

# 肠出血性大肠杆菌

## EHEC O104:H4检测技术

熊 衍 文

xiongyanwen@icdc.cn

中国疾病预防控制中心传染病所

2011年6月7日

# 大肠杆菌

正常菌群，一般不致病

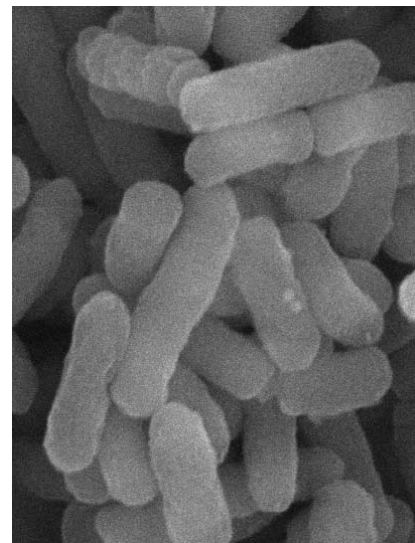
条件致病

细菌居住部位改变引起的肠外感染：

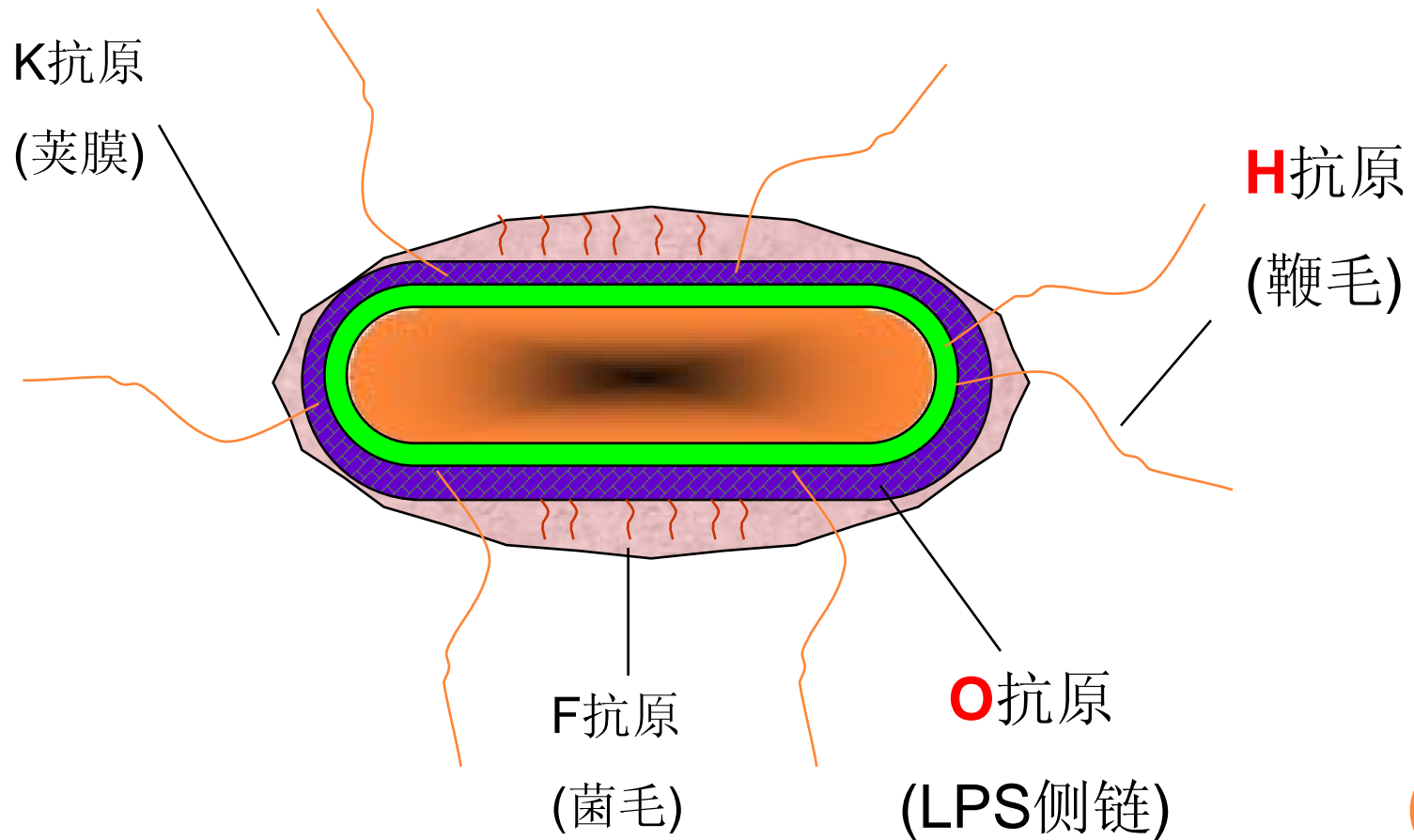
尿路感染最常见

致病菌株

某些带有致病基因的血清型，引起肠道感染



# 复杂的抗原构造



# 分类

可引起腹泻的大肠杆菌称为肠道致病性大肠杆菌或致泻性大肠杆菌。目前根据毒力因子、致病机理和流行病学特征，通常将致泻性大肠杆菌分为5类：

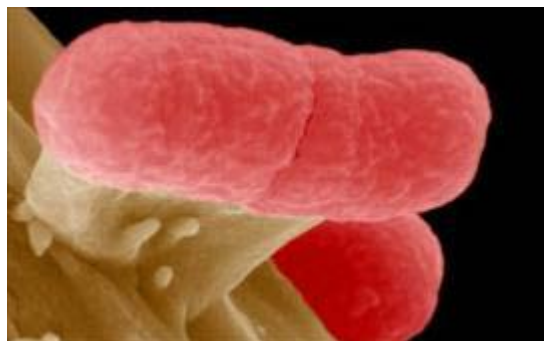
肠致病性大肠杆菌（**EPEC**）

肠产毒性大肠杆菌（**ETEC**）

肠侵袭性大肠杆菌（**EIEC**）

肠集聚性大肠杆菌（**EAEC**）

肠出血性大肠杆菌（**EHEC**）



# 致泻性大肠杆菌引起的腹泻

菌株	作用部位	所致疾病	致病机理
EPEC	小肠	婴儿腹泻	粘附和破坏上皮细胞
ETEC	小肠	旅行者腹泻 婴幼儿腹泻	肠毒素
EIEC	大肠	较大儿童或成人 痢疾样腹泻	侵袭和破坏 结肠粘膜上皮细胞
EAEC	小肠	急慢性腹泻	集聚性粘附上皮细胞
EHEC	大肠	出血性结肠炎	志贺毒素

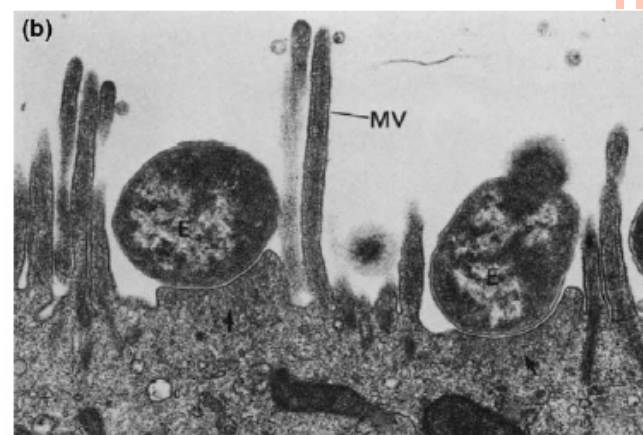
