

我国部分产生志贺毒素肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 脉冲电场凝胶电泳分型

逢波 景怀琦 郑翰 孙晖 赵爱兰 徐建国

【摘要】 目的 探讨我国部分地区产生志贺毒素的肠出血性大肠埃希菌(EHEC)O157:H7 菌株的分布、流行以及分型情况。方法 用脉冲电场凝胶电泳(PFGE)方法进行分型 ,辅以药物敏感性试验对 51 株产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 菌株进行研究。结果 根据细菌染色体 DNA 的 XbaI 酶切图谱 ,可将从江苏省徐州市等地分离的 51 株产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 菌株分成 8 个 PFGE 型别(PFGE1 ~ PFGE8) ,宁夏菌株为 PFGE1 型和 2 型 ,徐州菌株有 6 个 PFGE 型。1986 ~ 1988 年的分离菌株属于 PFGE7 型 ,1999、2000 年病人分离株的优势型别分别是 PFGE5 型与 3 型。1999 年爆发性流行期间从患者分离的 5 株菌属于 PFGE 5 型 ,从家畜家禽的粪便、食品、蔬菜等标本分离的 19 株菌 ,可以分为 PFGE3 ~ 6 等 4 个型别 ,其中 ,PFGE5 型占优势(10 株菌)。结论 爆发性流行的发生与携带病原菌的家畜家禽粪便污染的食品、蔬菜等有关 ,从我国部分地区分离的 EHEC O157:H7 菌株的 PFGE 型别有地区性差异。

【关键词】 大肠杆菌 O157:H7 ;脉冲电场凝胶电泳 ;分型 ;志贺毒素

Molecular typing of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated in China with pulsed field gel electrophoresis PANG Bo ,JING Huaiqi ,ZHENG Han ,SUN Hui ,ZHAO Ailan ,XU Jianguo. Institute for Infectious Disease Control and Prevention ,Chinese Center for Disease Control and Prevention ,Beijing 102206 ,China

【Abstract】 Objective To type and group the Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated recent years in China to understand the epidemiological features caused by the pathogen. **Methods** Pulsed field gel electrophoresis of large restriction fragments of bacterial chromosomal DNA was used. **Results** The 51 isolates of *E. coli* O157:H7 collected in recent years in China could be divided into 8 Pulsed Field Gel Electrophoresis(PFGE) types based on the size and number of restriction fragments and patterns , that were digested by XbaI. Strains isolated from Ningxia province showed only two types- PFGE1 and PFGE2. Strains isolated in Xuzhou of Jiangsu province had 6 PFGE types. Isolates identified between 1986-1988 belonged to PFGE7. Strains isolated from patients in 1999-2000 were PFGE5 and PFGE3. Strains isolated from stool samples of domestic animal , food and vegetable were PFGE3-6 , of which the predominant type was PFGE5. All of the 5 strains isolated from patients with diarrhea and hemolytic uremic syndrome(HUS)belonged to PFGE type 5 , which was the dominant type of the isolates from stool samples of domestic animal and samples of food and vegetable contaminated. **Conclusion** Data suggested that the cluster patients with diarrhea and HUS might have been related to the pathogens from domestic animas and contaminated food or vegetables. The distribution of PFGE types also varied in different provinces of China.

【Key words】 *Escherichia coli* O157:H7 ; Pulsed field gel electrophoresis ; Typing ; Shiga toxin

肠出血性大肠埃希菌(EHEC)O157:H7 是一种新发现的病原菌 ,能够引起出血性结肠炎(hemorrhagic colitis , HC)和溶血性尿毒综合征(hemolytic uremic syndrome , HUS)^[1-4] ,所引起的

腹泻病爆发与污染的牛肉或牛肉制品、水源、蔬菜、饮料等有关^[4-6] ,其主要的毒力基因为志贺毒素、质粒编码的溶血素和位于染色体上的 LEE 毒力岛 ,已经成为世界性的公共卫生问题。我国从 1987 年于腹泻病人的粪便中分离到 EHEC 菌株以来^[5] ,在许多省份也有分离到病原菌的报道。病原性细菌的分型有多种方法 ,相比较而言 ,细菌染色体 DNA 的稀有酶切位点限制性内切酶酶切片段的脉冲场凝胶电泳方法(pulsed field gel electrophoresis ,PFGE) ,因为

