

DOI:10.13350/j.cjpb.170403

• 论著 •

昆明市腹泻人群中肠黏附性大肠埃希菌的流行特征*

张顺先¹, 杨春利¹, 艾琳¹, 陈木新¹, 蔡玉春¹, 卢艳¹, 陈韶红¹, 徐闻², 古文鹏², 周永明², 夏尚¹,陈军虎¹, 李石柱¹, 陈家旭¹, 胡薇^{1,3**}, 周晓农^{1**}

(1. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织热带病合作中心, 国家级热带病国际联合研究中心, 上海 200025; 2. 云南省疾病预防控制中心, 云南昆明 650022;

3. 复旦大学生命科学学院微生物学与微生物工程系, 上海 200433)

【摘要】 目的 了解昆明地区肠黏附性大肠埃希菌(Enteraggregative *Escherichia coli*, EAEC)的流行特征, 为防治EAEC感染提供科学参考。方法 收集云南省昆明市4家哨点医院的腹泻患者粪便标本1 121份, 非腹泻者的粪便标本319份, 进行细菌培养(麦康凯培养基), 无菌挑选单个菌落(8—12个), 采用热提取法提取细菌DNA, 采用荧光定量PCR检测EAEC, 同时使用结构化问卷收集研究对象的基本信息。结果 EAEC在腹泻患者和非腹泻者中的检出率分别为5.4%和1.3%, 差异有统计学意义($\chi^2=10.104, P<0.05$)。男、女腹泻患者EAEC检出率分别为5.2%和5.7%, 差异无统计学意义($\chi^2=0.140, P>0.05$); 不同年龄组腹泻患者中EAEC检出率差异无统计学意义($\chi^2=10.865, P>0.05$); 腹泻患者EAEC检出率有明显的季节分布特征($\chi^2=12.819, P<0.05$), 夏季检出率最高(10.5%, 21/200); 冬季最低(2.0%, 8/394)。EAEC阳性腹泻患者水样便占26.2%(16/61), 黏液样便占70.5%(43/61)。EAEC腹泻患者易出现呕吐症状($\chi^2=12.819, P<0.05$)。结论 EAEC是腹泻的重要细菌性病原体, 开展和加强EAEC的监测, 可为EAEC相关腹泻的预防和控制提供科学依据。

【关键词】 腹泻病例; 肠黏附性大肠埃希菌; 流行特征; 昆明市

【中图分类号】 R378.21

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2017)04-0298-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2017 Apr; 12(4): 298—301.]

Epidemiological characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli* in patients with diarrhea in Kunming, China

ZHANG Shun-xian¹, YANG Chun-li¹, AI Lin¹, CHEN Mu-xin¹, CAI Yu-chun¹, LU Yan¹, CHEN Shao-hong¹, XU Wen², GU Wen-peng², ZHOU Yong-ming², XIA Shang¹, CHEN Jun-hu¹, LI Shi-zhu¹, CHEN Jia-xu¹, HU Wei^{1,3}, ZHOU Xiao-nong¹ (1. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory for Parasitology and Vector Biology, MOH of China, WHO Collaborating Center for Tropical Diseases, National Center for International Research on Tropical Diseases, Shanghai 20025, China; 2. Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention; 3. Department of Microbiology and Microbial Engineering, School of Life Sciences, Fudan University) **

【Abstract】 **Objective** To examine the epidemiological characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) in the City of Kunming, Yunnan Province in order to provide a scientific reference for the prevention and treatment of EAEC infection in China. **Methods** A total of 1,121 patients with diarrhea and 319 healthy controls were recruited from four sentinel hospitals in the City of Kunming from June 2014 to July 2015. Stool samples were cultured (MacConkey agar), single colonies were selected (8—12 single colonies), and total genomic DNA was extracted (heat extraction) to detect EAEC with real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). A structured questionnaire was used to obtain basic information and information on clinical manifestations. **Results** EAEC was detected at a higher rate in patients with diarrhea than in controls (5.4%, 1.3%, $\chi^2=10.104, P<0.05$). The prevalence of EAEC did not differ significantly between male and female patients with diarrhea (5.2%, 5.7%, $\chi^2=0.140, P=0.709$). The rate at which EAEC was detected did not differ significantly by age group ($\chi^2=10.865, P=0.054$). EAEC was detected in patients with diarrhea according to marked seasonal trends ($\chi^2=12.819, P<0.05$). EAEC was most often detected in the summer (10.5%, 21/200).