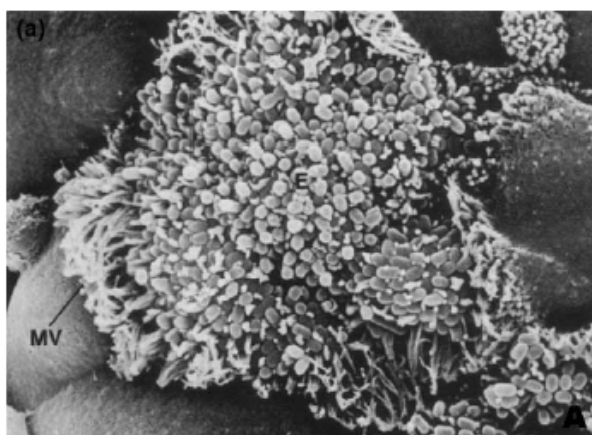
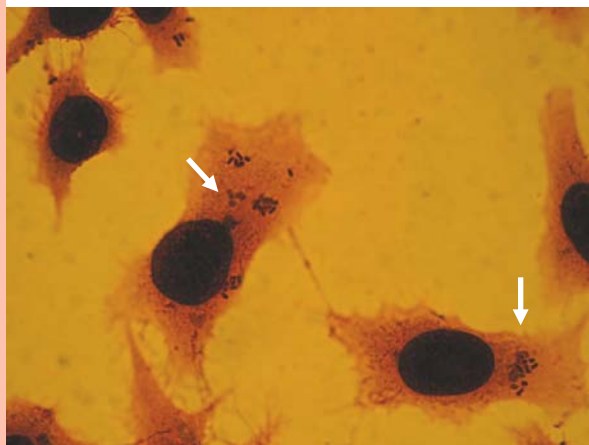


# 肠致病性大肠杆菌

(Enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)

**致病机制：**LEE毒力岛和EAF质粒（编码束状菌毛）

病原菌在十二指肠、空肠和回肠上段粘膜表面大量繁殖，粘附于微绒毛，导致刷状缘被破坏、微绒毛萎缩、上皮细胞排列紊乱和功能受损（A/E损伤），造成严重腹泻。



# 肠致病性大肠杆菌

(Enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)

**典型EPEC**（含有LEE和70~100kb的大毒力质粒EAF）是发展中国家引起婴幼儿特别是0~6个月婴儿腹泻的主要病原菌，在某些发展中国家EPEC引起的婴儿腹泻可达30~40%。上世纪40~50年代之前，EPEC常引起发达国家婴幼儿腹泻的暴发；

**非典型EPEC**（含有LEE但不含毒力质粒EAF）是发达国家引起腹泻的重要病原菌，并能引起发达国家婴幼儿和成人的腹泻暴发。非典型ECEPEC感染引起的腹泻通常持续时间更长，可超过14天。典型EPEC的储存宿主主要是人，而非典型EPEC人和动物都可作为储存宿主。

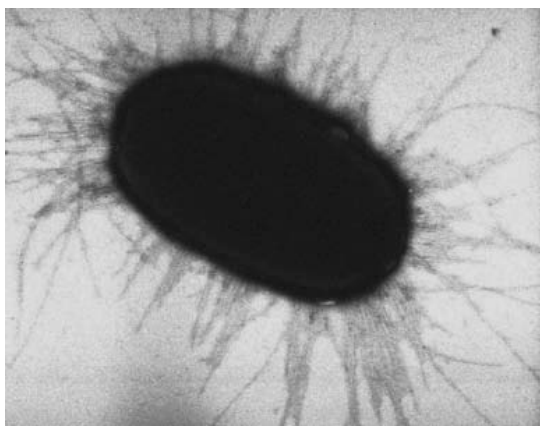


# 肠产毒性大肠杆菌

(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)

