

研究报告

2018—2020年湖州市腹泻人群致泻大肠埃希菌流行特征及病原分析

吴晓芳,陈莉萍,严伟,沈月华,卢忠豪

(湖州市疾病预防控制中心,浙江湖州 313000)

摘要:目的 了解湖州市腹泻人群中致泻大肠埃希菌(DEC)的感染状况、主要毒力基因以及耐药情况。方法 对2018—2020年各哨点医院腹泻患者粪便标本进行分离,采用多重荧光定量聚合酶链式反应(PCR)法对DEC分离株进行毒力基因检测,用微量肉汤稀释法进行药敏试验。结果 共检出DEC阳性病例293例,分离菌株294株。肠集聚性大肠埃希菌(EAEC)占55.4%(163/294),肠产毒性大肠埃希菌(ETEC)占29.6%(87/294),肠致病性大肠埃希菌(EPEC)占11.2%(33/294),肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC)占3.4%(10/294),肠出血性大肠埃希菌(EHEC)占0.3%(1/294)。随机选取117株DEC对氨苄西林、茶啉酸、氨苄西林-舒巴坦、四环素进行耐药性检测,耐药率分别为70.9%、60.7%、53.8%、51.3%。多重耐药率达到55.6%。对亚胺培南、头孢他啶、阿莫西林-克拉维酸、头孢西丁的敏感率为99.1%、92.3%、92.3%和91.5%。DEC引起的腹泻发病高峰在7—8月,20~39岁为主要感染人群。结论 湖州市腹泻人群感染DEC基因型别以EAEC和ETEC为主,存在多重抗生素耐药,病例分布呈现明显的季节性,感染人群以青壮年为主。

关键词:致泻大肠埃希菌;流行特征;毒力基因;耐药

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)03-0260-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.03.003

Epidemiologic characteristics and pathogen analysis of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Huzhou, 2018-2020

WU Xiaofang, CHEN Liping, YAN Wei, SHEN Yuehua, LU Zhonghao

(Center for Disease Control and Prevention of Huzhou City, Zhejiang Huzhou 313000, China)

Abstract: Objective To investigate the infection status, main virulence genes and drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) in the diarrhea population in Huzhou, Zhejiang Province. **Methods** DEC were isolated from fecal specimens from patients with diarrhea in three sentinel hospitals from 2018 to 2020. All clinical isolates were then further identified using multiplex real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). The microbroth dilution method was used for drug sensitivity testing. **Results** A total of 293 DEC positive cases were detected, and 294 strains were isolated. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) accounted for 55.4% (163/294), and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) accounted for 29.6% (87/294). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) accounted for 11.2% (33/294), Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) accounted for 3.4% (10/294) and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) accounted for 0.3% (1/294). The antimicrobial resistance rates of 117 randomly selected strains to ampicillin, nalidixic acid, ampicillin-Sulbactam and tetracyclin were 70.9%, 60.7%, 53.8% and 51.3%, respectively. The multidrug resistance rate reached 55.6%. The sensitivity rates to imipenem, ceftazidime, amoxicillin clavulanic acid and cefoxitin were 99.1%, 92.3%, 92.3% and 91.5%. DEC cases had a peak in July to August, and the main infected population was between 20 and 39 years old. **Conclusion** The DEC genotypes of the patients with diarrhea in Huzhou, Zhejiang Province were mainly EAEC and ETEC, with multiple antibiotic resistance. The distribution of cases was obviously seasonal, and the infected population was mainly young adults.

Key words: Diarrheagenic *Escherichia coli*; epidemiologic characteristics; virulence gene; resistance

致泻大肠埃希菌(Diarrheagenic *Escherichia coli*, DEC)是引起感染性腹泻和食源性疾病的重要病原

菌之一^[1]。根据致病机制不同可分为肠致病性大肠埃希菌(Enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)、肠侵袭性大肠埃希菌(Enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)、肠产毒性大肠埃希菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)、产志贺毒素大肠埃希菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*)、肠出血性大

收稿日期:2021-01-28

作者简介:吴晓芳 女 主任技师 研究方向微生物检验

E-mail: xf980718@126.com

肠埃希菌(*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC)和肠集聚性大肠埃希菌(*Enteraggregative Escherichia coli*, EAEC)^[2]。不同型别的DEC具有特异性毒力因子^[3],根据国家标准对不同DEC的分型主要通过毒力基因检测确认。细菌性感染的治疗主要依靠抗菌药物,由于抗生素的广泛使用与滥用,导致DEC的耐药现象越来越严重^[4]。为了解湖州市DEC的病原特征和流行病学情况,对2018—2020年湖州市3家食源性疾病监测哨点医院送检的DEC分离鉴定菌株进行毒力基因和耐药检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

