

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2015.06.001

· 论 著 ·

## 2011—2013 年北京某城区感染性腹泻患者致病菌检测分析

白书媛, 刘淑岭, 高波, 胡三梅, 霍哲, 张浩

(北京市西城区疾病预防控制中心, 北京 100053)

**[摘要]** 目的 分析北京某城区 2011—2013 年感染性腹泻患者致病菌分布及脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 图谱特征, 为感染溯源提供依据。方法 收集 2011 年 1 月—2013 年 12 月该区域肠道门诊感染性腹泻患者粪便标本 1 179 份, 对其培养分离的致病菌进行血清分型及 PFGE 分析。结果 1 179 份标本, 共培养肠道病原菌 330 株, 其中检出居前 4 位的肠道致病菌依次为志贺菌属 93 株 (28.18%)、沙门菌属 69 株 (20.91%)、副溶血性弧菌 44 株 (13.33%) 及致泻性大肠埃希菌 11 株 (3.33%)。18 株宋内志贺菌 PFGE 分为 8 个型别, 聚类相似度接近 88%; 69 株沙门菌属细菌分为 18 个血清型, 共 41 种 PFGE 型别, 其中山夫登堡沙门菌和肠炎沙门菌具有明显的优势带型; 23 株副溶血性弧菌 PFGE 型别较为分散。结论 3 年间感染性腹泻患者致病菌的血清型和 PFGE 带型分布较为广泛, 应注意沙门菌属和志贺菌属细菌的 PFGE 优势菌型, 警惕其引发的感染性腹泻暴发流行。

**[关键词]** 感染性腹泻; 肠道致病菌; 志贺菌属; 沙门菌属; 副溶血性弧菌; 致泻性大肠埃希菌; 病原菌; 脉冲场凝胶电泳; 分子流行病学

**[中图分类号]** R181.3<sup>+</sup>2 R442.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)06-0361-05

## Pathogenic detection of infectious diarrhea in patients in a district of Beijing from 2011 to 2013

BAI Shu-yuan, LIU Shu-ling, GAO Bo, HU San-mei, HUO Zhe, ZHANG Hao (Xicheng District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100053, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the distribution and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of pathogenic bacteria causing infectious diarrhea in a district of Beijing from 2011 to 2013, and provide basis for tracing infection sources. **Methods** A total of 1 179 stool specimens of infectious diarrhea from patients in a diarrhea outpatient department from January 2011 to December 2013 were collected, all isolated pathogens were identified by serotyping and PFGE analysis. **Results** 330 enteric pathogens were isolated from 1 179 specimens, the top 4 bacteria were *Shigella spp.* (28.18%,  $n = 93$ ), *Salmonella spp.* (20.91%,  $n = 69$ ), *Vibrio parahaemolyticus* (13.33%,  $n = 44$ ), and diarrheagenic *Escherichia coli* (3.33%,  $n = 11$ ). 18 *Shigella sonnei* isolates were identified as 8 PFGE patterns, clustering similarity was close to 88%; 69 *Salmonella spp.* strains belonged to 18 serotypes and 41 PFGE patterns, *Salmonella senftenberg* and *Salmonella enteritidis* had dominant patterns; no dominant PFGE patterns were obviously identified among 23 strains of *Vibrio parahaemolyticus*. **Conclusion** The serotypes and PFGE patterns of pathogenic bacteria in infectious diarrhea in past three years showed a wide distribution characteristics, the dominant PFGE patterns of *Salmonella spp.* and *Shigella spp.* need to be paid more attention, and outbreak of infectious diarrhea caused by *Salmonella spp.* and *Shigella spp.* should be alerted.

