

风险监测

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

傅祎欣¹,陈伟伟¹,叶素贞²,叶海梅³,潘洁茹³

(1.福建省疾病预防控制中心,福建福州 350001; 2.南平市疾病预防控制中心,福建南平 353000; 3.福州市疾病预防控制中心,福建福州 350004)

摘要:目的 了解2019年福建省哨点医院腹泻患者中致泻大肠埃希菌(DEC)感染状况、毒力基因携带、分子分型及耐药情况。方法 采集腹泻患者210份粪便标本按照GB 4789.6—2016《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》方法分离大肠埃希菌后进行荧光聚合酶链式反应(PCR)确认,并对分离出的DEC进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型及药敏试验。结果 共检出阳性菌株32株,检出率为15.2%(32/210),其中肠道致病性大肠埃希菌(EPEC)占37.5%(12/32),肠道集聚性大肠埃希菌(EAEC)占37.5%(12/32),产肠毒素大肠埃希菌(ETEC)占25.0%(8/32)。药敏试验结果表明,32株菌对氨苄西林耐药程度最高,耐药率为78.1%(25/32),其次是四环素和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑,耐药率分别为62.5%(20/32)和59.4%(19/32)。多重耐药(MDR)率为50.0%(16/32)。PFGE结果表明,32株菌共分为28种PFGE带型,其中12株EPEC共分为10种带型,12株EAEC共分为10种带型,8株ETEC共分为8种带型,其中EPEC聚类分析结果有两组菌株具有100.0%相似带型,EAEC有一组菌株具有100.0%相似带型,ETEC聚类分析没有完全一致的带型。结论 2019年福建省哨点医院腹泻患者DEC感染主要以EPEC、EAEC为主,菌株分型带型存在多样性,菌株耐药状况严重,且存在较高的多重耐药率。

关键词:致泻大肠埃希菌; 荧光聚合酶链式反应; 毒力基因; 药敏; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)05-0539-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.05.013

Infection status and etiological characteristics of diarrheogenic *Escherichia coli* among diarrhea patients in sentinel hospitals of Fujian Province in 2019

FU Yixin¹, CHEN Weiwei¹, YE Suzhen², YE Haimei³, PAN Jieru³

(1. Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention, Fujian Fuzhou 350001, China;
2. Nanping Center for Disease Control and Prevention, Fujian Nanping 353000, China;
3. Fuzhou Center for Disease Control and Prevention, Fujian Fuzhou 350004, China)

Abstract: Objective To investigate the infectious status, virulence gene, molecular typing and antibiotic resistance of diarrheogenic *Escherichia coli* (DEC) in sentinel hospitals of Fujian Province in 2019. **Methods** Fluorescent polymerase chain reaction (PCR) was used to identify 210 fecal samples of diarrhea patients after isolation of *E. coli* according to GB 4789.6-2016, and then pulsed field gel electrophoresis (PFGE) molecular traceability and antibiotic resistance test were conducted on the isolated DEC. **Results** Thirty two strains of bacteria were detected, with a detection rate of 15.2% (32/210). Among them, enteropathogenic *E. coli* (EPEC) accounted for 37.5% (12/32), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) for 37.5% (12/32), and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) for 25.0% (8/32). The results of antibiotic resistance test showed that these 32 strains of bacteria were most resistant to ampicillin, with a resistance rate of 78.1% (25/32), followed by tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole, with resistance rates of 62.5% (20/32) and 59.4% (19/32), respectively. The multiple antibiotic resistance rate was 50.0% (16/32). The results of PFGE showed that 32 strains of bacteria causing diarrhea were divided into 28 PFGE banding patterns. Among them, 12 strains of EPEC and 12 strains of EAEC were divided into 10 PFGE banding patterns, respectively, and 8 strains of ETEC were divided into 8 PFGE banding patterns. The results of cluster analysis showed that two groups of EPEC strains had 100.0% similar

收稿日期:2020-07-16

基金项目:福建省科技计划项目(2018Y0008)

作者简介:傅祎欣 女 初级检验技师 研究方向为食品安全卫生与食源性疾病预防 E-mail:1329237455@qq.com

通信作者:陈伟伟 女 主任技师 研究方向为食品安全卫生与食源性疾病预防 E-mail:chenww10160@163.com

banding patterns, one group of EAEC strains had 100.0% similar banding patterns, and ETEC strains did not have completely consistent banding pattern. **Conclusion** EPEC and EAEC were the main pathogens of diarrhea in surveillance points of Fujian Province in 2019. The genetic diversity of the strains showed that the genetic relationship between them was relatively distant. The antibiotic resistance of DEC was severe, and the rate of multiple antibiotic resistance was high.

