



江苏部分地区鸡源与猪源弯曲菌耐药性分析与毒力基因检测

唐梦君^{1,2}, 周倩^{1,2}, 张小燕^{1,2}, 张静^{1,2}, 唐修君^{1,2},

陆俊贤^{1,2}, 周生¹, 蒲俊华^{1,2}, 高玉时^{1,2*}

(1. 江苏省家禽科学研究所, 扬州 225125; 2. 江苏省家禽遗传育种重点实验室, 扬州 225125)

摘要: 旨在了解江苏省部分地区鸡源与猪源弯曲菌的耐药及毒力基因携带情况。从江苏省 25 个规模养殖场采集 250 份粪便样品进行弯曲菌的分离鉴定, 采用琼脂平板稀释法测定 9 种抗菌药物的最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentrations, MICs), PCR 方法扩增弯曲菌 8 种与致病力相关的毒力基因。结果显示: 共分离得到 93 株弯曲菌, 包括空肠弯曲菌 45 株, 结肠弯曲菌 48 株; 空肠弯曲菌对萘啶酸 (80.0%)、四环素 (71.1%) 和环丙沙星 (66.7%) 的耐药率较高, 而结肠弯曲菌对红霉素 (87.5%)、萘啶酸 (79.2%) 和阿奇霉素 (72.9%) 产生较强的耐药性, 分离株多重耐药现象严重, 多重耐药率达 67.7%; 8 个毒力基因在弯曲菌分离株中的携带率不同, *cdtB* 和 *cadF* 携带率为 100%, *htrB* 为 97.8%, *clpP* 为 76.3%, *csrA* 为 18.3%, *wlaN* 为 5.4%, *cst II* 为 2.2%, *cgtB* 为 0%。结果提示, 江苏省畜禽养殖场弯曲菌分离株多重耐药情况严重, 毒力相关基因在弯曲菌中分布广泛。

关键词: 弯曲菌; 耐药性; 毒力基因; 分离鉴定

中图分类号: S852.613

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2020)09-2284-09

Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of *Campylobacter* spp. Isolated from Chicken and Swine Farms in Jiangsu Province

TANG Mengjun^{1,2}, ZHOU Qian^{1,2}, ZHANG Xiaoyan^{1,2}, ZHANG Jing^{1,2},
TANG Xiujun^{1,2}, LU Junxian^{1,2}, ZHOU Sheng¹, PU Junhua^{1,2}, GAO Yushi^{1,2*}

(1. *Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125, China*; 2. *Key Laboratory for Poultry Genetics and Breeding of Jiangsu Province, Yangzhou 225125, China*)

Abstract: The aim of this study was to investigate the antimicrobial resistance, virulence genes of *Campylobacter* spp. isolated from chicken and swine farms in Jiangsu Province. *Campylobacter* spp. were isolated and identified from two hundred and fifty fecal samples collected from twenty-five animal farms in Jiangsu Province. *Campylobacter* strains were tested for the antimicrobial susceptibility against to 9 kinds of antimicrobial agents by using an agar dilution method. Eight virulence genes (*cdtB*, *cadF*, *htrB*, *clpP*, *csrA*, *wlaN*, *cst II*, and *cgtB*) were detected by polymerase chain reaction. Ninety-three *Campylobacter* strains were isolated and identified from 250

收稿日期: 2020-01-21

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31700005); 江苏现代农业(肉鸡)产业技术体系(JATS[2019]382); 江苏省现代农业—重点及面上项目(BE2018363); 江苏省属公益类科研院所自主科研经费(BM2018026); 江苏省家禽遗传育种重点实验室资助项目(JQLAB-202002)

作者简介: 唐梦君(1980-), 女, 重庆合川人, 副研究员, 博士, 主要从事食源性病原微生物耐药性研究, E-mail: tangmengjun1980@163.com; 周倩(1992-), 女, 福建南平人, 硕士, 主要从事食源性病原微生物耐药性研究, E-mail: zhouqian_hx@163.com; 唐梦君和周倩为同等贡献作者

* 通信作者: 高玉时, 主要从事病原微生物耐药性研究, E-mail: gaoy100@sina.com

samples, including 45 *C. jejuni* strains and 48 *C. coli* strains. The highest percentage of antimicrobial resistance was found for nalidixic acid (80.0%), tetracycline (71.1%) and ciprofloxacin (66.7%) in *C. jejuni* isolates. The *C. coli* isolates were most frequently resistant to erythromycin (87.5%), nalidixic acid (79.2%) and azithromycin (72.9%). Moreover, the multi-drug resistance (resistance to three or more antimicrobial classes) was common among *Campylobacter* isolates with a rate of 67.7%. On the other hand, the 93 *Campylobacter* strains showed a wide variation for the presence of the 8 virulence genes, *cdtB* and *cadF* were positive for all isolates, while *htrB*, *clpP*, *csrA*, *wlaN*, *cst II* and *cgtB* was 97.8%, 76.3%, 18.3%, 5.4%, 2.2%, and 0%, respectively. The results indicated that the multiple drug resistance of *Campylobacter* strains from animal origin was relatively serious. In addition, the virulence-associated genes were detected widely among *Campylobacter* strains.

