

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(5):676-683; 4 May 2011  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

# 江苏某地健康绵羊群产志贺毒素大肠杆菌体内分离株的分子流行病学及致病力

顾丛丛<sup>#</sup>, 薛涛<sup>#</sup>, 徐婷婷, 高崧<sup>\*</sup>, 焦新安<sup>\*</sup>, 刘秀梵

扬州大学兽医学院、农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009

**摘要:**【目的】探讨江苏某羊场健康绵羊体内产志贺毒素大肠杆菌的带菌和流行情况, 同时就分离株的致病力和对 Vero 细胞的毒性作用作了研究。【方法】基于本实验室已经建立的 EHEC O157:H7 EDL933W 株的 *stx1*、*stx2*、*eaeA*、*hlyA* 四个基因的多重 PCR 检测并配合选择性增菌、平板筛选等方法对 STEC 进行分离鉴定。【结果】在为期 6 个月的连续跟踪调查中, 共分离到 STEC 菌株 107 株, 分离率为 19.4% (107/550)。分离株属于 41 种 O 血清型、62 种 O:H 血清型, 未定型 (ONT) 有 22 株, 粗糙型 (OR) 1 株。其中属于绵羊 STEC 的优势血清型有 O5 (2 株)、O91 (1 株)、O103 (1 株)。本文检测到的优势血清型为 O93, *stx2* 阳性菌株的分离率较 *stx1* 阳性菌株的分离率高, LD<sub>50</sub> 测定结果表明分离株对小鼠致病力不高, 受试的 3 个分离株均不能致小鼠死亡。对 107 株 *stx* 阳性分离株噬菌斑试验表明, 71 株阳性菌株携带噬菌体 (66.3%, 71/109)。受试分离株进行 Vero 细胞毒性试验, 其中有一个菌株 *stx* 基因阳性但不能使 Vero 细胞产生病变。【结论】绵羊是 STEC 的天然宿主, 可健康带菌。虽然 STEC 分离株对小鼠的致病力较弱, 但不能排除其对人类安全的威胁。STEC 携带志贺毒素基因并不意味着一定表达志贺毒素, 需对志贺毒素的表达及调控机理做进一步的研究。

**关键词:** 产志贺毒素大肠杆菌, PCR, O 抗原, H 抗原, 半数致死量, Vero 细胞

**中图分类号:** S852.65      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 05-0676-08

产志贺毒素大肠杆菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC) 系一类在体内或体外生长时可产生志贺毒素的病原性大肠杆菌。STEC 菌株一般含有多种毒力基因, 如志贺毒素基因 (*stx*)、粘附因子基因 (*eae*)、溶血素基因 (*hly*) 等。志贺毒素具有细胞毒性, 可致 vero 细胞病变和死亡<sup>[1-2]</sup>。通常将携带粘附因子 (*eae*)、溶血因子 (*hly*), 能够引起人类出血性结肠炎和溶血性尿毒综合症的 STEC, 又称

为肠出血性大肠杆菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)<sup>[3-4]</sup>。反刍动物, 尤其是奶牛、绵羊、山羊, 已成为引起人类发病的主要宿主来源<sup>[3,5-6]</sup>。本实验室周琼等对健康奶牛中 STEC 的流行病学调查显示, O26 是其优势血清型, 有重要的临床意义<sup>[4]</sup>。世界上多个国家都已对健康绵羊体内 STEC 的携带情况进行了深入调查, 如巴西、澳大利亚、西班牙等<sup>[3,5-7]</sup>。而我国这一方面的研究不多<sup>[4]</sup>, 有必要

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30972196, 30771460, 30471281); 国家“863 计划” (2003AA222141); 国家支撑计划 (2009BADB9B01)

<sup>\*</sup> 通信作者。高崧, Tel: +86-514-87991448, E-mail: gsong@yzu.edu.cn; 焦新安, Tel: +86-514-87971803, E-mail: jiao@yzu.edu.cn

**作者简介:** <sup>#</sup> 对本文有同等贡献。顾丛丛 (1986-), 女, 山东章丘人, 硕士研究生, 主要从事产志贺毒素大肠杆菌流行病学研究, E-mail: congcongjinan@163.com; 薛涛 (1982-), 女, 山东临沂人, 博士研究生, 主要从事产志贺毒素大肠杆菌相关方面的研究, E-mail: netbf1982@sina.com

**收稿日期:** 2010-10-24; **修回日期:** 2010-01-28

对我国健康绵羊体内 STEC 的携带情况及绵羊体内 STEC 的基本特征有所了解。

1 材料

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞: Vero 细胞、大肠杆菌 K12、DH5 $\alpha$ 、产志贺毒素大肠杆菌标准株 EHEC O157:H7 EDL933W 由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室保存。噬菌体指示菌 MC1061,由上海交通大学严亚贤博士惠赠。分离株为从江苏省某羊场健康绵羊的粪便中分离所得。

