

2013–2015 年北京市丰台区腹泻患者 肠产毒性大肠埃希菌的 MLST 分型

余红¹, 董晓根¹, 尉秀霞¹, 秦萌¹, 王兆娥¹, 陈倩²

1. 北京市丰台区疾病预防控制中心, 北京 100071; 2. 北京市疾病预防控制中心

摘要: **目的** 了解 2013–2015 年北京市丰台区腹泻患者肠产毒性大肠埃希菌 (ETEC) 分布与分子分型特征, 为 ETEC 的分子流行病学研究提供参考依据。 **方法** 对 2013–2015 年北京市丰台区腹泻病例的粪便标本进行致病菌分离培养, 采用 MLST 法, 用 eBURST V 3 软件和 MEGA 5.0 对分离株进行分子分型及进化树分析。 **结果** 从 1 599 例腹泻病患者粪便标本中检出 ETEC 58 株, 分离率为 3.6% (58/1 599)。58 株 ETEC 分离株 MLST 分型结果为共分成 19 个型别, 部分试验菌株形成 2 个 ST 克隆群, 分别为 STC-6007、STC-3103, 分别同属于一个进化分支, 多数菌株的遗传关系较远, 可能与菌株来源多样有关。 **结论** ETEC 感染 2013–2015 年在丰台区腹泻疾患中占较高比例, ST-6010 与 ST-69 是最主要的 ST 型别。

关键词: 致泻大肠埃希菌; MLST 分型; 管家基因; 进化树

中图分类号: R378.2⁺1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2018)07-0874-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2018.07.031

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 可以直接反映食品的污染情况, 容易对其进行检出和监测, 是较为理想的微生物溯源指示微生物。大肠埃希菌中某些菌株引起腹泻、致病性强的, 且与人类疾病有关的, 统称为致泻大肠埃希菌, 一般包括 5 种, 肠产毒性大肠埃希菌 (*Enterotoxigenic E. coli*, ETEC) 是其中之一。ETEC 引发细菌性食物中毒, 国内各地均有报道^[1-5]。丰台区于 2013–2014 年肠道多病原监测中发现, 致泻大肠埃希菌是丰台区感染性腹泻主要的病原菌之一, 其中以 ETEC 的感染率最高。ETEC 引起患者腹泻, 多为轻度水泻, 亦可呈严重的霍乱样症状。致病毒素为不耐热肠毒素 (heat-labile toxin, LT) 和耐热性肠毒素 (heat-stable toxin, ST)。加强对食品中及感染性腹泻中分离的 ETEC 菌株的检测和监测, 了解丰台区 ETEC 菌株的分布和变异规律, 及时发现和甄别 ETEC 暴发疫情中的型别, 并及时溯源, 对于 ETEC 类腹泻疾病的防控具有较重要意义。

传统的细菌形态、血清型和噬菌体型等细菌分型方法已不能满足流行病学研究及疫情分析需要。1998 年, Achtman 等^[6] 提出多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST)。MLST 方法是针对管家基因

(house-keeping gene) 上存在的变异位点, 通过对等位基因片段 (allele) 核苷酸序列测定, 每一个等位基因位点被命名为相应的基因序号, 结合不同的等位基因位点的信息就构成了一个等位基因图谱 (allele profile), 被命名为序列型 (sequence type, ST)。应用软件对所有菌株的 ST 进行克隆株复合体 (clonal complex, CC), Groups 和 Singletons 的归类。本研究通过对 58 株菌进行了 MLST 序列分型, 现将分子分型及进化树分析等报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 北京市丰台区 2013–2015 年肠道门诊腹泻患者便标本分离鉴定并保存的 ETEC 分离株。

1.1.2 主要仪器与试剂 全自动细菌鉴定仪 Phoenix-100 购自美国 BD 公司; 实时荧光 PCR 仪 7500FAST 购自美国 ABI 公司; 普通 PCR 仪购自美国 ABI 公司; 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; 月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (LST) 肉汤增菌液, 伊红美蓝 (EMB) 和 MacConkey 琼脂培养基均购自北京路桥公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司; TaKaRa LA Taq[®], DL2000 DNA Marker, Premix Ex Taq[™] (Probe qPCR) 购自 Takara 公司; PCR 引物和产物纯化及测序由北京天一辉远生物科技有限公司完成。所有试剂在有效期内使用。

