

· 调查研究 ·

登封市屠宰场生猪小肠结肠炎耶尔森菌病原学研究

张胜勇¹, 夏胜利², 王德祥¹, 张锦², 李洪民¹

1 登封市卫生防疫站, 河南 登封 452470; 2 河南省疾病预防控制中心, 郑州 450016

摘要: **目的** 了解登封市屠宰场生猪小肠结肠炎耶尔森菌带菌率、血清分型、毒力基因分布等情况, 为制定预防措施提供参考依据。 **方法** 从屠宰场生猪扁桃体及回盲部内容物中分离小肠结肠炎耶尔森菌, 并进行生化鉴定、血清分型、毒力基因 PCR 检测。 **结果** 从 196 份生猪咽拭子中分离出 107 株小肠结肠炎耶尔森菌, 检出率为 54.59%; 从 196 份生猪肛拭子中分离出 36 株小肠结肠炎耶尔森菌, 检出率为 18.37%。检出菌血清型为 O:3, 生物型为 3 型, I 型(*ail*⁺, *ystA*⁺, *ystB*⁻, *yadA*⁺, *virF*⁺) 占 93.71% (134/143), II 型(*ail*⁺, *ystA*⁺, *ystB*⁻, *yadA*⁻, *virF*⁻) 占 6.29% (9/143)。 **结论** 登封市生猪小肠结肠炎耶尔森菌以致病菌株为主, 今后应加强该菌的进一步监测工作。

关键词: 生猪; 小肠结肠炎耶尔森菌; 毒力基因; 生物分型

中图分类号: R378 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2014)05-0459-03

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.05.020

Etiological study of *Yersinia enterocolitica* isolated from live pigs in abattoirs in Dengfeng, China

ZHANG Sheng-yong¹, XIA Sheng-li², WANG De-xiang¹, ZHANG Jin², LI Hong-min¹

1 Dengfeng Hygiene and Anti-Epidemic Station, Dengfeng 452470, Henan Province, China;

2 Henan Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, Henan Province, China

Corresponding author: XIA Sheng-li, Email: xiasl@hncdc.com.cn

Supported by the 12th Five-Year Major National Science and Technology Projects of China (No. 2013ZX10004203-002-002)

Abstract: Objective To investigate the detection rate, serotype, and virulence gene distribution of *Yersinia enterocolitica* isolated from live pigs in Dengfeng, China, and to provide reference for the development of preventive measures. **Methods** *Yersinia enterocolitica* was isolated from the pharyngeal swabs (tonsils) and intestinal contents (at the ileocecal junction), which were collected from the live pigs in abattoirs in Dengfeng. Biochemical identification, serotyping, and PCR detection of virulence gene were performed on the isolates. **Results** A total of 107 strains of *Y. enterocolitica* were isolated from 196 pharyngeal swabs, with a detection rate of 54.59%; 36 strains were isolated from 196 intestinal contents, with a detection rate of 18.37%. The serotype of the isolates was O:3. Three biological types were identified as follows: type I (*ail*⁺, *ystA*⁺, *ystB*⁻, *yadA*⁺, *virF*⁺), with a ratio of 93.71% (134/143), and type II (*ail*⁺, *ystA*⁺, *ystB*⁻, *yadA*⁻, *virF*⁻), with a ratio of 6.29% (9/143). **Conclusion** The pathogenic strains are dominant among *Y. enterocolitica* isolated from live pigs in Dengfeng. Monitoring of *Y. enterocolitica* should be strengthened in the future.

Key words: Live pig; *Yersinia enterocolitica*; Virulence gene; Biological type

小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)隶属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae), 耶尔森菌属(*Yersinia*)。目前, 耶尔森菌属包括 11 个种, 其中致病的有 3 个种。它们为鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)、假结核耶尔森菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)和小肠结肠炎耶尔森菌。小肠结肠炎耶尔森菌广泛存在于自然界的各种动物宿主, 家畜、家禽的带菌率较高。历史研究文献显示猪是该菌致病性菌株的主要宿主^[1-3], 尤其是猪扁桃体及猪

回盲部内容物中小肠结肠炎耶尔森菌分离率较高。为了解登封市猪扁桃体及回盲部内容物携带小肠结肠炎耶尔森菌现状, 在登封市生猪屠宰场采集猪咽拭子及猪肛拭子标本, 对其进行常规培养、生化鉴定、生物分型、血清分型、毒力基因检测等。进而分析生猪携带该菌的病原学特征, 为预防小肠结肠炎耶尔森菌传播提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2013 年, 在登封市定点生猪屠宰场, 用消毒好的棉拭子(特制加长)采集刚屠宰后的生猪咽拭子及肛拭子各 196 份, 立即放入已备好的 10 ml 改良