Key words: *Campylobacter* spp.; antibiotic resistance; virulence-related genes; isolation and identification

* **Corresponding author:** GAO Yushi, E-mail: gaoy100@sina.com

弯曲菌(*Campylobacter* spp.)是胃肠炎的主要病原,其临床表现为腹泻、发热、腹绞痛等临床症状,每年全球有4亿~5亿腹泻病例^[1]。国内研究报道显示,腹泻患者中空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*, *C. jejuni*)检测的阳性率为7.1%,已超过志贺菌(5.7%),并有逐渐增加的趋势^[2]。除肠炎外,弯曲菌还能引起格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome, GBS),这是一种以急性进行性神经肌肉麻痹为特征的自身免疫性疾病^[3]。

弯曲菌感染通常为自限性,无需抗菌药物治疗,但对于免疫力低下及重症患者,抗菌药物的治疗是必要的。在人医临床上,环丙沙星和红霉素是治疗弯曲菌感染的首选药物^[4],其他抗菌药如庆大霉素、四环素和阿奇霉素被列为治疗全身性弯曲菌感染的替代药物^[5]。近年来,从人、食品源动物分离的弯曲菌耐药性显著增加^[6-7],其主要原因之一是过度使用抗菌药物^[8-9]。耐药菌株特别是多重耐药株的出现使得抗菌药物的治疗效果减弱,治疗负担增加,严重威胁到人类的身体健康。弯曲菌已被证明拥有自然转化的遗传结合机制,如果弯曲菌获得了抗菌药物耐药(antimicrobial resistance, AMR)基因,这种特性会使耐药基因在动物和人之间迅速传播从而转移给人类^[10]。因此,弯曲菌的耐药性问题已引起人们的广泛关注,成为科学研究的热点。

弯曲菌定植于多种食品源动物肠道,而家禽被认为是弯曲菌的主要宿主^[11]。50%~80%的人弯曲菌病是由鸡引起,其致病机制仍不明确,但研究证实毒力基因是主要的致病因素。*cadF*基因编码外

膜蛋白与纤连蛋白结合,介导弯曲菌与宿主肠上皮细胞相互作用^[12]。*cdtB*基因编码细胞溶胀毒素,参与细胞毒素的产生^[13]。*cgtB*和*wlaN*基因参与 β -1,3半乳糖转移酶的生产 and 生物合成,与格林-巴利综合征中胶质苷类蛋白的表达有关^[8]。*Cst-II*基因编码唾液酸转移酶,与格林-巴利综合征相关。*crsA*基因编码转录调控因子,对黏附肠道细胞、氧化应激具有重要调控作用。*clpP*基因编码的是一种热应激蛋白^[14],在病原微生物中,高温和氧化应激等条件下*clpP*的表达增强,*clpP*与*clp*-ATP酶亚基结合增强细菌酪蛋白水解酶的活性^[15]。*htrB*基因编码一种有助于脂质A合成的酰基转移酶^[16-17],这种酶的合成能调节机体环境变化的反应^[17]。

为加强江苏省动物源弯曲菌耐药性监测,促进养殖环节科学合理用药,保障动物源性食品和公共卫生安全。本研究对江苏省部分猪鸡养殖场进行弯曲菌的分离,测定分离株对多种抗菌药物的耐药谱,并对其与致病机制相关的8种毒力基因进行检测,为今后临床合理用药、有效防控弯曲菌感染提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 样品来源于江苏省徐州、盐城、南通、宿迁、淮安、常州等畜禽主产区的15个养鸡场和10个养猪场。鸡源样品采集泄殖腔棉拭子,猪源样品采集动物新鲜粪便,每个养殖场采集样品10份,样品共250份。所有样品采集后于24 h内

4 ℃ 送至实验室处理(详见“1.2.1”)。

1.1.2 主要试剂 CCD A 培养基和哥伦比亚培养基购自英国 OXOID 公司; *ExTaq* premix 和 DL 2000 bp DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;脱纤维绵羊血购自青岛海博生物技术有限公司;厌氧罐购自日本 MGC 公司;混合气(5% O₂、10% CO₂ 和 85% N₂)购自南京特种气体厂有限公司;弯曲菌耐药性药敏检测板购自青岛中创生物科技

技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 生化培养箱(HPS-150,太仓市华美生化仪器厂);PCR 仪(eppendorf,德国);电泳仪(DYY-12 型,北京市六一仪器厂);凝胶成像系统(GBOX,基因有限公司)。

1.1.4 引物 本研究中所用的主要毒力基因引物序列及扩增片段大小见表 1,引物由上海生物工程有限公司合成。

表 1 弯曲菌毒力基因引物序列及片段大小

Table 1 Primer sequences, amplicon sizes of virulence-associated genes of *Campylobacter*

