

我国腹泻病患者和家畜家禽粪便标本中携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌的调查

程伯鯤 崔树玉 温宪芹 姜桂香 李连青 刘巧突 赵斌秀 叶长芸 徐建国

【摘要】 目的 了解携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌在我国腹泻病患者粪便标本、动物粪便标本及部分食品标本中的存在情况和所致腹泻病的临床特征。方法 使用菌落原位杂交、DNA 打点杂交和 PCR 扩增等方法。结果 在各地送检的从腹泻病患者粪便标本中分离到的、用常规方法不能鉴定的大肠杆菌中,均检出带有小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌菌株,检出率为 27.05% (436/1 612)。从市售食品标本中分离的大肠杆菌中,携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌的检出率为 10.23% (9/88)。从家畜家禽粪便中分离的大肠杆菌中,携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌检出率为 5.71% (16/280)。携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌所致腹泻的典型临床表现为食欲不振、腹痛、寒战乏力、正常体温或低热、每日腹泻多在 6 次以上、多为粘液便。结论 携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌在我国分布广泛,检出率高于其他几类致泻性大肠杆菌,对我国人民的健康是一个潜在的威胁。

【关键词】 致泻性大肠杆菌;耶尔森氏菌;毒力岛;腹泻

Detection of *Escherichia coli* strains harboring pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica* in diarrheal patients and animals in China CHENG Bokun*, CUI Shuyu, WEN Xianqin, et al. *Priority Laboratory of Molecular Medical Bacteriology, Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To investigate the prevalence of *Escherichia coli* strains harboring high pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica* in diarrhea patients, animals, food samples and resulted clinical symptoms. **Methods** Colony hybridization, DNA dot hybridization and polymerase chain reaction (PCR) were used. **Results** HPI-harboring *E. coli* were found in the strains isolated in various provinces of China. The isolation rates were 27.05% (436/1 612) in the strains isolated from diarrhea patients, 10.23% (9/88) in the strains isolated from food samples and 5.71% (16/280) in the strains isolated from feces of cattle and pigs. Typical clinical symptoms of diarrhea caused by HPI-harboring *E. coli* were inappetency, abdominal pain, shiver and vapidty. Patient's temperature was usually normal or low. Over six episodes of diarrhea was frequently observed, of which most were unformed stools with mucous. **Conclusion** *E. coli* strains harboring high-pathogenicity-island of *Yersinia* species were frequently isolated from diarrhea patients, animals and food samples as well, which might be one of the major causes of diarrhea in China.

【Key words】 Diarrhea genic *E. coli*; *Yersinia enterocolitica*; Pathogenicity island; Diarrhea

毒力岛是医学细菌学领域近年来出现的一个新

名词^[1]。毒力岛的两侧具有重复序列、整合酶或插入元件, DNA G+C 克分子百分比及密码使用与宿主有明显差异,可能是外源性的。一种病原菌可具有多个毒力岛^[1]。毒力岛的发现使水平性的基因转移可能会导致新的病原性细菌产生的学说得到广泛的支持。

1998 年 Schubert 等^[2]报道在一部分粘附性大肠杆菌(entero-adherent *E. coli*, EAEC)中具有小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI (high pathogenicity

基金项目:国家自然科学基金杰出青年基金资助项目(39625001),国家重点基础研究发展规划项目(G1999054101)

作者单位:102206 北京 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 卫生部医学细菌学重点实验室(程伯鯤、赵斌秀、叶长芸、徐建国);山东省卫生防疫站(崔树玉、温宪芹);沈阳市卫生防疫站(姜桂香);山西省儿童医院(李连青);湖南省安仁县卫生防疫站(刘巧突)

island) 毒力岛的 *irp-2* 基因等, 比例高达 93%, 而在致病性大肠杆菌(entero-pathogenic *E. coli*, EPEC)、出血性大肠杆菌(entero-heamorrhagic *E. coli*, EHEC)、产毒性大肠杆菌(enterotoxingenic *E. coli*, ETEC) 及志贺氏菌等菌株中极少发现, *irp-2* 基因。在我们实验室发现和命名的肠产志贺样毒素且具侵袭力的大肠杆菌(entero-SLTs-producing and invasive *E. coli*, ESIEC)^[3,4] 菌株中也有一部分具有小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的基因。

我们以小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的 *irp-2* 基因作为探针, 对从各地腹泻病患者粪便标本、动物粪便标本、食品标本等分离的、使用常规血清学和生化方法不能鉴定的大肠杆菌菌株进行了检测, 并对其所引起的腹泻的临床表现进行了分析, 现将结果报道如下。

