

1株与大肠埃希菌O157生化结果相似的志贺氏菌的鉴定

阚式绂¹, 黄裕^{1*}, 王明明²

(1. 深圳市农产品质量安全检验检测中心, 深圳 518005; 2. 深圳华大基因研究院, 深圳 518083)

摘要: **目的** 对一菌株 sznjO23 进行分析鉴定。**方法** 从猪肝中分离到菌株 sznjO23, 并对该菌株的菌落形态、生化特征及分子生物学特性进行分析。**结果** 该菌株在 CT-SMAC 平板上呈圆形、光滑、较小的无色菌落, 在改良 CHROMagar O157 显色平板上为紫色圆形的菌落。经全自动微生物鉴定分析系统 VITEK 2 Compact 鉴定, 其生化结果 96% 可能性为大肠埃希菌 O157, 但血清学试验结果反应完全混浊, 未出现任何凝集。16S rDNA 序列分析发现, 该菌株与志贺氏菌(ATCC29903)的进化距离较近、同源性高, 相似度为 99.26%。**结论** 菌株 sznjO23 为志贺氏菌。当生化试验、血清学试验结果不一致时可选择 16S rDNA 序列分析的方法进行鉴定, 以保证结果的准确性。

关键词: 志贺氏菌; 生化试验; 血清学试验; 16S rDNA 序列

Identification of a strain of *Shigella* with biochemical features similar to *Escherichia coli* O157

KAN Shi-Fu¹, HUANG Yu^{1*}, WANG Ming-Ming²

(1. Shenzhen Inspection and Testing Centre for Quality and Safety of Farm Products, Shenzhen 518005, China; 2. BGI-Shenzhen, Shenzhen 518083, China)

ABSTRACT: Objective To analyze and identify a bacterium of sznjO23. **Methods** A strain of sznjO23 was isolated from pig's liver, and the colonial morphology, biochemical features, and molecular biological characteristics of the strain were analyzed. **Results** Its colonies features on CT-SMAC were rounded, smooth, small, and colorless, while the strain became purple and circular on CHROMagar O157. Biochemical results showed that the strain had 96% possibility to be *E. coli* O157 by VITEK 2 Compact. Serology reaction was cloudy, and it didn't appear any agglutination. The sequence analysis result of 16S rDNA showed that the strain was closed to *Shigella* (ATCC29903) from evolutionary distance with the similarity of 99.26%. **Conclusion** The strain of sznjO23 was *Shigella*. When the results of biochemical tests and serological test were inconsistent, 16S rDNA sequence analysis can be used in order to ensure the accuracy of the results.

KEY WORDS: *Shigella*; biochemical tests; serological test; 16S rDNA sequence

1 引言

肠杆菌科细菌属种较多, 由大量相互类似的革兰氏

阴性杆菌组成^[1], 如埃希氏菌属、志贺氏菌属、沙门氏菌属等, 它们的生物学特性彼此相似、抗原部分相同或相似, 属间抗原的关联常与该抗原的相似或相同的糖类组成有关

*通讯作者: 黄裕, 高级兽医师, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: 910241198@qq.com

*Corresponding author: HUANG Yu, Senior Veterinarian, Shenzhen Inspection and Testing Centre for Quality and Safety of Farm Products, Shenzhen 518005, China. E-mail: 910241198@qq.com

[2]。这些细菌常寄居在人和动物的消化道, 并随粪便排出体外, 广泛分布于自然环境中, 大多数肠道杆菌属于正常菌群, 但也有部分肠道杆菌是致病菌^[1]。肠出血性大肠杆菌(EHEC)是能引起人的出血性腹泻和肠炎的一群大肠埃希氏菌, EHEC 有 50 多个血清型, 最具代表性的是 O157:H7^[3]。

O157:H7 于 1982 年报告并被确认为致病菌, 该菌可引起人类出血性肠炎、溶血性尿毒综合征以及血小板减少性紫癜^[4]。该菌曾在国内外爆发和流行, 发生大肠杆菌 O157:H7 感染的国家主要有美国、加拿大、英国、意大利、日本、爱尔兰、比利时、德国、原捷克斯洛伐克、澳大利亚、阿根廷、南非、以色列等, 1996 年, 日本发生了世界上规模最大、涉及上万人的大肠杆菌 O157 感染爆发流行^[5]。1999 年我国苏皖出现 O157:H7 感染大爆发^[6]。因该菌可造成严重的危害, 所以受到全世界的关注。据报道家畜家禽等动物携带病原体与发病数有一定相关性, 家畜家禽带菌率越高则患病的病人越多^[7]。此外, 有多项研究表明, O157:H7 广泛存在于生肉、熟肉制品、生牛奶、水产品、酸奶等^[8,9]。因此控制该菌的源头对控制 O157:H7 引起的食源性疾病有重要意义。

朱惠芳等^[10]在检测过程中也发现生化、血清等试验不一致的情况, 他们发现肠侵袭型大肠埃希氏菌与志贺氏菌有相似的菌落形态、生化特征、抗原成分, 这就给目标菌的分离鉴定带来了困难。本研究从深圳某屠宰场的猪肝中分离出一菌株 sznjO23, 通过对其菌落的形态、生化特性及其 16S rDNA 序列进行分析研究, 最终确定该菌株为志贺氏菌, 并与已报道的志贺氏菌 ATCC29903 的 16S rDNA 一致。本研究在检验大肠埃希氏菌 O157:H7 过程中, 在应用传统的检测方法的基础上, 进一步对该菌株进行 16S rDNA 分析, 多种方法共同使用, 对疑难菌株的鉴定具有重要意义。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验仪器: IPP110 生化培养箱(德国 Memmert 公司); HEV-50 自动高压灭菌器(日本 HIRAYAMA 公司); 全自动微生物鉴定分析系统 VITEK 2 Compact(法国梅里埃公司)。

主要试剂: 改良 EC 肉汤、改良山梨醇麦康凯(CT-SMAC)琼脂、改良 CHROMagar O157 显色琼脂平板、三糖铁(TSI)琼脂、营养琼脂平板均购自北京陆桥公司; VITEK 2 GN 革兰氏阴性菌鉴定卡购自法国梅里埃公司; 大肠埃希菌 O157 诊断血清购自泰国 S&A 公司。

实验样品: 2015 年购于深圳某屠宰场的猪肝。

菌株: O157 标准菌株 NCTC12900 和志贺氏菌标准菌株 CMCC51572 购自广东环凯微生物科技有限公司。

2.2 实验方法

2.2.1 取样与增菌

根据 GB/T 4789.36-2008 食品卫生微生物学检验大肠

埃希氏菌 O157: H7/NM 检验中所述方法: 无菌操作取检验样猪肝 25 g, 加入到含有 225 mL mEC+n 肉汤的均质袋中, 在拍击式均质器上连续均质 1 min, 37 °C 培养 18~24 h。同时将 O157 标准菌株 NCTC12900 和志贺氏菌标准菌株 CMCC51572 进行复壮。

2.2.2 分离培养

将增菌后的菌液及 O157 标准菌株 NCTC12900 划线接种于 CT-SMAC 平板和改良 CHROMagar O157 显色平板上, 37 °C 培养 18~24 h。

2.2.3 生化试验及血清学试验

挑取可疑菌落, 接种 TSI 琼脂。TSI 结果符合的接种营养琼脂, 用大肠埃希菌 O157 诊断血清进行玻片凝集试验。用全自动微生物鉴定分析系统 VITEK 2 Compact GN 革兰氏阴性菌鉴定卡进行生化鉴定。同时进行标准菌株对照试验。

2.2.4 16S rDNA 序列测定

纯化的菌株送深圳华大农业与循环经济科技有限公司进行 16S rDNA 菌种鉴定。

3 结果与分析

3.1 分离培养结果

如图 1A、B 所示, 菌株在 CT-SMAC 平板上呈圆形、光滑、较小的无色菌落。在改良 CHROMagar O157 显色平板上为紫色圆形的菌落, 命名为 sznjO23。如图 1C、D 所示, O157 标准菌株 NCTC12900 在 CT-SMAC 平板上呈圆形、光滑、较小的无色菌落, 在改良 CHROMagar O157 显色平板上为紫色圆形菌落。

3.2 生化及血清学试验结果

将 sznjO23、NCTC12900 和 CMCC51572 进行生化鉴定, 菌株 sznjO23 生化结果 96%可能性为大肠埃希菌 O157。47 个生化反应孔中, *L*-脯氨酸芳胺酶、 α -半乳糖苷酶、磷酸酶、氨基乙酸芳胺酶、O/129 耐受、*L*-苹果酸盐同化和 ELLMAN 共 7 个生化反应孔结果与标准菌株 NCTC12900 不一致; β -半乳糖苷酶、*D*-麦芽糖、*L*-脯氨酸芳胺酶、*L*-乳酸产碱、琥珀酸盐产碱、氨基乙酸芳胺酶、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶和 *L*-乳酸盐同化共 9 个生化反应孔结果与标准菌株 CMCC51572 不一致。NCTC12900 生化结果 97%可能性为大肠埃希菌 O157。CMCC51572 生化结果 99%可能性为志贺氏菌。结果见表 1。

将菌株 sznjO23 进行血清学试验, 结果反应完全混浊, 未出现任何凝集。

3.3 16S rDNA 序列测定结果

登录 NCBI 网站, 经 BLAST 比对分析后, 用 MEGA6 软件进行生物学分析, 将测序得到的菌株 sznjO23 的 16S rDNA 序列与其他典型菌株进行遗传信息学分析, 通过邻

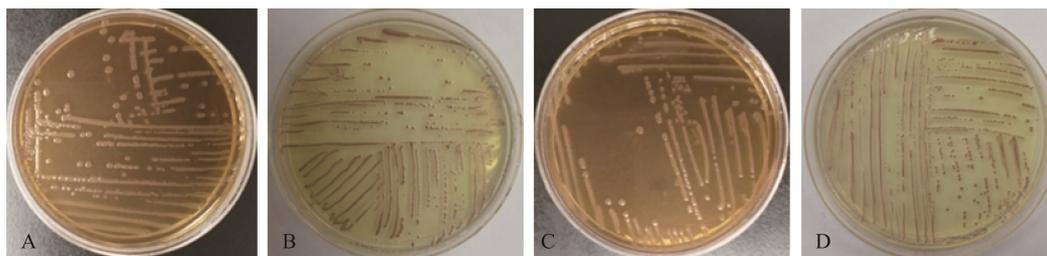


图1 菌株 sznjO23 的菌落形态特征

Fig. 1 Colonial morphology of the bacterium sznjO23

表1 分离菌株 sznjO23 和标准菌株生化结果

Table 1 Biochemical characteristics of sznjO23, NCTC12900 and CMCC51572

续表 1

生化试验	结果		
	sznjO23	NCTC12900	CMCC51572
TSI	黄色	黄色	黄色
丙氨酸 - 苯丙氨酸 - 脯氨酸芳胺酶	-	-	-
侧金盏花醇	-	-	-
吡咯烷基芳胺酶	-	-	-
L-阿拉伯醇	-	-	-
D-纤维二糖	-	-	-
β -半乳糖苷酶	+	+	-
H ₂ S 产生	-	-	-
β -N-乙酰葡萄糖苷酶	-	-	-
谷氨酰芳胺酶 pNA	-	-	-
D-葡萄糖	+	+	+
γ -谷氨酰转移酶	-	-	-
发酵/葡萄糖	+	+	+
β -葡萄糖苷酶	-	-	-
D-麦芽糖	+	+	-
D-甘露醇	+	+	+
D-甘露糖	+	+	+
β -木糖苷酶	-	-	-
β -丙氨酸芳胺酶 pNA	-	-	-
L-脯氨酸芳胺酶	-	+	+
脂酶	-	-	-
古老糖	-	-	-
酪氨酸芳胺酶	+	+	+
尿素酶	-	-	-

生化试验	结果		
	sznjO23	NCTC12900	CMCC51572
TSI	黄色	黄色	黄色
D-山梨醇	-	-	-
蔗糖	-	-	-
D-塔格糖	-	-	-
D-海藻糖	+	+	+
柠檬酸盐(钠)	-	-	-
丙二酸盐	-	-	-
5-酮-葡萄糖苷	-	-	-
L-乳酸产碱	+	+	-
α -葡萄糖	-	-	-
琥珀酸盐产碱	+	+	-
N-乙酰- β -半乳糖苷酶	-	-	-
α -半乳糖苷酶	-	+	-
磷酸酶	-	+	-
氨基乙酸芳胺酶	-	+	+
鸟氨酸脱羧酶	+	+	-
赖氨酸脱羧酶	+	+	-
组氨酸同化	-	-	-
COURMARATE	+	+	+
β -葡萄糖苷酸酶	-	-	-
O/129 耐受	+	-	+
谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶	-	-	-
L-苹果酸盐同化	-	+	-
ELLMAN	-	+	-
L-乳酸盐同化	-	-	+

注: +表示阳性; -表示阴性。

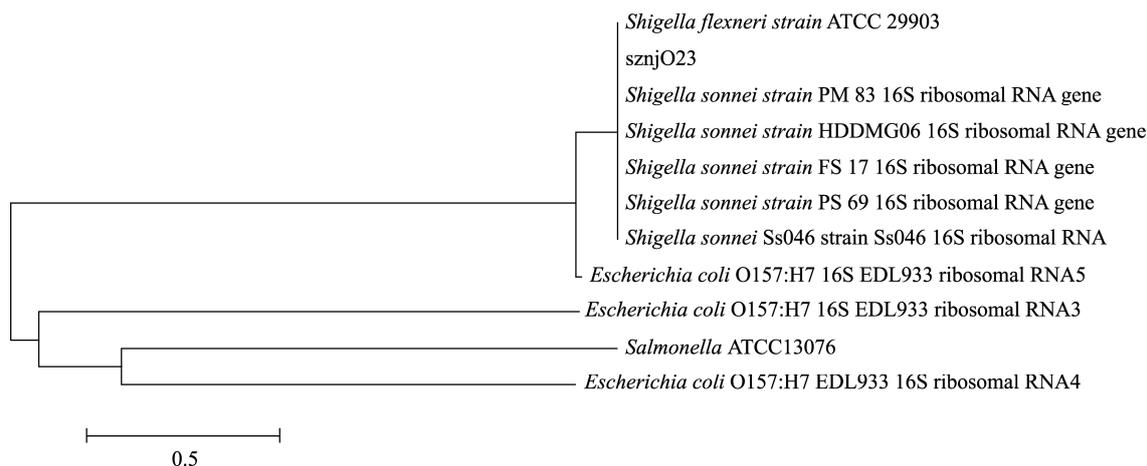


图 2 菌株 sznjO23 的 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the bacterium sznjO23 based on 16S rDNA sequence

位相连法(neighbor-joining)构建系统发育树(图 2), 结果表明菌株 sznjO23 的 16S rDNA 序列与志贺氏菌(ATCC29903)的进化距离较近、同源性高, 相似度为 99.26%。测序结果在 GENBANK 数据库中比对分析, 相似度大于 99% 的细菌判定为同种细菌^[11-12], 所以可确定该菌株为志贺氏菌。

4 讨论与结论

目前食品中大肠埃希氏菌 O157 的检验方法多采用 GB/T 4789.36-2008《食品卫生微生物学检验大肠埃希氏菌 O157: H7/NM 检验》。由于 O157:H7 与其它一些病原菌有共同的特性, 在鉴定过程中可能会出现假阳性和假阴性的结果, 对此我国以及 FDA^[13]在制定检测标准时需要做生化试验和血清学实验, 以保证检测的准确性^[14]。此外, 分子生物学检测方法也发展较为快速, 例如朱飞舟等运用 16S rRNA 基因序列分析法鉴定大肠埃希菌、志贺氏菌、伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌等 14 种细菌^[15]; 方光远等运用分子生物学技术对不同病例动物源大肠杆菌进行了 16S rDNA 同源性分析^[16]。

虽然传统的方法操作简单, 耗资少, 但速度慢。由于传统的检测方法较为费时、费力, 因此该方法难以满足对食源性病原菌的快速检测的要求, 但是此法仍然是对阳性样品进行最终鉴定的综合方法。而分子生物学方法是一种快速、准确的检测方法, 但该方法耗资多、需要精密仪器。在传统方法的基础上, 应用分子生物学方法对疑难菌株进行鉴定, 即降低了检测成本, 又保证了检测结果的准确性。

本研究从猪肝中分离到的菌株 sznjO23 的生化结果 96%可能性为大肠埃希菌 O157, 但血清学试验结果反应完全混浊, 未出现任何凝集。为了准确鉴定菌株 sznjO23, 将其送进行 16S rDNA 测序, 将测序结果在 NCBI 网站的 BLAST 比对分析后, 用 MEGA6 软件进行生物学分析, 16S

rDNA 序列遗传分析显示菌株 sznjO23 与志贺氏菌(ATCC29903)的进化距离较近、同源性高, 相似度为 99.26%。相似度大于 99% 的细菌判定为同种细菌, 所以可确定该菌株为志贺氏菌。

通过表现型和基因型两种方法均可以对病原菌进行鉴定, 但基因型比表现型更加稳定, 国标应用的生化试验属于表现型鉴定, 但病原菌基因表达水平往往会受到环境因素的干扰, 所以基于表现型的鉴定存在较多不确定因素^[15]。16S rDNA 序列结构特殊、保守, 受环境因素影响较小, 但其具有种间多态性, 通过比对 16S rDNA 序列可以鉴定细菌, 该方法适用于所有细菌的分析^[17-18]。

因此, 菌株分离鉴定过程中, 在初步观察了菌落形态、大小、颜色等特征后, 还需结合生化试验结果、血清学实验结果进一步分析, 必要时加做 16S rDNA 序列分析, 多方法鉴定以保证结果的准确性。

参考文献

- [1] 赫什. 兽医微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2007. Hirsh. Veterinary Microbiology [M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [2] 张宗辉, 奚弟荣. 与志贺菌和大肠埃希菌 O157 诊断血清交叉凝集反应细菌的分离和鉴定[J]. 预防医学情报杂志, 2013, 29(7):612-614. Zhang ZH, Xi DR. Isolation and identification of bacteria cross-reacting with *Shigella* and *E.coli* O157 anti-serums[J]. J Prev Med Inf, 2013, 29(7):612-614.
- [3] 周庭银. 临床微生物学诊断与图解[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007. Zhou TY. Diagnosis and illustration of clinical microbiology [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2007.
- [4] 卢珊, 白莉, 熊衍文. 一种鉴别与大肠埃希菌 O157 血清凝集的弗氏枸橼酸杆菌的 PCR 方法[J]. 疾病监测, 2009, 24(6): 438-439. Lu S, Bai L, Xiong YW. A PCR method of identification for *Citrobacter freundii* agglutinating with O157 serum [J]. Dis Surv, 2009, 24(6):

- 438-439.
- [5] 王燕, 谢贵林, 杜琳. 大肠杆菌 O157:H7 感染流行概况[J]. 微生物学免疫学进展, 2008, 36(1): 51-58.
Wang Y, Xie GL, Du L. The prevalence of *E. coli* O157:H7 [J]. Prog Microbiol Immunol, 2008, 36(1): 51-58.
- [6] 白向宁, 赵爱兰, 夏胜利, 等. 非 O157 产志贺毒素大肠杆菌分离株的多位点序列分型研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(6): 544-560.
Bai XN, Zhao AL, Xia SL, et al. Multilocus sequence typing of non-O157 *Shiga* toxin-producing *Escherichia coli* isolates [J]. Chin J Zoonoses, 2012, 28(6): 544-560.
- [7] 张锦, 夏胜利, 马宏, 等. 河南省出血性大肠杆菌 O157:H7 监测研究[J]. 疾病监测, 2003, 18(9): 325-327.
Zhang J, Xia SL, Ma H, et al. Analysis on surveillance result of EHEC O157:H7 in Henan province [J]. Dis Surv, 2003, 18(9): 325-327.
- [8] 杨毓环, 林杰. 福建省食品污染物监测 O157:H7 大肠杆菌的调查与分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(1): 75-76.
Yang YH, Lin J. Investigation and analysis of *E. coli* O157:H7 by food contamination monitoring in Fujian Province [J]. Chin J Health Lab Technol, 2006, 16(1): 75-76.
- [9] 王辛, 张芳, 刘华, 等. 陕西省食品污染现状监测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(2): 223-225.
Wang X, Zhang F, Liu H, et al. Monitoring and analysis of the present situation of food pollution in Shaanxi Province [J]. Chin J Health Lab Technol, 2003, 13(2): 223-225.
- [10] 朱惠芳, 黄巧萍. 1 株与志贺氏菌生化相似、抗原相同的大肠埃希氏菌[J]. 实用检验医师杂志, 2014, 6(4): 256-258.
Zhu HF, Huang QP. A strain of *Escherichia coli* with a similar biochemical features and same antigen to *Shigella* [J]. Chin J Clin Path, 2014, 6(4): 256-258.
- [11] 沈亚娟. 应用 16srRNA 基因序列分析鉴定非典型细菌的实验研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012.
Shen YJ. Application of identification of atypical bacteria with 16s rRNA gene sequence analysis [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2012.
- [12] Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, et al. 16S rRNA Gene sequencing versus the API20 NE system and the VITEK 2ID-GNB card for identification of nonfermenting gram-negative Bacteria in the clinical laboratory [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(4): 1359-1366.
- [13] Tu SI, Patterson D, Briggs C, et al. Detection of immunomagnetically captured *Escherichia coli* O157:H7 by antibody-conjugated alkaline phosphatase [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2001, 26(6): 345-349.
- [14] 宋宏新, 李宏. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的检测方法进展[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 607-610.
Song HX, Li H. Review of methods for detection EHEC O157:H7 [J]. Food Sci, 2007, 28(11): 607-610.
- [15] 朱飞舟, 陈利玉, 陈汉春. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(10): 1035-1041.
Zhu FZ, Chen LY, Chen HC. Identification of pathogenic microorganism by sequencing 16S rRNA gene [J]. J Cent South Univ (Med Sci), 2013, 38(10): 1035-1041.
- [16] 方光远, 茅慧华, 蒋加进. 不同病例动物源大肠杆菌的分离鉴定及 16S rDNA 同源性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(12): 3126-3132.
Fang GY, Mao HH, Jiang JJ. The isolation, identification and 16SrDNA homology analysis of *Escherichia coli* from animals in different cases [J]. China Anim Husband Vet Med, 2015, 42(12): 3126-3132.
- [17] Thorne JL, Kishino H, Painter IS. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution [J]. Mol Biol Evol, 1998, 15(12): 1647-1657.
- [18] Woese CR. Bacterial evolution [J]. Microbiol Rev, 1987, 51(2): 221-271.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



阚式绒, 博士, 主要研究方向为食源性病原微生物的检验。
E-mail: grammar849@sohu.com



黄裕, 高级兽医师, 主要研究方向为农产品质量安全。
E-mail: 910241198@qq.com