

北京地区食源性沙门菌消毒剂抗性基因和耐药基因分布及相关性分析

马 征, 翟卫帅, 邹之宇, 吴聪明, 沈建忠, 汪 洋, 刘德俊
(中国农业大学动物医学院 兽医公共卫生安全全国重点实验室, 北京 海淀 100193)

摘要: 为了解北京地区消毒剂抗性基因分布、携带情况及其与耐药基因之间的关系, 本试验采集北京市 6 个行政区共计 39 家超市及农贸市场的猪肉和鸡肉样品, 分离培养沙门菌并进行鉴定, 随后结合 SeqSero2、Staramr 和 Diamond 等生物信息学软件对沙门菌的消毒剂抗性基因和耐药基因进行筛选与分析。结果显示, 从 28 家超市和 11 家农贸市场的 148 份猪源和 147 份鸡源样品中共分离得到 79 株 (26.78%) 沙门菌。所有分离菌株共预测得到 17 种血清型, 其中 71 株鉴定得到 16 种序列型 (ST), 大部分分离菌株的血清型与 ST 型一一对应, 其中优势菌株为肠炎沙门菌 ST11 ($n=24$)。共检出 32 个消毒剂抗性基因, 其中非共同携带的抗性基因有 5 个, 包括外膜孔道蛋白基因 *ompD/npmC* (携带率 72.15%)、有机汞调控蛋白基因 *merR2* (携带率 37.97%)、季铵盐类消毒剂抗性基因 *qacEΔ1* (携带率 21.52%) 和 *qacF* (携带率 12.66%)、外排泵基因 *oqxAB* (携带率 1.27%)。共检测到 50 个耐药基因, 覆盖氨基糖苷类、大环内酯类和四环素类等共 10 类抗菌药物, 其中氨基糖苷类占比最高 (36.00%)。相关性分析结果显示, 消毒剂抗性基因个数与耐药基因种类数量之间存在显著的正相关 ($R=0.43$, $P=6.3 \times 10^{-5}$), 提示沙门菌在携带消毒剂抗性基因的同时, 可能也携带更多种类的耐药基因。本试验为指导食品消毒剂的合理使用、保障北京地区食品安全和疾病预防提供理论支持, 具有公共卫生学意义。

关键词: 沙门菌; 全基因组测序; 消毒剂抗性基因; 耐药基因

中图分类号: S852.61

文献标志码: A

文章编号: 0529-6005(2024)05-0012-09

Distribution and Correlation Analysis Between Disinfectant Resistance Genes and Antibiotic Resistance Genes of Foodborne *Salmonella* spp. in Beijing

MA Zheng, ZHAI Weishuai, ZOU Zhiyu, WU Congming, SHEN Jianzhong, WANG Yang, LIU Dejun
(National Key Laboratory of Veterinary Public Health and Safety, College of Veterinary Medicine,
China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: To understand the distribution and carriage status of disinfectant resistance genes and their relationship with antibiotic resistance genes in Beijing, this study collected swine and chicken samples from 39 supermarkets and farmer's markets in 6 administrative districts of Beijing, isolated and cultured *Salmonella*, and then screened and analyzed disinfectant resistance genes and antibiotic resistance genes of *Salmonella* using bioinformatics software such as SeqSero2, Staramr, and Diamond. The results showed that a total of 79 strains (26.78%) of *Salmonella* were isolated from 148 swine samples and 147 chicken samples from 28 supermarkets and 11 farmer's markets. A total of 17 serotypes were predicted for all isolated strains, among which 16 sequence types (STs) were identified for 71 strains. The serotypes of most isolates corresponded to ST types one by one, and the dominant strain was *Salmonella enteritidis* ST11 ($n=24$). A total of 32 disinfectant resistance genes were detected, including 5 non-co-carried resistance genes, including outer membrane porin genes *ompD/npmC* (carriage rate 72.15%), organic mercury-regulating protein gene *merR2* (carriage rate 37.97%), quaternary ammonium disinfectant resistance genes *qacEΔ1* (carriage rate 21.52%) and *qacF* (carriage rate 12.66%), and efflux pump gene *oqxAB* (carriage rate 1.27%). A total of 50 antibiotic resistance genes were detected, covering 10 classes of antibiotics such as aminoglycosides, macrolides, and tetracyclines, among which aminoglycosides had the

收稿日期: 2023-08-30

基金项目: 北京市科技计划课题 (Z211100007021009); 国家自然科学基金专项项目 (32141002); 国家自然科学基金面上项目 (32072922)

作者简介: 马征 (1998-), 男, 硕士生, 研究方向为动物源细菌耐药性, E-mail: mazheng1206@126.com

翟卫帅 (1994-), 男, 博士生, 研究方向为动物源细菌耐药性, E-mail: zws18363976198@163.com

注: 翟卫帅与马征对本文具有同等贡献

通信作者: 刘德俊, E-mail: liudejun@cau.edu.cn

highest proportion (36.00%). The results of correlation analysis showed a significant positive correlation between the number of disinfectant resistance genes and the number of antibiotic resistance gene categories ($R = 0.43$, $P = 6.3 \times 10^{-5}$), suggesting that *Salmonella* may carry more types of antibiotic resistance genes while carrying disinfectant resistance genes. This study provides theoretical support for guiding the rational use of food disinfectants, ensuring food safety, and disease prevention in Beijing, with public health significance.

Key words: *Salmonella*; whole-genome sequencing; disinfectant resistance gene; antibiotic resistance gene

Corresponding author: LIU Dejun, E-mail: liudejun@cau.edu.cn

沙门菌是一种常见的食源性和人兽共患病原菌,能够对动物源性食品流通的不同环节造成污染^[1-2],间接导致人类疾病的感染和暴发^[3-4],具有重大的公共卫生安全风险。近年来由于抗菌药物的广泛使用,食源性沙门菌耐药性日益严重,且大部分菌株为多重耐药菌^[5]。多重耐药沙门菌能够通过动物源性食品等实现跨物种传播^[6-7],对医学临床的抗感染治疗造成潜在威胁^[8]。

为减少动物源性食品生产和流通过程中沙门菌等病原菌的污染,现在市面上大多使用含氯消毒剂、过氧化物类消毒剂和食品级季铵盐类消毒剂等对食品生产环境和器具进行消毒。然而,消毒剂的过度使用可能会导致细菌产生不同程度的消毒剂抗性^[9-10],其抗性机理包括产生生物膜、借助外排泵系统和改变靶点等^[11],与抗性机理相对应的代表性基因包括环境消毒后刺激金黄色葡萄球菌生物膜变化的 *icaA* 基因、外排泵 *qac* 家族基因和改变三氯生作用靶点的 *fabI* 基因等^[12-14]。消毒剂压力下,细菌在对其产生抗性的同时,也可能对抗生素产生耐药性,使耐药表型出现增强和敏感等变化^[15-16]。此外,消毒剂的不合理使用还能够促进基因的突变和水平转移,从而加剧抗生素耐药性的传播^[17-18]。

目前,沙门菌消毒剂抗性基因与耐药基因二者间关联性的研究报道较少^[19-21],而关于沙门菌消毒剂的报道多为其抗性基因的类型、处理后生物膜形成能力和抑菌效果等。此外,北京地区沙门菌消毒剂抗性基因的分布及流行情况鲜有报道。本试验基于全基因组测序和生物信息学分析技术,通过对北京市不同区域分离获得的 79 株沙门菌进行对比分析,筛查沙门菌中消毒剂抗性基因和耐药基因的种类和个数,统计其携带率,分析沙门菌的血清型和序列型(Sequence type, ST),探究沙门菌消毒剂抗性基因和耐药基因二者之间的相关性,以为指导动物源性食品流通不同环节消毒剂的使用,保障食品安全和人类健康提供理论和数据支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 科玛嘉沙门菌显色培养基,购自上海欣中生物工程有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒,购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;缓冲蛋白胨水(Buffered peptone water, BPW)、四硫磺酸钠煌绿增菌液(Tetrathionate broth, TTB)基础培养基、脑心浸出液(Brain heart infusion, BHI)肉汤、脑心浸出液琼脂(Brain heart infusion agar, BHIA)、0.1% 煌绿和碘液,均购自北京陆桥技术股份有限公司; α -萘基-4-羟基肉桂酸和 Bruker 标准溶剂,均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 主要仪器 全自动微生物质谱检测系统,安图实验仪器(郑州)有限公司产品;全自动核酸提取仪,南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品;Nano-Drop OneC 分光光度计,美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

1.3 样品来源 2023 年 5 月于北京市 6 个行政区(东城区、西城区、朝阳区、海淀区、丰台区和石景山区)的 28 家超市和 11 家农贸市场共采集样品 295 份,包括 148 份新鲜猪肉样品和 147 份新鲜鸡肉样品。

1.4 菌株分离 将采集的样品 12 h 内带回实验室于超净工作台内进行预处理。取 25 g 肉样置于无菌均质袋内,加入 50 mL BPW,充分均质,37 °C 静置培养 16 ~ 18 h。吸取 1 mL 上述培养液转移至 8 mL TTB 中,42 °C 静置培养 16 ~ 18 h。颠倒混匀增菌液,用接种环蘸取增菌液,划线接种于沙门菌显色培养基上,并设置阳性对照,37 °C 静置过夜培养;隔天挑取疑似菌落再次划线接种于沙门菌显色培养基上进行纯化,37 °C 静置培养 12 h;挑取纯化后疑似单菌落划线接种于 BHIA 上,37 °C 过夜静置培养,等待进一步鉴定。

1.5 菌种鉴定和保存 挑取 BHIA 上中等大小的单菌落至靶板的小孔上晾干,滴加 1 μ L 裂解液(70% 甲酸溶液),置于开启风机的超净工作台中晾干,再滴加 1 μ L 基质(溶于 Bruker 标准溶剂的过饱

和 α -氰基-4-羟基肉桂酸溶液)上清液并晾干等待上机。根据全自动微生物质谱检测系统操作说明进行菌种鉴定,得分为9.0~10.0的结果认定为种水平置信,得分为6.0~9.0的结果认定为属水平置信,得分小于6.0的结果不可置信。再挑取各菌株单菌落至BHI肉汤中,置于37℃摇床过夜培养,加入60%甘油置于-80℃冰箱冻存保种。

1.6 细菌基因组提取 提前将冻存于-80℃的菌株转接至BHI肉汤中,置于37℃摇床过夜培养。参照细菌DNA提取试剂盒说明书提取细菌总DNA,使用NanoDrop OneC分光光度计测定光密度(Optical density, OD)值,以对基因组的浓度和质量进行评估,OD_{260 nm}/OD_{280 nm}应在1.8~2.0范围内,OD_{260 nm}/OD_{230 nm}应在2.0~2.3范围内。提取的基因组于-20℃冻存备用。

1.7 序列测定和生物信息学分析 将提取的细菌基因组送至北京赛默百合生物科技有限公司通过Illumina平台进行全基因组测序,获得的序列通过SPAdes软件进行拼接,并于NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中通过BLAST进行比对。使用Seqsero2软件分析分离获得沙门菌的血清型。使用Staramr软件分析分离获得沙门菌的ST型。通过Abricate软件筛选耐药基因,并使用Resfinder数

据库(<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>)进一步校对。通过Diamond软件筛选消毒剂抗性基因,并使用Bacmet数据库(<http://bacmet.biomedicine.gu.se/>)进一步校对。使用Easyfig 2.2.5软件构建*qacEΔ1*和*qacF*基因的遗传环境图谱。

1.8 数据处理 试验数据采用Excel 2021进行整理,采用SPSS软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),数据结果以“平均值±标准差”表示, $P < 0.001$ 表示差异极显著, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著。

2 结果

2.1 菌株分离和鉴定 通过菌株的分离培养和鉴定共获得79株沙门菌,总检出率为26.78%(79/295);其中,鸡源菌株的检出率为31.97%(47/147),猪源菌株的检出率为21.62%(32/148),二者之间的检出率存在显著性差异($P < 0.05$)(图1)。此外,不同行政区之间的检出率也存在较大差别,其中东城区与西城区的差别最大,检出率分别为46.15%(24/52)和8.93%(5/56)。其余行政区的检出率从高到低依次为丰台区(36.36%,12/33)、海淀区(28.57%,16/56)、朝阳区(25.00%,12/48)和石景山区(20.00%,10/50)(图2)。

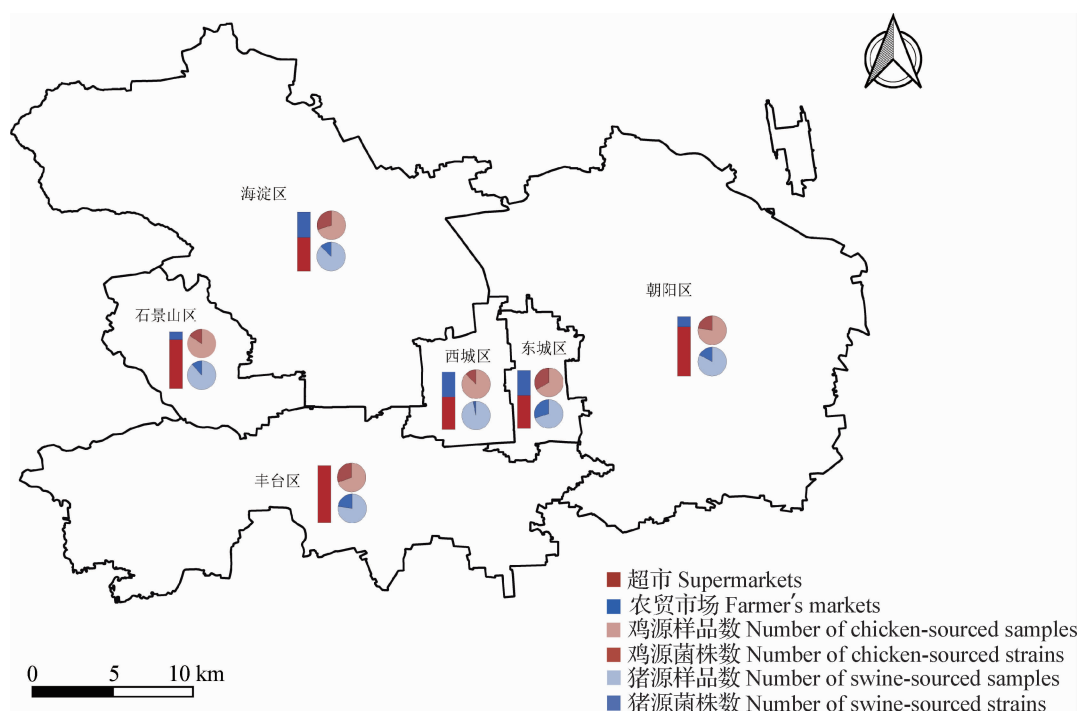


图1 北京市不同行政区采样和沙门菌分离情况统计

Fig. 1 Statistics on sampling and isolation of *Salmonella* in different administrative districts of Beijing

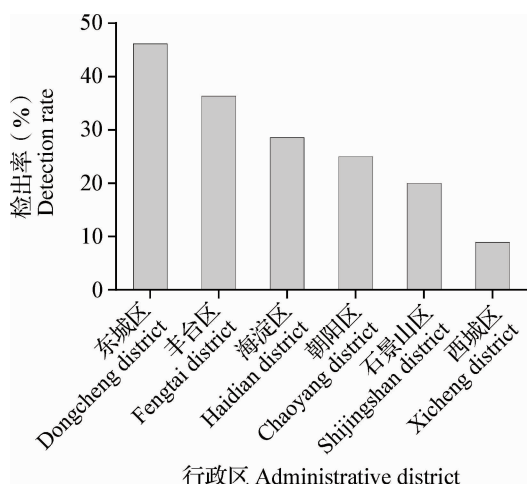


图2 北京市不同行政区沙门菌检出率

Fig. 2 Detection rates of *Salmonella* in different administrative districts of Beijing

2.2 ST型和血清型分析 北京市6个行政区分离获得沙门菌的ST型与血清型具有较高的多样性,ST型分析结果显示,79株分离菌中共发现了16种已知ST型(图3),其中有8株分离菌的ST型未知。通过Seqsero2软件进行血清型预测,79株分离菌中共发现了17种血清型(图4)。进一步分析发现,大部分分离菌株的ST型和血清型一一对应,只有少量菌株存在差别。其中,肠炎沙门菌ST11($n=24$)、I,4,[5],12:i:-沙门菌ST34($n=12$)和里森沙门菌ST469($n=9$)为优势菌株。鸡源沙门菌($n=47$)中共有12种已知ST型和14种血清型,7株分离菌的ST型未知,其中以肠炎沙门菌ST11和肯塔基沙门菌ST198最为常见。猪源沙门菌($n=32$)中共有6种已知ST型和6种血清型,1株分离菌的ST型未知,其中以I,4,[5],12:i:-沙门菌ST34、里森沙门菌ST469和伦敦沙门菌ST155最为常见。总体上看,鸡源菌株的ST型和血清型均比猪源菌株丰富。

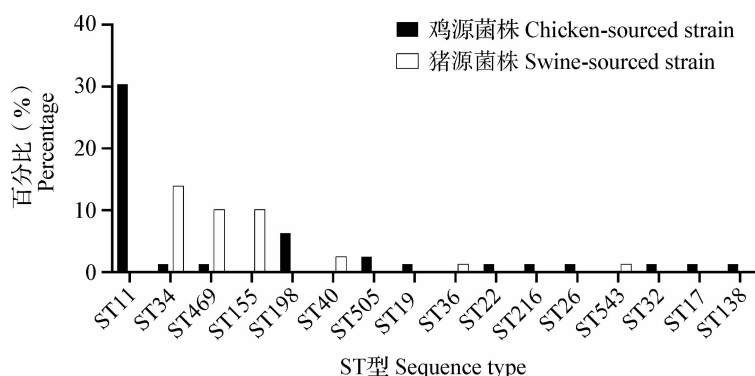


图3 79株沙门菌的16种ST型来源和百分比

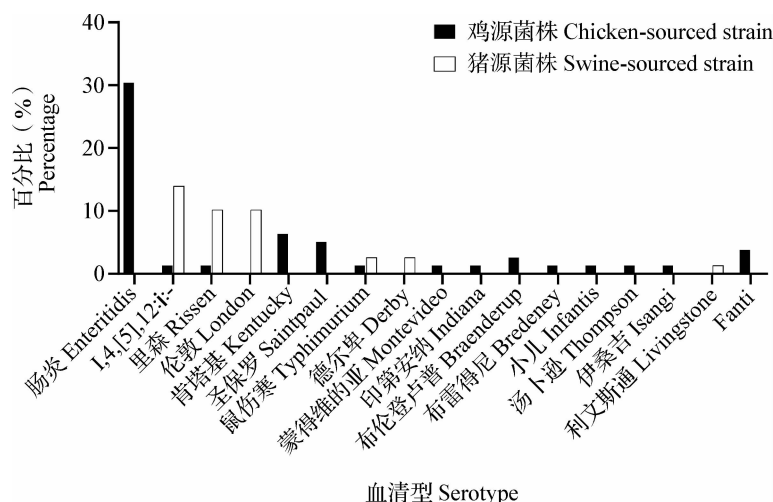
Fig. 3 Sources and percentages of 16 sequence types of 79 *Salmonella* strains

图4 79株沙门菌的17种血清型来源和百分比

Fig. 4 Sources and percentages of 17 serotypes of 79 *Salmonella* strains

79 株沙门菌的空间分布情况结果显示,同一超市同一起来源的不同样品之间存在相同的血清型和 ST 型,例如,海淀区第 3 家超市的 HD-3-C1、HD-3-C2 和 HD-3-C3 菌株均为肠炎沙门菌 ST11;第 6 家超市的 HD-6-C1、HD-6-C2 和 HD-6-C3 菌株均为肠炎沙门菌 ST11;第 5 家超市的 HD-5-C2、HD-5-C3 和 HD-5-C4 菌株 ST 型未知,但都为 Fanti 血清型;东城区第 1 家超市的 DC-1-P2、DC-1-P3 和 DC-1-P4 菌株均为 I,4,[5],12:i:-沙门菌 ST34;第 2 家超市的 DC-2-P1 和 DC-2-P3 菌株均为伦敦沙门菌 ST155, DC-3-P3 和 DC-3-P4 菌株均为伦敦沙门菌 ST155;第 3 家超市的 DC-3-C2、DC-3-C3 和 DC-3-C4 菌株 ST 型未知,但都为圣保罗沙门菌;第 7 家超市的 DC-7-P2 和 DC-7-P3 菌株均为伦敦沙门菌 ST155, DC-7-C1、DC-7-C3 和 DC-7-C4 菌株均为肠炎沙门菌

ST11;朝阳区第 2 家超市的 CY-2-P1、CY-2-P3 和 CY-2-P4 菌株均为里森沙门菌 ST469;石景山区第 4 家超市的 SJS-4-P1 和 SJS-4-P2 菌株均为 I,4,[5],12:i:-沙门菌 ST34。上述结果提示,超市内不同肉样间存在交叉污染。同时,丰台区某超市分离的 3 株沙门菌 FT-1-P1、FT-1-C1 和 FT-1-P3 来自不同来源和部位,但存在相同的血清型和 ST 型(I,4,[5],12:i:-沙门菌 ST34);6 个行政区不同超市和农贸市场的沙门菌分离株之间(除上述已注明血清型和 ST 型外的 47 株沙门菌分离株)存在相同的血清型和 ST 型,提示可能存在食品生产链的源头污染和肉品流通过程的交叉污染。此外,3 株鼠伤寒沙门菌 XC-6-P3、SJS-6-C3 和 FT-4-P2 虽然血清型相同,但 ST 型均不同,分别为 ST36、ST19 和 ST34(图 5)。

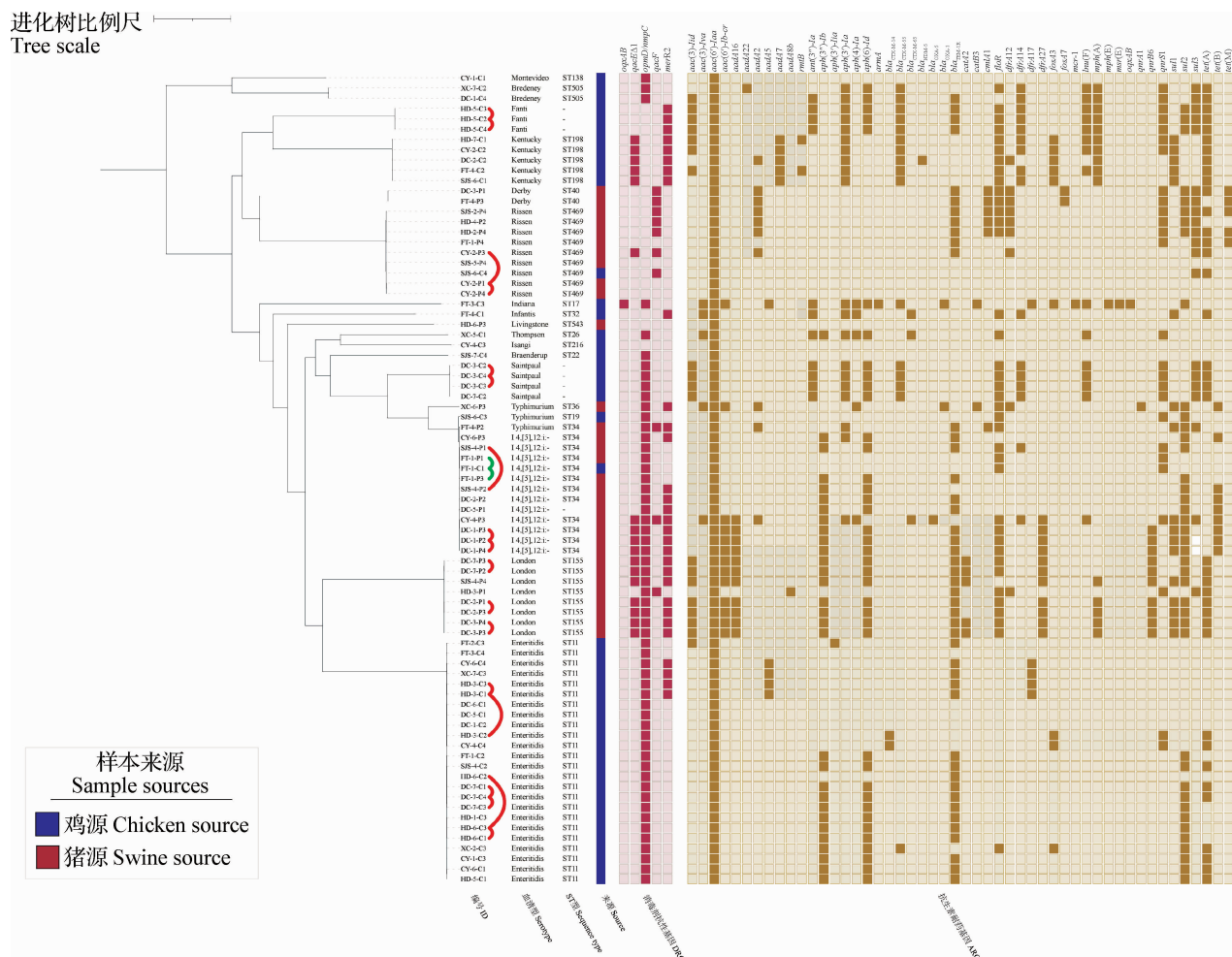


图 5 79 株沙门菌消毒剂抗性基因和耐药基因热图

Fig. 5 Heatmap of disinfectant resistance genes (DRG) and antibiotic resistance genes (ARG) in 79 *Salmonella* strains
 橙色连线:同一超市同一起来源存在相同血清型和 ST 型的不同样品;绿色连线:同一超市不同来源存在相同血清型和 ST 型的不同样品

