

2015-2016 年南京地区儿童感染性腹泻病原学监测结果分析

江晓, 杜雪飞, 叶艳华, 金萍, 王炜, 丁洁, 姜云

南京市疾病预防控制中心, 江苏 南京 210003

摘要: **目的** 监测分析 2015-2016 年南京地区儿童腹泻主要病原体, 为该地区儿童腹泻病原的快速诊断与防治提供依据。**方法** 收集 2015-2016 年在南京市儿童医院感染消化科就诊的典型腹泻患儿粪便标本(或肛拭子)300 例, 对易导致儿童腹泻的最常见的 8 种病原菌(沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌、5 种肠致泻性大肠埃希菌)进行病原菌分离、鉴定, 同时采用荧光定量 PCR 方法对易导致儿童腹泻的 5 种肠道病毒(诺如病毒、札如病毒、轮状病毒、星状病毒、腺状病毒)进行检测分析。**结果** 在 300 例腹泻患儿粪便标本中, 病原菌的总检出率为 17%, 其中肠致泻性大肠埃希菌检出率为 10%, 志贺菌属检出率为 0.03%, 沙门菌属检出率为 6.7%; 副溶血性弧菌未检出; 病毒总检出率为 9%, 其中诺如病毒检出率为 4.7%, 札如病毒 2.3%, 轮状病毒 0.33%, 星状病毒 0.33%, 腺状病毒 1.33%。2015 和 2016 年间病原体总检出率、病原菌检出率、病毒检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 2015-2016 年南京地区引起儿童腹泻的主要肠道病原菌以致腹泻型大肠杆菌属为主; 其次为沙门菌属, 肠道病毒以诺如病毒为主, 其次为札如病毒。

关键词: 感染性腹泻; 病原体; 儿童

中图分类号: R378.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2018)12-1508-03 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2018.12.029

感染性腹泻病是由细菌、病毒、寄生虫等病原微生物引起的以腹泻为主要临床症状的常见病, 严重的还会继发脱水、休克、溶血性尿毒综合征等^[1-2], 在发展中国家, 每年约 200 万儿童死于腹泻, 约 20% 的死亡患儿年龄小于 5 岁, 对人类和社会的发展造成了巨大的损失^[3-4]。为了解南京市儿童(0~14 岁)感染性腹泻病原谱的构成和特点, 选取了本市有代表性的三甲儿童医院, 采集了 2015-2016 年儿童腹泻患者的粪便标本进行了感染性腹泻的病原学监测, 通过对儿童腹泻病原谱的掌握, 为感染性腹泻儿童的预防控制工作提供病原学依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 依据《2015 江苏省食源性疾病预防工作手册》及《2016 江苏省食源性疾病预防工作手册》选择本市有代表性的三甲儿童医院(南京市儿童医院腹泻门诊)作为儿童腹泻监测哨点医院。监测时间为全年, 重点是每年的 4 月 1 日-10 月 30 日。监测点每年采集至少 150 份门诊腹泻病例(每日排便 3 次或以上, 且大便性状有改变呈稀便、水样便、粘液便或脓血便)急性期(发病 3 d 内)的大便、肛拭子或呕吐

物标本进行 8 种病原菌和 5 种病毒检测。8 种病原菌包括沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌、肠致泻性大肠埃希菌包括 EPEC(肠致病性大肠埃希菌)、ETEC(肠产毒性大肠埃希菌)、EIEC(肠侵袭性大肠埃希菌)、EHEC(肠出血性大肠埃希菌)和 EAEC(肠粘附性大肠埃希菌); 5 种病毒、札如病毒、轮状病毒、星状病毒、腺状病毒检测。

1.2 细菌鉴定 采集的新鲜粪便(或肛拭子)标本根据临床诊断结果于 24 h 内接种于相应的分离培养基或增菌液进行进一步分离鉴定。

1.2.1 细菌分离 沙门菌: 取样品适量置于 SBG 增菌液 36 ℃ 培养 24 h 进行沙门菌增菌, 增菌后划线 CHROMagar(科玛嘉)沙门显色平板和 XLD 平板分离, 37 ℃ 培养 18~24 h 观察。挑取沙门显色平板上紫红色圆形光滑菌落和 XLD 平板上圆形光滑黑心可疑单菌落做进一步鉴定。志贺菌: 样本直接划线 XLD 平板, 37 ℃ 培养 18~24 h 观察, 挑取无色, 半透明圆形, 光滑可疑单菌落做进一步鉴定。副溶血性弧菌: 样本采用 3% NaCl 增菌液 37 ℃ 培养 18~24 h 划线 CHROMagar 弧菌显色平板, 挑取紫红色圆形光滑可疑单菌落分别接种营养平板纯培养 36.5 ℃ 24 h 后进一步鉴定。肠致泻性大肠埃希菌: 样本直接划线 CHROMagar 大肠埃希菌显色平板, 挑取蓝绿色圆形光滑半透明可疑单菌落 3~5 个分别穿刺克氏双糖, 可疑菌落接种营养平板 37 ℃ 24 h 后采用荧光 PCR 进行单

基金项目: 江苏省卫生厅预防医学基金科研课题(Y2012043)

作者简介: 江晓(1968-), 女, 硕士, 主任技师, 主要从事食源性病原微生物检测及相关性研究工作。

通信作者: 叶艳华, E-mail: 58773010@qq.com。

菌落鉴定。

1.2.2 细菌生化鉴定 菌悬液制备分别来自可疑菌落在营养平板上纯培养物革兰染色镜检结果均为革兰阴性短小杆菌,取培养物与 0.85%NaCl 配成 0.5 麦氏单位菌悬液填充 ATBID32E 细菌生化鉴定卡,用全自动细菌鉴定药敏分析仪检测鉴定。

1.3 病毒检测

1.3.1 病毒总核酸的提取 取绿豆大小的粪便或 50~100 μl 水样便,加生理盐水 500 μl 制成 10%~20% 的悬液,8 000 g 离心 5 min,取 200 μl 上清液,用达安公司生产的诺如病毒、札如病毒、轮状病毒、星状病毒、腺状病毒荧光 PCR 试剂盒中的核酸提取试剂提取核酸。按说明进行操作,提取的病毒核酸置-80 ℃ 保存备用。

1.3.2 RT-PCR 检测 使用达安生物工程有限公司生产的诺如病毒、札如病毒、轮状病毒、星状病毒、腺状病毒实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒进行核酸检测。试剂配制及荧光 RT-PCR 反应条件参见试剂盒说明书。检测仪器为 ABI 7500 Real-Time PCR System。

1.4 统计学分析 所有数据运用 SPSS 17.0 对数据进行统计分析。计数资料采用频数和率进行统计描述,组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 2015-2016 年儿童病原体总检出率结果比较 2015-2016 年共收集粪便标本(或肛拭子)300 份,病原体的总检出率 26.0%,其中病原菌的检出率为 17.0%,病毒核酸检出率为 9.0%。2015 和 2016 年间病原体总检出率、病原菌检出率、病毒检出率差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 2015-2016 年南京市儿童医院儿童腹泻病原体检出结果比较(n,%)

年份	例数	总检出	病原菌检出	病毒检出
2015	150	43(28.7)	31(20.7)	12(8.0)
2016	150	35(23.3)	20(13.3)	15(10.0)
合计	300	78(26.0)	51(17.0)	27(9.0)
χ^2 值		1.109	2.858	0.366
P 值		0.292	0.091	0.545

2.2 2015-2016 年儿童腹泻样本中几种主要种病原和病毒检出率结果比较 见表 2。2015 年和 2016 年各细菌和病毒检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 2015-2016 年南京市儿童医院儿童腹泻主要病原体检出结果比较(n,%)

年份	总份数	沙门菌	志贺菌	副溶血性弧菌	肠致泻性大肠埃希菌(5 种)	轮状病毒	诺如病毒	星状病毒	腺状病毒	札如病毒
2015	150	11(7.3)	1(0.7)	0(0.0)	19(12.7)	0(0.0)	8(5.3)	1(0.7)	3(2.0)	3(2.0)
2016	150	9(6.0)	0(0.0)	0(0.0)	10(6.7)	1(0.7)	6(4.0)	0(0.0)	1(0.7)	4(2.7)
合计	300	20(6.7)	1(0.33)	0(0.0)	29(9.7)	1(0.33)	14(4.7)	1(0.33)	4(1.3)	7(2.3)
χ^2 值		0.214	1.003		3.092	1.003	0.300	1.003	1.014	0.146
P 值		0.643	0.317		0.079	0.317	0.584	0.317	0.314	0.702

3 讨论

腹泻病是全球性公共卫生问题之一,仅次于呼吸道感染,是影响儿童健康第二大杀手。全球每年约有 30~50 亿腹泻患者,尤其是感染性腹泻病,在发展中国家,每年约 200 万儿童死于腹泻,约 20% 的死亡患儿年龄小于 5 岁,对人类和社会的发展造成了巨大的损失^[3,5]。据以往文献报道,发生在夏秋季节的儿童、青少年感染性腹泻最常见的病原菌以致泻型大肠杆菌、志贺菌、沙门菌最为常见^[6-7],病毒则以诺如病毒和轮状病毒的检出居多。因此,开展儿童腹泻的病原学研究具有重要的临床及流行病学意义。为了解南京地区

近两年儿童腹泻致病菌和病毒感染情况及菌谱变化,本研究对 2015-2016 年就诊于儿童医院感染消化科的部分腹泻患儿进行了腹泻病原感染情况调查及腹泻病原菌分离鉴定,以探讨本地区近两年儿童腹泻的主要病原体,为本地区儿童腹泻病原的快速诊断与防治提供根据。

本研究结果显示,2015-2016 年南京市引起儿童感染性腹泻病原体以细菌居多(17%),其次为病毒(9%)。而细菌中肠致泻性大肠埃希菌的检出率位居第一(10%),沙门菌位居第二(6.7%)。病毒的检出以诺如病毒位居第一(4.7%),其次为札如病毒(2.3%)。

以往文献报道志贺菌是引起儿童腹泻主要致病菌^[8], 轮状病毒是引起儿童腹泻首要腹泻病毒^[9-10], 但本研究显示致泻性大肠埃希菌是近两年南京市引起儿童腹泻的主要致病菌, 其次是沙门菌; 而腹泻病毒则是诺如病毒位居第一, 和以往文献报道的监测结果不一致。表明 2015-2016 年南京地区儿童腹泻病原体图谱发生了明显变化, 特别是致泻性大肠埃希菌中的肠粘附性大肠埃希菌(EAEC)占比最大, 而 EAEC 被发现与发展中国家儿童腹泻密切相关。

值得一提的是可能由于轮状疫苗的推广使用, 根据文献报道诺如病毒正逐步取代轮状病毒成为最重要的非细菌性食源性腹泻病毒趋势, 近年来报道关于诺如病毒引发的多起暴发疫情: 2015 年 1 月发生在广东某市的 8 起感染性腹泻的调查和分析, 所有样本均未检出食物中毒常规致病菌, 但检出了诺如病毒和轮状病毒^[11]; 2010 年 12 月南京某幼儿园先后出现呕吐症状的 3 例患者, 对其呕吐物进行病原学检测, 包括细菌的常规分离培养及病毒的荧光定量 PCR 检测和测序分析, 细菌分离鉴定未发现致病菌, 而病毒学检测, 3 例均为诺如病毒核酸阳性, 经测序分析为 G II.4 亚型, 确定为病毒感染所致^[12]; 2013 年 11 月南京市某高校发生了一起急性胃肠炎疫情, 经对疫情标本病原体检测分析, 也确认其病原体为诺如病毒核酸阳性, 从而排除了细菌性食物中毒^[13]。2013 年湖南省株洲市^[14]、2014 年上海市金山区^[15]、湖南省新晃县^[16]也报告了诺如病毒感染性腹泻疫情。本文近两年对南京市临床样本的检测分析也发现, 诺如病毒引起的腹泻已经成为南京市儿童病毒感染性腹泻最主要的病因之一, 针对上述特点, 一方面将继续做好样本的采集和监测工作, 及时掌握和预测幼儿呕吐首诊的变化特点, 做到及时发现, 及时控制。另一方面, 由于病毒性感染无特殊治疗方法, 加强病毒病预防相关知识的宣传和教育就显得更为重要了。

目前对儿童腹泻病原菌的分离鉴定主要采用分离培养法, 即经标本增菌、分离培养、生化鉴定及血清分型等一系列步骤才可确定病原菌型别。其中由于致泻大肠埃希菌的分离由于有五种, 即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 和肠粘附性大肠埃希菌 EAEC, 它们在分离平板和初步生化上无明显差异, 血清凝集还有交叉, 因此根据江苏省食源性疾病监测工作手册, 进一步的分离通过生化初筛后对可疑单菌落进行 PCR 鉴定检测其毒力基因再结合生化鉴定

结果而最终确认。

感染性腹泻是当今全球性重要公共卫生问题, 近年来多国出现的以腹泻为主要症状的暴发疫情引起各国的重视。感染性腹泻的传播因素复杂, 本地区不同人群的感染性腹泻的发生有一定的规律性和季节性, 可根据本地区近年的特点制定相应的防控措施, 此外仍然需要进一步完善实验室监测系统, 进行长期有效的监测, 才能有效的控制暴发流行, 保障人民群众的生命安全。

参考文献

- [1] Soli KW, Maure T, Kas MP, et al. Detection of enteric viral and bacterial pathogens associated with paediatric diarrhoea in Goroka, Papua New Guinea[J]. Int J Infect Dis, 2014, 2014(27): 54-58.
- [2] 雷雷, 荏静, 余光清, 等. 2012-2014 年深圳市宝安区成人和儿童感染性腹泻病原学分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(8): 934-937.
- [3] Grimwood K, Forbes DA. Acute and persistent diarrhea[J]. Pediatr Clin North Am, 2009, 56(6): 1343-1361.
- [4] 李少丽, 钟雪梅, 冯燕玲, 等. 2011 年夏季北京地区儿童腹泻病原菌监测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(4): 432-434.
- [5] Grimwood K, Forbes DA. Acute and persistent diarrhea[J]. Pediatr Clin North Am, 2009, 56(6): 1343-1361.
- [6] 靳晓红, 马凤龙, 戚金荣, 等. 2014 年济南市医院感染性腹泻常见病原菌检测与分析[J]. 实用预防医学, 2017, 24(1): 65-67.
- [7] Nunes MDRCM, Magalhes PP, Macêdo ADS, et al. Attaching and effacing *Escherichia coli* Shiga toxin-producing *E. coli* in children with acute diarrhea and controls In Teresina, Brazil[J]. Trans, 2012, 20(1): 43-47.
- [8] 焦明远, 李家伟, 黄卫华. 青少年儿童腹泻病原学分析及耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(15): 3805-3807.
- [9] 林谦, 金玉, 周进苏, 等. 2009-2010 年南京儿童医院 5 岁以下儿童病毒性腹泻分子流行病学特点[J]. 中国循证儿科杂志, 2012, 7(1): 31-36.
- [10] Nurminen K, Blazevic V, Huhti L, et al. Prevalence of norovirus G II-4 antibodies in Finnish children[J]. Med Nieml, 2011, 83(3): 525-537.
- [11] 汪海波, 王琪, 涂承宁, 等. 广东某市暴发的 8 起感染性腹泻调查分析[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2015, 38(5): 348-351.
- [12] 张洪英, 祁贤, 华玲慧. 等. 导致幼儿呕吐的病原学检测[J]. 现代预防医学, 2013, 40(6): 1128-1133.
- [13] 王璇, 石利民, 张洪英, 等. 南京市诺如病毒 G II.4/Sydney 变异株感染疫情的病原学研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(24): 3501-3504.
- [14] 龙奇志, 陈湘, 张平芳, 等. 一起学校诺如病毒感染性腹泻暴发疫情的调查[J]. 实用预防医学, 2016, 23(12): 1486-1488.
- [15] 宋灿磊, 刘天, 杜荐如, 等. 金山区某学校一起诺如病毒感染性腹泻疫情流行病学调查[J]. 实用预防医学, 2017, 24(4): 429-432.
- [16] 吴红杏, 蒲祖伟, 姚正才, 等. 一起因饮水污染所致的学校诺如病毒感染性腹泻暴发调查[J]. 实用预防医学, 2016, 23(8): 977-979.