

## 研究报告

## 不同宿主源弯曲菌黏附侵袭肠上皮细胞及在鸡肠道内定殖的比较

郭家卉<sup>1,2</sup>, 崔一芳<sup>2</sup>, 李鹏祥<sup>1,2</sup>, 申学阳<sup>1,2</sup>, 曹晓亚<sup>2</sup>, 马洪海<sup>2,3</sup>, 郭芳芳<sup>2</sup>, 丁保安<sup>\*1</sup>, 徐福洲<sup>\*2</sup>

1 青海大学农牧学院, 青海 西宁 810016

2 北京市农林科学院畜牧兽医研究所 畜禽疫病防控技术北京市重点实验室, 北京 100097

3 北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206

郭家卉, 崔一芳, 李鹏祥, 申学阳, 曹晓亚, 马洪海, 郭芳芳, 丁保安, 徐福洲. 不同宿主源弯曲菌黏附侵袭肠上皮细胞及在鸡肠道内定殖的比较[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5150-5158

Guo Jiahui, Cui Yifang, Li Pengxiang, Shen Xueyang, Cao Xiaoya, Ma Honghai, Guo Fangfang, Ding Baoan, Xu Fuzhou. Comparison on adhesion and invasion to intestinal epithelial cells and chicken intestine colonization of *Campylobacter* strains from different hosts[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5150-5158

**摘要:**【背景】弯曲菌(*Campylobacter*)是重要的人畜共患病原菌,可在多种动物肠道定殖,但不同宿主源弯曲菌对肠上皮细胞的黏附侵袭特征及在鸡肠道内的定殖能力并不明确。【目的】探究不同宿主源弯曲菌对不同宿主肠上皮细胞黏附侵袭及在鸡肠道内定殖能力的差异性。【方法】利用5株来自不同宿主源弯曲菌,包括人源、鸡源、鸭源和牛源空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)及猪源结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*),在对菌株PCR鉴定、运动性及生物膜形成能力测定的基础上,分别测定各菌株对人源肠上皮细胞 Caco-2、猪源肠上皮细胞 IPEC-J2 和大鼠源肠上皮细胞 IEC-6 的黏附能力,通过庆大霉素保护试验测定菌株对肠上皮细胞的侵袭能力,比较黏附量和侵袭量的差异;将5株弯曲菌分别口服攻毒鸡,于攻毒后不同日龄(different days post inoculation, DPI)采集肠道样品测定弯曲菌的菌落数,比较不同弯曲菌在鸡肠道内定殖的差异。【结果】人源弯曲菌运动力显著高于其他4株动物源弯曲菌,而牛源和猪源弯曲菌生物膜形成能力显著高于其他菌株。黏附

基金项目:北京市农林科学院创新能力建设专项(KJCX20220422);北京市农林科学院青年科学基金(QNJJ202109);北京市农林科学院畜牧兽医研究所改革与发展基金(XMSSYJJ2022-2)

**Supported by:** Special Program on Science and Technology Innovation Capacity Building of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (KJCX20220422); Science Foundation for Young Scholars of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (QNJJ202109); Research and Development Foundation of Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (XMSSYJJ2022-2)

\*Corresponding authors: E-mail: DING Baoan: dingbaoan1967@163.com; XU Fuzhou: fuzhouxu@163.com

Received: 2022-08-25; Accepted: 2022-10-17; Published online: 2022-10-27

侵袭测定结果显示, 人源弯曲菌对 Caco-2 细胞的黏附能力显著高于动物源弯曲菌, 但侵袭能力显著低于动物源弯曲菌; 鸭源和牛源弯曲菌对 IPEC-J2 细胞的黏附能力显著低于其他菌株, 而且鸭源弯曲菌的侵袭能力显著低于其他菌株; 不同菌株对 IEC-6 细胞的黏附能力无显著差异, 但鸡源弯曲菌侵袭能力显著低于其他菌株。不同弯曲菌口服攻毒鸡后 1、3 和 6 d 动物源弯曲菌定殖水平显著高于人源, 在攻毒后 10 d 和 15 d 仅牛源弯曲菌显著高于人源, 于攻毒后 15 d 所有菌株达到约 8–10 Log<sub>10</sub> (CFU/g) 的稳定定殖水平。【结论】来源于不同宿主的弯曲菌对不同宿主肠上皮细胞均具有黏附侵袭能力, 同时可在鸡肠道内稳定定殖, 提示弯曲菌在不同动物间传播和适应性定殖的特征, 对开展弯曲菌针对性防控措施具有一定的借鉴意义。

**关键词:** 弯曲菌; 宿主; 肠上皮细胞; 黏附; 侵袭; 定殖

## Comparison on adhesion and invasion to intestinal epithelial cells and chicken intestine colonization of *Campylobacter* strains from different hosts