1.1.2 培养基:麦康凯琼脂培养基 (Mac) (蛋白胨 20.0 g,牛胆盐 5.0 g,乳糖 10.0g,氯化钠 5.0 g,中性红 0.03 g,琼脂 14.0 g,加蒸馏水至 1 L,pH 7.0 - 7.4)购自上海中科昆虫生物技术开发有限公司。EC 肉汤 (*E. coli* Broth) (胰蛋白胨 20.0 g,乳糖 5.0 g,3 号胆盐 1.5 g,磷酸氢二钾 4.0 g,磷酸二氢

钾 1.5 g,氯化钠 5.0 g,加蒸馏水至 1 L,pH6.9  $\pm$  0.1);大肠杆菌 O157 显色培养基 (HB7006)均购自青岛高科园海博生物技术有限公司。胰酶大豆肉汤 (tryptone soy broth, TSB) 培养基为 Sigma 公司生产。

1.1.3 主要试剂和仪器:dNTPs、Taq DNA 聚合酶、100 bp DNA Ladder 等均购自 TaKaRa 公司。大肠杆菌 O 抗原全套诊断血清购自中国兽药监察所。大肠杆菌 H 抗原全套诊断血清购自天津生物芯片有限责任公司。萘啶酮酸 (nalidixic acid, Nal),上海生工生物工程技术有限公司进口分装。注射用丝裂霉素 (mitomycin, MMC),2 mg/支,浙江海正药业股份有限公司。

1.1.4 引物的设计与合成:针对 EHEC O157:H7 EDL933W 株的 *stx1*、*stx2*、*eaeA*、*hlyA* 基因序列设计引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成 (表 1)。

表 1 多重 PCR 引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of synthetic oligonucleotide primers used in the multiplex-PCR

Primer code	Primer sequence(5'→3')	Annealing temp / $^{\circ}$ C	Size /bp
Stx1 (F)	TCTCAGTGGGCGTCTTATG	57.80	338
Stx1 (R)	TACCCCTCAACTGCTAATA	55.75	
Stx2 (F)	TCGTCACTCACTGGTTTCATC	58.01	398
Stx2 (R)	CAGTTATCTGACATTCTGGTTG	56.35	
EaeA (F)	ATGCTTACTGCTGCTTTAGG	55.75	248
EaeA (R)	GCCTTCATCATTTTCGCTTTC	55.75	
HlyA (F)	GCTTGGAAATAGAAATACACCG	56.06	583
HlyA (R)	TTGTTCTCTATGTGCGTC	55.41	

1.2 样品采集

2008 年 8 月 - 2009 年 1 月对江苏地区某羊场的 500 只健康绵羊羊粪随机采样,进行为期 6 个月的跟踪监测,共采集 550 份样品。采集每只羊新鲜粪便约 1 g,放入含有 35% - 40% 甘油的灭菌 PBS 的指形管中,置于盛有冰块的保温盒中运回实验室备用。

1.3 样品的前增菌

将上述样品旋涡混匀,500  $\times$  g 离心 30 s,移取上层液体 500  $\mu$ L 置于 5 mL EC 肉汤中,充分混匀,于 41 $^{\circ}$ C 水浴静置培养 6 - 12 h。

1.4 样品 PCR 检测

取 1mL 培养物以煮沸法制得粗制模板,进行两重基因 *stx1* 和 *stx2* PCR 检测,剩余培养物保存于 4 $^{\circ}$ C。阳性样品,取剩余培养物涂布 O157 显色平

板,37 $^{\circ}$ C,静置培养 18 - 24 h。挑取 O157 显色平板上的紫红色菌落和蓝色菌落各 5 - 10 个于 TSB 中,37 $^{\circ}$ C,220 r/min,振摇培养 18 - 24 h。同样方法制备菌体 DNA 模板,四重 PCR 检测 *stx1*、*stx2*、*eaeA*、*hlyA*,阳性样品再经复检确认。Mac 琼脂平板上连续传两代,单菌落鉴定为阳性的,即为纯化菌株。

1.5 分离株血清型鉴定

利用玻板、试管凝集试验测定 O 抗原,玻板凝集试验测定 H 抗原。按抗体试剂盒说明书提供的方法进行。

1.6 噬菌体的诱导

将受试菌株及噬菌体指示菌 MC1061 接种 LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C,220 r/min 振荡过夜,将培养液接种到新鲜的 LB 培养基中 (含终浓度为 1 mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub>),37 $^{\circ}$ C,220 r/min 振荡 3.5 h 至对数生长期

( $OD_{600}$  为 0.45 – 0.55), 在上述菌液中加入诺氟沙星(Norfloxacine)至终浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$ , 37℃ 诱导 2 h, 将诱导培养的菌液 4℃, 5000  $\times$  g, 离心 10 min, 上清用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌, 取滤液涂平板, 检测无菌状态。将无菌滤液于 -20℃ 保存备用。

