

麂子源蜂房哈夫尼亚菌的分离鉴定及生物学特性

杨志^{#1}, 王康^{#1}, 李冠宗², 孙玉林³, 杨福梅¹, 孙旺¹, 周可¹, 代飞燕^{*1}

1 云南农业大学动物医学院, 云南 昆明 650201

2 华中农业大学动物科学技术学院 动物医学院, 湖北 武汉 430070

3 昆明市技术合同认定登记站, 云南 昆明 650021

杨志, 王康, 李冠宗, 孙玉林, 杨福梅, 孙旺, 周可, 代飞燕. 麂子源蜂房哈夫尼亚菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5072-5082

Yang Zhi, Wang Kang, Li Guanzong, Sun Yulin, Yang Fumei, Sun Wang, Zhou Ke, Dai Feiyan. Isolation, identification, and biological characterization of *Hafnia alvei* from a barking deer[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5072-5082

摘要:【背景】蜂房哈夫尼亚菌是革兰阴性杆菌, 是一种机会致病菌、腐生菌, 常见于人和动物肠道、污水、土壤和乳制品中, 能引起人和动物败血症, 而且具有潜在的致腹泻作用。【目的】为对昆明轿子雪山自然保护区内死亡麂子体内潜在的致病菌进行分离鉴定及生物学特性分析。【方法】无菌采集死亡麂子的部分肠道组织进行细菌的分离培养和鉴定, 并对分离获得的菌株进行药物敏感性试验及动物回归试验。【结果】鉴定分离菌株为蜂房哈夫尼亚菌, 编号 KMJZXS0312。药敏试验结果表明, 该菌对青霉素、头孢噻吩等 7 种抗生素耐药, 对氟苯尼考、卡那霉素、呋喃唑酮、阿莫西林中介, 对恩诺沙星、复方新诺明等 13 种抗生素敏感。动物回归试验表明, 该菌能致小鼠死亡, 引起小鼠胃和肠道胀气, 肠道薄而透亮, 肝脏点状出血, 肺脏有针尖大小出血点, 肝脏病理切片显示, 肝细胞轻度水样变性, 肝细胞肿胀, 胞质疏松淡染。【结论】本实验从麂子肠组织分离到一株具有致病性的蜂房哈夫尼亚菌, 对其致病机制进行了分析, 并进行了药物敏感试验, 提供了菌株新的生物学信息, 具有重要的公共卫生学意义。

关键词: 麂子; 蜂房哈夫尼亚菌; 分离鉴定; 药敏试验; 回归试验

基金项目: 云南农业大学兽医公共卫生省创新团队项目(202105AE160014); 云南省乡村振兴科技专项(202104BI090017)
#对本文贡献相同

Supported by: Project of Provincial Innovation Team of Veterinary Public Health of Yunnan Agricultural University (202105AE160014); Yunnan Province Rural Revitalization Science and Technology Project (202104BI090017)

#These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: dfy1995026@163.com

Received: 2022-05-06; Accepted: 2022-06-20; Published online: 2022-08-04

Isolation, identification, and biological characterization of *Hafnia alvei* from a barking deer

YANG Zhi^{#1}, WANG Kang^{#1}, LI Guanzong², SUN Yulin³, YANG Fumei¹, SUN Wang¹, ZHOU Ke¹, DAI Feiyan^{*1}

1 College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China

2 School of Animal Science and Technology, School of Animal Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

3 Kunming Technology Contract Certification and Registration Station, Kunming 650021, Yunnan, China

Abstract: [Background] *Hafnia alvei*, a Gram-negative bacillus, an opportunistic pathogen, a saprophytic bacterium, is commonly detected in human and animal intestines, sewage, soil, and dairy products and can cause septicemia in human and animal, showing the potential to result in diarrhoea. [Objective] To isolate, identify and analyze the biological characteristics of potential pathogenic bacteria in the death of a barking deer (*Muntjac*) in Kunming Jiaozi Snow Mountain Nature Reserve. [Methods] A part of the intestinal tissue of the dead barking deer was collected aseptically for bacterial isolation and identification, and the isolate was subjected to drug sensitivity test and animal regression test. [Results] The isolate was identified as *Hafnia alvei* and named KMJZXS0312. It was resistant to 7 antibiotics including penicillin and ceftiofene, intermediately resistant to florfenicol, kanamycin, furazolidone, and amoxicillin, and sensitive to 13 antibiotics such as enrofloxacin and compound sulfamethoxazole. The animal regression test showed that the strain caused flatulence in the stomach and intestinal tract, thin and translucent intestine, spot hemorrhage in the liver, pinpoint hemorrhage in the lung. In addition, the strain caused degeneration and swelling of hepatocytes, as well as loose and lightly staining of the cytoplasm. Finally, it led to the death of mice. [Conclusion] A pathogenic *H. alvei* strain was isolated from a barking deer intestinal tissue. The biological characterization and drug sensitivity test in this study provide new biological information of the strain, which has important public health significance.

Keywords: *Muntjac*; *Hafnia alvei*; isolation and identification; drug susceptibility test; regression experiment

蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei*)是哈夫尼亚菌属的唯一菌种,为革兰阴性杆菌,兼性厌氧,有鞭毛结构,能扩散生长。其生物学性状与大肠埃希菌和志贺菌相似,因此过去称其为中间型副大肠杆菌^[1-2]。蜂房哈夫尼亚菌被认为是一种条件致病菌,生存范围非常广,自然环境中的湖泊、海洋及土壤中都有分布,冷藏的牛奶、肉制品及鱼肉等食品中更为常见。

蜂房哈夫尼亚菌具有致腐性和致病性,从人和动物的粪便、血液,以及呼吸道、感染灶

等临床样本和食品中均有检出的报道,但其机理及其在感染中的作用尚不明确^[3],在临床上常被忽视。研究发现,蜂房哈夫尼亚菌能与沙门氏菌属、志贺氏菌、侵袭性大肠埃希菌 O144、侵袭性大肠埃希菌 O157:H7 等诊断血清发生凝集反应^[4-9]。由此可见,在进行蜂房哈夫尼亚菌的血清学诊断时容易造成误诊。

目前,国内外对于蜂房哈夫尼亚菌的研究主要有信号传导物质等分子水平的研究。蜂房哈夫尼菌可以作为工业用菌,集中在 2 个方向:

一个是产尸胺；另一个是降解毒死蜱，具有较大的开发价值，而且能够在一定程度上解决部分环境问题。

麂子属哺乳纲(*Mammalia*)偶蹄目(*Artiodactyla*)鹿科(*Cervidae*)，被列入中国生物多样性红色名录、濒危野生动植物种国际贸易公约附录、国家保护的有益的具有科学研究价值的陆生野生动物名录。因此本研究采集死亡麂子病料，通过病原菌分离纯化、形态学观察、生化试验和16S rRNA 基因序列分析，分离鉴定出病原菌并进行药物敏感性试验，以期为该病的有效防治提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

