

江苏省南通地区小肠结肠炎耶尔森菌分布特征初步研究

顾玲 汪华 朱凤才 史智扬 曾小燕 谭兆营 肖玉春 邱海燕
王鑫 金东 崔志刚 王冰 阙飙 王新生 景怀琦 徐建国

【摘要】 目的 了解江苏省南通地区小肠结肠炎耶尔森菌的分布特点和毒力特征。方法 用常规方法从家畜家禽粪便标本中分离小肠结肠炎耶尔森菌,PCR 法检测其五种毒力相关基因,同时对国内分离到的 O:8 血清型菌株进行脉冲场凝胶电泳分析。结果 从该地区 293 份家畜家禽粪便标本中分离到 91 株小肠结肠炎耶尔森菌,分离率为 31.06%。未分离到国内主要流行血清型 O:3 和 O:9,其中有 39.57% 菌株毒力基因分布特征为: *ail*⁻、*ystA*⁻、*ystB*⁻、*yadA*⁻、*virF*⁻,有 60.43% 菌株为 *ail*⁻、*ystA*⁻、*ystB*⁺、*yadA*⁻、*virF*⁻,两株国外引进的强毒菌株具有相同的脉冲图形,与国内分离到的 O:8 血清型菌株存在显著的差异。结论 致病性小肠结肠炎耶尔森菌的分布具有局限性,江苏省南通地区小肠结肠炎耶尔森菌的分布可能以非致病菌为主。

【关键词】 小肠结肠炎耶尔森菌;血清型;毒力基因

Study on the distribution of *Yersinia enterocolitica* in Nantong, Jiangsu province GU Ling^{*}, WANG Hua, ZHU Feng-cai, SHI Zhi-yang, ZENG Xiao-yan, TAN Zhao-ying, XIAO Yu-chun, QIU Hai-yan, WANG Xin, JIN Dong, CUI Zhi-gang, WANG Bing, KAN Biao, WANG Xin-sheng, JING Huai-qi, XU Jian-guo. *Jiangsu Provincial Center for Diseases Control and Prevention, Nanjing, 210009, China

Corresponding author: JING Huai-qi, Email: jinghuaiqi@icdc.cn; XU Jian-guo, Email: xujg@public.bta.net.cn Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 **Objective** To study the distribution of *Yersinia enterocolitica* and its virulence factors in Nantong, Jiangsu. **Methods** *Yersinia* strains were isolated from livestock and poultry. Conventional PCR was used to detect the virulence factors of all strains and strain O:8 was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** The combined isolation rate of *Yersinia enterocolitica* from livestock and poultry was 31.06% and the gene distribution characters were: 39.57% of them were *ail*⁻, *ystA*⁻, *ystB*⁻, *yadA*⁻, *virF*⁻; 60.43% were *ail*⁻, *ystA*⁻, *ystB*⁺, *yadA*⁻, *virF*⁻ respectively. The two reference strains from America and Denmark showed similar electrophoresis patterns but were significantly different with O:8 strains isolated from China while the serotypes of *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 which were the main epidemic strains in China, were not found in this area. **Conclusion** The pathogenic *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9 were not found in Nantong, Jiangsu province.

【Key words】 *Yersinia enterocolitica*; Serotype; Virulence gene

小肠结肠炎耶尔森菌感染是近年来受到全球重视的一种肠道传染性疾病,在许多国家已经证实由

小肠结肠炎耶尔森菌引起的感染在人群中是比较常见的,属于全球性疾病。由于该菌易在低温生长,所以在一些寒冷的国家和地区或寒冷的季节较为常见,有人称其为“冰箱病”。在 20 世纪 80 年代中期,我国发生过两次由小肠结肠炎耶尔森菌引起的流行,造成 500 多人感染^[1,2]。近年来随着人们生活水平的提高,爆发较为少见,主要以散发为主,临床症状较轻,仅有个别病例出现严重症状^[3]。小肠结肠炎耶尔森菌感染虽然属于自限性疾病,但由于其感染可引起结节性红斑、关节炎、肝炎等后遗症,值得

基金项目:国家“十五”科技攻关计划资助项目(2003BA712A05-04);江苏省“135”医学重点工程资助项目

作者单位:210009 南京,江苏省疾病预防控制中心(顾玲、汪华、朱凤才、史智扬、曾小燕、谭兆营);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(肖玉春、邱海燕、王鑫、金东、崔志刚、阙飙、景怀琦、徐建国);辽宁省沈阳市疾病预防控制中心(王冰);江苏省南通市疾病预防控制中心(王新生)

