

2017年江苏省食源性疾病中致泻大肠埃希氏菌的感染状况及耐药性分析

唐震,沈贇,秦思,郑东宇,马恺,乔昕,周永林*

江苏省疾病预防控制中心,江苏 南京 210009

[摘要] 目的:了解江苏省食源性疾病病例中致泻大肠埃希氏菌的感染、耐药及病原学特征,为疾病防控及临床治疗提供依据。方法:收集2017年江苏省48家食源性疾病哨点医院腹泻患者粪便或肛拭子标本,采用传统分离培养结合荧光定量PCR方法,检测5种致泻大肠埃希氏菌并进行分型鉴定,对其感染状况进行流行病学分析;采用微量肉汤稀释法测定266株致泻大肠埃希氏菌对8类14种抗菌药物的耐药性。结果:在9884份粪便或肛拭子样本中,检出289份致泻大肠埃希氏菌(2.92%),5种病原型别中检出率最高为肠黏附性大肠埃希氏菌(EAEC, 1.53%),其次为肠产肠毒素大肠埃希氏菌(ETEC, 0.81%)和肠致病性大肠埃希氏菌(EPEC, 0.54%),有2株菌为双重菌合并感染;致泻大肠埃希氏菌夏秋季节检出较高,其中8月份检出率最高;男性、女性检出率分别为2.78%和3.08%,差异无统计学意义($\chi^2=0.801, P>0.05$);在年龄分布上,<1岁组检出最高(4.55%),1~5岁组其次(4.06%),不同年龄组检出率有统计学意义($\chi^2=45.780, P<0.01$);致泻大肠埃希氏菌呈现较高的耐药率(91.35%),耐药率最高的抗菌药物是氨苄西林(64.3%),其次是萘啶酸(60.9%)和四环素(51.9%);多重耐药率达到60.9%,其中1株菌耐受14种抗菌药物。结论:江苏省食源性致泻性大肠埃希氏菌中EAEC感染率最高,多重耐药情况较为严重,<5岁的婴幼儿需要重点关注。

[关键词] 致泻大肠埃希氏菌;食源性疾病;感染;耐药

[中图分类号] R117

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)10-1371-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20181008

Infection status and drug resistance of diarrheogenic *Escherichia coli* in foodborne diseases in Jiangsu Province, 2017

Tang Zhen, Shen Yun, Qin Si, Zheng Dongyu, Ma Kai, Qiao Xin, Zhou Yonglin*

Center of Disease Control and Prevention of Jiangsu Province, Nanjing 210009, China

[Abstract] **Objective:** To analyze pathogenic characteristics of diarrheogenic *Escherichia coli* (DEC) in the patients with food borne diseases in Jiangsu Province; to understand drug resistance status and provide effective basis for better prevention, control and clinical treatment in the future. **Methods:** The fecal specimens of diarrhea patients in 48 food borne disease sentinel hospitals in Jiangsu Province were collected in 2017, 5 kinds of DEC were detected by traditional separation culture method combined with fluorescence quantitative PCR. The infection characteristics were analyzed by epidemiological description. At the same time, 266 DEC strains were subjected to drug resistance test against 14 antibiotics of 8 categories by micro broth dilution method. **Results:** Among 9884 samples of fecal or anal swabs, a total of 289 DEC were detected (accounted for 2.92%), the highest detection rate in 5 types was EAEC (accounted for 1.53%), followed by ETEC (accounted for 0.81%) and EPEC (accounted for 0.54%), 2 samples were double bacteria combined infection. The positive DEC detection rate was relatively higher in summer, the highest rate was observed in August. The proportions of male and female infection (2.78% and 3.08%, respectively) were approximately equal and no statistical difference was found between different genders ($\chi^2=0.801, P>0.05$). For age distribution, the highest rate was detected among the 1 year old group (accounted for 4.55%), followed by 1-5-year-old group (accounted for 4.06%), the detection rate of different age groups was statistically significant ($\chi^2=45.780, P<0.01$). The DEC demonstrated high drug resistance rate (accounted for 91.35%), among which ampicillin had the highest drug resistance rate (64.3%), followed by nalidixic acid (60.9%) and tetracycline (51.9%); multi-drug

[基金项目] 江苏省科技强卫重点学科项目(ZDXKA2016008)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 158582009@qq.com

resistance rate was 60.9%, 1 strains was resistant to all 14 kinds of antibiotics. **Conclusion:** The infection rate of EAEC in DEC is the highest among food borne DEC in Jiangsu province. Infants younger than 5 years old require emphasized focus. The multi-drug resistance of DEC is relatively serious, which needs to more attention.

