

产志贺毒素肠聚集性大肠埃希菌感染的 检验诊断与防治

王金良

作者单位:300040 天津市,天津市公安医院

2011 年 5 月起,德国出现新型肠出血性大肠埃希菌(*enterohaemorrhagic Escherichia coli*, EHEC)感染的疫情,来势凶猛,很快蔓延到英国、荷兰、法国、奥地利、挪威、西班牙、瑞士、丹麦、芬兰、捷克等几乎整个欧洲国家,美国也发现了确诊病例。截止 6 月底,已报告有 3600 余人发病,死亡 52 人^[1]。更为严重的是,有 852 例感染者(约 20%)发生了溶血性尿毒综合征(haemolytic uremic syndrome, HUS)。患者在腹泻、发热后很快出现急性的肾功能衰竭、血小板减少和血管内溶血等症状而危及生命^[2]。因此,及时的诊断和进行抢救性治疗成为关键。

1 新型病原菌的确定

已知的致病性大肠埃希菌有产毒素性、致病性、侵袭性、肠出血性和肠聚集黏附性 5 种。我国学者^[3]报告的产志贺毒素且具侵袭力者尚需更多研究证实。EHEC 有 200 余种血清型,通常流行的是 O157:H7 血清型,此血清型引起的爆发性流行在世界许多国家和地区,包括我国的安徽省等地均发生过^[4]。这次欧洲大范围流行的病原体经过有我国科学家参与的全基因组测序发现它是 O104:H4 血清型,其基因有 80%来自 O104 型细菌,另 20%来自肠聚集黏附性大肠埃希菌(*enteroaggregative Escherichia coli*, EAggEC)。代表菌株 TY2482 与 2002 年中自非的艾滋病患者的腹泻标本中分离的 EAggEC(代表菌株 55989)有超过 93%的同源性。EAggEC 常引起儿童和成人的急性或持续性腹泻。目前所形成的基因杂交变种缺失了 EHEC 毒力岛上的 *eae* 基因和 pO157 大质粒上的 *ehxA* 基因,却获得了 EAggEC 的数种毒力基因,包括 *aggA* 至 *aggD* 的 4 个基因等。可以认为,它结合了 EHEC 和 EAggEC 的基因特性^[5]。人们对此新型菌株缺少免疫力,故形成产志贺毒素肠聚集性大肠埃希菌(*shiga toxin-producing enteroaggregative Escherichia coli*, STEAEC)的爆发流行,震惊了世界。

2 新型病原菌的致病机制

2.1 新型病原菌的致病机制主要是能在患者体内产生志贺毒素。志贺毒素以前也被称为 Vero 细胞毒素,类志贺毒素,故

EHEC 与 Vero 细胞毒素大肠埃希菌和志贺毒素大肠埃希菌实为同义词。志贺毒素作用于肠道引起腹泻,其病理表现为肠黏膜出血和水肿,伴有和致病性大肠埃希菌引起的与紧密黏附/擦伤(A/E)相似的细胞损伤,使细胞内 Ca^{2+} 和 IP_3 升高,进一步加剧损伤。编码志贺毒素的基因主要有 *stx1* 和 *stx2*,还有一些变异体。志贺毒素与痢疾菌的毒素性质相近,由 A、B 两个亚单位组成。相对分子质量为 32×10^3 的 A 亚单位为蛋白溶解性, B 亚单位为五聚体,与肠道细胞上的糖脂性受体结合而起作用。志贺毒素是引起肠出血和 HUS 的重要因子, *stx2* 在导致 HUS 中比 *stx1* 更为重要,且对肾脏血管内皮细胞有更大毒性,其编码基因分为 *stxA2* 和 *stxB2*。已证明,此次新型菌株流行易造成肾脏急性损伤,与其可产生更多的 *stx2* 有很大关系^[6]。

2.2 来自 EAggEC 的聚集黏附菌毛 I 型基因簇(AAF/I) AAF/I 是感染菌黏附于肠壁的重要因子,同时在肠壁发生紧密黏附/擦伤(A/E)样的细胞损伤。据 Qin 等^[7]研究,上述两基因(簇)是新型流行菌株的重要特征。经对 54 株欧洲流行菌的检验,有 52 株同时检出 *stx2* 和 AAF/I 两种基因,认为可以常规应用于对该菌的检验和鉴定。

