

山梨醇发酵产志贺毒素大肠埃希菌 O157:H⁻ 的特征与检测

王树坤 张媛春 师庭明 储从家

山梨醇发酵产志贺毒素大肠埃希菌 O157:H⁻ (sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H⁻, 简称 SF STEC O157:H⁻) 已成为欧洲大陆感染性腹泻的主要原因^[1,2]。本文综述 SF STEC O157:H⁻ 菌株的致病性、感染流行病学、表型和分子特征以及适宜的微生物学诊断技术。

1. SF STEC O157:H⁻ 是人类的致病菌: SF STEC O157:H⁻ 是 1988 年首次在德国巴伐利亚一次溶血性尿毒综合征 (HUS) 爆发中获得确认, 6 例患儿有 2 例分离到该菌株, 菌株含有志贺毒素的 stx₂ 基因^[3]。一项为期 3 年的前瞻性对照研究调查了 SF STEC O157:H⁻ 在儿科 HUS 和腹泻散发病例中的意义, 104 例 HUS 病人和 668 例住院腹泻病人该菌株的分离率分别为 13.5% 和 0.45%^[3]。近几年来的一些研究发现, SF STEC O157:H⁻ 菌株在 HUS 和腹泻病人中的分离率范围分别为 3.2% ~ 17.7% 和 0.4% ~ 1.5%^[4,5]。

在 1995 ~ 1996 年冬季, 德国巴伐利亚再次发生 SF STEC O157:H⁻ 感染的爆发, 出现 28 例 HUS 患儿, 3 例死亡^[2]。估计受到感染的腹泻病患者有 300 ~ 600 例^[6]。在 1995 年, 从捷克共和国波希米北部 2 例 HUS 患儿粪便标本分离到 SF STEC O157:H⁻ 菌株, 该菌株与德国分离株没有流行病学联系^[7]。之后, 在匈牙利、芬兰、奥地利等国家也从腹泻或 HUS 病人分离到 SF STEC O157:H⁻ 菌株^[5,8]。然而, 欧洲大陆以外其他国家至今仍未分离到 SF STEC O157:H⁻ 菌株的报告。

2. SF STEC O157:H⁻ 感染症的流行病学: 少量资料提示 SF STEC O157:H⁻ 与 STEC O157:H7 所致感染症的流行病学在某些方面不相同 (表 1), 前者流行高峰在寒冷月份且患者多为 3 岁以下儿童^[2,7,8]; 已确认牛是 STEC O157:H7 的主要传染源^[6], 但至今仅从 1 头奶牛和 1 匹小马粪便各分离到 1 株 SF STEC O157:H⁻, 还未从其他被证实为 STEC O157:H7 传染源的猪、羊、山羊、鹿、鸡等家养或野生动物中分离到 SF STEC O157:H⁻ 菌株^[8]。

在 1995 ~ 1996 年, 德国 SF STEC O157:H⁻ 感染症爆发可能是食物源性传播, 病例对照研究确认牛肉香肠 (mortadella 和 teewurst) 是 SF STEC O157:H⁻ 菌株的传播媒介^[2]。直接接触携带 SF STEC O157:H⁻ 的奶牛和小马的粪

表 1 SF STEC O157:H⁻ 和 STEC O157:H7 感染症流行病学的比较

流行病学特征	SF STEC O157:H ⁻	STEC O157:H7
地理分布	欧洲大陆、世界其他地区?	世界范围
流行季节	上年 9 月至次年 4 月	6 ~ 8 月
年龄分布	3 岁以下儿童 (HUS 病人年龄的中位数是 25.5 个月)	3 岁以上儿童 (HUS 病人年龄的中位数是 47 个月)
传染源	牛 (1 株)、小马 (1 株)	牛、其他家养和野生动物 (羊、猪、马、狗、鹿、鸡、海鸥)
传播途径	污染食品、接触动物、人与人接触?	污染食品和水、接触动物、人与人接触
感染剂量	不清楚	很低 (< 50 个菌体)

3. SF STEC O157:H⁻ 菌株的表型和毒力特征: 至今发现的 SF STEC O157:H⁻ 菌株具有相同的表型和毒力特征 (表 2)。SF STEC O157:H⁻ 在 24 h 孵育期内发酵山梨醇并表达 β-D-葡萄糖醛酸酶活性^[2,7,9]; 采用大肠埃希菌 O157:H7 噬菌体分型系统证明 SF STEC O157:H⁻ 菌株大多属于噬菌体 88 型菌并与噬菌体 23 型菌密切相关, 然而, 目前还未发现 STEC O157:H7 菌株存在这两型菌^[1,2,7,9-11]。

