



反刍动物产志贺毒素大肠杆菌的分离鉴定和致病潜力分析

胡夏佩¹, 王惠¹, 孔学维¹, 佟盼盼², 田睿³, 刘茂军³, 马勋⁴, 张海燕⁵, 张炜^{1*}

¹南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

²新疆农业大学动物医学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

³江苏省农业科学研究所, 江苏 南京 210014

⁴新疆石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832003

⁵芜湖职业技术学院生物工程学院, 安徽 芜湖 241003

摘要: 产志贺毒素大肠杆菌(*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC)是重要的食源性病原, 而 STEC 往往以正常菌群的形式存在于牛羊等反刍动物肠道。【目的】本研究对牛羊粪便样品中的 STEC 分离和鉴定并对分离株进行致病潜力分析。从江苏、云南和河北等地共分离到羊源 STEC 菌株 11 株, 牛源 STEC 菌株 1 株, 另新疆农业大学佟盼盼组馈赠牛源菌株 10 株。【方法】通过细菌选择培养及特异性基因 *stx1* 和 *stx2* 的检测进行分离鉴定; 并通过 Vero 细胞毒性试验、溶血活性试验和毒力因子的检测分析 STEC 分离株的致病潜力。【结果】分离到羊源分离株 11 株, 分离率 17.5% (11/63); 分离得到牛源分离株 1 株, 分离率 0.7% (1/134); 11 株羊源分离株中有 5 株对 Vero 细胞具有强的毒性, 3 株有溶血活性; 11 株牛源分离株中有 5 株对 Vero 细胞具有强的毒性, 3 株有溶血活性。11 株羊源 STEC 分离株 *eae* 基因携带率为 63.6% (7/11), 而 11 株牛源 STEC 分离株 *eae* 基因携带率仅为 9.0% (1/11)。【结论】结果表明羊源 STEC 菌株的分离率和致病潜力高于牛源菌株, 所以, 除牛外, 羊作为 STEC 菌株宿主也应该得到更多的重视。

关键词: 产志贺毒素大肠杆菌, Vero 细胞毒性, 毒力基因, 致病潜力, 溶血活性

产志贺毒素大肠埃希菌(*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC)是一类携带了通常由前噬菌体编码的一种或两种志贺毒素基因的新发高致病性食源性病原菌, 与人类腹泻、出血性结肠炎(hemorrhagic colitic, HC)以及高死亡率的溶血性

尿毒综合征(hemolytic uremic syndrome, HUS)等疾病有关^[1-2]。根据血清型不同, 分为 O157 STEC 和非 O157 STEC, O157:H7 是被一致认为是致病力和毒性较强的血清型^[3]。但近年来由非 O157 STEC 引起的散发感染或暴发逐渐增多^[4]。所以,

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1602500); 国家自然科学基金(U1803109); 安徽省高校优秀青年人才支持计划(gxyq2019201); 芜湖职业技术学院校级科技团队(wzykjtd202002)

*通信作者。Tel: +86-25-84395328; Fax: +86-25-84396517; E-mail: vszw@njau.edu.cn

收稿日期: 2020-10-10; 修回日期: 2020-12-18; 网络出版日期: 2021-05-17

各种来源的 STEC 均应受到重视。

STEC 宿主广泛, 现在的研究表明反刍动物特别是牛是 STEC 最主要宿主, 主要位于牛的肠道, 作为正常菌群的组分之一, 并不引起牛感染发病^[5]。人类往往通过食用被牛的排泄物直接或间接污染的食物和饮水而感染。STEC 感染难以控制的重要原因其具有极低的感染剂量(小于 100 个细胞)^[6-7]。1982 年, STEC O157:H7 通过被污染的牛肉在美国首次暴发, 引起 4 人死亡, 并且每年在美国引起腹泻疾病超过 96000 例和 3200 例住院患者^[8-9]。其后在日本等地都有发生, 1996 年, 在日本大阪也曾暴发流行 STEC, 其中感染人数多达 9000 余人, 9 人死亡^[10]。我国于 1999-2000 年在江苏等地暴发了人感染 O157:H7 血清型 STEC 大的疫情, 报告 HUS 患者 195 例, 其中死亡 177 例, 血清流行病学调查估计感染人数 20326 人^[11]。现有的研究主要集中在人, 对其贮藏宿主的研究相对较少, 相对来讲, 动物作为传染源更为重要, 它往往是动物来源食品污染的根源。而对储藏宿主的研究又主要集中在牛上, 1987 年, Borczyk 等首次发现牛是 STEC O157:H7 的储藏宿主^[12]。姜海清等于 2014 年江苏某奶牛场分离到 STEC 菌株, 通过 BALB/c 小鼠模型证明牛源 STEC 菌株有较强的致病性^[13], 羊在中国的饲养量也非常大, 2016 年, 羊肉在我国肉类产量中的比重 5.4%^[14]。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, 而我国这一方面的研究不多^[15], 有必要对我国健康绵羊体内 STEC 的携带情况及基本特征作进一步研究。