### 1.7 噬菌斑的获得

以大肠杆菌 MC1061 作为指示菌, 利用双层琼脂平板法获得噬菌斑<sup>[8-9]</sup> (底层 LB 琼脂培养基加入 1.5% 琼脂粉, 顶层 LB 琼脂培养基加入 0.7% 琼脂粉), 顶层琼脂培养基含终浓度为 1 mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$ 。顶层琼脂培养基预先置于 56℃ 水浴中保温。将步骤 1.6 所获得的噬菌体滤液 100  $\mu\text{L}$  与 200  $\mu\text{L}$  指示菌混匀, 37℃ 孵育 25 min 后, 与顶层琼脂混匀, 迅速倾注到底层琼脂上, 37℃ 过夜培养, 观察噬菌斑。

### 1.8 Vero 细胞毒性试验

Vero 细胞长成单层后, 将未经诱导的细菌培养液的滤液接种已长成单层的 Vero 细胞后, 观察细胞病变<sup>[10-11]</sup>。

### 1.9 $\text{LD}_{50}$ 测定

**1.9.1 受试菌株小鼠感染适应株的获得:** 挑选 3 株临床分离株作为受试菌株, 阳性对照为 EDL933W 株, 阴性对照为 K12 株。3 周龄清洁级 ICR 小鼠以含萘啶酮酸(Nal, 50 mg/L) 的灭菌水饮水 3 天, 后禁食、禁水 18 – 24 h。制备感染菌液, 每只小鼠灌服  $1 \times 10^9$  CFU 的菌量, 同时腹腔注射丝裂霉素(MMC, 2.5 mg/kg 体重), 攻毒后继续饮用同浓度的萘啶酮酸水溶液。观察小鼠临床表现, 3 天后采集小鼠粪便, 分离受试菌株, 经鉴定正确后便为感染适应株。

**1.9.2 攻毒:** 3 周龄 ICR 小鼠, 含萘啶酮酸(Nal, 50 mg/L) 灭菌水饮水 3 天之后禁食、禁水 18 – 24 h。用灭菌 PBS 调整攻毒菌所需的 4 个攻毒剂量:  $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$  CFU, 每个攻毒剂量接种 4 只 ICR 小鼠, 阴性对照组不攻毒; 同时腹腔注射丝裂霉素(MMC, 2.5 mg/kg 体重), 攻毒后继续饮用同浓度的萘啶酮酸水溶液, 一周内观察小鼠临床表现、死亡情况。对死亡的小鼠作细菌分离, 用特异性 O 抗原、H 抗原单因子血清对分离到的细菌进行鉴定, 以确定是否为接种菌。通过 Reed 和 Muench 的方法计算  $\text{LD}_{50}$ <sup>[12]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 STEC 流行病学调查结果

2008 年 8 月 – 2009 年 1 月对某羊场的健康绵羊进行随机采样, 550 份粪样中, 分离到 STEC 菌株 109 株, 分离率为 19.8%, 各月份 STEC 的分离率见图 1。本羊场共分离到 41 种 O 抗原血清型, 62 种 O:H 血清型, ONT 22 株, OR 1 株; 受检羊场健康绵羊体内 STEC 的血清型多样, 单就 O 血清型, O93 是较常见血清型, 但未见优势 O:H 血清型, 详见表 2。

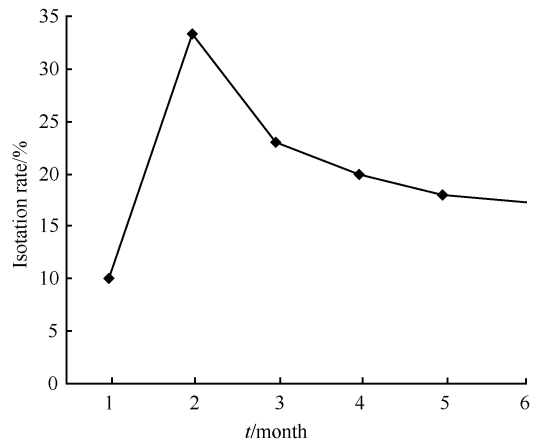


图 1 2008 年 8 月 – 2009 年 1 月 STEC 分离率的总体趋势

Fig.1 The trend of the STEC isolation rate from August 2008 to January 2009.

