



研究报告

江苏部分地区猪源结肠弯曲菌耐药性分析及多位点序列分型

周倩 张小燕 张静 唐修君 陆俊贤 唐梦君* 高玉时*

江苏省家禽科学研究所 江苏 扬州 225125

摘要:【背景】弯曲菌(*Campylobacter*)是重要的人畜共患肠道病原菌,可通过食物链传播,引起人类腹泻性肠炎。【目的】了解猪源弯曲菌耐药特征和分子遗传特征,对江苏省10个规模化猪场进行弯曲菌分离和耐药性检测,并研究分离株的分子分型。【方法】采用琼脂平板稀释法进行最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定,PCR方法扩增耐药基因,以弯曲菌7个管家基因(*aspA*、*glnA*、*gltA*、*glyA*、*pgm*、*tkt*和*uncA*)为目的基因进行多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)研究。【结果】100份样品共分离出结肠弯曲菌22株,分离率为22%,弯曲菌检出情况与养殖规模和日龄无关($P>0.05$)。耐药性试验结果显示,20株分离株为多重耐药菌株(81.82%, 20/22),猪源结肠弯曲菌分离株对10种抗生素耐药程度不一,分别为:庆大霉素36.36%,链霉素50%,克林霉素27.27%,氟喹诺酮类13.64%,四环素40.91%,环丙沙星18.18%,茶啉酸63.63%,泰利霉素59.09%,红霉素100%,阿奇霉素81.82%;共检出了4种耐药基因[*cfr*、*adE-Sat4-aphA*、*ermB*和 $Tet(O)$],检出率分别为4.5%、59.1%、9.1%和100%;多位点序列分型结果显示共获得11个ST型,主要流行CC-828克隆系(100%);进化树结果显示,所有分离株聚集归为2个大群,分别为2个分支和9个分支。 χ^2 检验和Logistic回归模型表明共有3个序列型(sequence type, ST)与其相对应的抗菌药物有相关性。【结论】猪源结肠弯曲菌对大环内酯类抗生素具有较高的耐药性, $Tet(O)$ 基因检出率最高,分离株的序列型呈多样性。

关键词: 结肠弯曲菌, 耐药性, 耐药基因, 多位点序列分型, 相关性分析

Drug resistant and multilocus sequence typing of *Campylobacter coli* from pig source in Jiangsu province

ZHOU Qian ZHANG Xiao-Yan ZHANG Jing TANG Xiu-Jun LU Jun-Xian

TANG Meng-Jun* GAO Yu-Shi*

Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou, Jiangsu 225125, China

Abstract: [Background] *Campylobacter* is one of the most common zoonotic pathogens and is a leading cause of human gastroenteritis through food chain. [Objective] To study the phenotypic resistance and

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31700005); Jiangsu Modern Agriculture (Broiler) Industrial Technology System (JATS[2020]359); Independent Research Funding of Public Welfare Research Institutes in Jiangsu Province (BM2018026)

*Corresponding authors: E-mail: TANG Meng-Jun: tangmengjun1980@163.com; GAO Yu-Shi: gaoyu100@sina.com

Received: 20-12-2019; Accepted: 06-05-2020; Published online: 04-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31700005); 江苏现代农业(肉鸡)产业技术体系(JATS[2020]359); 江苏省属公益类科研院所自主科研经费(BM2018026)

*通信作者: E-mail: 唐梦君: tangmengjun1980@163.com; 高玉时: gaoyu100@sina.com

收稿日期: 2019-12-20; 接受日期: 2020-05-06; 网络首发日期: 2020-06-04

molecular type of *Campylobacter* isolated from pig source in ten intensive pig farms of Jiangsu province. **[Methods]** The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by agar dilution method and the resistance genes were detected by polymerase chain reaction (PCR). Seven *Campylobacter* housekeeping genes including *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkl* and *uncA* were amplified and sequenced, then the sequences of genes were analysed through multilocus sequence typing (MLST). **[Results]** A total of 22 isolates were identified from 100 samples (22%), the detection of *Campylobacter* was independent of breeding scale and age ($P>0.05$). 81.82% of the isolates were resistant to three or more than three drugs, resistance rates to ten drugs were under different degrees, gentamicin (36.36%), streptomycin (50%), clindamycin (27.27%), chloramphenicol (13.64%), tetracycline (40.91%), ciprofloxacin (18.18%), nalidixic acid (63.63%), telithromycin (59.09%), erythromycin (100%), azithromycin (81.82%). The resistance-genes detection rates to *cfr*, *adE-Sat4-aphA*, *ermB* and *Tet(O)* were 4.5%, 59.1%, 9.1% and 100%, MLST results showed that 11 sequence types were found and CC-828 was the prevalent clonal complex (100%), Evolutionary tree results showed that all strains were belonged to two groups, which had two branches and nine branches, respectively. χ^2 test and Logistic regression analysis showed that three sequence types (STs) were associated with their corresponding antimicrobial agents. **[Conclusion]** The high resistance to macrolides antibiotics and the high detection of *Tet(O)* were found in *Campylobacter coli* from swine feces, and *C. coli* population showed diverse genetic nature.