STEC 主要致病因子有志贺毒素、溶血素、黏附素及其他致病相关因子。志贺毒素(Shiga toxin)包括志贺毒素 1 (*Stx1*)和志贺毒素 2 (*Stx2*), 对 Vero 细胞和 Hela 细胞有一定的毒性, 分别由 *stx1* 和 *stx2*

编码^[16-17]。这两个毒素基因往往是 STEC 鉴定及毒力分型的重要靶点。并且, 不同的 *stx1* 和 *stx2* 的亚型有着不同的毒力。

本研究对 2018-2019 年从全国多点采样 197 份牛羊粪便样品, 通过特异性基因 *stx1* 和 *stx2* 分离鉴定 STEC, 本实验室分离到 11 株羊源 STEC 菌株, 1 株牛源 STEC 菌株, 10 株新疆牛源 STEC 菌株, 并对分离到的 STEC 菌株进行致病潜力分析, 旨在初步了解我国部分地区牛源羊源 STEC 菌株的流行情况及菌株特征, 为进一步针对性地预防人感染 STEC 的流行和暴发提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 病料来源: 63 份羊源粪便样品采集自江苏, 134 份牛源粪便样品采集于 2018-2019 年江苏、河北、云南等地。样品来源表格见表 1。

1.1.2 主要试剂: Luria-Bertani (LB)琼脂培养基; O157 显色培养基购自青岛海博生物技术有限公司; 绵羊血购自南京鼎思生物技术有限公司; 引物由南京擎科生物有限公司合成; ddH₂O、2×Rapid Taq Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司; Vero 细胞为本实验室保存; 48 孔细胞培养板购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 菌株: O157:H7 标准菌株 EDL933 (ATCC 43895); O157:H7 标准菌株 ATCC 43889; O157:H7 标准菌株 NCTC 12900。所有分离株信息见表 2。

1.2 STEC 菌株分离及 O157:H7 分离

1.2.1 STEC 的鉴别培养: STEC 菌株分离方法参考薛涛等的方法^[18]。取适量粪便样品接种于肉汤培养基中, 37 °C 增菌培养 12 h 左右。800 r/min

表 1. 样品来源表格
Table 1. Sample source form

Sample collection location	Animal species	Number of samples	Number of isolated strains
Jiangsu province	Sheep	63	11
Hebei province	Cow	10	0
Hebei province	Cow	10	0
Inner Mongolia Autonomous Region	Cow	6	0
Jiangsu province	Cow	30	0
Guangdong province	Cow	6	0
Hebei province	Cow	3	0
Shanxi province	Cow	7	0
Shandong province	Cow	10	0
Beijing	Cow	10	1
Guangdong province	Cow	10	0
Yunnan province	Cow	32	0

表 2. STEC 菌株信息情况表
Table 2. STEC strains information in the experiment

Strain number	Animal species	Source	Serotype	Strain number	Animal species	Source	Serotype
EC276	Sheep	Jiangsu	O157:H7	EC635	Cow	Xinjiang	O88
EC278	Sheep	Jiangsu	O157:H7	EC626	Cow	Xinjiang	O179:H8
EC275	Sheep	Jiangsu	—	EC631	Cow	Xinjiang	—
EC277	Sheep	Jiangsu	—	EC612	Cow	Beijing	—
EC274	Sheep	Jiangsu	—	EC632	Cow	Xinjiang	—
EC279	Sheep	Jiangsu	—	EC636	Cow	Xinjiang	—
EC280	Sheep	Jiangsu	—	EC149	Cow	Xinjiang	—
EC281	Sheep	Jiangsu	—	EC150	Cow	Xinjiang	—
EC282	Sheep	Jiangsu	—	EC622	Cow	Xinjiang	—
EC283	Sheep	Jiangsu	—	EC625	Cow	Xinjiang	—
EC284	Sheep	Jiangsu	—	EC623	Cow	Xinjiang	—

离心 2 min 去除杂质, 取上清作为模板检测 STEC 特异性基因 *stx1* 和 *stx2*, 对 *stx1* 或 *stx2* 阳性的肉汤培养液, 划线接种于 O157 显色培养基, 放 37 °C 恒温培养箱静置培养 18–24 h。

1.2.2 PCR 鉴定; 挑取 O157 显色平板上的紫红色菌落和蓝色菌落各 5–10 个于 LB 中, 37 °C、220 r/min 振荡培养 18–24 h, 鉴定 *stx1* 和 *stx2* 基因确定是否为 STEC, 再鉴定 O157:H7 特异性鉴定基因 Z3276 基因确定是否为 O157:H7 血清型。PCR 阳性样品再送测序进行确认。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。PCR 产物由苏州金唯智公司测序, 引物由南京擎科生物有限公司合成。

1.3 志贺毒素基因亚型分析

志贺毒素基因(*stx1/stx2*)亚型分析采用 PCR 分型方法^[19], 引物序列及反应条件见表 3。挑选部分菌株进行 *stx1/stx2* 全长扩增与测序, 与 GenBank 数据库中收录的 *stx1/stx2* 序列进行 BLAST 比对, 验证 PCR 分型结果。