1.2 方法

基金项目: 北京市疾病预防控制中心食物中毒诊断溯源北京市重点实验室开放基金 (2015BZ0063-01); 北京市丰台区卫生计生系统科研项目 (2015-92)

作者简介: 余红 (1981–), 女, 河北任丘人, 硕士, 副高级检验师, 研究方向: 微生物检验。

通信作者: 陈倩, E-mail: cchenqian@263.net。

1.2.1 ETEC 菌株分离鉴定 对标本及时进行 ETEC 的分离培养,直接将标本接种于 LST 肉汤增菌液中,36 ℃±1 ℃培养 10~24 h,之后接种于 EMB 和 MacConkey 琼脂进行分离培养和生化鉴定。具体检测过程和质量控制参见《GB/T 4789.6-2003 食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希菌检验》和《感染性腹泻诊断标准 WS 271-2007》。采用实时荧光 PCR(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)鉴定,引物探针见表 1,反应条件和反应体系可参见相应的试剂盒说明。

表 1 ETEC 基因引物探针序列

引物名称	引物序列(5'-3')
lt-F	GTTGACTGCCCGGGACTTC
lt-R	CGGAATATCGCAACACACAAAT
lt-Probe	CCTGAAATGTTGGCGCGCTCTTAAATG
st-F	ACAGACATCATCAGAATCAGAACAAAT
st-R	AGTGGTCCTGAAAGCATGAATAGTAG
st-Probe	CACCCGGTACAAGCAGGATTACAACACA

1.2.2 DNA 模板的提取 根据细菌基因组提取试剂盒说明提取 ETEC 分离株的总核酸,-20 ℃冰箱保存备用。

1.2.3 PCR 扩增管家基因并双向测序 根据 *E. coli* MLST 数据库(<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>)提供的大肠杆菌 MLST 分型方案,选择 7 个管家基因 *adk*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA*、*recA*,PCR 引物序列、退火温度及产物大小于网站下载,见表 2。

表 2 MLST 的管家基因 PCR 引物序列、扩增产物大小和退火温度

管家基因	引物序列	片段大小(bp)	退火温度(℃)
<i>adkF</i>	5'-ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3'	583	54
<i>adkR</i>	5'-CGGTCAACTTTCGCGTATTT-3'		
<i>fumCR1</i>	5'-TCCCGGCAGATAAGCTGTGG-3'	806	54
<i>fumCF</i>	5'-TCACAGGTCCGCCAGCGCTTC-3'		
<i>fumCR</i>	5'-GTACGCACGCCGAAAGAAAGATTG-3'		
<i>gyrBF</i>	5'-TCGGCGACACGGATGACGGG-3'	911	60
<i>gyrBR1</i>	5'-GTCCATGTAGCGCTTACGGG-3'		
<i>gyrBR</i>	5'-ATCAGCGCTTACCGCGATC-3'		
<i>icdF</i>	5'-ATCGAAAGTAAAGTACTGTTCGGGCACA-3'	878	54
<i>icdR</i>	5'-GGACGCAGCAGCATCTGTT-3'		
<i>mdhF</i>	5'-ATGAAAGTCGAGTCTCGGCGCTGCTGGCGG-3'	932	60
<i>mdhR</i>	5'-TTAACGAACTCCTGCCACAGGCATATCTTCTT-3'		
<i>mdhF1</i>	5'-AGCGCGCTTCTGTTCAATGC-3'		
<i>mdhR1</i>	5'-CAGGTTCAAGAACTCTCTCTGT-3'		
<i>purAF1</i>	5'-TCGCTAACGCTGTCTGCTG-3'	816	54
<i>purAF</i>	5'-CGCGCTGATGAAAGAGATGA-3'		
<i>purAR</i>	5'-CATACGGTAAGCCACGCAGA-3'		
<i>recAR1</i>	5'-AGCGTGAAGGTAAACCTGTC-3'	780	58
<i>recAF</i>	5'-CGCATTCGCTTACCCCTGACC-3'		
<i>recAF1</i>	5'-ACCTTTGTAGCTGTACCAAG-3'		
<i>recAR</i>	5'-TCGTGCGAAATCTACGCACCGGA-3'		

PCR 反应采用 50 μl 体系,包括 10 μmol/L 的上下游引物各 2 μl,2 mmol/L dNTPs 2.5 μl,含 MgCl₂ 的 10 × PCR Buffer 5.0 μl,5 U/μl 的 La Taq DNA 聚合酶