Keywords: *Campylobacter coli*, Drug resistance, Resistance gene, Multilocus sequence typing (MLST), Dependency analysis

弯曲菌(*Campylobacter*)是重要的人畜共患肠道病原菌,革兰氏阴性,1963年由 Veron 等发现,其中空肠弯曲菌(*C. jejuni*)和结肠弯曲菌(*C. coli*)最为常见,感染后可引起人类细菌性肠胃炎或畜类(如猪、牛)流产^[1]。弯曲菌定植于畜禽等温血动物肠道内,可因屠宰加工过程中肠道破裂而污染设施环境和水,从而污染畜禽产品^[2]。虽然弯曲菌感染引起的肠炎是自限性的,但对于症状严重的患者,抗生素的治疗是必须且有效的^[3]。长期以来,兽用抗菌药物市场秩序不够规范、畜禽养殖过程中的不科学用药、公众对细菌耐药性认知程度低、国家动物源性细菌耐药性防控体系薄弱等众多因素导致细菌耐药形势日趋严重,对人类健康和公共卫生产生威胁。多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是一种高分辨率的分子分型技术,以管家基因的序列多态性为基础,管家基因不同序列号的组合决定菌株相应的序列型(sequence type, ST)^[4-6]。与脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)和鞭毛蛋白基因 A-限制性片段长度多态性(flagellinA-

restriction fragment length polymorphism, *flaA*-RFLP)分型方法相比,MLST 分子分型具有分辨率高、重复性好和共享性优等优势,因此被广泛应用于流行病学研究。

为加强兽用抗菌药物管理,遏制动物源细菌耐药,保障养殖业生产安全和食品安全,我国农业农村部在 2017 年制定了《全国遏制动物源细菌耐药性行动计划(2017-2020)》。本研究通过对江苏省 10 个猪养殖场分离鉴定的 22 株弯曲菌分离株开展耐药性检测与 MLST 分型,以期能及时掌握本地区弯曲菌耐药情况和临床兽医正确用药提供依据。

1 材料

1.1 样品采集及处理

样品采集地点为江苏省 10 个不同规模化猪场,猪场销售模式为“公司+农户”模式,卫生情况基本一致,每个猪场采集健康猪粪样品 10 份,共 100 份,采样时间为 2018 年 5 月。猪场具体情况如表 1 所示。采集的样品置于冰盒,24 h 内运送

至实验室, 0.1 g 粪便样品加入到 1.5 mL 磷酸盐缓冲溶液(PBS)稀释涂于含 6 种抗生素的选择性 CCDA 培养基。分离株统一编号为: 2018+来源+养殖场编号+该场菌株序号。药敏质控株空肠弯曲菌 ATCC 33560 为本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

含 6 种抗生素(头孢哌酮、多粘菌素 B、两性霉素 B、利福平、三甲氧苄氨嘧啶和放线菌酮)的选择性 CCDA 培养基、哥伦比亚培养基和 BHI 培养基, Oxoid 公司; SpeedSTAR™ HS DNA Polymerase 和 DL2000 DNA Marker, 宝生物工程

(大连)有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生物科技(北京)有限公司。生化培养箱, 太仓市华美生化仪器厂; PCR 仪, Eppendorf 公司; 电泳仪, 北京市六一生物科技有限公司; 凝胶成像系统, Gbox 基因有限公司。

1.3 MLST 管家基因引物

采用 Dingle 等^[7]的方法, 选取 7 个管家基因(*aspA*、*glnA*、*gltA*、*glyA*、*pgm*、*tkl* 和 *uncA*), 引物序列参照 MLST 数据库(<http://pubmlst.org/campylobacter>), 如表 2 所示。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 猪养殖场信息

Table 1 The information of pig farms

| 养殖场编号 | 日龄 | 养殖量 | 用药记录 |
|-------------|-----|--------------|---|
| No. of farm | Age | Breed amount | Medication administration record |
| 14 | 145 | 400 | 多西环素、卡帕西林 Doxycycline, Capacillin |
| 15 | 110 | 460 | 安痛定、阿莫西林、乙酰甲喹、链霉素、氟苯尼考、柴胡、黄芪多糖、庆大霉素、甲氧苄氨嘧啶 Antondine, Amoxicillin, Mequindox, Streptomycin, Florfenicol, Radix bupleuri, Astragalus polysacharin, Gentamicin, Trimethoprim |
| 16 | 83 | 1 100 | 安痛定、阿莫西林、乙酰甲喹、链霉素、氟苯尼考、柴胡、黄芪多糖、庆大霉素、甲氧苄氨嘧啶 Antondine, Amoxicillin, Mequindox, Streptomycin, Florfenicol, Radix bupleuri, Astragalus polysacharin, Gentamicin, Trimethoprim |
| 17 | 140 | 1 100 | 安痛定、氟苯尼考、庆大霉素、甲氧苄氨嘧啶、链霉素 Antondine, Florfenicol, Gentamicin, Trimethoprim, Streptomycin |
| 18 | 125 | 850 | 安痛定、阿莫西林、乙酰甲喹、链霉素、卡那霉素、青霉素、地塞米松、庆大霉素、甲氧苄氨嘧啶 Antondine, Amoxicillin, Mequindox, Streptomycin, Kanamycin, Penicillin, Dexamethasone, Gentamicin, Trimethoprim |
| 19 | 138 | 430 | 复方布他磷注射液、VD ₂ 、柴胡、青霉素 Compound buta phosphorus injection, VD ₂ , Radix bupleuri, Penicillin |
| 20 | 95 | 550 | 安痛定、乙酰甲喹、复方氨基比林、甲氧苄氨嘧啶、阿莫西林、林可霉素、地塞米松、柴胡、庆大霉素 Antondine, Mequindox, Compound aminopyrine, Trimethoprim, Amoxicillin, Lincomycin, Dexamethasone, Radix bupleuri, Gentamicin |
| 22 | 70 | 308 | 链霉素、阿莫西林、青霉素、柴胡、庆大霉素、林可霉素、地塞米松 Streptomycin, Amoxicillin, Penicillin, Radix bupleuri, Gentamicin, Lincomycin, Dexamethasone |
| 23 | 95 | 800 | 地塞米松、青霉素、安痛定、乙酰甲喹、柴胡、鱼腥草、黄芪多糖 Dexamethasone, Penicillin, Antondine, Mequindox, Radix bupleuri, Houttuynia cordata, Astragalus polysacharin |
| 24 | 100 | 1 300 | 安痛定、阿莫西林、磺胺间甲氧嘧啶钠、链霉素、头孢噻吩 Antondine, Amoxicillin, Sulfamethoxiazine sodium, Streptomycin, Cefoxifuri |

注: 用药记录仅为该养殖场兽药室保存的兽药, 不一定与所采样品直接相关。

Note: The medication administration record is only referred from the veterinary kept in veterinary medicine room but may not be directly related to the sample taken.