表 3. 引物序列
Table 3. Primer sequence

Identification primer	Primer sequence	Product size/bp	Annealing temperature/°C	References
<i>stx1</i>	GAGCGAAATAATTTATATGTG TTGATGATGGCAATTCAGTAT	504		[18]
<i>stx2</i>	CCATGACAACGGACAGCAGTT CCTGTCAACTGAGCACTTTGC	627		[18]
<i>z3276</i>	CGCGGATCCTTTAGTAAAAGTGTC GGCAAGCTTAATCGTATTCACGTT	1035		[18]
Stx gene subtype				
<i>stx1a</i>	CTCTTTCCAGGACAACAGCGGTT GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG	478	64	[19]
<i>stx1c</i>	CCTTTCCTGGTACAACCTGCGGTT CAAGTGTGTACGAAATCCCCTCTGA	252	64	[19]
<i>stx1d</i>	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	203	64	[19]
<i>stx2a</i>	GCGATACTGRGBACTGTGGCC CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG GCCACCTTCACTGTGAATGTG	349	64	[19]
<i>stx2b</i>	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC CAGCAAATCCTGAACCTGACG	251	64	[19]
<i>stx2c</i>	GAAAGTCACAGTTTTTATATAACAACGGGTA CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA	177	64	[19]
<i>stx2d</i>	AAARTCACAGTCTTTATATAACAACGGGTG TTYCCGGCCACTTTTACTGTG GCCTGATGCACAGGTACTGGAC	179	69	[19]
<i>stx2e</i>	CGGAGTATCGGGGAGAGGC CTTCTGACACCTTACAGTAAAGGT	411	64	[19]
<i>stx2f</i>	TGGGCGTCATTCACTGGTTG TAATGGCCGCCCTGTCTCC	424	64	[19]
<i>stx2g</i>	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC GATGGCAATTCAGAATAACCGCT	573	60	[19]
Virulence gene				
<i>eae</i>	TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	482	57	[20]
<i>rfbE</i>	AATTGAAGATTGCGCTGAAGCCTTTG GAGTACATTGGCATCGTGTGGACAG	507	55	[20]
<i>efal</i>	GAGACTGCCAGAGAAAG GGTATTGTTGCATGTTTCCAG	479	51	[20]
<i>saa</i>	CGTGATGAACAGGCTATTGC ATGGACATGCCTGTGGCAAC	119	52	[20]
<i>tox B</i>	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA TTCTTACCTGATCTGATGCAGC	602	55	[20]
<i>ehxA</i>	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG TCTCGCTGATAGTGTGTTGGTA	1551	57	[20]
<i>ast A</i>	CCATCAACACAGTATAATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111	55	[20]
<i>subA</i>	TATGGCTTCCCTCATTGCC TATAGCTGTTGCTTCTGACG	556	60	[20]
<i>katP</i>	CTTCTGTTCTGATTCTTCTGG AACTTATTTCTCGCATCATCC	2125	56	[20]
<i>paa</i>	ATGAGGAAACATAATGGCAGG TCTGGTCAGGTCGTCAATAC	350	60	[20]

1.4 毒力基因及黏附相关基因检测

采用 PCR 方法对所有 22 株 STEC 菌株进行黏附相关基因 *iha efaI saa paa eibG*、毒力相关基因 *astA subA katP toxB* 和溶血相关基因 *ehxA hly* 检测。引物及其反应条件详见表 3^[20]。

1.5 细胞模型和溶血性评价 STEC 菌株毒力

通过对 Vero 细胞的细胞毒性检测和溶血活性的检测共同评定 STEC 菌株的毒力大小。产志贺毒素大肠杆菌能够产生一种毒素使 Vero 细胞发生病变, 这种毒素也称为 Vero 细胞毒素, Vero 细胞毒性实验可判定 STEC 志贺毒素生物活性的强弱^[21], 也是判断产志贺毒素大肠杆菌志贺毒素活性的一种金标准^[22]。对 Vero 细胞的细胞毒性检测: 挑单菌接种于 LB 培养基中, 培养 12 h, 12000 r/min 离心 8 min, 取上清液以 0.22 μm 滤器过滤除菌。所获得的无菌上清液将用于 Vero 细胞毒性测定。Vero 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的细胞营养液 DMEM 中, 铺于 48 孔细胞板中, 放置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件培养箱中培养。待细胞铺满, 用 PBS 洗 3 次, 用 DMEM 培养液以 1:4 稀释度稀释细菌上清液, 加入细胞孔中, 标准株 O157:H7EDL933 为阳性对照, DH5 α 为阴性对照。18、36、48 h 用倒置显微镜观察收集结果, 并根据出现细胞病变时间与细胞病变程度评出 4、3、2 和 1 分。每株菌做 3 次重复实验。溶血活性实验: 根据溶血环大小, 将溶血活性分为 3、2 和 1 分。每株菌做 3 次重复实验。

2 结果和分析

2.1 样品中的细菌分离鉴定结果

63 份羊粪便样品分离到 11 株羊源 STEC 菌株, 分离率 17.5%; 其中 2 株为 O157:H7 血清型。

128 份牛粪便样品分离到 1 株牛源 STEC 菌株。O157 显色培养基的结果见图 1, 部分 PCR 鉴定结果见图 2 和图 3。

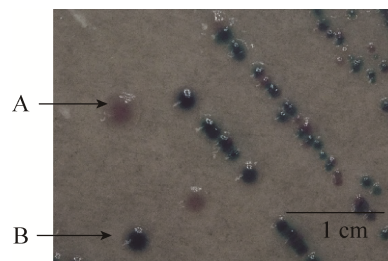


图 1. 用 O157 显色培养基分离 STEC 菌株图

Figure 1. The image of STEC strain isolated with O157 chromogenic medium. A: suspected as O157: H7; B: non-O157 STEC.

