

风险监测

北京市顺义区市售生鲜整鸡中弓形杆菌流行状况及耐药特征分析

王园园^{1,2},李颖^{1,2},杨杰^{1,2},张彦春^{1,2},张爽^{1,2},张赫^{1,2},王苗^{1,2},马红梅^{1,2},张茂俊^{2,3}

(1. 北京市顺义区疾病预防控制中心,北京 101320; 2. 北京市顺义区疾病预防控制中心微生物感染性疾病检测工作站,北京 101320; 3. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,北京 102206)

摘要:目的 了解顺义区市售生鲜整鸡中弓形杆菌的污染状况及耐药特征。方法 在顺义区农贸市场、超市随机采集零售生鲜整鸡样品 60 份,应用滤膜法对样品进行弓形杆菌的分离培养,采用基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)及实时荧光定量 PCR 进行菌株鉴定,并将菌株的质谱图进行聚类分析。采用琼脂稀释法对弓形杆菌分离株进行 11 种抗生素的耐药性检测。结果 60 份市售生鲜整鸡样品中弓形杆菌的检出率为 26.67% (16/60),且均为布氏弓形杆菌。6 月、7 月弓形杆菌的检出率明显高于 5 月。16 株弓形杆菌分离株经 MALDI-TOF MS 聚类,以相对距离 1 000 为节点分为两个簇群,相对距离与菌株相似性呈负相关,聚类图对样品地域来源有一定的提示作用。弓形杆菌分离株对喹诺酮类抗生素耐药严重,对萘啶酸和环丙沙星的耐药率分别为 81.25% 和 43.75%;对庆大霉素(12.50%)、红霉素(12.50%)、阿奇霉素(12.50%)、泰利霉素(12.50%)、链霉素(6.25%)耐药率相对较低。结论 顺义区零售生鲜整鸡中弓形杆菌的检出率较高,应警惕因未烧熟煮透和交叉污染导致食源性疾病的风险。

关键词:弓形杆菌;基质辅助激光解吸飞行时间质谱;生鲜整鸡;耐药

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2022)02-0297-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.02.017

Prevalence and antibiotics susceptibility of *Arcobacter* isolated from commercial fresh whole chicken in Shunyi District, Beijing

WANG Yuanyuan^{1,2}, LI Ying^{1,2}, YANG Jie^{1,2}, ZHANG Yanchun^{1,2}, ZHANG Shuang^{1,2}, ZHANG He^{1,2},
WANG Miao^{1,2}, MA Hongmei^{1,2}, ZHANG Maojun^{2,3}

(1. Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101320, China; 2. Workstation for Microbial Infectious Disease, Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101320, China; 3. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: Objective To understand the contamination status and antibiotics resistance of *Arcobacter* isolated from commercial fresh whole chicken in Shunyi District. **Methods** Sixty fresh whole chicken from retail markets and supermarkets in Shunyi District were randomly purchased. The Bacterial isolation was carried out using the membrane filtration methods. The strains were identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and real-time fluorescent PCR. The mass spectra of the strains were clustered. The isolated *Arcobacter* strains were subjected to a susceptibility test for 11 antibiotics using agar dilution method. **Results** The detection rate of *Arcobacter* in 60 samples of commercially available fresh whole chicken was 26.67% (16/60) and all of them were *Arcobacter butzleri*. The detection rate of *Arcobacter* in June and July was significantly higher than that in May. Sixteen strains of *Arcobacter* were clustered by time-of-flight mass spectrometry and were divided into two clusters with a relative distance of 1 000. The relative distance was negatively correlated with the similarity of the strains, and the clustering map had a certain suggestive effect on the regional origin of the samples. The *Arcobacter* isolates were highly resistant to quinolone antibiotics and the resistance rates to nalidixic acid and ciprofloxacin were 81.25% and 43.75%, respectively. The resistance rate to gentamicin (12.50%) and erythromycin (12.50%), azithromycin (12.50%), telithromycin

收稿日期:2021-08-25

作者简介:王园园 女 主管技师 研究方向为病原微生物检测 E-mail:415809126@qq.com

通信作者:张茂俊 女 研究员 研究方向为感染性疾病病原学研究及诊断 E-mail:zhangmaojun@icdc.cn

(12.50%) and streptomycin (6.25%) was relatively low. **Conclusion** The detection rate of *Arcobacter* in raw chickens in Shunyi District is high. It should be alert to the risk of food-borne diseases caused by undercooked cooking and cross-contamination.

