

山东省聊城市 2020–2021 年小肠结肠炎耶尔森菌食品分离株分子特征分析

钱璐 梁胜楠 崔方元 程利红 王江莘 姜宁宁 张香媛 姜祥坤

山东省聊城市疾病预防控制中心细菌性传染病预防控制所,聊城 252000

通信作者:姜祥坤,Email:jiangxk2000@126.com

【摘要】 目的 了解 2020–2021 年山东省聊城市小肠结肠炎耶尔森菌(*Y.e*)食品分离株分子特征。方法 对聊城市市售生肉与肉制品中 *Y.e* 开展分离培养、药敏试验、毒力基因检测、PFGE 和全基因组测序(WGS)。利用微生物基因组注释系统对全基因组数据进行拼接组装,对组装基因组开展多位点序列分型(MLST)和核心基因组多位点序列分型(cgMLST),并应用基于 WGS 的单核苷酸多态性(wg-SNPs)分型方法与美国生物技术信息中心上获取的 14 株国内外 *Y.e* 的基因组进行遗传进化分析。结果 165 份样品中共检出 21 株 *Y.e*,检出率为 12.73%,20 株 *Y.e* 测序成功。*Y.e* 携带多种耐药基因和毒力基因,出现多重耐药现象,毒力基因 PCR 检测显示 21 株 *Y.e* 呈现 2 种毒力基因特征;PFGE、MLST 和 cgMLST 聚类分析显示,21 株 *Y.e* 呈高度多样性;wg-SNPs 遗传进化分析显示 20 株 *Y.e* 可分为 2 个进化主分支。结论 聊城市市售生肉与肉制品中分离的 *Y.e* 携带多种耐药基因和毒力基因,且分子分型呈现高度多样性,应加强生肉与肉制品中 *Y.e* 分子生物学监测,开展基因组测序及分子分型检测工作,为预防由 *Y.e* 引起的食源性疾病提供理论依据。

【关键词】 小肠结肠炎耶尔森菌; 全基因组测序; 毒力基因; 耐药性; 单核苷酸多态性分型

Molecular characterization of foodborne *Yersinia enterocolitica* strains in Liaocheng City, Shandong Province, from 2020 to 2021

Qian Lu, Liang Shengnan, Cui Fangyuan, Cheng Lihong, Wang Jiangshen, Jiang Ningning, Zhang Xiangyuan, Jiang Xiangkun

Bacterial Infectious Disease Control and Prevention, Liaocheng Center for Disease Control and Prevention, Shandong Province, Liaocheng 252000, China

Corresponding author: Jiang Xiangkun, Email: jiangxk2000@126.com

【Abstract】 **Objective** To understand the genome analysis and molecular typing of foodborne *Yersinia enterocolitica* (*Y.e*) strains in Liaocheng City of Shandong Province from 2020 to 2021. **Methods** The *Y.e* strains were isolated from raw meat and meat products. Then we made the strain identification, drug sensitivity test, virulence gene test, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and whole genome sequencing (WGS). The genome sequencing data were assembled with the microbial genome annotation package. We performed the multilocus sequence typing (MLST) and core genome multilocus sequence typing (cgMLST) and used WGS-based single nucleotide polymorphism typing (wg-SNPs) method to carry out genetic evolution analysis with 14 domestic and *Y.e* genomes obtained from the NCBI. **Results** A total of 21 strains of *Y.e* were detected from 165 samples, with a detection rate of 12.73%. The 20 strains of *Y.e* were sequenced successfully. The 20 strains of *Y.e* carries a variety of drug resistance genes and virulence genes, showing multiple drug resistance. The virulence gene PCR test showed that 21 strains of *Y.e* having two virulence

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20220720-00645

收稿日期 2022-07-20 本文编辑 万玉立

引用格式:钱璐,梁胜楠,崔方元,等.山东省聊城市 2020–2021 年小肠结肠炎耶尔森菌食品分离株分子特征分析[J].中华流行病学杂志,2023,44(2):302-309. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220720-00645.

Qian L, Liang SN, Cui FY, et al. Molecular characterization of foodborne *Yersinia enterocolitica* strains in Liaocheng City, Shandong Province, from 2020 to 2021[J]. Chin J Epidemiol, 2023, 44(2): 302-309. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220720-00645.



genes. Cluster analysis of PFGE, MLST, and cgMLST showed that the genomics of 21 strains was highly diverse. The genetic evolution analysis of wg-SNPs showed that 20 *Y.e* strains could be divided into two main evolutionary branches. **Conclusions** *Y.e* strains isolated from raw meat in Liaocheng City carry a variety of drug resistance genes and virulence genes, and the molecular typing is highly diverse, which may cause infection risk. The molecular biological monitoring of *Y.e* in raw meat should be strengthened, and genome sequencing and molecular typing detection be carried out to provide the theoretical basis for foodborne illness caused by *Y.e*.

【Key words】 *Yersinia enterocolitica*; Whole genome sequencing; Virulence gene; Drug resistance; Single nucleotide polymorphism typing

小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*, *Y.e*) 是国内外广泛关注的食源性致病菌和人畜共患病病原菌之一^[1]。在冰箱及储存的生肉及其制品中常被发现^[2-3], 人类可通过食入污染的水源和食物被感染, 引起腹泻等肠道疾病, 严重的可引起反应性关节炎、败血病等^[4]。目前对 *Y.e* 的研究多集中在传统方法主要包括生物分型、血清凝集和 PCR 毒力基因检测等^[1-5], 全基因组测序技术能够在基因水平上全面分析细菌的分子生物学特征, 不仅能够通过多位点序列分型(MLST)、核心基因组多位点序列分型(cgMLST)和基于全基因组测序的单核苷酸多态性(wg-SNPs)分型等技术进行病原细菌分子分型, 还能根据全基因组测序数据分析毒力基因和耐药基因, 研究其致病性^[6-7]。本研究于 2020-2021 年对山东省聊城市市售生肉及肉制品中 *Y.e* 污染状况进行监测, 并对分离的 *Y.e* 进行全基因组测序, 测序数据进行 MLST、cgMLST 和 wg-SNPs 分型以及毒力基因和耐药基因分析, 同时进行药敏试验、PFGE 和毒力基因 PCR 检测。旨在准确获得生肉与肉制品中 *Y.e* 的基因组特征, 了解其遗传进化关系、耐药性和毒力性, 为今后 *Y.e* 的感染防控和开展分子流行病学监测提供科学依据。