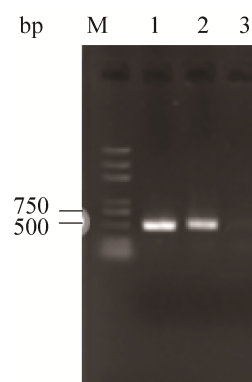


图 2. 部分菌株的 *stx1* 基因鉴定结果

Figure 2. Identification results of *stx1* gene of some strains. M: DNA standard DL2000 PLUS; cane 1: EC276; cane 2: EC278; cane 3: control.

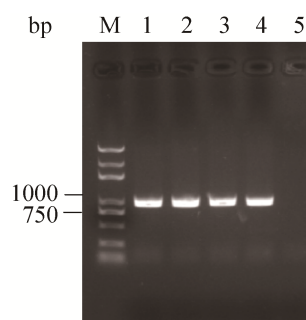


图 3. Z3276 基因鉴定结果

Figure 3. Z3276 gene identification results. M: DNA standard DL2000; cane 1: ATCC 43895; cane 2: ATCC 43889; cane 3: EC276; cane 4: EC278; cane 5: control.

2.2 志贺毒素基因亚型结果

11 株羊源 STEC 分离株: 11 株都携带 *stx1* 基因, 其中 *stx1a* 亚型 1 株, *stx1c* 亚型 2 株, *stx1d* 亚型 2 株, 其余为不确定型(ONT); 9 株携带 *stx2* 基因, 其中 *stx2a* 亚型 1 株, *stx2b* 亚型 1 株, *stx2c* 亚型 3 株, 其余为不确定型(ONT)。11 株牛源 STEC 分离株: 8 株携带 *stx1* 基因, 其中 *stx1a* 亚型 4 株, *stx1d* 亚型 2 株, 其余为不确定型(ONT); 7 株携带 *stx2* 基因, 其中 *stx2a* 亚型 4 株, 其余为不确定型(ONT)。

2.3 毒力基因及黏附相关基因检测

11 株羊源 STEC 分离株 *eae* 基因携带率为 63.6% (7/11), 而 11 株牛源 STEC 分离株 *eae* 基因携带率仅为 9.0% (1/11)。11 株羊源 STEC 分离株:

其他的黏附基因 *saa*、*paa*、*iha*、*efal* 和 *eibG* 携带率分别为 0 (0/11)、9.0% (1/11)、45.5% (5/11)、36.4% (4/11)和 0% (0/11)。毒力相关基因 *astA*、*subA*、*katP* 和 *toxB* 携带率分别为 9.0% (1/ 11)、0 (0/ 11)、45.5% (5/11)和 27.3% (3/11)。溶血基因 *ehxA* 和 *hly* 携带率分别为 63.6% (7/11)和 54.5% (6/11)。

11 株牛源 STEC 分离株: 其他的黏附基因 *saa*、*paa*、*iha*、*efal* 和 *eibG* 携带率分别为 0 (0/11)、0 (0/11)、45.5% (5/11)、0 (0/11)和 0 (0/11)。毒力相关基因 *astA*、*subA*、*katP* 和 *toxB* 携带率分别为 9.0% (1/11)、18.2% (2/11)、0 (0/11)和 0 (0/11)。溶血基因 *ehxA* 和 *hly* 携带率分别为 81.8% (9/11)和 45.5% (5/11)。

