

张楠驰, 苟小兰, 王利. 致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌分离鉴定及三重 PCR 检测方法的建立 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 95-101.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050227

ZHANG Nanchi, GOU Xiaolan, WANG Li. Isolation and Identification of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* and Development of a Triple PCR Detection Method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 95-101. (in Chinese with English abstract).
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050227

· 生物工程 ·

致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌分离鉴定及三重 PCR 检测方法的建立

张楠驰, 苟小兰, 王 利*

(西南民族大学, 青藏高原动物遗传资源保护与利用国家教育部重点实验室,
动物科学国家民委重点实验室, 四川成都 610041)

摘要:为鉴定导致患病鲫鱼肛门红肿、腹部有出血点症状的病原菌, 并建立一种快速检测该病原菌的方法。本研究从患病鲫鱼中分离了病原菌, 采用形态学、理化特性分析及 16S rDNA 序列分析方法鉴定菌株。采用 PCR 扩增法检测该菌毒力基因, 琼脂纸片扩散法检测该菌株的耐药性, 致病性能验证试验检测其致病性。针对该菌 *ail* 基因、*inv* 基因和 *intB* 基因设计了 3 条特异性引物, 通过对反应体系和条件的优化, 建立了一种检测该菌的三重 PCR 方法并初步应用于患病鲫鱼样品的检测中。结果显示, 从患病鲫鱼心脏组织中分离了一株小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*), 命名为 fsznc-10。检测到该菌携带 *ail*、*ystB*、*virF*、*intB* 毒力基因, 该菌对诺氟沙星、庆大霉素等 5 种抗生素敏感, 对鲫鱼具有一定的致病性。三重 PCR 方法可准确扩增出小肠结肠炎耶尔森氏菌 *ail*、*inv* 和 *intB* 三个目的基因, 而其他菌株均未扩增出目的基因。该方法检测该菌 DNA 最低检出量为 1.704×10^{-6} ng/ μ L, 检测患病鱼心脏样品的阳性率约为 86.67%, 与 16S rDNA 序列分析方法的检测符合率为 100%。本试验建立的三重 PCR 检测法具有特异性强、敏感性高、操作简单、成本低的优点。这为临床中小肠结肠炎耶尔森氏菌的防控和检测提供参考依据。

关键词:小肠结肠炎耶尔森氏菌, 毒力基因, 快速检测, 多重 PCR

中图分类号: TS254.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)07-0095-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050227

Isolation and Identification of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* and Development of a Triple PCR Detection Method

ZHANG Nanchi, GOU Xiaolan, WANG Li*

(Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Exploitation of Ministry of Education, Key Laboratory of Animal Science of State Ethnic Affairs Commission, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: This paper aimed to identify the pathogenic bacterium that caused anal swelling and abdominal bleeding of *Carassius auratus*, and establish a rapid detection method for the pathogenic bacterium. In this study, the pathogenic bacterium was isolated from *Carassius auratus*, and identified by morphological, physical and chemical characteristics analysis and 16S rDNA sequence analysis. The virulence gene of the bacterium was detected by PCR method. The drug sensitivity of isolated strain was detected by disk agar diffusion method and its pathogenicity was discussed by artificial infection. Three specific primers of *ail* gene, *inv* gene and *intB* gene were designed for the isolated strain. A triple PCR method for detecting the isolated strain was established and this method was used to test samples of sick *Carassius auratus*. The result showed that a *Yersinia enterocolitica* strain named fsznc-10 was isolated from the heart of diseased *Carassius*

收稿日期: 2020-05-22

基金项目: 四川省科技支撑项目 (2016NZ0044)。

作者简介: 张楠驰 (1993-), 男, 硕士, 研究方向: 微生物遗传学, E-mail: zhangnanchi@126.com。

* 通信作者: 王利 (1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物遗传学, E-mail: qinxin916@aliyun.com。

auratus. *Yersinia enterocolitica* fsznc-10 had virulence genes of *ail*, *ystB*, *virF* and *intB*. *Yersinia enterocolitica* fsznc-10 was nonresistant to five antibiotics such as norfloxacin and gentamicin, and it had certain pathogenicity to *Carassius auratus*. Triple PCR method could accurately amplify three target genes of *ail*, *inv* and *intB* of *Yersinia enterocolitica*, while other strains had not amplified the target genes. The minimum template concentration for the detection of *Yersinia enterocolitica* was 1.704×10^{-6} ng/ μ L. The positive rate of the triple PCR method for detecting heart samples of sick fish was about 86.67%, and its detection coincidence rate with the 16S rDNA sequence analysis method was 100%. The triple PCR detection method has the advantages of strong specificity, high sensitivity, simple operation and low cost. The present paper research provides scientific data reference for the prevention, control and detection of *Yersinia enterocolitica* in clinical practice.

