

调查研究

一起引起食源性疾病的小肠结肠炎耶尔森菌分离菌株的检测分析

包云娟

(东阳市疾病预防控制中心,浙江 东阳 322100)

摘要:目的 了解一株引起婴幼儿腹泻的食源性疾病的小肠结肠炎耶尔森菌的血清型、毒力基因携带和耐药性。方法 通过血清凝集法、改良 K-B 纸片法及 PCR 法,对分离菌株进行血清分型、药敏试验、毒力基因(*ail*, *ystB*, *virF*)及 O:3 血清型菌株特异性脂多糖 O-侧链的生物合成基因 *rfbc* 的检测。结果 本菌株 O:3 血清凝集试验阳性,带有毒力基因 *ail*、*virF* 及 O:3 血清型菌株特异性鉴别基因 *rfbc*,而毒力基因 *ystB* 阴性;该菌株已对头孢唑林、氨苄西林和复方新诺明产生耐药,但对其他头孢类、碳青霉烯类、氨基糖苷类等药物敏感。结论 引起食源性疾病的病原菌是 O:3 血清型且带有 *ail*、*virF* 毒力基因的致病性非 1A 型小肠结肠炎耶尔森菌。

关键词:小肠结肠炎耶尔森菌;毒力基因;血清型;致病性;耐药;PCR

中图分类号:R18 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)04-0375-03

Analysis on a Case of Foodborne Disease Caused by *Yersinia enterocolitica*

BAO Yun-juan

(Dongyang Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Dongyang 322100, China)

Abstract: Objective To investigate the serotype, pathogenicity and drug resistance of *Yersinia enterocolitica* causing a case of foodborne disease. **Method** Serum agglutination method, modified K-B paper method and PCR were used for serotyping, evaluation on sensitivity, detection of virulence genes (*ail*, *ystB*, *virF*) and the *rfbc* gene which biosynthesizing the specific lipopolysaccharide O-side chain of O: 3 serotype strain. **Results** The *Y. enterocolitica* strain isolated in this study is positive in O: 3 serotyping test, carrying the virulence genes of *ail* and *virF* and specific gene *rfbc* but no *ystB*. The strain is resistant to cefazolin, ampicillin, and sulfamethoxazole compound, but sensitive to other drugs such as cephalosporins, carbapenems, and aminoglycoside. **Conclusions** The case of foodborne disease is caused by pathogenic non-biotype 1A serotype O: 3 *Yersinia enterocolitica* strains carrying virulence genes of *ail* and *virF*.

Key words: *Yersinia enterocolitica*; Virulence Genes; Serotype; Pathogenicity; Drug Resistance; PCR

2007年6月,东阳市疾病预防控制中心接临床食源性疾病监测哨点医院(东阳市人民医院)报告一起因小肠结肠炎耶尔森菌引起食源性疾病的案例。该患者为一2岁女婴,症状表现为严重腹泻,因到个体诊所进行治疗但症状未得到缓解,遂送至本市人民医院急诊科诊治。经对大便检查,大便为粘液状的黄色大便,隐血试验±,镜检白细胞5~7个,未检出寄生虫卵,但大便培养检出小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)。对患者饮食史进行调查发现,该患者近期曾食用冰箱存储的水果。综合流行病学调查情况及实验室检测结果,判断本病为小肠结肠炎耶尔森菌引起的食源性疾病,是典型的“冰箱病”。为了解分离菌株具体的血清型、耐药性

以及致病基因携带情况,特对菌株做了进一步检测,现将检测结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

腹泻患者大便。

1.2 培养基、试剂及仪器

耶尔森菌选择琼脂基础和添加剂由英国 Oxoid 公司生产;改良克氏双糖铁琼脂、脑心浸液琼脂、尿素反应管购自北京陆桥技术有限责任公司;API20E 生化试剂条由法国-生物梅里埃生产;诊断血清购自日本生研株式会社(O:1、O:2、O:3、O:5、O:8、O:9)和中国药品生物制品检定所(除生研以外的其他血清),但 O:3 单克隆抗血清则由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所腹泻病室提供;TaqDNA 聚合酶(1 000 U/支)、dNTP(100 mmol/L, 4 × 100 μl)购自华美生物工程公司;引物由赛百盛公司合成;TC-

收稿日期:2009-11-13

作者简介:包云娟 女 副主任技师 研究方向为食品微生物和食源性病原微生物。E-mail: baoyunjuan@sina.com

25/H型PCR仪购自杭州大和热磁电子有限公司; Gel Documentation 2000型读胶仪购自BIORAD公司; ATB全自动细菌检测仪购自法国-生物梅里埃公司。

1.3 药物敏感试验

药敏纸片由杭州微生物试剂厂生产。采用WHO推荐的改良K-B纸片法,结果解释参照临床实验室标准化委员会(CLSI)的临界值判断标准。18种抗生素分别为:氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢唑啉、头孢吡肟、头孢曲松、头孢替坦、头孢他定、氨基曲南、庆大霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素、呋喃妥因、环丙沙星、左氧氟沙星、亚胺培南、厄他培南、复方新诺明。质控菌株ATCC25922大肠埃希菌、ATCC25923金黄色葡萄球菌由浙江省疾病预防控制中心提供。所有药敏纸片均在有效期内使用。

1.4 菌株培养

挑取耶尔森菌选择性培养基上中间红色且边缘无色透明的可疑菌落,接种于改良克氏双糖培养基25℃、尿素反应管25℃、半固体37℃/25℃、脑心浸液琼脂25℃中经24h培养,以备观测相应培养结果及生化条反应、血清凝集、药敏试验及PCR检测用。

1.5 基因检测

1.5.1 DNA模板制备 脑心浸液琼脂培养基上挑

取28℃24h培养物适量,于0.4ml灭菌去离子水中研磨均匀,置-80℃冰箱冷冻过夜后,煮沸20min,迅速冰浴冷却,10000r/min离心10min,取上清液作为模板,-20℃冻存备用。

1.5.2 引物/PCR扩增 用于检测小肠结肠炎耶尔森菌染色体上的侵袭黏附位点*ail*、肠毒素基因*ystB*及转录活化因子*virF*毒力基因引物均参照国外文献[1];用于检测小肠结肠炎耶尔森菌O:3血清型菌株特异性脂多糖O-侧链*rfbC*基因的特异性引物则参照文献[2]。各引物序列及退火温度见表1。25μl PCR反应体系中,模板1μl, TaqDNA聚合酶1U, MgCl₂ 1.5mmol/L, dNTP 200μmol/L, 引物0.1μmol/L。扩增参数为94℃预变性5min, 94℃变性15s, 退火30s(退火温度见表1), 72℃延伸30s, 25个循环, 最后72℃延伸10min。PCR反应时设空白对照和阳性对照。阳性对照菌株分别为O:3血清型ATCC52203和O:9血清型ATCC52212。

2 结果

2.1 菌株培养/生化/血清学结果

尿素酶阳性, 37℃无动力, 25℃有动力, 改良克氏双糖斜面培养结果为A/A--; API-20E生化鉴定结果生化谱为1114521, 可信度为99.9%, 生化反应结果具体见表2。血清学玻片凝集试验鉴定该菌株为O:3血清型。

表1 实验中所用引物及退火温度

引物名称	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)	退火温度(℃)
<i>ail</i>			
Forward	TAA TGT GTA CGC TGC GAG	351	57
Reverse	GAC GTC TTA CTT GCA CTG		
<i>ystB</i>			
Forward	GTA CAT TAG GCC AAG AGA CG	146	61
Reverse	GCA ACA TAC CTC ACA ACA CC		
<i>virF</i>			
Forward	GGC AGA ACA GCA GTC AGA CAT A	561	63
Reverse	GGT GAG CAT AGA GAA TAC GTC G		
<i>rfbC</i>			
Forward	CGC ATC TGG GAC ACT AAT TCG	405	55
Reverse	CCA CGA ATT CCA TCA AAA CCA CC		

表2 生化谱1114521结果

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL
+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	
+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	

2.2 药敏试验结果

该菌株仅对头孢类头孢唑啉、青霉素类氨苄西林、磺胺类复方新诺明等耐药,而对单环丙酰胺类氨基曲南及硝基呋喃类呋喃妥因为中度敏感,但对氨

苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢比肟、头孢曲松、头孢替坦、头孢他定、庆大霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、亚胺培南、厄他培南则均显示为敏感。

2.3 基因检测结果

经 PCR 检测发现,该菌株携带有 *ail*、*virF* 毒力基因,未检测出 *ystB* 毒力基因,O:3 血清型鉴别基因 *rfbC* 检测为阳性,见表 3。

表 3 基因检测结果

基因名称	<i>ail</i>	<i>ystB</i>	<i>virF</i>	<i>rfbC</i>
检测结果	+	-	+	+

3 讨论

该患者是由 O:3 血清型且带有 *ail*、*virF* 毒力基因的小肠结肠炎耶尔森菌引起腹泻的散发食源性典型病例。小肠结肠炎耶尔森菌病(耶氏病)是 20 世纪 80 年代以来引起国际社会广泛关注的一种新的肠道传染病,世界各大洲均有发现,是欧洲某些国家腹泻的主要病种,不少地区小肠结肠炎耶尔森菌引起的胃肠炎和严重腹泻比痢疾还多^[3]。耶氏病一年四季均有发生,因为本菌易在低温生长,因此在寒冷地区或在寒冷的季节较为常见,也称为“冰箱病”,尤以冬春季为多。另外,小肠结肠炎耶尔森菌分布广泛,可存在于生的蔬菜、水果、乳和乳制品、肉类等中,也存在于家畜、家禽、啮齿动物、爬行动物、水生动物和观赏动物中。人类通过进食被污染的饮水、食物等造成感染。我国疫情以散发为主,如 1986 年兰州市城关区古城坪发生由 O:3 血清型小肠结肠炎耶尔森菌引起的人腹泻暴发流行、1987 年沈阳市某中等专科学校发生因 O:9 血清型小肠结肠炎耶尔森菌所致的一起腹泻暴发流行^[4]。小肠结肠炎耶尔森菌的致病性主要与分布在染色体和 70Kb 质粒编码的毒力因子有关,并且只有染色体和质粒编码的毒力因子共同作用,才能使小肠结肠炎耶尔森菌通过肠粘膜进入下层淋巴组织定居繁殖,发挥其致病作用^[5]。少数病人病原菌经血流散布,造成全身化或带给关节和其他组织,引起肠外型的小肠结肠炎耶尔森菌感染,而婴幼儿则多见于腹泻。

该幼儿病人是通过食用被小肠结肠炎耶尔森菌污染的水果而引致腹泻的,发病原因与以上陈述相符。经对分离株进行生化鉴定、血清学玻片凝集试验初步鉴定为 O:3 血清型小肠结肠炎耶尔森菌。再对该菌株作进一步 PCR 检测发现,该菌株染色体源基因 *ail* 即粘附侵袭位点基因阳性,可见该菌株具有侵袭性,其次质粒(*pYV*)源毒力基因 *virF*(*yop* 调节子的转录活化因子)阳性,表明其具有致病性(因致病性耶尔森菌质粒编码的 *YOPs* 是毒力决定因子之一,已证实它们在致病过程中具有很重要的作用^[4]),而 *ystB* 检测为阴性,则表明该菌株为非 1A 型小肠结肠炎耶尔森菌;因 *rfbC* 基因是小肠结肠炎耶尔森菌 O:3 血清型菌株特异性脂多糖 O-侧链的特异性鉴别基因,该基因检测阳性,表明该菌株应是 O:3 血清型菌株,这与血清凝集结果相符。综上所述,该菌株应为 O:3 血清型且毒力基因 *ail* + *virF* + 而 *ystB* - 的致病性非 1A 型小肠结肠炎耶尔森菌。药敏试验结果表明,该菌株虽对大部分其他所测抗生素敏感,但对头孢类头孢唑啉、青霉素类氨苄西林、磺胺类复方新诺明药物已产生耐药,故建议今后在治疗该类腹泻病人时,应注意上述药物的使用。

参考文献

- [1] THOERNER P, BIN KINGOMBE C I, BOGLI-STUBER K, et al. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69 (3): 1810-1816.
- [2] WEYNANTS V, JADOT V, DENOEL P A, et al. Detection of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 by a PCR method [J]. *J Clin Microbiol*. 1996, 34(5):1224-1227.
- [3] 金培刚,丁刚强,顾振华. 食源性疾病预防与应急处置[M]. 上海:复旦大学出版社,2006: 58.
- [4] 于恩庶,徐秉锟. 中国人兽共患病学[M]. 2 版. 福州:福建科学技术出版社,1996: 67.
- [5] 孟真,石国祥. 浙江省部分地区小肠结肠炎耶尔森菌(动物株)分子生物学特性初探[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17 (1):60-62.