Orange link: Different samples with the same serotype and ST type from the same source in the same supermarket;

Green link: Different samples with the same serotype and ST type from different sources in the same supermarket

2.3 消毒剂抗性基因与耐药基因的分布及二者关联性分析 由图 5 可知,鸡源样品平均携带 1.19 (56/47) 个消毒剂抗性基因和 7.21 (339/47) 个耐药基因,猪源样品平均携带 1.84 (59/32) 个消毒剂抗性基因和 9.16 (293/32) 个耐药基因。鸡源样品中携带的消毒剂抗性基因主要是外膜孔道蛋白 *opmD*/*npmC* (76.60%, 36/47) 和有机汞调控蛋白 *merR2* (27.66%, 13/47) 2 种,耐药基因以氨基糖苷类 [*aph* (3')-*Ia* (36.17%, 17/47)、*aph* (6)-*Id* (48.94%, 23/47)]、四环素类 [*tet* (A) (53.19%, 25/47)] 和 β -内酰胺类 [*bla*_{TEM-1B} (44.68%, 21/47)] 为主;猪源样品中携带的消毒剂抗性基因除了 *opmD*/*npmC* (65.63%, 21/32) 和 *merR2* (53.13%, 17/32) 外,主要为季铵盐类 *qac* 家族基因的 *qacE* Δ 1 (37.50%, 12/32) 和 *qacF* (28.13%, 9/32),耐药基因以氨基糖苷类 [*aph* (3")-*Ib* (53.13%, 17/32)、*aph* (6)-*Id* (50.00%, 16/32)]、氯霉素类 [*floR* (62.50%, 20/32)] 和磺胺类 [*sul2* (75.00%, 24/32)、*sul1* (34.38%, 11/32)] 为主, β -内酰胺类耐药基因较鸡源样品少。

在所有 79 株沙门菌中,共检出 32 个消毒剂抗

性基因,非共同携带的抗性基因共有 5 个,其中包含 2 个季铵盐类消毒剂抗性基因 *qacE* Δ 1 (21.52%, 17/79) 和 *qacF* (12.66%, 10/79),其余为外膜孔道蛋白基因 *opmD*/*npmC* (72.15%, 57/79)、有机汞调控蛋白 *merR2* (37.97%, 30/79) 和外排泵基因 *oqxAB* (1.27%, 1/79);共检出 50 个耐药基因,其中包含氨基糖苷类、四环素类和大环内酯类等共 10 种类型,最常见的类型为氨基糖苷类 (36.00%, 18/50) 和 β -内酰胺类 (14.00%, 7/50)。79 株沙门菌中,氨基糖苷类 *aac* (6')-*Iaa* 耐药基因携带率达到了 100%,其次是 *aph* (6)-*Id* (49.37%, 39/79); β -内酰胺类耐药基因中 *bla*_{TEM-1B} 携带率最高 (56.96%, 45/79);磺胺类耐药基因中 *sul2* 携带率最高 (51.90%, 41/79);氯霉素类耐药基因中 *floR* 携带率最高 (48.10%, 38/79);四环素类耐药基因中 *tet* (A) 携带率最高 (48.10%, 38/79),其余耐药基因的占比均低于 45.00%。对沙门菌消毒剂抗性基因与耐药基因进行线性回归分析和 *P* 检验可知,当消毒剂抗性基因的个数越多时,耐药基因种类的数量也越多,二者之间存在线性关系,且存在极显著性差异 ($R = 0.43, P < 0.001$) (图 6)。

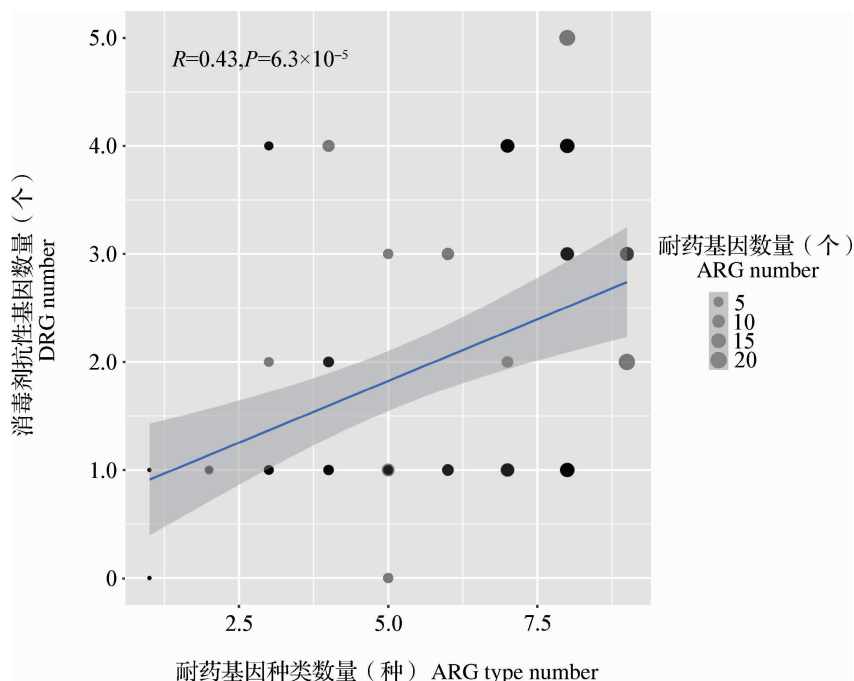


图 6 79 株沙门菌消毒剂抗性基因与耐药基因关联性分析

Fig. 6 Correlation analysis of disinfectant resistance genes (DRG) and antibiotic resistance genes (ARG) in 79 *Salmonella* strains

2.4 消毒剂抗性基因遗传环境分析 消毒剂抗性基因 *qacF* 的上游通常为 *aadA1*、*cmlA1* 和 *aadA2* 基因,部分含有 *aadA8* 和 *tnpA* 等基因,而下游通常为

sul3 和 *hcaB* 等基因,部分菌株的下游序列被 *IS406* 截断,导致沙门菌无法获得更多的耐药基因 (图 7)。另一抗性基因 *qacE* Δ 1 上游通常为 *aadA* 基因,个别

含有 *dfrA27*、*dfrA12* 和 *estX* 等基因,下游多为 *sul1* 基因,在部分菌株中,在 *qacEΔ1* 下游还发现了与汞耐

受性和解毒机制有关的 *merA*、*merD* 和 *merE* 等基因 (图 8)。

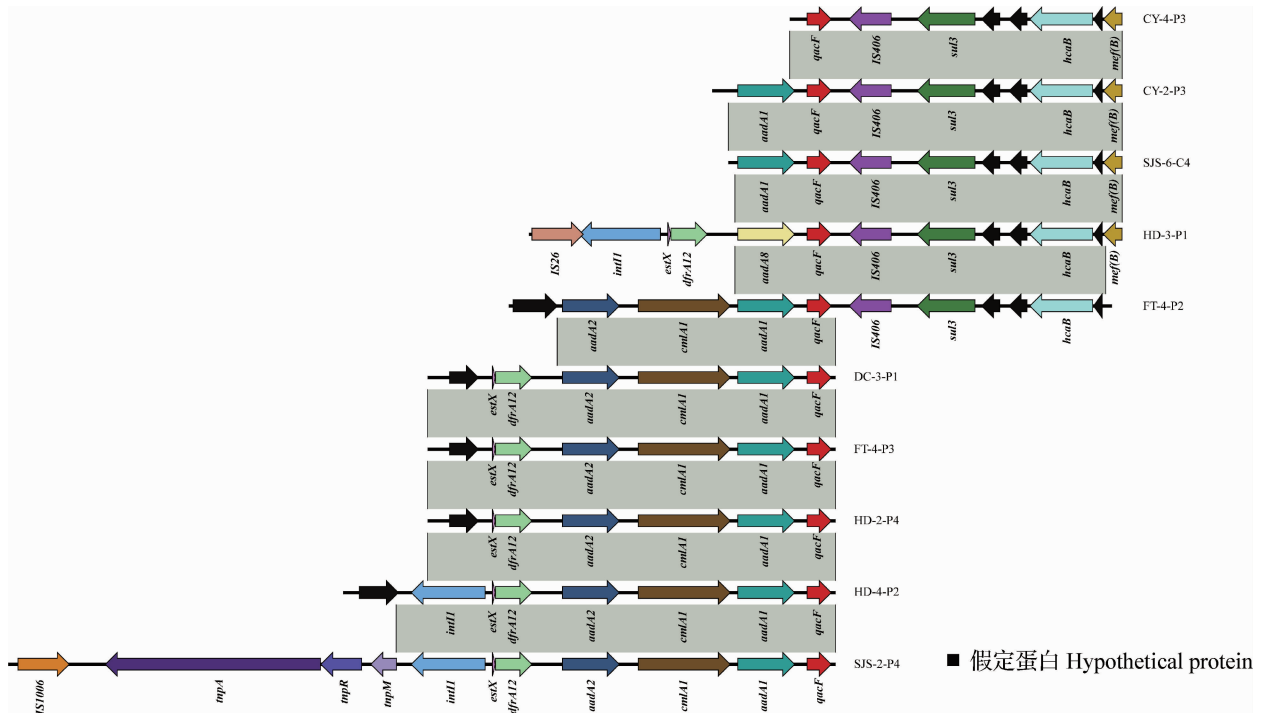


图 7 沙门菌季铵盐类消毒剂抗性基因 *qacF* 遗传环境示意图

Fig. 7 Genetic environment schematic diagram of *Salmonella* quaternary ammonium disinfectant resistance gene *qacF*

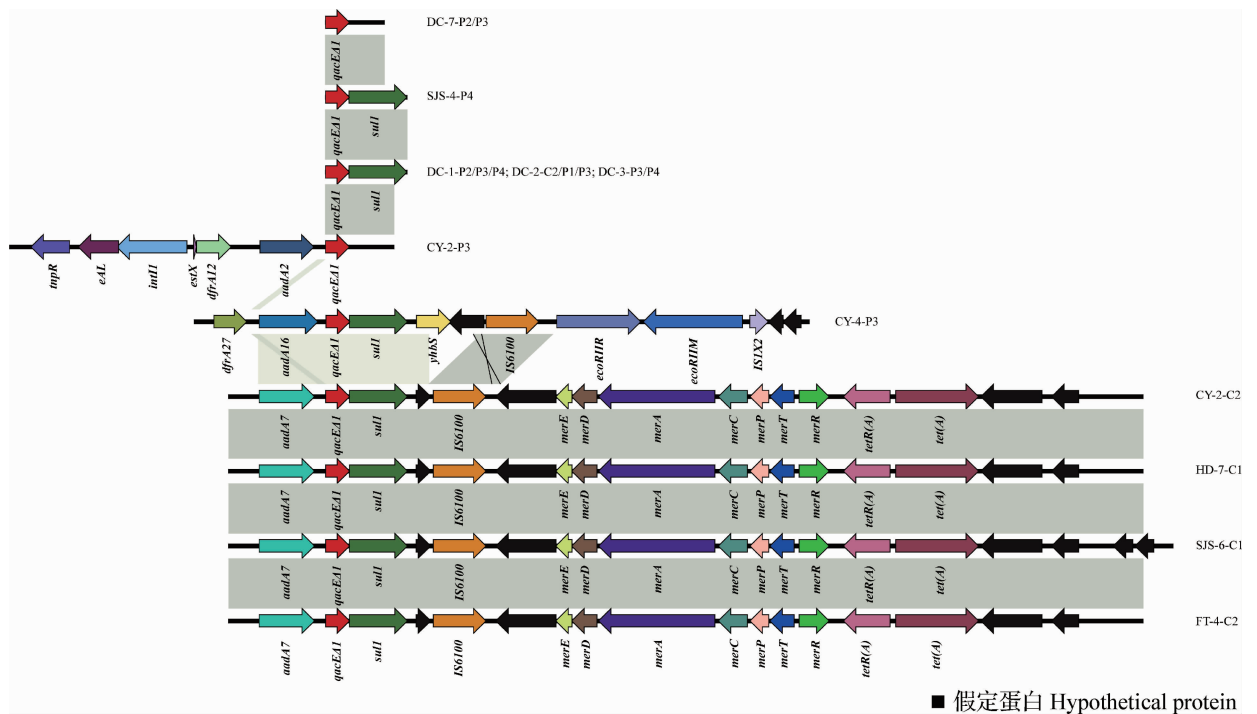


图 8 沙门菌季铵盐类消毒剂抗性基因 *qacEΔ1* 遗传环境示意图

Fig. 8 Genetic environment schematic diagram of *Salmonella* quaternary ammonium disinfectant resistance gene *qacEΔ1*

3 讨论

沙门菌是一种革兰阴性(G^-)菌,通常寄居在

人类和动物的肠道中,广泛存在于自然界,能够通过粪便在不同动物之间传播,也可以通过被污染的食品传播。食用被污染的肉、蛋和奶制品是人类感

染沙门菌的主要原因,人类感染后会出现腹泻、呕吐和发热等症状,严重者还会引起菌血症等并发症,儿童、老人和免疫力低下的患者等是重症高发人群。张成龙等^[22]对 2011—2020 年 10 年间北京地区导致腹泻的多重耐药菌进行了筛选培养和分析,发现沙门菌的检出率位于第 3 位,是造成腹泻最常见的病原菌之一。Wang 等^[23]对 2006—2019 年 14 年间我国沙门菌的血清型和耐药性进行了动态监测,发现 ST11 为优势序列型,肠炎沙门菌在东部、北部和西北地区为优势血清型。Wang 等^[24]对 2014—2015 年我国 5 个省份沙门菌进行了流行病学调查,发现鸡肉的检出率最高,肠炎沙门菌是检出的 66 种血清型中主要的优势血清型之一,上述研究结果与本试验结果存在较高的一致性。Mu 等^[25]研究指出, I, 4, [5], 12:i:-沙门菌的流行率逐年升高,是猪和人中分离的主要流行血清型,且多重耐药情况也愈发严重,本试验结果中 I, 4, [5], 12:i:-沙门菌的检出率为第二,只有 1 株 FT-1-C1 来自鸡源,其他均来自猪源,提示应进一步加强猪源多重耐药沙门菌的防控。

在动物和人类感染沙门菌后,通常会使用抗生素进行治疗,但由于药物的不合理使用,使得临床菌株耐药现象日益严重。受限于沙门菌研究的地域性,本试验主要与市内其他的相关报道进行对比分析。畅晓辉等^[26]对 2017 年北京地区肉类样品中的沙门菌进行全基因组分型和耐药基因型分析,285 份样品分离出的 38 株沙门菌多为鸡源,且肠炎沙门菌这一血清型占比最高,常见的耐药基因种类有氨基糖苷类和 β -内酰胺类等,与本试验的全基因组分析结果相似。刘伟等^[27]对 2015—2020 年 6 年间北京市海淀区食源性疾病患者的粪便和肛拭子样本进行了检测和分析,发现沙门菌的检出率逐年增高,且耐药性也呈上升趋势。从保障食品安全和人类健康的角度出发,相关部门应加强对沙门菌的流行和耐药监测,降低其在食品流通环节的污染风险,减少疾病的发生。

消毒剂作为防控多重耐药沙门菌从食品向人类传播的手段之一,在动物源性食品生产和销售各个环节均有使用。在各类消毒剂的压力下,沙门菌也逐渐获得了相应的抗性基因以抵抗其杀灭作用。杨明哲等^[28]指出,沙门菌在季铵盐类消毒剂的压力下能够产生适应性,影响该类消毒剂抗性的外排泵基因主要为 *qac* 基因家族。吴上等^[29]在使用不同类型的消毒剂胁迫伤寒沙门菌标准菌株后,发现消毒剂能够与抗生素产生共同耐药或者诱导耐

药。本试验分离得到的 79 株野生型沙门菌中,除 *sitD*、*marA* 和 *acrB* 等沙门菌中固有的消毒剂抗性基因外,检出率最高的为季铵盐类消毒剂 *qac* 基因,且携带消毒剂抗性基因数量多的菌株,耐药基因的携带率也较高。Chen 等^[21]研究表明,消毒剂暴露下可以诱导沙门菌的交叉耐药,且携带 *qacEΔ1* 基因的一类整合子与消毒剂和抗生素抗性水平存在正相关性,本试验 *qacEΔ1* 基因的遗传环境中所携带的耐药基因类型(氨基糖苷类 *aadA* 基因、磺胺类耐药基因 *sul1* 和二氢叶酸还原酶 *dhfr* 基因)与其报道存在一致性。杨盛智等^[30]研究发现,*qacEΔ1* 基因与 *sul1* 基因存在显著相关性,本试验遗传环境图谱中,*qacEΔ1* 基因的下游大部分都为 *sul1* 基因,与上述报道相符。此外,通过遗传环境图谱可知,沙门菌中出现了多个耐药基因串联的现象,而这种现象一般是由整合子介导的。本试验部分菌株 *qacF* 与 *qacEΔ1* 基因上游检出了耐药基因串联的区域,并检出了 I 类整合子的 *intI1* 基因,推测该部分耐药基因可能是由 *intI1* 型 I 类整合子所介导的。Ye 等^[31]研究发现,2018—2019 年我国重庆某地猪场的 51 株 *intI1* 阳性沙门菌中有 42 株携带有耐药基因盒,并推测甲氧苄氨嘧啶耐药基因 *dhfr* 可能促成了甲氧苄氨嘧啶耐药表型的出现,与上述研究相比,本试验中虽没有检出连续的耐药基因盒,但存在个别的 *dhfrA12* 耐药基因,提示 I 类整合子的存在能够赋予沙门菌消毒剂和抗生素抗性,增大了沙门菌流行与传播的风险。同时,本试验从多株分离菌中检出了 I 类整合子 *intI1* 基因,但由于二代测序技术的读长限制,该基因的实际携带率可能更高,提示 *intI1* 型 I 类整合子可能是介导消毒剂抗性基因和抗生素耐药基因在本地区沙门菌中传播的因素之一。因此,在消毒剂压力下,沙门菌在产生消毒剂抗性的同时,由于消毒剂抗性基因与抗生素耐药基因共存于整合子中,也存在间接促进抗生素耐药基因传播的可能。

综上,本试验从北京市超市和农贸市场分离获得 79 株猪源和鸡源沙门菌,其优势 ST 型、优势血清型和耐药基因的检出情况与该地区先前报道大致相符,对消毒剂抗性基因的分析弥补了本地区该类数据的空白。除外排泵等非某一类型消毒剂的抗性基因外,季铵盐类消毒剂抗性基因 *qacEΔ1* 和 *qacF* 的检出率最高。消毒剂抗性基因与耐药基因二者的关联性分析表明,携带消毒剂抗性基因较多的菌株往往携带较多的耐药基因,提示消毒剂抗性压力也可诱导更多耐药菌株的产生。为防控多重

耐药沙门菌可能带来的风险,应加强动物源性食品监测,进而保障公共卫生安全。

参考文献:

- [1] Hage E R, Rayess Y E, Bonifait L, *et al.* A national study through a 'Farm-to-fork' approach to determine *Salmonella* dissemination along with the Lebanese poultry production chain[J]. *Zoonoses Public Health*, 2022, 69(5): 499–513.
- [2] Chen T, Jiang J, Ye C, *et al.* Genotypic characterization and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* isolated from chicken, pork and the environment at abattoirs and supermarkets in Chongqing, China [J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 456.
- [3] Threlfall E J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections [J]. *FEMS Microbiol Reviews*, 2002, 26(2): 141–148.
- [4] Zhou Q, Zhong Y, Shan Z, *et al.* Etiological survey and traceability analysis of a foodborne disease outbreak of *Salmonella* senftenberg in Guizhou Province[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2023, 20(8): 351–357.
- [5] Pławińska-Czarnak J, Wódz K, Kizerwetter-Świda M, *et al.* Multi-drug resistance to *Salmonella* spp. when isolated from raw meat products[J]. *Antibiotics*, 2022, 11(7): 876.
- [6] Wallis C V, Lowden P, Marshall-Jones Z V, *et al.* Distinct fermentation and antibiotic sensitivity profiles exist in *Salmonellae* of canine and human origin [J]. *BMC Microbiology*, 2018, 18(1): 15.
- [7] Silva C, Calva E, Maloy S. One health and food-borne disease: *Salmonella* transmission between humans, animals, and plants [J]. *Microbiol Spectrum*, 2014, 2(1): 20–2013.
- [8] Magdy O S, Moussa I M, Hussein H A, *et al.* Genetic diversity of *Salmonella enterica* recovered from chickens farms and its potential transmission to human [J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2020, 13(4): 571–576.
- [9] Khan H, Liu M, Kayani M U R, *et al.* DNA phosphorothioate modification facilitates the dissemination of *mcr-1* and *bla_{NDM-1}* in drinking water supply systems [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 268: 115799.
- [10] Chen Z, Guo J, Jiang Y, *et al.* High concentration and high dose of disinfectants and antibiotics used during the COVID-19 pandemic threaten human health [J]. *Environmental Sciences Europe*, 2021, 33(1): 11.
- [11] 张可玟, 胡泓, 陈刚. 微生物消毒剂抗性机理[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2022, 49(1): 34–47.
- [12] Tong C, Hu H, Chen G, *et al.* Disinfectant resistance in bacteria: mechanisms, spread, and resolution strategies [J]. *Environmental Research*, 2021, 195: 110897.
- [13] Ribič U, Klančnik A, Jeršek B. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from industrial cleanrooms under regular routine disinfection [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 122(5): 1186–1196.
- [14] Skovgaard S, Nielsen L N, Larsen M H, *et al.* *Staphylococcus epidermidis* isolated in 1965 are more susceptible to triclosan than current isolates [J]. *Public Library of Science One*, 2013, 8(4): e62197.
- [15] Kim M, Weigand M R, Oh S, *et al.* Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(17): e01201-18.
- [16] Gadea R, Fernández Fuentes M Á, Pérez Pulido R, *et al.* Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods [J]. *Food Microbiology*, 2017, 63: 58–71.
- [17] Lu J, Guo J. Disinfection spreads antimicrobial resistance [J]. *Science*, 2021, 371(6528): 474.
- [18] Zhang Y, Gu A Z, He M, *et al.* Subinhibitory concentrations of disinfectants promote the horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across Genera [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(1): 570–580.
- [19] Deng W, Quan Y, Yang S, *et al.* Antibiotic resistance in *Salmonella* from retail foods of animal origin and its association with disinfectant and heavy metal resistance [J]. *Microbial Drug Resistance*, 2018, 24(6): 782–791.
- [20] Mustafa G R, Zhao K, He X, *et al.* Heavy metal resistance in *Salmonella typhimurium* and its association with disinfectant and antibiotic resistance [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 702725.
- [21] Chen S, Fu J, Zhao K, *et al.* Class I integron carrying *qacEΔ1* gene confers resistance to disinfectant and antibiotics in *Salmonella* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2023, 404: 110319.
- [22] 张成龙, 陈素明, 张树永, 等. 北京地区多重耐药的腹泻病原菌的构成及耐药特点 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2023, 30(4): 559–563.
- [23] Wang Y, Liu Y, Lyu N, *et al.* The temporal dynamics of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* and predominant serovars in China [J]. *National Science Review*, 2023, 10(3): nwaac269.
- [24] Wang W, Zhao L, Hu Y, *et al.* Epidemiological study on prevalence, serovar diversity, multidrug resistance, and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases of *Salmonella* spp. from patients with diarrhea, food of animal origin, and pets in several provinces of China [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64(7): e00092-20.
- [25] Mu Y, Li R, Du P, *et al.* Genomic epidemiology of ST34 monophasic *Salmonella enterica* serovar typhimurium from clinical patients from 2008 to 2017 in Henan, China [J]. *Engineering*, 2022, 15: 34–44.
- [26] 畅晓晖, 张捷, 亓合媛, 等. 北京地区肉类中沙门氏菌全基因组分型及耐药分析 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(3): 783–791.
- [27] 刘伟, 尹可欣, 白婧, 等. 北京市海淀区食源性疾病沙门菌血清型分布和耐药性分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2022, 32(1): 64–67.
- [28] 杨明哲, 董庆利, 牛洪梅, 等. 沙门氏菌对季铵盐类消毒剂的适应性耐受机制研究进展 [J]. *工业微生物*, 2023, 53(3): 83–90.
- [29] 吴上, 杨阳, 孙嘉笛, 等. 消毒剂胁迫鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028s 的抗性及其耐药性测定 [J]. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2021, 52(1): 13–18.
- [30] 杨盛智, 吴国艳, 龙梅, 等. 鸡蛋生产链中沙门氏菌对抗生素及消毒剂的耐药性研究 [J]. *遗传*, 2016, 38(10): 948–956.
- [31] Ye C, Xu D, Chen J, *et al.* Antimicrobial resistance and molecular characterization of class I integron in *Salmonella* isolates recovered from pig farms in Chongqing, China [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2021, 18(10): 712–717.

