
ICS 11.020

C59

团 体 标 准

T/CPMAxxx-2019

耶尔森菌病诊断标准

Diagnostic standard of Yersiniosis

2019 年 月 日发布

2019 年 月 日实施

中华预防医学会发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 术语和定义.....	1
3 诊断依据.....	1
3.1 流行病学史	1
3.2 临床表现	2
3.3 实验室检测	2
4 诊断原则.....	3
5 诊断	3
5.1 临床诊断病例	3
5.2 确诊病例	3
6 鉴别诊断.....	3
附录 A(资料性附录)耶尔森菌病流行病学	4
附录 B(资料性附录)耶尔森菌病临床表现	6
附录 C(规范性附录)耶尔森菌病病原学检测	8
参考文献.....	20

前言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由中华预防医学会归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、中国疾病预防控制中心、首都医科大学附属北京地坛医院、北京大学人民医院、江苏省疾病预防控制中心、郑州市食源性致病菌快速检测试剂工程研究中心、肃北蒙古族自治县疾病预防控制中心、国家食品安全风险评估中心。

本标准主要起草人：王鑫、景怀琦、冉陆、陈志海、王辉、朱凤才、李凤琴、曾明、鲍昌俊、王岚、梁未丽、青震涛、春花。

本标准属首次发布。

耶尔森菌病诊断标准

1 范围

本标准规定了耶尔森菌病的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。

本标准适用于全国各级医疗机构和疾病预防控制机构工作人员对耶尔森菌病的病原学检测、诊断和报告。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

耶尔森菌 *Yersinia*

肠杆菌科耶尔森菌属的细菌，目前已发现了 18 个种，其中对人致病的种包括小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌与鼠疫耶尔森菌。

2.2

耶尔森菌病 *Yersiniosis*

主要由小肠结肠炎耶尔森菌感染造成，少数由假结核耶尔森菌感染造成，是一种人兽共患病、食源性疾病，以腹泻为主要临床表现的胃肠道传染病，少数可出现结节性红斑、反应性关节炎，甚至是脓毒症等肠外并发症。

注：鼠疫耶尔森菌感染人类造成的疾病称为鼠疫。

3 诊断依据

3.1 流行病学史

全年都可发病。猪和犬是最主要的传染源。病人发病前多曾摄入不洁食品、水，尤其是经冰箱冷藏保存的食物；或与耶尔森菌病患者、病原携带者、带菌动物接触。接受小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌感染者或病原携带者捐献的血液输血，也可造成耶尔森菌病血源性传播。由于冰箱内保存食品是重要的传染来源，因此该病又被称为“冰箱病”。详细流行病学特征见附录 A。

3.2 临床表现

耶尔森菌病的临床表现复杂多样，可表现为胃肠炎型、类阑尾炎型（末端回肠炎型）、反应性关节炎型、结节性红斑型和脓毒症型。

胃肠炎型：最常见，主要表现为急性腹泻，腹泻频率，少则 3~5 次/日，多者达 10 余次/日，部分伴有发热和腹痛。粪便有性状改变，可出现稀便、黏液便、脓血便。

类阑尾炎型：即末端回肠炎型，表现为明显的右下腹痛，部分在临床上被诊断为阑尾炎。

少部分患者还可发展为肠外并发症，主要包括：

反应性关节炎型：最常见的肠外耶尔森菌病型别，主要表现为关节疼痛、肿胀和关节囊液渗出。

结节性红斑型：部分患者发生胃肠炎后 1 周~2 周出现结节性红斑或多形性红斑多。

脓毒症型：血源性感染或免疫功能缺陷的患者可发展到脓毒症，比较罕见，但病死率高。

详细临床特征见附录 B。

3.3 实验室检测

3.3.1 粪便常规检查

粪便性状改变，主要表现为水样便或稀便，亦可见黏液便，少数可见便中带血或脓血。多数病人粪便镜检可见白细胞，其中部分亦可见红细胞。

3.3.2 样本快速检测

小肠结肠炎耶尔森菌或假结核耶尔森菌特异性抗体标记的胶体金快速检测试剂可直接检测患者新鲜粪便，和/或检测粪便、肛拭子、血液（全血或血块）、组织样本（肠系膜淋巴结、切除的阑尾、内镜取得的肠道内壁等）的增菌液阳性。详细操作方法见附录 C。

3.3.3 样本核酸检测

从患者的粪便、肛拭子、血液（全血或血块）、组织样本（肠系膜淋巴结、切除的阑尾、内镜取得的肠道内壁等）等任一种样本中检测到小肠结肠炎耶尔森菌或假结核耶尔森菌特异性基因[铁草胺菌素受体基因（*foxA*）、黏附侵袭基因（*ail*）、侵袭素基因（*inv*）]中一个或多个基因阳性。详细操作方法见附录 C。

3.3.4 病原分离培养

从患者的粪便、肛拭子、血液（全血或血块），组织样本（肠系膜淋巴结、切除的阑尾、内镜取得的肠道内壁等）等任一种样本中分离到小肠结肠炎耶尔森菌或假结核耶尔森菌，详细操作方法见附录 C。

4 诊断原则

根据流行病学史、临床表现和实验室检测进行诊断。

5 诊断

5.1 临床诊断病例

符合以下一种情况者，为临床诊断病例：

- a) 符合 3.2、3.3.1 和 3.3.2，3.1 供参考；
- b) 符合 3.2、3.3.1 和 3.3.3，3.1 供参考。

5.2 确诊病例

符合以下一种情况者，为确诊病例：

- a) 符合 3.2、3.3.1 和 3.3.4。
- b) 符合 3.2、3.3.1 和 3.3.3，且目的基因 *foxA*、*ail*、*inv* 一个或多个基因的聚合酶链式反应（PCR）扩增产物经测序，与 Genbank 等核酸数据库中的参考序列比对一致。

