

风险监测

2014—2018 年北京市人源性肠致病性大肠埃希菌耐药特征
及分子特征研究

王丽丽^{1,2}, 张寻^{1,2}, 陈倩^{1,2}

(1.北京市疾病预防控制中心 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室,北京 100013;
2.北京市预防医学研究中心,北京 100013)

摘要:目的 了解北京市门诊腹泻病例肠致病性大肠埃希菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC) 分离株抗生素敏感性情况及分子分型特征。方法 采用微量肉汤稀释法对 2014—2018 年北京市门诊腹泻病例 EPEC 分离株进行 8 类 14 种抗生素敏感性检测。参照 PulseNet 中非 O157 大肠埃希菌脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分型方法,对不同区县不同采样时间分离的菌株采用随机抽样原则,对 140 株菌基因组经限制性内切酶 *Xba* I 酶切后进行分子分型和聚类分析。结果 2014—2018 年北京市门诊腹泻病例 EPEC 分离株总耐药率为 84.8% (391/461), 氨苄西林、四环素、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑耐药率较高,分别为 66.4% (294/443)、54.0% (249/461)、45.6% (210/461)。461 株菌分为 200 种耐药谱,耐 3 类及 3 类以上抗生素的菌株数达 249 株 (54.0%), 有 1 株菌对 7 类 12 种抗生素耐药。常见耐药谱为茶啉酸耐药,占 4.3% (20/461)。环丙沙星、茶啉酸、四环素、亚胺培南耐药率和耐药谱种类呈逐年缓慢上升趋势。其中 140 株菌共产生 136 种 PFGE 带型,带型分布较为分散,无优势带型,菌株之间的相似系数为 53.3%~100.0%。结论 2014—2018 年北京市腹泻病例 EPEC 耐药情况严重,耐药谱复杂广泛,多重耐药菌株及耐药谱种类呈逐年增多趋势。菌株的基因型呈多态性分布。
关键词:患者; 肠致病性大肠埃希菌; 耐药性; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型
中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)04-0371-04
DOI:10.13590/j.cjfh.2019.04.014

Antimicrobial resistance and molecular characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrheal patients in Beijing from 2014 to 2018
WANG Lili^{1,2}, ZHANG Xun^{1,2}, CHEN Qian^{1,2}
(1. Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Centers for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China; 2. Beijing Centers for Disease Preventive Medical Research, Beijing 100013, China)

Abstract: **Objective** To investigate the antibiotic sensitivity and molecular typing characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates in out-patient diarrhea cases in Beijing. **Methods** 461 strains were tested for drug susceptibility. Random sampling principle was adopted for strains isolated at different time in and counties, and 140 strains were characterized by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **Results** The total drug resistance rate of 461 EPEC strains was 84.8% (391/461). Ampicillin, tetracycline, and methylbenzidine/sulfamethoxazole had higher drug tolerance rates of 66.4% (294/443), 54.0% (249/461) and 45.6% (210/461), respectively. 461 strains were divided into 200 resistance spectrums. 54.0% (249/461) of the isolates were resistant to 3 or more kinds of antibiotics, and 1 strain was resistant to 12 antibiotics. Common resistance spectrum was only resistant to nalidixic, accounting for 4.3% (20/461). Ciprofloxacin, nalidixic, tetracycline, imipenem resistance rates and types of drug resistance spectrum were slowly increasing year by year. 140 strains produced 136 PFGE patterns, and there was no dominant pattern. The similarity coefficient was 53.3% to 100.0%. **Conclusion** The resistance of EPEC isolated from diarrhea patients in Beijing was serious, the spectrum of resistance was complex, and the variety of multiple resistant strains and resistance spectrum increased yearly. PFGE patterns showed diversity.
Key words: Patient; enteropathogenic *Escherichia coli*; drug resistance; pulsed field gel electrophoresis; molecular typing

腹泻性疾病是世界范围内的一个重要的公共卫生问题。感染性腹泻是引起全球 5 岁以下儿童死亡的第二大原因,每年可造成约 13 万人死亡^[1]。肠致病性大肠埃希菌(enteropathogenic *Escherichia coli*,EPEC)是致泻大肠埃希菌中的一种致病类型,是主要引起儿童特别是婴幼儿感染性腹泻的重要致病菌之一^[2],常引起婴儿脱水、酸中毒,病死率高。2014—2018 年北京市门诊腹泻病例病原菌监测数据表明,EPEC 可导致各月份各年龄段人群发生急性感染性腹泻,并造成慢性持续性腹泻。

