

研究报告

辽宁省婴幼儿食品中肠集聚性大肠埃希菌的病原学特征及耐药谱研究

李雪,孙婷婷,魏彤竹,王伟杰,刘海霞,张铭琰,刁文丽

(辽宁省疾病预防控制中心,辽宁沈阳 110005)

摘要:目的 对2018—2020年辽宁省婴幼儿食品中致泻大肠埃希菌开展持续监测,了解和掌握本省内致泻大肠埃希菌的病原学特征、药物敏感性特征,为本省致泻大肠埃希菌流行病学研究奠定坚实基础,为可能导致的食源性疾病合理用药提供依据。方法 采集辽宁省共208份婴幼儿食品,分离肠杆菌科细菌,并进行16S rRNA基因测序分析与生化鉴定。对鉴定得到的大肠埃希菌进行毒力基因检测,收集分离的肠集聚性大肠埃希菌(EAEC)进一步进行血清学分型和耐药谱研究。结果 16S rRNA基因测序通过对肠杆菌科进行种鉴定,发现与生化结果一致。其中EAEC的检出率较高,且EAEC的毒力基因 pic 携带率高。毒力基因分型和血清分型具有一致性。共检测出25株EAEC,其中40%菌株(血清型O134:H9)携带毒力基因 pic ,28%菌株(血清型O3:H2)同时携带毒力基因 $aggR$ 和 $astA$,16%菌株(血清型O9:H6)携带毒力基因 $aggR$,16%菌株(血清型O62:H7)携带毒力基因 $astA$ 。78株大肠埃希菌中EAEC毒力基因的携带率为32.1%。25株EAEC为多重耐药株,主要对 β 内酰胺类、大环内酯类、喹诺酮类、四环素类抗菌药物耐药严重。结论 EAEC是辽宁省婴幼儿食品中大肠埃希菌主要污染菌型,且具有较高的耐药性,应给予更多关注。

关键词:肠集聚性大肠埃希菌;16S rRNA;生化鉴定;毒力基因;耐药谱;血清型

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)02-0174-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.02.004

Pathogenic characteristics and drug resistance spectrum of Enteroaggregative *Escherichia coli* in infant food in Liaoning Province from 2018 to 2020

LI Xue, SUN Tingting, WEI Tongzhu, WANG Weijie, LIU Haixia, ZHANG Mingyan, DIAO Wenli

(Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention, Liaoning Shenyang 110005, China)

Abstract: Objective To give a solid foundation for the epidemiological data of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC), and provide a basis for the rational drug use for foodborne diseases caused by DEC, the continuous monitoring of DEC from 2018 to 2020 in Liaoning Province was carried out. The pathogenic characteristics and drug sensitivity characteristics of DEC were investigated. **Methods** A total of 208 infant food in Liaoning Province were collected, from which *Enterobacteriaceae* was isolated, and 16S rRNA gene sequencing analysis and biochemical identification were carried out. The virulence genes of *E. coli* were detected. The serotype and drug resistance spectrum of EAEC were identified. **Results** Identified species of *Enterobacteriaceae* by 16S rRNA gene sequencing method was consistent with the biochemical results. The detection rate of EAEC in infant food was high, and the detection rate of virulence gene pic of EAEC was high. Virulence genotyping was consistent with the serum typing. According to the virulence gene carried by *Escherichia coli*, 25 strains of EAEC were detected, of which 40% of the strains (serotype O134:H9) carried virulence gene pic , 28% of the strains (serotype O3:H2) carried virulence gene $aggR$ and $astA$, 16% of the strains (serotype O9:H6) carried virulence gene $aggR$, and 16% of the strains (serotype O62:H7) carried virulence gene $astA$. The carrying rate of EAEC virulence gene in 78 strains was 32.1%. The drug resistance of 25 EAEC strains was not optimistic, and there were multiple drug-resistant strains. The resistance was mainly for β lactams, macrolides, quinolones and tetracyclines. **Conclusion** EAEC was the main contamination of *Escherichia coli* in infant food in Liaoning Province, and had high drug resistance, which need more attention to be paid to.

