

东北市售鸡肉中空肠弯曲杆菌的分离鉴定、分型及耐药性分析

Isolation, identification, multilocus sequence typing analysis and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from commercial chicken in northeast China

费鹏¹ 赵胜娟¹ 姜亦超² 江岩³ 刘丽莉¹

FEI Peng¹ ZHAO Sheng-juan¹ JIANG Yi-chao² JIANG Yan³ LIU Li-li¹

肖枫¹ 张慧芸¹ 唐浩国¹ 康怀彬¹

XIAO Feng¹ ZHANG Hui-yun¹ TANG Hao-guo¹ KANG Huai-bin¹

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2. 长白山食品药品检验检测中心, 吉林 白山 134500; 3. 穆棱市食品检验检测中心, 黑龙江 牡丹江 157500)

(1. College of Food and Biological Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2. Changbai Mountain Food and Drug Inspection Testing Center, Baishan, Jilin 134500, China; 3. MuLeng City Food Inspection Testing Center, Mudanjiang, Heilongjiang 157500, China)

摘要:为了揭示东北地区市售鸡肉中空肠弯曲杆菌的污染情况、种群特征及耐药性。采集东北地区市售鸡肉样品1 000份,分离鉴定空肠弯曲杆菌。通过多位点序列分型技术分析空肠弯曲杆菌的遗传多样性。利用K-B琼脂扩散法检测该致病菌对8种抗生素的耐药性。结果表明:1 000份样品中共分离出62株空肠弯曲杆菌,污染率为6.2%;62株空肠弯曲杆菌被分为14个序列型(Sequence Type, ST),其中ST5和ST1为该种群的优势ST;耐药性分析结果显示,62株空肠弯曲杆菌对环丙沙星、复方新诺明和头孢噻肟具有高度的敏感性。

关键词:鸡肉;空肠弯曲杆菌;分离鉴定;多位点序列分型;耐药性

Abstract: In order to reveal the contamination, population characteristics and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from commercial chicken in Northeast China, 1 000 chicken samples were collected from the Northeast China. *C. jejuni* was isolated and identified. The genetic diversity of *C. jejuni* was analyzed by multilocus sequence typing (MLST). The antimicrobial resistance of *C. je-*

juni to 8 antibiotics was detected by K-B AGAR diffusion method. The results indicated that 62 *C. jejuni* strains were isolated from 1 000 chicken samples with a contamination rate of 6.2%, and were divided into 14 sequence types (STs). Among them, ST1 and ST5 were the dominant STs. The results of antimicrobial resistance analysis showed that 62 *C. jejuni* strains were highly sensitive to ciprofloxacin, compound sinomin and cefotaxime.

Keywords: commercial Chicken; *Campylobacter jejuni*; isolation and identification; multilocus sequence typing; antimicrobial resistance

空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)是常见的食源性致病菌之一,主要存在于家畜家禽等动物体内,其中鸡是最易携带该致病菌的动物^[1-3]。中国是鸡肉的消费大国,食用未煮熟的鸡肉是感染空肠弯曲杆菌的主要原因,感染该致病菌会导致患者腹泻、关节炎和格林-巴利综合征等疾病,严重地危害了消费者的健康^[4-5]。空肠弯曲杆菌具有高度的遗传多样性,且对抗生素有较强的耐药性,给充分认识和有效控制该致病菌带来了难题^[6-7]。

对空肠弯曲杆菌遗传多样性的研究有助于揭示特定环境中该致病菌的种群特征,增加对空肠弯曲杆菌的认识,该方向的研究已被研究者们关注^[8-10]。陈荀等^[11]利用脉冲场电泳技术对鸡肉产业链中(粪便、屠宰场中鸡肉)的空肠弯曲杆菌进行了分型研究,结果表明,83株供试菌株被分为了45

基金项目:河南科技大学博士科研启动基金项目(编号:13480066);河南省重点攻关项目(编号:161100110900)