Key words: *Yersinia enterocolitica*; virulence gene; rapid detection; multiplex PCR

小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)属于肠杆菌科、耶尔森氏菌属^[1]。小肠结肠炎耶尔森氏菌是一种人畜共患病原菌,也是一种重要的食源性致病菌,很多国家都已将该菌列为进出口食品的常规检测项目^[2]。小肠结肠炎耶尔森氏菌可导致人和动物患急性腹泻、脑膜炎、心肌炎等临床疾病,极易感染免疫力低下的初生动物和婴儿,对人和动物机体健康造成一定的威胁^[3-4]。该菌具有广泛的宿主性,传播范围广、感染频率高,可感染家畜、家禽、鸟类及昆虫等^[5]。该菌广泛分布于自然界,在水、土壤、动物以及食物中均可被检测出,可通过人、动物、食物、水源等介质进行传播,也是少数能在冷藏温度下生长的肠道致病菌之一^[4,6-8]。致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌可能含有 *ystA*、*ystB*、*yadA* 和 *virF* 等多个毒力基因^[9]。检测位于染色体上的黏附侵袭位点基因 *ail* 可鉴定食品中致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌,该方法被 ISO/TS18867:2015 等标准所采用^[9]。*intB* 基因是耶尔森氏菌属所携带的耶尔森氏菌强毒力岛(High-pathogenicity island, HPI)毒力基因中的一段基因,耶尔森氏菌侵袭蛋白(Invasin, *inv*)在致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌中表达^[10]。因此同时检测 *ail*、*intB* 和 *inv* 基因可鉴定样品中是否含有致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌。

我国目前检测动物和食品中致病菌的方法主要是传统的微生物学检测方法,虽然结果较为可靠,但具有检测速度慢、程序复杂和成本高等缺点。因此,需要建立一种快速、准确、有效地检测小肠结肠炎耶尔森氏菌的方法。快速检测细菌的分子生物学检测技术主要有常规 PCR 技术、多重 PCR 技术等。常规 PCR 技术主要是扩增细菌的一条特异性基因,而不同细菌间 16S rDNA 基因、23S rDNA 基因序列具有一定同源性,这将对检测方法的特异性产生一定的影响^[11-12]。多重 PCR 技术具有高效性、系统性、经济简便性等特点,与常规 PCR 技术相比具有更高的特异性,被应用于病原微生物的检测和基因分型鉴定等方面,在细菌快速检测方面也有着重要的临床意义和广泛的应用前景^[13-14]。本实验室从病鲫鱼心脏中鉴定出菌株 fsznc-10,设计并建立一种可以快速、准确、有效的鉴定该菌的多重 PCR 方法,以期防治和检测由该菌引起的人和动物共患疾病的研究提

供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

患病鱼 来源于四川省某养殖场发现的一批腹部轻微出血、肿胀、肛门红肿的鲫鱼;营养肉汤培养基 北京奥博星生物技术有限责任公司;CIN-1 培养基及配套试剂、改良 Y 培养基 杭州微生物试剂有限公司;Premix Taq(TaKaRa Taq Ver.2.0 plus dye)、核酸分子量标准品(DL2000 Marker) 大连宝生生物有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒 天根生物有限公司;细菌生化鉴定管 杭州微生物试剂有限公司;标准革兰氏染色试剂盒 北京雷根生物技术有限公司;假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)、维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、弗劳地枸橼酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、中间气单胞菌(*Aeromonas media*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)、霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*)和无丙二酸枸橼酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*) 均保藏于西南民族大学动物科学国家民委重点实验室;85 条健康成年鲫鱼(516.05±20.04 g) 购自成都某市场。

ESJ200-4 电子天平 沈阳龙腾电子有限公司;HZQ-X100 恒温振荡培养箱 四川新科仪器有限公司;SteriLGARD IIIADVANCE 生物安全柜 Baker 公司;DHP-9052 电热恒温培养箱 上海齐欣科学仪器有限公司;DHG-9203A 高温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司;WGZ-2XJ 细菌浊度计 上海昕瑞仪器仪表有限公司;DYY-6B 稳压稳流电泳仪 北京市六一仪器厂;13395H2X 生物显微镜 Leica 公司;KW-1000DC 恒温水浴锅 金坛市科析仪器有限公司;S1000 Thermal Cycler 基因扩增仪、GEL DOC2000 凝胶成像系统 伯乐公司。