材料与方法

1. 材料:

(1) 样品来源: 2020-2021 年, 从聊城市农贸市场及超市等监测点共采集 165 份生肉与肉制品, 其中鸡肉 30 份、猪肉 54 份、牛肉 46 份、羊肉 2 份、培根制品 30 份。4 h 内送至实验室开展检测工作。

(2) 主要试剂与仪器: 改良磷酸盐缓冲液(中国北京陆桥技术股份有限公司)、CIN-1 培养基(中国北京陆桥技术股份有限公司)、改良 Y 培养基(中国北京陆桥技术股份有限公司)、限制性内切酶 *Not* I、*Xba* I (日本 TaKaRa 公司)、小肠结肠炎耶尔森菌种属及毒力基因多重实时荧光 PCR 检测试剂盒(中国

北京卓诚惠生生物科技股份有限公司)、基质液(法国生物梅里埃公司)、QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司)、96 孔药敏板(美国赛默飞世尔科技公司)、建库试剂盒(中国深圳华大智造科技股份有限公司)、测序试剂盒(中国深圳华大智造科技股份有限公司)。

全自动微生物质谱分析仪(法国生物梅里埃公司)、全自动药敏试验菌液接种及判读系统(美国赛默飞世尔科技公司)、NanoDrop ONE 超微量紫外-可见光分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司)、Invitrogen Qubit 4 荧光计(美国赛默飞世尔科技公司)、全基因组测序仪(中国深圳华大智造科技股份有限公司)、脉冲场凝胶电泳仪(美国 BIO-RAD 公司)。标准菌株: ATCC23715、ATCC25922、ATCC9812、ATCC8739。

2. 研究方法:

(1) 菌株分离培养、鉴定及毒力基因 PCR 检测: 以无菌操作取生肉及其制品 25 g 放入含有 225 ml 改良磷酸盐缓冲液增菌液的无菌均质袋中, 以均质器均质 1 min 后于 26 °C 增菌 48 h。将增菌液 0.5 ml 与碱处理液 4.5 ml 充分混合 15 s 后分别接种至 CIN-1 培养基和改良 Y 培养基, 26 °C 培养 48 h, 典型菌落在 CIN-1 培养基上为中心深红色, 周围具有无色透明圈, 在改良 Y 培养基上为无色透明、不黏稠的菌落。挑取可疑菌落接种至改良克氏双糖培养基, 将斜面和底部皆变黄且不产气的培养物进一步接种至尿素酶, 26 °C 培养 24 h, 尿素酶反应阳性者再进一步接种至半固体培养基分别置于 26 °C 和 36 °C 培养 24 h, 将 26 °C 有动力而 36 °C 无动力的可疑菌落挑至 BHI 培养基^[8] 进行培养, 然后采用 Vitek 2 compact 30 进行生化鉴定, 并结合质谱进行鉴定^[9]。采用荧光定量 PCR 方法, 对 *Y.e* 的 *ail*、*ystA*、*ystB*、*yadA*、*virF* 基因进行检测, 参照试剂盒及仪器使用说明书要求进行操作^[2]。

(2) 药敏试验: 鉴定为 *Y.e* 的菌落, 药敏试验用微量肉汤稀释法进行, 使用国家致病菌识别网肠道

菌群专用革兰阴性需氧菌药敏检测板 CHNENF, 检测按照说明书完成, 并做 ATCC25922 的药敏质控^[4,10-11]。试验结果用全自动药敏判读系统判读, 分析其最低抑菌浓度值, 根据 2021 年美国临床实验室标准化委员会的相应标准判读^[12], 分为敏感(S)、中介(I)和耐药(R)。共检测 14 种抗生素, 分别为氯霉素(CH, 4~32 μg/ml)、复方新诺明(SXT, 0.5/9.5~8/152 μg/ml)、多粘菌素 E(CT, 0.25~8 μg/ml)、厄他培南(ETP, 0.25~8 μg/ml)、美罗培南(MEM, 0.12~2 μg/ml)、头孢噻肟(CTX, 0.25~16 μg/ml)、头孢他啶(CAZ, 0.25~16 μg/ml)、头孢他啶/阿维巴坦(CZA, 0.25/4~8/4 μg/ml)、四环素(TET, 1~16 μg/ml)、替加环素(TIG, 0.25~8 μg/ml)、环丙沙星(CIP, 0.015~0.12 μg/ml)、阿米卡星(AMI, 4~64 μg/ml)、氨苄西林(AMP, 2~32 μg/ml)、氨苄西林/舒巴坦(AMS, 2/1~32/16 μg/ml)。

(3) PFGE 分型: 鉴定为 *Y.e* 的菌落, 实验参照《国家致病菌识别网技术规范—小肠结肠炎耶尔森菌》进行。主要实验参数: 细菌悬液浊度 4.0~4.5; 限制性内切酶 *Not I* (10 U/μl) 37 °C 酶切 2 h; 电泳参数 2~20 s, 18.5 h; 利用 H9812 作为分子量标准。指纹图谱上传至 BioNumerics 软件进行分析, 构建聚类树状图, 位置优化度和容许度为 1.5%, 带型相似度 85.0% 以上判定为一个带型簇^[8]。

(4) 全基因组测序: 将鉴定为 *Y.e* 的菌落纯培养, 用 QIAamp DNA Mini Kit 提取菌株基因组 DNA, 用超微量分光光度计测定基因组 DNA 纯度, 用 Invitrogen Qubit 4 测定基因组 DNA 浓度, 基因组 DNA 浓度需 >4.59 ng/μl。使用华大基因二代测序仪完成全基因组测序, 建库试剂盒与测序试剂盒均使用华大基因生产试剂盒。