Key words: *Arcobacter*; matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; fresh whole chicken; drug resistance

弓形杆菌(*Arcobacter*)作为一种新兴的食源性人畜共患病病原体,被认为是动物腹泻、乳腺炎和流产的致病因子,同时可引起人体的菌血症、心内膜炎、腹膜炎、胃肠炎和腹泻^[1]。目前确定的弓形杆菌属有25个种,其中布氏弓形杆菌(*Arcobacter butzleri*)、嗜低温弓形杆菌(*Arcobacter cryaerophilus*)和斯氏弓形杆菌(*Arcobacter skirrowii*)是常见的3个种^[1-2]。弓形杆菌在环境中尤其水源中分布较多,可以通过受污染的食物和水源传播^[3]。有研究显示,市售鸡肉是弓形杆菌重要的来源之一^[4-5]。目前国内关于弓形杆菌的报道较少。本研究采集市售生鲜整鸡样品,通过滤膜法分离并使用基质辅助激光解吸飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer, MALDI-TOF MS)和实时荧光定量PCR的方法鉴定弓形杆菌,并对分离的弓形杆菌进行耐药性分析,初步了解本地区生鲜整鸡样品中弓形杆菌的污染情况并分析其耐药特征。

1 方法和材料

1.1 样品采集

在顺义区农贸市场、超市随机采集零售生鲜整鸡样品。采集时间为2018年5~7月共3个月份,采样量为每月20件。采集样品均为生鲜整鸡样品,且未经过冷冻处理。采集过程符合无菌操作,样品保存于无菌塑封袋中,4℃2h内运送至实验室进行弓形杆菌的分离鉴定。

1.2 试剂和仪器

无菌棉拭子(Copan公司),Cary-Blair运送培养基、弓形杆菌分离培养试剂盒(青岛中创生物科技有限公司,ZC-ARCO-001),弓形杆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,ZC-AST-010),细菌基因组DNA提取试剂盒(北京卓成惠生生物科技股份有限公司),弓形杆菌三重荧光定量PCR检测试剂盒(青岛中创生物科技有限公司,ZC-ARCO-003),Lightcycler®480II荧光定量PCR仪(德国罗氏),基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪及分析软件(Autoflex speed, Burke),所有试剂均在有效期内使用。

1.3 检测方法

1.3.1 弓形杆菌分离培养

分离培养使用成品试剂盒,在无菌环境中将生鲜整鸡转移到均质袋中,加入缓冲蛋白胍水(buffered peptone water, BPW)500 mL,用力揉搓生鲜整鸡表面15 min,确保其全部部位都被BPW浸泡;吸取300 μL BPW,均匀滴加在覆盖有0.45 μm滤膜的双孔板培养基(Karmali选择性培养基和哥伦比亚血平板)上,每张滤膜上的菌液5~6滴,呈“梅花状”分布,在生物安全柜中风干40 min后揭去滤膜,置于32℃微需氧环境(85% N₂、10% CO₂、5% O₂)中培养48 h。挑取边缘整齐、光滑湿润、针尖大小的可疑菌落,接种在哥伦比亚血平板上,置于37℃微需氧环境继续培养48 h。

1.3.2 质谱鉴定及聚类分析

取纯培养的弓形杆菌,使用甲酸提取法处理后进行MALDI-TOF MS鉴定,结果分析采用flexcontrol软件,用标准品进行系统误差校正。质谱结果用Biotyper分析软件判读,细菌菌属和菌种判断标准:2.300~3.000为高置信度的种水平鉴定,2.000~2.299为确定的属水平鉴定,可能的种水平鉴定,<2.000为不可靠的鉴定;本研究选取≥2.000的菌株作为待测菌株,作进一步实时荧光定量PCR鉴定。所有鉴定为弓形杆菌的质谱图谱在MALDI Biotyper软件中进行聚类分析。

