

- [ 2 ] 陈祖义. 稀土元素的脑部蓄积性、毒性及其对人群健康的潜在危害[J]. 农村生态环境, 2005, 21(4): 72-73, 80.
- [ 3 ] 朱为方, 徐素琴, 张辉, 等. 稀土区儿童智商调查研究[J]. 科学通报, 1996, 41(10): 914-916.
- [ 4 ] 吴敏仪, 张萍, 杨维东, 等. 长期喂饮钇对子代大鼠生长发育及学习记忆能力的影响[J]. 卫生研究, 2006, 35(3): 310-312.
- [ 5 ] 杨维东, 张萍, 刘洁生, 等. 长期稀土钇暴露对大鼠学习记忆能力影响[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(2): 183-184.
- [ 6 ] Veerle P P, Geert J B, An R B, et al. Lanthanum: a safe phosphate binder [J]. Seminars in Dialysis, 2006, 19(3): 195-199.
- [ 7 ] 罗贯一. 硝酸钇对大鼠胃粘膜和胃酸分泌的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1991, 5(1): 50-52.
- [ 8 ] 任雁, 董田甜, 邹莉波, 等. 神经发育毒性体内及体外评价方法[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(1): 61-64.
- [ 9 ] OECD. Draft Test Guideline 426. OECD Guideline for testing of chemicals[Z]. 2000-01-21.
- [ 10 ] Hirano S, Suzuki K T. Exposure, metabolism and toxicity of rare earths and related compounds [J]. Environmental Health Perspectives, 1996, 104(Supplement): 85-95.
- [ 11 ] FENG L X, XIAO H Q, HE X, et al. Long-term effects of lanthanum intake on the neurobehavioral development of the rat [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2006(28): 119-124.
- [ 12 ] 王翹楚, 姜丹, 常秀丽, 等. 动物神经行为测试方法的研究现状[J]. 中国预防医学杂志, 2012, 13(12): 943-946.

## 论著

# 山东地区大肠杆菌的耐药性及分子分型研究

盖文燕, 王娟, 曲志娜, 王君玮, 黄秀梅, 王玉东, 赵思俊, 洪军

(中国动物卫生与流行病学中心 农业部畜禽产品质量安全风险实验室(青岛), 山东 青岛 266032)

**摘要:**目的 了解山东地区肉鸡养殖环节大肠杆菌的分布情况, 初步揭示山东地区大肠杆菌分离株的耐药性及分子流行规律和特征, 为该菌的分子溯源及风险评估提供依据。方法 选取山东地区 2000—2012 年肉鸡养殖场分离的 42 株大肠杆菌为研究对象, 用 13 种抗菌药物进行药物敏感性试验, 选用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 及多位点序列分型 (MLST) 两种分型方法对菌株进行分析。结果 PFGE 方法可分为 34 个带型, 菌株之间的相似系数为 60% ~ 100%, 带型比较分散, 未发现绝对优势的带型; MLST 方法得到 18 个序列型 (ST), 菌株的 7 个管家基因均有不同程度的变异; 耐药性结果显示, 42 株菌均为多重耐药, 对氨苄西林 (AM)、复方新诺明 (SXT) 和氧氟沙星 (NOR) 的耐药率较高, 分别为 97.62%、92.86% 和 90.48%。结论 山东省部分地区肉鸡养殖场中大肠杆菌耐药谱较广, 耐药现象比较严重, 菌株基因呈多态性, 菌株分布具有一定的时间性和地区性。

**关键词:** 大肠杆菌; 耐药性; 脉冲场凝胶电泳; 多位点序列分型; 食源性致病菌

中图分类号: R155; R378.2<sup>+1</sup> 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)02-0109-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.02.003

## Molecular classification and drug resistance analysis of *Escherichia coli* in Shandong Province

GAI Wen-yan, WANG Juan, QU Zhi-na, WANG Jun-wei, HUANG Xiu-mei, WANG Yu-dong,  
ZHAO Si-jun, HONG Jun

(China Animal Health and Epidemiology Center, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Livestock and Poultry Products (Qingdao), Ministry of Agriculture, Shandong Qingdao 266032, China)