为了解北京市人源性 EPEC 耐药特征及来源分布,为北京市 EPEC 分子诊断、溯源及临床用药提供依据,本研究基于北京市食源性疾病监测网络门诊腹泻病例病原监测工作,对 2014—2018 年 EPEC 分离株进行抗生素敏感性分析及脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis,PFGE)分子分型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

本试验所用菌株为 2014—2018 年北京市食源性疾病监测网络门诊腹泻病例病原监测分离的 EPEC 菌株,共 461 株,基因鉴定结果均为 *uidA*(+)和 *eae*(+)。药敏试验用质控菌株为大肠埃希菌(ATCC 25922)。PFGE 分子量标准菌株为沙门菌(H9812)。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 浊度仪(法国 bioMérieux),去离子水系统(美国 Millipore),水浴摇床,台式高速离心机,PFGE 仪及配套设备、凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad。

脑心浸液培养基(北京陆桥技术股份有限公司),调节阳离子浓度的营养肉汤培养液及革兰阴性需氧菌药敏检测板(上海星佰生物技术有限公司)。Seakem Gold 琼脂糖(美国 Cambrex Bio Science Rockland),蛋白酶 K(德国 Merck),限制性内切酶 *Xba* I(大连 Takara)。

1.2 方法

1.2.1 耐药性测定

根据美国临床与实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute,CLSI)文件 M100-S25^[3]推荐的药敏试验抗生素选择原则确定耐药性检测所用的抗生素名单,采用微量肉汤稀释法测定各种抗生素对致病菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration,MIC)。测试的抗生素包括 8 类 14 种,分别为 β -内酰胺类的氨苄西林(AMP)、氨苄西林/舒巴坦(AMS)、头孢唑林(CFZ)、头孢他啶(CAZ)、头孢

噻肟(CTX)、头孢西丁(CFX)、亚胺培南(IPM),氨基糖苷类的庆大霉素(GEN),大环内酯类的阿奇霉素(AZM),四环素类的四环素(TET),酰胺醇类的氯霉素(Chl),喹诺酮类的萘啶酸(NAL),氟喹诺酮类的环丙沙星(CIP),以及磺胺类的甲氧苄啶/磺胺甲噁唑(SXT)。根据 CLSI 的相应解释标准^[3]获得敏感(S)、中介(I)和耐药(R)的结果。

1.2.2 PFGE 分型

对不同区县不同采样时间分离的菌株采用随机抽样原则,选取 140 株菌进行分子分型和聚类分析。参照国际食源性致病菌分子分型监测网络(PulseNet)中非 O157 PFGE 分型的标准操作方法进行^[4]。主要试验参数如下:细菌悬液浓度用 bioMérieux 麦氏比浊仪调至 4.0~4.2;使用限制性内切酶 *Xba* I(50 U),37℃ 酶切 2 h;电泳参数为 6.76~35.38 s,18 h;电泳后使用 GelRed 染色,纯水脱色,读取电泳图谱;沙门菌标准菌株(H9812)作为分子量标准。PFGE 图像录入 BioNumerics(V7.6)软件,对电泳图像进行数据分析,构建聚类树状图。

2 结果

2.1 EPEC 总体耐药情况

对 2014—2018 年北京市门诊腹泻病例病原监测中分离到的 461 株 EPEC 进行抗生素敏感性试验。结果显示,461 株试验菌株中,70 株菌对测试的 14 种抗生素全部敏感。其他 391 株菌均对 1 种或多种抗生素表现出不同程度的耐药,耐药率为 84.8%(391/461)。其中 AMP、TET、SXT、CFZ 和 NAL 的耐药率较高,分别为 66.4%(294/443)、54.0%(249/461)、45.6%(210/461)、44.9%(199/443)和 41.6%(192/461),见表 1。