* **【基金项目】** 国家科技重大专项(No. 2008ZX10004-011, 2012ZX10004-220); 国家卫生行业科研专项(No. 201502021); 上海市公共卫生第四轮三年行动计划项目(No. GWIV-29); 国家重点研发计划项目(No. 2016YFC1202000)。

** **【通信作者】** 胡薇, E-mail: huwwyz@163.com;
周晓农, E-mail: ipdzhoun@sh163.net

【作者简介】 张顺先(1982—), 男, 甘肃人, 博士。研究方向: 传染病预防控制。E-mail: zhangshunxian110@163.com

and least often in the winter (2.0 %, 8/394). Watery stool was noted in 26.2 % (16/61) of patients with diarrhea caused by EAEC, and mucus in the stool was noted in 70.5 % (43/61) of patients with diarrhea. Patients with diarrhea due to EAEC tended to vomit ($\chi^2=12.819$, $P<0.05$). **Conclusion** EAEC is one of the main pathogens that causes diarrhea. Surveillance of EAEC must be developed and enhanced, and this will provide a reference for preventing and controlling diarrhea caused by EAEC.

【Key words】 Patient with diarrhea; EAEC; epidemiological characteristics; City of Kunming

腹泻是全球重要的公共卫生问题之一,每年造成约70万<5岁的儿童死亡^[1]。我国每年报告的感染性腹泻病例高达7000万,报告发病率为55.9/1000,其报告发病率在38种法定传染病中位居前三^[2-3],每年可造成约1万名<5岁的儿童死亡^[4]。引起腹泻的病原体多种多样^[5],细菌性病原体及代谢产物是引起腹泻的重要原因之一^[1,3,5],尤其在经济社会发展落后、卫生条件差的国家或地区^[6]。致腹泻性大肠埃希菌(Diarrheagenic *Escherichia coli*, DEC)是引起腹泻的重要细菌性病原体,根据其毒力基因又分为肠黏附性大肠埃希菌(Enteroadhesive *Escherichia coli*, EAEC)、肠产毒性大肠埃希菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)、肠致病性大肠埃希菌(Enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)、肠侵袭性大肠埃希菌(Enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)和肠出血性大肠埃希菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)^[2, 6-8]。EAEC是包括我国在内的很多发展中国家儿童腹泻的主要细菌性病原体之一。我国<5岁的住院腹泻儿童中EAEC的检出率为1.6%^[9]。本研究调查了云南省昆明市腹泻患者EAEC感染的情况,揭示其流行特征,可为当地EAEC的防治提供科学参考。

材料与方法

1 监测点选择

选取云南省第一人民医院、昆明医科大学第一附属医院、昆明市儿童医院和昆明市普吉社区医院作为腹泻综合监测点。

2 研究对象

从上述4家医院的门诊就诊的腹泻和非腹泻人群中选择腹泻病例和非腹泻研究对象。

腹泻病例的纳入标准:2014年7月1日—2015年6月30日期间(按就诊当天计算)在上述4家哨点医院门诊就诊的患者中,选择过去24 h内腹泻次数 ≥ 3 次、粪便形态异常(水样便,血样便,黏液样便和蛋花样便等)、且过去2周内无腹泻症状的病人作为腹泻病例。

非腹泻研究对象纳入标准:2014年7月1日—2015年6月30日期间(按就诊当天计算),在上述医

院门诊就诊的患者中,选取过去24 h内排便次数 < 3 次、粪便形态正常、未患有其他消化道疾病或症状、且过去2周内无腹泻症状者作为非腹泻就诊者。且每个非腹泻病例与其对应的腹泻病例年龄相差不超过4个月,就诊日期相差不超过15 d。排除粪便样品量不足、问卷记录不完整和拒绝参加本研究者。

