·临床检验研究论著·

# 肠道感染中致泻性大肠埃希菌的检测及流行情况分析

高　昆[1]，赵雪涛[2]，韩　倩[1]，黄惠婷[1]

（1. 上海市徐汇区大华医院检验科，上海 200237；2. 上海市徐汇区疾病预防控制中心，上海 200237）

**摘　要：目的**　检测肠道感染中致泻性大肠埃希菌（DEC）的感染情况，了解本地区各种 DEC 的流行病学特征。**方法**　对 835 例腹泻患者粪标本中分离出的大肠埃希菌，用荧光 PCR 法检测致病基因，鉴定 DEC。**结果**　共检测出 148 株 DEC 菌株（阳性率 17.7%），其中，肠聚集性大肠埃希菌（EAEC）14 株，肠致病性大肠埃希菌（EPEC）22 株，弥散聚集性大肠埃希菌（DAEC）28 株和肠产毒性大肠埃希菌（ETEC）65 株，仅 eastA 阳性未能分组的 19 株。6～10 月共检出 DEC 90 株。0～13 岁患者检出 DEC 菌株 11 株，阳性率 10.8%（11/102）；>13～60 岁患者检出 DEC 菌株 108 株，阳性率 20.3%（108/532）；>60 岁患者检出 DEC 菌株 29 株，阳性率 14.4%（29/201）。**结论**　DEC 是引起肠道腹泻的主要致病菌之一，DEC 的检出与季节和年龄有关。分子生物学的检测方法更灵敏，临床实验室应选择更加灵敏的方法，加强对致泻性大肠埃希菌的检测。

**关键词：**大肠埃希菌，致泻性；　致病基因；　肠道感染

**DOI：**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.07.023　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2014)07-0853-03

**The detection and epidemiology of diarrheogenic *Escherichia coli* with intestinal infection**

*Gao Kun*[1], *Zhao Xuetao*[2], *Han Qian*[1], *Huang Huiting*[1]

(1. *Department of Clinical Laboratory, Xuhui Dahua Hospital, Shanghai* 200237, *China*;
2. *Xuhui Center for Disease Control and Prevention, Shanghai* 200237, *China*)

**Abstract: Objective**　To detect the infectious situation of diarrheogenic *Escherichia coli* (DEC) in intestinal infectious disease, and to analyze the epidemiology characteristics of DEC. **Methods**　The 835 DEC strains were from patients with gastroenteritis, The real-time PCR assay was used to detect specific virulence gene to identify DEC. **Results**　In 835 samples, the positive strains were 148, the positive rate was 17.7%. This include 14 strains with EAEC, 22 strains with EPEC, 28 strains with DAEC and 65 strains with ETEC. 19 strains with eastA positive only. The 90 positive strains were detected from June to October. The positive rate was 10.8% in people aged 0－13, the positive rate was 20.3% in people aged >13－60, the positive rate was 14.4% in people more than 60 years of age. **Conclusion**　The DEC is one of the main pathogens in intestinal infectious diarrhea, DEC is associated with seasons and ages. The real-time PCR method is more sensitive. The more sensitive method must be chosed by the clinical laboratory for detecting the diarrheogenic DEC.

**Key words:** *Escherichia coli*, diarrheogenic;　virulence gene;　intestinal infection

大肠埃希菌（*Escherichia coli*，*E. coli*）是人肠道中的正常菌群，其中有些菌株携带致病基因，能引起腹泻，称为致泻性大肠埃希菌（DEC）。根据 DEC 的致病特点和携带的致病基因大致分为：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[1]。DEC 是引起腹泻的常见致病菌，其致病机制与致病基因或获得性毒力质粒有关，常规的细菌培养与鉴定方法不能鉴别各种致病性大肠埃希菌，检出率较低[2]。本研究用分子生物学方法检测大肠埃希菌的 10 种致病基因，以了解本地区肠道感染中 DEC 的感染及流行情况。其中，eae、bfpa 为 EPEC 的致病基因，LT、ST 为 ETEC 的致病基因，ial 为 EHEC 的致病基因，Aggr 为 EAEC 的致病基因，draac 为 DAEC 的致病基因，eastA 为 EAEC 的耐热肠毒素致病基因，VT1、VT2 为两种不同的 VERO 毒素基因片段。

## 1　材料与方法

**1.1**　标本来源　2012 年 1 月至 2012 年 12 月收集本院急诊及肠道门诊腹泻患者粪便标本 835 例。

**1.2**　试剂与仪器　HE 平板和营养琼脂等培养基由上海伊华公司提供，PCR 引物、探针及 Taq 酶和 dNTP 等试剂均由上海赛百盛生物技术有限公司合成与提供，荧光定量 PCR 仪为 Bio-Rad IQ5。大肠埃希菌 ETEC 诊断血清为丹麦哥本哈根产品。