2022年2月，昆明轿子雪山自然保护区发现一只死亡麂子，就地解剖发现，主要有胃轻腹胀气、肠道出血且有溃疡灶，后将伴有溃疡灶的肠组织采集后送至云南农业大学动物医学院进行实验室确诊。SPF昆明系小鼠(云南生物制药有限公司实验动物福利伦理审查委员会，2022001)购自昆明医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂和仪器

胰酪大豆培养基(TSA)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、麦康凯培养基(MAC)、水解酪蛋白琼脂培养基(MH)、平板计数培养基(PCA)、哥伦比亚血琼脂培养基、DL2000 DNA Marker，生工生物工程(上海)股份有限公司；Premix Taq (TaKaRa Taq Version 2.0 Plus Dye)，宝日医生物技术(北京)有限公司；药敏片和微量生化反应管，杭州滨和微生物试剂有限公司；FinePure 通用型基因组柱式提取试剂盒，济凡生物科技(北京)有限公司。生化恒温培养箱，上海恒科科技有限公司；水浴恒温振荡器，金坛杰瑞尔电器有限公司；PCR 仪，Bio-Rad 公司；组织包

埋机、石蜡切片机，沈阳恒松科技有限公司。

2 方法

2.1 病原菌分离纯化培养及生长情况观察

在超净工作台内用接种环将病料接种到TSB 培养基中，37 °C、120 r/min 增菌培养18–24 h。然后使用接种环采用三区划线法接种TSB 增菌液到TSA 培养基上培养，37 °C 恒温培养24–36 h，观察生长情况。挑取优势单菌落接种到TSB 培养基中，37 °C、120 r/min 纯化培养24 h，然后分别接种到TSA、MAC 和血琼脂培养基上，37 °C 恒温培养24 h，观察在不同培养基上的生长形态和菌落形态。

2.2 染色镜检

吸取200 μL 纯培养菌液到1.5 mL 离心管中，8 000 r/min 离心1 min 去上清液，沉淀固定到载玻片上，干燥后进行革兰氏染色，观察其形态特征。

2.3 生化试验

将分离纯化的菌株穿刺接种于细菌生化反应微量鉴定管中，培养18–36 h，参考《常见细菌系统鉴定手册》^[10]对结果进行判定。

2.4 PCR 扩增

以FinePure 通用型基因组柱式提取试剂盒提取病原菌的基因组DNA 为PCR 模板，采用细菌16S rRNA 基因通用引物27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行扩增。PCR 反应体系(25 μL)：Premix Taq 10 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各0.5 μL，模板DNA 4 μL，ddH₂O 10 μL。PCR 反应条件：95 °C 5 min；95 °C 30 s，56 °C 30 s，72 °C 90 s，共35个循环；72 °C 10 min；4 °C 保存。

2.5 测序比对和构建系统发育树

将PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份

有限公司进行测序, 将测序结果在 NCBI-BLAST 上进行比对, 选取相似性高的 28 株肠杆菌科不同属种菌株利用 DNASTar 进行相似性比对分析, 利用 MEGA 11.0 构建系统发育树。参考菌株信息见表 1。

2.6 动物回归试验

参照 GB 4789.2—2016^[11]进行菌落总数测定。将 SPF 昆明系小鼠公母各半分为 2 组, 每

组 6 只, 试验组每只腹腔接种 0.5 mL 浓度为 1.8×10^8 CFU/mL 的菌液; 对照组相同方法注射等量生理盐水。观察记录小鼠的临床症状及死亡时间, 无菌解剖死亡小鼠, 观察组织器官病理变化, 典型病变组织进行病理组织切片观察, 无菌采取小鼠的病变部位进行细菌分离培养、革兰染色镜检、16S rRNA 基因序列测定, 再与原菌株比对。

表 1 参考菌株信息

Table 1 Information of reference bacteria

菌株名称 Strain name	分离地 Location	分离源 Isolation source	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>Escherichia coli</i> strain KENECK5	Nigeria	Poultry	MK606101.1
<i>E. coli</i> strain CUMB NS 02	India	River water	MN197730.1
<i>E. coli</i> strain B10	China	Forest musk deer	KU870318.1
<i>E. coli</i> strain CCFM8340	China	Human feces	KJ803897.1
<i>E. coli</i> strain EC1704-1	China	Chicken	MG602205.1
<i>Salmonella</i> sp. strain S85_04530	Malaysia	Poultry	MT621365.1
<i>S. enterica</i> strain CM	Nigeria	Rats	MW320717.1
<i>S. enterica</i> strain SAMC-RUSOL(23)3	Nigeria	Rubber	MN606184.1
<i>S. enterica</i> DSM 9386	Korea	—	NR_116125.1
<i>S. enterica</i> subsp. GDYJS2011-1	China	Duck	JQ867391.1
<i>Shigella flexneri</i> strain KS7	India	<i>Homo sapiens</i>	OM281759.1
<i>S. flexneri</i> strain LXJ63	China	Coastal dinoflagellate	MN746200.1
<i>S. boydii</i> strain ZH1	China	Feces	JQ073777.1
<i>S. dysenteriae</i> strain ATCC 13313	United States of America	—	NR_026332.1
<i>Hafnia alvei</i> strain NC1211	Japan	Larvae of <i>Myrmeleon</i>	AB244470.1
<i>H. alvei sensu stricto</i> genomosp.1 ATCC 29926	Belgium	—	FM179942.1
<i>H. alvei</i> strain HAMB1 1279	Finland	—	LT899985.1
<i>H. alvei</i> strain R-53631	Belgium	Bumble bee gut	LT631752.1
<i>H. alvei</i> strain M-T-TSA_95	Lithuania	Roach	JQ795767.1
<i>H. alvei</i> strain FC2951	China	Patient	MK312669.1
<i>H. sp.</i> 3-12(2010)	China	Intestinal tract	HM489947.1
<i>H. alvei</i> strain LT-V2	China	Sturgeon fish	OK103784.1
<i>H. alvei</i> strain F9	China	Milk	KT767908.1
<i>Klebsiella</i> sp. strain InAD-062	China	—	MF401268.1
<i>K. pneumoniae</i> strain X11	China	—	MZ389264.1
<i>K. sp.</i> VITKAS-2	India	Soil	JQ398846.1
<i>K. sp.</i> strain B2-M-1	Korea	Human feces	OK271588.1
<i>K. sp.</i> strain BF-T-1	Korea	Human feces	OK325990.1

注: —: 分离源不详

Note: —: Source of isolation unknown.

