

## 研究报告

## 自腹泻病例和家用冰箱分离的小肠结肠炎耶尔森菌病原特征分析

张彦春,张爽,杨杰,王苗,王园园,李颖

(北京市顺义区疾病预防控制中心,北京 101300)

**摘要:**目的 研究自腹泻病例和家用冰箱中分离的小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*, Ye)的病原学特征,为科学防控Ye的污染提供依据。**方法** 采集2017年北京市顺义区2家哨点医院肠道门诊腹泻患者病例粪便标本和顺义区83户家用冰箱中的涂抹拭子样品,对分离的Ye进行毒力基因、脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型检测和耐药试验。**结果** 腹泻病例粪便标本中Ye阳性率为0.27%(1/372),家用冰箱中Ye阳性率为6.02%(5/83);冰箱分离株仅携带*ystB*基因,腹泻病例分离株携带*ail*、*ystA*、*virF*、*yadA*基因;腹泻病例和冰箱分离株PFGE带型亲缘关系较远。全部Ye对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、头孢唑林均耐药,腹泻病例分离株对茶啶酸耐药。**结论** Ye在北京市顺义区腹泻病例中流行强度不高,家用冰箱受Ye污染较为严重,腹泻病例和冰箱中分离的Ye病原学特征具有一定差异。

**关键词:** 小肠结肠炎耶尔森菌; 腹泻病例分离株; 冰箱分离株; 脉冲场凝胶电泳; 耐药性; 毒力基因

**中图分类号:** R155 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2018)06-0582-04

**DOI:** 10.13590/j.cjfh.2018.06.006

### Analysis of pathogenic characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from household refrigerators and diarrhea patients

ZHANG Yanchun, ZHANG Shuang, YANG Jie, WANG Miao, WANG Yuanyuan, LI Ying  
(Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101300, China)

**Abstract: Objective** To study the etiological characteristics of *Yersinia enterocolitica* (Ye) isolated from diarrheal patients and household refrigerators, and to provide basis for scientific prevention and control of Ye. **Methods** Stool samples were collected from diarrhea patients from two outpatients in two hospitals in Shunyi District, Beijing in 2017. Smear samples were collected from 83 household refrigerators in Shunyi District. Ye was isolated and cultured, and the isolated stains of Ye were tested for toxin genes, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) molecular typing and drug resistance tests. **Results** The positive rate of Ye was 0.27% (1/372) in stool samples of diarrhea patients and 6.02% (5/83) in household refrigerators. The strains isolated from refrigerators only carried the *ystB* gene and the strains isolated from diarrhea patients carried *ail*, *ystA*, *virF* and *yadA* genes. Six Ye strains showed 4 PFGE patterns with a low similarity. All Ye strains were resistant to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid and cefazolin, and the Ye strain isolated from diarrhea patient was resistant to nalidixic acid. **Conclusion** The prevalence of Ye was not high in the patients of diarrhea in Shunyi District of Beijing. Ye contamination in household refrigerators was more serious. Ye pathogenic characteristics in environment and diarrhea patient were different.

**Key words:** *Yersinia enterocolitica*; diarrhea isolates; refrigerator isolates; pulsed field gel electrophoresis; drug resistance; toxin gene

小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*, Ye)广泛分布于自然界,是少数几种能在冷藏温度下生长的肠道致病菌之一,该菌天然寄居在多种动物体内,如猪、鼠、家畜等,通过污染食物(牛奶、猪

肉等)和水经粪-口途径感染或因接触染疫动物而感染。在欧洲,Ye和弯曲菌、沙门菌都是重要的人兽共患病原菌<sup>[1-3]</sup>。Ye的毒力基因主要有5种,其中包括染色体源毒力基因*ail*、*ystA*、*ystB*和质粒源毒力基因*yadA*、*virF*。其中*ail*、*ystA*、*yadA*、*virF*基因都与腹泻密切相关。由于Ye嗜冷,因此家用冰箱也可成为Ye污染食物进而感染人群的重要来源。2017年,北京市顺义区开展腹泻病例中Ye的病原学监测,为配合腹泻病例分离菌株的病原学特征分析和