由于 SF STEC O157:H⁻ 菌株无动力, 其 H 抗原不能通过血清分型确定, 因此, 采用限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析方法对德国和捷克共和国 SF STEC O157:H⁻ 代表分离株编码鞭毛蛋白亚单位基因 (fliC) 作了分析, 结果证明受测试菌株均拥有编码 H7 抗原的 fliC 基因^[9,12]。SF STEC O157:H⁻ 菌株 fliC 基因核苷酸序列分析显示该菌株 fliC 基因积累多个突变, 这可能是鞭毛蛋白不表达的原因^[13]。此外, 已确认在 SF STEC O157:H⁻ 菌株 fliC 基因的保守区内有两个插入子, 这在阅读框架内产生一个转换, 从而引入一个早期停止密码子, 这很可能构成此类菌株无动力的分子基础^[13]。

虽然 SF STEC O157:H⁻ 菌株的毒力特征总体上与 STEC O157:H7 相似, 但 SF STEC O157:H⁻ 菌株有其特异的毒力因子谱, 包括单一 stx₂ 基因、编码紧密素 (intimin) 的 eae、含有 EHEC hlyA 和 etp 但无 espP 和 katP 的一个约 90 kb 大质粒 (表 2)。SF STEC O157:H⁻ stx₂ 基因和 STEC O157:H7 stx₁ 和 stx₂ 基因均由噬菌体携带^[14]。SF STEC O157:H⁻ 与 STEC O157:H7 菌株明显不同的另一特征是后者有称为亚硝酸盐抗性和粘附岛 (TAI) 的一种毒力岛, TAI 携带编码一种新型粘附蛋白和亚硝酸盐抗性物质的基因 (表 2),

基金项目: 云南省学术技术带头人基金资助项目 (1999 516)
作者单位: 653100 云南省玉溪市疾病预防控制中心流行病科 (王树坤、张媛春); 玉溪市医院检验科 (师庭明、储从家)
便是捷克共和国与德国散发病例感染的传播途径^[9]。

表 2 SF STEC O157:H⁻ 和 STEC O157:H7 的表型和毒力特征

血清型	表型特征*					染色体毒力基因			大质粒 (ca. 90 kb)	质粒基因 [#]				
	SF/GUD	PT	Stx	Hly	TR	stx	eae	TAI		hlyA	katP	espP	etp	sfp
SF STEC O157:H ⁻	+ / +	88 23	仅有 Stx ₂	-(+)	无	stx ₂	紧密素	-	有	+	-	-	+	+
STEC O157:H7	- / -	有多个型, 不存在 88 或 23	Stx ₁ , Stx ₂ , Stx _{2c}	+	有	stx ₁ , stx ₂ , stx _{2c}	紧密素	+	无	+	+	+	+	-

* SF/GUD:山梨醇发酵/β-D-葡萄糖醛酸酶活性;PT:噬菌体型;Stx:志贺毒素表型;Hly:产生肠溶血素;TR:亚硝酸盐抗性,在头孢克肟-亚砷酸钾山梨醇麦康凯琼脂平板上的生长能力

hlyA:溶血素;katP:触酶/过氧化物酶;espP:丝氨酸蛋白酶;etp:II型分泌途径系统;sfp:菌毛基因簇

SF STEC O157:H⁻ 基因组缺少 TAI 是该类菌株对亚硝酸盐敏感的遗传学基础^[15,16]。SF STEC O157:H⁻ 和 STEC O157:H7 大质粒间的差异包括:①SF STEC O157:H⁻ 菌株没有 katP 和 espP;②两型菌的 EHEC hlyA 基因表达不同,STEC O157:H7 的 hlyA 基因得以完全表达,在有洗涤红血细胞和 Ca²⁺ 离子的肠溶血素琼脂平板上产生典型的肠溶血素表型,而绝大多数 SF STEC O157:H⁻ 菌株 hlyA 基因不表达而无溶血表型(表 2)^[2,7-9];③SF STEC O157:H⁻ 质粒上含有已确认的一种新基因簇 sfp(编码山梨醇发酵 EHEC 菌毛的质粒),sfp 介导甘露糖抗性血凝作用和新型菌毛的表达,这是在 STEC O157:H7、其他 STEC 菌株或肠杆菌科成员中没有发现的 SF STEC O157:H⁻ 的一个独有特征^[5]。

4. SF STEC O157:H⁻ 的菌系起源与进化:采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析 1988~1991 年间德国分离 21 株 SF STEC O157:H⁻ 菌株的克隆关系,所有菌株均具有相同或密切相关的 XbaI 酶切电泳图型,该图型与 STEC O157:H7、非山梨醇发酵(NSF)STEC O157:H⁻、SF stx 阴性的大肠埃希菌 O157:H45 的电泳型(ET)明显不同^[14]。结合这些菌株的 ET、表型特征和毒力因子可得出结论:SF STEC O157:H⁻ 菌株代表着大肠埃希菌 O157 血清群内值得注意的一个新克隆^[3,14]。德国最近一项研究证实了这一点,用 PFGE 和 ρ 基因分型检测 1988~1998 年间分离 210 株 STEC O157(包括 40 株 SF STEC O157:H⁻)的克隆关系,STEC O157:H7 和 NSF STEC O157:H⁻ 菌株有多种多样的基因型,而 SF STEC O157:H⁻ 菌株具有一种独特的 PFGE 图型和两种密切相关的 ρ 基因图谱^[1,17]。而且,德国和捷克共和国分离 SF STEC O157:H⁻ 菌株的 PFGE 分析证明所有分离株均具有相同或密切相关的 PFGE 图型,提示两国分离株属同一克隆^[9]。