毒力基因 Virulence genes	引物序列(5'→3') Primer sequence	扩增片段大小/bp Size of amplified product	退火温度/℃ Annealing temperature	参考文献 Reference
<i>htrB</i>	F:CGCACCCAATTTGACATAGAA R:TTTTTAGAGCGCTTAGCATTGTCT	70	52	[18]
<i>clpP</i>	F:TCGGAGCATTTTTGCTTAGTTG R:CTCCACCTAAAGGTTGATGAATCAT	90	52	[18]
<i>csrA</i>	F:CACAGTCAGTGAAGGTGCTT R:ACTCGCACAATCGCTACTTC	878	52	[18]
<i>cstII</i>	F:CAGCTTTCTATTGCCCTTGC R:ACACATATAGACCCCTGAGG	570	52	[18]
<i>wlaN</i>	F:TTAAGAGCAAGATATGAAGGTG R:CCATTTGAATTGATATTTTTG	672	46	[19]
<i>cgtB</i>	F:TTAAGAGCAAGATATGAAGGTG R:GCACATAGAGAACGCTACAA	420	56	[20]
<i>cadF</i>	F:TTGAAGGTAATTTAGATATG R:CTAATACCTAAAGTTGAAAC	400	42	[18]
<i>cdtB</i>	F:CACGGTTAAAATCCCCTGCT R:GCACTTGGAATTTGCAAGGC	495	52	[18]

1.2 方法

1.2.1 细菌分离与纯化 泄殖腔棉拭子置于含 500 μL 灭菌 PBS(磷酸盐缓冲液, pH 7.2)的 Eppendorf 管中,充分浸泡 20 min,间隔振荡数次,取出棉拭子,取 100 μL 涂布 CCD A 平板;新鲜粪便样品取适量用 PBS 进行稀释,取 100 μL 涂布 CCD A 平板,微需氧条件 42 ℃ 培养 36 h。挑取 CCD A 平板上灰白色的可疑菌落,进行 PCR 鉴定。具体鉴定方法见文献[21]。

1.2.2 药敏试验 采用 96 孔板琼脂稀释法进行药敏试验,包括对兽医及人医临床常用抗感染的喹诺酮类(萘啶酸和环丙沙星)、大环内酯类(红霉素、阿奇霉素和泰利霉素)、氨基糖苷类(庆大霉素)、四

环素类(四环素)、林可胺类(克林霉素)和酰胺醇类(氟苯尼考)共 6 类 9 种抗菌药物。以空肠弯曲菌(ATCC33560)作为质控菌株,药敏试验操作步骤按照说明书进行。最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值为 24 h 后在平板上完全抑制细菌生长的最低药物浓度,根据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2018)和 NARMS-2014 (<https://www.cdc.gov/narms/antibiotics-tested.html>)推荐标准进行耐药判定。

1.2.3 毒力基因检测 常规煮沸法制备菌株 DNA 模板,PCR 扩增毒力基因。其反应体系为 25 μL,包括 *ExTaq* premix 12.5 μL,上、下游引物

两对($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 $1 \mu\text{L}$,模板 DNA $1 \mu\text{L}$,无菌去离子水 $9.5 \mu\text{L}$ 。PCR 循环条件: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 1 min ; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s ,根据不同引物选择相应的退火温度, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min ,共 30 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min 。PCR 产物经 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳成像,选取 PCR 扩增产物送至上海生工生物工程有限公司测序,并在 GenBank Blast 比对验证。

2 结果

2.1 弯曲菌分离鉴定情况

采集 250 份样品,共分离鉴定得到 93 株弯曲菌,总分离率为 37.20% ($93/250$),其中空肠弯曲菌 45 株,均为鸡源的,结肠弯曲菌 48 株:鸡源结肠弯

曲菌 25 株,猪源结肠弯曲菌 23 株。具体结果见表 2。

2.2 弯曲菌的耐药情况

93 株弯曲菌的药敏详细结果见表 3。受测弯曲菌对 9 种抗菌药物均存在不同程度的耐药。空肠弯曲菌耐抗菌药物按严重程度依次为萘啶酸 (80.0%)、四环素 (71.1%)、环丙沙星 (66.7%)、红霉素 (62.2%)、克林霉素 (62.2%)、阿奇霉素 (60.0%)、泰利霉素 (42.2%)、庆大霉素 (31.1%) 和氟苯尼考 (6.7%)。与空肠弯曲菌相比,结肠弯曲菌耐药种类略有差异,结肠弯曲菌对红霉素 (87.5%) 产生较强的耐药性,其次为萘啶酸 (79.2%)、阿奇霉素 (72.9%) 和四环素 (66.7%)。而猪源和鸡源的结

表 2 江苏省畜禽源弯曲菌的分离情况

Table 2 Prevalence of food animal *Campylobacter* strains isolated from Jiangsu province