基金项目 国家科技部社会公益性基金资助项目

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卫生部医学分子细菌学重点实验室

能够对整个染色体进行分析,稳定性好,分辨率高,已经成为许多病原性细菌的常规分型方法。细菌染色体 DNA 的 XbaI 酶切片段的 PFGE 分析技术在 EHEC O157:H7 的分子流行病学分析中得到了广泛的应用,也是目前最为认可的方法。我们对从我国某些地区分离到的产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 菌株进行了染色体 DNA 的 XbaI 酶切片段 PFGE 分析,现将结果报告如下。

材料与方 法

一、材料

1. 菌株: 试验菌株由江苏省徐州市、宁夏回族自治区和安徽省疾病预防控制中心提供。试验菌株的来源见表 1。

2. 主要试剂: Taq DNA 聚合酶购自华美生物工程公司; XbaI 内切酶、低熔点琼脂糖、PFGE 级琼脂糖均为 Promega 公司产品; PFGE 分子量标准 I 为 Roche 公司产品。蛋白酶 K 为 MERCK 公司产品。十二烷基肌氨酸钠、苯甲基磺酰氟(PMSF)、脱氧胆酸钠均为 Sigma 公司产品。

3. 主要仪器: PCR 仪为 PERKIN-ELMER 公司的 GeneAmp PCR System 9600。读胶仪为 BIO-RAD 公司的 Gel Documentation 2000。脉冲场凝胶电泳仪为 Amersham Pharmacia 公司的 Gene Navigator。

二、实验方法

1. PCR 扩增: ①志贺样毒素基因: 可扩增志贺毒素 1、2 的基因。引物为: 1: 5'-TTGACGATAGA CTTCCTCGAC-3', 2: 5'-CACATATAAAATTTATTC GCTC-3'。扩增参数: 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 1 min, 51℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。②溶血素基因, 引物为: 1: 5'-ACGATGTGGTTTATTCTGGA-3', 2: 5'-CTTCACGTCACCATACATAT-3'。扩增参数: 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 1 min, 57℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。③ *caeA* 基因, 为 LEE 毒力岛的关键基因之一, 引物为: 1: 5'-CAGGTCGTCGTCTGCTAA A-3', 2: 5'-TCAGCGTGGTTGGATCAACCT-3'。扩增参数: 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 1 min, 57℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。④ H7 鞭毛 (*fliC*) 基因引物为: 1: 5'-GCCGTGTCGAGTTCTATCGAGC-3', 2: 5'-CAACGG TGACTTTATCGCCATTC-3'。扩增参数: 94℃ 预变性

