

Vero 细胞毒素大肠菌(VTEC)的分离 及表型和分子生物学特性的研究

李景学 周国清 温宪芹 崔树玉 孟蔚 孙启华 王宇璐

(山东省卫生防疫站, 济南 250014)

摘要 26株 Vero 细胞毒素(VT)阳性大肠菌, 经分子生物学鉴定表明, 其中14株与 EHEC 探针杂交阳性, 按 Levine 等的标准判定属产 Vero 细胞毒素大肠菌(VTEC), 其血清型为 $O_{157}:H_7$ 3株(血便2株, 脓血便1株), $O_{157}:NM$ 3株(血便1株, 腹泻牛便2株), O_{29} 1株(粘液便), 现有血清不能分型7株(血便3株, 脓血便3株, 水样便1株); 其余12株虽 VT 毒素阳性, 但 EHEC 探针阴性, 按标准判定尚难确认, 有待进一步研究。

关键词 Vero 细胞毒素大肠菌(VTEC), 肠出血性大肠菌(EHEC), Vero 细胞试验, EHEC 基因探针

Vero 细胞毒素大肠菌(VTEC)是近10年来新确认的一组病原菌。1983年 Riley 等^[1]首次报道, 大肠菌 $O_{157}:H_7$ 能引起出血性结肠炎(HC), 故名为肠出血性大肠菌(EHEC), 该菌产生的 Vero 细胞毒素(VT)是致病性因子, 引起了广大微生物和临床医务人员的高度重视。1989年 Karmali^[2]将产生 VT 毒素的大肠菌统称为产 Vero 细胞毒素大肠菌(VTEC), 并指出, VTEC 除引起腹泻外, 常导致三种严重并发症, 即出血性结肠炎(HC)、溶血性尿毒综合症(HUS)和血栓形成血小板减少性紫癜(TTP), 其中并发 HUS 和 TTP 者其死亡率高达 50%和 75%。目前已从各种标本中检出 VTEC50 多个血清型, 其中最常见的是 $O_{157}:H_7$ 。国内^[3]仅见到徐州市防疫站从 HC 病人检出 $O_{157}:H_7$ 血清型的报道, 尚未见其它报道。为了解 VTEC 在我省的存在状况, 1992 年我们对医院腹泻门诊病人粪便及散在的腹泻牛粪便进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 粪便标本: 共收集医院门诊腹泻病人的血性便、脓血便、水样便和粘液便标本 512 份。

散在农家的腹泻牛便 47 份。

1.1.2 培养基: 麦康凯琼脂(MAC)、山梨醇麦康凯琼脂(SMAC)、双糖铁琼脂和 MIU(动力-脲基质-尿素)为本站培养基室制备的半成品。 H_7 抗血清-山梨醇半固体按文献[4]制备。各种生化培养基按文献[5]制备。产毒培养基依文献[5]的 Honda 产毒培养基改良而成。

1.1.3 诊断血清: O_{157} 诊断血清系本室用标准菌 EHEC $O_{157}:H_7$ (中国预防医学科学院流行病学和微生物学研究所提供, 菌号 882364) 的浓菌悬液 100℃加温后免疫家兔制成。 H_7 诊断血清用大肠菌 $O_{153}:K^-:H_7$ (中国药品生物制品检定所提供, 菌号 44748-1) 的肉汤培养物免疫家兔, 所得血清用免疫菌株 100℃加温菌液吸收 O 抗体后而成。

1.1.4 Vero 细胞: 由本站病毒科提供。

1.1.5 分子生物学制剂: 由中国预防医学科学院流行病和微生物研究所微生物室制备, EHEC 探针为酶切 EHEC $O_{157}:H_7$ 菌株所携带与编码粘附性菌毛有关的 60Md 质粒的 3.4kb 片段; PCR(多聚酶链反应)引物为针对 EHEC 探针的特异性序列设计; VT₁ (SLT-

1) 探针因菌株原因, 多次酶切不成功, 故仅有 VT₂ (SLT-1) 探针。

1.2 试验方法

1.2.1 标本的分离与菌落的初筛: 标本采集后, 每个标本立即分别接种于 MAC 和 SMAC 平板各一个, 37℃ 培养 18—20h, 视两种平板上菌落的反应情况, 用下述三种方法初筛。

(1) 凡 MAC 平板上发酵乳糖, SMAC 平板上呈现无色菌落(不发酵山梨醇)者, 选该菌落 5 个以上, 用 O₁₅₇ 血清检查, 无论凝集与否, 均取 3 个菌落分别接种 H₇ 抗血清-山梨醇半固体、双糖铁和 MIU 半固体各一支, 培养后其反应符合 EHEC O₁₅₇: H₇ 时^[9], 再做 Vero 细胞试验。