[Key words] diarrheogenic *Escherichia coli*; food borne disease; infection; drug resistance

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(10): 1371-1375]

食品安全问题一直是社会关注的重要问题。我国发生的食物中毒事件中,细菌性食物中毒的人数最多,占总中毒人数的45.8%^[1]。致泻大肠埃希氏菌(diarrheogenic *Escherichia coli*, DEC)是一类常见的能引起人体以腹泻症状为主的大肠埃希氏菌,可通过污染食物引起人类发病^[2]。最常见的DEC主要包括5种,分别为肠致病性大肠埃希氏菌(EPEC)、肠产肠毒素大肠埃希氏菌(ETEC)、肠侵袭性大肠埃希氏菌(EIEC)、肠出血性大肠埃希氏菌(EHEC)和肠黏附性大肠埃希氏菌(EAEC)。近年来急性腹泻粪便标本中DEC的检出率有所增加^[3]。此外,该菌对常用抗菌药物出现的较高耐药性引起了广泛关注。为了解江苏省DEC的感染、耐药状况及病原学特征,现对2017年江苏省48家哨点医院的食源性疾病病例标本进行检测及耐药实验,为疾病防控及临床治疗提供依据。

1 对象和方法

1.1 对象

2017年1—12月在江苏省48家食源性疾病病原学监测哨点医院,选取有腹泻症状(每日排便 ≥ 3 次,且粪便性状异常,稀便、水样便、黏液便或脓血便等)的就诊患者,由哨点医院收集患者的人口学、社会学信息、临床症状、食物暴露危险因素等流行病学资料,采集粪便或肛拭子标本,共计9 884份。

1.2 方法

1.2.1 细菌模板制备

取腹泻患者粪便标本或肛拭子悬液接种于5 mL EC肉汤(北京陆桥公司)中,37℃培养18 h,取适量细菌10 000 r/min离心5 min,去上清,沉淀用灭菌超纯水悬浮,测定细菌浓度约为 3×10^9 CFU/mL;100℃煮沸10 min,置于冰浴中冷却;4℃10 000 r/min离心10 min,取上清1 μ L作为PCR模板。

1.2.2 大肠埃希氏菌多重PCR分型

采用荧光定量PCR方法对菌悬液进行5种致泻大肠埃希氏菌(ETEC、EPEC、EHEC、EIEC和EAEC)的分型实验,具体操作按照ABT 5种DEC多重PCR

检测试剂盒(北京卓诚惠生有限公司)说明书进行。

1.2.3 细菌的分离与鉴定

将经多重PCR毒力基因检测为阳性的肉汤培养液接种大肠显色平板(广东环凯公司)中进行单菌落分离培养,挑取显色平板上蓝绿色菌落,每个平板挑取5个或以上可疑菌落,采用朱敏等^[4]报道的方法进行单个毒力基因确认实验,并采用全自动微生物生化鉴定系统(VITEK 2)及GN卡(法国生物梅里埃公司)对毒力基因阳性的单个菌株进行生化鉴定,根据毒力基因和生化鉴定的结果判定是否为DEC。

1.2.4 药敏试验MIC测定

各区市监测实验室将鉴定后确定为DEC的菌株定期上送至省疾控中心实验室进行药敏试验。实验参照美国临床实验室标准化委员会(CLSI 2016版)发布的抗菌药物种类,使用微量肉汤稀释法以全自动药敏加样判读系统及阴性药敏检测板(美国赛默飞世尔公司)测定DEC对8类共14种抗菌药物的药物敏感型,抗菌药物为:氨苄西林/舒巴坦(AMS)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑(SXT)、亚胺硫霉素(IPM)、四环素(TET)、头孢唑啉(CFZ)、头孢西丁(CFX)、庆大霉素(GEN)、氨苄西林(AMP)、氯霉素(CHL)、环丙沙星(CIP)、萘啶酸(NAL)、阿奇霉素(AZM),判定结果分为耐药株R、中介I、敏感株S,实验采用大肠埃希氏菌国际标准株ATCC 25922作为质控对照。

