

4种致泻性大肠埃希菌分子诊断方法的评估及其在监测中的应用

黄峥 许浩 郭家胤 黄晓兰 李颖 侯琪 王爱敏 王传清 金汇明
许学斌 胡家瑜 史贤明 冉陆 阙颢

【摘要】 目的 评估和建立用于常规监测4种致泻性大肠埃希菌(DEC)的分子诊断方法,并应用于上海市腹泻人群DEC的监测。方法 使用丹麦SSI分子诊断试剂盒对DEC参考菌株进行验证试验及制定DEC-PCR诊断、分离的操作规程(DEC-PCR-SOP),并检测2012年6—9月上海市3家临床医院腹泻病例粪便标本。结果 经26株DEC参比菌株验证,SSI分子诊断试剂盒的特异性为100%;1887份腹泻病例标本共分离得到218株DEC(乳糖阳性181株,乳糖阴性37株),其中致病性大肠埃希菌(EPEC)118株、产毒性大肠埃希菌(ETEC)90株、侵袭性大肠埃希菌(EIEC)9株、产志贺毒素大肠埃希菌(STEC)1株、志贺菌18株,总阳性率为11.6%;监测地区DEC腹泻病例中以EPEC占优势,而EPEC腹泻病例中又以2岁以下婴幼儿为主;外籍DEC病例以ETEC占优势,新生儿ETEC病例占5岁以下低年龄组腹泻病例的1/3。结论 经评估DEC-PCR-SOP用于4种DEC常规监测的数据结果可信。国内食源性监测网络实验室应不断完善4种DEC诊断和参比能力。

【关键词】 致泻性大肠埃希菌;分子诊断;评估;监测

Assessment and application of a molecular diagnostic method on the detection of four types of diarrheagenic *Escherichia coli* HUANG Zheng¹, XU Hao¹, GUO Jia-yin¹, HUANG Xiao-lan², LI Ying², HOU Qi³, WANG Ai-min⁴, WANG Chuan-qing⁴, JIN Hui-ming⁵, XU Xue-bin⁵, HU Jia-yu⁵, SHI Xian-ming⁶, RAN Lu⁷, KAN Biao⁷. 1 Center of Hygiene Inspection of Changning District, Shanghai 200051, China; 2 Changning District Center of Disease Control and Prevention; 3 Shanghai United Family Hospital; 4 Fu-Dan University Subsidiary Children Hospital; 5 Shanghai Municipal Center of Disease Control and Prevention; 6 School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University; 7 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding authors: XU Xue-bin, Email: xbxu@scdc.sh.cn; WANG Chuan-qing, Email: chuqing12@yahoo.com.cn

This work was supported by grants from the Mega-projects of Science and Technology Research of China (No. 2012ZX10004215-003), the Subproject 6 of the Sino-US Emerging Infectious Diseases Cooperation Project and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA101601).

【Abstract】 Objective To establish and evaluate a molecular diagnostic method for routine monitoring of four types of diarrheagenic *Escherichia (E.) coli* (DEC) and to study the distribution of four types of DEC isolated from diarrheal patients in Shanghai. **Methods** DEC-PCR standard operation procedure (SOP) had been developed for DEC detection and isolation, using the Statens Serum Institute (SSI) DEC PCR kits with multiplex PCR technique after verification tests on reference strains. Diarrhea specimens from 3 clinical hospitals in Shanghai were tested from June to

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.06.018

基金项目:国家重大科技专项(2012ZX10004215-003);中美新发再发传染病合作项目(子项目6);国家高技术研究发展计划("863"计划)(2012AA101601)

作者单位:200051 上海市长宁区卫生检验所(黄峥、许浩、郭家胤);长宁区疾病预防控制中心(黄晓兰、李颖);上海和陆医院(侯琪);上海复旦大学附属儿科医院(王爱敏、王传清);上海市疾病预防控制中心(金汇明、许学斌、胡家瑜);上海交通大学农业与生物学院(史贤明);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(冉陆、阙颢)