2.4 STEC 菌株 Vero 细胞毒性和溶血活性强弱评定

STEC 菌株的 Vero 细胞毒性检测结果见图 4,

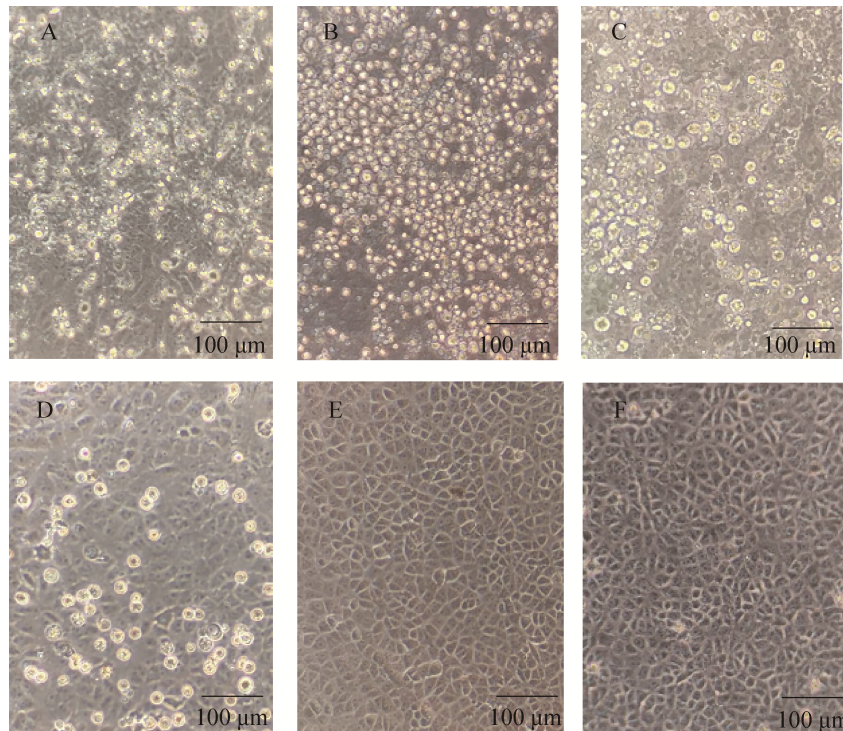


图 4. Vero 细胞接种细菌滤液后 36 h 病变图

Figure 4. The cytopathic effect of Vero cells after inoculating bacterial filtrate and normal cells. A: ATCC 43985; B: EC282; C: EC283; D: EC276; E: DH5 α ; F: control.

阳性对照(ATCC 43985)的 Vero 细胞形态变圆皱缩, 之后逐渐死亡, 阴性对照(DH5 α) Vero 细胞形态正常。部分 STEC 分离株出现不同程度的变圆皱缩和死亡现象, 且出现细胞死亡时间不同, 据此得出评分结果, 见表 4。羊源 STEC 分离株中有

Vero 细胞毒性的有 EC276、EC278、EC281、EC282、EC283、EC281。牛源 STEC 分离株中有 Vero 细胞毒性的有 EC626、EC635、EC623、EC622、EC636。溶血活性检测结果见图 5。结果可见, 部分 STEC 菌株有溶血环, 且溶血环大小不一, 部

表 4. STEC 溶血活性和 vero 细胞毒作用评分

Table 4. STEC hemolytic activity and vero cytotoxicity score

Original number	Hemolytic activity			Cytotoxicity		
	First repeat	Repeat two	Repeat three	16 h	32 h	48 h
ATCC 43895	4	4	4	0	0	0
EC276	0	0	0	2	2	3
EC278	1	1	1	3	3	4
EC275	1	1	1	0	0	0
EC277	0	0	0	0	0	0
EC274	0	0	0	0	0	0
EC279	0	0	0	0	0	0
EC280	0	0	0	0	0	0
EC281	2	2	2	1	1	1
EC282	0	0	0	4	4	4
EC283	0	0	0	3	3	3
EC284	0	0	0	0	0	0
EC612	0	0	0	0	0	0
EC625	0	0	0	0	0	1
EC635	1	2	1	3	3	4
EC626	0	0	0	3	3	4
EC148	0	0	0	0	0	0
EC149	0	0	0	0	0	0
EC631	0	0	0	0	0	0
EC623	1	2	1	2	3	4
EC622	1	1	1	2	2	4
EC632	0	0	0	0	0	0
EC636	0	0	0	1	1	1
DH5 α	0	0	0	0	0	0

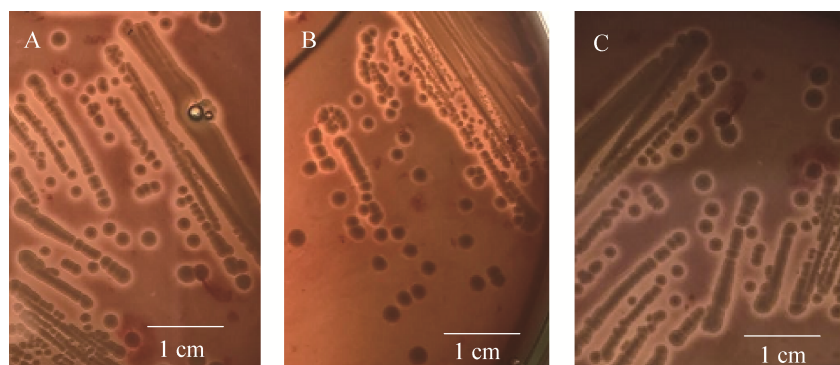


图 5. 细菌划线接种血平板 12 h 溶血图片

Figure 5. The hemolytic effect of blood plate after inoculating bacterial. A: EC281; B: EC278; C: EC275.

分菌株不溶血, 根据溶血环大小进行 3、2、1 和 0 的评分。羊源 STEC 分离株中有溶血活性的有 EC278、EC275、EC281; 牛源 STEC 分离株中有溶血活性的有 EC623、EC622、EC635。综合评分 4 分以上认为是致病潜力较强的菌株, 致病潜力较强的菌株有 EC278、EC282、EC635。

3 讨论

本研究从 197 份牛羊粪便样品中分离到 12 株 STEC 菌株, 另有 10 株牛源分离株来自新疆, 并通过 Vero 细胞毒性试验、溶血活性试验和毒力因子的检测分析 STEC 分离株的致病潜力大小。

薛涛等在江苏部分地区牛场分离 STEC 菌株, 696 份粪便样品分离到 77 株 STEC, 分离率为 11.1%^[18]。本实验于 2018–2019 年江苏、河北、云南等多地采集 134 份牛源粪便样品, 仅分离到 1 株 STEC 菌株, 分离率 0.7%。有研究者对江苏健康绵羊 STEC 菌株进行研究, 550 份绵羊粪便样品分离到 109 株 STEC 菌株, 分离率为 19.8%^[19]。本研究在江苏句容采集 63 份健康绵羊粪便样品分离到 11 株 STEC 菌株, 分离率为 17.5%。以上这些研究提示, 在江苏地区, 羊源 STEC 的分离率高于牛源分离率。2020 年有研究报道在新疆阿克苏地区某羊养殖场中 STEC 分离率达到(9/21) 42.86%, 分离率较高^[22]。根据以往研究, 牛被公认为 STEC 主要宿主, 对 STEC 菌株的分离多集中于牛源。但近年来关于羊源 STEC 菌株分离率较高, 提示绵羊作为 STEC 的储藏宿主, 对其的研究应引起重视。

西班牙、德国、澳大利亚多项对 HUS 病人的调查, 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%^[23–24], 11 株羊源 STEC 分离株 *eae* 基因携带率为 63.6% (7/11)。2019 年 Ferhat 等的研究报道, 在阿尔及尔市的 363 个绵羊样本, *eae* 基因的阳性率 18.9%^[25]。Zaheri 等的研究中报道 72 个绵羊山羊粪便样本中 *eae* 基因的阳性率为 0^[26]。郑晓风等报道新疆阿克苏地区羊源 STEC 菌株中 *eae* 基因的阳性率 4.7%^[27]。张凌等报道新疆地区羔羊源 STEC 菌株中 *eae* 基因的阳性率 0^[28]。刘英玉等报道新疆库尔勒地区羊源产志贺毒素大肠杆菌中 *eae* 基因的阳性率 5.5%^[29]。本实验中 STEC 分离株中 *eae* 基因的阳性率也远高于之前研究报道的分离率, 也高于近几年国内外羊源 STEC 菌株 *eae* 基因的阳性率。提示这些羊源 STEC 菌株一旦传播给人, 可能引起严重的疾病。应通过定期检测动物粪便样本, 及时治疗, 及时应对, 避免传播到人类。

stx1+stx2 基因型占的比例最多(81.8%), *stx1*、*stx2* 基因型分别占 18.2%、0%。与郑晓风等新疆地区羊 STEC 菌株相比, *stx1+stx2* 基因型比例提高将近一倍^[27]。与刘英玉等新疆库尔勒地区羊源 STEC *stx1+stx2* 基因型比例 35.5%相比, 显著提高^[29]。*stx1* 和 *stx2* 基因的共表达可增强 STEC 的毒力^[30], 也提示了本批羊源 STEC 菌株致病潜力较大。

通过 *stx1/ stx2* 基因及亚型的检测, 共检测出 *stx1a*、*stx1c*、*stx1d*、*stx2a*、*stx2b*、*stx2c* 等亚型。研究报道, *stx2a*、*stx2d* 和 *stx2c* 等 *stx2* 亚型菌株具有较高的毒力^[24]。11 株羊源 STEC 分离株中 *stx2a* 亚型 1 株、*stx2c* 亚型 3 株, 11 株牛源 STEC 分离株中 *stx2a* 亚型 4 株。提示本实验室的分离株具有较大的致病潜力, 且牛源羊源携带高毒力亚型的比率相等。提示羊源菌株的致病潜力不亚于牛源菌株。

本实验分离到的 11 株羊源 STEC 菌株, 其中 2 株经 O157:H7 特异性鉴定基因 Z3276 基因鉴定为 O157:H7 血清型。O157:H7 血清型 STEC 菌株一直以来危害最为严重, 毒性最强。对 Vero 细胞的毒性结果显示, 11 株羊源分离株中有 5 株 (EC276、EC278、EC281、EC282、EC283)、牛源分离株中也有 5 株 (EC626、EC635、EC623、EC622、EC636) 对 Vero 细胞有一定的毒性。能使 Vero 细胞变圆皱缩, 之后逐渐死亡, 且程度不同。溶血实验结果显示, 11 株羊源 STEC 菌株中有 3 株 (EC275、EC278、EC281)、牛源 STEC 分离株中也有 3 株 (EC623、EC622、EC635) 有溶血活性。在对 Vero 细胞的细胞毒性检测和溶血活性等方面来看, 牛源羊源菌株的致病潜力相当。STEC 菌株引起人发病, 并不引起牛羊等动物发病。只有小鼠作为模型模拟人的发病, 但小鼠并非理想的动物模型, 由于小鼠肠道内大量繁殖革兰氏阳性厌氧菌^[25], 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^[25-26]。小鼠的肠道感染情况与人类的肠道感染情况相差较大, 所以小鼠模型不能准确反应对人类的致病性, 未做动物实验。