(责任编辑 孟迪)

禽呼肠孤病毒在我国部分地区蛋鸡群中的血清流行率和风险因素分析

郑好¹, 杨霞¹, 张素¹, 赵一萌¹, 汤君宇¹, 高丽¹, 曹红¹,
马国明², 王占新³, 郑世军¹, 王永强¹

(1. 中国农业大学动物医学院 兽医公共卫生安全全国重点实验室 农业农村部动物流行病学重点实验室, 北京 海淀 100193; 2. 北农大科技股份有限公司, 北京 海淀 100193; 3. 温氏食品集团股份有限公司 广东省畜禽健康养殖与环境控制企业重点实验室, 广东 云浮 527300)

摘要:禽呼肠孤病毒(ARV)在我国流行范围较广,感染家禽后使其出现病毒性关节炎、生长不良和产蛋量下降等表现,对我国养禽业造成较严重的经济损失。为了解我国蛋鸡群中 ARV 的流行情况及存在的感染风险因素,本试验在 2022 年 11 月—2023 年 3 月从北京、天津、河北、山东、河南、江苏、陕西、湖北和重庆 9 个省市的 45 个蛋鸡养殖场(其中包括祖代蛋鸡群、父母代蛋鸡群和商品代蛋鸡群),收集共计 45 份调查问卷和 968 份血清样本。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中的 ARV 抗体,并结合调查问卷,采用单因素分析和逻辑回归分析方法找到蛋鸡出现 ARV 感染症状的风险因素。ELISA 检测结果显示,968 份血清样本中检出阳性 863 份,阳性率为 89.15% (95% CI:87.0% ~ 91.0%);单因素分析结果显示,全进全出饲养模式下的蛋鸡出现 ARV 感染症状的概率显著低于区域性全进全出饲养模式或不同日龄、不同批次混养饲养模式下的蛋鸡,且具有较强程度的关联($P < 0.05$, $0.1 < OR < 0.3$);生物安全防控严格的大、中型规模化养殖场(5 万只以上)的蛋鸡出现 ARV 感染症状的概率显著低于生物安全防控存在不足的小型养殖场(2 万 ~ 5 万只)的蛋鸡,且具有较强程度的关联($P < 0.05$, $0.1 < OR < 0.3$);员工不注意对鸡舍消毒的养殖场饲养的蛋鸡出现 ARV 感染症状的概率显著高于员工对鸡舍具有较强或一般消毒意识的养殖场饲养的蛋鸡,具有中等程度的关联($P < 0.05$, $1.5 < OR < 3.0$)。综上所述,饲养模式、养殖场规模和员工对鸡舍的消毒意识可能是产蛋鸡群感染 ARV 的风险因素。

关键词:蛋鸡; 禽呼肠孤病毒(ARV); 抗体检测; 风险因素

中图分类号:S851.31+2

文献标志码:A

文章编号:0529-6005(2024)03-0001-08

Seroprevalence and Risk Factors Analysis of Avian Reovirus in Layer Chicken Flocks in Some Areas of China

ZHENG Hao¹, YANG Xia¹, ZHANG Su¹, ZHAO Yimeng¹, TANG Junyu¹, GAO Li¹, CAO Hong¹,
MA Guoming², WANG Zhanxin³, ZHENG Shijun¹, WANG Yongqiang¹

(1. National Key Laboratory of Veterinary Public Health and Safety Key Laboratory of Animal Epidemiology and Zoonosis of Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Beinongda Technology Co., Ltd., Beijing 100193, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Livestock and Poultry Health Breeding and Environmental Control, Wens Food Group Co., Ltd., Yunfu 527300, China)

Abstract: Avian reovirus (ARV) is widely prevalent in China, causing viral arthritis, growth retardation, and decreased egg production in infected poultry, leading to significant economic losses in the poultry industry. To understand the prevalence of ARV in layer chicken flocks in China and identify potential risk factors for infection, this study was conducted from November 2022 to March 2023 in 45 chicken farms across nine provinces and municipalities, including Beijing, Tianjin, Hebei, Shandong, Henan, Jiangsu, Shaanxi, Hubei, and Chongqing. The surveyed farms included grandparent, parent, and commercial layer chicken flocks. A total of 45 questionnaires and 968 serum samples were collected. ARV antibodies in the serum were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Single-factor analysis and logistic regression analysis, in conjunction with the questionnaire data,

收稿日期:2023-05-18

基金项目:国家自然科学基金(32072850)

作者简介:郑好(2000-),女,本科生,就读于动物医学专业,E-mail:1016261538@qq.com

通信作者:王永强,E-mail:vetyq@cau.edu.cn

were employed to identify risk factors for ARV infection symptoms in layer chickens. The ELISA results showed that out of 968 serum samples, 863 were positive, yielding a positivity rate of 89.15% (95% CI: 87.0% – 91.0%). Single-factor analysis revealed that the onset of ARV infection symptoms of layer chickens in an all-in-all-out rearing mode was significantly lower than those in regional all-in-all-out or mixed-age and batch rearing mode, and this association was statistically significant ($P < 0.05$, $0.1 < OR < 0.3$). The onset of ARV infection symptoms of layer chickens in large and medium-scale poultry farms (over 50 000 chickens) with strict biosecurity measures was significantly lower than those in small-scale farms (20 000 – 50 000 chickens) with inadequate biosecurity measures, and this association was statistically significant ($P < 0.05$, $0.1 < OR < 0.3$). The onset of ARV infection symptoms of layer chickens raised in farms where staff paid little attention to shed disinfection was significantly higher than those in farms where staff had strong or moderate disinfection awareness, and this association was of moderate strength ($P < 0.05$, $1.5 < OR < 3.0$). In conclusion, the rearing mode, farm size, and staff's awareness of disinfection in chicken coops are potential risk factors for ARV infection in layer chicken flocks.

Key words: layer chicken ; avian reovirus (ARV) ; antibody detection ; risk factor

Corresponding author: WANG Yongqiang , E-mail : vetwyq@cau.edu.cn

禽呼肠孤病毒 (Avian reovirus, ARV) 属于呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属,呈球形的正二十面体结构,具有双层衣壳,衣壳外无囊膜包被。该病毒于 1954 年由 Fahey 和 Crawley^[1] 首次从病鸡呼吸道内分离得到,于 1972 年首次被确定为鸡病毒性关节炎的致病因子^[2],1985 年王锡堃等^[3] 证实我国存在 ARV 感染。ARV 基因组为线性双股 RNA,可分为 10 个基因片段,按照其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移率由大到小依次可分为 L 组 (包含 L1、L2 和 L3 三个基因片段)、M 组 (包含 M1、M2 和 M3 三个基因片段)、S 组 (包含 S1、S2、S3 和 S4 四个基因片段)。这些基因片段至少编码 8 种结构蛋白 (λA 、 λB 、 λC 、 μA 、 μB 、 σA 、 σB 和 σC 蛋白) 和 4 种非结构蛋白 (μNS 、 σNS 、p10 和 p17 蛋白)^[4]。其中, σC 蛋白位于病毒外层衣壳,是 ARV 表达的所有蛋白中唯一具有吸附宿主细胞能力的蛋白,在病毒侵染细胞时可协助病毒吸附到宿主细胞表面;此外, σC 蛋白还是 ARV 的主要抗原,其 C-末端具有特异性的中和抗原表位,可刺激宿主分泌特异性中和抗体,因此, σC 蛋白是开发抗 ARV 亚单位疫苗的研究热点,该蛋白可通过大肠杆菌等原核生物或鸡胚成纤维细胞等真核系统进行表达,且表达产物具有良好的免疫原性,因此, σC 蛋白也可被用于建立 ARV 的临床诊断方法,如酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测方法的建立^[5]。

ARV 主要有 3 种致病表现,一是影响宿主的胃肠道功能,主要表现为消化吸收不良、腹泻、精神萎靡和羽毛杂乱等;二是导致宿主发生关节疾病,主要表现为关节炎、腿部肿胀和跛行等;三是同时表现胃肠道和关节症状。该病毒在感染家禽后还可破坏宿主的免疫系统,增加宿主对其他病原微生物的易感性,导致家禽死淘率升高、饲料转化率降低

和产蛋量下降,此外,该病毒引起的关节疾病使禽类屠宰废弃率升高,给我国养禽业造成了较大的经济损失^[4]。

ARV 在世界范围内普遍存在,摩洛哥、埃及和莫桑比克南部等地的肉鸡群中 ARV 感染率均在 80% 以上^[6-8]。该病毒宿主广泛,可感染包括鸡、火鸡和鸭在内的多种禽类,传播途径包括水平传播和垂直传播,临床中以水平传播为主,ARV 在物品表面、饲料和饮水中都能存活一定时间,粪便是主要的传播媒介^[9-10]。ARV 在我国流行范围较广,感染率呈上升趋势,近年来的研究表明,该病毒在我国的流行过程中毒力不断增强,毒株基因型日趋复杂且存在变异株,在吉林省、山东省和安徽省等地分别在病鸡体内分离得到了 ARV 变异株 ARV-JL21-0102、ARV-SD20-3203、AHZJ19 和 PHC-2020-0545,其中 AHZJ19 与当前的疫苗株 S1133 的 σC 蛋白仅有 50% 左右的同源性^[11-15],提示目前临床使用的传统疫苗可能无法提供完全的免疫保护作用。目前,我国并没有治疗禽类感染 ARV 的有效药物,因此做好预防工作是降低 ARV 感染率、减少病鸡死淘率的重要措施。本试验从我国 9 个不同省市采集蛋鸡血清样本共 968 份,结合血清学检测和问卷调查分析,了解目前我国产蛋鸡群中 ARV 的血清流行率,寻找蛋鸡感染 ARV 的风险因素,以期丰富我国产蛋鸡群中 ARV 的流行病学数据,并可为我国养禽业制定 ARV 的防控措施提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记兔抗鸡 IgG,购自北京博奥森生物技术有限公司;脱脂奶粉,购自内蒙古伊利实业集团股份有限公司;缓冲液,购自中科迈晨 (北京)

科技有限公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine,TMB)显色液,购自广东标允生物科技有限公司;终止液,购自温氏食品集团股份有限公司。ARV 抗原,本实验室自制;含吐温-20 的磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline with Tween-20,PBST):在 2 L 1 × PBS 中加入 1 mL Tween-20,于磁力搅拌器上搅拌均匀。

1.2 主要仪器和器材 96 孔酶标板,购自康宁公司;自动洗板机,购自美国 Bio-Rad 公司;酶标仪,购自瑞士 TECAN 公司;−80 ℃超低温冰箱,购自美国 Forma Scientific 公司;制冰机,购自日本 SANYO 电气公司;电热恒温培养箱,购自上海蓝豹实验仪器有限公司;磁力搅拌器,购自美国 IKA 公司。

1.3 样本采集和处理 2022 年 11 月—2023 年 3 月,对北京、天津、河北、山东、河南、江苏、陕西、湖北和重庆 9 个省市的 45 个蛋鸡养殖场进行问卷调查,调查内容包括养殖场厂址、鸡群类型、养殖模式、饲养模式、养殖场规模、蛋鸡是否出现 ARV 感染症状、出现 ARV 感染症状的日龄和是否接种过 ARV 疫苗等信息,并由各养殖场随机选择 20 ~ 35 只蛋鸡采集血液,制备血清,每只蛋鸡平均收集 0.5 ~ 1 mL 血清,保存在 1.5 mL 离心管中,低温运送至实验室,放于 −80 ℃冷冻备用,用于血清学检测。

1.4 血清学 ELISA 检测方法 96 孔板包被已纯化的 ARV 抗原,加入 1:100 稀释的血清样本,37 ℃孵育 1 h。待血清中的 ARV 特异性抗体与包被的病毒抗原形成复合物。用 PBST 洗去孔中未结合的物质,加入 HRP 标记兔抗鸡 IgG,37 ℃孵育 30 min,待酶标抗体与孔中附着的水清抗体结合。用 PBST 洗去未结合的偶联物,加入 TMB 显色液,10 min 后加

入终止液。用酶标仪检测并记录各孔在 620 nm 波长处的吸光度(Optical density,OD)值。

1.5 血清阴阳性临界值的确定 阴阳性临界值 = 阴性样本 OD_{620 nm} 值的平均值 + 2.58 × 标准差(Standard deviation,SD),若待测血清样本 OD_{620 nm} 值小于阴阳性临界值则判定为阴性,反之则判定为阳性。

1.6 数据分析 使用 Microsoft Excel 整理 ELISA 检测结果,结合调查问卷信息,用 SPSS 26 软件对风险因素进行单因素分析和逻辑回归分析,根据 *P* 值(Probability value,*P*-value)和比值比(Odds ratio,OR)判断所分析的风险因素与蛋鸡出现 ARV 感染症状之间的显著性和关联程度。

2 结果

2.1 ARV 感染情况 2022 年 11 月—2023 年 3 月,共从 45 个采样鸡群收集 968 份血清样本,采用 ELISA 方法检测血清样本中 ARV 特异性抗体,共检测出 863 份阳性血清,阳性率为 89.15%(95% CI: 87.0% ~ 91.0%)。在 968 份血清样本中有 80 份血清样本采自接种过 ARV 疫苗的鸡群,ELISA 检测结果显示均为阳性血清;其余 888 份血清采自未接种过 ARV 疫苗的鸡群,ELISA 检测结果显示有 783 份为阳性血清,阳性率为 88.18%(95% CI: 85.9% ~ 90.2%)。对于每个采样鸡群,ARV 感染率介于 10% ~ 100%(表 1)。湖北地区、陕西地区、江苏地区、河南地区、天津地区、重庆地区、河北地区、北京地区和山东地区未接种过 ARV 疫苗的采样鸡群的 ARV 感染率分别为 100%、100%、100%、100%、100%、100%、99.10%、93.98% 和 56.31%。

表 1 采样蛋鸡群 ELISA 检测结果
Table 1 ELISA detection results of sampled layer chicken flocks

省或市 Province or city	采样蛋鸡 群数 Number of sampled layer chicken flock	血清阳性样本 数/血清样本 总数(阳性率) [<i>n</i> / <i>n</i> (%)] Serum positive samples/Total serum samples (Positivity rate)	出现 ARV 症状前是 否接种过 ARV 疫苗 Whether the chickens were vaccinated with ARV vaccine before the onset of ARV symptoms	采血前是否接种 过 ARV 疫苗 Whether the chickens were vaccinated with ARV vaccine before blood collection	采样蛋鸡群症状 Symptoms in the sampled layer chicken flock	出现症状 的日龄 Age of the onset of symptoms
湖北省 Hubei	4	20/20(100)	否 No	否 No	关节肿大,腿部肿胀,生长不良,腿部 关节变形(扁平状) Swollen joints, swollen legs, stunted growth,deformed leg joints (flat)	>25
		20/20(100)	否 No	否 No	—	
		30/30(100)	否 No	否 No	关节肿大,腿部关节变形(扁平状) Swollen joints,deformed leg joints (flat)	120
		18/18(100)	否 No	否 No	—	

续表

省或市 Province or city	采样蛋鸡 群数 Number of sampled layer chicken flock	血清阳性样本 数/血清样本 总数(阳性率) [$n/n(\%)$] Serum positive samples/Total serum samples (Positivity rate)	出现 ARV 症状前是 否接种过 ARV 疫苗 Whether the chickens were vaccinated with ARV vaccine before the onset of ARV symptoms	采血前是否接种 过 ARV 疫苗 Whether the chickens were vaccinated with ARV vaccine before blood collection	采样蛋鸡群症状 Symptoms in the sampled layer chicken flock	出现症状 的日龄 Age of the onset of symptoms
北京市 Beijing	5	30/30(100)	否 No	否 No	—	
		20/20(100)	否 No	否 No	—	
		20/20(100)	否 No	否 No	—	
		8/13(61.54)	否 No	否 No	—	
		20/20(100)	是 Yes	是 Yes	跛行,腿部关节变形(扁平状) Claudication, deformed leg joints (flat)	>25
山东省 Shandong	15	19/20(95.00)	否 No	否 No	—	
		20/20(100)	否 No	否 No	—	
		20/20(100)	否 No	否 No	—	
		21/21(100)	否 No	否 No	极个别生长不良 Very occasional stunted growth	
		10/10(100)	否 No	是 Yes	关节肿大 Swollen joints	112
		20/20(100)	否 No	是 Yes	关节肿大,生长不良 Swollen joints, stunted growth	234
		10/10(100)	否 No	是 Yes	跛行,关节肿大,生长不良 Claudication, swollen joints, stunted growth	189
		12/20(60)	否 No	否 No	—	
		8/20(40.00)	否 No	否 No	—	
		4/20(20.00)	否 No	否 No	—	
		11/19(57.89)	否 No	否 No	—	
		2/17(11.76)	否 No	否 No	—	
		1/10(10.00)	否 No	否 No	—	
		5/17(29.41)	否 No	否 No	—	
		2/18(11.11)	否 No	否 No	—	
陕西省 Shaanxi	1	35/35(100)	否 No	否 No	跛行,关节肿大,腿部肿胀,生长不良 Claudication, swollen joints, swollen legs, stunted growth	>25
江苏省 Jiangsu	1	30/30(100)	否 No	否 No	关节肿大,腿部肿胀,腿部关节变形(扁平状) Swollen joints, swollen legs, deformed leg joints (flat)	120
河南省 Henan	3	5/5(100)	否 No	否 No	—	
		8/8(100)	否 No	否 No	跛行,关节肿大,腿部关节变形(扁平状) Claudication, swollen joints, deformed leg joints (flat)	>25
		6/6(100)	否 No	否 No	—	
天津市 Tianjin	1	20/20(100)	否 No	否 No	—	
河北省 Hebei	13	20/20(100)	否 No	否 No	—	
		24/26(92.31)	否 No	否 No	—	
		29/30(96.67)	否 No	否 No	—	
		30/30(100)	否 No	否 No	—	

续表						
省或市 Province or city	采样蛋鸡 群数 Number of sampled layer chicken flock	血清阳性样本 数/血清样本 总数(阳性率) [n/n(%)] Serum positive samples/Total serum samples (Positivity rate)	出现 ARV 症状前是 否接种过 ARV 疫苗 Whether the chickens were vaccinated with ARV vaccine before the onset of ARV symptoms	采血前是否接种 过 ARV 疫苗 Whether the chickens were vaccinated with ARV vaccine before blood collection	采样蛋鸡群症状 Symptoms in the sampled layer chicken flock	出现症状 的日龄 Age of the onset of symptoms
		29/29(100)	否 No	否 No	—	
		25/25(100)	否 No	否 No	—	
		29/29(100)	否 No	否 No	—	
		30/30(100)	否 No	否 No	—	
		27/27(100)	否 No	否 No	—	
		30/30(100)	否 No	否 No	—	
		30/30(100)	否 No	否 No	—	
		26/26(100)	否 No	否 No	—	
		20/20(100)	否 No	是 Yes	关节肿大,腿部关节变形(扁平状) Swollen joints,deformed leg joints (flat)	>25
重庆市 Chongqing	2	30/30(100)	否 No	否 No	—	
		29/29(100)	否 No	否 No	跛行 Claudication	>25
总计 Total	45	863/968(89.15)				

注:—:未见 ARV 感染症状
Note:—:No symptoms of ARV infection were observed

在采集的所有血清样本中,采自出现 ARV 感染症状蛋鸡的血清样本有 264 份(其中包括接种过 ARV 疫苗的 80 份蛋鸡血清样本),ELISA 检测结果均为阳性,阳性率为 100% (95% CI: 98.6% ~ 100.0%);其余 704 份血清样本采自没有出现 ARV 感染症状的蛋鸡(同时未接种过 ARV 疫苗),经 ELISA 检测,其中有 599 份为阳性血清,阳性率为 85.09% (95% CI:82.2% ~ 87.6%)。

2.2 蛋鸡出现 ARV 感染症状的风险因素分析 结合调查问卷信息,统计分析不同风险因素与蛋鸡出现 ARV 感染症状的相关性,结果显示,全进全出饲养模式下的蛋鸡出现 ARV 感染症状的概率显著低于区域性全进全出饲养模式或不同日龄、不同批次混养饲养模式下的蛋鸡,且存在较强关联 ($P < 0.05, 0.1 < OR < 0.3$);大、中型规模化养殖场(5 万只以上)的蛋鸡出现 ARV 感染症状的概率显著低于小型养殖场(2 万~5 万只)的蛋鸡,且存在较强关联 ($P < 0.05, 0.1 < OR < 0.3$);员工不注意对鸡舍消毒的养殖场饲养的蛋鸡出现 ARV 感染症状的概率显著高于员工对鸡舍具有较强或一般消毒意识的养殖场饲养的蛋鸡,且存在中等程度关联($P < 0.05, 1.5 < OR < 3.0$)(表 2)。

饲养过程中有野禽出现的蛋鸡出现 ARV 感染症状的概率高于饲养过程中没有野禽出现的蛋鸡,但统计学差异不显著 ($P > 0.05$)。鸡群类型、养殖模式和蛋鸡在出现 ARV 感染症状前是否进行 ARV 疫苗免疫的统计学差异均不显著 ($P > 0.05$)(表 2)。

对单因素分析结果中具有统计学差异的风险因素进行逻辑回归分析,结果显示,饲养模式是蛋鸡出现 ARV 感染症状的风险因素($P < 0.05$)(表 3)。

3 讨论

本试验结果显示,从产蛋鸡群中收集的 968 份血清样本的 ARV 抗体阳性率为 89.15% (95% CI: 87.0% ~ 91.0%);968 份血清中采自未接种过 ARV 疫苗的蛋鸡血清样本共计 888 份,其中 783 份为阳性血清,阳性率为 88.18% (95% CI: 85.9% ~ 90.2%),未接种过 ARV 疫苗但体内存在特异性抗体的蛋鸡,其体内抗体的存在归因于 ARV 感染。本试验测得的蛋鸡群平均血清 ARV 抗体阳性率与 Pu 等^[16]在 2008 年报道的我国蛋鸡群平均血清 ARV 抗体阳性率(92%)相比略低,可能与样本来源、采样方法不同有关。在所有抽样地区中,未接种过 ARV 疫苗的采样蛋鸡群具有较高的平均血清阳性率(56% ~ 100%),表明 ARV 感染在我国蛋鸡群中较常见,分析其可能原因包括:ARV 在家禽种群中普遍存在,采样蛋鸡群的 ARV 疫苗接种率普遍偏低,蛋鸡体内不存在具有免疫保护作用的特异性抗体,容易受到环境中 ARV 的感染^[9-10];鸡群使用受污染的疫苗也可能是导致病毒感染在鸡群中高发的原因^[16-17],但本试验中并没有对采样鸡群的疫苗进行分析,因此无法确定本试验中采样鸡群血清抗体阳性率较高是否与疫苗有关。本试验中有 1 个位

表 2 蛋鸡出现 ARV 感染症状的单因素分析
Table 2 Single-factor analysis of ARV infection symptoms in layer chickens

序号 Serial number	变量 Variable	分类 Category	阳性数 Number of positive	阴性数 Number of negative	阳性率(%) Positivity rate	阳性率的95%置信区间(%)			OR 的95% 置信区间			P 值 P-value	卡方值 χ ²
						95% confidence interval of positivity rate			比值比 OR	95% confidence interval of OR			
						上限 Upper	下限 Lower	下限 Lower		上限 Upper			
1	鸡群类型 Flock type	祖代 Ancestor	1	1	50.0	98.7	1.3	3.000	57.365	0.157	0.481	0	
		父母代 Parent	8	15	34.8	57.3	16.4	1.600	6.031	0.424	0.526	0.132	
		商品代 Commercial	5	15	25.0	49.1	8.7	1.000					
2	养殖模式 Culture mode	引种 Introduction	9	18	33.3	54.0	16.5	1.000					
		自繁自养 Self-breeding and self-raising	5	13	27.8	53.5	9.7	0.769	2.838	0.209	0.753	0.156	
3	饲养模式 Rearing mode	全进全出 All-in-all-out	1	13	7.1	33.9	0.2	0.026	0.341	0.002	0.002	7.904	
		区域性全进全出 Regional all-in-all-out	7	16	30.4	52.9	13.2	0.146	0.909	0.023	0.043	3.184	
		不同日龄、不同批次混养 Mixed age and batch	6	2	75.0	96.8	34.9	1.000					
4	养殖场规模 Farm size	小型养殖场 Small-scale farm (20 000 ~ 50 000 只)	3	1	75.0	99.4	19.4	1.000					
		中型规模化养殖场 Medium-scale poultry farm (50 000 ~ 100 000 只)	1	9	10.0	44.5	0.3	0.037	0.793	0.002	0.041	3.159	
		大型规模化养殖场 Large-scale poultry farm (> 100 000 只)	10	21	32.3	51.4	16.7	0.159	1.724	0.015	0.134	1.244	
5	饲养过程中是否有野禽出现 Whether there is the presence of wild birds during the rearing process	是 Yes	5	3	62.5	91.5	24.5	1.000	0.971	0.038	0.085	2.869	
		否 No	9	28	24.3	41.2	11.8	0.193					

于北京地区的养殖场,采样鸡群在未出现 ARV 症状前即接种了 ARV 疫苗,但之后仍出现 ARV 感染症状,分析其原因可能为采样鸡群感染的是野毒株,传统的 ARV 疫苗株无法提供足够的免疫保护作用,验证这一推测需要对发病鸡群进行病毒分离。

本试验血清样本中有 704 份采自没有出现 ARV 感染症状且未接种过 ARV 疫苗的蛋鸡,检测结果显示,704 份血清样本中有 599 份为阳性血清,阳性率为 85.09% (95% CI:82.2% ~87.6%),表明 ARV 在采样鸡群中大多呈隐性感染;发病鸡群主要表现为病毒性关节炎症状,这与报道一致^[9]。根据本试验收集的调查问卷,发病鸡群往往在 25 日龄后,多于 100 ~200 日龄表现出临床症状。

本试验逻辑回归分析结果显示,饲养模式是蛋鸡出现 ARV 感染症状的风险因素,分析其原因可能是全进全出的饲养模式保障了同一栋鸡舍或同一个养殖场可以在同一时间进入同批同日龄的蛋鸡,在出栏时也可以在同一时间将场内的蛋鸡全部出场,这时整栋鸡舍或养殖场没有蛋鸡存在,可以对环境进行彻底的打扫消毒,降低饮水、饲料和栋舍墙壁表面等环境中的病毒含量,因此相较于不实施全进全出饲养模式的养殖场鸡群,实施全进全出饲养模式的养殖场鸡群出现 ARV 感染症状的概率较低^[16,18]。

本试验单因素分析显示,不同养殖场规模下的生物安全防控差异和员工对鸡舍的消毒意识差异与蛋鸡出现 ARV 感染症状有关。分析其原因可能是小型养殖场受到资金、人员和场地规模等多因素限制,导致无法给鸡群提供与大、中型规模化养殖场等同的良好的环境管理条件,造成病毒感染率上升^[18];当员工具有较强的鸡舍消毒意识时,可有效降低环境中的病毒含量,减少蛋鸡接触环境中 ARV 的机会,从而降低感染风险^[19]。在蛋鸡出现 ARV 感染症状前是否接种 ARV 疫苗的统计学差异不显著($P>0.05$),可能与本试验样本量较小有关。

综上,本试验结果显示,饲养模式、养殖场规模和员工对鸡舍的消毒意识与产蛋鸡群出现 ARV 感染症状之间存在显著相关性,提示在 ARV 的防控中需要重点关注这三方面。

参考文献:

[1] Fahey J E, Crawley J F. Studies on chronic respiratory disease of chickens II. isolation of a virus[J]. Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science, 1954, 18(1): 13-21.