致病机制：肠毒素和定植因子

肠毒素有不耐热肠毒素（heat labile enterotoxin, LT）和耐热肠毒素（heat stable enterotoxin, ST）两种。LT与腺苷环化酶作用，使胞内cAMP水平增高，导致肠粘膜细胞内水、钠、氯等过度分泌至肠腔，导致腹泻；而ST通过激活肠粘膜细胞上的鸟苷环化酶，使胞内cGMP升高而导致腹泻。





# 肠侵袭性大肠杆菌

(Enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)

**致病机制：侵袭性大质粒**

与志贺菌相似。

细菌经消化道进入大肠后，穿过粘液层，粘附到肠上皮细胞上，引起细胞内吞，被带入细胞内空泡中。其毒力主要表现在能使空泡破坏，细菌进入上皮细胞胞浆中增殖，最后杀死细胞，再扩散到邻近细胞，导致组织破坏和随后的炎症发生。



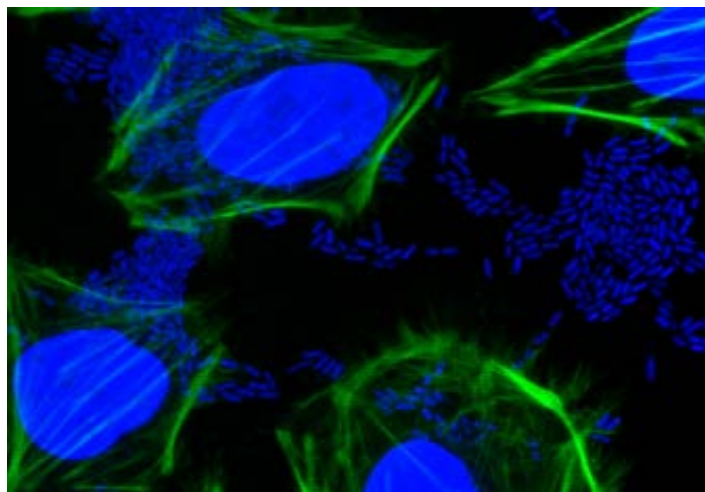
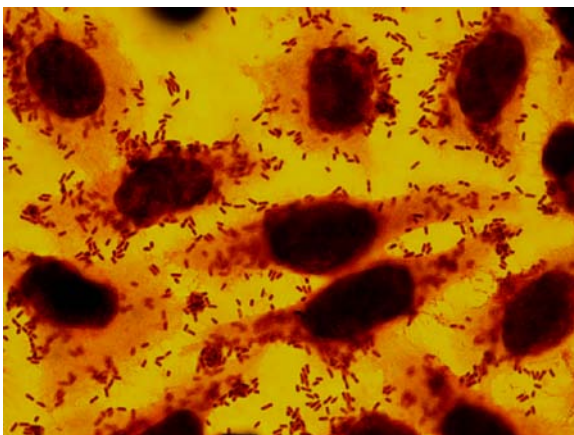
# 肠集聚性大肠杆菌

(Enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC)

致病机制：毒素和粘附素

毒素包括肠集聚耐热毒素（enteroaggregative heat-stable toxin, EAST）和不耐热毒素（plasmid encoding toxin, Pet），可导致大量液体分泌。

细菌通过集聚性粘附菌毛粘附于肠粘膜上皮细胞，在细胞表面聚集，形成砖状排列。



# 肠出血性大肠杆菌

(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)

## 临床表现:

EHEC O157:H7感染的潜伏期是3~4天，但在某些暴发中可以长达5~8天或短至1~2天。我国暴发流行的地区最短潜伏期为8小时，平均为1~5天。临床表现主要有：腹部绞痛和轻度腹泻，一些病例为血性腹泻（出血性肠炎）。多数病人10天内康复，少数病人特别是幼儿和老年人，可出现严重并发症，如以急性肾功能衰竭、溶血性贫血和血小板减少为特点的溶血尿毒综合症（HUS）。一般5%~10%的EHEC感染者可发展为溶血尿毒综合症，病例死亡率为3%至5%。



# 肠出血性大肠杆菌

(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)

致病机制：志贺毒素和LEE毒力岛

EHEC产生的毒素能使vero细胞产生病变，故称vero毒素；又因与志贺菌的毒素在生物学特性、物理特性和抗原性等方面相似，亦称志贺样毒素（shiga-like toxin, SLT）或志贺毒素Stx；EHEC的Stx分两型，Stx1与痢疾志贺菌的ST基本相同，可被抗志贺菌抗毒素中和。Stx2则与ST有60%的同源，Stx2目前发现有多种亚种。两型毒素均由溶原性噬菌体介导。



# 肠出血性大肠杆菌

(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)

O157:H7是EHEC的主要血清型，此外还包括O26、O111、O103、O113、O117、O128等四十多个血清型。

由EHEC O157:H7引起的大暴发：

1982年美国首次报道大肠杆菌O157:H7引起出血性肠炎。

1996年日本报告一起学校儿童的暴发疫情，病例7470例，住院病例近千例，有约100病例并发HUS，死亡3例。

1999年我国苏皖等地发生了大肠杆菌O157:H7感染性腹泻的暴发，估计2万人感染，195例HUS，死亡177人。

2006年美国暴发一起由污染的包装菠菜造成的暴发，具有高的住院率（50%）和HUS（16%）。

# 肠出血性大肠杆菌

(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)

## STEC, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

人们把产生志贺毒素的大肠杆菌统称为**STEC**。相对来说，**STEC**的范围大一些，**EHEC**覆盖的范围小一些。**STEC**包括**EHEC**，**EHEC**只是**STEC**的一部分。