综上所述, 从分离率、毒力基因、亚型分析、对 Vero 细胞的细胞毒性检测和溶血活性等方面综合来看, 提示本研究从健康绵羊分离的 STEC 菌株致病潜力较大。以往忽略对健康动物在食品安全中的威胁, 现如今应重视绵羊作为宿主在 STEC 流行中的影响。其他反刍动物如鹿等的 STEC 研究也可以开展。

参考文献

- [1] Grisaru S, Xie JL, Samuel S, Hartling L, Tarr PI, Schnadower D, Freedman SB, for the Alberta Provincial Pediatric Enteric Infection Team. Associations between hydration status, intravenous fluid administration, and outcomes of patients infected with shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *JAMA Pediatrics*, 2017, 171(1): 68.
- [2] Purwar S, Roy S, Metgud S. Non-O157: H7 shiga toxin producing diarrhoeagenic *Escherichia coli* (STEC) in southern India: a tinderbox for starting epidemic. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2016, 10(10): DC11-DC15.
- [3] Doorduyn Y, de Jager CM, van der Zwaluw WK, Friesema IHM, Heuvelink AE, de Boer E, Wannet WJB, van Duynhoven YTHP. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157 outbreak, The Netherlands, September-October 2005. *Euro Surveillance*, 2006, 11(7): 182-185.
- [4] Coombes BK, Wickham ME, Mascarenhas M, Gruenheid S, Finlay BB, Karmali MA. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(7): 2153-2160.
- [5] Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*, 2007, 85(suppl_13): E45-E62.
- [6] Hussein HS, Sakuma T. Invited review: prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(2): 450-465.
- [7] Varma JK, Greene KD, Reller ME, DeLong SM, Trottier J, Nowicki SF, DiOrio M, Koch EM, Bannerman TL, York ST, Lambert-Fair MA, Wells JG, Mead PS. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA*, 2003, 290(20): 2709-2712.
- [8] Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 2005, 11(4): 603-609.
- [9] Friesema I, Sigmundsdottir G, van der Zwaluw K, Heuvelink A, Schimmer B, de Jager C, Rump B, Briem H, Hardardottir H, Atladottir A, Gudmundsdottir E, van Pelt W. An international outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, September-October 2007. *Eurosurveillance*, 2008, 13(50): 19065.
- [10] Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K, Tamura K. Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 infection by two different genotype strains in Japan, 1996. *Lancet*, 1996, 348(9030): 831-832.
- [11] Xiong YW, Wang P, Lan RT, Ye CY, Wang H, Ren J, Jing HQ, Wang YT, Zhou ZM, Bai XM, Cui ZG, Luo X, Zhao AL,