Feng 等^[18]用多位点酶电泳以确定 STEC O157 菌株(包括德国 SF STEC O157:H⁻ 分离株)的遗传关系,对 SF STEC O157:H⁻ 克隆和 STEC O157:H7 克隆复合体的进化关系作了分析研究。STEC O157 菌株共含有 5 种密切相关的 ET,不同 ET 之间仅相差 1 或 2 个酶等位基因。SF STEC O157:H⁻ 菌株属 ET₄ 而正好为 STEC O157:H7 克隆复合体的一个分支,与常见 STEC O157:H7 相差 2 个酶等位基因。在 Feng 等提出 STEC O157(表型标志物和毒力因子)的逐级进化模型中,STEC O157:H7 和 SF STEC O157:H⁻ 都是从一个类致病性大肠埃希菌(EPEC)的远祖(大肠埃希菌 O55:H7)演化而来,该远祖菌

携带致病岛肠细胞抹平的基因座位(LEE),并在进化过程中获得 stx₂ 基因、大质粒和编码 O157 抗原的 rfb 区;SF STEC O157:H⁻ 克隆是从 O157:H7 克隆复合体的早期分支进化而来,细菌丧失动力但仍保留远祖发酵山梨醇和表达 β-D-葡萄糖醛酸酶活性的能力。

5. SF STEC O157:H⁻ 菌株的微生物学检测:SF STEC O157:H⁻ 菌株与共同生长在山梨醇麦康凯琼脂平板(SMAC)上的大肠埃希菌没有区别,因此,仅使用 SMAC 作为 STEC O157 检测的方法会漏检。要筛检并分离 STEC O157:H7 以外的 SF STEC O157:H⁻ 菌株,SMAC 培养法必须与检测 SF STEC O157:H⁻ 菌株所具有的两个重要特征(stx₂ 基因或 Stx₂ 产物和 O157 脂多糖)的方法相结合。德国成功用于检测病人粪便中 SF STEC O157:H⁻ 的诊断技术包括选择性粪便增菌培养,含 stx₂ 基因细菌的 PCR 筛检、免疫磁珠分离(IMS)等^[3,16]。为确认 PCR 阳性粪便培养物中的 SF STEC O157 菌株,采用地高辛标记的 stx₂ 探针进行 100~200 个散在菌落的杂交或用菌落免疫印迹法鉴定产 Stx₂ 菌落^[19]。含 stx₂ 和/或产 Stx₂ 的 SF 菌落需用标准生化试验和抗 O157 血清凝集试验以确定为大肠埃希菌 O157^[3]。

捷克共和国检测 SF STEC O157 感染的诊断方法包括用 SMAC 直接培养或 IMS 培养和 ELISA 筛检粪便 O157 抗原,如果 ELISA 结果提示 O157 大肠埃希菌感染而 SMAC 上不存在 NSF 菌落,就用乳胶凝集试验和 O157 抗血清玻片凝集试验分别进行 Stx₂ 和 SF STEC O157 菌落检测^[7,9,16,20]。

SF STEC O157:H⁻ 感染症微生物学诊断的最大局限是该菌株对亚硝酸盐敏感而不能在头孢克肟-亚硝酸盐 SMAC 平板(CT-SMAC)上分离培养出来,但 CT-SMAC 是 STEC O157:H7 的一种适宜选择性培养基^[16]。而且,大多数 SF STEC O157:H⁻ 菌株肠溶血素表型缺失,不能靠肠溶血素琼脂进行检测^[2,7-9]。因此,SF STEC O157:H⁻ 感染的微生物学诊断还存在一定困难,需用费时费力的方法,也急需研制分离 SF STEC O157 菌株的选择性培养基。通过联合使用选择性增菌、IMS 以及检测 stx₂ 和/或 Stx₂ 的方法以最大限度地分离 SF STEC O157 菌株,这是对有 O157 大肠埃希菌感染证据(粪便存在 O157 抗原和/或抗 O157 脂多糖抗体 IgM)而粪便培养没有发现任何 NSF 菌落的 HUS 和腹泻患者作出正确病原诊断的保证。