通讯作者:景怀琦,Email: jinghuaiqi@icdc.cn; 徐建国,Email: xujg@public.bta.net.cn

顾玲、汪华同为第一作者

关注。

小肠结肠炎耶尔森菌有众多的血清型,目前研究认为仅有少数几个型别具有致病性。我国致病性小肠结肠炎耶尔森菌是以O:3型为主,其次是O:9型。在美洲国家主要是以O:8型为主^[4]。为了解江苏省南通地区宿主动物中小肠结肠炎耶尔森菌分布状况及其携带毒力基因情况,开展本项研究,所要检测的毒力相关基因主要包括:位于染色体上的毒力基因:*ail* (小肠结肠炎耶尔森菌粘附侵袭位点基因)、*ystA* (小肠结肠炎耶尔森菌耐热性肠毒素基因)和 *ystB* (小肠结肠炎耶尔森菌生物 1A 型携带的肠毒素基因,此类菌株通常为非致病性菌株);位于质粒上的基因:*yadA* (粘附素,涉及到自凝、血清抗性和粘附)、*virF* (*yop* 调节子的转录活化因子),它们也是小肠结肠炎耶尔森菌致病所必需的^[5]。粘附侵袭位点 *ail*, 与 *inv* 基因没有同源性^[6], 该基因区域约有 650 bp, 编码的蛋白质相对分子质量 (M_r) 为 17×10^3 , 此蛋白与侵袭素相似, 介导小肠结肠炎耶尔森菌的侵袭性, 与小肠结肠炎耶尔森菌的致病性密切相关。

材料与方 法

1. 培养基:改良磷酸盐缓冲液、改良克氏双糖琼脂、麦康凯琼脂和半固体琼脂由江苏省微生物试剂厂提供;Rustigian's 尿素培养基由上海市疾病预防控制中心试剂厂提供。

2. 菌株的分离培养:将 293 份来自江苏省南通地区牛、羊、猪和狗的粪便标本分别接种改良磷酸盐缓冲液,于 4℃ 分别增菌培养 7 天、14 天和 21 天后转种于麦康凯平板,26℃ 培养 24~48 h,挑取可疑菌落,分别接种改良克氏双糖琼脂,26℃ 培养 24 h。产酸且不产硫化氢者转种 Rustigian's 尿素培养基,尿素阳性者分别转种两支半固体培养基,分别置于 26℃ 和 37℃ 培养 24 h。26℃ 有动力且 37℃ 无动力者为小肠结肠炎耶尔森菌疑似菌株,分别进行生化鉴定和血清分型。

3. 生化反应与血清分型:API-20E 生化试剂购自法国生物梅里埃有限公司,按试剂说明书操作;分型血清购自日本生研株式会社(包括O:1,2、O:3、O:5、O:8和O:9)和中国药品生物制品检定所(O:1,2、O:3、O:5、O:8和O:9型以外的血清),O:3及O:9单克隆抗血清由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所腹泻病室制备。

4. PCR 技术:参照文献[7,8]设计 *ail*、*ystA*、*ystB*、*yadA* 和 *virF* 五种毒力相关基因扩增引物,由北京赛百盛公司合成,引物序列见表 1。Taq DNA 聚合酶(1000 U/支)、dNTPs(100 mmol/L, $4 \times 100 \mu\text{l}$),购自华美生物工程公司。PCR 技术按常规操作。

表1 5种毒力相关基因扩增引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)	退火温度 (℃)
<i>ail</i>	F:TAA TGT GTA OGC TGC GAG	351	57
	R:GAC GTC TTA CTT GCA CTG		
<i>ystA</i>	F:ATC GAC ACC AAT AAC CGC TGA G	79	61
	R:CCA ATC ACT ACT GA CTT CGG CT		
<i>ystB</i>	F:GTA CAT TAG GCC AAG AGA CG	146	61
	R:GCA ACA TAC CTC ACA ACA CC		
<i>yadA</i>	F:CTT CAG AIA CTG GTG TCG CTG T	849	60
	R:ATG CCT GAC TAG AGC GAT ATC C		
<i>virF</i>	F:GGC AGA ACA GCA GTC AGA CAT A	561	63
	R:GGT GAG CAT AGA GAA TAC GTC G		