10 min, 94℃ 变性 1 min, 62℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

表 1 产志贺毒素的 EHEC O157:H7 分离菌株的来源和 PFGE 分型结果

菌株号	PFGE 型	来 源	分离地点	分离时间
9-53	4	羊粪	徐州	1999
9-60	6	牛粪	徐州	1999
9-67	5	猪粪	徐州	1999
9-68	4	猪粪	徐州	1999
9-92	4	牛粪	徐州	1999
9-93	3	牛粪	徐州	1999
9-94	3	牛粪	徐州	1999
9-100	4	猪粪	徐州	1999
9-105	3	羊粪	徐州	1999
9-114	5	鸡粪	徐州	1999
9-119	5	羊粪	徐州	1999
9-120	5	牛粪	徐州	1999
2000-1	1	腹泻病人	宁夏	2000
2000-2	1	腹泻病人	宁夏	2000
2000-3	1	腹泻病人	宁夏	2000
2000-4	1	腹泻病人	宁夏	2000
2000-5	1	腹泻病人	宁夏	2000
2000-6	2	腹泻病人	宁夏	2000
2000-7	2	腹泻病人	宁夏	2000
2000-8	2	腹泻病人	宁夏	2000
21	5	HUS	徐州	2000
65	5	腹泻病人	徐州	1999
143	5	腹泻病人	徐州	1999
223	5	腹泻病人	徐州	1999
284	5	HUS	徐州	1999
9-741	5	羊粪	徐州	1999
9-1206	5	生羊肉	徐州	1999
9-1207	5	熟羊肝	徐州	1999
9-1349	5	猪头肉	徐州	1999
9-1354	5	生羊肉	徐州	1999
9-2045	5	羊粪	徐州	1999
881003	7	腹泻病人	徐州	1987
881004	7	腹泻病人	徐州	1987
882364	7	腹泻病人	徐州	1987
885203	7	腹泻病人	徐州	1987
8812754	7	腹泻病人	徐州	1987
beatle19	3	蜚螂	徐州	2000
beatle20	3	蜚螂	徐州	2000
beatle33	3	蜚螂	徐州	2000
beatle103	3	蜚螂	徐州	2000
007	3	腹泻病人	徐州	2000
13	3	腹泻病人	徐州	2000
61	3	腹泻病人	徐州	2000
92	3	腹泻病人	徐州	2000
119	3	腹泻病人	徐州	2000
193	3	腹泻病人	徐州	2000
229	3	腹泻病人	徐州	2000
296	3	腹泻病人	徐州	2000
384	3	腹泻病人	徐州	2000
351	6	腹泻病人	徐州	2000
ah53	3	牛粪	安徽	1999

2. 抗菌药物敏感性试验: 药敏纸片和 Mueller-Hinton(MH)培养基均自中国药品生物制品检定所。试验方法按常规方法操作。

3. 细菌染色体 DNA 酶切片段的 PFGE 分析: ①

包埋细胞:将细菌接种到 LB 琼脂,过夜培养;用生理盐水将细胞稀释至 10^8 /ml;取 3 ml 收集细胞 ($10\ 000\ r/min$ 离心 5 min);用 1 ml 细胞悬浮液 [10 mmol/L Tris (pH 7.2), 20 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na) (pH 8.0)] 溶开沉淀,融化 0.02 g 低熔点琼脂糖到 1 ml 去离子水,置 $50^\circ C$;将细胞液与低熔点琼脂糖等体积混匀;将混合物加入模具孔中,每孔 100 μ l,置 $4^\circ C$ 15 min 或室温 1 h,溶菌;将胶块放入 5 ~ 10 ml 大小试管中,加入 1 ml 溶菌酶溶液 [10 mmol/L Tris (pH 7.2), 50 mmol/L NaCl, 0.2% 脱氧胆酸钠, 1% 十二烷基肌氨酸钠] 将胶块浸没到溶菌酶溶液中,轻摇,置 $37^\circ C$ 2 h 至过夜,倒出溶菌酶溶液,用去离子水洗 2 次。

② 蛋白消化:将胶块浸没到蛋白酶 K 溶液 [0.1 mol/L EDTA-2Na (pH 8.0), 0.2% 脱氧胆酸钠, 1% 十二烷基肌氨酸钠, 1 mg/ml 蛋白酶 K], $50^\circ C$ 孵化过夜 (中间可换 1 次蛋白酶 K 溶液);用清洗溶液 [20 mmol/L Tris (pH 7.2), 50 mmol/L EDTA (pH 8.0)] 轻摇洗胶块 2 次, 30 min;用含苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的清洗溶液处理胶块 2 次, $50^\circ C$, 每次 2 h;再用清洗溶液洗胶块 3 次, 每次 30 min。再用 0.1 倍的清洗溶液室温洗胶块 30 min。

③ 酶切:将胶块浸入 1 ml 适当的酶切缓冲液中,室温轻摇 1 h;加入酶切液体 300 μ l (其中含有 XbaI 50 U) 进行酶切。

④ 加样:融化 1.8 g 用于 PFGE 的琼脂糖到 180 ml 0.5 倍的 Tris-硼酸-EDTA-2Na (0.5 倍 TBE) 溶液;于 $50^\circ C$ 制作凝胶;用清洗溶液 1 ml 室温洗胶块 30 min;用 0.5 倍 TBE 洗胶块 30 min。