6 鉴别诊断

6.1 耶尔森菌病胃肠炎型应与细菌性痢疾、肠侵袭性大肠埃希菌腹泻、沙门菌腹泻等相鉴别。

6.2 耶尔森菌病类阑尾炎型（末端回肠炎行）应与急慢性阑尾炎相鉴别。

6.3 耶尔森菌病反应性关节炎型应与链球菌、葡萄球菌等其他细菌感染所致化脓性关节炎相鉴别。

6.4 耶尔森菌病结节性红斑型应与药物性、过敏性结节性红斑等相鉴别。

6.5 耶尔森菌病脓毒症型应与其他细菌感染所致脓毒症相鉴别。

附录 A
(资料性附录)
耶尔森菌病流行病学

A.1 流行特征

耶尔森菌病是一种全球性疾病，各大洲均有分布，比利时、芬兰、瑞典等是目前人类小肠结肠炎耶尔森菌感染率最高的国家，最近一次报道是 2018 年上半年在瑞典由于食用猪肠引起的一起暴发。中国在 20 世纪 80 年代报道过两次暴发，大约有 500 人感染。当前，已从腹泻样本中分离到病原体为阳性，致病性小肠结肠炎耶尔森菌在中国的感染率为 0.59%，并不低于其他国家调查结果，以 3/O:3 型为流行型别，不同于欧洲国家流行的 4/O:3 型。已经发现在我国临床上部分耶尔森菌导致的腹泻常被诊断为细菌性痢疾，因此我国实际耶尔森菌病流行水平可能被低估。假结核耶尔森菌的感染率一般都稍低于小肠结肠炎耶尔森菌，多分布于北半球，南半球主要见于澳大利亚和新西兰，南美州（除巴西外）与非洲则罕有报道。芬兰与日本是报告假结核耶尔森菌感染最多的国家。

耶尔森菌病一年四季均可发生，由于耶尔森菌的嗜冷性，在寒冷季节多发。

A.2 传染源

小肠结肠炎耶尔森菌为人兽共患病原体，具有广泛的动物宿主，在人类以及所有温血的野生或家养动物中均能发现，猪和犬是最主要的宿主和传染源，在爬行动物、鱼和甲壳水生动物的体表和体内也偶有发现，已经证实苍蝇、蟑螂等昆虫带菌，也可分离自外环境。生猪或未完全熟制猪肉、猪内脏制品是人类感染耶尔森菌病的最主要来源。我国 11 个省市的调查显示，生猪中小肠结肠炎耶尔森菌的平均携带率为 19.53%，最高的地区达到 54.90%。啮齿动物和犬携带或感染该菌也较常见，其他家养哺乳动物、鸟类也都可能带菌。接触带菌动物，尤其与家犬的密切接触，也是感染耶尔森菌病的一种重要方式。假结核耶尔森菌分布更为广泛，在鸟类中的感染率通常大大高于小肠结肠炎耶尔森菌，候鸟的迁徙则对于假结核耶尔森菌在世界范围内不同大陆之间的广泛传播起到很大作用。

A.3 传播途径

小肠结肠炎耶尔森菌与假结核耶尔森菌主要通过粪一口途径传播。人类感染，尤其是暴发流行最主要的途径是通过摄入了被污染的食物和水。人类患者的粪便、尿液带菌可引起人群间的相互传染。人类通过直接接触带菌动物也会造成感染。

小肠结肠炎耶尔森菌与假结核耶尔森菌是食源性病原菌，可通过冰箱储存食物造成传播。该菌的污染可能发生在食物的制造、加工，以及无封闭包装食品的切割、分装、搬运、售卖等各个过程。目前已从各种生熟肉食、蔬菜、奶及奶制品、果汁饮料等食物中分离出小

肠结肠炎耶尔森菌。由于细菌本身的嗜冷性,可以在冰箱冷藏保存的食品中长期存活和繁殖,冰箱低温储存的食品是感染耶尔森菌病的重要来源。水源或土源传播造成的疫情多是由于水和土壤遭到了被感染牲畜粪便的污染。

输入受到小肠结肠炎耶尔森菌或假结核耶尔森菌污染的红细胞是引起输血相关感染的原因之一,由于该菌能够在冷藏温度下繁殖,因此它也可能会通过冷藏保存的血液使受血者感染。耶尔森菌病的血源性传播虽然比较罕见,但由于通常会直接导致患者发生脓毒症,病死率高,仍然需要得到重视。

A.4 易感人群

人群普遍易感,发病者多见于婴幼儿。婴幼儿发病多为腹泻型病例,其他临床型病例的发病率则低于成人,较大年龄儿童和青少年多为类阑尾炎型。人类白细胞抗原 HLA-B27 等位基因携带者、肝病、糖尿病、血液病、器官移植术后、人类免疫缺陷病毒(HIV)携带者等免疫缺陷者更容易发生反应性关节炎等肠外并发症。严重感染一般发生在使用免疫抑制剂、具有免疫缺陷或铁过载的人群中。通常预后较好,有严重基础疾病合并败血症者预后较差,病死率较高。

