

安徽省 2018—2019 年小肠结肠炎耶尔森菌分型分布及分子特征分析

袁媛¹, 孙永¹, 常宏伟², 陈晓龙³, 撒楠¹, 高大维², 苏斌¹

1. 安徽省疾病预防控制中心微生物检验科, 安徽 合肥 230601; 2. 六安市疾病预防控制中心, 安徽 六安 237000;
3. 宣城市疾病预防控制中心, 安徽 宣城 242000

摘要: **目的** 了解 2018—2019 年安徽省小肠结肠炎耶尔森菌分型分布及分子特征。**方法** 收集 2018—2019 年腹泻患者、动物粪便、食品等不同类型样本进行小肠结肠炎耶尔森菌的分离, 对菌株进行系统生化鉴定、血清型分型、毒力基因 PCR 检测及脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分子分型。**结果** 2 186 份样本中共分离到 97 株小肠结肠炎耶尔森菌, 主要血清型为 O:3 型和 O:5 型, O:3 血清型 21 株, 占 21.65% (21/97), O:5 血清型 17 株, 占 17.53% (17/97), 毒力基因分布为黏附侵袭位点基因 (*ail*+)、耐热性肠毒素 A 基因 (*ystA*+)、耐热性肠毒素 B 基因 (*ystB*-)、黏附素 (*yadA*+) 和 *yop* 调节子转录活化因子 (*virF*+) 占 19.59% (19/97), *ail*-、*ystA*-、*ystB*+, *yadA*- 和 *virF*- 占 63.92% (62/97)。PFGE 分子分型显示腹泻患者和宿主猪的菌株相似性 ≥95.00%。**结论** 在安徽省食品、环境和部分腹泻患者中小肠结肠炎耶尔森菌分离株大多为非致病性菌株, 动物宿主猪和腹泻患者中存在致病性小肠结肠炎耶尔森菌, 猪体内分离的菌株与人感染密切相关, 猪是小肠结肠炎耶尔森菌致病性菌株的主要宿主。

关键词: 小肠结肠炎耶尔森菌; 血清型; 毒力基因; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号: R378 文献标识码: A 文章编号: 1003-8280(2021)03-0298-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2021.03.008

Type distribution and molecular characteristics of *Yersinia enterocolitica* in Anhui province, China, 2018–2019

YUAN Yuan¹, SUN Yong¹, CHANG Hong-wei², CHEN Xiao-long³, SA Nan¹, GAO Da-wei², SU Bin¹

1. Microbiology Laboratory, Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hefei, Anhui 230601, China;
2. Lu'an Center for Disease Control and Prevention, Lu'an, Anhui 237000, China; 3. Xuancheng Center for Disease Control and Prevention, Xuancheng, Anhui 242000, China

Corresponding author: SU Bin, E-mail: sub@ahcdc.com.cn

Supported by the National Science and Technology Major Project of China (No. 2018ZX10713003-002-005)

Abstract: **Objective** To investigate the type distribution and molecular characteristics of *Yersinia enterocolitica* in Anhui province, China, 2018-2019. **Methods** Different types of samples were collected from patients with diarrhea, animal feces, and food from 2018 to 2019, *Y. enterocolitica* strains were isolated to perform systematic biochemical identification, serotyping, polymerase chain reaction detection of virulence genes, and molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** Among 2 186 samples, a total of 97 strains of *Y. enterocolitica* were isolated, with O:3 (21/97, 21.65%) and O:5 (17/97, 17.53%) being the main serotypes. Virulence gene analysis showed that 19.59% (19/97) of the strains were attachment invasion locus gene-positive (*ail*+) , *Yersinia* stable toxin A gene-positive (*ystA*+) , *Yersinia* stable toxin B gene-negative (*ystB*-) , *Yersinia* adhesin A gene-positive (*yadA*+) , and *yop* regulon transcriptional activator gene-positive (*virF*+) ; 63.92% (62/97) were *ail*- , *ystA*- , *ystB*+, *yadA*- , and *virF*- . Molecular typing by PFGE showed ≥95.00% similarity between the strains from patients with diarrhea and the strains from the host pigs. **Conclusion** In Anhui province, most *Y. enterocolitica* strains isolated from food, environment, and some patients with diarrhea are non-pathogenic. There are pathogenic strains in the host pigs and some patients with diarrhea. Strains isolated from pigs are closely related to human infection. Pigs are the main host of pathogenic strains of *Y. enterocolitica*.

