

北京地区腹泻病患者致泻性大肠埃希菌感染类型及其流行特征

曲梅 张新 钱海坤 吕冰 黄瑛 严寒秋 梁志超 贾蕾 王全意

【摘要】 目的 了解北京地区腹泻人群中致泻性大肠埃希菌(DEC)毒力基因的分布及流行特征。方法 对2012—2013年监测医院的腹泻患者粪便样本进行分离培养,再采用实时荧光PCR检测毒力基因。结果 6 370份粪便标本有253份阳性,共分离到DEC 262株,阳性检出率为4.0%(253/6 370),9份标本发现两种不同型别的DEC混合感染。肠致病性大肠埃希菌(EPEC)为42.8%,其中非典型EPEC占42.0%,典型EPEC占0.8%;肠产毒性大肠埃希菌(ETEC)为38.9%,其中耐热肠毒素基因 st 阳性占24.8%,不耐热型肠毒素基因 lt 阳性占9.9%, st 和 lt 均阳性占4.2%;肠聚集性大肠埃希菌(EAEC)为15.3%;肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC)为2.7%;检出1株产志贺毒素大肠埃希菌(STEC),血清型为O26:K60。ETEC感染具有明显的年龄分布特征;各型DEC全年均有检出,且呈季节性变化。结论 北京地区腹泻病患者DEC感染类型以EPEC和ETEC为主,且EPEC分离株多为非典型,并存在混合感染,不同型别DEC感染具有年龄和季节性分布特征。

【关键词】 致泻性大肠埃希菌;毒力基因;实时荧光PCR

Study on the genotype and epidemic characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from diarrheal patients in Beijing Qu Mei, Zhang Xin, Qian Haikun, Lyu Bing, Huang Ying, Yan Hanqiu, Liang Zhichao, Jia Lei, Wang Quanyi. Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China

Corresponding author: Wang Quanyi, Email: wangqy@bjcdc.org

This work was supported by grants from the Project of Beijing High-Level Technical Personnel Training in Health (No. 2013-3-099) and National Science and Technology Support Projects for the "Twelfth Five-Year Plan" for Infectious Diseases of China (No. 2012ZX10004215-003-001).

【Abstract】 **Objective** To understand the distribution of virulence gene and the epidemiological characteristics of diarrheagenic *Escherichia (E.) coli* (DEC) from diarrheal patients in Beijing. **Methods** Stool specimens from diarrheal patients were cultured which were collected from the hospitals under sentinel surveillance program, during 2012–2013. DNA was examined by real-time PCR. **Results** 253 out of 6 370 specimens were positive for DEC detection with the rate as 4.0%. A total number of 262 DEC strains were isolated. Two different pathotypes of DEC strains with mixed infection, were isolated from 9 specimens. Different pathotypes would show the following profiles: 42.8% for enteropathogenic *E. coli* (EPEC) including 42.0% atypical and 0.8% typical; 38.9% for enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) including 24.8% st positive, 9.9% lt positive and 4.2% st and lt both positive; 15.3% for enteroaggregative *E. coli* (EAEC); 2.7% for enteroinvasive *E. coli* (EIEC); one strain STEC with serotype O26:K60. ETEC had obvious characteristics on age. All kinds of DEC were isolated throughout the year with seasonal fluctuation. **Conclusion** DEC isolates from diarrheal patients in Beijing were dominated by EPEC and ETEC, with atypical ones accounted for the majority of EPEC. One specimen was found under mixed infection. Pathotypes DEC were found to have different age and seasonal distributions.

【Key words】 Diarrheagenic *Escherichia coli*; Virulence gene; Real-time PCR

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.10.010

基金项目:北京市高层次卫生技术人才培养计划(2013-3-099);国家“十二五”科技重大专项(2012ZX10004215-003-001)

作者单位:100013 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

通信作者:王全意, Email: wangqy@bjcdc.org

致泻性大肠埃希菌(DEC)是引起腹泻的主要病原体。根据其致病机制可分为肠致病性大肠埃希菌(EPEC)、肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC)、肠聚集性大肠埃希菌(EAEC)、肠产毒性大肠埃希菌(ETEC)和肠出血性大肠埃希菌(EHEC)。不同型别的 DEC 具有特异性的毒力因子^[1,2]。目前临床诊断的腹泻病例较少进行病原学检测,尤其是针对 DEC 腹泻,如采用传统的血清学鉴定则可造成大量漏诊。近年国内外多通过毒力基因检测,对 DEC 进行致病型分析,该方法简便快速、节约成本,并可判断菌株是否存在致病能力,具有公共卫生意义。为此本研究收集 2012—2013 年北京地区腹泻患者粪便标本,进行 DEC 分子水平监测,以掌握本地区内 DEC 的感染类型和流行病学特征。