2018—2020年湖州市3家食源性疾病监测哨点医院从腹泻病例标本中分离到的致泻大肠埃希氏菌菌株,共294株。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 2 Compact 细菌及药敏鉴定仪(法国梅里埃),ABI 7500 荧光定量PCR仪(美国ABI公司),Sensititre Vizion 全自动药敏试验菌液接种判读仪(Thermo公司)。

5种致泻大肠埃希氏菌核酸多重实时荧光PCR检测试剂盒(A版本)(北京卓诚),96孔药敏板(Thermo fisher),以上试剂均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 核酸提取和扩增

将分离菌株用加热煮沸方法提取模板,按照说明书要求配制反应体系、根据反应条件进行荧光定量PCR扩增。

1.2.2 药敏试验

挑取3~5个纯菌落,在无菌水中乳化,菌悬液调整为0.5浓度单位。将配制好的菌悬液10 μL加入到含CAMHT肉汤培养基的试管内,然后取50 μL肉汤菌悬液至药敏板微孔中,36℃培养24 h后,根据菌液的最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC),来判断敏感(S)、中敏(I)和耐药(R)。

1.3 统计学分析

应用Excel 2010对数据进行整理,采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,运用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEC阳性病例流行病学特征

2.1.1 人群分布

293份阳性病例中年龄最小1岁,最大为84岁。DEC在各个年龄组都有发病,20~39岁和40~59岁2个年龄组所占比例最高,分别为49.5%和22.9%。EAEC、ETEC感染也以20~39岁年龄组比例最高,分别为26.6%和17.7%。见表1。

表1 2018—2020年湖州市293份DEC阳性病例不同年龄组检测情况

Table 1 Detection status of 293 DEC positive cases in different age groups in Huzhou from 2018 to 2020

型别	检出数	年龄组(岁)				
		0~5	6~19	20~39	40~59	≥60
EAEC	163	3 (1.0)	20 (6.8)	78 (26.6)	41 (14.0)	21 (7.2)
ETEC	86	2 (0.7)	6 (2.0)	52 (17.7)	20 (6.8)	6 (2.0)
EPEC	32	7 (2.4)	7 (2.4)	12 (4.1)	5 (1.7)	1 (0.3)
EIEC	10	1 (0.3)	4 (1.4)	3 (1.0)	1 (0.3)	1 (0.3)
EHEC	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
EPEC/ETEC	1	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
合计	293	13 (4.4)	38 (13.0)	145 (49.5)	67 (22.9)	30 (10.2)

注:括号内为检出率(%),括号外为DEC阳性病例数

2.1.2 时间分布

2018—2020年每月都有不同型别的DEC检出,DEC阳性病例数从5月份开始上升,7—8月出现高峰,见图1。

2.2 DEC阳性病例检出情况

2018—2020年共分离DEC菌株294株,检出DEC阳性病例293例,5个基因型别都有检出。EAEC占55.6%(163/293),ETEC占29.4%(86/293),EPEC占10.9%(32/293),EIEC占3.4%(10/293),检出1例EHEC,EPEC+ETEC混合感染

1例。2018—2020年DEC阳性检出率分别为7.9%(133/1677)、3.4%(48/1398)、7.8%(112/1439)。3年间DEC阳性检出率具有显著统计学差异($\chi^2 = 62.38, P < 0.05$)。

2.3 DEC毒力基因检测情况

294株DEC分离株,其中EAEC携带 $astA$ 和 pic 基因的构成比占85.9%(140/163),ETEC携带 $estIa$ 、 $estIb$ 基因的构成比占62.1%(54/87),33株EPEC都携带 eae 基因的非典型EPEC(100.0%),1株EHEC携带 $stx1$ 、 $stx2$ 基因,见表2。

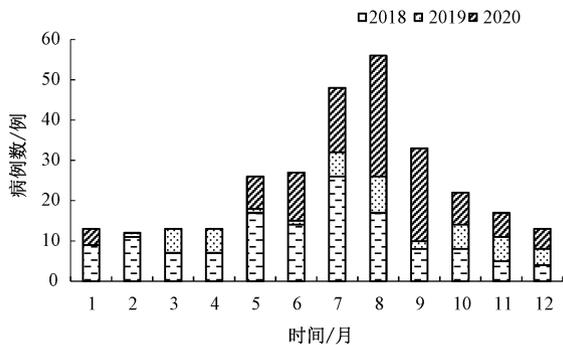


图1 不同季节 DEC 阳性病例分布情况

Figure 1 Distribution of DEC positive cases in different seasons

表2 2018—2020年湖州市致泻大肠埃希菌毒力基因分布情况

Table 2 Distribution of virulence genes of DEC in Huzhou, Zhejiang Province from 2018 to 2020

