

太原地区携带 OI-28 毒力基因组岛致泻大肠埃希菌性小儿腹泻

李连青 黄永峰 戎建荣 武素梅 刘小玉 朱庆义 徐建国

【摘要】 目的 探讨携带 OI-28 毒力基因组岛致泻大肠埃希菌在小儿腹泻中的病原学作用。方法 在山西省儿童医院采集 257 例腹泻患儿粪便,做肠道病原菌常规培养和致泻大肠埃希菌血清学分型鉴定,用 PCR 和 DNA 斑点杂交检测致泻大肠埃希菌 EHEC OI-28 毒力基因组岛中与 RTX 相关的 5 个毒力基因。结果 257 例腹泻患儿检出病原菌 206 株(80.16%)。其中大肠埃希菌 149 株(57.98%),其他肠道致病菌 57 株(22.18%)。血清分型检出致泻大肠埃希菌 EPEC 3 株(2.01%)、ETEC 2 株(1.34%)、EHEC 2 株(1.34%),其余 142 株为“疑似致泻大肠埃希菌”(55.25%)。149 株大肠埃希菌中 OI-28 5 个基因全阳性者 21 株(14.09%),1 个基因阳性者 8 株(5.37%),2 个基因阳性者 2 株(1.34%)。21 例携带 OI-28 毒力基因组岛大肠埃希菌感染的腹泻患儿,以 3 岁以下小儿为主(80.95%)。结论 携带 OI-28 毒力基因组岛大肠埃希菌是夏季小儿腹泻的重要病原菌之一。

【关键词】 OI-28 毒力基因组岛; 致泻大肠埃希菌; 小儿腹泻

Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* harboring genomic O island 28 isolated from children diarrhea in Taiyuan LI Lian-qing*, HUANG Yong-feng, RONG Jian-rong, WU Su-mei, LIU Xiao-yu, ZHU Qing-yi, XU Jian-guo. *Shanxi Clinical Laboratory Center, Taiyuan 030012, China
Corresponding author: ZHU Qing-yi, Email: qingyi@kingmed.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the etiologic value of diarrheagenic *E. coli* harboring genomic O island 28(OI-28) containing five putative virulence genes(Z0608, Z0609, Z0615, Z0634 and Z0635), which were related to RTX (Repeat in toxin) toxin family isolated from children with diarrheal disease in Taiyuan. **Methods** In the study, 257 fecal samples from children with diarrheal disease collected in Shanxi Children's Hospital. Diarrheagenic *E. coli* and enteropathogenic bacteria were isolated and identified by conventional bacterial culture and typing specific diarrheagenic *E. coli* (EPEC, EIEC, ETEC and EHEC) diagnostic serum, while diarrheagenic *E. coli* harboring genomic OI-28 containing five putative virulence genes (Z0608, Z0609, Z0615, Z0634 and Z0635) were detected by PCR and DNA southern blot hybridization. **Results** 206 strains(80.16%) of enteropathogenic bacteria were detected from 257 children with diarrhea disease, containing 149 strains(57.98%) of diarrheagenic *E. coli* and 57 strains(22.18%) of other entero-pathogenic bacteria. Among 3 strains(2.01%) of EPEC, 2 strains(1.34%) of ETEC, 2 strains(1.34%) EHEC were detected by typing specific serum, while all of the 142 strains(95.30%) isolated were suspected to be diarrheagenic *E. coli*. 21 strains(14.09%) of diarrheagenic *E. coli* harboring genomic OI-28 containing five putative virulence genes (Z0608, Z0609, Z0615, Z0634 and Z0635) were detected by polymerase chain reaction and DNA southern blot hybridization, 8 strains (5.37%) of diarrheagenic *E. coli* containing only one genomic OI-28 virulence gene, 2 strains(1.34%) of diarrheagenic *E. coli* containing two genomic OI-28 virulence gene. 21 children with diarrhea diseases caused OI-28-harboring *E. coli* containing five important putative virulence genes were among 0 to 3 years old (80.95%). These children correlating with OI-28-harboring *E. coli* did not present special clinical symptoms or signs. **Conclusion** The diarrheagenic *E. coli* harboring genomic OI-28 was one of the important etiology for children with diarrheal disease in summer season.

