

多重 PCR 对大肠杆菌的毒力基因分型与系统进化分类的研究

倪奕弘¹, 陈沿廷¹, 魏霜², James Chin³, 吴希阳¹

(1. 暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广东广州 510632) (2. 汕头市出入境检验检疫局, 广东汕头 515041)
(3. 伊丽莎白麦克阿瑟农业学院, 新南威尔士康登 2570)

摘要: 本文对不同来源大肠杆菌的毒力基因分布情况进行调查及系统进化分类, 探讨大肠杆菌的系统进化分类与毒力基因携带的关联。本研究针对引起人类和动物肠道内或肠道外疾病的 6 种病原型大肠杆菌的 47 个毒力基因, 采用多重 PCR 方法对 38 株大肠杆菌和 4 株志贺氏菌进行毒力基因的分布调查及系统进化分类。肠道致病大肠杆菌中携带其病原型标志毒力基因和多种肠外致病大肠杆菌的毒力基因; 非致病性大肠杆菌也携带某些肠外致病大肠杆菌的毒力基因, 但是两者都不含肠道致病大肠杆菌的毒力基因。对 42 株菌的系统进化分类结果表明, 大多数肠外致病大肠杆菌属于 B2 或 D。肠道临床菌株中大部分被归为 D (19.2%)、B1 (50.0%) 和 A (30.8%), 3 株非致病性菌株 DH5 α , BL-21 和 XL-10 属于 A。大肠杆菌毒力基因的携带和系统进化之间有很显著的联系, 肠道内与肠道外的感染与不同的毒力基因相关联。

关键词: 多重 PCR; 大肠杆菌; 系统进化分型; 毒力基因

文章篇号: 1673-9078(2014)3-38-42

Multiplex PCR Assays for *Escherichia coli* Phylogenetic Assignments and Virulence Gene Ownership

NI Yi-hong¹, CHEN Yan-ting¹, WEI Shuang², James Chin³, WU Xi-yang¹

(1. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

(2. Shantou Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shantou 515041, China)

(3. Elizabeth Macarthur Agriculture Institute, NSW Department of Primary Industries, Camden, NSW 2570, Australia)

Abstract: The relationship between different phylogroups and virulence genes of *E. coli* from various origins were identified. Forty-seven virulence genes (VGs) markers found in six pathotypes of *E. coli* known to cause intestinal and extra-intestinal disease in humans or animals were investigated. Multiplex PCR assays were used to screen 42 strains including clinical and commensal isolates for these virulence genes and assign the strains to phylogenetic group. Results showed that IPEC isolates possessed typical IPEC genes and some ExPEC genes. The non-pathogenic strains also possessed ExPEC genes. None of the ExPEC or non-pathogenic isolates harbored VGs typical for IPEC. The phylogenetic grouping of 42 isolates showed that most of the ExPEC strains belong to group B2 or D. Most of the intestinal clinical isolates were confined to groups D (19.2%), B1 (50.0%) and A (30.8%), Three non-pathogenic strains, DH5 α , BL-21 and XL-10, belonged to group A. This study indicated that the presence of virulence genes were closely related to phylogenetic groupings.

Key words: multiplex PCR; *Escherichia coli*; Phylogenetic grouping; virulence gene

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 的多样性和与人类的生物学相关性可分为三类: 非致病大肠杆菌, 这在正常人类粪便中占绝对多数; 肠道致病大肠杆菌 (Intestinal pathogenic *E. coli*, IPEC), 主要分布于环

收稿日期: 2013-10-22

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (S2012010008479); 广东省突发公共事件应急技术研究中心专项 ([2011]733)

作者简介: 倪奕弘 (1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全

通讯作者: 吴希阳 (1966-), 男, 博士, 教授

境和少数健康人肠道导致肠道疾病; 肠道外致病大肠杆菌 (Extraintestinal Pathogenic *E. coli*, ExPEC), 主要导致肠道外的感染。IPEC 还包括多种病原型, 如常见肠内致病的肠侵袭性大肠杆菌 (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC)、肠致病性大肠杆菌 (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC)、肠产毒性大肠杆菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)、肠出血性大肠杆菌 (Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC), 肠黏附性大肠杆菌 (Enteraggressive *E. coli*, EAEC) 等, 由于携带各自的毒力基因而具有

