·实验室研究·

非O157产志贺毒素大肠埃希菌分离株脉冲场凝胶电泳分析

金东 赵爱兰 白向宁 孟琼 于波 袁雪娇 熊衍文 侯雪新 李振军

【摘要】 **目的** 对国内不同宿主来源的非O157产志贺毒素大肠埃希菌(STEC)分离株进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析,以初步建立中国非O157 STEC菌株的基础数据库,了解其分子流行病学特征。**方法** 参照PulseNet非O157 STEC的PFGE实验方法对76株非O157 STEC分离株进行分析,并使用BioNumerics软件进行聚类。**结果** 在PulseNet推荐的电泳参数和内切酶*Xba*Ⅰ情况下,菌株酶切片段分布均匀,条带易于识别。76株非O157 STEC分离株产生62种PFGE带型,初步聚类为A~M 13个群,不同来源菌株的PFGE带型分布广泛,但均具有某些优势的PFGE聚类群。**结论** 国内不同来源的非O157 STEC呈高度多态性,PulseNet推荐的PFGE电泳参数和内切酶*Xba*Ⅰ适用于中国非O157 STEC菌株的分析。

【关键词】 非O157产志贺毒素大肠埃希菌; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型

Pulsed-field gel electrophoresis typing on non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates

JIN Dong, ZHAO Ai-lan, BAI Xiang-ning, MENG Qiong, YU Bo, YUAN Xue-jiao, XIONG Yan-wen, HOU Xue-xin, LI Zhen-jun. State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: *LI Zhen-jun*, Email: lizhenjun@icdc.cn

This work was supported by grants from the National Science and Technology Major Projects of China (No. 2011ZX10004-001 *and* No. 2012ZX10004-501) *and the National Health Research Industry Special Fund* (No. 201302006).

【**Abstract**】 **Objective** To establish a database and to understand the molecular epidemiological features of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from different animal reservoirs and patients. **Methods** Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed according to the PulseNet protocol with minor modifications. A dendrogram was constructed using the BioNumerics. **Results** Under the PulseNet protocol, 62 PFGE patterns were obtained from 76 non-O157 STEC isolates and then divided into A to M groups. Isolates from different sources were widely distributed in different groups, but were predominant seen in certain groups. **Conclusion** The non-O157 STEC isolates in China were highly polymorphic. PulseNet protocol seemed to be suitable for the typing of Chinese non-O157 STEC isolates.

【**Key words**】 Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; Pulsed-field gel electrophoresis; Molecular typing

产志贺毒素大肠埃希菌(STEC)是重要的食源性病原菌,可引起水样腹泻、出血性肠炎(HC)、溶血性尿毒综合征(HUS)等病死率高的疾病[1]。自1982年美国首次报道从食物中毒患者以及HUS患者粪便标本中分离到STEC O157:H7以来[2],由O157:H7所引起的暴发及散发病例在世界范围内不断报道[3-5]。近年来由非O157 STEC造成暴发以及散发感染的报道越来越多[6],特别是2011年5月德国暴发STEC O104:H4感染疫情,波及北美及欧洲16个国家[7]。提示未来非O157 STEC的流行或暴发可能会成为公共卫生领域的一个重要问题。脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术已广泛应用于追踪监测细菌性传染病的暴发和流行,在分析菌株之间的遗传差异及相关性,协助追踪感染来源,控制继发性感染等方面发挥着不可替代的作用。本研究参考美国疾病预防控制中心PulseNet非O157 STEC

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.05.020

基金项目:国家科技重大专项(2011ZX10004-001, 2012ZX10004-501);卫生科研行业专项(201302006)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室

