

华东地区鸡-猪弯曲菌分子流行病学调查

程牧¹, 冀德君^{1*}, 薛峰^{2*}

¹扬州良德抗体生物科技有限公司, 扬州大学 江苏扬州

²南京农业大学 江苏南京

【摘要】目的 检测华东地区鸡和猪源性弯曲菌的分布与分子分型特征, 为华东地区弯曲菌的防控提供参考。**方法** 采集不同来源标本进行弯曲菌分离培养, 采用纸片扩散法进行弯曲菌的药敏试验, 采用PCR检测法进行分型检测。**结果** 共检测690份样品, 其中87份弯曲菌阳性(12.17%)。所获菌株对头孢类、磺胺类抗生素高度耐药; 分型检测共鉴定出50种ST型, 其中ST-21(%)为主要型别。**结论** 华东地区弯曲菌分布和耐药状况呈现多样化特点, 不同来源分离株耐药谱存在差异, 且菌株ST型与耐药性间没有严格的对应关系。

【关键词】 弯曲菌; 药敏试验; 分子分型; 耐药性

【基金项目】 扬州市邗江区科技项目(2021)

Molecular epidemiological survey of *Campylobacter* spp. in chickens and pigs in East China

Mu Cheng¹, Dejun Ji^{1*}, Feng Xue^{2*}

¹Yangzhou Liangde Antibody Biotech. Co., Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

²Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, China

【Abstract】 Objective To detect the distribution and molecular typing characteristics of *Campylobacter* spp. of chicken and pig origin in East China, and to provide reference for the prevention and control of *Campylobacter* spp. in East China. **Methods** Specimens from different sources were collected for isolation and culture of *Campylobacter*, drug sensitivity test of *Campylobacter* was performed by paper diffusion method, and typing detection was performed by PCR assay. **Results** A total of 690 samples were tested, of which 87 were positive for *Campylobacter* (12.17%). The obtained strains were highly resistant to cephalosporin and sulfonamide antibiotics; 50 ST types were identified in the typing test, among which ST-21 (%) was the main type. **Conclusion** The distribution and resistance status of *Campylobacter* in East China showed diversified characteristics, and there were differences in the resistance profiles of isolates from different sources, and there was no strict correspondence between ST types and drug resistance of strains.

【Keywords】 *Campylobacter*; Drug sensitivity test; Molecular typing; Drug resistance

1 前言

弯曲菌(*Campylobacter*)可引起动物腹泻、流产和人类急性肠炎、格林巴利综合征等多种病症, 是一种重要人兽共患病原菌^[1], 作为正常寄生菌广泛存在于野生动物和畜禽肠道中^[2]。直接的病原接触和食用受污染食品可使人 and 动物致病, 弯曲菌病的暴发流行会引起重大公共卫生事件。畜禽中, 空肠

弯曲菌的主要宿主是鸡, 结肠弯曲菌的主要宿主是猪^[3]。我国肉类消费以鸡猪肉为主, 而华东地区是鸡猪的主要养殖地区, 占有我国大部分的鸡猪饲养量。因此, 采取对鸡、猪弯曲菌的日常监测是预防和控制人和动物弯曲菌病的重要手段。本研究定期从华东地区一些鸡和猪场采样分离弯曲菌, 并进行耐药性检测和菌株分子分型, 以阐明弯曲菌在我国

作者简介: 程牧, 江苏南通, 从事动物产品检验方面的研究。

*通讯作者: 冀德君, 薛峰

华东地区的流行病学特征, 为制定人和动物弯曲菌病的监测和防制制度提供科学参考。

2 材料和方法

2.1 菌株

试验中菌株由江苏省出入境检验检疫局农产品与食品安全重点实验室提供^[4]。弯曲菌标准菌株: ATCC33560 购自中国保种中心; 质控用大肠杆菌和沙门氏菌均由实验室保藏。

以棉拭子采集华东地区鸡、猪不同来源的肛拭样品或其他样品, 插入 C-B 运送培养基, 24h 内送到实验室处理。增菌培养 18-24 h, 在改良 Skirrow 平板上划线接种, 置于厌氧罐或三气培养箱中分离培养, 48h 后观察结果, 并按文献^[5]的方法进行鉴定。