表 2 结肠弯曲菌 MLST 和耐药基因扩增引物及产物片段大小

Table 2 Amplification primers of *C. coli* for MLST and resistant gene and gene length

| 基因名称 Gene name | 引物序列 Primers sequence (5'→3') | 大小 Size (bp) | 退火温度 Annealing temperature (°C) | 参考文献 References |
|----------------------|--|-----------------|------------------------------------|--------------------|
| <i>aspA</i> | F: CAACTTCAAGATGCAGTACC R: ATCTGCTAAAAGTATGCATTGC | 899 | 53 | MLST 数据库 |
| <i>glnA</i> | F: TTCATGGATGGCAACCTATTG R: GCTTTGGCATAAAAAGTTGCAG | 1 262 | | MLST Database |
| <i>gltA</i> | F: GATGTAGTGCATCTTTACTC R: AAGCGCTCCAATACCTGCTG | 1 012 | | |
| <i>glyA</i> | F: TCAAGGCGTTTATGCTGCAC R: CCATCACTTACAAGCTTATAC | 816 | | |
| <i>pgm</i> | F: TTATAAGGTAGCTCCGACTG R: GTTCCGAATAGCGAAAATAACAC | 1 150 | | |
| <i>tkt</i> | F: AGGCTTGTGTTTTAGGCGG R: TGACTTCCTCAAGCTCTCC | 1 102 | | |
| <i>uncA</i> | F: AAGCACAGTGGCTCAAGTTG R: CTACTTGCTCATCCAATCAC | 1 120 | | |
| <i>cfp</i> | F: GGTGAAACTGTTGTGGAGAT R: AGTTTCCGTAAGTGTGTTTT | 722 | 55 | [8] |
| <i>adE-Sat4-aphA</i> | F: GGAGAAACTTTTGTCCACCTACC R: AATGTCATACCACTTGTCCGC | 1 538 | 55 | [9] |
| <i>ermB</i> | F: TGAAAAAGTACTCAACCAAAT R: TCCTCCGTTAAATAATAGAT | 692 | 55 | [10] |
| <i>Tet(A)</i> | F: GTGAAACCCAACATACCCC R: GAAGGCAAGCAGGATGTAG | 888 | 56 | [11] |
| <i>Tet(B)</i> | F: CCTTATCATGCCAGTCTTGC R: ACTGCCGTTTTTTCGCC | 774 | 56 | |
| <i>Tet(O)</i> | F: AACTTAGGCATTCTGGCTCAC R: TCCCACTGTTCCATATCGTCA | 515 | 55 | [12] |

注：引物既是扩增引物也是测序引物。

Note: Amplification primers are also the sequencing primers.

2 方法

2.1 细菌分离纯化及鉴定

取 100 μ L PBS 稀释的粪便样品到含有 6 种抗生素的选择性 CCDA 培养基上，无菌 L 棒涂匀后倒置于厌氧罐，充入混合气，42 $^{\circ}$ C 微需氧培养 36 h 后挑取疑似菌落(扁平、有金属光泽、像水滴样菌落)接种于哥伦比亚血平板，于 42 $^{\circ}$ C 微需氧培养 36 h，重复 2 次，直至得到单一纯培养菌落。

水煮法粗提 DNA，细菌沉淀加入 200 μ L 无菌去离子水，混匀后 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min，12 000 r/min 离心 3 min，取上清作为 DNA 模板备用。采用三重 PCR 方法^[13]鉴定弯曲菌，PCR 扩增的 16S rRNA 基因、*mapA*、*ceuE* 片段大小分别为 857、589 和 462 bp。引物序列分别为：

16S rRNA 基因：F：5'-ATCTAATGGCTTAA
CCATTAAAC-3'；R：5'-GGACGGTAACTAGTT
TAGTATT-3'。

mapA：F：5'-CTATTTTATTTTTGAGTGCTT
GTG-3'；R：5'-GCTTTATTTGCCATTTGTTTTA
TTA-3'。

ceuE：F：5'-AATTGAAAAATTGCTCCA
ACTATG-3'；R：5'-TGATTTTATTATTTGTAGCAG
CG-3'。

PCR 反应体系(25 μ L)：SpeedSTARTM HS
DNA Polymerase 12.5 μ L，上、下游引物
(10 μ mol/L)各 1 μ L，模板 DNA 1 μ L，ddH₂O 补
齐。PCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C 1 min；95 $^{\circ}$ C 30 s，
55 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 1 min，共 35 个循环；72 $^{\circ}$ C
10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后成像。

经 PCR 鉴定后的菌株收集于含有 20%甘油的 BHI 培养基中, 标记记录, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

2.2 药敏试验

将冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的结肠弯曲菌用接种环挑取部分菌液涂抹于选择性 CCDA 培养基, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 微需氧培养 36 h 后接种于 5%哥伦比亚血平板, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 微需氧培养 36 h 后进行药敏试验。根据养殖场用药情况和对公共卫生的影响, 研究猪源弯曲菌对 6 类 10 种抗生素的耐药性, 包括氨基糖苷类(庆大霉素和链霉素)、林可酰胺类(克林霉素)、酰胺醇类(氯霉素)、四环素类(四环素)、喹诺酮类(环丙沙星和萘啶酸)和大环内酯类(泰利霉素、红霉素和阿奇霉素)。药敏试验使用商品化弯曲菌耐药性药敏检测板, 最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值为 24 h 后在平板上完全抑制细菌生长的最低药物浓度, 根据临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2018)和国家耐抗菌素监测系统(National Antimicrobial Resistance Monitoring System, NARMS)进行耐药判定。