**[Key words]** infectious diarrhea; enteric pathogen; *Shigella spp.*; *Salmonella spp.*; *Vibrio parahaemolyticus*; diarrheagenic *Escherichia coli*; pathogen; pulsed-field gel electrophoresis; molecular epidemiology

[Chin Infect Control, 2015, 14(6):361-365]

[收稿日期] 2015-01-10

[基金项目] 北京市西城区科学计划项目 (2011JH26)

[作者简介] 白书媛 (1978-), 女 (蒙古族), 北京市人, 主管技师, 主要从事临床微生物检验研究。

[通信作者] 刘淑岭 E-mail: liushuling@bjxccdc.cn

感染性腹泻是危害人体健康的重要疾病,是由病原微生物及其产生的毒素或寄生虫引起的以腹泻为主的肠道传染病。由于病原谱构成复杂,感染性腹泻防控难度较大。本研究对 2011—2013 年收集的临床腹泻患者粪便标本培养的菌株进行检测分析,旨在了解本辖区肠道门诊感染性腹泻患者病原谱构成及分子流行病学状况,现将检测分析结果报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 本辖区医院肠道门诊 2011 年 1 月—2013 年 12 月腹泻患者 1 179 份粪便标本分离病原菌 330 株。患者临床表现为 24 h 内连续腹泻 3 次及以上,粪便性状改变(稀便、水样便、黏液便或脓血便等),且均为未服用抗菌药物。

1.2 主要试剂和培养基 XLD、TCBS、TSI 培养基,微量生化管,M-H 琼脂均购自北京陆桥技术有限公司;沙门菌和弧菌显色培养基为法国科玛嘉产品;BPW 增菌液、SC 增菌液、3% NaCl 碱性蛋白胨水、EC 肉汤,均购自青岛海博生物技术有限公司;药敏纸片为英国 OXOID 产品,VITEK GN 鉴定卡为法国生物梅里埃公司产品,志贺菌诊断血清购自兰州生物制品研究所。沙门菌诊断血清(兰州生物制品研究所和泰国 S&A 公司);SeakemGold 琼脂糖(美国 Cambrex Bio Science Rockland);蛋白酶 K(德国 Merck 公司);限制性内切酶 Xba I(美国 New England Biolabs 公司),均在有效期内使用。

1.3 主要仪器 包括全自动细菌鉴定仪 VITEK 2 和浊度仪(法国生物梅里埃公司)、实验用去离子水系统(美国 Millipore 公司)、SW22 型水浴摇床(德国 Julabo 公司)、5415D 型台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司)、凝胶成像系统、脉冲场凝胶电泳仪及配套设备(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 菌株鉴定 采集的粪便标本于 24 h 内,分别接种于增菌液中(BPW 增菌液、SC 增菌液、3% NaCl 碱性蛋白胨水、EC 肉汤),培养 18~24 h 后,转至 XLD、TCBS、TSI 等培养基,进行沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌等多种病原菌的分离、生化鉴定和血清学分型。鉴定方法依据《细菌性和阿米巴性痢疾诊断标准 WS287-2008》和《感染性腹泻诊断标准 WS271-2007》进行诊断。脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型按照 PulseNet 制定的沙门菌脉冲场电泳标准分

型方法进行,沙门菌标准株 H9812 作为分子量标记。

1.5 质控菌株 鼠伤寒沙门菌 ATCC 14208、宋内志贺菌 ATCC 51060 及副溶血性弧菌 ATCC 27519 均由中国药品生物制品检定所提供;大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 均购自卫生部临床检验中心。

1.6 统计学分析 应用 Excel 2003 处理数据,SPSS 17.0 软件进行统计分析,采用  $\chi^2$  检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。用 BioNumerics 软件对电泳图像进行数据分析,得出聚类树状图。聚类图类型根据非加权配对算术平均法(unweighted pair-group method using arithmetic averages,UPGMA)构建,相似率 100% 认定为同一 PFGE 型,<100% 认定为不同的 PFGE 型。

## 2 结果

2.1 病原菌检出情况 共采集感染性腹泻患者粪便标本 1 179 份,检出病原菌 330 株,检出率为 27.99%,其中 20 份粪便标本检出 2 种病原菌。330 株病原菌中肠道致病菌 217 株,居前 4 位的肠道致病菌依次为志贺菌属 93 株(28.18%)、沙门菌属 69 株(20.91%)、副溶血性弧菌 44 株(13.33%)及致泻性大肠埃希菌 11 株(3.33%);其他条件致病菌共 113 株,居前 4 位的依次为弗氏柠檬酸杆菌 21 株(6.36%)、铜绿假单胞菌 17 株(5.15%)、奇异变形杆菌 15 株(4.55%)、类志贺邻单胞菌 8 株(2.42%),见表 1。