2.2 耐药性检测

按文献^[6]的琼脂扩散法检测菌株耐药性。棉拭子吸取 0.5 麦氏单位菌液均匀涂布在 CCDA 药敏板上 (厚度 4mm), 同时采用大肠埃希菌、沙门氏菌菌株作质控, 放置于 42°C 培养箱 10min, 将抗生素纸片贴在琼脂表层, 置 42°C 培养 48h 后, 观察抑菌环及其大小。测量各纸片抑菌环直径, 判定抑菌环的边缘以肉眼可见细菌生长为标准, 并按 CLSI/NCCLS 标准判定敏感或耐药程度。

2.3 MLST 分型^[7]

(1) 管家基因扩增

参考 MLST 网站对弯曲菌分型的方法, 以 7 个管家基因 *gltA*、*aspA*、*glnA*、*glyA*、*pgm*、*tkl* 和 *uncA* 作为分型目的基因。根据所提供弯曲菌分型的方法所用 PCR 及测序引物序列, 进行引物合成 (南京金斯瑞科技有限公司, 中国), 并于 -20°C 保存备用。PCR 扩增体系采用 50 μ L 反应体系, 依 MLST 官网提供的程序方法进行。PCR 产物进一步进行测序 (金斯特科技 (南京) 有限公司)。

(2) 序列分析

拼接上下游序列为一个完整序列, 利用 GenBank 数据库进行 BLAST 分析, 并采用 Lasergene7.1 对序列进行 Clustal V 聚类分析。测序结果同时上传到 MLST 网站进行在线分析, 使用 minimum-spanning tree 和 Tree drawing 软件将分析结果与网站数据库比对。

3 结果

3.1 样品分离

共检测样品 690 份, 其中 87 份弯曲菌呈阳性, 平均阳性率为 12.61%。其中, 鸡源样品阳性率 14.08% (69/490), 猪源的阳性率为 9.0% (18/200), 初步表明了弯曲菌在鸡群体中更常见。

3.2 耐药性分析

从所分离的菌株中选取 87 株弯曲菌, 采用琼脂扩散法分别做了 10 大类 27 种临床常用的抗生素药敏试验。弯曲菌分离株具有耐药性的抗生素种类按耐药程度排序为: 头孢菌素类、磺胺类、喹诺酮类、四环素类 (表 1)。所获得的弯曲菌分离株对部分青霉素类、大环内脂类、氨基糖甙类、氯霉素类抗生素较为敏感, 而对头孢菌素类、喹诺酮类、磺胺类、四环素类和青霉素类中的青霉素 G 等抗生素具有较强耐药性。这一检测结果提示我们在临床用药中应注意避开该菌具耐药性的抗生素种类, 同时也反映了过去一段时期以来, 抗生素添饲呈现非常普遍应用的态势。

在 27 种药物中, 对所有分离株具有较高敏感性的有 11 种, 占 40.74%。从耐药菌株的耐药谱可以看出, 87 株分离株的耐药主要集中在头孢菌素类、喹诺酮类、磺胺类等抗生素, 其中猪源分离株的多重耐药性较鸡源分离株更为严重 (表 2), 说明对猪的抗生素添饲更加普遍, 程度也更严重。

3.3 MLST 分型

87 株弯曲菌的 7 个管家基因扩增产物测序结果与国际 MLST 数据库中的序列进行 BLAST 比对, 总共检测到 44 种 ST 型, 以及 20 种新的 ST 型 (图 1)。其中, 鸡源菌株有 32 种 ST 型, 以及 18 种新的 ST 型; 猪源菌株有 18 种 ST 型, 以及 4 种新的 ST 型。鸡源和猪源共有 6 种 ST 型, 包括 2 种新的 ST 型; 经过初步比对分析, ST 型与耐药性间没有严格对应关系。

4 讨论

弯曲菌已成为许多国家最重要的腹泻病原菌之一^[8], WHO 将它列为最常见的食源性疾病之一。弯曲菌能定植于包括鸡、鸭、鹌鹑和鸵鸟等在内的所有家禽^[9,10], 以及猪和奶牛。近年来, 弯曲菌的流行已引起各国广泛关注, 国外尤其是发达国家对不同种类样品的弯曲菌进行了风险性评估^[11]。本研究通过对华东地区鸡猪进行空肠弯曲菌携菌率和耐药性调查, 了解了华东地区鸡猪普遍携带弯曲菌, 且感