Key words: *Yersinia enterocolitica*; Serotype; Virulence gene; Pulsed-field gel electrophoresis

小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*) 是一种对人和动物均具有致病性的人兽共患病原体,

基金项目: 国家科技重大专项 (2018ZX10713003-002-005)

作者简介: 袁媛, 女, 硕士, 副主任技师, 主要从事病原微生物检验工作, E-mail: coclyy2020@sohu.com

通信作者: 苏斌, E-mail: sub@ahcdc.com.cn

也是欧洲细菌性腹泻的第三大原因^[1]。该菌经粪口途径传播,人类通过接触污染的水源、食品、感染动物的排泄物感染,受污染的肉类及肉制品等食物常常成为最主要传染源,猪被认为是导致人类致病的主要宿主^[2]。小肠结肠炎耶尔森菌可分为 70 多种血清型,与人类耶尔森菌病相关的血清型通常为 O:3、O:5、O:8、O:9 与 27 血清型^[3],在欧洲和北美生物主要流行的生物血清型为 4/O:3 型^[4-5],3/O:3 型是中国最流行的生物血清型^[6]。该菌致病性和毒力机制仍然比较复杂,位于致病性菌株染色体上的黏附侵袭位点基因(*ail*)和耐热性肠毒素 A 基因(*ystA*)基因是最常用的染色体靶标基因,*ail* 基因介导该菌的侵袭性,*ystA* 是其致泻的主要原因。该菌中的另一个致病因子为 pYV 质粒,包含黏附素(*yadA*)和 *yop* 调节子转录活化因子(*virF*)基因,编码称为 Yops 蛋白质的产生,具有黏附和抑制吞噬等作用。由于在中国的国家监测系统中无法报告耶尔森菌病,因此大多数医院都没有对小肠结肠炎耶尔森菌进行常规检测,只有少数研究中零星数据的报道。

在过去几十年中,脉冲场凝胶电泳(PFGE)作为细菌分型的金标准,可以比较不同国家或地区微生物的细菌种群。为了研究近年来安徽省小肠结肠炎耶尔森菌分布状况及分子病原学特征,对 2018—2019 年从腹泻患者、动物、蝇类媒介外环境及各类食品中分离的菌株进行生化鉴定、血清学分型、毒力基因及 PFGE 分析,为今后小肠结肠炎耶尔森菌在各类样品中的监测及人群感染防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源 2018—2019 年采集安徽省六安、宣城、合肥、铜陵市共计 2 186 份家禽家畜、病例、生熟食品、蝇类媒介外环境等各类标本,进行小肠结肠炎耶尔森菌分离鉴定。参考菌株 ATCC23715 购自中国药品生物制品检定所。

1.2 主要试剂 选择性培养基为北京路桥技术有限公司产品;API20E 生化鉴定条购自法国梅里埃公司;分型血清购自日本生研株式会社;核酸提取试剂盒购自中国台湾圆点公司;限制性内切酶购自 Promega 公司。

1.3 生化鉴定和血清凝集试验 将分离菌株纯培养物进行生化鉴定,血清玻片凝集试验,同时生理盐水做自凝对照实验。

1.4 DNA 模板制备和毒力相关基因检测 核酸提取实验操作步骤及程序设置按照核酸提取仪及试剂盒说明书进行,提取核酸的洗脱体积为 50 μ l, -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。毒力基因鉴定按参考文献[7]鉴定:小肠

结肠炎耶尔森菌 *ail*、*ystA*、耐热性肠毒素 B 基因(*ystB*)、*yadA* 和 *yop* 调节子 *virF*。模板量为 5 μ l,总反应体积 25 μ l。反应条件为:预变性 95 $^{\circ}$ C 4 min,1 个循环;变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,退火 62 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。使用 1.5% 的琼脂糖凝胶对扩增产物进行分离鉴定。

1.5 分子分型 按照中国疾病预防控制中心《小肠结肠炎耶尔森菌实验室分离与鉴定手册》中 PFGE 方法,对随机选取的 22 株小肠结肠炎耶尔森菌进行分子分型,用 Bionumerics 软件对 PFGE 结果进行遗传变异分析。

1.6 统计学分析 使用 EpiData 3.1 软件建立数据库,双重录入并检错,使用 SPSS 13.0 软件进行数据分析,计数资料采用绝对数进行描述,构成比比较采用 χ^2 检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 标本分离率 2018—2019 年安徽省 2 186 份标本共分离出 97 株小肠结肠炎耶尔森菌,分离率为 4.44%,其中家禽家畜动物粪便分离率为 5.12% (31/605),病例分离率为 2.21% (20/903),生熟肉类食品分离率为 8.94% (42/470),蝇类媒介外环境分离率为 1.92% (4/208)。

2.2 血清学分型结果 97 株菌株经 Api20E 生化鉴定均为小肠结肠炎耶尔森菌,由于分型血清类型有限,共有 O:1,2、O:3、O:5、O:8、O:9 五种血清型,97 株小肠结肠炎耶尔森菌中分出 O:1,2 血清型 4 株,占 4.12%,O:3 血清型 21 株,占 21.65%,O:5 血清型 17 株,占 17.53%,O:8 血清型 13 株,占 13.40%,O:9 血清型 6 株,占 6.19%,未定型 36 株,占 37.11%。血清分型在不同菌株来源组差异有统计学意义($\chi^2=64.160, P<0.001$)。见表 1。

表 1 安徽省不同地区采集标本小肠结肠炎耶尔森菌血清分型结果

Table 1 Serotypes of *Yersinia enterocolitica* isolates from samples collected from different areas of Anhui province

菌株来源	血清分型						合计
	O:1,2	O:3	O:5	O:8	O:9	未定型	
食品	1	2	13	1	5	20	42
动物粪便	3	17	3	3	0	5	31
患者	0	2	0	8	1	9	20
媒介及外环境	0	0	1	1	0	2	4
合计	4	21	17	13	6	36	97

2.3 毒力基因检测结果 对 97 株分离的菌株进行 *ail*、*ystA*、*ystB*、*yadA* 和 *virF* 5 种毒力基因 PCR 检测,结果见表 2。其毒力基因分布特征为:21 株 O:3 血

清型菌株有 19 株均携带 *ail*、*ystA*、*yadA* 和 *virF* 4 种毒力基因, 即 *ail*+, *ystA*+, *ystB*-, *yadA*+, *virF*+, 占 19.59%, 3 株为 *ail*+, *ystA*+, *ystB*-, *yadA*- 和 *virF*-, 占 3.09%, 其余除 13 株全部阴性外, 均携带 *ystB* 基因, 即 *ail*-, *ystA*-, *ystB*+, *yadA*- 和 *virF*-, 占 63.92%。血清分型在不同基因型组间差异有统计学意义 ($\chi^2=103.591, P<0.001$)。见表 2。

2.4 PFGE 分型及聚类分析结果 22 株菌经 *Not I* 内切酶酶切, 将 PFGE 电泳图像储存为 TIFF 格式, 用数据处理软件 Bionumerics (version 5.0) 识别图像条带, 使用参考菌株 *Salmonella* Braenderup H9812 (*Xba I*

酶切) 作为分子质量标准进行校准, 必要时进行人工校正处理。选择 20 kb 以上可识别的条带进行聚类分析, 小于 Marker 最小片段的条带被舍去。使用非加权配对算术平均法 (unweighted pair group method using arithmetic averages, UPGMA) 进行条带聚类。22 株小肠结肠炎耶尔森菌共分为 20 种 PFGE 带型, 图谱条带数为 17~31 条, 主要酶切条带集中在 25~240 kb, 不同地市菌株带型比较独特, 不同血清型带型分布广泛, 未发现存在交叉性, 不同年份同一地市的猪标本和腹泻患者中各有 2 株 O:3 血清型致病性菌株, 带型基本相同, 相似性 $\geq 95.00\%$ 。见图 1。

表 2 安徽省不同地区采集标本小肠结肠炎耶尔森菌毒力基因分布情况

Table 2 Virulence gene distribution of *Yersinia enterocolitica* isolates from samples collected from different areas of Anhui province

基因型	血清型						菌株总数 (株)
	O:3	O:8	O:9	O:1,2	O:5	未定型	
<i>ail</i> + <i>ystA</i> + <i>ystB</i> - <i>yadA</i> + <i>virF</i> +	19	0	0	0	0	0	19
<i>ail</i> - <i>ystA</i> - <i>ystB</i> + <i>yadA</i> - <i>virF</i> -	0	11	6	2	14	29	62
<i>ail</i> + <i>ystA</i> + <i>ystB</i> - <i>yadA</i> - <i>virF</i> -	2	0	0	0	0	1	3
<i>ail</i> - <i>ystA</i> - <i>ystB</i> - <i>yadA</i> - <i>virF</i> -	0	2	0	2	3	6	13
合计	21	13	6	4	17	36	97

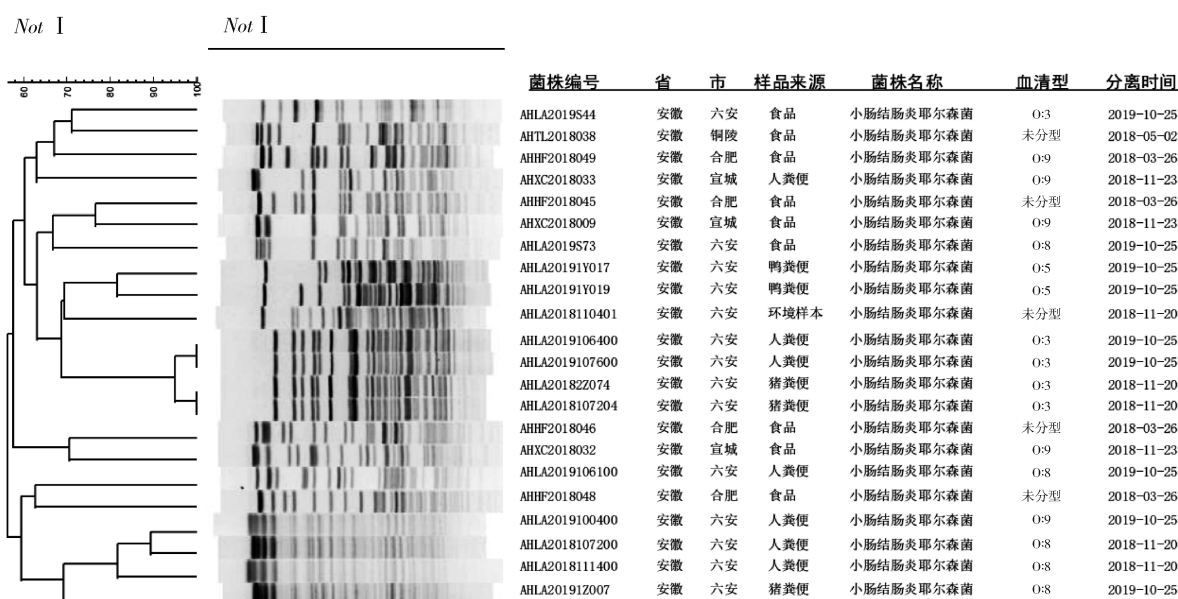


图 1 安徽省小肠结肠炎耶尔森菌脉冲场凝胶电泳分型聚类结果

Figure 1 Typing and clustering results with pulsed-field gel electrophoresis for *Yersinia enterocolitica* isolates from Anhui province

3 讨论

小肠结肠炎耶尔森菌在我国分布广泛^[8]。通过对安徽省 2018—2019 年的不同地区采集标本进行监测, 分析该菌在不同来源、不同类型样本中的相对分布情况, 结果发现致病性菌株在安徽省家畜家禽中分离率最高, 猪为小肠结肠炎耶尔森菌的主要宿主, 非致病性菌株在生熟肉制品中分离率最高。但是小肠结肠炎耶尔森菌病在中国腹泻病患者中报告较少, 多为散发, 可能由于临床腹泻病例中可能存在

漏报和就诊前服药等情况, 从而使该菌的分离率普遍较低, 河南省监测的病例分离率为 0.26%^[9], 2018—2019 年该菌在安徽省的分离率为 2.21%, 分离率略高于其他省份, 在动物粪便的分离率为 5.12%。在欧洲, 采用荧光 PCR 和传统培养方法比较发现, 猪扁桃体中该菌的阳性率分别为 88.00% 和 34.00%, 远高于粪便的分离率^[10]。有研究小组使用 PCR 方法在婴儿粪便检测到约为 20.00% 的感染率^[11], 说明该菌在动物和人的感染情况远高于传统粪便分离培养的分离率。在今后的监测中, 可以尝

试在应用传统分离培养的同时,使用更为灵敏的 PCR 方法,并且采集不同类型的宿主样本,以提高在各种样品中的检出率。

本次监测结果与我国小肠结肠炎耶尔森菌非致病性菌株和致病性菌株的血清型和毒力基因分布情况一致。在我国致病性血清型主要为 O:3 型^[7],在安徽省本次分离的菌株中也获得了相似结果,O:3 型菌株从 17 株动物宿主猪和 2 名腹泻病例中分离出来,均携带 *ail*、*ystA*、*yadA* 和 *virF* 毒力基因,为典型的致病性菌株特征,从大多数病例、食品和其他蝇类媒介外环境等标本中分离出的菌株多为 *ystB*+ 菌株,血清型别较为分散,其中血清型 O:5(17/97)和未定型菌株(36/97)是分析样品中占比较大的 2 个血清型,与国外研究相近^[12]。该基因仅存于部分生物 1A 型菌株,该类菌株不携带其他毒力基因,属于传统意义上的非致病性菌株。但是该生物型菌株在腹泻患者、各类食品、环境、水和健康动物中的高流行性,说明该生物型菌株的致病潜力值得进一步研究。