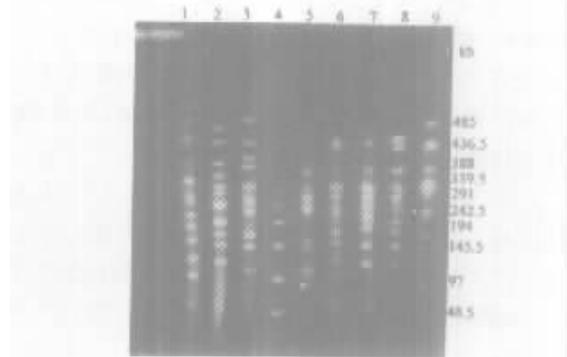
⑤ 准备电泳:制备 2.5 L 0.5 倍 TBE 倒入电泳槽,冷却至 $12^\circ C$;将 0.04 g 低熔点琼脂糖融化到 2 ml 去离子水,将胶块放入琼脂糖凝胶孔中,2% 琼脂糖封孔。

⑥ 电泳:电压 200 V,脉冲参数 5 ~ 10 s 10 h;10 ~

45 s 20 h,电泳温度 $12^\circ C$,电泳结束后,用 0.5 μ g/ml 的 EB 染色 30 min,于 0.5 倍 TBE 中脱色 20 min,使用读胶仪照相。

结 果

我国 1986 ~ 1988、1999 和 2000 年分离的 51 株产生志贺毒素的 EHEC O157:H7,均具有 LEE 毒力岛和质粒编码的溶血素基因。O157 脂多糖 (LPS) 和 H7 鞭毛基因的检测结果和特异性抗血清的凝集结果一致,这些菌株包括从腹泻病患者、家畜家禽粪便、食品和从蝇螂肠道分离的菌株。将 51 株试验菌株的染色体 DNA 使用 XbaI 进行原位酶切,使用 PFGE 进行分析,根据 XbaI 酶切片段的分子量和数目的不同,可以分为 8 个 PFGE 型,宁夏菌株为 PFGE1 型 (5 株) 和 PFGE2 型 (3 株),徐州菌株有 6 个 PFGE 型。1986 ~ 1988 年的分离菌株属于 PFGE7 型 (5 株),1999、2000 年病人分离株的优势型别分别是 PFGE5 型 (5/5) 与 PFGE3 型 (9/10)。不同 PFGE 分型的电泳图谱见图 1。1999 年从腹泻、腹泻继发急性肾功能衰竭患者分离的 5 株菌 12 种抗菌药物的敏感性试验结果见表 2。



1. PFGE4 型; 2. PFGE8 型; 3. PFGE7 型; 4. Marker; 5. PFGE6 型; 6. PFGE3 型; 7. PFGE2 型; 8. PFGE1 型; 9. PFGE5 型

图1 不同 PFGE 型别的电泳图谱

表2 1999 年从腹泻病人、溶血性尿毒综合征患者分离的 5 株 EHEC O157:H7 菌株的抗菌药物敏感性试验结果

菌株号	抗 菌 药 物											
	SXT	DO	CIP	CFP	S	PIP	CZ	GM	FR	TE	C	NOR
21	R	R	S	S	S	S	M	S	S	R	S	S
65	M	M	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S
143	R	M	S	S	S	S	S	M	S	S	S	S
223	M	M	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S
284	R	M	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S

注 SXT:复方新诺明 (23.75 μ g/片), DO:强力霉素 (30 μ g/片), CIP:环丙沙星 (5 μ g/片), CFP:头孢哌酮 (75 μ g/片), S:链霉素 (10 μ g/片), PIP:哌拉西林 (100 μ g/片), CZ:头孢唑啉 (30 μ g/片), GM:庆大霉素 (10 μ g/片), FR:痢特灵 (300 μ g/片), TE:四环素 (30 μ g/片), C:氯霉素 (30 μ g/片), NOR:诺氟沙星 (10 μ g/片); S:敏感, M:中度敏感, R:不敏感