- [2] Walker E R, Friedman M H, Olson N O. Electron microscopic study of an avian reovirus that causes arthritis[J]. Journal of Ultrastructure Research, 1972, 41(1): 67-79.
- [3] 王锡堃,唐秀英,刘庆祥,等. 应用琼扩试验检查鸡病毒性关节炎[J]. 家畜传染病, 1985(3): 26-27.
- [4] 陈祥. 禽呼肠孤病毒 p10 蛋白在宿主细胞中降解的分子机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [5] 王孟月,吴芑,程艺,等. 禽呼肠孤病毒 σ C 重组蛋白的表达纯化与免疫原性分析[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(9): 1720-1725.
- [6] Al-Ebshahy E, Mohamed S, Abas O. First report of seroprevalence and genetic characterization of avian orthoreovirus in Egypt[J]. Tropical Animal Health and Production, 2020, 52(3): 1049-1054.
- [7] Achhal E A, Zhari A, Aitlaydi N, et al. First seroprevalence survey of avian reovirus in broiler breeders chicken flocks in Morocco[J]. Viruses, 2023, 15(6), 1318.
- [8] Pinto S C, Aleixo J, Camela K, et al. Seroprevalence of infectious bronchitis virus and avian reovirus in free backyard chickens[J]. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 2022, 89(1): e1-e4.
- [9] Jones R C. Avian reovirus infections[J]. Revue Scientifique et Technique de l'OIE, 2000, 19(2): 614-625.
- [10] 钟泽麓. 禽呼肠孤病毒研究进展[J]. 广西畜牧兽医, 2012, 28(4): 251-255.
- [11] 罗丹,刘芮,高玉龙,等. 肉鸡禽呼肠孤病毒变异株的分离与致病性研究[J]. 中国家禽, 2021, 43(10): 25-31.
- [12] 刘芮,罗丹,李凯,等. 一株基因 V 型禽呼肠孤病毒的分离鉴定与致病性研究[J]. 中国兽医科学, 2022, 52(5): 603-609.
- [13] Zhang J, Li T, Wang W, et al. Isolation and molecular characteristics of a novel recombinant avian orthoreovirus from chickens in China[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 771755.
- [14] Yan T, Guo L, Jiang X, et al. Discovery of a novel recombinant avian orthoreovirus in China[J]. Veterinary Microbiology, 2021, 260: 109094.
- [15] 李彬,韩晓青,刘平,等. 2020—2021 年我国部分省份禽呼肠孤病毒分子流行病学调查[J]. 中国动物检疫, 2022, 39(8): 6-11.
- [16] Pu J, Liu X, Guo Y, et al. Seroprevalence of avian reovirus in egg-laying chicken flocks in China[J]. Avian Diseases, 2008, 52(4): 675-679.
- [17] Bruhn S, Bruckner L, Ottiger H P. Application of RT-PCR for the detection of avian reovirus contamination in avian viral vaccines[J]. Journal of Virological Methods, 2005, 123(2): 179-186.
- [18] 成祖斌,张新国,于传军. 中小规模蛋鸡场疫病防控现状与相关措施[J]. 中国动物保健, 2021, 23(2): 37-38.
- [19] Savage C E, Jones R C. The survival of avian reoviruses on materials associated with the poultry house environment[J]. Avian Pathology, 2003, 32(4): 417-423.

(责任编辑 孟迪)

北京地区猫 4 种肠道原虫流行病学调查

洪慧颐, 张兆霞, 宋世豪, 于咏兰

(中国农业大学动物医学院, 北京 海淀 100193)

摘要: 隐孢子虫和贾第鞭毛虫等原虫不仅可寄生于猫的肠道, 同时可引起人类感染。为掌握北京地区猫肠道常见原虫的感染情况, 本调查于 2021 年 6—12 月共采集 628 份北京市不同区域猫的粪便样本并提取核酸, 对胎儿三毛滴虫 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 基因、蓝氏贾第鞭毛虫核糖体 RNA 小亚基 (SSU rRNA) 基因、隐孢子虫 SSU rRNA 基因和囊等孢球虫线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (mtCOI) 基因进行 PCR 扩增和测序, 并统计分析这 4 种肠道原虫的感染率和感染风险因素; 针对蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫阳性样本, 根据蓝氏贾第鞭毛虫的 β -贾第素 (bg)、谷氨酸脱氢酶 (gdh) 和磷酸丙糖异构酶 (tpi) 基因以及隐孢子虫的 60 kDa 糖蛋白 (gp60) 基因对其进行分子分型。结果显示, 北京地区猫肠道原虫的总感染率为 20.22% (127/628), 混合感染率为 16.54% (21/127); 其中, 胎儿三毛滴虫感染率为 10.19% (64/628)、蓝氏贾第鞭毛虫感染率为 6.69% (42/628)、隐孢子虫感染率为 4.46% (28/628)、囊等孢球虫感染率为 3.03% (19/628)。蓝氏贾第鞭毛虫基因型为集聚体 B (26/41)、F (12/41)、C (1/41)、A I (1/41) 和 A/F (1/41), 隐孢子虫均为猫隐孢子虫, 包括 XIXa (23/25) 和 XIXc (2/25) 亚型家族。经分析, 纯种猫更易感染胎儿三毛滴虫和蓝氏贾第鞭毛虫 ($P < 0.05$), 患猫的主要临床症状是腹泻或软便 ($P < 0.01$); 年龄小于 1 岁、雌性和未绝育的猫更易感染隐孢子虫 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 年龄小于 1 岁、未绝育、未免疫和未驱虫的猫更易感染囊等孢球虫 ($P < 0.01$)。结果表明, 北京地区猫感染的原虫存在人兽共患基因型, 包括蓝氏贾第鞭毛虫集聚体 A 和 B 以及猫隐孢子虫亚型家族 XIXa 和 XIXc, 有潜在的人兽共患风险。

关键词: 胎儿三毛滴虫; 蓝氏贾第鞭毛虫; 隐孢子虫; 囊等孢球虫; 猫

中图分类号: S858.293

文献标志码: A

文章编号: 0529-6005(2024)01-0029-08

Epidemiological Investigation of Four Intestinal Protozoa in Cats in the Beijing

HONG Huiyi, ZHANG Zhaoxia, SONG Shihao, YU Yonglan

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Protozoa such as *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., which can parasitize the cat's intestinal tracts, are known to cause infections in humans. In order to understand the infection status of common intestinal protozoa in cats in Beijing, this survey collected 628 fecal samples from cats in different regions of Beijing from June to December 2021. The nucleic acid was extracted, and PCR amplification and sequencing were performed on the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 gene of *Tritrichomonas foetus*, small subunit ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA) gene of *Giardia duodenalis*, SSU rRNA gene of *Cryptosporidium* spp., and cytochrome C oxidase subunit I (mtCOI) gene of *Cystoisospora* spp., and the infection rates and risk factors of these four intestinal protozoa were analyzed. For positive samples of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp., molecular typing was performed based on the β -giardin (bg), glutamate dehydrogenase (gdh), and triosephosphate isomerase (tpi) genes of *Giardia duodenalis* and the glycoprotein 60 (gp60) gene of *Cryptosporidium* spp.. The results showed that the overall infection rate of intestinal protozoa in cats in Beijing was 20.22% (127/628), and the mixed infection rate was 16.54% (21/127). Among them, *Tritrichomonas foetus* had an infection rate of 10.19% (64/628), *Giardia duodenalis* had an infection rate of 6.69% (42/628), *Cryptosporidium* spp. had an infection rate of 4.46% (28/628), and *Cystoisospora* spp. had an infection rate of 3.03% (19/628). The genotypes of *Giardia duodenalis* were as follows: assemblage B (26/41), F (12/41), C (1/41), A I (1/41), and A/F (1/41), while *Cryptosporidium* spp. were all of the *Cryptosporidium felis*, including subtype families XIXa (23/25) and XIXc (2/25). The analysis showed that purebred cats were more susceptible to *Tritrichomonas foetus* and *Giardia duodenalis* ($P < 0.05$), and the main clinical symptoms in

收稿日期: 2022-07-01

基金项目: 中国农业大学教育教学改革专项 (00133001)

作者简介: 洪慧颐 (1996-), 女, 硕士, 研究方向为小动物临床诊疗, E-mail: hunghuiyi@hotmail.com

张兆霞 (1979-), 女, 兽医师, 硕士, 研究方向为小动物临床病理学, E-mail: zhangzhaoxia1979@sohu.com

注: 张兆霞与洪慧颐对本文具有同等贡献

通信作者: 于咏兰, E-mail: gaodifeihao@cau.edu.cn

infected cats were diarrhea or soft stools ($P < 0.01$). Cats under 1 year old, females, and non-sterilized cats were more susceptible to *Cryptosporidium* spp. ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while cats under 1 year old, non-sterilized, non-immunized, and not dewormed were more susceptible to *Cystoisospora* spp. ($P < 0.01$). The results indicate the presence of zoonotic genotypes in protozoa infecting cats in Beijing, including *Giardia duodenalis* assemblages A and B and *Cryptosporidium* spp. subtype families XIXa and XIXc, posing a potential risk of zoonotic transmission.

Key words: *Tritrichomonas foetus*; *Giardia duodenalis*; *Cryptosporidium* spp.; *Cystoisospora* spp.; cat

Corresponding author: YU Yonglan, E-mail: gaodifeihao@cau.edu.cn

腹泻是猫常见的临床症状,可由多种因素引起,原虫是导致猫慢性腹泻的重要病原,其中胎儿三毛滴虫(*Tritrichomonas foetus*)、蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia duodenalis*)、隐孢子虫(*Cryptosporidium* spp.)和囊等孢球虫(*Cystoisospora* spp.)(旧称为等孢球虫)较为常见,诊疗不当可发展为慢性腹泻,进一步导致脱水、电解质紊乱、酸碱失衡、营养不良和肠道菌群失调等多种并发症^[1]。其中,蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫是引起人类水源性腹泻的重要人兽共患病病原,在养猫数量日益增加的今天,尤其具有不可忽略的公共卫生学意义。北京地区猫群数量庞大,却罕见上述4种肠道原虫的相关流行病学数据,因此,本试验使用分子生物学方法对北京地区猫群体的这4种原虫进行调查,并对其中的蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫进行分子分型,评估感染风险因子和潜在的人兽共患风险,以期为临床疾病的诊疗和人兽共患病的预防提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集 2021年6—12月,于中国农业大学教学动物医院采集猫的粪便样本共628份,记录样本相关信息,包括年龄、性别、品种、绝育情况、免疫史、驱虫史和症状(是否腹泻/软便)。

1.2 主要试剂 TIANamp Stool DNA Kit 粪便基因组DNA提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;2 × High-GC PCR StarMix with Loading Dye 和 2 × Taq PCR StarMix with Loading Dye,均购自北京康润诚业生物科技有限公司;BIOWEST Regular Agarose G-10,购自上海贝晶生物技术有限公司;Ultra GelRed (10 000 ×),购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;DL-1 000 DNA Marker,购自宝日生物技术(北京)有限公司。

1.3 主要仪器 DW-HL218型超低温冷冻储存箱,购自中科美菱低温科技股份有限公司;YXQ-50S II型高压灭菌锅,购自北京隆丰天科技有限公司;Sorvall Legend Micro 17R 微量离心机,购自美国赛默飞世尔科技公司;HWS12型电热恒温水浴锅,购

自上海一恒科技有限公司;DYY-6C型电泳仪和WD-9413B型凝胶成像分析仪,均购自北京六一生物科技有限公司;Bio-Best135A型凝胶成像系统,购自美国SIM公司。

1.4 试验方法

1.4.1 形态学检查 使用生理盐水冲洗结肠获得粪便样本后,吸取一滴样本滴于载玻片上,盖上盖玻片后于光学显微镜下观察,记录镜检结果。

1.4.2 DNA提取 按照粪便基因组DNA提取试剂盒说明书操作提取粪便DNA,DNA样本存于-20℃备用。

1.4.3 PCR扩增 分别对胎儿三毛滴虫的ITS1-5.8S rRNA-ITS2基因、蓝氏贾第鞭毛虫核糖体RNA小亚基(Small subunit ribosomal ribonucleic acid,SSU rRNA)基因、隐孢子虫SSU rRNA基因和囊等孢球虫线粒体细胞色素C氧化酶亚基I(Cytochrome C oxidase subunit 1,mtCOI)基因进行聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction,PCR)扩增,以统计分析这4种原虫在北京地区猫群中的感染率。对蓝氏贾第鞭毛虫PCR阳性样本进一步通过PCR扩增β-贾第素(β-giardin, bg)、谷氨酸脱氢酶(Glutamate dehydrogenase, gdh)和磷酸丙糖异构酶(Triosephosphate isomerase, tpi)基因;对隐孢子虫PCR阳性样本进一步通过PCR扩增微小隐孢子虫60 kDa糖蛋白(Glycoprotein 60, gp60)基因和猫隐孢子虫gp60基因,以对蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫进行分子分型。PCR扩增的引物序列、反应体系和反应程序参照参考文献进行(表1)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,阳性样本的PCR产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4.4 序列比对和系统进化关系分析 在GenBank数据库中搜索蓝氏贾第鞭毛虫不同集聚体(Assemblage)的基因序列并下载,使用Snapgene 6.0.2修饰PCR产物测序结果,并与相关序列进行比对,以区分集聚体类型。在GenBank数据库中搜索隐孢子虫不同基因型的基因序列并下载,使用Snapgene

6.0.2 修饰 PCR 产物测序结果,并与相关序列进行比对,以区分基因型。使用 MEGA 11.0.11 的邻接法 (Neighbor Joining, NJ) 构建隐孢子虫 *gp60* 基因的系统进化树,Bootstrap Replications 设为 1 000 次重复。

表 1 肠道原虫 PCR 扩增的目的基因和引物序列
Table 1 Target genes and primer sequences for PCR amplification of intestinal protozoa

原虫种类 Protozoan species	目的基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence
胎儿三毛滴虫 <i>Tritrichomonas foetus</i>	ITS1-5.8S rRNA-ITS2 ^[2]	TFR3 TFR4	CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA
蓝氏贾第鞭毛虫 <i>Giardia duodenalis</i>	SSU rRNA ^{*[3]}	Gia2029 Gia2150c RH11 RH4	AAGTGTGCTGCAGACGGACTC CTGCTGCCGTCCTTGGATGT CATCCGGTCGATCCTGCC ACTCGAACCCCTGATTCTCCGCCAGG
隐孢子虫 <i>Cryptosporidium</i> spp.	SSU rRNA ^{*[4]}	F1 R1 F2 R2	TTCTAGAGCTAATACATGCG CCCATTTCCTTCGAAACAGGA GGAAGGTTGTATTTATTAGATAAAG AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA
囊等孢球虫 <i>Cystoisospora</i> spp.	<i>mtCOI</i> ^[5]	Sdae_Cox1_260F Sdae_Cox1_1147R	GATCTTTATGTTYTTRATGCC CATTACCCATAACYACACC
蓝氏贾第鞭毛虫 <i>Giardia duodenalis</i>	<i>bg</i> ^{*[6]}	G7 G759 BG1 BG2	AAGCCCGACGACCTACCCGCACTGC GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC GAACGAACGAGATCGAGGTCCG CTCGACGAGCTTCGTGTT
蓝氏贾第鞭毛虫 <i>Giardia duodenalis</i>	<i>gdh</i> ^{*[7]}	GDHeF GDHiR GDHiF GDHiR	TCAACGTYAAYCGYGGYTTCGTT GTTRTCCTTGCACATCTCC CAGTACAACCTCYGCTCTCGG GTTRTCCTTGCACATCTCC
蓝氏贾第鞭毛虫 <i>Giardia duodenalis</i>	<i>tpi</i> ^{*[8]}	AL3543 AL3546 AL3544 AL3545	AAATATGCCTGCTCGTGG CAAACCTTTTCCGCAAACC CCCTTCATCGGIGGTAACCTT GTGGCCACCACICCCGTGCC
猫隐孢子虫 <i>Cryptosporidium felis</i>	<i>gp60</i> ^{*[9]}	GP60CF_F1 GP60CF_R1 GP60CF_F2 GP60CF_R2	TTTCCGTTATTGTTGCAGTTGCA ATCGGAATCCCAACATCGAAC GGGCGTTCTGAAGGATGTAA GGGCGTTCTGAAGGATGTAA
微小隐孢子虫 <i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>gp60</i> ^{*[10-11]}	C7F1 C7R1 AL3532 AL3534	ATGAGATTGTCGCTCATTATCG TTACAACACGAATAAGGCTGC TCCGCTGTATTCTCAGCC GCAGAGGAACCAGCATC

注: *:巢式 PCR,引物序列按顺序分别为第 1 对和第 2 对引物序列
Note: *:Nested PCR,the primer sequences are in order of the first and second pairs of primers

1.4.5 感染风险因素的评估和分析 使用 Excel 记录整理病例信息和检测结果,使用 IBM SPSS Statistics 28.0.0.0 进行卡方检验,分析年龄、性别、品种、绝育情况、免疫史、驱虫史和症状(是否腹泻/软便)与 4 种肠道原虫感染率的相关性。

2 结果

2.1 北京地区猫肠道原虫感染情况 本试验共收集了 628 份粪便样本,肠道原虫的总感染率为 20.22% (127/628),胎儿三毛滴虫感染率为 10.19% (64/628)、蓝氏贾第鞭毛虫感染率为 6.69% (42/628)、隐孢子虫感染率为 4.46% (28/628)、囊等孢球虫感染率为 3.03% (19/628);其中 106 份样本仅感染 1 种原

虫,16 份样本感染 2 种原虫,5 份样本感染 3 种原虫,混合感染率为 16.54% (21/127)。部分样本的 PCR 扩增结果如图 1 所示。测序结果显示,28 例隐孢子虫均为猫隐孢子虫(*Cryptosporidium felis*),19 例囊等孢球虫包括 14 例猫囊等孢球虫(*Cystoisospora felis*)和 5 例芮氏囊等孢球虫(*Cystoisospora rivolta*)。

2.2 感染风险因素的评估和分析 对不同年龄、性别、品种、绝育情况、免疫史、驱虫史和症状(是否腹泻/软便)的猫粪便样本进行统计分析,结果如表 2 所示,纯种猫更易感染胎儿三毛滴虫和蓝氏贾第鞭毛虫($P<0.05$),患猫的主要临床症状是腹泻或软便($P<0.01$);年龄小于 1 岁、雌性和未绝育的猫更易感染隐孢子虫($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且单一感

染隐孢子虫的猫均为表现腹泻/软便的症状;年龄小于1岁、未绝育、未免疫和未驱虫的猫更易感染囊

等孢球虫($P<0.01$);其余因素与4种肠道原虫感染率无显著相关性($P>0.05$)。

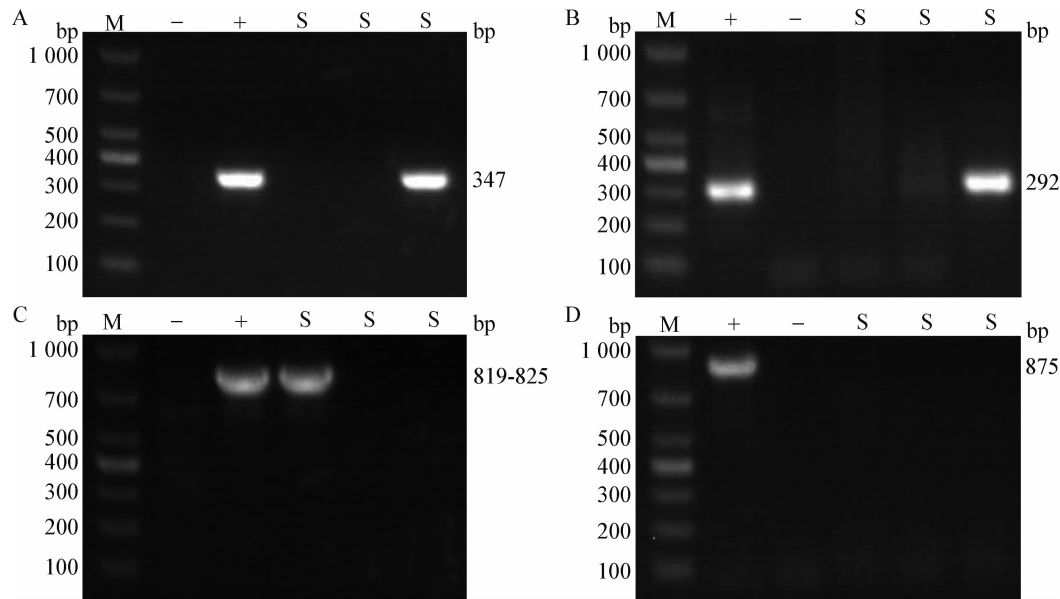


图1 部分样本的肠道原虫 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of intestinal protozoa from some samples

A: 胎儿三毛滴虫 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 基因; B: 蓝氏贾第鞭毛虫 SSU rRNA 基因; C: 隐孢子虫 SSU rRNA 基因; D: 囊等孢球虫 *mtCOI* 基因; M: DL-1 000 DNA 相对分子质量标准; +: 阳性对照; -: 阴性对照; S: 样本

A: ITS1-5.8S rRNA-ITS2 gene of *Tritrichomonas foetus*; B: SSU rRNA gene of *Giardia duodenalis*; C: SSU rRNA gene of *Cryptosporidium* spp.; D: *mtCOI* gene of *Cystoisospora* spp.; M: DL-1 000 DNA Marker; +: Positive control; -: Negative control; S: Sample

表2 北京地区猫肠道原虫感染情况

Table 2 Intestinal protozoa infection status in cats in Beijing

类别 Category		样本数 Number of specimens	阳性样本数(感染率) [n (%)] Number of positives (Positive rate)			
			胎儿三毛滴虫 <i>Tritrichomonas foetus</i>	蓝氏贾第鞭毛虫 <i>Giardia duodenalis</i>	隐孢子虫 <i>Cryptosporidium</i> spp.	囊等孢球虫 <i>Cystoisospora</i> spp.
年龄 Age	<1y	286	28(9.79)	25(8.74)	18(6.29) *	18(6.29) **
	≥1y	342	36(10.53)	17(4.97)	10(2.92)	1(0.29)
性别 Sex	雄性	395	38(9.62)	28(7.09)	11(2.78) **	9(2.28)
	雌性	233	26(11.16)	14(6.01)	17(7.30)	10(4.29)
品种 Breed	纯种	448	53(11.83) *	37(8.26) *	19(4.24)	11(2.46)
	非纯种	180	11(6.11)	5(2.78)	9(5.00)	8(4.44)
绝育情况 Neuter	绝育	215	27(12.56)	9(4.19)	3(1.40) **	1(0.47) **
	未绝育	413	37(8.96)	33(7.99)	25(6.05)	18(4.36)
免疫史 Immunization	已免疫	206	29(14.08)	19(9.22)	11(5.34)	3(1.46) **
	未免疫	210	21(10.00)	12(5.71)	11(5.24)	16(7.62)
驱虫史 Insecticide	已驱虫	185	30(16.22)	20(10.81)	12(6.49)	3(1.62) **
	未驱虫	126	13(10.32)	9(7.14)	5(3.97)	15(11.90)
症状 Symptom	腹泻/软便	306	51(16.67) **	30(9.80) **	12(3.92)	12(3.92)
	无腹泻/软便	127	7(5.51)	7(5.51)	10(7.87)	5(3.94)

