

• 临床检验研究论著 •

2011 年夏季北京地区儿童腹泻病原菌监测结果分析

李少丽¹, 钟雪梅², 冯燕玲¹, 薛冠华¹, 闫超¹, 张艳玲², 孙红妹^{1△}

(1. 首都儿科研究所细菌研究室, 北京 100020; 2. 首都儿科研究所附属儿童医院感染消化科, 北京 100020)

摘要:目的 监测分析 2011 年夏季北京地区儿童腹泻主要病原菌, 为该地区儿童腹泻病原的快速诊断与防治提供依据。**方法** 收集 2011 年夏季在该院感染消化科就诊的腹泻患儿粪便标本, 提取粪便标本 DNA, 设计特异性引物建立 PCR 方法对易导致儿童腹泻的最常见的 3 种病原菌进行检测, 部分阳性结果测序验证, 并与以往腹泻病原菌监测结果进行比较分析。**结果** 在 259 例腹泻患儿中, 总病原菌的检出率为 69%, 其中致腹泻型大肠杆菌属检出率为 64%, 志贺菌属检出率为 15%, 沙门菌属检出率为 4.2%; 男女儿童致病菌检出率、各年龄组间和急性慢性腹泻天数比较差异均无统计学意义。本监测结果显示, 致腹泻型大肠杆菌属是目前北京市引起儿童夏季腹泻的主要病原菌, 其次为志贺菌属。**结论** (1) 2011 年夏季北京地区引起儿童腹泻的主要肠道病原菌种类发生了明显的变化, 以致腹泻性大肠杆菌属为主。(2) 该研究建立的快速 PCR 法可检测多种儿童腹泻易感病原菌。

关键词:微生物学; 腹泻; 北京

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)04-0432-03

Infectious diarrhea pathogens among children in Beijing area in the summer of 2011

Li Shaoli¹, Zhong Xuemei², Feng Yanling¹, Xue Guanhua¹, Yan Chao¹, Zhang Yanling², Sun Hongmei^{1△}

(1. Department of Bacteriology, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China; 2. The Affiliated Children's Hospital of Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China)

Abstract: **Objective** To investigate the main infectious diarrhea pathogens among children in Beijing area in the summer of 2011, and to find out a rapid differential diagnosis method for pathogenic bacteria and provide the basis for prevention and treatment of this disease. **Methods** Stool samples of children with infectious diarrhea in Department of Gastrointestinal and Infectious in the Affiliated Children's Hospital of Capital Institute of Pediatrics were collected from June to August in 2011. Specimens' DNA was extracted and a specific PCR method was established to detect the most common pathogens which easily to cause the children diarrhea. The results were sequenced and confirmed, and then compared with the previous studies. **Results** In the 259 cases with diarrhea, the total detection rate of the pathogen was 69%, among which the rate of diarrhea cause by enteropathogenic Escherichia coli was 64%, by Shigella bacteria was 15% and by Salmonella bacteria was 4.2%. The rates of pathogenic bacteria detection had non-statistical difference between boys and girls and different age groups, and also no significant difference among the different months in summer. **Conclusion** Escherichia coli might be the main pathogen of diarrhea in Beijing this year, followed by Shigella. There could be a significant change about pathogenic bacteria causing children's diarrhea in Beijing area in summer. PCR assay, established in this study, could be used for rapid detection of pathogens of children's diarrhea.

Key words: microbiology; diarrhea; Beijing

腹泻病是儿童的第二大致命杀手, 全球每年约有 30~50 亿腹泻患者, 尤其是感染性腹泻病, 在发展中国家, 每年约 200 万儿童死于腹泻, 约 20% 的死亡患儿年龄小于 5 岁, 对人类和社会的发展造成了巨大的损失^[1-3]。以往文献报道, 发生在夏秋季节的儿童、青少年感染性腹泻最常见的病原菌是细菌, 尤以致腹泻型大肠杆菌、志贺菌属、沙门菌属最为常见^[4-7]。因此, 开展儿童腹泻的病原学研究具有重要的临床及流行病学意义。为了解北京地区 2011 年夏季儿童腹泻致病菌感染情况及菌种变化, 我们研究建立了儿童肠道易感病原菌快速基因检测方法, 对 2011 年夏季就诊于首都儿科研究所附属儿童医院感染消化科的部分腹泻患儿进行了致病菌谱及感染率调查, 以探讨本地区 2011 年夏季儿童腹泻的主要病原谱, 为本地区儿童腹泻病原的快速诊断与防治提供根据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 6~8 月在首都儿科研究所附属儿童医院感染消化科就诊的门诊腹泻患儿粪便标本, 共 259