讨 论

从徐州市、安徽省、宁夏自治区分离到的 51 株产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 菌株,根据染色体 DNA 的 XbaI 酶切图谱,可以分成 8 个 PFGE 型别(PFGE1~PFGE8)。在徐州菌株中没有发现宁夏的 PFGE 型别,在宁夏菌株中也没有发现徐州的 PFGE 型别,提示我国部分地区的 EHEC O157:H7 菌株的 PFGE 型别可能存在着地区性差异。徐州 5 年中分离的菌株有 6 个 PFGE 型,提示该地区 EHEC O157:H7 的优势型别可能在发生着变化。

1999 年我国某地发生了 EHEC O157:H7 感染。由于标本采集的时间和没有使用免疫磁珠方法,仅从腹泻患者和腹泻症状继发性肾功能衰竭患者的粪便标本分离了 5 株 EHEC O157:H7 菌株。这 5 株菌的抗菌药物敏感性试验结果相近(表 2),毒力基因检测结果相同,染色体 DNA 的 XbaI 酶切片段的 PFGE 图谱相同,结果提示,1999 年发生的 EHEC O157:H7 感染可能是由同一型别(PFGE5 型)菌株引起的。我们对从家畜家禽的粪便标本和食品标本分离的 19 株 EHEC O157:H7 菌株进行了分析,根据染色体 DNA 的 XbaI 酶切片段的 PFGE 分析结果,携带病原菌的家畜家禽可能是 1999 年发生 EHEC O157:H7 感染的传染源。携带病原菌的家畜家禽的粪便可通过多种途径污染食品、蔬菜,使其具有传播病原菌的作用。

2000 年我室与原徐州市卫生防疫站合作从当地腹泻病人的粪便中分离到 10 株和从蜚螂肠道分离出 4 株产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 结果发

现 4 株蜚螂分离株和 10 株病人分离株中的 9 株的毒力因子检测结果及 PFGE 图谱相同。考虑到蜚螂的生活习性与粪便密切相关、徐州地区动物粪便大量携带 EHEC O157:H7 的事实,我们认为蜚螂有可能在 EHEC O157:H7 的传播中发挥一定的作用。徐州地区的菌株可能存在多种型别。因某种因素的作用可能会导致优势型别的转换或替代。如果某些菌株一旦发生变异,会导致腹泻病爆发性流行。为了更好地了解 EHEC O157:H7 的流行病学特点,需要加强实验室监测工作。

参 考 文 献

- 1 Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, et al. Infections of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press, 1995: 739-761.
- 2 Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev*, 1991, 13: 60-98.
- 3 Reida PM, Wolt HW, Pohls W, et al. An outbreak due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a child day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralblatt Bakteriologie*, 1994, 281: 534-543.
- 4 Weagant SD, Bryant JL, Bark DH. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *J Food Prot*, 1994, 57: 629-631.
- 5 Xu JG, Quan TS, Xiao DL, et al. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains in China. *Curr Microbiol*, 1990, 20: 299-336.
- 6 徐建国. 中国 1997~1998 年大肠杆菌 O157:H7 检测情况分析. *疾病监测*, 1999, 14: 176-178.

(收稿日期 2001-11-10)

(本文编辑:尹廉)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于中华医学会主办的系列杂志封面加注 “中华医学会系列杂志”的通告

由中国科学技术协会主管、中华医学会主办的系列医学学术期刊(以下简称中华医学会系列杂志)在长期的办刊工作中,充分发挥专家云集、人才荟萃、联系广泛、专业覆盖面广的优势,紧密团结广大医学工作者,坚持正确的学术导向和学术质量至上的办刊方针,始终站在传播最新医学知识、交流最新科研进展、引导学术发展方向、推动医学科技进步的前沿,形成了高水平、高质量的办刊特色,得到了广大读者的厚爱,被公认为中国医学界最具学术权威性的杂志系列,具有广泛的社会影响。

为了维护中华医学会系列杂志的良好形象和合法权益,也便于读者对中华医学会系列杂志的识别,自 2002 年第 1 期起,中华医学会系列杂志除《美国医学会杂志中文版(JAMA)》、《英国医学杂志中文版(BMJ)》和《美国医学会眼科杂志中文版》等国际合作杂志外,均在杂志封面加注“中华医学会系列杂志”。