黄峥、侯琪同为第一作者

通信作者:许学斌, Email: xbxu@scdc.sh.cn; 王传清, Email: chuqing12@yahoo.com.cn

September, 2012. **Results** Specificity of the PCR kit was 100% by verification on the 26 DEC reference strains. A total number of 218 DEC isolates, including 181 fermented lactose and 37 unfermented lactose were identified from the 1887 stool specimens of diarrhea patients, with positive rate as 11.6%. The most common pathogen (54.1%, 118/218) was enteropathogenic *E. coli* (EPEC), followed by enterotoxigenic *E. coli* (ETEC, 41.3%, 90/218), enteroinvasive *E. coli* (EIEC, 4.1%, 9/218) and Shigatoxin-producing *E. coli* (STEC, 0.5%, 1/218) in addition to 18 *Shigella* isolates. ETEC dominated in diarrhea patients with foreign residency, as well as 1/3 were perinatal stage of neonatal ETEC of all diarrhea cases under the age of 5, while EPEC dominated in the Chinese diarrhea patients especially among young kids under the age of 2. **Conclusion** Data was reliable after assessment on this molecular diagnostics and separation procedures used for the routine monitoring on four types of DEC, while the diagnosis and reference ability of DEC regarding the laboratories net-working on food-borne pathogens need to be built up and improved.

[Key words] Diarrheagenic *Escherichia coli*; Molecular diagnostics; Assessment; Monitor

致泻大肠埃希菌(diarrheagenic *E. coli*, DEC)引发的肠道感染在肠道病原谱中所占比重已超过志贺菌和沙门菌,成为婴幼儿和成人腹泻重要致病菌^[1,2]。依据 DEC 毒力因子、致病机制及遗传学特性,可分为肠致病性大肠埃希菌(EPEC)、肠产毒性大肠埃希菌(ETEC)、肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC)、肠出血性大肠埃希菌(EHEC)和肠聚集性大肠埃希菌(EAEC)^[1,3]。其中 EHEC 广泛存在养殖奶牛、肉牛肠道,易直接或间接污染食物,导致食源性暴发^[4,5]。如 EHEC O157:H7、EHEC O111 和特殊变异耐药型大肠埃希菌 O104:H4 在美国、日本和欧洲引发重大食源性突发事件。为掌握上海地区不同腹泻人群中 DEC 所占比重,有必要建立快速可靠的分子生物学和病原学诊断方法,为此本研究选择 WHO 的 DEC 参比实验室已获得应用和评估的丹麦 SSI 常规 4 种 DEC 分子诊断试剂盒^[6],通过检测 2012 年 6—9 月上海市 3 家临床医院腹泻病例粪便标本,以验证及制定 DEC-PCR 诊断、分离的操作规程(DEC-PCR-SOP)。

材料与方法

1. 标本和菌株来源:在参与上海市食源性感染性疾病监测网络哨点的 9 家公共卫生实验室和 28 家临床实验室中,选择具有典型代表的 3 家临床医院作为监测哨点医院。1887 份腹泻病例粪便标本来自 2012 年 6—9 月监测哨点的上海复旦大学附属儿科医院(1222 份)、长宁区中心医院(374 份)和上海和睦家医院(291 份)。26 株 DEC 参考菌株(包含有不同毒力基因 EPEC、ETEC、EIEC 和 EHEC 菌株)由上海市疾病预防控制中心微生物实验室提供。

2. 试剂和仪器:包括肠道专用分离琼脂平板和 DEC 多重 PCR 诊断试剂盒(丹麦 SSI);肠道双支糖综合鉴别管、麦康凯琼脂平板和哥伦比亚琼脂基础斜面(上海市疾病预防控制中心试剂供应中心);志

贺菌分型血清 24 种(日本生研公司);扩增仪(美国伯乐公司)、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像仪(上海复日科技公司)。所有试剂均按照说明书要求保存并在有效期内使用。

3. 菌株验证方法:按照 DEC-PCR 诊断试剂盒说明书要求对 26 株参比菌株进行基因扩增、电泳和诊断,验证试剂盒的特异性。

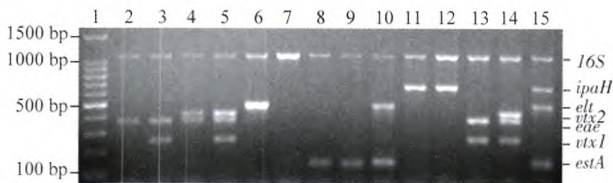
4. DEC-PCR-SOP:本研究建立的 DEC-PCR-SOP 是将 PCR 多重基因筛选混合样品与单菌落基因复核结合后建立的基于常规分离技术的组合方法,4 种 DEC 的单纯检测和分离的周期为 1~2 d,若临床实验室需加做抗生素敏感试验则需要 2~3 d 完成。对粪便肛拭子标本直接划线接种 SSI 肠道菌分离平板,36 °C 过夜培养,任意选择 5 个单个菌落(菌落特征为乳糖阳性或阴性、边缘光滑或不光滑的中等大小菌落)进行菌落编号后,以无菌操作方式各挑取半个菌落混合成 1 个待检样品,按照说明书要求依次进行 DNA 抽提、扩增、电泳后判读结果。若混合样结果为除 16S 基因外任一或多个靶基因阳性者,则重新取对应分离平板上的 5 个标记菌落进行单独定位的复核鉴定,获得相匹配的阳性结果后再纯化原始菌落,用于生化鉴别试验(*ipaH* 阳性者需要使用肠道双支糖综合鉴别管区别志贺菌和大肠埃希菌的生化特征)、乳糖发酵试验、抗生素敏感性试验和菌株的保存等。

