

研究报告

食品中 2 株非常见耶尔森菌分离鉴定及耐药性分析

罗嘉远,陈洪友,陈敏,窦剑明,高芬,张曦
(上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

摘要:**目的** 对食品中两株 *Yersinia aleksiciae* (Ya) 进行分离鉴定及耐药性分析研究,为非常见耶尔森菌属菌株的分离鉴定提供技术储备。**方法** 2018 年 8 月至 2019 年 3 月采集猪肉、牛肉、鸡肉食品样品,共 300 份。对分离到的疑似 Ya 菌株完成生化鉴定、耐药表型鉴定和全基因组测序分析。**结果** 食品样品中 Ya 的检出率为 0.7% (2/300),生化鉴定中 Ya 与小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*, Ye) 最大区别是 Ye 为赖氨酸脱羧酶阴性, Ya 为赖氨酸脱羧酶阳性。Ya 暂未发现与 Ye 类似的对氨苄西林、I 代头孢菌素、替卡西林等抗生素的天然耐药性,两株 Ya 菌株的耐药性不同。全基因组测序比对 16S rRNA 和 *gyrB*、*rpoD* 基因三个片段序列,证实两株分离菌株为 Ya。**结论** 分离到的两株 Ya 为国内首次发现,目前国外鲜有从食品中分离出该菌的报道。本研究提供的方法可用于其他非常见耶尔森菌的分离鉴定。

关键词: *Yersinia aleksiciae*; 耶尔森菌; 赖氨酸脱羧酶; 全基因组测序; 耐药表型
中图分类号: R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456 (2020) 01-0020-05
DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.01.004

Isolation and drug resistance of 2 stains of *Yersinia* from food

LUO Jiayuan, CHEN Hongyou, CHEN Min, DOU Jianming, GAO Fen, ZHANG Xi
(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: Objective Identification and drug resistance of two stains of *Yersinia aleksiciae* (Ya) isolated from different foods were studied, which provided technical reserves for the isolation of the new *Yersinia* spp. **Methods** A total of 300 food samples were collected from August 2018 to March 2019, including pork, beef and chicken. Separation culture, biochemical identification, drug resistance test, and whole genome sequencing analysis were performed on the isolated suspected Ya. **Results** The positive rate of Ya in food samples was 0.7% (2/300). In biochemical identification, Ya was distinguished from *Yersinia enterocolitica* (Ye) by lysine decarboxylase test, and Ya was positive for lysine decarboxylase while Ye was negative. Ya didn't exhibit natural resistance to ampicillin, cephalosporin I, ticarcillin and other drugs similar to Ye, and the drug resistance was different between the two strains. 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* genes were compared by whole genome sequencing to confirm that the two isolates were Ya. **Conclusion** The two strains of Ya were isolated and found in China for the first time. There was also no report on the isolation of these strains from food. The method provided in this study could be used for the isolation and identification of new *Yersinia* spp.

Key words: *Yersinia aleksiciae*; *Yersinia* strains; lysine decarboxylase; whole genome sequencing; drug resistance

耶尔森菌属 (*Yersinia* spp.) 属于肠杆菌科,其广泛分布于自然界,目前该菌属已发现 22 个种。耶尔森菌属中较为常见的致病种主要有小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*, Ye)、假结核耶尔森菌和鼠疫耶尔森菌。鼠疫耶尔森菌曾被建议归属于假结核耶尔森菌,但由于其引起的鼠疫传染性强,造成的感染后果十分严重,历史发生过三次大流

行,故将鼠疫耶尔森菌单独列种^[1]。假结核耶尔森菌为肠道病原菌,主要引起胃肠道症状,在奶类食品中有过暴发^[2]。Ye 经粪口途径传播,接触带菌动物和食品容易感染,在欧洲,Ye、弯曲菌和沙门菌是 3 个最主要的食源性病原菌^[3]。耶尔森菌属中的其他种如克氏耶尔森菌 (*Yersinia kristensenii*, Yk)、中间耶尔森菌 (*Yersinia intermedia*, Yi)、伯克维耶尔森菌 (*Yersinia bercovieri*, Yb)、弗氏耶尔森菌 (*Yersinia frederiksenii*, Yf) 等的相关研究较少,因暂未发现这些种与人类致病性相关,故也被称为非致病性耶尔森菌^[4-5]。近年来研究发现临床腹泻患者标本中耶尔森菌属的检出率较高,某些腹泻症状也与非致病

收稿日期:2019-12-25
作者简介:罗嘉远 男 技师 研究方向为耶尔森菌属检测
E-mail: luojiayuan@scdc.sh.cn
通信作者:陈敏 男 主任技师 研究方向为细菌学检测
E-mail: chenmin@scdc.sh.cn

性耶尔森菌存在密切关系,传统认为仅携带 *foxA* 和 *ystB* 基因的生物 1 A 型 Ye 是非致病的,但 1982—2002 年间的耶尔森菌暴发中仍检出大量非致病性耶尔森菌,并且患者的症状与致病性 Ye 的患者类似^[6-7],因此非致病性耶尔森菌仍需被重视。

细菌耐药性传播中,耐药基因的水平转移至关重要,非致病性耶尔森菌的生化表型与 Ye 较为接近,对其开展耐药研究可深入了解耶尔森菌耐药基因在种属内的形成和传播。本研究首次从日常风险监测的食品(猪肉和牛肉)中分离出两株 *Yersinia aleksiciae*(Ya),并对其生化特性和耐药情况进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

2018 年 8 月至 2019 年 3 月,自上海市部分大、中、小超市及农贸市场采集猪肉、牛肉和鸡肉样品,肉品类型为新鲜肉、冷冻肉及半成品调理肉,共 300 份。食品样品采集后放入食品采样袋中并做好样品详细信息记录,放入 4 ℃ 冰箱内保存,12 h 内送至上海市疾病预防控制中心进行后续检测,运输途中样品放置于冷藏箱内。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK II Compact 生化鉴定仪、Api 20E 鉴定试剂条、Api 32E 鉴定试剂条、VITEK MS 均购自法国 Biomerieux,全基因组测序仪(华大基因),生物安全柜,恒温培养箱,台式离心机。

蛋白胨山梨醇胆盐肉汤(美国 Fluka),耶尔森菌选择性培养基(CIN,英国 Oxoid),*Not I* 限制性内切酶(日本 Takara)。药敏板及相关药敏试剂均购自上海星佰生物技术有限公司,检测抗生素包括氨苄西林(AMP)、氨苄西林/舒巴坦(AMS)、四环素(TET)、氯霉素(CHL)、复方新诺明(SXT)、头孢唑林(CFZ)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢西丁(CFX)、庆大霉素(GEN)、亚胺培南(IPM)、萘啶酸(NAL)、阿奇霉素(AZI)、磺胺异噁唑(SFZ)、环丙沙星(CIP)、阿莫西林/克拉维酸(AMC)、头孢噻肟/克拉维酸(CTX-C)、头孢他啶/克拉维酸(CAZ-C)、多粘菌素 E(CT)、多粘菌素 B(PB)、米诺环素(MIN)、阿米卡星(AMI)、氨曲南(AZM)、头孢吡肟(FEP)、美罗培南(MEM)、左氧氟沙星(LEV)、多西环素(DOX)、卡那霉素(KAN)、链霉素(STR)、吉米沙星(GEM)。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离培养

将食品样品放置于增菌袋内,倒入 225 ml 蛋白

胨山梨醇胆盐肉汤,4 ℃ 冷增菌 14 d。增菌后将菌液轻轻混匀,用 10 μl 接种环取 1 环增菌液接种于 CIN,26 ℃ 培养 24~36 h,挑取直径约 2~3 mm、中心呈深玫瑰红色、周围有窄的半透明环菌落转种营养琼脂培养基,26 ℃ 培养 24 h。

1.2.2 生化鉴定、耐药检测、全基因组测序分析

使用 VITEK II Compact 生化鉴定仪(GN 卡)、Api 20E 鉴定试剂条以及 Api 32E 鉴定试剂条完成细菌的生化鉴定,三种试验方法相互补充验证,获得最大生化谱。耐药试验参照说明书完成,并做大肠埃希菌(ATCC 25922)的药敏质控。全基因组测序使用华大基因 BGISEQ-100 测序平台完成,建库试剂盒与测序试剂盒使用华大基因生产试剂盒完成。得到拼接序列后,使用 mega 7.0 软件进行本地 Blast,比对 16S rRNA 和 *gyrB*、*rpoD* 基因。

2 结果

2.1 菌株的形态学鉴定

300 份食品样品中有 2 份样品检出 Ya(2 株),检出率为 0.7%(2/300),食品来源为上海市某两个大型超市中散装冷鲜猪肉和包装冷鲜牛肉块,采样时间相同。食品样品杂菌污染较为严重,增菌液培养 24~36 h 后需拿出观察。分离菌株在 CIN 平板上的菌落形态与小肠结肠炎耶尔森菌相近,中央呈粉红色牛眼状凸起,边缘光滑透明,但在相同培养时间下,分离菌株的菌落更小,中央略有凸起,但深玫瑰红色区域较大。培养 48 h 后,凭肉眼难以与其他耶尔森菌属(除鼠疫耶尔森菌外)区分。

2.2 生化反应

对 2 株分离菌株使用 Api 20E、Api 32E 进行生化鉴定。结果显示,分离菌株与 Ye 的最大区别为赖氨酸脱羧酶,分离菌株为赖氨酸脱羧酶阳性,并且 2 株分离菌株的生化结果与 SPRAGUE 等^[8]相关研究数据相似。2 株分离菌株生化反应见表 1。

2.3 抗生素耐药试验结果

对 2 株分离菌株进行 30 种抗生素耐药检测,其中 1 株主要对 AMP、AMS、CTX、CAZ、AMC 等 β-内酰胺酶类抗生素耐药,同时对 MEM 也表现为耐药。另一株仅对 CFX 和 AMC 中介,两者耐药情况差异较大。

2.4 基因测序结果

使用华大基因二代测序仪完成 2 株分离菌株的全基因组测序。使用 mega 7.0 软件采用本地 Blast 对 16S rRNA、*gyrB*、*rpoD* 三个基因序列进行分析,使用邻接(NJ)法构建进化树。系统发育树显示,分离菌株与 Yb 的亲缘性非常接近,与耶尔森菌属中三

表 1 分离菌株生化反应

Table 1 Biochemical features of the isolated stains

生化项目	SH-YA1	SH-YA2	Ye	阳性 率 ^[8] /%
赖氨酸脱羧酶	+	+	-	100
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	100
尿素酶	+	+	+	100
蜜二糖	-	-	-	0
鼠李糖	-	-	-	0
甘油	+	+	+	64
L-阿拉伯糖	+	+	+	100
海藻糖	+	+	+	82
D-木糖	+	+	+	100
水杨苷	-	-	-	0
纤维二糖	+	+	+	100
肌糖	+	-	-	55
乳糖	+	+	+	100
棉子糖	-	-	-	0
山梨醇	+	+	+	100
山梨糖	-	+	+	82
蔗糖	-	-	-	0
七叶苷	-	-	-	0
柠檬酸盐	-	-	-	0
丙二酸	-	-	-	0
吡噪	-	-	-	18
γ-谷氨酰基-β-萘酰胺	+	+	+	100
L-焦谷氨酸-β-萘酰胺	+	+	+	100
L-脯氨酸-β-萘酰胺	+	+	+	100
邻硝基苯基-β-D-吡喃木糖	-	-	-	0
邻硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷	+	+	+	100
对硝基苯基-β-葡萄糖苷酸	-	+	+	45
5-溴-4-氯-3-吡啶基丁酸酯	-	-	-	0
VP 试验	-	-	-	0

注:菌株 SH-YA1 分离自猪肉;菌株 SH-YA2 分离自牛肉;Ye 为标准菌株 ATCC 9610^[8]

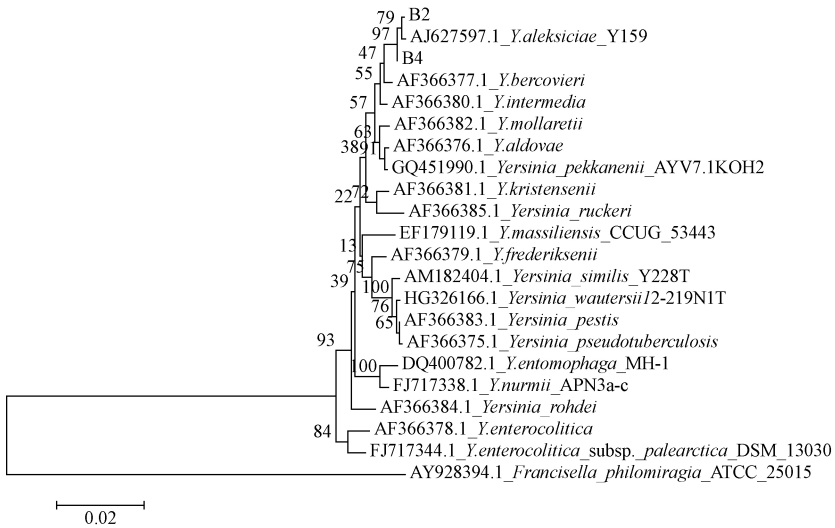
类致病种亲缘关系较远。本次检出的 2 株菌株与 Ya 模式菌株 Y159 同属于一簇,置信度分别为 97%、100%、100%,由此确定此次分离到的菌株均为 Ya。系统发育树见图 1~3。

3 讨论

本研究在上海市食品样品中检出两株 Ya,根据 LPSN (List of prokaryotic names with standing in nomenclature) 查 询 (<http://www.bacterio.net/yersinia.html>),该菌首次由 SPRAGUE 等^[8]于 2005 年命名,目前国内暂无此细菌相关资料。该种模式菌为 Y159,其命名原则是为纪念德国汉堡一名对耶尔森菌属的流行病学和微生物学研究作出贡献的教授。经过 PubMed 查询,由命名者在 2015 年进行了 Y159 菌株的全基因组测序。在分离鉴定过程中,VITEK II 鉴定结果为 Ye 群,Api 20E 及 Api 32E 鉴定结果为耶尔森菌属,VITEK MS 鉴定结果为伯克韦尔耶尔森菌(*Yersinia bercovieri*),最后由二代测序比对 16S rRNA、*gyrB*、*rpoD* 序列结果,最终鉴定为 Ya。

本研究中,Ya 在 CIN 上的菌落形态与 Ye、Yf、Yi 等耶尔森菌十分相似,单纯靠菌落形态辨识不能分离 Ya。从生化反应看,Ya 与 Ye 比较明确的生化差异为赖氨酸脱羧酶反应,此反应包含在 Api 20E 反应管内,故在日常鉴定中,如 VITEK II 或质谱仪无法确定到种的情况下,采用 Api 20E 及 Api 32E 能够在考虑经济性和实效性的情况下更好地鉴定 Ya,有条件的情况下可以选择二代或三代测序进行准确鉴定。

从 2 株 Ya 的耐药表型看,Ya 并没有类似 Ye 的



注:B2 为 SH-YA1;B4 为 SH-YA2

图 1 使用 NJ 法构建 16S rRNA 序列系统进化树
Figure 1 NJ phylogenetic trees based on 16S rRNA

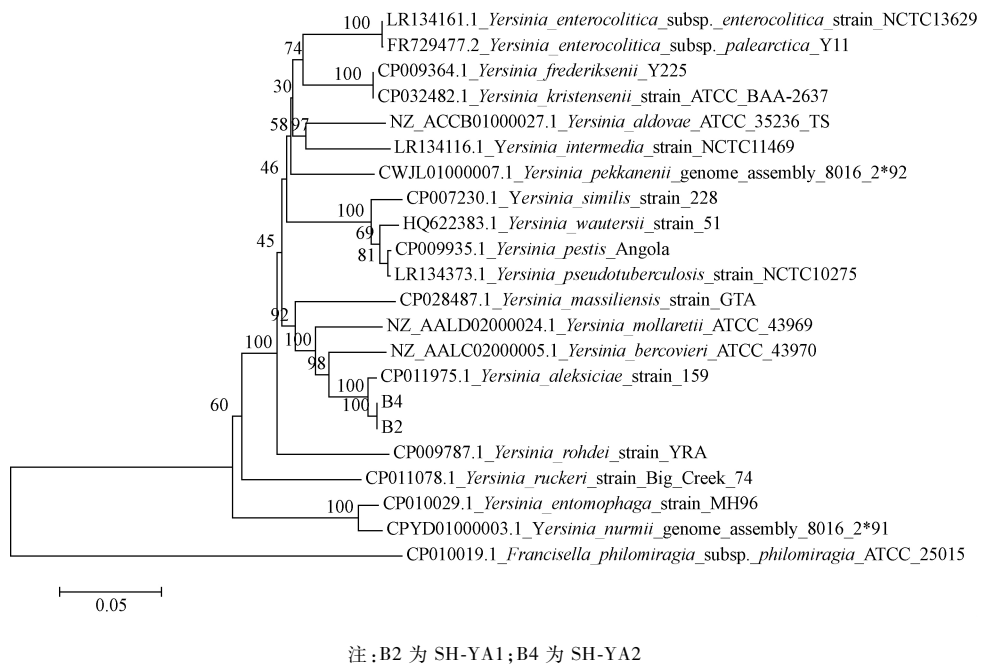


图 2 使用 NJ 法构建 *gyrB* 基因序列系统进化树
Figure 2 NJ phylogenetic trees based on *gyrB* gene

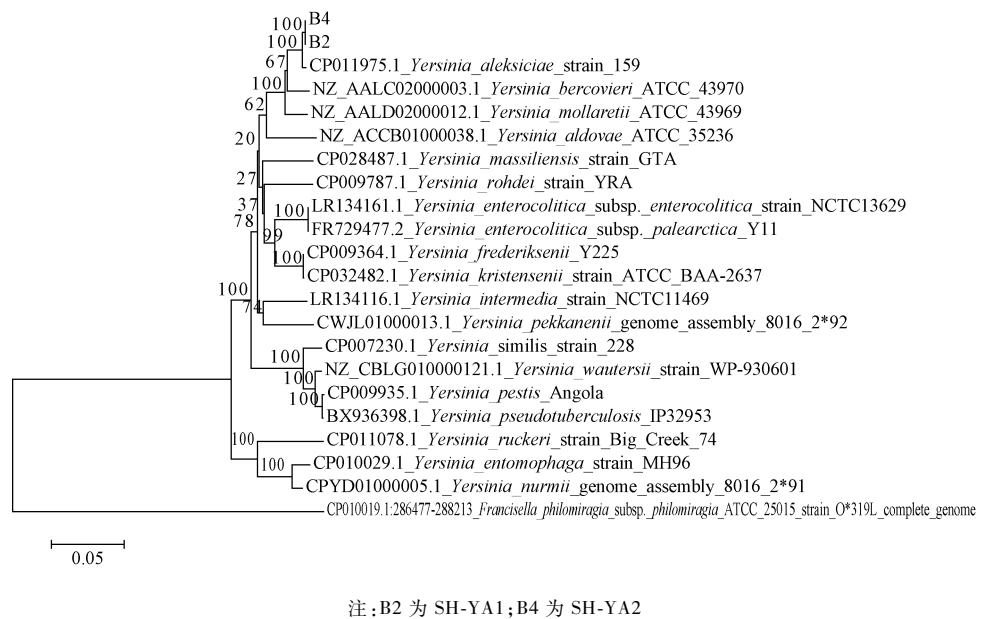


图 3 使用 NJ 法构建 *rpoD* 基因序列系统进化树
Figure 3 NJ phylogenetic trees based on *rpoD* gene

对 AMP、头孢菌素 I 代、替卡西林等药物的天然耐药性,其耐药机制可能与 Ye 有所不同。但 2 株 Ya 的耐药性差异极大,分析可能是样品来源不同,SH-YA1 分离自国产某品牌散装冷鲜猪肉,SH-YA2 分离自澳大利亚某品牌包装冷冻牛腱。不同国家的畜牧业养殖方法可能造成菌株获得性耐药的差异。

Ya 菌株目前在国内外报道中均罕见,暂时无法明确其致病性,但根据 MITTAL 等^[9]和 LOFTUS 等^[10]研究报道,非致病性耶尔森菌建立感染的机会主要取决于宿主防御系统的状态,并且本研究中 1 株 Ya 为多重耐药株,Ya 是否致病仍不明朗,其耐药

基因是否会携带转移到致病菌上还是未知,故 Ya 仍需被关注及开展更深入的研究。类似 Yk、Yf、Yi 的首次发现与鉴定,本研究建立的方法也可用于为其他新发耶尔森菌的分离鉴定提供借鉴。

参考文献

[1] GUIYOULE A, GRIMONT F, ITEMAN I, et al. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1994, 32(3) : 634-641.

[2] CASTRO H, JAAKKONEN A, HAKAKORPI A, et al. Genomic epidemiology and phenotyping reveal on-farm persistence and cold adaptation of raw milk outbreak-associated *Yersinia*