2.7 药敏试验

采用标准纸片法(K-B法)对分离的菌株进行药敏试验。菌液吸取 200 μL 注入 MH 琼脂培养基中,用无菌的三角棒将菌液均匀涂布在 MH 琼脂培养基上,将恩诺沙星、复方新诺明等 24 种抗生素贴片完成后,将平板倒置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h,测量抑菌圈直径,统计分析结果。

3 结果与分析

3.1 菌落形态及镜检结果

分离菌在 TSA 上呈中等大小、表面光滑、湿润、无色、半透明的菌落(图 1A);在 MAC 上呈中等大小、表面光滑、湿润、乳白色且在麦康凯培养基褪色(图 1B);在血琼脂平板上菌落为表面光滑、湿润、灰白色、无溶血(图 1C);通过光学显微镜观察到菌体无芽孢、无荚膜,呈红色短杆状(图 2),将其编号为 KMJZXS0312。

3.2 生化试验结果

生化试验结果见表 2。可知甲基红试验、赖氨酸、鸟氨酸阳性,发酵葡萄糖产气,不能发酵木糖、棉子糖、山梨醇等。根据《常见细菌系统鉴定手册》^[10]初步鉴定 KMJZXS0312 为哈夫尼亚菌属。

3.3 PCR 扩增及 16S rRNA 基因序列分析结果

3.3.1 PCR 扩增结果

菌株 KMJZXS0312 通过 PCR 扩增出目的基因 1 500 bp 左右的片段(图 3),符合预期结果,PCR 扩增产物测序结果利用 DNASTar-SeqMan 拼接获得菌株 16S rRNA 基因序列长为 1 433 bp。将获得的序列在 NCBI-BLAST 中进行比对,与已知菌株 NC1211 (AB244470.1)相似性达 99.93%,与菌株 3-12(2010) (HM489947.1)相似性达 99.72%。

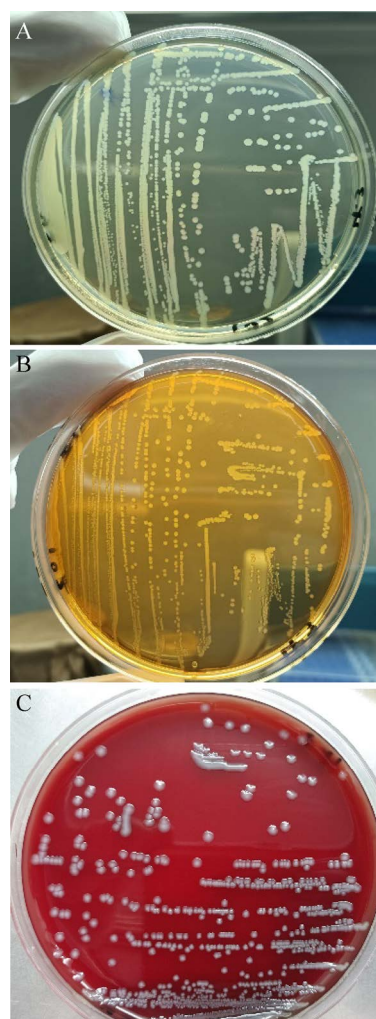


图 1 分离菌在不同琼脂上的菌落形态 A: TSA; B: MAC; C: 血琼脂平板

Figure 1 Colony morphology of isolated bacteria on different agar media. A: TSA; B: MAC; C: Blood agar plate.

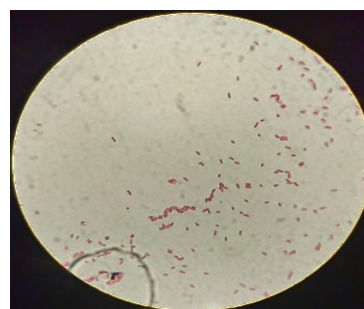


图 2 菌株染色镜检结果(16 \times 100)

Figure 2 The results of the microscopic examination of the isolated strain (16 \times 100).

表 2 菌株生化试验结果

Table 2 Biochemical test results of strain

试验项目 Test item	结果 Result
硫化氢 Hydrogen sulfide	-
苯丙氨酸 Phenylalanine	-
葡萄糖酸盐 Gluconate	-
β-半乳糖苷 β-galactoside	-
Methyl red test	+
VP test	-
枸橼酸盐 Citrate	-
明胶 Gelatin	-
蔗糖 Sucrose	-
尿素 Urea	-
动力 Dynamic	-
葡萄糖产气 Glucose gas	+
侧金盏花醇 Side calendula	+
鸟氨酸 Ornithine	+
棉子糖 Raffinose	-
山梨醇 Sorbitol	-
木糖 Xylose	-
赖氨酸 Lysine	+

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative.

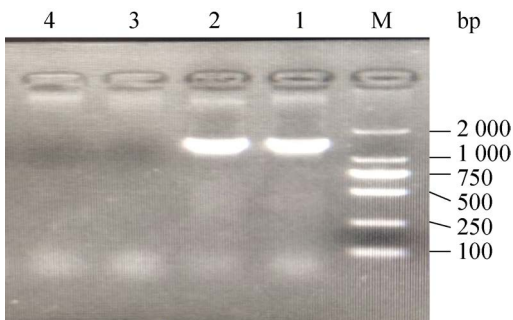


图 3 菌株 PCR 扩增产物电泳图 M: DL2000 DNA Marker; 1: 样品; 2: 样品重复; 3: 阴性对照; 4: 空白对照

Figure 3 Electrophoresis of PCR amplification products of strains. M: DL2000 DNA Marker; 1: Sample; 2: Sample repeat; 3: Negative control; 4: Blank control.

3.3.2 相似性比对及系统发育树构建结果

利用 DNASTar-MegAlign 进行基于 16S rRNA 基因序列比对, 结果如图 4 所示, 分离菌株 KMJZXS0312 与埃希菌属相似性在 94.2%–94.4% 之间, 与沙门氏菌属相似性在 93.3%–94.2% 之

间, 与志贺氏菌属相似性在 93.6%–94.0% 之间, 与克雷伯菌属相似性在 95.2%–95.5% 之间, 与哈夫尼亚菌属相似性最高, 在 99.1%–99.8% 之间, 与菌株 LT-V2 (OK103784.1) 相似性最高, 达 99.8%; 利用 MEGA 11.0 采用最大似然估计法(maximum likelihood estimation, MLE)基于 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, 结果见图 5, 分离菌株 KMJZXS0312 不与埃希菌属、志贺氏菌属、沙门氏菌属、克雷伯菌属处在同一支, 而与哈夫尼亚菌属处在同一支, 与菌株 3-12(2010) (HM489947.1) 处在系统发育树同一分支, 亲缘关系最接近, 聚为一族; 而哈夫尼亚菌属只有唯一菌种蜂房哈夫尼亚菌。因此, 分离菌株鉴定为蜂房哈夫尼亚菌(GenBank 登录号为 ON495745.1)。

