

肉与肉制品空肠弯曲菌耐药性和多位点序列分型

刘海霞, 耿英芝, 王伟杰, 李雪, 张眉眉

辽宁省疾病预防控制中心检验检测所, 辽宁 沈阳 110005

摘要: **目的** 了解辽宁省肉与肉制品中分离的空肠弯曲菌的耐药性和多位点序列分型 (MLST), 为防治食源性空肠弯曲菌感染提供依据。**方法** 于2020年对9株分离自肉与肉制品检测样品的空肠弯曲菌进行全基因组测序, 采用琼脂稀释法检测最低抑菌浓度, 分析菌株耐药性。采用微生物耐药机制溯源参比数据库及分析系统鉴定 MLST 型别。**结果** 检出耐药株6株, 多重耐药株4株。对四环素、萘啶酸、环丙沙星、氟苯尼考、庆大霉素和链霉素耐药分别为6、5、4、2、1和1株; 对阿奇霉素、氯霉素和克林霉素敏感。9株空肠弯曲菌检出6种ST型别, 以ST45和ST2274为主, ST未分型1株。ST45型的KW028和KW029亲缘关系较近, 同源性较高; ST2274型的KW040和KW042亲缘关系较近, 同源性较高; ST6701型的KW007与ST2274型的KW040、KW042遗传亲缘关系较近, 仅相差1个pgm管家基因。**结论** 9株分离自肉与肉制品检测样品的空肠弯曲菌对四环素、萘啶酸和环丙沙星耐药率较高, 以ST45和ST2274为主。

关键词: 空肠弯曲菌; 耐药性; 多位点序列分型

中图分类号: R117 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2023) 04-0342-04

Antimicrobial resistance in and multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* in meat and meat products

LIU Haixia, GENG Yingzhi, WANG Weijie, LI Xue, ZHANG Meimei

Institute of Inspection and Testing, Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shenyang, Liaoning 110005, China

Abstract: Objective To investigate the antimicrobial resistance in and multilocus sequence typing (MLST) of *Campylobacter jejuni* in meat and meat products in Liaoning Province, so as to provide insights into the management of *C. jejuni* infection. **Methods** Nine *C. jejuni* isolates from meat and meat products in 2020 were subjected to whole genome sequencing, and the minimum inhibitory concentration was measured with the agar dilution method. MLST of *C. jejuni* isolates was performed with the microbial resistance mechanism traceability reference database and analysis system. **Results** Six drug-resistant *C. jejuni* isolates were detected, and there were four multidrug-resistant isolates. There were six *C. jejuni* isolates resistant to tetracycline, five isolates resistant to nalidixic acid, four isolates resistant to ciprofloxacin, two isolates resistant to florfenicol, one isolate resistant to gentamicin and one isolate resistant to streptomycin. Nine *C. jejuni* isolates showed sensitive to azithromycin, chloramphenicol and clindamycin. MLST identified six ST types in nine *C. jejuni* isolates, with ST45 and ST2274 as the predominant type, and detected one isolate with unclassified ST type. Phylogenetic analysis showed that KW028 and KW029 of ST45 type were closely related and had high homology, and KW040 and KW042 of ST2274 type were closely related with high homology, while KW007 of ST6701 type was closely related to KW040 and KW042 of ST2274 type, with only one pgm housekeeper gene in difference. **Conclusions** High resistance to tetracycline, nalidixic acid and ciprofloxacin was detected in nine *C. jejuni* isolates from meat and meat products, and ST45 and ST2274 were predominant ST types of *C. jejuni*.

Keywords: *Campylobacter jejuni*; drug resistance; multilocus sequence typing

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2023.04.017

作者简介: 刘海霞, 本科, 主管技师, 主要从事食源性致病微生物检测工作

通信作者: 张眉眉, E-mail: zangmeimei@163.com

弯曲菌是人畜共患病原菌, 90% 的弯曲菌感染由空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 导致^[1-2]。空肠弯曲菌是革兰阴性菌, 微需氧环境生长, 可寄居在牛、羊等牲畜的肠道中, 通过排泄物污染食物和水源, 可引发消化道疾病、吉兰-巴雷综合征和反应性关节炎。临床上常使用大环内酯类、氯霉素类和喹诺酮类抗生素治疗空肠弯曲菌感染。近年来, 空肠弯曲菌耐药水平不断上升。2017年世界卫生组织(WHO)指出喹诺酮耐药弯曲菌是威胁人类健康的“十二恶菌”之一^[3]。《2019年美国抗生素耐药性威胁》报告显示, 耐药弯曲菌居严重威胁榜第一位^[4]。多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是一种基于核酸序列测定细菌分型的方法, 与传统分子生物学分型方法相比, 分辨力高、操作简单, 能识别更多亚型, 并确定不同ST型别间的系统发育关系及其与疾病的联系^[5]。本研究选择肉与肉制品中检出的空肠弯曲菌进行全基因组测序, 分析耐药性和MLST分型, 为防治食源性空肠弯曲菌感染提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 9株空肠弯曲菌分离自2020年辽宁省126份市售肉与肉制品。样品来源于农贸市场、超市、零售店和网络店铺, 包括预包装样品30份和散装样品96份。经辽宁省疾病预防控制中心复核确认。药敏试验质控菌株空肠弯曲菌 ATCC 33560 由美国典型微生物保藏中心生产。

1.2 主要仪器与试剂 BioNumerics 分析系统, 全自动核酸提取系统 Qiagen QIACUBEDNA (德国 Qiagen 公司); 实时荧光定量 PCR 检测系统 (BAXQ7, 美国杜邦); 生物安全柜 (NU-425-400E Glass II, 美国 NuAire)。哥伦比亚血琼脂 (北京陆桥技术股份有限公司); QIAamp Viral DNA Mini Kit (德国 Qiagen); 空肠弯曲菌核酸检测试剂盒, 弯曲菌琼脂稀释法抗生素最低抑菌浓度检测试剂盒 (青岛中创生物科技有限公司)。以上所有试剂均在有效期内使用。

1.3 方法

1.3.1 菌株复苏 将冷冻的空肠弯曲菌菌株在微需氧条件下, 使用哥伦比亚血琼脂 42℃培养 48 h, 传至三代备用。

1.3.2 核酸制备和鉴定 按照仪器操作规范, 采用全自动核酸提取系统 Qiagen QIACUBEDNA 提取纯培养的空肠弯曲菌核酸。依据 GB 4789.9—2014《食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 空肠弯曲菌检

验》^[6], 采用空肠弯曲菌核酸检测试剂盒鉴定菌株, 预变性 94℃, 5 min, 1 个循环; 变性 94℃, 15 s, 45 个循环; 退火、延伸及检测荧光 60℃, 1 min, 45 个循环, 检测通道为 HEX。

1.3.3 药敏试验 采用琼脂稀释法检测红霉素、阿奇霉素、萘啶酸、环丙沙星、庆大霉素、链霉素、氯霉素、氟苯尼考、四环素、泰利霉素和克林霉素对空肠弯曲菌的最低抑菌浓度, 按照药敏检测板使用说明书, 人工判读最低抑菌浓度, 并依据美国抗生素耐药性监测系统 (NARMS-2014) 判定敏感和耐药。耐 3 种及以上抗生素的菌株为多重耐药株。

1.3.4 MLST 分析 将提取的核酸送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行二代测序分析。分析数据平台为国家食品安全风险评估中心的全民健康保障信息化工程食品安全风险评估业务应用平台微生物耐药机制溯源参比数据库及分析系统 1.0 (<https://sppt.cfsa.net.cn:8207/bacsys/software>)。测序数据来源于北京诺禾致源生物信息科技有限公司。经测序分析后, 系统直接显示 ST 型别。该系统使用 Prokka 1.14.6 软件 (<https://github.com/tseemann/prokka>) 对组装完成的细菌基因组进行注释^[7-8]。将组装完成的细菌基因组序列上 MlSt 2.11 软件 (<https://github.com/tseemann/mlst>) 分析 MLST 型别^[9], 将所有菌株的测序数据传入 BioNumerics 7.6 系统后, 聚类分析并构建最小生成树。

2 结果

2.1 药敏试验结果 9株空肠弯曲菌检出耐药株 6 株, 多重耐药株 4 株。对四环素、萘啶酸、环丙沙星、氟苯尼考、庆大霉素和链霉素耐药分别为 6、5、4、2、1 和 1 株; 对阿奇霉素、氯霉素和克林霉素敏感。对萘啶酸、环丙沙星和四环素 3 种抗生素耐药 1 株; 对萘啶酸、环丙沙星、氟苯尼考和四环素 4 种抗生素耐药 2 株; 对萘啶酸、环丙沙星、庆大霉素、链霉素和四环素 5 种抗生素耐药 1 株 (菌株型号 KW011)。

2.2 MLST 分析结果 9株空肠弯曲菌共检出 6 种 ST 型别, 分别为 ST45 和 ST2274 各 2 株, ST6701、ST8089、ST354 和 ST51 各 1 株, 见表 1。亲缘关系结果显示: ST45 型的 KW028 和 KW029 亲缘关系较近, 同源性较高; ST2274 型的 KW040 和 KW042 亲缘关系较近, 同源性较高; ST6701 型的 KW007 与 ST2274 型的 KW040、KW042 仅相差 1 个 *pgm* 管家基因, 亲缘关系较近; ST 未分型 1 株。见图 1。

表 1 9 株空肠弯曲菌 ST 型别
Table 1 ST types of 9 *Campylobacter jejuni* isolates

菌株型号	ST 基因型	管家基因
KW007	6701	aspA(9), glnA(17), gltA(5), glyA(10), pgm(10), tkt(3), uncA(3)
KW008	—	aspA(2), glnA(23), gltA(4), glyA(64), pgm(488), tkt(25), uncA(23)
KW011	8089	aspA(8), glnA(455), gltA(291), glyA(668), pgm(127), tkt(24), uncA(19)
KW016	354	aspA(8), glnA(10), gltA(2), glyA(2), pgm(11), tkt(12), uncA(6)
KW028	45	aspA(4), glnA(7), gltA(10), glyA(4), pgm(1), tkt(7), uncA(1)
KW029	45	aspA(4), glnA(7), gltA(10), glyA(4), pgm(1), tkt(7), uncA(1)
KW040	2274	aspA(9), glnA(17), gltA(5), glyA(10), pgm(350), tkt(3), uncA(3)
KW042	2274	aspA(9), glnA(17), gltA(5), glyA(10), pgm(350), tkt(3), uncA(3)
KW079	51	aspA(7), glnA(17), gltA(2), glyA(15), pgm(23), tkt(3), uncA(12)

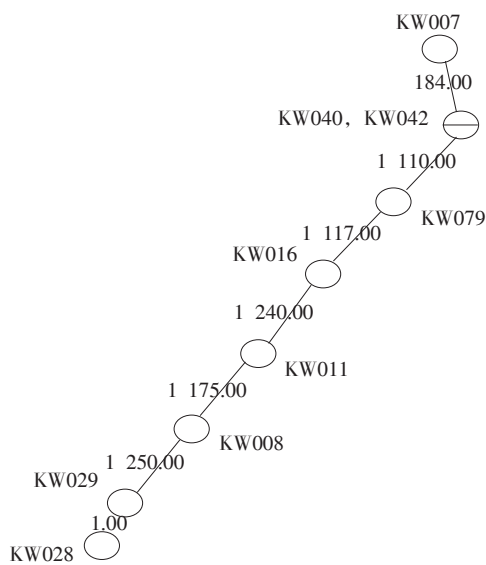


图 1 9 株空肠弯曲菌 MLST 亲缘关系分布

Figure 1 Phylogenetic relationships of 9 *Campylobacter jejuni* isolates as revealed by MLST

