

## 调查研究

## 1株食源性蜡样芽胞杆菌分离株的分子特征毒性及耐药性研究

秦希曦<sup>1</sup>,李文<sup>1</sup>,张雯<sup>2</sup>,岳楠<sup>1</sup>,马红梅<sup>1</sup>,曾瑾<sup>1</sup>,马臣杰<sup>1</sup>

(1. 宁夏大学生命科学学院,宁夏银川 750021;2. 宁夏回族自治区兽药饲料监察所,宁夏银川 750001)

**摘要:**目的 研究株蜡样芽胞杆菌 SCY 分离株的毒力和耐药性。方法 使用选择性培养基从银川市某餐厅鱼肉菜肴中培养分离获得蜡样芽胞杆菌 SCY 分离株,经 23S rRNA 基因 PCR 测序鉴定后,通过二代全基因组测序技术分析 SCY 分离株的基因组特征,进而分别采用免疫组化技术和药敏纸片实验研究 SCY 分离株的毒性和耐药性。结果 SCY 分离株的基因组大小为 5.82 Mb,编码基因个数为 5 767,编码区总长度占全基因组的 85.50%。SCY 分离株基因组中共含有 11 个基因岛、16 个 CRISPR 和 5 个前噬菌体;其中,SCY 编码基因分别在 PHI 和 VFDB 毒力因子数据库中注释到了 14 个和 62 个毒力基因(Identity>80, Evalue<0.05),在 CARD 耐药数据库中注释到了 215 个耐药基因(Best Hit evalue<0.05)。小鼠肠道组织切片免疫组化结果表明,炎症因子 IL-1 $\beta$ 、CASP1 和 Nlrp3 的表达水平发生差异显著性上调。22 种细菌抗生素药敏纸片试验结果显示,SCY 分离株对氯霉素、克林霉素等高度敏感,对四环素、头孢唑啉、头孢吡酮、氟苯青霉素表现为中介,对青霉素、苯唑西林、哌拉西林、杆菌肽、头孢他啶等 10 种抗生素表现为耐药,SCY 分离株多重耐药情况较为严重。结论 本研究发现的 SCY 分离株属于肠毒株,携带多种肠毒素毒力基因,且具有典型的多重耐药特征。研究结果为揭示蜡样芽胞杆菌分离株的致病机制提供参考依据。

**关键词:**蜡样芽胞杆菌;分离株;毒性;毒力基因;耐药性

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)08-1183-09

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.08.008

**Genome sequencing analysis and drug resistance of the foodborne strain SCY of *Bacillus cereus***QIN Xixi<sup>1</sup>, LI Wen<sup>1</sup>, ZHANG Wen<sup>2</sup>, YUE Nan<sup>1</sup>, MA Hongmei<sup>1</sup>, ZENG Jin<sup>1</sup>, MA Chenjie<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Ningxia University, Ningxia Yinchuan 750021, China;

2. Ningxia Hui Institute of Veterinary Drug and Feed Supervision, Ningxia Yinchuan 750001, China)

**Abstract: Objective** The aim of this study was to investigate the virulence and resistance of *Bacillus cereus* SCY isolates. **Methods** *B. cereus* was isolated from fish dishes in a restaurant in Yinchuan using a selective medium and was named the SCY strain. After identification using PCR sequencing of the 23S rRNA gene, the genetic characteristics were analyzed by adopting second-generation whole genome sequencing technology. Next, the toxicity and drug resistance of the SCY isolate were studied using mouse studies and drug-sensitive paper experiments, respectively. **Results** The genome size of the SCY isolate was 5.82 Mb, the number of coding genes was 5 767, and the total length of the coding region accounted for 85.50% of the whole genome. The genome of the SCY isolates contained 11 gene islands, 16 CRISPR, and five prephages; among them, 14 and 62 virulence genes were annotated in the PHI and VFDB virulence factor databases (Identity>80, Evalue<0.05), respectively, and 215 resistance genes were annotated in the CARD resistance databases for SCY-encoded genes (Best Hit evalue<0.05). The immunohistochemical results of the mouse intestinal tissue sections showed that the expression levels of the inflammatory factors IL-1 $\beta$ , CASP1, and Nlrp3 were differentially and significantly upregulated. The results of 22 bacteria antibiotic sensitivity paper tests showed that the SCY isolate was highly sensitive to chloramphenicol and clindamycin, showed an intermediary to tetracycline, cephalixin, and ampicillin, and showed resistance to 10 antibiotics, including penicillin, benzocillin, piperacillin, bacitracin, and cephalixin, and

收稿日期:2022-05-26

基金项目:宁夏自然科学基金项目(2021AAC03049、2022AAC02019);2022年大学生创新创业训练计划(S202210749062)

作者简介:秦希曦 女 在读本科生 研究方向为生物科学 E-mail:2331496004@qq.com

通信作者:马臣杰 男 高级实验师 研究方向为食品微生物 E-mail:biom0707@163.com

曾瑾 女 教授 研究方向为肠道微生物 Email:zengjinnxu@163.com

马臣杰和曾瑾为共同通信作者

its multidrug resistance was more serious. **Conclusion** SCY isolates are enterotoxigenic strains, yet they carry multiple enterotoxin virulence genes and have typical multiple drug resistance characteristics. These findings provide clues for revealing the pathogenic mechanism of *B. cereus* isolates.

**Key words:** *Bacillus cereus*; isolate; toxicity; virulence gene; drug resistance

蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)是重要的食源性致病菌。该菌能产生抗逆性很强的孢子,需在0.1 MPa 121 °C湿热高压15 min方可被杀灭,普通的食品加工条件无法将其消除<sup>[1-2]</sup>。据统计,世界上1.4%~12%的食源性疾病的暴发由蜡样芽胞杆菌引起<sup>[3]</sup>。因此,蜡样芽胞杆菌病及其病原体毒力、耐药表型的调查研究受到了世界各国的广泛关注<sup>[4-6]</sup>。

食源性蜡样芽胞杆菌病患者大多会出现恶心、呕吐、腹痛、腹泻等症状,其病症种类及轻重程度与该菌的毒力因子密不可分<sup>[7-8]</sup>。已知蜡样芽胞杆菌的毒力因子主要包括溶血素 BL(Hemolysin BL, HBL)<sup>[9]</sup>、溶血素(Hemolysin II)<sup>[10]</sup>、非溶血性肠毒素(Nonhemolytic enterotoxin, NHE)<sup>[11]</sup>、细胞毒素 K(Cytotoxin K, cytK)<sup>[12]</sup>以及呕吐毒素(Cereulide)<sup>[13]</sup>等。抗生素是治疗蜡样芽胞杆菌病的主要手段。然而,研究表明多数蜡样芽胞杆菌分离株对 $\beta$ -酰胺类抗生素具有较强的抗药性<sup>[14-15]</sup>。因此,调查研究蜡样芽胞杆菌分离株对细菌抗生素的耐受性及敏感性,对蜡样芽胞杆菌病的治疗具有现实意义。

蜡样芽胞杆菌携带可移动基因元件(Mobile genetic elements, MGEs)<sup>[16-17]</sup>,包括转座子、质粒和噬菌体等多种形式,是抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARG)<sup>[18-19]</sup>和毒力基因(Virulence factors, VF)<sup>[20-22]</sup>的重要存储和交换载体,对 ARG 和 VF 在微生物群落中的水平转移具有重要意义<sup>[16-17]</sup>。采用二代测序技术高通量测序技术解析蜡样芽胞杆菌分离株的基因组特征,通过生物信息学注释和预测分离株毒力因子和耐药机制,是发掘该菌潜在流行病学和用药方案的重要手段。

本研究从银川市某餐厅酸菜鱼菜品中分离获得蜡样芽胞杆菌 SCY 分离株,并采用二代全基因组测序技术分析该菌的基因分子特征,进而结合小鼠实验和药敏纸片试验研究了 SCY 分离株的毒力及耐药情况。实验结果将为深入调查研究食源性蜡样芽胞杆菌的危害提供线索和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与材料

E2370 液晶程控全温振荡培养箱(上海碧云天);5425 R 离心机(德国艾本德);TOne PCR 仪(德国耶拿);PE150 测序仪(美国因美纳);RM2016 冰

冻切片(德国徕卡);HY-5 脱色摇床(上海程捷)。

SPF 级雌鼠 C57/BL6 购自宁夏医科大学实验动物中心(SCXK(宁)-2015-0001),动物实验已通过宁夏大学实验动物伦理委员会审批(NXU-2021-008);HB0248 甘露醇卵黄多黏菌素琼脂培养基(青岛海博生物);HB0109-7 营养琼脂培养基(青岛海博生物);ZP ZP303 G<sup>+</sup>细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒(北京庄盟生物),E7370L NEBNext<sup>®</sup>Ultra<sup>™</sup> DNA Library Prep Kit for Illumina(美国 NEB),AS112-11 2×EasyTaq<sup>®</sup> PCR SuperMix for PAGE(北京全式金),LM10N13 苏木素染液(北京百灵威),ZLI-9018 DAB 试剂盒(北京中杉金桥)、66737-1-Ig IL-1 $\beta$  抗体(美国 Proteintech),22915-1-AP CASP1 抗体(美国 Proteintech),19771-1-AP NLRP3 抗体(美国 Proteintech),110705001 22 种药敏纸片(湖南比克曼)。

### 1.2 蜡样芽胞杆菌分离株的分离培养及鉴定

参照食源性蜡样芽胞杆菌检验标准(GB 4789.14—2014)所述方法,使用一次性无菌接种环从宁夏银川市某餐厅酸菜鱼中充分挑取少量鱼糜至无菌采样袋中。随后,在超净工作台中将25 g 鱼糜样品与225 mL 无菌水涡旋混匀,经10倍系列稀释,划线接种于甘露醇卵黄多黏菌素琼脂培养基,30 °C静置培养24 h。根据菌落周围是否形成粉色沉淀环,初步筛选鉴定获得蜡样芽胞杆菌分离株。

进而利用蜡样芽胞杆菌 23S rRNA 基因 PCR 测序方法鉴定分离株。挑取具有典型蜡样芽胞杆菌形态特征的单菌落重悬至100  $\mu$ L 无菌水中,经沸水浴加热2 min 裂解菌体,作为 PCR 模板溶液备用。PCR 扩增体系为2×Easy Taq PCR SuperMix 12.5  $\mu$ L,上游和下游引物各10  $\mu$ mol/L 1  $\mu$ L,模板 DNA 1  $\mu$ L,无菌水补足至25  $\mu$ L。反应条件为94 °C预变性5 min,94 °C变性30 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸15 s,扩增30个循环,72 °C延伸10 min。采用1%琼脂糖电泳检测 PCR 扩增产物,每个泳道上样量为5  $\mu$ L。上述 PCR 扩增产物送至上海生工公司测序后,通过 BLAST 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对分析该扩增产物序列是否为蜡样芽胞杆菌基因序列。最后,将该蜡样芽胞杆菌分离株命名为 SCY 分离株。

表1 蜡样芽胞杆菌 23S rRNA 基因 PCR 引物信息

Table 1 PCR primers for *Bacillus cereus* 23S rRNA gene

引物名称	引物序列	产物大小
F1	GCGAGCGAAACGGAACATAG	167 bp
R1	AGGATACATTCAAGAGAGAACGAGA	

### 1.3 SCY 分离株的二代全基因组测序技术分析

挑取 SCY 分离株单菌落接种于营养肉汤培养基, 37 °C 震荡培养过夜, 提取基因组 DNA 备用。采用 NEBNext®Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina 试剂盒构建 DNA 文库, 在 Illumina PE150 平台完成二代全基因组测序 (Whole genome sequencing, WGS), 样品测序深度 > 0.99。在 NCBI 创建的非冗余蛋白质数据库 (Non-redundant protein database, NR) 中, 通过注释和检索 SCY 分离株基因对应的物种信息鉴定 SCY 分离株。基于软件 readfq (version 10) 过滤下机数据获得有效数据 (Clean Data), 通过 SOAP denovo (version 2.04) 等软件完成基因组的组装, 分别利用 IslandPath-DIOMB (Version 0.2)、phiSpy (Version 2.3) 和 CRISPRdigger (Version 1.0) 预测 SCY 基因组中的基因岛、前噬菌体序列及 CRSIPR 序列。随后, 通过病原宿主互作数据库 (Pathogen Host Interactions Database, PHI) (<http://www.phi-base.org/>) 和致病菌毒力因子数据库 (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria, VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) 注释分析毒力基因, 综合抗生素研究数据库 (Comprehensive Antibiotic Research Database, CARD) <sup>[23-24]</sup> (<https://card.mcmaster.ca/>) 注释分析耐药基因。

### 1.4 基于 SNP 构建系统进化树

在 NCBI 数据库中搜集 9 株不同来源的蜡样芽胞杆菌分离株, 以菌株 ATCC14579 为参考进行单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 分析 (见表 2)。基于样品和参考菌株群体的 SNP 矩阵利用 TreeBeST 软件邻接法构建系统进化树。

表2 9株蜡样芽胞杆菌参考菌株信息

Table 2 The general information of 9 reference strains of *Bacillus cereus*

菌株编号	GenBank 编号
ATCC14579	GenBank: AE016877.1
NC7401	GenBank: AP007209.1
S.601	GenBank: JAFLOK010000001.1
CDHWZ7	GenBank: CP095767.1
AFA01	GenBank: CP068724.1
CPT56D-587-MTF	GenBank: CP090081.1
H2	GenBank: CP043966.1
FORC.021	GenBank: CP014486.1
MRY14-0075	GenBank: AP022894.1

### 1.5 SCY 分离株毒性分析

试验小鼠在试验前禁食不禁水 8 h。采用营养肉汤培养基对 SCY 分离株增菌培养, 采用生理盐水

将其稀释至  $1 \times 10^9$  CFU/mL。将 20 只 BALB/c 鼠随机均分为 2 组, 分别灌喂 0.2 mL PBS 和 0.2 mL 菌液, 24 h 后解剖小鼠, 并采集小鼠肠道组织浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中, 4 °C 冷藏备用。免疫组化用石蜡包埋技术处理小肠样品, 在冰冻切片机制片后, 经过脱水、抗原修复、血清封闭后, 4 °C 过夜孵育 IL-1 $\beta$ 、CASP1 及 NLRP3 一抗抗体。次日用 PBS 洗片, 37 °C 孵育二抗 30 min, 滴加新鲜配制的 DAB 显色液使二抗显色 (棕色)。利用苏木素复染细胞核 3 min, 冲洗掉多余染料, 切片依次浸泡于无水乙醇和二甲苯中脱水封片, 显微镜镜检采集图像。

根据数据库 VFDB 和 PHI 注释结果, 梳理 SCY 分离株携带的已知蜡样芽胞杆菌毒力基因, 并分析其潜在的毒力基因。

### 1.6 SCY 分离株的耐药性分析

参考《抗菌药物敏感性试验的技术要求》WS/T 639—2018 中需氧蜡样芽胞杆菌属药敏试验方法检测分析 SCY 分离株的耐药性。SCY 分离株菌液涂布于营养琼脂培养基平板, 将 3 片药敏纸片均匀贴附于培养基平板中, 置于 37 °C 培养箱中静置培养 20 h。测量药敏纸片周围透明圈的直径, 对照我国卫生行业标准《抗菌药物敏感性试验的技术要求》WS/T 639—2018, 判断该菌对 9 类 22 种细菌抗生素的敏感性; 根据微生物耐药数据库 CARD 的基因注释分析结果, 挖掘 SCY 分离株耐药表型与耐药基因潜在的关联性。

### 1.7 统计学分析

本文所有柱状图均采用 Graphpad 9.0.2 绘制, 动物实验及药敏试验均采用 3 次以上生物学重复。

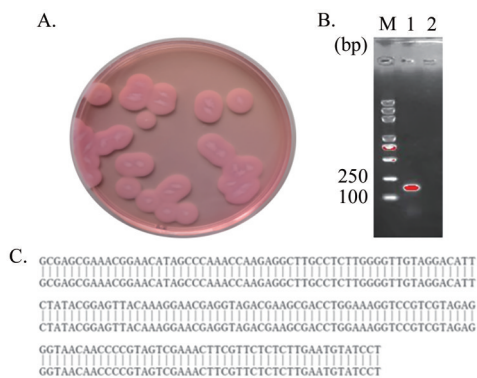
## 2 结果

### 2.1 蜡样芽胞杆菌分离株的分离培养及复筛

如图 1A 所示, SCY 分离株在甘露醇卵黄多黏菌素琼脂选择性培养上生长, 其表观形态为蜡白色菌落, 且菌落周围有粉色沉淀环。挑取上述典型特征的 SCY 分离株单菌落进行 PCR 检测, 如图 1B 所示, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果表明 PCR 扩增产物大小约为 167 bp, 符合预期大小。如图 1C 所示, PCR 扩增产物测序结果表明, SCY 分离株的 23S rRNA 编码基因与蜡样芽胞杆菌同源性较高。为了准确鉴定 SCY 分离株, 仍需采用基因组测序对其进行进一步鉴定。

### 2.2 SCY 分离株的二代全基因组测序技术分析

在 NR 数据库中, 注释分析了 SCY 分离株基因对应的物种, 根据注释基因的个数由高到低排序, 列出了前 10 个注释物种名称及注释基因数量 (图 2)。



注:A:甘露醇卵黄多黏菌素琼脂培养基的观测;B:分离株23S rRNA基因PCR检测;C:分离株23S rRNA基因PCR测序分析;M: Marker、Trans2K DNA marker;1:分离株菌落PCR;2:阴性对照

图1 SCY分离株的分离、培养及鉴定

Figure 1 Isolation, cultivation, and identification of SCY isolates

由图2可知,SCY分离株有3736个基因被注释为蜡样芽胞杆菌基因,注释基因数量远高于其他物种,因此判定SCY分离株为蜡样芽胞杆菌。

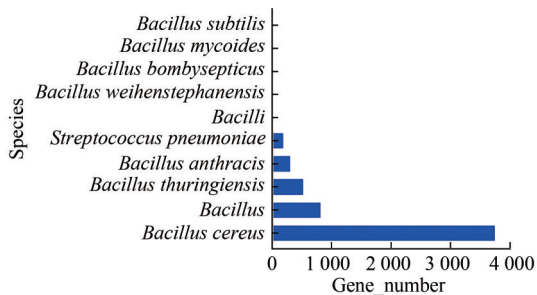


图2 SCY分离株在NCBI-NR数据库中的物种注释分析  
Figure 2 Species annotation analysis of SCY isolates in the NCBI-NR database

SCY分离株基因组大小为5.82 Mb,编码基因个数为5767,编码区总长度占全基因组的85.50%。此外,SCY含有11个基因岛、16个CRIPRSE、5个前噬菌体。如图3所示,病原细菌致病性数据库VFDB和PHI中分别注释到282个和425个毒力基因(Evalue<0.05);按照Identity>80条件过滤保留了可信度较高的注释结果,在VFDB和PHI中分别注释到62个和14个毒力基因。在微生物耐药基因数据库CARD注释到215个耐药基因(Best Hit evalue<0.05),按照Best\_Identities降序排列得到TOP20的耐药基因(Best hit ARO)为*BcII*、*BLA1*、*FosB*、*dfrE*、*vanRM*、*blt*、*rphB*、*vanZF*、*vanSM*、*vatH*、*dfrG*、*bcrC*、*bacA*、*vanYA*、*CatU*、*sav1866*、*aadK*、*msrB*和*oleC*。

以蜡样芽胞杆菌标准株ATCC14579作为参考菌株进行SNPs分析,结果如表3所示,SCY及其他8株蜡样芽胞杆菌的SNPs数量不尽相同,其中,SCY分离株总SNPs数量最多,为319990个,分布

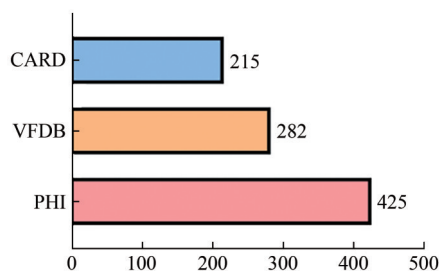


图3 SCY分离株的毒力基因和耐药基因注释统计

Figure 3 Annotated statistics of virulence genes and drug resistance genes of SCY isolates

表3 样本菌株基因组SNPs分析

Table 3 SNPs analysis in the genomes of sample strains

菌株编号	总SNPs数量	编码区SNPs数量	
		同义SNPs	非同义SNPs
SCY	319 990	204 489	75 228
NC.7401	316 728	203 265	74 052
S.601	40 547	22 006	11 611
CD.7	167 783	99 668	41 927
AFA.01	42 145	23 231	12 007
CP.56	44 199	24 382	12 754
H.2	41 701	22 628	12 083
FORC.021	41 721	22 969	22 969
MR.14	319 823	205 423	74 832

在编码区的数量占比为87.4%。

基于SCY菌株和参考菌株群体的SNP矩阵数据,利用TreeBeST软件邻接法构建系统进化树(图4),分支长度表示进化距离的大小。根据进化距离可将10株据进化距离分为Group1和Group2两组,SCY菌株与MRY14-0075和NC7401菌株的亲缘关系较近。

### 2.3 SCY分离株毒性分析

免疫组化分析结果如图5所示,SCY分离株感染能够引起肠道组织中焦亡信号通路关键调控因子NLRP3、CASP1及IL-1 $\beta$ 的差异性表达。

在PIH数据库和VFDB数据库注释分析结果中排名前20的毒力基因中,可见已知蜡样芽胞杆菌毒力基因共12个,包括呕吐基因*cesB*<sup>[13]</sup>、腹泻基因*NHE*<sup>[25]</sup>和*CodY*<sup>[26]</sup>,产芽孢基因*sodA1*、*sodA2*和*sodC*<sup>[27]</sup>;还有其他已知蜡样芽胞杆菌毒力基因*plcr*、*entA*、*hly-III*、*cytK*、*Mfd*、*pagA1*和*pagA2*。此外,SCY分离株携带多种其他致病菌毒力基因,如*HtrA*、*yceH*、*yceG*、*SpoVG*、*CspB*和*nfu*。

### 2.4 SCY分离株的耐药性试验

如表4所示,SCY分离株药敏纸片试验结果表明,该菌对5类10种细菌抗生素表现出抗药特性,包括 $\beta$ -内酰胺类抗生素青霉素、苯唑西林、哌拉西林、多肽类抗生素杆菌肽、阿莫西林、头孢他啶和头孢曲松,氨基糖苷类抗生素链霉素,磺胺类抗生素复方新诺明,以及甲硝唑。

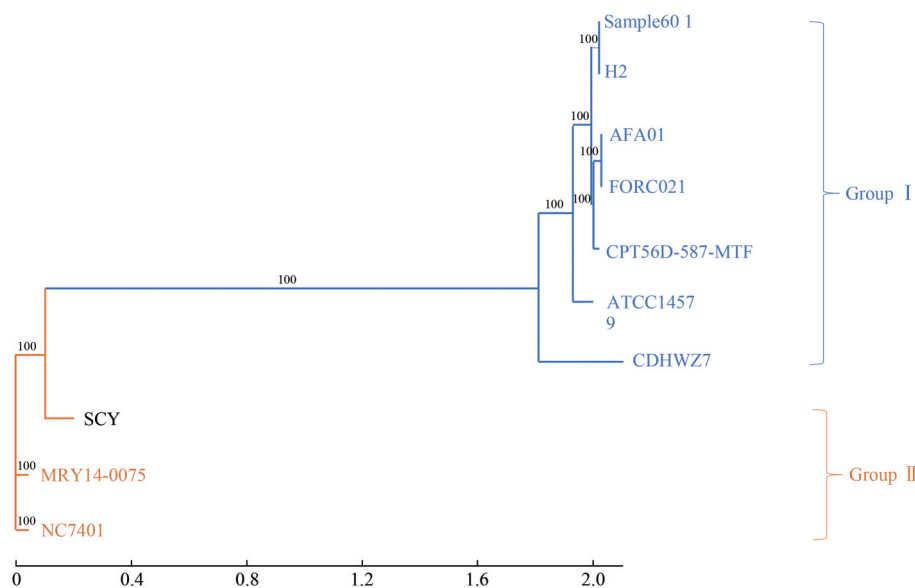


图4 基于SNP分析的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree based on the analysis of SNP

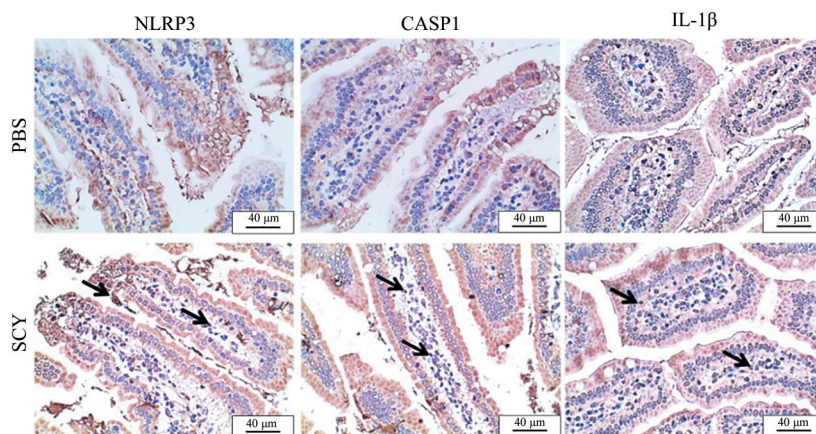


图5 小鼠肠道组织的免疫组化分析

Figure 5 Immunohistochemical analysis of mouse intestinal tissues

基于CARD数据库对抗性基因类型ARO进行预测,分析结果表明,SCY分离株携带 $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药基因:*BclI*、*BLA1*;携带多肽类抗生素耐药基因:*mprF*、*bcrC*、*bacA*;携带糖肽类抗生素耐药基因:*vanR*、*vanRF*、*vanRG*、*vanZF*、*vanSM*、*vanYA*;携带苯尼考耐药基因:*vatH*、*catB2*;携带氨基糖苷耐药基因:*aadK*、*vanRF*、*vanRG*;携带链霉素耐药基因:*catB2*;携带磷霉素耐药基因:*FosB*;携带四环素耐药基因:*otr(A)*;携带抗二氨基嘧啶决定簇:*dfrG*、*dfrE*;携带福霉素耐药基因:*rphB*;携带抗霉素抗性的决定因素:*CatU*。同时一些耐药基因具有药物外排泵复合物或抗生素耐药亚基功能,例如*blt*、*sav1866*、*msrB*、*oleC*、*TaeA*、*lmrB*、*tetA(60)*、*tetB(60)*。SCY分离株耐药表型对应的耐药基因如表5所示。

### 3 讨论

蜡样芽胞杆菌是引起食物中毒和肠道外疾病

的重要致病菌。该菌分布广泛且抗逆性强,易于通过农业作物和牲畜污染种类丰富的食物,给食品加工卫生工作带来了重大挑战。在我国一项关于39个地区860份即食食品(熟肉、炒饭、凉面、凉菜等)中蜡样芽胞杆菌的流行情况调查研究中发现,蜡样芽胞杆菌抽检阳性率高达35%<sup>[28]</sup>。

蜡样芽胞杆菌毒力因子种类丰富,可通过芽孢、生物被膜及分泌可溶性毒素蛋白,引起患者腹泻、呕吐等临床病症,其感染剂量可低至 $10^3$  CFU/g<sup>[29]</sup>。引起蜡样芽胞杆菌病腹泻症状的毒力因子编码基因主要包括,溶血型肠毒素基因*hbl*、非溶血型肠毒素基因*nhe*、细胞毒素K基因*cytK*、肠毒素FM基因*entFM*和肠毒素T基因*bceT*,引发患者呕吐症状的毒力因子编码基因主要为*CesB*基因。

本文在鉴定SCY分离株的过程中,采用了PCR技术对其23S rRNA基因扩增测序。由于蜡样芽胞杆菌菌群包含了蜡样芽胞杆菌、炭疽杆菌(*Bacillus*

表4 SCY分离株的药敏纸片试验结果

Table 4 Results of drug-sensitive paper test of SCY isolates

药品纸片抗生素种类	含量/( $\mu\text{g}$ /片)	判断是否耐药的抑菌圈直径标准/mm			抑菌圈直径/mm	敏感性
		耐药 R	中介 I	敏感 S		
青霉素(PEN)	10	$\leq 28$		$\geq 29$	16.2	R
苯唑西林(OXA)	1	$\leq 17$	18~24	$\geq 25$	9	R
哌拉西林(PRL)	100	$\leq 28$		$\geq 29$	14	R
杆菌肽(BAT)	0.04 U/片	$\leq 8$	9~12	$\geq 13$	0	R
头孢他啶(CTZ)	30	$\leq 14$	15~17	$\geq 18$	9	R
头孢曲松(CTR)	30	$\leq 13$	14~20	$\geq 21$	10.8	R
链霉素(S)	10	$\leq 11$	12~14	$\geq 15$	7.5	R
复方新诺明(T/S)	25	$\leq 10$	11~15	$\geq 16$	0	R
阿莫西林(AMO)	25	$\leq 19$		$\geq 20$	13	R
甲硝唑(MTZ)	5			$\geq 16$	0	R
四环素(TET)	30	$\leq 14$	15~18	$\geq 19$	16	I
头孢唑林(CEZ)	30	$\leq 14$	15~17	$\geq 18$	16	I
头孢哌酮(CPZ)	75	$\leq 15$	16~20	$\geq 21$	17.5	I
氨苄青霉素(AM)	10	$\leq 11$	12~14	$\geq 15$	13.5	I
氯霉素(CLM)	30	$\leq 12$	13~17	$\geq 18$	23	S
克林霉素(CLN)	2	$\leq 14$	15~20	$\geq 21$	22.5	S
头孢氨苄(CHA)	30	$\leq 14$	15~17	$\geq 18$	19.5	S
米诺环素(MIN)	30	$\leq 14$	15~18	$\geq 19$	19	S
克拉霉素(CLR)	15	$\leq 13$	14~17	$\geq 18$	22	S
环丙沙星(CIP)	5	$\leq 15$	16~20	$\geq 21$	23	S
庆大霉素(GM)	120	$\leq 12$	13~14	$\geq 15$	28.5	S
氧氟沙星(OFX)	15	$\leq 12$	13~15	$\geq 16$	25	S

表5 SCY分离株的耐药基因和耐药表型的关联分析

Table 5 Correlation analysis of genotype resistance and phenotype resistance of SCY isolates

抗生素类型	药品名称	耐药基因
$\beta$ -内酰胺类抗生素	青霉素(PEN)	<i>BcII</i> 、 <i>BLA1</i>
	苯唑西林(OXA)	
	哌拉西林(PRL)	
	头孢他啶(CTZ)	
	头孢曲松(CTR)	
	阿莫西林(AMO)	
多肽类抗生素	杆菌肽(BAT)	<i>mprF</i> 、 <i>bcrC</i> 、 <i>bacA</i>
氨基糖苷类抗生素	链霉素(S)	<i>vanR</i> 、 <i>vatH</i> 、 <i>aadK</i> 、 <i>vanRF</i> 、 <i>catB2</i> 、 <i>vanRG</i>

*anthracis*)和苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)等亲缘关系较近的菌种,使得23S rRNA基因的分辨率不足以有效区分上述3种细菌<sup>[30-31]</sup>。为了避免菌种鉴定假阳性,本文通过在NR数据库中对分析SCY分离株的测序信息,获得菌种注释结果排序表,其中蜡样芽孢杆菌的排序第一,评分远高于其他菌株,证实了该菌为蜡样芽孢杆菌。

基于SNP分析构建的系统进化树显示SCY与MRY14-0075和NC7401菌株的亲缘关系较近。MRY14-0075和NC7401均为临床分离株,其中,NC7401属于呕吐型蜡样芽孢杆菌强毒株<sup>[32]</sup>。据此推测,SCY具有潜在的致病性,需要进一步实验验证。

本文发现的SCY分离株,携带了多种已知蜡样芽孢杆菌毒力基因。其中,*nhe*基因可编码NHE,NHE毒素可通过诱导钾外排并激活NLRP3炎症小体引发肠上皮细胞焦亡导致腹泻<sup>[25]</sup>。*CodY*参与调

控蜡样芽孢杆菌生物膜的形成及肠毒素的产生<sup>[26]</sup>。*PlcR*与信号肽PapR形成复合物,调控蜡样芽孢杆菌的毒力<sup>[33]</sup>。*sodA1*基因是蜡样芽孢杆菌重要的抗逆性基因,可能对芽孢的形成具有重要调控作用<sup>[27]</sup>。*sodA1*基因和*sodC*基因与蜡样芽孢杆菌的致病性密切相关<sup>[27]</sup>。*pagA1*和*pagA2*基因,在蜡样芽孢杆菌致人炭疽样肺部感染中起着关键作用<sup>[34]</sup>。此外,基于WGS细菌毒力因子注释分析,发现SCY分离株携带6个其他细节来源的毒力基因,包括*HtrA*、*yceH*、*yceG*、*SpoVG*、*CspB*和*nfu*。其中,*HtrA*是炭疽杆菌重要的抗逆性基因和毒力蛋白分泌调控基因<sup>[35]</sup>。*yceH*和*yceG*基因的缺失导致炭疽杆菌对活性氧物质和杀菌肽的敏感性增加<sup>[36]</sup>。*SpoVG*是RNA结合蛋白编码基因,调节李斯特菌的对溶菌酶的抗性<sup>[37]</sup>。*CspB*基因参与菌体生物膜的形成,促进李斯特菌在低温环境下的增殖<sup>[38]</sup>。*nfu*可通过促进铁硫蛋白的成熟调节金黄色葡萄球菌的毒力<sup>[39]</sup>。

蜡样芽胞杆菌不仅分布广泛<sup>[40-41]</sup>,而且具有丰富的亚种多样性<sup>[42]</sup>,通过 MGEs 与环境微生物发生核酸信息交换<sup>[16]</sup>,增强了蜡样芽胞杆菌毒力基因的可塑性<sup>[42-43]</sup>。

抗生素是治疗细菌感染的重要药物。然而,临床过度依赖抗生素导致病原菌普遍存在多重耐药能力<sup>[44]</sup>。本研究发现 SCY 分离株对青霉素、苯唑西林、哌拉西林、杆菌肽、头孢他啶等抗生素耐药,对四环素、头孢唑啉、头孢哌酮和氨苄青霉素敏感。这与之前的研究结果相似,蜡样芽胞杆菌对大部分 $\beta$ -酰胺类药物均有耐药性<sup>[40]</sup>。在 SCY 分离株耐药表型和耐药基因的联动分析结果中,10种耐药表型中有8种可找到其对应的耐药基因。但甲硝唑和复方新诺明并未找到相对应的基因,可能存在新的耐药机制和耐药基因。另外,SCY 分离株虽然携带了四环素耐药基因 *otr(A)*,但其耐药表型仅为中介。四环素是广谱抗生素,其耐药机制比较复杂。迄今,临床研究中已经发现的四环素耐药基因除 *otr(A)* 之外,还有 *tetW*、*tetM* 及 *tetO* 等,但是决定四环素耐药表型的关键因素尚未确定<sup>[45]</sup>。研究表明,多重耐药性增加了大肠杆菌<sup>[46]</sup>、铜绿假单胞菌<sup>[47]</sup>和鲍曼不动杆菌<sup>[48]</sup>的毒力基因携带数量。但也有研究指出,幽门螺杆菌<sup>[49]</sup>、副溶血弧菌<sup>[50]</sup>和白念珠菌<sup>[51]</sup>的耐药表型与毒力基因型无关。尚未见蜡样芽胞杆菌的多重耐药性与毒性相关性的研究。

本研究从银川市某酸菜鱼中获得的蜡样芽胞杆菌 SCY 分离株。研究结果显示,SCY 分离株呈现典型的肠毒性分子特征和多重耐药表型。深入研究蜡样芽胞杆菌分离株的多样性特征,将为预测评估食源性蜡样芽胞杆菌病风险,合理制定食源性蜡样芽胞杆菌疾病的治疗方案提供参考依据。

## 参考文献

- [1] DEJANA S, ELIZABETA R, BILJANA M S, et al. Enterotoxin and emetic toxin genes profiles and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from food, environmental and clinical samples in Serbia[J]. Acta Veterinaria, 2020, 70(2): 182-193.
- [2] TIRLONI E, STELLA S, BERNARDI C, et al. Identification and pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains isolated from a dairy processing plant producing PDO taleggio cheese [J]. Microorganisms, 2020, 8(6): 949.
- [3] GRUTSCH A A, NIMMER P S, PITTSLEY R H, et al. Molecular pathogenesis of *Bacillus* spp., with emphasis on the dairy industry[J]. Fine Focus, 2018, 4(2): 203-222.
- [4] 王琼, 马红梅, 曾瑾, 等. 食源性蜡样芽胞杆菌的危害及其检测方法研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(5): 633-637.  
WANG Q, MA H M, ZENG J, et al. Research progress on the hazards of foodborne *Bacillus cereus* and its detection method [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(5): 633-637.
- [5] KIM M J, HAN J K, PARK J S, et al. Various enterotoxin and other virulence factor genes widespread among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(6): 872-879.
- [6] LIU X Y, HU Q, XU F, et al. Characterization of *Bacillus cereus* in dairy products in China[J]. Toxins, 2020, 12(7): 454.
- [7] HUANG Y Y, FLINT S H, PALMER J S. *Bacillus cereus* spores and toxins—the potential role of biofilms [J]. Food microbiology, 2020, 90: 103493.
- [8] 王继艳. 一起由蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒事件调查分析 [J]. 应用预防医学, 2021, 27(3): 211-213.  
WANG J Y. Investigation and analysis of a food poisoning incident caused by *Bacillus cereus* [J]. Applied Preventive Medicine, 2021, 27(3): 211-213.
- [9] TUIPULOTU D E, MATHUR A, NGO C, et al. *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host-pathogen interactions [J]. Trends in Microbiology, 2021, 29(5): 458-471.
- [10] KAPLAN A R, KAUS K, DE S, et al. NMR structure of the *Bacillus cereus* hemolysin II C-terminal domain reveals a novel fold[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 3277.
- [11] DIETRICH R, JESSBERGER N, EHLING-SCHULZ M, et al. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus* [J]. Toxins, 2021, 13(2): 98.
- [12] GAO T, DING Y, WU Q, et al. Prevalence, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 533.
- [13] DELBRASSINNE L, BOTTELDOORN N, ANDJELKOVIC M, et al. An emetic *Bacillus cereus* outbreak in a kindergarten: Detection and quantification of critical levels of cereulide toxin [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2015, 12(1): 84-87.
- [14] ZHAO S, CHEN J, FEI P, et al. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from dairy products in China [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(5): 3994-4001.
- [15] 郭佳, 王娉, 周继福, 等. 乳源蜡样芽胞杆菌耐药性、毒力因子检测及分子特征研究 [J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(11): 131-138.  
GUO J, WANG P, ZHOU J F, et al. Study on drug resistance and molecular typing of *Bacillus cereus* from dairy products [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2021, 23(11): 131-138.
- [16] JOHNSON C M, GROSSMAN A D. Integrative and conjugative elements (ICEs): What they do and how they work [J]. Annual Review of Genetics, 2015, 49: 577-601.
- [17] CROFTS T S, GASPARRINI A J, DANTAS G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome [J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(7): 422-434.
- [18] SVARA F, RANKIN D J. The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance [J]. BMC Evolutionary Biology, 2011, 11: 130.
- [19] NOGUEIRA T, RANKIN D J, TOUCHON M, et al. Horizontal gene transfer of the secretome drives the evolution of bacterial

- cooperation and virulence[J]. *Current Biology*, 2009, 19(20): 1683-1691.
- [20] DLAMINI B S, MONTSO P K, KUMAR A, et al. Distribution of virulence factors, determinants of antibiotic resistance and molecular fingerprinting of *Salmonella* species isolated from cattle and beef samples: Suggestive evidence of animal-to-meat contamination [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2018, 25(32): 32694-32708.
- [21] ABANA D, GYAMFI E, DOGBE M, et al. Investigating the virulence genes and antibiotic susceptibility patterns of *Vibrio cholerae* O1 in environmental and clinical isolates in Accra, Ghana[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2019, 19(1): 76.
- [22] BECEIRO A, TOMÁS M, BOU G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26(2): 185-230.
- [23] ALCOCK B P, RAPHENYA A R, LAU T T Y, et al. CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D517-D525.
- [24] JIA B F, RAPHENYA A R, ALCOCK B, et al. CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 45(D1): D566-D573.
- [25] DUPORT C, JOBIN M, SCHMITT P. Adaptation in *Bacillus cereus*: from stress to disease [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1550.
- [26] KOVÁCS Á T. The global regulator CodY is required for the fitness of *Bacillus cereus* in various laboratory media and certain beverages [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(13): fnw126.
- [27] ZHANG J M, WANG H D, HUANG Q B, et al. Four superoxide dismutases of *Bacillus cereus* 0-9 are non-redundant and perform different functions in diverse living conditions [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2020, 36(1): 12.
- [28] YU S B, YU P F, WANG J, et al. A study on prevalence and characterization of *Bacillus cereus* in ready-to-eat foods in China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 3043.
- [29] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs [J]. *EFSA Journal*, 2016, 14(7): e04524.
- [30] CARROLL L M, CHENG R A, WIEDMANN M, et al. Keeping up with the *Bacillus cereus* group: Taxonomy through the genomics era and beyond[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(28): 7677-7702.
- [31] EHLING-SCHULZ M, LERECLUS D, KOEHLER T M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential [J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(3): 10.1128/microbiolspec.GPP3-10.1128/microbiolspec.0032-2018.
- [32] Takeno A, Okamoto A, Tori K, et al. Complete genome sequence of *Bacillus cereus* NC7401, which produces high levels of the emetic toxin cereulide[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(17): 4767-4768.
- [33] SLAMTI L, LEMY C, HENRY C, et al. CodY regulates the activity of the virulence quorum sensor PlcR by controlling the import of the signaling peptide PapR in *Bacillus thuringiensis* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 6: 1501.
- [34] SELDINA Y I, PETRO C D, SERVETAS S L, et al. Certhrax is an antivirulence factor for the *Anthrax*-like organism *Bacillus cereus* strain G9241[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(6): e00207-e00218.
- [35] ISRAELI M, ELIA U, ROTEM S, et al. Distinct contribution of the HtrA protease and PDZ domains to its function in stress resilience and virulence of *Bacillus anthracis* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 255.
- [36] FRANKS S E, EBRAHIMI C, HOLLANDS A, et al. Novel role for the *yceGH* tellurite resistance genes in the pathogenesis of *Bacillus anthracis* [J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(3): 1132-1140.
- [37] BURKE T P, PORTNOY D A. SpoVG is a conserved RNA-binding protein that regulates *Listeria monocytogenes* lysozyme resistance, virulence, and swarming motility[J]. *mBio*, 2016, 7(2): e00240.
- [38] KRAGH M L, MUCHAAMBA F, TASARA T, et al. Cold-shock proteins affect desiccation tolerance, biofilm formation and motility in *Listeria monocytogenes* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 329: 108662.
- [39] MASHRUWALA A A, PANG Y Y, ROSARIO C Z, et al. *Nfu* facilitates the maturation of iron-sulfur proteins and participates in virulence in *Staphylococcus aureus* [J]. *Molecular microbiology*, 2015, 95(3): 383-409.
- [40] YU S B, YU P F, WANG J, et al. A study on prevalence and characterization of *Bacillus cereus* in ready-to-eat foods in China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 3043.
- [41] YU P, YU S, WANG J, et al. *Bacillus cereus* isolated from vegetables in China: incidence, genetic diversity, virulence genes, and antimicrobial resistance[J]. *Frontiers in microbiology*, 2019, 10: 948.
- [42] FAYAD N, KALLASSY AWAD M, MAHILLON J. Diversity of *Bacillus cereus* sensu lato mobilome[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 436.
- [43] ZHENG Z Q, ZHANG Y L, LIU Z Y, et al. The CRISPR-Cas systems were selectively inactivated during evolution of *Bacillus cereus* group for adaptation to diverse environments [J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(6): 1479-1493.
- [44] Friedman N D, Temkin E, Carmeli Y. The negative impact of antibiotic resistance [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(5): 416-422.
- [45] BERGLUND F, BÖHM M E, MARTINSSON A, et al. Comprehensive screening of genomic and metagenomic data reveals a large diversity of tetracycline resistance genes[J]. *Microbial Genomics*, 2020, 6(11): mgen000455.
- [46] 张忠印, 吉飞跃, 周小玉. 异体输血患者术后感染病原菌和大肠埃希菌感染毒力因子的分布及与耐药性的关系[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(8): 964-967.
- ZHANG Z Y, JI F Y, ZHOU X Y. Interaction relationship between distribution of infectious pathogens and virulence factors and resistance in allogeneic transfusion patients [J]. *Journal of*



- Pathogen Biology, 2022, 17(8): 964-967.
- [47] 周凯, 时翠娟, 宋国滨, 等. 铜绿假单胞菌QS系统调控基因和毒力基因的携带、表达及与耐药的相关性[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(5): 748-753.
- ZHOU K, SHI C X, SONG G B, et al. Correlation of carriage and expression of QS regulatory genes and virulence genes with drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2022, 57(5): 748-753.
- [48] 王鑫玲, 叶英. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药性与毒力基因的相关性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(7): 699-705.
- WANG X L, YE Y. The correlation analysis of the resistance and virulence genes of *Penicillium carbon alkene resistant Acinetobacter baumannii* [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2021, 46(7): 699-705.
- [49] 张双红, 谢勇, 李弼民, 等. 儿童幽门螺杆菌毒力基因与抗生素耐药相关性研究[J]. 临床儿科杂志, 2017, 35(1): 59-63.
- ZHANG S H, XIE Y, LI B M, et al. The correlation of virulence genes and antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* isolates in children [J]. Journal of Clinical Pediatrics, 2017, 35(1): 59-63.
- [50] 宗华, 曾德唯, 殷静, 等. 重庆市南岸区水产品 and 腹泻患者副溶血弧菌相关性分析[J]. 现代医药卫生, 2020, 36(15): 2339-2342.
- ZONG H, ZENG D W, YIN J, et al. Analysis on correlation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products and diarrhea patients in Nan'an District of Chongqing City [J]. Journal of Modern Medicine & Health, 2020, 36(15): 2339-2342.
- [51] 孙康德, 张家胜, 陈旭, 等. 口腔白念珠菌耐药性及毒力因子表达水平相关性研究[J]. 检验医学, 2019, 34(8): 730-735.
- SUN K D, ZHANG J S, CHEN X, et al. Correlations of virulence factor expression and drug resistance for *Candida albicans* isolated from oral cavity [J]. Laboratory Medicine, 2019, 34(8): 730-735.

## 《中国食品卫生杂志》顾问及第五届编委会名单

顾问: 陈君石、黄璐琦、江桂斌、李林、沈建忠、吴清平、Jianghong Meng(美国)、Patrick Wall(爱尔兰)、Samuel Godefroy(加拿大)、Gerald Moy(美国)、Paul Brent(澳大利亚)、Marta Hugas(比利时)、Yukikko Yamada(日本)、Tom Heilandt(德国)、Andreas Hensel(德国)、Christopher Elliott(英国)、Christine Nelleman(丹麦)

主任委员: 卢江

副主任委员: 王竹天、李宁、孙长颢、王涛、谢剑炜、应浩、丁钢强、张峰、张永慧

主编: 吴永宁

编委(按姓氏笔画排序)

丁钢强(中国疾病预防控制中心营养与健康所)

应浩(中国科学院上海营养与健康所)

于洲(国家食品安全风险评估中心)

张丁(河南省疾病预防控制中心)

于维森(青岛市疾病预防控制中心)

张峰(中国检验检疫科学研究院)

马宁(国家食品安全风险评估中心)

张卫兵(南通市疾病预防控制中心)

马会来(中国疾病预防控制中心)

张立实(四川大学华西公共卫生学院)

马群飞(福建省疾病预防控制中心)

张永慧(广东省疾病预防控制中心)

王君(国家食品安全风险评估中心)

张旭东(国家卫生健康委员会医院管理研究所)

王茵(浙江省医学科学院)

张剑峰(黑龙江省疾病预防控制中心)

王涛(浙江清华长三角研究院)

张朝晖(中国海关科学技术研究中心)

王硕(南开大学医学院)

张惠媛(中国海关科学技术研究中心)

王慧(上海交通大学公共卫生学院)

张遵真(四川大学华西公共卫生学院)

王永芳(国家卫生健康委员会卫生健康监督中心)

陈波(湖南师范大学化学化工学院)

王竹天(国家食品安全风险评估中心)

陈颖(中国检验检疫科学研究院)

王松雪(国家粮食和物资储备局科学研究院)

陈卫东(广东省市场监督管理局)

王晓英(中国动物疫病预防控制中心)

邵兵(北京市疾病预防控制中心)

计融(国家食品安全风险评估中心)

武爱波(中国科学院上海营养与健康所)

邓小玲(广东省疾病预防控制中心)

赵舰(重庆市疾病预防控制中心)

卢江(国家食品安全风险评估中心)

赵云峰(国家食品安全风险评估中心)

匡华(江南大学食品学院)

赵贵明(中国检验检疫科学研究院)

朱心强(浙江大学医学院)

钟凯(科信食品与营养信息交流中心)

(下转第1219页)