

· 实验室研究 ·

中国部分地区大肠埃希菌 O157 的分子分型及变异研究

王丽丽 夏胜利 胡万富 顾玲 杨晋川 陈倩 崔志刚 许彦梅
王鑫 叶长芸 景怀琦 徐建国

【摘要】 目的 了解出血性大肠埃希菌(EHEC)O157 的分子流行特征和遗传变异关系并完善 EHEC O157:H7 感染性腹泻监测制度。方法 采用聚合酶链反应分析毒力基因的分布情况;用脉冲场凝胶电泳技术对 1988 - 2005 年部分地区分离到的 249 株 EHEC O157:H7 (其中产志贺毒素的 245 株,不产志贺毒素的 4 株)和 51 株 O157 非 H7 进行分子流行病学分析。结果 *stx2* 基因在我国的 EHEC O157:H7 菌株中有着很高的分布率,部分菌株携带 *stx2* 基因变种。300 株 O157 共分为 161 种带型,其中 51 株 O157 非 H7 菌株共有 42 种带型,4 株 O157:H7 非产毒株分别为 4 种带型,245 株 EHEC O157:H7 共有 115 种带型。结论 EHEC O157 间的基因变异较大;产 *stx2* 原毒素的菌株和 *stx2* 毒素发生变异的菌株带型相差较大。部分菌株之间存在着一定的交叉,说明虽然这两大类菌株有其特有的流行克隆系,但是它们的克隆系之间亲缘关系较近。

【关键词】 大肠埃希菌 O157; 脉冲场凝胶电泳; 聚合酶链反应

Molecular epidemiology of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 in some areas in China WANG Li-li*, XIA Sheng-li, HU Wan-fu, GU Ling, YANG Jin-chuan, CHEN Qian, CUI Zhi-gang, XU Yan-mei, WANG Xin, YE Chang-yun, JING Huai-qi, XU Jian-guo. *National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China Corresponding author: XU Jian-guo, Email: xujg@public. bta. net. cn

【Abstract】 Objective To understand the epidemiological characteristics of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 and to determine the degree of its genetic relations. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) techniques and chromosomal DNA digested by restriction enzyme *Xba* I according to PulseNet directions by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) method were applied to 300 *E. coli* O157 strains isolated from patients and animal sources from 1988 to 2005 from Henan, Jiangsu and Anhui provinces. **Results** Very high prevalence of *stx2* gene in EHEC O157:H7 strains isolated from some provinces of China was found and variation existed in some strains. We got 161 PFGE patterns from 300 strains. The *stx2*-producing strains could be clearly separated from *stx2* variation-producing strains. **Conclusion** The variability of restriction enzyme-digestion patterns of O157 genomes suggested that the presence of some genomic diversity among the strains did exist.

【Key words】 Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157; Pulsed field gel electrophoresis; Polymerase chain reaction

肠出血性大肠埃希菌(EHEC)O157:H7 是 1982 年首次在美国发现的一种致病罕见血清型的

大肠埃希菌^[1]。1999 - 2000 年我国的江苏、安徽、河南等地发生了该菌的流行,全国许多省市也分离到菌株。为了更好地研究我国 EHEC O157:H7 的流行病学特点和菌株变异规律,本研究对 1988 - 2005 年从我国各地分离的 EHEC O157 进行了分子分型分析。

基金项目:国家科技攻关课题资助项目(2003BA712A05-04);国家自然科学基金资助项目(30371279)

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(王丽丽、崔志刚、许彦梅、王鑫、叶长芸、景怀琦、徐建国);河南省疾病预防控制中心(夏胜利);安徽省疾病预防控制中心(胡万富);江苏省疾病预防控制中心(顾玲);江苏省徐州市疾病预防控制中心(杨晋川);北京市疾病预防控制中心(陈倩)

材料与方 法

1. 菌株:来自 1988 - 2005 年在我国河南、安徽和江苏等地分离的 EHEC O157 共 300 株。其中产志贺毒素 EHEC O157:H7 245 株,不产志贺毒素

王丽丽、夏胜利、胡万富、顾玲、杨晋川同为第一作者
通讯作者:徐建国,Email: xujg@public. bta. net. cn

EHEC O157:H7 4 株, O157 非 H7 51 株。阳性对照菌株为 O157:H7 EDL933, 阴性对照菌株为大肠埃希菌 MG1655, 脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分子量标准菌株 H9812^[2]。