2.3 耐药基因的检测

采用 PCR 方法检测多重耐药基因 *cfr*、氨基糖苷类耐药基因簇 *adE-Sat4-aphA*、红霉素耐药基因 *ermB* 及四环素耐药基因 *Tet(A)*、*Tet(B)* 和 *Tet(O)*。扩增引物见表 2。

2.4 多位点序列分型(MLST)

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。采用 PCR 分别扩增 7 个管家基因, PCR 反应体系(25 μL): SpeedSTARTM HS DNA Polymerase 12.5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , ddH₂O 补齐。PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 共 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳验证, 片段大小与预期一致且条带单一明亮的样品

送至生工生物工程(上海)有限公司测序。扩增引物见表 2。

2.5 MLST 测序数据分析

将双向测序结果用 BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) 和 SeqMan (DNASTar Inc., Madison, WI, USA)整理后与标准序列比对剪切, 结果上传提交至弯曲菌 MLST 数据库 (<http://pubmlst.org/campylobacter>), 获得各菌株所对应的各等位基因值, 从而确定其序列型和克隆群(clonal complex, CC)。将各菌株的等位基因序列按照顺序(*aspA-glnA-gltA-glyA-pgm-tkt-uncA*)进行连接, 采用 MEGA 6.0 软件中 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树, 分析各菌株间相互关系。

2.6 统计学分析

采用 SAS 9.2 统计软件处理, 组间比较采用 χ^2 检验。采用 Logistic 回归模型分析抗菌药物耐药性与耐药基因的相关性, 以及抗菌药物耐药性与 ST 分型之间的相关性, 选择 χ^2 检验结果 $P < 0.05$ 的变量, 以抗菌药物耐药情况为因变量, 耐药基因(ST 分型)检出情况为自变量纳入二元 Logistic 回归模型。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 弯曲菌分离鉴定结果

PCR 鉴定结果如图 1 所示, 22 株分离株均为结肠弯曲菌, 未检出空肠弯曲菌, 总检出率为 22% (22/100)。养殖量 300–500 头猪场 4 个, 检出率为 22.5% (9/40); 500–1 000 头猪场 3 个, 检出率为 23.3% (7/30); 1 000 头以上 3 个, 检出率为 20% (6/30)。所有猪源样品来源于生长阶段新鲜猪粪便, 其中日龄 70–100 d (包括 100 d)猪场 5 个, 检出率 18% (9/50); 日龄 100–150 d 猪场 5 个, 检出率 26% (13/50)。应用 χ^2 检验对以上不同养殖规模和不同日龄弯曲菌检出情况进行统计学分析, 均无统计学差异($P_{\text{不同养殖规模}}=0.948$, $P_{\text{不同日龄}}=0.334$, $P > 0.05$)。

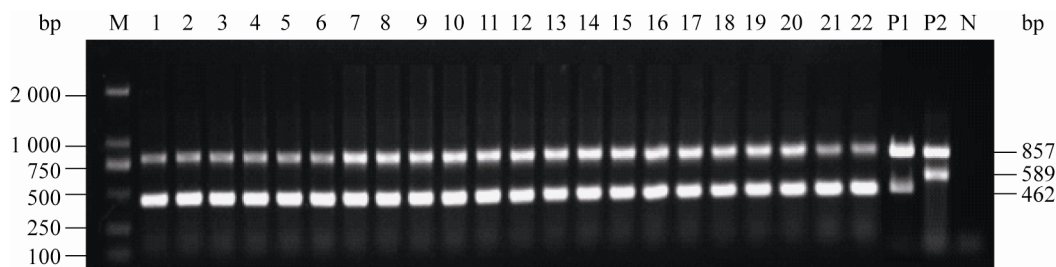


图1 PCR 鉴定结果

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification

注: M: DL2000 DNA Marker; 1-22: 22 株弯曲菌分离株(按照编号顺序排列); P1 和 P2: 结肠弯曲菌和空肠弯曲菌阳性模板, N: 阴性模板; 857 bp 为弯曲菌属特异性条带, 462 bp 和 589 bp 分别为结肠弯曲菌和空肠弯曲菌种特异性条带。

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1-22: 22 *Campylobacter* isolates (in number order); P1 and P2: Positive templates of *C. coli* and *C. jejuni*, N: Negative; 857 bp was a *Campylobacter* genus specific band, 462 bp and 589 bp were specific bands of *C. coli* and *C. jejuni*, respectively.

3.2 22 株结肠弯曲菌药物敏感性试验和耐药基因检测结果

由图2和表3可知, 弯曲菌分离株对大环内酯类的红霉素、阿奇霉素和泰利霉素产生了很强的耐药性, 耐药率分别为 100%、81.82% 和 59.09%; 对喹诺酮类的两种抗生素耐药性差异较大, 萘啶酸为 63.64%, 而环丙沙星为 18.18%; 对氯霉素较敏感, 耐药率为 13.64%。猪源结肠弯曲菌耐药情况较严重, 多重耐药(耐 3 类及以上抗生素)率达 81.82% (20/22), 但未发现完全耐药或完全敏感菌株。22 株弯曲菌分离株耐药谱型相对比较多样, 且来源于同一养殖场分离株的耐药谱也不尽相同。

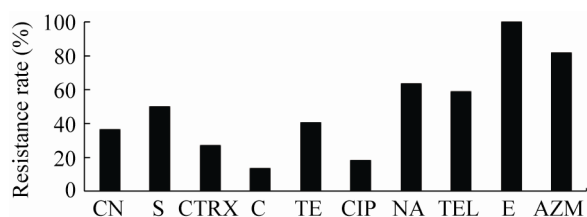


图2 猪源结肠弯曲菌分离株对 10 种抗生素的耐药率

Figure 2 The resistance rates of *Campylobacter coli* to 10 kinds of antibiotics

注: CN: 庆大霉素; S: 链霉素; CTRX: 克林霉素; C: 氯霉素; TE: 四环素; CIP: 环丙沙星; NA: 萘啶酸; TEL: 泰利霉素; E: 红霉素; AZM: 阿奇霉素。

Note: CN: Gentamicin; S: Streptomycin; CTRX: Clindamycin; C: Chloramphenicol; TE: Tetracycline; CIP: Ciprofloxacin; NA: Nalidixic acid; TEL: Telithromycin; E: Erythromycin; AZM: Azithromycin.

22 株结肠弯曲菌中检出多重耐药基因 *cfr*, 检出率为 4.5% (1/22); 氨基糖苷类耐药基因簇 *adE-Sat4-aphA* 检出率为 59.1% (13/22); 红霉素耐药基因 *ermB* 检出率为 9.1% (2/22); 四环素耐药基

表3 22 株猪源结肠弯曲菌耐药谱统计

Table 3 Statistics of drug resistance spectrum in 22 *C. coli* isolates

| 菌株编号 No. of strains | 耐药种数 Number of drugs | 耐药谱 Antibiotic resistance spectrum |
|------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| 2018Pig14-1 | 8 | S-CTRX-C-CIP-NA-TEL-E-AZM |
| 2018Pig15-2 | 8 | S-CTRX-C-TE-NA-TEL-E-AZM |
| 2018Pig17-3 | 8 | S-CTRX-TE-CIP-NA-TEL-E-AZM |
| 2018Pig19-1 | 8 | CN-S-TE-CIP-NA-TEL-E-AZM |
| 2018Pig23-1 | 8 | CN-S-CTRX-TE-NA-TEL-E-AZM |
| 2018Pig15-1, | 7 | CN-S-TE-NA-TEL-E-AZM |
| 2018Pig22-1 | | |
| 2018Pig16-2 | 7 | CN-S-C-NA-TEL-E-AZM |
| 2018Pig14-2, | 6 | S-TE-NA-TEL-E-AZM |
| 2018Pig24-1 | | |
| 2018Pig17-1 | 6 | CN-S-NA-TEL-E-AZM |
| 2018Pig17-2 | 5 | TE-NA-TEL-E-AZM |
| 2018Pig20-3 | 4 | CTRX-CIP-E-AZM |
| 2018Pig15-3, | 3 | NA-E-AZM |
| 2018Pig18-2 | | |
| 2018Pig16-1 | 3 | TEL-E-AZM |
| 2018Pig19-2 | 2 | CTRX-E |
| 2018Pig20-1 | 1 | AZM |
| 2018Pig18-1, | 1 | E |
| 2018Pig18-3, | | |
| 2018Pig20-2, | | |
| 2018Pig22-2 | | |

注: 抗生素简写与图 2 相同。

Note: The antibiotic abbreviation is the same as in Figure 2.

因 *Tet(O)* 检出率为 100% (22/22); 未检出 *Tet(A)* 和 *Tet(B)*。

3.3 多位点序列分型(MLST)结果

以分离株结肠弯曲菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果见图 3, 与预期结果大小一致。

22 株猪源结肠弯曲菌共检出 11 种 ST 型, 均为 ST-828 克隆群(表 4)。其中 ST-1058 为主要流行株, 占 22.7% (5/22)。仅 *tkf* 的等位基因值表现出多样性, 有 43 (27%)、47 (18%)、35 (27%)、85 (5%)、44 (18%) 和 332 (5%), 其他各管家基因等位基因值变化较小。经 MEGA 6.0 分析显示(图 4), 22 株结肠弯曲菌分别位于两大分支上: 第一个分支共 2 株

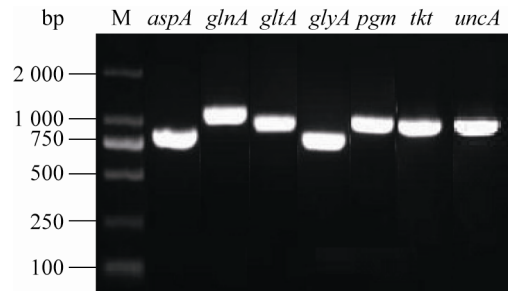


图 3 结肠弯曲菌的 MLST 管家基因扩增结果

Figure 3 MLST amplification results of *Campylobacter coli*

Note: M: DL2000 DNA Marker.

菌, 第二分支共 20 株菌。从耐药菌株所对应养殖场及 ST 聚类结果表明耐药性与养殖情况并无明显的关联性。

表 4 22 株猪源结肠弯曲菌的 MLST 数据分析

Table 4 Analysis of 22 *C. coli* isolates among CCs and STs

| 菌株数 No. of strains | 等位基因 Alleles | | | | | | | ST | ST clonal complex |
|-----------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|-------------------|
| | <i>aspA</i> | <i>glnA</i> | <i>gltA</i> | <i>glyA</i> | <i>pgm</i> | <i>tkf</i> | <i>uncA</i> | | |
| 2 | 33 | 39 | 30 | 82 | 104 | 43 | 17 | 828 | ST-828 complex |
| 3 | 33 | 38 | 30 | 82 | 104 | 43 | 17 | 854 | ST-828 complex |
| 3 | 33 | 39 | 30 | 82 | 104 | 47 | 17 | 1055 | ST-828 complex |
| 5 | 33 | 39 | 30 | 82 | 104 | 35 | 17 | 1058 | ST-828 complex |
| 1 | 33 | 39 | 30 | 82 | 104 | 85 | 68 | 1104 | ST-828 complex |
| 1 | 33 | 39 | 30 | 82 | 104 | 44 | 17 | 1145 | ST-828 complex |
| 1 | 33 | 39 | 30 | 82 | 118 | 35 | 17 | 1153 | ST-828 complex |
| 3 | 33 | 38 | 30 | 82 | 104 | 44 | 17 | 1579 | ST-828 complex |
| 1 | 32 | 39 | 30 | 82 | 104 | 43 | 17 | 1593 | ST-828 complex |
| 1 | 33 | 39 | 30 | 82 | 104 | 47 | 68 | 1747 | ST-828 complex |
| 1 | 33 | 38 | 30 | 82 | 104 | 332 | 17 | 3336 | ST-828 complex |

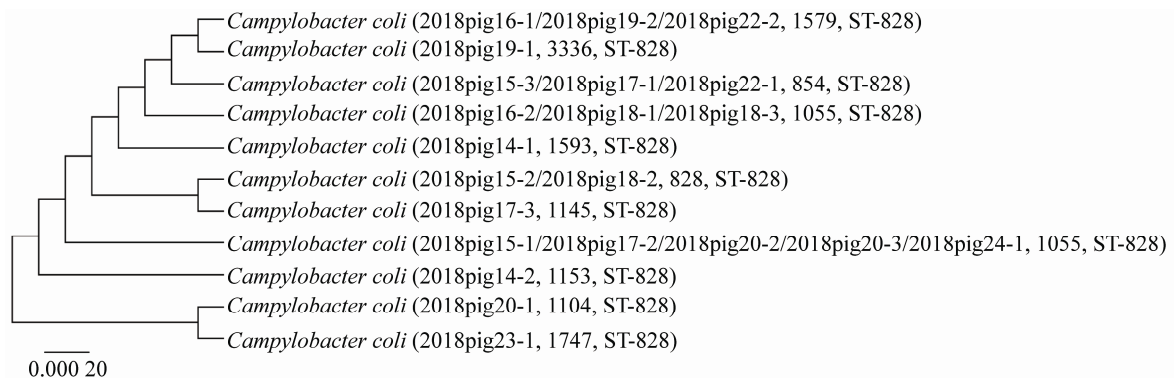


图 4 22 株猪源结肠弯曲菌的 11 个 ST 序列型的基因发育树

Figure 4 Phylogenetic trees of 11 STs identified among 22 *Campylobacter coli* isolates

注: 括号内数字分别为菌株名称, 菌株 ST 型及其所属克隆群; 标尺长度表示 0.02% 的核苷酸序列差异。

Note: The data in brackets show the name of isolates, sequence types and clonal complex, respectively; The ruler length represents a 0.02% nucleotide sequence difference.

3.4 耐药性与耐药基因及 ST 分型相关性分析

以菌株每种药物耐药情况为分组依据,对每个耐药基因进行 χ^2 检验(结果未列出),结果有统计学意义的变量($P < 0.05$)以抗菌药物耐药情况为因变量,耐药基因检出情况为自变量纳入二元 Logistic 回归模型。结果显示均无统计学意义。

同理, χ^2 检验比较不同耐药情况下 ST 型检出率与耐药率是否有差异, Logistic 回归模型分析 ST 分型与抗菌药物耐药率相关性。结果显示有 5 种抗菌药物(链霉素、克林霉素、氯霉素、萘啶酸和阿奇霉素)与其对应的 ST 型(ST-1579, ST-1153 和 ST-1593)有统计学意义($P < 0.01$) (表 5)。检出 ST-1579 的弯曲菌链霉素耐药性升高,萘啶酸和阿奇霉素耐药性降低;检出 ST-1153 的弯曲菌对克林霉素中度敏感;检出 ST-1593 的弯曲菌氯霉素耐药性升高。

4 讨论与结论

弯曲菌作为一种重要的人畜共患病原菌,不仅能引起人类和动物细菌性腹泻,严重可引起格林-巴利综合症,临床上以四肢对称性弛缓性瘫痪为主要表现^[14]。畜禽类等温血动物的肠黏膜均可携带弯曲菌并成为人类急性腹泻的主要污染源^[1]。禽类弯曲菌报道较多,猪源弯曲菌污染情况报道较少。

本研究中,10 个养殖场采集的 100 份样品中分离到 22 株结肠弯曲菌,分离率为 22%,与吴玲玲等^[1]和秦祥等^[15]结果相一致,说明猪源弯曲菌主要流行菌种为 *C. coli*,弯曲菌检出情况与养殖规模和日龄无关($P > 0.05$)。国内外已有大量的研究论文报道弯曲菌的多重耐药现象^[8-11,16-17]。本研究对猪源 *C. coli* 耐药现状进行 10 种常规抗生素的监测,分离菌株对氯霉素药物耐药率最低(13.64%),表明自 2002 年以来在畜禽动物养殖禁用氯霉素有效降低了弯曲菌对氯霉素的耐药性。然而秦祥等^[15]在 2018 年报道北京郊区猪源结肠弯曲菌分离株对多种药物具有显著耐药性,其中氯霉素耐药率为 100%。许建紫^[18]研究报道了猪源结肠弯曲菌对多种药物的耐药情况,氯霉素(0%)、庆大霉素(17.5%)、萘啶酸(92.1%)、链霉素(90.5%)、环丙沙星(90.3%)。研究结果差异较大可能是由于不同地域药物使用习惯不同。本研究猪源结肠弯曲菌与唐梦君等^[19]研究中鸡源结肠弯曲菌相比,庆大霉素、四环素、环丙沙星耐药率较低,分析原因可能是畜禽养殖中不同动物用药习惯不一。依本研究结果,有必要在畜禽生产过程对大环内酯类和喹诺酮类药物的使用进行规范指导,避免抗生素的滥用引起细菌耐药性。

表 5 抗菌药物与相关因子多因素分析表

Table 5 The logistic regression analysis of antimicrobial drugs and related factors

| 抗菌药物 Drugs | 相关因子 ^a Related factors ^a | P_{χ^2} | 耐药情况 ^b Drug resistance situation ^b | | | β_1 | β_2 | C | P |
|---------------|---|--------------|---|---------|---------|-----------|-----------|---------------|-------|
| | | | R | I | S | | | | |
| | | | S | ST-1579 | 0.000 4 | | | | |
| CTRX | ST-1153 | 0.005 3 | 0/6 | 1/1 | 0/14 | 0.044 88 | 0.045 38 | 0.000 75 | <0.01 |
| C | ST-1593 | 0.010 0 | 1/3 | 0/0 | 0/19 | 0.045 05 | 0.045 47 | 4.163 34e-17 | <0.01 |
| NA | ST-1579 | 0.013 7 | 0/14 | 0/0 | 3/8 | 0.045 62 | 0.045 43 | -1.040 8e-16 | <0.01 |
| AZM | ST-1579 | 0.015 6 | 1/18 | 0/1 | 2/3 | 0.045 50 | 0.045 47 | -0.000 468 75 | <0.01 |

注: ^a: 仅列出与对应抗菌药物多因素分析有统计学意义的耐药基因和 ST 分型; ^b: 耐药情况下方数据为: 计数资料/样本数量; 抗生素简写与图 2 相同; R: 耐药, I: 中敏, S: 高敏。

Note: ^a: Only the genes and ST with statistical significance for the χ^2 test of antimicrobial are listed below; ^b: The enumeration data/the sample data was listed below the drug resistance situation; The antibiotic abbreviation is the same as in Figure 2; R: Resistant, I: Intermediate, S: Susceptible.

本研究中共检出了 4 种耐药基因 [*cfi*、*adE-Sat4-aphA*、*ermB* 和 *Tet(O)*]。据文献报道, 携带 *cfi* 基因的菌株可对氯霉素类、林可酰胺类、截短侧耳素、链阳菌素 A 和恶唑烷酮 5 大类常用抗菌药物耐药, 使细菌产生多重耐药^[17]。本研究中携带有 *cfi* 基因的分离株其耐药率为 30% (3/10), 耐药谱为 NA-E-AZM; *adE-Sat4-aphA* 检出率较高, 为 59.1%。*adE-Sat4-aphA* 基因簇能介导链霉素、卡那霉素和新霉素等耐药, 是耐药菌株在多重氨基糖苷类抗生素压力下的选择结果^[20]。本研究中, 两株 *ermB* 阳性菌株 (2018Pig23-1 和 2018Pig24-1) 为多重耐药菌株。*ermB* 名为耐红霉素甲基化酶基因, 该基因常与其他抗生素的耐药基因、转座子等元件关联, 这些元件通常整合在 *ermB* 基因的上下游区域, 如 *cfi*、*tet(M)*、*tet(Q)* 和 *aadE* 等, 携带有 *ermB* 基因的耐药基因岛可通过自然转化方式进行传播^[10]。因此, 选择检测 *ermB* 基因对多重耐药弯曲菌监测具有重要意义。*Tet(O)* 基因编码的核糖体保护蛋白是弯曲菌对四环素耐药的主要机制之一^[21]。本研究中四环素耐药率为 40.91%, *Tet(O)* 基因检出率 100%, 而 *Tet(A)* 和 *Tet(B)* 均未检出, 耐药性与耐药基因相关性分析表明无统计学意义 ($P>0.05$), 推断携带耐药基因 *Tet(O)* 不能够直接导致菌株对四环素耐药, 可能存在其他耐药机制。

目前, 在 MLST 数据库中弯曲菌可以分成 10 119 种 ST 型, 共收录了 97 733 株菌株的相关信息。MLST 数据库可以不断积累更新, 越来越丰富的数据使得 MLST 在微生物分型上凸显优势。本研究中, 猪源结肠弯曲菌分离株 ST 型呈多态性分布, 但都隶属于 ST-828 克隆系, 这与国内外的许多研究报道^[22-24] 的结果一致, 通过聚类分析推断江苏地区结肠弯曲菌分离菌株遗传关系上存在同源性, 与日龄和养殖量并无联系。本研究中, 相关性分析表明共有 3 种 ST 型与其相对应的 5 种抗菌药物耐药有相关性, 对耐药性升高和降低作用

不同。事实上, 研究人员在致力于研究耐药菌株与 ST 和 ST 克隆系、ST 型与致病性的相关性时发现, 耐药性与 ST 和 ST 克隆系相关性差^[22], ST 型与毒力特征之间不存在某种确定的关系^[25]。但 *C. coli* 主要流行 ST-828 克隆系与人源和食源性弯曲菌克隆系相一致^[22,26], 说明猪肠道中的弯曲菌可以通过污染水源或畜禽产品等方式增加人感染弯曲菌的风险。

本研究分析了江苏省 10 个规模化猪场弯曲菌的耐药表型和耐药基因携带情况及 MLST 分型, 结果显示, 猪源结肠弯曲菌分离率较高, 分离株多重耐药现象普遍, 应当加强畜禽弯曲菌流行病学调查。

REFERENCES

- [1] Wu LL, Yan JZ, Li YF, et al. Identification and phylogenetic analysis of *Campylobacter* of a pig farm in Henan Pprovince[J]. Jiangsu Journal of Preventive Medicine, 2018, 29(1): 30-33 (in Chinese)
吴玲玲, 闫江舟, 李艳芳, 等. 河南省某养殖场猪源弯曲杆菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 江苏预防医学, 2018, 29(1): 30-33
- [2] Gripp E, Hlahla D, Didelot X, et al. Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle[J]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 584
- [3] Hong J, Ma K, Gu L. Virulence genes analysis and MLST typing of *Campylobacter jejuni* in Jiangsu[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2017, 27(7): 1006-1010 (in Chinese)
洪捷, 马恺, 顾玲. 江苏地区空肠弯曲菌多位点序列分型和毒力基因分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(7): 1006-1010
- [4] Behringer M, Miller WG, Oyarzabal OA. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA*-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84(2): 194-201
- [5] Boes J, Nersting L, Nielsen EM, et al. Prevalence and diversity of *Campylobacter jejuni* in pig herds on farms with and without cattle or poultry[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(4): 722-727
- [6] Yao XP, Zhang B, Wang H, et al. MLST typing and genetic evolution of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry in some areas of Sichuan, China[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35(1): 5-10 (in Chinese)

- 姚学萍, 张博, 王寒, 等. 四川部分地区禽源空肠弯曲菌 MLST 分型及遗传进化分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(1): 5-10
- [7] Dingle KE, Colles FM, Falush D, et al. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(1): 340-347
- [8] Tang YZ, Dai L, Sahin O, et al. Emergence of a plasmid-borne multidrug resistance gene *cfi(C)* in foodborne pathogen *Campylobacter*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72(6): 1581-1588
- [9] Zhang AY, Gu YX, Liang H, et al. Distribution of aminoglycoside resistance gene cluster *aadE-sat4-aphA-3* in 607 *Campylobacter* isolates from different sources in China[J]. Disease Surveillance, 2015, 30(6): 479-484 (in Chinese)
- 张艾煜, 顾一心, 梁昊, 等. 我国 607 株不同宿主来源弯曲菌耐药基因簇 *aadE-sat4-aphA-3* 分布分析[J]. 疾病监测, 2015, 30(6): 479-484
- [10] Deng FR. Prevalence and dissemination of the resistance genomic islands in *Campylobacter* isolates from food animals and patients in partial areas of China[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- 邓凤如. 耐药基因岛在我国部分地区动物源和人源弯曲菌中的流行和传播[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2016
- [11] Zhao S, Mukherjee S, Li C, et al. Cloning and expression of novel aminoglycoside phosphotransferase genes from *Campylobacter* and their role in the resistance to six aminoglycosides[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2018, 62(1): e01682-17
- [12] Abdi-Hachesoo B, Khoshbakht R, Sharifiyazdi H, et al. Tetracycline resistance genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from poultry carcasses[J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2014, 7(9): e12129
- [13] He R, Huang JL, Xu HY, et al. Development and application of multiplex PCR assay for the detection of *Campylobacter* spp.[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2007, 28(1): 5-8 (in Chinese)
- 何蕊, 黄金林, 许海燕, 等. 弯曲菌多重 PCR 检测方法的建立及其初步应用[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 28(1): 5-8
- [14] Li HL, Xu YD, Fang JY, et al. Identification of *Campylobacter coli* from pig source and the triplex PCR identification of cytolethal distending toxin[J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018(6): 6-9 (in Chinese)
- 李海利, 徐引弟, 方剑玉, 等. 猪源结肠弯曲菌分离鉴定及细胞致死性膨胀毒素三重 PCR 分子检测[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2018(6): 6-9
- [15] Qin X, Liu Q, Liu DD, et al. Isolation, identification and multilocus sequence typing of *Campylobacter* from animal source in Anhui province[J]. Microbiology China, 2018, 45(5): 1073-1081 (in Chinese)
- 秦祥, 刘茜, 刘丹丹, 等. 安徽部分地区动物源弯曲菌的分离鉴定及多位点序列分型[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1073-1081
- [16] Lim SK, Moon DC, Chae MH, et al. Macrolide resistance mechanisms and virulence factors in erythromycin-resistant *Campylobacter* species isolated from chicken and swine feces and carcasses[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2016, 78(12): 1791-1795
- [17] Xuan HY, Cai JX, Xia LN. Research progress of *cfi* gene mediated bacteria resistance[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2019, 21(1): 43-50 (in Chinese)
- 轩慧勇, 蔡建星, 夏利宁. 细菌耐药基因 *cfi* 的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(1): 43-50
- [18] Xu JZ. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in pig and chicken and development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Campylobacter jejuni*[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- 许建紫. 猪、鸡弯曲菌的分离鉴定和耐药性分析及空肠弯曲菌 LAMP 检测方法的研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2016
- [19] Tang MJ, Zhou Q, Zhang XY, et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from chickens[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2017, 38(9): 18-22 (in Chinese)
- 唐梦君, 周倩, 张小燕, 等. 鸡源结肠弯曲菌耐药性分析[J]. 动物医学进展, 2017, 38(9): 18-22
- [20] Tang MJ, Zhou Q, Zhang XY, et al. Prevalence and antimicrobial resistance analysis of *Campylobacter* spp. from broiler slaughter and processing chain[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2018, 34(12): 1131-1136 (in Chinese)
- 唐梦君, 周倩, 张小燕, 等. 肉鸡屠宰加工生产链中弯曲菌污染状况及耐药性分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(12): 1131-1136
- [21] Qin SS, Wu CM, Wang Y, et al. Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* isolated from pigs in two provinces of China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(1): 94-98

- [22] Wang X, Zhou T, Meng JH. Multilocus sequence typing for molecular typing of *Campylobacter coli* from poultry meat[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2010, 41(2): 234-239 (in Chinese)
王新, 周婷, 孟江洪. 禽源结肠弯曲杆菌的耐药性分析与 MLST 分型[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(2): 234-239
- [23] Thakur S, White DG, McDermott PF, et al. Genotyping of *Campylobacter coli* isolated from humans and retail meats using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(5): 1722-1733
- [24] Wei B, Cha SY, Kang M, et al. Antimicrobial susceptibility profiles and molecular typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from ducks in South Korea[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7604-7610
- [25] Lü JM, Huang W, Zhang ZY, et al. Study on pathogenicity of different multilocus sequence types of *Campylobacter jejuni* in poultry[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(11): 11-15 (in Chinese)
吕嘉敏, 黄武, 张宗尧, 等. 不同 MLST 型禽源空肠弯曲菌致病性研究[J]. 动物医学进展, 2015, 36(11): 11-15
- [26] Zhang XY, Tang MJ, Zhou Q, et al. Prevalence and characteristics of *Campylobacter* throughout the slaughter process of different broiler batches[J]. Frontier in Microbiology, 2018, 9: 2092

征 稿 简 则

1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊, 被中文核心期刊、中国科技核心期刊、CSCD 核心期刊收编, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今, 本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 而且入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA、ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.4171)