

深圳市腹泻人群致泻性大肠埃希菌流行及病原特征研究

李迎慧 邱亚群 冼慧霞 石晓路 林一曼 陈琼城 江敏

姜伊祥 胡璐璐 扈庆华

518055 深圳市疾病预防控制中心 重大传染病监控重点实验室(李迎慧、邱亚群、冼慧霞、石晓路、林一曼、陈琼城、江敏、姜伊祥、扈庆华); 518060 深圳大学生命科学学院(胡璐璐、扈庆华)

通信作者:扈庆华, Email:huqinghua03@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.01.025

【摘要】 目的 了解深圳地区腹泻患者中致泻性大肠埃希菌(DEC)的流行状况及病原特征。方法 对2014年深圳市4家哨点医院门诊急性腹泻患者粪便标本进行DEC的分离、分子鉴定、血清分群及PFGE分型。结果 1 823份粪便标本中分离到74株DEC,阳性分离率为4.06%;感染病例年龄分布以<3岁的婴幼儿及20~39岁中青年为主,病例集中在5—9月夏秋季。以肠产毒性大肠埃希菌(ETEC)和肠致病性大肠埃希菌(EPEC)为主,分别占45.9%和31.1%。ETEC以O159最多,2株及以上PFGE带型一致的菌株有5簇;其他型别DEC血清型和PFGE带型均较分散。结论 2014年深圳地区腹泻病患者DEC的感染类型以ETEC和EPEC为主,存在年龄及季节分布特征,菌株的血清型及PFGE分子带型较分散,应警惕ETEC的暴发风险。

【关键词】 致泻性大肠埃希菌;毒力基因;脉冲场凝胶电泳

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10004215-003-005);广东省医学科学技术研究基金(A2014645);深圳市科技计划项目(201302142)

Epidemiologic and etiologic characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* infection in population in Shenzhen Li Yinghui, Qiu Yaqun, Xian Huixia, Shi Xiaolu, Lin Yiman, Chen Qiongcheng, Jiang Min, Jiang Yixiang, Hu Lulu, Hu Qinghua

Shenzhen Key Laboratory of Priority Infectious Disease Control, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China (Li YH, Qiu YQ, Xian HX, Shi XL, Lin YM, Chen QC, Jiang M, Jiang YX, Hu QH); School of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China (Hu LL, Hu QH)
Corresponding author: Hu Qinghua, Email: huqinghua03@163.com

【Abstract】 Objective To understand the epidemiologic and etiologic characteristics of diarrheagenic *Escherichia (E.) coli* infections in Shenzhen. **Methods** Stool samples were collected from acute diarrheal patients in four sentinel hospitals in Shenzhen and diarrheagenic *E. coli* strains were isolated and identified with multiplex real-time PCR. Serotyping and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing were conducted for the diarrheagenic *E. coli* isolates. **Results** A total of 74 diarrheagenic *E. coli* strains were isolated from 1 823 stool samples (4.06%). The patients were mainly young children aged <3 years and adults aged 20–39 years, and the infections mainly occurred during May–September of a year. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) were predominant (45.9% and 31.1%). Serogroups and PFGE patterns varied among the diarrheagenic *E. coli* isolates. However, serogroup O159 were predominant in ETEC and there were 5 clusters with ≥ 2 strains sharing same PFGE patterns. **Conclusions** ETEC and EPEC were predominant in diarrheagenic *E. coli* strains isolated from diarrheal patients in Shenzhen. Age and season specific characteristics of diarrheagenic *E. coli* infections were observed. The serotypes and PFGE patterns of diarrheagenic *E. coli* strains varied. Close attention should be paid to the possible ETEC outbreak.