1.3.3 菌株实时荧光定量PCR鉴定

挑取一环纯培养的弓形杆菌,加入200 μL超纯水,震荡混匀,沸水煮10 min,13 000 r/min离心后取上清,进行布氏弓形杆菌、嗜低温弓形杆菌、斯氏弓形杆菌实时荧光定量PCR鉴定,鉴定使用弓形杆菌三重荧光定量PCR检测试剂盒,扩增条件为预变性94℃,5 min,1个循环;变性94℃,15 s,延伸60℃,1 min,变性、延伸各45个循环。

1.3.4 耐药性检测

使用琼脂稀释法对弓形杆菌进行7类11种抗生素耐药检测。检测步骤包括:将弓形杆菌接种哥伦比亚血平板37℃微需氧(85% N₂、10% CO₂、5% O₂)培养48 h;用无菌棉签挑取少许弓形杆菌菌落,悬浮于1 mL无菌稀释液至1.0麦氏浊度,充分混匀后做10倍稀释,把稀释菌液滴加到药敏板孔中,每

孔 3 μL ;将加好的药敏板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 微需氧环境中培养 48 h;取出药敏板,肉眼观察每个培养孔中弓形杆菌的生长结果,获取弓形杆菌的最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)并进行耐药或敏感的判定。抗生素耐药判定依据参考弯曲菌(CLSI, M100-S25, 2015):大于或等于临界值即判定为耐药,临界值具体为红霉素(Erythromycin, ERY) 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$,阿奇霉素(Azithromycin, AZI) 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$,萘啶酸(Nalidixic acid, NAL) 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$,环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP) 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,庆大霉素(Gentamicin, GEN) 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,链霉素(Streptomycin, STR) 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,氯霉素(Chloramphenicol, CHL) 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,氟苯尼考(Florfenicol, FLO) 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$,四环素(Tetracycline, TET) 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,泰利霉素(Telithromycin, TEL) 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$,克林霉素(Clindamycin, CLI) 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。质控菌株为空肠弯曲菌 ATCC33560。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计数资料的比较应用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 检测结果

2.1 样品信息

本次研究共采集生鲜整鸡样品 60 件,其中来源于销售环节上游大型批发市场的样品 44 件,来源于下游零售店的样品 16 件。

2.2 弓形杆菌检出分布

生鲜整鸡样品中弓形杆菌检出率为 26.67%(16/60),5、6、7 月检出率分别为 5.00%(1/20)、45.00%(9/20)、30.00%(6/20),差异有统计学意义($\chi^2 = 8.352, P = 0.008$)。大型批发市场和零售店生鲜整鸡样品中弓形杆菌检出率分别为 34.09%(15/44)和 6.25%(1/16),差异有统计学意义($\chi^2 = 4.651, P = 0.046$)。

2.3 弓形杆菌飞行时间质谱与实时荧光定量 PCR 鉴定结果

飞行时间质谱与实时荧光定量 PCR 鉴定弓形杆菌菌种结果一致,16 株均为布氏弓形杆菌,无嗜低温弓形杆菌和斯氏弓形杆菌。弓形杆菌在 Karmali 选择性培养基菌落形态和革兰染色形态见图 1 和图 2。

2.4 飞行时间质谱聚类结果

将 16 株弓形杆菌获取的蛋白质图谱进行聚类分析:16 株弓形杆菌主要分成 A、B 两簇,A、B 簇群为最大距离(Distance Level=1 000),B 簇群中 SP-2018-27 和 SP-2018-59 两株菌距离最小(Distance Level=0)。