**1.3**　细菌培养鉴定　标本接种于 HE 平板，35 ℃培养 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》要求鉴定大肠埃希菌，对部分不典型菌株用 API20E 确认。

**1.4**　细菌核酸制备　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，取上清用于 PCR 检测。

**1.5**　PCR 反应　用 Premier 公司 Beacon designer 7.9 软件获取基因编号序列，用软件选取致泻性大肠埃希菌各致病基因上下游引物和探针。PCR 反应体系：$Mg^{2+}$ 浓度为 5 mmol/L，上

作者简介：高昆　男，副主任技师，主要从事微生物检验研究。

导，发现在氨苄西林诱导作用下，大肠埃希菌的菌落变成颗粒型，而菌体形态则由最初的革兰阴性小杆菌逐渐变成长杆菌、圆球体、丝状菌、巨形体，当菌液浓时成为丝状，可形成网状，类似于真菌菌丝，与正常菌体有明显区别。

在本研究中，大肠埃希菌 L 型在 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪中的细菌计数，理论浓度与仪器细菌计数之间有较大的差异，并且尿沉渣细菌计数明显低于理论浓度，说明尿沉渣分析仪的细菌计数并不能准确反映 L 型细菌实际浓度，这一计数特点与细菌型相同，原因还可能是与细菌的聚集性相关[7]。但是，细菌型在同一尿沉渣分析仪细菌计数较细菌 L 型高出近一倍，此差异是否能说明同一细菌的细菌型在尿沉渣分析仪的计数一定就大于 L 型？作者认为是否定的，理由有 3 点：(1)由 L 型菌生长特性决定，其液体培养基内都表现为沉淀生长，混悬在生理盐水或蒸馏水内也可迅速沉积，可导致吸样不均匀；(2)检测结果重复性不佳，由于细菌的聚集程度、振摇程度不同，导致结果有较大的差异；(3)细菌 L 型分为稳定 L 型、相对稳定 L 型与不稳定 L 型，稳定 L 型不论是在不含诱导剂的培养基中多次传代培养或是在动物体内，都能够保持相对稳定的性质或不能自发返祖[10]。而本次研究仅诱导出相对稳定 L 型与不稳定 L 型，尚不能预知稳定 L 型在尿沉渣分析仪中的特点。但是根据稳定 L 型无法自发返祖导致了培养困难的特点，推测此型菌用 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪计数可能会出现尿沉渣分析仪细菌计数阳性但培养阴性的结果。因此，对泌尿系统感染的诊断除了缩短检验时间，改进检测方法的特异性与敏感性外，在临床用药前进行尿液标本的送检，避免 L 型细菌的形式，也是快速准确诊断与治疗的关键。

## 参考文献


[1] 林特夫，黄谷良. 细菌 L 型感染的意义和研究进展(四)——细菌 L 型的检验和鉴定[J]. 蚌埠医学院学报，2008，33(2)：127-131.

[2] 陈登宇，陈艺林，徐萍萍. 哌拉西林诱导铜绿假单胞菌 L 型形成的实验研究[J]. 蚌埠医学院学报，2010，35(2)：115-116.

[3] 王珊，齐慧敏，张再红，等. 苯唑西林诱导金黄色葡萄球菌形成 L 型研究[J]. 中国临床药理学杂志，2010，26(7)：502-505.

[4] 林业杰，欧剑鸣，王晓萍，等. 霍乱弧菌 L 型诱导实验观察[J]. 海峡预防医学杂志，2001，7(3)：19-21.

[5] 高东旗. 李仕英，侯雨丰，等. 消毒剂对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌诱导 L 型形成的实验观察[J]. 中国消毒学杂志，1998，15(3)：152-155.

[6] 陈丽，张坤，李月强，等. UF-1000i 尿沉渣分析仪检测细菌的性能及对尿路感染的筛查价值[J]. 华中科技大学学报：医学版，2011，40(3)：354-356.

[7] 万芳，杜利军，陈恒，等. UF-500i 全自动尿沉渣分析仪在细菌计数中应用的探讨[J]. 国际检验医学杂志，2012，33(13)：1636-1637.

[8] 刘贵建，程实. 尿路感染的实验室诊断进展[J]. 中华检验医学检验杂志，2009，32(6)：616-620.

[9] Santra J，Eeva LP，Pauliina K，et al. Screening of urine samples by flow cytometry reduces the need for culture[J]. J Clin Microbiol，2010，48(9)：3117-3121.

[10] 王和. 现代前列腺炎基础与临床[M]. 贵阳：贵州科技出版社，2005：132-136.

[11] 黄福达，杨志钊，张秀明，等. UF-1000i 全自动尿液有形成分分析仪性能评价[J]. 检验医学，2011，26(8)：560-563.


(收稿日期：2013-08-28)

(上接第 854 页)


购中分离到致病性大肠埃希菌[J]. 中国实验动物学杂志，2012，(9)：81-83.

[4] Yatsuyanagi J，Saito S，Miyajima Y，et al. Characterization of atypical enteropathogenic Escherichia coli strains harboring the astA gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan[J]. J Clin Microbiol，2003，41(5)：2033-2039.

[5] Lopes LM，Fabbricotti SH，Ferreira AJ，et al. Heterogeneity among strains of diffusely adherent Escherichia coli isolated in Brazil[J]. J Clin Microbiol，2005，43(4)：1968-1972.

[6] 赵红庆，苑锡铜，王玉飞，等. 多重 PCR 检测致泻大肠埃希菌方法的建立[J]. 中国卫生检验杂志，2009，19(10)：2223-2226.

[7] Müller D，Greune L，Heusipp G，et al. Identification of unconventional intestinal pathogenic Escherichia coli isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR[J]. Appl Environ Microbiol，2007，73(10)：3380-3390.

[8] Hamitton MJ，Hadi AZ，Griffith JF. et al. Large scale analysis of virulence genes in Escherichia coli strains isolated from Avalon Bay，CA[J]. Water Res，2010，44(18)：5463-5473.

[9] 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.

[10] 朱敏，冉陆，沈圣，等. 多重 PCR 快速检测致泻性大肠埃希菌[J]. 中华预防医学杂志，2010，44(4)，345-348.

[11] 王辉，马焕丽，邱燕飞. 社区细菌感染性腹泻病原学监测结果分析[J]. 国际检验医学杂志，2012，33(19)：2404-2406.

[12] 黄芳，邓瑛，曲梅，等. 2010 年北京市感染性腹泻病原学监测分析[J]. 中华预防医学杂志，2011，45(9)：820-824.


(收稿日期：2013-10-14)

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 IU，模板为 3 μL，用 $dH_2O$ 补足总体积为 30 μL。PCR 反应条件：37 ℃ 2 min，94 ℃ 3 min，1 循环；94 ℃ 10 s，60 ℃ 40 s，40 循环；60 ℃测定荧光值。

## 2　结　　果

**2.1**　DEC 检测结果　835 例腹泻患者粪便标本，经培养共检测出 DEC 148 株，阳性率为 17.7%(148/835)。其中，EAEC(Aggr 阳性) 14 株，EPEC[eae 阳性和(或)bfpa 阳性]22 株，DAEC (draac 阳性)28 株和 ETEC[ST 阳性和(或)LT 阳性]65 株，仅出现 eastA 阳性不能分类 19 株，未检出 EHEC。

**2.2**　不同季节阳性菌株种类分布　6～10 月 DEC 菌株最多，为 90 株，与此段时间腹泻高发相关，见图 1。不同阳性菌株的检出情况也呈现季节性，EAEC 在 1～3 月未检出，其余时间呈现散发分布；DAEC 在 1～3 月和 10～12 月检出较多，5～9 月未检出；EPEC 和 ETEC 在 7～9 月检出最多。见表 1。

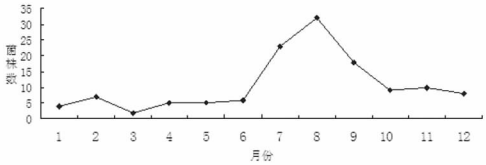


**图 1　阳性菌株与季节的关系**

**表 1　2012 年 1～12 月各种阳性菌株分布情况(*n*)**

| 月份 | 各种菌型的菌株数 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | EAEC | DAEC | EPEC | ETEC | 仅 eastA 阳性 |
| 1 月 | — | 4 | — | — | 3 |
| 2 月 | — | 6 | 1 | — | 1 |
| 3 月 | — | 1 | — | 1 | 1 |
| 4 月 | 2 | 2 | 1 | — | 3 |
| 5 月 | — | — | 1 | 4 | 1 |
| 6 月 | 3 | — | 1 | 2 | 1 |
| 7 月 | 3 | — | 10 | 10 | — |
| 8 月 | 3 | — | 4 | 25 | — |
| 9 月 | 1 | — | — | 17 | — |
| 10 月 | 1 | 2 | — | 6 | 1 |
| 11 月 | 1 | 5 | 4 | — | 2 |
| 12 月 | — | 8 | — | — | 6 |