(2) 如果在上述两种平板上均呈红色或粉红色菌落, 仅从 MAC 平板上选 3 个菌落分别接种双糖铁和 MIU 半固体各一支, 培养后符合大肠菌特性时, 再做 Vero 试验。

(3) 如果在 MAC 平板上有大量无色菌落, 不考虑 SMAC 平板上的结果, 仅从前者选 3 个无色菌落分别接种双糖铁和 MIU 半固体各一支, 培养后备做其它致病菌的检测。

1.2.2 Vero 细胞试验: 按 Karmali 等^[6]描述的方法略加改良。即取 0.1ml 试验菌过夜肉汤培养物接种于 20ml 改良的 Honda 产毒培养基, 37℃ 过夜培养后 10000r/min 离心 30min, 其沉淀用 PBS (pH7.2) 洗三次, 最后悬浮于 1ml 无菌盐水中(含多粘菌素 B0.1mg/ml), 置 37℃ 水浴 30min 后离心, 其上清用 0.22μm 无菌滤膜过滤, 取滤液按常规做 Vero 细胞试验。同时用 VT 阳性标准菌(菌号 882364)、VT 阴性菌(菌号 44748-1)及无菌盐水(含多粘菌素 B0.1mg/ml)做对照。每孔至少检查 5 个视野, 计算总数不少于 200 个细胞中圆形细胞所占比例的 95% 可信上限, 视为阳性。

1.2.3 生化与血清学特性的检测: 凡 Vero 细胞试验阳性菌, 均用 O 血清做该菌的活菌和 100℃ 加温菌液做玻片凝集, 阳性时再做试管凝

集。动力阳性菌应用 H 血清做玻片和试管(肉汤培养物)凝集试验。糖类发酵试验观察 14d。

1.2.4 分子生物学试验: EHEC 和 VT₂ 探针杂交及 PCR (多聚酶链反应) 由中国预防医学科学院流行病微生物研究所微生物室协助检测。

2 结果

2.1 菌落的初筛

有 19 份腹泻标本在 MAC 平板上均发酵乳糖, 在 SMAC 平板上山梨醇阴性, 其中 8 份阴性菌落呈优势, 11 份为少量散在。经方法 1 初筛, 仅 6 份呈优势菌落的标本与 O₁₅₇ 血清凝集(血便 3 份, 脓血便 1 份, 腹泻牛便 2 份), 而且均为氧化酶阴性, H₇ 抗血清-山梨醇半固体上动力和山梨醇阴性, 双糖铁和 MIU 半固体上葡萄糖、乳糖和胨基质阳性, H₂S 和尿素酶阴性, 动力阳性和阴性各 3 株。其余 13 份标本或氧化酶阳性, 或 H₇ 抗血清-山梨醇半固体上动力和山梨醇阳性, 或 MIU 半固体上尿素酶阳性而被排除。用方法 2 初筛, 从无其它致病菌的腹泻标本中筛选出 211 株符合大肠菌特性的菌株, 均为氧化酶阴性, 双糖铁上葡萄糖和乳糖阳性, H₂S 阴性, MIU 半固体上胨基质阳性, 尿素酶阴性。动力阳性者 198 株, 阴性者 13 株。

2.2 表型特性

2.2.1 VT 毒素: 初筛菌株经 Vero 细胞检测, VT 毒素阳性的有 26 株, 初筛为大肠菌的 20 株, EHEC 6 株。而且 VT 阳性对照菌阳性, VT 阴性对照菌和无菌盐水(含多粘菌素 B)均阴性。

2.2.2 生化与血清学特性: 26 株 VT 阳性菌均为革兰氏阴性杆菌, 氧化酶阴性, 发酵葡萄糖产酸产气, 甘露醇、麦芽糖、木糖、阿拉伯糖、胨基质和 MR 阳性, 肌醇、西蒙氏柠檬酸盐、苯丙氨酸、尿素、VP 和 H₂S 阴性, 其它生化特性见表 1, 血清学鉴定结果见表 2。

表 1 26 株 Vero 细胞试验阳性大肠菌的生化特性

菌 号	蔗 糖	侧 金 盞 花 醇	水 杨 素	纤 维 二 糖	山 梨 醇	棉 子 糖	卫 茅 醇	赖 氨 酸	鸟 氨 酸	动 力
92-1※	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
92-2※	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
92-3※	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
92-4※	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
92-15※	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
92-16※	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
92-7※	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
92-8※	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
92-13※	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
92-14※	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
92-17※	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
92-20※	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
92-22※	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
92-24※	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
92-5	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
92-6	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
92-9	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
92-10	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
92-11	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
92-12	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
92-18	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
92-19	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
92-21	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
92-23	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
92-25	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
92-26	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+