2.3 其他毒力因子 如质粒编码的肠溶血素, EHEC 通常具有相对分子质量为 $60\,000 \times 10^3$ 的质粒,编码溶血素。原在德国发生的感染,90%的产志贺毒素菌株有此质粒,质粒的基因为 *ehxA*, *ehxB*, *ehxC*, *ehxD*。溶血素可溶解红细胞以供应 EHEC 更多的铁并促其生长。ChuA 基因即大肠杆菌含铁血红蛋白利用基因编码相对分子质量为 69×10^3 的外膜蛋白,可使 EHEC 利用溶血的铁促进生长。细菌的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是菌体 O 抗原结构的组成部分,可增强志贺毒素的细胞毒性。

3 临床表现

EHEC 可导致急性出血性腹泻、出血性结肠炎和 HUS。可出现的并发症有胆囊炎、肠穿孔、胰腺炎、阑尾炎、肺炎、出血性膀胱炎、肺水肿、心肌损伤和神经症状,最严重的是发生 HUS。过去流行中的 EHEC 感染者只有不足 10%发生 HUS

(多发生在 16 岁以下儿童或老年人),其潜伏期 3-4 d,也可短至 1-2 d。患者出现肠绞痛、低热、血便,约半数有呕吐。发生 HUS 的患者表现为微血管异常溶血性贫血、血尿、少尿或无尿、皮下黏膜出血、血小板减少和急性肾功能减退,可迅速出现肾功能衰竭,常危及生命。尤其值得注意的是,抗生素的应用可使菌体裂解释放出更多志贺毒素,易引起 HUS 以及菌群失调,给治疗带来困难,应特别注意。

4 检验诊断

4.1 粪便常规检验 粪便常规检验有肉眼可见的鲜血或显微镜下的红细胞,这是提示该菌感染的重要线索。镜下白细胞也较多。

4.2 粪便培养 ①细菌的分离培养应尽早进行,在发病 2 d 内分离率可达 100%,3-6 d 则由 91.7%降至 30.3%。常规应用的麦康凯和中国蓝琼脂培养基适用,而 SS 琼脂培养基因可抑制部分大肠杆菌生长而不适用。美国疾病预防控制中心建议对血便应用山梨醇麦康凯琼脂 (sorbitol macconkey agar, SMAC) 选择性培养基。EHEC 不发酵山梨醇,在此培养基上生长为白色的菌落为可疑,再进一步鉴定其 O、H 抗原。②增菌培养。粪便接种于含 50 ng/mL 头孢克肟和 40 μg/mL 万古霉素的 GN 肉汤或胰酶大豆汤内,经 4 h 增菌后分离可提高检出率。③改良 SMAC 选择性培养基。培养基中加入亚碲酸盐或加入新生霉素以选择性地抑制其他大肠杆菌生长。由于 EHEC 也不发酵鼠李糖,故含有头孢克肟、山梨醇和鼠李糖的培养基有更佳的选择性。

4.3 生化反应初步鉴定^[9] EHEC 一般不发酵山梨醇和鼠李糖,其 β 葡萄糖醛酸酶也为阴性。可用 β 葡萄糖醛酸酯的显色或荧光底物来检测,是快速鉴定 EHEC 的一种手段。在非选择性的肠溶血素琼脂培养基温育 3 h 和过夜出现溶血的菌落也有提示作用。但应注意这些生化指标对检验 STEC 的结果尚无报告。发酵山梨醇和 β 葡萄糖醛酸酶阳性的 EHEC 菌株均曾出现过。

4.4 确定细菌的 O、H 抗原 这是确定菌型的关键。传统方法应用大肠埃希菌的 O、H 分型血清与菌落进行凝集试验,但 H 抗原的检出常需进行诱导。现有用 O 和 H 抗原的单克隆抗体致敏的胶乳凝集法。已报告有商品 ELISA 试剂盒直接从粪便中检测 O 抗原的快速方法。