通信作者:李振军, Email: lizhenjun@icdc.cn

PFGE分型方法，对我国不同来源的非O157 STEC分离株进行分析，以建立我国非O157 STEC的PFGE基础数据库，了解其分子流行病学特征。

材料与方法

1. 实验菌株：本研究中76株非O157 STEC菌株分别分离自腹泻患者粪便(2株)、羊粪(25株)、牛粪(20株)、猪粪和猪肠内容物(29株)。菌株分离时间为2002—2012年，标本来源包括北京、河南、湖南、四川、黑龙江、青海、贵州等地。所有菌株经系统生化鉴定为大肠埃希菌，采用多重PCR方法对菌株进行stx_1/stx_2毒力基因检测，并利用PCR检测$rfbE_{O157}$基因结合O157抗血清以排除属于O157血清群的菌株[8]。参考菌株沙门菌H9812(*Salmonella braenderup* strain H9812)用于PFGE分析时的分子量Marker。

2. 主要试剂：Taq DNA聚合酶、限制性内切酶*Xba* Ⅰ购自TaKaRa公司；SeaKem Gold(SKG)琼脂糖购自基因科技(上海)有限公司；蛋白酶K、十二烷基肌氨酸钠购自德国Merck公司；SDS购自北京鼎国生物技术有限公司；EDTA、Tris及硼酸购自生工生物工程(上海)技术服务有限公司。比浊用试管为Falcon352054(美国BD公司)；50 ml Screw-cap试管为Corning Centrifuge Tube(美国Corning公司)。

3. 主要仪器：脉冲场凝胶电泳仪为CHEF DRIII system(美国Bio-Rad公司)，凝胶成像系统为GEL Doc 2000(美国Bio-Rad公司)，水浴摇床为Grant OLS2000(英国Grant公司)，浊度仪为Densimat(法国BioMérieux Vitek公司)，PCR仪为SensoQuest Labcycler(德国Senso公司)产品。

4. PFGE：参照美国CDC PulseNet操作手册，略有改动。

(1)制作胶块：挑取单个菌落接种于新鲜LB琼脂培养基上，37 ℃培养18～24 h。刮取适量细菌，调整其麦氏比浊值至4.0～4.5。取400 μl细菌悬浊液37 ℃孵育5 min后加入20 μl蛋白酶K(20 mg/ml)。将菌悬液与400 μl 1% Seakem Gold：1% SDS混匀后加入模具，在室温下凝固10～15 min后制成胶块。将胶块移入5 ml细胞裂解液[50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)，50 mmol/L EDTA (pH 8.0)，1%十二烷基肌氨酸钠，0.1 mg/ml蛋白酶]中，54 ℃水浴摇床(转速约130 r/min)中孵育2 h。使用纯水于50 ℃水浴摇床中清洗2次，每次10 min(转速不变)；然后使用Tris：EDTA Buffer[10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)，1 mmol/L EDTA (pH 8.0)]在50 ℃的水浴摇床中清洗4次，每次15 min。

(2)酶切：切取2 mm宽的胶块，用150 μl酶切缓冲液37 ℃缓冲10～15 min。重新加入酶切缓冲液和适量的限制性内切酶共200 μl，每个样本*Xba* Ⅰ酶的用量为45 U。37 ℃孵育2 h。吸出酶切液，加入200 μl 0.5×TBE，将胶块加在梳子齿上，干燥约5 min后，倒入平衡好的1% SKG，室温凝固30 min。

(3)电泳：电泳条件为2000～2200 ml 0.5×TBE，电压6.0 V/cm，脉冲夹角120°，起始脉冲时间6.8 s，终止脉冲时间35.4 s，电泳时间18～19 h。