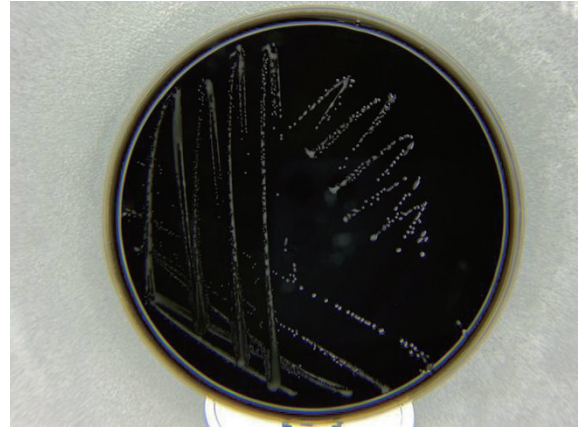


图1 弓形杆菌在 Karmali 选择性培养基上菌落形态

Figure 1 Colony morphology of *Arcobacter* on Karmali selective medium

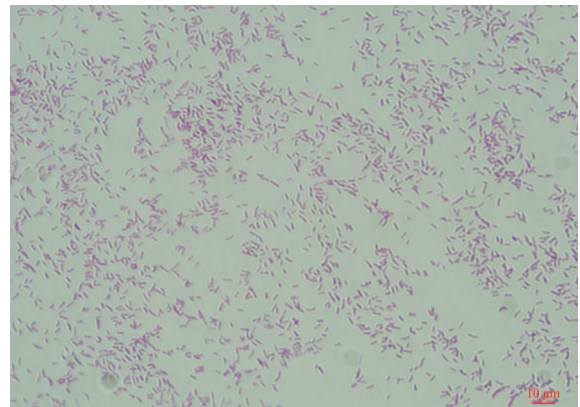


图2 弓形杆菌革兰染色在显微镜(100 \times 10油镜)下形态

Figure 2 The morphology of *Arcobacter* Gram stained under microscope (100 \times 10)

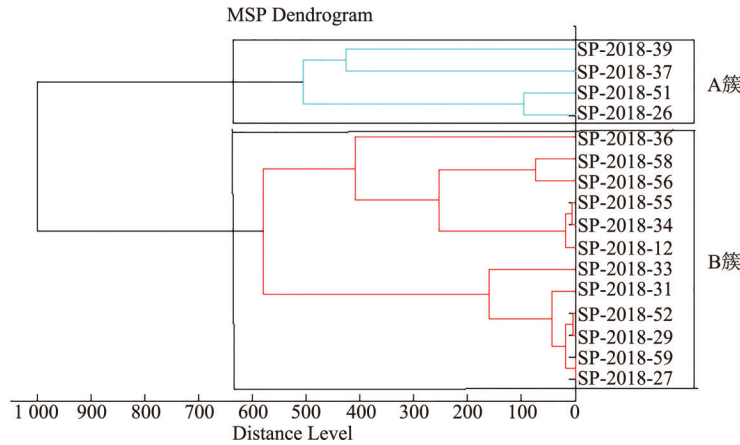
A、B 簇群各自分为若干支,聚类结果和菌株间相对距离见图 3。

2.5 耐药性检测结果

在 11 种抗生素耐药性检测中,耐药率由高至低依次为萘啶酸(81.25%)、环丙沙星(43.75%)、氟苯尼考(31.25%)、氯霉素(25.00%)、克林霉素(25.00%)、四环素(18.75%)、红霉素(12.50%)、阿奇霉素(12.50%)、庆大霉素(12.50%)、泰利霉素(12.50%)、链霉素(6.25%)。多重耐药率 25.00%(4/16)。耐药结果与耐药判定依据见表 1,耐药谱分布见图 4。

3 讨论

国外已有弓形杆菌作为食源性病原的相关报道,弓形杆菌甚至可以引起食源性疾病暴发^[6]。2017 年本实验室也在腹泻病人的粪便中分离到弓形杆菌。食品中弓形杆菌污染情况及病原学特征的研究具有重要意义,在国外食品中弓形杆菌污染的相关研究中,鲜鱼、贝类、牛、羊、猪、家禽中弓形杆菌的检出率为 18.30%~58.33%^[7-10],本研究中