* 小肠结肠炎耶尔森菌血清型O:8扩增产物片段大小

5. 脉冲场凝胶电泳 (PFGE):参照美国 CDC PulseNet USA 的统一方法。所用试剂及仪器包括:内切酶 *Not I*:Promega Corporation Catalog # R6431 200 U;琼脂糖:SeaKem Gold Agarose, Cambraex Bio Science Rockland, Inc. USA;蛋白酶 K:Merck Gemany;SDS:北京鼎国生物技术发展中心,进口分装;脉冲场凝胶电泳仪:Chef Mapper, BioRad USA;读胶仪:Gel Doc 2000, BioRad USA;水浴摇床:Grant OLS2000, Grant England;浊度仪:Densimat, bioMerieux France;电泳参数:电压梯度 6 V/cm, 电场夹角 120°, 电泳缓冲液 0.5× TBE, 电泳温度 14℃, 缓冲液的流速约为 1 L/min。

结 果

1. 菌株分离情况:293 份标本中共分离到 91 株小肠结肠炎耶尔森菌,总分离率为 31.06%,其中猪分离率最高,达 34.92%,因为从牛分离的标本量少,阳性率结果不具有代表性,故未计算(表 2)。

表2 江苏省南通地区宿主动物携带 小肠结肠炎耶尔森菌情况

动物	检测份数	阳性份数	阳性率(%)
猪	126	44	34.92
羊	116	34	29.31
狗	47	11	23.40
牛	4	2	标本太少
合计	293	91	31.06

2. 血清分型情况:91 株小肠结肠炎耶尔森菌可

分为 19 个血清型,其中 O:7,8 和 O:6,30 型最多,各占 16.48% (15/91); O:5 型占 10.99% (10/91); O:16,29 型和 O:8 型各占 9.89% (9/91)。详见表 3。

表3 宿主动物中 91 株小肠结肠炎耶尔森菌血清型分布

血清型	狗(株)	牛(株)	羊(株)	猪(株)	合计(株)
O:7,8			4	11	15
O:6,30	3		6	6	15
O:5	2		1	7	10
O:16,29			6	3	9
O:8	1		2	6	9
O:12,26	2		2	3	7
O:10K	1	1	3		5
O:44	1		2	2	5
O:19,8			1	3	4
O:10		1	2		3
O:48			2		2
O:49,51				1	1
O:6,31	1				1
O:12,25				1	1
O:14				1	1
O:16			1		1
O:25				1	1
O:46			1		1
合计	11	2	33	45	91

3. 毒力基因携带情况:对 91 株小肠结肠炎耶尔森菌分别进行 *ail*、*ystA*、*ystB*、*yadA* 和 *virF* 五种毒力相关基因检测。结果显示:91 株小肠结肠炎耶尔森菌均不携带 *ail*、*ystA*、*yadA* 和 *virF* 四种毒力基因,55 株(60.43%)菌携带 *ystB* 基因(表 4)。

4. 20 株 1986 年江苏南通地区分离到小肠结肠炎耶尔森菌宿主、血清型及毒力相关基因检测结果见表 5。

5. 中国江苏分离的小肠结肠炎耶尔森菌 O:8 血清型菌株脉冲场凝胶电泳的部分结果,见图 1。结果表明从国内分离到的 O:8 血清型菌株与国外引进的两个流行株在带型上存在很大的差异,国外

引进的具有完整毒力因子的两株菌具有相同的脉冲图形。国内分离到的这些菌株之间带型也存在很大差别,只有两株菌得到了相同的聚类关系。

表4 91 株不同血清型小肠结肠炎耶尔森菌中毒力相关基因检测结果

血清型	<i>ail</i>	<i>ystA</i>	<i>ystB</i>	<i>virF</i>	<i>yadA</i>
O:10	3(0)	3(0)	3(2)	3(0)	3(0)
O:10K	5(0)	5(0)	5(4)	5(0)	5(0)
O:12,25	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)
O:12,26	7(0)	7(0)	7(1)	7(0)	7(0)
O:14	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)
O:16,29	9(0)	9(0)	9(0)	9(0)	9(0)
O:16	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)
O:19,8	4(0)	4(0)	4(1)	4(0)	4(0)
O:25	1(0)	1(0)	1(1)	1(0)	1(0)
O:44	5(0)	5(0)	5(1)	5(0)	5(0)
O:46	1(0)	1(0)	1(1)	1(0)	1(0)
O:48	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)
O:49,51	1(0)	1(0)	1(1)	1(0)	1(0)
O:5	10(0)	10(0)	10(10)	10(0)	10(0)
O:6,30	15(0)	15(0)	15(13)	15(0)	15(0)
O:6,31	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)
O:7,8	15(0)	15(0)	15(11)	15(0)	15(0)
O:8	9(0)	9(0)	9(9)	9(0)	9(0)
合计	91(0)	91(0)	91(55)	91(0)	91(0)