染状况较复杂。这将为公共卫生管理部门采取一定的防疫措施提供了科学参考依据。细菌耐药性问题已经成为悬在人类头上的达摩克利斯之剑, 多重耐

药性菌株也成为人类治疗细菌感染时的梦魇。近年来, 由于抗生素在动物上普遍长期且不恰当使用, 动物源弯曲菌的耐药性也逐渐增高。

表 1 87 株弯曲菌分离株药敏试验结果

类别	药物名称	剂量($\mu\text{g}/\text{disc}$)	耐药	中敏	高敏	敏感
青霉素类	青霉素 G	10	77.01	9.20	13.79	22.99
	氨苄西林	10	37.93	28.74	33.33	62.07
	阿莫西林	30	1.15	45.98	52.87	98.85
头孢菌素类	头孢哌酮	30	98.85	0.00	1.15	1.15
	头孢拉定	30	87.36	2.30	10.34	12.64
	头孢噻肟	30	10.34	34.48	55.17	89.66
	头孢孟多	30	98.85	0.00	1.15	1.15
	头孢克罗	30	32.18	24.14	43.68	67.82
	链霉素	10	20.69	3.45	75.86	79.31
	庆大霉素	10	19.54	6.90	73.56	80.46
氨基糖甙类	卡那霉素	30	21.84	8.05	70.11	78.16
	壮观霉素	10	18.39	1.15	80.46	81.61
	阿米卡星	30	8.05	2.30	89.66	91.95
喹诺酮类	诺氟沙星	10	82.76	4.60	12.64	17.24
	环丙沙星	5	79.31	5.75	14.94	20.69
	左旋氧氟沙星	5	67.82	3.45	28.74	32.18
	萘啶酸	30	81.61	1.15	17.24	18.39
	恩诺沙星	5	78.16	1.15	20.69	21.84
	复方新诺明	25	98.85	1.15	0.00	1.15
	磺胺甲基异噁唑	25	97.70	1.15	1.15	2.30
大环内酯类	红霉素	15	10.34	13.79	75.86	89.66
	阿奇霉素	15	9.20	5.75	85.06	90.80
	四环素	30	72.41	8.05	19.54	27.59
四环素类	土霉素	30	74.71	5.75	19.54	25.29
	强力霉素	30	73.56	4.60	21.84	26.44
林可霉素类	克林霉素	2	10.34	6.90	82.76	89.66
	氯霉素	10	0.00	2.30	97.70	100.00

表 2 鸡猪弯曲菌分离株的耐药率, 单位: %

宿主	耐药谱																							
	5R	6R	7R	8R	9R	10R	11R	12R	13R	14R	15R	16R	17R	18R	19R	20R	21R	22R	23R	24R				
猪	0	4	0	0	4	12	4	4	4	12	12	12	0	4	4	4	0	8	4	4				
鸡	1.61	0	6.45	1.61	4.84	8.06	1.61	8.06	9.68	14.52	17.74	11.29	8.06	1.61	0	1.61	1.61	0	0	0				

注: R 代表对几种抗生素耐药, 如 24R 表示对 24 种抗生素耐药。

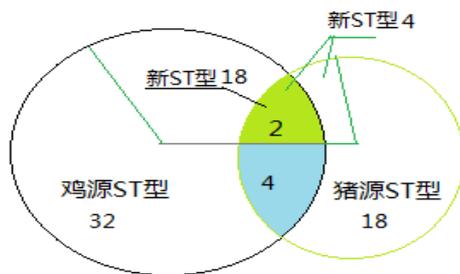


图1 鸡源和猪源菌株 ST 型分布示意图

本研究选用了 10 大类 27 种人和动物临床上常用的抗生素, 对所分离的 87 株空肠弯曲菌进行了药敏试验。结果正如预期, 在华东地区猪和鸡源弯曲菌中耐药菌株和多重耐药菌株迅速增多, 这两种畜禽与人的关系也更为密切。这些临床上常用抗生素大多呈中度敏感或不敏感, 特别是目前经常使用的药物如头孢菌素类、喹诺酮类等抗生素, 所分离菌株均产生了较强耐药性。研究结果与周倩等^[12]对江苏地区猪源弯曲菌耐药性结果、李健等^[13]对济南市市售肉鸡中空肠弯曲菌耐药性结果均相一致。这一结果具有很好的警示意义, 控制动物抗生素的滥用已到了刻不容缓的时刻。