【Key words】 Genomic O island 28; Diarrheagenic *E. coli*; Children diarrhea

肠出血性大肠埃希菌(EHEC)O157:H7 可引起

出血性肠炎(HC)和溶血性尿毒综合征(HUS),目前缺乏有效的治疗手段,已成为世界性的公共卫生问题。EHEC 的致病性主要是由于其含有多个毒力基因组岛;如 *LEE* 毒力因子、*stx* (志贺毒素)、*hly* (溶血素)等所引起的。2001 年 Perna 等发表了 EHEC

基金项目:山西省科学技术厅科研攻关项目(041075)

作者单位:030012 太原,山西省临床检验中心(李连青、黄永峰、戎建荣、刘小玉);山西省儿童医院(武素梅);广州金城医学检验中心(朱庆义);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(徐建国)

通讯作者:朱庆义,Email:qingyi@kingmed.com.cn

O157:H7 菌株 EDL933 毒力基因组全序列,与非致病性大肠埃希菌 K-12 菌株 MG1655 全基因组序列进行比较,在 MG1655 中存在,EDL933 中不存在的基因组命名为“K”岛(K-islands),EDL933 独有的基因组叫做“O”岛(O-islands)。在 177 个 O 岛中有 47 个相对分子质量 > 5 kb,是与细菌毒力、代谢、适应力等有关的毒力基因组。其中 OI-28 基因组(genomic O island 28)序列全长 24 956 bp,由 5 个功能未知的基因(Z0608, Z0609, Z0615, Z0634, Z0635)构成^[1]。国内徐建国等发现在 82 株携带耶尔森菌 HPI 毒力基因组 *irp2* 基因的大肠埃希菌中有 29 株菌携带 OI-28 毒力基因组,阳性率为 35.4%。产志贺毒素(*stx*)的 O157:H7 大肠埃希菌具有这个毒力基因组,不产生 *stx* 的 O157:H7 大肠埃希菌,没有这个毒力基因组,提示 OI-28 基因组可能与细菌毒力有关^[2]。为了解携带 OI-28 毒力基因组致泻大肠埃希菌在太原地区小儿腹泻中的病原学地位及其分布情况,我们对这些与腹泻相关的大肠埃希菌进行研究,报告如下。

材料与方 法

1. 标本来源:2003 年 7-8 月在山西省儿童医院腹泻门诊和住院患儿 257 例,年龄 15 岁以下,急性发病,病程不超过 2 周,24 h 内出现 3 次及以上稀便、水样便、血便或其他粪便性状改变者。填写腹泻病个案调查表,同时用无菌采便器采集患儿粪便标本,立即送检。

2. 细菌分离培养与鉴定:按肠道病原菌常规方法培养。营养琼脂、麦康凯琼脂购自杭州天和微生物试剂有限公司,SS 琼脂购自军事医学科学院微生物流行病研究所,细菌微量生化鉴定系统(API)和氧化酶试剂购自法国生物-梅里埃公司;肠致病性大肠埃希菌(EPEC)和肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC)诊断血清购自兰州生物制品研究所,EHEC 诊断血清购自中国药品生物制品检定所,肠产毒性大肠埃希菌(ETEC)诊断血清购自成都生物制品研究所。

3. PCR 和 DNA 杂交试验:

(1) 试验菌株:参考菌株 EHEC(O157:H7/EDL933/ATCC 700927)、EPEC(O127:H6, E2348/69)、ETEC(O78:H11, 10407, ATCC 31703)、EIEC(44825)、EAggEC(042)作为阳性对照;MG1655(K12 / ATCC 47076)作为阴性对照,由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供。试验菌株:149

株大肠埃希菌为本室从腹泻患儿分离经形态学和血清学鉴定。

(2) PCR 引物设计和合成:根据 GenBank 公布的 EHEC O157:H7 EDL933 基因组全序列,参照参考文献[3-6]应用 Primer premier 5.0 软件,设计和合成 8 对致泻大肠埃希菌毒力基因鉴定和 5 对 OI-28 毒力基因组测定引物,由上海生物工程公司合成(表 1、2)。