收稿日期:2021-12-08

基金项目:辽宁省自然科学基金(2019-ZD-1091)

作者简介:李雪 女 主任技师 研究方向为传染病和食源性致病微生物检测 E-mail:812626707@163.com

通信作者:刁文丽 女 主任医师 研究方向为营养与食品卫生 E-mail:diaodwl@163.com

Key words: Enteroaggregative *Escherichia coli*; 16S rRNA; biochemical identification; virulence genes; drug resistance; serotypes

致泻性大肠埃希菌(Diarrheagenic *Escherichia coli*, DEC)对人类具有致病性,且该菌对婴幼儿的伤害更为严重,因此有必要对婴幼儿食品进行致病菌监测,并对检出的大肠埃希菌进行毒力基因检测、血清分型和耐药谱研究,掌握其流行病学特征^[1]。

1987年NARO等在智利儿童腹泻的粪便中分离出一种新的大肠埃希菌^[2-4],该菌在细胞培养中能以特有的砖堆样或聚集样黏附于组织培养的Hep-2上皮细胞,后被命名为肠集聚性大肠埃希菌(Enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC),也叫作Hep-2细胞黏附性大肠埃希菌^[5-8]。现认为EAEC是引起持续性腹泻的重要病原菌,可引起儿童营养不良、脱水、甚至死亡。该菌对婴幼儿的伤害较严重,一般引起2周以上的持续性腹泻^[9-11],已在世界多个国家引起暴发或散发病例。

本研究通过对DEC连续3年的持续监测,发现本省EAEC是主要流行致病菌型,通过分析本地区EAEC菌株的病原学特征、药物敏感性特征,以期为EAEC流行病学研究奠定坚实基础,为其可能导致的婴幼儿食源性疾病合理用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

25株EAEC分离自2018—2020年辽宁省内14市内市场销售的208份婴幼儿食品(婴儿面条22株,婴儿米粉2株,婴儿小饼干1株,婴儿奶粉0株)。标准菌株*E. coli* ATCC25922为本实验室保存。

1.2 主要仪器及试剂

PCR仪、电泳仪、凝胶成像系统(美国ABI)。API20E生化试剂条、大肠埃希菌诊断血清(丹麦SSI),16S rRNA基因扩增引物(国家风险评估中心提供),PCR试剂、DNA提取试剂盒、五种致泻大肠毒力基因快速检测试剂盒(卓诚惠生),革兰氏阴性菌药敏板(赛默飞特),结晶紫中性红胆盐琼脂VRBGA(北京路桥)。

1.3 肠杆菌科分离

按照国标GB 4789.41—2016^[1]中肠杆菌科分离鉴定方法进行。

1.4 肠杆菌科16S rRNA基因测序

将分离出的155株细菌提取DNA,方法按照DNA提取试剂盒说明书进行。DNA以16S rRNA

基因引物经PCR扩增后电泳,将电泳产物(目的条带大小1500 bp左右)提供给汇佰生物有限公司进行16S rRNA基因测序,测序后进行NCBI BLAST比对,从而鉴定出肠杆菌科细菌种类。16S rRNA基因引物:27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

1.5 生化鉴定

采用API20E生化试剂盒,按照说明书步骤操作。

1.6 血清学分型

采用国标GB 4789.6—2016^[2]中玻片凝集方法操作。

1.7 大肠埃希菌毒力基因检测

按照5种致泻大肠毒力基因快速检测试剂盒说明书操作。按照《2020年食品安全风险监测手册》^[3]中致泻大肠埃希菌毒力基因检测方法进行鉴定。大肠埃希菌ATCC 25922作为标准菌株。