GUO Jiahui<sup>1,2</sup>, CUI Yifang<sup>2</sup>, LI Pengxiang<sup>1,2</sup>, SHEN Xueyang<sup>1,2</sup>, CAO Xiaoya<sup>2</sup>, MA Honghai<sup>2,3</sup>, GUO Fangfang<sup>2</sup>, DING Baoan<sup>\*1</sup>, XU Fuzhou<sup>\*2</sup>

1 College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

2 Beijing Key Laboratory for Prevention and Control of Infectious Diseases in Livestock and Poultry, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

3 College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

**Abstract: [Background]** *Campylobacter* is a major zoonotic bacterial pathogen which can colonize the intestinal tract of a variety of animals. However, adhesion and invasion to intestinal epithelial cells and chicken intestine colonization of *Campylobacter* strains from different hosts are unclear. **[Objective]** To compare the adhesion and invasion to intestinal epithelial cells and the chicken intestine colonization of *Campylobacter* strains from different hosts. **[Methods]** Five *Campylobacter* strains isolated from different hosts, including human-, chicken-, duck-, and bovine-derived *Campylobacter jejuni* strains and a porcine-derived *C. coli* strain, were studied. The strains were identified by multiplex PCR and tested for motility and biofilm formation ability. The adhesion of each strain to human intestinal epithelial cell line Caco-2, porcine intestinal epithelial cell line IPEC-J2, and rat intestinal epithelial cell line IEC-6 was determined respectively. The invasion of each strain to intestinal epithelial cells was determined by gentamicin protection test. The differences in adhesion and invasion were statistically analyzed. Further, chickens were challenged orally with the five strains respectively. We collected the cecal samples on different days post inoculation (DPI) to determine the chicken intestine colonization ability of *Campylobacter*. **[Results]** The motility of human-derived *C. jejuni* was significantly higher than that of other four animal-derived *Campylobacter* strains, and the biofilm formation ability of bovine- and porcine-derived strains was significantly higher than that of other strains. The human-derived *C. jejuni*

showcased stronger adhesion and weaker invasion to Caco-2 cells than animal-derived strains. The adhesion ability of duck- and bovine-derived strains to IPEC-J2 cells was significantly lower than that of other strains, and the invasion ability of the duck-derived strain was significantly lower than that of other strains. There was no significant difference in the adhesion ability of the five strains to IEC-6 cells, while the invasion ability of chicken-derived strain was significantly lower than that of other strains. The animal-derived strains showed higher colonization levels than the human-derived strain at 1, 3 and 6 DPI, while only the bovine-derived strain had significantly higher colonization level than the human-derived strain at 10 and 15 DPI. All the strains reached a stable colonization level of 8–10 Log<sub>10</sub> (CFU/g) at 15 DPI. **[Conclusion]** *Campylobacter* strains from different hosts can adhere to and invade the intestinal epithelial cells of various animal origins and colonize chicken intestine, which suggest that *Campylobacter* can transmit among and colonize different animals. The results are helpful for developing targeted prevention and control measures against *Campylobacter*.

**Keywords:** *Campylobacter*; host; intestinal epithelial cells; adhesion; invasion; colonization

弯曲菌(*Campylobacter*)是一种重要的人兽共患传染性病原细菌,在世界范围内广泛存在,感染人后引起腹痛、腹泻等肠炎表现,同时与人自身免疫性疾病如格林-巴利综合征密切相关<sup>[1]</sup>。弯曲菌属中目前已鉴定了40多个种和亚种,其中以空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)和结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*)感染最为普遍,分别约占人弯曲菌感染的90%和10%<sup>[2]</sup>。除人感染外,该菌普遍存在于畜禽等多种动物肠道内,引起母畜流产、不孕、乳房炎、幼畜腹泻等临床表现,但在家禽肠道内定殖后无明显的临床症状和病理变化,成为人感染的主要来源<sup>[3]</sup>。目前,对弯曲菌在不同宿主肠道内感染和定殖的机制认识不足,因此,鉴定该菌与肠道上皮细胞的相互作用对解析其致病性及防控均具有重要意义。

弯曲菌在宿主肠道内定殖过程中,首先与肠道上皮细胞发生相互作用。研究显示,弯曲菌对宿主肠道上皮细胞的黏附侵袭能力对其致病性具有重要作用<sup>[4]</sup>。目前,有关弯曲菌黏附侵袭人肠道上皮细胞的研究报道较多,而且鉴

定了多个黏附侵袭相关的细菌蛋白<sup>[5]</sup>;但对不同宿主源弯曲菌黏附侵袭动物肠道上皮细胞的比较研究相对较少,严重阻碍了弯曲菌在不同动物肠道内致病机制的解析及防控技术的研发。鉴于此,本试验利用人源、猪源及鼠源等3种肠道上皮细胞系,分别测定和比较人源、鸡源、鸭源、牛源及猪源等5种弯曲菌对这些细胞的黏附侵袭能力,同时测定这些菌株在鸡肠道内的定殖能力,以期解析弯曲菌在不同动物肠道内的定殖、致病机制及开展针对性防控措施提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和细胞株