当对不同来源的菌株进行 PFGE 分析时发现,不同年份的腹泻病例(2019 年)和当地的宿主动物猪(2018 年)在同一个聚类簇里,两者之间存在较高的同源性,相似性≥95.00%。表明动物分离株和人类感染存在联系。在世界范围内的大多数国家,猪被认为是致病性菌株的主要储存宿主。该菌具有在低温下的生长能力,这些因素均增加了其通过污染的猪肉、水源或者生熟食品的交叉污染进入食物链传播的可能性。猪是引起耶尔森菌病流行和暴发的载体^[11],本次安徽省的监测于不同年份在宿主和病例中发现高度同源的菌株,提示在生猪肉的屠宰、产品销售和肉制品加工等环节,无论地理位置或是时间的不同,都有可能导致人类感染的风险。从 *ystB*+ 腹泻病例、食物和环境中的非致病性菌株在其条带之间具有更大的多样性并且扩散到其他簇,这种多样性可能与该生物型的血清型的多样性有关。从目前的监测尚未发现非致病性菌株中病例与环境食品等样本之间的联系性。

本次监测在不同年份的人和动物中分离出高度同源的菌株,提示该菌在动物宿主的传播中,可能持续对食品安全和公共卫生构成潜在威胁,需要进一步的流行病学调查,确定小肠结肠炎耶尔森菌的传播途径。

利益冲突 无

参考文献

[1] Le Guern AS, Martin L, Savin C, et al. Yersiniosis in France: overview and potential sources of infection[J]. Int J Infect Dis,

2016,46:1-7. DOI:10.1016/j.ijid.2016.03.008.

- [2] Chlebicz A, Śliżewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as zoonotic foodborne diseases: a review[J]. Int J Environ Res Public Health, 2018, 15(5): 863. DOI:10.3390/ijerph15050863.
- [3] Filik K, Szermer-Olearnik B, Wernecki M, et al. The podovirus ϕ 80-18 targets the pathogenic American biotype 1B strains of *Yersinia enterocolitica*[J]. Front Microbiol, 2020, 11:1356. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01356.
- [4] Råsbäck T, Rosendal T, Stampe M, et al. Prevalence of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Swedish pig farms[J]. Acta Vet Scand, 2018, 60(1):39. DOI:10.1186/s13028-018-0393-5.
- [5] Duan R, Liang JR, Zhang J, et al. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 3/O:3 among children with diarrhea, China, 2010-2015[J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(9): 1502-1509. DOI:10.3201/eid2309.160827.
- [6] Liang JR, Kou ZQ, Qin S, et al. Novel *Yersinia enterocolitica* prophages and a comparative analysis of genomic diversity[J]. Front Microbiol, 2019, 10:1184. DOI:10.3389/fmicb.2019.01184.
- [7] 景怀琦,李继耀,肖玉春,等. O:3 和 O:9 小肠结肠炎耶尔森菌主要毒力基因分布调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2004, 15(4): 317-319. DOI: 10.3969/j.issn.1003-4692.2004.04.024.
- Jing HQ, Li JY, Xiao YC, et al. PCR detection and investigation of distribution of virulence factors for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 and O:9[J]. Chin J Vector Biol Control, 2004, 15(4): 317-319. DOI:10.3969/j.issn.1003-4692.2004.04.024.
- [8] 曹严华,夏胜利,顾玲,等. 2004—2005 年我国部分地区小肠结肠炎耶尔森菌宿主分布调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2007, 18(3): 238-240. DOI: 10.3969/j.issn.1003-4692.2007.03.019.
- Cao YH, Xia SL, Gu L, et al. Investigation on host-distribution of *Yersinia enterocolitica* in China in 2004 and 2005[J]. Chin J Vector Biol Control, 2007, 18(3): 238-240. DOI: 10.3969/j.issn.1003-4692.2007.03.019.
- [9] 穆玉姣,张白帆,潘静静,等. 河南省小肠结肠炎耶尔森菌病原学特征和分子分型研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019, 39(3): 180-184. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2019.03.004.
- Mu YJ, Zhang BF, Pan JJ, et al. Etiological characteristics and molecular typing of *Yersinia enterocolitica* in Henan province[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2019, 39(3): 180-184. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2019.03.004.
- [10] Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Stephan R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir[J]. Int J Food Microbiol, 2007, 119(3): 207-212. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.050.
- [11] Liang JR, Wang X, Xiao YC, 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.
- [12] Tennant SM, Grant TH, Robins-Browne RM. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, 38(2): 127-137. DOI: 10.1016/S0928-8244(03)00180-9.

收稿日期:2020-12-15 本文编辑:陈秀丽