- Wang Y, Zhang SM, Sun H, Wang L, Xu JG. A novel *Escherichia coli* O157: H7 clone causing a major hemolytic uremic syndrome outbreak in China. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e36144.
- [12] Borczyk AA, Karmali MA, Lior H, Duncan LM. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7. *Lancet*, 1987, 1(8524): 98.
- [13] 姜海清. 江苏某奶牛场产志贺毒素大肠杆菌的分子流行病学与遗传相关性分析研究. 扬州大学硕士学位论文, 2015.
- [14] 赵印, 杜立新, 刘强德. 2017年中国羊产业发展报告与发展预测. 第十五届(2018)中国羊业发展大会论文集. 兰考, 2018: 8–17.
- [15] 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.
- [16] Liu F, Song DZ, Li J, Yu XH. Research progress on shiga toxin-producing *Escherichia coli* epidemiology and virulence factors. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(1): 187–191. (in Chinese)
刘飞, 宋定州, 李键, 于学辉. 产志贺毒素大肠杆菌的流行病学及致病因子的研究进展. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(1): 187–191.
- [17] Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998, 11(3): 450–479.
- [18] Xue T, Gu CC, Gao S, Jiao XA, Zhou Q, Zhang WJ, Liu XF. Identification of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in one farm of Jiangsu province and their pathogenicity on mice. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2011, 42(6): 830–837. (in Chinese)
薛涛, 顾丛丛, 高崧, 焦新安, 周琼, 张文俊, 刘秀梵. 江苏某奶牛场健康奶牛体内产志贺毒素大肠杆菌的分离鉴定及其对小鼠致病性的研究. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(6): 830–837.
- [19] Bettelheim KA, Beutin L. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(2): 205–217.
- [20] Gu CC, Xue T, Xu TT, Gao S, Jiao XA, Liu XF. Epidemiological investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates originated from healthy sheep in one farm of Jiangsu province and their pathogenicity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(5): 676–683. (in Chinese)
顾丛丛, 薛涛, 徐婷婷, 高崧, 焦新安, 刘秀梵. 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. *微生物学报*, 2011, 51(5): 676–683.
- [21] Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 1977, 18(3): 775–779.
- [22] 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(2): 903–905.
- [23] 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, 14(11): 1803–1806.
- [24] Dong HJ, Lee S, Kim W, An JU, Kim J, Kim D, Cho S. Prevalence, virulence potential, and pulsed-field gel electrophoresis profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from cattle. *Gut Pathogens*, 2017, 9: 22.
- [25] 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 verotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H-in mitomycin-treated mice. *Infection and Immunity*, 1994, 62(8): 3447–3453.
- [26] Sun Y, Liu J, Feng SZ, Gao F, Guo XJ, Chang GQ. Mouse model for infectious disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Laboratory Animal Science and Administration*, 2003, 20(4): 6–9. (in Chinese)
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*, 2003, 20(4): 6–9.
- [27] Zheng XF, Zhang Y, Liu YY, Zhu MY, Zheng XQ, Lu W, Jiang JD, Zhu MH. Detection and analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cattle and sheep sources in some regions of Xinjiang, China. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 51(10): 2518–2527. (in Chinese)
郑晓风, 张妍, 刘英玉, 朱明月, 郑晓琴, 卢玮, 蒋金豆, 朱梦含. 新疆部分地区牛羊源产志贺毒素大肠埃希菌菌株检测与分析. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(10): 2518–2527.
- [28] Zhang L, Tong PP, Zhang Y, Ma XY, Zhang MM, Liu LY, Yao G, Chen TJY, Su ZQ. Analysis of drug resistance, virulence genes and serotypes of STEC in a large-scale sheep farm in Xinjiang. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2020, 57(10): 1921–1930. (in Chinese)
张凌, 佟盼盼, 张毅, 马晓玉, 张萌萌, 刘璐瑶, 姚刚, 陈童锦悦, 苏战强. 羔羊 STEC 的耐药性、毒力基因和血清型分析. *新疆农业科学*, 2020, 57(10): 1921–1930.
- [29] Liu YY, Zhu MY, Su XY, Xu L, Liu JF, Zheng XF, Zhang Y, Zheng XQ. The origin of sheep in Xinjiang Korla region Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its drug resistance analysis. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2020, 22(5): 122–128. (in Chinese)
刘英玉, 朱明月, 苏晓月, 胥兰, 刘俊飞, 郑晓风, 张妍, 郑晓琴. 新疆库车地区羊源产志贺毒素大肠杆菌及其耐药性分析. *中国农业科技导报*, 2020, 22(5): 122–128.
- [30] Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H. *Escherichia coli* harboring shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 185(1): 74–84.

Isolation, identification and pathogenic potential analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia* from ruminants

Xiapei Hu¹, Hui Wang¹, Xuewei Kong¹, Panpan Tong², Rui Tian³, Maojun Liu³, Xun Ma⁴, Haiyan Zhang⁵, Wei Zhang^{1*}

¹ College of Animal Medical, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

² College of Animal Medical, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

³ Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China

⁴ College of Animal Technology, Xinjiang Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

⁵ School of Bioengineering, Wuhu Vocational and Technical College, Wuhu 241003, Anhui Province, China

Abstract: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an important food-borne pathogen, which often exists in the intestines of ruminants, such as cow and sheep, as normal flora. **[Objective]** In this study, we isolated and identified Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cow and sheep feces samples, and analyzed their pathogenic potentials. Totally 11 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheeps and 1 isolate from cattle were isolated from Jiangsu, Yunnan, and Hebei, and another 10 isolates of STEC from cattle were donated by Tong Pan Group of Xinjiang Agricultural University. **[Methods]** We conducted the separation and identification through bacterial selective culture and detection of specific genes *stx1* and *stx2*. We analyzed the pathogenic potential of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates by Vero cytotoxicity test, hemolytic activity test, and toxin factor detection. **[Results]** In this study, the separation and identification result revealed that 11 isolates of sheep origin were isolated with an isolation rate of 17.5% (11/63); 1 isolate from cow origin was isolated with an isolation rate of 0.7% (1/134). The pathogenic potential results showed that, among the 11 sheep-derived isolates, 5 of them had strong toxicity to Vero cells, and 3 had hemolytic activity. Among the 11 cow-derived isolates, 5 had strong toxicity to Vero cells, and 3 had hemolytic activity. The *eae* gene carrying rate of the 11 sheep-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates was 63.6% (7/11), while the *eae* gene carrying rate of the cow-derived 11 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates was only 9.0% (1/11). **[Conclusion]** The results indicated that the isolation rate and pathogenic potential of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains derived from sheep were higher than the strains of cow origin. Therefore, sheep, as the host of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains, should be paid higher attention than cow.

Keywords: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Vero cytotoxicity, virulence gene, pathogenicity, hemolytic activity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1602500), by the National Natural Science Foundation of China (U1803109), by the Anhui Province University Outstanding Young Talents Support Program (gxyq2019201) and by the School-level Technology Team of Wuhu Vocational and Technical College (wzykjtd202002)

*Corresponding author. Tel: +86-25-84395328; Fax: +86-25-84396517; E-mail: vszw@njau.edu.cn

Received: 10 October 2020; Revised: 18 December 2020; Published online: 17 May 2021