作者简介:费鹏,女,河南科技大学讲师,博士。

通信作者:康怀彬(1963—),男,河南科技大学教授,硕士。

E-mail: khbin001@163.com

收稿日期:2018-02-25

个不同的分子型,揭示了鸡肉产业链中该致病菌的分子特征。脉冲场电泳技术的结果并不能揭示基因层面的信息,其结果也不能实现实验室之间的数据共享,而多位点序列分型(Multilocus Sequence typing, MLST)技术能够弥补上述不足^[12]。Ma等^[6]利用 MLST 技术对天津地区市售鸡肉中的空肠弯曲杆菌进行了分析,研究发现 42 株空肠弯曲杆菌被分成了 22 个不同的序列型(Sequence Type, ST),并分析了不同 STs 空肠弯曲杆菌的系统发育关系。洪捷等^[13]则利用 MLST 技术研究了分离自江苏地区空肠弯曲杆菌的种群特征,31 株空肠弯曲杆菌被分成了 21 个 STs。上述报道一定程度上揭示了禽肉及鸡肉产业链中空肠弯曲杆菌的遗传多样性,然而关于东北地区市售鸡肉中的空肠弯曲杆菌种群特征的研究尚未见报道。

目前,使用抗生素是治疗空肠弯曲杆菌感染最有效和常用的方法。然而,随着抗生素的滥用和长时间的使用,菌株很有可能产生耐药性。黄金林等^[14]发现奶牛源的空肠弯曲杆菌具有多重耐药性。周倩等^[15]分析了禽源的空肠弯曲杆菌的耐药性,发现了一株对 92.6%的抗生素都具有耐药性的菌株。Yang 等^[9]发现长时间的红外突变处理能够显著地提高空肠弯曲杆菌杆菌对环丙沙星、萘啶酸、四环素、强力霉素、氟苯尼考、氯霉素和庆大霉素的耐受性。这些研究表明,对空肠弯曲杆菌进行及时的耐药性监测是非常必要的。

本研究以东北地区市售鸡肉为研究对象,对其空肠弯曲杆菌的污染情况进行调查,利用 MLST 技术分析其遗传多样性,系统地揭示东北地区市售鸡肉中空肠弯曲杆菌的种群特征。在此基础上,对分离株进行耐药性监测,以期为市售鸡肉中空肠弯曲杆菌的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

样品采集:2017 年 1 月~11 月,采集东北地区市售的鸡肉样品 1 000 份,其中鸡胸肉和鸡翅各 500 份,用无菌棉签擦拭(3 cm×3 cm),并保存在磷酸盐(phosphate buffered saline,PBS)缓冲液中,低温保存运往实验室;

溶菌肉汤(Lysogeny Broth, LB)、PBS 缓冲液、脱纤维绵羊血、CCDA 选择性培养基;青岛海博生物技术有限公司;
21 种药敏纸片:北京兰伯瑞生物技术有限公司;
引物合成:苏州金唯智生物科技有限公司;
细菌全基因组 DNA 试剂盒、2×PCR Master Mix;天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 主要仪器设备

高速台式离心机:GT10-1 型,北京时代北利离心机有限公司;
高压灭菌锅:SANYO 型,上海迭戈生物科技有限公司;
恒温培养箱:DNP-9272A 型,常州诺基仪器有限公司;
电泳仪:BIO-RAD 型,北京伯乐生命科学发展有限公司;
生物洁净工作台:BCW-1000 型,北京东联哈尔仪器制造有限公司;

PCR 仪:Veriti®型,北京昊诺斯科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 空肠弯曲杆菌的分离鉴定 根据周倩等^[15]的方法,取 100 μL PBS 稀释液,对其进行分离纯化。挑取单菌落,接种在 5%脱纤维羊血的 LB 肉汤培养基中,在微需氧(10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂)、37 ℃的条件下培养 48 h。吸取空肠弯曲杆菌菌液 2 mL,根据细菌全基因组 DNA 试剂盒说明书对其进行 DNA 提取,利用 16S rRNA 测序技术进行鉴定。
1.3.2 看家基因 PCR 扩增及测序 按照 Lévesque 等^[16]的报道合成引物(*aspA*、*glnA*、*gltA*、*glyA*、*pgm*、*tkt* 和 *uncA*),以空肠弯曲杆菌 DNA 为模板,对其进行 PCR 扩增。扩增体系(50 μL)为:DNA 模板 2 μL,2×PCR Master Mix 25 μL,双蒸水 23 μL。7 对引物的反应体系相同,均为:94 ℃预变性 10 min,30 个循环(94 ℃,1 min;50 ℃,1 min;72 ℃,1 min),最后 72 ℃延伸 10 min。利用 1%的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行验证,并对 PCR 产物进行基因测序分析。
1.3.3 空肠弯曲杆菌 MLST 分析 登陆空肠弯曲杆菌 MLST 数据库(<http://pubmlst.org/campylobacter/>),将看家基因的基因测序结果在数据库中进行比对,得到 7 个看家基因的等位基因号,并根据 7 个等位基因号确定空肠弯曲杆菌的序列型(Sequence Type, ST),并利用 MEGA6.0 软件对串序列进行最小似然系统发育分析。
1.3.4 空肠弯曲杆菌的耐药性分析 选取 8 种抗生素,利用美国临床实验室标准化研究所(CLSI)推荐的 K-B 琼脂扩散法,分析空肠弯曲杆菌的耐药性。将活化的菌液稀释至 0.5 麦氏浓度,然后根据药敏纸片说明书进行测试,在微需氧、37 ℃的条件下培养 48 h,根据抑菌圈直径的大小(mm)按 CLSI/NCCLS 评估空肠弯曲杆菌的耐药性。