来源 Origin	样本数 Samples	弯曲菌分离株数(分离率/%)	
		No. of <i>Campylobacter</i> isolates (rate of <i>Campylobacter</i> isolates)	
		空肠弯曲菌 <i>C. jejuni</i>	结肠弯曲菌 <i>C. coli</i>
猪 Pig	100	0(0.0)	23(23.0)
鸡 Chicken	150	45(30.0)	25(16.7)
总计 Total	250	45(18.0)	48(19.2)

表 3 畜禽源弯曲菌耐药结果

Table 3 Resistance results of food animal *Campylobacter* strains against 9 antimicrobial agents

抗生素种类 Antimicrobial class	抗生素名称 Antimicrobial agents	耐药折点/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Resistant breakpoints	结肠弯曲菌耐药株数 (耐药率/%) No. of resistant isolates of <i>C. coli</i> (resistance rate)			空肠弯曲菌 耐药株数 (耐药率/%) No. of resistant isolates of <i>C. jejuni</i> (resistance rate)
			总计 Total	猪源 Swine	鸡源 Chicken	鸡源 Chicken
Macrolides	红霉素 Erythromycin	≥ 32	42(87.5)	23(100.0)	19(76.0)	28(62.2)
	阿奇霉素 Azithromycin	≥ 8	35(72.9)	19(82.6)	16(64.0)	27(60.0)
	泰利霉素 Telithromycin	≥ 16	25(52.1)	14(60.9)	11(44.0)	19(42.2)
Quinolones	萘啶酸 Nalidixic acid	≥ 64	38(79.2)	15(65.2)	23(92.0)	36(80.0)
	环丙沙星 Ciprofloxacin	≥ 4	30(62.5)	5(21.7)	25(100.0)	30(66.7)
Aminoglycosides	庆大霉素 Gentamicin	≥ 8	19(39.6)	9(39.1)	10(40.0)	14(31.1)
Phenicols	氟苯尼考 Florfenicol	≥ 8	5(10.4)	3(13.0)	2(8.0)	3(6.7)
Tetracycline	四环素 Tetracycline	≥ 16	32(66.7)	10(43.5)	22(88.0)	32(71.1)
Lincosamides	克林霉素 Clindamycin	≥ 8	25(52.1)	9(39.1)	16(64.0)	28(62.2)

肠弯曲菌,对部分抗菌药物的耐药率也存在差异,猪源结肠弯曲菌对大环内酯类的红霉素、阿奇霉素和泰利霉素的耐药率显著高于鸡源结肠弯曲菌;而对环丙沙星和萘啶酸的耐药率显著低于鸡源结肠弯曲菌。

耐药弯曲菌所耐受抗菌药物的数量如图 1 所示:在 93 株弯曲菌中,共有 63 株弯曲菌对 3 类或 3 类以上的抗菌药物耐药,多重耐药率达 67.7%。其中空肠弯曲菌 29 株,结肠弯曲菌 34 株。其中,耐 4 类抗菌药物的菌株数量最多,有 27 株(29.03%),其次为耐 5 类抗菌药物的菌株(19 株),耐 3 类抗菌药物(均为 13 株),耐 6 类抗菌药物(4 株),7 株分离株对 6 类抗菌药物均敏感,且全部为空肠弯曲菌,4 株分离株对 6 类抗菌药物均耐药,其中,3 株为空肠弯曲菌,1 株为结肠弯曲菌。

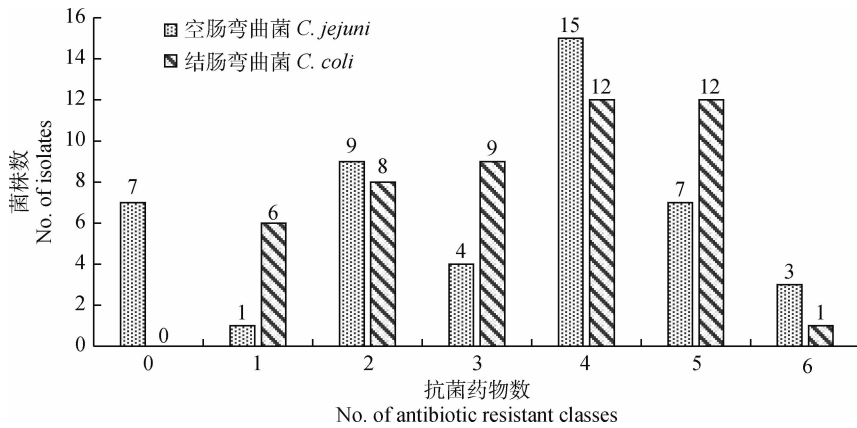


图 1 93 株弯曲菌分离株的多重耐药情况

Fig. 1 Multidrug resistance of 93 *Campylobacter* strains

表 4 毒力基因在畜禽源空肠弯曲菌和结肠弯曲菌中的分布

Table 4 Distribution of virulence genes in *C. jejuni* and *C. coli* strains isolated from chicken and swine sources

