

• 论 著 •

长沙市食品从业人员致泻大肠埃希菌实时荧光多重 PCR 检测结果分析

文 岚, 朱彩明, 曹珂珂, 黄非凡, 田 斌[△]

(长沙市疾病预防控制中心 410001)

摘要:目的 了解长沙市食品从业人员致泻大肠埃希菌感染、分布及毒力基因携带情况。方法 抽取长沙市 9 个单位 258 例食品从业人员为研究对象, 采用实时荧光多重聚合酶链反应(PCR)检测致泻大肠埃希菌。结果 致泻大肠埃希菌感染率为 15.5%(40/258), 其中肠聚集性大肠埃希菌(EAEC)占 10.9%(28/258), 肠致病性大肠埃希菌(EPEC)占 3.1%(8/258), 肠出血性大肠埃希菌(EHEC)占 1.6%(4/258), 未检出肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC)和肠产毒性大肠埃希菌(ETEC)。28 株 EAEC 携带 uidA 基因 26 株, aggR+pic 基因 13 株, astA 基因 27 株, 携带率分别为 92.9%、46.4%、96.4%; 8 株 EPEC 全部携带 eae 和 uidA 基因; 4 株 EHEC 中 3 株携带 eae 基因, 且都携带 stx1+stx2 基因。结论 建立持续监测致泻大肠埃希菌的机制和深入研究其分子流行病学理论, 除了为监管部门制订和评价公共卫生措施提供基础数据, 对评价食品安全状况, 有效控制传染源、保护人民群众健康具有重要意义。

关键词:致泻大肠埃希菌; 食品从业人员; 实时荧光多重 PCR; 长沙

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)16-2260-03

Analysis on detection results of diarrheogenic *Escherichia coli* among food practitioners in
Changsha City by real time fluorescence multiple PCR

WEN Lan, ZHU Caiming, CAO Keke, HUANG Feifan, TIAN Bin[△]

(Changsha Municipal Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the infection and distribution situations of diarrheogenic *Escherichia coli* among food practitioners in Changsha City and to understand the carrying status of its virulence genes. **Methods** Totally 258 food practitioners from 9 units of Changsha City were extracted as the research subjects. Diarrheogenic *Escherichia coli* was detected by adopting the real time fluorescence multiple PCR. **Results** The infection rate of diarrheogenic *Escherichia coli* was 15.5%(40/258), in which EAEC accounted for 10.9%(28/258), EPEC for 3.1%(8/258) and EHEC for 1.6%(4/258) respectively, EIEC and ETEC were not found. Among 28 strains of EAEC, 26 strains carried uidA gene, 13 strains carried aggR+pic gene and 27 strains carried astA gene, the carrying rates were 92.9%, 46.4% and 96.4% respectively; eight strains of EPEC all carried eae and uidA genes; among 4 strains of EHEC, 3 strains carried eae gene, moreover all 4 strains carried stx1+stx2 gene. **Conclusion** Establishing a mechanism for continuously monitoring diarrheogenic *Escherichia coli* and deeply studying its molecular epidemiologic theory not only provide the essential data for the supervisory departments formulating and evaluating the public health measures, but also has an important significance for evaluating the food safety status, which can effectively control infectious source and protect the people's health.

Key words: diarrheogenic *Escherichia coli*; food practitioner; real time fluorescence multiplex PCR; Changsha

大肠埃希菌(EC)是肠道中较为重要的正常菌群, 能为宿主提供一些具有营养作用的合成代谢物质^[1]。一些血清型的大肠埃希菌获得了致病能力, 可引起肠道内感染, 故称为致泻大肠埃希菌^[2](DEC)。致泻大肠埃希菌是重要的食品安全危害因素, 受到消费者和食品加工企业的广泛关注。

