

• 临床检验研究论著 •

致婴幼儿腹泻的肠致病性大肠埃希菌血清分型和毒力基因检测

潘伟光, 李一凡, 邓启文, 张健华

(广东医学院附属南山医院微生物检验室, 广东深圳 518052)

摘要:目的 了解引起婴幼儿腹泻的肠致病性大肠埃希菌血清分型情况及其毒力基因携带状况。方法 采集 2011 年 6 月至 2012 年 2 月医院儿科婴幼儿腹泻患者的粪便标本进行大肠埃希菌的分离培养, 通过血清凝集试验和细菌生化反应筛选出肠致病性大肠埃希菌, 采用多重 PCR 检测毒力基因 *escV*、*bfpA*、*Stx1* 和 *Stx2*。结果 503 例粪便标本中共分离出 47 株肠致病性大肠埃希菌, 检出率是 9.34%。血清分型有 9 种, 最多的血清型是 O86:k61, 占了阳性菌株的 27.66%。毒力基因 *escV* 阳性合计 22 株, *bfpB* 阳性合计 17 株, 检出率分别是 46.81% 和 36.17%, 其中, (*escV*+*bfpB*) 阳性 14 株, *escV* 阳性 8 株, *bfpB* 阳性 3 株, 携带毒力基因的菌株阳性率为 53.19%, 未检出毒力基因 *Stx1* 和 *Stx2*。结论 肠致病性大肠埃希菌血清学分型与毒力基因携带有差异, 有条件的实验室可以直接检测大肠埃希菌的毒力基因, 为临床提供更准确的诊断依据。

关键词: 肠致病性大肠杆菌; 腹泻; 血清; 毒力

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)13-1691-02

Serotyping of the infant diarrhea causing Enteropathogenic Escherichia coli and their virulence genes detection

Pan Weiguang, Li Yifan, Deng Qiwen, Zhang Jianhua

(Microbiology Laboratory, the Affiliated Nanshan Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen, Guangdong 518052, China)

Abstract: **Objective** To investigate of the serogroup distribution of Enteropathogenic Escherichia coli that cause diarrhea in infants and young children and the presence of their virulence genes. **Methods** Isolated and cultured Escherichia coli from the stool specimens of pediatric diarrhea patients, collected in our hospital from June 2011 to February 2012. Then screened the Enteropathogenic Escherichia coli using serum agglutination test and bacterial biochemical reactions. Multiplex PCR was performed to detect virulence genes *escV*, *bfpA*, *Stx1* and *Stx2*. **Results** 47 Enteropathogenic Escherichia coli was isolated from 503 diarrhea stool samples, with a detection rate of 9.34%. There were 9 serotypes, in which O86:k61 was most common, with detection rates of 27.66%. The number of samples for *escV* positive and *bfpB* positive were 22 (detection rate 46.81%) and 17 (detection rate 36.17%), respectively. Within these, sample number for *escV*+*bfpB* double positive was 14, *escV* positive was 8 and *bfpB* positive was 3. The positive rate of strains carrying virulence genes of 53.19%. Virulence genes *Stx1* and *Stx2* were not detected. **Conclusion** There is a difference between the serotyping of Enteropathogenic Escherichia coli and their virulence genes carrying status. It is advisable that laboratory with better conditions should directly detect Enteropathogenic Escherichia coli virulence genes to provide the more precise information for clinical diagnosis.