3 粪便标本的采集

无菌采集符合条件的腹泻病例和非腹泻者粪便标本3 g或3 ml至一次性无菌采样杯中(卡里—布莱尔转运培养基),24 h内转运到云南省疾病预防控制中心实验室。

4 EAEC的检测

取粪便标本接种到改良肉汤培养液增菌6 h,然后接种至麦康凯选择性培养基培养18 h—24 h。挑选10~12个单个菌落,依次加入到盛有100 μ l的1.5 ml无菌水的EP中,且混匀;同时把每一个单个菌落分别接种营养琼脂平板并做标记,37℃培养18 h—24 h。混合液通过热提取法提取细菌核酸(100℃,10 min),12000 g离心5 min,取上清作为DNA模板,然后进行荧光定量PCR检测,前引物和后引物分别为aggR-333f(CAGCGATACATTAAGACGCCTAAAG)和aggR-448r(CGTCAGCATCAGCTACAATTATTC)^[10]。PCR反应体系为:Mixture 10 μ l(SYBR® Premix Ex Taq™ II,宝生物,大连),aggR-333f(10 μ mol)和ggR-448r(10 μ mol)各0.5 μ l,DNA模板1 μ l,ddH₂O 8 μ l。扩增条件为:预变性95℃、30 s;变性95℃、5 s,退火60℃、30 s,循环40次;在退火阶段检测荧光。当混合液模板出现阳性时,把该标本对应的每一个单个菌落分别加到含100 μ l无菌水的1.5 ml EP管中,通过热提取法提取核酸并检测单个菌落是否为EAEC(与上述方法相同)。阳性菌株加入到25%甘油—脑心浸液中,-70℃冷冻保存。

5 数据分析和处理

使用SPSS 19.0软件(SPSS 19.0, USA)进行数据分析。分类资料的构成比、OR值及95%可行区间(CIs)的计算使用 χ^2 检验或Fisher检验法,连续性数据根据数据特征选择t检验、方差分析或秩和检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

6 伦理学

本研究已通过中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所伦理审查委员会评审。

结 果

1 研究对象基本特征

本研究共选取 1 121 例腹泻病例和 319 名非腹泻者。所有研究对象的性别比(男:女)为 1.0(724/716),腹泻病例性别比为 1.0(559/562),而非腹泻者为 1.07(165/154),两组研究对象性别比差异无统计学意义($\chi^2=0.343, P=0.558$)。研究对象中位年龄为 1.3 岁(四分位间距:0.7—24.5),腹泻病例中位年龄为 1.2 岁(四分位间距:0.7—4.8),非腹泻者中位年龄为 4.8 岁(四分位间距:0.8—40.0),腹泻患者年龄小于非腹泻者($\chi^2=20.163, P<0.05$)。来自城区的腹泻患者占腹泻患者总数的 67.2%(753/1 121),农村地区占 17.0%(191/1 121),城乡结合部占 15.8%(177/1 121);来自城区的非腹泻者占非腹泻者总数的 69.9%(223/319),来自城乡结合部占 21.6%(69/319),来自农村地区占 8.5%(27/1 121),差异有统计学意义($\chi^2=17.293, P<0.05$)。

2 感染和未感染腹泻患者 EAEC 基本特征分析

EAEC 阳性腹泻患者年龄与 EAEC 阴性腹泻患者年龄差异无统计学意义($\chi^2=1.832, P>0.05$)(表 1);两组间腹泻次数间差异无统计学意义($\chi^2=0.851, P>0.05$),发热患者百分比差异无统计学意义($\chi^2=1.957, P>0.05$),呕吐发生百分比差异有统计学意义($\chi^2=7.289, P<0.05$);水样便发生百分比差异有统计学意义($\chi^2=9.656, P<0.05$),粘液样便发生百分比差异有统计学意义($\chi^2=12.873, P<0.05$)。

表 1 感染和未感染 EAEC 腹泻患者基本特征比较

Table 1 Comparison of basic information and clinical characteristics between diarrhea cases with and without EAEC infection