材料与方法

1. 标本来源:2012 年 1 月至 2013 年 12 月收集北京地区 6 个区县 17 家医院肠道门诊腹泻病例,按照“北京市肠道传染病监测方案”的要求进行规范采样,共收集 6 370 份标本。所有待检标本保存 Cary-Blair 运送培养基,于 24 h 内送至各区县疾病预防控制中心(CDC)进行菌株分离培养鉴定及毒力基因检测。

2. 方法:

(1)分离培养鉴定及血清分型:粪便标本接种 MAC 平板,(36±1)℃ 培养过夜;挑取 5 个可疑 DEC 菌落(粉红色、凸起、光滑、湿润),进行三糖铁和 MIU 初步生化试验鉴定及 VITEK 全自动系统生化分析。所需生化培养基和生化试剂均购自北京陆桥技术有限公司。5 种 DEC 血清分型采用宁波天润生物药业有限公司诊断血清。所有操作按试剂盒说明书进行,用生理盐水作为对照。

(2)荧光 PCR 检测毒力基因:对系统生化鉴定阳性菌株,转种 LB 平板后,可直接刮取菌苔,加入 200 μl 无菌蒸馏水,振荡分散细菌后,100℃ 水浴 10 min,10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清用于 PCR 模板。荧光 PCR 反应:①反应体系:25 μl 中包含 2×PCR 反应混合物,上、下游引物各 0.2 μmol/L, TaqMan 探针 0.2 μmol/L,模板 DNA 2 μl;②反应条件:95℃ 10 min;95℃ 15 s;60℃ 1 min

(检测荧光信号);40 个循环。荧光 PCR 仪为 ABI 7500;PCR 试剂为 ABI Taqman Universal PCR Master Mix;引物、探针由北京擎科生物技术公司合成,序列见表 1。Ct 值为 15~30,且有标准的“S”形曲线,诊断为阳性。

结 果

1. DEC 检出及基因型:采用 Real time-PCR 检测 6 370 份样本,253 份检出 DEC,阳性检出率为 4.0%,共分离到 262 株 DEC。其中 EPEC 位居第一位占 42.8%,包括不典型 EPEC(*eae* 阳性)42.0%,典型 EPEC(*eae* 和 *bfpA* 均阳性)0.8%;其次为 ETEC 38.9%(耐热肠毒素基因 *st* 阳性 24.8%,不耐热型肠毒素基因 *lt* 阳性 9.9%,*st* 和 *lt* 均阳性 4.2%)、EAEC 15.3%、EIEC 2.68%;1 株产志贺毒素大肠埃希菌(STEC)(*eae* 和 *stx1* 均阳性),血清型为 O26:K60(表 2)。

2. DEC 混合感染:阳性标本中有 9 份检测到两种致病型 DEC 混合感染。其中 ETEC+EAEC 混合感染 4 例,EPEC+EAEC 混合感染 3 例,EPEC+ETEC 混合感染 2 例。

3. 血清型分布:262 株只有 19 株菌确定为 13 种血清型。分别为①EPEC:4 株 O55:K59(B5),O26:

表 1 DEC 毒力基因引物探针序列

DEC	毒力基因	引物探针	序列(5'~3')
EHEC	<i>stx1</i>	stx1-F	CATCGCGAGTTGCCAGAAT
		stx1-R	TGCGTAATCCCACGGACTCT
		stx1-Probe	Fam-TGCCGGACACATAGAAGGAACTCATCA-Tamra
	<i>stx2</i>	stx2-F	GCTGGAATCTGCAACCGTTACT
		stx2-R	CACGAATCAGGTTATGCCTCAGT
		stx2-Probe	Fam-CTGCACTTCAGCAAATCCGGAGCCT-Tamra
EPEC	<i>eae</i>	eae-F	CCGATTCCTCTGGTGACGA
		eae-R	CCACGGTTTATCAAACACTGATAACG
		eae-Probe	Fam-CGTCATGGTACGGGTAA-Tamra
	<i>bfpA</i>	bfpA-F	TCTTTGATTGAATCGGCAATG
		bfpA-R	TGTGACTTATTGGAATCAGACGC
ETEC	<i>lt</i>	lt-F	GTTGACTGCCCGGACTTC
		lt-R	CGGAATATCGCAACACACAAAT
		lt-Probe	Fam-CCTGAAATGTTGCGCCGCTCTTAAATG-Tamra
	<i>st</i>	st-F	ACAGACATCATCAGAATCAGAACAAT
		st-R	AGTGGTCTGAAAGCATGAATAGTAG
		st-Probe	Fam-CACCCGGTACAAGCAGGATTACAACACA-Tamra
EAEC	<i>aggR</i>	aggR-F	CAGAATCGTCAGCATCAGCTACA
		aggR-R	AAGGATGCCCTGATGATAATATACG
		aggR-Probe	Fam-ACCAATTCGGACAACACTGCAAGCATCT-Tamra
EIEC	<i>ipaH</i>	ipaH-F	CGTGAACAGGTCGCTGCAT
		ipaH-R	CAGCAGCAACAGCGAAAGACT
		ipaH-Probe	Fam-TCAGTGCCTCTGCGGAGCTTCGAC-Tamra