【Key words】 Diarrheagenic *Escherichia coli*; Virulence gene; Pulsed field gel electrophoresis

Fund programs: National Science and Technology Major Project of China (2012ZX10004215-003-005); Guangdong Medical Science and Technology Research Project (A2014645); Shenzhen Science and Technology Project (201302142)

致泻性大肠埃希菌(DEC)感染可致婴幼儿和成年人急/慢性腹泻,严重者甚至并发溶血性尿毒综合征(HUS)^[1]。DEC感染不仅散发存在,还经常引起大规模食源性疾病暴发,对公共卫生造成严重威胁^[2]。DEC根据毒力特征主要分为5种型别:肠致病性大肠埃希菌(EPEC)、肠产毒性大肠埃希菌(ETEC)、肠出血性大肠埃希菌(EHEC)、肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC)和肠聚集性大肠埃希菌(EAEC)^[3]。目前DEC实验室检测方法仍显复杂,我国关于DEC感染的数据库较为有限。为此本研究依托深圳市感染性腹泻病原谱监测网络,在4家哨点医院腹泻患者中开展DEC分离、鉴定、血清分群及PFGE分型分析。

材料与方法

1. 标本来源:选择深圳市4家(市、区级各1家及街道级2家)综合性医院作为哨点医院。2014年每个哨点医院每月采集门诊急性期感染性腹泻患者新鲜粪便标本30~60份(采样率为3%~7%)。监测病例纳入标准为每日排便 ≥ 3 次,粪便性状改变呈稀便、水样便、黏液便或脓血便等;排除已使用抗生素的患者,不恰当服用化学物质或食用毒蕈等致腹泻患者,以及明确诊断为阿米巴痢疾等寄生虫性腹泻和腹泻超过2周的病例。

2. 主要试剂和仪器:科玛嘉ECC显色平板(郑州博赛生物技术公司),大肠埃希菌诊断血清(日本生研株式会社),PCR引物、探针及相关试剂[宝生物(大连)有限公司],Seakem Gold Agarose(Lonza公司,美国),蛋白酶K、EDTA[Sigama(上海)试剂有限公司],*Xba*I酶(NEB公司,美国),Gel Red(Biotium公司,美国),荧光PCR仪CFX 96、CHEF-DR III电泳仪和成像系统(Bio-Rad公司,美国),Bionumerics软件(Version No. 6.0; Applied Maths,比利时)。

3. 菌株分离和分子鉴定:将采集的新鲜粪便标本接种ECC显色平板,(36 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养18~24 h后,随机挑取3个蓝色菌落接种克氏双糖铁斜面培养基,在相同温度再培养18~24 h,生化反应符合大肠埃希菌的培养物用于DEC的分子鉴定及血清分型。采用水煮法提取模板DNA,刮取新鲜培养物悬浮于加有200 μl 灭菌水的EP管中,水浴煮沸5 min后,8 000 r/min离心10 min,取上清液备用。利用本实验室建立的改良分子信标多重荧光PCR 2管法鉴定DEC^[4]。ETEC的目标基因为*stx*、*stx*和*lt*,EPEC为*eaeA*、*escV*,EHEC为*eaeA*、*escV*、*stx1*和*stx2*,EAEC为*aggR*,EIEC为*ipaH*。引物、探针序列及反应体系

见陈清亮等^[4]报道。检测样本 Ct 值 < 35 ,且有标准的“S”形曲线者诊断为阳性。

4. 血清分群和PFGE分析:用大肠埃希菌O抗原诊断血清52种,根据产品使用说明,对分子鉴定为DEC的菌株进行O抗原分群。按照PulseNet International“大肠埃希菌(O157:H7和非O157)、沙门菌、宋内志贺菌和福氏志贺菌PFGE标准操作程序”操作,选用*Xba*I酶,电泳时间为19 h。电泳结束后,将凝胶放入 $3 \times \text{Gel Red}$ 染液中染色30 min;去离子水洗脱2次,每次30 min。Bio-Rad成像分析系统拍照。用BioNumerics软件对电泳图谱进行数据分析。

结 果

1. DEC分离率及感染人群特征:2014年深圳市4家哨点医院腹泻就诊人数为46 487例,其中急性腹泻1 823例,采样率为3.92%。共分离到基因阳性DEC 74株,阳性分离率为4.06%,未发现与其他致病菌的混合感染。DEC感染者以男性为主(60.8%),暂住人口居多(48.6%);年龄分布以 < 3 岁的婴幼儿(31.1%)及20~39岁中青年(45.9%)为主;患者中约半数仅有腹泻症状,36.5%伴腹痛,出现发热/呕吐者不足20%,64.9%表现为水样便。不同特征患者DEC分离率有差异,但均无统计学意义(表1)。DEC腹泻病例集中在5—9月夏秋季,以6月病例数最多(14例);阳性率呈现2个高峰,分别为6月(7.41%)和9月(7.69%)。

