

不同厂家小肠结肠炎耶尔森氏菌微量生化鉴定试剂盒的比对

杨绪伟¹, 林国强¹, 卢勉飞¹, 李艳嫦¹, 蔡芷荷^{1,2,3}, 吴清平^{2*}

(1. 广东环凯微生物科技有限公司, 广东广州 510663)

(2. 广东省科学院微生物研究所, 广东广州 510070) (3. 广东环凯生物科技有限公司, 广东肇庆 526238)

摘要: 评价本实验室研制的小肠结肠炎耶尔森氏菌微量生化鉴定试剂盒(简称 EasyID)的使用性能。用 36 株菌(包括小肠结肠炎耶尔森氏菌 2 株标准株, 19 株分离株; 弗氏耶尔森氏菌 5 株分离株; 中间型耶尔森氏菌 5 株分离株; 克氏耶尔森氏菌 5 株分离株), 测试 EasyID, 传统液态生化管(简称 HKM)以及国内其他品牌(简称 KIT)的三种鉴定试剂盒。结果表明: 36 株测试菌株的鉴定结果, EasyID、KIT 两种干制鉴定试剂盒与 HKM 传统液态鉴定试剂盒鉴定结果相比总体符合率分别为 99.69%、98.15%, EasyID 相比 KIT, 与 HKM 的符合率更高; EasyID、HKM、KIT 三种鉴定试剂盒与标准要求相比总体符合率分别为 99.37%、99.07%、97.83%, EasyID 符合率最高, HKM 其次, KIT 略低。结论: EasyID 小肠结肠炎耶尔森氏菌微量生化鉴定试剂盒的可靠性优于 KIT, 与 HKM 相当。在使用方便性上, 采用一步加样的技术的 EasyID 优于 HKM 和 KIT。

关键词: 生化鉴定; 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 微量化

文章编号: 1673-9078(2022)08-297-301

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.8.0897

Comparison of Micro-biochemical Identification Kits for *Yersinia enterocolitica* from Different Manufacturers

YANG Xuwei¹, LIN Guoqiang¹, LU Mianfei¹, LI Yanchang¹, CAI Zhihe^{1,2,3}, WU Qingping^{2*}

(1. Guangdong Huankai Microbial Sci & Tech. Co. Ltd., Guangzhou 510663, China)

(2. Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Science, Guangzhou 510070, China)

(3. Guangdong Huankai Biologic Sci & Tech. Co. Ltd., Zhaoqing 526238, China)

Abstract: This study aimed to evaluate the performance of the micro-biochemical identification kit for *Yersinia enterocolitica* developed in our laboratory (termed EasyID). Thirty six strains of *Y. enterocolitica* (including two standard strains and nineteen isolated strains of *Y. enterocolitica*; five isolated strains of *Y. flexneri*; five isolated strains of *Y. intermedia*; five isolated strains of *Yersinia Klebsiella*) were used to evaluate the three kinds of *Y. enterocolitica* identification reagent kits: EasyID, traditional liquid biochemical tube (HKM) and other domestic brands (termed KIT). The results showed that the identification results of the thirty six tested strains exhibited overall coincidence rates of 99.69% and 98.15%, respectively, for the “dry” identification kits, EasyID and KIT, compared with those of the traditional liquid identification kits. Compared with KIT, EasyID had a higher coincidence rate with HKM; the three identification kits, EasyID, HKM and KIT, had overall compliance rates of 99.37%, 99.07%, and 97.83%, respectively, compared with the standard requirements, with the EasyID having the highest conformity rate, followed by HKM then KIT. Conclusion: The reliability of EasyID *Yersinia enterocolitica* microbiochemical identification kit was superior to KIT and comparable to HKM. In terms of ease of use, EasyID involving one-step sampling technique was superior to HKM and KIT.