例, 粪便性状有水样便、粘液便、血样便等, 所采集标本为新鲜留取大便, 不混有尿液和杂质, 留取时间不超过 2 h, 放于无菌容器中, 4 度保存运输。患儿全部来自北京市的各个区县, 其中急性腹泻患儿病例有 224 例(病程小于 2 周); 慢性腹泻和迁延性腹泻的患儿共有 35 例(病程大于 2 周)。在本研究中男患儿 155 例, 女患儿 104 例, 年龄构成从 1~154 个月, 可分为 3 组: 1~36 月患儿 215 例, 36~72 月患儿 27 例, 72~154 月患儿 17 例。

1.2 试剂 粪便基因组 DNA 快速提取试剂购自北京庄萌国际生物基因科技有限公司, PCR 所用试剂购自北京天根生化科技有限公司。

1.3 方法 按照厂家试剂盒说明书提取腹泻患儿的粪便标本 DNA, 设计特异性引物对 3 种导致儿童夏季腹泻最常见的病原菌: 致腹泻型大肠杆菌属、沙门菌属、志贺菌属进行检测, 部分检测结果进行测序验证, 并对结果进行分析。

1.3.1 DNA 提取 参照试剂盒说明书进行, 为提高 DNA 产

量,对试剂盒所说实验步骤和试剂用量进行了改进,同时检测改进前后的 DNA 提取物含量。

1.3.2 PCR 检测 根据 GenBank 中公布的致腹泻型大肠杆菌属基因序列,包括肠产毒性大肠杆菌(ETEC)、肠侵袭性大肠杆菌(EIEC)、肠致病性大肠杆菌(EPEC)、肠出血性大肠杆菌(EHEC)、肠集聚性大肠埃希菌(EAEC),通过 Blast 比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),设计特异性的通用引物,单管扩增这些致病菌。同样方法设计志贺菌属通用引物,扩增产物包含痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏志贺菌、宋内志贺菌;沙门菌属包含:鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌、猪霍乱沙门菌等。且所有引物的 T_m 值相近($60\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$)。PCR 反应体系为 $25\text{ }\mu\text{L}$,不含 Mg^{2+} 的 Buffer($10\times$) $2.5\text{ }\mu\text{L}$,将 Mg^{2+} (25 mmol/L)、dNTP(2.5 mmol/L)、Taq DNA Polymerase($2.5\text{ U}/\mu\text{L}$)和引物配制成为不同浓度的组合,用去离子水补充至 $25\text{ }\mu\text{L}$ 、 Mg^{2+} 、dNTP、Taq DNA Polymerase 和引物的浓度范围依次为: Mg^{2+} 浓度范围 $1.0\sim 4.0\text{ mmol/L}$,以 0.5 mmol/L 递增;dNTPs 浓度范围 $0.1\sim 1.5\text{ mmol/L}$,以 0.5 mmol/L 递增;Taq DNA Polymerase 浓度范围 $0.5\sim 2.5\text{ U}$,以 0.5 U 单位递增;引物浓度范围 $0.1\sim 0.6\text{ }\mu\text{mol/L}$,以 $0.1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 递增。采用矩阵法进行对比实验。反应条件:预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s ,为了提高 PCR 反应的灵敏度和特异性,根据设计的引物退火温度,以 $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为基础,以 $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 递加,直至 $62\text{ }^{\circ}\text{C}$,时间 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min ,进行 33 个循环。

1.3.3 测序验证 对部分检测为阳性的临床菌株的 PCR 产物进行测序,由上海英骏生物科技有限公司北京分公司完成。并对测序结果进行 Blast 分析、比对。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 DNA 提取 对改进前后的 DNA 产物测定其 OD 值,结果发现,改进后的 DNA 提取物其 OD 值均高于改进前的值,DNA 含量更高。