注：“Distance Level”为相对距离，菌株最小差异为0，最大差异作为1 000，相对距离与菌株相似性呈负相关

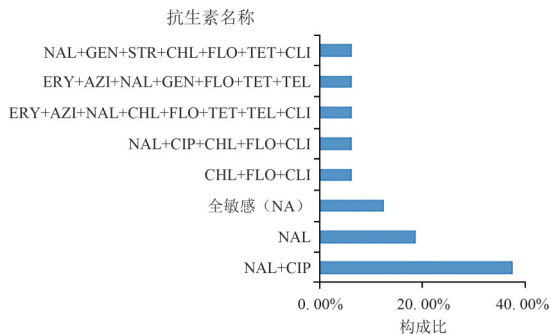
图3 弓形杆菌的飞行时间质谱聚类图

Figure 3 Time-of-flight mass spectrometry clustering of *Arcobacter*

表1 弓形杆菌耐药率分布

Table 1 Distribution of resistance rates of *Arcobacter*

抗生素类别	抗生素名称	耐药	敏感
		株数(率)	株数(率)
大环内酯类	红霉素	2(12.50%)	14(87.50%)
	阿奇霉素	2(12.50%)	14(87.50%)
喹诺酮类	萘啶酸	13(81.25%)	3(18.75%)
	环丙沙星	7(43.75%)	9(56.25%)
氨基糖苷类	庆大霉素	2(12.50%)	14(87.50%)
	链霉素	1(6.25%)	15(93.75%)
氯霉素类	氯霉素	4(25.00%)	12(75.00%)
	氟苯尼考	5(31.25%)	11(68.75%)
四环素类	四环素	3(18.75%)	13(81.25%)
酮内酯类	泰利霉素	2(12.50%)	14(87.50%)
林可酰胺类	克林霉素	4(25.00%)	12(75.00%)



注:ERY:红霉素;AZI:阿奇霉素;NAL:萘啶酸;CIP:环丙沙星; GEN:庆大霉素;STR:链霉素;CHL:氯霉素;FLO:氟苯尼考; TET:四环素;CLI:克林霉素;TEL:泰利霉素

图4 弓形杆菌耐药株的耐药谱

Figure 4 Drug resistance spectrum of resistant strains of *Arcobacter*

市售生鲜整鸡的弓形杆菌检出率为 26.67%，证明本地区弓形杆菌在食品中同样污染较为严重。食品中弓形杆菌污染造成的致病风险值得进一步关注。

本次研究中分离 16 株弓形杆菌中布氏弓形杆菌构成比为 100%，而 2016 年王敏等^[11]报道北京市零售鸡肉样品中弓形杆菌检出情况中，布氏弓形杆

菌构成比为 8.00%，而嗜低温弓形杆菌构成比为 91.20%，与本次研究中各菌种构成比存在较大差异，这可能与采样季节、采样地点和样品新鲜程度有关。国外相关报道中，食品中分离弓形杆菌同样是布氏弓形杆菌构成比高^[7-10]，与本研究结果一致。本次研究中 6、7 月弓形杆菌的检出率明显高于 5 月，这也提示弓形杆菌污染与季节变化具有相关性，由于本次监测时间短，未能显示出整年变化趋势。大型批发市场生鲜整鸡样品中弓形杆菌检出率明显高于零售商店，说明食品不同销售环节弓形杆菌污染状况存在差异。

综合分析采样信息和质谱聚类结果，A 簇中 SP-2018-26、SP-2018-51 与 B 簇中 SP-2018-12、SP-2018-27 四株菌来源的生鲜整鸡样品来自同一生产厂家，B 簇中 SP-2018-58、SP-2018-56、SP-2018-55、SP-2018-31、SP-2018-52、SP-2018-59 六株菌来源的生鲜整鸡样品来自同一生产厂家，其余样品来自不同厂家或是未问询到生产厂家。以上说明质谱聚类图能一定程度提示弓形杆菌污染食品的地域相关性。Giacometti 等^[12]报道 MALDI-TOF 分型虽然比脉冲场凝胶电泳 (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 和多位点序列分型 (Multilocus sequence typing, MLST) 鉴定指数低，但能够确定簇并且准确鉴定布氏弓形杆菌菌株到种水平，在流行病学调查溯源中有一定意义。