1.3 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行流行病学数据统计分析,检测阳性率比较采用 χ^2 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病原检出分布

在全省48个监测哨点医院共收集9 884例食源性腹泻患者信息,其中男5 215例,女4 669例,年龄最小48 d,最大85岁。采集9 884份粪便或肛拭子标本,检出DEC阳性289份,总阳性率为2.92%,毒

力基因检测与系统生化实验结果吻合;经分型鉴定后确定EAEC最多,为151份(1.53%),其次为ETEC和EPEC较多,分别为80份(0.81%)和53份(0.54%),不同病原之间检出率差异有统计学意义($\chi^2=273.3, P<0.01$)。2份样本为混合感染,分别为ETEC/EAEC混合和EPEC/EAEC混合。

表1 9 884例食源性疾病患者5种DEC检出情况

Table 1 Detection of 5 kinds of DEC in 9 884 patients with foodborne diseases

病原类型	阳性数	构成比(%)	检出率(%)
ETEC	80	27.68	0.81
EIEC	2	0.69	0.02
EAEC	151	52.25	1.53
EPEC	53	18.34	0.54
EHEC	1	0.35	0.01
ETEC/EAEC	1	0.35	0.01
EPEC/EAEC	1	0.35	0.01
合计	289	100.00	2.92

2.2 流行病学特征

DEC男性阳性检出率为2.78%(145/5 215),女性为3.08%(144/4 669),差异无统计学意义($\chi^2=0.801, P>0.05$)。<1岁年龄组阳性率最高,为4.55%,其次是1~5岁为4.06%,其他年龄段阳性率均低于4.00%;各年龄组阳性率差异有统计学意义($\chi^2=45.780, P<0.01$,表2),DEC感染全年均有病例发生,4~11月出现明显高峰,阳性率也在5~10月呈现高峰(图1)。

2.3 耐药情况

各监测点上送DEC共266株,省级实验室进行耐药实验结果显示,266株DEC仅有23株菌对该14种抗菌药物表现为敏感或中介,其余243株(91.35%)菌均表现为不同程度的耐药,对氨苄西林耐药率最高,达64.3%,其次是萘啶酸(60.9%)、四环素(51.9%)、甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑(44.7%),亚胺硫霉素的耐药率最低(0.8%);对抗菌素耐药谱进行分析表明,耐3种抗菌药物及以上菌株有162株(占60.9%),耐7种抗菌药物及以上的菌株有41株(15.4%),最高有1株菌耐所有14种抗菌药物(表3)。

3 讨论

本文研究了江苏省食源性疾病患者中DEC的感染情况,对其引起食源性疾病的流行病学发病特征、耐药特征等方面进行了阐述。研究显示,我省DEC的总体检出率为2.92%,男女性阳性率无显著差异。

表2 9 884例食源性疾病患者不同年龄、性别DEC检出情况

Table 2 Detection of DEC in 9 884 patients with foodborne diseases with different age and gender

特征	病例数	阳性数	阳性率(%)	χ^2 值	P值
年龄				45.780	<0.01
<1岁	813	37	4.55		
1~5岁	1 698	69	4.06		
6~15岁	659	16	2.43		
16~25岁	1 317	52	3.95		
26~35岁	1 671	56	3.35		
36~45岁	952	22	2.31		
46~55岁	1 044	15	1.44		
56~65岁	841	13	1.55		
66~75岁	549	6	1.09		
≥75岁	340	3	0.88		
性别				0.801	>0.05
男	5 215	145	2.78		
女	4 669	144	3.08		
合计	9 884	289	2.92		

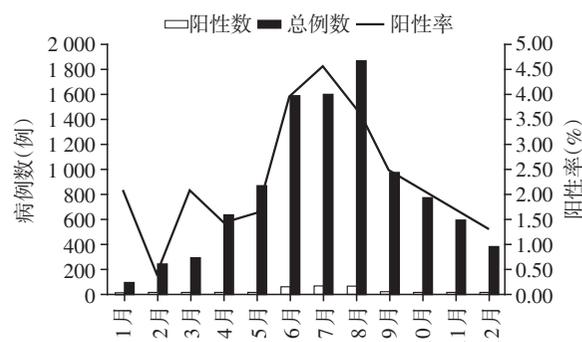


图1 2017年江苏省食源性疾病患者DEC检出率及季节分布
Figure 1 Prevalence and seasonal distribution of DEC in patients with foodborne diseases in Jiangsu Province in 2017

泰国Ratchtrachenchai等^[5]的一项结果显示,12岁以下儿童5种DEC的阳性检出率及排序分别为EAEC(10.2%)、EPEC(3.2%)、ETEC(3.0%)、EIEC(0.5%)、STEC(0.04%)。本文的阳性检出率虽然较泰国的低,但5种DEC的构成比大致相当,其中EAEC检出率最高,与河南、上海等地5种致泻大肠感染情况调查基本一致^[4,6]。

文献报道,DEC是婴幼儿腹泻和旅行者腹泻的主要致病菌之一,会引起小范围暴发甚至全球性的流行^[7-10]。本资料显示,<1岁的婴儿和1~5岁组的幼儿感染率最高,分别为4.55%和4.06%,提示婴幼儿是DEC的易感人群,可能与该年龄段婴幼儿免疫

表3 266株DEC对常用抗菌药物的耐药率

Table 3 Resistance rate of 266 strains of DEC to commonly used antibacterial drugs

抗菌药物	耐药(R)		中介(I)		敏感(S)	
	数量	耐药率(%)	数量	耐药率(%)	数量	耐药率(%)
氨苄西林/舒巴坦(AMS)	60	22.6	87	32.7	119	44.7
头孢噻肟(CTX)	71	26.7	3	1.1	192	72.2
头孢他啶(CAZ)	19	7.1	22	8.3	225	84.6
甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑(SXT)	119	44.7	0	0.0	147	55.3
亚胺硫霉素(IPM)	2	0.8	0	0.0	264	99.2
四环素(TET)	138	51.9	1	0.4	127	47.7
头孢唑啉(CFZ)	92	34.6	68	25.6	106	39.8
头孢西丁(CFX)	17	6.4	14	5.3	235	88.3
庆大霉素(GEN)	76	28.6	1	0.4	189	71.1
氨苄西林(AMP)	171	64.3	0	0.0	95	35.7
氯霉素(CHL)	44	16.5	11	4.1	211	79.3
环丙沙星(CIP)	31	11.7	3	1.1	232	87.2
萘啶酸(NAL)	162	60.9	0	0.0	104	39.1
阿奇霉素(AZM)	95	35.7	0	0.0	171	64.3

力较为低下,胃肠功能较弱有关,食用污染食物后容易引起腹痛腹泻;5~9月DEC的发病率较高,提示夏季依然是DEC的高发季节,夏季气温较高,为细菌滋生繁殖提供了良好的条件,今后须进一步加强低年龄段婴幼儿及夏季腹泻患者的监测。

DEC是常见的食源性致病菌,传统的检验多采用增菌、选择性平板分离、可疑菌落生化鉴定、血清分型等方法,该方法检验周期长,费时费力,漏检现象多,且血清凝集方法因其血清型别众多、易出现交叉凝集现象,实验往往不能进行到底,同时进口血清价格昂贵,不利于检验人员常规使用。本研究采用增菌后直接多重荧光定量PCR毒力基因检测,结合典型菌落生化鉴定方法进行鉴定检测,在一定程度上优化了实验步骤,且保证了阳性检出率^[11]。本资料中,<5岁的婴幼儿DEC检出率为4.34%,与文献报道一致,说明该方法可作为DEC的检测鉴定方法。DEC种类多,经常有2种及以上病原体合并感染的现象^[12]。本研究289例阳性病例中仅有2例出现了合并感染的现象,不同类别的DEC致病原理和临床表现不尽相同,合并感染通常会导致临床症状更为复杂和严重。

文献报道,食源性致病菌中耐药株,甚至多重耐药株不断出现并有上升趋势,耐受的抗菌药物种类也日趋增多^[13-14]。大肠杆菌长期寄存在人体的肠道内,极易产生耐药性,姬华等^[15]已经证明大肠杆菌能以多种方式与沙门氏菌、志贺氏菌等食源性致病