菌株类别 <i>Campylobacter</i> species	来源 Origin	数量 No. of isolates	毒力基因携带株数(携带率/%) No. of virulence genes in <i>campylobacter</i> (carrying rate)							
			<i>htrB</i>	<i>clpP</i>	<i>csrA</i>	<i>cst</i> II	<i>wlaN</i>	<i>cgtB</i>	<i>cdtB</i>	<i>cadF</i>
<i>C. jejuni</i>	鸡源 Chicken	45	44(95.7)	40(86.1)	16(34.8)	1(2.1)	5(10.8)	0(0)	45(100.0)	45(100.0)
	猪源 Swine	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
<i>C. coli</i>	鸡源 Chicken	25	24(96.0)	14(56.0)	1(4.0)	1(4.0)	0(0.0)	0(0.0)	25(100.0)	25(100.0)
	猪源 Swine	23	23(100.0)	17(73.9)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	23(100.0)	23(100.0)
	总计 Total	93	91(97.8)	71(76.3)	17(18.3)	2(2.2)	5(5.4)	0(0.0)	93(100.0)	93(100.0)

2.3 弯曲菌毒力基因分布

对 93 株弯曲菌进行毒力基因的检测,其检测结果如表 4 所示。*cdtB*、*cadF* 基因在空肠和结肠弯曲菌中携带率最高,为 100%;其次是 *htrB* 毒力基因,在空肠和结肠弯曲菌中均具有较高的携带率,其猪源结肠弯曲菌的携带率为 100%,高于鸡源结肠弯曲菌(96.0%);空肠弯曲菌中 *clpP* 毒力基因携带率(86.1%)高于结肠弯曲菌(鸡源 56.0%和猪源 73.9%);*csrA* 毒力基因在空肠弯曲菌携带率为 34.8%,而结肠弯曲菌仅 1 株携带 *csrA* 毒力基因;5 株空肠弯曲菌检出 *wlaN* 毒力基因,而在结肠弯曲菌中未检出;*cst* II 毒力基因在空肠和结肠弯曲菌中携带率均比较低,各 1 株菌株检出;93 株弯曲菌中均未检测到 *cgtB* 毒力基因。

3 讨论

弯曲菌作为重要的食源性、人畜共患致病菌之一,可引起人的细菌性胃肠炎。弯曲菌宿主来源广泛,能在家禽、猪及野生鸟类的肠道内作为常在菌长期存在,并可以通过食物链广泛传播,引起人类疾病^[22]。本研究从江苏省不同地区猪和鸡养殖场收集样本 250 份,共分离到弯曲菌 93 株,总分离率 37.2%,高于邓凤如^[23]报道的宁夏(33.2%)、山东(20.5%)和广东地区(23.3%)的分离率。从分离的猪源弯曲菌的种类来看,23 株弯曲菌全部为结肠弯曲菌,与 Alter 等^[24]从 15 个养猪场分离得到的弯曲菌均为结肠弯曲菌的结果一致。本研究猪源弯曲菌的分离率为 23.0%,与国内邓凤如等^[23]报道的 24.7%接近,远低于法国、英国、美国及加拿大的数据^[25],但高于日本的分离率^[26]。本研究鸡源弯曲菌分离株中空肠弯曲菌 45 株,结肠弯曲菌 25 株,空肠弯曲菌仍然是主导菌种。不同地区鸡源弯曲菌的分离率不同,分离率从 2%到 100%不等^[27]。在国内,不同省份鸡源弯曲菌检出率也存在差异,如邓凤如等^[23]研究报道宁夏鸡养殖场分离率为 16.5%,而广东为 35.5%。本研究江苏省鸡养殖场弯曲菌分离率为 46.7%,高于以上报道省份的弯曲菌分离率^[23],与张小燕^[28]报道的 2016 年江苏地区鸡养殖场的分离率接近。不同国家不同地区弯曲菌分离率不同,其可能原因是不同地区弯曲菌流行程度不同,也有可能是动物养殖情况、养殖规模、采样的方式、样本数量以及各实验室的分离方法不同造成。

从江苏省分离的 93 株动物源弯曲菌的药敏试验结果显示,弯曲菌对氟喹诺酮类、大环内酯类和四环素类耐药率较高,这与国内外报道弯曲菌多重耐药情况一致^[4, 29]。而大环内酯类和氟喹诺酮类是治疗弯曲菌感染的首选药物,四环素是替代药物,如果耐药菌感染人,可导致人的治疗失败。不同国家或地区空肠弯曲菌对氟喹诺酮类抗菌药物耐药水平不一,如西班牙空肠弯曲菌对氟喹诺酮类抗菌药物耐药率为 94.5%,匈牙利为 86.1%,法国为 56.9%,而瑞士为 40.7%^[7]。本研究结果表明,空肠弯曲菌对氟喹诺酮类药物产生较强的耐药性,其萘啶酸和环丙沙星的耐药率分别为 80.0%和 66.7%,该结果与我国近年来的报道一致,表明我国空肠弯曲菌对氟喹诺酮类药物的耐药比较严重^[30-31]。结肠弯曲菌对大环内酯类红霉素和阿奇

霉素的耐药率分别为 87.5%和 72.9%,其中,猪源结肠弯曲菌的耐药率分别为 100.0%和 82.6%,高于 Lim 等^[32]所分离猪源结肠弯曲菌的红霉素耐药率(23.9%)和阿奇霉素耐药率(23.9%)。总体而言,结肠弯曲菌对大环内酯类药物的耐药率高于空肠弯曲菌,猪源结肠弯曲菌耐药率高于鸡源结肠弯曲菌,该结果与以往的文献报道^[33]一致。鸡源结肠弯曲菌和猪源结肠弯曲菌对氟喹诺酮类和大环内酯类药物的耐药性也存在差异,其原因可能是氟喹诺酮类的恩诺沙星和大环内酯类的泰乐菌素可分别用于鸡和猪细菌疾病预防和治疗,这种选择性压力导致了耐药弯曲菌的产生,同时也导致了耐药表型的差异。

迄今为止,弯曲菌的致病机制尚未清楚,但研究显示,弯曲菌的致病性与细菌的黏附力、侵袭力和产毒能力有关。93 株动物源弯曲菌 8 种毒力基因携带情况分析结果显示,77%菌株携带至少 4 种毒力基因,5%的菌株携带有 6 种毒力基因,其中,*cadF* 和 *cdtB* 毒力基因携带率为 100%。*cadF* 基因在弯曲菌与宿主细胞的黏附和定植过程中起重要作用^[34],Ziprin 等^[35]报道 *cadF* 检出阴性的菌株不能定植在鸡的肠道。*cdtB* 基因参与编码细胞致死性膨胀毒素,这两个基因在弯曲菌中广泛存在,与洪捷等^[36]、李博等^[37]、Nguyen 等^[38]和 Khoshbakht 等^[39]国内外报道的结果一致。*csrA* 具有调控多种毒力表型的作用,包括动力、氧压力耐受以及细菌定植。本研究空肠弯曲菌 *csrA* 的携带率为 34.8%,低于 González-hein 等^[40]报道的 87.3%,同时该作者认为 *csrA* 基因在空肠弯曲菌应激反应中起着重要的调节作用。

有研究表明,*cst- II*^[41]、*cgtB* 和 *wlaN*^[8] 与格林-巴利综合征的发生相关。Louwen 等^[42]发现 *cst- II* 能影响空肠弯曲菌对肠道上皮细胞的侵袭能力,本研究中空肠和结肠弯曲菌 *cst- II* 毒力基因携带率分别为 2.1%和 4.0%,均低于洪捷^[36]报道的江苏地区鸡源空肠弯曲菌 53.8%的携带率。*cgtB* 和 *wlaN* 基因产物与-1,3 半乳糖基转移酶有关。在本研究中,*wlaN* 仅在空肠弯曲菌中检测到,空肠弯曲菌携带率为 10.8%,与 Datta 等^[43]报道的 4.7%的携带率接近,远低于 Khoshbakht 等^[39]报道的 82.2%。Lapierre 等^[19]、Andrzejewska^[44] 等研究报道 *wlaN* 在空肠弯曲菌中的流行率高于结肠弯曲菌,在本研究中结肠弯曲菌未检出 *wlaN* 基因,与以

往的研究结果一致。Khoshbakht 等^[39]报道从肉鸡粪便中分离的弯曲菌,其 *cgtB* 基因携带率为 22.22%,同时发现空肠弯曲菌的携带率是结肠弯曲菌的两倍,有 15 株菌同时检出 *cgtB* 基因和 *wlaN* 基因,其中,10 株为空肠弯曲菌,5 株为结肠弯曲菌,在本研究中,空肠和结肠弯曲菌中均未检测到 *cgtB* 基因。

当弯曲菌高温应激时,可产生包括 ATP-依赖的 *clpP* 热休克蛋白来保护自身^[45-46]。Abu-Madi 等^[47]研究报道在卡塔尔零售点分离的空肠弯曲菌中,*clpP* 基因携带率为 95.9%,作者分析其携带率高的原因可能是 *clpP* 基因的表达能帮助弯曲菌在夏季高温条件下存活。而本研究中 *clpP* 携带率低于该文献的报道。空肠弯曲菌 *htrB* 基因编码脂质 A 合成的酰基转移酶^[16, 48],该酶的合成能调节机体对环境变化的反应,该基因在弯曲菌中相对保守。在本次研究中 *htrB* 基因具有高的流行率,表明该基因对宿主主体内该细菌生存具有重要的调节作用。

4 结 论

江苏省畜禽养殖场弯曲菌分离率较高,分离株多重耐药现象严重,毒力基因分布广泛,检出与格林-巴利综合征相关的毒力基因。因此,在畜禽生产上,应谨慎使用抗菌药物,尤其是氟喹诺酮类和大环内酯类药物的使用,同时应加强弯曲菌的耐药及毒力基因监测。

参考文献 (References):

[1] RUIZ-PALACIOS G M. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken[J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(5):701-703.