人源空肠弯曲菌参考菌株 NCTC 11168 (HuCj11168)由中国疾病预防控制中心张茂俊博士惠赠;鸡源空肠弯曲菌分离株(ChCj3)、鸭源空肠弯曲菌分离株(DuCj2)、牛源空肠弯曲菌分离株(BoCj2)和猪源结肠弯曲菌分离株(PoCc5)由本实验室分离保存。人结肠癌细胞 Caco-2 由本实验室保存;猪肠上皮细胞 IPEC-J2

由北京市农林科学院畜牧兽医研究所王晶博士惠赠; 大鼠肠上皮细胞 IEC-6 由北京农学院刘晓晔博士惠赠。

## 1.2 培养基、主要试剂和仪器

弯曲菌培养用 Mueller-Hinton (MH) 肉汤及琼脂, Oxoid 公司; 细胞培养用 DMEM 培养基及胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), Gibco 公司。Heracell 三气培养箱和 Countess 细胞计数仪, Thermo Fisher 公司。

## 1.3 实验动物

动物实验遵循北京市农林科学院畜牧兽医研究所实验动物福利伦理审查委员会的规定开展, 实验动物福利伦理审查编号为: IHVM11-2202-9。实验使用的 2 周龄无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级雏鸡购自北京梅里亚实验动物中心, 实验动物使用许可证编号为 SYXK (京) 2017-0039。

## 1.4 弯曲菌培养

弯曲菌培养参照文献[6], 即将保存于 $-80^{\circ}\text{C}$  的弯曲菌菌株分别划线接种于 MH 琼脂平板, 在三气培养箱( $5\% \text{O}_2$ 、 $10\% \text{CO}_2$ 、 $85\% \text{N}_2$ ) 中  $42^{\circ}\text{C}$  培养 24–48 h, 挑取单菌落分别接种于 MH 肉汤中培养, 传代用于后续试验。

## 1.5 弯曲菌鉴定

在对弯曲菌分离株进行鉴别培养、生化鉴定等基础上, 利用三重 PCR 方法<sup>[7]</sup>对本试验使用的菌株进行弯曲菌属和种的鉴定。

## 1.6 菌株运动力测定

运动力测定试验参照文献[6], 配制 0.4% MH 半固体培养基, 吸取  $2\ \mu\text{L}$  弯曲菌新鲜菌液垂直插入半固体培养基中, 缓缓注入菌液, 置于三气培养箱中培养 24 h, 通过测定接种部位的弯曲菌生长圈直径来判定菌株的运动力。

## 1.7 菌株生物膜形成能力测定

利用结晶紫染色法测定 5 株弯曲菌在 MH

肉汤中的生物膜形成能力<sup>[8]</sup>。试验在 96 孔聚苯乙烯微孔培养板中进行, 不同菌株新鲜培养物调节  $OD_{600}$  值为 0.2 后进行 100 倍稀释(约  $10^6$  CFU/mL), 每孔中加入  $200\ \mu\text{L}$  菌液, 置于三气培养箱中  $42^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, PBS 洗板 3 次后每孔加入  $100\ \mu\text{L}$  甲醇固定 15 min, 弃甲醇后自然风干, 每孔加入  $200\ \mu\text{L}$  结晶紫溶液( $10\ \text{mg/mL}$ ), 室温下染色 15 min, 弃染液并冲洗干净, 自然风干后每孔加入  $100\ \mu\text{L}$  33%冰乙酸溶液,  $37^{\circ}\text{C}$  作用 30 min 后利用多功能酶标测定仪 Synergy H1 测定  $OD_{590}$  值。每次试验设置 3 个重复并重复 3 次试验, 取相同样品的  $OD_{590}$  平均值进行分析。

## 1.8 肠上皮细胞培养

用添加 10% FBS 的 DMEM 培养液进行肠上皮细胞的复苏和培养, 待细胞铺满单层后加入 0.25% 胰酶进行消化和传代, 至细胞生长旺盛后用于细菌黏附侵袭试验。

## 1.9 黏附侵袭试验

参照文献[9]进行弯曲菌黏附侵袭肠上皮细胞试验。于 6 孔细胞培养板中培养肠上皮细胞, 细胞铺满单层后加入 0.25% 胰酶消化, 利用细胞计数仪进行细胞计数, 然后重新铺板培养至细胞长满单层。将培养 12 h 至对数生长早期的弯曲菌培养液经  $8\ 000\ \text{r/min}$  离心 5 min, 弃去 MH 肉汤, 用  $0.01\ \text{mol/L}$  PBS ( $\text{pH}\ 7.2$ ) 重复清洗菌沉淀 3 次, 用含 1% FBS 的 DMEM 培养基重悬菌沉淀, 按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 100 进行细胞感染, 于  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  培养箱内孵育 3 h 后, 用 PBS 洗涤 3 次去除未黏附细菌, 加入 0.1% Triton X-100 裂解细胞, 10 倍比系列稀释后涂布计数弯曲菌, 细菌计数结果即为黏附量和侵袭量之和。为测定侵袭量, 将同样 MOI 感染的细胞孵育 3 h 后, PBS 洗涤去除未黏附细菌, 加入含  $250\ \mu\text{g/mL}$  庆大霉素和 1% FBS 的 DMEM 培养