6. 展望:调查世界范围人类疾病中 SF STEC O157:H⁻ 感

染症的意义并更好了解该感染症流行病学的先决条件是必须改进该病原菌的微生物学检测技术。联合使用 SF STEC O157:H⁻ 分离用选择性培养基和 IMS 集菌是高度敏感特异的诊断技术,可获得临床和环境标本病原体的最大分离率。世界范围临床和流行病学研究中实施这一最佳诊断方案就能提供有关 SF STEC O157:H⁻ 菌株是否真的仅限于欧洲大陆或同样分布于现今未检测的其他地区的信息。而且,该诊断方法能进一步评价牛和其他动物与人作为 SF STEC O157:H⁻ 传染源的重要性并确定这一感染症的其他传播途径。这将为该病原菌引起人类疾病预防控制措施的实施提供依据。

为深入了解 PFGE 图型密切相关 SF STEC O157:H⁻ 菌株的克隆组成,并在流行病学研究中对这些菌株进行分型,需要建立在 SF STEC O157:H⁻ 克隆内有菌株鉴别力的分型方法,如全基因组系列分析技术^[21],最终认识 SF STEC O157:H⁻ 和 STEC O157:H7 的基因差异,确定 STEC O157 病原菌的完整毒力因子谱并进一步阐明其遗传、进化和种系发生关系。

参 考 文 献

- 1 Leisegang A, Sachse U, Prage R, et al. Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H⁻ in Germany — a ten-year study. *Int J Med Microbiol*, 2000, 290:269-278.
- 2 Ammon A, Peterson LR, Karch H. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain *E. coli* O157:H⁻. *J Infect Dis*, 1999, 179:1274-1277.
- 3 Gunzer F, Bohm H, Russmann H, et al. Molecular detection of sorbitol-fermenting *E. coli* O157 in patients with HUS. *J Clin Microbiol*, 1992, 30:1807-1810.
- 4 Karch H, Huppertz HI, Bockemuhl J, et al. Shiga toxin-producing *E. coli* infections in Germany. *J Food Prot*, 1997, 11:1454-1457.
- 5 Karch H, Bielaszewska M. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H⁻ strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J Clin Microbiol*, 2001, 39:2043-2049.
- 6 Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*, 1998, 352:1207-1212.
- 7 Bielaszewska M, Schmidt H, Karmali MA, et al. Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H⁻ strains in the Czech Republic. *J Clin Microbiol*, 1998, 36:2135-2137.
- 8 Keskimaki M, Saari T, Heiskanen T, et al. Shiga toxin-producing *E. coli* in Finland from 1990 through 1997: prevalence and characteristics of isolates. *J Clin Microbiol*, 1998, 36:3641-3646.
- 9 Bielaszewska M, Schmidt H, Liesegang A, et al. Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H⁻ strains and a source of human diseases. *J Clin Microbiol*, 2000, 38:3470-3473.
- 10 Rios M, Prado V, Trucksis M, et al. Clonal diversity of Chilean isolates of EHEC from patients with HUS, asymptomatic subjects, and food products. *J Clin Microbiol*, 1999, 37:778-781.
- 11 Khakhria R, Duck D, Lior H. Extended phage-typing scheme for *E. coli* O157:H7. *Epidemiol Infect*, 1990, 105:511-520.
- 12 Fields PI, Blom K, Hughes HJ, et al. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *E. coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. *J Clin Microbiol*, 1997, 35:1066-1070.
- 13 Reid SD, Selander RK, Whittam TS. Sequence diversity of flagellin (fliC) alleles in pathogenic *E. coli*. *J Bacteriol*, 1999, 181:153-169.
- 14 Karch H, Bohm H, Schmidt H, et al. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *E. coli* O157:H⁻. *J Clin Microbiol*, 1993, 31:1200-1205.
- 15 Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, et al. Iha: a novel *E. coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun*, 2000, 68:1400-1407.
- 16 Karch H, Janetzki MS, Aleksic S, et al. Isolation of EHEC O157 strains from patients with HUS by using IMS, DNA-based methods, and direct culture. *J Clin Microbiol*, 1996, 34:516-519.
- 17 Datz MC, Janetzki MS, Fanke S, et al. Analysis of the EHEC O157 DNA region containing lambdoid phage gene ρ and Shiga-like toxin structural genes. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62:791-797.
- 18 Feng P, Lampel KA, Karch H, et al. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *E. coli* O157:H7. *J Infect Dis*, 1998, 177:1750-1753.
- 19 Karch H, Bielaszewska M, Bitzan M, et al. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *E. coli* infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999, 34:229-243.
- 20 Karmali MA, Petri M, Bielaszewska M. Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *E. coli*. *J Clin Microbiol*, 1998, 37:396-399.
- 21 Perna NT, Plunket IG, Burland V, et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, 2001, 409:529-533.

(收稿日期 2002-04-20)

(本文编辑:尹廉)