(4)图像获取：完成电泳后，将胶放入1 μg/ml溴化乙锭溶液中染色30 min，置纯水中脱色30 min，凝胶成像仪中成像并记录结果。

(5)电泳图像分析和结果聚类分析：PFGE图像应用BioNumerics(Version 4.0)数据库软件(Applied Maths BVBA, Belgium)进行处理，识别图像条带。在图像识别过程中，在Marker最小片段外的实验菌株条带因不能为Marker校准而剔除。图像通过统一的Marker进行校准，标定条带位置，必要时进行人工校正。聚类方法和参数选择：聚类图类型(Dendrogram type)选择UPGMA(Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages)方法，条带位置差异容许度(position tolerance)选择1.5%，优化值(optimization)为1.5%。采用Band based/Dice方法计算相似性系数(similarity coefficient)，即Dice系数(F×100%，F value×100%)。$F=2n_{xy}/(n_x+ny)$，式中n_x是菌株x的总的片段数，n_y是菌株y的总的片段数，n_{xy}是菌株x和菌株y的相同的片段数，F值反映的是不同菌株电泳条带的相似性程度，范围0～1之间，0代表完全不相关，1代表完全相同。参考PulseNet的命名原则，对每一种不同的带型进行命名。

结　果

1. 非O157 STEC分离株的PFGE分型：按照PulseNet非O157 STEC的PFGE分型方案，本研究76株不同来源的非O157 STEC分离株共产生62种不同的PFGE带型(EZKX01001～EZKX01062)(图1)。其中包括4株菌的带型有EZKX01017，包括3株菌的带型有EZKX01010和EZKX01023，包括2株菌的带型分别有EZKX01008、EZKX01013、EZKX01019、EZKX01037、EZKX01039、EZKX01045、EZKX01062，其余每个PFGE带型分别只有1株菌。根据UPGMA聚类图，将78株菌(包括2株2011