注: 相同种类原虫同一感染因素分析, *: 差异显著($P<0.05$), **: 差异极显著($P<0.01$), 无标记: 差异不显著($P>0.05$)

Note: For the same type of protozoa, the same infection factor analysis, *: significant difference ($P<0.05$), **: highly significant difference ($P<0.01$), no label: no significant difference ($P>0.05$)

2.3 蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫的分子分型 通过镜检和 PCR 扩增共检出蓝氏贾第鞭毛虫感染样本 42 份,其中 SSU rRNA、*bg*、*gdh* 和 *tpi* 四个基因的扩增效率分别为 97.6% (41/42)、71.4% (30/42)、69.0% (29/42) 和 42.9% (18/42),另有 1 份镜检阳性样本 4 个基因的 PCR 扩增结果均为阴性。通过 PCR 扩增

共检出隐孢子虫 28 份,SSU rRNA 基因测序结果均为猫隐孢子虫,其中 PCR 扩增检出微小隐孢子虫 *gp60* 基因 0 份,猫隐孢子虫 *gp60* 基因 25 份,即本试验所得 28 份隐孢子虫阳性样本均为猫隐孢子虫,无混合感染情况,猫隐孢子虫 *gp60* 基因扩增效率为 89.29% (25/28)。部分样本的分子分型 PCR 扩增结果如图 2 所示。

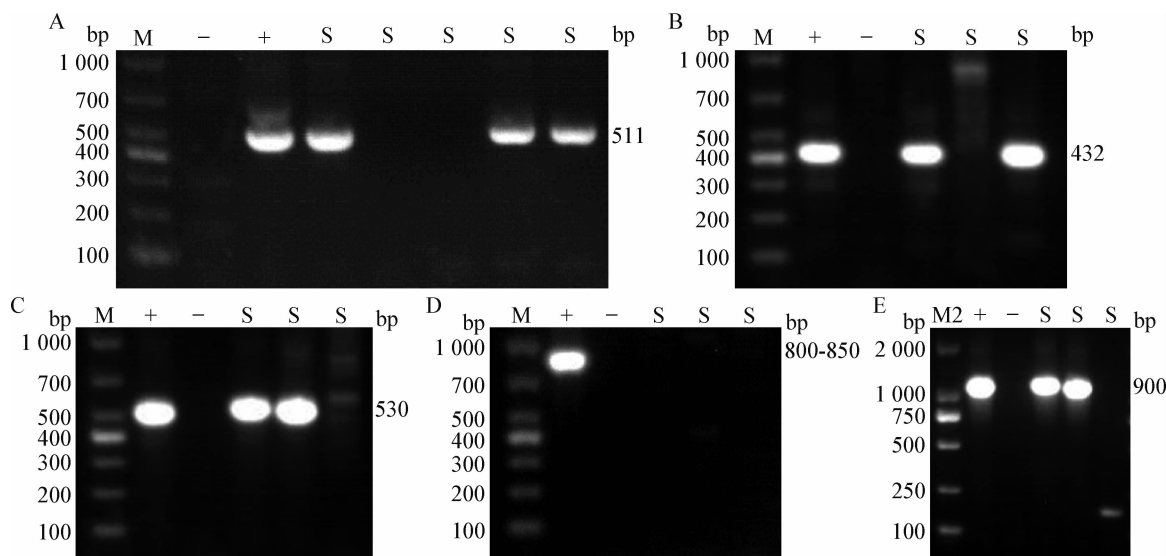


图2 部分样本的蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫分子分型 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of molecular subtyping of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in some samples

A: 蓝氏贾第鞭毛虫 *bg* 基因; B: 蓝氏贾第鞭毛虫 *gdh* 基因; C: 蓝氏贾第鞭毛虫 *tpi* 基因; D: 微小隐孢子虫 *gp60* 基因; E: 猫隐孢子虫 *gp60* 基因; M: DL-1 000 DNA 相对分子质量标准; M2: DL-2 000 DNA 相对分子质量标准; +: 阳性对照; -: 阴性对照; S: 临床样本

A: *bg* gene of *Giardia duodenalis*; B: *gdh* gene of *Giardia duodenalis*; C: *tpi* gene of *Giardia duodenalis*; D: *gp60* gene of *Cryptosporidium parvum*; E: *gp60* gene of *Cryptosporidium felis*; M: DL-1 000 DNA Marker; M2: DL-2 000 DNA Marker; + :Positive control; - :Negative control; S: Sample

蓝氏贾第鞭毛虫 SSU rRNA、*bg*、*gdh* 和 *tpi* 基因的集聚体分型结果显示,在 PCR 扩增结果呈阳性的 41 例样本中,集聚体 B 占比最高,为 63.41% (26/41),其次为集聚体 F,占比为 29.27% (12/41),此外有 1 份集聚体 C、1 份集聚体 A I 和 1 份集聚体 A/F。所有样本于不同基因位点的分型结果一致,未见混合感染集聚体的情况。

将 25 份猫隐孢子虫 *gp60* 基因 PCR 扩增结果呈阳性样本的基因序列与 GenBank 中公布序列进行比对,将本试验获得的分离株命名为“编号 + Cat Beijing”,系统进化树如图 3 所示,25 份猫隐孢子虫阳性样本中,有 23 份属于 XIXa 亚型家族,有 2 份属于 XIXc 亚型家族。

3 讨论

本试验首次对北京地区猫胎儿三毛滴虫、蓝氏

贾第鞭毛虫、隐孢子虫和囊等孢球虫的感染情况进行了分子流行病学调查。感染率由高到低分别为胎儿三毛滴虫 (10.19% , 64/628)、蓝氏贾第鞭毛虫 (6.69% , 42/628)、隐孢子虫 (4.46% , 28/628) 和囊等孢球虫 (3.03% , 19/628)。这 4 种肠道原虫在世界范围内感染率分别介于 0% ~ 81.8%^[12]、1.3% ~ 27.3%^[13]、0% ~ 40.8%^[14] 和 1% ~ 67%^[15], 相比较而言, 本试验所得的感染率中等偏低。分析其原因可能是因为肠道原虫在猫只数量密集、卫生条件有限的场所更容易传播, 而本试验样本集中于动物医院采集, 调查群体主要为家养宠物猫, 未包含卫生条件较差或猫只数量密集的群体, 如流浪猫或收容所猫。

本试验结果显示,猫的胎儿三毛滴虫和蓝氏贾第鞭毛虫感染率与品种相关,隐孢子虫的感染率与年龄、性别和绝育情况相关,囊等孢球虫的感染率

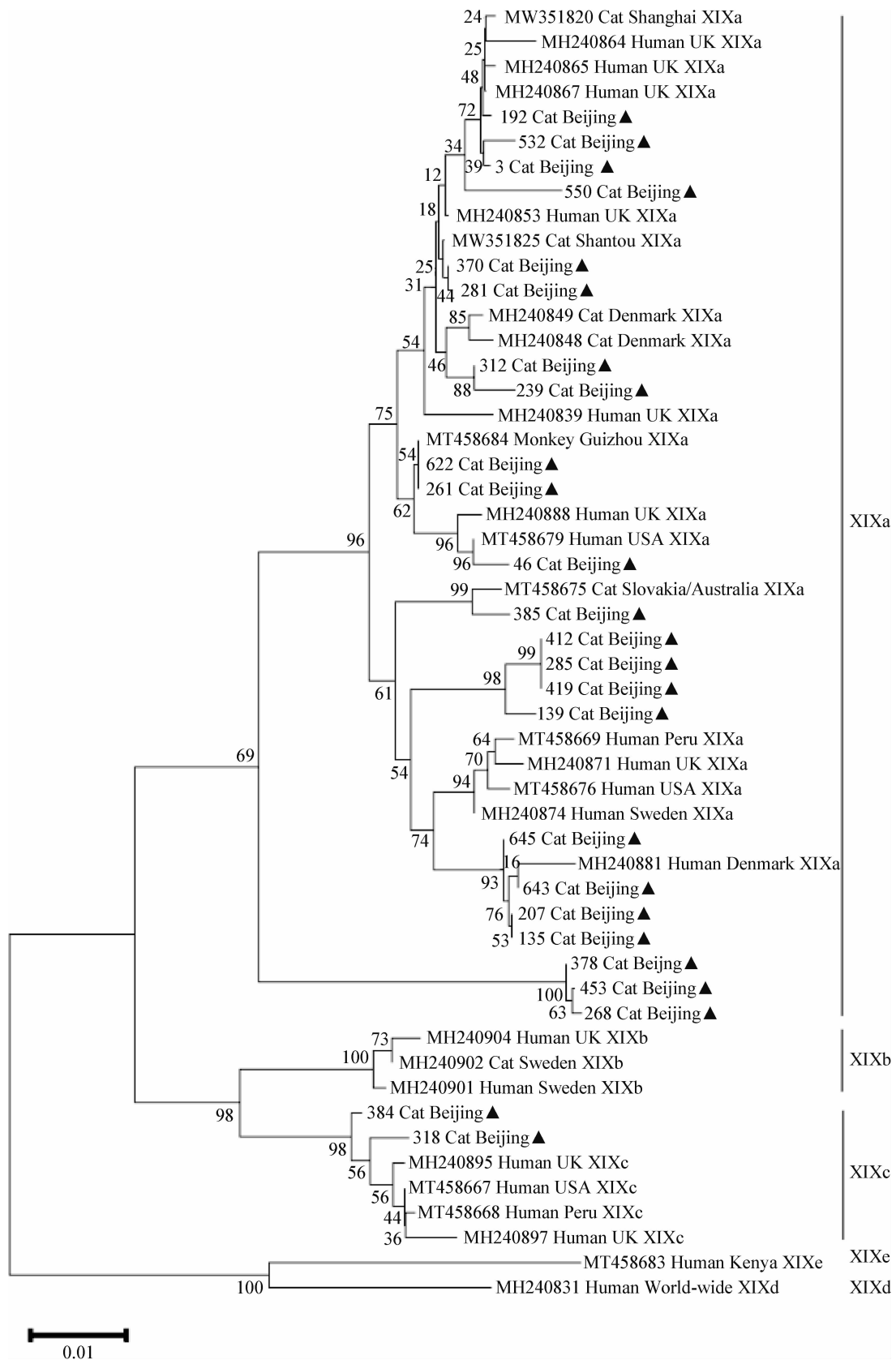


图3 基于猫隐孢子虫 *gp60* 基因构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on the *gp60* gene of *Cryptosporidium felis*

▲: 本试验所得分离株

▲: The isolates obtained in this study

与年龄、绝育情况、免疫史和驱虫史相关,此结果与国外部分研究结果一致^[12,16-18]。目前,并没有足够的证据表明纯种猫在遗传或免疫方面更易感染寄生虫,出现这些差异的原因可能主要由密集的饲养环境引起。由于商业目的,纯种猫大多生活在多猫家庭或有多猫家庭生活史,这和收容所的猫生活环境类似,互相梳理毛发或共用猫砂盆均会增加原虫传播的风险;幼龄猫可能因为免疫系统尚不成熟所以更易感染寄生虫;猫的性别与肠道原虫易感性的相关性目前尚不明确。

本试验 4 种原虫的混合感染率为 16.54% (21/127)。有研究显示,混合感染其他原虫有增加胎儿三毛滴虫感染风险和加重临床症状的可能^[19]。本试验中单一感染隐孢子虫的病例均无明显胃肠道症状,但混合感染病例均表现软便或腹泻的临床症状,与另一研究结果相符^[20]。因此,若确诊猫患有某一肠道原虫病,经治疗后症状未见明显好转时,建议排查是否存在其他原虫感染。

蓝氏贾第鞭毛虫病是在世界范围流行的重要人兽共患寄生虫病,分为集聚体 A~H,其中集聚体 A 和 B 属于人兽共患基因型,集聚体 F 为猫易感型^[18]。本试验结果显示,北京地区猫的蓝氏贾第鞭毛虫主要优势基因型为集聚体 B,其次为集聚体 F,此结果与广州市^[21]和上海市^[22]的调查结果相似。此外本试验检出 1 份样本为犬易感型集聚体 C,为单一感染,且有软便的临床症状,另有研究在犬源和人源蓝氏贾第鞭毛虫中检测出猫易感型集聚体 F^[21,23],说明蓝氏贾第鞭毛虫存在于犬和猫、人和猫之间跨物种传播的可能。本试验结果表明,北京地区猫作为伴侣动物,有同时作为蓝氏贾第鞭毛虫宿主向人类传播疾病的可能性,因此若确诊猫患有蓝氏贾第鞭毛虫病,应建议主人加强个人卫生和环境卫生的管理,避免儿童或其他动物过多地接触患猫。

猫的隐孢子虫病在世界各地多有报道,微小隐孢子虫和猫隐孢子虫为主要优势虫种^[14],在我国猫隐孢子虫是主要优势虫种^[24-26]。本试验结果显示,北京地区猫的隐孢子虫主要优势虫种为猫隐孢子虫,未见微小隐孢子虫感染,与国内研究结果^[24-25]相似。本试验基因分型结果显示,北京地区猫隐孢子虫的主要优势亚型家族是 XIXa,此结果与国外相关研究结果^[9,27-28]相符。此外,本试验有 2 株猫隐孢子虫分离株属于亚型家族 XIXc,是首次发现猫源分离株来自于此亚型家族。

虽然普遍认为猫隐孢子虫是专性寄生于猫科动物的原虫,但已有相关报道显示,猫隐孢子虫可

感染人类并引起腹泻症状^[18,29]。在我国,已发现猫隐孢子虫存在于腹泻患者、艾滋病患者、无胃肠道症状患者和住院患者中^[30]。在蒋文的研究中,从免疫健全和免疫缺陷的患者体内均可分离出猫隐孢子虫亚型家族 XIXa、XIXc 和 XIXd,即无论患者的免疫功能如何,不同亚型的猫隐孢子虫均可能感染人类^[27]。本试验所发现的猫隐孢子虫均属于人兽共患基因型,其中分离株 622 Cat Beijing 与参考序列 MT458684 的 *gp60* 基因有 100% 的同源性,MT458684 序列源于 1 名尼日利亚的艾滋病患者,也与我国的恒河猴源样本同源,进一步指示了猫隐孢子虫跨物种传播的可能。因此,若临床中检测出猫携带隐孢子虫,应告知主人潜在的人兽共患风险,保持良好的卫生条件,确保水源的清洁,以避免隐孢子虫的传播。

参考文献:

- [1] Sykes J E. Canine and feline infectious diseases[M]. St. Louis, Mo. :Elsevier/Saunders,2014.
- [2] Felleisen R S J, Lambelet N, Bachmann P, et al. Detection of *Trichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences [J]. Journal of Clinical Microbiology,1998,36(2):513-519.
- [3] Appelbee A J, Frederick L M, Heitman T L, et al. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada [J]. Veterinary Parasitology,2003,112(4):289-294.
- [4] Xiao L, Alderisio K, Limor J, et al. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool [J]. Applied and Environmental Microbiology,2000,66(12):5492-5498.
- [5] Ogedengbe M E, Ogedengbe J D, Whale J C, et al. Molecular phylogenetic analyses of tissue coccidia (sarcocystidae; apicomplexa) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial COI sequences confirms the paraphyly of the genus *Hammondia* [J]. Parasitology Open,2016,2(2):1-16.
- [6] Lalle M, Pozio E, Capelli G, et al. Genetic heterogeneity at the *B-giardin* locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes [J]. International Journal for Parasitology, 2005, 35 (2): 207-213.
- [7] Read C M, Monis P T, Andrew Thompson R C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2004,4(2):125-130.
- [8] Sulaiman I M, Fayer R, Bern C, et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* [J]. Emerging Infectious Diseases, 2003, 9 (11): 1444-1452.
- [9] Rojas-Lopez L, Elwin K, Chalmers R M, et al. Development of a *gp60*-subtyping method for *Cryptosporidium felis* [J]. Parasites &

- Vectors, 2020, 13(1):39.
- [10] Mead J R, Arrowood M J. *Cryptosporidium* methods in molecular biology[M]. New York: Humana, 2020:103–116.
- [11] Alves M, Xiao L, Sulaiman I, *et al.* Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(6): 2744–2747.
- [12] Bastos B F, Almeida F M D, Brener B. What is known about *Tritrichomonas foetus* infection in cats? [J]. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 2019, 28(1):1–11.
- [13] Cai W, Ryan U, Xiao L, *et al.* Zoonotic giardiasis: an update[J]. Parasitology Research, 2021, 120(12):4199–4218.
- [14] Meng X, Li M, Lyu C, *et al.* The global prevalence and risk factors of *Cryptosporidium* infection among cats during 1988—2021: a systematic review and meta-analysis [J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 158:105096.
- [15] Dubey J P. A review of *Cystoisospora felis* and *C. rivolta*-induced coccidiosis in cats[J]. Veterinary Parasitology, 2018, 263:34–48.
- [16] Uchôa F F D M, Sudré A P, Campos S D E, *et al.* Assessment of the diagnostic performance of four methods for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal samples from human, canine and feline carriers[J]. Journal of Microbiological Methods, 2018, 145:73–78.
- [17] Erickson M C, Ortega Y R. Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems [J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(11):2786–2808.
- [18] Ryan U M, Feng Y, Fayer R, *et al.* Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia*—a 50 year perspective (1971—2021) [J]. International Journal for Parasitology, 2021, 51(13–14):1099–1119.
- [19] Yao C, Köster L S. *Tritrichomonas foetus* infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat[J]. Veterinary Research, 2015, 46(1):35.
- [20] Gookin J L, Levy M G, Law J M, *et al.* Experimental infection of cats with *Tritrichomonas foetus* [J]. American Journal of Veterinary Research, 2001, 62(11):1690–1697.
- [21] 孙永祥. 广州市犬猫肠道寄生虫流行病学调查与三种肠道原虫基因型鉴定[D]. 广州:华南农业大学, 2019.
- [22] Xu H, Jin Y, Wu W, *et al.* Genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bienersi* and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Shanghai, China[J]. Parasites & Vectors, 2016, 9(1):121.
- [23] Silva A, Martins F, Ladeia W A, *et al.* First report of *Giardia duodenalis* assemblage F in humans and dogs in southern Brazil [J]. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, 2022, 89:101878.
- [24] Li J, Dan X, Zhu K, *et al.* Genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Guangdong, China[J]. Parasites & Vectors, 2019, 12(1):571.
- [25] Li W, Liu X, Gu Y, *et al.* Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis*, and trichomonads in domestic cats in East China[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2019, 81(6):890–896.
- [26] 杨立娟. 上海地区伴侣动物和实验动物三种致腹泻肠道原虫分子流行病学研究[D]. 吉林:吉林农业大学, 2021.
- [27] 蒋文. 医院污水中三种肠道原虫的分布及伴侣动物隐孢子虫的人兽共患特征研究[D]. 上海:华东理工大学, 2020.
- [28] Li J, Yang F, Liang R, *et al.* Subtype characterization and zoonotic potential of *Cryptosporidium felis* in cats in Guangdong and Shanghai, China[J]. Pathogens, 2021, 10(2):89.
- [29] Beser J, Toresson L, Eitrem R, *et al.* Possible zoonotic transmission of *Cryptosporidium felis* in a household[J]. Infection Ecology & Epidemiology, 2015, 5(1):28463.
- [30] Liu A, Gong B, Liu X, *et al.* A retrospective epidemiological analysis of human *Cryptosporidium* infection in China during the past three decades (1987—2018)[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2020, 14(3):e8146.

2022 年青岛地区鸡源和鸭源多黏菌素 耐药大肠杆菌流行情况

崔云昊^{1,2}, 刘志成^{1,2}, 张启迪³, 刘德俊⁴, 宋士凯⁵, 衣云鹏⁵,
李秋², 刘志海^{1,2,6}, 张亚茹⁷, 李道稳¹

(1. 天津农学院动物科学与动物医学院 天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室, 天津 西青 300392; 2. 青岛农业大学
化学与药学院, 山东 青岛 266109; 3. 青岛农业大学动物医学院, 山东 青岛 266109; 4. 中国农业大学动物医学院, 北京
海淀 100193; 5. 山东省农业科学院家禽研究所, 山东 济南 250100; 6. 河南农业大学动物医学院, 河南 郑州 450000;
7. 中国农业大学动物科学技术学院, 北京 海淀 100193)

摘要:为了分析青岛地区鸡源和鸭源多黏菌素耐药大肠杆菌的流行特征,并为多黏菌素的临床应用提供参考依据,本试验于山东省青岛市屠宰场采集鸡源和鸭源粪便样本,通过多黏菌素培养基分离大肠杆菌;分别采用琼脂稀释法、PCR、接合试验和全基因组测序,分析菌株的药物敏感性、耐药基因和毒力因子流行特征、系统发育群、*mcr-1* 基因可转移性和遗传环境。结果显示,本试验从 133 份粪便样本中共分离获得 26 株多黏菌素耐药大肠杆菌,总分离率为 19.55% (26/133),其中鸭源菌株分离率 (24.24%, 16/66) 高于鸡源菌株 (14.93%, 10/67)。药物敏感性分析结果显示,所有菌株对替加环素和美罗培南全部敏感,对其余测试药物耐药率较高 (42.31% ~ 100%),所有分离菌株均存在多重耐药现象,鸡源菌株多重耐药较为分散,而鸭源菌株多重耐药集中于 6 和 9 重。26 株分离菌株均携带黏菌素耐药基因 *mcr-1*;其余耐药基因携带率介于 7.69% ~ 96.15%, *tet(B)* 基因仅在鸡源菌株中携带 (20.00%), *qnrS* 基因在鸡源菌株中携带率 (30.00%) 显著低于鸭源 (100%)。毒力因子检测发现, *tarT*、*aer*、*pap* 和 *neuC* 基因在鸡源菌株中的携带率 (90.00%、70.00%、50.00% 和 30.00%) 高于鸭源 (62.50%、12.50%、0% 和 0%)。系统发育群结果显示,青岛地区多黏菌素耐药大肠杆菌的主要系统发育群为 A 组,占比为 76.92%。接合试验证实了部分 *mcr-1* 具有可转移性。*mcr-1* 遗传环境结果显示, *mcr-1* 上、下游并未发现插入序列。结果表明, *mcr-1* 仍旧是导致禽源多黏菌素耐药大肠杆菌流行的主要“元凶”,但鸡源和鸭源多黏菌素耐药菌株在耐药性、耐药基因和毒力因子检出率等方面表现出一定差异性。因此, *mcr-1* 在食品动物源细菌中的流行研究和监控仍旧不可忽视。

关键词:鸭; 鸡; 多黏菌素; 毒力因子; 大肠杆菌; *mcr-1*

中图分类号:S858.3

文献标志码:A

文章编号:0529-6005(2024)05-0030-09

Epidemiology of Colistin-Resistant *Escherichia coli* from Chicken and Duck Sources in Qingdao in 2022

CUI Yunhao^{1,2}, LIU Zhicheng^{1,2}, ZHANG Qidi³, LIU Dejun⁴, SONG Shikai⁵, YI Yunpeng⁵,
LI Qiu², LIU Zhihai^{1,2,6}, ZHANG Yaru⁷, LI Daowen¹

(1. Tianjin Key Laboratory of Agricultural Animal Breeding and Healthy Husbandry, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China; 2. College of Chemistry and Pharmacy, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 3. College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 4. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 5. Poultry Research Institute of Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China; 6. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China; 7. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

收稿日期:2023-11-18

基金项目: 鲁渝科技协作项目 (2022LYXZ030); 山东省青年科技创新团队项目 (2021KJ094); 山东省自然科学基金 (ZR2020QC199, ZR2020MC188); 国家自然科学基金 (32172911); 青岛农业大学高层次人才启动基金 (6631121042); 中国博士后科学基金 (2021M701105); 农业农村部智慧养殖重点实验室 (部省共建) 开放基金 (2023-TJAUKLSBF-2107)

作者简介: 崔云昊 (1998-), 男, 硕士生, 研究方向为兽医药理与毒理, E-mail: 21046997@qq.com

刘志成 (1997-), 男, 硕士生, 研究方向为兽医药理与毒理, E-mail: liuzhicheng55@163.com

注: 刘志成与崔云昊对本文具有同等贡献

通信作者: 张亚茹, E-mail: zhangyr1992110@163.com; 李道稳, E-mail: lidaowen@tjau.edu.cn

Abstract: To analyze the epidemiological characteristics of colistin-resistant *Escherichia coli* from chicken and duck sources in Qingdao and provide reference for the clinical application of colistin, samples were collected from chicken and duck feces at slaughterhouses in Qingdao, Shandong Province. Colistin-resistant *E. coli* were isolated using colistin-containing agar plates. Drug susceptibility, resistance genes, virulence factors, phylogenetic groups, transferability and genetic environment of the *mcr-1* gene were analyzed using agar dilution, PCR, conjugation assays, and whole-genome sequencing. The results showed that a total of 26 colistin-resistant *Escherichia coli* strains were isolated from 133 feces, with an overall isolation rate of 19.55% (26/133), of which the isolation rate from duck sources (24.24%, 16/66) was higher than that from chicken sources (14.93%, 10/67). Drug susceptibility analysis revealed that all strains were susceptible to tigecycline and meropenem, while resistance rates to other tested drugs were relatively high (42.31% ~ 100%). All isolated strains exhibited multidrug resistance, with chicken-source strains showing more dispersed multidrug resistance compared with duck-source strains, which were more concentrated at 6 and 9 drugs. All 26 isolates carried the colistin resistance gene *mcr-1*, while the carriage rates of other resistance genes ranged from 7.69% to 96.15%. The *tet(B)* gene was only carried by chicken-source strains (20.00%), and the carriage rate of the *qnrS* gene in chicken-source strains (30.00%) was significantly lower than that in duck-source strains (100%). Virulence factor detection revealed that the carriage rates of the *tarT*, *aer*, *pap*, and *neuC* genes in chicken-source strains (90.00%, 70.00%, 50.00%, and 30.00%, respectively) were higher than those in duck-source strains (62.50%, 12.50%, 0%, and 0%, respectively). Phylogenetic analysis showed that the predominant phylogenetic group of colistin-resistant *E. coli* in Qingdao was group A, accounting for 76.92%. Conjugation assays confirmed the transferability of *mcr-1* in some strains. Genetic environment analysis of *mcr-1* showed no insertion sequences upstream or downstream of *mcr-1*. These results indicate that *mcr-1* remains the main driver of the prevalence of colistin-resistant *E. coli* in poultry sources, but there are differences in resistance, resistance genes, and virulence factors between chicken-source and duck-source colistin-resistant strains. Therefore, research and monitoring of the prevalence of *mcr-1* in food animal sources should not be ignored.