附录 B
(资料性附录)
耶尔森菌病临床表现

B.1 概述

耶尔森菌进入人体肠道后通过肠黏膜进入下层淋巴组织派氏结（Peyer's 结），在肠腔和肠淋巴组织中生长繁殖，导致大量多核白细胞增生，引起急性炎症。极少数病人病原体经血流播散，由于小肠结肠炎耶尔森菌的嗜淋巴特征，有可能通过淋巴管播散，到达关节和其他组织，引起耶尔森菌肠外感染。

耶尔森菌病潜伏期 1d~10d。该病患者可长期排菌，潜伏期跨度较长。由于菌型不同以及个体的健康状况、反应性、免疫水平不同，临床表现也不同：腹泻多见于婴幼儿；结节性红斑多见于 40 岁以上的成人；肠系膜淋巴结炎多发生在青少年及年长儿童；自身免疫现象常见于妇女；HLA-B27 病人易发生关节炎；在铁过载的患者中，较常发生全身性感染。

B.2 临床分期

B.2.1 急性期

此期以急性炎症为主，临床表现因感染器官而异，通常可从受侵害部位分离出病原体。主要表现有肠胃炎、淋巴结炎、末端回肠炎（类阑尾炎）、肺炎、脓毒症等。其中以肠炎最常见，可发生在任何年龄组，但 5 岁以下婴幼儿发病率最高。

B.2.2 并发症期

主要表现为反应性关节炎、结节性红斑、心肌炎等。此期于急性期后 1 周~3 周出现，大部分合并症比较严重，常需住院治疗。

B.2.3 再发期

主要疾病有多发性肌炎、类风湿性关节炎、红斑狼疮、结节性多发性关节炎等自身免疫病。

B.3 临床类型

B.3.1 胃肠炎型

急性胃肠炎是耶尔森菌病最常见的临床表现，典型症状为腹泻和发热，婴幼儿所占比例较高，病情轻重不一；腹泻为水样便、黏液便、重者可出现血便，每日腹泻次数不等，少则 3 次~5 次/d，多者达 10 余次/d，便常规检验可见白细胞和/或红细胞。目前我国临床上部分耶尔森菌导致的腹泻常被诊断为细菌性痢疾。

B.3.2 类阑尾炎型（末端回肠炎型）

某些病例表现右下腹 1/3 处疼痛，形成临床上的一种急症，常被诊断为阑尾炎，但通过阑尾手术后发现阑尾多正常，而且常观察到末端回肠、阑尾、肠系膜淋巴结肿大。

B.3.3 反应性关节炎型

反应性关节炎型是最常见的肠外耶尔森菌病型别，以成人为主，女性居多。关节局部症状主要表现为疼痛、肿胀和关节囊液渗出。

B.3.4 结节性红斑型

结节性红斑型也是肠外耶尔森菌病的一种。部分成人耶尔森菌病会在胃肠炎后 1 周~2 周出现结节性红斑或多形性红斑多，但也有调查表示 40%的病例缺乏胃肠症状。

B.3.5 脓毒症型

不常见，但症状严重，病死率接近 50%。具有肝硬化、糖尿病、恶性肿瘤、严重贫血和血液病等病史的感染者可发展为脓毒症，少数的一般感染者也会发生。

附录 C
(规范性附录)
耶尔森菌病病原学检测

C.1 样本采集、转运与保存

患者的粪便、肛拭子、血液（全血或血块）、组织（肠系膜淋巴结、切除的阑尾、肠道内壁等）样本等都可用于耶尔森菌的分离培养。腹泻病人粪便样本采集着重选取性状改变或脓液、黏液部位。

样本采集后立即分为两份，一份置于无菌容器内 4℃ 迅速转运到病原学实验室按照 C.2 的方法进行核酸检测；一份立即按照 C.3 的方法接种到增菌液或选择性培养基中，按照增菌和培养的相应温度 24h 内转运到病原学实验室进行细菌分离培养。

如现场无法直接接种增菌液或培养基，可将 5mL 或 5g 以上样本暂时置于 Carry-Blair 转运培养基中，4℃ 冷藏条件下，24~48h 之内运输到病原学实验室后进行核酸检测或菌株分离培养。

如样本不能及时检测需要存放较长时间，则建议将样本置于 25%~30% 灭菌甘油肉汤中，立即 -20℃ 或更低温度冷冻，保存和转运温度全程需要保持在 -20℃ 或以下，样本保存 3 个月~6 个月后仍可分离到菌株，但分离效率可能受到影响，核酸检测效率不会受到较大影响。

C.2 样本快速检测

C.2.1 样本快速检测液

取少量待测粪便，肛拭子，血液（全血或血块），肠系膜淋巴结、切除的阑尾或内镜取得的肠道内壁等组织样本于 1mL 生理盐水充分震荡混匀，待自然沉降后取上清液作为样品快速检测液；增菌样品将增菌管颠倒混匀，待自然沉降后取上清液作为样品快速检测液。

C.2.2 检测方法

准备好样本快速检测液后，打开胶体金快速检测试剂，吸取样品快速检测液，滴加 1 滴~2 滴（约 100μl~150μl）于检测卡上的样品孔内，需确保操作过程中没有气泡产生。设置好计时器，于加样后 15min~20min 内判读结果。