4.5 志贺毒素检查 志贺毒素的检验方法有 ELISA 法,反向胶乳凝集法 (VTEC-RPLA, OXOID 公司,日本 SEIKEN 公司)、检测 LPS 的 ELISA 法和免疫磁珠分离菌体再测毒素的方法等。经典的方法是用 Vero 细胞进行细胞毒试验,观察在毒素作用下细胞的特异性形态改变。

4.6 基因诊断 如上述,推荐用 PCR 扩增技术检测 stx2 和 AAFI 两种基因,均为阳性即可确定为 STEC。可用多重 PCR 同时检查多种基因。Paton 等^[9]同时检查 stx1、stx2、eae、

ehxA、saa 5 种基因对 EHEC 的鉴定取得满意结果。新兴起的基因芯片在菌种鉴别及流行菌株的确定和研究中起着重要作用,但目前尚不适宜常规应用。

4.7 流行菌株的确定 由于 EHEC 常发生爆发流行,所以流行病学调查,追踪感染源和确定流行菌株有着关键性意义。常需要用 PCR-基因限制性片段多态性分析,PCR-随机扩增多态性分析,PCR-单链构象多态性分析,多位点序列分型技术和质粒 DNA 酶切指纹图谱等分子生物学技术来确定流行菌株的同源性。

4.8 血清学诊断 过去在诊断 O157:H7 EHEC 的感染中用患者感染期和恢复期血清与流行菌株的菌液做凝集试验,有 4 倍以上凝集滴度升高者,可确诊。此法只能作为回顾性诊断和流行病学调查。在此次 STEC 的流行中的诊断作用尚未见报告。

4.9 抗菌药物敏感性试验 据现有资料,本菌对氨苄西林、多种头孢类、四环素类耐药,对氨基糖苷类、环丙沙星、碳青霉烯类、磷霉素敏感。

5 EHEC 感染的防治

对感染患者的治疗中一个很重要的问题是不能随意使用抗生素。因为在抗生素作用下,菌体大量裂解,可增加菌体内志贺毒素的释放,使病情加重,以致促进 HUS 的发生。因此输液、补充电解质和调节肠道的细菌群是治疗的重要手段。如疑似发生了 HUS,应该及时输入新鲜血浆、浓缩红细胞和血小板。抢救重症患者需采用血液透析疗法,使用肝素、蛋白酶抑制剂疗法。密切监测肾功能的改变,严重者要及时做肾切除或肾移植手术。德国报告^[10]研制成功一种对抗志贺毒素的单克隆抗体,在治疗危重患者中证明有效。

我国目前尚没有该病原菌感染报道,提高对该病的认识,加强预防十分重要。该菌存在于家畜(牛、鸡、羊、狗、猪等)的肠道。家畜粪便污染的食物是主要的感染源。蔬菜、水果是受污染的主要食品。多数患者是因生食了黄瓜、西红柿或生菜、沙拉等而被感染。在欧洲流行的初期,德国曾发布信息,认为流行菌株来源于从西班牙进口的黄瓜,但未有直接证据。后经检验证明德国产的豆芽等芽苗菜,是此次疫情的源头。被细菌污染的水源(包括饮用水、游泳池水、湖水、地表水等)也是重要的传播媒介。人与人之间的密切接触也可传染,因未治愈的患者粪便和受污染的环境中也可带菌。要防止“病从口入”,要避免生食蔬菜和水果,或者在食用前认真洗涤和消毒。不要饮生水,注意饭前、便后的认真洗手。有关部门要切实加强食品卫生监督,搞好水源管理,加强对家畜、家禽、奶类和肉类产品的管理,避免经食品和污染源而传播 EHEC。我国卫生部已及时发出感染防控通知和初步的检验流程要求,应切实执行^[11]。

