGATGT	
hly-F ^[6]	5'-CACACGGAGCTTATAATAATCTGTCA	340
hly-R	5'-AATGTTATCCCAITGACATCAITTGACT	

5. 模板制备 :将分离的菌株在普通营养琼脂上 37℃ 培养 18~24 h,刮取 2~3 个菌落于 200 μl 灭菌生理盐水中混匀,煮沸 10~15 min,直接用于 PCR 扩增。

6. 多重引物 PCR 方法 :反应总体积为 50 μl,在 0.5 ml 离心管中依次加入 :10 × Buffer 5 μl, dNTPs (每种 dNTP 溶液浓度为 0.2 mmol/L) 4 μl,引物计 8 条,每条 1.5 μl(10 pmol/μl),Taq 酶 0.5 μl(1 U),DEPC 处理的双蒸水 26.5 μl,模板 2 μl,石蜡油 50 μl。以参考菌株 882364 作阳性对照,ATCC 25922 作阴性对照,DEPC 处理的双蒸水作试剂空白对照。反应程序 :94℃ 7 min,变性模板 DNA,然后 94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 1 min,30 个循环,最后

72℃ 延伸 5 min。

7. PCR 产物检测 :PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,分子量 100~1 000 bp 的 Marker 作参照,在紫外灯下观察实验结果。

结 果

1. 用 4 对引物进行多重引物 PCR 反应,阳性对照 882364 有 4 种毒力基因(SLT₂ + SLT₁ + eaeA + hly),而 ATCC25922 和试剂空白对照均为阴性结果。

2. 不同地区分离菌株毒力基因图谱及毒力基因携带率见表 2。

表2 不同地区分离菌株毒力基因图谱及毒力基因携带率

地区类型	地区	检测数	未检出	SLT ₂ + hly	SLT ₂ + eaeA + hly	SLT ₂ + SLT ₁ + eaeA + hly	携带率 (%)
高发区	A	21	2		12	7	90.5
	B	21	4		17		81.0
低发区	C	7	2	2	3		71.4
	D	12	7		4	1	41.7
非流行区	E	11	9		2		18.2
	F	13	13				0.0
合计		85	37	2	38	8	56.5

3. 不同宿主动物分离菌株毒力基因图谱及毒力基因携带率见表 3。

4. 检出毒力基因的 48 株菌株均携带 SLT₂、hly 毒力基因,携带 eaeA 基因菌株 46 株,占 95.8%,携带 SLT₁ 基因菌株 8 株,占 16.6%。毒力基因图谱见表 4。

表3 不同宿主动物分离菌株毒力基因图谱及毒力基因携带率

动物种类	检测数	未检出	SLT ₂ + hly	SLT ₂ + eaeA + hly	SLT ₂ + SLT ₁ + eaeA + hly	携带率 (%)
牛	24	11		12	1	54.2
羊	23	4	1	14	4	82.6
猪	18	10	1	5	2	44.4
鸡	19	12		6	1	36.8
兔	1			1		100.0
合计	85	37	2	38	8	56.5

讨 论

综合分析检测结果,我省分离的菌株毒力基因携带率为 56.5%,不同地区的分离株携带率有所不同,个别地区高达 90% 以上,有的地区则未检测到带毒力基因的菌株,这一结果与不同地区发病率的高低有平行的关系。疾病高发地区,菌株毒力基因携带率达 85.7%(36/42),低发或散发地区为 52.6%

(10/19) 疑似或非流行地区为 8.3%(2/24)。

表4 携带毒力基因菌株的毒力基因图谱

毒力基因	菌株数	构成比(%)
SLT ₂ + hly	2	4.2
SLT ₂ + eaeA + hly	38	79.2
SLT ₂ + SLT ₁ + eaeA + hly	8	16.6
合计	48	100.0

不同的宿主动物分离株其毒力基因携带阳性率从高到低依次为羊 > 牛 > 猪 > 鸡。仅有的一份兔粪便标本分离株也检出毒力基因。

我省分离的菌株毒力基因图谱以 SLT₂ + eaeA + hly 为主,占 79.2%,其次为 SLT₂ + SLT₁ + eaeA + hly 和 SLT₂ + hly,分别占 16.6% 和 4.2%;有毒力基因的菌株均有 hly 和 SLT₂,绝大多数菌株有 eaeA 基因,携带 SLT₁ 的菌株则较少,这与国外一些报道有所不同。Fagan 等^[7]报道澳大利亚用 MPCR 方法检测动物粪便中 EHEC 毒力基因,SLT₁ 和 hly 最为多见,在检出毒力基因的标本中,SLT₂ 阳性率不足 10%,eaeA 的阳性率低于 30%。其毒力基因图谱呈多样性,47.8% 的标本仅检出 hly 基因。

虽然 O157:H7 的致病机理尚未完全阐明,但其产生的毒素在疾病的发展过程中起着重要的作用。有文献报道,SLT₂ 阳性菌株能引起更加严重的症状和组织病理学改变^[8]。

O157:H7 感染已成为世界性的卫生问题,随着生物技术的不断发展,对其毒力因子的研究也在不断地深入。流行病学调查结果表明,家养动物,特别是牛、羊、猪等家畜是 O157:H7 的主要贮存宿主,因此,O157:H7 感染的预防和控制应从贮存宿主的管

理入手。结合简便、快速、特异、敏感的分子生物学的方法对各监测点分离的菌株进行毒力基因的检测,对流行病学调查分析、制定预防和控制疾病暴发的对策有重要的参考价值。

参 考 文 献

- 1 Neill MA, Tarr PI, Clausen CR, et al. *Escherichia coli* O157:H7 as the predominant pathogen associated with the hemolytic uremic syndrome: a prospective study in the Pacific Northwest. *Pediatrics*, 1987, 80:37-40.
- 2 Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, et al. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol*, 1983, 18:512-520.
- 3 Reilly A. A prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections: memorandum from a WHO meeting. WHO consultation on prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. *Bull World Health Organ*, 1998, 76:245-255.
- 4 Boerlin P, McEwen SA, Boerlin PF, et al. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol*, 1999, 37:497-503.
- 5 Louie M, Read S, Simor AE, et al. Application of multiplex PCR for detection of non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in bloody stools: identification of serogroups O26 and O111. *J Clin Microbiol*, 1998, 36:3375-3377.
- 6 Bonnet R, Souweine B, Gauthier G, et al. Non-O157:H7 stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *J Clin Microbiol*, 1998, 36:1777-1780.
- 7 Fagan PK, Hornitzky MA, Bettelheim KA, et al. Detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65:868-872.
- 8 Karpman D, Connell H, Svensson M, et al. The role of lipopolysaccharide and Shiga-like toxin in a mouse model of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J Infect Dis*, 1997, 175:611-620.

(收稿日期 2000-06-28)