材料与方法

1. 菌株来源: 本试验所检测的大肠杆菌菌株包括 3 部分。从腹泻病患者粪便标本分离的大肠杆菌来源于北京市、辽宁省沈阳市、湖南省安仁县、山东省、浙江省杭州市、新疆维吾尔自治区、重庆市涪陵区及山西省; 从动物粪便标本分离的大肠杆菌来源于辽宁省沈阳市、新疆维吾尔自治区、北京市及重庆市涪陵区; 从市售食品分离的大肠杆菌来源于辽宁省沈阳市及北京市。上述菌株与 ESIEC 初筛血清发生凝集, 为可疑 ESIEC 菌株。使用常规血清学方法证明不属于 ETEC、EPEC、EIEC、EHEC。

2. 菌株分离: 各地从腹泻病患者和家畜家禽粪便标本和市售食品标本中分离的大肠杆菌, 使用 EPEC、EHEC、EIEC、ETEC 诊断血清不能够鉴定的大肠杆菌, 属于这次调查的范围。部分分离菌株与 ESIEC 初筛血清发生凝集反应。

3. 主要试剂: 地高辛标记和检测试剂盒, 购自德国宝灵曼公司。Taq DNA 聚合酶, 购自上海生工公司。dNTP 购自美国 Promega 公司。硝酸纤维素膜, 购自北京化工学校附属工厂。ESIEC 初筛血清, 由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所制备。

4. *irp-2* 基因 PCR 引物^[2]: 由上海生工公司合成, 序列为:

5' AAGGATTCGCTGTTACCGGAC 3'

5' TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT 3'

5. PCR 方法: 参照文献[5]进行。*irp-2* 基因

PCR 反应循环参数: 预变性 94℃ 5 min, 变性 94℃ 1 min, 退火 62℃ 1 min, 延伸 72℃ 1 min, 30 个循环, 最后一个循环 72℃ 延伸 5 min。

6. PCR 产物的纯化及回收: 使用 QIAgene 公司的切胶回收试剂盒, 按说明书进行。

7. 探针的标记及菌落原位杂交: 操作方法参见文献[5]及 Boenringer Mannheim 公司 DIG 标记及检测试剂盒说明书。

结 果

1. 以 PCR 合成的 *irp-2* 基因为探针, 使用菌落原位杂交方法对所收集的菌株进行了小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的检测。从腹泻病患者粪便标本、动物粪便标本及市售食品中分离的, 用常规血清学和生化方法不能鉴定的大肠杆菌中携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌的检测结果见表 1 至表 3。

表1 从腹泻病患者粪便标本中分离的携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌的检出率

菌种来源	检 测 标本数	<i>irp-2</i> 基因阳性	
		菌株数	阳性率(%)
北京市 ESIEC 菌株	61	20	32.78
辽宁省沈阳市腹泻病患者 粪便标本	51	7	13.72
湖南省安仁县腹泻病患者 粪便标本	488	99	20.28
山东省腹泻病患者粪便标本	176	42	23.86
新疆维吾尔自治区腹泻病患者 粪便标本	147	12	8.16
重庆市涪陵区腹泻病患者 粪便标本	16	2	12.50
浙江省杭州市腹泻病患者 粪便标本	262	114	43.51
山西省儿童医院腹泻病患者 粪便标本	411	140	34.06
合 计	1 612	436	27.05

2. 携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌所致腹泻病临床症状的调查结果: 我们选择了山东省和湖南省的 *irp-2* 基因杂交阳性菌株相应的腹泻病患者的流行病学调查表, 对其临床症状进行了分析, 结果发现携带小肠结肠炎 HPI 毒力岛的大肠杆菌所致 128 例腹泻病人的临床症状主要有: 食欲不振(64.06%), 腹痛(50.78%), 寒战乏力(55.47%), 正常体温(47.66%) 或低热(28.12%), 日腹泻 6 次以上者居多(50.79%), 腹泻便的主要类

型为粘液便(48.43%)。

表2 从动物粪便标本分离的携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌的检出率

菌株分离地区	标本来源	检测菌株数	<i>irp-2</i> 基因阳性	
			菌株数	阳性率(%)
辽宁省沈阳市	牛粪	9	1	11.11
	猪粪	56	7	12.50
	鸡粪	6	0	0.00
	鸭粪	17	0	0.00
	小计	88	8	9.09
北京市	猪粪	14	0	0.00
	鸡粪	12	0	0.00
	小计	26	0	0.00
重庆市涪陵区	牛粪	24	0	0.00
	猪粪	38	3	7.89
	鸡粪	1	0	0.00
	鸭粪	1	0	0.00
小计	64	3	4.69	
新疆维吾尔自治区	不详	102	5	4.90
合计		280	16	5.71

表3 从市售食品中分离的携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌的检出率

菌株分离地区	标本来源	检测菌株数	<i>irp-2</i> 基因阳性	
			菌株数	阳性率(%)
辽宁省沈阳市	牛肉	4	1	25.00
	猪肉	21	1	4.76
	鸡肉	2	0	0.00
	牛奶	9	0	0.00
	小计	36	2	5.56
北京市	牛肉	16	4	25.00
	猪肉	14	2	14.29
	鸡肉	9	0	0.00
	牛奶	7	0	0.00
	汉堡肉饼	6	1	16.67
小计	52	7	13.46	
合计		88	9	10.23