引文格式:

杨绪伟,林国强,卢勉飞,等.不同厂家小肠结肠炎耶尔森氏菌微量生化鉴定试剂盒的比对[J].现代食品科技,2022,38(8):297-301,+9

YANG Xuwei, LIN Guoqiang, LU Mianfei, et al. Comparison of micro-biochemical identification kits for *Yersinia enterocolitica* from different manufacturers [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 297-301, +9

收稿日期: 2021-08-15

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1604201); 肇庆市引进西江创新团队项目(肇人才领2018-8)

作者简介: 杨绪伟(1987-), 男, 助理工程师, 研究方向: 食品微生物检测产品, E-mail: 1372646149@qq.com

通讯作者: 吴清平(1962-), 男, 博士, 研究员, 中国工程院院士, 研究方向: 食品安全监测与控制, E-mail: wuqp203@163.com

Key words: biochemical identification; *Yersinia enterocolitica*; microquantization

小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 属于肠杆菌科, 是重要的食源性致病菌之一。在过去的二十年间, 欧、美等国家发生了多起的由该菌引起的食源性中毒事件^[1-3]。小肠结肠炎耶尔森氏菌病 (耶氏菌病) 是 20 世纪 80 年代才受到重视的一种新的肠道传染病, 不少地区耶氏菌引起的胃肠炎和严重腹泻, 比痢疾还多, 此菌甚至能引起败血症等疾病^[4,5]。在欧洲, 耶尔森氏菌病已继沙门菌病和弯曲菌病之后, 排在第 3 位的常见肠道疾病, 已成为流行最广泛的传染疾病之一。1981 年我国才发现此病, 通过全国性调查和研究, 发现其在我国的分布非常广泛^[6,7]。主要通过污染食品或水源, 经粪-口途径传播, 进而给人们造成危害。

由于小肠结肠炎耶尔森氏菌的危害性, 并且广泛存在于食品中, 对人们健康构成较大威胁, 因此, 小肠结肠炎耶尔森氏菌的分离鉴定对人类具有重要意义。很多国家都已将该菌列为食品的常规检测项目。鉴于小肠结肠炎耶尔森氏菌的特性, 其检测流程较长, 所以一些研究通过运用分子生物学的检测方法, 如 PCR 法、LAMP 法、免疫法和实时荧光 RPA 法等, 快速筛选和传统培养分离相结合来进行检测该菌^[8-12], 但是目前小肠结肠炎耶尔森氏菌的检测还是以常规分离鉴定技术为主^[13]。基于传统生化鉴定原理开发的小肠结肠炎耶尔森氏菌商品化检验产品, 还有 API 20E 和 VITEK 鉴定系统等, 集成了更全面的生化反应, 较传统生化试剂应用更为便捷^[14]。但该类商品化产品的鉴定结果受其自身菌株数据库的限制, 不能保证在种水平上进行准确鉴定, 例如运用 API20E 试剂不能区分蔗糖反应阴性的小肠结肠炎耶尔森氏菌和克氏耶尔森氏菌^[15]。耶尔森氏菌的基本生化反应特征为: 过氧化氢酶阳性、氧化酶阴性、尿素酶阳性, 发酵葡萄糖, 大多数菌株不发酵乳糖等。通过以下生化反应: 靛基质、V-P 试验、柠檬酸盐、L-鸟氨酸、蔗糖、纤维二糖、L-鼠李糖、蜜二糖和山梨醇, 可以进一步鉴别耶尔森氏菌属菌株的生化特征差异^[16]。国标 GB 4789.8-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验》^[17]中列出了小肠结肠炎耶尔森氏菌及其他 5 种耶尔森氏菌的主要生化反应特征, 用于属内鉴定区别。由于目前传统的生化鉴定管均为液体状态, 存在运输不方便、稳定性差导致保质期短的问题, 且西林瓶铝盖难开, 特别是当实验非常多的情况下, 给检验人员带来了很大的工作量。为了更好地对小肠结肠炎耶尔森氏菌进行鉴定,

减轻检验人员的工作量, 本实验室依据 GB 4789.8-2016^[17], 以传统生化鉴定为基准, 将传统液体鉴定试剂进行微量化和干燥化处理, 研制出干燥态的、方便使用的小肠结肠炎耶尔森氏菌生化鉴定试剂盒。为评价本研究成果干燥态的鉴定试剂盒的鉴定效果, 特与传统液态生化鉴定试剂盒和国内同类产品进行了对比, 现将对比结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂

本实验室研制的小肠结肠炎耶尔森氏菌生化鉴定试剂盒 (以下简称 EasyID), 批号为 A0027T; 小肠结肠炎耶尔森氏菌干制微量生化鉴定试剂盒 (简称 KIT), 批号为 190508; 广东环凯微生物科技有限公司生产的传统液态生化鉴定试剂盒 (简称 HKM), 批号为 5108306; 胰酪胨大豆琼脂培养基 (TSA), 批号为 1084731。

1.2 仪器与设备

BSC-1360-L II B2 生物安全柜, 北京东联哈尔仪器; HVE50 灭菌锅, 日本 HIRAYAMA; DNP-9162 电热恒温培养箱, 广东环凯微生物科技有限公司。

1.3 菌株

表 1 试验菌株种群统计

Table 1 Population statistics of test strains

主要种群	标准株	分离株	小计
小肠结肠炎耶尔森氏菌 <i>Y. enterocolitica</i>	2	19	21
弗氏耶尔森氏菌 <i>Y. frederiksenii</i>	0	5	5
中间型耶尔森氏菌 <i>Y. intermedia</i>	0	5	5
克氏耶尔森氏菌 <i>Y. kirstensenii</i>	0	5	5
总计	2	34	36

共使用 36 株试验株, 其中分离株来源于各类食品, 目前这 36 株菌株均来自广东省食品微生物安全工程研究中心 (种群统计见表 1), 试验株具体编号如下:

小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*): 2 株标准株: CMCC(B)52204、CICC21565; 19 株分离株: FSCC(I)234024、FSCC(I)234074、FSCC(I)234112、FSCC(I)234128、FSCC(I)234133、FSCC(I)234138、FSCC(I)234142、FSCC(I)234144、FSCC(I)234150、FSCC(I)234152、FSCC(I)234166、FSCC(I)234169、FSCC(I)234172、

FSCC(I)234174、FSCC(I)234198、FSCC(I)234202、FSCC(I)234203、FSCC(I)234207、FSCC(I)234208; 弗氏耶尔森氏菌 (*Y. frederiksenii*): 5 株分离株: FSCC(I)234240、FSCC(I)234242、FSCC(I)234263、FSCC(I)234299、FSCC(I)234309; 中间型耶尔森氏菌 (*Y. intermedia*): 5 株分离株: FSCC(I)234030、FSCC(I)234060、FSCC(I)234214、FSCC(I)234262、FSCC(I)234268; 克氏耶尔森氏菌 (*Y.kirstensenii*): 5 株分离株: FSCC(I)234061、FSCC(I)234086、FSCC(I)234095、FSCC(I)234122、FSCC(I)234274。

1.4 方法

EasyID 使用定方法: 取鉴定条及悬浮培养基, 使用前平衡至室温; 从新鲜培养的 TSA 平板上挑取可疑

单菌落接种于悬浮培养基中, 制成 0.5 麦氏浊度的均一菌悬液; 从底座上取下鉴定条, 并从鉴定条右侧向左掀开贴膜, 用微量移液器小心注入 2 mL 菌悬液于分液槽中, 贴回贴膜, 并依次抬起左右两侧数次, 使菌液液面达同一高度, 然后水平托起分液槽端, 确保菌液流入各反应孔中, 贴紧薄膜并放回底座。再次从右侧掀开贴膜, 向第 6 号孔准确添加 30 μL 发酵添加剂, 再分别向第 7、8 号孔中各滴加 3~4 滴无菌液体石蜡, 贴紧薄膜。将已接种的鉴定条放置 26 °C 培养箱; 培养完毕后, 按附件 1 记录 1~8 孔结果; 向第 9 孔滴加 VP 试剂甲液 3 滴, 乙液 2 滴, 不贴紧贴膜, 暴露空气放置 10 min 后, 再观察并记录结果。

KIT 和 HKM 按照相关产品说明书进行操作。主要典型生化特征如下表 2。

表 2 小肠结肠炎耶尔森氏菌与其他相似菌的生化性状鉴别表

Table 2 Identification of biochemical characters between *Yersinia enterocolitica* and other similar bacteria

