

口服 O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) 能够减少 O157: H7 在山羊体内的定殖

张雪寒,何孔旺,俞正玉,茅爱华

(江苏省农业科学院 兽医研究所,农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏 南京 210014)

摘要: 为了明确 O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) 口服能否减少亲本株 O157: H7 在山羊体内的定殖。选用 3 月龄山羊,首先口服接种 O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$),分别于第 7、14 天再次口服接种亲本株 O157: H7,监测亲本株 O157: H7 的排菌持续时间和排菌量。结果表明: O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) 口服后第 7 天攻击亲本株 O157: H7,第 4 天检测不到亲本株 O157: H7 的排菌;第 14 天攻击亲本株 O157: H7,第 9 天检测不到亲本株 O157: H7 的排菌。直接口服亲本株 O157: H7,排菌一直持续到第 25 天。口服 O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) 能够减少 O157: H7 在山羊体内的定殖,为研制 EHEC O157: H7 基因缺失疫苗奠定了基础。

关键词: O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$); 山羊; 排菌

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2012)03-0123-03

Oral Inoculation with O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) Leads to Decreased Shedding in Goats after Challenge with *Escherichia coli* O157: H7

ZHANG Xue-han, HE Kong-wang, YU Zheng-yu, MAO Ai-hua

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Engineering Research of Veterinary Bio-products of Agricultural Ministry, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: Clarify whether oral inoculation with O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) leads to decreased shedding in goats after challenge with *Escherichia coli* O157: H7. Three months old goats were chosen to orally inoculate EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) at 0 day and inoculate parent EHEC O157: H7 at 7 days and 14 days, respectively. EHEC O157: H7 of shedding in feces were detected by plate cultivation. The goats challenged with EHEC O157: H7 at 7 days did not shed bacteria in their feces on the 4th day, and the goats at 14 days no shedding on the 9th day, whereas the goats only with EHEC O157: H7 were shedding bacteria for 23 days. Oral inoculation with O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) was able to decrease shedding and colonization EHEC O157: H7 in goats. Therefore, our study provides data to develop attenuated vaccine of EHEC O157: H7.

Key words: O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$); Goats; Shedding bacteria

肠出血性大肠杆菌(Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157: H7 是重要的食源性人兽共患病原菌。在动物宿主体内长期生存,并且其宿主范围非常广泛,其中,反刍动物带菌率较高^[1-3]。因此,动物作为传染源要比人类更为重要,它往往是动物源食品污染的根源^[4-6]。EHEC O157: H7 的感染因具有暴发流行趋势、强烈的致病性与致死性以及抗生素治疗会加剧病情等特点,已经成为全球性的

公共卫生问题。目前,对其感染缺乏有效的防治方法,尤其没有成熟的防控制剂市售。

整合到 EHEC O157: H7 基因组的前噬菌体编码志贺毒素 I 和 II(Stx I 和 Stx II),独立于 EHEC O157: H7 基因组的大质粒 pO157 编码溶血素(Hly)和 ToxB 等一些毒力因子^[4-13]。2 种毒素均由 1 个 A 亚单位和 5 个 B 亚单位组成,A 亚单位具有细胞内毒性,B 亚单位具有细胞结合特性,能与具有特定

收稿日期:2012-04-08

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2010068);江苏省农业支撑计划-社会发展(BE2011771);国家科技支撑计划(2012BAK08B07)

作者简介:张雪寒(1977-),女,河北高碑店人,副研究员,博士,主要从事人兽共患病原研究。

受体(Gb3) 的细胞结合, 从而引导 A 亚单位发挥作用。Stx 能引起被感染的人腹泻, 并可能出现出血性结肠炎(Hc) 或溶血性尿路综合症(Hus) 等全身性并发症。EHEC O157: H7 可以血红蛋白和血红素为原料, 快速生长繁殖产生更多的毒素引起病变。Hly 产生需要 4 种相连的基因 HlyC、A、B、D 的产物, 其中 HlyA 是结构基因。EHEC O157: H7 的大质粒 pO157 编码, 因与艰难梭状芽胞杆菌(*Clostridium difficile*) 毒素 B 有同源性, 命名为 ToxB, 整个阅读框 9 501 bp。ToxB 通过某些机制间接的影响 LEE 毒力岛编码蛋白的合成和分泌, 从而降低 O157: H7 的黏附作用^[12]。

笔者前期针对 *stx* *hly* 和 *tox* 这 3 个全基因上下游序列分别设计引物对, 扩增上下游同源臂, 同时选取庆大霉素、壮观霉素和卡那霉素基因表达盒作为筛选标记, 先后进行构建, 成功获得基因缺失株 EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$)。Balb/c 小鼠试验表明, 缺失株在小鼠体定殖能力降低, 排菌量少, 排菌时间缩短。并且口服后能够降低亲本株在鼠体内定殖。