Key words: Enteropathogenic Escherichia coli; diarrhea; serum; virulence

大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是肠道中重要的正常菌群, 能为宿主提供一些具有营养作用的合成代谢产物, 但有些菌株具有致病性, 可以引起肠道内感染, 包括胃肠炎、腹泻, 故又称致泻大肠埃希菌(*diarrheagenic escherichia coli*, DEC)。致泻大肠埃希菌依其致病机制、临床表现、流行病学特征和血清学分型, 可分为 6 个群: 肠致病性大肠埃希菌(*enteropathogenic escherichia coli*, EPEC)、肠产毒性大肠埃希菌(*enterotoxigenic escherichia coli*, ETEC)、肠侵袭性大肠埃希菌(*enteroinvasive escherichia coli*, EIEC)、肠出血性大肠埃希菌(*enterohemorrhagic escherichia coli*, EHEC)、肠聚集性大肠埃希菌(*enteroaggregative escherichia coli*, EAEC)、扩散粘附大肠埃希菌(*diffuse adherence escherichia coli*, DAEC)。其中 EPEC 是引起婴幼儿感染性腹泻的重要致病菌, 甚至引起婴幼儿的死亡。由于其表型和生化特征与肠道正常的大肠埃希菌并无区别, 因此对它的鉴定成为各国学者广泛关注的问题。我们收集 503 例婴幼儿腹泻患者粪便进行肠致病性大肠埃希菌的检测, 现将实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 2011 年 6 月至 2012 年 2 月本院儿科 503 例 5 岁以下婴幼儿腹泻患者的粪便标本。

1.1.2 主要试剂 麦康凯琼脂平板(广州迪景), 克氏双糖铁琼脂(广州迪景), 动力-靛基质-尿素试验管(广州迪景), LB 琼脂平板(广州迪景), API20 生化鉴定条(法国梅里埃), 肠致病性大肠埃希菌诊断血清(兰州生物), SK1201-UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工), dNTP 混合液(10 mmol/L, 上海生工), Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L, 上海生工), 10 $\times$ Taq 缓冲液(上海生工), 引物(上海生工)。

1.1.3 主要仪器 PCR 扩增仪(PCT-200)、Powerpac Basic 电源、水平电泳槽(Mini-Sub Cell GT)购自美国 Bio-Rad 公司, 凝胶成像系统(Image Master VDS)购自瑞士 Pharmacia Biotech 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离鉴定和血清学分型 将粪便标本划线分离接种麦康凯琼脂平板, (36 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 培养 18~24 h, 在麦康凯琼脂平板上选取 5 个可疑大肠埃希菌菌落(淡粉红色或粉红色、突起、光滑、湿润、中等大小菌落)分别转种克氏双糖铁琼脂和动力-靛基质-尿素试验管继续培养 18~24 h, 初步鉴定为大肠

埃希菌后,用 EPEC 诊断血清确定血清型,具体方法参照产品说明书。对血清分型阳性的菌株用 API 20E 鉴定条进行大肠埃希菌的生化复核鉴定,具体方法参照产品说明书。EPEC 菌株-80℃低温冰箱保存。

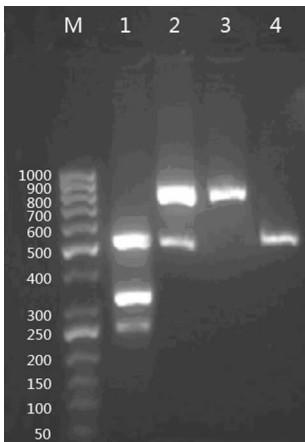
1.2.2 毒力基因检测 (1)模板的制备 EPEC 菌株接种到 LB 琼脂平板,(36±1)℃ 孵育 16~18 h,选取单个菌落再次传代,挑取适量的单个新鲜菌落,按照细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提供的方法提取细菌 DNA。(2)引物的合成:参考文献[1],选择 Stx1(Shiga toxin Stx-producing E. coli,STEC),Stx2(STEC),escV(EPEC,STEC)、bfpB(EPEC)4 个毒力基因作为靶基因,引物序列见表 1,委托上海生工生物工程技术有限公司合成。(3)PCR 扩增:采用 25 μL 反应体系,包含 DNA 模板 2 μL、4 个毒力基因上下游引物(10 pmol/μL)各 0.5 μL、dNTP 混合液(10 mmol/L)1.0 μL、10×Taq 缓冲液 2.5 μL、Taq DNA 聚合酶(5 u/μL) 0.5 μL,加无菌双蒸水到 25 μL。反应条件设为预变性 94℃ 5 min,然后 94℃ 30 s,63℃ 30 s,72℃ 1.5 min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。取标记物和 PCR 扩增产物各 5 μL,1.5%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)电泳,凝胶成像系统观察电泳条带,电泳图谱见图 1。(4)质量控制:采用 O157 大肠埃希菌作为 Stx1 和 Stx2 阳性对照,bfpB 和 escV 阳性对照通过送一个 2 个条带阳性的 PCR 产物到上海生工生物工程技术有限公司进行测序比对,验证这两个阳性条带的基因类型。

