

# 辽宁部分地区生肉制品中小肠结肠炎耶尔森菌多位点序列分型及耐药分析

王伟杰<sup>1</sup>, 刘海霞<sup>1</sup>, 李雪<sup>1</sup>, 战杨<sup>2</sup>, 孙婷婷<sup>1</sup>, 魏彤竹<sup>1</sup>, 厚安阳<sup>3</sup>, 张眉眉<sup>\*1</sup>

1 辽宁省疾病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110172

2 大连市西岗区疾病预防控制中心, 辽宁 大连 116019

3 中国医科大学 公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110122

王伟杰, 刘海霞, 李雪, 战杨, 孙婷婷, 魏彤竹, 厚安阳, 张眉眉. 辽宁部分地区生肉制品中小肠结肠炎耶尔森菌多位点序列分型及耐药分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3059-3069.

WANG Weijie, LIU Haixia, LI Xue, ZHAN Yang, SUN Tingting, WEI Tongzhu, HOU Anyang, ZHANG Meimei. Multilocus sequence typing and drug resistance analysis of *Yersinia enterocolitica* in raw meat products in some areas of Liaoning Province[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3059-3069.

**摘要:** 【背景】小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)是一种人兽共患病原细菌, 在我国分布广泛, 可引起多种肠道症状以及全身性疾病, 对人类和动物的健康造成威胁。【目的】了解辽宁省内部分地区不同畜禽生肉来源的小肠结肠炎耶尔森菌耐药表型、耐药基因、毒力基因及多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)特征。【方法】对辽宁省 2018–2021 年分离自市售生鸡肉、生猪肉和生牛肉三类食品样品的 26 株小肠结肠炎耶尔森菌进行药物敏感性试验和血清型鉴定, 并通过全基因组测序技术进行遗传相关信息分析。【结果】26 株小肠结肠炎耶尔森菌对头孢唑啉(cefazolin, CFZ)的耐药程度最高, 对多黏菌素 E (polymyxin E, CT)全部中介耐药, 对氯霉素(chloramphenicol, CHL)和庆大霉素(gentamicin, GEN)两种抗生素均为敏感。26 株菌的毒力基因以 *ail<sup>-</sup>virF<sup>-</sup>yadA<sup>-</sup>ystA<sup>-</sup>ystB<sup>+</sup>* 型为主, 存在一株 *ail<sup>+</sup>virF<sup>-</sup>yadA<sup>-</sup>ystA<sup>+</sup>ystB<sup>-</sup>* 基因型, 来自猪肉样品。血清型以 O:5 为主, 占比为 84.6%, O:8 和未分型的菌株占比均为 7.7%。26 株菌均携带 *CRP*、*rosA* 和 *rosB* 这 3 种相同的耐药基因, 有 14 株携带 *vat(F)* 和 *blaA* 基因, 2 株携带 *qnrD* 基因。经 MLST 分析共获得 21 种 ST 型, 其中 ST150 型、ST726 型、ST848 型、ST143 型、ST820 型各有 2 株, 其余 ST 型各 1 株, 同一聚类簇的 ST 型别, 其毒力基因和耐药基因较一致。【结论】辽宁省不同生肉来源的小肠结肠炎耶尔森菌 ST 型分布较分散, 携带多种耐药基因, 存在一定的耐药风险。

**关键词:** 小肠结肠炎耶尔森菌; 耐药基因; 全基因组测序; 多位点序列分型; 耐药表型

\*Corresponding author. E-mail: zangmeimei@163.com

Received: 2023-10-31; Accepted: 2023-12-22; Published online: 2024-02-21

# Multilocus sequence typing and drug resistance analysis of *Yersinia enterocolitica* in raw meat products in some areas of Liaoning Province

WANG Weijie<sup>1</sup>, LIU Haixia<sup>1</sup>, LI Xue<sup>1</sup>, ZHAN Yang<sup>2</sup>, SUN Tingting<sup>1</sup>, WEI Tongzhu<sup>1</sup>, HOU Anyang<sup>3</sup>, ZHANG Meimei<sup>\*1</sup>

1 Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shenyang 110172, Liaoning, China

2 Dalian Xigang District Center for Disease Control and Prevention, Dalian 116019, Liaoning, China

3 School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110122, Liaoning, China

**Abstract:** [Background] *Yersinia enterocolitica* is a zoonotic bacterium with wide distribution in China and can cause a variety of intestinal symptoms and systemic diseases, posing a threat to human and animal health. [Objective] To understand the drug resistance phenotypes and genes, virulence genes, and multilocus sequence typing of *Y. enterocolitica* isolated from different raw meat sources in Liaoning Province. [Methods] A total of 26 strains of *Y. enterocolitica* were isolated from raw chicken, raw pork, and raw beef samples in Liaoning Province from 2018 to 2021. The drug sensitivity test and serotyping were carried out, and whole genome sequencing was conducted to reveal the genetic information of the strains. [Results] The 26 strains of *Y. enterocolitica* had the highest resistance to cefazolin. All the 26 strains were intermediately resistant to polymyxin E and sensitive to chloramphenicol and gentamicin. The virulence genes of the 26 strains were mainly  $ail^- virF^- yadA^- ystA^- ystB^+$ , and there was a strain with the genotype of  $ail^+ virF^- yadA^- ystA^+ ystB^-$ , which was from a pork sample. Most of the strains presented the serotype of O:5, accounting for 84.6%, and the strains with the serotype of O:8 and unserotyped accounted for 7.7%. All the 26 strains carried the same resistance genes of *CRP*, *rosA*, and *rosB*. Fourteen strains carried *vat(F)* and *blaA*, and 2 strains carried *qnrD*. A total of 21 sequence types (ST) were obtained by multilocus sequence typing, of which ST150, ST726, ST848, ST143, and ST820 each had two strains, and the remaining STs each had one strain. The STs of the same cluster had the same virulence genes and drug resistance genes. [Conclusion] The STs of *Y. enterocolitica* from different raw meat samples in Liaoning Province present scattered distribution and carry multiple drug resistance genes, posing a risk of drug resistance.

**Keywords:** *Yersinia enterocolitica*; drug resistance gene; whole genome sequencing; multilocus sequence typing; drug resistance phenotype

小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)已成为最重要的食源性致病菌之一,可引起多种肠道症状,如腹泻、肠炎、肠膜淋巴结炎及末端回肠炎等,并且能穿过肠道上皮细胞,在淋巴小结中繁殖,引发如结节性红斑、反应性

关节炎和心内膜炎等症状,严重可发展为败血症,造成死亡<sup>[1]</sup>,由其引起的食源性疾病在欧洲地区已成为继沙门氏菌病和弯曲病之后第三常见肠道疾病<sup>[2]</sup>。小肠结肠炎耶尔森菌广泛分布于自然界,是能在冷藏温度下生长的少数肠

道致病菌之一。该菌常常污染食品和水源, 经粪-口途径传播, 传播的范围较广、感染的频率较高; 该菌的宿主较广泛, 除人类之外, 还可对禽畜类及昆虫等造成感染, 对人类和动物的健康造成威胁<sup>[3-4]</sup>。许多国家已将该菌列为进出口食品的常规检测病原菌。在中国, 人群感染小肠结肠炎耶尔森菌主要呈散发流行, 但在某些地区也出现过大规模暴发流行。

近年来全基因组测序技术(whole genome sequencing, WGS)开始广泛应用, 测序数据结果在经处理和分析后可用来快速识别细菌群落的基因型特征。因此, 本研究基于全基因组测序技术(WGS)测定的辽宁省小肠结肠炎耶尔森菌的全基因组序列, 利用多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)、毒力基因、耐药基因对菌株进行分析比对, 再通过药物敏感试验获得其耐药表型, 对其药物敏感性展开研究, 并对各结果的关联性进行探讨, 进而了解辽宁地区小肠结肠炎耶尔森菌的流行特点以及致病特征, 并对其耐药监测与防治策略提供更具特征性的科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品

26 株小肠结肠炎耶尔森菌来自辽宁省 2018–2021 年市售生鸡肉、生猪肉和生牛肉三类食品样品, 以鸡肉源占比最高, 为 57.7% (15/26), 牛肉源为 26.9% (7/26), 猪肉源最少, 为 15.4% (4/26)。26 株菌中大部分分离自沈阳市的样品, 占比为 73.1% (19/26), 其余菌株分别来自本溪市 11.5% (3/26)、辽阳市 7.7% (2/26) 和铁岭市 7.7% (2/26)。药敏质控菌株为大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922, 标准菌株为小肠结肠炎耶尔森菌 CMCC 52203, 均为本实验室保藏。

### 1.2 培养基

脑心浸出液(brain heart infusion, BHI)肉汤, 北京陆桥技术有限公司。

### 1.3 主要试剂和仪器

革兰氏阴性需氧菌药敏检测板, 上海星佰生物技术有限公司; 细菌 DNA 提取试剂盒, 江苏硕世生物科技股份有限公司; 血清分型试剂, 日本生物科学研究所有限公司。全自动核酸提取仪, 江苏硕世生物科技股份有限公司; 恒温培养箱, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.4 药敏试验

使用革兰氏阴性需氧菌药敏检测板对 26 株小肠结肠炎耶尔森菌进行药敏试验, 共 14 种抗生素, 包括氨苄西林(ampicillin, AMP)、氨苄西林-舒巴坦(ampicillin-sulbactam, AMS)、头孢唑啉(cefazolin, CFZ)、头孢噻肟(cefotaxime, CTX)、头孢西丁(cefepime, CFX)、头孢他啶(ceftazidime, CAZ)、亚胺培南(imipenem, IPM)、庆大霉素(gentamicin, GEN)、多黏菌素 E (polymyxin E, CT)、四环素(tetracycline, TET)、萘啶酸(nalidixic acid, NAL)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、氯霉素(chloramphenicol, CHL)、磺胺甲噁唑-甲氧苄啶(sulfamethoxazole trimethoprim, SXT)。大肠埃希氏菌 ATCC 25922 耐药结果在质控范围内。

### 1.5 DNA 的提取和全基因组测序

将保存的菌株接种至 BHI 肉汤 26 °C 恒温培养 24 h 后利用全自动核酸提取仪提取细菌基因组 DNA, 送北京诺禾致源科技股份有限公司使用 Illumina HiSeq 平台进行二代测序, 使用 SOAP de novo (v2.04)<sup>[5-6]</sup>、SPAdes<sup>[7]</sup>和 ABySS<sup>[8]</sup> 组装软件进行组装。

### 1.6 全基因组组分分析

使用 GeneMarkS (v4.17)<sup>[9]</sup>软件对测序的基因组进行编码基因预测。通过 tRNAscan-SE 软

件<sup>[10]</sup> (v1.3.1)对 tRNA 进行预测。基于序列组成, 采用 IslandPath-DIOMB 软件<sup>[11]</sup> (v0.2)预测基因岛, 其通过检测序列中二核苷酸偏向性和移动性基因以判定基因岛及潜在的水平基因转移。通过 phiSpy 软件<sup>[12]</sup> (v 2.3)预测样品基因组上的前噬菌体。

### 1.7 多位点序列分型

将测序结果经拼接组装后, 上传至基因组流行病学中心 MLST 分析平台(<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>), 得到菌株的 MLST 型别。确定 7 个等位基因序号构成的基因型(sequence type, ST), 并将 7 个字符型数据导入 BioNumerics 8.0 软件, 利用非加权分组平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA), 依据 26 株菌的 MLST 型别进行聚类分析, 生成相似度矩阵和最小生成树。