—：未检出。

**2.3**　阳性菌株分离患者年龄分布　0～13 岁患者检出 DEC 菌株 11 株(EAEC 2 株、DAEC 4 株、EPEC 3 株、ETEC 1 株和仅 eastA 阳性 1 株)，阳性率 10.8%(11/102)；＞13～60 岁患者检出 DEC 菌株 108 株(EAEC 9 株、DAEC 21 株、EPEC 16 株、ETEC 49 株和仅 eastA 阳性 13 株)，阳性率 20.3%(108/532)；＞60 岁患者检出 DEC 菌株 29 株(EAEC 3 株、DAEC 3 株、EPEC 3 株、ETEC 15 株和仅 eastA 阳性 5 株)，阳性率 14.4%(29/201)。

**2.4**　方法学验证结果　分别用阳性对照菌株和阴性对照菌株进行试验，阳性菌株均能得到设计预期的特异性扩增曲线，阴性对照菌株均没有得到特异性扩增曲线。

## 3　讨　　论

DEC 是引起腹泻的常见病原菌之一，由于形态与普通大肠埃希菌相似，传统的培养和血清凝集法检测阳性率偏低，且同一血清型下因携带不同的致病基因又可分为不同的致病类型，给临床诊断带来了困难[3-4]。近年，国内外已有学者依据不同菌株致病基因差异用分子生物学的方法来进行鉴定[6-10]，分子生物学可检测致病基因，更能反映菌株的致病情况，并且，灵敏度也高于血清学检测，因此分子生物学的方法可能会成为鉴定致 DEC 的常规方法。

作者参考国外学者的分子生物学方法，通过设计各致病基因的 PCR 引物进行目的基因特异性扩增，共检出带有致病基因的 DEC 148 株(阳性率 17.7%)，其中，EAEC(Aggr 阳性) 14 株，EPEC[eae 阳性和(或)bfpa 阳性]22 株，DAEC (draac 阳性)28 株和 ETEC[ST 阳性和(或)LT 阳性]65 株，仅出现 eastA 阳性不能分类 19 株，未检出 EHEC。

本研究发现，DEC 菌株检出率与季节有关，6～10 月 DEC 菌株最多(90 株)，与此段时间腹泻高发相关。不同阳性菌株的检出情况也呈现季节性变化，EAEC 在 1～3 月未检出，其余时间呈现散发分布；DAEC 在 1～3 月和 10～12 月检出较多，5～9 月未检出；EPEC 和 ETEC 在 7～9 月检出最多。

本研究发现，DEC 菌株检出率与与年龄也有一定相关性，0～13 岁患者检出 DEC 菌株 11 株(EAEC 2 株、DAEC 4 株、EPEC 3 株、ETEC 1 株和仅 eastA 阳性 1 株)，阳性率 10.8%(11/102)；＞13～60 岁患者检出 DEC 菌株 108 株(EAEC 9 株、DAEC 21 株、EPEC 16 株、ETEC 49 株和仅 eastA 阳性 13 株)，阳性率 20.3%(108/532)；＞60 岁患者检出 DEC 菌株 29 株(EAEC 3 株、DAEC 3 株、EPEC 3 株、ETEC 15 株和仅 eastA 阳性 5 株)，阳性率 14.4%(29/201)。有研究发现 DEC 菌株的检出情况各个地区也有不同[11-12]。分析本地区 DEC 菌株季节性特点和与年龄的相关性，为本地区以后的预防控制和针对性的治疗提供了可靠的依据。

本研究中除了检测常用的致病基因片段，增加 draac 和 eastA 两个致病基因，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 19 株只检出 eastA 基因，这是因为携带致病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 eastA 基因的菌株，可能毒力较弱，或为易感菌株，易接受质粒传递的致病基因形成感染菌株，这需要对这些菌株进一步研究。

总之，DEC 作为引起肠道感染的主要病原菌，现有的检测方法已不能满足临床的需要，相关部门应加强协作，使用准确、可靠的方法检测病原菌，为疾病的流行、控制、预防和治疗提供帮助。

## 参考文献

[1]　赵爱兰，熊衍文，白雪梅，等. 鉴定五类致泻性大肠埃希菌和志贺菌的多重 PCR 方法[J]. 疾病监测，2011，26(1)：65-67.

[2]　陈爱平，陈建辉，杨劲松，等. 分子生物学技术在肠致泻性大肠杆菌诊断中的应用[J]. 中国人兽共患病学报，2011，27(9)：808-811.

[3]　高家红，仝品芬，孙晓梅，等. 从临床肺炎死亡树(下转第 857 页)