表2 北京地区262株DEC毒力基因分布

DEC	毒力基因	阳性菌株数	构成比(%)
EPEC	<i>eae</i>	110	42.0
	<i>eae+bfpA</i>	2	0.8
ETEC	<i>st</i>	65	24.8
	<i>lt</i>	26	9.9
	<i>lt+st</i>	11	4.2
EAEC	<i>aggR</i>	40	15.3
EIEC	<i>ipaH</i>	7	2.7
STEC	<i>eae+stx1</i>	1	0.4
合计		262	100.0

K60(B6)、O125:K70(B15)各2株及O126:K71(B16)、O128:K67(B12)、O44:K74(L)、O114:K90和O119:K69(B14)各1株;②ETEC:1株O15:K?;③EIEC:O28:K73、O164:K?、O124:K72、O29:K?和O26:K60(B6)各1株。绝大部分菌株无法分型。

4. DEC感染特征:

(1)人群分布:262株DEC分离自男性150株,女性103株(含混合感染),性别比为1.5:1。感染人群平均年龄31.4岁;职业分布以家务及待业人员最多(50例),其次为散居儿童(33例)。细菌性腹泻在各年龄组均有发病。其中以20~39岁年龄组为主,发病2621例,占总发病人数的41.1%(2621/6370),DEC阳性病例为121例,阳性率为4.6%;其次为40~59岁组和0~5岁组,发病人数分别为1303例和1170例,DEC阳性病例分别为48例和39例,阳性率分别为3.7%和3.3%;6~19岁和≥60岁组发病人数较少(表3)。各年龄组不同型别病原检出率有差异,EPEC、ETEC和EAEC在各年龄组均有检出。ETEC以6~19岁年龄组检出率最高(2.3%),0~5岁组最低(0.5%),差异有统计学意义;EPEC和EAEC虽在各年龄组均有检出,但差异无统计学意义。

(2)时间分布:监测年度内各月DEC阳性检出率呈波动性变化,但总体趋势较为一致,显示6—8月为检出高峰,10月以后明显下降,4月出现较大幅度下降。检出率具有明显的季节性分布,其中夏秋季高,冬春季低(图1)。2013年全年平均检出水平明显高于2012年(5.0% vs. 3.0%),差异有统计学意义($P<0.05$)。不同型别

DEC检出率的时间分布稍有不同。全年各月均检出EPEC,但高峰为6月;ETEC检出主要集中在夏秋季,以7月最高;EAEC除1和4月外,其他月份均有检出,但高峰在8月;EIEC全年检出率均低,只在1、8和9月有检出;监测年度内唯一分离的1株STEC是于6月检出。

讨 论

本研究262株DEC以EPEC和ETEC为主要型别,血清分型后只有19株能明确O抗原型别。据2010—2011年北京地区监测结果,用现行的血清分型方法共检测出77株DEC,阳性检出率为1.6%(77/4803)^[3],明显低于本研究用毒力基因分型的检出率(4.0%),DEC在主要肠道致病菌中的检出比例由2010年的7.5%上升至2013年的32.0%,与国内其他研究报道基本一致^[4-6]。表明临床单独采用血清学诊断可能造成大量病例的误检和漏检。

EPEC是北京地区DEC流行的优势型别,在检出的112株EPEC中,98.2%为非典型EPEC,只有1.8%为典型EPEC。既往研究报道,典型EPEC一直是发展中国家婴幼儿腹泻的主要病原菌,而非典型EPEC则是在发达国家的腹泻人群或健康儿童中高发^[7,8]。但近来研究数据显示,非典型EPEC在发