6 参考文献

- 1 WHO. EHEC outbreak: Update 14[EB/OL].
- 2 WHO. Germany investigates outbreak of haemolytic uremic syndrome [EB/OL].
- 3 王金良,倪语星,徐英春,主编.细菌性腹泻实验诊断规范.上海科技出版社,2002:16-28.
- 4 王晓玲.大肠杆菌 O157:H7 细胞毒素坏死因子同源基因的克隆表达.实用检验医师杂志,2010,2:17-21.
- 5 王庆忠,葛平,肖艳群,等.肠出血大肠埃希菌 O104:H4 检测技术.检验医学,2011,26:496-498.
- 6 WHO. Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC)[EB/OL].
- 7 Qin J, Cui Y, Zhao X, et al. Identification of the Shiga Toxin-producing Escherichia coli O104:H4 strain responsible for a food poison outbreak in Germany by PCR. J Clin Microbiol, 2011, 49:3439-3440.
- 8 王金良.致腹泻性大肠埃希菌感染的快速检验诊断.传染病信息, 2007,20:204-207.
- 9 Paton AW, Paten JC. Direct detection and characterization of Shiga toxinogenic Escherichia Coli by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA and saa. J Clin Microbiol, 2002, 40:271-274.
- 10 Bitzan M, Schaefer F, Reymond D. Treatment of typical (enteropathic) hemolytic uremic syndrome. Semin Thromb Hemost, 2010, 36:594-610.
- 11 中华人民共和国卫生部.卫生部应急办关于做好输入性肠出血性大肠埃希菌感染防控工作的通知.北京:中华人民共和国卫生部, 2011.

(收稿日期:2010-09-06)

(本文编辑:杨军)

消息

中华医学会第七次全国中青年检验医学学术会议

中华医学会第七次全国中青年检验医学学术会议定于 2012 年 4 月 18-20 日在南京市召开。全国中青年检验医学学术会议是中国检验医学专业的一项大型学术活动,近年来,随着检验医学的迅猛发展,中国中青年检验工作者开拓进取,成绩斐然。为实时有效地展示他们的学术成果并促进学术交流,全国中青年检验医学学术会议将由每 4 年举办一次改为每两年一次。届时将邀请国内外知名专家和院士就检验医学及相关学科的最新研究进展进行学术演讲。会议将进行优秀论文评奖,同时举行临床检验设备展览会。会议将授予国家级继续教育学分。

1 征文范围

现将会议征文有关事项通知如下:一、征文范围:(1)临床基础检验和血液学检验;血液学、体液学、细胞形态学、血液病基因诊断、血栓与止血、血型与输血等临床与基础研究;(2)临床生化检验:临床生物化学检验技术和方法学研究与应用、生物化学指标在临床各种疾病诊断中的应用与基础研究;(3)临床微生物学:微生物细菌鉴定与药敏试验、院内交叉感染检测与控制、临床病毒学检测、实验室生物安全等相关研究;(4)临床免疫学诊断和分子生物学技术:感染性疾病的实验室诊断、肿瘤标志物及其应用、自身免疫疾病的实验室诊断、免疫相关技术和分子生物学技术在临床诊断和监测中的应用等临床与基础研究;(5)临床实验室管理、医学实验室认可、临床实验室室间质量评价、临床实验室质量控制、临床实验室标准化等实践与研究;(6)其他相关领域的基础与

临床研究等。

2 征文要求

征文要求:(1)年龄要求:1962 年 1 月 1 日以后出生的中青年检验医学(实验诊断学)学者和专业技术人员。(2)稿件要求:论著、经验总结、综述和评论性文章均可,必须是未公开发表过的文章,请在投稿时选择是否参加评奖,评奖入围论文原则上以原始研究(论著)为主,请提供 1000 字的摘要和全文,摘要内容包括目的、方法、结果、结论。请勿写成过于简短的内容提要形式。摘要请采用文字表述,不要附图、表。无摘要或摘要字数过少者不能评奖。(3)投稿形式:大会不接受电子邮件投稿,全部采用网上在线投稿

(4)会议成立优秀论文评奖专家委员会。论文评奖以“科学性、创新性、实用性”为基本准则,在来稿中进行遴选和评审,最后以无记名投票形式产生一等奖、二等奖、三等奖和优秀奖。

截稿日期:2012 年 2 月 15 日。

3 联系方式

联系地址:北京市东四西大街 42 号中华医学会学术会务部

邮编:100710

联系人:贾玲、徐展

电话:010-85158129

传真:010-65123754

E-mail: lilyjia@163.com; xuzhan@cma.org.cn