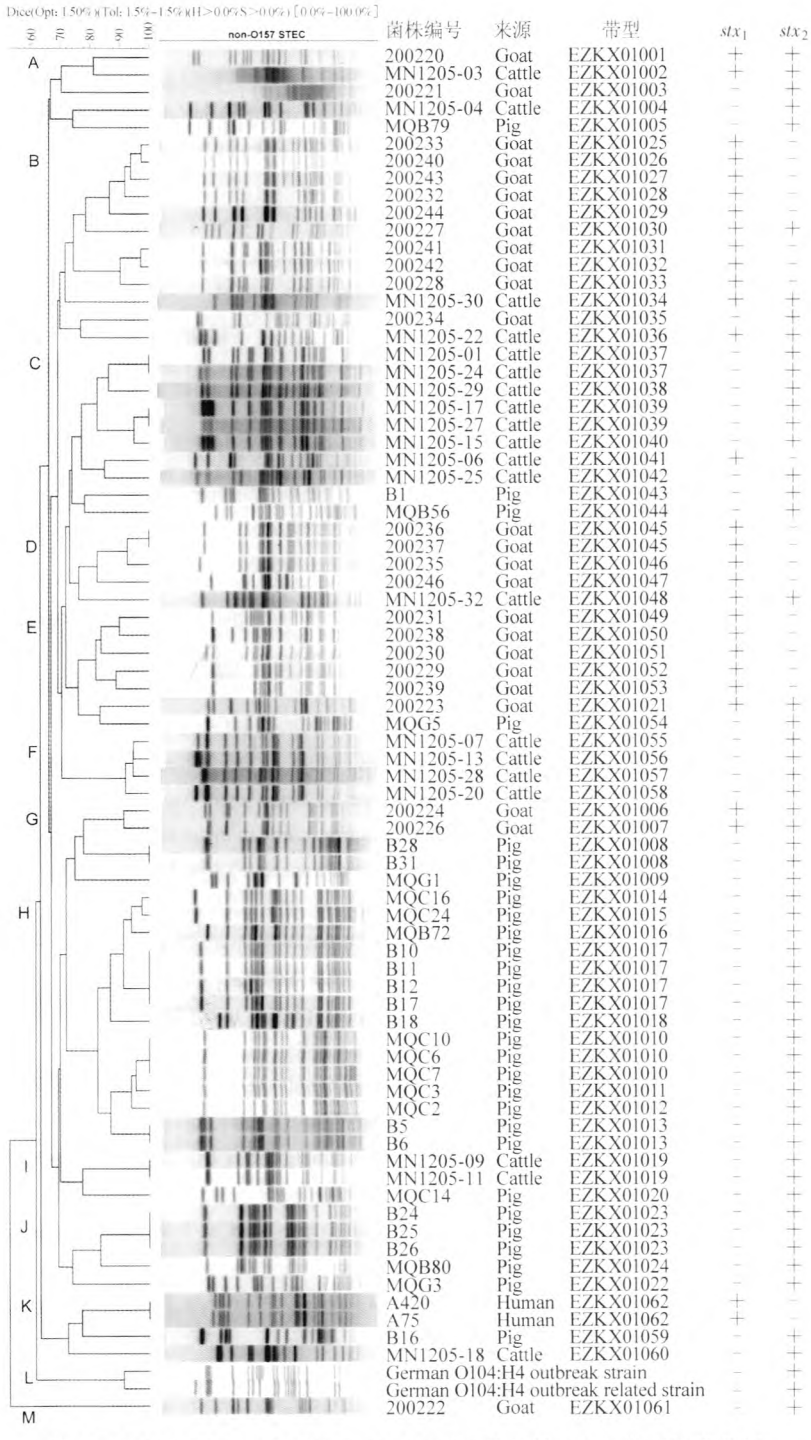

图1 78株不同宿主来源的非O157 STEC分离株PFGE带型聚类分析

年德国大肠埃希菌O104：H4疫情暴发菌株和暴发相关菌株)的PFGE带型分为A～M共13个群，各群包括的菌株数量为1～15株。分析结果表明我国不同地域不同腹泻患者或者健康动物携带的非O157 STEC呈高度多态性。

2. 不同宿主来源非O157 STEC分离株的PFGE分型：本研究中共涉及人、羊、牛、猪4种宿主来源的非O157 STEC，腹泻患者分离菌株只有2株，呈相同的带型(EZKX01062)，且与其他动物来源的菌株存在较大差异，其聚类相似性<80%；25株羊分离株分布于6个群，但以B、D、E群为主；20株牛分离株分布于7个群，但以C、F群为主，且F群中只包括牛分离株；29株猪分离株分布于8个群，但以H和J群为主，且其中只包括猪分离株(表1)。以上结果表明不同来源菌株的PFGE带型分布广泛，且均具有某些优势的PFGE聚类群。

3. 不同PFGE型别菌株携带志贺毒素基因情况：76株非O157 STEC分离株中，stx_1基因阳性20株，stx_2基因阳性47株，stx_1+stx_2基因均阳性9株。F、H、I、G群菌株均只携带stx_2基因，可能与其主要来源于牛(F群)或猪(H、I、G群)的分离株有关。其余PFGE群的菌株存在不同的志贺毒素基因形式。

讨 论

目前发现能引起人感染的STEC血清型已超过400种，其中以O157：H7血清型为主[9]。近年来非O157 STEC感染率不断上升，世界许多国家出现了非O157 STEC暴发[10,11]。有鉴于此，美国疾病预防控制中心于2009年建议临床实验室对所有腹泻标本进行O157 STEC分离培养及非O157 STEC检测[12]。我国1999年在苏皖地区出现O157：H7感染暴发后，已在某些地区开展了O157：H7的监测，但非O157 STEC在我国的感染情况目前尚无系统研究。白向宁等[13]对我国部分动物源性非O157 STEC菌株的多位点序列分型(MLST)

表1 不同宿主来源非O157 STEC菌株的PFGE带型分布

菌株来源	菌株数	PFGE带型数	所属PFGE群	优势PFGE群
腹泻患者	2	1	K	K
羊	25	24	A、B、D、E、G、M	B、D、E
牛	20	17	A、B、C、D、F、I、K	C、F
猪	29	20	A、C、E、G、H、I、J、K	H、J

分析表明，我国的菌株与国际流行菌株有一定亲缘关系，应重视非O157 STEC的感染。近期我们从腹泻患者粪便中分离到非O157 stx_1基因阳性的菌株，也进一步说明我国实际存在非O157 STEC感染。