液, 继续孵育 3 h 杀灭细胞外黏附细菌, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入 0.1% Triton X-100 裂解细胞, 经 10 倍倍比系列稀释后涂布计数, 得到结果为细菌侵袭量。所有试验均重复 3 次, 每次试验设置至少 3 个重复, 通过计算分别获得 5 株弯曲菌对 3 种肠上皮细胞的黏附量和侵袭量。

### 1.10 鸡口服攻毒试验

鸡口服攻毒试验参照文献[6]进行。即: 将 2 周龄 SPF 雏鸡 150 只随机分为 6 组, 每组 25 只, 分别饲养于独立的隔离器中, 用于攻毒 5 株弯曲菌 HuCj11168、ChCj3、DuCj2、BoCj2、PoCc5 和非攻毒对照, 攻毒前检测肛拭子样品均为弯曲菌阴性。将在三气培养箱(5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>、85% N<sub>2</sub>)中 42 °C 培养 12 h 后的试验菌株用 MH 培养液稀释 1 000 倍, 每只鸡口服攻毒 100 μL (约 10<sup>5</sup> CFU/只), 非攻毒对照组口服 100 μL MH 培养液, 分别于攻毒后 1、3、6、10 和 15 d 每组剖杀 5 只鸡, 取盲肠内容物称重后用 MH 培养液 10 倍倍比系列稀释, 分别涂布含有弯曲菌选择性抑制剂(Oxoid 公司)的 MH 平板, 置三气培养箱内培养 48 h 后进行菌落计数。

### 1.11 统计学分析

利用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析, 数据以平均数±标准差进行统计, 采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同宿主源弯曲菌鉴定及特性

利用三重 PCR 对本试验的 5 株弯曲菌的鉴定结果如图 1A 所示, 所有 5 株菌均扩增出弯曲菌属 16S rRNA 基因(857 bp), 同时 HuCj11168、ChCj3、DuCj2 和 BoCj2 扩增出空肠弯曲菌 *mapA* 基因(589 bp), PoCc5 扩增出结肠弯曲菌 *ceuE* 基因(462 bp)。在半固体培养基上测定弯

曲菌运动力结果显示, 5 株弯曲菌均表现出良好的运动力, 其中 HuCj11168 运动力最高, 显著高于其他 4 株动物源分离株(图 1B)。5 株弯曲菌生物膜形成能力测定结果显示, 菌株 BoCj2 和 PoCc5 的生物膜形成能力显著高于 HuCj11168、ChCj3 和 DuCj2 (图 1C、1D)。

### 2.2 弯曲菌对肠上皮细胞的黏附量测定结果

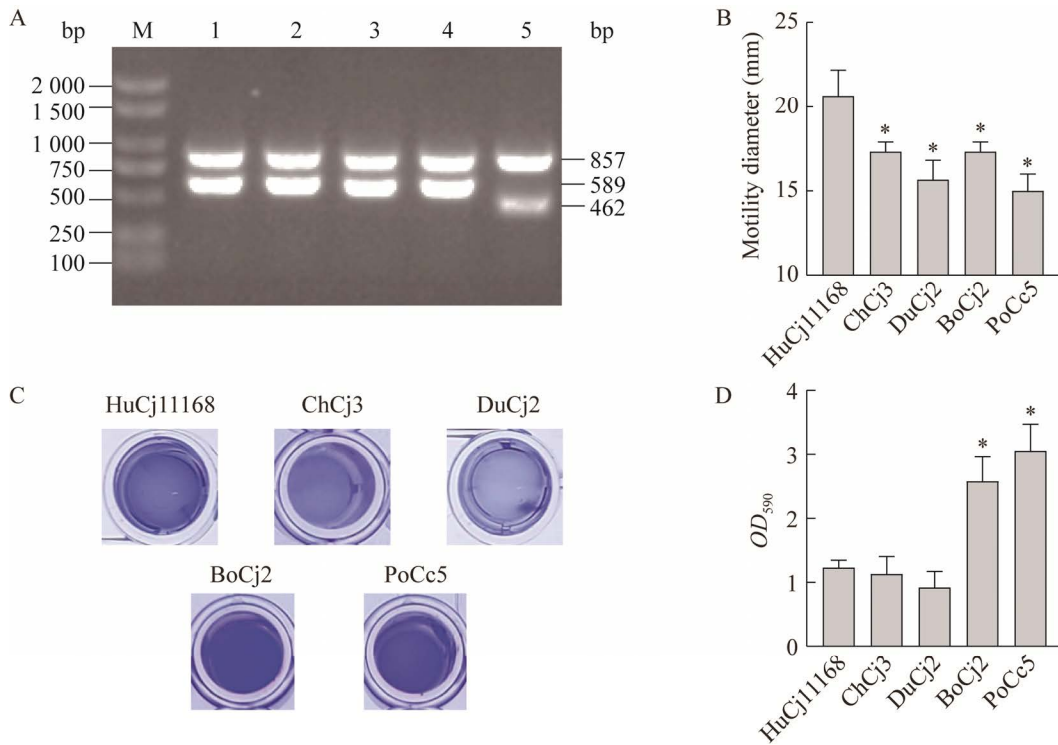
五株弯曲菌对 3 种肠上皮细胞的黏附量测定结果如图 2 所示。结果显示, 5 株弯曲菌对 Caco-2 的黏附量在 10<sup>5</sup>–10<sup>7</sup> CFU/mL 之间, 其中 HuCj11168 黏附量最高, 其次为 DuCj2, 而 ChCj3、BoCj2 和 PoCc5 对 Caco-2 的黏附量显著低于 HuCj11168; 5 株弯曲菌对 IPEC-J2 的黏附量在 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> CFU/mL 之间, 其中 DuCj2 和 BoCj2 的黏附量显著低于 HuCj11168; 而 5 株弯曲菌对 IEC-6 的黏附量在 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> CFU/mL 之间, 相互间无显著性差异。

