

弯曲菌噬菌体在家禽生产中的防控进展

倪娟^{1,2,3}, 潘道东^{1,2}, 孙杨赢¹, 叶宏伟⁴, 杨华^{2,3}, 唐标^{2,3*}

(1. 宁波大学食品与药学学院, 宁波 315211; 2. 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 杭州 310021; 3. 浙江省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 杭州 310021; 4. 杭州市临安区农林技术推广中心, 杭州 311399)

摘要: 弯曲菌感染是引起细菌性肠胃炎的主要原因之一, 在世界范围内是常见的食源性人畜共患致病菌。家禽被证明是弯曲菌的重要储存库, 同时也是人类弯曲菌病的主要感染源。弯曲菌的多重耐药性问题严重, 人类弯曲菌病的发病率居高不下, 对公共卫生造成威胁。因此, 寻找一种安全的抗生素替代品已经成为了目前亟待解决的问题。噬菌体是环境中普遍存在的细菌杀手, 能够侵占细菌宿主细胞, 抑制其正常生存繁殖, 其中特异性噬菌体能够裂解细菌, 具有特异性强、使用简便、增殖快、抗菌能力强的特点, 有成为抗生素代替品的潜力。本文就弯曲菌噬菌体的分类、弯曲菌噬菌体的生物学特性及噬菌体在家禽中的应用进行了综述, 以期弯曲菌噬菌体在食品安全控制方面的应用研究提供参考。

关键词: 弯曲菌; 噬菌体; 耐药性

Progress in the prevention and control of *Campylobacter* phages in poultry production

NI Juan^{1,2,3}, PAN Dao-Dong^{1,2}, SUN Yang-Ying¹, YE Hong-Wei⁴, YANG Hua^{2,3}, TANG Biao^{2,3*}

(1. School of Food and Pharmacy, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Hangzhou 310021, China; 3. Institute of Agro-product Safety and Nutrition, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 4. Agricultural and Forestry Technology Extension Center of Lin'an District, Hangzhou 311399, China)

ABSTRACT: *Campylobacter* infection is one of the main causes of bacterial gastroenteritis, and it is a common food-borne zoonotic pathogen in the world. Poultry has been proven to be an important reservoir of *Campylobacter*, and it is also the main source of infection for human *Campylobacter* disease. The multi-drug resistance of *Campylobacter* is a serious cause of the high incidence of human campylobacteriosis and has a negative impact on public health. Therefore, it has become an urgent problem to find a safe substitute for antibiotics. Bacteriophage is a ubiquitous bacterial killer in the environment, which can invade bacterial host cells and inhibit their normal survival and reproduction. In addition, specific bacteriophages can lyse bacteria and have the characteristics of strong specificity, easy use, fast proliferation, and strong antibacterial ability. They have the potential to become a substitute

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2020C02031)、国家自然科学基金青年项目(31700007)、省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室项目(2010DS700124-ZZ2008)

Fund: Supported by the Zhejiang Key Research and Development Program Project (2020C02031), the National Natural Science Foundation Youth Project (31700007), and the Provincial Ministry Co-construction of Agricultural Product Quality and Safety Hazard Factors and Risk Prevention and Control National Key Laboratory Project (2010DS700124-ZZ2008)

*通信作者: 唐标, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为动物源细菌耐药性研究。E-mail: tb_411@163.com

*Corresponding author: TANG Biao, Ph.D, Assistant Professor, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, No.298 Desheng Middle Road, Shangcheng District, Hangzhou 310021, China. E-mail: tb_411@163.com

for antibiotics. This article reviewed the classification and biological characteristics of *Campylobacter* phages, as well as the application of *Campylobacter* phages in poultry, and provided some guidance for the application of *Campylobacter* phages in food safety control.