2 结果与分析

2.1 东北地区市售鸡肉中空肠弯曲杆菌的污染情况

东北地区 1 000 份市售鸡肉中共有 62 份空肠弯曲杆菌阳性样品,总污染率为 6.2%,具体见表 1。62 份阳性样品中鸡胸肉样品 37 份(7.4%),鸡翅样品 25 份(5.0%),可见鸡胸肉中空肠弯曲杆菌的污染率高于鸡翅。东北 5 个不同地区市售鸡肉空肠弯曲菌的污染率分别为 5.5%(A)、5.5%(B)、7.5%(C)、6.0%(D)、6.5%(E)。在 2012 年和 2013 年的调查中发现鸡肉中空肠弯曲杆菌的污染分别为 11.5%^[17]和

表 1 东北地区市售鸡肉空肠弯曲杆菌污染情况[†]
Table 1 The contamination of *C. jejuni* in commercial chicken in Northeast China %

地区	鸡胸肉	鸡翅	总污染率
A	7	4	5.5
B	6	5	5.5
C	9	6	7.5
D	7	5	6.0
E	8	5	6.5

† 样品数为 100。

13.66%^[18],本研究中东北地区市售鸡肉中该致病菌的污染率为 6.2%,明显低于之前的污染率。

2.2 东北地区市售鸡肉中空肠弯曲杆菌的 MLST 分析

将 62 株空肠弯曲杆菌看家基因的序列在数据库中进行比对,得到看家基因等位基因号和 ST,结果见表 2。62 株空肠弯曲杆菌被分为了 14 个 ST,分别为 ST1(15 株)、ST5(24 株)、ST28(2 株)、ST52(4 株)、ST64(4 株)、ST88(3 株)、ST90(1 株)、ST236(1 株)、ST456(2 株)、ST751(1 株)、

ST905(1 株)、ST1222(2 株)、ST3228(1 株)和 ST3242(1 株),说明该致病菌具有较高的遗传多样性。其中 ST5 和 ST1 型的空肠弯曲杆菌分别占总菌株数的 31.87% 和 24.19%,是鸡肉中空肠弯曲杆菌的优势 ST。在董俊等^[19]的研究中显示分离自湖北地区禽类的空肠弯曲杆菌的优势 ST353 和 ST464。这些与本研究的结果并不一致,是因为空肠弯曲杆菌的分离地区和来源不同,说明不同地区和来源的空肠弯曲杆菌在种群组成上存在差异。

表 2 62 株空肠弯曲杆菌 MLST 分析结果
Table 2 MLST analysis results of 62 *C. jejuni* strains

ST	等位基因							数量
	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkf</i>	<i>uncA</i>	
1	2	1	54	3	4	1	5	15
5	7	2	5	2	10	3	6	24
28	64	19	20	77	94	54	16	2
52	9	25	2	10	22	3	6	4
64	1	6	15	24	12	28	1	4
88	4	7	10	4	36	28	1	3
90	2	1	1	3	2	27	5	1
236	3	4	1	4	19	1	5	1
456	59	1	12	3	2	12	5	2
751	7	7	40	4	42	7	1	1
905	2	15	4	3	154	25	35	1
1222	4	7	140	4	1	7	1	2
3228	10	1	16	322	10	5	7	1
3242	33	39	30	79	188	164	17	1