2.2 PCR 反应条件的确定 通过对 PCR 反应体系和反应条件的不断优化,对比分析,确定 PCR 反应体系为 Buffer($10\times$) $2.5\text{ }\mu\text{L}$, Mg^{2+} $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 、dNTP $1\text{ }\mu\text{L}$ 、Taq DNA Polymerase $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 和上下游引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$,用去离子水补充至 $25\text{ }\mu\text{L}$;反应条件为预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min ,33 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min ,为最佳的反应体系和反应条件,琼脂糖凝胶电泳结果条带清晰,无杂带。本研究建立的 PCR 方法检测儿童肠道易感病原菌的扩增产物片段长度分别为:致腹泻型大肠杆菌属 250 bp 、志贺菌属 415 bp 和沙门菌属 532 bp ,对部分 PCR 产物测序结果做 Blast 分析,证实扩增的目的片段基因序列分别属于这 3 种病原菌属。

2.3 病原菌检出结果 在 259 例腹泻患儿中,总病原菌的检出率为 69% ($178/259$),其中致腹泻型大肠杆菌属检出率为 64% ($166/259$),志贺菌属检出率为 15% ($39/259$),沙门菌属检出率 4.2% ($11/259$),以上 3 项全部阳性者 0 例,2 项阳性者 38 例,其中致腹泻型大肠杆菌属合并志贺菌属阳性的有 31 例,致腹泻型大肠杆菌属合并沙门菌属阳性者有 6 例,志贺菌属合并沙门菌属阳性者仅有 1 例。166 例致腹泻型大肠杆菌属阳性的患儿,就诊前的平均腹泻天数为 6.23 d ,其中急性腹泻患儿有 144 例,占大肠杆菌属阳性患儿的比例为 86.7% ,慢性和迁延性腹泻患儿有 18 例,占大肠杆菌属阳性患儿的比例为

10.8% ,另有 4 例腹泻天数不详;39 例志贺菌属阳性的患儿,就诊前的平均腹泻天数为 9.46 d ,其中急性腹泻患儿 29 例,占志贺菌属阳性患儿的比例为 74.4% ,慢性和迁延性腹泻患儿 8 例,占志贺菌属阳性患儿的比例为 20.5% ,2 例腹泻天数不详;11 例沙门菌属阳性的患儿,就诊前的平均腹泻天数为 10.73 d ,其中急性腹泻患儿 8 例,占沙门菌属阳性患儿的比例为 72.7% ,慢性和迁延性腹泻患儿 3 例,占沙门菌属阳性患儿的比例为 27.3% 。对本结果采用非参检验(Kruskal-wallis 检验), $\chi^2=4.334$, $P=0.115>0.05$,腹泻天数差异无统计学意义。

在 155 例男性患儿中,总病原菌的检出率为 81% ;104 例女患儿中,总病原菌的检出率为 87% ;男女致病菌检出率无统计学意义($P=0.2658>0.05$)。不同年龄组中, $1\sim 36$ 月总病原菌的检出率为 70% ;36~72 月总病原菌的检出率为 52% ;72~154 月总病原菌的检出率为 82% ,年龄组间比较无统计学意义($P=0.071>0.05$)。259 例腹泻患儿中,6 月份 153 例,共检出病原菌 129 株(84%),7 月份 52 例,共检出病原菌 38 株(73%),8 月份 54 例,共检出病原菌 49 株(91%)。夏季各月份间病原菌感染差异无统计学意义。

3 讨 论

目前我国临床上对儿童腹泻病原菌的诊断主要采用分离培养法,即经标本增菌、分离培养、革兰染色镜检和生化及菌落观察等一系列步骤才可确定病原菌感染结果。该方法虽然准确、可靠,但操作繁琐、费时、费力,完成整个检测过程需 $4\sim 7\text{ d}$,不能及时指导临床治疗,且容易受样本质量、培养基、培养条件、人为操作、就诊前抗菌素的使用等诸多因素影响,极易造成漏检。本文建立的 PCR 方法通过对儿童常见的致腹泻型病原菌的 DNA 的快速检测,可实现一次性完成 3 种主要致腹泻型病原菌的检测,并通过测序、与 GenBank 中已知序列比对,验证了该方法的准确性和特异性。结果显示该方法比常规的细菌分离鉴定敏感度高,检测快速,可用于临床病例的快速诊断和流行病学调查,具有一定的实用性。