注:括号外数据为检测株数,括号内数据为阳性株数

表5 1986 年江苏省南通地区分离菌株的血清型及毒力相关基因检测结果

血清型	菌株总数	宿主		毒力基因				
		人	猪	<i>ail</i>	<i>ystA</i>	<i>ystB</i>	<i>virF</i>	<i>yadA</i>
O:10K	1	1		1(0)	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)
O:12,25	1	1		1(0)	1(0)	1(1)	1(0)	1(0)
O:12,26	3	2	1	3(0)	3(0)	3(0)	3(0)	3(0)
O:16,29	1	1		1(0)	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)
O:25	1	1		1(0)	1(0)	1(1)	1(0)	1(0)
O:5	5	5		5(0)	5(0)	5(5)	5(0)	5(0)
O:6,30	1	1		1(0)	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)
O:7,8	2	2		2(0)	2(0)	2(2)	2(0)	2(0)
O:8	5	5		5(0)	5(0)	5(5)	5(0)	5(0)
合计	20	2	18	20(0)	20(0)	20(14)	20(0)	20(0)

注:同表 4

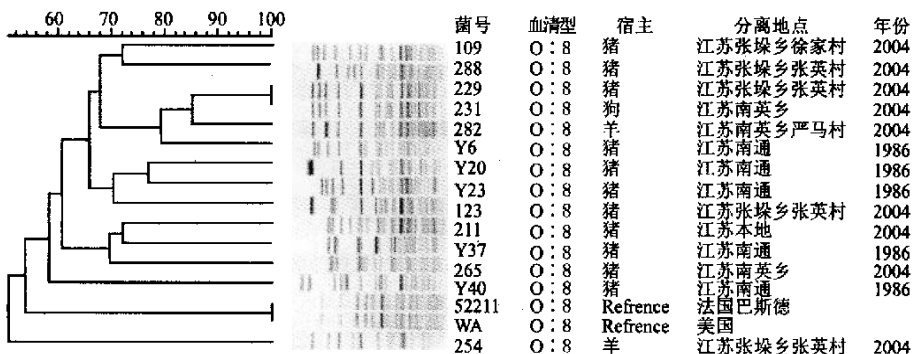


图1 国外引进 O:8 血清型菌株与江苏分离 O:8 血清型菌株脉冲场凝胶电泳图谱的聚类结果

讨 论

我们对江苏省南通地区 293 份宿主动物标本进行小肠结肠炎耶尔森菌检测,共分离到 91 株小肠结肠炎耶尔森菌,分布于 19 个血清型,其中 O:7,8 和 O:6,30 型最多,各占 16.48%; O:5 型占 10.99%; O:16,29 型和 O:8 型各占 9.89%。1986 年曾在该地区宿主动物中分离到小肠结肠炎耶尔森菌,分布于 9 个血清型: O:8 (25%, 5/20)、O:5 (20%, 4/20)、O:7,8 (15%, 3/20)、O:12,26 (5%, 1/20)、O:16,29 (5%, 1/20)、O:25 (5%, 1/20)、O:6,30 (5%, 1/20)、O:10,25 (5%, 1/20) 和 O:10K (5%, 1/20)。此次调查结果与 1986 年相似,均分离到在美国国家主要流行的 O:8 血清型,而未分离到在我国呈流行性的 O:3 和 O:9 血清型小肠结肠炎耶尔森菌。从这两个年度的调查结果,我们认为致病性小肠结肠炎耶尔森菌的分布具有局限性。