DEC 型别	毒力基因	菌株数(株)	构成比(%)
EAEC (n=163)	<i>astA, pic</i>	140	85.9
	<i>aggR</i>	14	8.6
	<i>aggR, astA, pic</i>	9	5.5
ETEC (n=87)	<i>estIa, estIb</i>	54	62.1
	<i>elt</i>	24	27.6
	<i>estIa, estIb, elt</i>	9	10.3
EPEC (n=33)	<i>eae</i>	33	100.0
EIEC (n=10)	<i>ipaH</i>	10	100.0
EHEC (n=1)	<i>stx1, stx2</i>	1	100.0
合计	—	294	100.0

2.4 DEC 药敏检测结果

2018—2020年随机选取117株DEC分离株进行药敏试验,117株DEC对头孢他啶、头孢西丁和阿莫西林-克拉维酸敏感率达到90%以上外,对其他抗生素均出现不同程度的耐药。对氨苄西林的耐药率高达70.9%,其次是萘啶酸为60.7%,氨苄西林/舒巴坦为53.8%,四环素和头孢唑林分别为51.3%和37.6%,见表3。同时还出现多重耐药情况,多重耐药率为55.6%(65/117)。

表3 2018—2020年湖州市致泻大肠埃希菌耐药分析

Table 3 Analysis of drug resistance of DEC in Huzhou from 2018 to 2020

抗生素名称	耐药株 / 率 (%)	中敏株 / 率 (%)	敏感株 / 率 (%)
氨苄西林	83 / 70.9	1 / 0.9	33 / 28.2
氨苄西林/舒巴坦	63 / 53.8	9 / 7.7	45 / 38.5
四环素	60 / 51.3	2 / 1.7	55 / 47.0
氯霉素	24 / 20.5	5 / 4.3	88 / 75.2
头孢唑林	44 / 37.6	36 / 30.8	37 / 31.6
头孢噻肟	25 / 21.4	0 / 0.0	92 / 78.6
头孢他啶	7 / 6.0	2 / 1.7	108 / 92.3
头孢西丁	7 / 6.0	3 / 2.6	107 / 91.5
庆大霉素	36 / 30.8	2 / 1.7	79 / 67.5
亚胺培南	0 / 0.0	1 / 0.9	116 / 99.1
萘啶酸	71 / 60.7	0 / 0.0	46 / 39.3
阿奇霉素	33 / 28.2	0 / 0.0	84 / 71.8
环丙沙星	36 / 30.8	11 / 9.4	70 / 59.8
阿莫西林-克拉维酸	4 / 3.4	5 / 4.3	108 / 92.3

3 讨论

本文通过对2018—2020年湖州市3家哨点医院4514份腹泻病例标本进行DEC的检测,发现DEC是引起湖州地区腹泻最常见的食源性致病菌,其次为副溶血性弧菌、沙门氏菌^[5]。2018—2020年湖州市DEC检出率为6.5%(293/4514),EPEC和ETEC混合感染1份,高于北京地区^[6]和河南省2015—2017年^[7]的检出率。3年间5个基因型别都有不同程度检出,EAEC和ETEC为湖州地区流行的主要基因型别,与杭州市^[8]、2016—2017年湖州市^[9]的检测结果一致,与2019年福建省^[10]和北京丰台区^[11]有所不同。近年来,湖州市也发生过几起由EAEC和ETEC引起的食源性疾病事件。毒力基因检测结果显示,EAEC所携带的*astA*和*pic*基因的构成比为85.9%。

EAEC产生的肠毒素有热稳定性肠毒素EAST1和丝氨酸蛋白酶Pet/Pic^[12],湖州市检出的EAEC多数都携带*pic*基因。ETEC携带的*estIa, estIb*基因的构成比占62.1%,与河南省^[7]检测结果有所不同。ETEC携带的毒力基因*elt*和*estIb*,是不耐热肠毒素LT蛋白亚单位的编码基因和耐热肠毒素ST蛋白IB的编码基因,ETEC常可导致婴幼儿和旅游者腹泻^[13]。33株EPEC都是非典型EPEC,均携带*eae*基因,与北京地区^[6]结果相符。研究表明,非典型EPEC在发达国家和发展中国家的发病率明显高于典型的EPEC^[14]。2020年还检出1株携带*stx1, stx2*基因的EHEC分离株。在1例腹泻患者中同时检出了2种不同基因型别的DEC,表明该患者存在不同型别的混合感染。