### 2.2 分离株噬菌斑测定结果

分离株噬菌斑测定结果见表 3。结果显示, 分离到的 *stx* 阳性菌株 107 株中, 能产生噬菌斑者 71 株, 不能产生噬菌斑者 28 株, 疑似 8 株。

### 2.3 $\text{LD}_{50}$ 和 Vero 细胞毒性试验结果

挑选临床分离株 3 株, 阳性对照 EDL933W, 阴性对照 K12 进行  $\text{LD}_{50}$  的测定, 由于受试分离株攻毒小鼠均没有死亡, 阳性对照 (EDL933W) 全部死亡 ( $\text{LD}_{50}$  为  $10^{4.6}$ ), 推测其对小鼠的致病力较弱; 受试分离株  $\text{LD}_{50}$  无法通过 Reed 和 Muench 的方法计算。

同时将分离株 9u19-1-1、9u20-1-1、EDL933、K12 菌株培养液的滤液接种单层 Vero 细胞后, EDL933 株的滤液 18 h 就产生细胞病变, 病变表现为细胞变圆、皱缩、脱落而后死亡, 分离株 9u19-1-1 与细胞作用 24 h 出现同样细胞病变, 9u20-1-1 未发生病变 (图 2)。

表 2 2008 年 8 月 - 2009 年 1 月羊源 STEC 分离株基因型与血清型的统计

Table 2 Serotypes and genotypes of STEC isolates recovered from sheep fecal samples in a farm in Jiangsu Province during August 2008 to January 2009

Month	Genotype ( number )	Serotype ( number )
August 2008	Stx2 ( 5 )	ONT ( 2 ) , O58 : H35 ( 1 ) , O120 : H2 ( 1 ) , O153 : H - ( 1 ) ;
	Stx1 + Stx2 ( 4 )	ONT ( 2 ) , O48 : H - ( 1 ) , O130 : H11 ( 1 ) ;
	Stx1 + Stx2 + HlyA ( 1 )	O136 : H34 ( 1 )
September 2008	Stx1 ( 1 )	O150 : H8 ( 1 ) ;
	Stx2 ( 14 )	O21 : H - ( 1 ) , O24 : H8 ( 1 ) , O93 : H - ( 4 ) , O93 : H24 ( 1 ) , O93 : H43 ( 1 ) , O96 : H5 ( 1 ) , O103 : H2 ( 1 ) , O159 : H8 ( 1 ) , O159 : H19 ( 1 ) , ONT ( 2 ) ;
	Stx1 + Stx2 ( 9 )	ONT ( 2 ) , O21 : H - ( 1 ) , O55 : H5 ( 1 ) , O55 : H27 ( 1 ) , O91 : H - ( 1 ) , O93 : H - ( 1 ) , O93 : H24 ( 1 ) , O141 : H4 ( 1 )
	EaeA + Stx2 ( 1 )	OR : H29 ( 1 )
October 2008	Stx2 ( 13 )	ONT ( 7 ) , O4 : H - ( 1 ) , O64 : H28 ( 1 ) , O78 : H8 ( 1 ) , O83 : H2 ( 1 ) , O93 : H - ( 1 ) , O131 : HR ( 1 ) ;
	Stx1 + Stx2 ( 4 )	ONT ( 1 ) , O4 : H52 ( 1 ) , O66 : H12 ( 1 ) , OR : H - ( 1 ) ;
	Stx1 + Stx2 + HlyA ( 4 )	ONT ( 1 ) , O4 : H2 ( 1 ) , O11 : H15 ( 1 ) , O24 : H21 ( 1 ) ;
	EaeA + Stx1 + Stx2 ( 1 )	O156 : H27 ( 1 )
November 2008	Stx2 ( 15 )	ONT ( 2 ) , O4 : H - ( 1 ) , O4 : H2 ( 1 ) , O4 : H21 ( 1 ) , O39 : H - ( 1 ) , O82 : H8 ( 1 ) , O93 : H - ( 1 ) , O93 : H27 ( 1 ) , O100 : H7 ( 1 ) , O101 : H4 ( 1 ) , O114 : H10 ( 1 ) , O138 : H - ( 1 ) , O146 : H1 ( 1 ) , O147 : H - ( 1 ) ;
	Stx1 + Stx2 ( 5 )	ONT ( 1 ) , O21 : H - ( 1 ) , O39 : H - ( 1 ) , O93 : H2 ( 1 ) , O93 : H8 ( 1 )
December 2008	Stx1 ( 1 )	O146 : H8 ( 1 ) ;
	Stx2 ( 13 )	ONT ( 3 ) , O13 : HR ( 1 ) , O83 : H1 ( 1 ) ; O93 : H - ( 2 ) , O93 : H21 ( 1 ) , O93 : H34 ( 1 ) , O93 : HNT ( 1 ) , O100 : HNT ( 1 ) , O114 : HR ( 1 ) , O117 : H4 ( 1 ) ;
	Stx1 + Stx2 ( 2 )	O74 : H8 ( 1 ) , O83 : H2 ( 1 ) ;
	Stx1 + Stx2 + HlyA ( 2 )	O5 : H16 ( 1 ) , ONT : H8 ( 1 )
January 2009	Stx1 ( 1 )	O102 : H7 ( 1 ) ;
	Stx2 ( 9 )	ONT ( 2 ) , O4 : H55 ( 1 ) , O37 : H - ( 1 ) , O48 : H11 ( 1 ) , O55 : H - ( 1 ) , O93 : H1 ( 1 ) , O93 : HNT ( 1 ) , O116 : H5 ( 1 ) ;
	Eae + Stx2 + HlyA ( 1 )	O74 : H7 ( 1 ) ;
	HlyA + Stx2 ( 1 )	ONT ( 1 )

H- , non-motile ; OR , O rough ; ONT , O serogroup non-typable ; HNT , H serotype non-typable ; HR , H rough .