Key words: duck ; chicken ; colistin ; virulence factor ; *Escherichia coli* ; *mcr-1*

Corresponding authors: ZHANG Yaru , E-mail : zqdcu@163.com ; LI Daowen , E-mail : lidaowen@tjau.edu.cn

多黏菌素是一种多肽类抗生素,通过破坏细胞膜的通透性而发挥杀菌或抑菌作用,对革兰阴性菌引起的感染具有良好的治疗效果。多黏菌素因具有神经和肾脏毒性,一度被限制用于人医临床,但其作为饲料添加剂或预防用药,曾用于畜禽疾病防控和促生长。我国已成为农业上多黏菌素应用的最大消费国^[1]。但随着细菌多重耐药问题的日益严重,尤其是碳青霉烯类耐药菌的出现和传播,使人类面临抗细菌感染“无药可用”的境地;因此,多黏菌素再度被作为“最后一道防线”类药物,用于治疗多重耐药菌感染。然而,2015年Liu等^[2]在动物源细菌中发现了由质粒介导的多黏菌素耐药基因 *mcr-1*,该基因具有可转移性,可显著促进多黏菌素耐药性的快速传播,降低多黏菌素的临床疗效。*mcr-1* 一经发现,便引起了世界范围内广泛关注和研究,我国动物源 *mcr-1* 阳性菌株携带率高达 25%,仅次于越南(携带率 38%),且存在逐年递增的趋势^[3]。目前,*mcr-1* 已在至少 70 个国家或地区被广泛报道,其中包含 21 个亚洲国家或地区;同时其携带菌已多达 15 种菌属,在人类、动物和环境中广泛传播^[4]。有研究表明,多黏菌素作为饲料添加剂在畜禽养殖业中的长时间使用可能是导致 *mcr-1* 出现并流行的原因^[5]。因此,世界各国相继收紧了对黏菌素的使用,我国也积极采取了相关措施,于 2017 年 4 月禁

止多黏菌素 E 作为动物饲料添加剂用于畜禽养殖。值得一提的是,禁令实施起到了积极作用。现有的公开数据显示,2016 年及以前的大肠杆菌中 *mcr-1* 携带率为 18.8% (1 262/6 703);而禁令实施后,*mcr-1* 携带率降低为 12.4% (335/2 689)^[6]。然而,在畜禽养殖中,作为治疗用药的多黏菌素仍旧是促发 *mcr-1* 流行不可忽视的因素;因此,畜禽养殖中多黏菌素耐药性及 *mcr-1* 的流行仍需要及时关注,尤其是肉鸡和肉鸭养殖业发达且 *mcr-1* 流行广泛的青岛地区,应加强禽源黏菌素耐药性的监控。因此,本试验选择青岛地区屠宰场,采集鸡源和鸭源的粪便样本,通过细菌分离鉴定、药敏试验、耐药基因和毒力因子检测、接合试验和全基因组测序,探究多黏菌素耐药菌株的多重耐药性、耐药基因和毒力因子携带情况、系统发育群和 *mcr-1* 基因的可遗传性和遗传环境,并通过对比鸡源耐药菌株与鸭源耐药菌株的耐药现状,拟阐明禽源耐药菌株中耐药基因的传播机制,为青岛地区肉鸡和肉鸭的养殖和疾病防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 2022 年 10 月在山东省青岛市平度地区的 2 个屠宰场分别采集鸭源和鸡源粪便样

本,总计 133 份,其中鸭源样本共计 66 份,鸡源样本共计 67 份。

1.1.2 培养基和试剂 脑心浸出液肉汤 (Brain heart infusion broth,BHI)、麦康凯琼脂培养基 (MacConkey,MAC)、水解酪蛋白胨肉汤 (Mueller-Hinton broth,MHB) 和水解酪蛋白胨琼脂 (Mueller-Hinton agar,MHA),均购自青岛海博生物技术有限公司;2 × Taq Master Mix (Dye plus),购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;DNA Marker 和琼脂糖 (Agarose,AG),均购自博迈德生物技术有限公司;绿色荧光核酸染料,购自北京偶合科技有限公司;头孢噻呋 (Ceftiofur,CEF)、庆大霉素 (Gentamicin,GEN)、环丙沙星 (Ciprofloxacin,CIP)、美罗培南 (Meropenem,MER)、头孢噻肟 (Cefotaxime,CTX)、替加环素 (Tigecycline,TIG)、多黏菌素 B (Colistin,COL B)、多黏菌素 E (Colistin,COL E)、氟苯尼考 (Florfenicol,FFL)、红霉素 (Erythromycin,ERY)、四环素 (Tetracyclines,TET) 和阿莫西林 (Amoxicillin,AMO),均购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 生化培养箱,购自上海新苗医疗器械制造有限公司;超净工作台,购自上海归永电子有限公司;PCR 仪、凝胶成像仪和电泳仪,购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离和 16S rRNA 菌种鉴定 将所获得的粪便样本分装处理并根据不同屠宰场以及鸡源和鸭源进行标号。使用一次性接种环划线于含有 1 μg/mL

多黏菌素 B 的 MAC,倒置于 37 ℃ 生化培养箱培养 16 ~ 18 h,挑取红色、形状大小适宜的单菌落,放入 BHI 中进行增殖。取 1 mL 增殖菌液采用水煮法提取细菌 DNA,以提取的 DNA 为模板,通过 PCR 进行 16S rRNA 菌种鉴定,PCR 体系为 30 μL (2 μL DNA 模板 + 15 μL 2 × Taq Master Mix + 11 μL ddH₂O + 1 μL 上游引物 + 1 μL 下游引物),PCR 条件为 (95 ℃, 10 min) + { (95 ℃, 30 s) + (55 ℃, 30 s) + (72 ℃, 2 min) } × 30 + (72 ℃, 5 min),将 PCR 阳性产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序,将所得序列结果上传至 NCBI 数据库进行比对鉴定。

1.2.2 药敏试验 根据美国临床实验室标准委员会 (Clinical and Laboratory Standards Institute,CLSI) 推荐的判定标准^[7],以 ATCC 25922 *E. coli* (本实验室保藏菌种) 为质控菌株,采用琼脂稀释法测定分离菌株对 12 种抗生素的最小抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration,MIC)。

1.2.3 耐药基因检测 使用多重 PCR 方法检测分离菌株中 6 类 21 种常见耐药基因的携带情况,包括多黏菌素类 (*mcr-1*、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4* 和 *mcr-5*),四环素类 [*tet* (A)、*tet* (B)、*tet* (X)、*tmexC1* 和 *tmexD1*], 碳青霉烯类 (*bla_{NDM}*、*bla_{VIM}*、*bla_{OXA-48}* 和 *bla_{KPC}*),β-内酰胺类 (*bla_{CTX-M}*、*bla_{SHV}* 和 *bla_{TEM}*),酰胺醇类 (*floR*) 以及喹诺酮类 (*qnrA*、*qnrB* 和 *qnrS*)。耐药基因 PCR 扩增引物序列和参考条件如表 1 所示,将 PCR 产物使用 2% 琼脂糖进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪观察并记录条带位置。

表 1 耐药基因引物信息
Table 1 Information of resistance gene primers

基因名称 Gene name	引物序列 (5'→3') Primer sequence	产物长度 (bp) Product length	退火温度 (℃) Annealing temperature
<i>tet</i> (A) ^[8]	GCTACATCCTGCTTGCCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	55
<i>tet</i> (B) ^[4]	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAACACCG	659	55
<i>tet</i> (X) ^[4]	CAATAATTGGTGGTGGACCC TTCTTACCTTGGACATCCCG	468	55
<i>tmexC1</i> ^[4]	GAAGAGCAACGGGAAGAGGC TGCTGCGATCCACCGAGAT	721	61
<i>tmexD1</i> ^[4]	CAACTCGGGTGGTTTCGC GTCCGTTTGCTGAGGTTTGGT	1 093	60
<i>bla_{KPC}</i> ^[5]	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	798	56
<i>bla_{NDM}</i> ^[5]	GGTTTGCGGATCTGGTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	621	56
<i>bla_{VIM}</i> ^[9]	GATGGTGTGTTGGTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	390	56
<i>bla_{OXA-48}</i> ^[5]	GCGTGCTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	438	56

续表			
基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物长度(bp) Product length	退火温度(℃) Annealing temperature
<i>bla</i> _{SHV} ^[10]	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC ATCCCGCAGATAAATCACCAC	713	60
<i>bla</i> _{TEM} ^[6]	CATTTCCTGTGCGCCCTTATTC CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800	60
<i>bla</i> _{CTX-M} ^[6]	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTA CGGTTTTATCCCCACAAC	655	60
<i>floR</i> ^[6]	CACGTGAGCCTCTATAT ATGCAGAAGTAGAACGCC	868	55
<i>qnrA</i> ^[11]	CAGCAAGAGGATTTCTCACG AATCCGGCAGCACTATTACTC	630	58
<i>qnrB</i> ^[11]	GGCTGTCAGTTCATGATCG GAGCAACGATGCCTGGTAG	448	58
<i>qnrS</i> ^[11]	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428	58
<i>mcr-1</i> ^[12]	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	320	58
<i>mcr-2</i> ^[12]	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT TCTAGCCCGACAAGCATACC	715	58
<i>mcr-3</i> ^[12]	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG AATGGAGATCCCCGTTTTT	929	58
<i>mcr-4</i> ^[12]	TCACTTTCATCACTGCGTTG TTGGTCCATGACTACCAATG	1 116	58
<i>mcr-5</i> ^[12]	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC TCATTGTGGTTGTCTTTTCTG	1 644	58

1.2.4 毒力因子检测 使用 PCR 方法检测分离菌株中 12 种毒力基因的携带情况,包括毒素(*hlyA*、*cnf1* 和 *cdt*)、粘附素(*afa*、*sfa*、*pap* 和 *fimH*)、铁载体(*aer*)以及保护素(*neuC*、*kpsMT II*、*rfe* 和 *traT*),所有检测均设置阳性和阴性对照^[13]。

1.2.5 系统发育群分析 根据 Clermont 等^[14]报道,大肠杆菌菌株分为 A、B1、B2 和 D 共 4 个系统发育群,大多数共生菌株属于 A 组,肠外致病性大肠杆菌主要属于 B2 组,少数属于 D 组;以 *chuA*、*yjaA* 和 *TSPE4. C2* 基因为基础,制定系统发育群鉴定标准;PCR 可同时在 *chuA* 和 *yjaA* 基因位点或同时在 *chuA*、*TSPE4. C2* 和 *yjaA* 基因位点成功扩增的分离菌属于 B2 群;PCR 仅在 *chuA* 基因位点或同时在 *chuA* 和 *TSPE4. C2* 基因位点成功扩增的分离菌属于 D 群;PCR 仅在 *TspE4. C2* 基因位点成功扩增的分离菌属于 B1 群;PCR 仅在 *yjaA* 基因位点成功扩增或在 3 个位点均扩增不出条带的分离菌属于 A 群。本试验使用 PCR 方法检测分离菌株中 *chuA*、*TSPE4. C2* 和 *yjaA* 基因的携带情况,将 PCR 产物使用 2% 琼脂糖进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪观察并记录条带位置,鉴定分离菌株的系统发育群。

1.2.6 接合试验 将分离获得的携带 *mcr-1* 的菌株进行基因的可转移性测定;供体菌为 *mcr-1* 阳性

菌株,受体菌为大肠杆菌 J53(本实验室保藏菌种),加入 BHI 并于 37 ℃ 生化培养箱中培养,复活至 OD_{600 nm} 为 0.6~0.8(细菌处于对数生长期),以供体菌:受体菌为 1:3 的比例进行混合,滴在提前准备好的贴有无菌纤维素膜的无抗 MHA 中,37 ℃ 培养箱过夜培养;缓慢将膜上菌体刮至装有 500 μL 生理盐水的无菌离心管中,5 000 r/min 离心 5 min,弃上清后加入 500 μL BHI 悬浮,倍比稀释 10⁻¹~10⁻⁸ 倍,各取 100 μL 菌液涂布于提前准备好的双抗 MHA(多黏菌素 E+叠氮化钠)中,37 ℃ 过夜培养 18~24 h 后查看菌落生长情况。

1.2.7 全基因组测序 提取 2 株接合试验成功菌株的全基因组,进行 Illumina 二代高通量测序,使用 Ades v3.12 进行基因组组装,使用 Easyfig 对比 NCBI 数据库中相似度最高的序列,绘制 *mcr-1* 基因的遗传环境。

2 结果

2.1 细菌分离和 16S rRNA 菌种鉴定 结果如表 2 所示,本试验共分离获得 26 株禽源多黏菌素耐药大肠杆菌,总分离率为 19.55%(26/133),其中鸭源多黏菌素耐药大肠杆菌分离率(24.24%,16/66)高于鸡源多黏菌素耐药大肠杆菌分离率(14.93%,10/67)。

表 2 多黏菌素耐药大肠杆菌分离率
Table 2 Isolation rates of colistin-resistant *Escherichia coli*

来源 Source	地点 Site	样本数量(份) Number of samples	分离菌株数量(株) Number of isolated strains	分离率(%) Isolation rate
鸭源(1 厂) Duck source(Factory 1)	平度市 Pingdu city	33	12	36. 37
鸭源(2 厂) Duck source(Factory 2)	平度市 Pingdu city	33	4	12. 12
鸡源(1 厂) Chicken source(Factory 1)	平度市 Pingdu city	32	4	12. 50
鸡源(2 厂) Chicken source(Factory 2)	平度市 Pingdu city	35	6	17. 14
总计 Total		133	26	19. 55

2.2 药敏试验 药敏试验结果如图 1 所示,所有菌株均对多黏菌素 B 和多黏菌素 E 耐药,对四环素和氟苯尼考耐药率分别为 92. 31% (24/26) 和 84. 62%

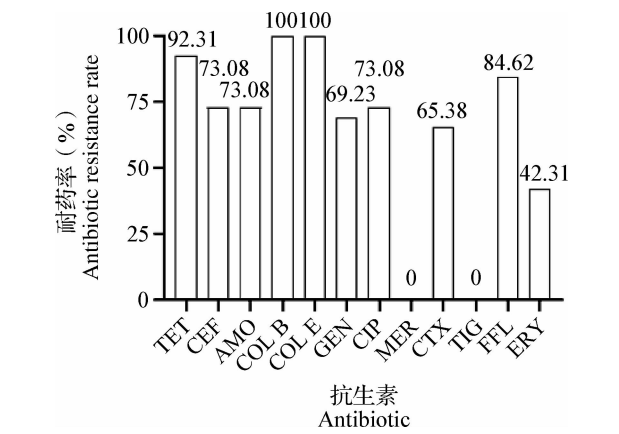


图 1 禽源大肠杆菌分离菌株对 12 种抗生素的耐药率
Fig. 1 Resistance rate of *Escherichia coli* isolates from poultry sources to 12 antibiotics

(22/26),对阿莫西林、头孢噻呋、环丙沙星、庆大霉素、头孢噻肟和红霉素呈现较高的耐药率,分别为 73. 08% (19/26)、73. 08% (19/26)、73. 08% (19/26)、69. 23% (18/26)、65. 38% (17/26) 和 42. 31% (11/26),未检测出对替加环素和美罗培南耐药的菌株。

鸡源菌株和鸭源菌株的对比分析结果如图 2 所示,鸭源和鸡源分离菌株对多黏菌素类药物的耐药率均为 100%,鸭源菌株对红霉素、氟苯尼考、环丙沙星、头孢噻呋、头孢噻肟、阿莫西林、庆大霉素和四环素的耐药率介于 25. 00% ~ 93. 75%,鸡源菌株介于 60. 00% ~ 100%;鸭源菌株对红霉素、头孢噻呋、阿莫西林、庆大霉素和环丙沙星的耐药率 (25. 00%、56. 25%、56. 25%、56. 25% 和 62. 50%) 均低于鸡源菌株 (70. 00%、100%、100%、90. 00% 和 90. 00%);鸡源菌株对氟苯尼考、头孢噻肟和四环素的耐药率 (70. 00%、60. 00% 和 90. 00%) 均略低于鸭源菌株 (93. 75%、68. 75% 和 93. 75%)。

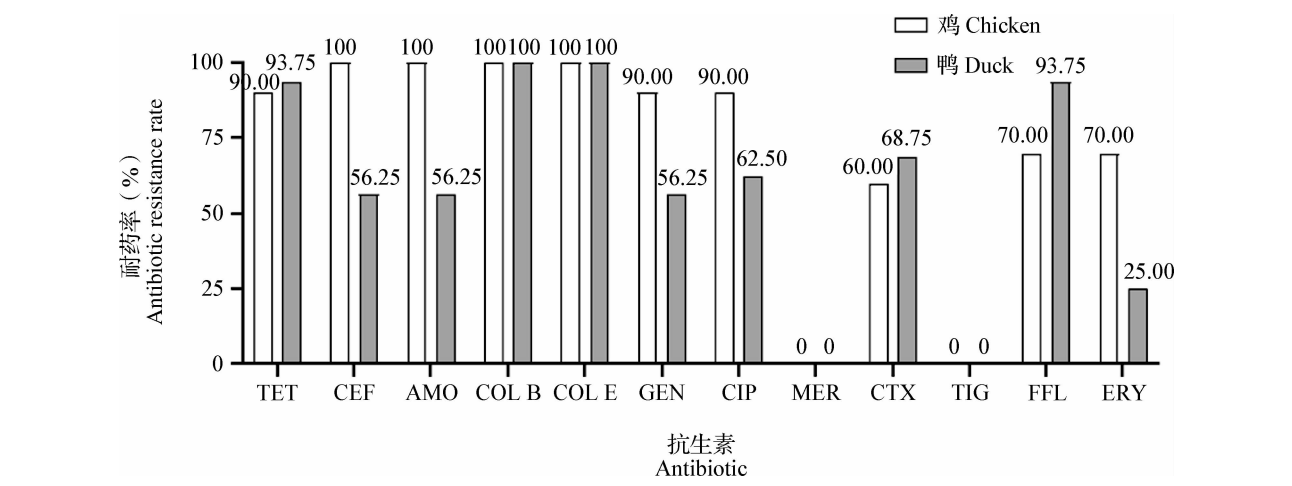


图 2 鸭源和鸡源大肠杆菌分离菌株的耐药率对比
Fig. 2 Comparison of antibiotic resistance rates of *Escherichia coli* isolates from duck and chicken sources

多重耐药分析结果如表 3 所示,所有分离菌株均存在多重耐药现象,耐药谱型为 5 ~ 10 重,并且 10 重耐药菌株的占比最高,为 26.92% (7/26),耐药谱型均为氟苯尼考 + 四环素 + 环丙沙星 + 红霉素 + 头孢噻肟 + 多黏菌素 E + 多黏菌素 B + 庆大霉素 + 阿莫西林 + 头孢噻唑;9 重耐药菌株共 6 株,其中耐药谱型为氟苯尼考 + 四环素 + 环丙沙星 + 头孢噻肟 + 多黏菌素 E + 多黏菌素 B + 庆大霉素 + 阿莫西林 + 头孢噻唑的菌株数量最多,为 5 株。

表 3 禽源大肠杆菌分离菌株多重耐药分析		
Table 3 Analysis of multi-antibiotic resistance of <i>Escherichia coli</i> isolates from poultry sources		
多重耐药种数 Number of multi-antibiotic resistance types	菌株数量(株) Number of strains	占比(%) Percentage
5	2	7.69
6	5	19.23
7	2	7.69
8	4	15.38
9	6	23.08
10	7	26.92

鸡源和鸭源多重耐药情况对比分析结果如图 3 所示,鸭源菌株以 9 重耐药为主,占比达 31.25% (5/16),其耐药谱型均为氟苯尼考 + 四环素 + 环丙沙星 + 头孢噻肟 + 多黏菌素 E + 多黏菌素 B + 庆大霉素 + 阿莫西林 + 头孢噻唑;鸡源菌株以 10 重耐药为主,占比达 40.00% (4/10),耐药谱型均为氟苯尼考 + 四环素 + 环丙沙星 + 红霉素 + 头孢噻肟 + 多黏菌素 E + 多黏菌素 B + 庆大霉素 + 阿莫西林 + 头孢噻唑;鸭源菌株和鸡源菌株都具有严重的多重耐药,鸡源菌株多重耐药较为分散,而鸭源菌株多重耐药集中于 6 和 9 重。

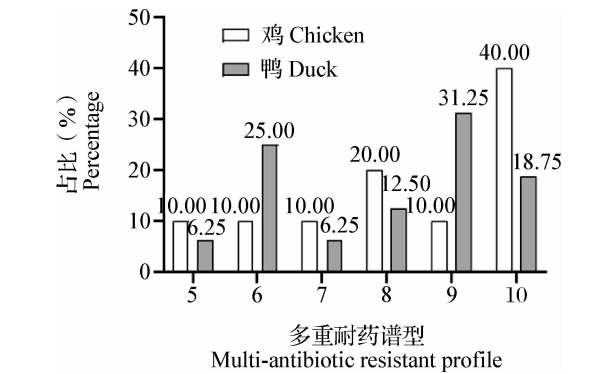


图 3 鸡源和鸭源大肠杆菌分离菌株的多重耐药对比分析
Fig. 3 Comparative analysis of multi-antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates from chicken and duck sources

2.3 耐药基因检测 如图 4 所示,在禽源菌株所有检测的耐药基因中,多黏菌素类耐药基因中 *mcr-1* 携带率最高,为 100% (26/26); β -内酰胺类耐药基因中 *bla*_{TEM} 携带率最高,为 69.23% (18/26);酰胺醇类耐药基因 *floR* 携带率为 61.54% (16/26);四环素类耐药基因中 *tet* (A) 携带率最高,为 96.15% (25/26);并且检测出 2 株分离菌株携带 *tet* (B) 基因,占比为 7.69% (2/26);喹诺酮类耐药基因中 *qnrS* 携带率最高,为 73.08% (19/26);其他耐药基因均未携带。对比分析鸭源和鸡源耐药基因流行情况,*qnrS*、*bla*_{TEM}、*tet* (A) 和 *floR* 在鸭源菌株中的携带率 [100% (16/16)、81.25% (13/16)、100% (16/16) 和 68.75% (11/16)] 均高于在鸡源菌株中的携带率 [30.00% (3/10)、60.00% (6/10)、90.00% (9/10) 和 50.00% (5/10)],说明相较于鸡源菌株,*qnrS*、*bla*_{TEM}、*tet* (A) 和 *floR* 在鸭源菌株中的流行性更高;但 *tet* (B) 只在鸡源菌株中携带。结果表明,鸭源菌株和鸡源菌株耐药基因携带情况严重。