2. 培养基: 普通 LB 培养基 (1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 1% 氯化钠, 加入琼脂粉至终浓度 2.0%)。

3. 主要试剂: Taq DNA 聚合酶, dNTP 均购自北京华美生物工程有限公司。引物由上海生工公司合成。DNA 分子量 Marker、限制性内切酶 *Xba* I 均购自 Promega 公司; ScaKm Gold 琼脂糖购自 Cambraex Bio Science Rockland 公司; 蛋白酶 K 购自 Merck 公司。

4. 主要仪器: PCR 仪为美国 MJ 公司的 PTC-200; 脉冲场凝胶电泳仪为 CHEF MAPPER system (Bio-Rad USA); 凝胶成像系统为 GEL Doc 2000 (Bio-Rad USA); 水浴摇床为 Grant OLS2000 (Grant England); 浊度仪为 Densimat (Biomérieux France); 比浊用试管为 REF352054 (BD 公司 USA); 50 ml Screw-cap 试管为 Corning Centrifuge Tube (Corning 公司 USA); 制胶用模具及 screened-cap (Bio-Rad USA)。

5. 模板的制备: 细菌染色体 DNA 模板制备用煮沸法。挑取 LB 培养基上生长的单个菌落加入装有 100 μl 三蒸水的 1.5 ml Eppendorf 管中, 混匀后在沸水中煮 10 min, 取出后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清作为模板, -20℃ 冻存备用。

6. 基因检测引物和 PCR 扩增: 用于 O157 抗原 (*rfb*) 和 H7 鞭毛 (*fliC*) 的检测, 以及志贺毒素基因的检测。各引物序列、产物片段大小以及退火温度见表 1。扩增反应体系为 20 μl (包括 4× dNTP 200 mmol/L, 引物 0.5 μmol/L, 模板 0.5~1 μg, Taq 酶 1 U)。PCR 扩增参数: 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 1 min, 退火 1 min (各引物采用其相应退火温度), 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, TBE 缓冲液电泳, 溴化乙锭 (EB) 染色后在 Bio-Rad 公司凝胶成像系统观察结果。

7. EHEC O157:H7 脉冲场凝胶电泳 (PFGE): 按照 O157:H7 PulseNet 推荐的标准方法操作^[3]。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。图像通过统一的 Marker H9812 进行校

准, 标定条带位置。选择 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) 方法聚类, 条带位置差异容许度 (position tolerance) 选择 1.0%, 优化值 (optimization) 0.5%。

表1 引物序列及产物片段大小

引物名称	引物序列 (5'-3')	产物大小 (bp)	退火温度 (℃)
O157 <i>rfb</i>		259	60
Upper	cgg aca tcc atg tga tat gg		
Lower	tig cct atg tac agc taa tcc		
H7 (<i>fliC</i>)		547	55
Upper	geg ctg teg agt tet atc gag c		
Lower	caa ctg tga ctt tat cgc cat tcc		
<i>stx1</i>		1649	55
Upper	tgc cat gag atc tga cc		
Lower	aac tga ctg aat tga gat g		
<i>stx2</i>		1260	52
GK1	ccc gga tcc atg aug tgt ata tta ttt naa tgg		
GK4	ccc gaa ttc tga gtc att att aaa ctg cac		

结 果

1. 毒力因子等基因检测: 应用 PCR 方法对 1988-2005 年我国江苏、安徽、河南等部分地区分离到的 93 株大肠埃希菌 O157 进行了 O157 抗原 (*rfb*)、H7 鞭毛 (*fliC*)、*stx1*、*stx2* 几个基因的 PCR 检测, 结合实验室以往实验结果, 本次实验菌株的毒力基因分布情况见表 2。

表2 毒力基因检测结果

血清型	产毒菌株数			不产毒菌株数	合计
	<i>stx1</i>	<i>stx1</i> & <i>stx2</i>	<i>stx2</i>		
O157:H7	1	32	212	4	249
O157 非 H7	0	0	0	51	51
合计	1	32	212	55	300

2. EHEC O157 的 PFGE 带型分析: 对 300 株 O157 进行了 PFGE 分型, 应用 BioNumerics (Version 4.0) 数据库软件 (Applied Maths BVBA, Belgium) 进行处理。结果得到 161 种带型。其中以 EXHX01.0001 带型 (共 10 株)、EXHX01.0002 带型 (共 24 株)、EXHX01.0003 带型 (共 12 株)、EXHX01.0005 带型 (共 15 株)、EXHX01.0006 带型 (共 14 株)、EXHX01.0008 带型 (共 17 株) 为主。