表 3 STEC 分离株噬菌斑筛选结果

Table 3 The plaque-forming result of the STEC strains

Month	Genotype ( number )	Plaque-forming result
August	Stx2 ( 5 )	+ ( 4 ) , - ( 1 ) ;
	Stx1 + Stx2 ( 4 )	+ ( 2 ) , - ( 1 ) , ? ( 1 ) ;
	Stx1 + Stx2 + HlyA ( 1 )	+ ( 1 ) ;
September	Stx1 ( 1 )	+ ( 1 ) ;
	Stx2 ( 14 )	+ ( 9 ) , - ( 4 ) , ? ( 1 ) ;
	Stx1 + Stx2 ( 9 )	+ ( 6 ) , - ( 3 ) ;
	EaeA + Stx2 ( 1 )	+ ( 1 ) ;
October	Stx2 ( 13 )	+ ( 7 ) , - ( 4 ) , ? ( 2 ) ;
	Stx1 + Stx2 ( 4 )	+ ( 2 ) , - ( 2 ) ;
	Stx1 + Stx2 + HlyA ( 4 )	+ ( 4 ) ;
	EaeA + Stx1 + Stx2 ( 1 )	? ( 1 ) ;
November	Stx2 ( 15 )	+ ( 6 ) , - ( 7 ) , ? ( 2 ) ;
	Stx1 + Stx2 ( 5 )	+ ( 4 ) , - ( 1 ) ;
December	Stx1 ( 1 )	+ ( 1 ) ;
	Stx2 ( 13 )	+ ( 9 ) , - ( 4 ) ;
	Stx1 + Stx2 ( 2 )	+ ( 1 ) , ? ( 1 ) ;
	Stx1 + Stx2 + HlyA ( 2 )	+ ( 2 ) ;
January	Stx1 ( 1 )	+ ( 1 ) ;
	Stx2 ( 9 )	+ ( 8 ) ; - ( 1 ) ;
	EaeA + Stx2 + HlyA ( 1 )	+ ( 1 ) ;
	HlyA + Stx2 ( 1 )	+ ( 1 ) ;

+ , positive ; - , negative ; ? , doubtful .

3 讨论

2008 年 8 月 - 2009 年 1 月对某绵羊场的健康绵羊进行羊粪随机采样,共采集 550 份样品,分离到 STEC 菌株 107 株,分离率为 19.4% ,2008 年 8 月份分离率最低,只有 10% ,2008 年 9 月份分离率最高,达到 33.3% ,随后逐月呈下降趋势。共出现 41 种 O 抗原血清型,62 种 O : H 血清型,无法定型 (ONT) 22 株,粗糙型 (OR) 1 株。所分离到的常见 O 血清型为 O93 ,与世界上其他国家绵羊、人体内 STEC 的分布情况不同<sup>[3, 5, 7, 13-14]</sup> ,但是志贺毒素基因 2 型的检出率基本一致<sup>[3, 5-6, 14-15]</sup> ,巴西一项针对健康绵羊的 STEC 流行病学调查,结果显示其分离率为 52.1% ,他们分离的优势血清型为 ONT : H8<sup>[3]</sup> ,而澳大利亚的一项针对健康绵羊的 STEC 流行病学调查,其分离率为 31.3% ,O5 : H - ,O78 : H8 ,O91 : H - 为其优势血清型<sup>[5]</sup> 。本次调查的结果,O93 可以确