1.8 药敏试验

采用微量肉汤稀释法,操作按照THERMO药敏板试剂盒说明书,结果判读参照《2020年食品微生物及其致病因子监测工作手册》^[12],以大肠埃希菌(ATCC 25922)作为质控菌株。耐药谱包括16种抗生素:氨苄西林(Ampicillin, AMP)、氨苄舒(Ampicillin/sulb, AMS)、四环素(Tetracycline, TET)、多黏菌素E(Colistin, CT)、氯霉素(Chloramphenicol, CHL)、头孢唑啉(Cefazolin, CFZ)、复方磺胺(Trimeth sulfame, SXT)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、头孢他啶(Ceftazidime, CAZ)、亚胺培南(Imipenem, IMP)、萘啶酸(Nalidixic, NAL)、头孢西丁(Cefoxitin, FOX)、头孢噻肟(Cefotaxime, FOT)、庆大霉素(Gentamicin, GEN)、阿奇霉素(Azithromycin, AZM)、红霉素(Erythromycin, ERY)。

2 结果

2.1 分离株种属鉴定

本研究首次对辽宁省内2018—2020年采集的208份婴幼儿食品进行肠杆菌科细菌的分离,并对分离到的155株菌进行了16S rRNA基因测序和生化鉴定。16S rRNA基因鉴定将155株细菌分成5个种,其中78株为大肠埃希菌(25株EAEC),占菌株总数的50.3%,其次肺炎克雷伯氏菌占比22.6%,巴西固氮螺菌占比1.9%,见表1。

表1 16S rRNA基因测序与生理生化结果
Table 1 16S rRNA gene sequencing and biochemical identification results

菌株种类	16S rRNA 基因测序结果			生化鉴定	
	数量	占比/%	%id	T	结果
大肠埃希菌	78	50.3	≥88.4	≥0.25	可接受的鉴定
肠球菌(粪肠球菌28株、屎肠球菌8株)	36	23.2	≥87.0	≥0.69	可接受的鉴定
肺炎克雷伯氏菌	35	22.6	≥99.4	≥0.5	很好的鉴定
枯草芽孢杆菌	3	1.9	94.8	0.62	好的鉴定
巴西固氮螺菌	3	1.9	89.3	0.71	可接受的鉴定

2.2 EAEC病原型特征分析

2.2.1 EAEC检测

对78株大肠埃希菌进行毒力基因检测,共检测出25株EAEC,毒力基因的携带率为32.1%。208份婴幼儿食品中,婴幼儿面条的EAEC检出率高达28.2%,其次为婴幼儿米粉和婴幼儿小饼干,检出率分别为4.5%和2.2%,而婴幼儿奶粉中未检出致泻大肠埃希菌(表2)。

表2 不同婴幼儿食品EAEC的检出率

婴幼儿食品种类	检出量	检出率/%
婴幼儿面条	78	28.2
婴幼儿米粉	44	4.5
婴幼儿小饼干	46	2.2
婴幼儿奶粉	40	0
合计	208	12.0

2.2.2 EAEC同源性对比

25株EAEC分离株测序结果与NCBI数据库收录的参考菌株16S rRNA基因序列进行同源性比对,结果显示25株EAEC分离株与大肠埃希菌参考株同源性均>99%。对25株EAEC分离菌株与参考菌株16S rRNA基因系列构建系统进化树发现,25株EAEC分离株与大肠埃希菌参考株聚为一支,见图1。

2.2.3 毒力基因及血清型检测

EAEC通常携带*pic*、*aggR*和*astA*3个毒力基因中的1种,或者多种毒力基因片段。本研究25株EAEC中40%菌株(血清型O134:H9)携带毒力基因*pic*,28%菌株(血清型O3:H2)同时携带毒力基因*aggR*和*astA*,16%菌株(血清型O9:H6)携带毒力基因*aggR*,16%菌株(血清型O62:H7)携带毒力基因*astA*。分型结果显示,辽宁省婴幼儿食品中主要流行的致泻大肠埃希菌型别为EAEC,而检出的25株EAEC的主要流行毒力基因型为*pic*,携带率高达40%,其次为毒力基因型*aggR*和*astA*。因此,辽宁省婴幼儿食品中EAEC是主要污染菌型,其他5种致泻大肠埃希菌未检出。