随着人际往来和贸易发展，传染病跨地区传播已成为其预防控制面临的重要问题。基于当前细菌性传染病的传播特征及其公共卫生威胁，美国疾病预防控制中心建立了以PFGE技术为核心的实验室分子分型监测网络（PulseNet），通过该网络已成功处置和预警了多起细菌性传染病暴发疫情。2004年由中国疾病预防控制中心牵头成立了我国细菌性传染病实验室分子分型监测网络（PulseNet China），PulseNet China作为国际网络（PulseNet International）的重要组成部分，实现了全球范围监测信息的查询和比对。本实验应用*Xba*Ⅰ内切酶对我国分离的非O157 STEC菌株进行PFGE分析，菌株酶切后的条带数目适中，片段大小分布均匀，是理想的限制性内切酶。使用PulseNet推荐的电泳参数得到酶切图谱中酶切片段分布均匀，条带易于识别；不同宿主中分离的菌株带型差异明显，与病原学特征相符。同时使用统一的限制性内切酶和电泳参数方便我们随时与国际网络的数据进行比对和分析。

本研究建立了我国非O157 STEC菌株的基础数据库，并可以在后续的工作中对数据库不断丰富，为我国非O157 STEC的暴发调查及溯源等奠定基础，同时通过与国际暴发菌株带型（如本研究中涉及的2011年德国大肠埃希菌O104：H4疫情暴发菌株和暴发相关菌株）的查询和比对，掌握了可能涉及我国利益的细菌性传染病的流行情况和病原学特征。

参 考 文 献

[1] Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(1): 142-201.

[2] Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med, 1983, 308(12): 681-685.

[3] Doorduyn Y, De Jager CM, van Der Zwaluw WK, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157 outbreak, The Netherlands, September-October 2005. Euro Surveill, 2006, 11(7): 182-185.

[4] Sodha SV, Lynch M, Wannemuehler K, et al. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections associated with a national fast-food chain, 2006: a study incorporating epidemiological and food source traceback results. Epidemiol Infect, 2011, 139(2): 309-316.

[5] Xiong Y, Wang P, Lan R, et al. A novel *Escherichia coli* O157: H7 clone causing a major hemolytic uremic syndrome outbreak in China. PLoS One, 2012, 7(4): e36144.

[6] Bettelheim KA. The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. Crit Rev Microbiol, 2007, 33(1): 67-87.

[7] Muniesa M, Hammerl JA, Hertwig S, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4: a new challenge for microbiology. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(12): 4065-4073.

[8] Wang T, Xiong YW, Bai XM, et al. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 by multiplex PCR. Chin J Clinical Labora Science, 2010, 28(4): 264-266. (in Chinese)
王涛，熊衍文，白雪梅，等. 多重PCR检测肠出血性大肠埃希菌O157：H7. 临床检验杂志，2010，28(4)：264-266.

[9] Blanco M, Blanco JE, Mora A, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae*-ξ). J Clin Microbiol, 2004, 42(2): 645-651.

[10] Ethelberg S, Smith B, Torpdahl M, et al. Outbreak of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection from consumption of beef sausage. Clin Infect Dis, 2009, 48(8): e78-81.

[11] Kappeli U, Hachler H, Giezendanner N, et al. Human infections with non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000-2009. Emerg Infect Dis, 2011, 17(2): 180-185.

[12] Gould LH, Bopp C, Strockbine N, et al. Recommendations for diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. MMWR Recomm Rep, 2009, 58(RR-12): 1-14.

[13] Bai XN, Zhao AL, Xia SL, et al. Multilocus sequence typing of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. Chin J Zoonoses, 2012, 28(6): 544-548, 560. (in Chinese)
白向宁，赵爱兰，夏胜利，等. 非O157产志贺毒素大肠杆菌分离株的多位点序列分型研究. 中国人兽共患病学报，2012，28(6)：544-548，560.

（收稿日期：2012-12-17）
（本文编辑：张林东）