临床研究 文章编号：0253-3626(2010)08-1252-04

临床分离肠外致病大肠杆菌及其与肠内致病大肠杆菌相关性的分子流行病学研究

唐志君，黄文祥，董一山，郑行萍，刘成伟，余登高
（重庆医科大学附属第一医院感染科、重庆市传染病寄生虫病重点实验室，重庆 400016）

【摘 要】目的：分析临床分离肠外致病大肠杆菌（Extraintestinal pathogenic escherichia coli，ExPEC）的血清型、毒力基因及其与肠内致病大肠杆菌的同源性，探讨 ExPEC 与肠内致病大肠杆菌的相关性。方法：以我院 2006~2009 年临床分离的 227 株 ExPEC 为研究对象。用常见肠内 30 种致病大肠杆菌“OK”诊断血清，对上述 227 株临床分离 ExPEC 做血清分型，并用 PCR 分析相关毒力基因，通过脉冲场凝胶电泳（Pulsed field gel electrophoresis，PFGE）分析部分患者 ExPEC 与该患者肠内大肠杆菌的同源性。结果：在 227 株 ExPEC 中，分离出 19 株肠产毒性大肠杆菌（Enterotoxigenic escherichia coli，ETEC）、15 株肠致病性大肠杆菌（Enteropathogenic escherichia coli，EPEC）。ETEC 不耐热肠毒素基因（Heat-labile enterotoxin，ltA）表达率 31.57%、耐热肠毒素基因（Heat-stable enterotoxin，stI）表达率 47.36%、stI/ltA 21.05%；EPEC 紧密粘附素毒力基因（*E.coli* attachment A，eac A）表达率 60.0%，束状菌毛毒力基因（Bundle-forming pilus，bfpA）66.66%，eaeA/bfpA 26.66%。PFGE 分型：2 例患者血培养大肠杆菌与该患者粪便中分离出的大肠杆菌 PFGE 分型一致。结论：肠内致病大肠杆菌血清型能引起临床肠外感染，但所占比例相对较少，且主要为 ETEC 和 EPEC 血清型。ExPEC 感染的败血症患者，其来源可能是其肠道致病大肠杆菌的移位所致。

【关键词】肠外感染大肠杆菌；血清型；毒力基因；脉冲场凝胶电泳
【中国图书分类法分类号】R181.3+2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-04

The relevance of molecular epidemiological study between Extraintestinal pathological escherichis coli infection in the clinic and intestinal pathogenic escherichis coli

TANG Zhi-jun，et al
（*Department of Infectious Diseases，the First Affiliated Hospitial，Chongqing Medical University*）

【Abstracts】*Objective*：To investigate the epidemiological correlation of the Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli （ExPEC）and the intestinal Pathogenic Escherichia coli. *Methods*：227 ExPEC strains isolated in the Department of Infectious Diseases of the First Affiliated Hospitial of Chongqing Medical University were studied to investigate their serotype by “OK”diagnostic serum.The virulence gene of the bacterium was analyzed by PCR.The homology of the intestinal Escherichia coli and ExPEC in some patients were analyzed by Pulsed field gel electrophoresis. *Results*：34 strains were selected in 227 ExPEC strains include 20（Enterotoxigenic escherichia coli，ETEC）strains，14（Enteropathogenic escherichia coli，EPEC）strains.The positive rate of virulence gene of ETEC were the heat labile enterotoxin gene （ltA）31.57%，heat stable enterotoxin gene （stI）47.36% and stI/ltA 21.05%. The positive rate of virulence gene of EPEC were the bundle-formingpilus gene（bfpA）66.66%，eeeA gene 60.0% and eaeA/bfpA 26.67%.Two cases of *E.coli* septicemia was found in patients with gut the same clone. *Conclusion*：Intestinal pathogenic *E.coli* serotype caused a relatively small proportion of the clinical ExPEC，and mainly ETEC and EPEC serotypes. ExPEC in patients with septemia，especially in serious ill patients，its intestinal translocation of *E.coli* may be the source of ExPEC.