1.2 实验方法

1.2.1 病料及处理 接种环无菌处理后,在病鱼心脏

取样并接种于营养琼脂培养基中, 28 °C 恒温培养 18 h 观察。

1.2.2 菌株分离和生理生化鉴定 挑取 1.2.1 中外观一致的单菌落, 并对其进行细菌纯化培养后转入营养肉汤培养基培养, 28 °C、180 r/min 培养 18 h。采用革兰氏染色法对细菌菌体进行染色, 显微镜下观察其颜色和形状。采用细菌生化鉴定管进行生化鉴定, 鉴定标准参照《伯杰细菌鉴定手册》和《鱼类及其他水生动物细菌实用鉴定指南》^[15]。

1.2.3 细菌基因组 DNA 提取及 16S rDNA 序列分析

根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书, 提取分离细菌总 DNA。采用本实验室使用的 16S rDNA 通用引物 (F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' / R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'), 以提取的分离菌 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物纯化回收后由生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序并拼接。将分离菌命名为 fsznc-10, 拼接后的 16S rDNA 序列提交至 GenBank 获取登录号, 并在 GenBank 上进行 BLAST 序列比对, 选取相似度较高的细菌 16S rDNA 基因序列, 利用 Mega 5.0 软件构建系统进化树。

1.2.4 分离菌毒力基因扩增 采用文献 [10] 设计的 *ail*、*ystB*、*virF*、*yadA*、*intB* 5 对毒力基因引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。以提取的菌株 fsznc-10 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 分离菌药敏试验 采用 KB 纸片扩散法, 培养后的菌液用细菌浊度仪测量细菌浓度后无菌水调至到 0.5 麦氏, 取 100 μL 涂布于 Mueller-Hinton Agar 培养基, 35 °C 培养 18 h 后测量结果。药物药敏纸片规格及敏感程度判断标准数据参照第 28 版 CLSI 标准。

1.2.6 分离菌致病性能验证 将分离菌分别制备成浓度为 $3 \times 10^3 \sim 3 \times 10^8$ CFU/mL 的菌悬液作为试验组, 10 倍等比稀释, 共 6 个浓度梯度。选取 60 尾健康鲫

鱼, 每浓度梯度 10 尾, 分别腹腔注射 0.1 mL 菌悬液, 另选取 10 尾健康鲫鱼腹腔注射 0.1 mL 生理盐水作对照, 饲养 7 d 观察发病和死亡情况, 参照文献 [16] 计算分离菌的半数致死量 (LD₅₀)。致病菌的再次分离采用改良 Y 选择性培养基。

1.2.7 特异性引物设计及三重 PCR 扩增 利用表 1 中 *ail* 和 *intB* 毒力基因引物, 并根据 GenBank 公布的小肠结肠炎耶尔森氏菌 *inv* 毒力基因设计的一对特异性引物 (详见表 1) 建立检测分离菌 (小肠结肠炎耶尔森氏菌) 的三重 PCR 方法。取 1.2.3 中提取的 fsznc-10 细菌基因组 DNA 作为模板, 用表 1 中的 *ail*、*intB* 和 *inv* 三对引物分别扩增。反应总体积为 25 μL, Premix Taq 12.5 μL, 上下游引物各 1 μL, DNA 模板 1.0 μL, ddH₂O 9.5 μL。单重 PCR 反应条件为 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, (45~64 °C) 45 s, 72 °C 40 s, 30 个循环; 72 °C 5 min, 确定三对引物的共同最佳退火温度。三对引物按照 1:1:1 的比例进行三重 PCR 扩增, 通过观察目的条带的亮度, 调节对应引物对的添加比例, 以优化各引物在三重 PCR 总反应体系中的浓度。三重 PCR 退火温度在 45~64 °C 范围的 16 个温度梯度进行筛选, 以确定三重 PCR 的最佳退火温度。PCR 均采用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.8 特异性和敏感性试验 采用细菌基因组 DNA 提取 1.1 中保存的各菌种的基因组作为模板, 按照优化后的反应条件和反应体系进行三重 PCR 扩增, 以检测该方法的特异性。测定菌株 fsznc-10 基因组 DNA 浓度后, 用无菌去离子水对 DNA 样品进行 10 倍倍比稀释 (10⁰~10⁹ 倍) 后作为模板, 按照优化后的反应条件进行三重 PCR 扩增。