Key words: Diarrheogenic *Escherichia coli*; fluorescent polymerase chain reaction; virulence gene; antibiotic resistance; pulsed field gel electrophoresis

致泻大肠埃希菌(DEC)是引起腹泻的病原菌之一,由DEC感染引起的腹泻不仅存在散发病例,还经常引起聚集性食物中毒事件^[1],给公共卫生造成极大的威胁^[2],因此长期开展哨点医院DEC监测具有重大意义。根据携带的毒力基因、致病机理和流行病学特征,DEC根据其携带的毒力基因通常分为肠道致病性大肠埃希菌(enteropathogenic *E. coli*, EPEC)、肠道侵袭性大肠埃希菌(enteroinvasive *E. coli*, EIEC)、产肠毒素大肠埃希菌(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)、产志贺毒素大肠埃希菌[shigatoxin-producing *E. coli*, STEC],包括肠道出血性大肠埃希菌(enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)和肠道集聚性大肠埃希菌(enteroaggregative *E. coli*, EAEC)^[3]。本研究分析2019年福建省哨点医院腹泻患者DEC感染状况、毒力基因携带情况,并通过药敏试验分析耐药状况及脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

2019年1~12月,从福建省5个地市6家有代表性三甲医院收集临床腹泻患者粪便标本210份,分离得到32株DEC。标准菌株:大肠埃希菌(ATCC 25922)购自北京三药,沙门菌(H9812)由中国疾病预防控制中心赠送。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 2 COMPACT(法国梅里埃),荧光聚合酶链式反应(PCR)鉴定仪、电泳仪、凝胶成像系统和PFGE及配套设备均购自美国Bio-Rad。

麦康凯(MAC)琼脂、伊红美蓝(EMB)琼脂、三糖铁(TSI)琼脂均购自北京陆桥,5种DEC核酸多重荧光PCR检测试剂盒(深圳生科原),蛋白酶K(德国Merck),限制性内切酶*Xba* I(美国New England Biolabs),Seakem Gold琼脂糖(瑞士Lonza),GN生化鉴定卡(法国梅里埃),96孔药敏板(美国赛默飞世尔),所有试剂均在有效期内。

1.2 方法

1.2.1 菌株生化试验及毒力基因鉴定

按照GB 4789.6—2016《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》^[3],210份粪

便标本分别直接划线至EMB和MAC琼脂上,挑取10个以上可疑菌落穿刺于TSI斜面,挑取TSI底层产酸的菌落,经VITEK 2 COMPACT进行生化鉴定为大肠埃希菌。采用水煮法获得核酸,进一步参照试剂盒方法,采用荧光PCR鉴定仪检测毒力基因。

1.2.2 药敏试验

检出的DEC参照《2017年国家食源性疾病预防工作手册》^[4],用96孔药敏板进行耐药分析。

1.2.3 PFGE分型

参照美国疾病预防控制中心公布的PFGE标准操作规程^[5],对分离到的DEC进行PFGE分子分型。以沙门菌(H9812)作为Marker,使用限制性内切酶*Xba* I(50 U),37℃酶切2 h。电泳参数:最小分子量为50 kb,最大分子量为400 kb,初始切换时间为6.76 s,最终切换时间为35.38 s,电压为6 V,夹角为120°,运行时间为18.5 h。电泳结束后使用3×工作液浓度的GelRed染料染色15 min,于超纯水中脱色30 min后使用Gel DocXR+凝胶成像系统读取并保存图谱,使用BioNumerics 7.6软件进行聚类分析,相似系数设置为Dice系数,优化1.5%,容忍度1.5%,聚类方法选用非加权组平均(UPGMA)法。