目前认为小肠结肠炎耶尔森菌的毒力基因主要包括:位于染色体上的毒力基因 *ail*、*ystA*;位于质粒上的基因 *yadA* 和 *virF*,后者是小肠结肠炎耶尔森菌致病所必须的^[6]。对 91 株小肠结肠炎耶尔森菌分别进行 *ail*、*ystA*、*ystB*、*yadA* 和 *virF* 五种毒力基因检测,除部分菌株 (60.43%) 携带 *ystB* 型肠毒素基因外,其余均不携带上述五种毒力相关基因。*ystB* 编码一种类似于 YstA 的耐热性肠毒素,它仅存在于生物 I A 型的菌株中,不具备感染的特性,大量研究证实该生物型通常是非致病性菌株。1986 年的分离株除部分携带 *ystB* 型肠毒素基因外,其余亦不携带上述五种毒力基因,与此次调查结果相似。小肠结肠炎耶尔森菌感染性疾病是一种动物源性疾病。研究结果提示:江苏省南通地区宿主动物中广泛携带该菌,但是因其不携带上述 4 种致病性基因,该地区分离株中未发现在我国能造成流行的 O:3 和 O:9 血清型,这些分离株毒力相关基因 PCR 检测除部分菌株携带 *ystB* 基因外,均为阴性(分离自腹泻患者典型致病株毒力基因的分布应为 *ail*、*ystA*、*yadA*、*virF*^[8]),即它们都属于非致病株,因此我们认为江苏省南通地区小肠结肠炎耶尔森菌的分布可能以非致病菌为主,本地区家畜家禽造成人间小肠结肠炎耶尔森菌感染的机会较少。有需要进一步加强该地区小肠结肠炎耶尔森菌监测工作以证实我们的推断。

91 株小肠结肠炎耶尔森菌中有 7 株为 O:8 血清

型,该血清型为美洲国家的主要流行型。我们所分离到的 O:8 血清型除携带 *ystB* 基因外不携带其他四种毒力基因,与欧美等国家该型流行株不同,它们缺乏致病所必需的毒力因子,因此该地区 O:8 血清型菌株不能引起感染流行。在我们的研究中观察到我国分离到的 O:8 血清型菌株虽然没有致病性,但在昆明小鼠试验中,它对国外引进的毒力株具有很好的保护性(待发表资料),脉冲场凝胶电泳的结果也证实江苏分离的 O:8 血清型小肠结肠炎耶尔森菌与典型的致病性菌株具有显著性差异,并且各菌株之间很少得到相似的脉冲图形,在江苏分离到的 14 株 O:8 血清型,只有 229 和 231 号菌株具有相同的脉冲图形,其他菌株的聚类结果都是分散的。然而两株分别从美国 (WA) 和法国巴斯德研究所 (52211) 引进的具有典型致病性的参考菌株具有相似的脉冲图形。最近我们完成了 100 多株国内的主要致病血清型 O:3 和 O:9 小肠结肠炎耶尔森菌的脉冲场凝胶电泳,各自均有十分相似的脉冲图形(待发表资料),因此我们推论小肠结肠炎耶尔森菌同一血清型的致病性菌株在遗传学上具有很高的相似。

综上所述,江苏南通地区宿主动物中广泛携带小肠结肠炎耶尔森菌,但未分离到我国主要流行血清型 O:3 和 O:9。分离株不携带致病所需的毒力因子,因此不会引起人间小肠结肠炎耶尔森菌感染。该地区小肠结肠炎耶尔森菌的分布可能以非致病菌为主。

参 考 文 献

- 1 孙殿斌,靳荣华,庞炜英,等. 我国首次发生小肠结肠炎耶尔森菌暴发流行. 中国人兽共患病杂志,1987,3(5):2-4.
- 2 沈阳市卫生防疫站. 国内首次 O:9 血清型耶尔森菌腹泻的暴发流行(小肠结肠炎耶尔森菌科论文汇编). 中华流行病学杂志,1987,16:19.
- 3 丁红,周林,王绍琴,等. 小肠结肠炎耶尔森菌败血症一例. 上海医学检验杂志,1999,14:251-253.
- 4 Rasmussen HN, Olsen JE, Rasmussen OF. RAPD analysis of *Yersinia enterocolitica*. Letters Applied Microbiol,1994,19:359-362.
- 5 Delor I, Kaackenbeeck A, Wauters G, et al. Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. Infect Immun,1990,58:2983-2988.
- 6 Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, et al. The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihist Genome. Microbiol and Mol Biol Rev,1998,62:1315-1352.
- 7 Thoerner P, Bin kingombe CI, Bögli SK, et al. PCR Detection of Virulence Gene in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and Investigation of Virulence Gene Distribution. Applied Environ Microbiol, 2003,69:1810-1816.
- 8 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. 中国媒介生物学及控制杂志,2004,15:317-319.

(收稿日期:2005-01-06)

(本文编辑:孙强正)