表 1 2014—2018 年北京市 EPEC 抗生素敏感性结果

Table 1 Antibiotic susceptibility of EPEC strains in Beijing during 2014-2018			
抗生素	耐药率/%	中介率/%	敏感率/%
AMP	66.4 (294/443)	4.1 (18/443)	29.6 (131/443)
AMS	32.1 (142/443)	26.0 (115/443)	42.0 (186/443)
CFZ	44.9 (199/443)	24.8 (110/443)	30.2 (134/443)
CTX	24.3 (112/461)	1.5 (7/461)	74.2 (342/461)
CFX	4.1 (19/461)	3.3 (15/461)	92.6 (427/461)
CAZ	4.7 (21/443)	7.9 (35/443)	87.4 (387/443)
CHL	11.7 (54/461)	5.2 (24/461)	83.1 (383/461)
CIP	11.5 (53/461)	2.4 (11/461)	86.1 (397/461)
GEN	21.7 (100/461)	2.6 (12/461)	75.7 (349/461)
IPM	1.6 (7/443)	2.3 (10/443)	96.2 (426/443)
NAL	41.6 (192/461)	0.0 (0/461)	58.4 (269/461)
TET	54.0 (249/461)	2.8 (13/461)	43.2 (199/461)
SXT	45.6 (210/461)	0.0 (0/461)	54.4 (251/461)
AZM	24.4 (108/443)	0.0 (0/443)	75.6 (335/443)

对抗生素耐药谱进行初步分析发现,461 株 EPEC 分离菌株共获得 200 种耐药谱。耐 3 类抗生素的菌株数最多(19.1%,88/461),其次为耐 1 类抗生素的菌株(18.2%,84/461),再次是耐 4 类抗生素

的菌株(13.2%,61/461)。耐 3 类及 3 类以上抗生素的菌株总数达 249 株(54.0%),其中有 1 株菌对 7 类 12 种抗生素耐药,见表 2。
最常见的耐药谱为 NAL(4.3%,20/461),其次

表 2 2014—2018 年北京市 EPEC 抗生素耐药情况

Table 2 Antibiotic resistance of EPEC in Beijing during 2014-2018												
耐 药 种 类 数	2014(<i>n</i> = 18)		2015(<i>n</i> = 24)		2016(<i>n</i> = 128)		2017(<i>n</i> = 141)		2018(<i>n</i> = 150)		合计(<i>n</i> = 461)	
	菌株数	占比 /%	菌株数	占比 /%	菌株数	占比 /%	菌株数	占比 /%	菌株数	占比 /%	菌株数	占比 /%
0	6	33.3	1	4.2	20	15.6	21	14.9	22	14.7	70	15.2
1	3	16.7	3	12.5	22	17.2	37	26.2	19	12.7	84	18.2
2	2	11.1	9	37.5	18	14.1	14	9.9	15	10.0	58	12.6
3	3	16.7	4	16.7	19	14.8	26	18.4	36	24.0	88	19.1
4	3	16.7	2	8.3	18	14.1	19	13.5	19	12.7	61	13.2
5	0	0.0	3	12.5	13	10.2	12	8.5	21	14.0	49	10.6
6	1	5.6	1	4.2	8	6.3	9	6.4	9	6.0	28	6.1
7	0	0.0	1	4.2	8	6.3	3	2.1	9	6.0	21	4.6
8	0	0.0	0	0.0	2	1.6	0	0.0	0	0.0	2	0.4

为 AMP、AMP-CFZ-CTX-TET-SXT、NAL-TET,分别占 2.8%(13/461)、2.0%(9/461)和 2.0%(9/461)。排名前 14 位的常见 EPEC 耐药谱见表 3。

2.2 历年耐药变化趋势

分别计算 2014—2018 年 14 种抗生素的耐药率(表 4),并进行耐药趋势分析。CIP、TET 耐药率分别由 2014 年的 5.6%(1/18)、50.0%(9/18)缓慢上升至 2018 年的 14.7%(22/150)、63.3%(95/150)。IPM 由 2015 年全部敏感缓慢上升至 2018 年耐药率 3.3%(5/150)。NAL 耐药率由 2014 年的 16.7%(3/18)缓慢上升至 2017 年的 45.4%(64/141)。

分别统计 2014—2018 年的耐药谱,结果表明 5 年来北京市门诊腹泻病例 EPEC 分离株的耐药谱种类逐年增多,分别为 11、20、70、75 和 91 种。耐 3 类及 3 类以上抗生素的多重耐药菌株所占比例分别

表 3 2014—2018 年北京市 EPEC 常见耐药谱及菌株分布(*n* = 461)

Table 3 Common drug resistance spectrums and strain distribution of EPEC in Beijing during 2014-2018		
耐药谱	耐药菌株数	占比/%
NAL	20	4.3
AMP	13	2.8
AMP-CFZ-CTX-TET-SXT	9	2.0
NAL-TET	9	2.0
CFZ	8	1.7
TET	8	1.7
AMP-AMS-GEN-NAL-TET-SXT-AZM	7	1.5
AMP-AMS-TET-SXT	6	1.3
AMP-GEN-TET	6	1.3
AMP-AMS-CFZ-CTX-NAL-TET-SXT	5	1.1
AMP-CFZ	5	1.1
AMP-CFZ-CTX	5	1.1
AMP-CFZ-CTX-NAL-TET-SXT	5	1.1
CHL-TET-SXT	5	1.1

表 4 2014—2018 年北京市 EPEC 各年耐药率(%)

Table 4 Annual drug resistance rate of EPEC in Beijing during 2014-2018					
抗生素	2014	2015	2016	2017	2018
AMP	—	83.3 (20/24)	63.3 (81/128)	61.0 (86/141)	71.3 (107/150)
AMS	—	29.2 (7/24)	56.3 (72/128)	24.1 (34/141)	19.3 (29/150)
CFZ	—	45.8 (11/24)	39.8 (51/128)	47.5 (67/141)	46.7 (70/150)
CTX	11.1 (2/18)	33.3 (8/24)	21.1 (27/128)	27.7 (39/141)	24.0 (36/150)
CFX	0.0 (0/18)	0.0 (0/24)	7.8 (10/128)	2.1 (3/141)	4.0 (6/150)
CAZ	—	0.0 (0/24)	5.5 (7/128)	5.0 (7/141)	4.7 (7/150)
CHL	33.3 (6/18)	4.2 (1/24)	12.5 (16/128)	9.2 (13/141)	12.0 (18/150)
CIP	5.6 (1/18)	4.2 (1/24)	10.9 (14/128)	10.6 (15/141)	14.7 (22/150)
GEN	33.3 (6/18)	29.2 (7/24)	23.4 (30/128)	16.3 (23/141)	22.7 (34/150)
IPM	—	0.0 (0/24)	0.0 (0/128)	1.4 (2/141)	3.3 (5/150)
NAL	16.7 (3/18)	29.2 (7/24)	44.5 (57/128)	45.4 (64/141)	40.7 (61/150)
TET	50.0 (9/18)	45.8 (11/24)	53.9 (69/128)	46.1 (65/141)	63.3 (95/150)
SXT	38.9 (7/18)	54.2 (13/24)	44.5 (57/128)	39.7 (56/141)	51.3 (77/150)
AZM	—	33.3 (8/24)	28.9 (37/128)	17.7 (25/141)	25.3 (38/150)

注:—为未对此抗生素耐药性进行检测

为 38.9% (7/18)、45.8% (11/24)、53.1% (68/128)、48.9% (69/141)、62.7% (94/150)。

2.3 PFGE 分型与聚类结果

随机选取的 140 株 EPEC 基因组经 *Xba* I 酶切后进行 PFGE 分子分型和聚类分析,菌株均产生较好的酶切效果,条带清晰、分布均匀。采用 BioNumerics 软件对电泳条带进行聚类分析后,140 株菌共分为 136 种不同的带型,除有 4 种 PFGE 带型分别包含 2 株菌外,其余菌株均为独特的带型,相似度为 53.3%~100.0%。PFGE 型别分散,无优势带型。

3 讨论

本研究结果表明,2014—2018 年北京市 EPEC 中 AMP 的耐药率最高 (66.4%),其次为 TET (54.0%)、SXT (45.6%)、CFZ (44.9%) 和 NAL (41.6%)。细菌耐药是目前人类面临的重要问题,其中 β -内酰胺类抗生素耐药是关注和研究的焦点之一。本研究中耐药率较高的 AMP 和 CFZ 同属于 β -内酰胺类。相关菌株耐药机制需要进一步深入研究。

NAL 作为第一代喹诺酮类药物,于 20 世纪 60 年代广泛用于临床和养殖业,其耐药率日益增高。本研究试验菌株的常见耐药谱分析结果显示,位居首位的是仅对 NAL 耐药。同时,本研究对 2014—2018 年历年抗生素耐药性趋势分析结果显示,CIP、NAL、TET、IPM 耐药率呈逐年缓慢上升趋势。这与临床治疗大肠埃希菌所致腹泻常用药物有一定的相关性。2014 年发布的第一份全球耐药报告显示耐 CIP 大肠埃希菌已成为重要的食源性致病菌,对人类产生巨大的健康风险和疾病负担^[5]。本研究检出多株 CIP 多重耐药菌株,且 IPM 耐药率逐年上升,与其具有复杂、可传播的喹诺酮耐药机制相关^[6]。

本研究中 461 株菌共包含 200 种耐药谱,耐 3 类及 3 类以上抗生素的菌株占 54.0%,其中有 1 株菌对 7 类 12 种抗生素耐药。耐抗生素的种类和耐药谱种类逐年增多,表明北京市人源性 EPEC 的耐药情况严重。这些多重耐药菌株一旦引起人群感染,若不能及时采取针对性治疗措施,极可能加重医疗负担或导致死亡率增高,提示临床抗生素的选择应以药物敏感性试验为依据。

PFGE 分子溯源通过对 PFGE 图谱进行分子分型和聚类分析,可用于识别聚集性病例,被广泛应用于追踪病原菌所致传染病的暴发流行、识别散在暴发病例的传染源,从而有效预防和控制疫情^[7-9]。本研究对不同区县不同采样时间分离的菌株采用随机抽样原则,选取 140 株菌进行了 PFGE 试验,以

初步了解北京市门诊腹泻病例 EPEC 分离株的 PFGE 带型分布情况,并掌握北京市 EPEC 优势带型,用于今后及时发现散发及疫情溯源分析。结果显示,140 株 EPEC 菌株经 *Xba* I 酶切后共产生 136 种 PFGE 带型,表明北京市 EPEC 菌株基因型呈现高度多态性,与我国和其他国家的情况类似^[10-11]。

本研究初步掌握了北京市 EPEC 菌株的耐药特征和 PFGE 分子特征型别,可用于快速有效地开展腹泻病例 EPEC 监测、及时识别暴发、追踪传染源,为 EPEC 病原学研究提供了基础数据,对于 EPEC 所致感染性腹泻的预防、诊断和治疗,降低北京市居民 EPEC 健康风险,以及维护首都公共卫生和健康具有重要意义。

参考文献

[1] BLACK R E, COUSENS S, JOHNSON H L, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis[J]. Lancet, 2010, 375 (9730) : 1969-1987.

[2] CROXEN M A, LAW R J, SCHOLZ R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli* [J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26 (4) : 822-880.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement; CLSI document M100-S25[S]. Wayne, PA: CLSI, 2015.

[4] PulseNet USA CDC. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157 : H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* [S]. USA; Centers for Disease Control and Prev-ention, 2017.

[5] NISCHAL P M. First global report on antimicrobial resistance released by the WHO[J]. The National Medical Journal of India, 2014, 27 (4) : 241.

[6] 白莉,甘辛,王丽丽,等. 食品和腹泻患者分离耐环丙沙星大肠埃希菌耐药特征及耐药机制的比较研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29 (2) : 121-125.

[7] RIBOT E M, FAIR M A, GAUTOM R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157 : H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet [J]. Foodborne Pathog Dis, 2006, 3 (1) : 59-67.

[8] OTERO V, RODRÍGUEZ-CALLEJA J M, OTERO A, et al. Genetic characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from ewes' milk, sheep farm environments, and humans by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79 (19) : 5864-5869.

[9] 王丽丽,陈倩. 1 例孕妇感染李斯特菌病例的病原学分析及分子特征研究[J]. 首都公共卫生, 2016, 10 (3) : 103-106.

[10] NAKHJAVANI F A, EMANEINI M, HOSSEINI H, et al. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea[J]. J Med Microbiol, 2013, 62 (Pt 2) : 191-195.

[11] 刘凯,袁雪姣,赵爱兰,等. 肠致病性大肠杆菌分离株的脉冲场凝胶电泳分析[J]. 现代预防医学, 2015, 42 (4) : 674-677.