收稿日期:2018-07-27

作者简介:张彦春 女 主管检验师 研究方向为微生物

E-mail: 1120714627@qq.com

通信作者:李颖 男 主管检验师 研究方向为病原微生物

E-mail: liying19830805@126.com

溯源分析,本研究同时开展了顺义区居民家用冰箱中 *Ye* 的污染状况调查,对分离的 *Ye* 的病原特征与耐药情况进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品及标本来源

腹泻病例的新鲜粪便标本采集自顺义区 2 家哨点医院(顺义区医院和顺义区空港医院),腹泻病例定义为腹泻次数  $\geq 3$  次/d<sup>[4]</sup>。2017 年采集腹泻粪便标本共 372 份,其中 4~10 月采集标本数量  $\geq 40$  份/月,其他月份采集标本数量  $\geq 10$  份/月。标本采集后 4℃ 暂存,24 h 内送北京市顺义区疾病预防控制中心进行病原学分离培养。

冰箱涂抹拭子样品采集自顺义区 83 户居民家庭,包括农户和非农户。样品由顺义区疾病预防控制中心专业人员入户采集,使用无菌棉拭子蘸取 0.85% 生理盐水反复涂抹冰箱内壁、隔板、搁物架等位置,插入改良磷酸盐缓冲液中送回实验室进行 *Ye* 的分离培养。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

聚合酶链式反应(PCR)仪和脉冲场凝胶电泳(PFGE)仪均购自美国 Bio-Rad, Vitek II Compact 生化鉴定仪(法国 Biomerieux),生物安全柜,恒温培养箱,台式离心机。

耶尔森选择性培养基(英国 OXOID),胰大豆琼脂(TSA,北京陆桥技术股份有限公司),*Not I* 内切酶(日本 Tarkara),抗生素药敏板及药敏肉汤均购自上海星佰生物技术有限公司,包括针对所有菌株的氨苄西林(AMP)、氨苄西林/舒巴坦(AMS)、四环素(TET)、氯霉素(CHL)、复方新诺明(SXT)、头孢唑林(CFZ)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢西丁(CFX)、庆大霉素(GEN)、亚胺培南(IPM)、萘啶酸(NAL)、阿奇霉素(AZI)、磺胺异噁唑(SFZ)、环丙沙星(CIP)、阿莫西林/克拉维酸(AMC)、头孢噻肟/克拉维酸(CTX-C)、头孢他啶/克拉维酸(CAZ-C)、多粘菌素 E(CT)、多粘菌素 B(PB)、米诺环素(MIN)、阿米卡星(AMI)、氨基糖苷类(AM)、头孢吡肟(FEP)、美罗培南(MEM)、左氧氟沙星(LEV)、多西环素(DOX)、卡那霉素(KAN)、链霉素(STR)、吉米沙星(GEM)。检测引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株分离培养

将少许腹泻病例粪便标本加入改良磷酸盐缓冲液中进行冷增菌,冰箱涂抹拭子样品直接进行 4℃、21 d 冷增菌。用 10  $\mu$ l 接种环取 1 环增菌液接

种于耶尔森菌选择性培养基中,26℃ 培养 72~96 h,挑取可疑单克隆菌落转种 TSA 培养基,26℃ 培养 24 h。

#### 1.2.2 毒力基因、分子分型检测和耐药试验

使用 Vitek II (GN 卡)进行细菌鉴定,阳性菌株进行 5 种毒力基因(*ail*、*ystA*、*ystB*、*yadA*、*virF*)检测<sup>[5]</sup>、PFGE 分子分型检测(*Not I* 酶切)<sup>[6]</sup>和耐药试验。指纹图谱上传至国家致病菌识别网进行聚类分析。

## 2 结果

### 2.1 *Ye* 分离情况

372 份腹泻病例粪便标本中检出 1 株 *Ye*,阳性率为 0.27% (1/372),阳性病例为 1 名 6 岁男性托幼儿童,其临床症状表现为腹痛、腹泻 3 次/d,粪便性状为水样便,无发热等全身症状,其可疑感染食品是家庭自制的蒸螃蟹。83 份家用冰箱涂抹拭子样品中检出 5 株 *Ye*,阳性率为 6.02% (5/83)。*Ye* 在耶尔森选择性培养基上呈粉红色中央凸起的“乳头”状菌落,培养 48 h 后菌落较小,中央突起不明显;培养 72~96 h 后菌落较大,中央凸起典型。

### 2.2 *Ye* 毒力基因检测情况

对 5 株冰箱分离株和 1 株腹泻病例分离株进行 5 种毒力基因(*ail*、*ystA*、*ystB*、*yadA*、*virF*) PCR 检测,检测结果见表 1。

表 1 6 株 *Ye* 菌株的 5 种毒力基因 PCR 检测结果

Table 1 PCR detection results of 5 toxin genes for

6 *Ye* isolates

| 菌株编号              | 来源   | 染色体源毒力基因   |             |             | 质粒源毒力基因     |             |
|-------------------|------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                   |      | <i>ail</i> | <i>ystA</i> | <i>ystB</i> | <i>yadA</i> | <i>virF</i> |
| BJSY2017Ye(HJ)001 | 冰箱   | -          | -           | +           | -           | -           |
| BJSY2017Ye(HJ)002 | 冰箱   | -          | -           | +           | -           | -           |
| BJSY2017Ye(HJ)003 | 冰箱   | -          | -           | +           | -           | -           |
| BJSY2017Ye(HJ)004 | 冰箱   | -          | -           | +           | -           | -           |
| BJSY2017Ye(HJ)005 | 冰箱   | -          | -           | +           | -           | -           |
| BJSY2017Ye001     | 腹泻病例 | +          | +           | -           | +           | +           |

注: + 表示阳性; - 表示阴性

### 2.3 *Ye* 的 PFGE 分子分型检测结果

6 株 *Ye* 经过 *Not I* 酶切电泳后获得 PFGE 条带,5 株冰箱分离株分成 3 种带型,其中 2 种带型中分别具有 2 株亲缘相似程度为 100.00% 的 *Ye*;另外 1 株冰箱分离株为一种独立带型;腹泻病例分离株为一种独立带型。4 种带型的亲缘关系介于 55.01%~62.96% 之间,聚类图见图 1。

### 2.4 *Ye* 的耐药试验结果

对 6 株 *Ye* 进行 30 种抗生素耐药检测,相同 PFGE 带型 *Ye* 呈现相同的耐药谱。5 株冰箱分离

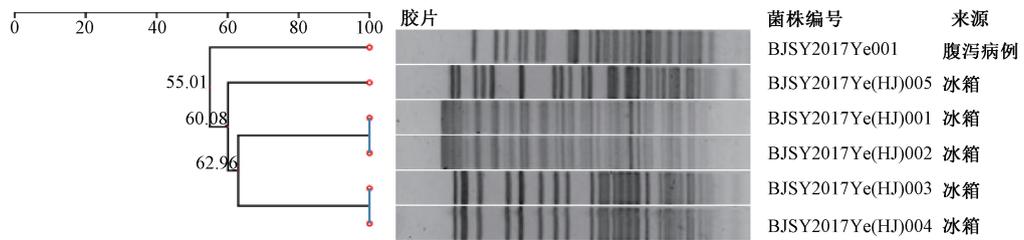


图1 6株Ye菌株的PFGE指纹图谱聚类图

Figure 1 PFGE fingerprints clustering diagrams of 6 Ye isolates

株主要对AMP、AMS、CFZ、CFX、AMC等 $\beta$ -内酰胺酶类抗生素耐药,而腹泻病例分离株除对 $\beta$ -内酰胺酶类抗生素耐药外,对喹诺酮类抗生素NAL也表现为耐药。6株Ye的耐药谱见表2。

表2 6株Ye菌株的耐药谱情况

Table 2 Antimicrobial resistance spectrums of 6 Ye isolates

| 菌株编号              | 来源   | 耐药谱                         |
|-------------------|------|-----------------------------|
| BJSY2017Ye(HJ)001 | 冰箱   | AMP + CFZ + AMC             |
| BJSY2017Ye(HJ)002 | 冰箱   | AMP + CFZ + AMC             |
| BJSY2017Ye(HJ)003 | 冰箱   | AMP + AMS + CFZ + CFX + AMC |
| BJSY2017Ye(HJ)004 | 冰箱   | AMP + AMS + CFZ + CFX + AMC |
| BJSY2017Ye(HJ)005 | 冰箱   | AMP + CFZ + AMC             |
| BJSY2017Ye001     | 腹泻病例 | AMP + CFZ + CFX + NAL + AMC |

### 3 讨论

本次研究中,腹泻病例监测中Ye阳性率为0.27%,与王鑫等<sup>[7]</sup>报道中国腹泻病例中Ye阳性率(0.42%)较为接近。唯一的阳性病例出现在2017年11月,感染时间所处季节符合Ye具有嗜冷性的特征。与中国北京、深圳、上海、台湾、无锡等地区的报道<sup>[8-14]</sup>比较,Ye流行强度低于沙门菌、弯曲菌、致泻大肠埃希菌、副溶血性弧菌等常见导致腹泻的病原菌。Ye在顺义区流行强度不高,其季节、人群和临床症状分布情况还需要通过进一步监测深入分析。

本次研究中83份家用冰箱涂抹拭子样品中Ye阳性率为6.02%,证明家用冰箱中Ye的污染状况较为严重。分离到Ye的冰箱使用年限为1~7年,说明Ye污染和冰箱新旧无明显的相关性。5台被Ye污染的冰箱中有3台日常清洗频率为每年2~3次,清洗使用清水或洗涤灵等不具有消毒效果的溶液;另外2台冰箱从不清洗。这些信息从一定程度反映出科学的日常维护是造成冰箱被Ye污染的原因之一。

冰箱和腹泻病例分离株的毒力基因分布存在差异。冰箱分离株仅携带 $ystB$ 基因,这种类型的Ye通常不具有致病性;腹泻病例分离株携带 $ail$ 、 $ystA$ 、 $virF$ 和 $yadA$ 基因,是典型的致病型Ye携带毒力基因的特征<sup>[15]</sup>。

6株Ye的PFGE条带分为4种带型,腹泻病例分离株和冰箱分离株带型的亲缘关系较远,但5株冰箱分离株中出现2次2种带型的成簇现象,而这些冰箱随机抽取自顺义区不同居民家庭,无任何相关性。这也说明环境中Ye的分布存在一定规律,需要更多环境菌株的积累以发现更多Ye分布的特征。

从6株Ye耐药情况看出,5株冰箱分离株所耐受的抗生素均属于 $\beta$ -内酰胺酶类,相同PFGE条带Ye表现相同的耐药特征。Ye对一代头孢(CFZ)和二代头孢(CFX)均耐药,对三代头孢(CTX和CAZ)和四代头孢(FEP)依然敏感;6株Ye对AMP和AMC均表现为耐药,同种带型的2株Ye对AMS也出现了耐药。腹泻病例分离株出现了对喹诺酮类抗生素NAL的耐药,这可能与临床广泛使用NAL具有一定关联。从这6株Ye耐药试验结果看出,腹泻病例分离株和冰箱分离株的耐药特征既有一定关联又有一些区别,Ye对 $\beta$ -内酰胺酶类抗生素的耐药形式较为严峻,临床应关注喹诺酮类抗生素使用对Ye进化产生的影响。

### 参考文献

- [1] TRCEK J, FUCHS T M, TRÜLZSCH K. Analysis of *Yersinia enterocolitica* ainvasin expression in vitro and in vivo using a novel luxCDABE reporter system[J]. Microbiology, 2010, 156(9): 2734-2745.
- [2] BOTTONE E J. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1997, 10(2):257-276.
- [3] DUAN R, LIANG J R, ZHANG J, et al. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 3/O:3 among children with diarrhea, China, 2010-2015[J]. Emerging Infectious Diseases, 2017, 23(9):1502-1509.
- [4] KOTLOFF K L, NATARO J P, BLACKWELDER W C, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the global enteric multicenter study, GEMS): a prospective, case-control study[J]. Lancet, 2013, 382(9888):209-222.
- [5] 徐建国, 阚颀, 张建中, 等. 现场细菌学[M]. 北京: 科学出版社, 2011:156-157.
- [6] WANG X, CUI Z H, TANG L, et al. Pathogenic strains of