C.2.3 结果判读

C.2.3.1 阳性结果

质控线与检测线都出现，提示检测到特异抗原。

C.2.3.2 阴性结果

质控线出现，检测线未出现，提示未检测到特异抗原。

C.2.3.3 无效结果

质控线未出现，则无论检测线是否出现，均为无效，应重新进行检测。

C.2.4 方法的局限性

C.2.4.1 假阳性结果

当阳性结果与临床表现不一致时，需通过其他方法进一步确证。

C.2.4.2 假阴性结果

当样本中抗原浓度低于检测下限，则出现假阴性结果。当阴性结果与临床表现不一致时，需通过其他方法进一步确证。

C.3 样本核酸检测

将粪便、肛拭子或组织样本按照相应试剂盒提取程序提取获得 DNA，使用普通聚合酶链式反应（PCR）或实时荧光定量聚合酶链式反应（qPCR）分别扩增小肠结肠炎耶尔森菌特异性基因 *foxA*、*ail* 和假结核耶尔森菌特异性基因 *inv*。所有反应均需设立阳性和阴性对照。

C.3.1 检测方法

C.3.1.1 qPCR 法

采用 20 μ l 体系：10 μ l 商业化 Premix，7.2 μ l 超纯水，0.2 μ l ROXII，上下游引物、探针（浓度均为 100 nmol/L）各 0.2 μ l，样本 DNA 2 μ l。引物、探针序列见表 C.1。

扩增程序为：95 $^{\circ}$ C 预变性 10s；95 $^{\circ}$ C 5s，60 $^{\circ}$ C 30 s，共 40 个循环。

表 C.1 *ail* 与 *foxA* 基因 qPCR 用引物与探针

引物/探针名称	引物序列/ 5' → 3'	扩增长度/bp
<i>ail</i> -F	TTTGGAAGCGGGTTGAATTG	101
<i>ail</i> -R	GCTCACGGAAAGGTTAAGTCATCT	
<i>ail probe</i>	FAM-CTGCCCCGTATGCCATTGACGTCTTA-BHQ	
<i>foxA</i> -F	ACGGCGGTGATGTGAACAA	85
<i>foxA</i> -R	GGGTCCACTTGCAGCACATT	
<i>foxA probe</i>	FAM-ACCTTCCTTGATGGGCTGCGCTTACTC-BHQ	
IAC-F	GCAGCCACTGGTAACAGGAT	118
IAC-R	GCAGAGCGCAGATACCAAAT	

IAC probe	HEX-AGAGCGAGGTATGTAGGCGG-TAMRA	
-----------	--------------------------------	--

C.3.1.2 普通 PCR 法

采用 20 μ l 体系：10 μ l 商业化 Premix，8 μ l 超纯水，上下游引物（浓度均为 10 μ mol/L）各 0.5 μ l，样本 DNA1 μ l。引物序列见表 C.2。

扩增程序为：95 $^{\circ}$ C 预变性 5min；95 $^{\circ}$ C 15s，退火 30s，72 $^{\circ}$ C 30s，25 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

表 C.2 *ail*、*foxA*、*inv* 基因普通 PCR 用引物

引物名称	引物序列 (5' → 3')	退火温度/ $^{\circ}$ C	扩增长度/bp
<i>ail</i> -F	TAATGTGTACGCTGCGAG	57	351
<i>ail</i> -R	GACGTCTTACTTGCACTG		
<i>foxA</i> -F	GGTTCCTTGAGCGTATTGATG	58	1094
<i>foxA</i> -R	GGTCATCGGTTTCAGCAGTTT		
<i>inv</i> -F	CGGTACGGCTCAAGTTAATCTG	61	183
<i>inv</i> -R	CCGTTCTCCAATGTACGTATCC		

PCR 完成后 1.5%琼脂糖凝胶电泳观察条带。

C.3.2 结果判读

样本核酸检测判读见表 C.3：*foxA* 和 *ail* 都阳性，表示样本中含有致病性小肠结肠炎耶尔森菌；仅 *foxA* 基因阳性者，表示样本中含有非致病性小肠结肠炎耶尔森菌；*inv* 基因阳性者，表示样本中含有假结核耶尔森菌。

表 C.3 样本核酸检测结果判断

	<i>foxA</i>	<i>ail</i>	<i>inv</i>
致病性小肠结肠炎耶尔森菌	+	+	-
非致病性小肠结肠炎耶尔森菌	+	-	-
假结核耶尔森菌	-	-	+

C.4 样本细菌分离培养

根据病原学检测目的不同，分别采用直接分离或长期冷增菌策略，临床急性期病例样本或疫情样本为节省时间，可直接接种选择性平板后分离菌株；日常监测或回顾性检测样本则可采用长时间冷增菌的策略从而提高分离率。

小肠结肠炎耶尔森菌与假结核耶尔森菌使用相同的分离培养流程，通过菌株形态、生化反应特征的差异进行鉴别。

C.4.1 样本细菌分离培养流程

粪便、肛拭子、全血直接接种平板或接种选择性增菌液；组织样本、血块则无菌研磨后接种平板或接种选择性增菌液，按照以下程序进行耶尔森菌分离培养（图 C.1）。

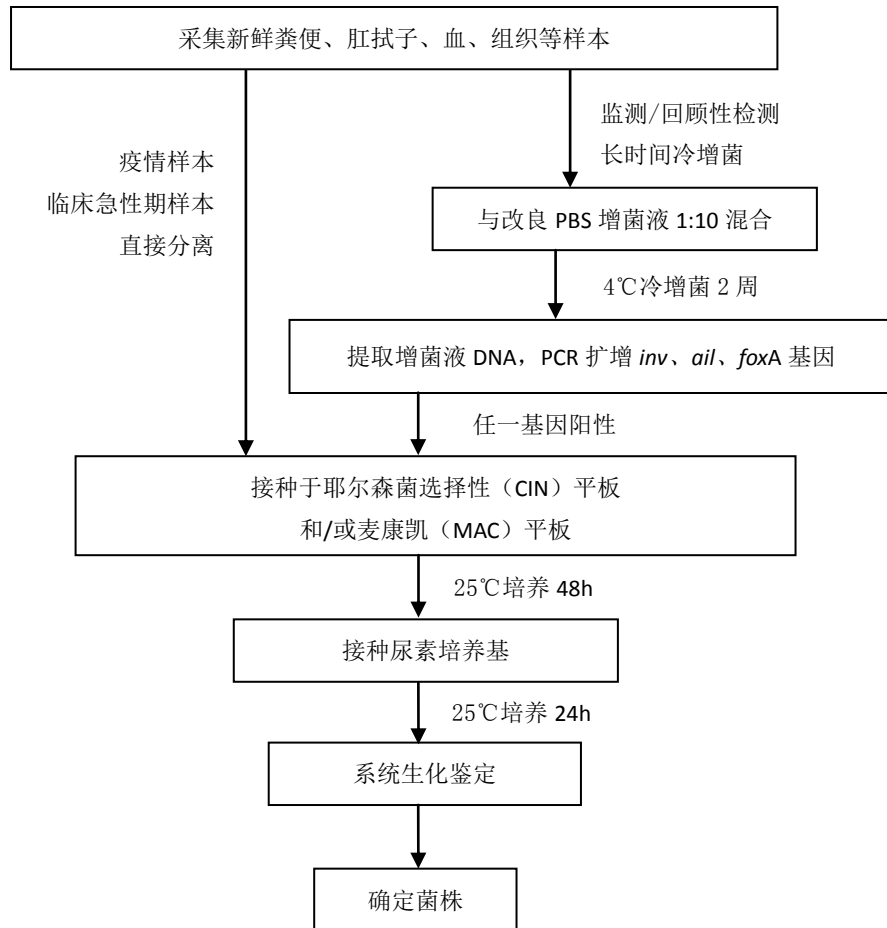


图 C.1 小肠结肠炎耶尔森菌与假结核耶尔森菌分离培养流程图

C.4.2 样本冷增菌

若选择直接分离策略，则直接跳至 C.4.4 步骤。

若选择长时间冷增菌策略，则将样本按照不低于 1:10 的比例接种于商品化的蛋白胨—

山梨醇—胆盐肉汤（Peptone Sorbitol Bile Broth，PSB）增菌液或商品化的改良磷酸盐缓冲液（改良 PBS）增菌液中，增菌液总体积需要至少 6mL 以上，充分摇匀。立即置于 4℃ 进行 2 周的冷增菌。

C.4.3 增菌液的分子生物学初筛

增菌 2 周后，提取增菌液 DNA，按照 C.2 所述方法进行耶尔森菌的分子生物学初筛。*foxA*、*ail* 与 *inv* 任一基因阳性的样本都接种选择性平板进行下一步分离培养，三个基因检测都阴性的样本判断为不含有小肠结肠炎耶尔森菌或假结核耶尔森菌，一般情况下不再进行菌株分离。

C.4.4 接种选择性平板

将选择直接分离策略的样本或增菌初筛阳性的样本接种于耶尔森菌选择性培养基（*Yersinia selective agar*，CIN 平板）或麦康凯平板（MAC 平板），划线分离。接种后立即置于 25℃ 培养。

小肠结肠炎耶尔森菌与假结核耶尔森菌在各种肠道选择性培养基上都可生长。在需氧或厌氧条件下均可生长，生长温度范围较宽，0~45℃ 都可生长，最佳生长温度为 25~28℃。一般增殖传代培养，使用普通 LB 平板或脑心浸液平板。小肠结肠炎耶尔森菌培养 18~24h，假结核耶尔森菌生长速度较慢，需要 24~48h。两种耶尔森菌的菌落形态类似，假结核耶尔森菌菌落更为细小。25℃ 培养 24h，呈细小湿润的奶白色菌落，脑心浸液平板上菌落稍大颜色稍深，在肉汤中呈均匀混浊生长，一般不形成菌膜。

样本首次接种建议培养 48h。在耶尔森菌选择性平板上，小肠结肠炎耶尔森菌形成较小的湿润菌落，直径约 1mm~2mm，中心呈深玫瑰红色，凸起较尖锐，周围有较窄的半透明环，称“公牛眼”状菌落。假结核耶尔森菌在耶尔森菌选择性平板上形态与小肠结肠炎耶尔森菌相似，但菌落更小，中心玫瑰色更深，周围透明环更窄。

麦康凯（MAC）平板 25℃ 培养 24~48h，形成直径约 0.5mm~1mm 的小菌落，圆形、光滑、湿润的半透明菌落，中央有极淡的粉色。

C.4.5 生化特征筛选——尿素分解试验

从每块选择性培养基上至少挑取 5 个可疑菌落进行生化鉴定，分别接种于尿素液体培养基，震荡均匀，25℃ 培养，尿素培养基变红色为分解尿素，接种 2h 开始即可陆续观察到，观察至 24h 结束。

C.4.6 系统生化鉴定

对分解尿素的疑似菌株重新在脑心浸液肉汤平板或 LB 平板上 25~28℃ 传代增殖后进行系统生化鉴定，可使用手工生化鉴定条、系统生化鉴定仪以及质谱鉴定仪，从而最终确定细

菌种属。

需要注意的是，由于耶尔森菌最优培养温度为 25~28℃，系统生化鉴定仪 37℃ 培养可能使部分生化反应结果发生变化，出现鉴定错误或无法鉴定的情况。质谱鉴定仪由于目前数据库所限，可能存在漏检或误检。

目前生物梅里埃手工生化鉴定试剂条(API20E)是耶尔森菌属生化鉴定的金标准。此外，可能会出现部分生化反应异常的情况，如：鸟氨酸脱羧酶、枸橼酸等反应。当菌落形态相似，其他生化反应较为符合的情况下，可用单管手动生化反应进行复核，以免漏掉阳性菌株。

小肠结肠炎耶尔森菌与假结核耶尔森菌的主要生化反应差异见表 C.4。

表C.4 小肠结肠炎耶尔森菌与假结核耶尔森菌生化反应比较

生化反应	小肠结肠炎耶尔森菌	假结核耶尔森菌	生化反应	小肠结肠炎耶尔森菌	假结核耶尔森菌
动力25℃/37℃	+/-	+/-	葡萄糖产气	-	-
尿素	+	+	甘露醇	+	+
H ₂ S	-	-	山梨醇	+	-
氧化酶	-	-	蔗糖	+	-
吲哚	v	-	棉子糖	-	v
靛基质	v	v	蜜二糖	-	v
甲基红	+	+	鼠李糖	-	+
VP25℃/37℃	v/-	-	纤维二糖	+	-
枸橼酸盐	-	v	肌醇	v	-
苯丙氨酸脱氨酶	-	-	乳糖	v	-
鸟氨酸脱羧酶	+	-	阿拉伯糖	+	+
赖氨酸脱羧酶	-	-	水杨酸	v	v
精氨酸脱羧酶	-	-	七叶苷	v	+

注：+：阳性结果；-：阴性结果；v：不同菌株结果不同。

C.5 菌种的保存与运输

小肠结肠炎耶尔森菌与假结核耶尔森菌在普通平板或斜面上可以存活 2 个星期以上。在 0.5% 脑心浸液半固体培养基上至少可以保存 3 个月至半年，可以作为短期保存或运输。长期保存菌株使用 20%~30% 甘油肉汤冻存，-80℃ 冻存，可保存十年以上，接种菌量大有利于菌种的保存。不建议使用瓷珠进行菌株短期保存运输或长期保存，可能会出现菌株无法复苏的情况。

按照原卫生部《人间传染的病原微生物名录》(卫科教发[2006]15 号)要求，小肠结肠炎耶尔森菌与假结核耶尔森菌属于第三类病原体，采用 B 类包装运输。

注：《人间传染的病原微生物名录》发布新版后，应按照新版要求执行。

C.6 菌株病原学特征鉴定

从样本中分离到的小肠结肠炎耶尔森菌或假结核耶尔森菌可依照以下方法进行进一步病原学特征的鉴定。

C.6.1 血清分型

C.6.1.1 小肠结肠炎耶尔森菌

小肠结肠炎耶尔森菌根据“O”抗原目前至少可以分为 70 个以上的血清型,但目前全球的商业化分型抗血清(或单克隆抗体)仅限于常见致病性菌株的血清型,包括 O:1,2、O:3、O:5、O:8 与 O:9 血清型。使用致病性菌株常见血清型的特异性单克隆抗体或分型抗血清进行玻片凝集,同时用生理盐水做对照。在生理盐水中自凝者为粗糙型菌株,不能分型。

小肠结肠炎耶尔森菌同一株菌可能具有多种“O”抗原因子,如: O:5,27、O:1,2a,3 等。用活菌抗原做凝集试验,必须与各型血清都做检测,才能判定型别。仅与少数得到的血清作试验,有时会漏掉其他抗原因子。某些“O”抗原同其他细菌有共同性,如 O:9 与布鲁菌有交叉反应。

通过玻片凝集进行血清分型,典型的凝集阳性结果为:形成大的凝集颗粒,液体完全变清亮。有时凝集结果不够典型:液体仍有混浊,但凝集颗粒已形成,颗粒稍小,可以判定为阳性结果。单克隆抗体的凝集与血清凝集结果不同,呈细沙状。

兔免疫分型诊断血清由于是多克隆抗体,因此会存在非特异凝集,在启用一个批次诊断血清前,需要做好质量评价。

C.6.1.2 假结核耶尔森菌

目前一共发现了 15 个血清型,6 个血清亚型: O:1a、O:1b、O:1c、O:2a、O:2b、O:2c、O:3、O:4a、O:4b、O:5a、O:5b、O:6、O:7、O:8、O:9、O:10、O:11、O:12、O:13、O:14、O:15。假结核耶尔森菌各个血清型都发现了致病性菌株,同一血清型,既有致病性菌株,也有非致病性菌株。从目前世界各地分离到的菌株来看,O:1~O:5 血清型菌株大多数都是致病性菌株。

由于分型血清的局限性,目前使用 PCR 方法进行血清分型。

使用普通 PCR 方法扩增表 C.5 各个基因,根据各个基因的组合判断血清型。

表 C.5 假结核耶尔森菌血清分型判别

血清型	目的基因										
	<i>gmd-fcl</i>	<i>ddhC-prt</i>	<i>manB</i>	<i>abe</i>	<i>wbyL</i>	<i>wbyH</i>	<i>ddhAB</i>	<i>wbyK</i>	<i>wzx</i>	<i>wzz-gsk</i>	<i>hemD-ddhD</i>