表 1 毒力基因和引物序列

毒力基因	引物	引物序列(5'~3')	产物大小(bp)
escV	escV-F	GGCTCTCTTCTTCTTTATGGCTG	534
	escV-R	CCTTTTACAAACTTCATCGCC	
bfpB	bfpB-F	GATAAACTGATACTGGGCAGC	826
	bfpB-R	AGTGACTGTTCCGGAAGCAC	
Stx1	Stx1A-F	GGCGTTCTTATGTAATGACTGC	250
	Stx1A-R	ATCCACGGACTCTTCCATC	
Stx2	Stx2A-F	CGTTTGGACATCTTCGTCTG	325
	Stx2A-R	AGCGTAAGGCTTCTGCTGTG	

2 结 果

2.1 PCR 扩增产物电泳结果见图 1。



M: 标记物; 1: Escherichia coli (O157); 2: escV + bfpB; 3: bfpB; 4: escV。

图 1 PCR 扩增产物电泳结果

2.2 血清分型和毒力基因检测结果 503 例粪便标本中共分离出 47 株肠致病性大肠埃希菌,检出率是 9.34%,血清分型有 9 种,最多的血清型是 O86:k61,占了阳性菌株的 27.66%。

毒力基因 escV 阳性合计 22 株,bfpB 阳性合计 17 株,检出率分别是 46.81%和 36.17%,其中,(escV+bfpB)阳性 14 株,escV 阳性 8 株,bfpB 阳性 3 株,携带毒力基因的菌株阳性率为 53.19%,未检出毒力基因 Stx1 和 Stx2,结果见表 2。

表 2 47 株致病性大肠埃希菌血清分型和毒力基因检测结果

血清型	毒力基因				菌株数
	escv	bfpB	Stx1	Stx2	
O26:k60	—	—	—	—	3
O44:k74	+	+	—	—	5
O44:k74	+	—	—	—	1
O55:k59	—	—	—	—	3
O86:k61	+	+	—	—	5
O86:k61	—	—	—	—	6
O86:k61	+	—	—	—	2
O114:k90	+	—	—	—	4
O119:k69	—	+	—	—	2
O119:k69	—	—	—	—	6
O125:k70	+	+	—	—	2
O125:k70	—	+	—	—	1
O127a:k63	+	+	—	—	2
O127a:k63	—	—	—	—	3
O128:k67	—	—	—	—	1
O128:k67	+	—	—	—	1

3 讨 论

EPEC 是全球性的致婴幼儿腹泻的病原菌。在我国,血清分型是 EPEC 常规的分型方法。我们通过实验分析,我院的 EPEC 血清分型具有多样性,最多的血清型是 O86:k61,占了阳性菌株的 27.66%。由于地域差异和血清型的多样性,不同实验室报道的 EPEC 阳性检出率和血清型分布有所不同^[2-3]。影响阳性检出率的最主要因素除抗血清的质量外,还包括:(1)样本的选择,腹泻婴幼儿的样本阳性检出率明显高于成年人,特别是小于 2 岁的婴幼儿;选择标本性状有改变的,如稀便、水样便、黏脓便或脓血便等,标本接种培养前先做涂片,白细胞计数大于或等于 10 个/高倍视野作为细菌培养的标准,这样就可以排除部分病毒感染的病历,大大提高了阳性检出率。(2)由于 EPEC 菌落形态和普通大肠埃希菌没有区别,选取尽可能多的菌落分别进行实验可以提高阳性率。

自研究者半个世纪前建立大肠埃希菌血清型分类系统以来,血清型一直被用作致泻性大肠埃希菌的鉴定依据及流行病学调查的标志。而血清分型常存有交叉反应现象,使得实验结果难以保证,因此工作中仅依靠传统的常规生化和血清学实验存在误检和漏检的可能,所以菌株血清型的鉴定不是致泻性大肠埃希氏菌的诊断和流行病学调查的理想方法。

大肠埃希菌的致泻性主要取决于是否携有相应的毒力因子,因此毒力基因的检测成为鉴别致泻性大肠埃希菌的重要依据。我们选择的 4 个毒力基因,其中的 bfpB 是编码 EPEC 成束菌毛(bundle-forming pilus,BFP)的一个重要基因^[4],EscV 是 EPEC 和 EHEC III 型分泌系统中共同的重要结构元件^[5-6]。参考文献[1],选择 STEC(产志贺毒素大肠埃希)特有的毒力基因 Stx1 和 Stx2,有助于排除包括 EHEC 在内的 STEC。本研究通过实验分析,血清分型阳性的菌株中,有 25 株携带毒力基因,携带毒力基因菌株阳性率为 53.19%。(下转第 1695 页)

前血清 HCV RNA 载量与 HCV 基因型无关^[9]。

一般认为,1b 型感染患者血清中病毒含量高,病毒复制活跃,干扰素反应差,临床疗效低于 2a 型。有报道^[10]称,104 例丙型肝炎患者接受治疗后持续应答者多为 2a 型患者(38%),1b 型患者仅为 7%。提示丙型肝炎患者在治疗前对病毒基因进行分型可以对合理用药提供可靠地依据。近年来发现 HCV 基因型对影响干扰素的应答较为重要,不同基因型的 HCV 对治疗药物如聚乙二醇干扰素、利巴韦林的敏感程度不同,例如,HCV 基因 1 型的患者需用聚乙二醇干扰素加标准剂量的利巴韦林治疗 48 周;而 HCV 基因 2、3 型的患者需用聚乙二醇干扰素加低剂量的利巴韦林治疗 24 周。所以确定 HCV 感染者基因型有助于临床治疗和合理用药。因此,对 HCV 基因型继续深入研究可以为明确 HCV 感染的发病机制与防治提供有效的方案。

总之,HCV 分型对临床医师治疗丙型肝炎用药有重要的临床指导意义。丙型肝炎不同基因型与药物疗效之间的关系被逐渐发现并应用于临床治疗中,对于不同患者根据丙型肝炎基因型采用相应有效的药物治疗方案将成为大趋势。个体化医疗已经逐渐替代了传统医疗模式,在改善治疗效果与降低药物毒性方面具有显著优势。

参考文献

[1] Cheng H, Johann S, Howe AY, et al. Molecular machanism of hepatitis C virus replicon variants with reduced susceptibility to a benzofuran inhibitor, HCV-796[J]. Antimicrob Agents Chemoth-

er, 2008, 52(9): 3327-3328.

- [2] Fried MW, Shiffman MF, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection[J]. N Engl J Med, 2002, 347(10): 975-982.
- [3] 中华医学会肝病学分会. 中华医学会传染病与寄生虫学分会丙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(4): 194-198.
- [4] 胡志军, 丁辉, 汪晓军. 69 例慢性丙型肝炎患者基因型与肝功能指标、HCV RNA 及中医证型的相关性分析[J]. 北京中医药, 2012, 31(3): 166-168.
- [5] 谢尧, 徐道振, 陆志檬. HCV 基因型对慢性丙型肝炎干扰素疗效的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(11): 72-75.
- [6] 蒋孝华, 谢玉桃, 谭明德. 病毒性肝炎血小板减少症影响因素的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(12): 734-736.
- [7] Tremlett H, Oger J. Hepatic injury, liver monitoring and the beta-interferon for multiple sclerosis[J]. Neurol, 2004, 251(23): 1297-1303.
- [8] 张立新, 安勇, 张孝国, 等. 山东地区慢性 HCV 感染者病毒的基因型分布[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(2): 567.
- [9] 周友乾, 尹凤鸣, 冯经华. 丙型肝炎病毒载量与基因型和抗病毒疗效的关系研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2011, 14(4): 340-343.
- [10] 王法治. 治疗前血清 HCV RNA 水平和 HCV 基因型是 α 干扰素治疗慢性丙型肝炎持续应答的住响预测因素[J]. 国外医学流行病学传染病分册, 1996, 25(3): 79-80.

(收稿日期: 2012-12-17)

(上接第 1692 页)

有文献报道^[7], 对血清分型阳性的 EPEC 菌株检测 eaeA 和 bfpA 这 2 个毒力基因, 携带毒力基因的菌株阳性率为 46.85%。其中, (eaeA + bfpA) 阳性占 26.13%, eaeA 阳性占 14.41%, bfpA 阳性占 6.31%。该文献还报道有 11.71% 的 EPEC 菌株经过毒力基因检测, 鉴定为 STEC, 通过这个报道, 也证明了单独依靠血清学诊断会造成部分病例误诊。而文献报道^[8]的研究是先检测大肠埃希菌毒力基因 escV 和 bfpB, 再进行血清分型, 15 株携带毒力基因的 EPEC 中, 有 11 株 O 抗原不能分型, 这也证明了单独依靠血清学诊断会造成部分病例漏检。

本研究检测 EPEC 的毒力基因并没有涵盖全部。EPEC 除了比较重要的 eaeA、bfpA、escV 和 bfpB 等毒力基因外, 可能还有其他罕见的未知致病因子。早在 1998 年, 毕振强等^[9]就报道了 eaeA 和 bfpA 2 个毒力基因阴性的 131 株 EPEC 中, 有 1 株 EPEC 表现为 LA/AE(局灶性黏附/黏附性和致黏附脱落病变效应)阳性, 提示可能有其他未知因素参与 EPEC 的 LA 黏附和致 AE 病变效应, 说明了 EPEC 致病因子的复杂性和多样性。反过来分析, 没有携带 eaeA 和 bfpA 这 2 个毒力基因的 EPEC 菌株中, 有 99.28% 菌株表现为 LA/AE 阴性, 就可以排除绝大多数 EPEC 的致病性。

综上所述, EPEC 血清学分型与毒力因子携带有差异, 有条件的实验室可以直接检测大肠埃希菌的毒力基因, 为临床提供更准确的诊断依据。

参考文献

[1] Müller D, Hagedorn P, Brast S, et al. Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC), atypical EPEC, and Shiga toxin-producing Escherichia

coli by a one-step multiplex PCR method[J]. J Med Microbiol, 2006, 44(7): 2626-2629.

- [2] Amisano G, Fornasero S, Migliaretti G, et al. Seasonality of diarrheagenic Escherichia coli pathotypes in the US students acquiring diarrhea in Mexico[J]. J Travel Med, 2011, 18(2): 121-125.
- [3] Ochoa TJ, Mercado EH, Durand D, et al. Frequency and pathotypes of diarrheagenic Escherichia coli in Peruvian children with and without diarrhea[J]. Rev Peru Med Exp Salud Publica, 2011, 28(1): 13-20.
- [4] Ramer SW, Bieber D, Schoolnik GK. BfpB, an Outer Membrane Lipoprotein Required for the Biogenesis of Bundle-Forming Pili in Enteropathogenic Escherichia coli[J]. J Bacteriol, 1996, 178(22): 6555-6563.
- [5] Gauthier A, Puente JL, Finlay BB. Secretin of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization[J]. Infect Immun, 2003, 71(6): 3310-3319.
- [6] 杨琴, 阎有功, 曹军皓. 肠出血性大肠杆菌 III 型分泌系统及其转位效应器蛋白[J]. 生命的化学, 2008, 28(4): 468-471.
- [7] Alikhani MY, Mirsalehian A, Aslani MM. Detection of typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli(EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea[J]. J Med Microbiol, 2006, 55(9): 1159-1163.
- [8] 孔海深. 致泻大肠埃希菌的分子分型和流行病学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [9] 毕振强, 永山宪市, 本田武司. 致病性大肠杆菌致病因子的研究[J]. 中国公共卫生学报, 1998, 17(4): 209-211.

(收稿日期: 2012-12-28)