致泻大肠埃希菌引起的腹泻是全球许多国家重要的公共卫生问题^[3]。通常分为 6 个群: 肠致病性大肠埃希菌(EPEC)、肠产毒性大肠埃希菌(ETEC)、肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC)、肠出血性大肠埃希菌(EHEC)、肠聚集性大肠埃希菌(EAEC)和扩散黏附大肠埃希菌(DAEC)等。搜索万方、维普和中国知网等数据库发现关于长沙市致泻大肠埃希菌的报道较少, 关于长沙市食品从业人员致泻大肠埃希菌的文献更为鲜见。为了解长沙市食品从业人员致泻大肠埃希菌感染、分布及毒力基因携带情况, 本研究采用实时荧光多重聚合酶链反应(PCR)检测食品从业人员肛门拭子, 分离培养标本, 并对结果进行分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 用整体抽样的方法于 2015 年 5~10 月抽取长沙市 9 个单位食品从业人员为研究对象, 共 258 例。其中供职卫生等级为 A 级餐饮单位的从业人员 203 例, 占 78.7%, 其余 55 例供职于卫生等级为 B 级的餐饮单位。工作单位性质为大学食堂、大型餐馆和中型餐馆的分别为 55、186 例和 17 例, 分别占调查人数的 21.3%、72.1%和 6.6%。从业人员的工种涉及厨师、服务员、切菜、切配菜工、洗菜工、蒸饭及其他。年龄 16~60 岁, 平均(35.23±12.06)岁; 工龄 20 d 至 35 年, 平均(7.73±8.26)年。性别、文化程度和民族信息见表 1。

1.2 试剂与仪器 荧光多重 PCR 检测采用北京卓诚惠生生物科技有限公司生产的 5 种致泻性大肠埃希菌实时荧光多重 PCR 检测试剂盒(适用 Roche 480 II)。仪器为 Roche 480 II。

1.3 方法 每例研究对象采集 1 份肛门拭子于卡-布(Cary-Blair)运送培养基内, 至实验室后立即接种于 1 块麦康凯

(MAC)琼脂平板,(36±1)℃培养 24 h,挑取 5 个大肠埃希菌可疑菌落(粉红色或红色,光滑、不透明、突起、湿润)分别接种营养琼脂,置于(36±1)℃培养 24 h,刮取营养琼脂平板上的新鲜培养物,进行实时荧光多重 PCR 检测。

表 1 研究对象一般信息					
项目	<i>n</i>	构成比(%)	项目	<i>n</i>	构成比(%)
性别			职专	8	3.1
男	153	59.3	初中	83	32.2
女	105	40.7	小学	9	3.5
文化程度			文盲	4	1.6
本科及以上	4	1.6	民族		
专科	33	12.8	汉	248	96.1
中专和中技	34	13.2	其他	10	3.9
高中	83	32.2			

1.4 统计学处理 数据使用 SPSS 18.0 统计软件分析。计数资料采用数量和百分比描述,行列表的统计采用 Fisher 精确检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实时荧光多重 PCR 检测结果 研究对象 258 例中检出致泻大肠埃希菌 40 例,感染率为 15.5%(40/258)。其中 EAEC 28 例(10.9%,28/258),EPEC 8 例(3.1%,8/258),EHEC 4 例(1.6%,4/258),未检出 EIEC 和 ETEC。未发现同一研究对象检出一种以上致泻大肠埃希菌的现象,40 例致泻大肠埃希菌中构成比最高的是 EAEC,占 70%(28/40),EPEC 和 EHEC 分别占 20%(8/40)和 20%(4/40)。致泻大肠埃希菌阳性结果在不同卫生等级、单位性质和工种中的分布见表 2 和表 3。

另外,统计结果还显示致泻大肠埃希菌阳性结果在不同性别间的差异无统计学意义,Fisher 精确检验 $P=0.754$ (95% CI :0.745~0.762)。致泻大肠埃希菌阳性结果各年龄均有,从 17~55 岁,无聚集倾向,Fisher 精确检验 $P=0.956$ (95% CI :0.952~0.960);与工龄长短亦无明显相关,工龄跨度从 1 个月到 26 年,也无聚集性倾向,Fisher 精确检验 $P=0.236$ (95%

CI :0.228~245)。

表 2 不同卫生等级和单位性质研究对象实时荧光多重 PCR 检测结果[<i>n</i> (%)]					
分类依据	类别	未检出	EAEC	EPEC	EHEC
卫生等级	A	165(81.3)	26(12.8)	8(3.9)	4(2.0)
	B	53(96.4)	2(3.6)	0(0.0)	0(0.0)
单位性质	大学食堂	53(96.4)	2(3.6)	0(0.0)	0(0.0)
	大型餐馆	151(81.2)	25(13.4)	7(3.8)	3(1.6)
	中型餐馆	14(82.4)	1(5.9)	1(5.9)	1(5.9)
合计		218(84.5)	28(10.9)	8(3.1)	4(1.6)

注:1.卫生等级为 A、B 两组检测结果经 Fisher 精确检验 $P=0.056$ (95% CI :0.051~0.060);2.大学食堂、大型餐馆和中型餐馆检测结果经 Fisher 精确检验 $P=0.064$ (95% CI :0.059~0.068)。