表 1 330 株病原菌分布情况

Table 1 Distribution of 330 pathogenic isolates

Bacteria	No. of isolates	Constituent ratio(%)
<i>Shigella spp.</i>	93	28.18
<i>Salmonella spp.</i>	69	20.91
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	44	13.33
<i>Citrobacter freundii</i>	21	6.36
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17	5.15
<i>Proteus mirabilis</i>	15	4.55
diarrheagenic <i>Escherichia coli</i>	11	3.33
<i>Plesiomonas Shigelloides</i>	8	2.42
<i>Aeromonas</i>	5	1.52
<i>Klebsiella pneumonia</i>	5	1.52
Other	42	12.73
Total	330	100.00

## 2.2 流行病学特征

2.2.1 年龄分布 1 179 例患者, 年龄 10~87 岁, 各年龄组病原菌阳性率: 10~岁组为 28.72% (27/94)、20~岁组为 26.13% (110/421)、30~岁组为 27.93% (62/222)、40~岁组为 27.01% (37/137)、50~岁组为 23.78% (39/164)、60~岁组为 28.95% (22/76)、≥70 岁组为 16.92% (11/65), 各年龄组病原菌阳性率相比, 差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 4.39, P > 0.05$ )。

2.2.2 性别分布 病原菌检出阳性率, 男性为 27.32% (153/560), 女性为 25.04% (155/619), 两组比较, 差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.79, P > 0.05$ )。

2.2.3 季节分布 330 株病原菌 1—12 月均有检出, 4—11 月检出率均 > 20%, 8 月检出率最高, 达 42.4%。各月份检出率比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 53.722, P < 0.001$ )。

2.3 致病菌血清型分布 93 株志贺菌属中, 宋内志贺菌 74 株 (占 79.57%), 福氏志贺菌 19 株 (占 20.43%); 69 株沙门菌属中, 分离居前 5 位的分别为山夫登堡沙门菌 (14 株, 20.29%)、肠炎沙门菌 (14 株, 20.29%)、鼠伤寒沙门菌 (11 株, 15.94%)、阿贡纳沙门菌 (5 株, 7.25%) 和印第安纳沙门菌 (5 株, 7.25%); 44 株副溶血性弧菌中, O3 血清群 38 株 (占 86.36%); 11 株致泻性大肠埃希菌中, 产毒性大肠埃希菌 (ETEC) 5 株 (占 45.45%), 致病性大肠埃希菌 (EPEC) 5 株 (占 45.45%), 侵袭性大肠埃希菌 (EIEC) 1 株 (占 9.09%)。

## 2.4 PFGE 结果

2.4.1 志贺菌属 18 株宋内志贺菌 PFGE 分型结果显示: 分为 8 个型别, 聚类相似度接近 88%, 其中 8 株同源性 100%。见图 1。

2.4.2 沙门菌属 69 株沙门菌属细菌 PFGE 分型结果显示: 分为 41 个型别, 其中, 14 株山夫登堡沙门菌中 13 株, 同源性为 100%; 14 株肠炎沙门菌分为 6 个型别, 其中 8 株同源性为 100%; 11 株鼠伤寒沙门菌同源性为 70%~100%, 分为 8 个型别。见图 2。

