

食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌污染调查和ERIC-PCR分型研究

胡惠娟^{1,2}, 吴清平², 张菊梅², 潘力¹, 郭伟鹏², 王惠贤²

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006) (2. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东广州 510070)

摘要: 通过调查全国17个城市中, 七大类食品的小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)污染情况, 了解其分布规律与遗传多样性, 从而为我国食品中*Y. enterocolitica*污染的溯源和控制供相应的数据支持。本研究采用了稍作修改的《食品微生物学检验-小肠结肠炎耶尔森氏菌检验(GB/T 4789.8-2008)》和GB/T4789.8-2003两种方法对食品中*Y. enterocolitica*进行检测, 同时运用ERIC-PCR技术对分离菌株进行分型研究。研究显示在946份食品样品中检出共50份*Y. enterocolitica*阳性样品, 总污染率为5.29%。在检出的阳性样品中包括肉与肉制品24份、速冻食品25份和食用菌1份, 污染率分别为12.06%、16.89%和0.74%, 速冻食品和肉与肉制品是目前我国*Y. enterocolitica*污染的主要食品类型。采用GB/T4789.8-2008检出阳性样品25份, 检出率为2.64%; 采用GB/T4789.8-2003检出34份, 检出率为3.59%明显高于GB/T4789.8-2008法。ERIC-PCR指纹图谱进行聚类分析, 结果显示72个分离株可分为四簇, 主要污染基因型在C簇, 初步建立了*Y. enterocolitica*的ERIC-PCR指纹图谱数据库。

关键词: 食品; 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 污染率

文章编号: 1673-9078(2014)6-294-300

The Contamination Investigation and ERIC-PCR Typing of *Yersinia enterocolitica* in Foods

HU Hui-juan^{1,2}, WU Qing-ping², ZHANG Ju-mei², PAN Li¹, GUO Wei-peng², WANG Hui-xian²

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)
(2. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry-Province Jointly Development), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: The contamination of *Yersinia enterocolitica* in seven kinds of food from 17 cities across the country was investigated for *Y. enterocolitica* distribution and genotypic diversity analysis. The microbiological examination of food hygiene--examination of *Y. enterocolitica* (GB/T4789.8-2008) and GB/T4789.8-2003 were slightly modified and used as the *Y. enterocolitica* detection methods. The ERIC-PCR fingerprinting of *Y. enterocolitica* was carried to typing. Fifty positive samples of *Y. enterocolitica* were detected from 946 food samples, and the total *Y. enterocolitica* contamination rate was 5.29%. Among the 50 positive samples, the raw meat, frozen food and edible fungi were 24 (12.06%), 25 (16.89%) and 1 (0.74%) respectively. The positive samples detected by GB/T4789.8-2003 method were 34 (3.59%) while were 25 (2.64%) by GB/T4789.8-2008. Cluster analysis showed that 72 *Y. enterocolitica* strains from 50 samples were divided into four groups and the type C was the main genotype, which initially established the *Y. enterocolitica* ERIC-PCR fingerprinting database .

Key words: food; *Yersinia enterocolitica*; contamination rate

收稿日期: 2013-12-17

基金项目: 广东省科技计划项目(2011A011303001); 广东省教育部产学研结合项目(2012B090400017)

作者简介: 胡惠娟(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为小肠结肠炎耶尔森氏菌污染调查和分布规律

通讯作者: 吴清平(1962-), 男, 博士, 研究员, 研究方向食品微生物安全监测与控制技术研究

小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 是少数几种能在冷藏温度下生长的肠道致病菌之一。感染后可引起胃肠道症状、呼吸系统、心血管系统等疾病,甚至引起急性阑尾炎、败血症^[1]。2008年新国标 GB/T 4789.8-2008^[2]代替了 GB/T 4789.8-2003^[3],主要在增菌时间和温度上做了调整,将4℃冰箱冷增菌改为26℃±1℃培养48~72 h,生化鉴定增加了API 20E和VITEK GNI⁺。但近年来仍有很多文献报道采用GB/T4789.8-2003法检测*Y. enterocolitica*。2011年,闫立群等对宁夏地区分离*Y. enterocolitica*进行生物学特性分析,采用细菌分离培养和生化方法分离鉴定菌株,增菌采用4℃培养14 d^[4]。2011年,袁义平等对东台市*Y. enterocolitica*监测分析,菌株分离用改良磷酸盐缓冲液于4℃增菌培养7、14、21 d^[5],近年来国内未见将两种国标法进行系统的比较分析研究的文章。

目前对*Y. enterocolitica*进行溯源分析的主要方法有脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)、随机扩增DNA多态性分析(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)和多位点序列分型(Multi locus sequence typing, MLST)^[6-9],而PFGE在不同实验室之间的重复性不高,且操作过程繁琐;RAPD虽然操作简便,但重复性差、结果复杂;MLST通过对管家基因序列的测定阐述同种间的进化关系,所需实验费用较高;ERIC-PCR分型技术是基于肠道细菌基因间高度保守的重复序列(Enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC)而设计进行的PCR分型方法,与上述方法相比,其具有操作简便、快捷、成本较低等优点,国外已成功应用于*Y. enterocolitica*^[10-11]的分子分型,但国内还没有人将ERIC-PCR应用于*Y. enterocolitica*的分型。

本研究首次系统地抽样调查了全国部分地区七大类食品(肉与肉制品、速冻食品、水产品、食用菌、熟食、蔬菜和奶制品)中的*Y. enterocolitica*污染情况,采用两种国标法 GB/T 4789.8-2003 和 GB/T 4789.8-2008对食品中*Y. enterocolitica*进行检测,分析比较两种国标法对*Y. enterocolitica*检出率。同时,通过ERIC-PCR分型技术对菌株进行分子分型和分析污染菌株的主要基因型,以为今后控制食品中*Y. enterocolitica*污染提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

从2012年9月开始采样,采样地点分为三大区域,

即长江以南(South of the Yangtze River,包括上海、合肥、南昌、武汉、成都、昆明)、长江以北(North of the Yangtze River,包括兰州、哈尔滨、西安、太原、北京、济南)和广东省(深圳、汕头、湛江、韶关、河源)。

为防止二次污染,全部食品均现场采集,采样方法严格按照《食品微生物学检验》GB 4789.1-2010进行,无菌采样,无菌包装,每件样品至少500 g,在4℃下8 h内送达实验室。本研究从17个城市各大超市和集贸市场采集七大类食品(肉与肉制品、速冻食品、水产品、食用菌、熟食、蔬菜和奶制品)共946份,具体情况见表1。

表1 各区域采样数量

Table 1 The sampling amounts of different districts

长江以南	样品数	长江以北	样品数	广东省	样品数
上海	57	兰州	57	深圳	54
合肥	63	哈尔滨	53	汕头	52
南昌	57	西安	55	湛江	54
武汉	59	太原	53	韶关	54
成都	57	北京	50	河源	55
昆明	61	济南	55	合计	269
合计	354	合计	323		
总计	946				

1.2 主要仪器设备

改良磷酸盐缓冲液(PSB)、CIN-1培养基平板、改良Y培养基平板、改良克氏双糖斜面、尿素、棉子糖、鼠李糖生化管、MID(GN A+B)微生物鉴定条购自广东环凯微生物科技有限公司;API 20E生化鉴定试剂条及其配套试剂由法国梅里埃公司生产。DNA提取试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司,Taq酶及PCR所需试剂购自东盛生物科技(广州)有限公司,DNA引物由华大基因公司合成。以上试剂均在有效期内使用。

1.3 试验方法

1.3.1 小肠结肠炎耶尔森氏菌的分离鉴定

参照国标《食品微生物学检验》GB/T 4789.8-2008和GB 4789.8-2003两种方法同时进行。将25 g样品用225 mL改良磷酸盐缓冲液(PSB)增菌,分别于26℃±1℃培养48 h和4℃±1℃培养7 d,用碱处理(0.5% KOH-0.5% NaCl)后划线接种CIN-1琼脂平板和改良Y琼脂平板上,置26℃±1℃培养48±2 h,典型菌落在CIN-1琼脂平板上为红色牛眼状菌落,在改良Y琼脂平板上为粉紫色、不粘稠的菌落。培养皿如

有典型菌落, 需将菌落 (大于 5 个随机挑取 5 个, 小于 5 个全选) 接种改良克氏双糖斜面和尿素生化管进行确证性试验, 将改良克氏双糖斜面和底部都变黄或者斜面变黄底部红色不产气, 尿素阳性的可疑菌, 挑单菌落进行氧化酶实验, 反应为阴性, 用 API 20E 和 MID 64+65 鉴定, 鉴定为 *Y. enterocolitica* 的记阳性。

1.3.2 小肠结肠炎耶尔森氏菌 ERIC-PCR

将鉴定后的 *Y. enterocolitica* 分离株和标准株 ATCC52204 (来自广东环凯微生物科技有限公司), 采用生工试剂盒提取基因组 DNA, 方法按照该试剂盒内的说明进行操作。同时对 ERIC-PCR 反应体系进行优化, 优化后的总反应体系为 25 μ L, 其中包含 1 μ L 模板 (约 50 ng)、4.0 mmol/L Mg^{2+} 、0.5 mmol/L dNTP、1.0 U TaqDNA 聚合酶 (广州东盛)、0.6 μ mol/L 引物。扩增程序为 95 $^{\circ}C$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 46 $^{\circ}C$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 3 min; 35 个循环; 72 $^{\circ}C$ 再延伸 10 min。扩增产物用 2.00% 的 TAE 琼脂糖在 90 V 电压电泳 60 min, 再通过紫外凝胶系统观察照相。分型条带采用 Gel-Pro Analyzer 软件和 Ntsys 软件处理分析。

2 结果与讨论

2.1 不同城市小肠结肠炎耶尔森氏菌检出结果

17 个城市共采集七大类食品 946 份, 其中检出 *Y. enterocolitica* 阳性样品 50 份, 总污染率为 5.29%, 具体的检出结果如表 2 所示。食品样品中分离株的具体信息如表 3 所示。

17 个城市的采样及检测在 2012 年 9 月到 2013 年 6 月之间进行, *Y. enterocolitica* 在不同城市的污染程度各不相同, 污染率从高到低为济南 (18.18%) > 西安 (10.91%) > 兰州 (8.77%) > 昆明 (8.20%) > 哈尔滨 (7.55%) > 北京

(6.00%) > 河源 (5.45%) > 合肥 (4.76%) > 太原 (3.77%) > 韶关 (3.70%) > 南昌 (3.51%) > 武汉 (3.39%) > 汕头 (1.92%) > 上海 (1.75%) = 成都 (1.75%) > 深圳 (0.00%) = 湛江 (0.00%), 济南的检出率最高为 18.18%, 深圳和湛江的检出率最低为 0.00%, 其中高于平均检出率 (5.29%) 的城市有济南、西安、昆明、兰州、哈尔滨、北京、河源, 部分城市污染程度比较严重, 应该引起相关部门的特别注意。存在差异的原因可能为: 第一, 地域的差异, 因各地气候条件、温度、湿度、空气污染程度不同, 各地域的物种具有各自的地域多样性; 第二, 受采样季节及温度的影响, 采集样品时各城市的温度不可能完全一致, 受温度和湿度的影响可能造成检出率的差异。

表 2 不同城市小肠结肠炎耶尔森氏菌污染情况

Table 2 The contamination rates of *Yersinia enterocolitica* in different cities

城市	样品数	阳性数	污染率/%
上海	57	1	1.75
合肥	63	3	4.76
南昌	57	2	3.51
武汉	59	2	3.39
成都	57	1	1.75
昆明	61	5	8.20
兰州	57	5	8.77
哈尔滨	53	4	7.55
西安	55	6	10.91
太原	53	2	3.77
北京	50	3	6.00
济南	55	10	18.18
深圳	54	0	0.00
汕头	52	1	1.92
湛江	54	0	0.00
韶关	54	2	3.70
河源	55	3	5.45
合计	946	50	5.29

表 3 食品中分离的小肠结肠炎耶尔森氏菌菌株

Table 3 *Yersinia enterocolitica* strains isolated from foods

菌株编号	样品种类	样品名称	来源	菌株编号	样品种类	样品名称	来源	菌株编号	样品种类	样品名称	来源
Ye1	肉与肉制品	肉糜	上海	Ye 20-1	速冻食品	速冻水饺	哈尔滨	Ye35-2	速冻食品	冻鸡翅	济南
Ye2	肉与肉制品	牛肉	合肥	Ye 20-2	速冻食品	速冻水饺	哈尔滨	Ye36	速冻食品	冻鸡翅	济南
Ye3	速冻食品	冻鸡翅	合肥	Ye 20-3	速冻食品	速冻水饺	哈尔滨	Ye36-1	速冻食品	冻鸡翅	济南
Ye4	肉与肉制品	鸡肠	合肥	Ye 21	速冻食品	速冻水饺	哈尔滨	Ye37	肉与肉制品	肉糜	济南
Ye5	速冻食品	小笼包	南昌	Ye 21-1	速冻食品	速冻水饺	哈尔滨	Ye38	肉与肉制品	羊肉片	济南
Ye5-1	速冻食品	小笼包	南昌	Ye 22	速冻食品	冻羊肉卷	哈尔滨	Ye38-1	肉与肉制品	羊肉片	济南
Ye5-2	速冻食品	小笼包	南昌	Ye 23	肉与肉制品	鸡肉	哈尔滨	Ye39	速冻食品	冻羊肉卷	济南

转下页

接上页

Ye6	速冻食品	冻牛肉卷	南昌	Ye24	肉与肉制品	肉糜	西安	Ye39-1	速冻食品	冻羊肉卷	济南
Ye7	速冻食品	冻鸡腿	武汉	Ye24-1	肉与肉制品	肉糜	西安	Ye40	肉与肉制品	鸡肉	济南
Ye8	肉与肉制品	猪肉	武汉	Ye25	肉与肉制品	肉糜	西安	Ye41	肉与肉制品	猪肉	济南
Ye9	速冻食品	冻半片鸭	成都	Ye26	速冻食品	冻鸡腿	西安	Ye42	速冻食品	冻鸡腿	济南
Ye10	肉与肉制品	肉糜	昆明	Ye27	肉与肉制品	鸡肉	西安	Ye43	速冻食品	速冻水饺	济南
Ye10-1	肉与肉制品	肉糜	昆明	Ye28	肉与肉制品	猪肉	西安	Ye43-1	速冻食品	速冻水饺	济南
Ye11	肉与肉制品	鸡肉	昆明	Ye29	速冻食品	冻鸭腿	西安	Ye43-2	速冻食品	速冻水饺	济南
Ye12	速冻食品	冻牛肉片	昆明	Ye29-1	速冻食品	冻鸭腿	西安	Ye43-3	速冻食品	速冻水饺	济南
Ye12-1	速冻食品	冻牛肉片	昆明	Ye30	速冻食品	速冻水饺	太原	Ye43-4	速冻食品	速冻水饺	济南
Ye13	肉与肉制品	鸭腿	昆明	Ye31	速冻食品	冻鸡翅	太原	Ye44	速冻食品	速冻水饺	济南
Ye14	肉与肉制品	猪肉	昆明	Ye31-1	速冻食品	冻鸡翅	太原	Ye44-1	速冻食品	速冻水饺	济南
Ye15	肉与肉制品	猪肉	兰州	Ye32	肉与肉制品	肉糜	北京	Ye45	肉与肉制品	牛肉	汕头
Ye16	食用菌	金针菇	兰州	Ye32-1	肉与肉制品	肉糜	北京	Ye46	速冻食品	速冻水饺	韶关
Ye17	速冻食品	冻半边鸭	兰州	Ye33	肉与肉制品	鸭肉	北京	Ye47	速冻食品	速冻水饺	韶关
Ye18	速冻食品	冻鸡腿	兰州	Ye34	肉与肉制品	鸡肉	北京	Ye48	肉与肉制品	牛肉	河源
Ye19	速冻食品	冻鸡肉	兰州	Ye35	速冻食品	冻鸡翅	济南	Ye49	速冻食品	速冻水饺	河源
Ye20	速冻食品	速冻水饺	哈尔滨	Ye35-1	速冻食品	冻鸡翅	济南	Ye50	速冻食品	冻鸡翅	河源

注：同一编号如 5-1 和 5-2 表示分离株来源同一样品。

2.2 食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌污染情况

分析

在七大类食品中，肉与肉制品检出 *Y. enterocolitica*

表 4 不同类型食品小肠结肠炎耶尔森氏菌污染情况

Table 4 The detection results of *Yersinia enterocolitica* in different foods

食品类型	肉与肉制品	水产品	速冻食品	食用菌	熟食	蔬菜	奶制品	合计
样品数量	199	169	148	136	170	85	39	946
阳性样品数	24	0	25	1	0	0	0	50
污染率	12.06%	0.00%	16.89%	0.74%	0.00%	0.00%	0.00%	5.29%

肉与肉制品和速冻食品是 *Y. enterocolitica* 污染的高风险的食品，需要引起相关行业和消费者的注意。在肉与肉制品中检出最多的是肉糜 33.33% (8/24)，其次是猪肉 26.32% (5/19)、鸡肉 25.00% (6/24)、鸭肉 23.53% (4/17)，肉糜即经加工后的猪肉污染 *Y. enterocolitica* 风险比未加工猪肉高，而猪污染风险比其他畜类和禽类都高，需要特别警惕。在速冻食品中检出最多的是速冻水饺 29.17% (7/24)，其次是冻鸡翅 22.22% (4/18)、冻鸡腿 19.35% (6/31)，速冻水饺污染率高可能是由于原料肉糜污染引起的，由于该菌是嗜冷菌，冻鸡翅和冻鸡腿在冷藏条件下 *Y. enterocolitica* 仍可生长繁殖，所以冷冻食品中的风险更高。

2.3 不同检测方法小肠结肠炎耶尔森氏菌检

阳性样品 24 份，污染率为 12.06% (24/199)，速冻食品中检出阳性样品 25 份，污染率为 16.89% (25/148)，食用菌检出阳性样品 1 份，污染率为 0.74% (1/136)，而其他四类样品中均未检出阳性样品，具体检出结果见表 4。

出情况

本次调查采用 GB/T 4789.8-2008 和 GB/T 4789.8-2003 两种国标法进行检测，GB/T 4789.8-2008 用改良 PSB 26 °C±1 °C 培养 48 h，GB/T 4789.8-2003 用改良 PSB 4 °C±1 °C 培养 7 d，在这两类食品中用两种不同的国标法进行检测，具体检出的阳性样品情况如表 5。

在采集的 946 份食品样品中，GB/T 4789.8-2003 检出率为 3.59% (34/946)，GB/T 4789.8-2008 检出率为 2.64% (25/946)，其中有六个城市 GB/T 4789.8-2008 没有检出，而 GB/T 4789.8-2003 有检出阳性样品，但两种国标法共检出阳性样品只有 9 份，说明不同的增菌温度和培养时间对 *Y. enterocolitica* 的检测影响很大，采用 4 °C 冷增菌，有利于 *Y. enterocolitica* 存活和缓慢繁殖，而对

大多数其他细菌不利或保持不变,特别适用于含菌量少的被检材料,也有部分*Y.enterocolitica*在26℃中温增菌能抵抗其他杂菌,具有生长优势,在某种程度上两种国标法存在互补,所以采用两种方法同时检测可以最大程度上解决样品处理过程中造成漏检的人为因素影响。

表5 两种方法小肠结肠炎耶尔森氏菌检出情况

Table 5 Detection results of *Yersinia enterocolitica* by different methods

城市	GB/T4789.8-2008	GB/T4789.8-2003	共检出	合计
上海	0	1	0	1
合肥	1	3	1	3
南昌	1	2	1	2
武汉	0	2	0	2
成都	1	0	0	1
昆明	4	3	2	5
兰州	2	3	0	5
哈尔滨	0	4	0	4
西安	4	3	1	6
太原	0	2	0	2
北京	3	1	1	3
济南	8	5	3	10
深圳	0	0	0	0
汕头	1	0	0	1
湛江	0	0	0	0
韶关	0	2	0	2
河源	0	3	0	3
合计	25	34	9	50

2.4 小肠结肠炎耶尔森氏菌分离株 ERIC-PCR

分型结果

将从50份食品中分离的72个分离株进行ERIC-PCR分型,ERIC-PCR电泳结果如图1所示,每个菌株ERIC-PCR产物进行凝胶电泳产生的带型稳定,条带数目为4~11条,片段大小约为200~3000 bp,采用Gel-Pro Analyzer软件和Ntsys软件处理分析,共有56种分型,分型结果如图2,所示相似系数处于0.42~1.00,反应出较高的遗传差异性。按照60%的基因同源性可以分为A、B、C、D四簇,其中A簇包含9株菌,相似系数约0.68~1.00; B簇包含14株菌中,相似系数约0.63~1.00; C簇包含41株菌,相似系数约0.71~1.00; D簇包含7株菌,相似系数约0.62~1.00, ATCC52204包含在D簇中,食品分离株主要基因型在C簇。其中43和44,

43-2、43-3和43-4, 12和13, 20-3、21-1和32-1, 10和21, 20-1和20-2, 17和18, 19、45、46和47, 35、36和42, 29-1和31-1菌株两两之间相似系数分别达到1.00,可认为是同一型别。

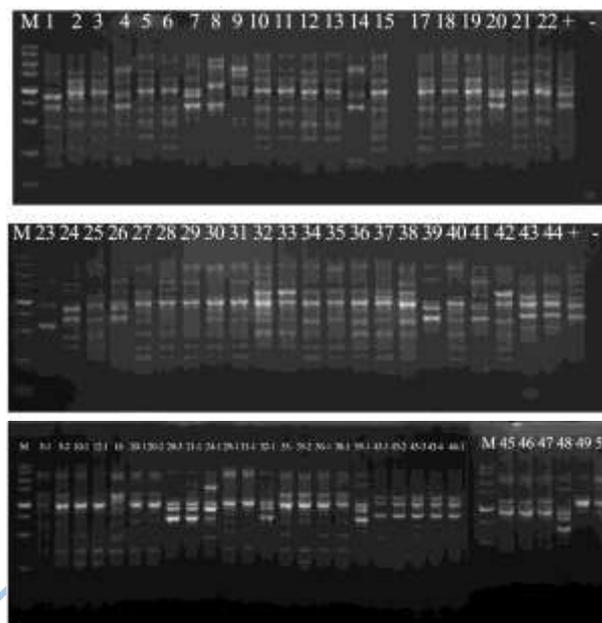


图1 小肠结肠炎耶尔森氏菌 ERIC-PCR 电泳图

Fig.1 ERIC-PCR electropherograms of *Yersinia enterocolitica*

注: M 为 maker, 从上到下条带大小分别为 5000、3000、2000、1500、1000、750、500、250、100 bp; +, *Yersinia enterocolitica* ATCC52204; -, 空白对照; 1-50, *Yersinia enterocolitica* 分离株。

3 结论

3.1 本研究采用两种国标法对全国 17 个城市七大类食品样品进行 *Y.enterocolitica* 分离鉴定,并对分离株进行 ERIC-PCR 分型研究,结果显示 946 份样品中,共 50 份检出 *Y.enterocolitica* 阳性样品,总检出率为 5.29%。在阳性样品中,肉与肉制品检出 24 份,污染率为 12.06% (24/199); 速冻食品中检出 25 份,污染率为 16.89% (25/148); 食用菌检出 1 份,污染率为 0.74% (1/136),而其他四类样品中均未检出阳性样品,说明 *Y.enterocolitica* 污染主要集中在肉与肉制品和速冻食品中,国内其他省份也有相关报道^[2]。猪肉污染 *Y.enterocolitica* 风险高于其他畜类和禽类,而经加工后的猪肉污染风险变高,由于原料带菌造成速冻水饺、冻鸡翅和冻鸡腿污染风险增加,建议不宜用冰箱长久贮藏生制肉类制品,食用时应彻底加热,以杜绝食物中毒隐患,生产厂家应严格控制原料污染带菌,建立加工过程的 GMP 是保证速冻食品安全卫生的关键所在。通过本次研究发现,GB/T 4789.8-2003 国标法采用低温增菌更有利于 *Y.enterocolitica* 的检出。采用

4℃冷增菌,有利于*Y.enterocolitica*存活和缓慢繁殖,而对大多数其他细菌不利或保持不变,特别适用于*Y.enterocolitica*污染程度低的被检材料,也有部分*Y.enterocolitica*在26℃中温增菌能抵抗其他杂菌,具有生长优势,在某种程度上两种国标法可以互补,单独使用其中一种国标容易造成漏检,同时使用两种国标法能最大程度减少漏检的发生。

结果来看,72株菌可分为56个型,相似系数在0.42~1.00之间,反映出具有较高的遗传多样性。污染菌株的优势菌株主要为C簇,不同来源地域的菌株在不同的簇中均有分布。同一份样品中收集到的菌株具有较高的相似性,如43-2、43-3和43-4,从同一城市更能分出型别相近或相同菌株,如12和13,17和18,28和29等等,而不同城市分离株则表现出遗传多样性。今后需要不断加强食品中的*Y.enterocolitica*检测,获取更多的菌株,以建立*Y.enterocolitica*分型数据库,进而对食品安全进行风险评估。

3.3 本研究首次对我国17个城市七大类食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌的污染情况进行了较为系统地调查,并对*Y.enterocolitica*分离株进行了分型研究,初步了解*Y.enterocolitica*污染情况及分布规律,建立起*Y.enterocolitica*的ERIC-PCR指纹图谱。以这些主要基因型菌株为研究对象,进行耐药机理和毒力基因分布研究将是下一步工作研究重点。

参考文献

[1] 邵奎东,郑威风,张市,等.耶尔森氏属主要菌种及其引起疾病概述[J].中国地方病防治杂志,2009,24(6):417-419
SHAO Kui-dong, ZHENG Wei-feng, ZHANG Shi, et al. Yersinia's overview main species and cause disease [J]. Chin J Ctrl End em Dis, 2009, 24(6): 417-419

[2] GB/T 4789.8-2003 食品卫生微生物学检验-小肠结肠炎耶尔森氏菌检验[S]
GB/T 4789.8-2003 Microbiological examination of food hygiene-examination of Yersinia enterocolitica [S]

[3] GB/T 4789.8-2008 食品卫生微生物学检验-小肠结肠炎耶尔森氏菌检验[S]
GB/T 4789.8-2008 Microbiological examination of food hygiene-examination of Yersinia enterocolitica [S]

[4] 闫立群,郭邦成,郝琼,等.2011年宁夏小肠结肠炎耶尔森氏菌生物学特性分析[J].宁夏医学杂志,2012,34(7): 608-610
YAN Li-qun, GUO Bang-chen, HAO Qiong, et al. Analysis on the biological characteristics of Yersinia enterocolitica of ningxia in 2011 [J]. Ningxia Med J, 2012, 34(7): 608-610

[5] 袁义成,吴银华,王迎庆,等.2011年江苏省台州市小肠结肠炎耶尔森氏菌监测分析[J].疾病监测,2012,27(5): 406-408
YUAN Yi-cheng, WU Yin-hua, WANG Ying-qing, et al. Surveillance of Yersinia enterocolitica in taizhou, jiangsu, 2011 [J]. Disease Surveillance, 2012, 27(5): 406-408

[6] Maria F A, Andreas S, Rogre S. Prevalence of pathogenic Yersinia enterocolitica in pigs slaughtered at a Swiss abattoir

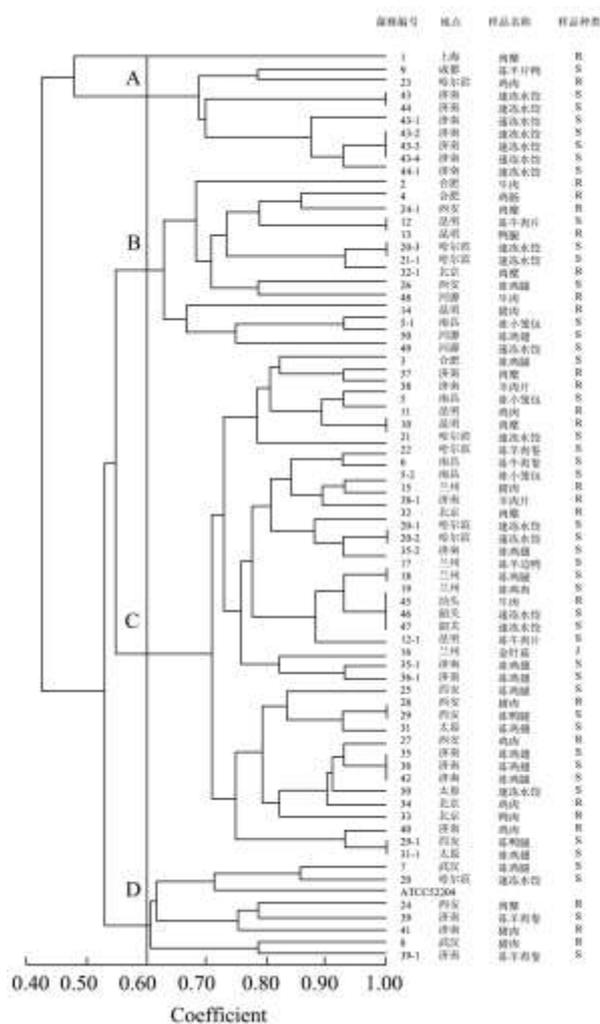


图2 小肠结肠炎耶尔森氏菌ERIC-PCR指纹图谱

Fig.2 The ERIC-PCR fingerprints of Yersinia enterocolitica

注: S代表速冻食品, R代表肉制品, J代表食用菌。

3.2 与PFGE、MLST、RAPD等方法相比,ERIC-PCR操作简单、成本低、多态性高,因此运用该方法进行*Y.enterocolitica*的遗传多样性研究分析较理想。近年来本实验室先后建立了阪崎肠杆菌^[13]、铜绿假单胞菌^[14]、蜡样芽孢杆菌^[15]、空肠弯曲菌^[16]等的ERIC-PCR分型方法,本研究在这些基础上进行ERIC-PCR反应体系的优化,成功建立了*Y.enterocolitica*的ERIC-PCR反应体系。从聚类分析

- [J]. Int J Food Microbiol, 2007, 119(3): 207-212
- [7] Sun W K , Hu B, Bi Z W, et al. Study of molecular subtypes of biotype 1A *Yersinia enterocolitica* in Shandong province from 2008 to 2009 [J]. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2012, 46(12): 1103-1106
- [8] Blixt Y, Knutsson R, Borch E, et al. Interlaboratory random amplified polymorphic DNA typing of *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like bacteria [J]. Int. J. Food Microbiol., 2003, 83: 15-26
- [9] Sihvonen L M, Jalkanen K , Huovinen E, et al. Clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A represent two phylogenetic lineages with differing pathogenicity-related properties [J]. BMC Microbiol., 2012, 12: 208-219
- [10] Sachdeva P, Viridi J S. Repetitive elements sequence (REP/ERIC)-PCR based genotyping of clinical and environmental strains of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A reveal existence of limited number of clonal groups [J]. FEMS Microbiol. Lett., 2004, 240(2): 193-201
- [11] Falcao J P, Falcao D P, Pitondo S A, et al. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil [J]. J. Med. Microbiol., 2006, 55(11): 1539-1548
- [12] 张健,刘巧宜,邓爱志,等.广州地区小肠结肠炎耶尔森氏菌分布特性的初步研究[J].中国卫生检验杂志,2008, 18(5):875-891
ZHANG Jian, LIU Qiao-yi, DENG Ai-zhi, et al. Preliminary investigation on pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* in Guangzhou [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18(5): 875-891
- [13] Ye Y W, Wu Q P, Zhou Y H, et al. Analysis of major band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and development of a species-specific PCR for detection of *Ent. sakazakii* in dry food samples [J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(3): 392-397
- [14] 李飞,吴清平,张菊梅,等.矿泉水和山泉水中粪链球菌污染调查及主要污染菌株的 ERIC-PCR 分型研究[J].微生物学通报,2013,40(5):881-890
LI Fei, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei, et al. Studies on the contamination investigation and ERIC-PCR typing of *Enterococcus faecalis* in mineral and spring water [J]. Microbiol. China, 2013, 40(5): 881-890
- [15] 王君,吴清平,吴克刚,等.蜡样芽胞杆菌 ERIC-PCR 分子分型方法的建立[J].现代食品科技,2013,29(7):1696-1701
WANG Jun, WU Qing-ping, WU Ke-gang, et al. Establishment of ERIC-PCR molecular typing method for *Bacillus cereus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1696-1701
- [16] 郑扬云,吴清平,吴克刚,等.空肠弯曲菌分离株 ERIC-PCR 分型和生化分型的比较研究[J].现代食品科技,2013, 29(8):1834-1850
ZHENG Yang-yun, WU Qing-ping, WU Ke-gang, et al. Comparison of the typing methods of ERIC-PCR and biochemical for *Campylobacter jejuni* isolates [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1834-1850