### 2.3 弯曲菌对肠上皮细胞的侵袭量测定结果

五株弯曲菌对 3 种肠上皮细胞的侵袭量测定结果如图 3 所示。结果显示, 5 株弯曲菌对 Caco-2 的侵袭量在 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> CFU/mL 之间, 其中 HuCj11168 侵袭量最低, 而 ChCj3、DuCj2、BoCj2 和 PoCc5 对 Caco-2 的侵袭量均显著高于 HuCj11168; 5 株弯曲菌对 IPEC-J2 的侵袭量在 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> CFU/mL 之间, 其中 DuCj2 的侵袭量显著低于 HuCj11168; 5 株弯曲菌对 IEC-6 的侵袭量在 10<sup>3</sup>–10<sup>5</sup> CFU/mL 之间, 其中 ChCj3 的侵袭量显著低于 HuCj11168。

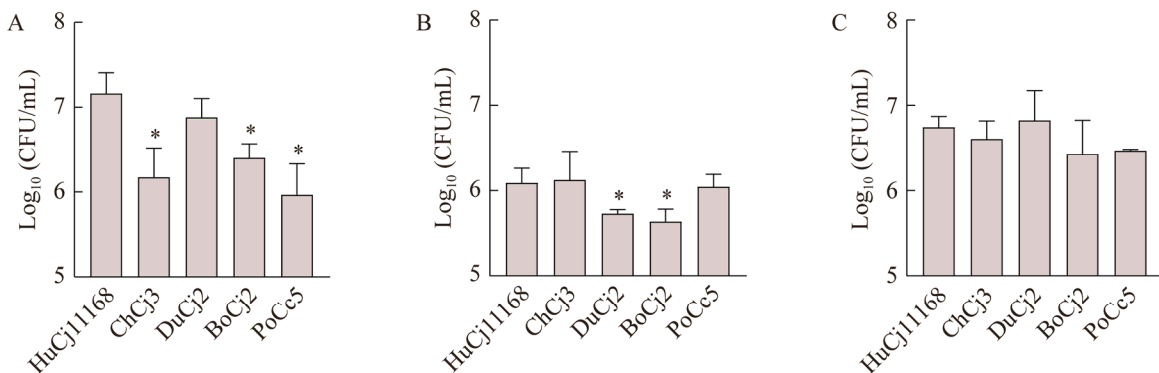
### 2.4 弯曲菌在鸡肠道内定殖测定结果

在整个试验周期内非攻毒对照组鸡只盲肠内容物弯曲菌分离培养均为阴性。如图 4 所示, 5 株弯曲菌口服攻毒 SPF 鸡后 1、3 和 6 d 动物源(鸡源、鸭源、牛源和猪源)弯曲菌定殖水平显著高于人源, 但在攻毒后 10 d 和 15 d 仅牛源弯曲菌定殖水平显著高于人源, 所有菌



**图1** 不同宿主源弯曲菌鉴定及特性测定结果 A: 5株弯曲菌三重PCR检测结果;M: DNA Marker; 1: HuCj11168; 2: ChCj3; 3: DuCj2; 4: BoCj2; 5: PoCc5; B: 5株弯曲菌在半固体培养基中运动力测定结果; C: 5株弯曲菌在MH培养基中生物膜形成能力代表性结晶紫显色结果; D: 5株弯曲菌在MH培养基中生物膜形成能力统计结果, \*表示该菌株与HuCj11168比较具有显著差异( $P<0.05$ )

**Figure 1** Identification and characterization of different host-derived *Campylobacter* strains. A: Amplicons of 5 *Campylobacter* strains by triplex PCR. M: DNA Marker; 1: HuCj11168; 2: ChCj3; 3: DuCj2; 4: BoCj2; 5: PoCc5; B: Motility of 5 *Campylobacter* strains in the semi-solid medium; C: Representative biofilm formation of 5 *Campylobacter* strains in the MH medium using the crystal violet staining; D: Biofilm formation abilities of 5 *Campylobacter* strains in the MH medium, the asterisk above the bar indicated statistically significant difference ( $P<0.05$ ) between the strain and HuCj11168.