O:1a		+				+	+		+		
O:1b	+	+	+		+	+	+	+		+	+
O:1c	+		+			+	+	+	+		
O:2a				+			+				
O:2b	+		+	+			+				
O:2c			+	+			+				
O:3	+	+	+				+				
O:4a			+				+				
O:4b		+					+				
O:5a	+		+				+		+		
O:5b	+		+						+		
O:6							+				
O:7										+	
O:8		+	+				+				
O:9											
O:10										+	+
O:11	+		+					+	+		
O:12	+		+		+		+				
O:13	+		+		+		+				
O:14	+		+		+	+		+	+		
O:15	+	+	+			+	+		+		

引物序列见表 C.6:

表 C. 6 假结核耶尔森菌血清分型引物序列

目的基因	引物名称	引物序列/5' → 3'	产物大/bp	退火温度/°C
<i>gmd-fcl</i>	Ypf-14159	TCAAGATCGCCATGAGAC	1370	53
	Ypr-15549	AGGTTTCATTCGTTGGTTC		
<i>ddhC-prt</i>	Ypf-5270	CGCATAGAAGAGTTTGTG	1072	
	Ypr-6342	CTTTCGCCTGAAATTAGAC		
<i>manB</i>	Ypf-18740	GCGAGCCATAACCCAATAGAC	963	
	Ypr-19703	GCCACCCATCAAATTCATAC		
<i>abe</i>	Abe1	AGAATAGTTCTGACTGGAGGAAG	775	
	Abe2	TCAGGAGCCATTACCTCATC		
<i>wbyL</i>	Ypf-17770	TTGGAGAAACAAACCTATCTGG	644	
	Ypr-18414	TTTGCATAAAAACGACATAGGC		
<i>wbyH</i>	Ypf-7170	CGTTATCCAAAAAAGAGG	528	
	Ypr-7698	ATGGGAGACGCTTGTGATG		
<i>ddhA-B</i>	Ypf-3057	TGTCGCCTAAAGTTATCG	407	

	Ypr-3464	CGAATATCACCGATTTC		
<i>wbyK</i>	Ypf-13231	CCGATTACCAGATTTTGAC	307	
	Ypr-13538	CAAATTCTTATAACCACCACG		
<i>wzx</i>	Ypf-8576	GAAATTCGCATGTAAAAGCTATTG	105	
	Ypr-8681	GAACCTAGACTTACCACCCCAAC		55
<i>wzz-gsk</i>	Ypf-20511	GAAAAATACAGCGAGCAG	742	
	Yerfb2	GAYTTGCGYTTACCAGGAAATTCATTG		
<i>hemD-ddhD</i>	Ypf-913	CAATCCAATGAAGAGTCAG	181	
	Ypr-1094	CCCTATGACATAAAAACCC		

扩增体系与扩增程序参照 C.3.1.2。

C.6.2 生物分型

C.6.2.1 小肠结肠炎耶尔森菌

生化反应不仅是小肠结肠炎耶尔森菌鉴定的主要依据，还作为生物分型依据。根据表 C.7 生化反应，25°C 培养 48h 后小肠结肠炎耶尔森菌的生物型可分为生物 1A、1B、2、3、4 和 5 共 6 个生物型。小肠结肠炎耶尔森菌的生物分型在临床上很有意义，大多数生物 1A 型是非致病性菌株，生物 1B、2、3、4 和 5 型则大部分为致病性菌株。

表 C.7 小肠结肠炎耶尔森菌生物分型指标

生化反应	生物型					
	1A	1B	2	3	4	5
脂肪酶	+	+	-	-	-	-
七叶苷	+	-	-	-	-	-
水杨甙	+	-	-	-	-	-
吲哚	+	+	(+)	-	-	-
木糖	+	+	+	+	-	d
海藻糖	+	+	+	+	+	-
硝酸盐还原试验	+	+	+	+	+	-
DNA 酶	-	-	-	-	+	+
脯氨酸胺酶	d	-	-	-	-	-
β-D-葡萄糖苷酶	+	-	-	-	-	-
吡嗪酰胺酶	+	-	-	-	-	-
注: +: ≥90%的菌株阳性; d: 11%-98%的菌株阳性; -: ≥90%的菌株阴性; (+): 弱阳性反应。						

C.6.2.2 假结核耶尔森菌

通过棉子糖、蜜二糖、枸橼酸利用试验可分为 4 个生物型（表 C.8）：

表 C.8 假结核耶尔森菌生物分型

生化反应	生物型			
	1 型	2 型	3 型	4 型
棉子糖	-	-	-	+
蜜二糖	+	-	-	+
枸橼酸	-	-	+	-

C.6.3 毒力基因鉴定

C.6.3.1 小肠结肠炎耶尔森菌

主要进行以下 5 个基因的正常 PCR 检测，所有反应均设立阳性和阴性对照：

位于染色体上的 *ail*（粘附侵袭位点基因）、*ystA*（小肠结肠炎耶尔森菌耐热性肠毒素 A 基因）和 *ystB*（生物 1A 型小肠结肠炎耶尔森菌携带的小肠结肠炎耶尔森菌耐热性肠毒素 B 基因）；位于毒力质粒（pYV）的 *yadA*（黏附素基因）和 *virF*（Yop 调节子转录活化因子基因）。