以往文献报道志贺菌属是引起儿童腹泻的主要致病菌,其次是沙门和大肠,但本研究显示致腹泻型大肠杆菌属是目前北京市引起儿童夏季腹泻的主要病原菌,其次为志贺菌属、沙门菌属感染率最低,和以往的监测结果不一致^[8-10],表明 2011 年夏季北京地区引起儿童腹泻的肠道病原菌种类发生了明显的变化,特别是志贺菌属和沙门菌属减少明显,而致腹泻型大肠杆菌属则明显增多。

本研究中对患儿病例资料的调查结果显示,患儿就诊前在家长指导下自行服用抗菌素现象十分普遍(以服用头孢克肟为多),占就诊患儿的 28% ($72/259$)。在 166 例大肠杆菌属阳性的患儿中,有 47 例(28%)患儿就诊前已服用抗菌素;39 例志贺菌属阳性的患儿,20 例(51%)患儿就诊前已服用抗菌素;11 例沙门菌属阳性的患儿,5 例(45%)患儿就诊前已服用抗菌素。如果采用传统的培养法来检测这些病原菌,则会对培养结果产生较大影响,出现大量的假阴性结果。但本研究采用的是 PCR 法,直接检测病原菌的 DNA,短期服用抗菌素对该检测结果影响不大,因此本研究建立的多病原 PCR 检测方法可快速检测儿童的腹泻易感病原菌,并可避免因抗菌素使用对病原学检测结果的影响。病例研究中发现大部分患儿在自行服用头孢克肟后仍腹泻,但因本次检测未对菌株进行分离培养和进

行菌株的药物敏感性实验,因此对菌株的耐药情况并不了解,但提示儿童腹泻后,家长千万别自行用药,应立即到医院进行粪便的病原学检查,根据检测结果在医护人员的指导下合理选择抗菌素,可避免抗菌素的滥用和更多超级细菌的出现。

综上所述,本研究结果提示,北京地区儿童肠道致病菌的组成已发生变化,因此需要在以后的工作中不断监测本地区肠道致病菌感染的特点,并进一步监测其耐药状况,总结规律性,为本地区的流行病学研究及临床合理用药提供依据,也为可能出现的腹泻引起的公共突发事件做好充分的准备。

参考文献

[1] Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhea in developing countries[J]. Bull World Health Organ, 2008, 86(9):710-717.

[2] Grimwood K, Forbes DA. Acute and persistent diarrhea[J]. Pediatr Clin North Am, 2009, 56(6):1343-1361.

[3] Black RE, Morris SS, Bryce J. Where and why are 10 million children dying every year[J]. Lancet, 2003, 361(9376):2226-2234.

[4] Prestler E, Zwick RH, Reichmann S, et al. Frequency and virulence properties of diarrheagenic Escherichia coli in children with diarrhea in Gabon[J]. Am J Trop Med Hyg, 2003, 69(4):406-410.

[5] Kukuruzovic R, Robins-Browne RM, Anstey NM, et al. Enteric pathogens, intestinal permeability and nitric oxide production in acute gastroenteritis[J]. Pediatr Infect Dis J, 2002, 21(8):730-739.

[6] Maria do Rosário Conceição Moura Nunes, Paula Prazeres Magalhães, Antônio da Silva Macêdo, et al. Attaching and effa-

cing Escherichia coli and Shiga toxin-producing E. coli in children with acute diarrhoea and controls in Teresina/PI, Brazil [J]. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2012, 20(1):43-47.

[7] Gunzburg S, Gracey M, Burke V, et al. Epidemiology and microbiology of diarrhea in young Aboriginal children in the Kimberley region of Western Australia[J]. Epidemiol Infect, 1992, 108(1):67-76.

[8] 曲芬, 毛远丽, 崔恩博, 等. 北京地区 1994~2005 年腹泻病原菌的分布及其耐药趋势[J]. 中华内科杂志, 2008, 47(4):304-307.