基金项目: 国家“十二五”科技重大专项课题(2013ZX10004203-002-002)

作者简介: 张胜勇, 男, 硕士, 主管检验师, 从事微生物学检验研究,

Email: zsy0371@163.com

通讯作者: 夏胜利, Email: xiasl@hncdc.com.cn

PBS 培养基带回实验室。屠宰场生猪来源于登封市周边农户(散养)。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离培养 将采集标本于 4 °C 冷增菌培养,分别于 7、14、21 d 后转种小肠结肠炎耶尔森菌选择性培养基,25 °C 培养 24~36 h,挑取疑似菌落转种克氏双糖斜面 25 °C 培养 24 h,选择克氏双糖+/+、不产气、H₂S⁻,接种于尿素培养基及半固体培养基,选择尿素酶+、25 °C 培养动力+、37 °C 培养动力-,镜检为革兰阴性杆菌或椭圆或球杆菌细菌者,使用 API20E(法国生物梅里埃公司 API20E 肠道菌生化鉴定板条)生化板条进行系统生化鉴定。

1.2.2 生物分型 生化反应是小肠结肠炎耶尔森菌鉴定的主要依据,同时将检测结果作为生物分型的依据。具体参照文献[4]的生物分型方法进行。

1.2.3 菌株的血清分型 对鉴定结果为小肠结肠炎耶尔森菌的菌株进行血清学分型。在血清学分型过程中设盐水对照。

1.2.4 PCR 检测 借助 PCR 检测技术对小肠结肠炎耶尔森菌黏附侵袭点基因(*ail*)、耐热性肠毒素基因(*ystA*)、生物 1A 型携带的肠毒素基因(*ystB*)、黏附素(*yadA*)、*yop* 调节子转录活化作用因子(*virF*)等进行检测。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离(170 V, 30 min)。引物序列见表 1。

表 1 各检测基因 PCR 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(°C)
<i>foxA</i>	Forward:GGT TCC TTG AGC GTA TTG ATG Revrs:GGT CAT CGG TTT CAG CAG TTT	1094	58
<i>ail</i>	Forward:TAA TGT GTA CGC TGC GAG Revrs:GAC GTC TTA CTT GCA CTG	351	57
<i>ystA</i>	Forward:ATC GAC ACC AAT AAC CGC TGA G Revrs:CCA ATC ACT ACT GA CTT CGG CT	79	61
<i>ystB</i>	Forward:GTA CAT TAG GCC AAG AGA CG Revrs:GCA ACA TAC CTC ACA ACA CC	146	61
<i>yadA</i>	Forward:CTT CAG ATA CTG GTG TCG CTG T Revrs:ATG CCT GAC TAG AGC GAT ATC C	849	60
<i>virF</i>	Forward:GGC AGA ACA GCA GTC AGA CAT A Revrs:GGT GAG CAT AGA GAA TAC GTC G	561	63

1.3 试剂及仪器设备 小肠结肠炎耶尔森菌选择性培养基和配套抗生素为美国 BD 公司产品,0.1 mol/L 磷酸盐缓冲盐水(pH 7.4,改良 PBS)、克氏双糖铁琼脂(KIA)、动力吡啉尿素培养基(MIU)购自上海市疾病预防控制中心,哥伦比亚营养琼脂购自英国 Oxoid 公司。小肠结肠炎耶尔森菌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、O:9),菌株鉴定用 API20E 生化板条及配套试剂均购自法国生物梅里埃公

司,PCR 扩增相关试剂及引物合成来自上海生工生物工程技术有限公司,PCR 热循环仪、电泳仪、凝胶成像仪均为美国 Bio-Bad 公司产品。PCR 扩增用 Premix、2000 bp DNA Ladder(DL2000)购自 TaKaRa 公司。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

2 结果

2.1 标本检出情况 196 份生猪扁桃体中共分离出 107 株小肠结肠炎耶尔森菌,检出率为 54.59%;196 份生猪回盲部内容物分离出 36 株小肠结肠炎耶尔森菌,检出率为 18.37%;猪咽拭子与猪回盲部内容物标本中同时携带小肠结肠炎耶尔森菌的有 28 份,占采集总数的 14.29%。

2.2 生物分型及血清学分型 生猪咽拭子及肛拭子检测出的 143 株小肠结肠炎耶尔森菌经 API20E 生化鉴定板条鉴定,生物分型为 3 型;因日本生研的血清类型有限,143 株小肠结肠炎耶尔森菌中只能鉴定出 O:3 血清型。

2.3 毒力基因检测 对生猪咽拭子检测出的 107 株菌株进行 *ail*、*ystA*、*ystB*、*yadA* 和 *virF* 5 种毒力基因检测,结果见表 2。I 型为 *ail*⁺、*ystA*⁺、*ystB*⁻、*yadA*⁺、*virF*⁺,II 型为 *ail*⁺、*ystA*⁺、*ystB*⁻、*yadA*⁻、*virF*⁻,III 型为 *ail*⁻、*ystA*⁻、*ystB*⁻、*yadA*⁻、*virF*⁻。其中 I 型和 II 型为致病性菌株,III 型为非致病性菌株。其毒力基因分布特征为 I 型占 71.33%(102/143),II 型占 3.50%(5/143),III 型未检出。

对生猪肛拭子检测出的 36 株菌株进行毒力基因检测,结果见表 2。其毒力基因分布特征为 I 型占 22.37%(32/143),II 型占 2.80%(4/143),III 型未检出。

表 2 小肠结肠炎耶尔森菌毒力基因类型 PCR 检测结果

样本	类型	毒力基因类型					血清分型(O:3)	总计(%)
		<i>ail</i>	<i>ystA</i>	<i>ystB</i>	<i>yadA</i>	<i>virF</i>		
咽拭子	I 型	+	+	-	+	+	102(71.33)	102(71.33)
	II 型	+	+	-	-	-	5(3.50)	5(3.50)
肛拭子	I 型	+	+	-	+	+	32(22.37)	32(22.37)
	II 型	+	+	-	-	-	4(2.80)	4(2.80)
合计							143(100.00)	143(100.00)

注:括号外数据为检出菌株数(株),括号内数据为构成比(%)。

3 讨论

小肠结肠炎耶尔森菌是一类人兽共患病原菌,动物宿主分布广泛,包括家畜、家禽、啮齿动物等^[5]。猪的携带率较高,是小肠结肠炎耶尔森菌主要的宿主动物^[6]。2013 年在登封市生猪屠宰场采集标本进行检测,进一步掌握该菌的病原学特点。

登封市生猪屠宰场猪扁桃体及回盲部内容物的带菌率分别为 54.59% 和 18.37%。猪扁桃体及回盲部内容物标本中小肠结肠炎耶尔森菌分离率不同,猪扁桃

(下转第 463 页)

安全性调查中未发现二次中毒及人畜禽等中毒现象,表明在此种投药方式下药物使用安全。但在草原大面积灭鼠工作中,往往采用毒饵直接投放的方式,由于该药具有杀灭作用,其安全性应随投药方式进一步考察。

3.4 达乌尔黄鼠的给药时机特点 达乌尔黄鼠每年繁殖1次,且黄鼠是一种冬眠动物,每年出蛰时间长达1个月左右,出蛰后即交配^[13],因此很难把握不育药剂的投饵时机,本试验采用毒饵站投饵法进行投药,既能较好防止因草原鸟类及其他动物取食而影响试验效果,又能达到长期保存药饵的作用,较好地解决了药剂的投放时机问题。

参考文献

- [1] 李华宇,董建国,赵亚冰,等. 草原大面积灭鼠对草原鸟类数量变化的影响[J]. 中国地方病防治杂志, 2013, 12(5): 35-37.
- [2] 尤德康,宋玉双,蒋永利,等. 贝奥雄性不育灭鼠剂防治两种害鼠试验[J]. 中国森林病虫害, 2010, 29(6): 46-48.
- [3] 孙红专,费巨波,徐建华,等. 贝奥雄性不育灭鼠剂现场应用效果的研究[J]. 中华卫生杀虫药械, 2006, 12(4): 266-270.

- [4] 石春玲,黄乔平. 贝奥雄性不育灭鼠剂林间药效试验[J]. 林业科技, 2010, 35(1): 30-31.
- [5] 尤德康,董晓波,宋玉双,等. 贝奥雄性不育灭鼠剂室内药效试验[J]. 中国森林病虫害, 2006, 25(3): 32-34.
- [6] 侯秀敏,文香,李卫民,等. 莠术醇雌性不育剂防治草地害鼠试验研究[J]. 青海草业, 2007, 16(4): 14-19.
- [7] 张春美,杨静莉,张天栋,等. 0.2%莠术醇抗生育剂防治森林害鼠试验[J]. 中国森林病虫害, 2009, 28(5): 9-11.
- [8] 初晓莉,赵云国,韩彦军,等. 抗生育剂莠术醇对草地害鼠的控制效应研究[J]. 吉林畜牧兽医, 2009(30): 8-10.
- [9] 王庭林,张慧娣,赵日良,等. 抗生育剂莠术醇对区域性害鼠的控制效应研究[J]. 山西农业科学, 2007, 35(10): 34-36.
- [10] 蒋永恩,郭永旺,施大钊,等. 莠术醇不育剂对布氏田鼠的不育效果观察[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2011, 22(1): 22-25.
- [11] 李生庆,张西云. 青藏高原地区应用生物灭鼠剂控制草地鼠害的药效试验研究[J]. 农药研究与应用, 2011, 15(2): 19-20.
- [12] 张晶仁,胡永校,尤焕文. 毒鼠屋灭达乌尔黄鼠最佳距离探讨[J]. 中国地方病防治杂志, 1993, 8(5): 311.
- [13] 赵天飙,梁炜,秦丰程,等. 草原黄鼠生态学研究[J]. 内蒙古师大学报: 自然科学(汉文)版, 2000(6): 125-129.

收稿日期: 2014-03-26

(上接第460页)

体的带菌率高于猪回盲部内容物的带菌率。这一结果与国内外研究结果相符^[1-2,7-8]。小肠结肠炎耶尔森菌的血清型众多,国内已报道58个^[8-9]。目前的研究认为仅有少数几种血清型为致病性菌株,其中O:3血清型为最常见的一种^[7,10]。本次分离的菌株血清型较为集中,均检出O:3致病型,与历史文献相符。结果证明登封市生猪携带的小肠结肠炎耶尔森菌为致病性菌株。由于登封市西部乡镇以农业种植及家畜饲养业为主,传统的家庭式圈养弊端明显,卫生条件差,防范意识低,极易发生养殖户与猪及其粪便接触而感染的事件。这也提醒我们今后在预防该病过程中要重点关注这一环节。

根据生化反应实验小肠结肠炎耶尔森菌生物型分为1A、1B、2~5型共6个,其中生物1A型为非致病性菌株,而生物1B、2~5型为致病性菌株^[11]。登封市生猪生物分型检测均为致病性菌3型。毒力基因检测分为3型,Ⅰ型为 ail^+ 、 $ystA^+$ 、 $ystB^-$ 、 $yadA^+$ 、 $virF^+$,Ⅱ型为 ail^+ 、 $ystA^+$ 、 $ystB^-$ 、 $yadA^-$ 、 $virF^-$,Ⅲ型为 ail^- 、 $ystA^-$ 、 $ystB^-$ 、 $yadA^-$ 、 $virF^-$ 。其中Ⅰ型和Ⅱ型为致病性菌株,Ⅲ型为非致病性菌株。登封市毒力基因检测结果显示均为Ⅰ型、Ⅱ型致病性菌株。这一检测结果从另一侧面证实登封市生猪所携带的小肠结肠炎耶尔森菌有致病性,具有感染人群的潜在危险。

志谢 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所景怀琦研究员及其团队在课题完成过程中给予帮助,特此志谢

参考文献

- [1] Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues[J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(2): 257-276.
- [2] 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.
- [3] Duan R, Liang J, Shi G, et al. Homology analysis of pathogenic *Yersinia* species *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* based on multilocus sequence typing[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(1): 20-29.
- [4] 汪华,景怀琦,朱凤才,等. 小肠结肠炎耶尔森氏菌[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 16-18.
- [5] Visser LG, Annema A, van Furth R. Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes[J]. Infect Immun, 1995, 63(7): 2570-2575.
- [6] 穆玉娇,赵嘉咏,郭秋生,等. 2005—2011年河南省小肠结肠炎耶尔森菌分布状况[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(7): 612-615.
- [7] 崔志刚,梁俊容,肖玉春,等. 中国屠宰场生猪中致病性小肠结肠炎耶尔森菌的脉冲场凝胶电泳分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, 24(3): 196-199.
- [8] Liang J, Wang X, Xiao Y. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered in Chinese Abattoirs[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(8): 2949-2956.
- [9] 李孟磊,穆玉娇,党李成,等. 河南省2007—2010年小肠结肠炎耶尔森菌监测分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(3): 312-315.
- [10] 景怀琦,邱海燕,李继耀,等. 小肠结肠炎耶尔森菌O:3血清型特异性单克隆抗体制备[J]. 疾病监测, 2004, 19(7): 247-249.
- [11] Singh I, Virdi JS. Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*[J]. J Med Microbiol, 2004, 53(11): 1065-1068.

收稿日期: 2014-03-26