※表示 EHEC 基因探针杂交阳性，+ 左上角数字表示阳性天数

从表 1 结果可见,符合大肠菌特性的 26 株 VT 阳性菌株,有 6 株初筛为 EHEC 菌株,均为山梨醇阴性或迟缓阳性, 棉子糖、卫茅醇、赖氨酸和鸟氨酸阳性,与文献 [9] 描述的 EHEC O₁₅₇:H₇ 菌株完全一致,而其它 8 株 VTEC 和 12 株待研究菌的生化特性与普通大肠菌难以区分。

表 2 血清学鉴定结果表明, 26 株 VT 阳性菌可分型 (群) 的有 9 株, 其中 EHEC 探针阳性的 7 株 (EHEC6 株, O₂₉ 1 株), 阴性的 2 株 (O₆ 1 株, O₁₂₆ 1 株)。9 株分型菌的 O 血清与该菌的活菌和加温菌液玻片凝集强度无明显差异, 但 6 株 EHEC 因具有 k 抗原, 其活菌和加温菌液的试管凝集效价明显不同 (表 2)。H 抗原的鉴定表明, 6 株 EHEC 中 3 株动力阳性, 应用 H₇ 血清做玻片和试管凝集确定, 其鞭毛抗原为 H₇, 另外 3 株多次检测无动力, 而鞭毛染色无鞭毛, 属 O 形菌。其余 3 株虽动力阳性但无 H 血清, 故未测试。(表 2)。

表 2 26 株 Vero 细胞试验阳性大肠菌的血清学鉴定结果

菌号	O 血清	玻片凝集		试管凝集		H 血清	玻片凝集	试管凝集
		活菌	100℃加温菌液	活菌	100℃加温菌液			
92-1※	O ₁₅₇	#	#	1:320	1:5120	H ₇	#	1:10240
92-2※	O ₁₅₇	#	#	1:320	1:2560	H ₇	#	1:10240
92-3※	O ₁₅₇	#	#	1:320	1:2560	H ₇	+++	1:10240
92-4※	O ₁₅₇	++	+++	1:160	1:2560	未测		
92-15※	O ₁₅₇	++	自凝	1:160	自凝	未测		
92-16※	O ₁₅₇	++	自凝	1:320	自凝	未测		
92-13※	O ₂₉	#	#	1:320	1:320	未测		
92-9	O ₆	#	#	未测	未测	未测		
92-21	O ₁₂₆	+++	#	1:320	1:640	未测		

注: ①其余 17 株现有血清不能分型
②血清原效价: O₁₅₇ 为 1:5120, H₇ 为 1:10240, O₂₉ 为 1:640, O₆ 为 1:320, O₁₂₆ 为 1:640
③※表示 EHEC 基因探针杂交阳性
④++、+++、# 表示不同的凝集强度

2.3 分子生物学特性

26 株 Vero 细胞试验阳性菌, EHEC 探针杂交阳性的 14 株, 其中 EHEC 6 株, O₂₉ 1 株, 血清学不能分型 7 株, 而 6 株 EHEC 以 PCR (多聚酶链反应) 检测也阳性。按 Levine 等^[7]的

标准 (Vero 细胞试验和 EHEC 探针杂交阳性属 VTEC) 判定, 14 株 Vero 细胞试验和 EHEC 探针杂交阳性菌均属 VTEC。其它 12 株虽 Vero 细胞试验阳性, 但 EHEC 探针杂交阴性, 按标准尚难确认 (表 3)。

表 3 26 株 Vero 细胞阳性大肠菌的分子生物学检测结果

血清型 (群)	株数	菌 号	分子生物学检测			结果
			EHEC 探针	VT ₂	PCR	
O ₁₅₇ : H ₇	1	(92-1)	+	-	+	VTEC
O ₁₅₇ : H ₇	2	(92-2, 92-3)	+	+	+	VTEC
O ₁₅₇ : NW	3	(92-4, 92-15, 92-16)	+	+	+	VTEC
O ₂₉	1	(92-13)	+	+	未测	VTEC
不能分型	2	(92-14, 92-24)	+	+	未测	VTEC
不能分型	5	(92-7, 92-8, 92-17) (92-20, 92-22)	+	-	未测	VTEC
不能分型	4	(92-5, 92-6) (92-25, 92-26)	-	+	未测	未定
O ₆	1	(92-9)	-	-	未测	未定
O ₁₂₆	1	(92-21)	-	-	未测	未定
不能分型	6	(92-10, 92-11, 92-12) (92-18, 92-19, 92-23)	-	-	未测	未定