2. 菌株型和血清群:74株DEC以ETEC最多(34株,45.9%),其次为EPEC(23株,31.1%)和EAEC(16株,21.6%),EIEC仅1株,未检测到EHEC菌株。有57株菌O抗原均获得分型,包括全部34株ETEC、12株EPEC和1株EIEC;27株菌O抗原不能分型,包括全部16株EAEC和11株EPEC。34株ETEC菌株分为9个血清群,以O159最多(13株),其次为O148(5株)和O25(4株);12株EPEC的O抗原比较分散,有11种(表2)。不同年龄组DEC分离率有差异, < 3 岁和 ≥ 60 岁年龄组DEC分离率较高,以感染EPEC和EAEC为主;20~、40~岁年龄组ETEC分离率相对较高(2.34%和2.42%)(表3)。

3. PFGE聚类分析:图1可见深圳地区DEC呈现分子型别的多态性。EPEC和EAEC未发现带型一致的菌株。同一血清群ETEC的PFGE带型存在一定相似性,聚集在一同分支。ETEC条带型一致的菌株有5簇,包括O148、O25菌株各1簇和O159菌株3簇。成簇病例发病时间跨度在1个月内的有

表1 2014年深圳市DEC感染者的流行病学及症状特征

特征	监测例数 (n=1 823)	DEC感染(n=74) 例数 构成比(%)	阳性率 (%)	P值
性别				0.211
男	979	45 60.8	4.60	
女	844	29 39.2	3.44	
年龄组(岁)				0.384
<3	396	23 31.1	5.81	
4~	123	3 4.1	2.44	
20~	896	34 45.9	3.79	
40~	331	10 13.5	3.02	
≥60	77	4 5.4	5.19	
户籍				0.363
常住	694	33 44.6	4.76	
暂住	1 032	36 48.6	3.49	
流动	97	5 6.8	5.15	
症状				0.205
腹泻	914	35 47.3	3.83	
腹泻+发热	95	8 10.8	8.42	
腹泻+呕吐	91	2 2.7	2.20	
腹泻+腹痛	510	17 23.0	3.33	
腹泻+发热+呕吐	40	1 1.4	2.50	
腹泻+发热+腹痛	41	3 4.1	7.32	
腹泻+呕吐+腹痛	111	7 9.5	6.31	
腹泻+发热+ 呕吐+腹痛	21	1 1.4	4.76	
大便性状				0.857
水样	1 083	48 64.9	4.43	
稀	677	23 31.1	3.40	
黏液	68	2 2.7	2.94	
蛋花样	43	1 1.4	2.33	
脓血	12	0 0.0	0.00	

3簇,包括O148、O25和O159菌株各1簇,其中O159成簇的2名病例居住地相聚较远,O148和O25成簇病例居住在相邻街道,提示有可能存在关联。

讨论

国内外普遍采用PCR法检测毒力基因来鉴定DEC^[5-9]。本实验室开发的2管多重荧光PCR法检测5种DEC,具有灵敏、准确、简便、快速等特点^[4],为DEC的大样本检测和常规监测提供了技术保障。

2014年深圳市4家哨点医院门诊急性腹泻病例DEC的分离率为4.06%,在细菌性腹泻中仅次于沙门菌。与国内其他地区相比,深圳市DEC检出率与北京市(4.0%)相近,但低于河南(9.2%)、浙江(14.1%)省和上海市(17.7%)^[6-9]。研究显示,不同国家、地区间DEC分离率有差异,如在巴西腹泻儿童中甚至高达59%^[5]。本研究表明选择腹泻伴发热、腹泻伴发热

及腹痛、腹泻伴呕吐及腹痛、水样便的患者采样,有助于提高DEC的检出率;从选择性平板上挑取更多的菌落进行基因检测也可提高DEC的检出率,但工作量较大。

不同地区DEC的型别存在一定差异,深圳市DEC以EPEC为主(45.9%),其次为EPEC(31.1%)。上海市徐汇区DEC感染者中EPEC约占半数(65/148),与本研究相似;北京市感染中EPEC最多为42.8%;浙江和河南省则以EAEC和EPEC为主;EIEC和EHEC在国内各地仅有零星检出^[6-9]。

DEC感染存在年龄分布特征。深圳市<3岁婴幼儿和≥60岁老年人DEC阳性率较高,以EPEC和EAEC为主;EPEC主要感染成年人。北京、上海市监测数据显示成年人组DEC检出率最高^[6,8]。EPEC主要感染成年人与通常认为的EPEC主要感染婴幼儿和旅行者不同,其原因有待进一步分析。

DEC表型和基因型存在多样性,深圳市超过1/3的菌株不能分到血清群;分到血清群的菌株中仅以EPEC中的O159较多,O148和O25血清群菌株略多。北京市分离的DEC也表现出血清型复杂分散性^[6]。本研究显示深圳市EPEC、EAEC和EIEC菌株PFGE带型均很分散,未发现条带型一致的菌株。EPEC的PFGE结果显示有5簇聚类,其中2簇的两两病例发病时间相隔在1个月内,居住地址为相邻街道,提示有可能存在关联。

综上所述,DEC是造成深圳市人群感染性腹泻的一组重要病原菌,2014年在细菌性腹泻病原中的

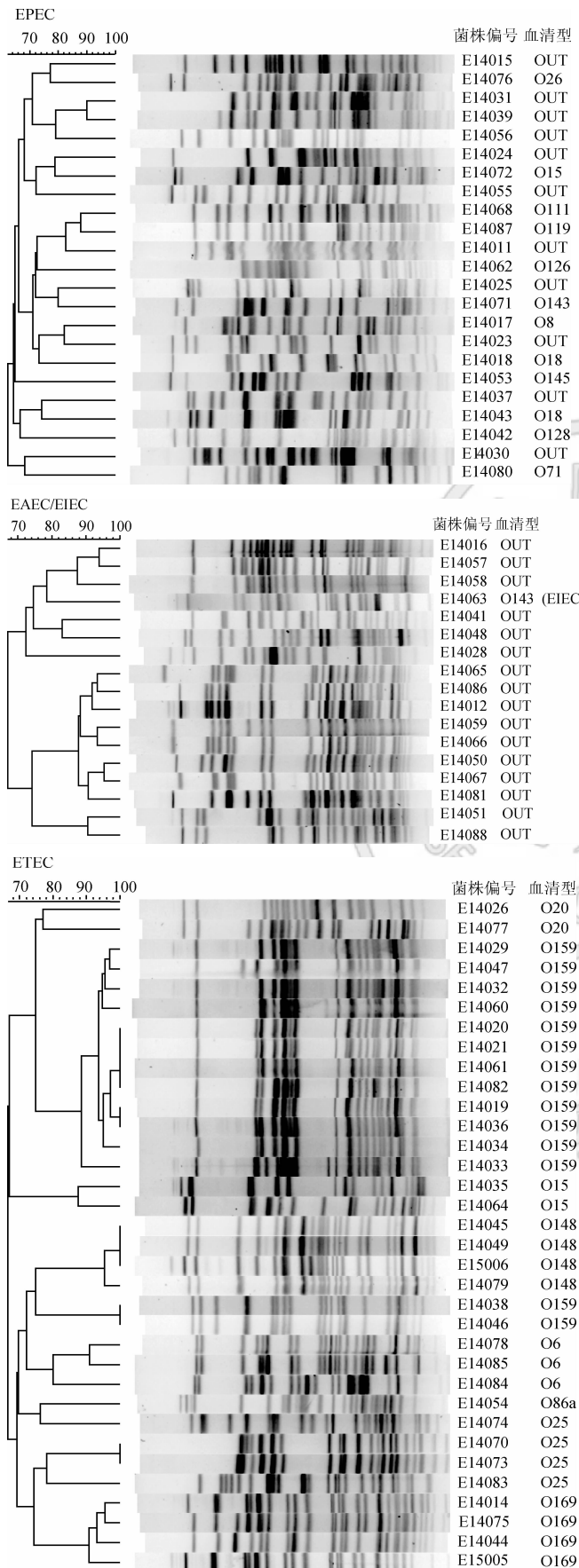
表2 2014年深圳市74株DEC型别和血清群分布

菌株	菌株数/ 构成比 (%)	不能分群 菌株数	能分群菌株		
			株数	血清 群数	血清群(菌株数)
EPEC	34/45.9	-	34	9	O148(5), O15(2), O159(13), O168, O169(3), O20(2), O25(4), O6(3), O86a
EPEC	23/31.1	11	12	11	O111, O119, O126, O128, O143, O145, O15, O18(2), O26, O71, O8
EAEC	16/21.6	16	-	-	
EIEC	1/1.4	-	1	1	O143

表3 2014年深圳市不同年龄组腹泻病例DEC分离情况

菌株	年龄组(岁)					合计 (n=1 823)
	<3 (n=396)	4~ (n=123)	20~ (n=896)	40~ (n=331)	≥60 (n=77)	
EPEC	3(0.76)	2(1.62)	21(2.34)	8(2.42)	0(0.00)	34(1.87)
EPEC	9(2.27)	1(0.81)	8(0.89)	2(0.60)	3(3.90)	23(1.26)
EAEC	10(2.53)	0(0.00)	5(0.56)	0(0.00)	1(1.30)	16(0.87)
EIEC	1(0.25)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.05)
合计	23(5.81)	3(2.44)	34(3.79)	10(3.02)	4(5.19)	74(4.06)

注:括号内数据为分离率(%)



分离率仅次于沙门菌,以 ETEC 和 EPEC 为主,血清群和 PFGE 型均较分散,ETEC 存在一定暴发风险,需加强关注。

志谢 本文的病例收集、信息采集及标本检测由深圳市感染性腹泻病原谱监测网络哨点医院相关人员完成,谨此感谢

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli* [J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2 (2) : 123-140. DOI: 10.1038/nrmicro818.
- [2] WHO. Outbreaks of *E. coli* O104 : H4 infection: update 30 [EB/OL]. (2011-07-22) [2015-06-01]. <http://www.euro.who.int/en/where-we-work/member-states/germany/sections/news/2011/07/outbreaks-of-e-coli-o104h4-infection-update-30>.
- [3] Matthew AC, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity [J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8 (1) : 26-38. DOI: 10.1038/nrmicro2265.
- [4] Chen QL, Shi XL, Li YH, et al. Rapid genetic typing of diarrheagenic *Escherichia coli* using a two-tube modified molecular beacon based multiplex real-time PCR assay and its clinical application [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2014, 13:30. DOI: 10.1186/s12941-014-0030-8.
- [5] Garcia PG, Silva VL, Diniz CG. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea [J]. J Microbiol, 2011, 49 (1) : 46-52. DOI: 10.1007/s12275-011-0172-8.
- [6] 曲梅,张新,钱海坤,等.北京地区腹泻患者致泻性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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.10.010. Qu M, Zhang X, Qian HK, et al. Study on the genotype and epidemic characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from diarrheal patients in Beijing [J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35 (10): 1123-1126. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.10.010.
- [7] Zhu M, Cui S, Lin L, et al. Analysis of the aetiology of diarrhoea in outpatients in 2007, Henan province, China [J]. Epidemiol Infect, 2013, 141(3): 540-548. DOI: 10.1017/S0950268812000970.
- [8] 赵雪涛,高昆,张春华. 2011至2012年徐汇区致泻性大肠埃希菌病原学监测与流行病学研究[J].检验医学,2013,28(8): 671-675. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2013.08.004. Zhao XT, Gao K, Zhang CH. The etiological survey and epidemiology research of diarrheagenic *Escherichia coli* in Xuhui district from 2011 to 2012 [J]. Lab Med, 2013, 28 (8) : 671-675. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2013.08.004.
- [9] Chen Y, Chen X, Zheng S, et al. Serotypes, genotypes and antimicrobial resistance patterns of human diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates circulating in southeastern China [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20 (1) : 52-58. DOI: 10.1111/1469-0691.12188.

图1 2014年深圳市哨点医院腹泻患者分离的EPEC、EAEC/EIEC和ETEC的PFGE聚类分析

(收稿日期:2015-06-08)

(本文作者:张林东)