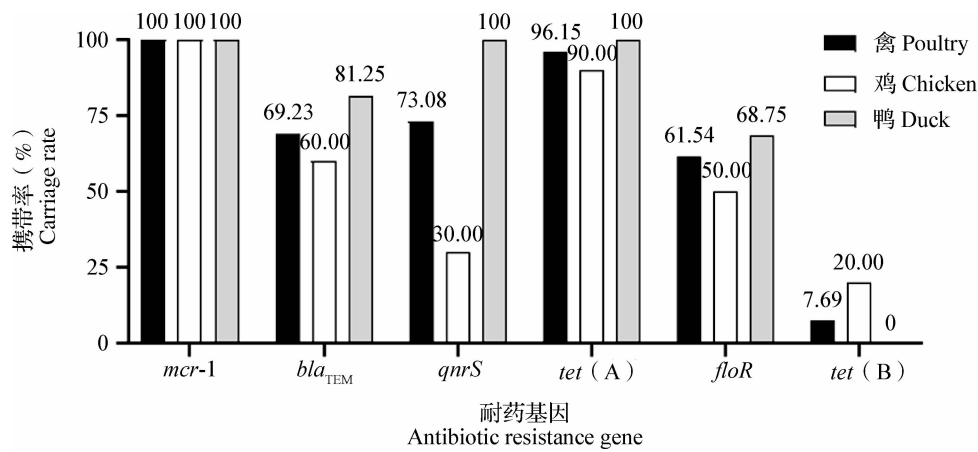


图 4 禽源大肠杆菌分离菌株耐药基因携带率
Fig. 4 Carriage rate of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry sources

禽源大肠杆菌分离菌株多重耐药基因谱型对比分析结果如表 4 所示,除 1 株鸡源菌株只携带 1 种耐药基因外,其余分离菌株都含多种耐药基因,最多可同时携带 5 种;共存 4 种耐药基因的菌株占比最高,为 50.00% (13/26),其次是共存 5 种耐药基因的菌株,占比 34.62% (9/26);共存 3 种耐药基

因的菌株有 3 株,并未检测出携带 2 种耐药基因的菌株。对比分析鸡源菌株和鸭源菌株,鸡源菌株携带的耐药基因数量为 1、3、4 和 5 种,而鸭源菌株携带的耐药基因数量集中在 4 和 5 种;鸭源菌株耐药基因谱型最多的是 *bla*_{TEM}-*mcr*-1-*qnr*S-*tet* (A)-*flo*R (50.00,8/16),而鸡源菌株耐药基因共存数量差异较大。

表 4 禽源大肠杆菌分离菌株多重耐药基因谱型对比分析
Table 4 Comparative analysis of multi-antibiotic resistance gene profiles of *Escherichia coli* isolates from poultry sources

基因共存数量 Number of co-existence genes	携带率 (%) Carriage rate	耐药基因谱型 Resistance gene profile	鸭源菌株数量 (株) Number of duck strains	鸡源菌株数量 (株) Number of chicken strains
1	3.85 (1/26)	<i>mcr</i> -1	0	1
3	11.54 (3/26)	<i>mcr</i> -1- <i>tet</i> (A)- <i>flo</i> R	0	2
		<i>mcr</i> -1- <i>tet</i> (A)- <i>bla</i> _{TEM}	0	1
4	50.00 (13/26)	<i>flo</i> R- <i>mcr</i> -1- <i>qnr</i> S- <i>tet</i> (A)	3	0
		<i>bla</i> _{TEM} - <i>mcr</i> -1- <i>qnr</i> S- <i>tet</i> (A)	5	2
		<i>mcr</i> -1- <i>tet</i> (A)- <i>bla</i> _{TEM} - <i>flo</i> R	0	1
		<i>mcr</i> -1- <i>tet</i> (A)- <i>tet</i> (B)- <i>flo</i> R	0	1
		<i>mcr</i> -1- <i>tet</i> (A)- <i>bla</i> _{TEM} - <i>tet</i> (B)	0	1
		<i>bla</i> _{TEM} - <i>mcr</i> -1- <i>qnr</i> S- <i>tet</i> (A)- <i>flo</i> R	8	1

2.4 毒力因子检测 如图 5 所示,3 种毒素基因中仅检测出 *cnf*I 基因,携带率为 15.38% (4/26);粘附素基因 *sfa*、*pap* 和 *fim*H 的携带率分别为 3.85% (1/26)、19.23% (5/26) 和 92.31% (24/26);在 34.62% (9/26) 的菌株中检测出铁载体 *aer* 基因;保护素基因 *neu*C 和 *tra*T 携带率分别为 11.54% (3/

26) 和 73.08% (19/26)。其中,*tar*T 和 *aer* 基因在鸡源菌株中的携带率 (90.00% 和 70.00%) 高于鸭源 (62.50% 和 12.50%);*pap* 和 *neu*C 基因只在鸡源菌株中携带,而 *sfa* 基因只在鸭源菌株中携带;*fim*H 和 *cnf*I 基因在鸡源和鸭源菌株中的携带率基本一致。

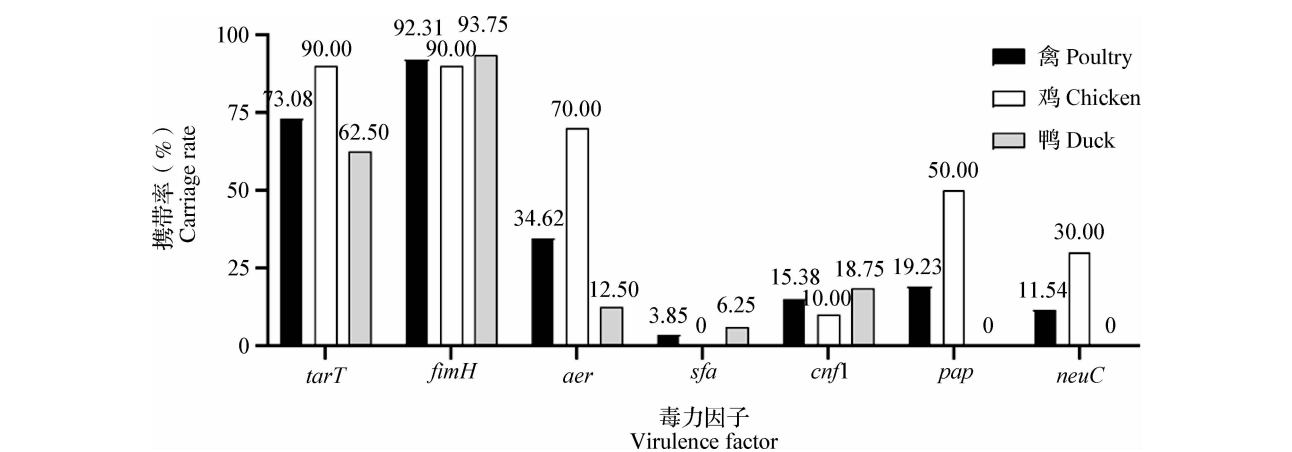


图 5 禽源大肠杆菌分离菌株毒力因子携带率
Fig. 5 Carriage rate of virulence factors of *Escherichia coli* isolates from poultry sources

2.5 系统发育群分析 根据电泳结果确定大肠杆菌的系统发育群的分型,结果显示,76.92% (20/26) 的分离菌株属于 A 组,其中鸡源菌株 8 株,占鸡源菌株总数的 80.00% (8/10),鸭源菌株 12 株,占鸭源菌株总数的 75.00% (12/16);11.54% (3/26) 的分离菌株属于 B1 组,其中鸡源菌株 1 株

(10.00%,1/10),鸭源菌株 2 株 (12.50%,2/16);7.69% (2/26) 的分离菌株属于 B2 组,均为鸭源菌株;3.85% (1/26) 的分离菌株属于 D 组,均为鸡源菌株。
2.6 接合试验 选取 *mcr*-1 阳性鸡源和鸭源菌株各 3 株进行接合试验,接合转移率介于 $5.10 \times 10^{-2}\%$ ~

2. $15 \times 10^{-9}\%$ (表5);其中,鸭源菌株均转移成功,接合转移率分别为 $2.15 \times 10^{-9}\%$ (Y2-8)、 $5.85 \times 10^{-4}\%$ (Y2-5) 和 $5.10 \times 10^{-2}\%$ (Y1-17),而鸡源菌株仅1株转移成功,接合转移率为 $1.14 \times 10^{-3}\%$ (J2-15)。

2.7 基因 *mcr-1* 核心遗传环境 *mcr-1* 基因遗传环境如图6所示,*mcr-1* 上、下游并未发现插入序列,*mcr-1* 上游存在编码 *DUF3150*、*DUF4165* 和 *DUF1187* 等结构域的基因;编码DNA拓扑异构酶和DNA复制蛋白的基因,转移和分泌相关基因 *virB4*、*virB11* 和 *IS3* 等;*mcr-1* 下游存在 *pap2* 基因、毒力基因 *hha* 和编码重组酶的基因等。

表5 *mcr-1* 基因接合转移率

Table 5 Conjugation transfer rates of *mcr-1* gene

菌株来源 Strain source	菌株名称 Strain name	接合转移率(%) Conjugation transfer rate
鸡 Chicken	J2-15	1.14×10^{-3}
	J2-22	未成功
	J1-26	未成功
鸭 Duck	Y2-8	2.15×10^{-9}
	Y2-5	5.85×10^{-4}
	Y1-17	5.10×10^{-2}

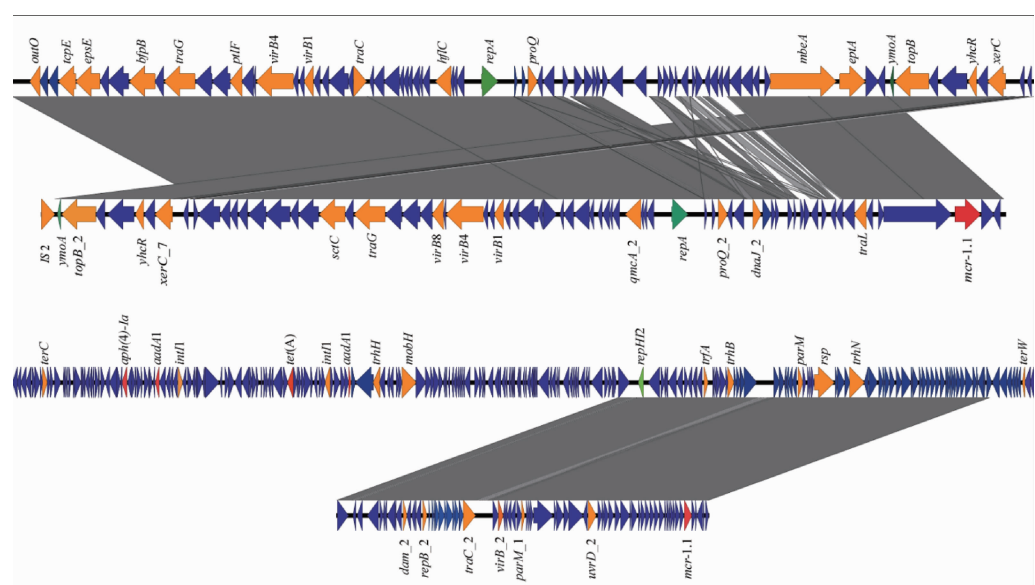


图6 *mcr-1* 基因遗传环境

Fig. 6 Genetic environment of *mcr-1*

3 讨论

大肠杆菌被认为是 *mcr* 基因的主要宿主,2015 年,我国首次在动物源中分离出携带 *mcr-1* 基因的大肠杆菌^[2]。大肠杆菌的分布广泛,动物粪便作为细菌和耐药基因的储存库,与土壤、水源和饲料等接触有可能为耐药菌和耐药基因的传播提供有利条件^[15]。本试验选取青岛地区禽源粪便样本分离大肠杆菌,探究禽源多黏菌素类耐药大肠杆菌和多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 流行现状,通过毒力因子和系统发育群分析,确定青岛地区耐多黏菌素大肠杆菌的主要系统发育群和毒力分布。

本试验从青岛市平度市采集 66 份鸭源样本和 67 份鸡源样本,分离纯化得到 26 株多黏菌素耐药大肠杆菌,分离率为 19.55%,高于王文静等^[16]在长沙地区的分离率(17.6%)。本试验中鸭源多黏菌素耐药大肠杆菌分离率(24.24%)高于鸡源多黏菌素耐药大肠杆菌的分离率(14.93%),这可能与不

同物种的耐药水平存在差异有关。本试验中鸡源耐药菌株的分离率(14.93%)略高于张印等^[17]于 2017—2018 年在山东省 8 个大型集约化养鸡场中的分离率(11.9%)。本试验中鸭源耐药菌株的分离率为 24.24%,对头孢噻肟、阿莫西林、庆大霉素、红霉素、四环素、环丙沙星和氟苯尼考均表现出较高的耐药性,这一结果与魏中锋等^[18]于山东省检测的肉鸭菌株耐药性一致。

本试验分离获得的多黏菌素耐药菌株均携带 *mcr-1* 基因;四环素耐药菌株和庆大霉素耐药菌株占比分别为 92.31% 和 69.23%,与四环素基因 *tet(A)* 携带率和 *qnrS* 基因携带率(分别为 96.15% 和 73.08%)基本一致;大肠杆菌分离菌株中 *floR* 基因携带率为 61.54%,低于赵公锦等^[19]于 2020 年对河南省大肠杆菌 *floR* 基因携带率的检测结果(85.10%),可能由于青岛地区与河南地区氟苯尼考类药物的使用情况存在差异导致。本试验分离菌株表现出的耐药性与相关耐药基因的携带率基

本一致,说明禽源菌株产生的耐药性与相关耐药基因的携带有关。菌株耐药基因共存现象十分广泛,*mcr-1-tet(A)-floR* 为占比较高的耐药基因谱型,也是其他多种耐药基因谱型的基础基因谱型。此外,本试验还发现多株 *mcr-1-tet(A)-bla_{TEM}* 共存菌株,说明在同一菌株中可同时存在 β -内酰胺类、多黏菌素类和四环素类的耐药基因,这一结果与先前报道基本一致^[20]。结果表明,青岛地区鸡鸭养殖过程中耐药基因传播较为复杂和多样,因此,应密切关注 *mcr-1-tet(A)* 和 *bla_{TEM}* 基因的流行情况。

大肠杆菌系统发育群根据毒力因子分布、耐药性和致病性的不同进行区分,其中 A 和 B1 组为共生型大肠杆菌,而 B2 和 D 组则包含多种毒力因子,且与致病性有关^[21]。本试验毒力基因检测结果证实,青岛地区耐多黏菌素大肠杆菌的主要系统发育群为 A 组(76.92%)和 B1 组(11.54%),而 B2(7.69%)组和 D 组(3.85%)占比率较低,这一结果与辽宁地区检测结果保持一致^[22]。结果表明,青岛地区多黏菌素耐药大肠杆菌多为共生型大肠杆菌。*mcr-1* 与毒力因子和致病性的关联还需进一步研究。

本试验 *mcr-1* 基因的遗传环境分析结果显示,*mcr-1* 基因上、下游并未发现插入序列,这可能是 Tn6330 介导的 *mcr-1* 传播过程中删除了 *ISAp1* 原件以保证 *mcr-1* 基因的稳定性引起的^[21]。值得注意的是,*mcr-1* 基因下游存在曾被认定为编码假设蛋白的 *pap2* 基因,Choi 等^[23] 研究报道了完整的 *pap2* 基因可能对携带 *mcr-1* 基因的大肠杆菌的多黏菌素耐药性存在一定的正向作用,本试验结果与该报道观点基本一致。

本试验结果表明,青岛地区家禽养殖中存在多黏菌素耐药大肠杆菌的流行,*mcr-1* 仍旧是导致禽源多黏菌素耐药菌株流行的主要“元凶”,而鸡源和鸭源多黏菌素耐药菌株在耐药性、耐药基因和毒力因子携带率方面表现出一定差异性,这可能与养殖临床用药和种属差异有关。因此,应该进一步加强 *mcr-1* 基因的流行研究和监控,同时应注意养殖过程中合理使用多黏菌素。

参考文献:

- [1] Ray M, Manjunath A, Halami P M. Prevalence of colistin resistance through the food chain, the global crisis[J]. The Journal of Antibiotics, 2022, 75(4): 185-198.
- [2] Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2016, 16(2): 161-168.
- [3] 曹兴旺, 李益涛, 徐道元, 等. 多黏菌素耐药 *mcr* 基因的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(19): 29-36.
- [4] Martiny H M, Munk P, Brinch C, et al. Global distribution of *mcr* gene variants in 214K metagenomic samples[J]. mSystems, 2022, 7(2): e0010522.
- [5] Shen Z, Wang Y, Shen Y, et al. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2016, 16(3): 293.
- [6] Anyanwu M U, Jaja I F, Okpala C O R, et al. Mobile colistin resistance (*mcr*) gene-containing organisms in poultry sector in low- and middle-income countries: epidemiology, characteristics, and one health control strategies[J]. Antibiotics, 2023, 12(7): 1117.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals[S]. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
- [8] Zhang C M, Du C, Xu H, et al. Occurrence of tetracycline-resistant fecal coliforms and their resistance genes in an urban river impacted by municipal wastewater treatment plant discharges[J]. Journal of Environmental Science and Health, 2015, 50(7): 744-749.
- [9] Hatrongjit R, Kerdsin A, Akeda Y, et al. Detection of plasmid-mediated colistin-resistant and carbapenem-resistant genes by multiplex PCR[J]. MethodsX, 2018, 5: 532-536.
- [10] Tewari R, Mitra S, Ganaie F, et al. Dissemination and characterisation of *mcr* producing extended-spectrum β -lactamases, AmpC β -lactamases and metallo- β -lactamases from livestock and poultry in Northeast India: a molecular surveillance approach[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2019, 17: 209-215.
- [11] Ciesielczuk H, Hornsey M, Choi V, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance determinants[J]. Journal of Medical Microbiology, 2013, 62(Pt 12): 1823-1827.
- [12] Rebelo A R, Bortolaia V, Kjeldgaard J S, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes[J]. Eurosurveillance, 2018, 23(6): 17-00672.
- [13] Moulin-Schouleur M, Schouler C, Tailliez P, et al. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and poultry origin[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(10): 3484-3492.
- [14] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4555-4558.
- [15] 路洋, 张捷, 蔡萍, 等. 广东省某大型养鸡场 *tet(X4)* 阳性大肠杆菌流行分布特征[J]. 中国兽医学报, 2023, 43(12): 2534-2539.
- [16] 王文静, 杜阳洋, 文立华, 等. 长沙地区禽源 *mcr-1* 肠杆菌流行病学调查[J]. 湖南畜牧兽医, 2023(4): 44-47.
- [17] 张印, 苑晓萌, 李璐璐, 等. 山东省养鸡场大肠杆菌多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 的流行情况[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(1): 66-70.
- [18] 魏中锋, 樊祜卿, 王文秀, 等. 山东肉鸭主要细菌病调查与耐药性分析[J]. 家禽科学, 2021(9): 52-56.
- [19] 赵公锦, 彭丽, 方忠意, 等. 河南省部分地区猪源大肠杆菌耐药基因 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 的分子流行病学调查[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(11): 1-7.
- [20] 任海燕, 刘旭东, 赵莉, 等. 青岛地区鸡源大肠埃希氏菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 动物医学进展, 2022, 43(12): 37-42.
- [21] 高笑, 徐亚昆, 丁鹏云, 等. 鸡源携带黏菌素耐药基因 *mcr-1* 大肠杆菌的流行情况及耐药性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(12): 5148-5159.
- [22] Zhang D, Zhang Z, Huang C, et al. The phylogenetic group, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* from clinical bovine mastitis[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(1): 572-580.
- [23] Choi Y, Lee J Y, Lim S K, et al. Intact *pap2* downstream of *mcr-1* appears to be required for colistin resistance[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2020, 97(1): 114997.

(责任编辑 孟迪)

山羊副结核病的诊断和分型鉴定

孟维康¹, 赵维宏¹, 李梦园¹, 马 薇¹, 丁玉林^{1,2,3}, 吉林台^{1,2}, 赵 丽^{1,2}, 刘永宏^{1,2,3}

(1. 内蒙古农业大学兽医学院, 内蒙古 呼和浩特 010000; 2. 农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010000; 3. 国家乳业技术创新中心, 内蒙古 呼和浩特 010000)

摘要:为了对1起山羊感染副结核分枝杆菌(MAP)的病例进行诊断,并对其感染的MAP菌株进行分型鉴定,本试验通过病史调查、尸体剖检观察和组织病理学检查对其进行初步诊断,通过聚合酶链式反应(PCR)扩增MAP特异性IS900和IS1311基因,并在测序后进行菌株鉴定、序列分析和IS900基因系统进化树构建。结果显示,病羊极度消瘦,血液稀薄;空肠和回肠肠壁增厚、黏膜面形成皱襞呈脑回样;肠系膜淋巴结肿大,呈灰黄色,切面可见灰白色病灶。肠道组织苏木素-伊红染色可见空肠、回肠黏膜固有层和黏膜下层大量的上皮样细胞和淋巴细胞增生;肠系膜淋巴结皮质区可见大量上皮样细胞增生,副皮质区有淋巴细胞增生;抗酸染色可见聚集在上皮样细胞内红染的小杆菌。PCR扩增IS900和IS1311基因产物均与目的基因片段预期大小一致;基因序列分析和IS900基因系统进化树显示,与本试验所得分离株同源性最高的参考序列均为II型MAP,且同源性均高于98%。综上所述,该羊场发病羊确诊患副结核病,感染菌株为II型MAP。本试验为副结核病的诊断和防治提供了参考。

关键词:副结核病;山羊;诊断;基因分型

中图分类号:S858.27

文献标志码:A

文章编号:0529-6005(2024)05-0056-07

Diagnosis and Genotyping Identification of Paratuberculosis in Goats

MENG Weikang¹, ZHAO Weihong¹, LI Mengyuan¹, MA Wei¹, DING Yulin^{1,2,3},
JIRINTAI S^{1,2}, ZHAO Li^{1,2}, LIU Yonghong^{1,2,3}

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010000, China; 2. Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Technology in Animal Disease, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hohhot 010000, China;
3. National Center of Technology Innovation for Dairy, Hohhot 010000, China)

Abstract: In order to diagnose a case of goats infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) and identify the genotype of the MAP strain causing infection, so as to provide scientific basis for the diagnosis and control of sheep paratuberculosis, this study conducted a preliminary diagnosis through medical history investigation, post-mortem examination, and histopathological examination. MAP-specific IS900 and IS1311 genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and strain identification, sequence analysis, and construction of IS900 gene phylogenetic tree were performed after sequencing. The results showed that the diseased goats were extremely emaciated with thin blood. The walls of the jejunum and ileum were thickened, and the mucosal surface formed folds resembling cerebral convolutions. The mesenteric lymph nodes were enlarged and gray-yellow, with gray-white lesions visible on the cut surface. Histopathological examination of intestinal tissues stained with hematoxylin-eosin revealed proliferation of epithelioid cells and lymphocytes in the lamina propria and submucosa of the jejunum and ileum. The cortical area of the mesenteric lymph nodes showed proliferation of epithelioid cells, while the paracortical area showed lymphocyte proliferation. Acid-fast staining revealed acid-fast bacilli clustered within epithelioid cells. PCR amplification of IS900 and IS1311 genes yielded products consistent in size with the target gene fragments. Sequence analysis and construction of IS900 gene phylogenetic tree revealed that the highest homology reference sequences obtained in this study were of type II MAP, with homology exceeding 98%. In conclusion, the diseased goats in the goat farm were diagnosed with paratuberculosis, and the infecting strain was identified as type II MAP. This study provides reference for the diagnosis and control of paratuberculosis.