2.4.3 副溶血弧菌 23 株副溶血性弧菌分为 19 个 PFGE 型, 其中 O3 : K6 型分为 13 个型别, 同源性为 60%~100%。见图 3。

2.4.4 致泻性大肠埃希菌 4 株致泻性大肠埃希菌同源性为 58%~70%。见图 4。

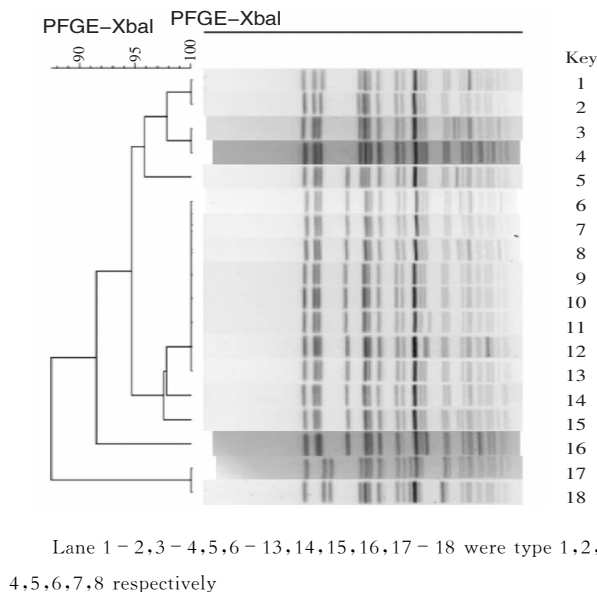
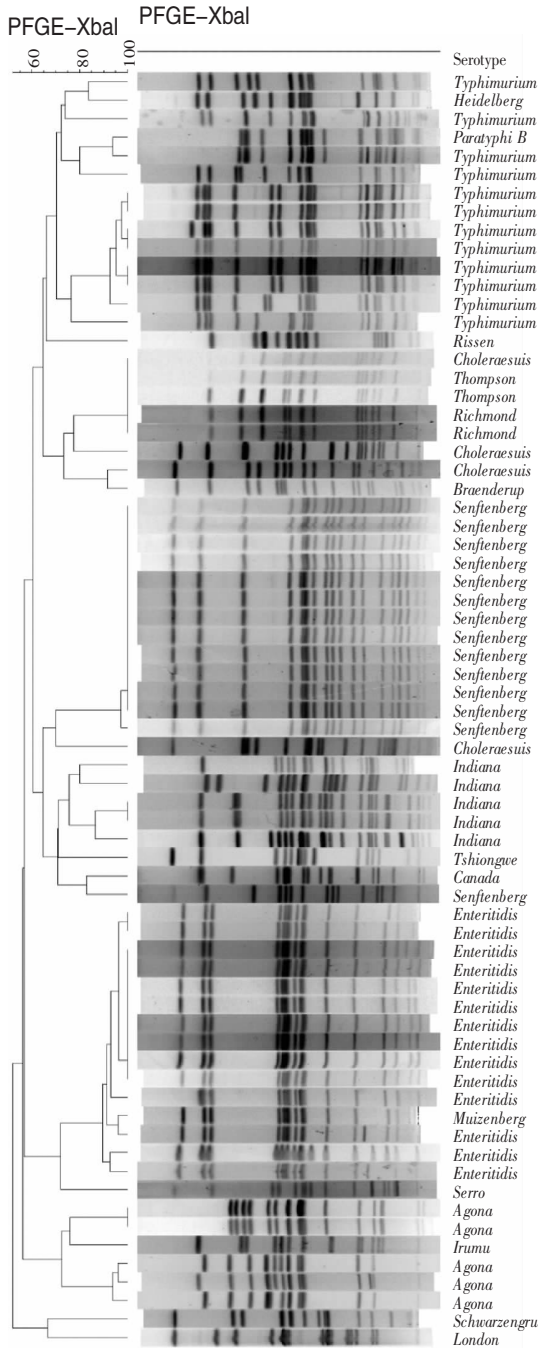


图 1 18 株宋内志贺菌 PFGE 聚类树状图  
Figure 1 Dendrogram of PFGE patterns of 18 *Shigella sonnei* isolates

## 3 讨论

传统的细菌鉴定分型方法如生化反应、血清分型、染色等技术是经典准确的鉴定方法。近年来, 基因分型技术 (如 PFGE、DNA 印迹、随机扩增 DNA 多态性分析等技术) 使细菌鉴定分型, 耐药基因检测和细菌分子流行病学调查变得更加精确、快速, 成为区分感染性菌株与非感染性菌株, 追溯传染源的有效手段<sup>[1]</sup>。现较为公认的同源性分析方法为 PFGE 同源分析<sup>[2]</sup>, 其在判断相同菌株及近似菌属的同源性方面具有不可替代的优势。