注: VT₁ 探针因菌株原因多次酶切未成功, 故未测试

3 讨论

Karmali^[2]认为产 Vero 细胞毒素大肠菌 (VTEC) 是指能在培养基上清液中产 VT 毒素的所有大肠菌; 而肠出血性大肠菌 (EHEC) 则是指与 EHEC 原型菌株 O₁₅₇ : H₇ 具有相同临床、流行病学和病理学特征的一群大肠菌, 目前已报道的 VTEC 中只有两个血清型 (O₁₅₇ : H₇ 和 O₂₆ : H₁₁) 属于 EHEC。Levine 等^[7]认为 VTEC 的致病性, 除噬菌体介导的 VT 毒素外, 还与该菌携带 60Md 质粒编码的粘附性菌毛有关, 并酶切该质粒制备了 3.4kb 的 EHEC 基因探针, 以测定此粘附性菌毛。Robert 等^[8]则认为 VTEC 和 EHEC 是同义词。

按 Karmali 的分类, 26 株产 VT 毒素的大肠菌均为 VTEC, 其中 6 株为 EHEC, 符合 EHEC 特性。按 Levine 等的分类则产 VT 毒素且 EHEC 探针阳性的 14 株为 VTEC, 另外的 12 株虽亦产 VT 毒素, 但 EHEC 探针为阴性, 不属于 VTEC。这 12 株菌是否属于 VTEC, 还有待进一步研究。

目前已发现的 VTEC 中, 以 EHEC O₁₅₇ : H₇ 最为常见, 对其表型特性、菌株筛选及与其它大肠菌鉴别的研究报道较多。本研究表明, 应用山梨醇麦康凯琼脂 (SMAC) 分离, 培养后挑选山梨醇阴性菌落, 再经 O₁₅₇ 血清凝集试验、H₇

抗血清-山梨醇半固体、双糖铁、MIU 半固体和氧化酶试验, 是筛选 EHEC O₁₅₇ : H₇ 的良好方法。而对 VTEC 其它血清型表型特性的报道较少, 至今尚未发现与其它大肠菌有任何鉴别意义的特性, 故多采用 Vero 细胞试验初筛。

致谢 承蒙中国预防医学科学院微生物流行病学研究所微生物室徐建国主任协助完成分子生物学试验, 谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Riley L W, R S Remis, S D Helgerson, et al. N Engl J Med, 1983, 308 (12): 681.
- [2] Karmali M A. Clin Microbiol Rev J, 1989, 2 (1): 15.
- [3] 权太淑, 范天锐, 李乐民, 等. 中华流行病学杂志, 1988, 9 (特刊 4): 24.
- [4] Farmer J J, B R Davis. J Clin Microbiol, 1985, 22 (4): 620.
- [5] 何晓青主编. 卫生防疫细菌检验, 江西南昌: 新华出版社, 1989, 701.
- [6] Karmali M A, M Petric C Lim, et al. J Clin Microbiol, 1985, 22 (4): 614.
- [7] Levine M M, J P Nataro, H Karch, et al. J Infect Dis, 1985, 156 (1): 175.
- [8] Robert E, M A Karmali, P A Fleming. J Infect Dis, 1988, 157: 1102.
- [9] 李景学, 崔树玉. 国外医学微生物学分册, 1993, 16 (2): 76.

ISOLATION OF VEROCYTOTOXIN-PRODUCING *E. COLI* (VTEC) AND IDENTIFICATION OF PHENOTYPE AND MOLECULAR BIOLOGY

Li Jingxue Zhou Guoqing Wen Xianqin Cui Shuyu Mong Wei Sun Qihua Wang Yulu

(Shandong Hygienic and Antiepidemic Station, Jinan 250014)

Abstract 26 strains *E. coli* which were positive of Verocytotoxin were described in this paper. By molecular biology identification, 14 strains of those which hybridized positively with EHEC gene probe were Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) according Levine's standard. Among the 14 strains, there were 3 strains whose sera-type is 0157: H7 (2 were from bloody stool, 1 was from pus bloody stool), 3 strains which is 0157: NM (1 was from bloody stool, 2 were from bovine diarrhoeal stool) and 1 was 029 (from mucous stool), and seven whose sera type hadn't been identified; The other strains (12 strains) were difficult to identify by Levine's standard which EHEC gene probe were negative although their Verocytotoxin is positive. It will be investigated advanced.

Key words Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC), Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), Vero cell test, EHEC gene prob