**图2** 五株弯曲菌对3种肠上皮细胞的黏附量测定结果 A: Caco-2; B: IPEC-J2; C: IEC-6。\*表示该菌株与HuCj11168比较具有显著差异( $P<0.05$ )

**Figure 2** Adhesion of 5 *Campylobacter* strains to three intestinal epithelial cells. A: Caco-2; B: IPEC-J2; C: IEC-6. The asterisk above the bar indicated statistically significant difference ( $P<0.05$ ) between the strain and HuCj11168.

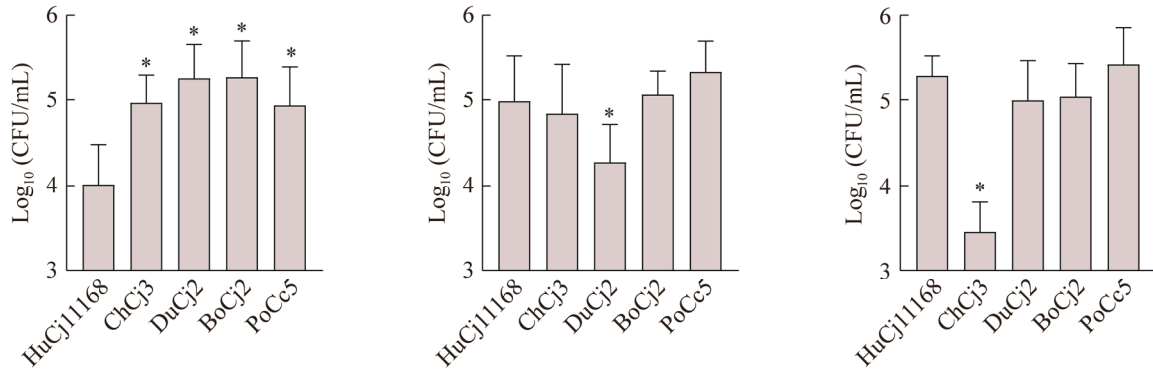


图3 五株弯曲菌对3种肠上皮细胞的侵袭量测定结果 A: Caco-2; B: IPEC-J2; C: IEC-6。\*表示该菌株与HuCj11168比较具有显著差异( $P < 0.05$ )

Figure 3 Invasion of 5 *Campylobacter* strains to three intestinal epithelial cells. A: Caco-2; B: IPEC-J2; C: IEC-6. The asterisk above the bar indicated statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) between the strain and HuCj11168.

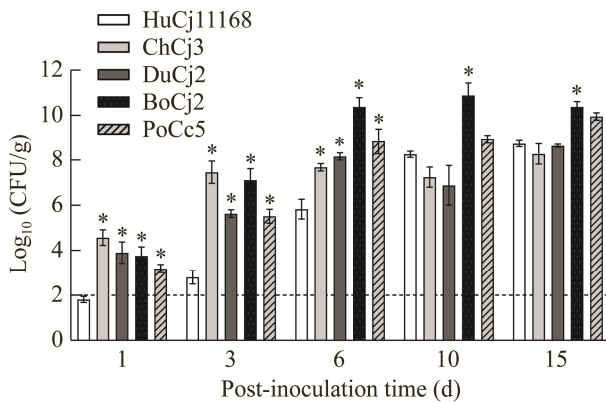


图4 五株弯曲菌口服攻毒后在鸡盲肠内定殖水平测定结果 图中横虚线表示本试验菌落计数的检测限。\*表示该菌株与HuCj11168比较具有显著差异( $P < 0.05$ )

Figure 4 Colonization levels of five *Campylobacter* strains in cecal contents of chickens via oral gavage. The broken line indicates the limit of detection for colony-forming unit (CFU) enumeration. The asterisk above the bar indicated statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) between the strain and HuCj11168.