不同的致病机理。毒力因子的携带是区分病原菌和非病原菌的关键因素,目前区分不同病原型的方法是检测其是否携带某种特定的毒力基因,如 EHEC 的 *stx1*、*stx2* 和 *eaeA* 基因^[1], EPEC 的 *bfpA* 基因编码 EPEC 黏附因子和 LEE 毒力岛^[2]。但是病原菌的致病性不是由 1~2 个毒力基因单独决定的,这些病原菌是否还具有其它帮助细菌定殖和生存于宿主的“适应性基因”尚缺乏研究。由于大肠杆菌之间存在基因迁移,不同病原型之间的毒力基因转移会导致新型致病菌演化,2011 年德国爆发的“毒黄瓜”事件的主要病原菌 *E. coli* O104:H4 就是两类致病基因结合在一起的综合体,即来自 EHEC 的 *stx2* 致病基因和 EAEC 的鞭毛黏附基因 AAF/II^[3]。

本研究从已知能引起人类、动物肠道内或肠道外疾病的 *E. coli* 中,收集了 6 种病原型的 47 个毒力基因序列。运用多重 PCR 方法对 38 株大肠杆菌和 4 株志贺氏菌的这些毒力基因分布情况进行调查(包括 21 株分离自人肠道内的临床菌株,6 株分离自人肠道外的临床菌株,12 株人类和动物的共生菌和 3 株实验室菌株)。结合系统进化分类分析不同病原型的 *E. coli* 的毒力特征,以及系统进化分类与毒力基因携带的关联。

1 材料与方法

1.1 菌株和临床特性

本研究的 42 株菌株包括 38 株大肠杆菌和 4 株志贺氏菌分离株(见表 1)。其中 21 株 *E. coli* 分离自腹泻或溶血-尿毒症综合征(HUS)患者的直肠(1-21 号,分别为 DES H1、DES B1、DES H24、DES H7、DES A1、DES H14、DES H8、DES H19、Ont:H-、DES 1644、DES 1643、5485、2665、9090(1)、5480、5483、7413、5768、8469、9983、2766),5 株分离自女性泌尿道感染(UTI)的尿液(22 号 8982,23 号 1616,24 号 8985,25 号 5584,26 号 8990),2 株来自 *E. coli* reference (ECOR) collection (27 号 ECOR60,28 号 ECOR68),6 株是人类粪便分离株(29 号 DG1-10,30 号 JA1-18,31 号 STJ1-1,32 号 FF1-78,33 号 TA165,34 号 STJ1-K4),Nissle 1917 (Mutaflo[®]) 为购自德国的 *E. coli* 益生菌(35 号)。4 株志贺氏菌分离自临床腹泻粪便(36 号 *S. flexneri* 1,37 号 *S. flexneri* 2,38 号 TW4393,39 号 TW6395)。3 株商业实验室菌株(40 号 DH5 α 、41 号 BL-21 和 42 号 XL-10)。

所有菌株均用 LB 培养基培养(北京陆桥技术有限公司),在 15% (V/V) 甘油保藏于 -80 °C。模

板 DNA 由 1 mL 过夜培养的 LB 肉汤煮沸 10 min 后获得,取 2 μ L 上清液进行 PCR。

1.2 血清型分类

分离菌株中的 O 和 H 抗原使用标准血清学方法进行确定^[4],与人类尿路感染相关的 9 种 O 型抗原(O1、O2、O4、O6、O7、O16、O18、O25、O50)为 O-UTI 抗原^[5]。