2.3 不同 ST 空肠弯曲杆菌的系统发育分析

以不同 ST 的空肠弯曲杆菌看家基因串联序列为研究对象,利用 MEGA6.0 软件构建最小似然算法系统发育树,得到了清晰的系统发育关系,结果见图 1。在 14 个不同的 ST 中,ST90 和 ST456,ST88 和 ST1222 之间具有较近的系统发育关系,说明上述 2 组 ST 的菌株可能具有相近的生物学特

性和侵染特性。ST3242 明显远离了其他 13 个 ST,说明 ST324 的空肠弯曲杆菌与其他菌株亲缘上有一定的距离,因此该菌株应该进行进一步的研究,确定其是否有独特的侵染和致病能力。

2.4 空肠弯曲杆菌耐药性分析

62 株空肠弯曲杆菌对 8 种抗生素的耐药性分析结果见表 3,在 8 种抗生素中对环丙沙星和复方新诺明的耐受率为 0%,对其他 6 种抗生素的耐受率分别为 91.94%(红霉素),88.71%(庆大霉素),74.19%(克林霉素),38.71%(青霉素),



图 1 不同 ST 空肠弯曲杆菌 7 个看家基因串联序列最小似然系统发育树
Figure 1 Maximum-likelihood tree of splicing sequence of 7 housekeeping genes in *C. jejuni* with different STs

表 3 62 株空肠弯曲杆菌耐药性分析 Table 3 Antibiotic susceptibility of 62 <i>C. jejuni</i> strains				
抗生素	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{Disc}^{-1}$)	空肠弯曲杆菌数量(百分比)		
		敏感	中敏	耐药
头孢噻肟	30	57(91.94%)	1(1.60%)	4(6.45%)
环丙沙星	5	60(96.77%)	2(3.23%)	0(0.00%)
红霉素	15	3(4.84%)	2(3.23%)	57(91.94%)
四环素	30	42(67.74%)	4(6.45%)	16(25.81%)
克林霉素	2	6(9.68%)	10(16.13%)	46(74.19%)
青霉素	10	36(58.07%)	12(19.36%)	24(38.71%)
庆大霉素	10	7(11.29%)	0(0.00%)	55(88.71%)
复方新诺明	25	58(93.55%)	4(6.45%)	0(0.00%)

25.81%(四环素),6.45%(头孢噻肟)。这些结果表明空肠弯曲杆菌对大多数的抗生素都产生了耐药性,而所有的受试菌株都不耐受环丙沙星和复方新诺明,因此可以利用这 2 种抗生素预防和治疗空肠弯曲杆菌的感染。

3 结论

本研究调查了东北地区市售鸡肉中空肠弯曲杆菌的污染情况,其污染率为 6.2%。62 株空肠弯曲杆菌被分为了 14 个 ST,分别为 ST1、ST5、ST28、ST52、ST64、ST88、ST90、ST236、ST456、ST751、ST905、ST1222、ST3228 和 ST3242,其中 ST5 和 ST1 为优势的 STs,说明空肠弯曲杆菌具有丰富的遗传多样性。抗生素耐药性分析表明空肠弯曲杆菌对环丙沙星、复方新诺明和头孢噻肟具有高度的敏感性,而对红霉素、庆大霉素、克林霉素、青霉素和四环素的耐受性较强。本研究的结果有助于了解东北地区市售鸡肉中空肠弯曲杆菌的污染情况、种群特征和抗生素耐药性,为了进一步揭示环境对空肠弯曲杆菌种群特征的影响,接下来的研究将用更为先进的全基因组测序技术分析空肠弯曲杆菌的遗传进化特性,并挖掘与耐药性相关的功能基因。

参考文献

[1] 吴清平,钟显,张菊梅.空肠弯曲杆菌生物膜形成和调控机理研究进展[J].微生物学报,2016,56(2):180-187.

[2] COLLADO L, MUÑOZ N, PORTE L, et al. Genetic diversity and clonal characteristics of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* isolated from Chilean patients with gastroenteritis[J]. Infection Genetics & Evolution, 2018, 58: 290-293.