[2] LI Y F, XIE X B, XU X B, et al. Nontyphoidal *salmonella* infection in children with acute gastroenteritis: prevalence, serotypes, and antimicrobial resistance in Shanghai, China[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2014, 11(3):200-206.

[3] FITZGERALD C. *Campylobacter* [J]. *Clin Lab Med*, 2015, 35(2):289-298.

[4] ENGBERG J, AARESTRUP F M, TAYLOR D E, et al. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates[J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(1):24-34.

[5] AARESTRUP F M, ENGBERG J. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*[J]. *Vet Res*, 2001, 32(3-4):311-321.

[6] GARCÍA-FERNÁNDEZ A, DIONISI A M, ARENA S, et al. Human *Campylobacteriosis* in Italy: emergence of multi-drug resistance to ciprofloxacin, tetracycline, and erythromycin [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9:1906.

[7] Eurosurveillance Editorial Team. European union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2012 published[J]. *Eurosurveillance*, 2014, 19(12):20748.

[8] RAEISI M, KHOSHBAKHT R, GHAEMI E A, et al. Antimicrobial resistance and virulence-associated genes of *Campylobacter* spp. isolated from raw milk, fish, poultry, and red meat[J]. *Microb Drug Resist*, 2017, 23(7):925-933.

[9] KAAKOUSH N O, CASTAÑO-RODRÍGUEZ N, MITCHELL H M, et al. Global epidemiology of *Campylobacter* infection [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(3):687-720.

[10] ACKE E, MCGILL K, QUINN T, et al. Antimicrobial resistance profiles and mechanisms of resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from pets [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2009, 6(6):705-710.

[11] LIN J. Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2009, 6(7):755-765.

[12] PATRONE V, CAMPANA R, VALLORANI L, et al. CadF expression in *Campylobacter jejuni* strains incubated under low-temperature water microcosm conditions which induce the viable but non-culturable (VBNC) state [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103(5):979-988.

[13] DEFRAITES R F, SANCHEZ J L, BRANDT C A, et al. An outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with a community water supply on a U. S. military installation[J]. *MSMR*, 2014, 21(11):10-15.

[14] FREES D, BRØNDSTED L, INGMER H. Bacterial proteases and virulence[M]//DOUGAN D A. Regulated Proteolysis in Microorganisms. Dordrecht: Springer, 2013:161-192.

[15] HUGHES R A, CORNBLATH D R. Guillain-Barré syndrome[J]. *Lancet*, 2005, 366(9497):1653-1666.

[16] PARKHILL J, WREN B W, MUNGALL K, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen

- Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences [J]. *Nature*, 2000, 403(6770):665-668.
- [17] HAUSDORF L, NEUMANN M, BERGMANN I, et al. Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter* spp. in a spinach-processing plant and evaluation of two *Arcobacter*-specific quantitative PCR assays[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2013, 36(4):235-243.
- [18] OTIGBU A C, CLARKE A M, FRI J, et al. Antibiotic sensitivity profiling and virulence potential of *Campylobacter jejuni* isolates from estuarine water in the Eastern Cape Province, South Africa[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(5):925.
- [19] LAPIERRE L, GATICA M A, RIQUELME V, et al. Characterization of antimicrobial susceptibility and its association with virulence genes related to adherence, invasion, and cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from animals, meat, and humans[J]. *Microb Drug Resist*, 2016, 22(5):432-444.
- [20] LINTON D, GILBERT M, HITCHEN P G, et al. Phase variation of a β -1, 3 galactosyltransferase involved in generation of the ganglioside GM₁-like lipo-oligosaccharide of *Campylobacter jejuni*[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 37(3):501-514.
- [21] 唐梦君, 周倩, 张小燕, 等. 肉鸡屠宰加工生产链中弯曲菌污染状况及耐药性分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(12):1131-1136.
- TANG M J, ZHOU Q, ZHANG X Y, et al. Prevalence and antimicrobial resistance analysis of *Campylobacter* spp. from broiler slaughter and processing chain[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2018, 34(12):1131-1136. (in Chinese)
- [22] GRIFFITHS P L, PARK R W A. *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease[J]. *J Appl Bacteriol*, 1990, 69(3):281-301.
- [23] 邓凤如. 耐药基因岛在我国部分地区动物源和人源弯曲菌中的流行和传播[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- DENG F R. Prevalence and dissemination of the resistance genomic islands in *Campylobacter* isolates from food animals and patients in partial areas of China [D]. Beijing: China Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [24] ALTER T, GAULL F, KASIMIR S, et al. Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms[J]. *Vet Microbiol*, 2005, 108(3-4):251-261.
- [25] KEMPF I, KEROUANTON A, BOUGEARD S, et al. *Campylobacter coli* in organic and conventional pig production in France and Sweden: prevalence and antimicrobial resistance[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8:955.
- [26] MILNES A S, STEWART I, CLIFTON-HADLEY F A, et al. Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003[J]. *Epidemiol Infect*, 2008, 136(6):739-751.
- [27] SAHIN O, KASSEM I I, SHEN Z Q, et al. *Campylobacter* in poultry: ecology and potential interventions[J]. *Avian Dis*, 2015, 59(2):185-200.
- [28] 张小燕, 周倩, 唐梦君, 等. 江苏地区鸡源弯曲杆菌分离鉴定及耐药性研究[J]. *中国家禽*, 2017, 39(18):23-27.
- ZHANG X Y, ZHOU Q, TANG M J, et al. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility profiles of *Campylobacter* isolates from chickens in Jiangsu Province[J]. *China Poultry*, 2017, 39(18):23-27. (in Chinese)
- [29] BESTER L A, ESSACK S Y. Prevalence of antibiotic resistance in *Campylobacter* isolates from commercial poultry suppliers in KwaZulu-Natal, South Africa [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62(6):1298-1300.
- [30] ZHANG M J, LIU X Y, XU X B, et al. Molecular subtyping and antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter coli* isolates from diarrheal patients and food-producing animals in China[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2014, 11(8):610-619.
- [31] CHEN X, NAREN G W, WU C M, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 144(1-2):133-139.
- [32] LIM S K, MOON D C, CHAE M H, et al. Macrolide resistance mechanisms and virulence factors in erythromycin-resistant *Campylobacter* species isolated from chicken and swine feces and carcasses[J]. *J Vet Med Sci*, 2017, 78(12):1791-1795.
- [33] ZHAO S, YOUNG S R, TONG E, et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from retail meat in the United States between 2002 and 2007[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(24):7949-7956.
- [34] MONTEVILLE M R, YOON J E, KONKEL M E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by

- Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization[J]. *Microbiology*, 2003, 149(1):153-165.
- [35] ZIPRIN R L, YOUNG C R, STANKER L H, et al. The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein[J]. *Avian Dis*, 1999, 43(3):586-589.
- [36] 洪捷, 马恺, 谈忠鸣. 江苏地区不同来源空肠弯曲菌菌株毒力基因分布[J]. *江苏预防医学*, 2015, 26(1):13-15.
HONG J, MA K, TAN Z M. Prevalence of virulence genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from different origins in Jiangsu Province[J]. *Jiangsu Journal of Preventive Medicine*, 2015, 26(1):13-15. (in Chinese)
- [37] 李博, 陈辉, 鞠长燕, 等. 深圳地区不同来源空肠弯曲菌毒力基因分布及分子分型研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(5):107-109, 112.
LI B, CHEN H, JU C Y, et al. Study on the differences of virulence genes and molecular typing in *Campylobacter jejuni* isolates from poultry products and diarrhea patients in Shenzhen[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2016, 31(5):107-109, 112. (in Chinese)
- [38] NGUYEN T N M, HOTZEL H, EL-ADAWY H, et al. Genotyping and antibiotic resistance of thermophilic *Campylobacter* isolated from chicken and pig meat in Vietnam[J]. *Gut Pathog*, 2016, 8:19.
- [39] KHOSHBAKHT R, TABATABAEI M, HOSSEINZADEH S, et al. Distribution of nine virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from broiler feces in Shiraz, Southern Iran[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2013, 10(9):764-770.
- [40] GONZÁLEZ-HEIN G, HUARACÁN B, GARCÍA P, et al. Prevalence of virulence genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from human, bovine and broiler[J]. *Braz J Microbiol*, 2013, 44(4):1223-1229.
- [41] PARKER C T, HORN S T, GILBERT M, et al. Comparison of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide biosynthesis loci from a variety of sources[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(6):2771-2781.
- [42] LOUWEN R, HEIKEMA A, VAN BELKUM A, et al. The sialylated lipooligosaccharide outer core in *Campylobacter jejuni* is an important determinant for epithelial cell invasion[J]. *Infect Immun*, 2008, 76(10):4431-4438.
- [43] DATTA S, NIWA H, ITOH K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces[J]. *J Med Microbiol*, 2003, 52(4):345-348.
- [44] ANDRZEJEWSKA M, SZCZEPANSKA B, SPICA D, et al. Prevalence, virulence, and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in raw milk, beef, and pork meat in Northern Poland[J]. *Foods*, 2019, 8(9):420.
- [45] KONKEL M E, KIM B J, KLENA J D, et al. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni* [J]. *Infect Immun*, 1998, 66(8):3666-3672.
- [46] STINTZI A. Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation[J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(6):2009-2016.
- [47] ABU-MADI M, BEHNKE J M, SHARMA A, et al. Prevalence of virulence/stress genes in *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in Qatari retail outlets[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6):e0156938.
- [48] GILBERT M, KARWASKI M F, BERNATCHEZ S, et al. The genetic bases for the variation in the lipooligosaccharide of the mucosal pathogen, *Campylobacter jejuni*: biosynthesis of sialylated ganglioside mimics in the core oligosaccharide[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(1):327-337.

(编辑 白永平)