KEY WORDS: *Campylobacter*; phage; antimicrobial resistance

0 引言

世界正处于多重耐药菌日益增多、新的有效抗生素缺乏的时代。随着抗生素的大量使用,细菌对抗生素不断产生耐药性,抗菌素耐药性已经成为人类健康和环境健康的一个主要威胁。过度使用和滥用抗生素是细菌耐药性加剧的主要原因,抗生素的残留物通过粪便等途径进入环境也会增加细菌产生耐药性的可能。由于耐药细菌的出现、多途径传播及持续存在对公共卫生造成严重风险,同时造成了严重的食品安全问题及巨大的临床、经济损失,让普通感染变得更加难以治疗。根据欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)和世界卫生组织(World Health Organization, WHO)报道,在欧洲联盟(European Union, EU)范围内每年造成超过 15 亿欧元的医疗成本和经济损失,给全球经济带来 1100 亿美元损失,每年至少有 420000 人死于耐药病原体,到 2050 年,在全球范围内预计每年的死亡人数将增加到 1000 万^[1]。

弯曲菌(*Campylobacter*)是广泛分布的细菌,是一种主要的食源性人畜共患致病菌。2019 年人类感染弯曲菌疾病的确诊病例为 220682 例,空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)和结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*)感染确诊病例分别占欧盟确诊病例的 23.9%和 24.2%^[2-3]。弯曲菌同样具有耐药性风险,并且对氟喹诺酮类、四环素、红霉素、庆大霉素等抗生素的耐药性报道越来越多。2018—2019 年从人和动物来源获得的空肠弯曲菌数据显示,空肠弯曲菌对氟喹诺酮类药物高水平耐药,对环丙沙星的耐药性由 59.3%增长到 61.5%。因此开发出新的替代方法来抵抗弯曲菌的耐药性十分重要^[2,4-5],其中使用噬菌体就备受关注。

噬菌体(bacteriophages)属于细菌性病毒,需要依靠细菌才能生长繁殖。其广泛分布在自然界中,凡是有细菌的场所,就可能有相应噬菌体的存在。噬菌体是细菌的天然捕食者,具有宿主特异性和选择性毒性,也具有克服细菌耐药性的进化能力,因此能够作为生物抗菌剂使用^[6]。迄今为止发现的所有噬菌体中有 96%是尾状噬菌体,由 *Siphoviridae* (61.7%)、*Myoviridae* (24.5%)和 *Podoviridae* (13.9%) 3 种类型组成^[7-8]。目前分离出来的弯曲菌噬菌体绝大多数属于 *Myoviridae*,只有极少数属于 *Siphoviridae* 和 *Podoviridae*^[9]。

弯曲菌噬菌体疗法作为一种潜在的治疗方法来治疗弯曲菌病。许多研究证实了噬菌体在减少鸡中弯曲菌定植

方面的功效, CARRILLO 等^[10]证明噬菌体治疗减少了实验鸡中弯曲菌的定植,并且减少的水平因不同的噬菌体-弯曲菌菌株组合、噬菌体剂量和噬菌体给药后的时间而异。THUNG 等^[11]发现弯曲菌噬菌体 CJ01 可以在冷藏温度(4 °C)下消除或显著减少零售羊肉和鸡肉上弯曲菌污染,同时也证明了在肉表面喷洒溶解性噬菌体的方法可以有效减少弯曲菌污染。噬菌体除了可以用于活体动物的治疗应用外还可以直接应用于食品或加工设备的表面,以减少食品中食源性致病菌的数量。由此可见,噬菌体有可能作为天然来源的抗菌剂来控制细菌病原体。

由于多重耐药细菌的出现,噬菌体疗法重新进入科学家的视野并被认为是抗生素的潜在替代方案,噬菌体疗法成为近年来研究和讨论的热点话题。本文就弯曲菌噬菌体的分类、弯曲菌噬菌体的鉴定及生物学特性、噬菌体在家禽中的应用进行了综述,以进一步阐明弯曲菌噬菌体在控制食源性病原体方面的进展,为今后弯曲菌噬菌体的研究提供参考。