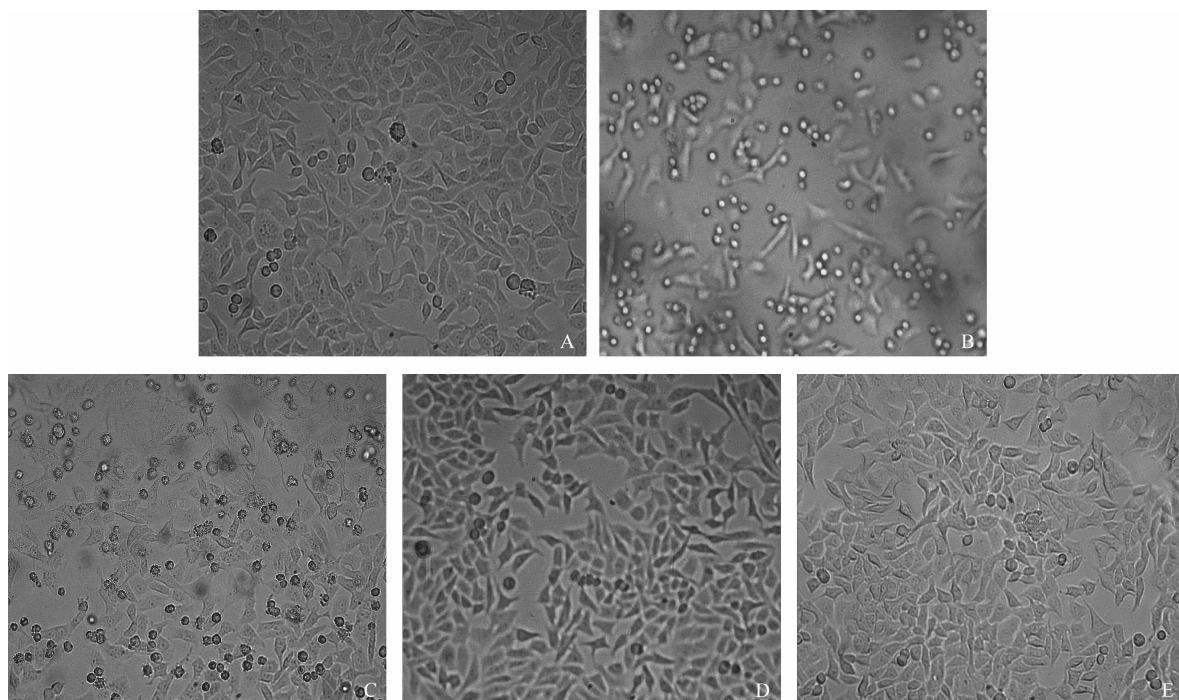


图2 Vero 细胞接种细菌滤液后 24 h 病变图

Fig. 2 The cytopathic effect of Vero cells after inoculating bacterial filtrate and normal cells. A: DH5 $\alpha$ ; B: EDL933W; C: 9U19-1; D: 9U20-1-1; E: Vero cells.

定为该场的流行菌株,同时,此次调查也分离到了澳大利亚已出现的优势血清型菌株,即 O5 和 O91,这与西班牙的报道相似。西班牙 Lugo 市 LREC 大肠杆菌参考实验室 (Laboratório de Referencia de *Escherichia coli*) 统计数据显示,健康绵羊肠道分离到的 STEC 覆盖了 50 个不同的 O 血清型,101 个 O: H 血清型。然而,只有极少的血清型是世界其他国家所分离的常见血清型,包括 O5: H -, O91: H -, O103: H2, O128: H2, O146: H8<sup>[3, 5, 15-17]</sup>。O157, O26 并不是绵羊肠道中 STEC 的优势血清型,而非 O157 引起人类发病的报道也越来越多<sup>[17]</sup>。羊源 STEC 中有许多血清型与导致人类疾病密切相关,在已知的 101 种血清型中,有 53 种在人类中分离到,其中有 23 种是从患有 HUS 的病人中分离到的<sup>[13]</sup>。

本研究利用多重 PCR 的方法,配合选择性增菌,检测 *eae*, *stx1*, *stx2*, *hlyA* 四重基因。志贺毒素 (Stx) 由噬菌体编码,是一种能够确定 STEC 特性的主要毒力因子,与人类临床感染所表现的人类溶血性肠炎 (hemorrhagic colitis, HC) 和溶血性尿毒综合征 (hemolytic uremic syndrome, HUS) 等许多疾病密

切相关。Stx 包括两个亚型 Stx1 和 Stx2,它们之间没有免疫交叉反应性,不同的 STEC 分离株可能表达 Stx1, Stx2 或者两种<sup>[15]</sup>;紧密素 (intimin) 基因 *eae* 位于 LEE 毒力岛上,是导致 A/E 损伤的重要毒力因子<sup>[16]</sup>;基于 O157、O26、O91 等 EHEC 通常都能产生溶血素,因此肠溶血素基因 (*hly*) 的检测是 EHEC 流行病学研究的一个实用指标。

挑选临床分离株接种单层 Vero 细胞,其中 9u19-1-1 菌株,含有 *stx1*, *stx2* 两重志贺毒素基因,培养物滤液接种 24 h 后细胞发生皱缩,变圆,进而脱落,说明该分离株表达的志贺毒素,引起了细胞病变。而另一株噬菌斑阳性的分离株 9u20-1-1,虽经三代传代后,细胞病变仍不明显,说明该分离株虽携带志贺毒素基因并能呈现噬菌斑,却并未表达基于细胞病变水平的志贺毒素,需要对志贺毒素的表达及其调控机理做深入的研究。