1.2.9 三重 PCR 检测法的临床应用 随机选择 15 个 1.2.1 中采集的发病和死亡鲫鱼的心脏组织样品, 匀浆后进行细菌基因组 DNA 提取, 采用本研究建立的三重 PCR 扩增, 同时利用 CIN-1 培养基和改良 Y 培养基对各心脏组织中的细菌进行分离培养并进行 16S rDNA 序列分析, 比较检测结果。

表 1 小肠结肠炎耶尔森氏菌毒力基因引物序列

Table 1 Primers of the virulence genes in the *Y. enterocolitica* strains

引物	序列(5'→3')	预测长度(bp)	GenBank登录号	退火温度(°C)
<i>ail</i>	Forward	taa tgt gta cgc tgc gag	351	M29945
	Reverse	gac gtc tta ctt gca ctg		
<i>ystB</i>	Forward	gta cat tag gcc aag aga cg	200	GU229276
	Reverse	gca aca tac ctc aca aca cc		
<i>virF</i>	Forward	ggc aga aca gca gtc aga cata	561	NC004564
	Reverse	ggt gag cat aga gaa tac gtc g		
<i>yadA</i>	Forward	ctt cag ata ctg gtg tgc ctg t	800	NC004564
	Reverse	atg cct gac tag agc gat atc c		
<i>intB</i>	Forward	tgc gcc atg cgg tcc atc	714	NC008800
	Reverse	ggt gca taa gat tct cgg		
<i>Inv</i> *	Forward	ctg tgg gga gac tgg gga agt ttg g	520	CAA88188
	Reverse	gaa ctg ctt gaa tcc ctg aaa acc g		

注: *仅应用于菌株 fsznc-10 的三重 PCR 检测。

1.3 数据处理

PCR 扩增图谱均有 BioradChemiDoc MP 凝胶成像系统产生, 后由 Adobe Photoshop 13.0 处理。系统发育树图片由 Mega 5.0 软件构建, Adobe Photoshop 13.0 处理。菌株生化鉴定和耐药表型试验均为三个重复组。

2 结果与分析

2.1 分离菌形态学和理化特性鉴定

将分离菌 fsznc-10 在营养琼脂培养基中 28 ℃ 恒温培养 18 h 后, 菌落呈现为圆形, 直径 1.0~3.2 mm, 乳白色隆起, 边缘整齐, 表面光滑湿润。经革兰氏染色后, 菌株为革兰氏阴性短杆菌, 多单个散在分布或排列成堆。分离菌 fsznc-10 的主要生理生化试验结果表明分离菌株具有动力性, V-P 试验、β-半乳糖苷酶、过氧化氢酶实验结果呈阳性, 不利用枸橼酸盐, 不分解蔗糖、葡萄糖, 不发酵鼠李糖、棉籽糖, 还原硝酸盐为亚硝酸盐, 不产 H₂S, 部分菌株分解肌醇、七叶苷。参照《伯杰氏系统细菌鉴定手册》^[1] 和《鱼类及其他水生动物细菌实用鉴定指南》^[15], 基本符合小肠结肠炎耶尔森氏菌的生化特性。

2.2 分离菌 16S rDNA 序列分析

分离菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物显示其片段约为 1500 bp(图 1)。测序结果显示, 分离菌株 16S rDNA 片段长度为 1424 bp。将分离菌株 16S rDNA 基因序列提交到 GenBank 中获得登录号 MN416303。16S rDNA 基因的系统发育树结果显示, 菌株 fsznc-10 与 *Yersinia enterocolitica* GM2402 聚为一支(图 2), 置信度为 100。结合分离菌株形态学和理化特性, 综合判定菌株 fsznc-10 为小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)。

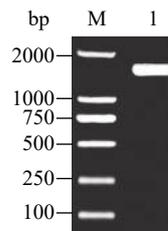


图 1 分离菌 16S rDNA 基因 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification results of 16S rDNA gene of the isolate strain

注: M: DL2000DNA Marker; 1: fsznc-10

2.3 分离菌毒力基因扩增

经 PCR 扩增的方法检测分离菌株毒力基因结果显示, 菌株 fsznc-10 扩增出长度分别约为 351、200、561 和 714 bp 的条带(图 3)。表明菌株 fsznc-10 携带 *ail*、*ystB*、*virF*、*intB* 毒力基因。

2.4 分离菌药敏试验

菌株 fsznc-10 对诺氟沙星、庆大霉素、多粘菌素 B、阿米卡星和链霉素敏感, 对头孢曲松和复方新诺明中度敏感, 对氨苄青霉素、呋喃唑酮和头孢噻吩耐药(表 2)。表明可采用诺氟沙星、庆大霉素、多粘菌素、阿米卡星和链霉素防治由小肠结肠炎耶尔森氏菌引起的鲫鱼疾病。

2.5 分离菌致病性能验证

经腹部注射最高浓度(3 × 10⁸ CFU/mL)分离菌株的鲫鱼, 1 d 后出现游动缓慢、反应迟钝的症状, 部分病鱼鱼鳍基部、上下颚、眼球等部位略有出血点, 约 36 h 开始出现死亡现象, 72 h 内全部死亡, 对照组未见异常或死亡鱼。参照文献 [16] 计算得出菌株 fsznc-10 的 LD₅₀ 为 7.54 × 10⁴ CFU, 表明菌株

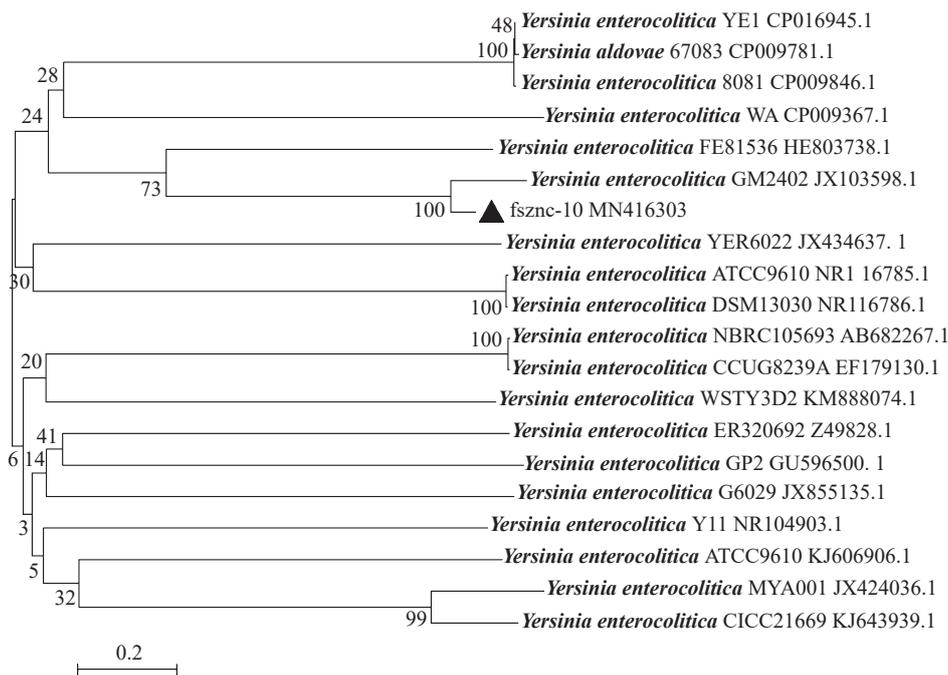


图 2 菌株 fsznc-10 16S rDNA 基因序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of strain fsznc-10 16S rDNA gene sequence

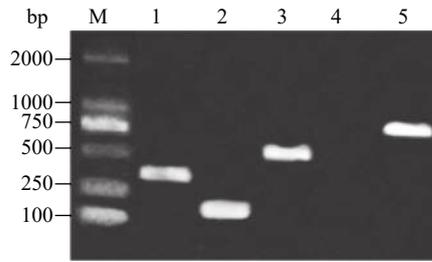


图 3 毒力基因的 PCR 扩增结果

Fig.3 PCR amplification of virulence gene

注: M: DL2000; 1: *ail*; 2: *ystB*; 3: *virF*; 4: *yadA*; 5: *intB*。

表 2 药敏实验结果

Table 2 Results of antibiotic sensitivity test

抗菌药物	结果	抗菌药物	结果
氨苄青霉素	R	诺氟沙星	S
庆大霉素	S	多粘菌素	S
头孢曲松	I	呋喃唑酮	R
阿米卡星	S	链霉素	S
复方新诺明	I	头孢噻吩	R

注: R: 耐药; I: 中度敏感; S: 敏感。

fsznc-10 对鲫鱼具有较强的致病性。从感染死鱼的心脏中分离出的细菌在改良 Y 平板上呈现粉红色、向上隆起、表面湿润的特征菌落, 经 16S rDNA 序列分析鉴定为小肠结肠炎耶尔森氏菌。

2.6 单一 PCR 和三重 PCR 扩增

3 对毒力基因的单一 PCR 扩增结果显示, 分别扩增出了约 300、500 和 700 bp 的目的条带, 测序结果显示各基因片段大小均与预期结果基本一致

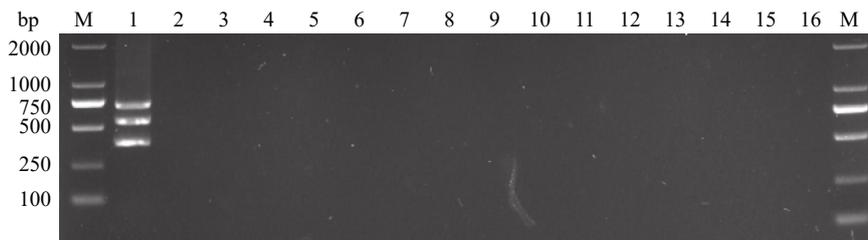


图 5 三重 PCR 的特异性检测

Fig.5 Specificity detection of triple PCR

注: M: DL2000DNA Marker; 1~15: *fsznc-10*、假结核耶尔森氏菌、维氏气单胞菌、哈维氏弧菌、门多萨假单胞菌、霍乱弧菌、嗜水气单胞菌、弗劳地枸橼酸杆菌、中间气单胞菌、粪肠球菌、大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、类志贺邻单胞菌、霍氏肠杆菌、无丙二酸枸橼酸杆菌; 16: 阴性对照。

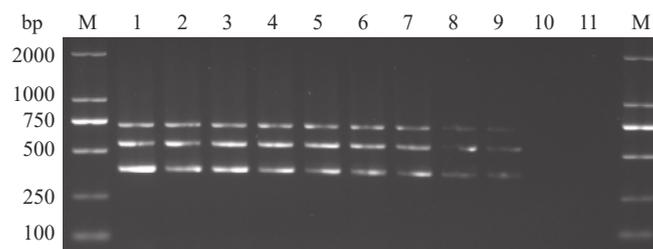


图 6 三重 PCR 的敏感性试验结果

Fig.6 Sensitivity test results of triple PCR

注: M: DL2000DNA Marker; 1~10: 菌株 *fsznc-10* 稀释 $10^0 \sim 10^9$ 倍; 11: 阴性对照。

(图 4)。经优化, 确定三重 PCR 最优反应体系为: Premix Taq 12.5 μ L, *ail* 上下游引物各 1.5 μ L, *inv* 上下游引物各 1.0 μ L, *intB* 上下游引物各 0.5 μ L, DNA 模板 2.0 μ L, ddH₂O 4.5 μ L, 总体系为 25 μ L。三重 PCR 最优反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 50 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。三重 PCR 扩增结果显示, 出现三条清晰条带, 且无其他杂带, 三对引物之间无干扰, 扩增准确。

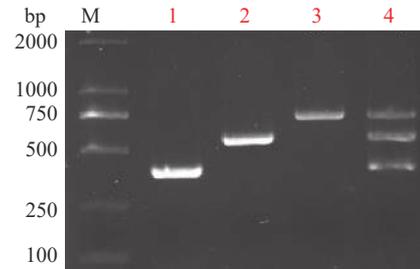


图 4 单一 PCR 与多重 PCR 扩增结果

Fig.4 Results of single PCR and multiplex PCR amplifications

注: M: DL2000DNA Marker; 1: *ail*; 2: *inv*; 3: *intB*;

4: 三重 PCR 结果。

2.7 特异性和敏感性试验结果

特异性试验结果显示, 仅 *fsznc-10* 三重 PCR 扩增结果出现 3 条清晰目的条带, 片段大小分别约为 351、520 和 714 bp, 其他菌株均未扩增出三条目的条带(图 5), 表明所建立的三重 PCR 方法特异性较强。敏感性试验结果显示(图 6), 菌株 *fsznc-10* DNA 模板稀释前的浓度为 170.40 ng/ μ L, 所建立的多重 PCR 检测法检测 *fsznc-10* 的最低模板浓度为 1.704×10^{-6} ng/ μ L, 表明该方法敏感性较高。