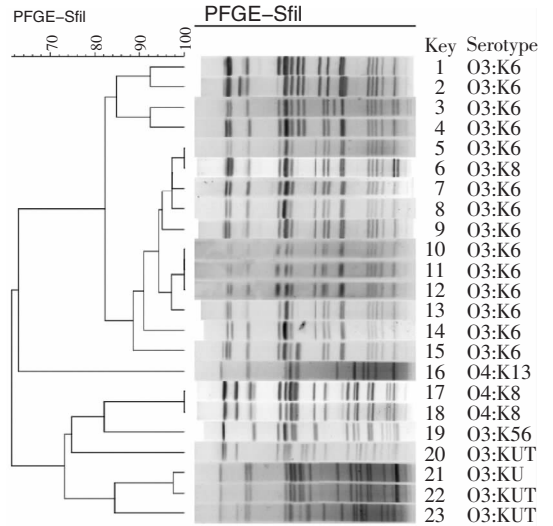
本研究结果显示, 患者人群不同年龄段和性别病原菌检出阳性率, 差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。患者发病具有明显的季节性, 主要集中在春末至夏秋季节, 此段时间温度适合细菌快速繁殖。2011—2013 年采集的 1 179 份粪便标本分离病原菌 330 株, 检出率为 27.99%, 低于陈日炳等<sup>[3]</sup>的数据; 检出较高的依次是志贺菌属 93 株 (占 28.18%)、沙门菌属 69 株 (占 20.91%)、副溶血性弧菌 44 株 (占 13.33%); 志贺菌属中主要血清型为宋内志贺菌, 与董晓根等<sup>[4]</sup>报道一致。值得注意的是在其他病原菌中, 弗氏柠檬酸杆菌、铜绿假单胞菌、奇异变形杆菌、类志贺邻单胞菌、气单胞菌属细菌等所占比例较大。



Typhimurium(鼠伤寒沙门菌)、Heidelberg(海德堡沙门菌)、Paratyphi B(乙型副伤寒沙门菌)、Rissen(里森沙门菌)、Choleraesuis(猪霍乱沙门菌)、Thompson(汤普森沙门菌)、Richmond(里氏满沙门菌)、Braenderup(布伦登普沙门)、Senftenberg(山夫登堡沙门菌)、Indiana(印地安纳沙门菌)、Tshiongwe(茨昂威沙门菌)、Canada(加拿大沙门菌)、Enteritidis(肠炎沙门菌)、Muizenberg(穆察别克沙门菌)、Agona(阿贡纳沙门菌)、Serro(赛罗沙门菌)、Irumu(伊鲁木沙门菌)、Schwarzengru(胥伐成格隆沙门菌)、London(伦敦沙门菌)

图 2 69 株沙门菌属细菌 PFGE 聚类树状图

Figure 2 Dendrogram of PFGE patterns of 69 *Salmonella* spp. isolates



*Vibrio parahaemolyticus* should agglutinate O,K antigen, such as O3 stands for O antigen, is type-3, K 6 stands for K antigen, is type - 6, KUT stand for K antigen and can't agglutinate

图 3 23 株副溶血性弧菌 PFGE 聚类树状图

Figure 3 Dendrogram of PFGE patterns of 23 *Vibrio parahaemolyticus* isolates

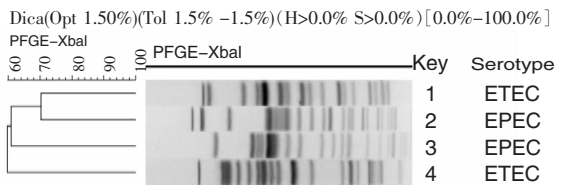


图 4 4 株致泻性大肠埃希菌 PFGE 聚类树状图

Figure 4 Dendrogram of PFGE patterns of 4 diarrheagenic *Escherichia coli* isolates