项目	小肠结肠炎耶尔森氏菌 <i>Y. enterocolitica</i>	中间型耶尔森氏菌 <i>Y. intermedia</i>	弗氏耶尔森氏菌 <i>Y. frederiksenii</i>	克氏耶尔森氏菌 <i>Y. kirstensenii</i>
动力 (26 °C)	+	+	+	+
尿素酶	+	+	+	+
V-P 试验 (26 °C)	+	+	+	-
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	+
蔗糖	d	+	+	-
棉子糖	-	+	-	-
山梨醇	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	+
鼠李糖	-	+	+	-

注: +阳性; -阴性; d 有不同生化型。

2 结果与讨论

2.1 两种干制鉴定试剂盒与传统液态生化鉴定试剂盒的比较

用 HKM、EasyID 和 KIT 三种试剂盒对 36 株测试菌株进行鉴定, 鉴定结果见表 3。与 HKM 相比, EasyID 和 KIT 两种试剂中 V-P 试验、鸟氨酸脱羧酶、蔗糖、山梨醇、甘露醇、鼠李糖 6 个反应符合率均为 100%, 尿素酶的符合率均为 97.22%; 26 °C 下 EasyID 的动力符合率为 100%, 优于 KIT (88.89%); 此外 EasyID 的棉子糖符合率为 100%, 优于 KIT (97.22%)。两种干制鉴定试剂盒 EasyID 和 KIT 与传统液态生化鉴定试剂盒 HKM 鉴定结果相比, 总体符合率分别为 99.69%、98.15%, EasyID 相比 KIT, 与 HKM 的符合率更高。

表 3 两种鉴定试剂盒与传统生化管的符合率

Table 3 Coincidence rate between two identification kits and

traditional biochemical tube

项目	符合率/%	
	EasyID	KIT
动力 (26 °C)	100	88.89
尿素酶	97.22	97.22
V-P 试验 (26 °C)	100	100
鸟氨酸脱羧酶	100	100
蔗糖	100	100
棉子糖	100	97.22
山梨醇	100	100
甘露醇	100	100
鼠李糖	100	100
平均符合率/%	99.69	98.15

2.2 三种鉴定试剂盒和国标典型特征的比较

表4 三种鉴定试剂盒与典型特征的符合率

Table 4 Coincidence rate of three identification kits with typical characteristics

项目	符合率/%		
	EasyID	HKM	KIT
动力(26 °C)	100	100	88.89
尿素酶	100	97.2	100
V-P 试验(26 °C)	94.44	94.44	94.44
鸟氨酸脱羧酶	100	100	100
蔗糖	100	100	100
棉子糖	100	100	97.22
山梨醇	100	100	100
甘露醇	100	100	100
鼠李糖	100	100	100
平均符合率/%	99.37	99.07	97.83

以国家标准给出的典型生化特征为标准^[9], 参照表2对三种鉴定试剂盒各反应的结果进行判定, 统计出36株测试菌株的符合率, 结果如下表4。与国标典型特征相比, 三种试剂盒中鸟氨酸脱羧酶、蔗糖、山梨醇、甘露醇、鼠李糖5项反应符合率均为100%,

V-P试验的符合率均为94.44%, 这6项反应三种试剂盒效果相当; 26 °C下EasyID和HKM的动力符合率均为100%, 优于KIT(88.89%); EasyID和KIT的尿素酶符合率均为100%, 优于HKM(97.22%); 此外, EasyID和HKM棉子糖的符合率均为100%, 优于KIT(97.22%)。EasyID、HKM和KIT三种鉴定试剂盒与标准要求相比总体符合率分别为99.37%、99.07%、97.83%, EasyID总体平均符合率略高于HKM和KIT, 其中KIT最差。

2.3 详细异常数据

本次试验的结果异于国标给出的典型生化特征的实验数据, 见表5。KIT试剂盒异常项目中包括了小肠结肠炎耶尔森氏菌和弗氏耶尔森氏菌的动力试验、中间型耶尔森氏菌的棉子糖试验和弗氏耶尔森氏菌的V-P试验共3个反应, 占数最多; 其次是HKM包含了克氏耶尔森氏菌的尿素酶试验和弗氏耶尔森氏菌的V-P试验共2个反应; EasyID异常的仅有弗氏耶尔森氏菌的V-P试验1个反应。

表5 详细异常数据

Table 5 Detailed abnormal data

菌株名称	菌株编号	项目	异常结果
小肠结肠炎耶尔森氏菌	CICC21565	动力	KIT: -
小肠结肠炎耶尔森氏菌	FSCC(1)234203	动力	KIT: -
小肠结肠炎耶尔森氏菌	FSCC(1)234207	动力	KIT: -
弗氏耶尔森氏菌	FSCC(1)234263	动力	KIT: -
克氏耶尔森氏菌	FSCC(1)234122	尿素酶	HKM: -
中间型耶尔森氏菌	FSCC(1)234030	棉子糖	KIT: -
弗氏耶尔森氏菌	FSCC(1)234240	V-P 试验	EasyID: - KIT: -; HKM: -
弗氏耶尔森氏菌	FSCC(1)234242	V-P 试验	EasyID: - KIT: -; HKM: -

3 结论

3.1 由表5的异常数据分析可知, 动力、尿素酶、棉子糖、V-P试验3个反应的生化特征与国标的典型生化特征不一致。其中动力、尿素酶和棉子糖3个反应是单一试剂的异常; 而V-P试验反应则是3种试剂一致的异常, 3种试剂的异常结果都呈假阴性。通过查阅伯杰细菌鉴定手册可知, 弗氏耶尔森氏菌的V-P试验没有26 °C的数据, 只有36 °C的数据, 其阳性率为0。根据这一阳性率和三种试剂鉴定出的该反应为一致的阴性, 可以确定这2株弗氏耶尔森氏菌的分离株V-P试验生化特征应该为阴性。

3.2 通过使用EasyID和KIT两种生化鉴定试剂盒进行试验, 根据试验操作过程中的易用性进行比较。

KIT的条掀开盖子后, 需在长槽里加无菌水来维持湿度, 加样的时候需要单孔添加菌悬液, 虽操作比较简单, 但是比较耗时; 而EasyID上方覆盖有封口贴膜, 可以防止在培养过程中液体过度蒸发, 不需要额外加水维持湿度; 接菌的时候轻轻撕开部分贴膜, 采用一步加样与分液技术, 把菌悬液一次加到鉴定条的分液槽里再贴回贴膜, 左右抬起鉴定条的两端使液面达到同一高度, 然后水平托起分液槽端, 使菌悬液流入各个反应孔。这种采用一步加样的方法, 减少了错加漏加的风险, 同时提高了加样效率, 在两种试剂易用性中体验最好。

3.3 EasyID和KIT两种鉴定试剂盒都是培养18~24 h就可以观看结果, 灵敏性一致。在观看结果方面, EasyID试剂的反应孔是圆孔倾斜依次排列, 每个反应

孔培养后的颜色一目了然,色泽清晰可见,判读和记录结果方便快捷;相比较 KIT 在观看结果时则没这么直观,需在试剂下方垫一张白纸才能完全看清反应孔里的颜色,判读结果时显的比较困难。

3.4 本研究依据国家标准研制出了小肠结肠炎耶尔森氏菌微量干燥态生化鉴定试剂盒,使得小肠结肠炎耶尔森氏菌鉴定更快速化、微量化和简易化,大大减轻了检验人员的工作量,以及减少了加工、储藏、运输过程中的人力物力,延长了鉴定试剂的保存期。