并不是所有的产**Stx**毒素的大肠杆菌都能引起出血性肠炎或溶血性尿毒综合症。




# EHEC O104:H4

## 德国肠出血性大肠杆菌O104:H4暴发疫情

今年五月初以来，德国卫生部门发现，由**STEC**引起的溶血性尿毒综合征（**HUS**）和血性腹泻病例较历年报道的明显增多，确定此次是一起肠出血性大肠杆菌感染暴发疫情。

根据世界卫生组织的报道，截止6月5日，德国已报告**630例HUS**病例，死亡**15例**；**1601例EHEC**感染病例，死亡**6例**。此外，欧洲奥地利、捷克、瑞典、丹麦、荷兰、波兰、法国、瑞士、挪威、西班牙、卢森堡和英国等**12国**共报道**31例HUS**（死亡**1例**）和**EHEC**感染病例**73例**。美国报道**2例HUS**病例。



# EHEC O104:H4

## 德国肠出血性大肠杆菌O104:H4暴发疫情

临床特点:

HUS发生率 (5~10%) (630/(1601+630))

死亡率 (3~5%) (15/627)

年龄: 89% (HUS) 为20岁以上成年人

88% (EHEC) (WHO, 6月6日)

性别: 70% (HUS) 为女性

62% (EHEC) (WHO, 6月6日)

感染来源: 黄瓜、西红柿、豆芽?





# EHEC O104:H4

## 德国肠出血性大肠杆菌O104:H4暴发疫情

菌株特点（Robert Koch Institute）：

血清型O104:H4

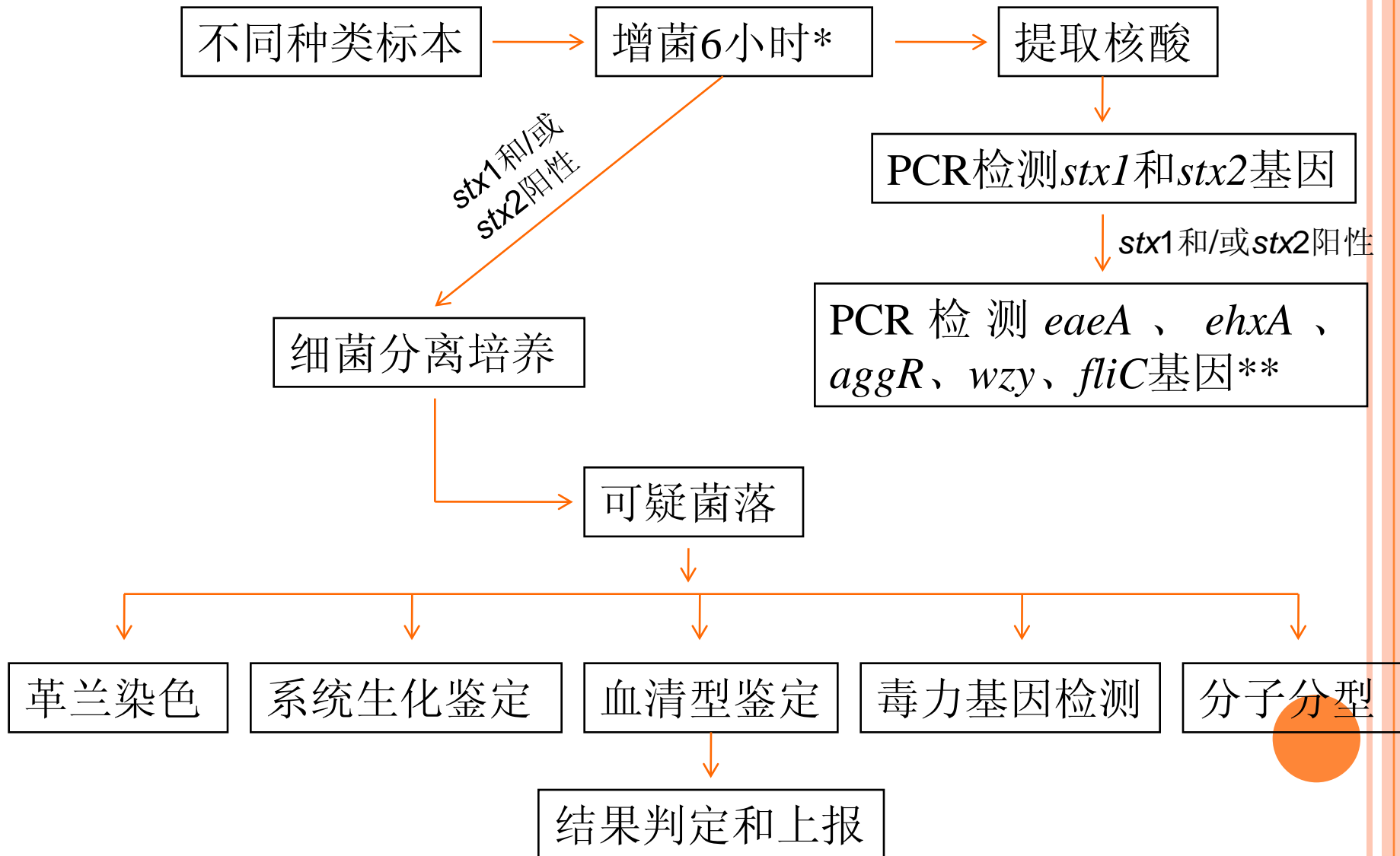
Shigatoxin 1: -	}	<b>EHEC</b>
Shigatoxin 2 (vtx2a) : +		
Intimin (eae) : -		
Enterohemolysin : -		

aatA-PCR: +	}	<b>EAEC</b>
aggR-PCR: +		
aap-PCR: +		
aggA-PCR: +		
aggC-PCR: +		

enteroaggregative Verocytotoxin-producing  
*E. coli* (EAggEC VTEC) O104:H4



# EHEC O104:H4检测技术流程



# 毒力基因/抗原特异性基因PCR检测方法

## 1、*stx1*

**slt-1-a:** 5'-CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG-3'

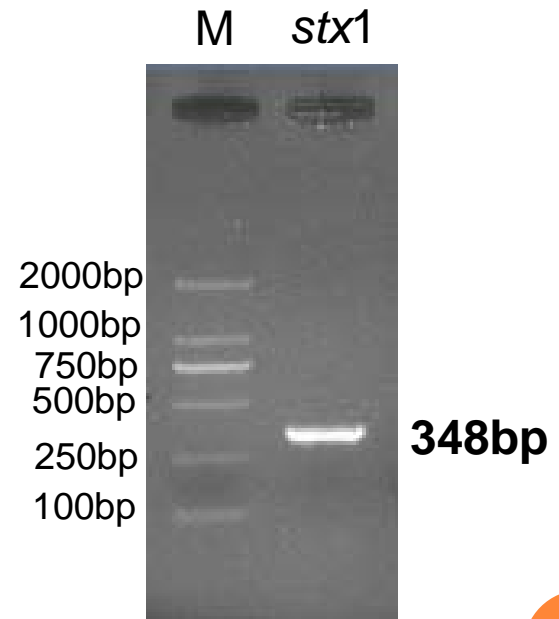
**slt-1-b:** 5'-CACCAGACAATGTAACCGCTG-3'

### PCR反应体系(20 $\mu$ l):

10 $\times$ PCR Buffer (含Mg <sup>2+</sup> )	2 $\mu$ l
slt-1-a引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
slt-1-b引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Taq DNA聚合酶 (5U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
DNA模板	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	13.8 $\mu$ l

### PCR反应条件:

94 $^{\circ}$ C 3min  
94 $^{\circ}$ C 30sec  
60 $^{\circ}$ C 30sec } 30循环  
72 $^{\circ}$ C 45sec  
72 $^{\circ}$ C 5min



# 毒力基因/抗原特异性基因PCR检测方法

## 2、*stx2*

**slt-2-a:** 5'-ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG-3'

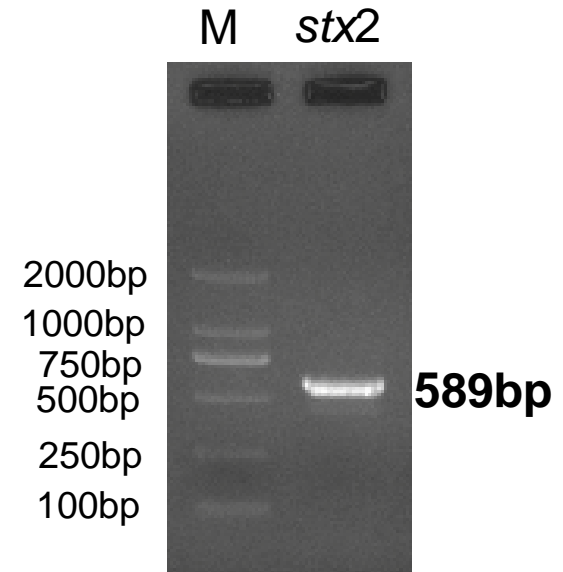
**slt-2-b:** 5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3'

### PCR反应体系(20 $\mu$ l):

10 $\times$ PCR Buffer (含Mg <sup>2+</sup> )	2 $\mu$ l
slt-2-a引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
slt-2-b引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Taq DNA聚合酶 (5U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
DNA模板	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	13.8 $\mu$ l

### PCR反应条件:

94 $^{\circ}$ C 3min  
94 $^{\circ}$ C 30sec  
56 $^{\circ}$ C 30sec } 30循环  
72 $^{\circ}$ C 45sec  
72 $^{\circ}$ C 5min



# 毒力基因/抗原特异性基因PCR检测方法

## 3、*eaeA*

**eaeA-a:** 5'-ATTACCATCCACACAGACGGT-3'

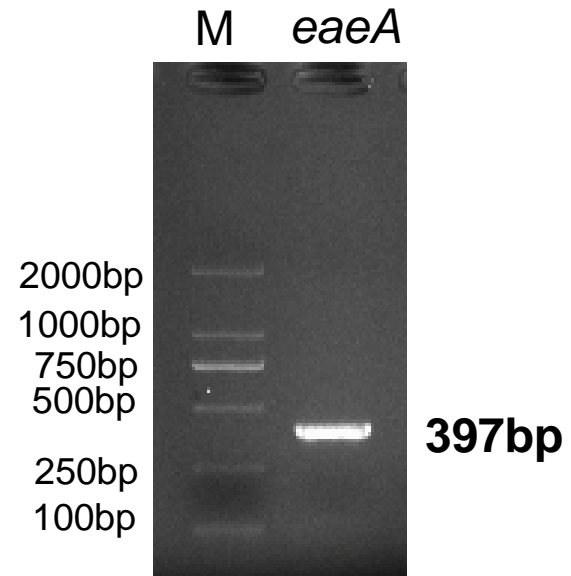
**eaeA-b:** 5'-ACAGCGTGGTTGGATCAACCT-3'

### PCR反应体系(20 $\mu$ l):

10 $\times$ PCR Buffer (含Mg <sup>2+</sup> )	2 $\mu$ l
eaeA-a 引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
eaeA-b 引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Taq DNA聚合酶 (5U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
DNA模板	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	13.8 $\mu$ l

### PCR反应条件:

94 $^{\circ}$ C 3min  
94 $^{\circ}$ C 30sec  
56 $^{\circ}$ C 30sec } 30循环  
72 $^{\circ}$ C 45sec  
72 $^{\circ}$ C 5min



# 毒力基因/抗原特异性基因PCR检测方法

## 4、*ehxA*

**MFS-1Fb:** 5'-CCAGGAGAAGAAGTTAGAG-3'

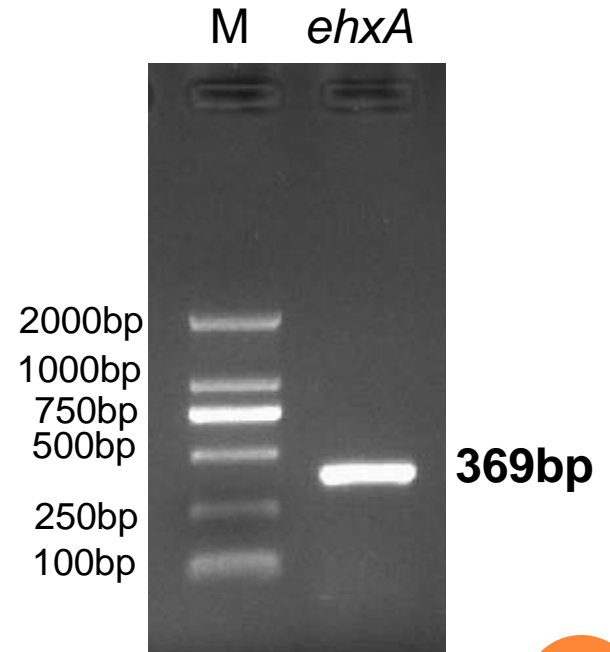
**MFS-1R:** 5'-CTTCACGTCACCATACATAT-3'

### PCR反应体系(20 $\mu$ l):

10 $\times$ PCR Buffer (含Mg <sup>2+</sup> )	2 $\mu$ l
MFS-1Fb 引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
MFS-1R 引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Taq DNA聚合酶 (5U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
DNA模板	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	13.8 $\mu$ l

### PCR反应条件:

94 $^{\circ}$ C 3min  
94 $^{\circ}$ C 30sec  
56 $^{\circ}$ C 30sec } 30循环  
72 $^{\circ}$ C 45sec  
72 $^{\circ}$ C 5min



# 毒力基因/抗原特异性基因PCR检测方法

## 5、aggR

**aggR-F:** 5'-GTATACACAAAAGAAGGAAGC-3'

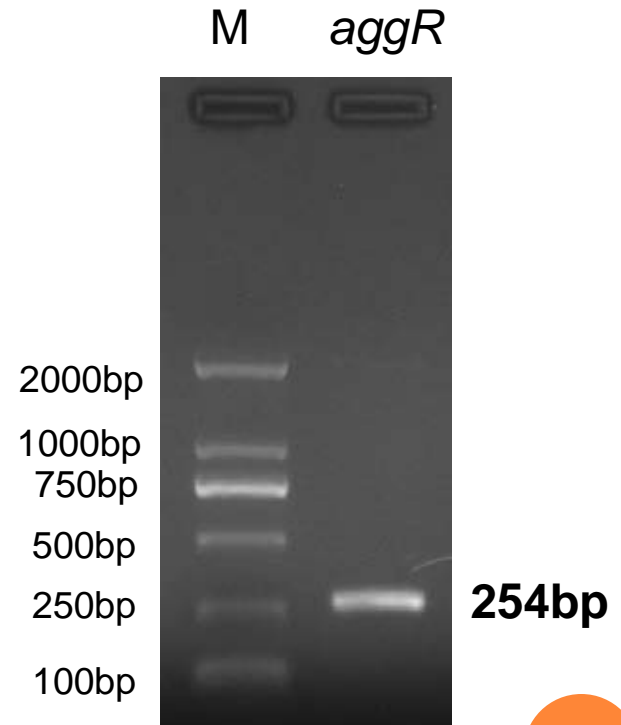
**aggR-R:** 5'-ACAGAATCGTCAGCATCAGC-3'

### PCR反应体系(20 $\mu$ l):

10 $\times$ PCR Buffer (含Mg <sup>2+</sup> )	2 $\mu$ l
aggR-F 引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
aggR-R引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Taq DNA聚合酶 (5U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
DNA模板	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	13.8 $\mu$ l

### PCR反应条件:

94 $^{\circ}$ C 3min  
94 $^{\circ}$ C 30sec  
56 $^{\circ}$ C 30sec } 30循环  
72 $^{\circ}$ C 45sec  
72 $^{\circ}$ C 5min



# 毒力基因/抗原特异性基因PCR检测方法

## 6、*aatA*

**aatA-F:** 5'-TATATTGAAATGCTTAGTGAGAG-3'

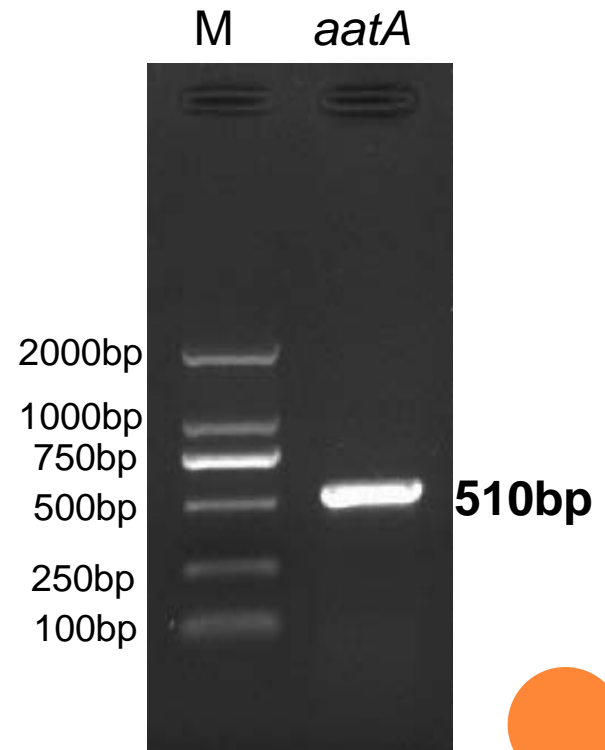
**aatA-R:** 5'-CTGATACCCAGACTAGCACT-3'