- Yersinia enterocolitica* isolated from domestic dogs (*Canis familiaris*) belonging to farmers are of the same subtype as pathogenic *Y. enterocolitica* strains isolated from humans and may be a source of human infection in Jiangsu Province, China [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(5):1604-1610.
- [7] WANG X, WANG J, SUN H, et al. Etiology of childhood infectious diarrhea in a developed region of China: compared to childhood diarrhea in a developing region and adult diarrhea in a developed region [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11):e0142136.
- [8] SHEN H W, ZHANG J J, LI Y H, et al. The 12 gastrointestinal pathogens spectrum of acute infectious diarrhea in a sentinel hospital, Shenzhen, China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7(28):1926.
- [9] CHI C Y, LIAO L N, HO C M, et al. Epidemiology, clinical features, and microbiology of patients with diarrhea in community clinics in Taiwan [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2017, 51(4):527-534.
- [10] 闻艳红, 彭华, 徐代庆, 等. 2012—2016 年北京市昌平区感染性腹泻病原菌检测结果分析 [J]. *现代预防医学*, 2017, 44(13):2444-2447, 2452.
- [11] 朱美娟, 李颖, 王彦波. 2013—2015 年北京市顺义区 947 份感染性腹泻病原菌监测结果分析 [J]. *现代预防医学*, 2017, 44(4):734-737, 754.
- [12] 沙丹, 李泓, 管红霞, 等. 无锡市腹泻病人沙门菌的病原学特征及分子分型研究 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2017, 33(4):378-381.
- [13] 沈隽卿, 张月娟, 袁国平, 等. 2010—2014 年上海市宝山区沙门菌监测分析及能力评估 [J]. *疾病监测*, 2016, 31(7):546-553.
- [14] 黎剑华, 龙冬玲, 卓菲, 等. 2012 年—2013 年深圳市罗湖区腹泻患者沙门菌流行特征及耐药情况分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(3):447-449.
- [15] 汪华. 小肠结肠炎耶尔森菌 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.

## 《中国食物与营养》2019 年征稿征订启事

中国科技核心期刊 中国农业核心期刊  
在线投稿系统: <http://foodandn.caas.cn>

《中国食物与营养》创办于 1995 年, 由农业部主管, 中国农业科学院、国家食物与营养咨询委员会主办的食物与营养领域相结合的综合性月刊, 国内外公开发行。2018 年影响因子为 0.918。

**办刊宗旨:** 立足于农业、食物、营养领域的结合, 报道国家在食物与营养相关领域的方针、政策、法规、标准等; 刊登食物生产、食物消费、食品工业、食物营养、公共营养、临床营养等方面的发展动态和科技成果等。

**本刊主要栏目有:** 专题论坛、食物安全、食物生产、食品工业、消费与流通、营养与健康、营养与疾病、膳食营养调查等。

《中国食物与营养》杂志由北京报刊发行局发行, 邮发代号为 82-597。本刊为月刊, 每期定价 15 元, 全年 180 元。也可直接汇款到编辑部订阅。

地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号《中国食物与营养》编辑部

电话: (010)82105306 传真: (010)82105184 邮编: 100081

E-mail: [sfnccli@163.com](mailto:sfnccli@163.com); [zgswwyy@caas.cn](mailto:zgswwyy@caas.cn)

## 《中国临床新医学》杂志重点论文征稿及奖励启事

《中国临床新医学》杂志是由中华人民共和国国家卫生健康委员会主管, 由中国医师协会和广西壮族自治区人民医院共同主办的国家级医学学术性科技期刊。本刊重点诚征各级基金课题论文和博士、硕士研究生毕业论文, 对重点论文开辟“快速通道”。以最快速度发表, 并给予 1000~2000 元奖励, 欢迎赐稿。具体请扫描本刊微信公众号。

投稿网址: [www.zglcxyxzz.com](http://www.zglcxyxzz.com) 邮箱地址: [zglcxyxzz@163.com](mailto:zglcxyxzz@163.com) 咨询电话: 0771-2186013