【Key words】Extraintestinal Pathogenic *E.coli*；Serotype；Virulence gene；Pulsed field gel electrophoresis

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 肠外 *E.coli* 实验菌株来源于我院 2006 年 7 月~2009 年 10 月临床分离于痰、血、中段尿培养共 227 株

作者介绍：唐志君（1981-），男，硕士，
研究方向：感染性疾病。
通讯作者：黄文祥，男，教授，E-mail：wenxiang_huang@163.com。

（血培养 43 株，痰培养 104 株，中段尿培养 80 株）。2009 年 7 月～10 月分离鉴定的部分肠外致病大肠杆菌（Extraintestinal pathigenic escherichia coli，ExPEC）患者（血培养 10 例，痰培养 14 例，中段尿培养 16 例）粪便中的（Escherichina coli，*E.coli*）。不耐热肠毒素（Heat- labile enterotoxin，ltA）和耐热肠毒素（Heal-stale enterotoxin，stI）阳性菌株购于广东省微生物菌种保藏中心，束状菌毛毒力基因（Bundle-forming，bfpA）和紧密粘附素毒力基因（*E.coli* attachment A，eaeA）阳性株由温州医学院检验科赠送。

1.1.2 主要试剂 大肠杆菌“OK”诊断血清购自宁波生物制品研究所；大肠杆菌生化鉴定管购自重庆迈克科技公司；大肠杆菌显色培养基购于青岛海博生物技术有限公司；Omega 质粒提取盒。PCR 试剂盒、内切酶 *Xba* Ⅰ购于 TaKaRa 公司，溶菌酶、蛋白酶 K 及引物由上海生工生物工程有限公司提供。

1.1.3 主要仪器 细菌培养箱（ThermoForma 公司）；超低温冰箱（美国 Thermo）；恒温震荡仪（德国 RosiloooTM 公司）；光学显微镜（日本 Olympus）；S1000PCR 仪、脉冲场电泳仪为 CHEF-DR Ⅱ、VersaDoc 凝胶成像系统（美国 Bio-Rad）。紫外分光光度计（美国 Thermo）。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离鉴定 将适量粪便标本均匀涂抹在大肠杆菌显色培养基上，经 37℃过夜培养，挑单个蓝色菌落（大肠杆菌菌落呈蓝色）于 LB 固体培养基上增菌，并进行生化鉴定后，于零下 20℃保存。

1.2.2 血清分型 用无菌接种环于洁净玻璃片加 1、2 滴“OK”多价血清，挑取菌落与血清混匀，轻轻晃动玻片，若呈现颗粒凝聚者，再将被检菌落制成浓厚菌液，于 100℃水浴加热 30 min 与所属“OK”单价血清做凝聚实验以确定菌群，仍呈颗粒凝聚者为阳性。

1.2.3 PCR PCR 模板：质粒提取方法按照试剂盒说明操作，提取后保存于零下 20℃。细菌 DNA 提取，用接种环刮取菌落，置于 1.5 ml EP 管中，加入 20 μl TE 液，震荡混匀，于沸水中煮 10 min，13 000 r/min 4℃离心 10 min，上清液作为模板，零下 20℃保存。PCR 反应：ltA/stI 双重 PCR，反应体系及引物参考文献[2]设计。反应体系为 10×PCR buffer 10 μl，$MgCl_2$ 8 μl，DNTP 混合物 8 μl，模板各 1 μl，上下游引物各 2 μl，Taq 酶 5 U，总反应体积 100 μl。反应条件①50℃2 min，95℃ 5 min ②95℃ 45 s，50℃ 45 s，72℃ 60 s，40 个循环；③72℃，10 min。bfpA/eaeA 普通 PCR 反应体系及引物参考文献[3]设计，bfpA/eaeA 基因反应体系均为 10×PCR buffer 5 μl，$MgCl_2$ 3 μl，DNTP 混货物 4 μl，模板各 1 μl，上下游引物各 2 μl，Taq 酶 2.5 U，总反应体积 50 μl。bfpA 基因反应条件①94℃ 5 min；②94℃ 60 s，55℃ 60 s，72℃ 60 s，35 个循环；③72℃，7 min。*eaeA* 基因反应条件①94℃ 5*min*；②94℃ 60 s，55℃ 60 s，72℃ 60 s，30 个循环；③72℃ 7 min。PCR 产物经 2%琼脂糖电泳，紫外灯下观察。