3 讨论

近年来,我国针对可能受到污染的肉与肉制品加强了空肠弯曲菌感染监测。本研究对肉与肉制品中分离出的 9 株空肠弯曲菌耐药性进行分析,结果显示 6 株空肠弯曲菌对四环素耐药 (6/9), 低于湖南省 (96.15%)^[10] 和浙江省温州市 (83.33%)^[11] 的调查结果。空肠弯曲菌对阿奇霉素、克林霉素、氯霉素和红霉素敏感,与既往研究报道其对红霉素、阿奇霉素部分耐药的结果^[12] 略有不同。耐药率的差异可能与不同地区空肠弯曲菌的感染及流行程度有关,也可能与样本种类、采样方式、样本数量和检测方法不同有关。检出多重耐药菌 4 株,其中 1 株多重耐药株对 5 种抗生素耐药,耐药情况不容乐观。

MLST 分析结果显示,9 株空肠弯曲菌分属 6 个

ST 型别,以 ST45 和 ST2274 为主,相同 ST 型别的菌株亲缘关系相近,同源性较高。ST6701 型的 KW007 与 ST2274 型的 KW040、KW042 仅相差 1 个管家基因,其他管家基因均相同,ST6701 和 ST2274 亲缘关系也较近。1 株 ST 未分型,为新发现的 ST 型别,7 个管家基因分别为 aspA(2)、glnA(23)、gltA(4)、glyA(64)、pgm(488)、tkt(25)和 uncA(23)。新 ST 型别的出现提示空肠弯曲菌发生新的变异,同时也扩充了空肠弯曲菌的 MLST 数据库。

本研究由于样本量有限,结果存在一定的局限性。细菌的耐药性除了本身的特性,也受到外界环境的影响,销售环节也可能引起二次污染。未来可通过全基因组测序结果进一步分析耐药性和耐药基因的关联性。

参考文献

- [1] 余峰玲,许艳平,路梅,等.2 种检测方法对弯曲菌检出率的影响 [J].食品安全质量检测学报,2021,12(4):1157-1160.
- [2] 孙磊,杨臻辉,恽茜,等.基于全基因组序列的弯曲菌特征分析 [J].生物信息学,2020,18(4):254-262.
- [3] 李颖,贾巧玲,周贵兰,等.2016—2018 年北京市顺义区成年人腹泻患者弯曲菌感染监测及病原学特征分析 [J].疾病监测,2020,35(1):21-28.
- [4] CODY A J, MCCARTHY N D, BRAY J E, et al.Wild bird-associated *Campylobacter jejuni* isolates are a consistent source of human disease, in Oxfordshire, United Kingdom [J].Environ Microbiol Rep, 2015, 7(5):782-788.
- [5] 章乐怡,楼辉煌,胡玉琴,等.温州市食源性弯曲菌耐药特征与分子分型研究 [J].中国人兽共患病学报,2020,36(7):583-588.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 空肠弯曲菌检验:GB 4789.9—2014 [S].2015.

(下转第 349 页)