表3 2012—2013年北京地区不同年龄组腹泻病例DEC检出率

DEC	年 龄 组 (岁)					合计 (n=6370)	P值
	0~5 (n=1170)	6~19 (n=515)	20~39 (n=2621)	40~59 (n=1303)	≥60 (n=761)		
EPEC	24(2.1)	7(1.4)	49(1.9)	24(1.8)	8(1.1)	112(1.8)	0.284
ETEC	6(0.5)	12(2.3)	56(2.1)	18(1.4)	10(1.3)	102(1.6)	0.003
EAEC	7(0.6)	3(0.6)	17(0.6)	9(0.7)	4(0.5)	40(0.6)	0.997
EIEC	1(0.1)	1(0.2)	4(0.2)	0(0.0)	1(0.1)	7(0.1)	0.414
STEC	1(0.1)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.1)	0.349
合计	39(3.3)	22(4.3)	121(4.6)	48(3.7)	23(3.0)	253(4.0)	0.144

注:括号外数据为DEC阳性例数,括号内数据为检出率(%)

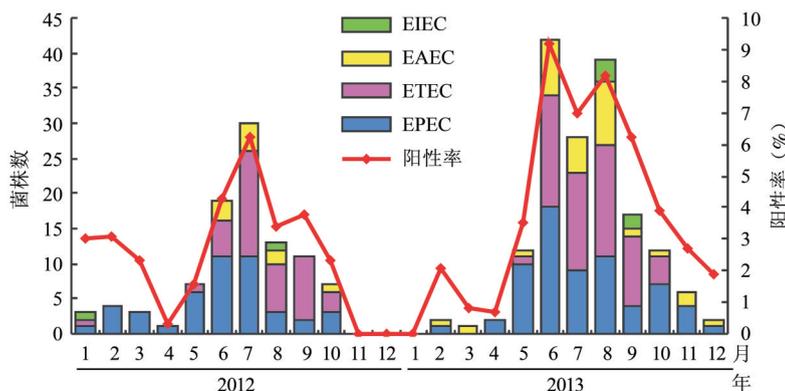


图1 2012—2013年北京地区不同时间(月)各型别DEC检出情况

中国国家和发达国家普遍流行,发病率明显高于典型EPEC^[9]。但在我国非典型EPEC的研究报道较少,而在北京地区散在流行,可能提示存在菌型的变迁。国内极少开展EAEC分子生物学检测,北京地区既往也无人感染数据。本研究还检出1株STEC(血清型为O26:K60),目前国际上报道的非O157型STEC菌株主要血清型为O26、O111、O103和O145等,有超过100种非O157型STEC能引起人类疾病^[10]。我国江苏等地发现的O26型STEC多为牲畜和食品来源^[11],鲜有人感染的报道。本研究还在同一份标本中发现DEC多种型别混合感染。2011年德国暴发的O104:H4感染疫情表明此为EHEC家族中一名新成员,约80%的基因来自O104:H4型菌,约20%的基因来自另一种大肠埃希菌。目前仍未找到其疫情传播的源头和特效治疗方法^[12]。

以往研究表明^[6],我国DEC感染者中,50%为5岁以下婴幼儿。本研究显示,以中年人(20~39岁)和青少年(6~19岁)检出率高,婴幼儿和老年人检出率低,但差异无统计学意义。

(感谢北京市大兴、丰台、通州、昌平、朝阳、西城区疾病预防控制中心相关人员在病例收集、流行病学调查及标本检测等方面付出的工作)

参 考 文 献

- [1] Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5849-5853.
- [2] 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]. J Microbiol Methods, 2007, 68(2): 331-341.
- [3] Qu M, Deng Y, Zhang X, et al. Etiology of acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in Beijing, China [J]. J Infect, 2012, 65(3): 214-222.
- [4] Zhang JL, Cui EB, Bao CM, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Infect Dis Info, 2012, 25(3): 180-182. (in Chinese)
- [5] Chen AP, Wu XC, Xiong MQ, et al. Detection on distribution of diarrheagenic *Escherichia coli* in the diarrheal population by RT-PCR [J]. Strait J Pre Med, 2012, 18(2): 1-3. (in Chinese)
- [6] Qin XX, Zhu CM. Prevalence and resistance status of diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. J Pediatr Pharm, 2008, 14(2): 61-64. (in Chinese)
- [7] Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(5): 508-513.
- [8] Afset JE, Anderssen E, Bruant G, et al. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(7): 2280-2290.
- [9] Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, et al. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008, 102(9): 852-856.
- [10] Johnson KE, Thorpe CM, Sears CL. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. Clin Infect Dis, 2006, 43(12): 1587-1595.
- [11] Xue T, Gu CC, Gao S, et al. Identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in one farm of Jiangsu province and their pathogenicity on mice [J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica, 2011, 42(6): 830-837. (in Chinese)
- [12] Frank C, Werber D, Cramer JP, et al. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany [J]. N Engl J Med, 2011, 365(19): 1771-1780.

(收稿日期:2014-05-26)

(本文编辑:张林东)