**Abstract: Objective** To understand the distribution of *Escherichia coli* in poultry and to reveal the drug resistance and molecular epidemic and characteristics of isolates from Shandong Province, and to provide science basis for the risk assessment. **Methods** A total of 42 *E. coli* isolates were analyzed with drug sensitivity test for 13 antimicrobial agents, and analyzed with PFGE and MLST genotyping. **Results** The PFGE genotyping of 42 isolates yielded 34 PFGE types. MLST analysis of isolates identified 18 STs, and the 7 housekeeping genes had different variation. All isolates were resistant to two or three antimicrobial agents, and the highest resistance was to AM, SXT and NOR, which was 97.62%、

收稿日期: 2015-01-06

基金项目: 国家农产品质量安全风险评估重大专项-2014年(GJFP2014007); 山东省科技发展计划项目(2014GSF120006)

作者简介: 盖文燕 女 助理研究员 研究方向为动物源性食品安全 E-mail: gaiwenyan0929@163.com

通讯作者: 王君玮 男 研究员 研究方向为动物源性食品安全与疫病控制 E-mail: yfjs2000@sina.com

92.86% and 90.48%, respectively. **Conclusion** The resistant spectrum of *E. coli* was wide and serious, gene was polymorphism, and the distribution had a certain timeliness and regional in parts of Shandong Province.

**Key words:** *Escherichia coli*; drug resistance; pulsed field gel electrophoresis; multilocus sequence typing analysis; foodborne pathogens

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 是人和动物体内的肠道常驻菌、条件性致病菌, 分布非常广泛。禽大肠杆菌病是由致病性大肠杆菌引起的人和动物局部或者全身性疾病, 随着规模化、集约化养鸡业的发展, 大肠杆菌病成为危害养鸡业的主要传染病之一, 可给养鸡业造成重大经济损失。在一些大型、个体养鸡场中, 由于饲养条件差 (如饲养密度过高、卫生条件较差等), 可引起大肠杆菌病的爆发。基于上述情况, 随着用药增多, 多重耐药大肠杆菌菌株的出现已对养鸡业的发展形成了严重威胁<sup>[1]</sup>。目前大肠杆菌的流行规律、特点及耐药性问题是全球关注的热点, 监测动物源大肠杆菌流行规律、分布特点及耐药性具有重要的公共卫生意义。

分子分型技术的应用已经对细菌流行病学的发展产生了革命性的影响。其中脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 技术, 由于分型结果准确、稳定、不受表型性状异变的干扰等优点<sup>[2]</sup>, 已经成为细菌分型的“金标准”<sup>[3]</sup>, 广泛用于细菌分型鉴定。多位点序列分型 (MLST) 技术利用 DNA 测序技术揭示管家基因的突变来对病原菌进行分型和鉴定, 该方法具有分辨率高、数据可靠、重复性好、结果便于不同实验室间进行比较、使全球的分子流行病学数据标准化等优点<sup>[4-7]</sup>, 因此 MLST 分型技术不仅广泛用于细菌的分型和溯源, 而且可以帮助了解细菌的克隆系和不同宿主的关系, 从而了解细菌的流行情况。

本研究收集 2000—2012 年山东地区肉鸡养殖场分离的大肠杆菌进行分型研究, 对常用的 13 种抗菌药物进行药物敏感性检测, 以了解大肠杆菌的耐药表型, 初步掌握山东地区肉鸡养殖场中大肠杆菌的耐药分布特点; 同时采用优化后的 PFGE 分型方法及 MLST 分型方法, 对分离株进行分子分型分析, 以探索山东地区肉鸡养殖场中大肠杆菌分离株的基因多态性及流行病学现状。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源

42 株大肠杆菌 (*E. coli*) 分离于 2000—2012 年山东地区肉鸡养殖场, 均为本实验室保存; 用生化反应试验、血清学方法及 PCR 方法对 42 株菌株进行鉴定, 明确了菌株均为非 O157 产志贺毒素大肠杆菌, 同时明确了菌株携带毒力基因的情况<sup>[8]</sup>。

PFGE 分子量标准菌株为沙门菌 Braenderup H9812, 由中国疾病预防控制中心传染病所 PulseNet 实验室馈赠。质控菌株为大肠杆菌 (ATCC 25922), 购自中国兽医药品监察所。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

CHEF-mapper 型脉冲场凝胶电泳仪、GEL DOXR 凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad, VITEK 浊度仪 (法国 BioMerieux), 纯水仪系统, 涡旋振荡器, 恒温培养箱, 水浴摇床。