1.3 系统进化分析

菌株的系统进化分类根据 Clermont 等报道的 3 个基因(*chuA*, *yjaA* 和 *TspE4C2*)进行多重 PCR^[6]。采用 Mastercycler 梯度 PCR 仪(Eppendorf)进行一个两步的三重 PCR:94 °C 4 min,94 °C 5 s,59 °C 10 s,30 个循环,最后延伸 72 °C 5 min。以下标准用于菌株的系统进化分类:group B₂: *chuA*+, *yjaA*+; group D: *chuA*+, *yjaA*-; group B₁: *chuA*-, *TspE4C2*+; group A: *chuA*-, *TspE4C2*-^[7]。

1.4 毒力基因检测

针对文献报道的 47 种与大肠杆菌致病性相关的毒力基因,利用多重 PCR 进行毒力基因的调查。其中 36 种与 ExPEC 毒力相关,11 种与 IPEC 毒力相关,包括与定殖、黏附、菌毛、产毒素、抵抗宿主免疫力、铁调节蛋白基因以及侵袭性酶等毒力相关基因。某些毒力因子会有针对性的进行遗传变异,比如 *pap* (*papAH*、*papEF*、*papC*、*papG*) 和 *sfa* (*sfa/focDE* 和 *sfaS*),本文也对 *papG* 等位基因(*papGI*, *papGII* 和 *papGIII*)的变异进行 PCR 检测。

利用 10 组多重 PCR 及 1 组单一 PCR 进行 47 种毒力基因的调查,另外 1 组多重 PCR 进行系统进化分类(表 2)。36 种与 ExPEC 相关的毒力因子通过多重 PCR 进行检测,按照引物的兼容性和扩增片段的大小将引物分成 6 组(I 至 VI);VII 为 Clermont PCR 的 3 个基因,用于系统进化分析;VIII 至 XII 为与 IPEC 相关联的 11 种基因,分别是 EHEC、ETEC、EaggEC、EPEC 和 EIEC 的标志基因。引物由上海生工生物技术有限公司合成,多重 PCR 反应试剂盒采用 Multiplex PCR Assay Kit (TaKaRa),反应体系及反应条件参照^[9],PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳后分析。

2 结果与讨论

2.1 多重 PCR 体系的建立

11 组多重 PCR 及 1 组单一 PCR 扩增 50 个基因(包

括 47 个毒力基因和 3 个系统进化分类基因)的结果如图 1, 图谱与文献报道一致, 能清晰观察到预期大小

的基因片段, 可以利用建立的多重 PCR 体系进行毒力基因的调查及系统进化分类。

表 1 用于多重 PCR 的毒力基因及其扩增片段

Table 1 Virulence genes included in the multiplex combinatorial PCR assays

Primer pool	Gene name [Amplicon size/bp]
I ^[8]	PAI (930), papAH (720), fimH (508), kpsMTIII (392), papEF (336), ibeA (170)
II ^[8]	fyuA (880), bmaE (507), sfa/focDE (410), iutA (300), papG allele III (258), kpsMT K1 (153)
III ^[8]	hlyA (1177), rfc (788), nfaE (559), papG allele I (461), kpsMT II (272), papC (200)
IV ^[8]	gafD (952), cvaC (680), cdtB (430), focG (360), traT (290), papG allele II (190)
V ^[8]	papG allele I (1190), papG allele II & III (1070), afa/draBC (559), cnfI (498), sfaS (240), kpsMT K5 (159)
VI	univcnf (1105), iha (827), iroN _{E.coli} (665), ompT (559), iss (323), ireA (254)
VII ^[6]	chuA (279), yjaA (211), TspE4C2 (152)
VIII ^[10]	chxA (534), eaeA (384), stx ₂ (255), stx ₁ (180)
IX ^[11]	eltA (696), estII (172)
X ^[12]	bfpA (326)
XI ^[13]	aggC (528), east-1 (111)
XII ^[14]	IpaH (600), estI (166)