参考文献

- [1] 郑浩轩,姜泊.小肠结肠炎耶尔森氏菌研究概况[J].中国微生物生态学杂志,2006,18(5):416-419
ZHENG Haoxuan, JIANG Bo. Research overview of *Yersinia enterocolitica* [J]. Chinese Journal of Microbiology, 2006, 18(5): 416-419
- [2] Acker M L, Schoenfeld S, Markman J, et al. An outbreak of *Yersinia enterocolitica*, O:8 infections associated with pasteurized milk [J]. J Infect Dis, 2000, 181(5): 1834-1837
- [3] Ray Susan M, Ahuja Shama D, Blake Paul A, et al. Population-based surveillance for *Yersinia enterocolitica*, infections in foodnet sites, 1996-1999: Higher risk of disease in infants and minority populations [J]. Clin Infect Dis, 2004, 38(S3): 181-189
- [4] Estrada C S M L, Velazquez L D C, Favier G I, et al. Detection of *Yersinia* spp. in meat products by enrichment culture, immunomagnetic separation and nested PCR [J]. Food Microbiology, 2012, 30(1): 157-163
- [5] Liang J, Duan R, Xia S, et al. Ecology and geographic distribution of *Yersinia enterocolitica* among livestock and wildlife in China [J]. Veterinary Microbiology, 2015, 178(1-2): 125-131
- [6] 于恩庶.中国小肠结肠炎耶尔森氏菌病研究进展[J].中华流行病学杂志,2000,21(6):453-455
YU Enshu. Research progress of *Yersinia enterocolitica* in China [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2000, 21(6): 453-455
- [7] 邵奎东,郑威风,张市.耶尔森氏菌属主要菌种及引起疾病概述[J].中国地方病防治杂志,2009,24(6):417-419
SHAO Kuidong, ZHENG Weifeng, ZHANG Shi. Overview of main strains and diseases caused by *Yersinia* [J]. Chinese Journal of Endemic Disease Control, 2009, 24(6): 417-419
- [8] 张昕,张惠媛,汪琦,等.小肠结肠炎耶尔森氏菌的检测[J].检验检疫科学,2008,18(6):23-26
ZHANG Xin, ZHANG Huiyuan, WANG Qi, et al. Detection of *Yersinia enterocolitica* [J]. Science of Inspection and Quarantine, 2008, 18(6): 23-26
- [9] 张健,邓志爱,刘巧宜,等.两种方法检测冻肉中的小肠结肠炎耶尔森氏菌[J].中国卫生检验杂志,2011,21(3):102-103, 106
ZHANG Jian, DENG Zhiai, LIU Qiaoyi, et al. Detection of *Yersinia enterocolitica* in frozen meat by two methods [J]. Chinese Journal of Health Inspection, 2011, 21(3): 102-103, 106
- [10] 张海鹏,郭英,钟佑宏,等.利用环介导等温扩增技术检测鼠肠中的致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌[J].医学动物防制, 2019,35(11): 1041-1043
ZHANG Haipeng, GUO Ying, ZHONG Youhong, et al. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in rat intestine by loop mediated isothermal amplification [J]. Medical Animal Control, 2019, 35(11): 1041-1043
- [11] 蔡其刚,唐一波,高小龙,等.青藏高原放牧家畜小肠结肠炎耶尔森氏菌 LAMP 检测方法的建立及应用[J].安徽农业科学,2019,47(24):107-110
CAI Qigang, TANG Yibo, GAO Xiaolong, et al. Establishment and application of lamp detection method for *Yersinia enterocolitica* of grazing livestock in Qinghai Tibet plateau [J]. Anhui Agricultural Science, 2019, 47(24): 107-110
- [12] 刘婧文,黄成栋,凌莉,等.致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌实时荧光 RPA 检测方法的建立[J].现代食品科技,2020,36(2): 255-262
LIU Jingwen, HUANG Chengdong, LING Li, et al. Establishment of real-time fluorescence RPA detection method for *Yersinia enterocolitica* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(2): 255-262
- [13] 陈学强.食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌检测技术研究[J].现代食品,2017,2(8):6-9
CHEN Xueqiang. Study on detection technology of *Yersinia enterocolitica* in food [J]. Modern Food, 2017, 2(8): 6-9
- [14] 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
- [15] Joutsen S, Laukkanen-Niinistö R, Henttonen H, et al. *Yersinia* spp. in wild rodents and shrews in Finland [J]. Vector Borne Zoonot Dis, 2017, 17(5): 303-311

(下转第9页)