本研究对检出的25株EAEC进行血清分型。

Isolated strain Co568.seq
Isolated strain Co567.seq
Isolated strain Co574.seq
Isolated strain Co578.seq
Isolated strain Co582.seq
Isolated strain Co583.seq
Isolated strain Co571.seq
Isolated strain Co588.seq
Isolated strain Co575.seq
Isolated strain Co576.seq
Isolated strain Co570.seq
Isolated strain Co581.seq
Isolated strain Co587.seq
Isolated strain Co569.seq
Isolated strain Co577.seq
Isolated strain Co580.seq
Isolated strain Co586.seq
Isolated strain Co573.seq
Isolated strain Co585.seq
Isolated strain Co579.seq
Isolated strain Co564.seq
Isolated strain Co584.seq
Isolated strain Co572.seq
Escherichia coli AY513502.seq
Isolated strain Co566.seq
Isolated strain Co564.seq
E.coli SG4(MN318323.1).seq
JQ694661.seq
Spu88546.seq
JQ694661.seq
EU178101.seq

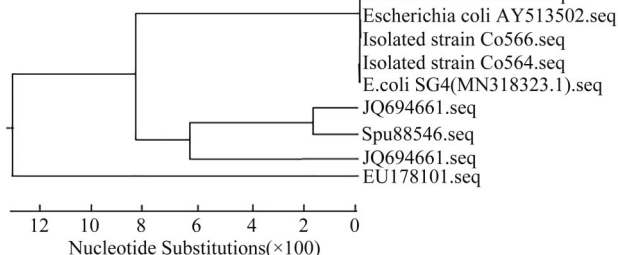


图1 16S rRNA基因系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence

表3 25株EAEC毒力基因型和血清型结果

毒力基因	血清型	占比/%
<i>pic+uidA+</i>	O134:H9	40
<i>aggR+astA+uidA+</i>	O3:H2	28
<i>aggR+uidA+</i>	O9:H6	16
<i>astA+uidA+</i>	O62:H7	16

注:97%以上大肠埃希菌为*uidA*阳性

结果显示,辽宁省婴幼儿食品中检出EAEC的主要流行血清型为O134:H9(40%),其次是O3:H2(28%)、O9:H6(16%)、O62:H7(16%),见表3。

2.3 药敏试验结果

25株EAEC均对红霉素耐药。25株EAEC对红霉素、复方磺胺、四环素、氨苄西林、氨苄舒、头孢唑啉、萘啶酸、环丙沙星8种药物出现不同程度耐药,并且出现多重耐药株。含有*aggR*和*astA*基因(或含有其中1种基因)血清型为O3:H2、O9:H6、O62:H7的EAEC菌株更易耐药,同时含有*aggR*和*astA*基因型血清型O3:H2的菌株更易产生多重耐药(表4)。

3 讨论

3.1 对肠杆菌科细菌进行16S rRNA基因测序的可行性探讨

由于生化一直是肠杆菌科细菌鉴定的金标准^[2],但生化鉴定耗时长、费用高,而应用16S rRNA基因

表4 婴幼儿食品中分离 EAEC 株的药敏结果、毒力基因和分离食品

耐药谱	耐药/株	耐药率/%	血清型	毒力基因	婴幼儿食品种类
ERY	25	100	O134:H9、O3:H2、O9:H6、O62:H7	<i>pic+aggR+astA+uidA+</i>	面条、小饼干、米粉
SXT	10	40	O134:H9、O3:H2、O9:H6、O62:H7	<i>pic+aggR+astA+uidA+</i>	面条、小饼干、米粉
TET	10	40	O3:H2、O9:H6、O62:H7	<i>aggR+astA+uidA+</i>	面条、米粉
AMP	10	40	O3:H2、O9:H6、O62:H7	<i>aggR+astA+uidA+</i>	面条、小饼干
AMS	10	40	O3:H2、O9:H6、O62:H7	<i>aggR+astA+uidA+</i>	面条、米粉
CFZ	10	40	O3:H2、O9:H6、O62:H7	<i>aggR+astA+uidA+</i>	面条、米粉
NAL	8	32	O3:H2、O9:H6、O62:H7	<i>aggR+astA+uidA+</i>	面条、小饼干
CIP	8	32	O3:H2、O9:H6、O62:H7	<i>aggR+astA+uidA+</i>	面条、小饼干
ERY-AMP-CFZ	2	8	O3:H2	<i>aggR+astA+uidA+</i>	面条
AMP-CFZ-AMS	2	8	O3:H2	<i>aggR+astA+uidA+</i>	面条
ERY-SXT-TET-AMP	1	4	O3:H2	<i>aggR+astA+uidA+</i>	面条
ERY-AMP-CFZ-SXT	1	4	O3:H2	<i>aggR+astA+uidA+</i>	面条
ERY-AMP-CFZ-NAL-CIP	1	4	O3:H2	<i>aggR+astA+uidA+</i>	面条

测序方法费用低且方便快捷。本研究中肠杆菌科细菌 16S rRNA 基因测序鉴定结果和生化鉴定结果完全一致,提示可以用 16S rRNA 基因测序方法对肠杆菌科细菌进行种鉴定。

25 株 EAEC 的 16S rRNA 基因系统进化树结果显示,16S rDNA 序列在大肠埃希菌中非常保守,因此 16S rRNA 序列分析不能用于大肠埃希菌毒力型鉴定,通过毒力基因检测和血清分型鉴定,才能获得更准确的分型结果。

3.2 致病性大肠埃希菌毒力基因、血清型及耐药谱的研究

3.2.1 EAEC 检出情况分析

本研究显示辽宁省婴幼儿食品中 EAEC 的检出率较高,达到 12.0%,其中婴儿面条中 EAEC 的检出率最高,而婴儿奶粉中未检出 EAEC。这可能与婴儿面条需要加热煮熟后食用,与食品加工过程控制不严格有关。婴幼儿奶粉的未被致病菌污染,可见婴幼儿奶粉在致病菌把控方面还是相当严格的^[13]。

文献[10]显示,国内地区,例如上海市、四川省同样也监测到婴幼儿食品 EAEC 的污染情况,尤其是需要煮食后食用的面食类产品中,EAEC 检出率高。国外情况也比较类似,美国一地区对婴幼儿类食品致病菌监测的过程中,在面条中同样检出了 EAEC^[7]。提示应关注婴幼儿食品的烹饪处理过程。

3.2.2 毒力与血清型分析

本研究在婴儿面条中检出同时携带毒力基因 *aggR* 和 *astA* 的菌株,血清型为 O3:H2 的多重耐药菌株。婴儿米粉、小饼干中检出携带 *aggR* 或 *astA* 的菌株,血清型为 O9:H6、O62:H7 的菌株。

毒力基因和血清型结果显示,携带相同毒力基因的 EAEC 的血清分型结果是相同的,携带不同毒力基因的 EAEC 血清分型结果是不同的。本研究可看出 EAEC 毒力基因的携带和血清分型是具有一致性的。因此可以对致泻大肠埃希菌毒力基因

分型和血清分型进行进一步实验研究和探讨。

3.2.3 耐药性分析

本研究对 25 株 EAEC 进行了耐药实验,耐药情况不容乐观。25 株 EAEC 均对红霉素出现耐药,提示 EAEC 菌株对红霉素易耐药。主要对 β 内酰胺类和大环内酯类、喹诺酮类、四环素类抗菌药物耐药严重,应引相关部门重视。国内其他城市,例如长沙市、邵阳市、慈利县和安仁县等地,近几年内从婴幼儿腹泻患者粪便中分离的 40 多株 EAEC,药敏结果显示,EAEC 对红霉素、氨苄西林、四环素、复方新诺明等耐药严重,对头孢他啶、阿米卡星等敏感^[14-15]。美国马里兰大学医学院对从 100 多株婴幼儿腹泻患者粪便中分离的 EAEC 药敏研究结果显示,主要对红霉素、氨苄青霉素、四环素、乙酰螺旋霉素、麦迪霉素、林可霉素、多黏菌素、多西环素产生耐药,对环丙沙星、复达欣、丁胺卡那霉素表现高度敏感^[16]。这些腹泻患者粪便中分离的 EAEC 药敏情况与我省婴幼儿食品中分离的 EAEC 药敏情况相似,这可能与当地普遍使用该类药物有关,建议临床使用 EAEC 敏感抗生素作为首选婴幼儿腹泻治疗用药。

本研究获得了辽宁省婴幼儿食品中 EAEC 的检出率及其毒力基因的携带情况,提示辽宁省婴幼儿食品中存在 EAEC 污染,且具有较高的携带率和耐药性,提示应对婴幼儿食品中 EAEC 污染应给予更多关注。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品微生物学检验肠杆菌科检验: GB 4789.41—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard—Microbiological examination of food—Examination of Enterobacteriaceae [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.