结 果

1. 参比菌株验证:26 株 DEC 参考菌株按照上述步骤操作后的扩增产物条带与目的基因的长度相符,条带间的区分度好,试剂盒内提供的两组阳性对照在预期位置能同时扩增出 4 种 DEC 所有对应靶基因产物(部分参考菌株的电泳图谱见图 1),证明该 DEC-PCR 试剂盒具有 100% 的特异性(表 1)。

2. DEC-PCR-SOP 的应用:1887 份腹泻病例粪

便标本共分离 218 株 DEC(乳糖阳性 181 株、乳糖阴性 37 株),总阳性率为 11.6%,6—9 月阳性率分别为 8.2% (29/352)、12.6% (50/397)、12.6% (81/642)、11.7% (58/496)。其中 EPEC 118 株(乳糖阳性 86 株,乳糖阴性 32 株)占 54.1%;EPEC 90 株(乳糖阳性 89 株,乳糖阴性 1 株)占 41.3%,其中 62 株(68.9%)产生 1 种耐热肠毒素 *estA*, 21 株(23.3%)产生另 1 种不耐热肠毒素 *elt*, 7 株(7.8%)同时产生 *estA* 和 *elt* 两种肠毒素。*ipaH* 阳性结果 27 株,经生化初筛证实:EIEC 9 株(乳糖阳性 5 株,乳糖阴性 4 株)占 4.1%,其余 18 株生化和血清证实 15 株宋内志贺菌、3 株福氏志贺菌;STEC 1 株(0.5%),乳糖阳性,产生 *vtx1* 毒素。



注:1 为 DNA Marker;2 为 SHCE5: EPEC (*eae*);3 为 SHCE10: EHEC (*vtx1*, *eae*);4 为 SHCE11: EHEC (*vtx2*, *eae*);5 为 SHCE12: EHEC (*vtx1*, *eae*, *vtx2*);6 为 SHCE3: ETEC (*elt*);7 为阴性对照: ATCC25922 (*16S*);8 为 SHCE1: ETEC (*estA*);9 为 SHCE2: ETEC (*estA*);10 为 SHCE9: ETEC (*estA*, *elt*);11 为 SHCE2: EIEC (*ipaH*);12 为 SHCE4: EIEC (*ipaH*);13 为 SHCE17(*vtx1*, *eae*);14 和 15 分别为两组阳性对照:*vtx1*, *eaeA*, *vtx2*, *16S* 和 *estA*, *elt*, *ipaH*, *16S*

图 1 DEC 参比菌株分子诊断电泳图谱

3. 哨点医院 DEC 监测:复旦大学附属儿科医院实验室检测腹泻患儿粪便标本 1222 份共分离 DEC 114 株,总阳性率为 9.3%,6—9 月阳性率分别为 8.0% (17/212)、10.5% (23/219)、8.6% (37/432)、10.3% (37/359),其中 EPEC 74 株、ETEC 37 株、EIEC 2 株、STEC 1 株;上海和睦家医院实验室检测腹泻患者粪便标本 291 份共分离 DEC 47 株,总阳性率为 16.2%,6—9 月阳性率分别为 11.1% (7/54)、13.0% (9/69)、19.6% (18/92)、18.4% (14/76),其中 EPEC 20 株、ETEC 26 株、EIEC 1 株;长宁区中心医院实验室检测腹泻患者粪便标本 374 份共分离 DEC 57 株,总阳性率为 15.2%,6—9 月阳性率分别为 7.0% (6/86)、16.5% (18/109)、22.0% (26/118)、11.5% (7/61),其中 EPEC 24 株、ETEC 27 株、EIEC 6 株。

4. 不同国籍 DEC 腹泻病例检测结果比较:1596 份中国籍腹泻病例标本共分离出 171 株 DEC,阳性率为 10.7%。其中 EPEC 98 株(57.3%);ETEC 64 株(37.4%),其中从 1 例 14 月龄女婴标本中同时分离到 2 株不同类型的 ETEC(1 株 *elt* 阳性和 1 株 *elt*, *estA* 均阳性);EIEC 8 株(4.7%);STEC 1 株(0.6%)。291 份