2.2 毒力基因的分布

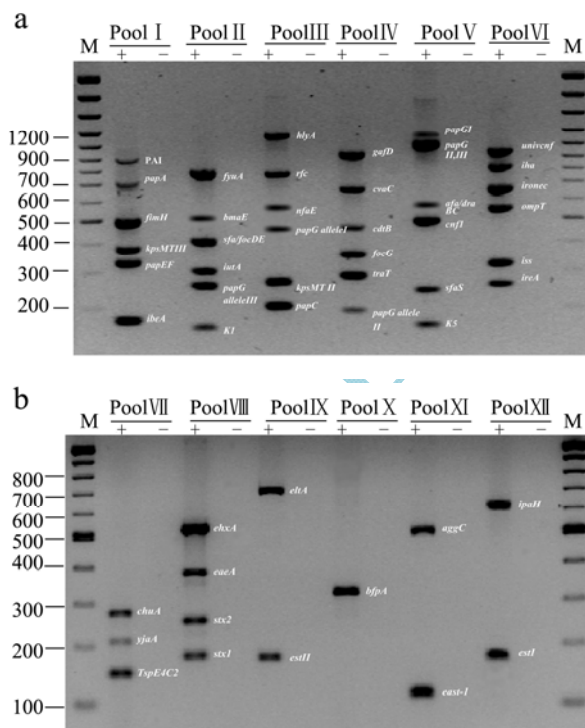


图 1 单一和多重 PCR 方法检测 E. coli 毒力基因。

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of uni/multiplex combinatorial PCR amplified E. coli virulence genes

注: a: 36 种与 ExPEC 相关的毒力因子引物分成 6 组(pool I 至 pool VI), b: 3 个 Clermont 基因在 pool VII, 与 IPEC 相关联的 11 种基因分布在 Pool VIII 至 Pool XII. ‘+’: 阳性对照组; ‘-’: MQ-H2O 对照; M: DNA markers.

如图 2 所示, 在 42 株菌中检出 30 个 ExPEC 毒力基因, 阳性率从 95.2% (fimH, 40/42) 到 2.4% (sfaS, 1/42), 未检出 6 个 ExPEC 毒力基因 (bmaE、gafD、nfaE、cdtB、papG allele I 和 papG allele I)。相比 IPEC 菌株, ExPEC 菌株中检测到更多 ExPEC 毒力基因的存在 (在 36 个与 ExPEC 相关的毒力基因中达到 27.8~52.8%, 而 IPEC 只有 2.8~25%)。ExPEC 菌株均未携带 IPEC 特有的毒力基因。

36 个与 ExPEC 相关的毒力基因中有 12 个在 IPEC 分离株中被检出, 阳性率范围从 95.5% (fimH, 21/22) 到 4.5% (afa, 1/22)。11 个与 IPEC 相关的毒力基因中有 6 个 (stx1、stx2、eaeA、exhA、east-1、bfpA 和 ipaH) 在大部分 IPEC 分离株中被检出, 阳性率范围从 26.2% (eaeA, 11/42) 到 4.8% (bfpA 和 ipaH, 2/42)。而 LT (不耐热的毒素), STa 和 STb 没有被检出, 表明测试菌株中不包含 ETEC 菌株。

分离自腹泻人群的两株大肠杆菌 (19 和 21 号) 确定为泌尿致病性血清型 (分别为 O75:H7 和 O25:H1), 同时携带数个典型的 ExPEC 基因。3 个非致病实验菌株 DH5α、BL-21 和 XL-10 也携带 ExPEC 基因, 如 fimH、traT 和 ompT。而益生菌 Nissle1917 (35 号) 也检出携带相当数量的 ExPEC 基因, 包括 PAI、focDG、kpsMTII、K5、fimH、fyuA、iutA、iha、ironec 和 ompT。

在志贺氏菌中, 36 和 37 号携带 ipaH 基因, 表明它们与 EIEC 相似; 39 号 (TW 6395) 携带 PAI, eae 和 bfpA 基因, 表明它们与 EPEC 更相似; 而 37 号仅