季节分布显示,2018—2020年湖州市的DEC腹泻病例数从5月份开始上升,7-8月为发病高峰,与北京^[6]的报道一致。2020年2-4月,由于新冠肺炎疫情影响,各类聚餐活动受到一定限制,降低了食源性疾病的发生风险,导致2020年DEC检出率显著低于2018年和2019年同期水平。

人群分布显示,293份DEC阳性病例中以20~39岁年龄组所占比例最高,发病年龄以青壮年为主。EAEC、ETEC感染人群也以20~39岁年龄组比例最高,与文献报道一致^[15-16]。EAEC主要以持续性的腹泻症状为主,ETEC和EPEC常导致旅游者和婴幼儿腹泻。本研究结果显示,EAEC、ETEC以及EPEC感染都以青壮年为主,究其原因可能与该年龄段人群外出就餐活动比较频繁,增加了食物暴露的机会,因此腹泻就诊人群多数集中在20~39岁年龄段。

近年来,由于临床治疗和养殖业中抗生素的不规范使用,导致抗生素耐药和多重耐药情况越来越严重。117株DEC分离株进行药敏试验,对氨苄西林的耐药率最高^[11],其次为萘啶酸、氨苄西林/舒巴坦、四环素和头孢唑林,与其他报道不同^[4,10]。同时还出现抗生素的多重耐药情况,多重耐药率达到55.6%,应加强对抗生素使用的监管力度。

DEC是近年来引起湖州地区感染性腹泻的最主要食源性致病菌之一,应加强对DEC基因型别以及耐药情况的连续监测,为防止DEC食源性疾病的发生以及指导临床用药提供技术支撑。

参考文献

- [1] JAY JM. Foodborne gastroenteritis caused by *Escherichia coli* [M]. Maryland: Aspen Publisher, 2005.
- [2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验: GB 4789. 6-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [3] BRANDAL LT, LINDSTEDT BA, AAS L, et al. Octaplex PCR and fluorescence-based capillary electrophoresis for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68(2): 331-341.
- [4] 李春, 张竹慧, 陈晴晴, 等. 2018年安徽地区临床分离致泻大肠埃希菌的耐药性检测及多位点序列分型[J]. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(9): 897-902.
- [5] 严伟, 徐德顺, 吴晓芳, 等. 2017年湖州市食源性疾病监测分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2019, 29(13): 1613-1615, 1618.
- [6] 曲梅, 张新, 钱海坤, 等. 北京地区腹泻患者致泻大肠埃希菌感染类型及其流行特征[J]. *中华流行病学杂志*, 2014, 35(10): 1123-1126.
- [7] 邱正勇, 张濛, 吴玲玲, 等. 2015-2017年河南省食源性疾病致泻大肠埃希菌监测情况分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(5): 445-448.
- [8] 周美芳, 陈晓, 余斐, 等. 2011—2013年杭州地区致泻性大肠埃希菌的流行特征及耐药性分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(11): 1655-1657.
- [9] 周丽华, 强鑫华, 王萍. 159株致泻大肠埃希菌病原学特征分析[J]. *预防医学*, 2018, 30(6): 614-615.
- [10] 傅祎欣, 陈伟伟, 叶素贞, 等. 2019年福建省哨点医院腹泻患者中致泻大肠埃希菌感染状况及病原学特征分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2020, 32(5): 539-543.
- [11] 王兆娥, 石婧, 尉秀霞, 等. 北京市丰台区腹泻患者中致泻大肠埃希氏菌感染状况及病原学分析[J]. *公共卫生与预防医学*, 2018, 29(6): 66-70.
- [12] 韩燃, 房华丽, 郭峰, 等. EHEC的新型粘附因子研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(2): 372-374.
- [13] 赵嘉咏, 朱敏, 谢志强, 等. 河南省5种致泻性大肠埃希菌病原学监测[J]. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(10): 924-927, 935.
- [14] OCHOA TJ, BARLETTA F, CONTRERAS C, et al. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection [J]. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 2008, 102(9): 852-856.
- [15] 王利, 洪颖, 陈谨, 等. 安徽省马鞍山市2014—2018年腹泻患者中致泻性大肠埃希菌病原学及流行特征分析[J]. *疾病监测*, 2019, 34(11): 1010-1016.
- [16] 赵嘉咏, 张白帆, 苏佳, 等. 2013年河南省致泻性大肠杆菌病原学与分子分型研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2016, 50(6): 525-529.