1.3 统计学分析

用SPSS 17.0软件进行统计学分析。率的比较用 χ^2 或Fisher确切概率值检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总体检出情况

210份粪便标本通过实验室分离鉴定,DEC检出率为15.2%(32/210),每份检出的标本均分离出1株DEC。其中南平市检出10株,福州市检出12株,龙岩市检出10株。

2.2 DEC毒力基因分型

32株DEC中,EPEC占37.5%(12/32),EAEC占37.5%(12/32),其中非典型EAEC共8株,典型EAEC共4株,ETEC占25.0%(8/32)。具体毒力基因分型见表1。

2.3 耐药状况

32株DEC对氨苄西林耐药程度最高,耐药率为78.1%(25/32),其次为四环素和甲氧苄啶/磺

表1 32株DEC毒力基因分布情况

Table 1 Distribution of virulence genes of 32 strains of DEC

菌株类型	菌株数	毒力基因							
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>pic</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>estIb</i>	<i>eht</i>
非典型 EAEC	8	-	-	-	-	-	+	-	-
典型 EAEC	1	-	-	-	-	+	-	-	-
	3	-	-	-	+	+	-	-	-
EPEC	12	-	-	+	-	-	-	-	-
ETEC	6	-	-	-	-	-	-	+	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	+

胺甲噻唑,耐药率为分别 62.5% (20/32) 和 59.4% (19/32),见表 2。

32 株 DEC 中,其中 16 株菌株存在多重耐药 (MDR) 情况,多重耐药率为 50.0% (16/32)。EPEC、EAEC 和 ETEC 的多重耐药率分别为 66.7% (8/12)、58.3% (7/12) 和 12.5% (1/8),差异无统计学意义 ($F=6.025, P>0.05$),具体耐药情况见表 3。

2.4 PFGE 分型

32 株 DEC 通过 PFGE 分型共分为 28 种带型,基因图谱相似度为 61.1%~100.0%。12 株 EPEC 共分为 10 种带型,相似度为 62.4%~100.0%,其中 F007 与 F009、A002 与 A003 两组均有 100.0% 相似的基因带型,且每组 DEC 菌株携带相同毒力基因,见图 1。12 株 EAEC 共分为 10 种带型,相似度为

表2 32株DEC对抗生素耐药状况

Table 2 Antibiotic resistance of 32 strains of DEC

抗生素	耐药菌株数 (%)	中介菌株数 (%)	敏感菌株数 (%)
氨苄西林	25 (78.1)	0 (0.0)	7 (21.9)
氨苄西林/舒巴坦	6 (18.8)	12 (37.5)	14 (43.8)
头孢唑林	8 (25.0)	14 (43.8)	10 (31.3)
头孢噻肟	6 (18.8)	0 (0.0)	26 (81.3)
头孢西丁	0 (0.0)	0 (0.0)	32 (100.0)
头孢他啶	0 (0.0)	2 (6.3)	30 (93.8)
亚胺培南	2 (6.3)	0 (0.0)	30 (93.8)
庆大霉素	3 (9.4)	0 (0.0)	29 (90.6)
四环素	20 (62.5)	0 (0.0)	12 (37.5)
萘啶酸	17 (53.1)	0 (0.0)	15 (46.9)
环丙沙星	3 (9.4)	0 (0.0)	29 (90.6)
氯霉素	8 (25.0)	4 (12.5)	20 (62.5)
甲氧苄啶/磺胺甲噻唑	19 (59.4)	0 (0.0)	13 (40.6)

表3 EPEC、EAEC及ETEC对抗生素耐药状况

Table 3 Antibiotic resistance of EPEC, EAEC, ETEC

抗生素	EPEC (n=12)			EAEC (n=12)			ETEC (n=8)		
	耐药	敏感	中介	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感
氨苄西林	9 (75.0)	0 (0.0)	3 (25.0)	11 (91.7)	0 (0.0)	1 (8.3)	5 (62.5)	0 (0.0)	3 (37.5)
氨苄西林/舒巴坦	2 (16.7)	2 (16.7)	8 (66.7)	3 (25.0)	7 (58.3)	2 (16.7)	1 (12.5)	3 (37.5)	4 (50.0)
头孢唑林	5 (41.7)	2 (16.7)	5 (41.7)	1 (8.3)	7 (58.3)	4 (33.3)	2 (25.0)	5 (62.5)	1 (12.5)
头孢噻肟	4 (33.3)	0 (0.0)	8 (66.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (100.0)
头孢西丁	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (100.0)
头孢他啶	0 (0.0)	1 (8.3)	11 (91.7)	0 (0.0)	1 (8.3)	11 (91.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (100.0)
亚胺培南	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (100.0)	2 (16.7)	0 (0.0)	10 (83.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (100.0)
庆大霉素	1 (8.3)	0 (0.0)	11 (91.7)	2 (16.7)	0 (0.0)	10 (83.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (100.0)
四环素	8 (66.7)	0 (0.0)	4 (33.3)	8 (66.7)	0 (0.0)	4 (33.3)	4 (50.0)	0 (0.0)	4 (50.0)
萘啶酸	3 (25.0)	0 (0.0)	9 (75.0)	10 (83.3)	0 (0.0)	2 (16.7)	4 (50.0)	0 (0.0)	4 (50.0)
环丙沙星	1 (8.3)	0 (0.0)	11 (91.7)	2 (16.7)	0 (0.0)	10 (83.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (100.0)
氯霉素	3 (25.0)	2 (16.7)	7 (58.3)	5 (41.7)	0 (0.0)	7 (58.3)	0 (0.0)	2 (25.0)	6 (75.0)
甲氧苄啶/磺胺甲噻唑	7 (58.3)	0 (0.0)	5 (41.7)	10 (83.3)	0 (0.0)	2 (16.7)	2 (25.0)	0 (0.0)	6 (75.0)

注:括号前数字为菌株数,括号中数字为相应占比

59.5%~100.0%,其中 A099 与 A118、A049 与 A050 两组菌株存在 100.0% 相似的基因带型,且两组菌株携带相同的毒力基因,见图 2。8 株 ETEC 共分为 8 种带型,相似度为 68.5%~93.8%,未出现带型一致的菌株,见图 3。

3 讨论

3.1 检测分析

通过分析 2019 年福建省监测哨点医院 210 份

粪便标本中 DEC 污染状况,发现腹泻患者主要以 EPEC 和 EAEC 感染为主,但是 ETEC 感染也较为突出,与深圳市^[6]调查结果(主要以 ETEC 为主)不同,与安徽省调查结果^[7]也存在差异,但总体感染状况与全国调查结果^[8]一致。本研究显示,2019 年福建省哨点医院并未检出 EIEC 和 STEC (包括 EHEC),一方面可能因为开展监测时间不长,样本量偏少,存在一定程度上的偏差;另一方面由于有些 STEC 在临床上引起人类出血性结肠炎 (HC) 或

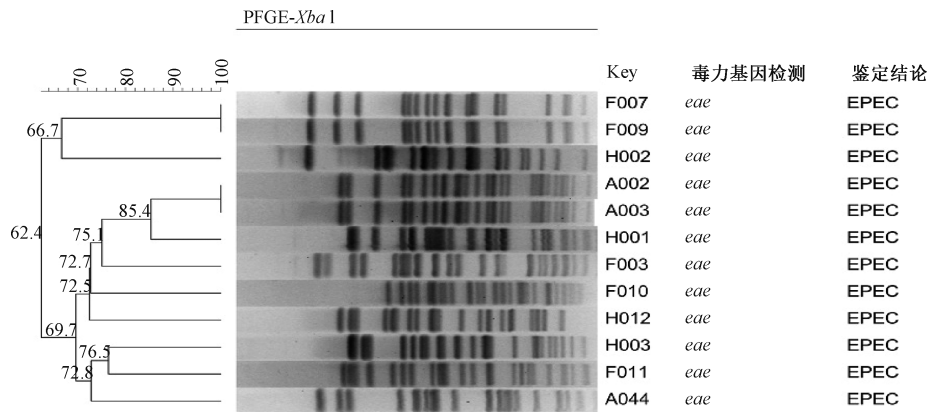


图1 12株EPEC聚类分析情况

Figure 1 Cluster analysis of 12 EPEC strains

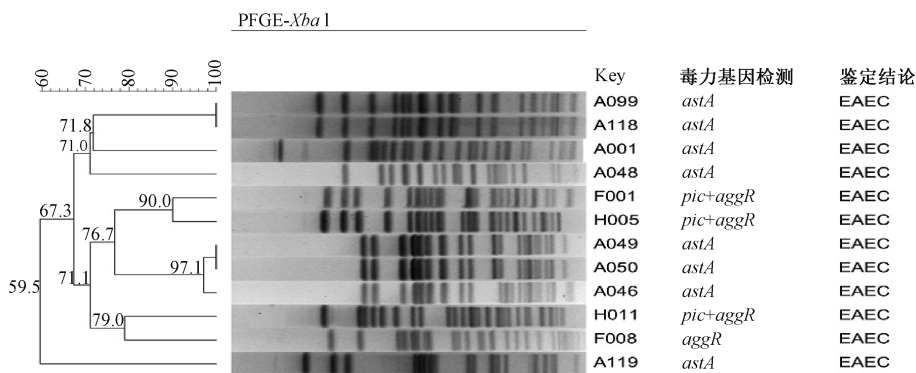


图2 12株EAEC聚类分析情况

Figure 2 Cluster analysis of 12 EAEC strains

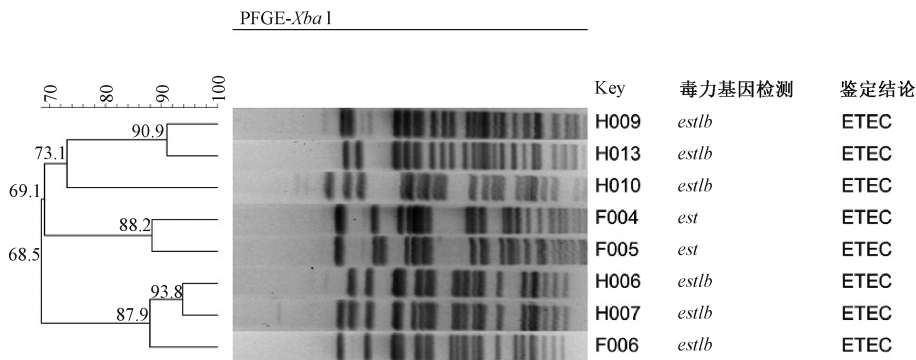


图3 8株ETEC聚类分析

Figure 3 Cluster analysis of 8 ETEC strains

出血性腹泻,并可进一步发展为溶血性尿毒综合征(HUS)^[3],因此患者在就诊时容易排除腹泻引起的疾病,导致漏检。本研究中DEC检出率为15.2%,其中南平市和龙岩市分离菌株均为10株,且均以EPEC为主,福州市阳性菌株为12株,以EAEC为主,这与杨劲松等^[9]2010—2012年在南平延平区腹泻患者中调查DEC以EPEC为主的结果基本一致。与我国其他省市检出率比较,本研究中DEC检出率稍高于2010—2015年深圳市(9.3%)^[6]及2015—

2017年河南省(5.2%)^[10]的检测结果,明显低于2010年贵阳市的检测结果(34.65%)^[11]。综上所述,福建省哨点医院腹泻患者中DEC的感染存在普遍性,但不同地区优势菌存在差异,可能由于各地区饮食习惯、经济条件、环境卫生等存在差异,导致不同区域的检出率与优势菌群不一致。本研究存在一定的局限性,仅监测5个地市哨点医院,并未覆盖全省,其代表性可能不足,尽管如此,还是在一定程度上反映福建省腹泻患者中DEC感染状

况,为今后对腹泻患者检测分析 DEC 提供参考依据。

3.2 药敏状况分析

对 32 株 DEC 进行药敏试验,结果显示对氨苄西林耐药程度最高,耐药率高达 78.1%,其次为四环素和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑。多重耐药率为 50.0%,最多对 9 种抗生素耐药。综上数据表明,随着抗生素的广泛使用,福建省哨点医院腹泻患者中 DEC 耐药情况严重,且存在多重耐药,应提高警惕。32 株 DEC 只对头孢西丁的敏感率为 100.0%,可以为临床用药提供适当参考。

3.3 PFGE 分析

PFGE 作为细菌分子分型的金标准被广泛应用,尤其在食物中毒事件中,能够准确有效溯源传染源^[12],同时也能够区分散发病例中细菌表型是否一致,为疾病暴发主动监测提供手段,从而达到预警效果。32 株 DEC 通过 PFGE 分型呈现 28 种带型,表明 2019 年腹泻患者中 DEC 的 PFGE 带型呈现高度多态性。通过分别对 EAEC、EPEC 进行聚类,共发现四组 100.0% 相似的带型,其中 A002 和 A003 两株菌通过网络追踪,发现分离自同一家庭,两名患者为夫妻关系,发病当天中午外出吃自助餐,晚上出现腹痛腹泻症状,表明有可疑食物引起食物中毒,但由于没有聚集性暴发且没有及时去餐厅调查取样,无法追踪具体导致该起食物中毒事件的可疑食物,无法形成完整的证据链。但也表明,食品在制作、运输的过程中极易容易被致病菌污染,虽然表面感官正常,但致病菌的繁殖已经导致食品腐坏,因此,食品安全监管部门应加强对餐饮企业的环境卫生管理,并对从业人员进行相应健康教育宣教,从而建立一个健康良好的餐饮环境,避免食物中毒的再次发生。PFGE 除对菌株溯源外,还能对继发性感染患者分离出的菌株分析判断是复发还是新菌株引发的再次感染,菌株编号为 A049 与 A050、A099 与 A118 的菌株分别分离自同一街道,时间分别为 6 月和 9 月,经调查,四位患者均有外出就餐史,提示某些 DEC 型别可能在特定的环境

中持续存在,应加强主动监测,防止聚集性疾病暴发。ETEC 带型呈现多态性,没有表型一致的基因带型,但基因带型相似度均高于 50%,同样不能放松警惕。

参考文献

- [1] 栾旭波,王小龙,史晓娟.一起细菌性食物中毒的病原学检测分析[J].河南预防医学杂志,2018,29(3):225-226.
- [2] WHO. Outbreaks of *E. coli* O104:H4 infection [EB/OL]. (2011-07) [2020-03-30]. <http://www.euro.who.int/en/where-we-work/member-states/Germany/section/news/2011/07/outbreaks-of-e.coli-O104h4-infection>.
- [3] 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.
- [4] 国家食品安全风险评估中心.2017 年国家食源性疾病预防工作手册[Z].2016.
- [5] U. S. Centers for Disease Control and Prevention. PFGE protocols for *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli* [EB/OL]. (2016-02-16) [2020-03-15]. <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>.
- [6] 白江涛,刘渠,陈应坚,等.深圳市龙岗区致泻大肠埃希菌的 PFGE 分子分型[J].热带医学杂志,2017,17(6):783-788.
- [7] 李春,俞俊岭.安徽地区腹泻患者感染肠致病大肠埃希氏菌的耐药特征[J].中国人兽病报,2019,35(8):732-737.
- [8] 张子科,赖圣杰,余建兴,等.我国 2012—2015 年门诊腹泻患者中致泻性大肠埃希菌流行特征分析[J].中华流行病学杂志,2017,38(4):419-423.
- [9] 杨劲松,李玉燕,廖慧,等.2010—2012 年福建省致泻性大肠杆菌监测结果分析[J].预防医学论坛,2014,20(3):161-165.
- [10] 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.
- [11] 韦小喻,游旅,田克诚,等.贵阳地区夏秋季腹泻病例中致泻性大肠杆菌监测分析[J].医学动物防治,2016,32(1):35-37.
- [12] 李明强,徐云龙,林燕,等.一起酒店聚餐引起的副溶血性弧菌食物中毒事件分析[J].中国食品卫生杂志,2019,31(3):281-283.