扩增体系与扩增程序参照 C.2.1.2，扩增引物见表 C.9：

表 C.9 小肠结肠炎耶尔森菌毒力基因 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>ail</i> -F	TAATGTGTACGCTGCGAG	351	57
<i>ail</i> -R	GACGTCTTACTTGCCTG		
<i>ystA</i> -F	ATCGACACCAATAACCGCTGAG	79	61
<i>ystA</i> -R	CCAATCACTACTGACTTCGGCT		
<i>ystB</i> -F	GTACATTAGGCCAAGAGACG	146	61
<i>ystB</i> -R	GCAACATACCTCACAACACC		
<i>yadA</i> -F	CTTCAGATACTGGTGTGCTGT	849	60
<i>yadA</i> -R	ATGCCTGACTAGAGCGATATCC	759 ^a	
<i>virF</i> -F	GGCAGAACAGCAGTCAGACATA	561	63
<i>virF</i> -R	GGTGAGCATAGAGAATACGTCG		
^a 1B/O:8 型菌株扩增产物片段大小。			

传统上根据染色体和毒力质粒携带毒力基因的情况可将小肠结肠炎耶尔森菌分为致病性和非致病性菌株。染色体上的 *ail* 和 *ystA* 基因是致病性菌株所必备的，自然条件下致病性

菌株是携带毒力质粒的，而在人工传代条件下，毒力质粒可能丢失。传统非致病性菌株不携带上述毒力基因，但部分非致病性菌株的染色体上携带 *ystB* 基因。传统致病性菌株是导致耶尔森菌病的最主要病原。但近来世界各地越来越多地报道发现了传统非致病性菌株导致的耶尔森菌病散发病例，甚至是小规模暴发流行。

结果判读（表 C.10）：

致病性小肠结肠炎耶尔森菌：*ail+*、*ystA+*、*ystB-*、*yadA+*、*virF+*或 *ail+*、*ystA+*、*ystB-*、*yadA-*、*virF-*（毒力质粒丢失）；

非致病性小肠结肠炎耶尔森菌：*ail-*、*ystA-*、*ystB+*、*yadA-*、*virF-*或 *ail-*、*ystA-*、*ystB-*、*yadA-*、*virF-*。

表 C.10 小肠结肠炎耶尔森菌菌株致病性判定

菌株致病性	染色体			毒力质粒	
	<i>ail</i>	<i>ystA</i>	<i>ystB</i>	<i>yadA</i>	<i>virF</i>
致病性菌株	+	+	-	+	+
	+	+	-	-	-
非致病性菌株	-	-	+	-	-
	-	-	-	-	-

C.6.3.2 假结核耶尔森菌

主要进行以下基因的普通 PCR 检测：*inv*（侵袭素基因）、*yadA*（黏附素基因）、*virF*（Yop 调节子转录活化因子基因）与 *ypmA*、*ypmB*、*ypmC*（编码结核耶尔森菌衍生丝裂原 A、B、C）。所有反应均设立阳性和阴性对照。

扩增体系与扩增程序参照 C.3.1.2，引物序列见表 C.10：

表 C.10 假结核耶尔森菌毒力基因 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>inv</i> -F	CGGTACGGCTCAAGTTAATCTG	183	61
<i>inv</i> -R	CCGTTCTCCAATGTACGTATCC		
<i>yadA</i> -F	CTTCAGATACTGGTGTGCTGT	849	60
<i>yadA</i> -R	ATGCCTGACTAGAGCGATATCC		
<i>virF</i> -F	TCATGGCAGAACAGCAGTCAG	590	53
<i>virF</i> -R	ACTCATCTTACCATTAAGAAG		
<i>ypmA</i> -F	CACTTTTCTCTGGAGTAGCG	350	51
<i>ypmA</i> -R	GATGTTTCAGAGCTATTGTT		
<i>ypmB</i> -F	TTTCTGTCATTACTGACATTA	453	52
<i>ypmB</i> -R	CCTCTTCCATCCATCTCTTA		
<i>ypmC</i> -F	ACACTTTTCTCTGGAGTAGCG	418	53

<i>ypmC-R</i>	ACAGGACATTTTCGTCA		
---------------	-------------------	--	--

C.6.4 分子分型——脉冲场凝胶电泳

脉冲场凝胶电泳（PFGE）目前被认为是小肠结肠炎耶尔森菌分子分型的金标准，此外多位点序列分析（MLST）、单核苷酸多态性（SNPs）分析等都可作为分子分型的方法。

小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌的 PFGE 操作步骤与一般肠道菌相同。小肠结肠炎耶尔森菌使用 *Not I* 进行酶切，电泳脉冲时间：2s~20s，电泳时间：18h~19h（10 泳道胶 18h，15 泳道胶 19h）。假结核耶尔森菌使用 *Not I* 或 *Fse I* 进行酶切，电泳脉冲时间：*Not I*：2~18s，*Fse I*：2~35s，电泳时间：18h~19h（10 泳道胶 18h，15 泳道胶 19h）。

参考文献

1. 景怀琦. 腹泻症候群病原学监测与检测技术[M]. 广州: 中山大学出版社, 2016.
2. 汪华. 小肠结肠炎耶尔森菌[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
3. BOTTONE EJ. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues[J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(2): 257-276.
4. WANG X, QIU H, JIN D, et al. O:8 serotype *Yersinia enterocolitica* strains in China. Int J Food Microbiol[J], 2008, 125(3): 259-66.
5. Duan R, Liang J, 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.
6. WANG X, CUI Z, WANG H, 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]. J Clin Microbiol. 2010, 48(5): 1604-1610.
7. LIANG J, WANG X, XIAO Y, et al. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered in Chinese abattoirs[J]. Appl Environ Microbiol. 2012 Apr; 78(8): 2949-2956.
8. SKURNIK M, PEIPPO A, AND ERVELA E. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b [J], Mol Microbiol. 2000, 37(2): 316-330.