特征 Characteristics	EAEC 阳性 n=61 (%) Patients infected with EAEC	EAEC 阴性 n=1060 (%) Patients without infected by EAEC	χ^2	P
年龄(年,中位数)	1.5	1.17	1.832	>0.05
腹泻次数($\geq 3/d$)	6	6	0.851	>0.05
发热($>37.3^\circ\text{C}$)	11 (18.1)	127 (12.0)	1.957	>0.05
呕吐	23 (37.3)	240 (22.6)	7.289	<0.05
脱水	3 (4.9)	61 (5.8)	0.075	>0.05
水样便	16 (26.2)	494 (46.6)	9.656	<0.05
粘液样便	43 (70.5)	497 (46.9)	12.873	<0.05
其他类型粪便	2 (3.3)	61 (5.8)	0.667	>0.05

3 腹泻和非腹泻者中 EAEC 感染情况比较

腹泻患者 EAEC 检出率为 5.4%(61/1121),非腹泻者 EAEC 检出率为 1.3%(4/319),差异有统计学意义($\chi^2=10.104, P<0.05$;OR=4.532,95%CI:1.635—12.560)。其中,<5 岁腹泻者 EAEC 检出率为

4.8%(41/850),<5 岁非腹泻者 EAEC 检出率为 1.2%(2/170),差异有统计学意义($\chi^2=4.666, P<0.05$,OR=4.257;95%CI:1.020—17.771)。>5 岁腹泻患者 EAEC 检出率为 7.4%(20/271),>5 岁非腹泻者 EAEC 检出率为 1.3%(2/149),差异有统计学意义($\chi^2=7.061, P<0.05$;OR=5.867,95%CI:1.350—25.414)。

4 腹泻患者 EAEC 感染分布

4.1 性别分布 女性腹泻患者 EAEC 检出率为 5.7%(32/562),男性患者为 5.2%(29/559),差异无统计学意义($\chi^2=0.140, P>0.05$;OR=0.906,95%CI=0.541—1.519)。

4.2 年龄分布 5~65 岁腹泻患者中 EAEC 检出率为 8.2%(20/224),1~2 岁为 7.1%(19/269),2~5 岁为 3.8%(5/132),0~6 月龄为 2.8%(7/186),6~12 月龄为 3.8%(10/263),>65 岁以上腹泻患者中为 0.0%(0/27),差异有统计学意义($\chi^2=10.865, P<0.05$)。

4.3 季节分布 EAEC 在腹泻患者中有明显的季节分布特征($\chi^2=12.819, P<0.05$),EAEC 在夏季腹泻患者中检出率最高(10.5%,21/200),其次是秋季(9.6%,25/260)、春季(2.6%,7/267),冬季(2.0%,8/394)。

讨 论

EAEC 是暴发性腹泻的主要病原体之一^[11],也是儿童和 HIV 感染者腹泻^[12-13]及旅行者腹泻的重要病原体^[11, 14]。研究表明 1010 CFU 浓度的 042 株 EAEC 可引起人类腹泻,而其他 EAEC 株(17-2,34b 和 JM 221)不能引起人类腹泻^[11, 15-17]。目前不同血清型 EAEC 的毒力和致病机制尚不完全清楚。

本研究显示,昆明地区 EAEC 是引起腹泻的肠道病原体之一,且 EAEC 的检出率无明显年龄分布特征,说明年龄不是影响 EAEC 感染的主要因素,这可能与 EAEC 感染机体之后形成的保护性免疫持续时间不长有关。EAEC 是腹泻患者中感染率较高的病原体之一,这与其他研究的结论相似(6.2%)^[18],Albert 等^[19-20]人的研究显示 EAEC 不是引起腹泻的病原体。本研究中<5 岁腹泻儿童中 EAEC 检出率为 4.8%,这低于 Vu 等^[6]人的研究结果(11.6%),同时 Ali 等^[17]人的研究显示在经济欠发达的国家或地区腹泻儿童中 EAEC 检出率高达 30.0%。本研究发现非腹泻病例 EAEC 检出率为 1.3%,而 Al-Gallas 等^[21]在突尼斯的研究发现非腹泻人群中 EAEC 的携带率可达 15.0%,这表明 EAEC 的携带现象在卫生条件较差的国家或地区较为普遍。

本研究揭示了昆明地区 EAEC 的流行特征,为昆

明地区 EAEC 相关腹泻的预防和控制提供了科学参考。由于 EAEC 可通过食物、水源等方式传播而引起暴发,故在进行腹泻患者病原监测的同时,采用荧光定量的方法,快速检测食品中 EAEC 的感染情况,对保证食品安全及腹泻防控均有重要意义。

【参考文献】

- [1] Walker CL, Rudan I, Liu L, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea[J]. Lancet, 2013, 381(9875): 1405—16.
- [2] 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—22.
- [3] Zhang SX, Zhou YM, Xu W, et al. Impact of co-infections with enteric pathogens on children suffering from acute diarrhea in southwest China[J]. Infect Dis Poverty, 2016, 5(1): 1—13.
- [4] Hao R, Li P, Wang Y, et al. Diversity of pathogens responsible for acute diarrheal disease in China[J]. Clin Infect Dis, 2013, 57(12): 1788—90.
- [5] Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study[J]. Lancet, 2013, 382(9888): 209—22.
- [6] Vu NT, Le Van P, Le Huy C, et al. Etiology and epidemiology of diarrhea in children in Hanoi, Vietnam[J]. Int J Infect Dis, 2006, 10(4): 298—308.
- [7] Tobias J, Kassem E, Rubinstein U, et al. Involvement of main diarrheagenic *Escherichia coli*, with emphasis on enteroaggregative *E. coli*, in severe non-epidemic pediatric diarrhea in a high-income country[J]. BMC Infect Dis, 2015(15): 79.
- [8] Rajendran P, Ajjampur SS, Chidambaram D, et al. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010, 68(2): 117—22.
- [9] Yu J, Jing H, Lai S, et al. Etiology of diarrhea among children under the age five in China: Results from a five-year surveillance [J]. J Infect, 2015, 71(1): 19—27.
- [10] Hidaka A, Hokyo T, Arikawa K, et al. Multiplex real-time PCR for exhaustive detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* [J]. J Appl Microbiol, 2009, 106(2): 410—20.
- [11] Scavia G, Staffolani M, Fisichella S, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(9): 1141—6.
- [12] Okeke IN. Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities[J]. J Infect Dev Ctries, 2009, 3(11): 817—42.
- [13] Hebbelstrup JB, Olsen KE, Struve C, et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli* [J]. Clin Microbiol Rev, 2014, 27(3): 614—30.
- [14] Adachi JA, Jiang ZD, Mathewson JJ, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world[J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(12): 1706—9.
- [15] Gerner-Smidt P, Jensen C, Olsen KE, et al. Diarrheagenic potential of *Escherichia coli* in children in a developed country[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5836—7.
- [16] Okhuysen PC, Dupont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance[J]. J Infect Dis, 2010, 202(4): 503—5.
- [17] Ali MM, Ahmed SF, Klena JD, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility [J]. J Infect Dev Ctries, 2014, 8(5): 589—96.
- [18] Bruijnesteijn Van Coppenraet LE, Dullaert-de Boer M, Ruijs GJ, et al. Case-control comparison of bacterial and protozoan microorganisms associated with gastroenteritis: application of molecular detection[J]. Clin Microbiol Infect, 2015, 21(6): 592.
- [19] Albert MJ, Faruque AS, Faruque SM, et al. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(11): 3458—64.
- [20] Randremanana R, Randrianirina F, Gousseff M, et al. Case-control study of the etiology of infant diarrheal disease in 14 districts in Madagascar[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44533.
- [21] Al-Gallas N, Bahri O, Bouratbeen A, et al. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology[J]. Am J Trop Med Hyg, 2007, 77(3): 571—82.

【收稿日期】 2016-12-20 【修回日期】 2017-02-14