Key words: paratuberculosis; goat; diagnosis; genotyping

Corresponding authors: ZHAO Li, E-mail: zhaolidky@126.com; LIU Yonghong, E-mail: lyhdly@126.com

收稿日期:2023-09-28

基金项目:国家乳业技术创新中心项目(2023-JSGG-5);内蒙古自治区自然科学基金项目(2022MS03023);国家自然科学基金项目(32260887)

作者简介:孟维康(1996-),男,硕士生,研究方向为基础兽医学,E-mail:2313942819@qq.com

通信作者:赵丽,E-mail:zhaolidky@126.com;刘永宏,E-mail:lyhdly@126.com

副结核病 (Paratuberculosis) 是由副结核分枝杆菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, MAP) 引起的反刍动物慢性消耗性疾病^[1], 其特征为顽固性腹泻、渐进性消瘦^[2] 和肠黏膜增厚呈脑回样^[3]。该病是非洲和许多发展中国家小反刍动物“被忽视的疾病”^[4], 我国将其列为三类动物疫病。

MAP 是一种胞内寄生、革兰和抗酸染色阳性菌^[5], 初代分离非常困难, 且生长缓慢^[6]。MAP 分为羊型 (S 型) 和牛型 (C 型, 也称为 II 型) 2 个基因型。羊型又分为 I 型、III 型和骆驼型, 而牛型则分离出野牛型 (B 型) 菌株, B 型菌株又包括印度野牛型和美国野牛型^[7]。前期研究发现, 内蒙地区绵羊和山羊均有感染 II 型和 III 型 MAP 的情况^[8]。

副结核病在世界许多地区呈地方性流行, 造成严重的经济损失, 如美国每年估计损失为 2 亿 ~ 2.5 亿美元^[9]。我国最早于 1953 年在内蒙古自治区发现了牛副结核病^[10], 1971 年在辽宁省发现羊副结核病^[11]。我国多个省市都有牛和羊副结核病的报道, 并且阳性率呈上升趋势^[12-14]。例如, 山东省 9 个地区奶牛 2019 年副结核病阳性率 (22.31%) 高于 2018 年副结核病阳性率 (11.24%)^[13]; 上海市松江区牛副结核病 2017—2019 年抗体阳性率分别为 1.6%、0.7% 和 4.4%^[14]。内蒙古自治区作为我国重要的农畜产品生产基地, 前期研究发现, 内蒙古自治区 6 个市羊副结核病总阳性率为 7.60%^[8], 部分地区 MAP 感染率高达 73.4%^[9]。本试验对内蒙古自治区 1 起山羊感染 MAP 的病例进行了诊断, 并对感染的 MAP 菌株进行分型鉴定, 为副结核病的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 病料来源和病史调查 内蒙古自治区某羊场 6~8 月龄发病黑山羊 3 只。通过询问养殖人员和现场观察, 记录发病情况和临床症状。本试验经内蒙古农业大学科学研究与学术伦理道德专门委员

会批准 (批准号: [2020]078)。

1.2 主要试剂 E. Z. N. A.® Stool DNA Kit, 购自美国 Omega Bio-tek 公司; MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 5.0 和 Taq™ Version 2.0 Plus Dye, 均购自宝日医生物工程 (大连) 有限公司; 作为阳性对照的 MAP 菌株, 为内蒙古农业大学兽医学院农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室分离、鉴定和保存的绵羊源 II 型 MAP 菌种。

1.3 主要仪器 PCR 仪, 基因有限公司产品; 电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司产品; 凝胶成像仪, 德国耶拿分析仪器股份公司产品; 全自动组织脱水机和全自动组织切片染色机, 日本 Sakuar 樱花公司产品。

1.4 尸体剖检和样品采集 直肠采集粪便样品后安乐死患病羊并对其进行剖检, 详细记录病理变化, 并采集肠和肠系膜淋巴结, 一部分固定于 10% 中性福尔马林溶液; 另一部分冷冻保存用于 DNA 提取。

1.5 组织病理学检查 将固定于 10% 中性福尔马林溶液中的组织经常规组织脱水、透明、包埋和切片, 然后进行苏木素-伊红 (Hematoxylin eosin, H. E.) 染色^[15] 和抗酸染色^[16], 显微镜下观察并记录组织病理学变化。

1.6 PCR 扩增 粪便样品加入 50 mL 蒸馏水搅拌均匀后过滤, 滤液在室温下 8 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。粪便样品沉淀物和组织样品分别使用 E. Z. N. A.® Stool DNA Kit 和 MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 5.0, 按照说明书操作提取基因组 DNA, 同时以本实验室保存的 MAP 菌株为阳性对照, 以无菌水为阴性对照。以提取的 DNA 为模板, 通过聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 分别扩增 MAP 特异性基因 IS900 基因和 IS1311 基因。MAP IS900 基因 (L1、L2、AV1 和 AV2) 和 IS1311 基因 (IS1311-F 和 IS1311-R) 引物 (表 1) 由生工生物工程 (上海) 股份

表 1 PCR 扩增引物序列信息
Table 1 Primer sequences information for PCR amplification

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence	产物长度 (bp) Product length	参考文献 Reference
IS900	L1	CTTCTCTGAAGGCTGTTTCGG	298	[17]
	L2	ACGTGACCTCGCCTCCAT		
	AV1	ATGTGGTTGCTGTGTTGGATGG		
	AV2	CCGCCGCAATCAACTCCAG		
IS1311	IS1311-F	GCGTGAGGCTCTGTGTTGAA	608	[18]
	IS1311-R	ATGACGACCGCTTGGGAGAC		

有限公司合成。扩增体系 (25 μL): *Premix Taq*TM 12.5 μL , ddH₂O 9.5 μL , 上、下游引物各 1 μL , 模板 1 μL 。IS900 基因采用巢式 PCR 方法, 第二轮 PCR 以第一轮产物为模板。IS900 基因第一轮和第二轮反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min。IS1311 基因反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.7 基因序列分析和 MAP 分型 将 PCR 扩增阳性产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果通过 BLAST 在线平台 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行 MAP 鉴定, 使用 DNASTAR 5.0 软件依据基因序列多位点比对特征, 进行序列分析和分型。通过 MEGA 5.0 软件运用邻接法 (Neighbor-joining, NJ), 以 GenBank 数据库中的 20 株不同亚型 MAP IS900 基因序列和本试验中的 MAP 分离菌株为样本, 构建系统进化树。

2 结果

2.1 病史调查 该羊场为 1 年前私人自建, 自行引进黑山羊进行繁育, 目前已有成年羊和羔羊共 800 多只, 全群接种小反刍兽疫、羊痘和羊三联四防疫苗, 定期进行体内外驱虫。圈养后从 2023 年 6 月开始陆续有羊死亡, 2 个月内死亡 170 余只, 死亡羊以 6~8 月龄为主。患病羊消瘦明显, 精神沉郁, 被毛粗乱无光泽, 持续性腹泻后死亡。

2.2 病理变化观察 剖检发现, 病羊血液稀薄; 空肠和回肠肠壁增厚, 黏膜面形成皱襞呈脑回样 (图 1A); 肠系膜淋巴结肿大, 呈灰黄色, 切面可见灰白色病灶 (图 1B)。H. E. 染色观察可见空肠、回肠黏膜固有层和黏膜下层增厚, 内有大量的上皮样细胞和淋巴细胞增生 (图 2A); 肠系膜淋巴结皮质区可见上皮样细胞大量增生 (图 2B), 副皮质区有淋巴细胞增生; 其他组织器官未见明显病理变化。抗酸染色观察可见聚集在上皮样细胞内红染的小杆菌 (图 3)。

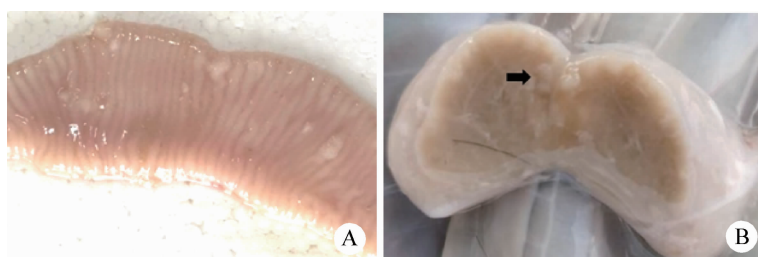


图 1 患病黑山羊剖检观察

Fig. 1 Dissection observation of diseased black goats

A: 空肠肠壁; B: 肠系膜淋巴结 (黑色箭头: 灰白色病灶)

A: Intestinal wall of jejunum; B: Mesenteric lymph node (Black arrow: Gray-white lesion)

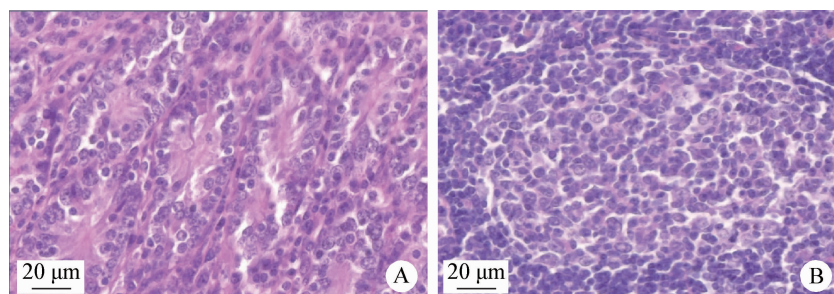


图 2 回肠和肠系膜淋巴结组织病理学观察 (H. E. 染色, 400 \times)

Fig. 2 Histopathological observation of ileum and mesenteric lymph nodes (H. E. staining, 400 \times)

A: 回肠固有层; B: 肠系膜淋巴结皮质区

A: Ileum propria; B: Cortex of mesenteric lymph node

2.3 PCR 扩增 使用 MAP IS900 和 IS1311 基因特异性引物, 对粪便、肠道和肠系膜淋巴结样品进行 PCR 扩增, 分别得到约为 298 bp (图 4A) 和 608 bp

的条带 (图 4B), 大小与预期一致。

2.4 基因序列分析和 MAP 分型

2.4.1 BLAST 在线分析 对本试验扩增的 IS900

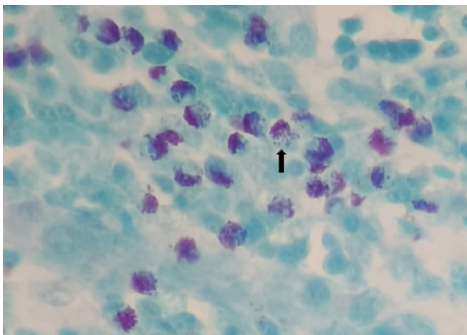


图 3 回肠抗酸染色观察(400 ×)
Fig.3 Acid-fast staining observation of the ileum (400 ×)
黑色箭头:红染的抗酸杆菌
Black arrow:Red-stained acid-fast bacilli

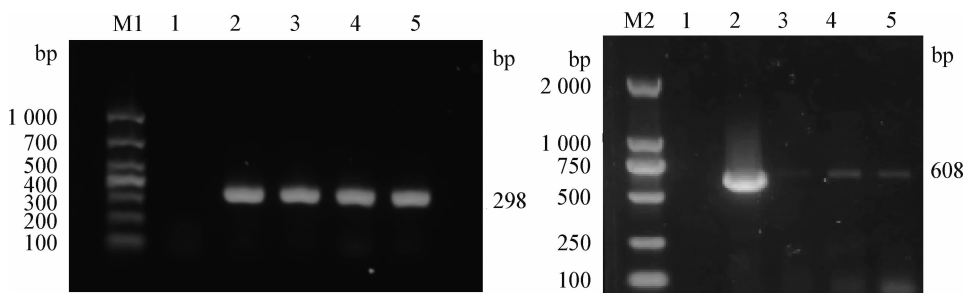


图 4 *IS900* 基因(A)和 *IS1311* 基因(B)的 PCR 扩增
Fig.4 PCR amplification of *IS900* gene (A) and *IS1311* gene (B)
M1:DL-1 000 Marker; M2:DL-2 000 Marker; 1:阴性对照; 2:阳性对照; 3:粪便样品; 4:肠道样品; 5:肠系膜淋巴结样品
M1:DL-1 000 Marker; M2:DL-2 000 Marker; 1:Negative control; 2:Positive control; 3:Stool sample; 4:Intestine sample;
5:Mesenteric lymph node sample

基因序列和 *IS1311* 基因序列进行 BLAST 分析,结果显示,2 个序列均与 II 型 MAP 菌株 DSM 44135 (GenBank 登录号:CP053068.1) 基因序列同源性最高(98.48%和 98.78%)。

2.4.2 *IS900* 基因序列分析 本试验获得的 MAP *IS900* 基因片段第 169、216 位碱基分别为 C(胞嘧啶)和 A(腺嘌呤)。

2.4.3 *IS1311* 基因序列分析 本试验获得的

IS1311 基因第 64、65、68、223、236、422、527、628 位碱基与 S 型代表株 JD97/1-2、C 型代表株 316V 和美国野牛型代表株 98/1010 一致;第 223 位碱基与 C 型代表株 316V 和 B 型代表株一致,但与 S 型代表株 JD97/1-2 不一致(表 2)。

2.4.4 *IS900* 基因进化树分析 进化树显示,本试验的 MAP 分离菌株处于 MAP II 型菌株分支(图 5)。

表 2 *IS1311* 基因测序结果对比分析
Table 2 Comparison analysis of *IS1311* gene sequencing results

菌株名称 Strain name	亚型 Subtype	位点 Position						
		64、65	68	223	236	422	527	628
JD97/1-2 (AJ223975)	S 型 Type S	TG	C	C	C	C	A	C
316V (AJ223974)	C 型 Type C	TG	C	Y	C	C	A	C
98/1010 (AJ308375)	B 型(美国野牛型) USA Bison type	TG	C	T	C	C	A	C
S5 (EF514838)	B 型(印度野牛型) Indian Bison type		C	T	C	N	N	N
MAP-LC		TG	C	T	C	C	A	C

注:Y:C/T; N:A/T/C/G; MAP-LC:本试验获得 MAP 菌株
Note:Y:C/T; N:A/T/C/G; MAP-LC:MAP strain obtained in this study

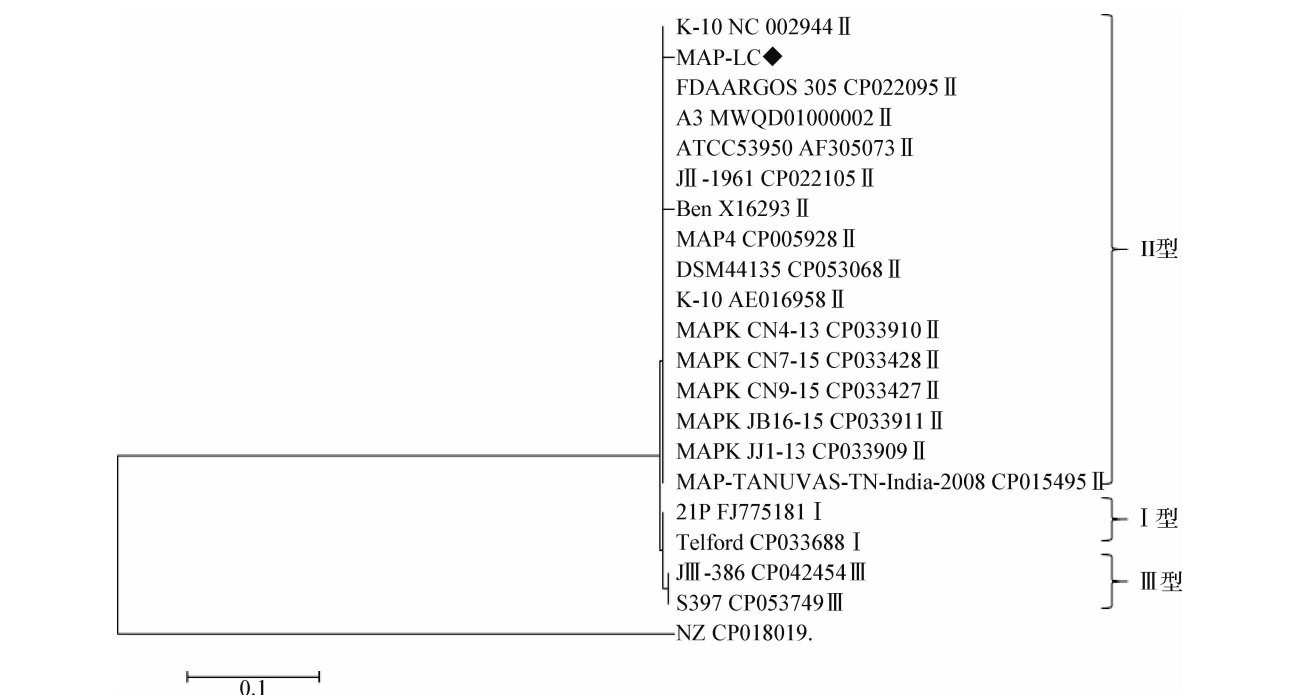


图5 *IS900* 基因系统进化树

Fig. 5 *IS900* gene phylogenetic tree

◆: 本试验获得 MAP 菌株

◆: MAP strain obtained in this study

3 讨论

粪-口途径是幼龄动物感染 MAP 最常见的途径,MAP 通过肠黏膜进入肠壁被巨噬细胞吞噬^[19],被感染的巨噬细胞迁移到局部淋巴管并扩散到区域淋巴结,刺激机体引起炎症和免疫反应^[20-21]。因此,副结核病以持续性腹泻和吸收不良为特征。本次发病羊共同主要病变均为增生性肠炎和增生性淋巴结炎,初步疑似为副结核病。

目前,用于副结核病早期亚临床感染的诊断方法缺乏敏感性,阻碍了疾病防控,给全世界的畜牧业造成了重大的经济损失^[22]。传统上,MAP 分离鉴定是副结核病诊断的“金标准”^[19]。然而,MAP 生长要求苛刻,生长速度缓慢,因此推动了替代诊断工具的开发。PCR 作为一种快速、特异、敏感的诊断副结核病的方法已被广泛接受^[23]。本试验通过 MAP *IS900* 和 *IS1311* 基因特异性引物对粪便样品和组织样品进行 PCR 扩增,结果显示为阳性。基因测序结果 BLAST 在线分析显示,与本试验菌株序列同源性最高的参考序列均为 MAP。结合组织切片抗酸染色阳性,该羊场病羊确诊为感染 MAP。

由于粪便样品中 MAP 数量较少,分枝杆菌细胞壁的抗裂解性导致 DNA 的回收较差,以及粪便样品

中高浓度抑制剂的存在,限制了基于 PCR 的 MAP 检测^[24]。本试验采用 DNA 提取前的浓缩步骤和巢式 PCR 来克服这些局限。该方法的进一步完善可以使其在临床和亚临床病例的检测中得到广泛的应用。携带 *IS900* 基因相似序列的分枝杆菌可能会阻碍 *IS900* 基因作为 PCR 的靶基因,但基于 *ISMap2*、*ISMap02* 或 *F57* 等替代基因的粪便 PCR 检测方案可能由于拷贝数低于 *IS900* 基因而具有较低的敏感性^[25]。因此,*IS900* 基因仍然是 PCR 的理想靶标,但应谨慎解释单独基于 *IS900* 基因 PCR 检测的诊断结果。Stina 等^[26] 建议通过后续测序或针对另一个 MAP 基因的 PCR 检测来确认 *IS900* 基因 PCR 阳性结果。因此,本试验结合 *IS1311* 基因 PCR 检测和对 PCR 产物进行测序分析,既利用了 *IS1311* 基因可以分型的优势,又排除了 MAP 假阳性。

本病例另外值得关注的是发病羊日龄。幼龄动物易感 MAP,但潜伏期较长,6~8 月龄发病明显早于以前报道的 18 月龄^[27]。然而,许多外界因素都会影响潜伏期时间长短。较大的 MAP 暴露剂量和应激都会导致潜伏期缩短,低于 12 月龄的山羊发病并不罕见^[28]。有文献报道,山羊比绵羊或牛更容易感染 MAP,且更容易出现临床症状^[29]。结合此羊场为山羊,且该羊场为新建未完工状态,圈养密

度大、饲养管理条件差、饲料单一且质量差,所以出现症状时间较早。另外,也可能与黑山羊品种、该 MAP 菌株生长特性或致病性等有关,需要进一步研究。

本试验通过 *IS900* 和 *IS1311* 基因的 PCR 扩增、BLAST 在线分析、基因位点和遗传演化关系分析,以确认该场山羊感染 MAP 的基因型。首先,2 个 MAP 特异性基因测序结果 BLAST 在线分析显示,同源性最高的参考序列均为 II 型 MAP。其次,MAP 不同基因型在 *IS900* 基因第 169、216 位碱基有差异,III 型在第 169 位为 T 或 C,而 I 型和 II 型在该位点为 C;III 型在第 216 位为 G 或 A, I 型和 II 型在该位点分别为 G 和 A^[30-31];本试验获得的 MAP *IS900* 基因第 169 位和第 216 位碱基分别为 C 和 A,因此本试验菌株可能为 II 型或 III 型 MAP。另外,通过分析 *IS1311* 基因第 64、65、68、223、236、422 和 527 位碱基可区分 S 型、C 型和 B 型 MAP 菌株^[32],分析结果显示,本试验菌株可能为 B 型或 C 型。最后,*IS900* 基因进化树显示本试验菌株处于 II 型 MAP 分支。综上所述,本试验位于内蒙古自治区中部地区羊场的山羊感染菌株为 II 型 MAP。但是,本实验室前期发现 II 型 MAP 主要存在于内蒙古自治区西部和东部地区,III 型 MAP 主要存在于内蒙古自治区西部和中部地区^[8],关于内蒙古自治区 MAP 的基因型分布还需要对大量样品进行分子流行病学调查。

副结核病尚无特效治疗药物和方法,对症治疗只能缓解症状^[33],尚未见副结核病成功治疗案例的报道。目前,防治本病最好的方法就是加强饲养管理,增强家畜体质,定期检疫、隔离和淘汰病畜,引种时严格检疫。

参考文献:

- [1] Kirkpatrick B W, Cooke M E, Frie M, et al. Genome-wide association analysis for susceptibility to infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in US Holsteins[J]. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(5): 4301–4313.
- [2] 王烈花. 山羊副结核的病理及防治[J]. *中兽医学杂志*, 2019(4): 71.
- [3] 马学恩, 王凤龙. 家畜病理学[M]. 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2016: 287.
- [4] Idris S M, Eitom K H, Okuni J B, et al. Paratuberculosis: the hidden killer of small ruminants[J]. *Animals*, 2021, 12(1): 12.
- [5] Correa-Valencia N, García-Tamayo Y M, Fernández-Silva J A. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Colombia (1924–2016): a review[J]. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2018, 31(3): 165–179.
- [6] 赵维宏, 韩文雄, 杨波, 等. 内蒙古地区羊源副结核分枝杆菌的分离与基因分型[J]. *中国农业科学*, 2023, 56(6): 1204–1214.
- [7] Rachel H, Rachel M, Keith S, et al. Molecular characterisation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Australia[J]. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1): 101.
- [8] Zhao L, Wang Y, Wang J L, et al. Serological investigation and genotyping of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep and goats in Inner Mongolia, China[J]. *PLoS One*, 2021, 16(9): e0256628.
- [9] Ott S L, Wells S J, Wagner B A. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 1999, 40(3-4): 179–192.
- [10] 韩有库, 胡希荣, 张文华. 牛付结核在我省流行情况及诊断方法的研究[J]. *吉林畜牧兽医*, 1979(1): 33–37.
- [11] 姚国华, 文立身. 用禽结核菌素皮内试验诊断绵羊副结核病[J]. *畜牧与兽医*, 1983(4): 40–41.
- [12] 努尔麦麦提·麦麦提敏. 新疆南疆牦牛副结核病的流行病学调查[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2022.
- [13] 陈志远, 张宇名, 迟丽丽, 等. 山东省部分地区规模化奶牛场副结核病血清学调查[J]. *中国奶牛*, 2022(4): 21–25.
- [14] 胡晓艳, 金一春, 曹向英, 等. 2017–2019 年上海市松江区牛副结核病血清学调查[J]. *福建畜牧兽医*, 2021, 43(3): 1–2.
- [15] 王凤龙. 兽医病理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022: 151–158.
- [16] 胡昌弟, 余旭良. 萋-尼抗酸染色冷染法与热染法结果比较分析[J]. *中国现代医生*, 2019, 57(15): 110–113.
- [17] Yu Y D, Zhang S H, Xu G Y, et al. Identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in sheep farms in Bayan-naoer, Inner Mongolia, China (short communication)[J]. *BMC Veterinary Research*, 2022, 18(1): 281.
- [18] Marsh I, Whittington R, Cousins D. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in *IS1311*[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 1999, 13(2): 115–126.
- [19] Nava M B, Saurabh G, Garima V, et al. Bioprospective role of *Ocimum sanctum* and *Solanum xanthocarpum* against emerging pathogen: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*; a review[J]. *Molecules*, 2023, 28(8): 3490.
- [20] Coussens P M. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2001, 2(2): 141–162.
- [21] Tessema M Z, Koets A P, Rutten V P, et al. Bacteriology: review paratuberculosis: how does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation? [J]. *Veterinary Quarterly*, 2001, 23(4): 153–162.
- [22] Munjal K S, Tripathi N B, Paliwal P O. Progressive immunopathological changes during early stages of experimental infection of goats with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* [J]. *Veterinary Pathology*, 2005, 42(4): 427–436.
- [23] Monika B, Martina B, Sarah M, et al. Development of a reference standard for the detection and quantification of *Mycobacterium*

- avium* subsp. *paratuberculosis* by quantitative PCR[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1):11622.
- [24] Kaur P, Folia G, Singh S V, *et al.* Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: IS900 PCR identification and IS1311 polymorphism analysis from ruminants in the Punjab region of India[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2010, 34(2):163–169.
- [25] Vansnick E, Rijk D P, Vercammen F, *et al.* Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* [J]. Veterinary Microbiology, 2004, 100 (3-4): 197–204.
- [26] Stina E, Göran B, KarlErik J. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 209 (2): 267–271.
- [27] McGregor H, Dhand K N, Dhunghyel P O, *et al.* Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: dose-response and age-based susceptibility in a sheep model[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2012, 107(1-2):76–84.
- [28] Suelee R. Control of paratuberculosis in small ruminants [J]. The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice, 2011, 27(3):609–620.
- [29] Stewart D J, Vaughan J A, Stiles P L, *et al.* A long-term bacteriological and immuno-logical study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 122(1-2):83–96.
- [30] Makeda S, Christine Y T, Marcel A B. Insertion sequence IS900 revisited[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44 (3): 1081–1083.
- [31] Elena C, Alicia A, Lucia J D, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are strain type specific[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(7):2260–2264.
- [32] Whittington R, Marsh I, Choy E, *et al.* Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species [J]. Molecular and Cellular Probes, 1998, 12(6):349–358.
- [33] Windsor P A. Paratuberculosis in sheep and goats[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 181(1-2):161–169.

(责任编辑 孟迪)