(5) 数据分析: 测序数据利用微生物基因组注释系统进行全功能分析, 包括基因组组装、耐药基因预测、毒力基因预测, 同时使用 k SNP 3.0 软件对 20 株 *Y.e* 食品分离株的全基因组与美国生物技术信息中心上获得的不同年份、地区和来源的 14 株具有代表性菌株基因组(表 1)构建 wg-SNPs 进化树。MLST 参考 *Y.e* 的 7 个管家基因 (*adk*、*argA*、*aroA*、*glnA*、*thrA*、*tmk*、*trpE*), 利用 MLST 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) 进行 ST 分型^[13-14]。cgMLST 分型利用 cgMLST Finder 1.1 (https://cge.cbs.dtu.dk/services/cgMLST_Finder/) 进行分型。数据参考病原菌抗性基因数据库 (comprehensive antibiotic research database, CARD, [https://card.](https://card.mcmaster.ca/)

[mcmaster.ca/](https://card.mcmaster.ca/)) 和毒力基因数据库 (virulence factor database, VFDB, <http://www.mgc.ac.cn>)^[14]。

表 1 14 株来自美国生物技术信息中心的小肠结肠炎耶尔森菌菌株信息

菌株编号	分离国家	分离年份	来源	登录号
Y1 WildBoar1B	意大利	2014	动物	GCA_001983245
Y11	德国	2013	病例	GCA_000253175
PhRBD_Ye1	菲律宾	2011	动物	GCA_000230775
IP26014	法国	2015	动物	GCA_001160345
FORC_002	韩国	2013	食品	GCA_000597945
ERL053484	新西兰	2005	动物	GCA_001182085
R31	巴西	2017	动物	GCA_022395105
IP20322	希腊	1988	食品	GCA_001139785
17-YE00056	德国	2017	食品	GCA_021311555
YE22602	英国	2002	动物	GCA_001222305
YE6	芬兰	2015	动物	GCA_001708595
YE165	瑞士	2011	动物	GCA_001708575
WA	美国	2015	病例	GCA_000834195
SO16	芬兰	2013	病例	GCA_019425925

结 果

1. *Y.e* 来源标本的分布: 从聊城市农贸市场及超市共监测 165 份肉与肉制品, 其中鸡肉 30 份、猪肉 54 份、牛肉 46 份、羊肉 2 份、培根制品 30 份。经分离、培养和鉴定, 共检出 *Y.e* 菌株 21 株, 检出率为 12.73%。其中在鸡肉中检出 7 份, 检出率为 4.24%; 在牛肉中检出 6 份, 检出率为 3.64%; 在猪肉中检出 8 份, 检出率为 4.85%。

2. 基因组组装报告: 使用微生物基因组注释系统对质控合格的测序数据进行基因组组装, 并利用测序数据对组装长度进行延伸, 其中菌株 *Y.e* 010 两次测序失败, 因此共得到 20 株 *Y.e* 基因组组装报告。20 个 *Y.e* 基因组的支架 (scaffold) N50 均 >20 kb, 重叠群 (contigs) N50 均 >20 kb。支架 $M(Q_1, Q_3)$ 为 34 (22, 106) 个, 重叠群 $M(Q_1, Q_3)$ 为 40 (26, 115) 个, 支架 N50 $M(Q_1, Q_3)$ 为 407 226 (102 676, 690 784) bp, 重叠群 N50 $M(Q_1, Q_3)$ 为 382 714 (85 816, 576 513) bp, GC 含量 $M(Q_1, Q_3)$ 为 47.22% (46.94%, 47.52%)。20 个菌株基因组分别最佳匹配到 *Y.e* GCA-001304755、*Y.e* GCA-000597945 和 *Y.e* GCA-001219385 等不同的最近缘序列。聊城市 21 株食源性 *Y.e* 的分离来源、分离时间及其基因组组装报告见表 2。

3. *Y.e* ST 分型: MLST 分型结果显示, 本研究

表 2 2020–2021 年聊城市 21 株食源性小肠结肠炎耶尔森菌(*Y.e*)基本信息及其基因组组装报告

菌株 ID	分离来源	分离时间 (年-月-日)	基因组大小 (bp)	GC 含量 (%)	支架		重叠群		最近序列 (GCA)	ST 分型
					个数	N50(bp)	个数	N50(bp)		
Y.e01	鸡肉	2020-06-01	4 761 609	47.07	25	404 197	30	394 702	001304755	568
Y.e02	鸡肉	2020-06-01	5 163 597	47.52	106	102 676	115	85 816	000597945	335
Y.e03	鸡肉	2020-06-01	4 709 624	47.25	32	320 769	35	243 201	001219385	311
Y.e04	鸡肉	2020-11-03	4 817 178	47.30	22	690 784	27	576 513	000597945	360
Y.e05	牛肉	2020-05-18	4 682 170	47.09	33	262 703	35	262 703	001217745	153
Y.e06	猪肉	2020-05-18	4 839 660	47.18	49	306 212	55	245 099	000597945	336
Y.e07	猪肉	2020-05-18	4 897 836	46.99	34	410 256	40	410 256	001106265	416
Y.e08	猪肉	2020-11-20	4 706 021	47.38	70	107 391	75	106 150	002082245	476
Y.e09	牛肉	2020-11-23	4 760 428	47.26	46	370 725	55	370 725	000285015	289
Y.e010	猪肉	2021-08-16	-	-	-	-	-	-	-	-
Y.e011	牛肉	2020-11-23	4 804 128	47.21	63	150 556	71	144 964	000597945	335
Y.e012	牛肉	2020-11-23	4 717 487	47.26	44	433 431	48	433 431	000597945	470
Y.e013	鸡肉	2020-11-23	4 812 355	47.18	41	416 001	46	416 001	001182085	290
Y.e014	鸡肉	2020-11-23	4 807 556	47.29	28	509 773	32	509 773	000597945	360
Y.e015	猪肉	2021-02-22	4 782 752	47.07	24	476 747	27	476 747	002082245	510
Y.e016	猪肉	2021-08-16	4 725 856	47.01	25	608 970	31	431 573	002082245	503
Y.e017	鸡肉	2021-03-22	4 640 829	46.99	24	411 774	26	411 774	002082245	666
Y.e018	猪肉	2021-04-13	4 884 874	47.27	50	316 317	60	316 317	000285015	496
Y.e019	牛肉	2020-11-23	4 772 794	47.16	34	279 505	38	205 942	001106265	538
Y.e020	牛肉	2021-02-22	4 893 374	47.33	74	516 573	91	279 447	000285015	496
Y.e021	猪肉	2021-08-16	4 850 587	46.94	33	572 703	39	410 002	002082245	503

20 株 *Y.e* 可分为 16 个 ST 型。其中 2 株为 ST360 型, 来自鸡肉; 2 株为 ST335 型, 来自鸡肉和牛肉; 2 株为 ST503 型, 来自猪肉; 2 株 ST496 型, 来自牛肉和猪肉; 其余 ST 型见表 2, 无主要型别。

4. *Y.e* 毒力基因谱分析: 全基因组测序显示, 21 株 *Y.e* 中毒力基因检测结果见表 3。侵袭性相关基因 *inv* 携带率为 100% (20/20); 外毒素合成相关基因 *yplA*、*YaxAB* 携带率分别为 20% (4/20)、80% (16/20); *ystB* 基因携带率为 90% (18/20); 黏附性相关基因 *Myf*、*yapC* 携带率为 65% (13/20)、20% (4/20); 与分泌系统相关基因 *ystI* 携带率为 35% (7/20)。荧光定量 PCR 结果显示 21 株 *Y.e* 呈现 2 种毒力基因特征, 均为非致病性菌株型, 11 株 *Y.e* 毒力基因特征为 *ail*⁻、*ystA*⁻、*ystB*⁻、*yadA*⁻、*virF*⁻; 10 株 *Y.e* 毒力基因特征为 *ail*⁻、*ystA*⁻、*ystB*⁺、*yadA*⁻、*virF*⁻。

5. *Y.e* 药敏试验结果与耐药基因检测: 本研究对 21 株 *Y.e* 进行了药敏试验。见表 4。有 10 株菌对 AMP 耐药, 耐药率为 47.62%, 有 7 株菌对 CIP 耐药, 耐药率为 33.33%, 有 2 株菌对 TET 耐药, 耐药率为 9.52%, 菌株 *Y.e03*、*Y.e07*、*Y.e09*、*Y.e015* 出现多重耐药现象。耐药基因检测结果显示 17 株菌携带 *blaA* 和 *vat (F)* 耐药基因; 20 株菌均携带 *y56 beta-lactamase* 耐药基因; 10 株菌携带氟喹诺酮类耐药基因 *qnrD1*; 2 株菌携带氟喹诺酮类耐药基因 *qnrS1*;

表 3 21 株小肠结肠炎耶尔森菌(*Y.e*)毒力基因分布情况

菌株 ID	分离来源	ST 分型	全基因组测序	PCR
Y.e01	鸡肉	568	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i>	-
Y.e02	鸡肉	335	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i> , <i>yplA</i>	-
Y.e03	鸡肉	311	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i> , <i>ystI</i>	-
Y.e04	鸡肉	360	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i>	-
Y.e05	牛肉	153	<i>inv</i> , <i>YaxA</i> , <i>YaxAB</i> , <i>Myf</i> , <i>yplA</i> , <i>ystB</i>	<i>ystB</i>
Y.e06	猪肉	336	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i> , <i>Myf</i>	<i>ystB</i>
Y.e07	猪肉	416	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystA</i> , <i>ystB</i>	<i>ystB</i>
Y.e08	猪肉	476	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i> , <i>Myf</i> , <i>yplA</i>	<i>ystB</i>
Y.e09	牛肉	289	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i> , <i>Myf</i>	-
Y.e010	猪肉	-	-	-
Y.e011	牛肉	335	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i> , <i>Myf</i> , <i>yplA</i>	-
Y.e012	牛肉	470	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i> , <i>ystI</i> , <i>Myf</i>	<i>ystB</i>
Y.e013	鸡肉	290	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i> , <i>Myf</i> , <i>ystI</i>	-
Y.e014	鸡肉	360	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i> , <i>ystI</i> , <i>Myf</i>	<i>ystB</i>
Y.e015	猪肉	510	<i>inv</i> , <i>yapC</i> , <i>Myf</i> , <i>ystI</i> , <i>ysa</i>	-
Y.e016	猪肉	503	<i>inv</i> , <i>yapC</i> , <i>ystB</i>	<i>ystB</i>
Y.e017	鸡肉	666	<i>inv</i> , <i>yapC</i> , <i>Myf</i>	-
Y.e018	猪肉	496	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i>	-
Y.e019	牛肉	538	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i> , <i>Myf</i>	<i>ystB</i>
Y.e020	牛肉	496	<i>inv</i> , <i>YaxAB</i> , <i>ystB</i> , <i>Myf</i> , <i>ystI</i>	<i>ystB</i>
Y.e021	猪肉	503	<i>inv</i> , <i>yapC</i> , <i>ystI</i> , <i>ysa</i> , <i>Myf</i> , <i>ystB</i>	<i>ystB</i>