0.5 μl,加双蒸水至 49 μl,模板 DNA 1.0 μl。PCR 反应条件为:预变性 95 ℃ 4 min;变性 94 ℃ 30 s,退火 45 s,延伸 72 ℃ 1 min,循环 30 次;72 ℃ 延伸 7 min。每次扩增均以无 DNA 模板的体系作为空白对照。取 PCR 产物 3 μl 以 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测,条带明亮唯一可测序。PCR 产物经纯化后,取 20 μl 用相应测序引物进行双向测序。

1.2.4 MLST 序列分析 用 Chromas 软件查看菌株等位基因的正反向序列图谱,通过 SeqMan 对等位基因序列进行拼接和校正,将校正后的序列在 *E. coli* MLST 数据库中进行比对,受试菌株序列与库中菌株序列相似性为 100%时,认为等位基因序列号相同。7 个管家基因序列号的组合即为该菌的 ST 型。利用 eBURST V 3 和 MEGA 5.0 软件,分析菌株之间的亲缘关系。

2 结果

2.1 ETEC 菌株分离情况 对 2013-2015 年肠道门诊收集腹泻患者的粪便标本进行 ETEC 分离鉴定。从 1 599 例腹泻病患者粪便标本中检出 ETEC 58 株,分离率为 3.6%(58/1 599)。

2.2 ETEC 分离株的 MLST 分型 2013-2015 年丰台区腹泻患者便标本 ETEC 分离株菌中,共得到 19 个 ST 型,部分分离株为相同序列型,其中序列型为 ST6010(11/58)和 ST94(11/58)比例较高,为优势型别菌株;其余有 ST6005(7/58)、ST226(6/58)、ST69(5/58)、ST6006(4/58)、ST6008(2/58),另外还有仅包括一株菌的序列型 ST218、ST3103、ST5057、ST6001、ST6002、ST6003、ST6004、ST6007、ST6009、ST6011、ST6012 和 ST6754。ST 型与菌株数量以及毒素基因型别之间的关系见图 1,ST 型与年份的分布图见图 2。

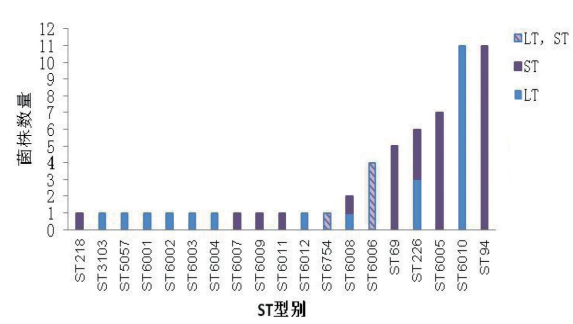


图 1 ST 型与菌株数量以及毒素基因之间的关系分布图

致病因素包括不耐热肠毒素 LT 或耐热性肠毒素 ST,或两者同时致病。ST6010 与 ST94 菌株数量最多均为 11 株,分别携带毒素 ST 和毒素 LT,另外,ST6005、ST69、ST6006 也对应单一的毒素型别。见图 1。

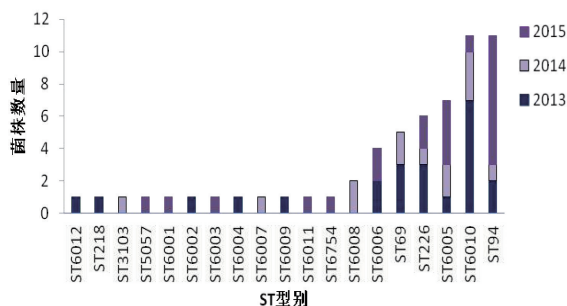


图 2 ST 型与年份的分布图

不同的 ST 型在不同年份菌株数量不同,随着时间菌株具有一定的遗传变化。其中,ST6010 与 ST94 二者具有菌株数目最多、不同年份的菌株都出现这两个 ST 型。见图 2。

2.3 ST 型的 eBURST 分析 应用 eBURST V 3 软件 <http://eburst.mlst.net/> 对 19 个 ST 型建立克隆谱系图谱,结果见图 3。实线相连的两个 ST 型相差 1 个管家基因,圆圈大小代表菌株个数,其中部分试验菌株形成 2 个 ST 克隆群,分别为 STC-6007 和 STC-3103,其中 STC-6007 包含了 5 个 ST 型,分别为 ST6006、ST6007、ST6008、ST6009 和 ST6010,共 19 株菌,STC-3103 包含了 2 个 ST 型,分别为 ST3103 和 ST5057,共 2 株菌。其余 ST 型的菌株单例,STC-6007 是最主要的 ST 克隆群,蓝圈 ST6007 为根据现有数据预测的 subgroup founder。多数菌株的遗传关系较远,由于丰台区处于北京市城市功能拓展区,是北京市流动人口相对集中的主要区域,根据这一区域特征,可能与菌株来源多样有关。