量较少有关。

参考文献

- [1] 曹文琪, 杨新军. 孕期体重增加的影响因素研究进展 [J]. 预防医学, 2021, 33 (3): 264-267.
- [2] GOLDSTEIN R F, ABELL S K, RANASINHA S, et al. Gestational weight gain across continents and ethnicity: systematic review and meta-analysis of maternal and infant outcomes in more than one million women [J/OL]. BMC Med, 2018, 16 (1) [2023-01-20]. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1128-1>.
- [3] SUN Y, SHEN Z, ZHAN Y, et al. Effects of pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain on maternal and infant complications [J/OL]. BMC Pregnancy Childbirth, 2020, 20 (1) [2023-01-20]. <https://doi.org/10.1186/s12884-020-03071-y>.
- [4] 中国营养学会. 中国妇女妊娠期体重监测与评价: T/CNSS 009—2021 [J]. 2021.
- [5] 陈泽琨, 邢燕, 童笑梅, 等. 北京市孕妇孕期增重影响因素对母婴健康的不良影响分析 [J]. 中华健康管理学杂志, 2021, 15 (3): 284-289.
- [6] 王芬, 陈庆, 杨柳, 等. 重庆妇女孕前体重、孕期增重对新生儿出生体重影响的前瞻性队列研究 [J]. 卫生研究, 2020, 49 (5): 705-710.
- [7] 中华人民共和国国务院. 国务院新闻办就《中国居民营养与慢性病状况报告(2020年)》有关情况举行发布会 [EB/OL]. 2020 [2023-01-20]. http://www.gov.cn/xinwen/2020-12/24/content_5572983.htm.
- [8] 吴申鹏, 董婧, 马旭, 等. 中国育龄女性体重过低、超重和肥胖的流行现状及危险因素分析 [J]. 中华临床营养杂志, 2022, 30 (2): 79-86.
- [9] CHENEY K, BERKEMEIER S, SIM K A, et al. Prevalence and predictors of early gestational weight gain associated with obesity risk in a diverse Australian antenatal population: a cross-sectional study [J/OL]. BMC Pregnancy Childbirth, 2017, 17 (1) [2023-01-20]. <https://doi.org/10.1186/s12884-017-1482-6>.
- [10] 常进科, 张俊绘, 赵文芳, 等. 孕妇体重自我管理动机水平的影响因素分析 [J]. 预防医学, 2022, 34 (9): 946-950.
- [11] 江南, 王双, 杨艳娜, 等. 通州区孕妇营养素补充剂认知和使用的影响因素分析 [J]. 预防医学, 2021, 33 (2): 204-207.
- [12] 王培成, 刘秀英, 杨生秀, 等. 孕中、晚期妇女体重增长评价及影响因素分析 [J]. 中国妇幼保健, 2016, 31 (5): 923-926.
- [13] 雷远, 王佑民, 程丽芳. 妊娠高血压与胰岛素抵抗、血脂代谢和D-二聚体关系 [J]. 中国医学前沿杂志, 2021, 13 (12): 74-78.
- [14] KURE LIU C, JOSEPH P V, FELDMAN D E, et al. Brain imaging of taste perception in obesity: a review [J]. Curr Nutr Rep, 2019, 8 (2): 108-119.
- [15] 蒋婷婷, 陈瑶, 周雪微, 等. 孕期焦虑状态对产妇产前分娩方式、产程和妊娠结局的影响 [J]. 中国医院统计, 2021, 28 (5): 409-412.

收稿日期: 2022-11-17 修回日期: 2023-01-20 本文编辑: 吉兆洋

(上接第 344 页)

- [7] ZANKARI E, HASNAN H, COSENTION S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67 (11): 2640-2644.
- [8] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation [J]. Bioinformatics, 2014, 30 (14): 2068-9069.
- [9] CARATTOLI A, ZANKARI E, GARCA-FERNANDEZ A, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58 (7): 3895-3903.
- [10] 龙奇志, 贾华云, 何礼, 等. 2016—2018年湖南省株洲市弯曲菌的流行特征及耐药性分析 [J]. 疾病监测, 2020, 35 (1): 34-38.
- [11] 跃进, 林冠凯, 章乐怡, 等. 温州市禽肉中空肠弯曲菌检测结果及耐药性分析 [J]. 预防医学, 2020, 32 (7): 686-688.
- [12] 韩鏊竹, 杨文腰, 李欣南, 等. 动物源弯曲菌分离纯化鉴定方法优化 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11 (24): 9354-9360.

收稿日期: 2022-10-26 修回日期: 2023-01-03 本文编辑: 吉兆洋