2 株菌携带四环素类耐药基因 *tet(A)*; 1 株菌携带二氨基嘧啶类耐药基因 *dfrA14*。

6. PFGE 分型和 cgMLST 分型: 经 PFGE 分子分

表 4 21 株小肠结肠炎耶尔森菌(*Y.e*)携带耐药基因类型和耐药性

菌株ID	ST分型	分离来源	耐药基因	耐药性
Y.e01	568	鸡肉	<i>blaA, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP、CIP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e02	335	鸡肉	<i>blaA, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP 耐药, 对 CIP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e03	311	鸡肉	<i>blaA, qnrD1, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP、CIP 耐药, 对 CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e04	360	鸡肉	<i>blaA, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP、CIP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e05	153	牛肉	<i>blaA, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP、CIP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e06	336	猪肉	<i>blaA, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP 耐药, 对 CIP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e07	416	猪肉	<i>blaA, qnrD1, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP、CIP 耐药, 对 CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e08	476	猪肉	<i>blaA, qnrD1, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 CIP 耐药, 对 AMP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e09	289	牛肉	<i>blaA, qnrD1, qnrS1, tet(A), vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP、TET、CIP 耐药, 对 CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e010	无	猪肉	-	对 CIP 耐药, 对 CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMP、AMS 敏感
Y.e011	335	牛肉	<i>blaA, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP、CIP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e012	470	牛肉	<i>blaA, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP、CIP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e013	290	鸡肉	<i>blaA, qnrD1, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP 耐药, 对 CIP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e014	360	鸡肉	<i>blaA, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP 耐药, 对 CIP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e015	510	猪肉	<i>dfiA14, qnrS1, tet(A), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP、TET 耐药, 对 CIP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e016	503	猪肉	<i>qnrD1, y56 beta-lactamase</i>	对 AMP、CIP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e017	666	鸡肉	<i>blaA, qnrD1, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 CIP 耐药, 对 AMP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e018	496	猪肉	<i>blaA, qnrD1, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP 耐药, 对 CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、CIP、AMS 敏感
Y.e019	538	牛肉	<i>blaA, qnrD1, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP 耐药, 对 CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、CIP、AMS 敏感
Y.e020	496	牛肉	<i>blaA, vat(F), y56 beta-lactamase</i>	对 AMP、CIP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感
Y.e021	503	猪肉	<i>qnrD1, y56 beta-lactamase</i>	对 CIP 耐药, 对 AMP、CH、SXT、CT、ETP、MEM、CTX、CAZ、CZA、TET、TIG、AMI、AMS 敏感

注: AMP: 氨苄西林; CIP: 环丙沙星; SXT: 复方新诺明; CT: 多粘菌素 E; ETP: 厄他培南; MEM: 美罗培南; CTX: 头孢噻肟; TET: 四环素; TIG: 替加环素; AMI: 阿米卡星; AMS: 氨苄西林/舒巴坦; CAZ: 头孢他啶; CZA: 头孢他啶/阿维巴坦; CH: 氯霉素

型后 21 株 *Y.e* 带型相似度为 68.0%~100.0%, 按相似度 85.0% 为标准分为 14 个带型簇^[8], 较为分散, 没有优势带型簇, 各带型簇涵盖的菌株数量在 1~3 之间。见图 1。相似度 96.2% 的 *Y.e012* 和 *Y.e011* 耐药基因携带情况一致, 但是耐药性表现不一致, 毒力基因携带情况不一致, ST 分型不一致; 相似度 96.8% 的 *Y.e004* 和 *Y.e014* 耐药基因携带情况一致, 耐药性表现一致, ST 分型一致, 但是毒力基因携带情况不一致。相似度 100.0% 的 *Y.e018* 和 *Y.e020* 耐药基因和毒力基因携带情况均不一致, ST 分型一致。ST 分型一致的两株菌(ST503 和 ST335) PFGE

指纹图谱相似度差异较大。

cgMLST 聚类分析显示 20 株 *Y.e* 之间存在等位基因差异, 数量在 25~313 个之间, 可分为 3 个主进化分支。2 株 ST360 型(*Y.e04* 和 *Y.e014*) 菌株之间等位基因差异数量为 26 个, 2 株 ST335 型(*Y.e02* 和 *Y.e011*) 菌株之间等位基因差异数量为 38 个, 2 株 ST503 型(*Y.e016* 和 *Y.e021*) 菌株有 25 个等位基因差异, 2 株 ST496 型(*Y.e018* 和 *Y.e020*) 菌株之间等位基因差异数量为 41 个。PFGE 相似度 96.2% 的 *Y.e012* 和 *Y.e011* 两株菌位于同一主分支的 2 个的亚分支上, 与 PFGE 聚类结果有差异。见图 2。

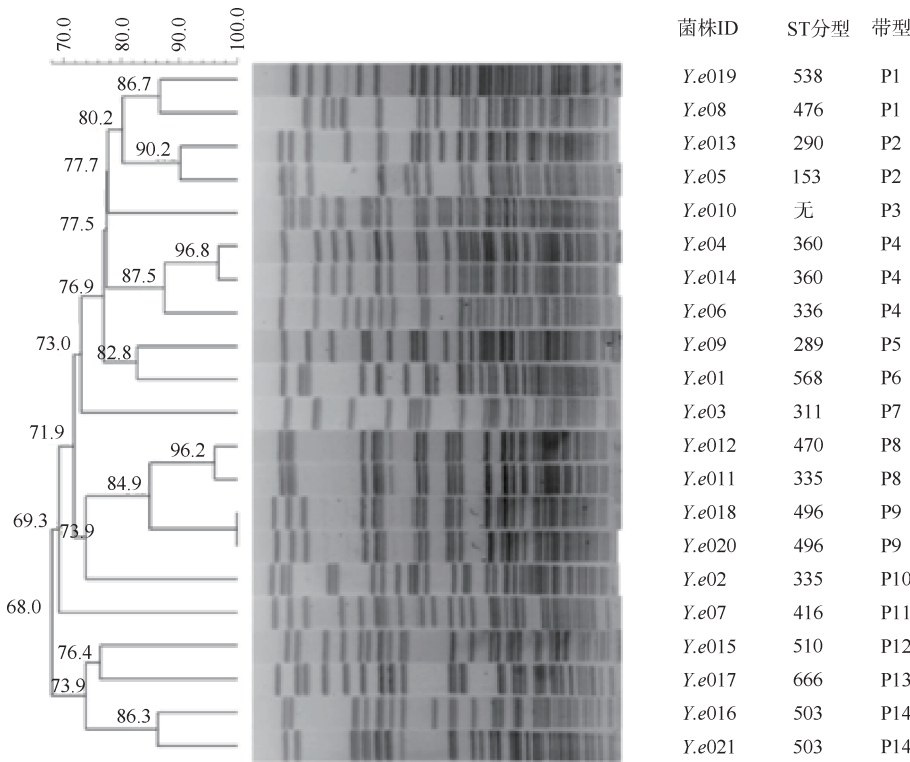


图1 基于21株小肠结肠炎耶尔森菌(Y.e)PFGE指纹图谱构建的树状图

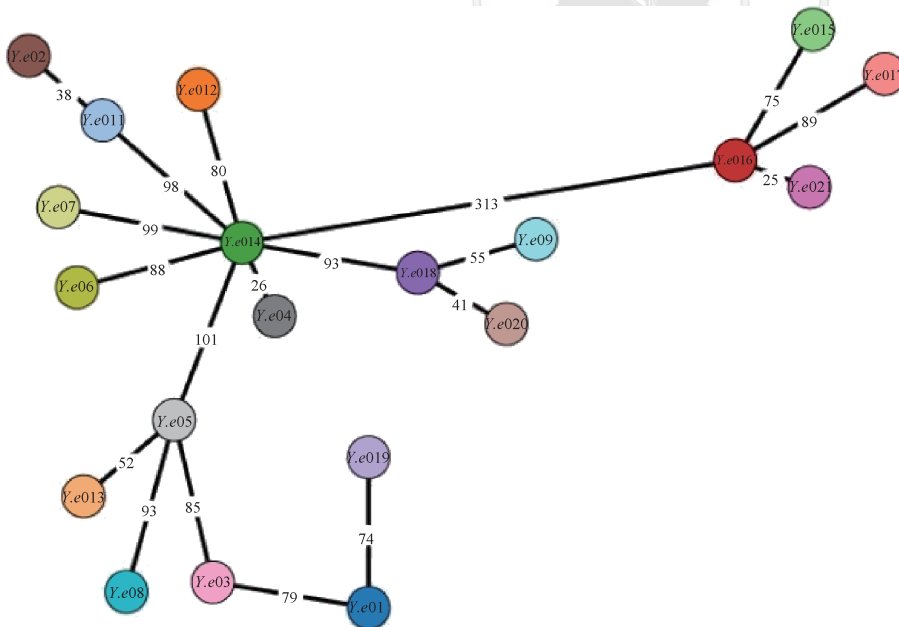


图2 基于20株小肠结肠炎耶尔森菌(Y.e)核心基因组多位点序列分型最小生成树

7. 基于 wg-SNPs 的遗传多样性分析: *Y. e* wg-SNPs 系统进化树结果见图 3, 34 株菌株可分为 2 个主进化分支, 2020–2021 年聊城市分离的 20 株 *Y. e* 食品分离株则分别位于这两个主进化分支上, 其中 *Y. e015*、*Y. e016*、*Y. e017* 和 *Y. e021* 位于主分支 1, *Y. e07* 位于主分支 2 的亚分支 2a, *Y. e04*、*Y. e09*、*Y. e012*、*Y. e014*、*Y. e018* 和 *Y. e020* 位于主分支 2 的亚分支 2b, *Y. e01*、*Y. e02*、*Y. e03*、*Y. e05*、*Y. e06*、*Y. e08*、

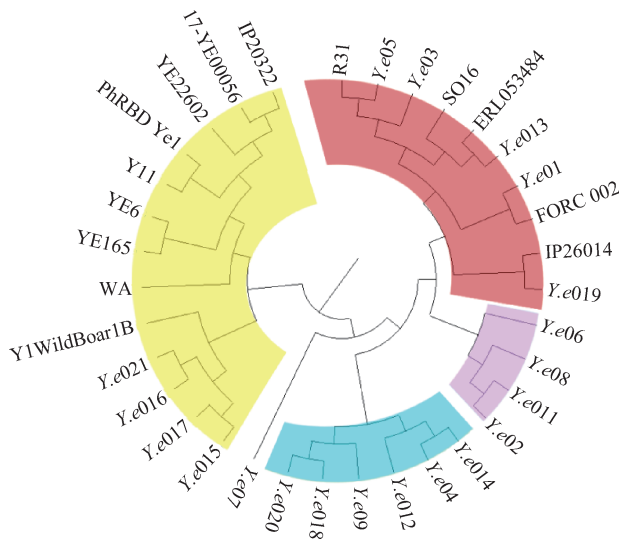
Y. e011、*Y. e013* 和 *Y. e019* 位于主分支 2 的亚分支 2c。

讨论

目前, *Y. e* 病在我国主要以低水平散发为主。由于其在低温环境下易于生长, 所以是“冰箱病”的主要致病菌之一^[15]。本研究通过对 2020–2021 年聊城市市售生肉及其制品中 *Y. e* 进行监测, 结果显示该致病菌在生肉与肉制品中分离率较高, 达 12.73%, 高于傅祎欣等^[2]报道的 *Y. e* 检出率, 低于王丽丽等^[8]的报道。提示居民肉制品应煮熟后食用, 并避免交叉污染。

Y. e 的致病性主要与毒力基因和耐药基因等特征有关, 近年来, 随着全基因组测序技术的发展和生物信息学分析工具的成熟, 大大提升了细菌全基因组研究的水平, 但 *Y. e* 全基因组研究在国内外仍是短板。目前, 国内外学者常通过 5 个毒力基因 (*ail*、*ystA*、*ystB*、*yadA* 和 *virF*) PCR 实验来确定 *Y. e* 有无致病性^[5]。致病性菌株通常携带 *ail*、*ystA*、*yadA* 和 *virF* 基因, 非致病性菌株不携带上述基因^[16]。本研究 PCR 结果显示, 21 株 *Y. e* 分离株均为非

致病型菌株, 这一结果与其他地区报道一致^[2,5,8]。本研究同时通过全基因组测序技术监测 *Y. e* 其他毒力基因, 如 *YaxAB*、*Myf* 等, 结果显示, *YaxAB* 和 *Myf* 基因在 *Y. e* 中携带率较高。Wagner 等^[17]证实了 *YaxAB* 编码的蛋白质有助于增强人类和小鼠细胞的细胞毒活性, 致使 *YaxAB* 在 *Y. e* 的致病性中起作用; Bräuning 等^[18]认为 *YaxAB* 在哺乳动物 *Y. e* 感染中的确切作用仍然难以捉摸, 但值得注意的是,



注:黄色部分为分支1;蓝色部分为分支2a;紫色部分为分支2b;红色部分为分支2c

图3 34株小肠结肠炎耶尔森菌(*Y.e*)基于全基因组测序的单核苷酸多态性系统进化树

*YaxAB*被发现对免疫细胞具细胞毒性,并影响小鼠感染模型中脾脏炎症的病变;Pakharukova等^[19]的研究显示,在进化过程中*Myf*基因专门作为碳水化合物结合黏附素,促进*Y.e*到肠细胞,引起致病性。因此,该类菌仍存在一定潜在危害性,有必要对该类菌进行持续性监测。笔者认为进行5种毒力基因PCR检测的同时,通过全基因组测序技术增加*Yax*和*Myf*等毒力基因检测,能在一定程度上更加准确地判定*Y.e*的潜在致病力。

*Y.e*对AMP和一代头孢类抗生素天然耐药,测序结果显示可能与*blaA*和*y56 beta-lactamase*耐药基因携带有关。21株*Y.e*耐药试验报告显示,*Y.e*对氟喹诺酮类(CIP)耐药率较高,与国内研究情况略有不同^[2,8-20],也有研究显示,*Y.e*分离株对氟喹诺酮类抗生素敏感^[2,8,19],本研究出现耐氟喹诺酮类(CIP)*Y.e* 6株,耐药基因检测结果显示可能与*qnrD1*和*qnrS1*等耐药基因的获得有关,为质粒介导的氟喹诺酮类耐药菌株,*qnr*基因编码的蛋白对DNA解旋酶产生保护作用,从而起到对氟喹诺酮类药物的抑制作用^[21]。菌株*Y.e016*携带耐药基因*qnrD1*,但药敏结果显示对氟喹诺酮类(CIP)敏感,可能是氟喹诺酮类耐药决定区存在耐药基因表达突变的情况。本研究出现2株*Y.e*分离株对四环素耐药,可能与*tet(A)*耐药基因的获得有关。部分菌株携带*blaA*和*y56 beta-lactamase*耐药基因,但药敏结果显示对AMP敏感,可能是耐药基因未表达的

原因。本研究出现对氟喹诺酮类、四环素类的耐药株,质粒的传播可以让耐药性在细菌间水平传播,增加不同种细菌的耐药性,提示临床上应谨慎使用氟喹诺酮类、四环素类抗生素。

现代分子分型方法以PFGE和MLST较常见,但都只利用了细菌有限的遗传信息,没有充分利用细菌整体的遗传信息去分析^[7],本研究进一步在全基因组的水平基于序列多态性进行分型。cgMLST是以基因为单元进行比对和分型,其分型结果相较于MLST和PFGE,更具有可靠性^[22],本研究结果也符合这一观点。如ST335的两株*Y.e*(菌株ID: *Y.e02*和*Y.e011*),cgMLST结果显示菌株之间等位基因差异数量为38个,采用cgMLST大大提高了常规MLST的分辨力。wg-SNPs系统进化树分析显示,主分支1中,4株中国山东省聊城市食品分离株(*Y.e015*、*Y.e016*、*Y.e017*和*Y.e021*)与意大利分离株Y1 WildBoar1B较近,而Y1 WildBoar1B则是从野生有蹄类动物尸体中分离出来的,并确定为高毒力株(生物型1B)^[23];亚分支2c中,中国山东省聊城市食品分离株*Y.e013*与新西兰动物尸体分离株ERL053484、芬兰临床分离株SO16较近,以上分析提示*Y.e*食品分离株在聊城市有引起感染的风险,值得防控部门关注。

综上所述,相关部门应加强生肉与肉制品中*Y.e*的分子生物学监测,开展基因组测序及分子分型检测工作,不断完善食源性致病菌大数据,对食品安全风险评估和疾病暴发预警具有重要意义。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 钱璐、梁胜楠、崔方元、程利红:实验操作、论文撰写;王江莘、姜宁宁、张香媛:数据整理、统计学分析;姜祥坤:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] Filik K, Szermer-Olearnik B, Wernecki M, et al. The podovirus ϕ 80-18 targets the pathogenic American biotype 1B strains of *Yersinia enterocolitica*[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1356. DOI: 10.3389/fmicb. 2020. 01356.
- [2] 傅祎欣,洪锦春,叶海梅,等. 2019-2020年福建省生肉中小肠结肠炎耶尔森菌污染状况及耐药分析[J]. 中国预防医学杂志, 2021, 22(3):193-196. DOI:10.16506/j.1009-6639. 2021.03.007.

Fu YX, Hong JC, Ye HM, et al. Prevalence and antibiotic resistance profile of *Yersinia enterocolitica* in row meat in Fujian province from 2019 to 2020[J]. Chin Prev Med, 2021, 22(3): 193-196. DOI: 10.16506/j.1009-6639.2021. 03.007.

- [3] Klinzing DC, Matias RR, Skowronski E, et al. Shotgun genome sequence of a *Yersinia enterocolitica* isolate from the Philippines[J]. J Bacteriol, 2012, 194(2):542-543. DOI: 10.1128/JB.06451-11.
- [4] 罗嘉远, 陈洪友, 陈敏, 等. 食品中 2 株非常见耶尔森菌分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(1): 20-24. DOI:10.13590/j.cjfh.2020.01.004.
Luo JY, Chen HY, Chen M, et al. Isolation and drug resistance of 2 stains of *Yersinia* from food[J]. Chin J Food Hyg, 2020, 32(1):20-24. DOI:10.13590/j.cjfh.2020.01.004.
- [5] 张彦春, 杨波, 王苗, 等. 北京市顺义区零售生猪肉中小肠结肠炎耶尔森菌的检测与病原特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(10):945-949. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.123.
Zhang YC, Yang B, Wang M, et al. Distribution and characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from retail raw pork meat in Shunyi, Beijing[J]. Chin J Zoonoses, 2021, 37(10): 945-949. DOI: 10.3969/j. issn. 1002-2694.2021.00.123.
- [6] 段然. 我国 5 岁以下儿童小肠结肠炎耶尔森菌病流行特征与致病性耶尔森菌比较基因组学初步研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2017:1-77.
Duan R. Epidemic characteristics and comparative genomics of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in children under 5 years old in China[D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2017:1-77.
- [7] 周海健, 阚飒. 细菌基因组分型方法的应用研究进展[J]. 疾病监测, 2016, 31(8):668-675. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2016.08.013.
Zhou HJ, Kan B. Progress in application research of bacterium genome-based subtyping[J]. Dis Surveill, 2016, 31(8):668-675. DOI:10.3784/j.issn.1003-9961.2016.08.013.
- [8] 王丽丽, 张寻, 段然, 等. 北京市市售生禽肉及社区居民冰箱耶尔森菌污染状况及分子特征研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(9): 752-757. DOI: 10.3969/j. issn. 1002-2694.2020.00.108.
Wang LL, Zhang X, Duan R, et al. Contamination status and molecular characteristics of *Yersinia* bacteria in raw meat and community refrigerators in Beijing[J]. Chin J Zoonoses, 2020, 36(9): 752-757. DOI: 10.3969/j. issn. 1002-2694.2020.00.108.
- [9] 张彦春, 张爽, 杨杰, 等. 自腹泻病例和家用冰箱分离的小肠结肠炎耶尔森菌病原特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(6):582-585. DOI:10.13590/j.cjfh.2018.06.006.
Zhang YC, Zhang S, Yang J, et al. Analysis of pathogenic characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from household refrigerators and diarrhea patients[J]. Chin J Food Hyg, 2018, 30(6): 582-585. DOI: 10.13590/j. cjfh. 2018.06.006.
- [10] Råsbäck T, Rosendal T, Stampe M, et al. Prevalence of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Swedish pig farms[J]. Acta Vet Scand, 2018, 60(1): 39. DOI: 10.1186/s13028-018-0393-5.
- [11] Liang JR, Kou ZQ, Qin S, et al. Novel *Yersinia enterocolitica* prophages and a comparative analysis of genomic diversity[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1184. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01184.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021.
- [13] Peng ZX, Zou MY, Li MH, et al. Prevalence, antimicrobial resistance and phylogenetic characterization of *Yersinia enterocolitica* in retail poultry meat and swine feces in parts of China[J]. Food Control, 2018, 93: 121-128. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.05.048.
- [14] Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(4): 1355-1361. DOI: 10.1128/JCM.06094-11.
- [15] Chlebicz A, Śliżewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as zoonotic foodborne diseases: a review[J]. Int J Environ Res Public Health, 2018, 15(5):863. DOI:10.3390/ijerph15050863.
- [16] Thoerner P, Bin Kingombe CI, Bögli-Stuber K, et al. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(3): 1810-1816. DOI:10.1128/AEM.69.3.1810-1816.2003.
- [17] Wagner NJ, Lin CP, Borst LB, et al. YaxAB, a *Yersinia enterocolitica* pore-forming toxin regulated by RovA[J]. Infect Immun, 2013, 81(11): 4208-4219. DOI: 10.1128/IAI.00781-13.
- [18] Bräuning B, Bertolin E, Praetorius F, et al. Structure and mechanism of the two-component α -helical pore-forming toxin YaxAB[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1806. DOI: 10.1038/s41467-018-04139-2.
- [19] Pakharukova N, Roy S, Tuittila M, et al. Structural basis for Myf and Psa fimbriae-mediated tropism of pathogenic strains of *Yersinia* for host tissues[J]. Mol Microbiol, 2016, 102(4):593-610. DOI:10.1111/mmi.13481.
- [20] 王闻卿, 崔琪奇, 王筱, 等. 上海市浦东新区食源性小肠结肠炎耶尔森菌耐药及分子流行病学特征[J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(3): 354-359. DOI: 10.3760/cma. j. issn.0254-6450.2019.03.019.
Wang WQ, Cui QQ, Wang X, et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of foodborne *Yersinia enterocolitica* in Pudong New District, Shanghai[J]. Chin J Epidemiol, 2019, 40(3): 354-359. DOI: 10.3760/cma. j. issn.0254-6450.2019.03.019.
- [21] 刘雪松, 张艳, 薛沾枚, 等. 一株喹诺酮耐药大肠杆菌耐药基因检测[J]. 现代畜牧科技, 2022(1): 35-37. DOI: 10.19369/j.cnki.2095-9737.2022.01.013.
Liu XS, Zhang Y, Xue ZM, et al. Detection of drug resistance gene in a quinolone resistant *Escherichia coli*[J]. Mod Anim Husbandry Sci Technol, 2022(1): 35-37. DOI: 10.19369/j.cnki.2095-9737.2022.01.013.
- [22] 畅晓晖. 基于全基因组测序的致病菌分型溯源技术研究进展[J]. 中国口岸科学技术, 2021, 3(增刊 1):41-47.
Chang XH. Research on pathogenic traceability of pathogenic bacteria based on whole-genome sequencing [J]. China Port Sci Technol, 2021, 3 Suppl 1:41-47.
- [23] Macori G, Romano A, Adriano D, et al. Draft genome sequences of four *Yersinia enterocolitica* strains, isolated from wild ungulate carcasses[J]. Genome Announc, 2017, 5(15):e00192-17. DOI:10.1128/genomeA.00192-17.