表1 致泻大肠埃希菌毒力基因岛测定引物

目的基因	引物序列(5'~3')	扩增片段(bp)	Tm(℃)
ETEC			
<i>st</i>	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG CTT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATT AC	150	52
<i>lt</i>	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC	696	60
EPEC			
<i>eaeA</i>	TAC ATT GAC TCC CGC TTT ACG CTT TGG CTT CCG CTA TGC TGA	770	60
<i>eaf</i>	CAG GGT AAA AGA AAG ATG ATA A TAT GGG GAC CAT GTA TTA TCA	400	60
<i>eaeB</i>	CAG GTC GTC GTG TCT GCT AAA TCA GCG TGG TTG GAT CAA CCT	1087	54.3
<i>slt1</i>	TGG AAA AAC TCA GTG CCT CT CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC	227	50
EIEC			
<i>ipaH</i>	TGG AAA AAC TCA GTG CCT CT CCA GTC CGT AAA TTC ATT CT	423	55
EAggEC			
<i>plasmid</i>	CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T	227	50

注: *st*: ETEC 热稳定毒素; *lt*: ETEC 热不稳定毒素; *eaeA*: EPEC 黏附抹平基因(编码紧密素); *eaf*: EPEC 黏附相关基因; *eaeB*: O157:H7 特异性黏附基因; *slt1*: EHEC 志贺样毒素 1; *ipaH*: EIEC 侵袭相关基因; *plasmid*: EAEC 质粒基因

表2 致泻大肠埃希菌 OI-28 毒力基因组岛鉴定引物

目的基因	引物序列(5'~3')	扩增片段(bp)	Tm(℃)
Z0608	CTT ACG CCA GTC AGC ACA GT GAC CCA GCC ATC ATA ATT GG	457	55.6
Z0609	ACA CCA TCG CTC AGG ACA AC CTG CAC GGT AGT GGT AAA AC	737	56.8
Z0615	ATT ACC CAT CCG CTG ACT GT CTG ATA GTG CTG ACC GAG AG	956	58.4
Z0634	CCA TTC TTC CTG CTG TTT GT GCT GCC CGA TAC TGA TGT T	787	56.5
Z0635	TGC TGA AAG TGC GAA TGT GTT ACC GCT GTG ATG CTG	960	55.2

(3) DNA 模板提取:刮取单菌落,加 150 μl 三蒸水悬菌,煮沸 10 min, 12 000 × g 离心 10 min, 取上清即为模板 DNA, -20℃ 保存备用。

(4) PCR 程序:反应条件为 94℃ 预变性 5 min,

94℃ 1 min, 50~60℃ 1 min(参照表 1、2 所示), 72℃ 1 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.5%~2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 0.5 μg/ml 溴化乙锭染色, 凝胶成像检测仪 (Gel Doc 2000, Bio-Rad) 观测并记录结果。

(5)DNA 纯化与探针标记: QIA gene 公司的切胶回收试剂盒进行纯化和回收。作探针标记, 用 DIG DNA 标记和检测试剂盒 (德国 Boehringer-Mannheim 公司) 制备 DNA 探针 (按试剂盒说明书操作)。

(6)DNA 斑点杂交: 取上述制备的 DNA 模板 2 μl 按顺序点膜, 自然晾干, 置紫外灯下照 5-10 min, 80℃ 烘箱中固定 2 h, 然后进行预杂交和杂交, 将膜放入标准杂交液中 (20 ml/100 cm²) 68℃ 孵育 2 h, 倒掉预杂交液; 将探针煮沸 10 min 变性、冷却, 加入杂交液, 置 68℃ 16 h, 杂交后洗膜、显色, 观测结果。

4. 统计学分析: 将数据用 SPSS 统计软件进行统计分析。

结 果

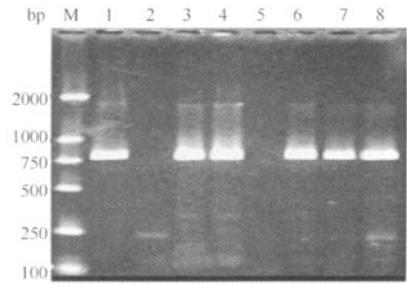
1. 致泻大肠埃希菌检测结果: 257 例腹泻病患儿童粪便标本共检出病原菌 206 株, 检出率为 80.16%。其中大肠埃希菌 149 例 (57.98%), 其他肠道致病菌 57 例 (22.18%), 提示大肠埃希菌仍然是夏季小儿腹泻 (尤其是 3 岁以下小儿) 的重要病原菌之一。根据血清分型, 大肠埃希菌中 EPEC 3 株 (2.01%)、ETEC 2 株 (1.34%)、EHEC 2 株 (1.34%), EIEC 未检出, 其余均为“疑似致泻大肠埃希菌” (55.25%)。

2. 致泻大肠埃希菌毒力岛基因检测结果:

(1) *eaeA* 和 *plasmid* 毒力岛基因检测结果: 149 株腹泻患者分离的大肠埃希菌, 使用 PCR 和 DNA 斑点杂交检测 5 类致泻大肠埃希菌毒力基因组岛, 结果 15 株检出携带 *eaeA* 和 *plasmid* 毒力基因组岛 (10.07%)。其中 5 株检出 EPEC *eaeA* 毒力岛基因, 10 株检出 EAggEC *plasmid* 毒力岛基因, 其余 6 个毒力岛基因未检出 (表 3), 图 1~4。

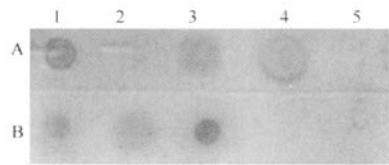
(2) OI-28 毒力基因组岛检测结果: 149 株腹泻患者分离的大肠埃希菌, 使用 PCR 和 DNA 斑点杂交检测 OI-28 毒力基因组岛 5 个基因。其中 21 株大肠埃希菌 5 个毒力基因均阳性, 8 株只检出 OI-28 5 个毒力基因组岛中的 1 个基因, 2 株检出 2 个

毒力基因, 若 PCR 与 DNA 杂交结果不符, 以杂交结果为准 (表 4, 图 5)。



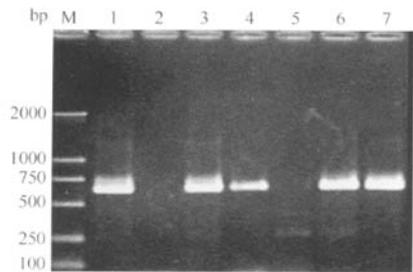
M: Marker DL2000; 1: 阳性对照 EHEC(O157:H7 EDL933); 2: 阴性对照大肠埃希菌 (MG1655); 3~8: 致泻大肠埃希菌 13、25、79、116a、160、195

图1 致泻大肠埃希菌 *eaeA* 毒力基因组岛 PCR 检测结果



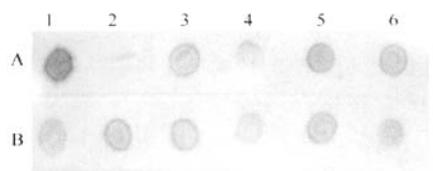
A1: 阳性对照 EHEC(O157:H7 EDL933); A2: 阴性对照大肠埃希菌 (MG1655); A3~5: 致泻大肠埃希菌 13、25、79; B1~3: 致泻大肠埃希菌 116a、160、195

图2 致泻大肠埃希菌 *eaeA* 毒力基因组岛打点杂交结果



M: Marker DL2000; 1: 阳性对照 O42; 2: 阴性对照大肠埃希菌 MG1655; 3~7: 26、69、72、73、74

图3 致泻大肠埃希菌 *plasmid* 毒力基因组岛 PCR 检测结果



A1: 阳性对照 EHEC (O157:H7 EDL933); A2: 阴性对照大肠埃希菌 (MG1655); A3~6: 致泻大肠埃希菌 26、69、73、74; B1~6: 致泻大肠埃希菌 118、119、128、190、193、W4

图4 致泻大肠埃希菌 *plasmid* 毒力基因组岛打点杂交结果

表3 149 株大肠埃希菌毒力基因组岛检测结果

试验大肠埃希菌编号	菌株数	ETEC		EPEC		EHEC		EIEC	
		<i>lt</i>	<i>st</i>	<i>eaf</i>	<i>eaeA</i>	<i>stx1</i>	<i>eaeB</i>	<i>lpaH</i>	<i>plasmid</i>
13,25,116a,160,195	5	-	-	-	+	-	-	-	-
26,69,73,74,118,119,128,190,193,W4	10	-	-	-	-	-	-	-	+

表4 149 株大肠埃希菌 PCR 和 DNA 杂交检测 OI-28 毒力岛基因结果

试验大肠埃希菌编号 检测菌株(菌株数)	OI-28 毒力岛基因组				
	Z0608	Z0609	Z0615	Z0634	Z0635
5,10,19,32,38,39,43,49,59, 107,108,109,120,127,142, 144,188,192,197,233,S19 (21)	+	+	+	+	+
114,152,191(3)	+	-	-	-	-
150,182(2)	-	-	-	+	-
51(1)	-	-	+	-	-
186(1)	-	+	-	-	-
227(1)	-	-	-	-	+
185(1)	-	+	-	-	+
210(1)	+	+	-	-	-

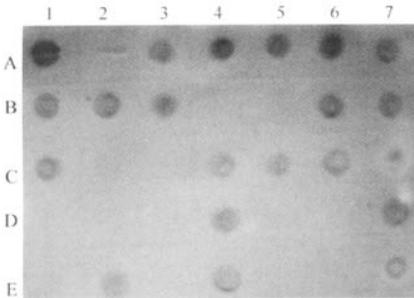


图5 部分病原菌 Z0608 基因打点杂交检测结果
A1:阳性对照 EHEC(O157:H7 EDL933); A2:阴性对照大肠埃希菌(MG1655); A3~7:致泻大肠埃希菌 5,19,32,38,39; B1~7:43,49,59,82,98,107,108 菌株; C1~7:109,112,114,120,127,142,144 菌株; D1~7:152,185,186,188,191,192,197 菌株; E1~7:210,233,W13,S8,S19,9,10 菌株

图5 部分病原菌 Z0608 基因打点杂交检测结果

3. 携带OI-28毒力基因组岛大肠埃希菌小儿腹泻临床特征:本组共调查腹泻患儿 257 例,男性 146 例(56.81%),女性 111 例(43.19%)。年龄0~1 岁 200 例(77.82%),1~3 岁 27 例(10.51%),3~6 岁 15 例(5.84%),6~15 岁 15 例(占5.84%)。调查结果表明,在 21 例携带OI-28毒力基因组岛大肠埃希菌腹泻患者中,男女病例相近,3 岁以下儿童为易感人群。经统计学分析,21 名患者的临床症状和体征与其他“疑似致泻大肠埃希菌”相关腹泻患儿的临床症状和体征比较,差异无统计学意义(表 5)。

表5 携带OI-28毒力基因组岛与其他疑似致泻大肠埃希菌患儿临床特征比较

临床症状和体征	带菌患者例数(%)	
	OI-28 基因大肠埃希菌	其他疑似致泻大肠埃希菌
恶心	0	3(2.46)
呕吐	4(19.05)	19(15.57)
腹泻次数		
3~5	5(23.81)	41(33.89)
>5	16(76.19)	80(66.12)
粪便性状		
黏液样	11(52.38)	68(56.20)
水样	6(28.57)	20(16.53)
血样	0	16(13.22)
糊状	2(9.52)	19(15.70)
食欲不振	4(19.05)	23(19.01)
腹痛	1(4.76)	11(9.09)
乏力	1(4.76)	16(13.22)
头痛	0	2(1.65)
体温(℃)		
正常	16(76.19)	81(66.94)
37.4~37.9	0	11(9.09)
>37.9	3(14.29)	13(10.74)

讨 论

感染性腹泻是婴幼儿时期发病率极高的疾病之一,轻者可有发热、腹痛、腹泻、乏力、食欲低下,重者可出现水和电解质紊乱,引起脱水、酸中毒,甚至危及患儿生命。引起腹泻的病源种类繁多,有细菌、病毒、寄生虫等病原体,细菌性腹泻的发病高峰多在夏秋季节。本文对 2003 年 7~8 月山西省儿童医院腹泻病患儿,做了细菌学和临床症状的分析研究。致泻大肠埃希菌检出率达 57.98%,高于其他肠道致病菌(22.18%),提示致泻大肠埃希菌仍然是夏季儿童腹泻(尤其是 3 岁以下儿童)的重要病原菌之一,其中多数不能用现有的诊断血清鉴定,需采用现代分子生物学技术 PCR 和 DNA 斑点杂交法进行基因分型鉴定。