### PCR反应体系(20 $\mu$ l):

10 $\times$ PCR Buffer (含Mg <sup>2+</sup> )	2 $\mu$ l
aatA-F 引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
aatA-R引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Taq DNA聚合酶 (5U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
DNA模板	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	13.8 $\mu$ l

### PCR反应条件:

94 $^{\circ}$ C 3min  
94 $^{\circ}$ C 30sec  
56 $^{\circ}$ C 30sec } 30循环  
72 $^{\circ}$ C 45sec  
72 $^{\circ}$ C 5min





# 毒力基因/抗原特异性基因PCR检测方法

## 7、*aap*

**aap-F:** 5'-ATGAAAAAAATTAA GTTTGTTATCTT-3'

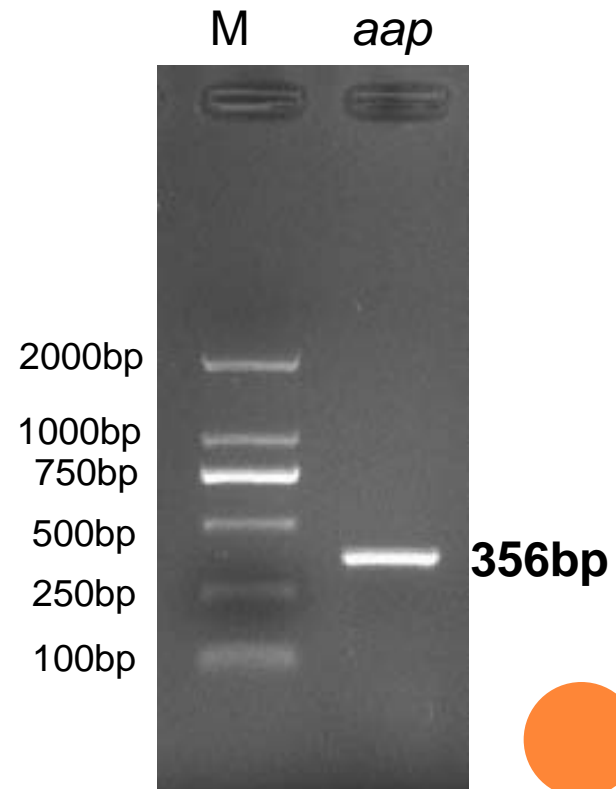
**aap-R:** 5'-TTATTTAACCATTTCG GTTAGAGC-3'

### PCR反应体系(20 $\mu$ l):

10 $\times$ PCR Buffer (含Mg <sup>2+</sup> )	2 $\mu$ l
aap-F 引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
aap-R引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Taq DNA聚合酶 (5U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
DNA模板	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	13.8 $\mu$ l

### PCR反应条件:

94 $^{\circ}$ C 3min  
94 $^{\circ}$ C 30sec  
56 $^{\circ}$ C 30sec } 30循环  
72 $^{\circ}$ C 45sec  
72 $^{\circ}$ C 5min



# 毒力基因/抗原特异性基因PCR检测方法

## 8、wzy

wzy-F: 5'-AGTTCATTAGATCGAGGTT-3'

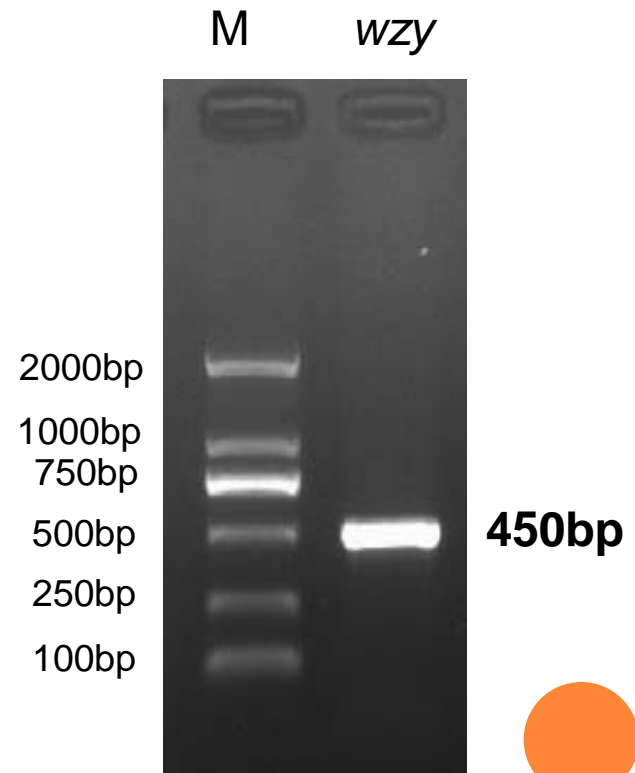
wzy-R: 5'-CTCCTTGCAAATGTGCAA-3'

### PCR反应体系(20 $\mu$ l):

10 $\times$ PCR Buffer (含Mg <sup>2+</sup> )	2 $\mu$ l
wzy-F 引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
wzy-R引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Taq DNA聚合酶 (5U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
DNA模板	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	13.8 $\mu$ l

### PCR反应条件:

94 $^{\circ}$ C 3min  
94 $^{\circ}$ C 30sec  
56 $^{\circ}$ C 30sec } 30循环  
72 $^{\circ}$ C 45sec  
72 $^{\circ}$ C 5min



# 毒力基因/抗原特异性基因PCR检测方法

## 9、*fliC* (H4)

**fliC-5:** 5'-TGA GTG ACC AGA CGA TAA CAG GG-3'

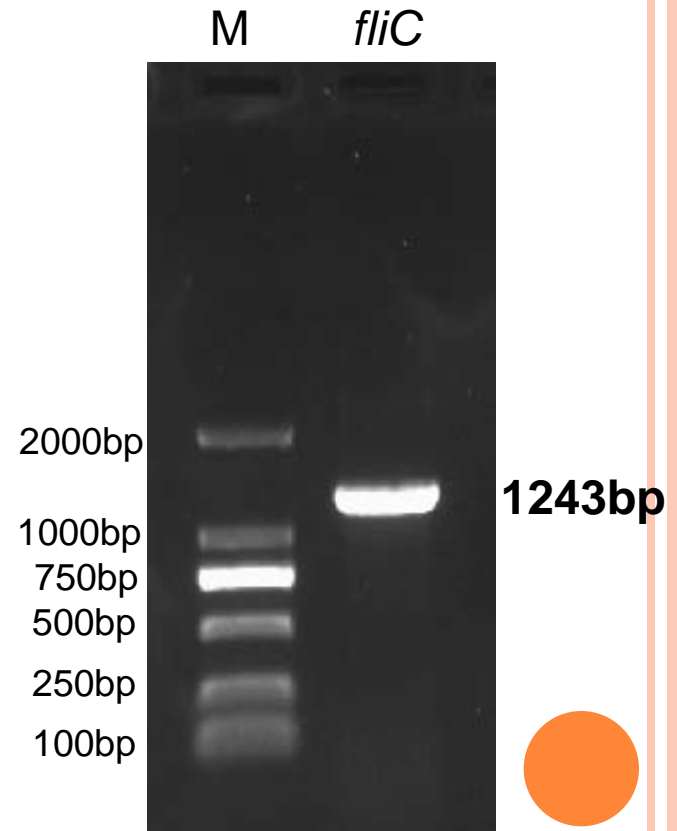
**fliC-6:** 5'-GGA CGA TTA GTG GGT GAA ATG AGG-3'

### PCR反应体系(20 $\mu$ l):

10 $\times$ PCR Buffer (含Mg <sup>2+</sup> )	2 $\mu$ l
fliC-5 引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
fliC-6引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Taq DNA聚合酶 (5U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
DNA模板	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	13.8 $\mu$ l

### PCR反应条件:

94 $^{\circ}$ C 3min  
94 $^{\circ}$ C 30sec  
65 $^{\circ}$ C 30sec } 30循环  
72 $^{\circ}$ C 90sec  
72 $^{\circ}$ C 7min



# 毒力基因/抗原特异性基因PCR检测方法

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所网站:

[www.icdc.cn](http://www.icdc.cn)

The screenshot shows the website interface for the Institute of Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention (ICDC, China CDC). The header includes the logo, name, and address. A navigation bar lists various sections like 'Home', 'Introduction', 'Leaders', etc. The main content area displays a news article titled '《肠出血性大肠杆菌O104:H4检测技术流程》' (Detection process of EHEC O104:H4), dated 2011-6-3. The article is attributed to the 'New Pathogen Laboratory, Institute of Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention' and was published on 2011-6-4. A sidebar on the left contains a login form, a notice section, and a link section.

中国疾病预防控制中心  
传染病预防控制所  
ICDC, China CDC

首页 | 所简介 | 所领导 | 专家风采 | 重大事件 | 历史回顾 | 科普之窗 | 科技交流 | 研究生园地 | 教育培训 | 生物安全 | 英文

2011年 6月6日 星期一 搜索:

栏目: 新闻动态

《肠出血性大肠杆菌O104:H4检测技术流程》  
2011-6-3 21:52:49 416 admin

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所新病原室 2011-6-4 发布

邮箱登陆  
用户名:   
@icdc.cn  
密码:

通知公告

---我国著名人兽共患病防治专家、科普作家俞东征教授的最新作品《动物咄语》，已经在我所网站上连载，欢迎阅读。m

友情联接  
[中国疾病预防控制中心](#)  
[中华人民共和国科技部](#)  
[中华人民共和国卫生部](#)  
[中华人民共和国农业部](#)  
[美国疾病预防控制中心](#)

不同种类标本  
↓  
增菌 6 小时\*



# 毒力基因/抗原特异性基因PCR检测方法

提供检测技术方法、分子分型方法

可提供如下试剂

- 1、9对PCR引物
- 2、EHEC O157:H7 EDL933菌株模板
- 3、EAEC O44:H18 Ec042菌株模板
- 4、O104 DNA模板
- 5、H4 DNA模板

上送菌株复核、鉴定



# EHEC O104:H4系列检测产品

天津生物芯片技术有限责任公司开发了一套针对EHEC O104:H4的系列检测产品。

货号	产品	规格	用途
IM-EH004-97	大肠杆菌O104诊断血清	1ml	免疫学检测
IM-EH001-4	大肠杆菌H4诊断血清	1ml	免疫学检测
Cat.No.CP038	大肠杆菌O104核酸扩增（PCR）检测试剂盒	20次/盒	分子生物学检测
Cat.No.FP017	大肠杆菌O104核酸扩增（PCR-荧光探针法）检测试剂盒	20次/盒	分子生物学检测
Cat.No.FP018	大肠杆菌H4核酸扩增（PCR-荧光探针法）检测试剂盒	20次/盒	分子生物学检测
IMS015-1	大肠杆菌O104免疫磁珠分离检测试剂盒	50次/盒	样品处理

# EHEC O104:H4系列检测产品



联系方式:  
022-66229538  
022-66226983

谢谢大家！

