

## 1 株沙门样大肠埃希菌的分离与鉴定

吴静怡, 刘拴奎, 刘 然, 董路宁, 李 明, 党荣理  
(新疆军区疾病预防控制中心, 新疆 乌鲁木齐 830011)

**[摘要]** **目的** 对 1 株与沙门菌抗血清发生交叉凝集的肠道菌分离株进行鉴定。**方法** 分别通过生化培养、抗血清凝集试验与 16S rRNA 序列比对分析, 对该菌株进行鉴定。**结果** 该菌株的分离培养、生化代谢特征均与大肠埃希菌一致, 但能与沙门菌属多型、群特异性抗血清发生凝集, 与大肠埃希菌抗血清无凝集反应。序列分析结果表明, 该菌株 16S rRNA 与大肠埃希菌一致, 与沙门菌属存在明显差异。**结论** 本实验分离获得 1 株具有沙门菌血清凝集特征的大肠埃希菌。

**[关键词]** 大肠埃希菌; 沙门菌属; 交叉凝集; 16S rRNA

**[中图分类号]** R378.2<sup>+</sup>1 R378.2<sup>+</sup>2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)02-0100-04

### Isolation and identification of one *Salmonella*-like *Escherichia coli* isolate

WU Jing-yi, LIU Shuan-kui, LIU Ran, DONG Lu-ning, LI Ming, DANG Rong-li (Center for Disease Prevention and Control Affiliated with Xinjiang Military Command Region, Urumuqi 830011, China)

**[Abstract]** **Objective** To identify and characterize one Enterobacteriaceae isolate which could cross-agglutinate with *Salmonella* diagnostic anti-serum. **Methods** Phenotype and genotype of the isolate were determined by culture, metabolic assay, agglutination reaction, and 16S rRNA sequence phylogenetic analysis, respectively. **Results** The isolate was consistent with *Escherichia coli* on culture and biochemical features, but could cross-agglutinate with multiple types or group-specific *Salmonella* anti-serum rather than *Escherichia coli* anti-serum. 16S rRNA sequence analysis revealed that the isolate was identical with *Escherichia coli*, but was obviously different from *Salmonella* spp. **Conclusion** One *Escherichia coli* isolate which can cross-agglutinate with *Salmonella* diagnostic anti-serum has been obtained in this study.

**[Key words]** *Escherichia coli*; *Salmonella* spp.; cross-agglutination; 16S rRNA

[Chin Infect Control, 2012, 11(2): 100-103]

肠杆菌科细菌是一大群代谢类型近似的革兰阴性杆菌, 广泛存在于人、畜肠道和自然环境中。多数肠杆菌具有条件致病性, 通常引起人类肠胃炎、痢疾等腹泻样疾病。其中以致病性大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*)、志贺菌属 (*Shigella* spp.) 和沙门菌属 (*Salmonella* spp.) 最为常见。通过血清凝集试验判别菌体表面的脂多糖 O 抗原与鞭毛 H 抗原种类仍是细菌鉴定的重要手段和依据。目前已知 H 抗原与 O 抗原种类繁多 (H1~H56, O1~O181), 血清型已逾千余种<sup>[1]</sup>。在常规检验工作中, 常见血清

的交叉凝集现象<sup>[2-3]</sup>可导致漏检、错检。

在对乌鲁木齐市腹泻病原菌流行病学调查过程中, 本中心分离获得 1 株与沙门菌抗血清呈交叉凝集的肠道菌株<sup>[4]</sup>, 通过常规生化培养与菌体 16S rRNA 序列分析相结合的方法, 完成了对该菌株的鉴定。现报告如下。

### 1 材料与方法

1.1 菌株来源 实验菌株由本实验室从腹泻患者

[收稿日期] 2011-08-12

[基金项目] 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治项目 (2009ZX10004-205)

[作者简介] 吴静怡 (1980-), 女 (汉族), 湖北省应山县人, 主治医师, 主要从事病原微生物检验研究。

[通讯作者] 党荣理 E-mail: dz4343@sina.com

粪便标本中分离获得,编号为 B54V。

1.2 培养基与试剂 沙门志贺选择性琼脂(*Salmonella Shigella* Agar,SS)、麦康凯琼脂(MacConkey Agar,MAC)、伊红美蓝琼脂(Eosin Methylene Blue Agar,EMB)、克氏双糖铁琼脂(Kligler Iron Agar,KIA)、V-P 试剂均购自北京陆桥公司;59 种沙门菌诊断血清和 4 种 EPEC 诊断血清为卫生部兰州生物制品研究所产品;API20E 生化板条为法国生物梅里埃公司(BioMerieux Company)产品。

1.3 菌株分离与初步生化鉴定 粪便标本分别划线接种于 SS、MAC、EMB 琼脂平板,37℃ 培养 24 h 观察菌落形态;挑取 2 个以上典型或可疑菌落,接种 KIA 和 V-P 半固体琼脂,37℃ 培养 24 h 后观察结果。

1.4 血清凝集试验 用专用滴管于洁净玻片上滴加 1 滴血清,取被检菌少许与血清混匀,1 min 内肉眼判断结果,并以生理盐水溶液作对照。

1.5 菌体 RNA 抽提 取待检菌株接种于 LB 培养基,振荡培养 12 h。收集 5 mL 菌悬液,3 000 r/min 离心 5 min 获得菌体沉淀,重悬于 3 mL 灭菌 Tris-HCl 溶液(0.1 mol/L, pH 7.8)。重复上步离心重悬操作一遍。按照说明书方法采用 TriZOL™ 试剂对菌体总核酸进行抽提与乙醇沉淀。最终获得的核酸沉淀溶于 40 μL DEPC 处理的去离子水,通过 1% (m/v) 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,并用 Nano-drop ND-1000(Thermo Fisher) 紫外分光光度计进行核酸定量。

1.6 16S rRNA 的反转录聚合酶链反应(PCR) 采用 Takara 16S rDNA Bacterial Identification PCR 试剂盒对菌体 16S rRNA 进行一步法反转录 PCR 扩增。反应总体积 25 μL,其中菌体总核酸溶液 4 μL(总量约 200 ng)。50℃ 反转录 30 min;热扩增反应中反应体系 95℃ 变性 30 s,59℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 30 个循环,最终于 72℃ 延伸 5 min。

1.7 测序与比对分析 阳性扩增片段,采用琼脂糖凝胶纯化回收,交予英骏公司进行测序。通过 BLAST 法对所获得序列进行多序列比对。应用 DNASTAR lasergene 7.0 Megalign 程序进行系统发生分析。比对采取 Clustal-W 算法。大肠埃希菌(GI: 213495400, 301344544)、志贺菌属(GI: 254939254, 152218530)与沙门菌属(GI: 310277743, 319433526 和 329749719)16S rRNA 序列收集于 GenBank。

## 2 结果

2.1 菌株培养 分离株 B54V 在 SS 和 MAC 培养基上呈现粉色、光滑湿润圆形菌落,在 EMB 培养基上呈现金属光泽菌落;接种 KIA 琼脂 24 h 后斜面呈红色,底层黄色,48 h 后斜面呈黄色,底层黄色;产气,H<sub>2</sub>S 阴性,动力阳性,V-P 试验阴性。生化代谢鉴定结果表明,待检测菌呈 β-半乳糖苷酶活性试验、吲哚试验阳性(表 1),综合上述生化培养特征,待检菌符合大肠埃希菌的生化特征。

表 1 沙门样大肠埃希菌分离株的代谢特性

Table 1 Biochemical reaction features of the *Salmonella*-like *Escherichia coli* isolate