1 弯曲菌噬菌体的分类

1.1 根据属分类

国际病毒分类委员会(International Virus Classification Committee, ICTV)于 2021 年重新制定了一个统一的病毒物种命名规则,它将遵循二项“属-种”格式^[12]。ATHINA 等^[13]发现目前感染弯曲菌的噬菌体可以分为两个属:*Fletchervirus* 和 *Firehammervirus*,两者与其他噬菌体属高度无关^[14-15]。同一个属中的噬菌体具有高度同源性,但两个不同属的噬菌体识别的受体不同,同源性也较低^[16-17]。目前,已经对 16 种弯曲菌噬菌体进行了全基因组测序(whole genome sequencing, WGS),结果如表 1 所示,其中 9 种属于 *Fletchervirus*、5 种属于 *Firehammervirus*、1 种还未分类。

1.2 根据基因组形态和大小分类

根据基因组大小和形态,将已知的弯曲菌噬菌体分为 3 组^[29],如表 2 所示。I 组是含有基因组大小为 320~425 kb 的噬菌体,含有这种大基因组的噬菌体是相对罕见的^[29-31]。它们的头部尺寸明显大于其他组的噬菌体,关于它们的介绍和应用尚未出现^[18,29]。II 组是基因组的大小为 180~190 kb 的噬菌体,经过 WGS 将其命名 *CP220likevirus*^[18,29]。通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术和测序发现 II 组噬菌体具有两个

亚组^[19-20]。II组噬菌体受体是鞭毛,通常感染空肠弯曲菌和大肠杆菌,且所有的II组菌体都含有大量的转座酶和归巢内切酶基因及相似的重复区域^[20]。III组是基因组大小为130~140 kb的噬菌体,将其命名为CP8unlikevirus^[18,29]。与II组噬菌体相比裂解更多的空肠弯曲菌菌株,并可能表现出更强的裂解活性^[19,21,32]。这3组噬菌体之间存在差异

性,因此,I组无法用于II组、III组的分离方法,I组与II组、III组用的分离方法有所不同,同时组内存在较大的相似性;而II组和III组都与类似T4的噬菌体有亲缘关系^[14,18]。2016年ICTV发布病毒分类,正式将这些II组和III组噬菌体别更名为“CP220virus”和“CP8virus”^[30],但对于I组的命名尚不清楚。

表1 全基因组测序的弯曲菌噬菌体信息
Table 1 *Campylobacter* phage information for whole genome sequencing

名称	GenBank 登录号	基因组 大小/bp	来源	国家	科	属	开放阅 读框数	GC 含量/%	参考文献
F352	MT863717.1	131638	鸡粪	丹麦	Myoviridae	<i>Fletcherivirus</i>	--	--	[13]
F379	MT932329.1	183102	鸡粪	丹麦	Myoviridae	<i>Firehammervirus</i>	--	--	[13]
CP81	FR823450	132454	鸡皮	德国	Myoviridae	<i>Fletcherivirus</i>	188	26.1	[14]
CPX	NC_016562	132662	零售鸡肉	英国	Myoviridae	<i>Fletcherivirus</i>	149	26	[18]
CP21	NC_019507.1	182833	水、农场	德国	Myoviridae	<i>Firehammervirus</i>	259	27.2	[19-20]
CP220	NC_027997.1	177534	鸡	英国	Myoviridae	<i>Firehammervirus</i>	--	27.4	[21]
CPt10	NC_027996.1	175720	环境	英国	Myoviridae	<i>Firehammervirus</i>	--	27.3	[21]
vB_CcoM-IBB_35	HM246720-4	172065	家禽	葡萄牙	Myoviridae	<i>Firehammervirus</i>	210	27.4	[22]
vB_CjeM_Los1	KX879627	134073	家禽排泄物	爱尔兰	Myoviridae	<i>Fletcherivirus</i>	169	26.2	[23]
CP8	KF148616	132667	鸡肉	英国	Myoviridae	<i>Fletcherivirus</i>	183	26	[23]
NCTC12673	NC_015464	135041	鸡皮	美国	Myoviridae	<i>Fletcherivirus</i>	172	26.2	[24]
CP30A	NC_018861	135572	家禽排泄物	英国	Myoviridae	<i>Fletcherivirus</i>	162	26.1	[25]
PC5	KX229736.1	131095	鸡肉	斯洛文尼亚	Myoviridae	<i>Fletcherivirus</i>	174	26.1	[26]
PC14	KX236333.1	134927	鸡肉	斯洛文尼亚	Myoviridae	<i>Fletcherivirus</i>	172	26.2	[26]
CAM-P21	MW462221.1	12587	牛肉	日本	Siphoviridae	--	18	31.19	[27]
DA10	MN530981.1	35379	家禽	--	Myoviridae	--	59	27.1	[28]