本研究旨在评价缺失株 EHEC O157: H7 ($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$) 能否降低亲本株 EHEC O157: H7 在天然寄居宿主体内的定殖。选用山羊作为宿主开展工作, 为研制用于防控 EHEC O157: H7 的基因缺失疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 EHEC O157: H7(*stx1-stx2* +) 为本室保存; 菌株 EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$) 为本室制备。

1.1.2 试剂 ExTaqTM (5 U/μL, TaKaRa 公司); 麦康凯培养基(杭州微生物试剂有限公司); 试验所用抗生素工作浓度为: 庆大霉素(Gm) 50 μg/mL, 壮观霉素(Spc) 100 μg/mL, 卡那霉素(Km) 50 μg/mL; 亚碲酸钾(Pot) 10 μg/mL、新生霉素(Nov) 50 μg/mL、万古霉素(Van) 40 μg/mL。

1.1.3 试验动物 3 月龄雄性山羊, 购自江苏省农业科学院羊场。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 EHEC O157: H7 (Pot^R Nov^R Van^R) 和 EHEC O157: H7 ($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$) (Pot^R Nov^R Van^R Gm^R Spc^R Km^R) 复苏、传代, 取第 5 代作为菌种, 接种到多量的 LB 培养基中, 37℃ 培养 10 h。4 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 并用 0.01 mol/L PBS 洗涤菌体 2 次, 最终用等体积的 PBS 重悬菌体, 10 mL/只 (10^{10} CFU/只) 攻击山羊备用。

1.2.2 EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$) 在山羊体内的定殖情况 选用 3 月龄雄性山羊 10 只, 分成 2 组 5 只/组。I 组攻击亲本株 O157: H7, II 组攻击 O157: H7 ($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$)。在攻毒前断食、断水 12~20 h, 攻毒后 6 h 恢复饮水饮食。每只羊单独饲养。在攻毒后的第 1 天开始检测, 分别采取每只羊的新鲜粪便 2 g, 置于含有 5 mL PBS 的离心管中, 4℃ 放置 4 h, 以软化粪便。软化后的粪便在涡旋仪上充分混匀成均质状。500 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 置于无菌的离心管中, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用 1 mL 无菌 PBS 重悬。10 倍比稀释后吸取 100 μL 涂布于山梨醇-麦康凯平板(含有 10 μg/mL 亚碲酸钾、50 μg/mL 新生霉素、40 μg/mL 万古霉素)。每个样品做 2 次重复。

1.2.3 EHEC O157: H7 ($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$) 抵抗 EHEC O157: H7 定殖的能力 选择 3 月龄山羊 15 只, 分成 3 组 5 只/组。I 组攻击亲本株 O157: H7, II 组和 III 组攻击 O157: H7 ($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$)。其中, II 组于第 7 天口服亲本株 O157: H7; III 组于第 14 天口服亲本株 O157: H7。观察动物体征以及排菌变化。

2 结果与分析

2.1 EHEC O157: H7 ($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$) 在山羊体内的定殖

亲本株 EHEC O157: H7 和缺失株 EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$) 排菌持续时间没有明显差异, 排菌量降低接近 1 个 CFU, 但与亲本株 EHEC O157: H7 相比, 差异不显著 ($P > 0.05$) (图 1)。

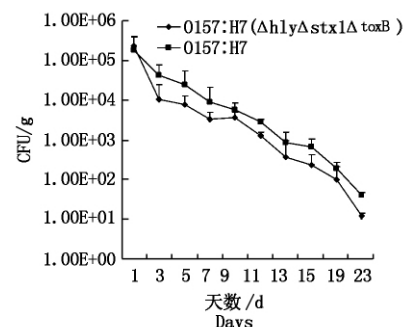


图 1 EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$) 在山羊体内的定殖

Fig. 1 Colonization of EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$) in goats

2.2 EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta tox$) 抵抗 EHEC O157: H7 定殖的能力

II 组第 7 天攻击 EHEC O157: H7 后, 于第 4 天检测不到亲本株的排菌; III 组第 14 天攻击 EHEC O157: H7 后, 于第 9 天检测不到亲本株的排菌。而 I 组一直排菌, 持续

到第 25 天(图 2)。EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) (II 组和 III 组) 的排菌一直持续(图 3)。

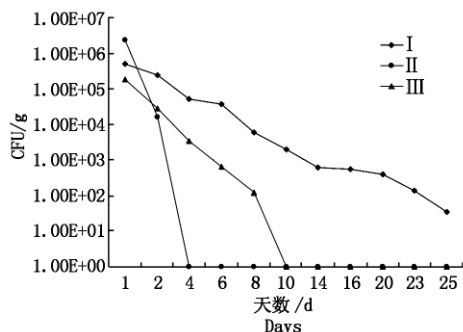


图 2 EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) 抵抗 EHEC O157: H7 定殖的能力