Biochemical reaction	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	B54V
ONPG	+	-	+
ADH	+ / -	+ / -	-
LDC	+	+ / -	+
ODC	+ / -	+ / -	-
CIT	-	+ / -	-
H <sub>2</sub> S	-	+ / -	-
URE	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	+	-	+
VP	-	-	-
GEL	-	-	-
GLU	+	+	+
MAN	+	+	+
INO	-	-	-
SOR	+	+	+
RHA	+	+ / -	+
SUC	+ / -	-	-
MEL	+ / -	-	+
AMY	-	-	-
ARA	+	+ / -	+
OXI	-	-	-
Coincidence rate			99.80%
Identification level	good	good	good

+ : Positive; - : Negative

2.2 血清凝集试验 分离株与沙门菌诊断血清发生凝集,不与常见的 4 种致病大肠埃希菌诊断血清发生凝集反应,详见表 2。

2.3 16S rRNA 比对分析 为对 B54V 进行基因型鉴定,应用 RT-PCR 方法对菌体 16S rRNA 进行特异性扩增。琼脂糖凝胶电泳结果表明,扩增获得长度为 510 bp 的菌体 16S rDNA 片段,与预期结果一致(图 1A)。序列测定与基于 16S rRNA 的系统

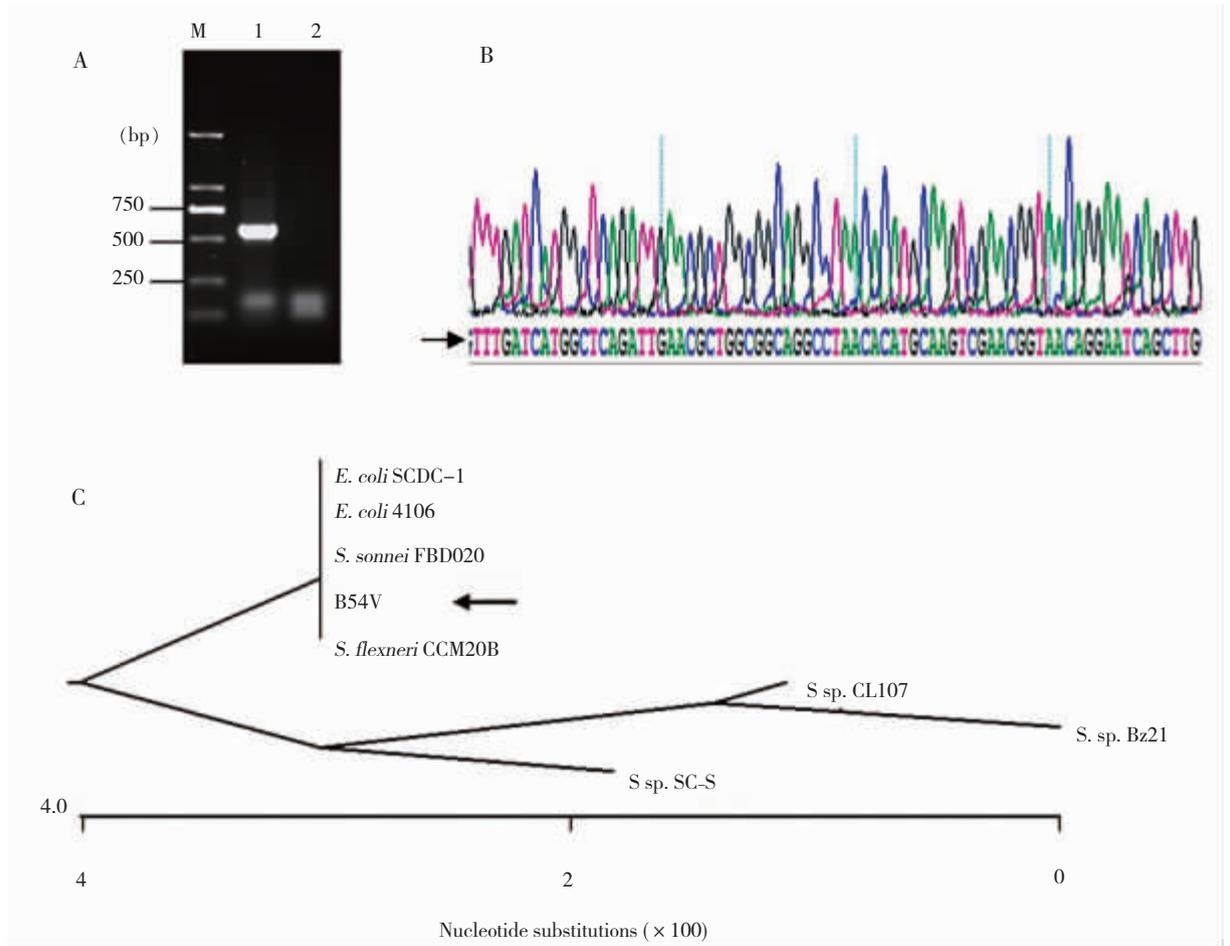
发生分析结果表明, B54V 16S rRNA 序列与大肠埃希菌完全一致(图 1B), 同源性与志贺菌更高, 与多