18 株宋内志贺菌 PFGE 相似性系数 >90%，优势带型为 8 条，占 44.44%，均来自散发病例，无流行病学关联，但其中有 6 株宋内志贺菌分离自 2011 年，提示当年本地区分子流行特征联系比较紧密，应注意有聚集性暴发。69 株沙门菌属细菌分为 18 个血清型，优势菌型同张新等<sup>[5]</sup>报道接近。经过 PFGE 分析，69 株沙门菌属细菌分为 41 种 PFGE 基因图谱，各基因型别的同源性 <60%；14 株山夫登堡沙门菌中，13 株酶切条带系数 100% 相同，说明基因组 DNA 同源性达 100%，为绝对优势带型，此 13 株山夫登堡沙门菌分布在 2011—2012 年，仍可认为是由同一类型的山夫登堡沙门菌引起的感染性腹泻。近年来，本地区山夫登堡沙门菌出现了小范围的集中趋势，应警惕其引发的食物中毒事件<sup>[6]</sup>。因缺乏完整的流行病学病例资料，无法确认 13 例相同型别的散发山夫登堡菌感染腹泻患者是否存在相

同的病因。近两年,为提高食源性致病菌及感染疾病监测能力,尽早对病原菌进行 PFGE 分析,实验室追溯,并及时探索散发病例或集中病例的内在关联<sup>[7-8]</sup>,提高预警能力,有效预防大规模感染性、食源性病例的发生。

副溶血性弧菌的致病性主要来自其耐热性直接溶血素(TDH)和耐热性相关溶血素(TRH),分别由 *tdh* 和 *trh* 基因编码合成,而引起腹泻的副溶血性弧菌主要为 *tdh* + *trh*-菌株<sup>[9]</sup>,临床分离的毒力菌株多携带 *tdh* 基因,致病力较强,开展副溶血弧菌 *tdh*、*trh* 毒力基因的检测,可作为区分产毒株与非产毒株,腹泻感染病原菌或食源性致病菌的筛选手段。

公共卫生领域传染病预防控制及监测中,PFGE 技术是公认的判断细菌同源性的金标准之一,其在临床微生物检测,特别是多重耐药菌或泛耐药菌的耐药监测、耐药基因筛选及医院感染暴发等方面也发挥着重要作用<sup>[10-12]</sup>。

#### [参 考 文 献]

[1] Singh A, Goering RV, Simjee S, et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(3): 512 - 530.

[2] 毛璞,傅威,叶丹,等.两种铜绿假单胞菌同源性分析方法比较[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(3): 161 - 164.

[3] 陈日炳,胡琴,崔海燕,等. 感染性腹泻的流行病学分析及病原学检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(24): 5313 - 5315.

[4] 董晓根,耿荣,赵伟,等. 北京市丰台区 2010—2011 年感染性腹泻致病菌监测分析[J]. 实用预防医学, 2012, 19(6): 887 - 889.

[5] 张新,刘桂荣,黄芳,等. 2008 - 2010 年北京市沙门菌血清型和药物敏感分析[J]. 中国预防医学杂志, 2011, 12(11): 899 - 901.

[6] 黄瑛,张新,曲梅,等. 脉冲场凝胶电泳技术用于两起山夫登堡沙门菌疫情溯源[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(6): 1575 - 1576.

[7] 高波,霍哲,安希龙. 食源性单增李斯特菌监测溯源技术研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(15): 2185 - 2187.

[8] 霍哲,白书媛,高波,等. 一起检出副溶血性弧菌与奇异变形杆菌食物中毒事件的分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(22): 3254 - 3256.

[9] 吴琪,邓志爱,张欣强,等. 散发肠道腹泻病人中副溶血弧菌表型及基因型特征分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(8): 1144 - 1147.

[10] 陈海红,李华茵,何礼贤,等. 耐碳青霉烯类鲍氏不动杆菌的同源性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(3): 421 - 424.

[11] 孙秋,黄文祥,史芳静,等. 临床分离肠杆菌科细菌金属  $\beta$ -内酰胺酶检测[J]. 中国感染控制杂志, 2014, 13(6): 321 - 326, 331.

[12] 毛璞,傅威,杨淳,等. ICU 分离的多重耐药鲍曼不动杆菌 PFGE 分型及 I 型整合子介导的耐药研究[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(6): 417 - 421.

(本文编辑:左双燕)