表 1 26 株 DEC 参比菌株经 DEC-PCR 验证后对应的靶基因

编号	DEC 菌株	靶基因						
		<i>16S</i>	<i>estA</i>	<i>elt</i>	<i>ipaH</i>	<i>vtx1</i>	<i>eae</i>	<i>vtx2</i>
SHCE1	ETECEC-129	+	+	-	-	-	-	-
SHCE2	ETECEC-130	+	-	-	+	-	-	-
SHCE3	ETECEC-142	+	-	+	-	-	-	-
SHCE4	EIEC4608	+	-	-	+	-	-	-
SHCE5	SH0163O157:H7	+	-	-	-	-	+	-
SHCE6	44155 O111	+	-	-	-	-	+	-
SHCE7	ETECEC188	+	+	-	-	-	-	-
SHCE8	ETECEC129	+	-	+	-	-	-	-
SHCE9	ETECEC240-3	+	+	+	-	-	-	-
SHCE10	EHEC3-92	+	-	-	-	+	+	-
SHCE11	EHEC4-92	+	-	-	-	-	+	+
SHCE12	EHEC5-92	+	-	-	-	+	+	+
SHCE13	EHEC96-10	+	-	-	-	+	+	+
SHCE14	ATCC43888	+	-	-	-	-	+	-
SHCE15	ATCC43889	+	-	-	-	-	+	+
SHCE16	EHECB II a	+	-	-	-	+	+	-
SHCE17	EHECA I c	+	-	-	-	+	+	-
SHCE18	EPECA I a	+	-	-	-	-	+	-
SHCE19	EHECA I b	+	-	-	-	+	+	-
SHCE20	EPEC82-2035	+	-	-	-	-	+	-
SHCE21	EHEC4-87	+	-	-	-	+	+	+
SHCE22	EPEC76-86	+	-	-	-	-	+	-
SHCE23	EHEC9-96	+	-	-	-	+	+	+
SHCE24	EPEC82-87	+	-	-	-	-	+	-
SHCE25	EHECSH98/10	+	-	-	-	+	+	+
SHCE26	EHECSH04	+	-	-	-	-	+	+

外籍腹泻病例标本共分离出 47 株 DEC,阳性率为 16.2%。其中 EPEC 20 株(42.6%);ETEC 26 株(55.3%),其中 19 株(73.1%)*estA* 阳性,5 株(19.2%)*elt* 阳性,2 株(7.7%)*estA* 和 *elt* 均阳性,并从 1 名 55 岁男性病例标本同时分离到 2 株不同类型的 ETEC(1 株 *elt* 阳性和 1 株 *elt*, *estA* 均阳性);EIEC 1 株(2.1%)。

5. EPEC 和 ETEC 腹泻病例特征及菌株乳糖表型特征:EPEC 病例共 118 例,男性(72 例)多于女性(46 例),<1 岁病例(53 例)明显多于其他年龄组,86 例为乳糖发酵表型。中国籍 EPEC 病例 98 例,男性(63 例)多于女性(35 例),<1 岁病例(47 例)明显多于其他年龄组,71 例为乳糖发酵表型;外籍 EPEC 病例 20 例(男性 9 例、女性 11 例),各年龄组间差异较小,15 例为乳糖发酵表型。<5 岁低龄组 EPEC 病例 74 例(男性 51 例、女性 23 例),42 例为 3~23 月龄,明显高于其他年龄组,55 例为乳糖发酵表型。ETEC 病例共 88 例(男性 47 例、女性 41 例),18~59 岁 44 例明显高于其他年龄组,87 例为乳糖发酵表型。中国籍 ETEC 病例 63 例(男性 29 例、女性 34

例), <1 岁和 18~59 岁病例分别为 17 和 22 例, 62 例为乳糖发酵表型; 外籍 ETEC 病例 25 例(男性 18 例、女性 7 例), 18~59 岁 22 例占绝对优势, 所有病例均为乳糖发酵表型; <5 岁低龄组 ETEC 病例 36 例(男性 20 例、女性 16 例), <28 日龄新生儿、3~23 月龄和 >4 岁的病例分别有 12、10、9 例, 有 35 例为乳糖发酵表型。