表 2 沙门样大肠埃希菌分离株的血清交叉凝集特征

Table 2 Serum cross-agglutination profiles of *Salmonella*-like *Escherichia coli*

Group or type	<i>Salmonella spp.</i>			<i>Escherichia coli</i>			
	A-F group	O antigen	H antigen	EPEC	EIEC	ETEC	O157
Agglutination result	++	++	-	-	-	-	-

+ ; Positive; - ; Negative



A; Agarose gel electrophoresis map of 16S rRNA amplicon (M; DL2000 molecular marker; Lane 1, 2 was B54V16S rRNA amplicon [510 bp] and negative control respectively); B; Sequencing of B54V 16S rRNA; C; 16S rRNA sequence phylogenetic analysis on B54V

图 1 B54V 菌株的 16S rRNA 序列测定与同源性分析

Figure 1 Amplification and phylogenetic analysis of *Salmonella*-like *E. coli* 16S rRNA

### 3 讨论

大肠埃希菌、志贺菌属和沙门菌属是引起腹泻的常见病原菌。到目前为止, 菌株的生化代谢特征与血清型别仍是肠道病原菌诊断的重要依据。在常规的检测流程中, 首先通过选择性培养获得待检菌, 符合双糖铁发酵特征的菌株再进行生化特性检测。最后将符合吡啶、甲基红<sup>+</sup>、V-P<sup>-</sup>的菌株作进一步

的血清型鉴定, 如待检菌与群特异性抗血清出现凝集反应, 即可鉴定为相应的肠道菌。

细菌表型受生长状态等多方面因素影响。在实际诊断鉴定中, 一部分菌株难以通过血清型和代谢型等表型进行鉴定。一方面, 肠杆菌的生化代谢对于生长环境变化非常敏感, 部分低活性大肠埃希菌呈乳糖不发酵或缓慢发酵表型, 这与沙门菌属在双糖铁代谢特征相同<sup>[5]</sup>; 另一方面, 部分菌株或能自发

凝集,与诊断血清的交叉凝集或不发生凝集。本实验鉴定的大肠埃希菌可与沙门 O 抗血清发生凝集反应,提示该菌株的 O 抗原可能与沙门菌属高度近似。O 抗原的特异性和多样性由脂多糖中的寡糖单位侧链中单糖的种类、排列以及修饰情况决定<sup>[6]</sup>。Wang 等<sup>[7]</sup>研究表明,沙门菌 O<sub>6</sub> 与大肠埃希菌 O<sub>17</sub>、O<sub>44</sub>、O<sub>73</sub>、O<sub>77</sub>、O<sub>106</sub> 血清型具有极为近似的寡糖骨架(Backbone)结构。O 抗原的表达与加工本质上由一系列相关基因调控。有学者发现沙门菌属中 O<sub>58</sub> 型与大肠埃希菌 O<sub>123</sub> 型的 O 抗编码基因簇全序列具有极高的同源性<sup>[8]</sup>。上述研究结果证明,至少特定血清型的大肠埃希菌与沙门菌等肠道细菌具有相同的进化祖先。因此,基于表型鉴定的诊断方法存在固有的漏诊、错诊概率。