SeaKem Gold 琼脂糖 (美国 BD), 脑心浸液培养基、细菌琼脂粉均购自北京陆桥技术有限公司, 限制性内切酶 *Xba* I (大连 TaKaRa), 大肠杆菌冻干型定量药敏检测试剂盒 (天津金章科技发展有限公司), 蛋白酶 K、其他试剂 (分析纯) 均购自上海生工生物股份有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PFGE 分型分析

参照美国疾病控制与预防中心 (CDC) PulseNet 的统一非 O157 产志贺毒素大肠杆菌 PFGE 方法<sup>[9]</sup>, 并经本实验室进行优化。将试验获取的电泳图谱用 BioNumerics v4.0 数据库软件进行处理, 识别图形条带。电泳图谱以 *Xba* I 酶切的 H9812 作为统一的分子量标准进行校准确定条带位置, 必要时进行手工校正。聚类图和矩阵图使用非加权配对算数平均法 (UPGMA) 构建, 条带位置差异容许度选择 1.0%, 优化值为 0.5%, Band based/Dice 系数来衡量 PFGE 带型之间的相似度, 范围在 0~1 之间, 0 表示完全不相关, 1 表示完全相同。在限制性内切酶的作用下, 不同菌株会呈现不同的条带数和片段大小, 按照 PulseNet 的命名原则, 对每一种不同的带型进行命名。

#### 1.2.2 MLST 分型分析

用水煮法提取菌株基因组 DNA, 采用 *E. coli* MLST 数据库<sup>[10]</sup> 提供的大肠杆菌 MLST 分型方案, 选择 7 对管家基因 (*adk*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA* 和 *recA*), 对菌株进行 MLST 分析; PCR 扩增体系及条件参考文献<sup>[11]</sup>。PCR 产物经纯化后, 进行双向测序。用 Seqman II 软件结合菌株等位基因的正反向序列图谱对等位基因序列进行拼接和校正, 将校正后的序列递交到 MLST 数据库进行分析, 得出等位基因型。7 个等位基因型的组合即为该菌的序列型 (ST)。然后用 BioNumerics v4.0 软件分析 ST 序

列型构建的最小生成树,分析菌株之间的亲源关系。

### 1.2.3 药敏试验

采用半定量琼脂扩散试验法,按照美国临床实验室标准化委员会 (CLSI) 推荐的操作程序进行<sup>[12]</sup>,判定各菌株对青霉素类(氨苄西林、奥格门丁)、头孢类(头孢噻唑)、氨基糖苷类(庆大霉素、大观霉素)、四环素类(四环素、多西环素)、氯霉素类(氟苯尼考)、磺胺及增效剂(磺胺异恶唑、复方新诺明)、喹诺酮类(恩诺沙星、氧氟沙星)及其他抗菌药物(多粘菌素)的敏感度,同时用大肠杆菌(ATCC 25922)作为质控菌株,参照 CLSI 的标准判断耐药

(R)、敏感(S)或中介(I)。

## 2 结果

### 2.1 PFGE 分析结果

42 株大肠杆菌经 *Xba* I 酶切,PFGE 分型后,每个菌株产生 11~16 条电泳条带,大约在 50~400 kb,采用 BioNumerics v4.0 数据库软件分析图谱,结果如图 1 所示。42 株大肠杆菌可分为 34 个不同的带型,命名为 0001~0034,菌株之间的相似系数为 60%~100%,带型比较分散,未发现绝对优势带型,说明菌株在基因水平上具有多态性。