FERREIRA 等^[13]通过 PRISMA 统计 2017 年 11 月前的文献得出：弓形杆菌对青霉素、头孢菌素的耐药率最高，对大环内酯类的耐药率为 10.7%~39.8%，对喹诺酮类耐药率为 4.3%~14.0%，对氨基糖苷类耐药率为 1.8%~12.9%，对四环素类耐药率为 0.8%~7.1%。本研究中弓形杆菌分离株对大环内酯类 [红霉素 (12.50%) 和阿奇霉素 (12.50%)]、氨基糖苷类 [链

霉素(6.25%)和庆大霉素(12.50%)]抗生素的耐药率基本在上述范围内,但对四环素类(18.75%),萘啶酸(81.25%)和环丙沙星(43.75%)等喹诺酮类抗生素的耐药率高。Rathlavath 等^[8]从海鲜和沿海环境中分离的 147 株布氏弓形杆菌对萘啶酸的耐药率达 70.7%,另一篇报道中^[14],从乳制品分离的 20 株布氏弓形杆菌均对萘啶酸有抗性,其耐药机制和造成高耐药率的原因值得进行更深入的研究。

综上所述,本地区市售生鲜整鸡中弓形杆菌污染状况较为严重,弓形杆菌的分布与耐药状况均具有一定特征。建议国内应在食品风险监测、食源性疾病病原学监测中逐步开展弓形杆菌污染监测和流行病学研究的工作。

参考文献

- [1] RAMEES T P, DHAMA K, KARTHIK K, et al. Arcobacter: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control-a comprehensive review[J]. Veterinary Quarterly, 2017, 37(1):136-161.
- [2] BARBOZA K, CUBILLO Z, CASTRO E, et al. First isolation report of *Arcobacter cryaerophilus* from a human diarrhea sample in Costa Rica[J]. Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo, 2017, 59: e72.
- [3] PATYAL A, RATHORE R S, MOHAN H V, et al. Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and foods of animal origin including aea food from India[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2011, 58(5): 402-410.
- [4] PEJCHALOVÁ M, DOSTALÍKOVÁ E, SLÁMOVÁ M, et al. Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in the Czech republic [J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(4): 719-727.
- [5] RAHIMI E. Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species isolated from poultry meat in Iran[J]. British Poultry Science, 2014, 55(2): 174-180.
- [6] LAPPI V, ARCHER J R, CEBELINSKI E, et al. An outbreak of foodborne illness among attendees of a wedding reception in Wisconsin likely caused by *Arcobacter butzleri* [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2013, 10(3): 250-255.
- [7] MOTTOLA A, BONERBA E, FIGUERAS M J, et al. Occurrence of potentially pathogenic arcobacters in shellfish [J]. Food Microbiology, 2016, 57: 23-27.
- [8] RATHLAVATH S, KOHLI V, SINGH A S, et al. Virulence genotypes and antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* isolated from seafood and its environment [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 263: 32-37.
- [9] SHIRZAD ASKI H, TABATABAEI M, KHOSHBAKHT R, et al. Occurrence and antimicrobial resistance of emergent *Arcobacter* spp. isolated from cattle and sheep in Iran [J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2016, 44: 37-40.
- [10] DE OLIVEIRA M G X, DE MOURA GOMES V T, CUNHA M P V, et al. Genotypic characterization of *Arcobacter* spp. isolated from chicken meat in Brazil [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2018, 15(5): 293-299.
- [11] 王敏, 顾一心, 梁昊, 等. 北京市零售鸡肉标本中弓形杆菌污染初步分析[J]. 疾病监测, 2016, 31(12): 1050-1054.
- WANG M, GU Y X, LIANG H, et al. Isolation and identification of *Arcobacter* from retail chicken meat in Beijing [J]. Disease Surveillance, 2016, 31(12): 1050-1054.
- [12] GIACOMETTI F, PIVA S, VRANCKX K, et al. Application of MALDI-TOF MS for the subtyping of *Arcobacter butzleri* strains and comparison with their MLST and PFGE types [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 277: 50-57.
- [13] FERREIRA S, LUÍS Â, OLEASTRO M, et al. A meta-analytic perspective on *Arcobacter* spp. antibiotic resistance [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2019, 16: 130-139.
- [14] FERREIRA S, OLEASTRO M, DOMINGUES F C. Occurrence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Arcobacter* sp. in a dairy plant [J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(4): 1019-1026.