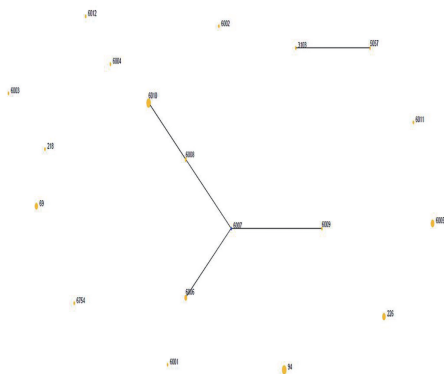


图 3 基于 MLST 数据 19 个 ST 型的 eBURST 分析结果图

2.4 基于 ST 代表株构建系统发生树 将 7 个管家基因的序列按顺序 (adk-fumC-gyrB-icd-mdh-purA-recA) 首尾拼接,利用 MEGA 5.0 软件,经 ClustalW 全局比对后,用邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统发生树,根据核苷酸的差异分析不同菌株间的亲缘关系。其中 STC-6007 属于同一个进化分支,与 eBURST 分析结果一致,并且与 ST218 和 ST226 亲缘关系较为接

近。见图 4。

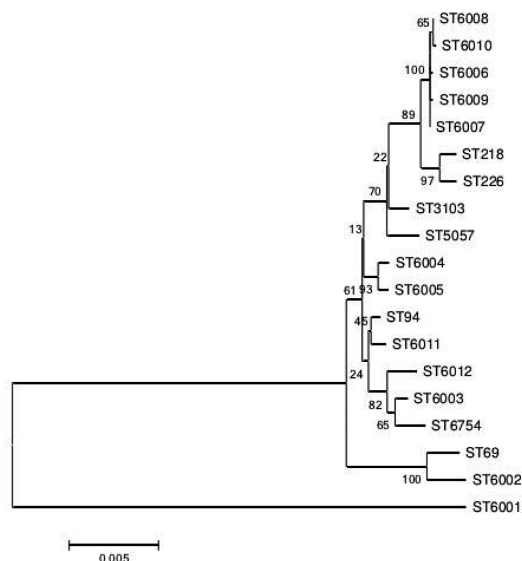


图 4 19 个 ST 型根据邻接法构建系统发生树图

3 讨论

由致泻大肠埃希菌引起的腹泻疾病近年来在多个国家都时有报道。2012 年丰台区开始致泻大肠埃希菌监测。2013-2015 年在腹泻患者粪便中检出 58 株 ETEC 菌株。为了有效的防止 ETEC 疫情的发生,必须及时了解丰台区 ETEC 病原体的分子流行病学状况,特别是菌株之间的遗传进化关系。

MLST 可以分析不同时间不同地区某一分离菌株的遗传相关性,因为直接利用所测定的管家基因的核苷酸序列进行组合分析,统一编码,测序技术有标准化流程,结果易于验证,可以跨实验室电子共享,数据重复性及可比性比较高^[7-8]。李红等^[9]、白向宁等^[10]对 EPEC 分离株、非 O157 产志贺毒素大肠杆菌分离株均采用大肠杆菌多位点序列分型数据库提供的 7 个管家基因,采用 SeqMan II、MEGA 5.05、eBURST V 3 等软件进行了 MLST 分型;王春晓等^[11]对 72 株分离自不同地域不同宿主的大肠埃希菌进行分型以及种系进化研究,并比较 MLST 和 PFGE 两种方法的差异,结果表明,MLST 的方法分辨率较高,适用于我国致泻大肠埃希菌长期流行菌株的进化分析。

本研究中 58 株 ETEC 具有 19 个 ST 序列型,根据 eBURST 和构建系统发生树分析结果,ST-6006、ST-6007、ST6009、ST6010 同属于 STC-6007,可能具有相同的进化祖先,并且处于同一进化分支上。而其他群在等位基因存在较多差异,其进化关系较远,具有较高的多样性,这与其他地区发表的大肠杆菌分型结果相同^[10]。ST6010 与 ST94 二者具有菌株数目最多、分别