- [2] 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.
National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National food safety standard-Microbiological examination of food- Examination of diarrheogenic *Escherichia coli*[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [3] 杨大进, 蒋定国. 2020 年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册[M]. 北京: 国家食品安全风险评估中心, 2020.
YANG D J, JIANG D G. National food pollutants and hazardous factors risk monitoring work manual in 2020[M]. Beijing: China National Center for Food Safety Risk Assessment, 2020.
- [4] ZHANG J Y, XU Y, LING X, et al. Identification of diarrheogenic *Escherichia coli* by a new multiplex PCR assay and capillary electrophoresis [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, 49: 101477.
- [5] WENG X, ZHANG C, JIANG H. Advances in microfluidic nanobiosensors for the detection of foodborne pathogens [J]. *LWT*, 2021, 151: 112172.
- [6] ZHANG M M, LIU J F, SHEN Z Q, et al. A newly developed paper embedded microchip based on LAMP for rapid multiple detections of foodborne pathogens[J]. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1): 197.
- [7] SADER H S, JONES R N. Impact of EUCAST, CLSI and USCAST ceftaroline breakpoint changes on the susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected from US medical centres (2015-2018)[J]. *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2020, 26(5): 658-659.
- [8] CHANG M X, ZHANG J F, SUN Y H, et al. Contribution of different mechanisms to ciprofloxacin resistance in *Salmonella* spp.[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 663731.
- [9] 赵彤. 食源性致病菌检测现状与食品微生物危险性评估[J]. 中国卫生标准管理, 2019, 10(4): 7-9.
ZHAO T. Detection status of foodborne pathogenic bacteria and food microbial risk assessment [J]. *China Health Standard Management*, 2019, 10(4): 7-9.
- [10] 江玲玲, 陈毅琼, 王向东, 等. 2014—2017年上海市静安区食源性疾病监测分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2018, 29(3): 101-103.
JIANG L L, CHEN Y Q, WANG X D, et al. Surveillance results of foodborne disease in Jing'an district, Shanghai(2014-2017) [J]. *Journal of Public Health and Preventive Medicine*, 2018, 29(3): 101-103.
- [11] 董庆利. 食源性致病微生物研究新动态[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9273-9274.
DONG Q L. Update on foodborne pathogen studies [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(24): 9273-9274.
- [12] 杨大进, 蒋定国. 2020 年食品微生物及其致病因子监测工作手册[M]. 北京: 国家食品安全风险评估中心, 2020.
YANG D J, JIANG D G. Work manual for monitoring food microorganisms and pathogenic factors in 2020 [M]. Beijing: China National Center for Food Safety Risk Assessment, 2020.
- [13] 王伟杰, 孙婷婷, 魏彤竹, 等. 2017—2018 年辽宁省食品中食源性致病微生物监测结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(22): 8566-8571.
WANG W J, SUN T T, WEI T Z, et al. Analysis of monitoring results of foodborne pathogenic microorganisms in food in Liaoning Province from 2017 to 2018 [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(22): 8566-8571.
- [14] 马红英. 实用医学培养基手册[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999.
MA H Y. Handbook of practical medical training medium [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 1999.
- [15] 刘巧突, 谭徽, 莫求明, 等. 湖南省首次发现肠集聚性大肠杆菌[J]. 实用预防医学, 2000, 7(2): 93-95.
LIU Q T, TAN H, MO Q M, et al. EA_ggEC first discovered in Hulan province [J]. *Practical Preventive Medicine*, 2000, 7(2): 93-95.
- [16] BHANM K, RAJ P, LEVINE M M, et al. Enteraggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 1989, 159(6): 1061-1064.