菌交换耐药基因,增强耐药能力。本资料中,266株DEC中有243株菌(91.35%)表现为不同程度的耐药,耐药率最高的是β-内酰胺酶类抗菌药物氨苄西林,耐药率高达64.3%,其次是喹诺酮类的萘啶酸(60.9%)、四环素类的四环素(51.9%),耐药抗菌药物种类与张恩等^[16]的研究一致;另外有90株菌对三代头孢药物(头孢噻肟和头孢他啶)耐药,提示DEC耐头孢类药物现象严重,对临床常见的抗菌药物的高耐药率会给患者的临床治疗带来一定的难度,需要引起更多的关注。随着农业和临床抗菌药物的广泛使用,多重耐药的大肠杆菌分离率越来越高,本研究中耐受7种抗菌药物及以上的菌株有41株,最多1株耐受14种抗菌药物,说明本省DEC多重耐药谱极广,耐药情况复杂,提示需要加强对临床和养殖业抗菌药物使用的管理,同时继续加强对DEC耐药性监测和研究,为更好地防控疾病积累数据。

[参考文献]

- [1] 卫生部办公厅关于2008年全国食物中毒报告情况的通报[Z]. 北京:中华人民共和国卫生部,2009
- [2] GB4789.6-2016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[S]. 北京:中国标准出版社,2016
- [3] Nyholm O, Halkilahi J, Wiklund G, et al. Comparative genomics and characterization of hybrid Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/EPEC) Strains [J]. PLoS One, 2015, 10(8):0135936

- [4] 朱敏, 谢志强, 赵嘉咏, 等. 河南省腹泻病人5种致泻大肠埃希菌感染调查[J]. 现代预防医学, 2010, 37(6): 1148-1150
- [5] Ratchrachenchai OA, Subpasu S, Hayashi H, et al. Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand[J]. J Med Microbiol, 2004, 53(3): 237-243
- [6] 李勇, 顾文超, 唐海丰, 等. 上海市普陀区2012年—2016年4种致泻性大肠埃希菌的监测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(23): 3465-3468
- [7] Lääveri T, Antikainen J, Pakkanen SH, et al. Prospective study of pathogens in asymptomatic travellers and those with diarrhoea: aetiological agents revisited[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(6): 535-541
- [8] Sakkejha H, Byrne L, Lawson AJ, et al. An update on the microbiology and epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* England 2010 - 2012 [J]. J Med Microbiol, 2013, 62(10): 1531-1534
- [9] Croxen MA, Law RJ, Scholz R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli* [J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(4): 822-880
- [10] Humphries RM, Linscott AJ. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis [J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(1): 3-31
- [11] 徐丹戈, 黄世旺, 李剑, 等. TaqMan-MGB荧光定量聚合酶链反应快速检测肠聚集性大肠埃希菌 *agg-R* 基因[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2014, 41(3): 155-158
- [12] 商晓春, 周晓红, 帅慧群, 等. 婴幼儿感染性腹泻病原学特征分析[J]. 疾病监测, 2015, 30(10): 855-860
- [13] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance [J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(3): 268-281
- [14] Pan HJ, Zhang JM, Kuang D, et al. Molecular analysis and anti-microbial susceptibility of enterotoxigenic *Escherichia coli* from diarrheal patients [J]. Diag Microbiol Infect Dis, 2015, 81(2): 126-131
- [15] 姬华, 张玫, 卢士玲, 等. 食源性大肠杆菌耐药性与毒力特征的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(7): 364-367
- [16] 张恩, 谢服煜, 周铁丽, 等. 2921株大肠埃希菌的临床分布与耐药分析[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(9): 1062-1065

[收稿日期] 2018-06-26

连续性数据分组

连续性量值如速率、高度、时间、年龄等分组表示不科学的情形是很常见的。

例如“年龄(岁)”数据分组为:10以下,10~20,20~30,⋯,60~70,70以上。

这是不准确、不科学的。这里其实涉及了极限数值的表示方法。GB/T 8170-2008给出的下列允许用语和表示方式:

从A到B $A \sim B$, $A \leq X \leq B$;

超过A到B $> A \sim B$, $A < X \leq B$;

至少A不足B $A \sim < B$, $A \leq X < B$;

超过A不足B $> A \sim < B$, $A < X < B$ 。

上述关于年龄不科学的分组可作如下修改:

1. 如果10在第2组,则表示为:

年龄(岁) $< 10, 10 \sim < 20, 20 \sim < 30, \dots, 60 \sim < 70, \geq 70$ 。

2. 如果10在第1组,则表示为:

年龄(岁) $\leq 10, > 10 \sim 20, > 20 \sim 30, \dots, > 60 \sim 70, > 70$ 。