3. 与 *irp-2* 基因探针杂交的菌株的 *ipaB* 基因的检测:根据文献报道^[2]约 27% 左右的 EIEC 与 *irp-2* 基因探针杂交呈阳性反应,为排除与 *irp-2* 探针杂交呈阳性反应的所检菌株为 EIEC 的可能性,我们以 EIEC 及志贺氏菌特异的 *ipaB* 基因作为探针与上述菌株进行杂交。在所有与 *irp-2* 探针杂交呈阳性反应的菌株中,与 *ipaB* 探针杂交同时为阳性的菌株我们认为是 EIEC,不包括在上述表 1 至表 3 的结果中。

讨 论

小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛位于染色

体上,大小为 45 kb。该毒力岛主要的结构基因为 *irp2*、*irp1* 和 *fyuA*。*irp2* 和 *irp1* 编码两种高分子量蛋白 HMWP2 和 HMWP1,*fyuA* 编码鼠疫菌素受体。毒力岛的存在与耶尔森氏菌的毒力有关^[2,6]。Schubert^[2]等发现在一部分粘附性大肠杆菌中存在着小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛,启发我们检测用常规血清学和生化方法不能鉴定的大肠杆菌中是否存在着该毒力岛。

在各地送检的从腹泻病患者粪便标本中分离的大肠杆菌中,均检出携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌。这类大肠杆菌所致的腹泻病的临床症状因少有脓血便和里急后重,不同于 EIEC 和志贺氏菌所致腹泻;因少见鲜血便而不同于 EHEC 所致腹泻;因其腹泻便多为粘液便,区别于 ETEC 引起的主要以水样便为特征的腹泻;患者多为正常体温或低热,区别于 EPEC 引起的腹泻多有发热和呕吐,也不同于由 EA_ggEC 引起的小儿顽固性腹泻。

我们还在猪和牛的粪便及猪肉、牛肉和汉堡肉饼中检测到携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌,说明家畜家禽可能是这一类致泻性大肠杆菌的宿主,其潜在的流行病学意义不容忽视。从上述结果中可见带有小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌是一类值得引起重视的新的腹泻病原菌,它在我国的分布广泛,检出率高于其他几类致泻性大肠杆菌,对我国人民的身体健康是一种潜在的巨大的威胁,值得我们进一步研究。

EAEC 是指对 HE_p-2 细胞具有粘附作用的大肠杆菌,其中对 HE_p-2 细胞呈集聚性粘附的大肠杆菌被命名为肠集聚性粘附大肠杆菌(Enterocaggregative *E. coli* EA_ggEC)^[7]。EAEC 毒力因子的研究尚不深入,其命名有待于商榷。我们所检出的这一类携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌与 EA_ggEC 的特异性 DNA 探针不杂交,不属于 EA_ggEC。根据其携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的特点,我们暂时将其称为携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌。我们发现一部分 ESIEC 菌株携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛,鉴于在有些产志贺毒素的大肠杆菌中也检测到 HPI 毒力岛^[8],ESIEC 和携带小肠结肠炎耶尔森氏菌 HPI 毒力岛的大肠杆菌的毒力因子和两者之间的关系还有待于进一步的研究。

(向为本研究提供菌株和资料的杭州市卫生防疫站潘勤草、重庆涪陵区卫生防疫站李优良、新疆维吾尔自治区卫生

防疫站杨珊及北京市卫生防疫站陈倩等同志致以衷心感谢)

参 考 文 献

- 1 徐建国. 毒力岛和细菌毒力的进化. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999, 19:1-9.
- 2 Schubert S, Rakin A, Karch H, et al. Prevalence of the " High - Pathogenicity Island " of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to human. Infect Immun, 1998, 66:480-485.
- 3 Jian - Guo Xu, Bo - Kun Cheng, Yan - Ping Wu, et al. Adherence patterns and DNA probe types of *Escherichia coli* isolated from diarrheal patients in China. Microbiol Immunol, 1996, 40:89-97.
- 4 徐建国 程伯鲲 吴艳萍, 等. 产志贺样毒素且具侵袭力的大肠杆

菌的研究. 中华流行病学杂志, 1994, 15:333-338.

- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2nd ed. Cold spring harbor laboratory press. 1989. 672-688.
- 6 Carniel E, Guilvout I, Prentice M. Characterization of a large chromosomal " high - pathogenicity island " in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. J Bacteriol, 1996, 178:6743-6751.
- 7 Nataro J, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1998, 11:142-201.
- 8 Karch H, Schubert S, Zhang D, et al. A genomic island, termed high - pathogenicity island, is present in certain non - O157 shiga toxin - producing *Escherichia coli* clonal lineages. Infect Immun, 1999, 67:5994-6001.

(收稿日期 :1999 - 12 - 20)