株于攻毒后15 d达到约8–10 Log<sub>10</sub> (CFU/g)的稳定定殖水平。结果提示,本试验中的所有宿主源弯曲菌均可在鸡盲肠内稳定定殖,而且鸡源弯曲菌未表现出显著的定殖优势。

### 3 讨论与结论

人弯曲菌感染主要来源于污染的畜禽及其制品,减少畜禽带菌率可显著降低人感染的风险<sup>[1]</sup>;同时弯曲菌感染人和畜禽引起完全不同的临床表现和病理变化<sup>[3]</sup>,因此,研究该菌与宿主肠道上皮细胞的相互作用对解析其定殖和致病机制及制定防控措施将具有重要意义<sup>[5]</sup>。

弯曲菌的运动力和生物膜形成能力均可显著提高其环境适应力,在该菌定殖宿主肠道、通过肠道黏液层黏附侵袭肠道上皮细胞及不同宿主间传播过程中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。目前,有关弯曲菌生物膜形成能力与其运动力、黏附侵袭细胞能力的相关性研究较少, Sałamaszyńska-guz 等<sup>[10]</sup>利用43株分离自鸡、牛、猪等不同动物源弯曲菌的鉴定结果显示,空肠弯曲菌运动力强但生物膜形成能力弱于结肠弯曲菌,牛源和猪源弯曲菌生物膜形成能力显著强于鸡源分离株,但弯曲菌生物膜形成能力与运动力、黏附侵袭 Caco-2 细胞能力之间无显著相关性。本试验结果也显示,不同宿主源的5株弯曲菌均具有运动力,牛源和猪源弯曲菌生物膜形成能力较强,但弯曲菌运动力、生物膜形成能力及黏附侵袭



肠上皮细胞能力之间无明显相关性。

弯曲菌与宿主肠上皮细胞相互作用主要包括 3 个阶段: (1) 弯曲菌黏附于宿主肠上皮细胞; (2) 黏附的弯曲菌侵袭肠上皮细胞; (3) 侵入宿主细胞内的弯曲菌形成囊泡(*Campylobacter-containing vacuole*, CCV), 在宿主细胞内存活<sup>[1]</sup>, 其中弯曲菌黏附侵袭肠上皮细胞在其定殖于宿主肠道并发挥致病作用的关键阶段。研究显示, 弯曲菌黏附侵袭肠道上皮细胞的能力是由多种因素决定的<sup>[4]</sup>。Byrne 等<sup>[12]</sup>研究显示, 人源和鸡源弯曲菌均可有效黏附和侵袭人源和鸡源原代肠道上皮细胞, 添加鸡源肠道黏蛋白可显著降低弯曲菌侵袭细胞的能力, 而人源肠道黏蛋白则可提高侵袭能力。Wysok 等<sup>[13]</sup>鉴定猪源和牛源弯曲菌分离株对 Hela 细胞的黏附和侵袭能力时显示, 多数菌株的黏附和侵袭能力呈现正相关关系, 但有部分菌株呈现高黏附而低侵袭能力, 推测与不同菌株携带的黏附或侵袭相关的基因有关。Zheng 等<sup>[14]</sup>研究显示, 分离自鸡、火鸡、猪、牛等肉制品中的弯曲菌菌株黏附侵袭人肠道上皮细胞 T84 的能力差异较大, 但黏附和侵袭能力呈现正相关关系, 推测弯曲菌黏附可促进其侵袭细胞但并不是必需的。Wysok 等<sup>[15]</sup>研究显示, 鸡源和人源弯曲菌对 Hela 细胞的黏附能力无显著差异, 但鸡源弯曲菌的侵袭能力显著高于人源弯曲菌。De Melo 等<sup>[16]</sup>研究显示, 与人源弯曲菌相比, 禽源弯曲菌含有更多与黏附侵袭相关的基因, 推测与其适应环境及传播能力相关。本试验检测 5 种宿主源弯曲菌对 3 种宿主源肠上皮细胞的黏附侵袭力结果显示, 测定菌株对不同宿主肠上皮细胞均具有一定的黏附和侵袭能力, 但人源参考菌株 NCTC 11168 对 Caco-2 细胞表现为高黏附而低侵袭的特征。同时, 本试验通过对不同宿主源弯曲菌多个分离株进行鉴定及运动力和生

物膜形成能力等的比较, 每个宿主选择了一个代表性菌株进行黏附侵袭试验, 由于同一宿主来源不同菌株的黏附和侵袭能力也存在显著差异<sup>[10,12,14-15]</sup>, 所以本试验测定结果不能反映同一宿主来源的不同菌株的普遍特征, 但测定菌株对不同宿主肠上皮细胞均具有黏附侵袭能力, 提示弯曲菌可在不同宿主间传播。

通常认为, 弯曲菌具有广谱系和窄谱系, 其中广谱系菌株可感染多种家养和野生动物, 而窄谱系菌株具有特定的宿主, 但弯曲菌遗传进化及不同谱系菌株在动物中的共存和传播研究较少<sup>[17]</sup>。Atterby 等<sup>[18]</sup>研究显示, 画眉源、野鸭源和鸡源弯曲菌分别感染野鸭后前者不能稳定定殖而后两者可稳定定殖, 但野鸭源和鸡源弯曲菌共感染野鸭后前者具有显著的定殖优势, 提示野生动物源弯曲菌具有一定的宿主特异性。本试验选用的人源和家养动物源弯曲菌均可稳定在鸡盲肠内定殖, 而且鸡源弯曲菌未体现显著的定殖优势, 提示这些菌株具有在人和家养动物中定殖和传播的能力。