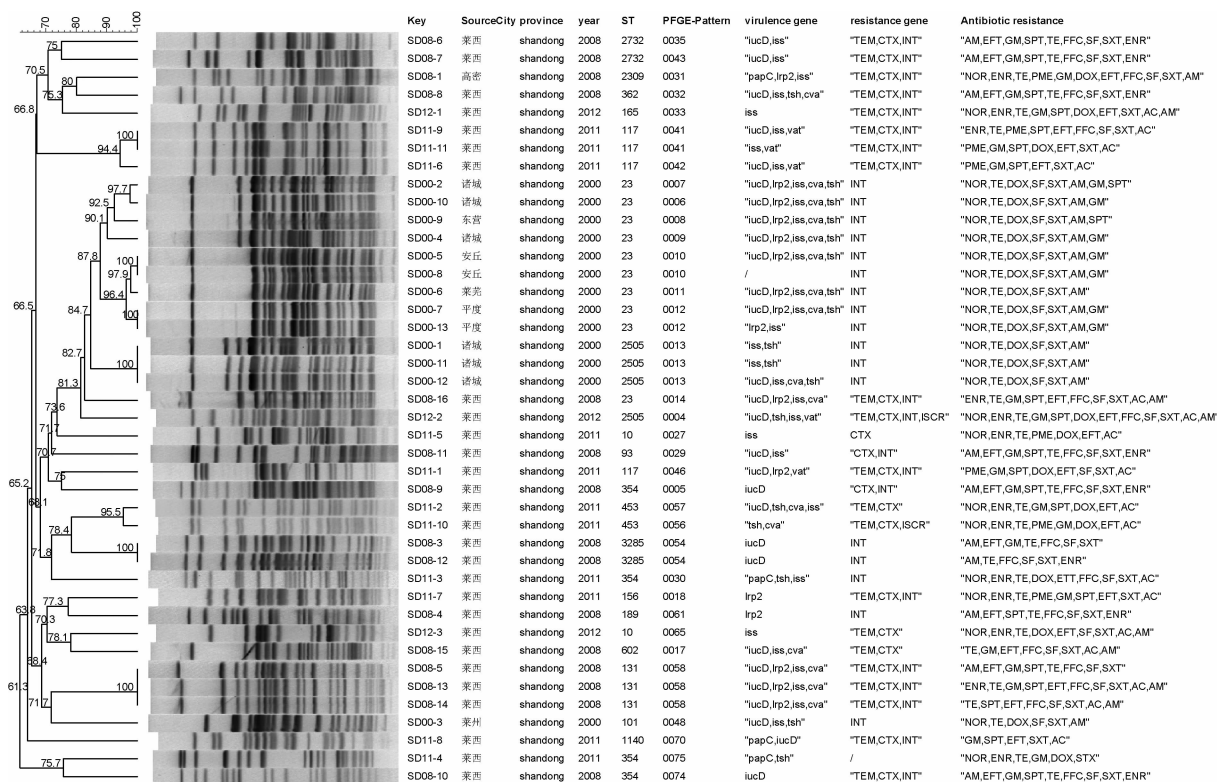


图 1 大肠杆菌 PFGE 聚类分析图

Figure 1 Dendrogram of PFGE profiles of *E. coli*

从菌株的来源分析,不同地区菌株的 PFGE 带型差别比较明显,相同地区菌株的 PFGE 带型差异较大,未发现不同地区具有相同带型的情况。从分离的时间看,相同年份来源菌株的 PFGE 带型散在分布,各个带型菌株数量比较分散。在 PFGE 图谱分析中,相似值在 0.85 以上的菌株可以判断为流行病学相关的,该方法能够用于分析菌株之间的相关性<sup>[13]</sup>。按照该方法 2000 年山东省不同地区分离的菌株均有相关性,莱西地区 2011 年的 3 株菌也有相关性,说明这些菌株之间有非常近的亲缘关系。其他的分离株之间均不相关,说明亲缘关系较远。

### 2.2 MLST 分型结果

将 42 株大肠杆菌的 7 个管家基因(*adh*, *fumC*,

*gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* 和 *recA*) 扩增产物的测序结果与 MLST 网络数据库中 *E. coli* 菌株序列进行比对,获得 42 个 ST 序列,对 ST 序列分析得到 18 个不同的 ST 型,见表 1。其中 ST-23 序列型最多,占总数的 23.81% (10/42),其次是 ST-354、ST-2505 和 ST-117 均占总数的 9.52% (4/42),未出现新的等位基因型。

采用 BioNumerics v4.0 软件对 42 株菌的 18 个不同的 ST 型分别按照时间和地区构建最小生成树,见图 2。从图 2 也可以看出,按照地区和时间聚类所得结果基本一致,ST23 与 ST2505,ST165 与 ST189 分别构成 1 个克隆系,它们之间只有 1 个等位基因的差异,其他 ST 型之间都是 3 个及 3 个以上等位基因的差异。从遗传关系上可知,ST-23 主要

表1 菌株的ST类型及每个位点的类型

Table 1 ST and allele profile of each isolate

| 分离株                              | ST型  | <i>adk</i> | <i>fumC</i> | <i>gyrB</i> | <i>icd</i> | <i>mdh</i> | <i>purA</i> | <i>recA</i> |
|----------------------------------|------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|
| SD08-4                           | 189  | 10         | 27          | 5           | 10         | 12         | 8           | 49          |
| SD08-5,13,14                     | 131  | 53         | 40          | 47          | 13         | 36         | 28          | 29          |
| SD08-6,7                         | 2732 | 46         | 26          | 208         | 6          | 5          | 16          | 4           |
| SD08-9,10,SD11-3,4               | 354  | 85         | 88          | 78          | 29         | 59         | 58          | 62          |
| SD08-11                          | 93   | 6          | 11          | 4           | 10         | 20         | 8           | 6           |
| SD08-15                          | 602  | 6          | 19          | 33          | 26         | 11         | 8           | 6           |
| SD11-7                           | 156  | 6          | 29          | 32          | 16         | 11         | 8           | 44          |
| SD11-8                           | 1140 | 83         | 23          | 164         | 181        | 80         | 1           | 42          |
| SD11-2,10                        | 453  | 99         | 6           | 33          | 33         | 24         | 8           | 7           |
| SD08-3,12                        | 3285 | 6          | 6           | 15          | 10         | 20         | 23          | 6           |
| SD12-2,SD00-1,11,12              | 2505 | 6          | 41          | 12          | 1          | 20         | 13          | 7           |
| SD11-5,SD12-3                    | 10   | 10         | 11          | 4           | 8          | 8          | 8           | 2           |
| SD08-1                           | 2309 | 271        | 26          | 39          | 25         | 5          | 31          | 19          |
| SD08-8                           | 362  | 62         | 100         | 17          | 31         | 5          | 5           | 4           |
| SD12-1                           | 165  | 10         | 27          | 5           | 10         | 12         | 8           | 2           |
| SD11-1,6,9,11                    | 117  | 20         | 45          | 41          | 43         | 5          | 32          | 2           |
| SD00-3                           | 101  | 43         | 41          | 15          | 18         | 11         | 7           | 6           |
| SD00-2,4,5,6,7,8,9,10,13,SD08-16 | 23   | 6          | 4           | 12          | 1          | 20         | 13          | 7           |

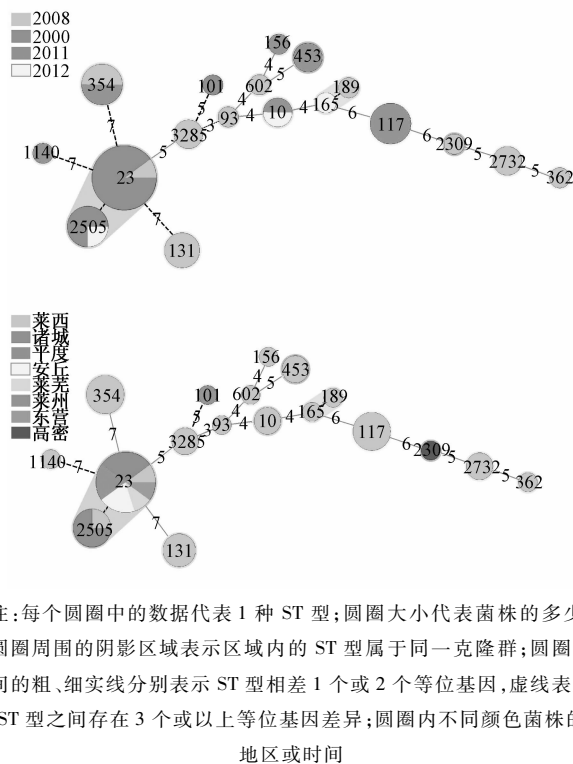
来源于诸城(2000年)、平度(2000年)、安丘(2000年)、莱芜(2000年)、东营(2000年)和莱西(2008年)6个地区的分离株,ST-2505分布在诸城(2000年)和莱西(2012年)2个地区,它们在等位基因*fumC*上有差异,说明2000年山东不同的地区的菌株有较近的亲缘关系,莱西地区在2008、2012年菌株之间也有较近的亲缘关系;ST-165和ST-189都来自莱西(2012、2008年)分离株,它们在*recA*等位基因上有差异,同样说明莱西地区在2008、2012年分离菌株亲缘关系较近。

### 2.3 药敏试验结果

42株大肠杆菌全部为耐药菌株,结果见表2,其中对氨基苄西林(AM)、复方新诺明(SXT)和氧氟沙星(NOR)的耐药率较高,分别为97.62%、92.86%和90.48%,对恩诺沙星(ENR)、多西环素(DOX)的耐药率为85.71%。而多粘菌素(PME)的敏感性最高,达78.57%,氟苯尼考(FFC)和奥格门丁(AC)的敏感性次之,均为47.62%。同时42株菌的多重耐药率也达到了100%,其中最小的为5耐,最多的为12耐,优势表型是NOR-TE-DOX-SF-SXT-AM-GM,结果见图1。

### 3 讨论

大肠杆菌传统的分型方法只能从血清型、耐药谱、噬菌体等分型方法上区分,都是从细菌的表型上进行分型。随着对细菌感染研究的日益深入,传统的细菌表型分析技术已不能满足疾病的诊断和流行病学调查的需要。因此,需要从分子水平对细



注:每个圆圈中的数据代表1种ST型;圆圈大小代表菌株的多少;圆圈周围的阴影区域表示区域内的ST型属于同一克隆群;圆圈之间的粗、细实线分别表示ST型相差1个或2个等位基因,虚线表示ST型之间存在3个或以上等位基因差异;圆圈内不同颜色菌株的地区或时间

图2 大肠杆菌 MLST 遗传关系分析图

Figure 2 Genetic relationships of *E. coli* isolates based on MLST

表2 大肠杆菌对13种抗菌药物的药敏试验结果

Table 2 13 kinds of resistance to antimicrobial agents of *E. coli*

| 药物名称       | R  | I  | S  | 耐药率/% | 敏感率/% |
|------------|----|----|----|-------|-------|
| 氧氟沙星(NOR)  | 38 | 2  | 2  | 90.48 | 4.76  |
| 恩诺沙星(ENR)  | 36 | 5  | 1  | 85.71 | 2.38  |
| 四环素(TE)    | 21 | 16 | 5  | 50.00 | 11.90 |
| 多粘菌素(PME)  | 7  | 2  | 33 | 16.67 | 78.57 |
| 庆大霉素(GM)   | 30 | 3  | 9  | 71.43 | 21.43 |
| 大观霉素(SPT)  | 22 | 6  | 14 | 52.38 | 33.33 |
| 多西环素(DOX)  | 36 | 2  | 4  | 85.71 | 9.52  |
| 头孢噻唑(EFT)  | 27 | 0  | 15 | 64.29 | 35.71 |
| 氟苯尼考(FFC)  | 17 | 5  | 20 | 40.48 | 47.62 |
| 磺胺异恶唑(SF)  | 35 | 0  | 7  | 83.33 | 16.67 |
| 复方新诺明(SXT) | 39 | 0  | 3  | 92.86 | 7.14  |
| 氨基苄西林(AM)  | 41 | 0  | 1  | 97.62 | 2.38  |
| 奥格门丁(AC)   | 17 | 5  | 20 | 40.48 | 47.62 |

注:参照 CLSI 的标准判断,耐药(R)、敏感(S)、中介(I)

菌进行基因分型。分子分型技术可以揭示菌株之间的关系,在流行病学调查中起着非常重要的作用。用于细菌分子分型的方法有核糖体分型、随机扩增PCR(RAPD)、多位点串联重复序列(MLVA)和扩增片段长度多态性(AFLP)等,分别从不同方面提供流行病学信息,但是有的方法结果不容易辨认或者结果不稳定。

PFGE方法是基于DNA结构的分子分型方法,被认为是分子分型的可靠方法,在国外被广泛应用于菌株的分子流行病学研究<sup>[14]</sup>。MLST通过分析多个(6~8个)管家基因内部片段核苷酸序列,对每个基因位点指派1个等位基因数值,从而

建立对应的等位基因图谱<sup>[15]</sup>。该方法在大肠杆菌中得到了很好地应用<sup>[16]</sup>,用该方法对动物源性大肠杆菌 ST 序列与人流行的大肠杆菌 ST 序列进行聚类分析,了解大肠杆菌在动物源与人流行的规律及相关性。

本研究收集山东地区 2000—2012 年肉鸡养殖场分离到的大肠杆菌进行分型研究,经 PFGE 分析获得 34 个不同的带型,菌株型较多,变异较大,DAI 等<sup>[17]</sup>对来自不同养殖场的 16 株多重耐药的鸡源大肠杆菌进行 PFGE 分型分析,获得 16 个不同的带型。李琳等<sup>[18]</sup>对 3 个养殖场 50 株鸡源大肠杆菌进行了 PFGE 分型分析,获得了 44 个不同的带型,这些都充分体现大肠杆菌分布的多态性。