由于小鼠肠道内大量繁殖革兰氏阳性厌氧菌<sup>[18]</sup>,STEC 并不能在小鼠肠道内大量繁殖,当接种 STEC 于 SPF 级或者清洁级小鼠体内时,只能在粪便中短时间检测到,几天之内,细菌数量迅速减

少<sup>[18-19]</sup>。倪晓平等采用 3 种不同微生物等级(普通、清洁和 SPF 级) ICR 小鼠经口感染 EDL933 O157:H7 株,所有小鼠经口攻菌后,均无明显的临床症状,即使是 SPF 级小鼠平均排菌时间也仅为 24 h<sup>[20]</sup>。最常用的感染模型是经过抗生素处理的小鼠模型<sup>[19-20]</sup>,如链霉素、萘啶酮酸等,以达到抑制肠道正常菌群的作用,本文参考孙洋等的方法,于小鼠饮水中加入萘啶酮酸来抑制肠道中的正常菌群,使攻毒后目的菌在肠道中成为优势菌群<sup>[19]</sup>。此外将供试分离株在小鼠体内进行传代,获得既耐受萘啶酮酸,又对小鼠的适应力增强的菌株,用这些感染适应株进行后续的感染实验;同时参考 Fujii 等的方法,在接种细菌的同时腹腔注射丝裂霉素<sup>[18]</sup>。丝裂霉素的作用与环磷酰胺相似,能够引起白细胞和血小板的下降。通过这些方法增强小鼠对 STEC 的易感性。

尽管疾病的发生需要 Stx 的存在,本研究中的受试菌株 9u19-1-1 能够表达志贺毒素,导致 Vero 细胞脱落死亡,却没有引起小鼠的死亡或临床症状,而阳性对照 EDL933 组在灌胃 3 天后全部死亡,说明仅仅能够在体内产生志贺毒素并不足以致小鼠发病,还需要其它毒力因子的参与,才可能导致小鼠发病。并且疾病的严重程度与志贺毒素在肠道内的大量累积没有关联<sup>[7]</sup>。西班牙、德国、澳大利亚多项对 HUS 的病人的调查, O26:H11 是最主要的病原菌<sup>[11]</sup>,并且一般都含有 *eae*, *stx1*, *hlyA* 3 个毒力基因,并且多项研究证明 *eae* 基因的携带与引起人类 HUS 疾病的 STEC 菌株关系密切,而 *eae* 基因在羊源 STEC 中很少出现,只有约 5%<sup>[11,17]</sup>,佐证了本实验中的分离株对小鼠致病力低。但可能小鼠并非理想的动物模型,本研究中对小鼠致病性试验结果,并不能否定其对人类的可能威胁。

目前,我国关于绵羊源 STEC 的研究很少,本文所得结果为我国动物 STEC 的研究提供了资料。

## 参考文献

- [ 1 ] Beutin L, Geier D, Zimmermann S, Aleksic S, Gillespie HA, Whittam TS. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 2175-2180.
- [ 2 ] 郁燕萍, 彭奕冰, 支立民, 季育华, 吴仲梁. Vero 细胞毒性试验法检测大肠杆菌 O157:H7 毒素. 微生物学杂志(*Journal of Microbiology*), 1999, 3: 26-28.
- [ 3 ] Vettorato MP, Leomil L, Guth BEC, Irino K, Pestana de Castro AF. Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Microbiology*, 2003, 95: 103-109.
- [ 4 ] 周琼. 江苏部分地区牛群肠出血性大肠杆菌分离株分子流行病学及 EHEC O157:H7 鞭毛蛋白单克隆抗体的研制. 扬州大学硕士学位论文, 2008.
- [ 5 ] Steven PD, Vidiya R, Karl AB, Barbara AV, Peter H, Graham B, Michael AH. Serotypes and virulence gene profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from feces of pasture-fed and lot-fed Sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 3910-3917.
- [ 6 ] Mora A, Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Dhahi G, Echeita A, González EA, Bernárdez MI, Blanco J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (Vero toxin)-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Research in Microbiology*, 2005, 156: 793-806.
- [ 7 ] Banatvala N, Debeukelaer MM, Griffin PM, Barrett TJ, Greene KD, Green JH, Wells JG. Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O111 and associated hemolytic-uremic syndrome: a family outbreak. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 1996, 15: 1008 - 1011.
- [ 8 ] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, 170-197.
- [ 9 ] 夏永杰. 致病性大肠杆菌中诱导的  $\lambda$  样噬菌体的主要基因位点的特征分析. 南京农业大学硕士学位论文, 2010, 11-25.
- [ 10 ] 严亚贤, 陆承平. 大肠杆菌 VT2 噬菌体的分离与溶源转染. 中国病毒学(*Virologica Sinica*), 2004, 19 (4): 389-393.

- [11] Vaz TMI, Irino K, Kato MAMF, Dias AMG, Gomes TAT, Medeiros MIC, Rocha MMM, Guth BEC. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42: 903-905.
- [12] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end points. *The American Journal of Hygiene*, 1938, 27: 493-497.
- [13] Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Coira MA, Blanco J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Vero toxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *Journal of clinical microbiology*, 2004, 1: 311-319.
- [14] Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Gonzalez EA, Mora A, Prado C, Fernández L, Rio M, Ramos J, Alonso MP. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Vero toxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiology and Infection*, 1996, 117: 251-257.
- [15] Leomil L, Aidar-Ugrinovich L, Guth BE, Irino K, Vettorato MP, Onuma DL, de Castro AF. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 2003, 97: 103-109.
- [16] Eaton KA, Friedman DI, Francis GJ, Tyler JS, Young VB, Haeger J, Abu-Ali G, Whittam TS. Pathogenesis of renal disease due to entero hemorrhagic *Escherichia coli* in germ-free mice. *Infection and immunity*, 2008, 6: 3054-3063.
- [17] Werber D, Beutin L, Pichner R, Stark K, Fruth A. Shiga toxin producing *Escherichia coli* serogroups in food and patients, *Germany Emerging Infectious Diseases*, 2008, 11(14): 1803-1806.
- [18] Fujii J, Kita T, Yoshida S, Takeda T, Kobayashi H, Tanaka N, Ohsato K, Mizuguchi Y. Direct evidence of neuron impairment by oral infection with Vero toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in mitomycin treated mice. *Infection and Immunity*, 1994, 62(8): 3447-3453.
- [19] 孙洋, 刘军, 冯书章, 高丰, 郭学军, 常国权. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 感染小鼠动物模型的初步建立. *实验动物科学与管理 (Laboratory Animal Science And Manage)*, 2003, 20(4): 6-9.
- [20] 倪晓平, 孙建荣, 查捷, 蒋辉权, 俞国强, 项华, 章晓玲. 大肠杆菌 O157:H7 对小鼠感染的实验研究. *中国人兽共患病杂志 (Chinese Journal of Zoonoses)*, 2002, 18(3): 74-76.

# Epidemiological investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates originated from healthy sheep in one farm of Jiangsu Province and their pathogenicity

Congcong Gu<sup>#</sup>, Tao Xue<sup>#</sup>, Tingting Xu, Song Gao<sup>\*</sup>, Xin'an Jiao<sup>\*</sup>, Xiufan Liu

Key Laboratory of Animal Infectious Disease of Agriculture Ministry, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

**Abstract:** [ **Objective** ] In order to investigate the distribution of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) among healthy sheep in a farm and the pathogenicity to mice and Vero cells of these STEC isolates. [ **Methods** ] We used polymerase chain reaction (PCR) to detect genes of *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *hlyA*, which had been developed in this laboratory previously, combining the selective cultivation and Chrom-Agar (CA) O157 plates to isolate STEC strains. [ **Results** ] A total of 107 STEC strains were isolated in a sheep farm during six visits from August, 2008 to January, 2009. The isolation rate was 19.8% (107/550). These isolates belonged to 41 O serotypes and 60 O: H serotypes, except that 21 were O non- typable and 1 was rough. O93 was the common serotype. Some isolates such as O5, O91, O103, which are reported in other countries originated from healthy sheep were also isolated in this study. *Stx2* positive rate was higher than that of *stx1*. 50% lethal dose assay in mice indicated the pathogenicity of isolates was low and none of the 3 tested isolates caused mice death. We selected 107 *stx* gene positive STEC strains to induce the lambdoid bacteriophages. The results showed that 71 out of 107 isolates formed plaques, while 28 did not after induction. Detection of Shiga toxins for three tested isolates in Vero cell assay indicated one *stx* gene positive strain lacked the toxigenicity to Vero cells. [ **Conclusions** ] Sheep are the natural reservoirs of STEC and they are healthy to carry STEC. Although these STEC isolates experience low pathogenicity to mice, they are potential threat to human health. Shiga toxin gene positive were not equal to production of Shiga toxins, so we need to further study the Shiga toxin expression and regulation mechanism.

**Keywords:** Shiga toxin-producing *E. coli*, multiplex polymerase chain reaction, O-antigen, H antigen, LD<sub>50</sub>

( 本文责编:王晋芳 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972196, 30771640, 30471281), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2003AA222141) to Gao Song and by the National Key Technology R&D Program (2009BADB9B01) to Jiao xin'an

<sup>\*</sup> Corresponding authors. Song Gao, Tel: +86-514-87991448, Fax: +86-514-87972218, E-mail: gsong@yzu.edu.cn; xin'an Jiao, Tel: +86-514-87971803, Fax: +86-514-87311374, E-mail: jiao@yzu.edu.cn

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

Received: 24 October 2010/ Revised: 28 January 2011