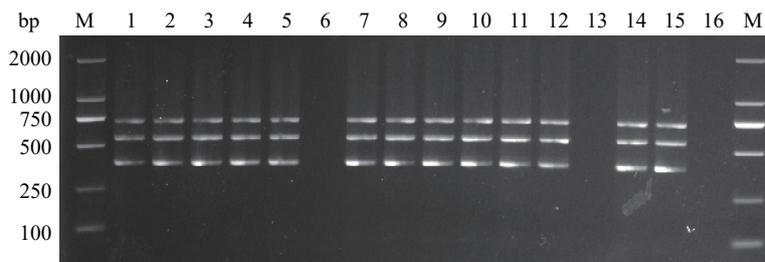


图7 临床样品三重 PCR 检测结果

Fig.7 Triple PCR results of clinical samples

注: M: DL2000DNA Marker; 1~15: 临床样品; 16: 阴性对照。

2.8 三重 PCR 检测法的临床应用

采用本试验建立的三重 PCR 方法对 15 个发病鲫鱼心脏组织样品进行检测,结果显示 13 个样品呈阳性(图 7),阳性检测率约为 86.67%。另外,采用 CIN-1 培养基和改良 Y 培养基对上述各心脏组织中的细菌进行分离培养并进行 16S rDNA 序列分析,均得到了相同的结果。表明本试验建立的三重 PCR 方法适合应用于临床样品的检测。

3 讨论与结论

小肠结肠炎耶尔森氏菌作为一种食源性人畜共患致病菌,该菌的检测具有重要的公共卫生意义^[17-18]。由该菌引起的临床症状主要表现为急性腹痛、腹泻、呕吐等胃肠现象及结节性红斑、关节炎、骨髓炎、肝炎、败血症等并发症^[19]。目前,已有研究人员从粪便、肉类食品等分离到小肠结肠炎耶尔森氏菌并检测到一些毒力基因。许文炯等^[20]、姜晓梅等^[21]分别检测到鲜肉样品、人粪便中小肠结肠炎耶尔森氏菌均携带 *ail*、*ystA*、*ystB*、*yadA*、*virF* 等毒力因子。*YadA*、*ail*、*intB*、*virF* 和 *inv* 毒力因子可介导胶原蛋白、纤粘蛋白和层粘连蛋白等结合从而增加细菌的粘附作用,还能减弱抗菌多肽对细菌的杀伤作用。*YstB* 毒力因子是耶尔森氏菌引起腹泻的重要原因之一。本试验检测到菌株 fsznc-10 携带 *ail*、*ystB*、*virF*、*intB* 毒力基因,未检测到 *yadA*,这与苟小兰等^[22]的检测结果基本一致。结合毒力基因检测和致病性能验证试验结果,表明该菌具有较强的致病性。

传统检测小肠结肠炎耶尔森氏菌的方法需通过中温增菌培养、理化鉴定、血清学分析等一系列复杂过程,存在费时费力、操作繁琐等特点,而且检出率不高,不利于及时准确诊断小肠结肠炎耶尔森氏菌。目前报道的小肠结肠炎耶尔森氏菌检测方法主要有荧光定量及酶联免疫吸附技术,这些方法不仅需要昂贵的仪器设备,而且对实验人员的操作技能要求也较高,不利于普及运用^[23]。随着分子生物学的迅速发展,相关学者对小肠结肠炎耶尔森氏菌的毒力基因及致病机制有了更加深入细致的了解,这为从分子水平上鉴定小肠结肠炎耶尔森氏菌及评估菌株的毒力提供了理论基础与技术支持。影响多重 PCR 检测的效

果的因素有很多,模板浓度、引物特异性和稳定性等均可能影响检测效果。在目前的研究中,有多种形式的多重 PCR 检测方法,如利用一条或多条保守基因的方法检测一种或多种细菌、利用数条特异性基因同时检测数种细菌等,此类方法通过一条特异性基因或多条非特异性基因(如 16S rDNA 和 23S rDNA 序列)来判断样品中是否含有目的细菌,但检测方法的特异性和准确性欠佳^[24-26]。本试验采用三条毒力基因检测一种细菌的方法,以提高所建立检测法的特异性和准确性,在临床应用实验中可检测出 100% 含有小肠结肠炎耶尔森氏菌的样品。该检测方法具有特异性高、敏感性高、准确可靠的特点,并且可在 2 h 内检测出菌样是否含有小肠结肠炎耶尔森氏菌,同时降低了鉴定细菌的成本。

综上所述,本试验从病鲫鱼中分离出小肠结肠炎耶尔森氏菌,检测该菌携带 *ail*、*ystB*、*virF*、*intB* 毒力基因,经分离菌致病性能验证试验验证了该菌为病原菌。利用 *ail*、*inv* 和 *intB* 三条毒力基因建立了一种快速、准确地检测小肠结肠炎耶尔森氏菌的三重 PCR 方法,并检测出该菌对诺氟沙星和庆大霉素等 5 种抗生素敏感。这为小肠结肠炎耶尔森氏菌的快速检测及防控提供了科学资料。

参考文献

- [1] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册(9版)[M]. 北京: 科学出版社, 1989.
- [2] Venkitanarayanan K, Annamalai T. Expression of major cold shock proteins and genes by *Yersinia enterocolitica* in synthetic medium and foods[J]. *J Food Prot*, 2005, 68(11): 2454.
- [3] Stachelska M A. Determining the prevalence of *inv*-positive and *ail*-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils using PCR and culture methods[J]. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 2017, 16(3): 303-310.
- [4] 付宏杰. 乳糖酸抑菌性及其对小肠结肠炎耶尔森氏菌抑菌机理的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
- [5] 关乃瑜, 夏爽, 赵丽丽, 等. 断奶仔猪源小肠结肠炎耶尔森氏菌的分离鉴定及其致病性研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2015, 37(9): 679-682.
- [6] 张霞, 温华蔚, 倪松, 等. 新等温扩增技术检测小肠结肠炎耶尔森氏菌[J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(23): 113-116.
- [7] 胡惠娟, 吴清平, 张菊梅, 等. 食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌

- 污染调查和 ERIC-PCR 分型研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(6): 294-300.
- [8] 冯育芳, 邢进, 岳秉飞, 等. 小肠结肠炎耶尔森氏菌、假结核耶尔森氏菌、志贺氏菌和空肠弯曲菌多重 PCR 方法的建立[J]. 实验动物科学, 2016, 33(1): 1-6.
- [9] 章志超, 龙慧, 吴鑫, 等. 食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌分离鉴定方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(2): 455-461.
- [10] 王利, 苟小兰. 鱼源小肠结肠炎耶尔森菌 5 种毒力基因的检测和分析[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(2): 68-70.
- [11] 陈宇明, 程天印, 王小君, 等. 藤黄微球菌 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医科技信息, 2007(1): 47-48.
- [12] 李天芝, 于新友, 莫玲. 基于 16S rRNA 基因的枯草芽孢杆菌 PCR 快速检测方法的建立[J]. 广东畜牧兽医科技, 2016(2): 53-55.
- [13] 刘变芳, 王涛, 王蕊, 等. 生鲜肉中产毒素大肠杆菌多重 PCR 检测方法构建[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12): 225-231.
- [14] 丁天翔, 潘阳阳, 何翊阁, 等. 快速检测奶牛乳房炎四种病原菌的多重 PCR 方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(1): 19-26.
- [15] 布勒. 鱼类及其他水生动物细菌实用鉴定指南[M]. 北京: 海洋出版社, 2013.
- [16] 伍晔晔, 孟庆玲, 乔军, 等. 奶牛源金黄色葡萄球菌新疆分离株生物被膜、肠毒素基因与毒力的检测及其相关性分析[J]. 西南农业学报, 2019, 32(11): 2693-2698.
- [17] Tan L K, Ooi P T, Thong K L. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* from food and pigs in selected states of malaysia[J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 94-100.
- [18] 杨澜. 实时荧光环介导等温扩增技术检测食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2013.
- [19] 刘翔, 刘阳波, 郭邦成, 等. 2008~2013 年宁夏小肠结肠炎耶尔森菌分布特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(3): 260-263, 271.
- [20] 许文炯, 丁洁, 陈晓蔚, 等. 小肠结肠炎耶尔森氏菌主要毒力基因分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2007(7): 675-677.
- [21] 姜晓梅, 李刚山, 王意银, 等. 小肠结肠炎耶尔森菌的分离鉴定及毒力基因检测[J]. 西南国防医药, 2015, 25(8): 844-846.
- [22] 苟小兰, 王利. 小肠结肠炎耶尔森氏菌对黄颡鱼的致病性及毒力基因检测[J]. 水产科学, 2013, 32(5): 293-296.
- [23] 杨兴林, 熊金凤, 李丽, 等. 荧光聚合酶链式反应与酶联免疫吸附法筛查肠道病毒 71 型病原感染的比较研究[J]. 华西医学, 2014, 29(7): 1309-1312.
- [24] 张祥林, 李京, 罗明, 等. 基于 16S rDNA 基因的谷斑皮蠹 PCR 检测技术[J]. 生物安全学报, 2017, 26(1): 75-79.
- [25] 谭秋杉, 高利荣, 王晓社, 等. 基于 16S rRNA 基因的不同血清型鸭疫里默氏杆菌 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(1): 50-53.
- [26] 毕水莲. 动物性食品源弓形菌 23S rRNA 基因 PCR 检测方法的建立[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(14): 3419-3423.