总而言之, 本试验 5 株不同宿主源弯曲菌在运动力、生物膜形成能力及黏附侵袭肠上皮细胞的能力等方面表现为菌株本身的特性, 测定菌株不但对不同宿主肠上皮细胞均具有一定的黏附和侵袭能力, 而且可在鸡盲肠内稳定定殖, 提示弯曲菌在人和家养动物中传播和适应性定殖的特征, 对开展弯曲菌针对性防控措施具有一定的借鉴意义。

## REFERENCES

- [1] Facciola A, Riso R, Avventuroso E, Visalli G, Delia SA, Laganà P. *Campylobacter*: from microbiology to prevention[J]. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 2017, 58(2): E79-E92
- [2] Fitzgerald C. *Campylobacter*[J]. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2015, 35(2): 289-298
- [3] Sahin O, Yaeger M, Wu ZW, Zhang QJ.



- Campylobacter*-associated diseases in animals[J]. Annual Review of Animal Biosciences, 2017, 5: 21-42
- [4] Burnham PM, Hendrixson DR. *Campylobacter jejuni*: collective components promoting a successful enteric lifestyle[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(9): 551-565
- [5] Rubinchik S, Seddon A, Karlyshev AV. Molecular mechanisms and biological role of *Campylobacter jejuni* attachment to host cells[J]. European Journal of Microbiology & Immunology, 2012, 2(1): 32-40
- [6] 魏国昊, 崔一芳, 郭芳芳, 曹晓亚, 王雪, 刘彦威, 徐福洲. 空肠弯曲菌全菌灭活疫苗免疫鸡效果评价[J]. 中国人兽共患病学报, 2022, 38(2): 115-121  
Wei GH, Cui YF, Guo FF, Cao XY, Wang X, Liu YW, Xu FZ. Evaluation of the immune efficacy of inactivated whole-cell *Campylobacter jejuni* vaccine in chickens[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2022, 38(2): 115-121 (in Chinese)
- [7] Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G, Colin P. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*[J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 29(6): 406-410
- [8] 吕佩帅, 张丽红, 丁小松, 郭芳芳, 崔一芳, 曹晓亚, 徐福洲. 胸膜肺炎放线杆菌在不同培养基中生长、生物膜形成及 Apx 毒素分泌能力的差异研究[J]. 动物医学进展, 2022, 43(1): 6-11  
Lü PS, Zhang LH, Ding XS, Guo FF, Cui YF, Cao XY, Xu FZ. Diversity on growth, biofilm formation and apx toxin secretion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in different culture media[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2022, 43(1): 6-11 (in Chinese)
- [9] Negretti NM, Konkel ME. Methods to study *Campylobacter jejuni* adherence to and invasion of host epithelial cells[J]. Methods in Molecular Biology: Clifton, N J, 2017, 1512: 117-127
- [10] Sałamaszyńska-guz A, Stefańska I, Baçal P, Binek M. Evaluation of selected phenotypic features among *Campylobacter* sp. strains of animal origin[J]. Veterinary Microbiology, 2018, 216: 25-30
- [11] Backert S, Hofreuter D. Molecular methods to investigate adhesion, transmigration, invasion and intracellular survival of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 95(1): 8-23
- [12] Byrne CM, Clyne M, Bourke B. *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells *in vitro*[J]. Microbiology: Reading, England, 2007, 153(Pt 2): 561-569
- [13] Wysok B, Wojtacka J. Detection of virulence genes determining the ability to adhere and invade in *Campylobacter* spp. from cattle and swine in Poland[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 115: 257-263
- [14] Zheng J, Meng JH, Zhao SH, Singh R, Song WX. Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(4): 768-774
- [15] Wysok B, Wojtacka J, Kivistö R. Pathogenicity of *Campylobacter* strains of poultry and human origin from Poland[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 334: 108830
- [16] De Melo RT, Dumont CF, Braz RF, Monteiro GP, Takeuchi MG, Lourenzatto ECA, Dos Santos JP, Rossi DA. Genotypical relationship between human and poultry strains of *Campylobacter jejuni*[J]. Current Microbiology, 2021, 78(8): 2980-2988
- [17] Colles FM, Ali JS, Sheppard SK, Mccarthy ND, Maiden MCJ. *Campylobacter* populations in wild and domesticated Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*)[J]. Environmental Microbiology Reports, 2011, 3(5): 574-580
- [18] Atterby C, Mourkas E, Méric G, Pascoe B, Wang H, Waldenström J, Sheppard SK, Olsen B, Järhult JD, Ellström P. The potential of isolation source to predict colonization in avian hosts: a case study in *Campylobacter jejuni* strains from three bird species[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 591