3. EHEC O157:H7 的 PFGE 分析: 为更好地了解 EHEC O157:H7 基因组间的遗传变异规律, 对 249 株 EHEC O157:H7 进行了带型分析和聚类分析, 245 株产毒株共有 115 种带型, 其中以

EXHX01.0001 带型(共 10 株)、EXHX01.0002 带型(共 24 株)、EXHX01.0003 带型(共 12 株)、EXHX01.0005 带型(共 15 株)、EXHX01.0006 带型(共 14 株)、EXHX01.0008 带型(共 17 株)、EXHX01.00011 带型(共 5 株)、EXHX01.00012 带型(共 6 株)、EXHX01.00019 带型(共 5 株)为主。9 种主带型包含了 108 株菌。4 株 EHEC O157:H7 非产毒株分别为 4 种带型。参考本试验室以往关于 *stx2* 原毒素和变种的研究结果,本实验对有该项背景资料的产 *stx2* 原毒素的 40 株菌株和产 *stx2* 毒素变种的 168 株菌株分别进行了带型分析,具有 *stx2* 原毒素的 40 株菌株得到了 11 种带型,具体带型及聚类关系如图 2; *stx2* 毒素变种的 168 株菌株得到了 94 种带型。



图1 300 株 EHEC O157 的主要 PFGE 带型

4. EHEC O157 非 H7 的带型分析: EHEC O157 非 H7 菌株共 51 株, PFGE 分析获得 42 种带型。

讨 论

实验采用美国疾病预防与控制中心(CDC)的发展并在全世界推广的 PFGE 标准方法,对 300 株 1988-2005 年从我国河南、安徽和江苏等地分离的 EHEC O157 进行 PFGE 分析,初步了解其分子流行病学特征。300 株菌共分为 161 种带型。其中 51 株非 H7 大肠埃希菌 O157 被分成了 42 种带型,4 株不产生志贺毒素的大肠埃希菌 O157:H7 分别为

不同的带型,245 株 EHEC O157:H7 分为 115 种带型,以 6 种型别为主,占检测菌株的 30.67% (92/300)。

本研究对 249 株大肠埃希菌 O157:H7 进行分析,其中 *stx1* 基因阳性的 1 株, *stx1* 和 *stx2* 基因均阳性的 32 株,只有 *stx2* 基因阳性的 212 株, *stx1* 和 *stx2* 基因均阴性的 4 株; 249 株 EHEC O157:H7 共得到 119 种带型,其中 9 种主要带型包含 108 株菌。

从江苏动物分离的 153 株菌有 71 种 PFGE 带型,其中 EXHX01.0006 带型 14 株、EXHX01.0008 带型 14 株、EXHX01.0001 带型 10 株、EXHX01.0002 带型 9 株、EXHX01.0005 带型和 EXHX01.00019 带型各 5 株。其他带型的菌株较少。山东省(6/9)和云南省(14/19)以 EXHX01.0002 带型的菌株为优势菌株,安徽省以 EXHX01.0005 带型(10/38)的菌株为优势菌株,河南省以 EXHX01.0007 带型(4/25)和 EXHX01.00010 带型(4/25)的菌株为优势菌株,重庆以 EXHX01.0009 带型(4/4)的菌株为优势菌株,天津以 EXHX01.00011 带型(4/8)的菌株为优势菌株。研究发现,我国大肠埃希菌 O157:H7 菌株的 PFGE 型别有地区性差异,一些地区有独特的优势菌株。一些 PFGE 型别的菌株,可能已经扩散到其他地区,如 EXHX01.0002 从江苏(1999 年)扩散到云南(2001 年),还有待于进一步研究证实。从 PFGE 图谱来看,非 H7 的大肠埃希菌 O157 的 PFGE 型别较多,且型别之间差异很大,说明基因组上的变异较为广泛。这些菌株一般不产生志贺毒素。

从以上的带型结果,我们可以看出产 *stx2* 变种毒素的菌株带型丰富(94/168),变化较大,以 EXHX01.0001 ~ EXHX01.00026 带型为多,以 EXHX01.0003、EXHX01.0005、EXHX01.0006、