多位点序列分型作为一种准确的分子分型方法于 1998 年问世以来, 以其高分辨率, 可重复性好, 可积累等优势而得到广泛关注^[14]。为了解华东地区弯曲菌的分子流行病学状况, 特别是不同菌株间的遗传进化关系。多位点序列方法可以分析不同时间、不同宿主分离株的遗传相关性, 同时通过已有菌株的数据库来比较不同研究中、不同时间和宿主分离株的遗传相关性, 以达到标准化, 全球共享化的目的, 因此, MLST 更适合于广义的流行病学研究。

通过对所分离 87 株鸡猪源弯曲菌的 MLST 分型, 我们发现此次华东地区分离的鸡猪源弯曲菌共检测出 50 种 ST 型, 包括 20 种新的 ST 型, 反映了华东地区弯曲菌具有较高遗传多态性, 即来源较为广泛、复杂, 提示今后的弯曲菌的预防工作要密切关注和严格控制不同的传播途径。

参考文献

- [1] 黄金林, 何蕊, 许海燕, 潘志明, 焦新安. 弯曲菌的公共卫生危害及其控制策略. 动物保健, 2006, (6): 9-11
- [2] Park SF. The physiology of *Campylobacter* species and

its relevance to their role as food-borne pathogens. *Int J Food Microbiol*, 2002, 74: 177-188

- [3] Senok A, Yousif A, Mazi W, Sharaf E, Bindayna K, El nima el-A, Botta G. Pattern of Antibiotic Susceptibility in *Campylobacter jejuni* Isolates of Human and Poultry Origin. *Jpn J Infect Dis*, 2007, 60(1): 1-4
- [4] 薛峰, 栾军, 张小荣, 祝长青等. 2006-2008 年江苏地区不同宿主感染空肠弯曲菌及其耐药性. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(12): 1206-1209
- [5] Xue Feng, Jiang Yuan, Xu Fei, et al. Isolation and Characterization of *Campylobacter* from Red-Crowned Cranes in China, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2009, 8(12): 2442-2446
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2005, 25: 1-167
- [7] 薛峰, 徐飞, 栾军, 李震中等. 多位点序列分型分析空肠弯曲菌华东动物源分离株. 微生物学报, 2010, 50(3):298-303
- [8] OzFoodNet Working Group . Burden and causes of food-borne disease in Australia : Annual report of the OzFoodNet network ,2005 (*J. Commun Dis Intell* , 2006 , 30 (3) : 278-300.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2005, 25: 1-167

- [10] Newell D.G. & Wagenaar J.A. (2000). Poultry infections and their control at the farm level. In *Campylobacter* (I. Nachamkin & M.J. Blaser, eds), 2nd Ed. ASM Press, Washington, DC, pp 497-509
- [11] Pulsenet (OL) (www.cdc.gov/pulsenet) .
- [12] 周倩, 张小燕, 张静等. 江苏部分地区猪源结肠弯曲菌耐药性分析及多位点序列分型. *微生物学通报*, 2020, 47(12): 4131-4141
- [13] 李健, 时玉雯, 刘辉. 济南市鸡源空肠弯曲菌的流行特征及病原毒力、耐药性分析. *现代预防医学*, 2021, 48(22): 4073-4077
- [14] Maidenm CJ , Bygraves JA , Feil E , et al .Multilocus Sequence typing : a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorg

anisms . *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95:3140-3145.

收稿日期: 2022年9月13日

出刊日期: 2022年10月28日

引用本文: 程牧, 冀德君, 薛峰, 华东地区鸡-猪弯曲菌分子流行病学调查[J], *农业与食品科学*, 2022, 2(4): 5-9.

DOI: 10.12208/j.jafs.20220049

检索信息: RCCSE 权威核心学术期刊数据库、中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2022 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS