

贵州省首次从腹泻病例中检出肠出血性大肠杆菌 O157 : H7

韦小瑜,游 旅,田克诚,唐光鹏,王定明

摘要:目的 从贵州省1例腹泻病例的粪便标本中分离鉴定O157肠出血性大肠杆菌并对其进行毒力基因检测。方法 收集腹泻病例的粪便标本,mEC肉汤增菌后,采用O157胶体金进行初筛,阳性者增菌液经免疫磁珠富集后进行肠出血性大肠杆菌的分离,对分离株进行系统生化鉴定,O157、H7诊断血清凝集,应用特异性PCR进行rfbE和fliC基因鉴定,以及stx1、stx2、eaeA和hlyA4种毒力基因检测。**结果** 腹泻病例粪便标本经mEC肉汤增菌后,检测O157胶体金阳性;增菌液经免疫磁珠富集后培养出可疑菌落,经系统生化鉴定为大肠杆菌,血清型为O157:H7;PCR检测O抗原特异性rfbE基因和H7特异性fliC基因均阳性;毒力基因eaeA、stx2和hly均阳性,stx1阴性。**结论** 分离株确诊为肠出血性大肠杆菌O157:H7,为贵州省腹泻病例中首株该病原体。

关键词:肠出血性大肠杆菌 O157 : H7;贵州;腹泻;PCR;毒力基因

中图分类号:R378 文献标识码:B 文章编号:1002-2694(2015)02-0183-03

Isolation and identification of the first strain of *Enterohemorrhagic Escherichia coli* O157 : H7 isolated from a patient with infectious diarrhea in Guizhou Province, China

WEI Xiao-yu, YOU Lü, TIAN Ke-cheng, TANG Guang-peng, WANG Ding-ming

(Research Institute of Infectious Disease Control and Prevention, Guizhou Provincial Center
for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China)

Abstract: In this study, we aimed to isolate and identify *Enterohemorrhagic Escherichia coli* O157 : H7 from a patient with infectious diarrhea in Guizhou Province, and then detect virulence genes. Feces from a diarrhea patient were enriched in mEC broth. The *E. coli* O157 was primary screened by Gold-immunochromatography assay (GICA), then followed by immunomagnetic bead separation (IMS) for the isolation of EHEC O157 from positive enrichment medium. Isolates were conducted with biochemical identification, sero-groups testing, specific PCR identification and virulence genes detection. Results showed that GICA was positive and EHEC O157 suspicious colonies were cultured by IMS. The strain was identified as *E. coli* O157 : H7 by sero-type and specific PCR. The virulence genes of eaeA, stx2 and hly were tested positive, and the stx1 was negative. The laboratory diagnostic result showed that the isolate from a patient with infectious diarrhea was EHEC O157 : H7. It is the first EHEC O157 : H7 strain isolated from a patient with infectious diarrhea in Guizhou Province.

Keywords: *Enterohemorrhagic Escherichia coli* O157 : H7; Guizhou; diarrhea; PCR; virulence genes

Supported by Science and Technology Fund of the Health Department of Guizhou Province (No. gzwkj2013-1-079) and grants from the National Key Program for Infectious Disease of China (No. 2012ZX10004-212)

肠出血性大肠杆菌(*Enterohemorrhagic Escherichia coli*,EHEC)是一种重要的人兽共患病原菌,该菌主要定居于动物的肠道内,通过污染的水源及食物引起人和动物感染。肠出血性大肠杆菌

(EHEC)有多种血清型,主要包括O157 : H7,O26 : H11和O111等几种血清型,其中毒力最强的血清型是O157 : H7。EHEC O157 : H7感染宿主后除可使人发生常规腹泻外,还可在5%~10%的病例中导致溶血性尿毒综合征、血栓性血小板减少等严重并发症,甚至死亡^[1]。世界各地包括中国都有不同规模的暴发流行。我国自1986年已先后在江苏、山东、河南、安徽、浙江等十多个省市发现了

国家科技重大专项(No. 2012ZX10004-212)和贵州省卫生科技基金(No. gzwkj2013-1-079)联合资助

作者单位:贵州省病症预防控制中心,贵阳 550004;Email: weixyuse@foxmail.com

O157:H7 感染病例。2014 年 4 月,在贵阳市,从 1 例腹泻病例的粪便标本中分离出 EHEC O157:H7。

1 材料与方法

1.1 病例资料 患者男性,1岁2月,散居儿童,家住贵州省贵阳市花溪区,为感染性腹泻散发病例,于就诊3d前出现发热38℃,腹泻,水样便,5次/d,无呕吐、腹痛、粘液便,周围无类似病人,就诊前曾采用口服补液治疗,收集患者标本前未服用过抗生素治疗,未做过粪便常规检测。

1.2 主要试剂和仪器 mEC 肉汤增菌液购自北京友康基业生物公司,大肠杆菌 O157 胶体金检测试剂盒购自郑州万泰,O157 免疫磁珠购自挪威英俊公司,O157、H7 诊断血清购自宁波天润,O157 显色培养基购自法国柯玛嘉,API20E 生化鉴定板条购自法国梅里埃。PCR 仪为德国 80W-Tprofessional Gradient 96;凝胶成像仪为 Gel Doc2000 型(Bio-Rad,美国)。引物合成由上海生工生物公司完成。实验菌株为 1 例腹泻病例粪便标本中分离的 EHEC O157:H7 疑似菌株,编号 GZ2014037,O157:H7 标准株 NCTC12900 购

自广东环凯生物科技有限公司。

1.3 传统方法鉴定 EHEC O157:H7 腹泻病例标本经 mEC 增菌后,进行大肠杆菌 O157 胶体金检测,胶体金阳性者 mEC 增菌液进行 O157 免疫磁珠(IMS)富集后转种至 O157 显色培养基,观察菌落生长时间、形态、菌落染色、系统生化鉴定、O157 和 H7 诊断血清凝集。

1.4 DNA 提取 挑取 O157:H7 肠出血性大肠杆菌可疑菌落接种至血平板培养 18 h 后,采用大连宝生物 DNA 提取试剂盒,按照试剂盒说明书步骤提取细菌 DNA。

1.5 特异性 PCR 鉴定 采用 PCR 方法,按照参考文献^[2]提供的 O157 菌体抗原特异基因 rfbE 和鞭毛抗原 H7 特异基因 flic 的引物序列和参数对实验菌株 GZ2014037 核酸进行扩增,同时采用 O157:H7 标准株核酸作为阳性对照,超纯水作为阴性对照。

1.6 毒力基因检测 采用 PCR 方法,按照参考文献^[2-4]提供的引物序列和扩增程序,见表 1,对实验菌株 GZ2014037 和 EHEC O157:H7 标准株的核酸进行 stx1、stx2、Hly、eaeA 4 种毒力基因检测,超纯水作为阴性对照。

表 1 实验用引物

Tab. 1 Primers used in laboratory

Primer	sequence(5'-3')	Annealing temperature/°C	Length of amplification fragment/bp
rfbEO157 ^[2]	F-5'CGGACATCCATGTGATATGG3' R-5'TTGCCTATGTACAGCTAACCC3'	60	259
flicH7 ^[2]	F-5'GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC3' R-5'CAACTGTGACTTTATCGCCATTCC3'	55	550
stx1 ^[3]	F-5'CCCGGATCCATGAAAAAAACATTATTAAATAGC3' R-5'CCCGAATTCAAGCTATTCTGAGTCACG3'	52	285
stx2 ^[4]	F-5'AAGAAGATGTTATGGCGGT3' R-5'CACGAATCAGGTTATGCCCTC3'	55	285
hly ^[2]	F-5'GCATCATCAAGCGTACGTTCC3' R-5'AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT3'	60	534
eaeA ^[2]	F-5'GACCCGGCACAGCATAAGC3' R-5'CCACCTGCAGCAACAAGAGGG3'	60	384

2 结果

2.1 大肠杆菌 O157 胶体金检测 腹泻病例粪便标本 mEC 肉汤增菌液大肠杆菌 O157 胶体金检测有两条红线出现,即在检测线和质控线位置均出现红线,判断为阳性。

2.2 菌落形态及染色鉴定 O157 胶体金阳性的 mEC 肉汤增菌液进行 O157 免疫磁珠(IMS)富集后转种至 O157 显色培养基,36℃培养过夜后可见大小约 0.5~1 mm、圆形、边缘整齐、表面光滑湿润、中心褐色周围淡紫色可疑菌落,对可疑菌落进行革兰染色镜检,结果为革兰染色阴性、无芽孢杆菌。

2.3 系统生化鉴定 将初步鉴定符合 O157 大肠杆菌的实验菌株 GZ2014037 进行 API20E 系统生化鉴定,结果 O157 大肠杆菌疑似菌株系统生化鉴定为大肠杆菌,API20E 生化编码为 5144152,鉴定度为 97.7%。

2.4 诊断血清凝集结果 实验菌株 GZ2014037 使用大肠杆菌 O157 诊断血清进行玻片凝集,凝集强度为(十十十),相应菌株再用 H7 进行血清凝集,凝集强度为(十十),同时用 O157:H7 标准菌株作为阳性对照,无菌生理盐水作为阴性对照。

2.5 特异性 PCR 鉴定结果 采用 PCR 方法对实

验菌株 GZ2014037 和标准菌株 NCTC12900 核酸进行扩增,结果显示本次分离菌株及标准菌株均获得 259 bp(rfbE 基因)和 547 bp(flic 基因)特异性扩增片断,而阴性对照无条带扩增。

2.6 毒力基因检测结果 采用 PCR 方法对实验菌株 GZ2014037 和标准株 NCTC12900 核酸进行检测,产物经 1.5% 琼脂糖进行电泳,结果实验菌株 GZ2014037 获得 384 bp(eaeA 基因)、285 bp(stx2 基因)、534 bp(hly 基因)的特异性扩增片断,无 stx1 条带扩增,标准株获得 384 bp(eaeA 基因)、534 bp(hly 基因)的特异性扩增片断,阴性对照无条带出现。

3 讨 论

贵州省近 5 年其他感染性腹泻(除霍乱、菌痢、伤寒副伤寒)发病率逐年增高,由 2008 年 14.98/10 万上升至 2012 年 25.97/10 万,其发病率仅次于手足口病,居肠道传染病第 2 位。贵州省引起腹泻的常见病原有沙门、弯曲菌、轮状病毒、诺如病毒等^[5-6],而由肠出血性大肠杆菌 O157 引起的腹泻病例至今未见报道。

腹泻病例中肠出血性大肠杆菌 O157 的检测程序,常采用大肠杆菌 O157 胶体金对标本进行初筛,初筛阳性的进行 IMS 富集获得分离菌株,为大肠杆菌 O157:H7 病原学检测的最佳程序,因大肠杆菌 O157 胶体金特异性强、灵敏度高,操作简便、快速,可对标本进行快速筛查,减少工作量,有助于及时诊断并确定治疗方案,尤其适合各级疾控中心和临床检验部门使用^[7]。本文对 1 例腹泻病例粪便标本进行 mEC 肉汤增菌后,检测大肠杆菌 O157 胶体金阳性,对增菌液进行 IMS 富集后分离到疑似肠出血性大肠杆菌 GZ2014037,经传统方法鉴定为肠出血性大肠杆菌 O157:H7,为贵州省腹泻病例中首株肠出血性大肠杆菌 O157:H7 病原菌。

为了从分子生物学水平证实该分离株,采用特异性 PCR 方法进行鉴定,结果 O157 菌体抗原特异基因 rfbE 和鞭毛抗原 H7 特异基因 flic 均阳性。脂多糖是细菌的表面抗原,具有重要的诊断和鉴定价值,rfbE 基因是编码 O157:H7 的脂多糖基因。针对编码 H7 鞭毛抗原的基因 flic 设计的引物,能特异地检测到 H7 基因,对特异地检出大肠杆菌 O157:H7 有辅助鉴定作用^[8]。该方法在腹泻病例和动物来源的菌株检测中得到广泛应用^[9]。本研究中 GZ2014037 菌株经特异性 PCR 检测为肠出血性大肠杆菌 O157:H7,与传统方法检测结果一致。

大肠埃希菌 O157:H7 主要依靠它产生的志贺毒素、溶血素和对上皮细胞的粘附素引起人体的损害。其中志贺毒素(Shiga toxin, Stx)包括 stx1 和 stx2, 是引起人类溶血性尿毒综合征和血栓性血小板减少性紫癜的主要毒力因子, 分别由 stx1、stx2 基因编码。而由 hlyA 和 eaeA 基因编码的溶血素和对上皮细胞的粘附素也是重要的致病因子^[8]。为了解贵州省 GZ2014037 分离株的毒力基因携带情况,本研究采用 PCR 方法,对该菌株进行毒力基因检测,发现贵州省首次从腹泻病例中分离的 O157:H7 肠出血性大肠杆菌携带 eaeA 基因、stx2 基因及 hly 基因,为强毒株。1996—1999 年贵州省曾从仔猪中检出 O157 大肠杆菌 3 株^[10],但至今一直未从病人中分离到 O157:H7 肠出血性大肠杆菌。本研究从腹泻病例中分离到肠出血性大肠杆菌,是迄今为止贵州省首次从腹泻病例中分离到肠出血性大肠杆菌 O157:H7,说明贵州省腹泻人群中存在肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的感染,应加强对该病原菌的监测。

参考文献:

- [1] Han R, Fang HL, Guo F, et al. Initial adherence of EHEC[J]. Progr Mod Biomed, 2014, (2): 372-376. (in Chinese)
韩燃,房华丽,郭峰,等. EHEC 的新型粘附因子研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, (2): 372-376.
- [2] Chen DL, Xu YM, Luo X, et al. Detection rfbO157, fliCH7, hlyA, eaeA, stx2 and mutation of stx2 genes of EHEC O157:H7 by PCR and meaning[J]. Chin J Health Lab Technol, 2005, 15(10): 1197-1201. (in Chinese)
陈道利,许彦梅,罗霞,等. PCR 方法检测 EHEC O157:H7 的 rfbO157,fliCH7,hlyA,eaeA,stx2 及其变种基因[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(10): 1197-1201.
- [3] Wang L, Ye CY, Zao AL, et al. Identification of a non-Shiga toxin-producing Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain[J]. Dis Surveillance, 2007, 22(7): 441-443. (in Chinese)
王蕾,叶长芸,赵爱兰,等. 一株不产志贺毒素的肠出血性大肠杆菌:菌株的鉴定[J]. 疾病监测, 2007, 22(7): 441-443.
- [4] Tyler SD, Johnson WM, Lior H, et al. Identification of verotoxin-in type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(7): 1339-1343.
- [5] Wei XY, You L, Tian KC, et al. Epidemic feature and bacteria etiological distribution for infectious diarrhea cases in Guiyang city[J]. J Appl Prev Med, 2012, 18(3): 133-136. (in Chinese)
韦小瑜,游旅,田克诚. 贵阳市夏秋季腹泻病例流行特征及细菌病原分布[J]. 应用预防医学, 2012, 18(3): 133-136.
- [6] Yan Y, Guo J, Tian KC, et al. Analysis on the pathogeny of viral diarrhea in summer and fall of 2010 in Guiyang districts[J]. Mod Prev Med, 2012, 18(3): 133-136. (in Chinese)