[9] 于国慧, 董方, 刘锡清, 等. 2009 年北京地区儿童感染性腹泻病原学及耐药性分析[J]. 中国小儿急救医学, 2011, 18(1):33-35.

[10] 于国慧, 宋文琪, 甄景慧, 等. 北京地区 2007 年儿童急性感染性腹泻病原菌监测分析[D]. 第三届全国细菌耐药监测与临床专题学术会议论文集, 2008:240-242.

[11] 王勇, 张凌, 苏文莉, 等. 北京部分地区肠道病原菌的分布及耐药状况[J]. 解放军预防医学杂志, 2007, 25(2):94-97.

[12] 曲芬, 鲍春梅, 崔恩博, 等. 北京地区近 4 年肠道病原菌感染的特点[J]. 传染病信息, 2004, 17(1):26-28.

[13] 曲芬, 毛远丽, 鲍春梅, 等. 2000~2003 年北京地区 1 542 株腹泻病原药敏试验结果分析[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(4):384-386.

[14] 于国慧, 董方, 甄景慧, 等. 北京地区儿童感染性腹泻病原学和耐药性分析[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(6):535-538.

(收稿日期:2012-10-17)

(上接第 431 页)

推测。现有研究表明 CRP 升高的程度能反应炎症组织的大小或活动性,在急性炎症和感染时,与疾病活动性有良好的相关性,且在治疗过程中 CRP 对炎症、感染反应不受化疗影响,其升幅与感染的严重程度和预后有关,以 CRP 的含量作为分组标准,对 AL 患者体内不同 CRP 含量与感染及 DIC 发生情况分析,结果显示:在所有发生 DIC 的 15 例 AL 患者中有 9 例 CRP 的含量大于 100 mg/L(81.8%),提示本组 AL 患者中,白血病患者本身和感染双重因素可能促使了 DIC 的发生,机体感染越严重其发生 DIC 的风险越高。AL 患者中 CRP 含量的监测一方面是机体感染情况的评判,另一方面可能作为发生 DIC 的风险指标,对此正在进行长期的大样本观察研究。

感染和 DIC 是 AL 常见并发症,也是 AL 致死的主要原因之一,AL 患者体内普遍存在感染和异常的凝血状态,AL 治疗过程中联合监测患者 CRP 和 D-D 有助于准确判断患者感染的严重程度及患者并发 DIC 的风险大小,为 DIC 的早期诊断、预防及治疗提供更可靠的依据。

参考文献

[1] Dalainas I. Pathogenesis diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation; a literature review[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2008, 12(1):19.

[2] Gralnick HR, Marchesi S, Givelber H. Intravascular coagulation in acute leukemia: clinical and subclinical abnormalities[J]. Blood,

1972, 40(5):709-718.

[3] Haferlach T, Bacher U, Kern W, et al. Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach[J]. Ann Hematol, 2007, 86(5):311-327.

[4] Dixit A, Chatterjee, Mishra PT, et al. Disseminated intravascular coagulation in acute leukemia at presentation and during induction therapy[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2007, 13(3):292-298.

[5] Chojnowski K, Wawro, niak E, et al. Assessment of coagulation disorder in patient with acute leukemia before and after cytostatic treatment[J]. Leuk Lymphoma, 1999, 36(1):77-84.

[6] Barbui T, Falanga A. Disseminated intravascular coagulation in acute leukemia[J]. Semin Thromb Hemost, 2001, 27(6):593-604.

[7] Hair GA, Padula S. Tissue factor expression in human leukemia cells. Leukemia Res, 1996, 20(1):1-11.

[8] 张之南, 郝玉书. 血液病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1817.

[9] Larosa SP, Opal SM. Tissue factor pathway inhibitor and antithrombin trial results[J]. Crit Care Clin, 2005, 21(3):433-448.

[10] Gando S, Nanzaki S, Morimoto Y, et al. Systemic activation of tissue factor dependent coagulation pathway in evolving acute respiratory distress syndrome in patients with trauma and sepsis[J]. J Trauma, 1999, 47(4):719-723.

(收稿日期:2012-08-09)