大肠埃希菌为正常肠道寄居菌,通常对人体无害,但其中某些菌株能够引起人类腹泻的,命名为致泻大肠埃希菌。现代细菌学分型方法分两类:表型分型和基因分型,各有其优缺点。根据 O、H、K 抗原不同,大肠埃希菌进行分类的方法是 Kauffman 及

其同工发展起来的,属于表型分型方法。现在已发现大肠埃希菌有 170 多个 O 血清型。随着现代分子生物学技术的发展,对于致泻大肠埃希菌根据其携带的毒力基因组岛,进行基因分型,决定其致病性,并用于致病机理的研究^[7]。本研究用 PCR 和 DNA 杂交法检测 149 株大肠埃希菌,检出 15 株携带毒力基因组岛致泻性大肠埃希菌。其中 5 株携带 EPEC *eaeA* 基因,10 株携带 EAggEC *plasmid* 基因。这 15 株病原菌均与致泻性大肠埃希菌诊断血清不凝集。而血清学方法鉴定为阳性的 9 株致泻大肠埃希菌,毒力岛基因检测却为阴性,因此,血清学分型鉴定不能代替毒力岛基因鉴定。说明血清学分型仍然是研究大肠埃希菌的一种有效方法,但却不能根据血清学研究结果而推论其遗传相关性和是否具有毒力基因。

DNA 和氨基酸检索结果提示 OI-28 的 Z0608 产物推测是外膜输出蛋白,Z0609 产物功能未知,Z0615 产物推测是 RTX 毒素家族外泌蛋白,Z0634 产物推测为胞浆膜输出蛋白,Z0635 产物推测为跨膜输出蛋白^[1]。RTX 毒素族是由部分革兰阴性菌所合成的毒素蛋白组成,包括细胞毒素、金属蛋白酶、脂肪酶和溶血素等。目前已知 RTX 毒素族有 20 多种毒素蛋白。RTX 毒素具有细胞和种属特异的溶血性、白细胞毒性和白细胞刺激性等作用^[8]。本研究根据 OI-28 的 5 个基因设计引物,这 5 个基因分别位于该岛左侧、中间和右侧,在某种意义上能够代表该岛。OI-28 5 个基因全为阳性的大肠埃希菌有 21 株(14.09%),有 8 株(5.37%)大肠埃希菌只检测到 OI-28 的 1 个基因,有 2 株大肠埃希菌(1.34%)只检测到 OI-28 的 2 个基因,说明这 5 个基因有成簇出现的趋势。并且 OI-28 基因组岛 G+C% 为 61.54%,而大肠埃希菌 G+C% 为 48%~52%,两者有差异,提示 OI-28 基因组岛可能是通过细菌间基因水平转移获得的外源性 DNA 片段,与细菌的

致病机制有关。基因在水平转移的过程中可以或多或少的丢失,通过缺失原有的一些基因或进行功能的调整,可以适当改变细菌的表型,使突变株在新的环境中能够适应选择压力而生存,谓致病适应性突变(patho-adaptive mutation)。这种突变能够推动条件致病菌在各种宿主环境扩散和生长过程中适应性进化^[9]。

参 考 文 献

- [1] Perna NT, Plunkett G III, Burland V, et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, 2001, 409(6819):529-533.
- [2] Xu JG, Cheng BK, Wen XQ, et al. High-pathogenicity island of Yersinia in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients in China. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(12):4672-4675.
- [3] Pabst WL, Altwegg M, Kind C, et al. Prevalence of Enteraggagative *Escherichia coli* among Children with and without Diarrhea in Switzerland. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(6):2289-2293.
- [4] Presterl E, Zwick RH, Reichmann S, et al. Frequency and virulence properties of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Gabon. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, 69(4):406-410.
- [5] Wick LM, Qi W, Lacher DW, et al. Evolution of Genomic Content in the Stepwise Emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol*, 2005, 187(5):1783-1791.
- [6] Nguyen TV, Van PL, Huy CL, et al. Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(2):755-760.
- [7] Zhu QY, Li LQ. Detection of High-pathogenicity island-harboring *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea disease. *Chin J Med Lab Techn* 2004, 5(4):253-256.
- [8] Lally ET, Hill RB, Kieba IR, et al. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol*, 1999, 7(7):356-361.
- [9] Kahali S, Sarkar B, Rajendran K, et al. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggagative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(9):4111-4120.

(收稿日期:2006-07-17)

(本文编辑:王多春)