表 3 不同工种研究对象实时荧光多重 PCR 检测结果[<i>n</i> (%)]				
工种	未检出	EAEC	EPEC	EHEC
厨师	99(83.9)	14(11.9)	4(3.4)	1(0.8)
服务员	55(84.6)	5(7.7)	2(3.1)	3(4.6)
切菜	30(93.8)	2(6.3)	0(0.0)	0(0.0)
切配菜工	10(71.4)	2(14.3)	2(14.3)	0(0.0)
洗菜工	16(76.2)	5(23.8)	0(0.0)	0(0.0)
蒸饭	5(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
其他	3(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
合计	218(84.5)	28(10.9)	8(3.1)	4(1.6)

注:不同工种检测结果经 Fisher 精确检验 $P=0.455$ (95% CI :0.445~0.465)。

2.2 40 株致泻大肠埃希菌毒力基因携带情况 28 株 EAEC 携带 uidA 基因 26 株,aggR+pic 基因 13 株,astA27 株,携带率分别为 92.9%、46.4%、96.4%;8 株 EPEC 全部携带 eae 和 uidA 基因;4 株 EHEC 中 3 株携带 eae 基因,且都携带 stx1+stx2 基因。见表 4。

表 4 40 株致泻大肠埃希菌毒力基因携带情况 (n)																
分类	eae		stx1+stx2		ipaH		est I		elt		uidA		aggR+pic		astA	
	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
EAEC	28	0	28	0	28	0	28	0	28	0	2	26	15	13	1	27
EPEC	0	8	8	0	8	0	8	0	8	0	0	8	8	0	8	0
EHEC	1	3	0	4	4	0	4	0	4	0	0	4	4	0	4	0
合计	29	11	36	4	40	0	40	0	40	0	2	38	27	13	13	27

注:十表示阳性,一表示阴性。

3 讨 论

致泻大肠埃希菌是许多国家和地区细菌性腹泻的常见病原菌,占腹泻病原菌的 40.3%左右^[4],监测中发现急性腹泻标本中致泻大肠埃希菌的检出率约为 7.19%^[5],也有报道成人腹泻标本检出率为 8.24%^[6],并且发现小于 1 岁的儿童中占有较大比重。致泻大肠埃希菌在细菌性食物中毒中扮演重要

角色^[7-9],因此对致泻大肠埃希菌监测是非常重要的工作。本文结果显示长沙市食品从业人员致泻大肠埃希菌阳性检出率为 15.5%,种群包括 EAEC、EPEC 和 EHEC,以 EAEC 为主,EPEC 和 EHEC 次之,未发现 EIEC 和 ETEC。邓艳华^[10]报道,采用分子生物学的方法监测食品从业人员致泻大肠埃希菌的感染率为 6.49%,检出了 EIEC 和 EPEC,且以

EIEC 为主。陈冲等^[5]报道结果显示 EPEC 和 EAEC 为主，EPEC 感染率高于 EAEC。与上述研究相比较长沙市致泻大肠埃希菌感染率和种群分布都不同。

研究检测出的致泻大肠埃希菌在单位性质、卫生等级和不同工种的分布差异无统计学意义($P>0.05$)。另外年龄和工龄因素对食品从业人员致泻大肠埃希菌感染亦无影响。这与其他研究人员的研究结果基本一致^[10-12]，这可能与调查人群基本属于机体免疫力较强的中年和壮年人群有关。

致泻大肠埃希菌的致病性和分类与其质粒携带的毒力基因的转移和溶源性噬菌体的序列整合密切相关。本研究检测出的阳性菌株所携带的毒力基因情况如下：28 株 EAEC 携带 uidA 基因 26 株，aggR+pic 基因 13 株，astA 基因 27 株，携带率分别为 92.9%、46.4%、96.4%；8 株 EPEC 全部携带 eae 和 uidA 基因；4 株 EHEC 中 3 株携带 eae 基因，且都携带 stx1+stx2 基因。说明长沙市食品从业人员所感染致泻大肠埃希菌毒力基因中 uidA、astA、aggR+pic 较为常见，eae 和 stx1+stx2 亦有发现。

因此，建立持续监测致泻大肠埃希菌的机制和深入研究其分子流行病学理论，除了为监管部门制订和评价公共卫生措施提供基础数据，对评价食品安全状况，有效控制传染源、保护人民群众健康也具有重要意义。

参考文献

[1] Hazen TH, Sahl JW, Redman JC, et al. Draft genome sequences of the diarrheagenic Escherichia coli collection [J]. J Bacteriol, 2012, 194(11):3026-3027.

[2] Lozer DM, Souza TB, Monfardini MV, et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic Escherichia coli strains isolated from Brazilian children living in low socio-

economic level communities [J]. BMC Infect Dis, 2013, 13:418-512.

[3] 孔海深. 致泻大肠埃希菌的分子分型和流行病学研究 [D]. 杭州:浙江大学, 2011.

[4] 王勇. 感染性腹泻预防控制对策与实验室监测的研究 [D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2007.

[5] 陈冲, 夏胜利, 赵嘉咏, 等. 2010~2012 年河南省致泻大肠埃希菌监测 [J]. 预防医学情报杂志, 2014, 30(11):964-968.

[6] 杨劲松, 李玉燕, 廖慧, 等. 2010~2012 年福建省致泻性大肠杆菌监测结果分析 [J]. 预防医学论坛, 2014, 20(3):161-162.

[7] 宋联元, 邱新村, 陆平. 细菌性食源性疾病实验诊断及危害因素分析 [J]. 疾病监测与控制, 2011, 5(7):441-442.

[8] 甘莉萍, 刘渠, 陈应坚, 等. 细菌性食物中毒的病原学分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(10):1255-1256.

[9] 刘巧突, 谭徽, 莫求明, 等. 湖南省首次发现肠集聚性大肠杆菌 [J]. 实用预防医学, 2000, 7(2):93-95.

[10] 邓艳华. 食品和公共场所从业人员致泻性大肠埃希菌携带情况分析 [J]. 实验与检验医学, 2015, 33(2):161-162.

[11] 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.

[12] 刘伟, 王菊光, 谢利军, 等. 2009-2012 年北京市海淀区细菌性食物中毒检测结果分析 [J]. 预防医学情报杂志, 2014, 30(10):857-860.

(收稿日期:2016-01-20 修回日期:2016-06-07)

(上接第 2259 页)

性缺血性肠病方面具有相对较高的灵敏度和特异度，具备良好的临床应用价值，可作为确诊缺血性肠病的辅助考察指标之一。

参考文献

[1] 张义雄, 刘智龄, 宋偲婷, 等. 凝血酶-抗凝血酶复合物及肠脂肪酸结合蛋白检测在早期诊断肠系膜上动脉栓塞的实验研究 [J]. 临床急诊杂志, 2015, 15(3):208-212.

[2] 朱继文, 戴宝平, 朱小波. hs-CRP、D-二聚体和 cTnI 检测在急性冠状动脉综合征早期诊断中的意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 30(20):2971-2972.

[3] 谢宁, 代军, 欧阳春晖, 等. 缺血性结肠炎 27 例临床分析及文献复习 [J]. 中国内镜杂志, 2011, 17(10):1047-1052.

[4] 周洪美, 金伟, 栾春艳, 等. 血浆 D-二聚体测定对急性缺血性结肠炎的早期诊断价值 [J]. 中国全科医学, 2011, 14(32):3719-3720.

[5] 汤义林. 评价血浆 D-二聚体水平在急性缺血性结肠炎病

人早期诊断价值 [J]. 医学理论与实践, 2013, 26(23):3180-3181.

[6] 李大健, 侯凤雪, 范宏叶. 缺血性结肠炎临床特点分析 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2014, 23(1):78-80.

[7] 周正端, 薛龙. 房颤伴缺血性肠病患者血 α -GST、CRP、D-二聚体相关性 [J]. 心血管病防治知识(学术版), 2014, 3(1):76-77.

[8] 刘玉峰, 范辉, 徐伟松, 等. 血清 D-二聚体、肌酸磷酸激酶浓度对缺血性结肠炎病变严重程度的判断价值 [J]. 中国现代医药杂志, 2014, 6(6):71-72.

[9] 靳颖, 潘澍潇, 陈立辉, 等. 血浆纤维蛋白原和 D-二聚体水平与进展性卒中关系的研究 [J]. 中国药物经济学, 2013, 6(6):302-304.

[10] 童明富, 蔡长春, 王细金, 等. 31 例缺血性肠病的临床特点分析及 D-二聚体在其诊断中的价值 [J]. 南昌大学学报(医学版), 2014, 54(8):47-49.

(收稿日期:2016-03-22 修回日期:2016-06-05)