讨 论

目前国内对 DEC 的检测主要按标本类型不同由传染病实验室和食品检验实验室, 分别依据卫生部感染性腹泻标准和食品微生物检验标准完成, 方法间原理不一、实验室各成体系、互不参比。本研究采用 DEC-PCR-SOP 对 4 种常见 DEC 腹泻标本检测表明, 可在 1~3 d 内完成常规性报告, 除准确度和特异性高外, 还可对所有 *ipaH* 基因阳性菌株通过简易生化和血清学试验甄别宋内和福氏志贺菌。218 株 DEC 的乳糖发酵试验提示, 除 1 株 ETEC 为乳糖阴性外, 其他 3 种 DEC 也多数发酵乳糖, 虽为无关致病因子, 但对 DEC-PCR-SOP 的建立、实施和培训有重要意义, 即 DEC 无法使用传统选择性定位培养基筛选符合概率特征的典型菌落。

本研究在腹泻病流行季节对上海市 3 家有代表性的哨点医院不同人群开展 DEC 监测, 表明 EPEC 是当地低龄组人群主要腹泻病原, 其中 <1 岁组病例数比 1~4 岁组高 3 倍, 男性病例多于女性; 其次为 18~59 岁者, 60%~80% 的感染因素疑有不洁饮食史。中外籍 EPEC 病例的年龄和性别构成无较大差异, 推测感染因素为环境或食品交叉污染造成的散发病例。本次分离的 ETEC 有 3 种类型, 其中以产 *estA* 的 ETEC 占优势, 病例的年龄和性别构成与 EPEC 感染相似, 以 18~59 岁病例占多数, ETEC 当地病例(22/63)和外籍病例(22/25)均符合“旅游者腹泻”病原检测的定义, 属经口传播的食源性疾病^[7]。但新生儿病例中 ETEC 感染例数(12/36)高于 EPEC 感染例数(5/74), 但其感染源和传播途径尚不明确。此外本次监测到 9 例(株)EIEC 感染, 提示该菌可能与志贺菌传播机制相似, 主要以社区范围传播, 其易感性低于志贺菌。本次监测仅从 1 例幼儿病例中分离到 1 株 STEC(*vtx1*), 提示该菌可能在当地人群中感染率低, 亦或未发生 STEC 生态入侵事件。

本次监测未针对 EAEC 或者肠黏附性大肠埃希菌(DAEC)的靶基因。主要是目前国内外的研究尚

未明确 EAEC 与急性腹泻间的因果关系, 且其多种致病因子与其他 DEC 共有, 目前也缺少简单可行的分子诊断方法^[8,9]。相对此次检测的 4 种 DEC 而言, EAEC 和 DAEC 是非专一性肠道病原菌, 因欧洲的 DTO104 食源性暴发菌株曾经携带 *AggR* 毒力因子, 在实验室追溯传染源的检测中备受重视, 因此应建立针对肠道 DEC 和肠外致病大肠埃希菌(ExPEC)感染的分子诊断技术网络实验室^[10]。

参 考 文 献

- [1] James PN, James BK. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(1): 142-201.
- [2] Zhu M, Xie ZQ, Zhao JY, et al. Research on the detection of five types of diarrheagenic *Escherichia coli* from diarrheal patients in Henan province. Mod Prev Med, 2010, 37(6): 1148-1150. (in Chinese)
朱敏, 谢志强, 赵嘉咏, 等. 河南省腹泻病人 5 种致泻性大肠埃希菌感染调查. 现代预防医学, 2010, 37(6): 1148-1150.
- [3] Angeles G. Diagnosis and main characteristics of *Escherichia coli* pathogenic groups. Salud Publica Mex, 2002, 44(5): 464-475.
- [4] Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, et al. Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. J Infect Dis, 2005, 192(10): 1422-1429.
- [5] Chen C, Xu XB, Gu BK. Comparison of several methods in detecting *Escherichia coli* O157: H7 strain. Chin Prev Med, 2004, 5(2): 107-109. (in Chinese)
陈纯, 许学斌, 顾宝柯. 肠出血性大肠杆菌 O157: H7 几种检测方法比较研究. 中国预防医学杂志, 2004, 5(2): 107-109.
- [6] Persson S, Olsen KEP, Scheutz F, et al. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(5): 516-524.
- [7] Qadri F, Svennerholm AM, Faroque ASG, et al. Enterotoxi-genic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(3): 465-483.
- [8] Keskimaki M, Mattila L, Peltola H, et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in Finns with or without diarrhea during a round-the-world trip. J Clin Microbiol, 2000, 38(12): 4425-4429.
- [9] Scaletsky ICA, Fabricotti SH, Aranda KR, et al. Comparison of DNA hybridization and PCR assays for detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. J Clin Microbiol, 2002, 40(4): 1254-1258.
- [10] Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. J Infect Dis, 2000, 181(5): 1753-1754.

(收稿日期: 2013-01-14)

(本文编辑: 张林东)