Fig. 2 Colonization of EHEC O157: H7 in goats inoculated with EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$)

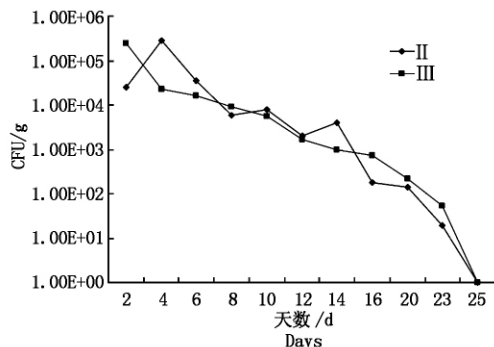


图 3 EHEC O157: H7 攻击后 EHEC O157: H7 ($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) 排菌情况

Fig. 3 Shedding of EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) in goats after challenged by EHEC O157: H7

3 讨论

肠出血性大肠杆菌 O157: H7 是通过食源性传播的一种重要的人兽共患病原。一旦感染后, 抗生素的使用并不能消除疾病甚至反而使病情恶化。反刍动物(牛、羊)是 EHEC O157: H7 主要的储存宿主, 长时间处于带菌状态, 并不表现临床症状, 通过排泄污染食物、水源和周边环境, 最终感染人而致病, 甚至致死^[1-3]。

本试验利用 EHEC O157: H7 在反刍动物结肠内寄生的特点, 通过分子生物学手段去除毒素因子和对定殖有一定调控作用的因子, 体外构建无毒素的 EHEC O157: H7 即 EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$), 开展新型微生物制剂的研制。通过口服 EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) 占位肠上皮细胞相应的结合位点, 减少 EHEC O157: H7 在体内的定殖。控制好传染病链条中的传染源环节, 进而防控人 EHEC O157: H7 的发生、流行。

EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) 是本室在前期构建的基因缺失菌株, 在小鼠体内的定殖时间明显缩短, 定殖的数量降低了近 3 个 CFU, 并且能够减少 EHEC O157: H7 在体内的定殖^[13]。为了进一步评价 EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) 在哺乳动物体内定殖的情况, 我们选择山羊作为宿主。试验结果显示, EHEC O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) 在山羊体内定殖的能力相比小鼠, 降低不明显。进一步说明, 小鼠不能完全取代山羊动物用于评价 EHEC O157: H7 的生物学特性。

综上所述, 通过口服基因缺失菌株来减少野生菌株在肠道内的定殖, 尤其是用于小型反刍动物, 国内外未见报道。本研究将为 EHEC O157: H7 的全面防控提供有效手段。

参考文献:

- [1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 states, 2008 [J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2009 57(14): 366–370.
- [2] Peter Feng. *Escherichia coli* serotype O157: H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants [J]. Emerging Infectious Diseases 2005 11(2): 47–52.
- [3] Doyle M P, Erickson M C. Summer meeting 2007—the problems with fresh produce: an overview [J]. Journal Applied Microbiology 2008 105(2): 317–330.
- [4] Girard F, Frankel G, Phillips A D *et al.* Interaction of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 with mouse intestinal mucosa [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 283(2): 196–202.
- [5] Mark A H, Christian M, Thomas A C *et al.* Bovine immune response to Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Clinical Vaccine Immunology 2006 11: 1322–1327.
- [6] Yuhng L, Elizabeth F, Andrew M. Human response to *Escherichia coli* O157: H7 infection antibodies to secreted virulence factors [J]. Infection and Immunity, 2000, 68(9): 5090–5095.
- [7] Liu H, Magoun L, Luperehio S. The Tir-binding region of enterohemorrhagic *Escherichia coli* intimin is sufficient to trigger actin condensation after bacterial-induced host cell signaling [J]. Molecular Microbiology 1999 34(1): 67–81.
- [8] McKee M L, Melton-Celsa A R, Moxley R A. *Escherichia coli* O157: H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells [J]. Infection and Immunity, 1995 63: 3739–3744.
- [9] Torres A G, Kaper J B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 to HeLa cells [J]. Infection and Immunity 2003 71: 4985–4995.
- [10] Meng J, Zhao S, Doyle M P. Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans [J]. International Journal of Food Microbiology 1998 45: 22–25.
- [11] Ebel F, Podzadel T, Rohde M. Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA containing surface appendage [J]. Molecular Microbiology 1998 30(1): 147–161.
- [12] Ichiro T, Masanori H, Hiroyuki A *et al.* *ToxB* Gene on pO157 of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 is Required for Full Epithelial Cell Adherence Phenotype [J]. Infection and Immunity 2008 69(11): 6660–6669.
- [13] 张雪寒, 何孔旺, 赵攀登, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157: H7($\Delta hly\Delta stx\Delta toxB$) 基因缺失株的构建 [J]. 华北农学报 2011 26(5): 1–8.