携带 *fyuA* 和 *east-1* 基因。

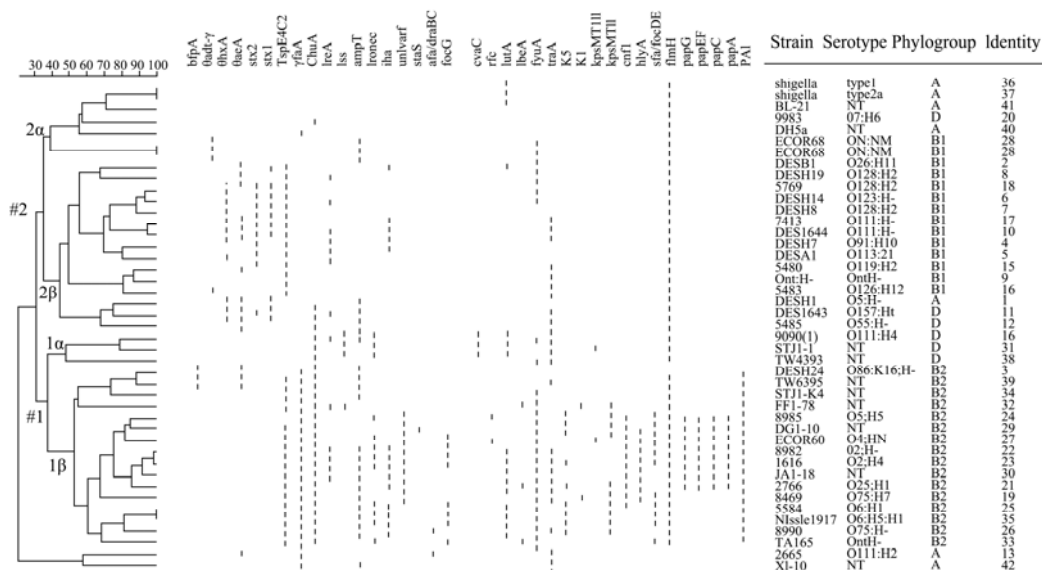


图2 UPGMA 系统进化树显示 42 个菌株携带的毒力基因与其所属的系统进化分组的关联性

Fig.2 Clustering of 42 *E. coli* isolates based on their virulence gene profiles and phylogenetic groups

2.3 大肠杆菌分离株的系统进化分析

本研究采用 Clermont 多重 PCR 区分四个进化群组 (B2、D、B1、A)。结果如图 2 所示, 在 42 株菌中 (38 株大肠杆菌和 4 株志贺氏菌), 16 株属于 B2 (37.2%), 6 株属于 D (14%), 13 株为 B1 (32.6%), 7 株为 A (16.3%)。其中 6 株分离自 UTI 的菌株均属于 B2, 这个结果与最近的系统进化研究相符合, 即大多数 ExPEC 菌株属于 B2 或 D。18 株肠道临床菌株中大部分被归为 D (22.2%), B1 (66.7%) 和 A (11.1%), 两株 EPEC 分离菌属于 B2 (DES H24 和 TW6395, 分别为 3 和 39 号)。3 株实验菌株 DH5a、BL-21、XL-10 (分别为 40、41 和 42 号) 都属于 A, 它们属于非致病菌不会引起疾病, 这与之前的研究一致^[15]。益生菌 Nissle 1917 (35 号) 属于 B2。4 株与大肠杆菌亲缘关系密切的志贺氏菌分布于 A、D 和 B2。

2.4 毒力基因与系统进化的关联

42 个菌株携带的毒力基因与其所属的系统进化分组的关联性如图 2 的 UPGMA 系统进化树所示。基于各菌株毒力基因谱建立的 UPGMA 系统进化树将 42 个菌株分为两个主要的群组 1# 和 2#, 将 B2 和 B1 区分开。两个主要的群组可细分为两个亚组 (1α 和 1β, 2α 和 2β)。B2 的菌株属于 1β 亚组, B1 的菌株属于 2β 亚组。D 中的 5 个菌株聚集一起, 但分别在两个不同的亚组里: 14、31、38 号在 1α 亚组, 临近 B2; 而 11 和 12 号在 2β 亚组, 临近 B1。这个结果表明, 依据菌株的毒力基因分布, B2 组的菌携带的毒力基因多于

B1 组的菌, 一些 D 组的菌与 B1 或 B2 组的菌致病性更接近。但是 D 组中的 20 号 (血清型 O7:H6) 被归于 A (2α) 中, 因为其只含有 *fimH* 基因。有关 *E. coli* 菌株的系统进化分组与其致病性的关联普遍接受 Picard 等的观点: 即 B2 组和部分 D 组的 *E. coli* 菌株属于致病菌, 而 A 和 B1 组多为健康的人类和动物的互生 (commensalism) 菌^[16]。本实验结果证明 D 组菌株毒力基因的分布特性也是介于致病菌与非致病菌之间。同时, 根据毒力基因的分布显示 A 组的几个菌株在系统进化树中分布比较分散, 原因可能是其携带的毒力基因很少而无法显示他们之间的关联, 但是基于看家基因 (housekeeping gene) 的 MLEE 和 MLST 分型则更适合 A 组的系统进化分析^[17]。

PAI (pathogenicity-associated islands) 存在于 B2 组的菌株中, 其他组菌株均不携带该基因 (P<0.05)。B2 中大部分菌株携带典型的 ExPEC 毒力基因, 但不含 IPEC 基因。此外, 当所有 B2 组的菌和 A、B1 组的菌进行比较时, *pap*、*sfa*、*hlyA*、*kpsMTII*、*focG* 和 *cnf1* 基因在 B2 组的菌中出现更频繁 (P<0.05)。3 个基因 *fimH*、*traT* 和 *ompT* 则广泛存在于 4 个进化群组里。

3 结论

3.1 本研究利用多重 PCR 的方法对 38 株大肠杆菌和 4 株志贺氏菌进行 47 种毒力基因的检测, 其中 36 个基因与 ExPEC 相关联, 11 个与 IPEC 相关联, 并对其系统进化情况及分布特征进行了分析。为了使实验数据更具代表性, 我们选择了 ExPEC, EAEC, EHEC,

STEC, EPEC 和 EIEC 这六种致病类型, 其临床病症主要表现为尿路感染, 溶血性尿毒综合征或腹泻。一株商业益生菌 Nissle 1917 的毒力基因谱也作为致病菌的对比列入研究范畴内。

3.2 通常人们认为病原菌携带毒力因子才会具有致病性, 检测这些毒力因子可以有效地分辨出任意一株 *E. coli* 是否具有潜在的致病能力^[18]。本实验结果与上述观点吻合, 因为不同的病原型有其独特的毒力基因组合。本文结果还显示有一些基因同时出现在致病菌和非致病菌中, 例如 *fimH*、*traT* 和 *ompT*, 这部分基因可能是帮助菌株在宿主体内适应环境及赖以生存繁殖的基因。有趣的是, 用于治疗肠道紊乱的商业益生菌 Nissle 1917^[19-20]携带含有多种与 ExPEC 相关联的基因, 包括 PAI、*focDG*、*kpsMTII*、K5、*fimH*、*fyuA*、*iutA*、*iha*、*ironec* 以及 *ompT*。这株菌已被 FDA 列入“GRAS”(generally regarded as safe)。Nissle1917 所含有的毒力基因中包括粘附作用的 *focDG*、*fimH*、*iha* 以及含铁细胞的 *fyuA*、*iutA*、*ironec* 和 *chuA*, 但并未发现毒素基因及入侵基因, 这与近来文献报道的结果一致^[21]。这个结果显示这部分基因可能有选择性地赋予 Nissle1917 更强的定殖能力以及在肠道内壁与其他菌属竞争铁的能力。

3.3 本研究发现利用基因分型的方法可以展示菌株毒力与 *E. coli* 系统进化结构的关系, 但目前尚未得知为什么 *E. coli* 系统进化结构与其毒力基因谱会有关联。有报道表明如果 *E. coli* 要获得和表达毒力因子, 它必须要具有特殊的遗传背景^[22]。例如, 在 B2 组中集中出现 ExPEC 毒力基因, 强烈地暗示具有 B2 的遗传背景很可能是获得 ExPEC 的基因的关键^[8,22]。因此我们推测, 通过更多的基因分析将有助于确立菌株基因组的骨架 (backbone), 因为不同病原型具有何种基因组骨架可能决定了其对于其他毒力基因或“适应性基因”表现的能力和趋向性。但因本次实验样本量少, 且存在区域及样本来源差异, 故应增加样本量进行深入研究。

3.4 本实验对肠道外致病大肠杆菌、肠道致病大肠杆菌及非致病菌进行基因分型, 探讨了不同病原型大肠杆菌的系统进化分类与毒力基因携带的关系, 结果表明肠道内与肠道外的感染与不同的毒力基因相关联。检测毒力基因谱不但可用于评定大肠杆菌的多样性, 作为筛选致病菌的工具, 也可以用于感染爆发的筛查和流行病学调查。

参考文献

[1] Pennington H. *Escherichia coli* O157 [J]. *Lancet*, 2010, 376:

1428-1435

- [2] Bugarel M, Martin A, Fach P, et al. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains [J]. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 142
- [3] Muniesa M, Hammerl J A, Hertwig S, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78: 4065-4073
- [4] Bettelheim K, Thompson C. New method of serotyping *Escherichia coli*: implementation and verification [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25(5): 781-786
- [5] Johnson J. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1991, 4(1): 80-128
- [6] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 4555-4558
- [7] Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, et al. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations [J]. *Microbiology*, 2001, 147: 1671-1676
- [8] Johnson J, Stell A. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181(1): 261-272
- [9] Wu X Y, Chapman T, Trott D J, et al. Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of commensal and enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 83-91
- [10] Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998, 11: 450-479
- [11] Do T, Stephens C, Townsend K, et al. Rapid identification of virulence genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates associated with diarrhoea in Queensland piggeries [J]. *Australian Veterinary Journal*, 2005, 83: 293-299
- [12] Gunzburg S, Tornieporth N, Riley L. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33: 1375-1377
- [13] Rich C, Alfidja A, Sirot J, et al. Identification of human

- enterovirulent *Escherichia coli* strains by multiplex PCR [J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2001, 15: 100-103
- [14] Sethabutr O, Echeverria P, Hoge C W, et al. Detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by PCR in the stools of patients with dysentery in Thailand [J]. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, 1994, 12:265-269
- [15] Chart H, Smith H R, La Ragione R M, et al. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5 α and EQ1 [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89: 1048-1058
- [16] Picard B, Garcia J S, Gouriou S, et al. The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal [J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67:546-553
- [17] Feil E J, Spratt B G. Recombination and the population structures of bacterial pathogens [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55:561-590
- [18] Bekal S, Brousseau R, Masson L, et al. Rapid Identification of *Escherichia coli* Pathotypes by Virulence Gene Detection with DNA Microarrays [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41: 2113-2125
- [19] Cukrowska B, LodInova-ZadnIkova R, Enders C, et al. Specific Proliferative and Antibody Responses of Premature Infants to Intestinal Colonization with Nonpathogenic Probiotic *E. coli* Strain Nissle 1917 [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2002, 55: 204-209
- [20] Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, et al. Analysis of the Genome Structure of the Nonpathogenic Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186: 5432-5441
- [21] Grozdanov L, Zahringer U, Blum-Oehler G, et al. A Single Nucleotide Exchange in the *wzy* Gene Is Responsible for the Semirough O6 Lipopolysaccharide Phenotype and Serum Sensitivity of *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184: 5912-5925
- [22] Escobar-Paramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, et al. A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli* [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, 21: 1085-1094