为提高诊断的准确性,本研究在表型鉴定的基础上,对待检菌的 16S rRNA 序列进行分析。16S rRNA 是细胞生物进化的标记分子,通过序列分析发现个别碱基的差异即可辨别大肠埃希、沙门菌属等肠杆菌成员。目前核酸扩增方法和序列测定已经非常普及,基因型的鉴定可为临床分离菌的鉴定提供有力的依据,同时血清学特异性的基于多重 PCR<sup>[9-10]</sup>、基因芯片或生物分子质谱检测方法的建立对于提高实验室与疾控体系的诊断能力,完善诊断技术储备都具有重要意义。

#### [参 考 文 献]

[1] Wang L, Wang Q, Reeves P R. The variation of O antigens in

gram-negative bacteria[J]. Subcell Biochem, 2010, 53: 123 - 152.

- [2] 何剑锋,叶金奶. 与福氏志贺氏菌有共同抗原的两株肠杆菌科细菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(5): 1168, 1174.
- [3] 高雯洁,张建平,沈志英,等. 一株与福氏志贺菌 1a 交叉凝集的低活性大肠埃希菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(11): 2115 - 2116.
- [4] 董路宁,党荣理,刘栓奎,等. 感染性腹泻细菌病原学监测结果分析[J]. 实用预防医学, 2010, 17(12): 2389 - 2390.
- [5] Jozefczuk S, Klie S, Catchpole G, et al. Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli* [J]. Mol Syst Biol, 2010, 6: 364 - 379.
- [6] Wang L, Wang Q, Reeves P R. The variation of O antigens in gram-negative bacteria[J]. Subcell Biochem, 2010, 53: 123 - 152.
- [7] Wang W, Perepelov A V, Feng L, et al. A group of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* O antigens sharing a common backbone structure[J]. Microbiology, 2007, 153(Pt 7): 2159 - 2167.
- [8] Liu B, Perepelov A V, Li D, et al. Structure of the O-antigen of *Salmonella* O66 and the genetic basis for similarity and differences between the closely related O-antigens of *Escherichia coli* O166 and *Salmonella* O66[J]. Microbiology, 2010, 156(Pt 6): 1642 - 1649.
- [9] Clark C G, Kropinski A M, Parolis H, et al. *Escherichia coli* O123 O antigen genes and polysaccharide structure are conserved in some *Salmonella enterica* serogroups[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(Pt 7): 884 - 894.
- [10] DebRoy C, Roberts E, Davis M, et al. Multiplex polymerase chain reaction assay for detection of nonserotypable Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O147[J]. Foodborne Pathog Dis, 2010, 7(11): 1407 - 1414.

(上接第 99 页)

(致谢:对中国疾病预防控制中心传染病预防控制所新病原室的熊衍文博士及赵爱兰、白雪梅老师对本研究的大力支持表示感谢!)

#### [参 考 文 献]

- [1] 张建萍,朱婉,褚云卓,等. 连续 6 年凝固酶阴性葡萄球菌的耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(11): 1410 - 1414.
- [2] 黄革,周晓红,蒋文玲,等. 金黄色葡萄球菌苯唑西林及红霉素

耐药基因多重 PCR 快速检测[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(4): 533.

- [3] 孙长贵译. 抗菌药物敏感性试验执行标准(第十九版信息增刊)[S]. M100 - S19. 美国:美国临床实验室标准化研究所, 2009: 47 - 55.
- [4] 任南. 实用医院感染监测方法与技术[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 2006: 306.
- [5] 韩佳音,卢次勇,林立丰. 医院感染病原菌分布及耐药性研究[J]. 中国消毒学杂志, 2008, 25(3): 249.