图2 具有 *stx2* 原毒素菌株的带型聚类图

EXHX01.0008、EXHX01.0012 的菌株为主。*stx2* 毒素基因的变异是否反映菌株的变异,还需要进一步的研究。相比之下,产 *stx2* 原毒素的菌株带型变化较少 (11/40),以 EXHX01.0001 (8/40)、EXHX01.0002 的菌株为主 (21/40),提示此类菌株的基因组相对于产 *stx2* 变种毒素的菌株较少变异。

通过对 EHEC O157:H7 产毒株有原毒素和毒素变种背景资料的菌株进行聚类分析,发现 EHEC O157:H7 *stx2* 基因阳性的菌株和 *stx2* 基因变异的菌株分别居于不同的 PFGE 型别,虽然部分菌株之间存在着一定的交叉。提示这两大类菌株分别属于不同的克隆系,但克隆系之间的关系较近。有实验表明部分产 *stx2* 变种毒素 *vha* 的菌株是由于细菌基因组上有了插入在 *stx2* 基因中的插入序列 IS1203 变种导致了基因组的改变,其他产 *stx2* 变种毒素 *vha* 的菌株的具体机制还有待于进一步的研究。

使用美国 CDC 推荐使用的方法,本试验初步建立了我国大肠埃希菌 O157:H7 菌株的 PFGE 数据库。通过对我国分离到 O157:H7 菌株的分子生物学研究已经发现,其与国外分离株相比具有自己的特点,在致病性上也具有独特之处。目前依托

PulseNet China,以 PFGE 分子分型为核心的 O157:H7 资源库已初具规模,为研究我国菌株特点,追溯亲缘关系,为 EHEC O157:H7 感染性腹泻控制提供宝贵依据。这个数据库的建立,使我们在可能的情况下,利用世界其他国家的数据库,查找传染源和传播途径。在出现大肠埃希菌 O157 的暴发时,将分离的暴发分离株的 PFGE 带型与我国数据库数据比对,可能时与世界其他国家的数据库比对,为查找传染源和传播途径提供线索。

参 考 文 献

- [1] Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*, 1983, 32:2335-2337.
- [2] Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(3): 1045-1050.
- [3] Adhami EW, Roberts LA, Vickery B, et al. Epidemiological analysis of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak using restriction fragment length polymorphisms of genomic DNA. *J Gen Microbiol*, 1991, 137:2713-2720.

(收稿日期:2007-07-05)

(本文编辑:尹廉)

· 读者来信 ·

关于对本刊统一使用“结核分枝杆菌”名称的建议

张晓宁

分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 是一类细长或稍弯的杆菌,因有分枝生长的趋势而得名。Lehmann 和 Neumann 在 1896 年第一次建立了“*Mycobacterium*”一词。结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 是引发人类结核病的病原菌。根据词义和细菌形态学特点,我国结核病学界常常将 *Mycobacterium tuberculosis* 的中文译名“结核分枝杆菌”和“结核分支杆菌”混用,为此国内专家在广泛征求意见的基础上,早在 2001 年就统一使用“结核分枝杆菌”名称^[1]。《中华结核和呼吸杂志》也于 2004 年起统一使用“结核分枝杆菌”名称^[2]。而《中华流行病学杂志》(本刊)仍在混用“结核分枝杆菌”名称,如曹晓慧等^[3]使用的是“结核分支杆菌”,刘忠泉和张宗德^[4]使用的是“结核分枝杆菌”。由于同一杂志采用

不同的名称,给读者带来一定的麻烦,会误认为是两种不同的细菌,为此,笔者建议本刊统一使用“结核分枝杆菌”这一名称。

参 考 文 献

- [1] 张秀珍. 关于采纳分枝杆菌或分支杆菌不同译名的建议. *中华检验医学杂志*, 2001, 24:114.
- [2] 潘毓萱. 分枝杆菌抑或分支杆菌辨. *中华结核和呼吸杂志*, 2004, 27:60-61.
- [3] 曹晓慧, 蒋毅, 张媛媛, 等. 13 个 VNTR 位点用于 113 株结核分枝杆菌的基因分型研究. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(8): 705-708.
- [4] 刘忠泉, 张宗德. 结核分枝杆菌的复苏因了. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(6):616-617.

(收稿日期:2007-11-22)

(本文编辑:张林东)