

六安地区小肠结肠炎耶尔森菌分型分布和特征分析

高大维¹, 张 凤¹, 陈智超¹, 常宏伟¹, 张丽梅¹, 陈蓓蕾¹, 段 然²

摘要:目的 通过对2018年度六安市小肠结肠炎耶尔森菌在腹泻患者、家禽家畜、苍蝇和冷冻冷藏食品检出的情况,了解小肠结肠炎耶尔森在该地区分布特征,为防治提供科学依据。方法 对采集的样本进行分离培养、生化、血清鉴定和分子生物学检测。结果 2018年共采集各类样本617份,检出小肠结肠炎耶尔森菌38株,检出率为6.16%,10类样本中有8类检出该菌,猪的粪便检出率最高为25%;其次为阳性病例对照样本,检出率为11.76%(38/617);鸡粪的检出率(5/60)和狗粪的检出率(1/12)均为8.33%。致病性小肠结肠炎耶尔森的血清学均为O:3型且基因分布均为*ail+*、*ystA+*、*yadA+*、*virF+*、*ystB-*,只有猪粪检出。首次在小肠结肠炎耶尔森菌患者家冰箱内壁和饲养家猪中检出小肠结肠炎耶尔森菌;PFGE分子分型显示腹泻患者之间菌株和宿主动物猪的菌株的相似度均为100%。结论 六安市小肠结肠炎耶尔森菌分布特点为:猪为该市小肠结肠炎耶尔森菌主要带菌者,感染率最高且均为致病性小肠结肠炎耶尔森菌;其它家畜、苍蝇以及冷藏食品也普遍存。更值得注意的是首次在小肠结肠炎耶尔森菌患者家冰箱内壁和饲养家猪中检出小肠结肠炎耶尔森菌,提示家庭环境和家畜为其感染高危因素值得高度重视,也为小肠耶尔森菌患者防控提供了方向。

关键词:小肠结肠炎耶尔森菌;腹泻患者;病例对照;基因检测;PFGE

中图分类号:R183 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2694(2019)10-0939-05

Typing distribution and characteristics of *Yersinia enterocolitica* in Lu'an, China

GAO Da-wei¹, ZHANG Feng¹, CHEN Zhi-chao¹, CHANG Hong-wei¹,
ZHANG Li-mei¹, CHEN Bei-lei¹, DUAN Ran²

(1, Lu'an Center for Disease Control and Prevention, Lu'an 237000, China;

2, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: To investigate the distribution characteristics of *Yersinia enterocolitica* and to provide scientific basis for prevention and treatment in the Lu'an area, through the detection for *Y. enterocolitica* in diarrhea patients, poultry and livestock, flies and frozen refrigerated food in Lu'an City in 2018, isolation, culture, biochemical, serological and molecular biological tests were performed on the collected samples. Results showed that a total of 617 samples were collected in 2018, 38 strains of *Y. enterocolitica* were detected, the detection rate was 6.16%. And *Y. enterocolitica* was detected in 8 species from 10 species. The highest detection rate in pig manure was 25%, the positive case-control samples, with a detection rate of 11.76%. The detection rate was 8.33% in chicken manure and dog manure. The pathogenic *Y. enterocolitica* was O:3 serotype and the gene distribution was *ail+*, *ystA+*, *yadA+*, *virF+*, *ystB-*. And detected only in pigs. *Y. enterocolitica* was detected in the inner wall of refrigerator and in pigs for the first time in the patients' with *Y. enterocolitica*. Molecular typing showed that the similarity between strains and host animals was 100% by PFGE. In conclusion, distribution characteristics of *Y. enterocolitica* in this city is that the main carriers of *Y. enterocolitica* are pigs with the highest infection rate. They all are pathopoiesis *Y. enterocolitica*. As for other, the livestock, flies and refrigerated foods are also common exist. It is worth noting that *Y. enterocolitica* was first detected in the refrigerator wall of *Y. enterocolitica* patients and in pigs. It is suggested that family environment and livestock are the high risk factors for infection. It also provides a direction for the prevention and treatment of *Y. enterocolitica* patients.

国家科技重大专项课题(No.2013X10004-203-002)

通讯作者:常宏伟, Email: chw@lacdc.com.cn;

ORCID: 0000-0002-4779-0375

作者单位:1.安徽省六安市疾病预防控制中心,六安 237000;

2.中国疾控中心传染病预防控制所,北京 102206

Keywords: *Yersinia enterocolitica*; diarrhea patients; case control study; genetic test; PFGE

Supported by the National Science and Technology Major Projects Subject(No.2013X10004-203-002)

Corresponding author: Chang Hong-wei, Email: chw@lacdc.com.cn

小肠结肠炎耶尔森菌在自然界广泛存在,是一种重要的食源性病原菌^[1],由于在寒冷的条件下生存的特性,使其在冰箱和冷冻冷藏食品中常常被发现^[2]。该菌可引起感染者腹泻等肠道炎症,严重的可引起反应性关节炎等自身免疫性疾病。随着对该菌的不断研究,引起越来越多国内外学者的关注^[3-4]。我中心作为该菌的国家监测点,自2005年以来,每年都对腹泻患者、动物宿主、冷冻冷藏食品等样本做了大量检测和研究,现将本年度采集样本的小肠结肠炎耶尔森菌检测的结果和分布分型特征报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 2018年4—11月采集六安市城南镇和城北乡2个监测点的腹泻患者、动物宿主的粪便、苍蝇以及检测阳性患者对照样本,以及本市两大超市的冷冻冷藏食品,将采集样本按1:10的比例置改良磷酸盐缓冲液(后称“改良PBS”)中冷藏(2~6℃)保存并及时(7~14 d)送检。

1.2 试剂与仪器 改良PBS、CIN选择性培养基和动力-吡啶-尿素培养基(MIU);青岛海博生物技术有限公司产品;半固体培养基;北京陆桥技术有限公司产品;分型血清试剂盒;日本生研株式会社产品,批号:286036;API20E生化鉴定条购;法国生物梅里埃公司产品,批号:1006634840;基因组DNA提取试剂盒和PCR反应体系试剂;天根生化科技有限公司产品;按参考文献^[5]合成*ail*、*ystA*、*ystB*、*yadA*、*rfbC*、*virF*6种毒力基因的引物,由上海生工生物工程有限公司合成;PCR扩增体系:参照使用说明书(采用每个反应体系20 μL,每个体系加入纯水8 μL, PremixTaqVersion2.0>Loading dye mix)10 μL,上下引物各0.5 μL, DNA模板1.0 μL);premix Taq酶试剂盒大连宝生物公司生产;限制性内切酶Not I、Xba I购自Promega公司,SeaKem Gold琼脂糖购自Cambraex Bio Science Roekland公司,蛋白酶K购自Merkc公司。以上使用的试剂均在有效期内。脉冲场凝胶电泳仪为Bio-Rad CHEF-DR III系统和Bio-Rad CHEF-Mapper系统,凝胶成像仪为Bio-Rad GelDoc 2000系统,均为美国伯乐公司产品。

1.3 方法 参照中国疾病预防控制中心编写的《小肠结肠炎耶尔森菌实验室分离与鉴定手册》(2、3版)^[5-6]程序。

1.4 数据统计处理 用统计学软件SPSS21.0版本进行统计学处理,采用卡方检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。用BioNumerics 5.0软件对PFGE结果进行聚类分析。

2 结果

2.1 小肠结肠炎耶尔森菌的各类样本的分布 2018年共采集腹泻患者、家禽家畜、苍蝇、冷冻冷藏食品和病例对照各类样本617份,检出小肠结肠炎耶尔森菌38株,总的检出率为6.16%,11种样本中有7种检出该菌,猪的粪便检出率最高为25%,与总检出率相比差异有统计学意义($\chi^2 = 28.20$, $P < 0.01$);其次为阳性病例对照样本,检出率为11.76%;鸡和狗的检出率均为8.33%(表1)。

表1 2018年六安市家各类样本小肠结肠炎耶尔森菌检出率
Tab.1 Detection Rate of *Y. enterocolitica* in Lu'an City in 2018

| 样品名称 | 检测份数 | 确定菌株数 | 检出率(%) |
|--------|------|-------|--------|
| 腹泻患者粪便 | 271 | 8 | 2.95 |
| 鹅粪 | 3 | 0 | 0 |
| 鸡粪 | 60 | 5 | 8.33 |
| 鸭粪 | 21 | 0 | 0 |
| 猪粪 | 64 | 16 | 25 |
| 狗粪 | 12 | 1 | 8.33 |
| 牛粪 | 2 | 0 | 0 |
| 苍蝇 | 60 | 1 | 1.67 |
| 阳性患者对照 | 17 | 2 | 11.76 |
| 生食 | 73 | 5 | 6.85 |
| 熟食 | 34 | 0 | 0 |
| 合计 | 617 | 38 | 6.16 |

2.2 小肠结肠炎耶尔森菌的菌型分布

2.2.1 血清型的检测情况 2018年分离38株小肠结肠炎耶尔森菌的血清型进行O:1/O:2、O:3、O:5、O:8、O:9和O:3分型研究,其中O:8型(14株)和O:3型(17株)为本市的优势菌株,与往年类似^[7-8],分别占全市分离菌株数的36.84%和44.7%,成为该地该病的主要感染菌型,O:5和O:9型各分离出1株,有3株菌为未分型的其它血清型(表2)。

2.2.2 毒力基因的检测情况 根据小肠结肠炎耶尔森菌毒力基因(*ail*、*ystA*、*ystB*、*yadA*、*virF*)的携

带情况,对 38 株小肠结肠炎耶尔森菌进行 4 种基因型^[9]分型研究,其中致病性的基因型 III 型和 IV 型,分别占总菌株的 42.11%(16/38)和 2.63%(1/38),猪粪均为致病性的基因型 III 和 IV 型,其余样本均为非致病性基因型 I 型、II 型(表 3)。

2.2.3 生化反应模式情况 我们通过法国生物梅里埃公司的 API.20E 生化试验系统对 38 株小肠结肠炎耶尔森菌进行生物学的鉴定,呈 9 种生化反应编码模式,最常见的 3 种生化反应编码式为:1155723、1015523、1155523 三种,分别占鉴定菌株的 39.47%、18.42%和 15.79%,其它 6 种均不多见(表 4)。结果显示生化反应编码模式与菌株的致病性和血清型别有关,其中菌株生化反应编码为 1155723、1015523、1115523 和 1054523 的均为致病性 O:3 血清型。二生化反应编码 1155723 和 1155523 均为非致病性 O8 型菌株。O:1/O:2 血清型的生化反应编码均为 1154723。

表 2 2018 年不同类型样本小肠结肠炎耶尔森菌血清分布
Tab.2 Serum distribution of *Y. enterocolitica* in different types of samples in 2018

| 宿主 | 血清型 | | | | | 合计 |
|------|-------|-----|-----|-----|-----|----|
| | O1/O2 | O:3 | O:5 | O:8 | O:9 | |
| 病人 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 8 |
| 猪 | 0 | 16 | 0 | 0 | 0 | 16 |
| 鸡 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 5 |
| 狗 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 苍蝇 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 食品 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| 病例对照 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 合计 | 2 | 17 | 1 | 14 | 1 | 38 |

表 3 2018 年不同类型样本小肠结肠炎耶尔森菌独立基因携带情况

Tab.3 Independent gene carriers of *Y. enterocolitica* from different types of samples in 2018

| 样品类别 | 基因型 | | | | 合计 |
|--------|-----|----|-----|----|----|
| | I | II | III | IV | |
| 病人粪便 | 1 | 8 | 0 | 0 | 9 |
| 猪粪 | 0 | 0 | 1 | 15 | 16 |
| 鸡粪 | 3 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| 狗粪 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 苍蝇 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 冷冻冷藏食品 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 病例对照 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 合计 | 5 | 16 | 1 | 16 | 38 |

注:基因型 I 型(*ail* -、*ystA* -、*ystB* -、*yadA* -、*virF* -), II 型(*ail* -、*ystA* -、*ystB* +、*yadA* -、*virF* -), III 型(*ail* +、*ystA* +、*ystB* -、*yadA* -、*virF* -), IV 型(*ail* +、*ystA* +、*ystB* -、*yadA* +、*virF* +)

表 4 38 株小肠结肠炎耶尔森菌生化反应模式与血清型比较
Tab.4 Thirty-eight strains of *Y. enterocolitica*: comparison of biochemical reaction patterns and serotypes

| 菌株生化型 | 菌株血清型 | | | | | 合计 |
|---------|-------|-----|---------|-----|-----|----|
| | O:3 | O:8 | O:1/O:2 | O:5 | 未定型 | |
| 1014522 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 1015523 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| 1115523 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 1054523 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 1154723 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 1155523 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 1155723 | 0 | 9 | 0 | 1 | 5 | 15 |
| 1155743 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 1155763 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 合计 | 17 | 10 | 2 | 1 | 8 | 38 |

2.3 本省首次在小肠结肠炎耶尔森菌患者家庭环境和动物宿主中检测到小肠结肠炎耶尔森菌 自 2016 年起,我中心在全省首次对腹泻病人粪便检测阳性的家庭设立阳性对照,对阳性病人家庭环境和饲养的家畜进行采样检测,今年首次在小肠结肠炎耶尔森菌阳性腹泻病人(样本编号为:AH2018-110400 号)家的冰箱中检测到小肠结肠炎耶尔森菌(样本编号为:AH2018-110401 号),同时在另一个小肠结肠炎耶尔森菌阳性腹泻病人(样本编号为:AH2018-107200 号)家饲养的家猪的粪便中(样本编号为:AH2018-107204 号)检测到小肠结肠炎耶尔森菌。成为本省关于小肠结肠炎耶尔森菌患者家庭环境和饲养的家畜检出小肠结肠炎耶尔森菌的首次报告。

2.4 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型 应用 PFGE 的方法对 2018 年 18 株小肠结肠炎耶尔森菌进行基因组带型分型,结果显示,5 份均携带毒力基因的猪粪样本分离菌株的带型类聚图高度一致,5 份腹泻病人分离菌株也均高度一致,均与本地鸡粪狗粪和食品等样本中分离菌株的带型类聚图还存在一定差异,腹泻病人粪便检测阳性的菌株和设立家庭阳性对照菌株的带型也存在一定的差异(图 1)。

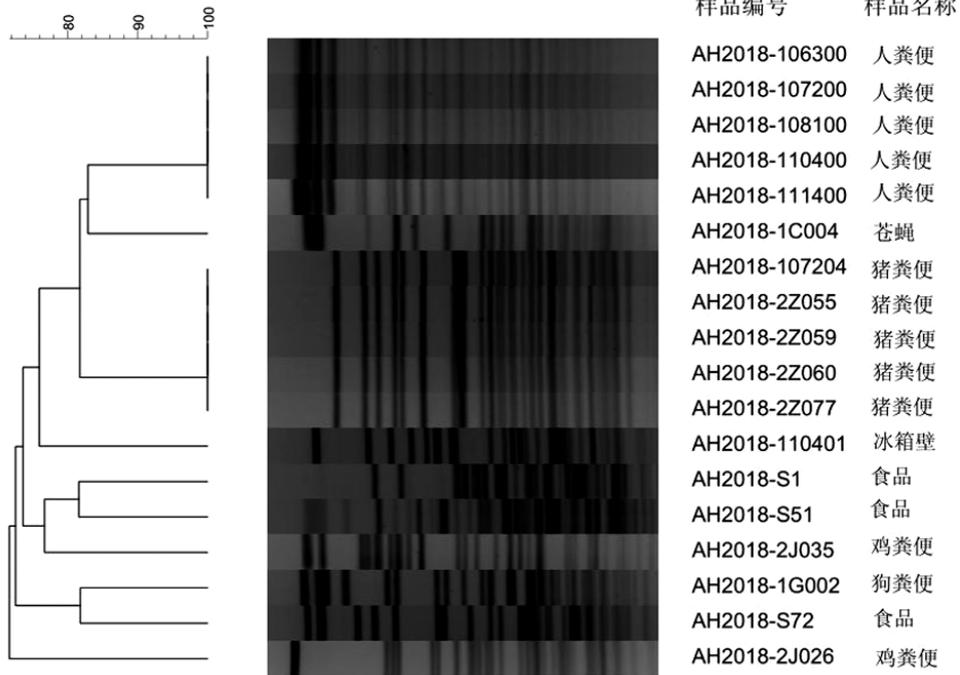


图1 18株小肠结肠炎耶尔森菌 PFGE 带型类聚图

Fig.1 PFGE band pattern of 18 strains of *Y. enterocolitica*

3 讨论

六安市地处安徽省西部简称皖西,是鄂豫皖三省交界的地区,对本市小肠结肠炎耶尔森菌的分布研究有着十分重要的意义。我中心自2005年以来一直对腹泻患者、动物宿主和冷冻冷藏食品等样本做了大量检测,基本弄清了该菌在腹泻患者、动物宿主和冷冻冷藏食品的分布情况。

2018年,我中心共采集11类617份样本,有9类38个样品检出小肠结肠炎耶尔森菌,总的检出率为5.30%。从检出率上看,64份猪粪样本中检出16份,检出率最高为25%,与总检出率相比差异有统计学意义($\chi^2 = 28.20, P < 0.01$),且均为致病性菌株,我们应该高度重视,提示从事生猪饲养和屠宰人员在工作中做好防护,同时由于小肠结肠炎耶尔森菌可能以猪为“圆心”向四周散发分布^[10],我们也要做好猪的饲养和加工与周围消毒隔离工作,防止进一步扩散。腹泻患者、家禽家畜、苍蝇、冷冻冷藏食品和病例对照均检出小肠结肠炎耶尔森菌,阳性检出率也处于较低的水平。其中冷冻冷藏食品中生食的检测率低于往年^[8-11]。综上,猪为致病性小肠结肠炎耶尔森菌的主要储存宿主,而其他家禽家畜和腹泻病人为非致病性小肠结肠炎耶尔森菌等主要携带者^[12-13]。

对2018年分离小肠结肠炎耶尔森菌的血清型分型研究显示,其中O:8型(14株)和O:3型(17

株)分别占全市分离菌株数的36.84%和44.74%,为本市的优势菌株,与往年类似^[7-8],成为本地区该病的主要感染菌型,致病性O:3型菌种占比之高,应引起高度重视。毒力基因的检测情况,显示致病性的基因型III型和IV型,分别占比总菌株的42.11%(16/38)和2.63%(1/38),且均从猪粪中检出,提示猪为本市致病性小肠结肠炎耶尔森菌的主要来源。其余各类样本均为非致病性基因型I型、II型,为低风险菌株。

通过对38株小肠结肠炎耶尔森菌进行生化学鉴定,呈9种生化反应编码模式,与血清型比较,发现API20E生化反应编码与血清学存在一定相关性^[14],其中菌株生化反应编码为1014522、1015523、1115523和1054523的均为致病性O:3血清型。而生化反应编码1155723和1155523均为非致病性O8型菌株。O:1/O:2血清型的生化反应编码均为1154723。

2016年起,我中心首次在面向全省对腹泻病人粪便检测阳性的家庭设立阳性对照,对阳性病人家庭的环境和饲养的家畜进行采样检测,首次在小肠结肠炎耶尔森菌阳性腹泻病人家的饲养的家猪的粪便和冰箱中检测到小肠结肠炎耶尔森菌。成为本省关于小肠结肠炎耶尔森菌阳性病人家庭环境和饲养的家畜检出小肠结肠炎耶尔森菌的首次报告,对于弄清小肠结肠炎耶尔森菌的腹泻病人感染因素有较

好的指导意义。通过 PFGE 方法对各类菌株样本的基因带型进行同源性的结果显示,腹泻病人粪便检测阳性的菌株和设立家庭阳性对照菌株的带型也存在一定的差异,提示患者家庭的冰箱内壁和饲养的家猪与患者的感染因素关系不大。但猪粪样本分离菌株的带型类聚图高度一致,腹泻病人分离菌株也均高度一致,均与本地鸡粪狗粪和食品等样本中分离菌株的带型类聚图还存在一定差异;提示猪之间的小肠结肠炎耶尔森菌高度同源^[15],人群之间的小肠结肠炎耶尔森菌也高度同源,与本地鸡粪狗粪和食品的同源性存在差异,此结果为不同种类小肠结肠炎耶尔森菌的防治提供科学的指导,需加强本地带菌猪群与健康猪群之间防护工作,同时做好小肠结肠炎耶尔森菌的腹泻病人与健康人群之间隔离防护工作。

(本文承中国疾控中心传染病所景怀琦研究员的帮助和指导,特此致谢。)

利益冲突:无

引用本文格式:高大维,张凤,陈智超,等.六安地区小肠结肠炎耶尔森菌分型分布和特征分析[J].中国人兽共患病学报,2019,35(10):939-943. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.122

参考文献:

- [1] Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism [J]. CRC Crit Rev Microbiol, 1997, 5(2):211-241. DOI: 10.3109/10408417709102312
- [2] Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues [J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(2):257-276. DOI:10.1128/CMR.10.2.257
- [3] Rosner BM, Stark K, Werber D. Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008 [J]. BMC Public Health, 2010, 10:337. DOI: 10.1186/1471-2458-10-337
- [4] Zheng H, Wang J, Sun Y, et al. Clinical isolation and characterization of *Yersinia enterocolitica* in China using real-time PCR

- and culture method [J]. Digestion, 2007, 75(4):199-204. DOI: 10.1159/000108646
- [5] 景怀琦,王鑫. 小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌实验室分离与鉴定手[M].2版.北京:中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,2009:75.
- [6] 景怀琦,王鑫. 小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌实验室分离与鉴定手[M].3版.北京:中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,2013:85.
- [7] 高大维,丁业荣,张凤,等. 六安市小肠结肠炎耶尔森菌检测及其分子生物学研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(3):256-261. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.03.009
- [8] 张凤,高大维,常宏伟,等. 六安市小肠结肠炎耶尔森菌病原学研究[J].中国卫生检验杂志,2018,28(23):2848-2850
- [9] Neubauer H, Aleksic S, Hensel A, et al. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups [J]. Int J Med Microbiol, 2000, 290(1): 61-64. DOI:10.1016/S1438-4221(00)80107-1
- [10] Wang X, Cui Z, Tang L, et al. Pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* isolated from domestic dogs belonging to farmers are of the same subtype as pathogenic *Y. enterocolitica* strains isolate from humans and may be a source of human infection in Jiangsu Province, China [J]. Clin Microbiol, 2010, 48(5): 1604-1610. DOI:10.1128/jcm.01789-09
- [11] 杨卫,丁业荣,常宏伟,等. 冷冻冷藏食品小肠结肠炎耶尔森菌病原学检测[J].中国公共卫生,2017,33(2):338-341.
- [12] Liang J, Wang X, Xiao Y, et al. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered in Chinese abattoirs [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(8): 2949-2956. DOI: 10.1128/AEM.07893-11
- [13] 李旭,梁俊容,肖玉春,等. 小肠结肠炎耶尔森菌在中国家畜家禽间分布研究[J].中国媒介生物学及控制杂志,2015,26(2): 145-147,171.
- [14] 张凤,丁业荣,高大维,等. 腹泻病人样本分离小肠结肠炎耶尔森菌及其病原学研究[J].中国卫生检验杂志,2015,25(16): 2693-2696.
- [15] 陈邬锦,王鹏. 中国小肠结肠炎耶尔森菌流行现状及其研究进展[J].中国人兽共患病学报,2015,31(4): 380-384. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2015.04.019

收稿日期:2019-04-01 编辑:王晓欢