全部菌株的图谱结果显示(见图 1),PFGE 分型和 MLST 分型具有相关性,ST 型相同的菌株,PFGE 型不一定相同,但是 PFGE 型相同的,ST 型一定相同,如 ST-23 分离株,来自于 2000、2008 年不同的分离时间和分离地点,但其 PFGE 是不同的;分离株 SD08-5、SD08-13 和 SD08-14 的 PFGE 型是相同的,其 ST 型均为 ST-131。同时 PFGE 相同的菌株,ST 型相同的菌株,既有来自于同一年份同一个地区同一个养殖场的,也有不同年份同一地区的,说明大肠杆菌分离菌株之间存在垂直传播和水平传播,因此结合 PFGE 分型方法和 MLST 分型方法有利于发现大肠杆菌流行优势株的分子特征,确定不同地区的菌株特点。

人类、经济型动物及食品之间存在一个相互紧密联系的微生态环境,养殖业大量使用抗生素,会使动物体内的微生物长期存在耐药筛选压力,必定会产生耐药株<sup>[19]</sup>。养殖环节的这些耐药菌株,必定会通过食物链定植于人体的肠道中,从而对人体的健康产生危害。因此研究肉鸡场中大肠杆菌菌株的耐药性及分布情况,可以从源头上控制用药,阻止抗生素在食物链中的转移。本研究选用 13 种抗菌药物对 42 株大肠杆菌进行药敏试验,结果显示 42 株菌株对 13 种药物的耐药性呈现两极分化,氨苄西林(AM)、复方新诺明(SXT)和氧氟沙星(NOR)的耐药率较高,分别为 97.62%、92.86% 和 90.48%,对恩诺沙星(ENR)、多西环素(DOX)的耐药率为 85.71%,与国内其他报道结果一致<sup>[8]</sup>。分析 PFGE 分型结果与耐药谱之间的关系,发现 PFGE 型相同的菌株其耐药谱型不一定相同,而 PFGE 型不同的菌株其耐药谱型可能相同,这与余婷等<sup>[20]</sup>报道的结果一致。由此可以看出同一克隆型的菌株在增殖播散的过程中存在耐药质粒的获取或丢失,导致耐药性的改变,使 PFGE 型相同的菌株具有不同的耐药谱。

本研究揭示了 2000—2012 年山东地区肉鸡养殖场中大肠杆菌的耐药谱、PFGE 型和 ST 型的分布特征,建立了包括耐药信息、毒力基因及 PFGE 分型和 MLST 分型等数据库,为发现大肠杆菌跨区域传播和散在分布于不同地理区域的暴发流行及从源头上控制和减少多重耐药菌株的产生,防止抗生素在食物链中的传播奠定基础。

(志谢 感谢中国疾病预防控制中心传染病所 PulseNet 室的同志)

## 参考文献

- [1] Guerra B, Junker E, Schroeter A, et al. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52(3): 489-492.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention. Prevention pneumococcal disease among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) [J]. *MMWR*, 2000, 49(RR-9): 1-35.
- [3] Gerner-Smidt P, Kincaid J, Kubota K, et al. Molecular surveillance of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157 by PulseNet USA [J]. *J Food Prot*, 2005, 68(9): 1926-1931.
- [4] Hanninen M L, Hakkinen M, Rautelin H. Stability of related human and chicken *Campylobacter jejuni* genotypes after passage through chick intestine studied by pulsed-field gel electrophoresis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(5): 2272-2275.
- [5] Harrington C S, Thomson-Carter F M, Carter P E. Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: implications for the flagellin gene typing scheme [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(9): 2386-2392.
- [6] Steinbrueckner B, Ruberg F, Kist M. Bacterial genetic fingerprint: a reliable factor in the study of the epidemiology of human campylobacter enteritis [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(11): 4155-4159.
- [7] Wassenaar T M, Geilhausen B, Newell D G. Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(5): 1816-1821.
- [8] 王娟, 黄秀梅, 翟海华, 等. 鸡大肠杆菌毒力因子流行病学调查及耐药性分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2013, 49(10): 38-41.
- [9] Centers for Disease Control and Prevention. PulseNet international [DB/OL]. [2014-10-16]. <http://www.pulsenetinternational.org>.
- [10] Warwick Medical School. *Escherichia coli* MLST databases [DB/OL]. [2014-10-16]. <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>.
- [11] 白向宁, 王红, 赵爱兰, 等. 食源性产志贺毒素大肠杆菌的分离及菌株特征分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(4): 312-317.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty second informational supplement [Z]. 2012.
- [13] Tenover F C, Albeit R D, Govering R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. *J Clin*

- Microbiol, 1995, 33(9):2233-2239.
- [14] Lukinmaa S, Takkunen E, Siitonen A. Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999 [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(8):3744.
- [15] 贾爱卿, 袁子彦, 何永龙, 等. 副猪嗜血杆菌广东分离株 MLST 分型研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(1):23-26.
- [16] MENG Q, BAI X, ZHAO A, et al. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pigs in China [J]. BMC Microbiol, 2014(15):5.
- [17] DAI L, LU L M, WU C M, et al. Characterization of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolates from chickens in China between 2001 and 2006 [J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 286(2):178-183.
- [18] 李琳. 鸡源大肠杆菌耐药性流行趋势及  $\beta$ -内酰胺酶基因分布特征研究 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [19] 白莉, 郭云昌, 董银苹, 等. 我国食品中大肠埃希菌 O157 耐药及 PFGE 分子分型特征分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(5):422-428.
- [20] 余婷, 安慧慧, 吴聪明, 等. 奶牛乳房炎分离大肠杆菌的耐药性及脉冲场凝胶电泳分型研究 [J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(9):6-11.

## 论著

# 高通量测序法对 7 种发酵豆腐细菌组成的比较研究

金林毅<sup>1</sup>, 黄飞<sup>2</sup>, 田浩<sup>2</sup>, 王芸<sup>2</sup>, 张晓君<sup>2</sup>

(1. 上海市七宝中学, 上海 201101; 2. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

**摘要:**目的 研究不同发酵豆腐的细菌菌群组成, 了解此类产品的食品安全风险。方法 从市场收集 4 个省份生产的 7 个品牌的发酵豆腐样品, 并从中提取 DNA, 对 16S rRNA 基因的 V3 区进行 PCR 扩增, 通过高通量测序和序列分析了解样品的细菌组成特征。结果 各样品获得序列数平均为 4 307 条。序列分析结果表明 7 种样品中厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门和梭杆菌门约占全部细菌的 97.4%; 各样品在门水平上为 4~13 类, 在属水平上, 样品的菌群组成复杂, 大多数样品的细菌菌属都在 10 类以上, 并发现样品的菌群组成与地域性和制作工艺密切相关; 另外, 部分样品检出较高丰度的克雷伯菌属、沙门菌属、克罗诺杆菌属等致病菌, 及弧菌属、肠杆菌属和变形杆菌属等潜在有害菌属。结论 产地和工艺对豆腐中的细菌具有明显的影响, 现有发酵豆腐的生产模式造成产品病原菌的过度繁殖, 产品存在食品安全风险。

**关键词:** 发酵豆腐; 16S rRNA 基因测序; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号: R155.5; S432.4<sup>+</sup>2; TS214 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)02-0114-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.02.004

## The comparison of bacterial compositions of seven types of fermented tofu using high-throughput sequencing technology

JIN Lin-yi, HUANG Fei, TIAN Hao, WANG Yun, ZHANG Xiao-jun  
(Qibao High School, Shanghai 201101, China)

**Abstract: Objectives** Fermented tofu is a type of traditional Chinese food. The aim of this study was to compare the bacterial composition and its effect on the quality and safety of fermented tofu. **Methods** The total DNA was directly extracted from seven brand of fermented tofu samples produced in four provinces. The V3 region of 16S rRNA gene were amplified, and PCR products were mixed for pyrosequencing. **Results** According to the analysis of the sequences, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes and Fusobacteria were predominant, accounting for 97.4% of all the bacteria. In terms of genus, most types of the fermented tofu had more than 10 genus members. It was also found that the composition of bacterial communities related to the geographic location and the production processes of fermented tofu. On the other hand, bacterial communities in some of fermented tofu showed relatively high abundance of pathogen or opportunistic pathogen, such as *Klebsiella*, *Salmonella*, *Cronobacter*, *Vibrio*, *Enterobacter* and *Bacteroidetes*. **Conclusion** These results suggested

收稿日期: 2014-08-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21177086); 上海市国际合作项目(12230706800)

作者简介: 金林毅 男 学生 研究方向为食品微生物学 E-mail: 980880480@qq.com

通讯作者: 张晓君 男 研究员 研究方向为微生物生态学 E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn