

儿童肠道感染中致泻性大肠埃希菌的检测

高 昆¹,赵雪涛²(1.上海市徐江区大华医院检验科 200237;2.上海市徐江区疾病预防控制中心 200237)

【摘要】 目的 了解儿童肠道感染中致泻性大肠埃希菌的感染情况。**方法** 对 95 份腹泻患儿粪标本中分离出的大肠埃希菌,用荧光聚合酶链反应(PCR)的方法检测毒力基因,鉴定致泻性大肠埃希菌。**结果** 检测出 15 株阳性菌株,阳性率为 15.8%,其中肠聚集性大肠埃希菌(EAEC) 6 株、肠致病性大肠埃希菌(EPEC) 4 株、弥散聚集性大肠埃希菌(DAEC) 4 株和肠产毒性大肠埃希菌(ETEC) 1 株。**结论** 致泻性大肠埃希菌是引起儿童腹泻的主要致病菌,临床实验室应加强对致泻性大肠埃希菌的检测。

【关键词】 致泻性大肠埃希菌; 毒力基因; 肠道感染

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.20.030 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)20-2698-02

Detection of diarrheagenic Escherichia coli isolated from children with intestinal infection GAO Kun¹, ZHAO Xue-tao² (1. Department of Clinical Laboratory, Dahua Hospital, Shanghai 200237, China; 2. Xuhui Center for Disease Prevention and Control, Shanghai 200237, China)

【Abstract】 Objective To analyze the infection status of diarrheagenic Escherichia coli(E. coli) from children with intestinal infection. **Methods** Virulence gene was detected and diarrheagenic E. coli was identified in 95 strains of E. coli isolated from children with intestinal infection. **Results** In 95 samples, the positive rate was 15.8% (15/95), including 6 strains of enteroaggarative E. coli, 4 strains of enteropathogenic E. coli, 4 strains of diffusely adherent E. coli and 1 strain of enterotoxigenic E. coli. **Conclusion** Diarrheagenic E. coli could be the main pathogens causing children diarrhea, for which the detection test should be emphasized in clinical laboratory.

【Key words】 diarrheagenic Escherichia coli; virulence gene; intestinal infection

根据致泻性大肠埃希菌(DEC)的致病特点,可分为:肠致病性大肠埃希菌(EPEC)、肠出血性大肠埃希菌(EHEC)、肠产毒性大肠埃希菌(ETEC)、肠聚集性大肠埃希菌(EAEC)和弥散聚集性大肠埃希菌(DAEC)等,其致病机制与毒力基因或获得性质粒有关^[1]。作者对 95 份腹泻患儿粪便标本进行致泻性大肠埃希菌的鉴定,现报道如下。

1 材料与方法

- 1.1 标本采集** 收集 2011 年 10 月至 2012 年 6 月本院门诊 0~12 岁腹泻患儿粪便标本共 95 份标本。
- 1.2 培养基** HE 平板和营养琼脂等培养基(上海伊华公司提供)。
- 1.3 培养与鉴定** 标本接种于 HE 平板,35℃ 18~20 h,挑取单个发酵乳糖菌落转种营养琼脂,按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)要求鉴定为大肠埃希菌,对部分不典型菌株用 API20E 确证。
- 1.4 模板 DNA 制备** 使用热裂解法。挑取数个分纯的菌

- 落,放入含有 0.1% triton X-100 及 0.5 mmol/L EDTA 配制溶液 100 μL 悬浮,100℃ 金属浴 5 min,12 000 g 离心 5 min,取上清液用于 PCR 检测。
- 1.5 聚合酶链反应(PCR)体系** Mg²⁺ 浓度为 5 mmol/L,上下游引物浓度为 0.25 μmol/L,探针浓度为 0.15 μmol/L, dNTPs 各 0.2 mmol/L, Taq 酶为 2 U,模板为 3 μL,用 dH₂O 补足总体积为 30 μL。
- 1.6 PCR 反应条件** 37℃ 2 min, 94℃ 3 min; 94℃ 10 s, 60℃ 40 s,循环 40 次; 60℃ 测定荧光值。
- 1.7 仪器和试剂** BIO-RAD IQ5 荧光定量 PCR 仪,引物、探针及 DNTP 等(上海赛百盛生物技术有限公司合成与提供)。
- 2 结 果**
- 2.1 DEC 各毒力基因引物和探针情况** 用 Premier 公司 Beacon designer7.9 软件获取基因编号序列,用软件选取上下游引物和探针,见表 1。

表 1 DEC 毒力基因引物及探针情况

毒力基因	引物和探针	序列(5'-3')	长度(bp)	位置(nt)	基因库编号
AggR	AggR-F	GATGCCCTGATGATAATATAC	80	358~437	Z18751 ^[2]
Eae	eae-F	CTGGTGATAATACCCGTTTAG	82	916~997	Z11541 ^[2]
Bfpa	bfpa-F	AGGTCTATCTTTGATTGAATC	84	289~372	AF119170 ^[2]
LT	LT-F	GCCATTGAAAGGATGAAG	89	457~545	X83966 ^[2]
ST	ST-F	GCTGTGAACCTTGTTGTA	101	461~561	M25607 ^[2]
Ial	ial-F	CTCGTTTATCGGTAGAAGA	90	2 335~2 424	M32063 ^[2]

续表 1 DEC 毒力基因引物及探针情况

毒力基因	引物和探针	序列(5'-3')	长度(bp)	位置(nt)	基因库编号
DraaC	daec-F	CACACGGGTTTTTCATGTG	75 bp	175~250	AF233530 ^[3]
EastA	eastA-F	GAACGATATCCTCATCGC	75 bp	172~250	L11241 ^[3]
VT1	VT1-F	GGCGTTCTTATGTAATGAC	96 bp	575~670	EF441598 ^[2]
VT2	VT1-F	CCCTCTTGAACATATATCTA	89 bp	144~232	EF441616 ^[2]

注:Eae、Bfpa 为 EPEC 的致病基因;LT、ST 为 ETEC 的致病基因;ial 为 ETEC 的致病基因;Aggr 为 EAEC 的致病基因;DraaC 为 DAEC 的致病基因;eastA 为 EAEC 的耐热肠毒素毒力基因。VT1、VT2 为两种不同的 VERO 毒素基因片段。

2.2 致泻性大肠埃希菌阳性情况 95 份标本中阳性菌株为 EAEC(Aggr+) 6 株(6.320%)、EPEC[*eae*+和(或)*bfpA*+]4 株(4.215%)、DAEC(Draac+)4 株(4.215%)和 ETEC[ST+和(或)LT+]1 株(1.050%),未检出 EIEC,阳性率为 15.8%(15/95)。eastA+菌株为 14 株,其中 EAEC 4 株、EPEC 4 株、DAEC 1 株和 ETEC 1 株,仅 eastA+阳性不能分类 4 株。共检测出含有阳性致病基因菌株 19 例,阳性率为 20%(19/95)。

2.3 按时间分布,2011 年 10~12 月共 12 株,2012 年 1~6 月共 7 株。

3 讨 论

致泻性大肠埃希菌因形态与普通大肠埃希菌相似,传统的培养和血清凝集法由于血清型过多而致阳性率偏低。随着分子生物学的发展,血清学鉴定已不能作为确定分类的依据,在同一血清型下,携带不同的毒力基因而可分为不同的致病类型,因此国内外都已开始使用毒力基因作为致泻性大肠埃希菌的分类方法^[1-2]。

儿童由于免疫系统发育不完善,肠道容易受到病原菌的感染而引起腹泻。从 95 例腹泻患儿检测结果分析,检出毒性基因片段的阳性率为 20%,从 2011 年 10 月至 2012 年 6 月都有阳性菌株,致泻性大肠埃希菌是儿童散发性腹泻的主要病原菌之一。以前检测大多使用血清学方法,阳性率远低于检测结果,造成大部分病原菌的漏检^[3];而以分子生物学为基础的诊断方法多用于疾病控制中心监测流行病学资料。应用于临床标本的检测不多^[4],致使对本地区的儿童腹泻中致泻性大肠埃希菌检出率了解不清楚,给临床诊断及治疗带来不便。

本次检测,除了常用的毒性基因片段,增加 DAEC(DraaC)和 eastA 两个毒性基因,eastA 为 EAEC 的耐热肠毒素基因。不仅在 EAEC 中检出,在 EPEC、ETEC 和 DAEC 中也有检出,

还有 4 株只检出 eastA 基因。这是因为携带毒性基因的质粒可在不同菌株之间进行传递,形成新的基因组合;只带有 eas-tA 基因的菌株,可能毒力较弱,或为易感菌株,易接受质粒传递的毒力基因形成感染菌株,这需要对这些菌株进一步研究^[5]。

总之,致泻性大肠埃希菌作为引起儿童肠道感染的主要病原菌,现有的实验方法已不能满足临床的需要,实验室人员和流行病学人员应加强协作,使用准确、可靠的方法检测病原菌,为疾病的流行、控制、预防和治疗提供依据。

参考文献

[1] Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C, et al. Detection and characterization of diarrheagenic Escherichia coli from young children in Hanoi, Vietnam[J]. J Clin Microbiol, 2005,43(2):755-760.

[2] 于新芬,潘劲草,孟冬梅,等.多重实时 PCR 检测致泻性大肠埃希菌志贺毒素和紧密素基因[J].中华检验医学杂志,2007,30(5):529-532.

[3] 祝俭平,廖礼梅.746 例婴幼儿秋季腹泻大便标本致泻性大肠菌群分析[J].检验医学与临床,2012,9(3):355-356.

[4] 徐义刚,崔丽春,李苏龙,等.多重 PCR 方法快速检测 4 种主要致腹泻性大肠埃希菌[J].微生物学杂志,2010,30(3):25-29.

[5] 李岷,李克涓,赵苏瑛.大肠埃希菌和克雷伯菌 ESBLs 及 AmpC 酶的检测[J].国际检验医学杂志,2009,30(11):1122-1123.

(收稿日期:2013-01-21 修回日期:2013-06-12)

(上接第 2697 页)

术治疗儿童化脓性膝关节炎 19 例分析[J].中国误诊学杂志,2012,12(11):2709.

[2] 赵飞.镜下关节清理治疗膝化脓性关节炎 21 例临床分析[J].实用骨科杂志,2011,17(3):257-259.

[3] 许晓秋,丁昉,张栋,等.急性化脓性膝关节炎镜下清理配合术后持续灌洗治疗 25 例[J].广西医科大学学报,2010,27(3):458-459.

[4] 唐波,王艳芬,马玉栋.关节镜治疗膝关节关节化脓性关节炎[J].泰山医学院学报,2011,32(2):134-135.

[5] 王敏,施翔,吴争鸣,等.关节镜技术治疗急性化脓性膝关

节炎[J].中国基层医药,2012,19(1):96-97.

[6] 项毅,续力民,孙振军,等.关节镜下清理并置管冲洗治疗膝关节化脓性关节炎 27 例[J].解放军医药杂志,2012,24(9):33-35.

[7] 付丽,唐伶俐,李璟,等.骨关节化脓性感染持续灌洗的护理[J].贵阳医学院学报,2008,33(1):98-100.

[8] 王晓国,靳方运,吴若丹.骨与关节严重感染 16 例灌洗治疗分析[J].中国误诊学杂志,2007,7(18):4392-4393.

(收稿日期:2013-03-30 修回日期:2013-06-12)