### 1.8 毒力基因的鉴定

将测序所获得的基因组在病原菌毒力因子数据库(virulence factor data base, VFDB)<sup>[13]</sup>中进行以下 5 种毒力基因的比对: 黏附侵袭位点基因(*ail*)、小肠结肠炎耶尔森菌耐药性肠毒素 A 基因(*ystA*)、小肠结肠炎耶尔森菌耐药性肠毒素 B 基因(*ystB*)、黏附素(*yadA*)、*yop* 调节子的转录活化因子(*virF*), 查找样本菌株所携带的毒力基因。

### 1.9 耐药基因的鉴定

使用 ABRicate v0.5 (<https://github.com/tseemann/abricate>) 软件, 将基因组序列与 ResFinder v4.0<sup>[14]</sup>数据库中的耐药基因进行比对, 查找菌株所携带的耐药基因, 参数设置中基因覆盖度及一致性阈值均为 80%。

### 1.10 血清分型的鉴定

采用玻片凝集法对 26 株小肠结肠炎耶尔森菌进行血清分型, 在洁净的载玻片上加一滴 O 因子血清, 将待测培养物混入成为均一性混浊悬液, 将玻片轻轻摇动, 在黑色背景下观察

反应。如在 2 min 内出现比较明显的小颗粒状凝集者即为阳性反应, 反之则为阴性, 另外, 用生理盐水作对照实验, 以检查有无自凝现象。

## 2 结果与分析

### 2.1 全基因组组分分析结果

26 株小肠结肠炎耶尔森菌的基因组序列长度均值为 4 895.25 kb, G+C 含量均值为 47.3%, 编码基因平均 4 570 个, 编码区总长度占全基因组的比例平均为 85.9%。对非编码区的 tRNA 进行预测, 结果显示各菌株包含 70–77 个 tRNA, 其平均长度均为 78 bp。基因岛是一些细菌、噬菌体或质粒中通过基因水平转移整合到微生物基因组中的一个基因组区段, 该 26 株菌中所包含基因岛数量的差异较大, 最多的有 20 个, 最少的为 6 个。前噬菌体是整合在宿主基因组上的温和噬菌体的核酸, 能随宿主细菌 DNA 进行同步复制或分裂传代, 26 株菌均包含前噬菌体片段, 每个菌的前噬菌体个数为 1–8 个。

### 2.2 药敏试验结果

经革兰氏阴性需氧菌药敏检测板鉴定, 在 26 株小肠结肠炎耶尔森菌株样本中, 对头孢唑啉(CFZ)的耐药程度最高, 耐药率为 100.0%, 其次是氨苄西林(AMP)和头孢噻肟(CTX), 耐药率分别为 73.1%和 34.6%, 对多黏菌素 E (CT)全部中介耐药, 对氯霉素(CHL)和庆大霉素(GEN)两种抗生素均为敏感(图 1)。

耐受 4 种抗生素的菌株有 4 株, 其中 AMP-CAZ-CTX-CFZ 占比较高, 耐受 3 种抗生素的菌株有 6 株, 耐药谱 AMP-CTX-CFZ 占比最高。分离自鸡肉的菌株, 以耐药谱 AMP-CFZ 为主, 分离自猪肉的菌株, 耐药谱也以 AMP-CFZ 较多, 而分离自牛肉的菌株, 耐药谱较分散(表 1)。

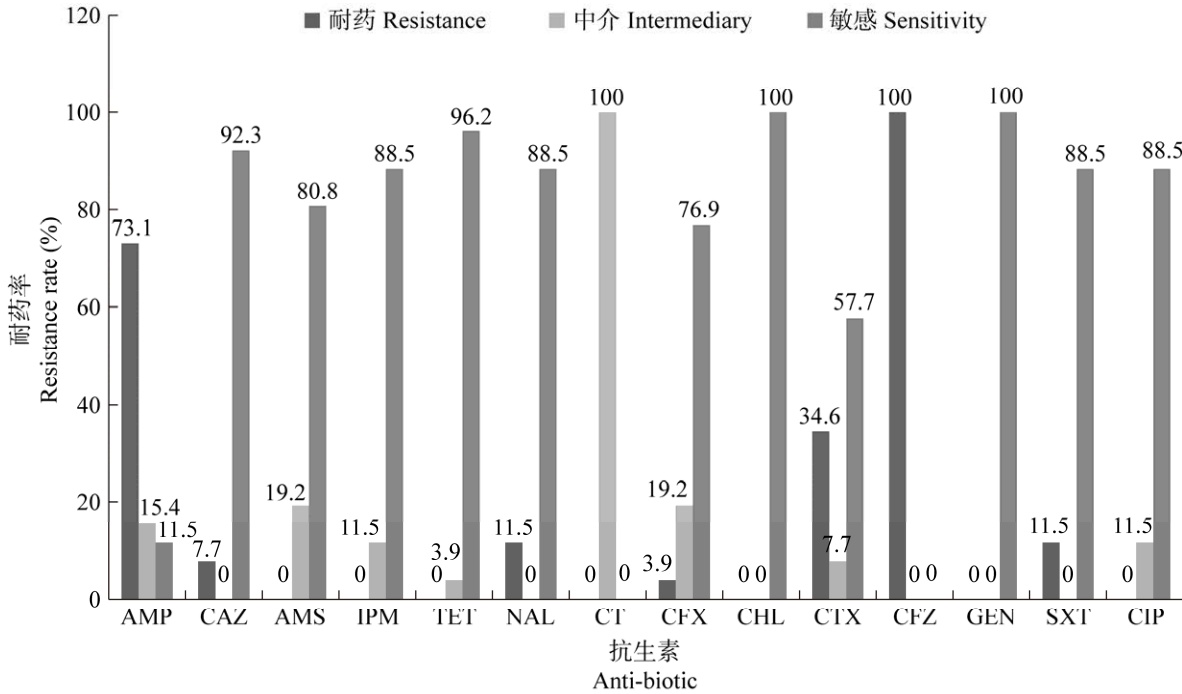


图 1 26 株小肠结肠炎耶尔森菌对 14 种抗生素的耐药情况

Figure 1 Resistance analysis of 26 strains of *Yersinia enterocolitica* to 14 antibiotics.

表 1 26 株小肠结肠炎耶尔森菌的耐药谱

Table 1 Drug resistance spectrum of 26 strains of *Yersinia enterocolitica*

耐药谱 Drug resistance	菌株数 Number of strains	来源 Source			总占比 Total proportion (%) (n=26)
		鸡肉 Chicken meat (n=15)	猪肉 Pork (n=4)	牛肉 Beef (n=7)	
AMP-CAZ-CTX-CFZ	2	1	0	1	7.7
AMP-CTX-CFZ-SXT	1	1	0	0	3.9
AMP-NAL-CTX-CFZ	1	0	0	1	3.9
AMP-CFX-CFZ	1	0	0	1	3.9
AMP-CFZ-SXT	2	0	1	1	7.7
AMP-CTX-CFZ	3	3	0	0	11.5
NAL-CFZ	2	1	0	1	7.7
AMP-CFZ	9	6	2	1	34.6
CTX-CFZ	2	1	1	0	7.7
CFZ	3	2	0	1	11.5

### 2.3 多位点序列分型结果

将所测得的基因序列中的目的管家基因序列在 MLST 数据库中针对 7 种目的管家基因进行比对, 得到相应等位基因编码和 ST 型, 每个等位基因的匹配度均为 100%。在 26 株小肠结肠炎耶尔森菌中经比对后共获得 21 种 ST 型, 其中

ST150 型、ST726 型、ST848 型、ST143 型、ST820 型各有 2 株, 其余 ST 型各 1 株。在 21 种 ST 型中, 有 13 种型别来自鸡肉样品, 7 种型别来自牛肉样品, 4 种型别来自猪肉样品。ST726 型和 ST820 型别为鸡肉和牛肉样品混合存在, 而 ST150 型为鸡肉和猪肉样品混合存在(表 2)。从

最小生成树的进化距离可以看出, ST730 型和 ST747 型间差异最小为 2.00, 其次是 ST747 型和 ST442 型, 距离为 3.00, ST747 型与 ST194 型、ST135 型、ST680 型、ST189 型、ST499 型间的差异均较大为 7.00 (图 2)。

## 2.4 毒力基因的鉴定结果

经数据库比对, 在 26 株小肠结肠炎耶尔森菌中, 有 13 株分离株基因型为  $ail^-virF^-yadA^-ystA^-ystB^+$  型, 占比为 50%, 其中猪肉源与牛肉源的分离株占比均为 23.1% (3/13), 而鸡肉源的分离株占

表 2 26 株小肠结肠炎耶尔森菌的 ST 型别

Table 2 ST types of 26 strains of *Yersinia enterocolitica*

样品	ST 型
Sample	ST type
鸡肉 Chicken	ST143 (2), ST150 (1), ST189 (1), ST336 (1), ST394 (1), ST525 (1), ST719 (1), ST726 (1), ST730 (1), ST745 (1), ST747 (1), ST820 (1), ST848 (2)
牛肉 Beef	ST134 (1), ST194 (1), ST442 (1), ST662 (1), ST680 (1), ST726 (1), ST820 (1)
猪肉 Pork	ST637 (1), ST499 (1), ST150 (1), ST135 (1)

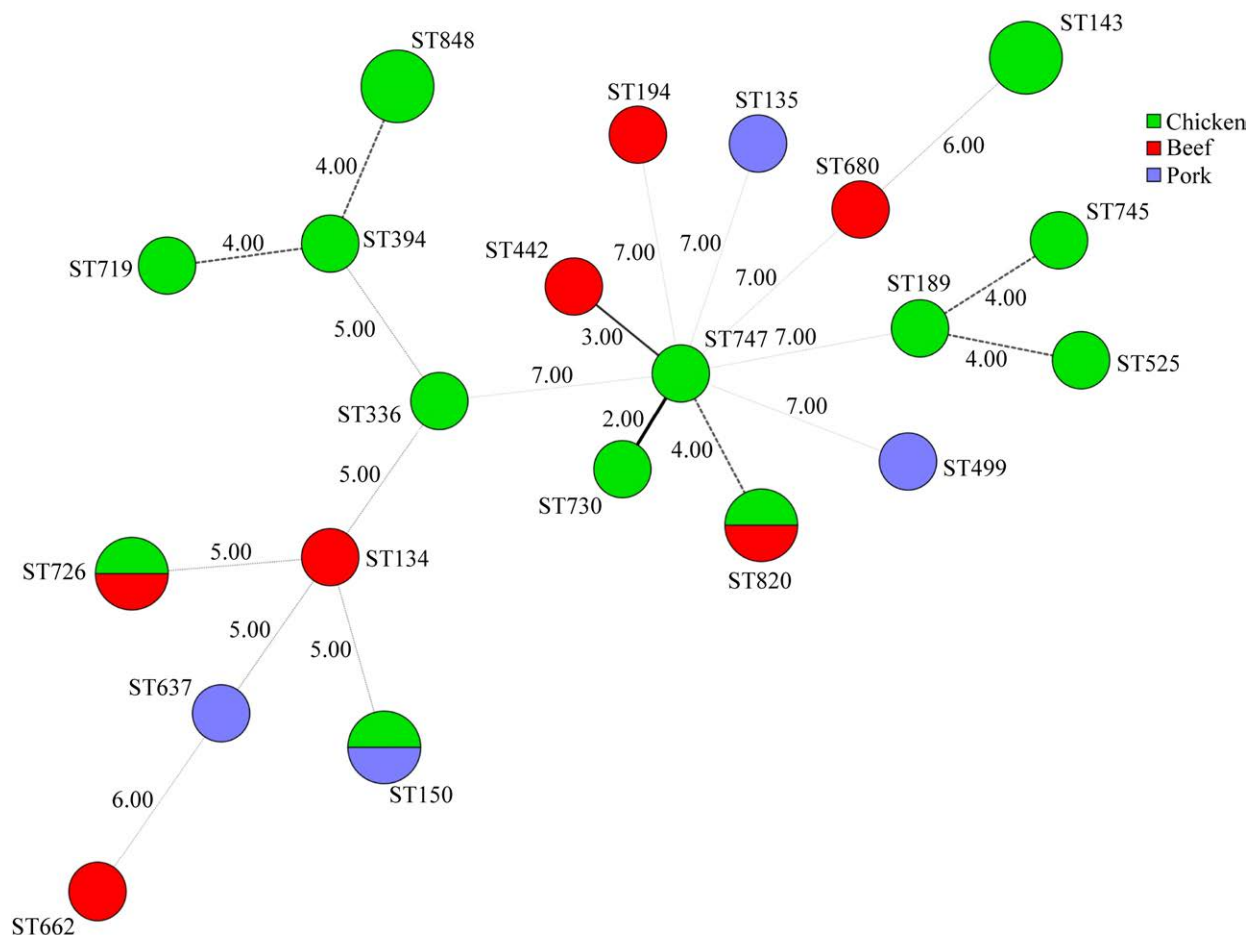


图 2 26 株小肠结肠炎耶尔森菌样品来源与 ST 型别的最小生成树分析

Figure 2 Minimum spanning tree analysis of the source of 26 *Yersinia enterocolitica* samples and ST type.

比为 53.8% (7/13); *ail<sup>+</sup>virF<sup>-</sup>yadA<sup>-</sup>ystA<sup>+</sup>ystB<sup>-</sup>* 基因型有一株, 占比为 3.9%, 其 ST 型为 ST135, 来自猪肉样品。其余基因型未检出。

## 2.5 血清分型的鉴定结果

对 26 株小肠结肠炎耶尔森菌进行了血清学分型。其中有 22 株为 O:5 血清型, 占比为 84.6%, 有 2 株为 O:8 血清型, 占比为 7.7%, 还有 2 株未分型的菌株, 占比 7.7%。

## 2.6 耐药基因的鉴定结果

26 株小肠结肠炎耶尔森菌株均携带 3 种相同的耐药基因, 分别是大环内酯类抗生素、培南、氟喹诺酮类抗生素的多重耐药外排泵基因 *CRP*, 肽类抗生素耐药基因 *rosA* 和 *rosB*。26 株菌株中有 14 株携带链霉素耐药基因 *vat(F)* 和头孢类抗生素耐药基因 *blaA*, 8 号和 20 号菌株除携带以上耐药基因以外, 还携带氟喹诺酮类抗生素耐药基因 *qnrD*, 其食品来源分别为牛肉和猪肉, 其中 8 号菌株对两类抗生素耐药, 耐药谱为 AMP-CFZ-SXT, 且对 CFX、CTX、CIP 中介耐药。

## 2.7 26 株小肠结肠炎耶尔森菌 MLST 型别、毒力特征、耐药特征比较分析

26 株小肠结肠炎耶尔森菌中有 6 株为双重耐药菌株。其中 5、16、22 号耐受  $\beta$ -内酰胺类和喹诺酮类抗生素, 其 ST 型分别为 ST134、ST747 和 ST719; 8、23、26 号菌株耐受  $\beta$ -内酰胺类和磺胺类抗生素, 其 ST 型分别为 ST662、ST726、ST135。以上 6 株双重耐药菌株中有 5 株同时携带 *CRP*、*rosA*、*rosB*、*vat(F)* 和 *blaA* 五种耐药基因。

26 株小肠结肠炎耶尔森菌中有 14 株携带毒力基因, 且出现明显的聚类现象, 共包含 11 种 ST 型, 分别为 ST150、ST134、ST726、ST848、ST394、ST719、ST637、ST336、ST662、ST499、

ST135, 以上菌株均携带链霉素耐药基因 *vat(F)* 和头孢类抗生素耐药基因 *blaA*, 血清型均为 O:5 型(图 3)。

## 3 讨论与结论

在我国耶尔森菌病虽以散发为主, 但小肠结肠炎耶尔森菌在食品动物养殖场和屠宰场却有较高污染率<sup>[15]</sup>, 关注禽畜类食品中小肠结肠炎耶尔森菌的分布情况、遗传特征和抗生素敏感情况, 对食源性耶尔森菌病的防治策略可以提供指导性意见。

有研究表明, 小肠结肠炎耶尔森菌可产生  $\beta$ -内酰胺酶, 因此对 AMP、AMC 和一代头孢类抗生素天然耐药<sup>[16]</sup>, 本研究结果中 26 株小肠结肠炎耶尔森菌均对 CFZ 耐药, 对 AMP 耐药率为 73.1%, 与傅祎欣<sup>[17]</sup>等的福建省生肉中小肠结肠炎耶尔森菌的耐药结果相近, 对 NAL 耐药率较低, 为 11.5%, 低于广州地区的研究结果(29.3%)<sup>[18]</sup>和上海市浦东新区的研究结果(27.0%)<sup>[19]</sup>。在三代头孢中, 小肠结肠炎耶尔森菌对 CTX 的耐药率为 34.6%, 且 42.3% 的菌株对 CTX 不敏感, 此外, 对肽类抗生素 CT 全部中介耐药, 因此应关注该菌对三代头孢、肽类抗生素的耐药性监测。本研究中分离自鸡肉的菌株, 以耐药谱 AMP-CFZ 为主, 对 AMP、CFZ 的耐药率分别为 73.3% 和 100%, 两者均低于中国四省份禽肉中耶尔森菌的耐药率<sup>[20]</sup>。分离自猪肉的菌株对 CFZ 的耐药率与鸡肉相同, 为 100% 耐药, 对 AMP 的耐药率略高于鸡肉, 为 75%, 略低于我国猪肉生产链中小肠结肠炎耶尔森菌的耐药率 77.5%<sup>[21]</sup>。而分离自牛肉的菌株, 耐药谱较分散, 但同样以耐 AMP 和 CFZ 为主。本研究中菌株对氨基糖苷类抗生素 GEN 和苯丙醇类抗生素 CHL 均 100% 敏感, 提示 GEN 和 CHL 能有效抑制小肠结肠炎耶尔森菌。



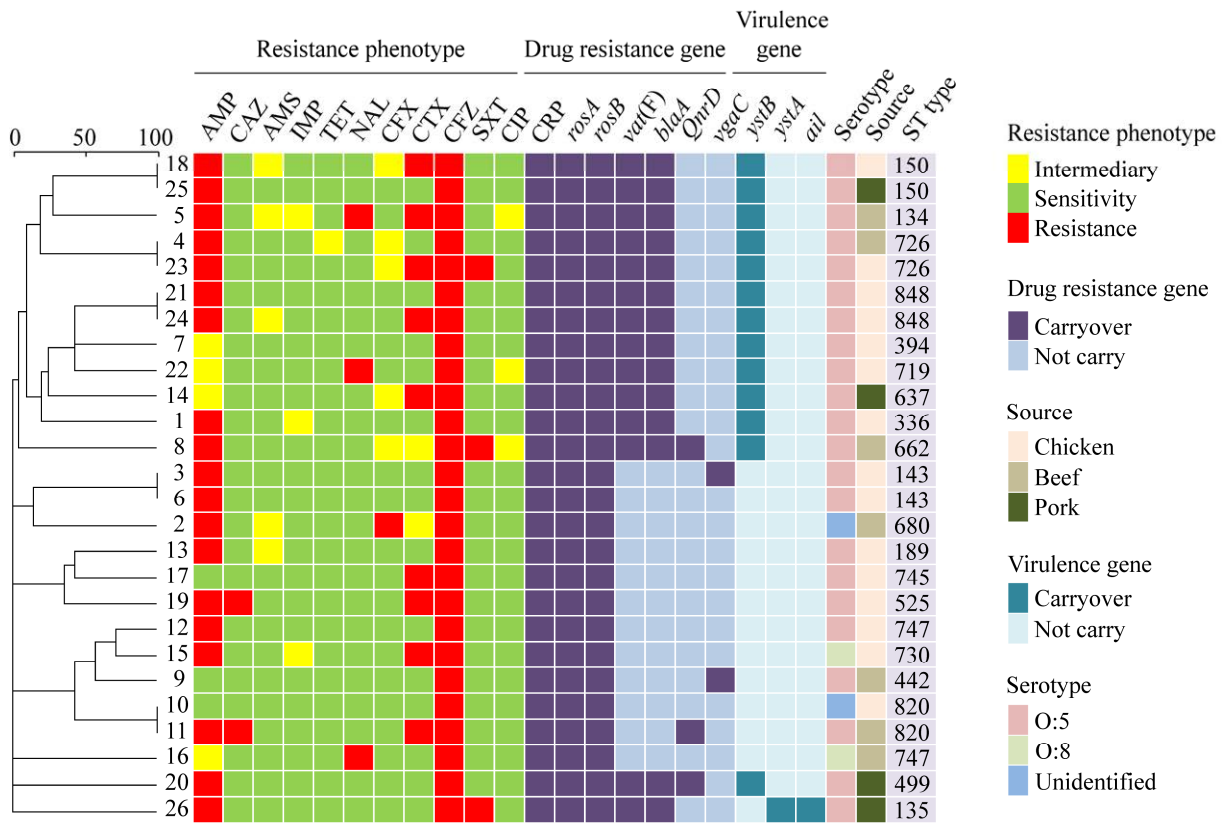


图 3 26 株小肠结肠炎耶尔森菌耐药表型、耐药基因及毒力基因遗传特征

Figure 3 Genetic characteristics of drug resistance phenotype, drug resistance gene and virulence gene of 26 strains of *Yersinia enterocolitica*.

本研究显示，当前辽宁省内地区食源性小肠结肠炎耶尔森菌的整体耐药水平较低，耐药性未出现大幅广泛增长，但依然需持续关注三代头孢、肽类抗生素的耐药性，并继续保持畜牧业、养殖业抗生素的管控措施。

本研究中，26 株小肠结肠炎耶尔森菌经毒力基因库比对主要基因型为 *ystB*<sup>+</sup> 型，占 50%，其血清型以 O:5 为主，结果与国内研究相近<sup>[22]</sup>，*ail*<sup>+</sup>*ystA*<sup>+</sup> 基因型有一株，其余菌株不含有毒力基因。据相关研究，小肠结肠炎耶尔森菌的致病性与其毒力基因有密切关系<sup>[23]</sup>，其中 *ail* 基因介导小肠结肠炎耶尔森菌的侵袭性，*ystA* 基因编码小肠结肠炎耶尔森菌的耐热性肠毒素，是该菌引起肠道症状的主要因素，*ystB* 编码类似 *ystA*

的耐热性肠毒素，目前证实 *ystB* 仅存在于非致病性的 1A 生物型中。通过本研究可以得知，在辽宁省内地区收集到的食源性小肠结肠炎耶尔森菌以携带 *ystB* 基因和无毒力基因的菌株为主，提示辽宁地区食源性小肠结肠炎耶尔森菌绝大多数为非致病性的。此外有一株来自猪肉样品的小肠结肠炎耶尔森菌为 *ail*<sup>+</sup>*ystA*<sup>+</sup> 基因型，其 ST 型为 ST135，据研究携带 *ail*<sup>+</sup>*ystA*<sup>+</sup> 基因的小肠结肠炎耶尔森菌具有致病性<sup>[24]</sup>，因此该菌株可能存在一定的致病能力。虽然辽宁省内地区流行的食源性小肠结肠炎耶尔森菌基本为非致病性的菌株，但也有少数的致病性菌株存在，因此仍不能疏忽对其进行监测与防范。

26 株小肠结肠炎耶尔森菌株均携带 3 种相



同的耐药基因, 分别是大环内酯类抗生素、培南、氟喹诺酮类抗生素的多重耐药外排泵基因 *CRP*, 肽类抗生素耐药基因 *rosA* 和 *rosB* 基因。其中肽类抗生素耐药基因 *rosA* 和 *rosB* 基因的耐药表型关联较好, 26 株菌对多黏菌素 E 表现为 100% 中介耐药, 说明携带 *rosA* 和 *rosB* 基因的菌株可能对肽类抗生素的耐药性有一定的影响。据文献[25]报道, 携带  $\beta$ -内酰胺酶 *blaA* 基因是耶尔森菌对 AMP、AMC 和一代头孢类抗生素天然耐药的主要原因, 本研究中对 AMP 的耐药率为 73.1%, 而 26 株菌只有 14 株携带头孢类抗生素耐药基因 *blaA* 基因, 携带率为 53.9%, 耐药基因和耐药表型的关联性不高, 推测可能多个耐药基因相互作用或存在其他影响因素造成了本研究中菌株对 AMP 的耐药。8 号和 20 号菌株除携带 *CRP*、*rosA*、*rosB*、*vat(F)*、*blaA* 耐药基因以外, 还携带氟喹诺酮类抗生素耐药基因 *qnrD* 基因, 其中 8 号菌株对 CIP 中介耐药, 其耐药表型与耐药基因有一定的关联性。本研究中其他的耐药基因与耐药表型的关联性较低, 如亚胺培南无耐药菌株, 只有 11.5% 的中介耐药, 这说明小肠结肠炎耶尔森菌的耐药基因比较复杂, 耐药基因的表达方式、表达量、多个耐药基因之间的相互作用、细菌生物膜的形成等原因都可能影响菌株的耐药特征<sup>[26]</sup>。

MLST 通过测定细菌生存和繁殖所必需的管家基因来阐述属水平的进化关系<sup>[27]</sup>, 本研究采用全基因组测序技术, 将所测得的基因序列中的目的管家基因序列在 MLST 数据库中针对 7 种目的管家基因进行比对。而 ST726 和 ST820 型别为鸡肉和牛肉样品混合存在, ST150 型别为鸡肉和猪肉样品混合存在, 少部分的 ST 型别同时存在于不同种类的生肉中, 因此应继续对生肉食品的过程进行监测, 以探究各类生肉在加工、运输、售卖等过程中是否存在小肠结肠炎

耶尔森菌的交叉污染。

本研究依据 MLST 聚类的相似度矩阵中, 第一聚类簇的菌株携带的毒力基因完全一致, 均只携带 *ystB* 基因, 而该聚类簇中耐药基因除 8 号菌株外, 其余菌株均只携带 *CRP*、*rosA*、*rosB*、*vat(F)*、*blaA* 基因。本研究中, 有 14 株菌株携带毒力基因, 该 14 株菌均携带链霉素耐药基因 *vat(F)* 和头孢类抗生素耐药基因 *blaA* 基因, 血清型均为 O:5 型, 整体的聚类现象较明显。因此提示亲缘关系较近的 ST 型别其毒力基因和耐药基因较一致。

本研究通过对近年采集的辽宁省沈阳市等地不同生肉来源的小肠结肠炎耶尔森菌样本进行了全基因组测序以及遗传特征分析, 并在遗传层面上分析了其耐药性及致病性的相关因素。结果显示这些地区生肉样品中, 小肠结肠炎耶尔森菌的毒力基因存在情况较单一, 以 *ystB*<sup>+</sup> 型为主; 同一聚类簇的 ST 型别, 其毒力基因和耐药基因存在一定的关联性, 但 ST 型分布较分散, 需要进一步研究; 其整体的耐药水平较低, 但出现了三代头孢耐药和肽类抗生素的中介耐药, 应对其耐药特征继续进行监测。

## REFERENCES

- [1] GUPTA V, GULATI P, BHAGAT N, DHAR MS, VIRDI JS. Detection of *Yersinia enterocolitica* in food: an overview[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2015, 34(4): 641-650.
- [2] LIANG JR, DUAN R, XIA SL, HAO Q, YANG JC, XIAO YC, QIU HY, SHI GX, WANG SK, GU WP, WANG CX, WANG ML, TIAN KC, LUO LZ, YANG M, TIAN HY, WANG JZ, JING HQ, WANG X. Ecology and geographic distribution of *Yersinia enterocolitica* among livestock and wildlife in China[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 178(1/2): 125-131.
- [3] STACHELSKA MA. Determining the prevalence of inv-positive and ail-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils using PCR and culture methods[J]. Acta

- Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2017, 16(3): 303-310.
- [4] 付宏杰. 乳糖酸抑菌性及其对小肠结肠炎耶尔森氏菌抑菌机理的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2018.
- FU HJ. Antibacterial activity of lactobionic acid and its antibacterial mechanism against *Yersinia enterocolitica*[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [5] LI RQ, ZHU HM, RUAN J, QIAN WB, FANG XD, SHI ZB, LI YR, LI ST, SHAN G, KRISTIANSEN K, LI SG, YANG HM, WANG J, WANG J. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing[J]. *Genome Research*, 2010, 20(2): 265-272.
- [6] LI RQ, LI YR, KRISTIANSEN K, WANG J. SOAP: short oligonucleotide alignment program[J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(5): 713-714.
- [7] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, GUREVICH AA, DVORKIN M, KULIKOV AS, LESIN VM, NIKOLENKO SI, PHAM S, PRJIBELSKI AD, PYSHKIN AV, SIROTKIN AV, VYAHHI N, TESLER G, ALEKSEYEV MA, PEVZNER PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. *Journal of Computational Biology: a Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 2012, 19(5): 455-477.
- [8] SIMPSON JT, WONG K, JACKMAN SD, SCHEIN JE, JONES SJM, BIROL I. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data[J]. *Genome Research*, 2009, 19(6): 1117-1123.
- [9] BESEMER J, LOMSADZE A, BORODOVSKY M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(12): 2607-2618.
- [10] LOWE TM, EDDY SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(5): 955-964.
- [11] HSIAO W, WAN I, JONES SJ, BRINKMAN FSL. IslandPath: aiding detection of genomic islands in prokaryotes[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(3): 418-420.
- [12] YOU Z, YONGJIE L, KARLENE HL, JONATHAN JD, DAVID SW. "PHAST: a fast phage search tool"[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39: W347-W352.
- [13] CHEN LH, YANG J, YU J, YAO ZJ, SUN LL, SHEN Y, JIN Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(Database issue): D325-D328.
- [14] ZANKARI E, HASMAN H, COSENTINO S, VESTERGAARD M, RASMUSSEN S, LUND O, AARESTRUP FM, LARSEN MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(11): 2640-2644.
- [15] LIANG JR, WANG X, XIAO YC, CUI ZG, XIA SL, HAO Q, YANG JC, LUO LZ, WANG SK, LI KW, YANG HS, GU WP, XU JG, KAN B, JING HQ. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered in Chinese abattoirs[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(8): 2949-2956.
- [16] FREDRIKSSON-AHOMAA M, CERNELA N, HÄCHLER H, STEPHAN R. *Yersinia enterocolitica* strains associated with human infections in Switzerland 2001-2010[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2012, 31(7): 1543-1550.
- [17] 傅祎欣, 洪锦春, 叶海梅, 潘洁茹, 陈伟伟. 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.
- FU YX, HONG JC, YE HM, PAN JR, CHEN WW. Prevalence and antibiotic resistance profile of *Yersinia enterocolitica* in raw meat in Fujian Province from 2019 to 2020[J]. *Chinese Preventive Medicine*, 2021, 22(3): 193-196 (in Chinese).
- [18] YE QH, WU QP, HU HJ, ZHANG JM, HUANG HX. Prevalence and characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from retail foods in China[J]. *Food Control*, 2016, 61: 20-27.
- [19] 王闻卿, 崔琪奇, 王筱, 张勇琪, 李彩云, 苏靖华, 赵冰, 黄红, 朱林英, 许学斌, 郝莉鹏. 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.
- WANG WQ, CUI QQ, WANG X, ZHANG YQ, LI CY, SU JH, ZHAO B, HUANG H, ZHU LY, XU XB, HAO LP. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of foodborne *Yersinia enterocolitica* in Pudong New District, Shanghai[J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2019, 40(3): 354-359 (in Chinese).
- [20] 彭子欣, 邹明远, 徐进, 关文英, 李莹, 刘丹茹, 张淑红, 郝琼, 闫韶飞, 王伟, 余东敏, 李凤琴. 中国四省份禽肉中耶尔森菌的耐药性及其耐药基因研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52(4): 358-363.
- PENG ZX, ZOU MY, XU J, GUAN WY, LI Y, LIU DR,

- ZHANG SH, HAO Q, YAN SF, WANG W, YU DM, LI FQ. Antimicrobial susceptibility and drug-resistance genes of *Yersinia* spp. of retailed poultry in 4 provinces of China[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2018, 52(4): 358-363 (in Chinese).
- [21] 吴艺影, 曲道峰, 韩剑众. 猪肉生产链细菌耐药性及其耐药基因调查研究[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(6): 78-83.
- WU YY, QU DF, HAN JZ. Investigation on antibiotic resistance and resistance genes in bacteria isolated from pork chain[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2015, 51(6): 78-83 (in Chinese).
- [22] 袁媛, 孙永, 常宏伟, 陈晓龙, 撒楠, 高大维, 苏斌. 安徽省 2018-2019 年小肠结肠炎耶尔森菌分型分布及分子特征分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2021, 32(3): 298-301.
- YUAN Y, SUN Y, CHANG HW, CHEN XL, SA N, GAO DW, SU B. Type distribution and molecular characteristics of *Yersinia enterocolitica* in Anhui Province, China, 2018-2019[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2021, 32(3): 298-301 (in Chinese).
- [23] 国家食品安全风险评估中心. 2019 年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册[S]. 北京: 国家食品安全风险评估中心, 2018: 259-272.
- National food safety risk assessment center. 2019 National Food Pollution and Harmful Factors Risk Monitoring Manual[S]. Beijing: National Food Safety Risk Assessment Center, 2018: 259-272 (in Chinese).
- [24] 周璐, 董晨, 郭惠, 吴银华, 张永杰, 艾静, 顾玲, 鲍倡俊, 周明浩, 朱凤才, 谈忠鸣. 江苏省 2015 年小肠结肠炎耶尔森菌毒力基因及染色体 16S rRNA 基因多态性分析[J]. 中华传染病杂志, 2018, 36(1): 34-37.
- ZHOU L, DONG C, GUO H, WU YH, ZHANG YJ, AI J, GU L, BAO CJ, ZHOU MH, ZHU FC, TAN ZM. Analysis of virulence genes and the chromosomal 16S rRNA gene polymorphism of *Yersinia enterocolitica* in Jiangsu Province, 2015[J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 2018, 36(1): 34-37 (in Chinese).
- [25] VERBIKOVA V, BORILOVA G, BABAK V, MORAVKOVA M. Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* species found in fruits and vegetables from the European Union[J]. Food Control, 2018, 85: 161-167.
- [26] DARBY EM, TRAMPARI E, SIASAT P, GAYA MS, ALAV I, WEBBER MA, BLAIR JMA. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited[J]. Nature Reviews Microbiology, 2023, 21: 280-295.
- [27] CHEN Y. DNA sequence-based subtyping of epidemic clones and outbreak clones of *Listeria monocytogenes*[D]. Pennsylvania State: Doctoral Dissertation of the Pennsylvania State University, 2007.