1.2.4 脉冲场凝胶电泳（Pulused field gelele ctrophoresis，PFGE） 参考文献[4]建立 PFGE 操作方法，做少量改动。挑取单菌落，接种于 LB 肉汤，37℃震荡过夜，使菌液浓度 OD 值 A_{600} 达到 1.0～1.2 时，取菌液 1 ml，离心收集细菌。用双蒸水洗细菌 3 次。菌液与 2% 的预熔低熔点琼脂糖预热于 42℃时等体积混合，注入 100 μl 模孔，置于 4℃冰箱 10 min，使胶块凝固。取出胶块，置于 EDTA（0.5 mol/L）与溶菌酶（2 mg/ml）经 37℃轻震荡 4 h，胶块移置蛋白酶 K（0.5 mg/ml）与 1% SDS，50℃轻震荡过夜。倒出裂解液，加入 TE 液包含 PMSF（200 μg/ml）处理 2 次，每次水浴 50℃，1 h。再用 TE 液洗胶块 4 次，每次 50℃，30 min。洗涤后，切 1/3 胶块侵入适量酶切缓冲液 37℃轻摇 30 min。弃去缓冲液，加入含 2 μl 限制性内切酶 *Xba* Ⅰ缓冲液，37℃轻震荡过夜酶切。将酶切后琼脂小胶移到梳子齿上，将 1% 的高强度琼脂糖凝胶倒入模型槽没过小胶。在电压 6 V/cm、脉冲起始转换变化时间为 2.2～54.2 s、电泳时间 20 h，EB 染色 30 min，脱色 20 min，在紫外等下观察结果。

1.3 统计方法

数据统计分析所用软件为 SAS 9.1 软件。率的比较用卡方检验，P 值 <0.05 认为差异有统计差异意义。

2 结 果

2.1 血清分型

临床分离的 227 株 ExPEC（血培养 43 株，痰培养 104株，中段尿培养 80 株）分离出 12 个肠内血清型共 34 株，占总菌株 14.97%。其中，血 11.62%（5/43）、尿 12.5%（13/104）、痰 20.0%（16/80），以上三者两两比较无统计差别（P 值均 >0.05）。34 株肠内血清型为 19 株 ETEC，15 株 EPEC，EHEC 和 EIEC 未分出。血清分型结果见表 1。

2.2 PCR 毒力基因检测

EPEC（n=15）毒力基因 bfpA 表达率 66.66%，eaeA 60.0%，eaeA/bfpA 26.67%；ETEC（n=19）毒力基因 ltA 表达率31.57%，stI 47.36%，stI/ltA 21.05%。电泳结果见图 1～3。

2.3 PFGE 同源性分析

本次实验运用 PFGE 分析 2009 年 7 月～10 月部分患者 ExPEC（血培养 10 例，痰培养 14 例，中段尿培养 16 例）与该患者肠内大肠杆菌的同源性，在 2 例 ExPEC 败血症患者的肠道内发现 ExPEC 的同源克隆株。PFGE 结果见图 4。结果分析采用 Band based/Dice 方法计算 Dice 相似系数，$F=2nxy/(nx+ny)$，nxy 为 X 菌株和 Y 菌株相同的片段数，nx 表示 X 菌株总片段数，ny 代表 Y 菌株的总片段数。F 值 0～1 之间，0 表示无关，越接近 1 同源性越高，1 表示完全相同[5]。A 患者血中 E.coli A1 和粪便中 *E.coli* A2 两株细菌酶切后电泳片段数和位置相同（F=1），应为同一克隆菌株。B 患者血中 *E.coli* B1 和粪便中 *E.coli* B2、B3 比较相差 1 个片段，其余片段位置相同（F=0.95），亦应视为同源克隆株。

3 讨 论

本次实验从 227 株临床 ExPEC（血培养 43 株，痰培养 104 株，中段尿培养 80 株）分离出 12 个肠内血清型共 34 株（19 株 ETEC，15 株 EPEC），占总菌株 14.97%，说明肠内致病血

表 1　血清分型

肠道致病 *E.coli*	血	痰	尿	合计
ETEC(7 型)				
O6:K15	0	2	1	3
O7:K1	0	1	1	2
O9:K9	0	1	0	1
O15:K7	2	0	3	5
O20:K17	2	0	1	3
O25:K19	1	0	3	4
O78:K80	0	0	1	1
EPEC(5 型)				
O26:K60	0	4	2	6
O111:K58	0	2	0	2
O114:K90	0	1	0	1
O125:K70	0	4	0	4
O128:K67	0	1	1	2
合计	5	16	13	34



图 3　stI/ltA 基因片段双重 PCR DNA 产物(190/450 bp)

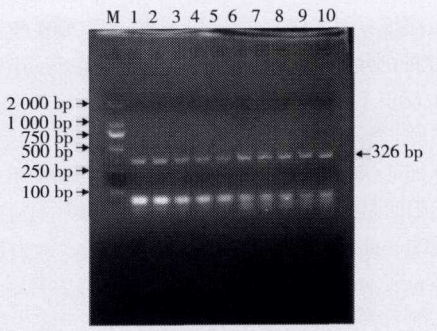


图 1　bfpA 基因片段的 PCR DNA 产物(326 bp)

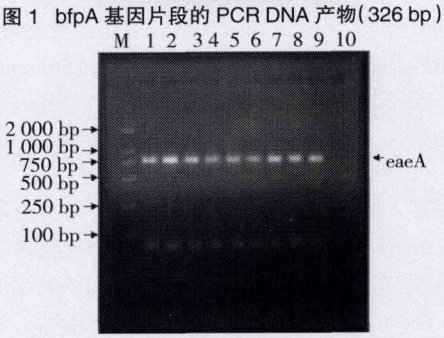
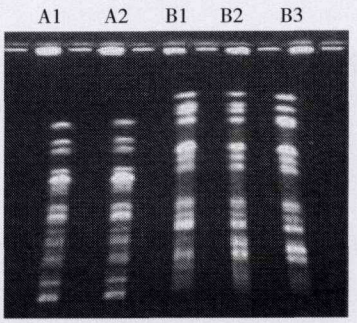


图 2　eaeA 基因片段 PCR DNA 产物(790 bp)



A1、A2 泳道分别为 A 患者的血、粪便中 *E.coli* PFGE 分型；B1 泳道为 B 患者血 *E.coli* PFGE 分型；B2、B3 泳道为 B 患者粪便 *E.coli* PFGE 分型

图 4　A B 2 例 ExPEC 败血症患者血与粪便中 ***E.coli*** 的 PFGE 分型

清型引起临床肠外感染的大肠杆菌比例相对较少，且主要以 ETEC 和 EPEC 为主，但肠道致病大肠杆菌 40%(12/30)的血清型能够引起肠道外的感染，则应当引起临床工作者的重视。本次实验仅鉴定出 ETEC 和 EPEC 血清型，EIEC 和 EHEC 血清型未分离出，原因考虑为 ETEC 和 EPEC 广泛分布于环境及少数健康人肠道，为临床感染常见致病株；EHEC 毒力较强，多为爆发流行，而本次收集的感染菌株多为临床散发病例，所以未分出；EIEC 血清型则可能不引起肠道外感染，其原因需待进一步研究。12 个血清型中，通过查阅文献[6-15]，了解肠外包括、血、尿、痰、脑脊液 ExPEC 的血清型。本次分型出的血清型 O6、O7、O9、O15、O20、O25 为常见肠外 ExPEC 血清型，占总分型菌株的 55.88%(19/34)。本次实验仅用了肠道相关诊断血清，所以上述文献提到的其他常见血清型 O1、O2、O16、O18、O22、O75 未在分型中，而本次分型 O26、O111、O114、O125、O128，在上述文献中未提到，属首次报道。临床 ExPEC 是常见感染，泌尿系统 *E.coli* 的感染为 60%~80%，呼吸道痰培养 *E.coli* 阳性率紧紧次于肺炎克雷伯杆菌[16]，而 *E.coli* 败血症在革兰阴性菌中占首位[17]。临床 ExPEC 感染已造成大量医疗资源浪费[18]，禽类 ExPEC 疫苗研究较多，临床 ExPEC 的研究也已开始，2009 年 6 月美国密歇根州立大学 15 日报道，该校研究人员开发出一种针对肠毒性大肠杆菌的疫苗，动物试验显示效果良好。进一步全面了解临床 ExPEC 血清型对开发更具广泛的 ExPEC 疫苗具有重要意义。

国外对临床 ExPEC 的研究较早，Brauner A[19]通过分析患者血、尿及粪便中 ExPEC 的血清型、毒力因子，认为血、尿中 ExPEC 的来源可能是肠道。Moulin-Schouleur M[20]通过血清分型、多位点序列分型(Multilocus sequence tping，MLST)比较感染人的 ExPEC 和家禽的 APEC(Avian pathoge-nic *E.coli*，APEC)，推测人的 ExPEC 可能来源于 APEC。国内对临床 ExPEC 的研究相对较少，多见于新生儿 ExPEC 的败血症及成人尿路感染。分析临床 ExPEC 的来源，掌握临床 ExPEC 感染的特征对临床医师的工作具有重要的指导意义。从本次 ExPEC 的毒力基因和 PFGE 实验结果分析，ETEC 毒力基因和肠道内 ETEC lt、st 阳性率[21]基本一致，而 EPEC 的毒力基因 bfpA 66.66%，eaeA 60.0%，eaeA/bfpA 26.67%较 M. Yousef Alikhani[3]报道的腹泻患者 EPEC 的 bfpA 22.51%，eaeA 32.46%，eaeA/bf-

pA 17.8%似有增高，bfpA 存在于质粒上，是束状菌毛的编码基因，eaeA 则存在于细菌染色体上，主要编码紧密粘附素。eaeA/bfpA 表达较高，提示细菌的侵袭能力增加，这可能是引起肠道外感染的原因之一，但本次实验样本量少，且存在区域及样本来源差异，故应进一步提高样本量研究。PFGE 分型技术被认为是细菌分子分型的"金标准"[22]，通过结合临床资料及 PFGE 实验结果初步分析临床 ExPEC 感染特征和感染来源。查阅 34 例肠内致病大肠杆菌引起的肠外感染病例，在资料完整的 26 份病例中：年龄 20~91 岁，平均年龄 65.9 岁，男女各 13 例；患 2 种(高血压病、糖尿病、冠心病、SLE、慢性肾病、COPD、恶性肿瘤等)以上基础疾病者占 76.9%(20/26)；发热患者 17 例；腹泻患者 6 例。可见高龄伴有多基础疾病患者是肠道致病大肠杆菌 EPEC 和 ETEC 在临床上感染的高危人群，临床症状发热多见于腹泻($P<0.01$，$\chi^2=9.43$)。因此，对于年老特别是病重发热患者应做相关细菌培养，同时临床医师应该思考，对高龄病危患者是否应该给予预防性抗感染治疗以减少 ExPEC 感染的机率？从 PFGE 结果分析，2 例大肠杆菌败血症患者有腹泻症状，在其肠道内找到了导致该患者败血症的同源克隆株。因此，可以推测导致患者败血症的 ExPEC 可能来源于肠道致病大肠杆菌的移位。那么肺部感染和尿路感染的 ExPEC 是否也来源于肠道大肠杆菌的移位？则需继续收集病例进一步研究。综上所述，肠内致病大肠杆菌血清型引起临床肠外感染所占比例相对较少，且主要为 ETEC 和 EPEC 血清型；高龄伴多基础疾病患者为临床 ExPEC 感染的高危人群，ExPEC 的败血症患者，其肠道大肠杆菌的移位可能是 ExPEC 的来源。

参 考 文 献

[1] Smith J L, Fratamico P M, Gunther N W. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli[J]. Foodborne Pathog Dis, 2007, 4(2): 134-163.

[2] Sandrina S P, James J M, Judith B W. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic Esch erichia coli DNA during course of infection [J]. Journal of clinical microbio logy, 1995, 33(5): 1054-1059.

[3] Alikhani M Y, Mirsalehian A, Aslani M M. Detection of typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea[J]. Journal of Medical Microbiology, 2006, 55(9): 1159-1163.

[4] Watabe M, Hogg G M, Millar B C, et al. Epidemiological study of E. coli O157:H7 isolated in Northern Irel and using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [J]. The Ulster Medical Society, 2008, 77(3): 168-174.

[5] Adhami E W, Roberts L A, Vickery B, et al. Epidemiological analysis of a methicillin resistant Staphylococcus aureus outbresk using restriction fragment length polymorphisms of genomic DNA[J]. J Gen Microbiol, 1991, 137(12): 2713-2720.

[6] Durant L, Metais A, Soulama-Mouze C, et al. Identification of candidates for a subunit vaccine against extraintestinal pathogenic Escherichia coli[J]. Foodborne Pathog Dis, 2007, 4(2): 134-163.

[7] Guidoni E B, Dalpra V A, Figueiredo P M, et al. *E.coli* virulence factors in children with neurogenic bladder associated with bacteriuria[J]. Pediatr Nephrol, 2006, 21(3): 376-381.

[8] Mandal P, Kapil A, Goswami K, et al. Uropathogenic Escherichia coli causing urinary tract infections[J]. Indian J Med Res, 2001, 114: 207-211.

[9] Tsukamoto T. PCR method for detection of K1 antigen and serotypes of Escherichia coli isolated from extraintestinal infection[J]. Kansenshogaku Zasshi, 1997, 71(2): 125-129.

[10] Terai A, Yamamoto S, Mitsumori K, et al. Escherichia coli virulence factors and serotypes in acute bacterial prostatitis [J]. Int J Urol, 1997, 4(3): 289-294.

[11] Dalmau D, Navarro F, Mirelis B, et al. Escherichia coli bacteraemia. Serotype O15:K52:H1 as a urinary pathogen[J]. J Hosp Infect, 1996, 34(3): 233-234.

[12] Blanco M, Blanco J E, Alonso M P, et al. Virulence factors and O groups of Escherichia coli strains isolated from cultures of blood specimens from urosepsis and non-urosepsis patients [J]. Microbiologia, 1994, 10(3): 249-256.

[13] Czirók E, Herpay M, Milch H, et al. Computerized complex typing of Escherichia coli strains from differrent clinical materials[J]. Acta Microbiol Hung, 1993, 40(3): 217-237.

[14] Siitonen A, Takala A, Ratiner Y A, et al. Invasive Escherichia coli infections in children: bacterial characteristics in different age groups and clinical entities[J]. Pediatr Infect Dis J, 1993, 12(7): 606-612.

[15] Falbo V, Famiglietti M, Caprioli A, et al. Gene block encoding production of cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin in Escherichia coli isolates from extraintestinal infections[J]. Infect Immun, 1992, 60(6): 2182-2187.

[16] 石宝平，方宗君，陈 燕. 呼吸内科病房感染病原菌与相关因素分析[J]. 中华现代内科学杂志，2005，2(6)：494-496.

[17] 何卫平，王慧芬. 83 例医院感染败血症致病菌谱及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志，2003，13(6)：570-571.

[18] Russo T A, Johnson J R. Medical and economic impact of extrain testinal infections due to Escherichia coli: focus on an increasingly important endemic problem[J]. Microbes Infect, 2003, 5(5): 449-456.

[19] Brauner A, Kaijser B, Wretlind B, et al. Characterization of Escheric hia coli isolated in blood, urine and faeces from bacteraemic patients and possible spread of infection[J]. APMIS, 1991, 99(4): 381-386.

[20] Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, et al. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(10): 3366-3376.

[21] 闻玉梅. 现代医学微生物学[M]. 上海：上海医科大学出版社，1999.299.

[22] Fakhr M K, Nolan L K, Logue C M, et al. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing salmonella enterica serovar typhinurium[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5): 2215-2219.

(责任编辑：冉明会)