[3] MOHAN V, STEVENSON M A, MARSHALL J M, et al. Characterisation by multilocus sequence and porA and flaA typing of *Campylobacter jejuni* isolated from samples of dog faeces collected in one city in New Zealand[J]. N Z Vet J, 2017, 65(4): 1-12.

[4] 赵鑫,张凤丽.应用 HACCP 有效防止鸡肉加工熟食过程中的空肠弯曲杆菌感染[J].中国畜牧兽医文摘,2015(6):201-209.

[5] 钟显.食品中空肠弯曲杆菌风险识别及菌株特性研究[D].广州:广东工业大学,2016:1.

[6] MA Hui, SU Yu-lan, MA Lu-yao, et al. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from retail chicken in Tianjin, China[J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(6): 1 032-1 040.

[7] GARCÍASÁNCHEZ L, MELERO B, JAIME I, et al. *Campylobacter jejuni* survival in a poultry processing plant environment[J]. Food Microbiology, 2017, 65: 185-192.

[8] CODY A J, BRAY J E, JOLLEY K A, et al. A core genome multi-locus sequence typing scheme for stable, comparative analyses of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* human disease isolates[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55(7): 2 086-2 097.

[9] YANG Wan-na, ZHANG Mao-jun, ZHOU Ji-yuan, et al. The molecular mechanisms of ciprofloxacin resistance in clinical *Campylobacter jejuni* and their genotyping characteristics in Beijing, China[J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2017, 14(7): 386-392.

[10] VINUEZABURGOS C, WAUTIER M, MARTINY D, et al. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in Ecuadorian broilers at slaughter age[J]. Poultry Science, 2017, 96(7): 2 366-2 374.

[11] 陈荀,刘书亮,吴聪明,等.鸡肉生产链中空肠弯曲杆菌的污染分析及 PFGE 分型研究[J].中国人兽共患病学报,2012,28(10):1 012-1 016.

[12] 费鹏,杨同香,姜亦超,等.克罗诺杆菌分型技术研究进展[J].食品科学,2017,38(21):308-312.

[13] 洪捷,马恺,顾玲.江苏地区空肠弯曲菌多位点序列分型和毒力基因分析[J].中国卫生检验杂志,2017(7):1 006-1 010.

[14] 黄金林,许海燕,张弓,等.江苏奶牛空肠弯曲菌和结肠弯曲菌流行状况及耐药性分析[J].中国人兽共患病学报,2007,23(10):1 016-1 020.

[15] 周倩,唐梦君,张小燕,等.江苏省禽源空肠弯曲杆菌的分离鉴定及耐药性研究[J].中国人兽共患病学报,2017,33(6):495-500.

[16] LÉVESQUE S, FROST E, ARBEIT R D, et al. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw Milk, and environmental water in Quebec, Canada[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(10): 3 404-3 411.

[17] 韩新锋,刘书亮,张晓利,等.鸡肉空肠弯曲杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J].中国人兽共患病学报,2012,28(1):31-36.

[18] 陈娜娜,陆思琴,陈荀,等.鸡肉空肠弯曲杆菌的污染率与耐药性分析[J].中国兽医杂志,2013,49(2):7-9.

[19] 董俊,韩梅,周康,等.47 株空肠弯曲菌湖北禽源株的多位点序列分型[J].微生物学报,2016,56(1):150-156.

信息窗

欧盟审查双炔酰菌胺的最大残留限量

据欧盟食品安全局(EFSA)消息,近日,欧盟食品安全局就审查双炔酰菌胺(mandipropamid)的最大残留限量发布意见。

根据欧盟(EC)No 396/2005 的第 12 章的规定,欧盟食品安全局审查了双炔酰菌胺(mandipropamid)的最大残留限量。

为了解双炔酰菌胺在植物、加工商品、轮作农作物以及牲畜中的最大残留限量,欧盟食品安全局参考了(EU)No 188/2011 号委员会条例相关结论、食品法典委员会与成员国的限量规定。

在现有数据基础之上,EFSA 得出最大残留限量提案并开展了消费者风险评估。经过评估,欧盟食品安全局认为,由于缺少部分数据,消费者风险评估仅被认为是指示性的,部分最大残留限量提议需要进一步评估。

(来源: <http://news.foodmate.net>)