3.4 动物回归试验结果

试验组 SPF 昆明系小鼠在接种菌液后出现精神沉郁、闭眼嗜睡、行动迟缓, 12 h 后开始死亡, 24 h 后全部死亡, 对照组小鼠无明显症状。解剖死亡小鼠胃和肠道胀气, 肠道变得薄而透亮(图 6A), 肝脏边缘梗死并有针尖大小点状出血(图 6B), 肺脏也见针尖大小出血点(图 6C)。死亡小鼠肝脏、肺脏、肠道经细菌分离鉴定、PCR 扩增测序比对结果与原菌株相同。病理切片结果(图 7)显示, 肝细胞轻度水样变性, 肝细胞肿胀, 胞质疏松淡染(图 7A 黑色箭头)。

3.5 药敏试验结果

分离菌株对 24 种抗菌药物敏感试验结果表明, 菌株 KMJZXS0312 对青霉素、头孢噻吩、头孢唑啉、头孢他啶、红霉素耐药, 对阿莫西林、头孢呋辛、卡那霉素、氟苯尼考、呋喃唑酮中介, 对哌拉西林、头孢舒巴坦、庆大霉素、复方新诺明、恩诺沙星等 14 种抗生素敏感(表 3)。

Percent identity

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
Divergence	1	100	96.5	98.6	98.5	98.3	98.3	94.0	94.0	93.9	94.1	94.1	99.5	93.8	93.8	94.6	94.3	99.0	99.1	99.9	99.9	99.9	99.4	94.4	99.7	99.3	96.7	96.7	96.1	97.2	1
	2	3.6	100	97.0	98.4	97.2	96.6	94.7	94.7	94.5	94.5	94.5	95.7	94.3	93.8	94.3	94.4	95.3	95.7	95.9	95.7	95.4	96.7	94.1	97.0	96.5	99.9	97.5	97.5	99.1	2
	3	1.4	3.1	100	99.5	99.7	99.0	94.4	94.4	94.3	94.3	94.2	97.8	94.1	93.5	94.2	94.1	94.7	95.0	95.1	95.1	98.8	93.8	99.2	98.6	97.1	97.1	97.0	97.8	3	
	4	1.5	3.7	0.5	100	98.2	98.6	93.9	93.9	93.8	94.0	94.1	98.8	93.5	93.4	94.2	94.2	95.7	95.7	95.1	95.4	95.1	98.9	93.8	99.2	98.7	96.6	97.0	96.5	97.7	4
	5	1.8	2.9	0.3	0.8	100	98.8	94.2	94.3	94.3	94.1	94.1	97.5	93.6	93.3	93.9	93.9	94.7	94.9	95.0	95.0	98.5	93.6	98.8	98.3	97.3	97.4	97.3	98.1	5	
	6	1.7	3.4	1.0	1.4	1.2	100	94.6	94.5	94.4	94.4	94.4	97.5	94.4	93.7	94.2	94.2	94.6	95.1	95.1	95.2	95.2	98.5	94.0	99.0	98.3	96.8	96.7	96.6	97.3	6
	7	6.2	5.5	5.8	6.3	6.1	5.7	100	99.8	99.7	99.9	93.8	99.3	99.2	99.9	99.5	95.3	95.3	94.7	94.7	94.4	94.1	99.4	94.5	93.9	94.7	94.0	93.8	94.1	7	
	8	6.2	5.5	5.7	6.3	5.9	5.6	0.2	100	99.8	99.8	99.9	93.2	98.9	99.1	99.9	99.5	94.4	94.7	94.7	94.7	94.4	94.1	99.2	94.5	93.9	94.8	93.7	93.8	94.1	8
	9	6.4	5.8	5.9	6.5	6.0	5.8	0.2	0.1	100	99.7	99.8	93.0	98.9	99.2	99.9	99.6	94.3	94.7	94.7	94.7	94.4	94.0	99.2	94.3	93.7	94.5	93.7	93.8	94.1	9
	10	5.9	5.5	5.7	5.9	5.9	5.5	0.0	0.0	0.1	100	99.7	94.3	99.1	99.0	99.7	99.4	95.6	95.9	95.1	95.1	94.6	94.2	99.2	94.4	94.1	94.6	93.9	93.8	94.0	10
	11	6.2	5.7	6.0	6.2	6.2	5.8	0.1	0.1	0.2	0.0	100	99.2	99.6	100.0	99.8	95.8	95.8	95.2	95.3	94.9	94.2	99.4	94.4	94.1	94.6	93.9	93.7	94.0	11	
	12	0.5	4.5	2.2	1.3	2.6	2.5	6.5	7.1	7.4	5.7	6.0	100	92.9	94.0	94.5	94.4	95.3	95.5	95.0	95.8	95.9	99.9	94.2	99.7	99.4	95.9	96.1	96.0	97.3	12
	13	6.5	6.0	6.2	6.8	6.7	5.9	0.7	1.0	1.1	0.6	0.6	7.5	100	99.3	99.4	94.0	94.5	94.4	94.1	93.8	98.7	94.2	93.6	94.3	93.2	93.3	93.7	13		
	14	6.5	6.5	6.8	6.9	7.0	6.6	0.8	0.8	0.7	0.4	6.2	1.3	99.9	100	99.2	95.3	95.2	95.0	94.9	94.0	99.5	94.0	93.9	93.9	94.0	93.0	93.6	14		
	15	5.6	5.9	6.1	6.1	6.4	6.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	5.7	0.7	0.1	100	99.8	95.7	95.7	95.7	95.7	95.5	94.5	99.8	94.5	94.5	94.4	94.0	93.6	93.9	15
	16	6.0	5.9	6.2	6.1	6.4	6.1	0.5	0.4	0.4	0.3	0.2	5.8	0.6	1.0	0.2	100	95.8	95.9	95.3	95.4	95.0	94.4	99.1	94.3	94.3	94.5	94.0	93.5	94.0	16
	17	3.9	4.7	5.3	4.2	5.3	5.2	4.7	5.6	5.7	3.9	4.2	4.7	6.1	4.8	4.3	4.2	100	99.8	98.6	98.8	98.4	96.2	95.4	96.5	96.1	95.4	95.5	95.7	96.8	17
	18	4.0	4.4	5.2	4.4	5.3	5.1	4.8	5.5	5.5	4.0	4.3	4.7	5.8	4.9	4.4	4.2	0.0	100	98.8	99.0	98.5	95.3	95.5	96.6	95.2	95.9	95.5	95.7	96.8	18
	19	4.2	4.3	5.2	5.1	5.2	5.1	5.5	5.4	5.5	4.8	5.0	4.1	5.8	4.9	4.4	4.9	1.2	1.2	100	98.8	98.7	96.0	95.4	96.4	95.7	95.9	95.7	95.1	96.2	19
	20	4.2	4.4	5.1	4.7	5.2	5.0	5.5	5.5	5.5	4.8	4.9	4.3	5.8	5.2	4.5	4.8	1.0	1.3	0.8	100	98.8	96.0	95.5	96.4	96.0	95.9	95.8	95.1	96.5	20
	21	4.2	4.7	5.1	5.0	5.2	5.0	5.8	5.8	5.9	5.3	5.3	4.2	6.2	5.3	4.6	5.2	1.4	1.5	1.3	1.3	100	95.2	96.3	95.9	95.6	95.4	94.8	96.3	21	
	22	0.6	3.4	1.2	1.1	1.5	1.5	6.2	6.1	6.3	5.7	6.1	0.1	6.5	6.3	5.7	5.8	3.7	3.8	4.1	4.1	4.1	94.2	99.7	99.7	96.8	96.9	96.2	97.3	22	
	23	5.9	6.1	6.4	6.4	6.6	6.3	0.6	0.7	0.8	0.5	0.6	6.0	1.3	0.5	0.2	0.9	4.6	4.7	4.7	4.7	4.9	6.1	94.4	94.2	94.2	93.8	93.3	93.6	23	
	24	0.3	3.1	0.8	0.8	1.2	1.0	5.7	5.7	5.9	5.5	5.9	0.3	6.1	6.3	5.8	5.9	3.4	3.4	3.7	3.7	3.8	0.3	5.9	99.6	97.1	97.2	96.6	97.3	24	
	25	0.7	3.6	1.4	1.3	1.8	1.7	6.4	6.3	6.6	5.8	6.2	0.6	6.7	6.4	5.7	5.9	3.8	3.9	4.5	4.2	4.2	0.3	6.1	0.4	96.6	96.7	96.0	97.3	25	
	26	3.4	0.1	3.0	3.5	2.7	3.3	5.5	5.4	5.7	5.4	5.7	4.3	5.9	6.4	5.8	5.8	4.5	4.3	4.2	4.3	4.6	3.3	6.0	2.9	3.5	97.6	97.5	98.3	26	
	27	3.4	2.6	3.0	3.0	2.6	3.4	6.3	6.5	6.6	6.1	6.4	4.0	7.2	6.9	6.3	6.3	4.5	4.7	4.4	4.4	4.7	3.2	6.5	2.9	3.4	2.4	99.1	99.7	27	
	28	4.0	2.6	3.1	3.5	2.7	3.5	6.5	6.4	6.5	6.2	6.6	4.1	7.1	7.3	6.7	6.8	4.3	4.5	5.1	5.1	5.4	3.9	7.0	3.5	4.1	2.5	0.9	99.1	28	
	29	2.7	1.8	2.1	2.2	1.8	2.6	6.0	6.0	6.0	5.8	6.1	2.6	6.5	6.6	6.2	6.1	3.0	3.1	3.8	3.4	3.7	2.6	6.5	2.6	2.6	1.6	0.1	0.8	99.1	29

图 4 分离菌株基于 16S rRNA 基因序列相似性比对分析

Figure 4 Alignment analysis of isolated strains based on 16S rRNA gene sequence homology.

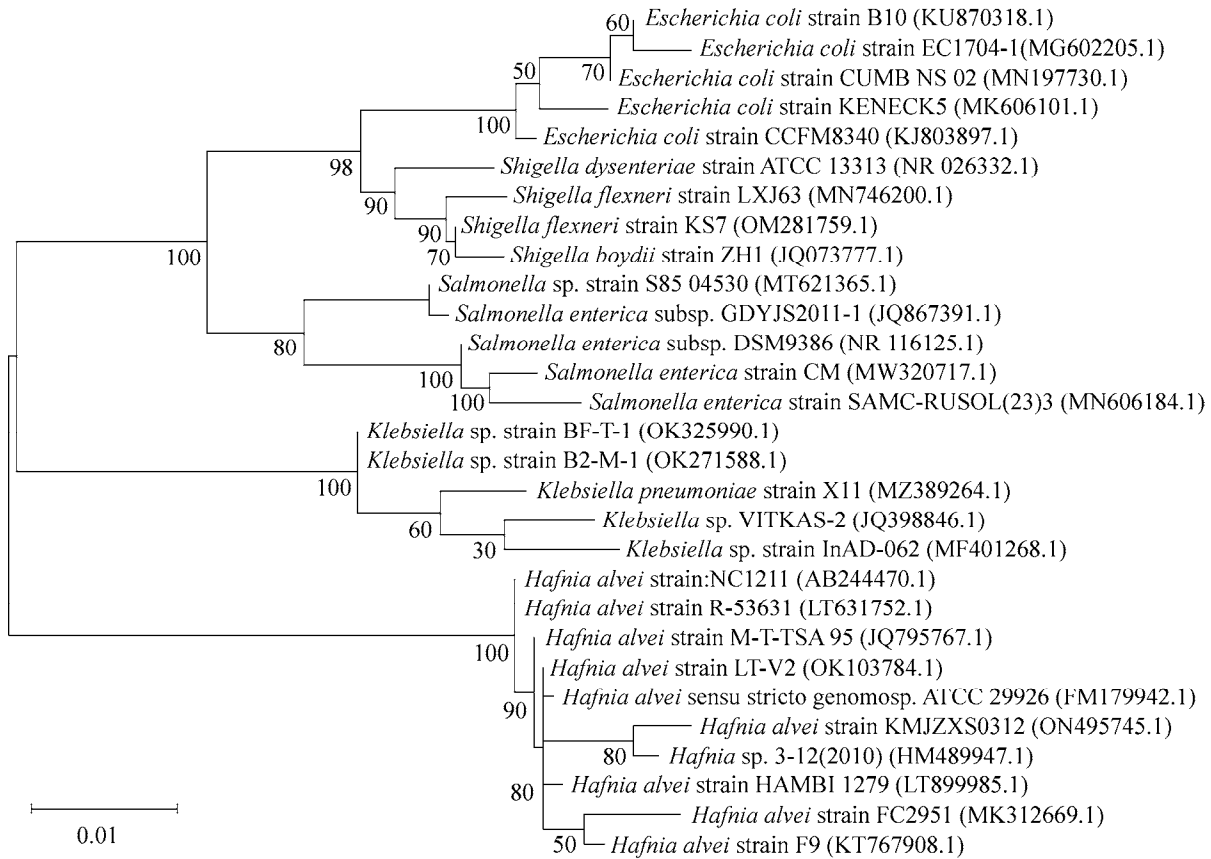


图 5 分离菌株基于 16S rRNA 基因序列系统发育树 括号中的序号为 GenBank 登录号；分支点数值代表进化树 bootstrap 值；分支长度代表发育树距离，标尺为 0.01

Figure 5 Phylogenetic tree of isolated strains based on 16S rRNA gene sequences. The GenBank accession number of aligned sequences are shown in the parenthesis; Values at branch nodes represent bootstrap value; The length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.01.

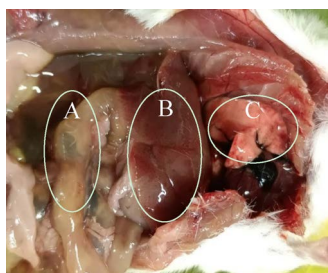


图 6 死亡小鼠解剖结果 A: 肠管变薄; B: 肝针尖大小出血点; C: 肺针尖大小出血点
Figure 6 Anatomy results of dead mouse. A: Thinning of the bowel; B: Hemorrhagic spots of the size of the needle tip in the liver; C: Hemorrhagic spots of the size of the needle tip in the lung.

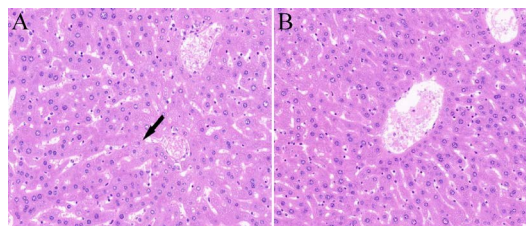


图 7 肝脏病理切片结果 A: 病变肝组织; B: 正常肝组织; 黑色箭头: 水样变性, 肝细胞肿胀, 胞质疏松淡染
Figure 7 Results of liver pathological sections. A: Diseased liver tissue; B: Normal liver tissue; Black arrow: Watery degeneration, swollen hepatocytes, loose and lightly stained cytoplasm.

表 3 菌株药敏试验结果

Table 3 Bacterial susceptibility test results

抗生素类型 Types of antibiotics	药物名称 Drugs name	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	判定结果 Result
β-内酰胺类 β-lactams	青霉素 Penicillin	0	R
	阿莫西林 Amoxicillin	15	I
	哌拉西林 Piperacillin	26	S
	头孢噻吩 Cefthiophene	0	R
	头孢唑啉 Cefazolin	0	R
	头孢呋辛 Cefuroxime	18	I
	头孢他啶 Ceftazidime	10	R
	头孢曲松 Ceftriaxone	24	S
	头孢噻肟 Cefotaxime	22	S
	头孢舒巴坦 Cefsulbactam	28	S
	氨基糖苷类 Aminoglycosides	卡那霉素 Kanamycin	16
庆大霉素 Gentamicin		19	S
阿米卡星 Amikacin		21	S
四环素 Tetracycline		19	S
四环素类 Tetracyclines	氟苯尼考 Florfenicol	16	I
酰胺醇类 Amide alcohols	氯霉素 Chloramphenicol	21	S
大环内酯类 Macrolides	红霉素 Erythromycin	0	R
磺胺类 Sulfonamides	甲氧苄啶 Trimethoprim	21	S
	复方新诺明 Compound sulfamethoxazole	27	S
喹诺酮类 Quinolones	恩诺沙星 Enrofloxacin	26	S
	环丙沙星 Ciprofloxacin	24	S
	诺氟沙星 Norfloxacin	25	S
	左氧氟沙星 Levofloxacin	27	S
硝基呋喃类 Nitrofurans	呋喃唑酮 Furazolidone	16	I

注: S: 敏感; I: 中介; R: 耐药

Note: S: Sensitive; I: Intermediary; R: Resistant.

4 讨论与结论

蜂房哈夫尼亚菌为革兰氏阴性短杆菌, 生长条件要求简单, 在 TSA、MAC、血琼脂培养基上均能生长出光滑、湿润、半透明或透明的中等大小菌落, 而且能使麦康凯培养基褪色, 24 h 内由粉红色变为橙色, 48 h 后变为无色。

药敏试验结果表明, 分离菌株对青霉素、头孢噻吩、头孢唑啉、头孢他啶、红霉素耐药, 这与邱吉宇等^[12]和闫艳新等^[13]结果相似, 但又存在差异, 这可能是由于宿主、地区及药物使用情况不同所造成的, 昆明轿子雪山自然保护区地带对野生动物很少或几乎未使用抗生素, 说明该菌在环境中有获得耐药的能力; 菌株对哌拉西林、头孢舒巴坦、庆大霉素、复方新诺明、恩诺沙星等多种抗生素敏感, 说明该菌株流行不广泛, 该地区未滥用抗生素。

蜂房哈夫尼亚菌普遍存在于人和动物肠道, 水源、土壤和乳制品中。一般是条件致病菌, 但能引起人各种炎症或化脓性炎症^[14-17]、败血症^[18-19]、腹泻^[20]、中毒^[21]等临床症状, 但其对动物的感染鲜见报道。查阅近年来相关文献, 邱吉宇等^[12]从贵州省患病蜂中成功分离到蜂房哈夫尼亚菌且具有致病性, 周玉法等^[22]在山东省淡水鱼肠道、赵庆新^[23-24]在江苏省鲤科四种鱼肠道、景如贤等^[25]在河南省黄河鲤、梅永超^[26]在辽宁省大菱鲆、陈拓等^[27]在上海口岸蝇、冯娟等^[28]在西藏口岸蝇、徐毅^[29]在温州市蜚蠊、徐海滨等^[30]在福建省清洁级试验大鼠及小鼠、Zhang 等^[31]在太行山猕猴、Lázaro-Díez 等^[32]在人体中均分离到蜂房哈夫尼亚菌, 有学者在狗身上也分离到该菌^[33]。

从空间分布上来看, 我国北方沿海沿河地带、贵州、西藏均有分离到蜂房哈夫尼亚菌, 从分离源上来看, 鱼类、哺乳动物、昆虫等动物中均有感染。由此可见, 蜂房哈夫尼亚菌喜

寒冷潮湿的环境, 对宿主无选择性, 广泛存在于各种动物体内及环境中。而本次试验从云南昆明轿子雪山自然保护区死亡麂子上成功分离到两株细菌, 其中一株为蜂房哈夫尼亚菌, 该菌株经动物回归试验证明其具有致病性, 使小鼠表现出精神萎靡、行动迟缓、嗜睡等临床症状, 而且小鼠在 24 h 内全部死亡, 说明其毒性较强。病理解剖发现, 有的死亡小鼠见肝脏边缘梗死, 有大面积针尖大小出血点, 肺脏针尖大小出血点, 胃肠胀气, 以及肠道管壁变薄等。病理切片可见肝细胞轻度水样变性, 肝细胞肿胀, 胞质疏松淡染。细胞水肿是由于细胞膜或线粒体损伤引起细胞可逆性变性的一种形式, 常是细胞损伤中最早出现的改变。有研究表明^[34], 存在于小肠上皮细胞内的钠-氢交换体 3 (sodium hydrogen exchanger 3, NHE3) 的活跃状态及表达与腹泻密切相关。结合病理解剖分析, 该菌致腹泻和致死的机制可能是膜钠-钾泵功能障碍, 使细胞内渗透压升高, 胞膜通透性增加, NHE3 活跃状态及表达异常, 引起腹泻, 严重者脱水死亡。另一株菌经动物回归试验证明无致病性, 因而推测该麂子死亡的原因是麂子抵抗力低下时, 蜂房哈夫尼亚菌侵入所致。

本实验对昆明轿子雪山自然保护区麂子源蜂房哈夫尼亚菌分离鉴定、致病性及机制进行分析, 并进行了药物敏感试验, 为菌株提供了新的生物学信息, 具有重要的公共卫生学意义。

REFERENCES

- [1] Yarlagadda K, Shrimanker I, Nookala VK. Catheter-associated *Hafnia alvei*-induced urosepsis. *Cureus*, 2019, 11(12): e6471
- [2] 倪语星, 尚红. 临床微生物学检验[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 305-306
Ni YX, Shang H. *Clinical Microbiology Test*[M]. 5th edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012: 305-306 (in Chinese)
- [3] Albert MJ, Alam K, Islam M, Montanaro J, Rahaman AS,

- Haider K, Hossain MA, Kibriya AK, Tzipori S. *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans[J]. *Infection and Immunity*, 1991, 59(4): 1507-1513
- [4] 曹军, 应月青, 杨曦. 1株疑似沙门菌的蜂房哈夫尼亚菌的鉴定[J]. *预防医学论坛*, 2010, 16(10): 933-935
Cao J, Ying YQ, Yang X. Identification of a strain of *Hafnia alvei* similar to *Salmonella*[J]. *Preventive Medicine Tribune*, 2010, 16(10): 933-935 (in Chinese)
- [5] 王滨, 李玉芳, 吕均, 牛作敬. 一株疑似沙门菌的蜂房哈夫尼亚菌分离与鉴定[J]. *现代预防医学*, 2011, 38(19): 3995-3996
Wang B, Li YF, Lv J, Niu ZJ. Identification and isolation of one strain of *Hafnia alvei* which is suspected as *Salmonella*[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2011, 38(19): 3995-3996 (in Chinese)
- [6] 李铁平, 徐洋, 王骥涛. 一株与痢疾 I 型志贺菌诊断血清交叉凝集的蜂房哈夫尼亚菌的鉴定[J]. *预防医学论坛*, 2022, 28(1): 59-60, 64
Li YP, Xu Y, Wang JT. Identification on a strain of *Hafnia alvei* cross-agglutinated with diagnosed serum of *Shigella dysenteriae* type I[J]. *Preventive Medicine Tribune*, 2022, 28(1): 59-60, 64 (in Chinese)
- [7] 沈梅云, 张晴. 1株与福氏 IV 型志贺菌发生交叉凝集的蜂房哈夫尼亚菌的分离鉴定[J]. *预防医学论坛*, 2015, 21(9): 704-705
Shen MY, Zhang Q. Isolation and identification of a strain of *Hafnia alvei* cross-agglutinating with *Shigella flexneri* type IV[J]. *Preventive Medicine Tribune*, 2015, 21(9): 704-705 (in Chinese)
- [8] 张建平, 燕勇. 一株与侵袭性大肠埃希菌 O144 诊断血清交叉凝集的蜂房哈夫尼亚菌[J]. *现代预防医学*, 2008, 35(20): 4051-4052, 4055
Zhang JP, Yan Y. A strain of *Hafnia alvei* cross-agglutinating with EIEC O144[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2008, 35(20): 4051-4052, 4055 (in Chinese)
- [9] 邱琴香, 徐庆, 侯敏, 文静波, 黄英. 2株与 O157 诊断血清交叉凝集的蜂房哈夫尼亚菌[J]. *疾病监测*, 2002, 17(7): 263-264
Qiu QX, Xu Q, Hou M, Wen JB, Huang Y. Two strains of *Hafnia alvei* cross-agglutinating with O157 diagnostic serum[J]. *Disease Surveillance*, 2002, 17(7): 263-264 (in Chinese)
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 1版. 北京: 科学出版社, 2001: 67-96
Dong XZ, Cai MY. *Manual for Systematic Identification of Common Bacteria*[M]. 1th edition. Beijing: Science Press, 2001: 67-96 (in Chinese)
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会; 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.2—2016, 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016
People's Republic of China National Health and Family Planning Commission; State Food and Drug Administration. GB 4789.2—2016, National food safety standard Food microbiology examination Detection of aerobic bacterial count[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016 (in Chinese)
- [12] 邱吉宇, 主性, 钟纯燕, 罗亚琰, 侯萍, 樊莹, 范文穗, 邓位喜, 韩建伦. 贵州中蜂蜂房哈夫尼亚菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(4): 1050-1058
Qiu JY, Zhu X, Zhong CY, Luo YY, Hou P, Fan Y, Fan WS, Deng WX, Han JL. Isolation, identification and drug sensitive test for *Hafnia alvei* from *Apis ceranina* Guizhou[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(4): 1050-1058 (in Chinese)
- [13] 闫艳新, 邹玲, 刘文华, 任慧英. 一例水貂感染蜂房哈夫尼亚菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *经济动物学报*, 2015, 19(2): 74-76, 79
Yan YX, Zou L, Liu WH, Ren HY. Isolation, identification and drug susceptibility test of *Hafnia alvei* from mink[J]. *Journal of Economic Animal*, 2015, 19(2): 74-76, 79 (in Chinese)
- [14] 于海涛, 刘秀娜. 化脓性关节炎中检出 1株蜂房哈夫尼亚菌[J]. *医学理论与实践*, 2004, 17(9): 995
Yu HT, Liu XN. A strain of *Hafnia alvei* detected in septic arthritis[J]. *The Journal of Medical Theory and Practice*, 2004, 17(9): 995 (in Chinese)
- [15] 周薇薇, 朱焱. 从化脓性胆管炎的引流液中分离蜂房哈夫尼亚菌 1株[J]. *黑龙江医药科学*, 2000, 23(6): 6
Zhou WW, Zhu Y. Isolation of a strain of *Hafnia alvei* from the drainage fluid of suppurative cholangitis[J]. *Heilongjiang Medicine and Pharmacy*, 2000, 23(6): 6 (in Chinese)
- [16] 洪我象, 郜忠海, 黄炳勇. 蜂房哈夫尼亚菌致眼内炎一例报告[J]. *眼科研究*, 1987, 5(1): 45
Hong WX, Gao ZH, Huang BY. Endophthalmitis induced by *Hafnia alvei*: report of a case[J]. *Chinese Ophthalmic Research*, 1987, 5(1): 45 (in Chinese)
- [17] 陆棣莘, 王金良. 蜂窝哈夫尼亚菌脑膜炎 1例报告[J]. *天津医药*, 1986, 14(10): 636
Lu D(S/X), Wang JL. Meningitis induced by *Hafnia alvei*: report of a case[J]. *Tianjin Medical Journal*, 1986, 14(10): 636 (in Chinese)
- [18] 庄景甫. 哈夫尼亚菌败血症 3例报告[J]. *医师进修杂志*, 1989(8): 9
Zhuang JF. A report of 3 cases of *Hafnia* septicemia[J]. *Journal of Postgraduates of Medicine*, 1989(8): 9 (in Chinese)
- [19] 高东田, 高素平. 蜂房哈夫尼亚菌引起败血症 1例[J].

- 济宁医学院学报, 1998, 21(4): 32
- Gao DT, Gao SP. Septicemia caused by *Hafnia alvei*: report of a case[J]. Journal of Jining Medical College, 1998, 21(4): 32 (in Chinese)
- [20] 李悦庆, 殷淑兰, 李新. 重症腹泻患者检出峰房哈夫尼亚菌 84 株报告[J]. 山东医药, 1999, 39(16): 63
- Li YQ, Yin SL, Li X. Report on the detection of 84 strains of *Hafnia alvei* in patients with severe diarrhea[J]. Shandong Medical Journal, 1999, 39(16): 63 (in Chinese)
- [21] 董新平, 郭维植. 蜂窝哈夫尼亚菌引起中毒 1 例报告[J]. 福建医药杂志, 1995, 17(6): 67
- Dong XP, Guo WZ. A case report of poisoning caused by *Hafnia alvei*[J]. Fujian Medical Journal, 1995, 17(6): 67 (in Chinese)
- [22] 周玉法, 李代军, 刘东燕, 刘敬博, 姚淑红, 蔡玉梅. 4 种常见淡水鱼肠道菌群的分析[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(8): 220-223
- Zhou YF, Li DJ, Liu DY, Liu JB, Yao SH, Cai YM. The intestinal flora analysis of four types of common freshwater fish[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 39(8): 220-223 (in Chinese)
- [23] 赵庆新. 鲤科四种鱼肠道菌群的相似性及其与系统进化的关系[J]. 遗传, 2001, 23(5): 449-451
- Zhao QX. A study of the construction of evolutionary tree of four fishes in cyprinidae by similarity values of intestinal microflora[J]. Hereditas: Beijing, 2001, 23(5): 449-451 (in Chinese)
- [24] 赵庆新. 鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)鱼苗肠道微生态调节的研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(2): 51-52
- Zhao QX. Microbial-ecosystem regulation in fry intestine of *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Microbiology, 2002, 22(2): 51-52 (in Chinese)
- [25] 景如贤, 郑亚萌, 张宁, 张志宇, 李祎. 黄河鲤水产细菌的分离及其毒力因子和群体感应信号分子的检测[J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 2049-2060
- Jing RX, Zheng YM, Zhang N, Zhang ZY, Li Y. Detection of virulence factors and quorum sensing signal molecules of aquatic bacteria from Yellow River carp[J]. Microbiology China, 2021, 48(6): 2049-2060 (in Chinese)
- [26] 梅永超. 大菱鲆源峰房哈夫尼亚菌群体感应基因 *hallR* 的克隆、表达及功能初析[D]. 锦州: 渤海大学硕士学位论文, 2019
- Mei YC. Cloning, expression and function analysis of quorum sensing genes *hallR* of *Hafnia alvei*[D]. Jinzhou: Master's Thesis of Bohai University, 2019 (in Chinese)
- [27] 陈拓, 曹晓梅, 邓耀华, 房健慧, 李飞. 浦东机场口岸蝇类携带病原菌种类及 16S rRNA 鉴定[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(6): 506-511
- Chen T, Cao XM, Deng YH, Fang JH, Li F. Species and 16S rRNA identification of fly-borne pathogens in Shanghai Pudong International Airport[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2012, 23(6): 506-511 (in Chinese)
- [28] 冯娟, 达拉, 董周立, 常春, 曹晓梅, 杨朝春. 西藏口岸 2017 年蝇类携带病原体的检测分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2019, 30(2): 194-196, 199
- Feng J, Da L, Dong ZL, Chang C, Cao XM, Yang CC. Detection and analysis of pathogens carried by flies at Tibetan ports in 2017[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2019, 30(2): 194-196, 199 (in Chinese)
- [29] 徐毅. 蜚蠊病原体携带研究进展[J]. 实用预防医学, 2015, 22(5): 636-639
- Xu Y. Research progress on cockroaches as carriers of pathogens[J]. Practical Preventive Medicine, 2015, 22(5): 636-639 (in Chinese)
- [30] 徐海滨, 郭维植, 陈建辉, 王伙聪, 沈晓娜, 董新平. 2001 年福建省部分清洁级实验大鼠、小鼠细菌检测分析[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(4): 126-127
- Xu HB, Guo WZ, Chen JH, Wang HC, Shen XN, Dong XP. Bacterial detection and analysis of some clean laboratory rats and mice in Fujian province in 2001[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2002, 18(4): 126-127 (in Chinese)
- [31] Zhang QX, Han SY, Liu KS, Luo J, Lu JQ, He HX. Occurrence of selected zoonotic fecal pathogens and first molecular identification of *Hafnia paralvei* in wild Taihangshan macaques (*Macaca mulatta tcheliensis*) in China[J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 2494913
- [32] Lázaro-Díez M, Redondo-Salvo S, Arboleya-Agudo A, Ocejudo-Vinyals JG, Chapartegui-González I, Ocampo-Sosa AA, Acosta F, Martínez-Martínez L, Ramos-Vivas J. Whole-genome sequence of *Hafnia alvei* HUMV-5920, a human isolate[J]. Genome Announcements, 2016, 4(3): e00556-e00516
- [33] Petchell WHR, Noble PJM, Burrow R, Humphreys WJE, Bautista Diaz-Delgado O. *Hafnia alvei*: the unreported pathogen responsible for a sub-capsular renal abscess in a 1-year-old, presumed immunocompetent crossbreed dog with no co-morbidities[J]. Veterinary Record Case Reports, 2021, 9(2): e55
- [34] 刘海涛. 补中益气汤经肠道 SGLT1/NHE3 调控作用治疗脾虚泄泻证的机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 博士学位论文, 2017
- Liu HT. The mechanism of BuzhongYiqi decoction for the treatment of spleen deficiency diarrhea by intestinal SGLT1/NHE3 regulation[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of Guangzhou University of Chinese Medicine, 2017 (in Chinese)