注:--:表示未知,下同。

表2 弯曲菌噬菌体的分类
Table 2 Classification of *Campylobacter* phages

噬菌体	ICTV 命名	基因 大小/kp	头部 大小/nm	特异性 受体	参考文献
I	--	320~425	143	鞭毛	[29-30]
II	CP220virus	180~190	83~99	鞭毛	[29-30]
III	CP8virus	130~140	100	荚膜多糖	[29-30]

2 弯曲菌噬菌体鉴定及生物学特性

弯曲菌噬菌体在20世纪被发现,目前被报道的弯曲菌噬菌体数量已经超过170,且几乎所有的噬菌体都是裂解性噬菌体,含有双链DNA,具有很窄的宿主范围^[9,17]。

在电子显微镜下可以观察到其头部呈现二十面体形态,尾部没有弹性,伸缩鞘较长^[28]。弯曲菌噬菌体定植在鸡、牛、羊等家禽的肠道内,也存在于环境和污水中,目前弯曲菌噬菌体大多数是从鸡等家禽的肠道或排泄物中分离。

2.1 弯曲菌噬菌体的贮存

弯曲菌噬菌体在运输、贮存过程中存在稳定性问题。为确保噬菌体能广泛应用,LU等^[33]研究了一种系统的冻干方法来保持噬菌体滴度稳定性,确保其效力,选择能广泛裂解靶细菌、缺乏宿主毒力相关基因及能有效减少空肠弯曲菌数量的噬菌体CP30A进行冻干。冻干可以生产稳定的CP30A噬菌体滤饼,且国际运输后滴度损失小于 $1 \log_{10}$ PFU/mL,同时发现将冻干方法与胰蛋白胨和酪氨酸等赋形剂一起使用,可以增强噬菌体的稳定性^[33]。另

有其他报道, 冷冻干燥和喷雾干燥都能有效地生产噬菌体粉末, 不会严重损坏噬菌体的生存能力^[34-35]。CARRIGY 等^[36]利用三亮氨酸和支链淀粉作为无定形壳形成剂, 使用弯曲菌噬菌体 CP30A 作为模型生物、海藻糖作为稳定剂, 发现三亮氨酸和海藻糖的组合, 通过喷雾干燥获得可流动粉末中的弯曲菌噬菌体 CP30A, 且经过 1 个月的干燥室温储存滴度仅降低 $(0.6 \pm 0.1) \log_{10}$ PFU/mL。虽然冻干的噬菌体在冷藏真空条件下通常是稳定的, 但噬菌体制成干粉制剂更能保持其效价稳定性, 延长产品保质期和运输范围, 节约弯曲菌噬菌体的储存、运输成本, 同时操作简便。

2.2 弯曲菌噬菌体繁殖

迄今为止发现的弯曲菌噬菌体都具有裂解性, 对于裂解噬菌体的繁殖通常是通过融合裂解的琼脂平板或感染细菌培养物来进行^[20]。不同类型的弯曲菌噬菌体进行繁殖的方法不一样^[14,21,37-38], 因此, 弯曲菌噬菌体需要确定其类型从而选出最佳的繁殖方法。HAMMERL 等^[20]常使用液体培养的方法来繁殖弯曲菌噬菌体, 用噬菌体感染 100 mL 指示菌株 NCTC 12662 培养物(OD_{588} 为 0.4), 感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.01, 然后在 42 °C 下培养 12~24 h。而 EMRE 等^[37]采用 NZCYM 覆盖琼脂平板法来繁殖噬菌体, 将提纯的噬菌体与 SM 缓冲液、宿主菌悬液及 NZCYM 覆盖琼脂混合, 然后在 37 °C、微需氧条件下培养 18~24 h。

2.3 弯曲菌噬菌体的鉴定检测

噬菌体的检测方法包括培养裂解法、噬菌斑测定和点检, 这些方法更偏向于有活力或适应性更强的裂解噬菌体^[39-40]。对于温和噬菌体或采样不足的噬菌体的检测常采用宏基因组学和噬菌体基因组分析等分子方法^[41]。宏基因组学只能帮助检测噬菌体基因组特征, 并不能分离噬菌体^[40]。噬菌体的分离通常通过噬菌斑进行, 这种方法的局限性在于噬菌体只能通过某些指示菌株上的裂解活性来鉴定, 并且测试样品中必须存在相对大量的噬菌体。因此, 更灵敏的多重实时 PCR 分子检测系统具有极大优势, 它能够对样品进行预筛选的同时还可以鉴定出噬菌体是属于 II 组还是 III 组。CLAUDIA 等^[42]在现有弯曲菌噬菌体基因组序列的基础上, 针对“CP220virus”和“CP8virus”类型噬菌体开发了一个多重 PCR 系统, 分别选择尾管基因和基板基因作为目标进行鉴定。IBAI 等^[43]首次使用随机扩增多态性 DNA-PCR 技术在弯曲菌噬菌体的遗传特征中进行评估, 结果发现仅对第 II 组的噬菌体有效。实时荧光定量 PCR 系统已被开发用于检测 II 组和 III 组相关的噬菌体, 但活性噬菌体和灭活噬菌体多数都是通过 PCR 技术检测, 因此 PCR 技术与噬菌斑检测技术相结合是目前分离和鉴定弯曲菌噬菌体最为有效的手段。

3 弯曲菌噬菌体在家禽中的防控

噬菌体对弯曲菌的治疗作用早在 20 世纪末就开始在家禽中开展各种研究^[20], 噬菌体在家禽生产中的应用目前主要侧重于减少弯曲菌数量的能力以及防止弯曲菌在肠道中定植两个方面。噬菌体减少家禽中弯曲菌的应用已经被广泛研究(表 3)。ATTERBURY 等^[50]确定肉鸡盲肠中存在噬菌体时空肠弯曲菌数量显著降低。AYMAN 等^[31]发现单次接种 $7 \log_{10}$ PFU/mL 剂量的弯曲杆菌特异性噬菌体 CP220 在接种后 48 h 后会导致弯曲菌数量减少 $2 \log_{10}$ CFU/g。在实验室研究阶段噬菌体减少鸡肠道中弯曲菌数量方面已经表现出巨大潜力, 但将其直接应用在生禽肉上以及农场等大规模养殖方面还需要进一步的研究。例如, 怎样解决弯曲菌对噬菌体的抗性问题, 弯曲菌可能会利用基因组的不稳定性来避免噬菌体的捕食及噬菌体如何在酸性条件下存活等, 只有将这些潜在问题全部解决才能够有机会将其应用到农场层面^[50-51]。

3.1 多种噬菌体混合控制

目前细菌对噬菌体的抗性可能是治疗性噬菌体应用开发的主要问题, 通过人工筛选和干预可以使噬菌体在食品保护和控制食源性病原体方面更有效。使用噬菌体-噬菌体或噬菌体-抗生素混合物的联合控制是克服细菌耐药性的一种可行选择。CARVALHO 等^[6]从家禽肠道内容物中分离出 3 个噬菌体组成噬菌体混合物, 通过食物和灌胃两种方式将噬菌体混合物送入鸡体内。发现噬菌体混合物能使空肠弯曲菌整个实验期间在鸡体内的定植数减少约 $2 \log_{10}$ CFU/g, 经口灌胃的方式效果更好。PICHARDS 等^[44]使用含有毒性的两种弯曲菌噬菌体 CP20 和 CP30A 组成噬菌体混合物来处理被空肠弯曲菌 HPC5 定植的肉鸡。结果发现混合噬菌体会在口服管饲后 48 h 建立肠道定植, 处理后 2 d 在盲肠中最有效, 弯曲菌菌落减少 $2.4 \log_{10}$ CFU/g。

噬菌体是从家禽身体中分离出来的, 它们用来减少活禽中弯曲菌定植的方法不会产生任何有害产物, 噬菌体捕食不影响微生物群落结构, 仅选择性降低了空肠弯曲菌的相对丰度。噬菌体联合控制增加了细菌宿主的感染范围, 同时降低了宿主产生噬菌体抗性的机会, 保持生物防治效率, 选择组成噬菌体混合物时需要考虑到一种噬菌体的活性是否会对另一种或几种噬菌体的活性产生影响。噬菌体混合物防治不仅可以克服噬菌体抗性问题还可以有更广泛的宿主范围。

3.2 噬菌体与抗菌剂联合应用

长时间使用噬菌体会使得细菌对噬菌体产生抗性, 克服噬菌体抗性方法包括基因工程、与抗菌剂组合使用等^[52]。目前, 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)是一种常用的食品防腐剂和抗菌剂, 是 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的离子螯合

剂, EDTA 通过复合二价阳离子来破坏细菌细胞膜的稳定性从而抑制细菌生长^[53-54]。与其他普通抗菌剂不同, EDTA 可以有效防御一些多重耐药菌株, 因为细菌需要在高镁水平进行复制而 EDTA 对 Mg^{2+} 离子具有很强的亲和力^[55]。目前很少有研究将噬菌体与普通抗菌剂联合使用。HUANG 等^[52]研究发现噬菌体 PC10 能使空肠弯曲菌活菌数在 8 h 减少 1.5 log 然后开始增长, 发现噬菌体 PC10 能使空肠弯曲菌的活菌数呈现先下降后上升的趋势, 噬菌体 PC10 与 1 mmol/L EDTA 联

合使用时对空肠弯曲菌的再生长能力有明显的抑制作用。适当浓度的 EDTA 在不抑制噬菌体裂解活性的情况下能抑制抗噬菌体再生长。而另一种螯合剂乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸能抑制噬菌体 PC10 的裂解活性, 但对 0.5 mmol/L 和 1 mmol/L 的空肠弯曲菌的再生长没有抑制作用。这次研究表明, 裂解噬菌体和食品添加剂 EDTA 联合使用可以有效地抑制革兰氏阴性菌中噬菌体抗性细菌的再生长, 同时螯合作用会影响噬菌体的裂解活性。

表3 噬菌体在消减家禽弯曲菌中的应用

Table 3 Application of bacteriophage in controlling *Campylobacter* in poultry

噬菌体	弯曲菌菌株	摄入途径	结果	参考文献
PhiCcoIBB35 PhiCcoIBB37 PhiCcoIBB12	2140CD1	饲喂 食物掺入	使用由 3 种噬菌体组成的混合物实现了 2 log ₁₀ 水平的降低。食物中的噬菌体递送比口服管饲法更有效	[6]
CP8 CP34	HPC5 GIIC8	饲喂	弯曲菌数量的减少取决于噬菌体-宿主组合、噬菌体剂量等。噬菌体 CP34 减少 HPC5 和 GIIC8, 这种减少保持 5 d。体外和体内结果之间存在显著差异	[10]
CJ01	鸡肉、羊肉 分离株	喷洒	肉表面喷洒溶解性噬菌体的方法在减少弯曲菌污染方面是有效的	[11]
CP20 CP30A	HPC5	饲喂	混合噬菌体会在口服管饲后 48 h 建立肠道定植, 处理后 2 d 在盲肠中最有效, 弯曲菌菌落减少 2.4 log ₁₀ CFU/g	[44]
NCTC 12669 NCTC 12671	C356	饲喂	第 5 d, 细菌数由最初的 3 log ₁₀ 水平降低后再次上升, 并在低于对照组的 1 log ₁₀ 水平稳定下来	[45]
NCTC 12684 CP81	NCTC 11168	--	4 °C 下肉中弯曲菌数量没有减少, 37 °C 下肉汤中弯曲菌数量减少 1~2 log ₁₀	[46]
NCTC 12672 NCTC 12673 NCTC 12674 NCTC 12678	鸡粪便分离株	饮水	屠宰前 1 至 4 d 使用噬菌体可以最大程度地减少屠宰场弯曲菌。盲肠中弯曲菌数量减少 3.2 log ₁₀	[47]
Φ3 Φ15	鸡肝分离株	--	4 °C 时应用于含有不同来源的空肠弯曲菌菌株的肝脏匀浆, 导致活菌数减少 0.2 ₀ ~0.7 log ₁₀	[48]
II 组和 III 组噬菌体	NCTC 12662 RM 1221	饲喂	荚膜多糖噬菌体与空肠弯曲菌的结合更紧密, 在低温下更有效地减少病原体。噬菌体混合物在减少空肠弯曲菌方面的效率高于单一噬菌体的效率。	[49]

注: --: 表示未知。

4 结论与展望

由于近年来抗生素长期、大量的使用导致多重耐药细菌大量出现, 细菌耐药性成为威胁动物和人类健康的世界性问题, 需要寻找新的抗菌药来克服抗生素耐药, 噬菌体又重新受到广泛关注。然而噬菌体不应在治疗中普遍取代抗生素药物, 而是补充其作用, 最终增强整体的抗菌效果。目前, 世界范围内正在研究噬菌体在农业、兽医生物控制、食品安全和人类临床治疗中的应用^[56]。噬菌体作为合适的弯曲菌治疗剂或生物控制剂必须满足以下基本条件。首先必须是专性裂解性噬菌体, 只能感染细菌细胞并产生后代噬菌体, 没有能力整合到细菌基因组中或携带细菌基因进行水平转移; 其次环境适应能力强; 最后噬菌体基因组不能含有害基因, 如编码毒素或耐药的基因。值得庆幸的是目前发现的弯曲菌噬菌体中不含相关毒力基因。

噬菌体疗法在食品中的应用非常具有吸引力, 并且可能会成为一种可持续的措施。噬菌体治疗与传统抗生素治疗相比具有很多优点: (1)它们和宿主存在于相同的环境中, 容易分离; (2)在治疗时一般都具有特异性, 不会破坏正常的肠道菌群; (3)具有自我复制和自我限制性质, 只有在敏感细菌存在的情况下才会繁殖; (4)噬菌体复制是一个依赖宿主细菌密度的过程。噬菌体疗法具有一定优势的同时也存在相应问题: (1)噬菌体不能取代普遍的抗菌药物; (2)噬菌体的效价稳定性及在食品和农业应用中的相关费用; 噬菌体效价在运输和使用过程中不稳定以及在食品和农业中使用价格较高; (3)噬菌体安全性问题, 噬菌体的使用在一些国家仍未得到批准^[57-58]; (4)宿主范围窄, 噬菌体疗法只能使用裂解噬菌体, 减少了可用噬菌体的数量^[59-60]; (5)细菌可能会进化出广泛的噬菌体抗性^[57,61]; (6)噬菌体对一些物理化学因素敏感, 主要是紫外线和温度^[62-63]。

目前国外已经允许产生志贺样毒素的大肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、沙门氏菌和志贺氏菌的噬菌体等14种噬菌体生物防治产品在食品中应用^[64]。用于家禽业的弯曲菌噬菌体产品目前只有极少数被批准使用,关于噬菌体产品用于减少家禽群或加工肉类中弯曲菌细菌数量的专利也很少^[64]。由于弯曲菌具有广泛的活性和很强的效力,目前发现减少这种病原体的最佳办法是用噬菌体混合菌株进行控制。因此,发现更多新的弯曲菌噬菌体并对其进行表征和测序,是目前在弯曲菌噬菌体方面研究的重点任务之一;除了研究裂解性噬菌体本身外,噬菌体在裂解期释放的活性蛋白在控制食源性病原体方面也具有潜力。目前噬菌体疗法已经在食品、兽医等多个方面获得成功,噬菌体成为新一代抑菌剂具有广阔前景。

参考文献

- [1] PABLO C, ALBERTO G, JAIME E, *et al.* Phages in food industry biocontrol and bioremediation [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10(7): 786.
- [2] The European Union One Health 2019 Zoonoses Report [J]. *EFSA J*, 2021, 19(2): e06406.
- [3] The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019 [J]. *EFSA J*, 2021, 19(4): e06490.
- [4] LEI D, ORHAN S, MADHUSUDAN G, *et al.* New and alternative strategies for the prevention, control, and treatment of antibiotic-resistant *Campylobacter* [J]. *Transl Res*, 2020, 223: 76–88.
- [5] TACCONELLI E, CARRARA E, SAVOLDI A, *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(3): 318–327.
- [6] CARVALHO CM, GANNON BW, HALFHIDE DE, *et al.* The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens [J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10(1): 232.
- [7] SHARP R. Bacteriophages: Biology and history [J]. *J Chem Technol Biot*, 2001, 76(7): 667–672.
- [8] CARRILLO CML, CONNERTON PL, PEARSON T, *et al.* Free-range layer chickens as a source of *Campylobacter* bacteriophage [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2007, 92(3): 275–284.
- [9] CONNERTON PL, TIMMS AR, CONNERTON IF. *Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy [J]. *J Appl Microbiol*, 2011, 111(2): 255–265.
- [10] CARRILLO CL, ATTERBURY RJ, EL-SHIBINY A, *et al.* Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11): 6554–6563.
- [11] THUNG TY, LEE E, MAHYUDIN NA, *et al.* Partial characterization and *in vitro* evaluation of a lytic bacteriophage for biocontrol of *Campylobacter jejuni* in mutton and chicken meat [J]. *J Food Saf*, 2020, 40(2): e12770.
- [12] WALKER PJ, SIDDELL SG, LEFKOWITE EJ, *et al.* Changes to virus taxonomy and to the international code of virus classification and nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2021) [J]. *Arch Virol*, 2021, 166(9): 2633–2648.
- [13] ATHINA Z, AHERN SJ, YVES B, *et al.* Two distinct modes of lysis regulation in *Campylobacter fletchervirus* and *Firehammervirus* phages [J]. *Viruses*, 2020, 12(11): 1247.
- [14] HAMMERL JA, CLAUDIA J, JOCHEN R, *et al.* *Campylobacter jejuni* group III phage CP81 contains many T4-like genes without belonging to the T4-type phage group: Implications for the evolution of T4 phages [J]. *J Virol*, 2011, 85(17): 8597–8605.
- [15] ACKERMANN HW. Phage classification and characterization [J]. *Methods Mole Biol*, 2009, 501: 127–140.
- [16] SØRENSEN MCH, GENCAY YE, BIRK T, *et al.* Primary isolation strain determines both phage type and receptors recognised by *Campylobacter jejuni* bacteriophages [J]. *PLoS One*, 2017, 10(1): e0116287.
- [17] JAVED MA, ACKERMANN HW, AZEREDO J, *et al.* A suggested classification for two groups of *Campylobacter myoviruses* [J]. *Archi Virol*, 2014, 159(1): 181–190.
- [18] JÄCKEL C, HAMMERL JA, HERTWIG S. *Campylobacter* phage isolation and characterization: What we have learned so far [J]. *Methods Protocols*, 2019, 2(1): 18.
- [19] JÄCKEL C, HAMMERL JA, REETZ J, *et al.* *Campylobacter* group II phage CP21 is the prototype of a new subgroup revealing a distinct modular genome organization and host specificity [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 629.
- [20] HAMMERL JA, CLAUDIA J, JOCHEN R, *et al.* The complete genome sequence of bacteriophage CP21 reveals modular shuffling in *Campylobacter* group II phages [J]. *J Virol*, 2012, 86(16): 8896.
- [21] TIMMS AR, JOANNA CY, SCOTT AE, *et al.* Evidence for a lineage of virulent bacteriophages that target *Campylobacter* [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 214.
- [22] CARVALHO CM, KROPINSKI AM, LINGOHR EJ, *et al.* The genome and proteome of a *Campylobacter coli* bacteriophage vB_CcoM-IBB_35 reveal unusual features [J]. *Virol J*, 2012, 9(1): 35.
- [23] O'SULLIVAN L, LUCID A, NEVE H, *et al.* Comparative genomics of Cp8viruses with special reference to *Campylobacter* phage vB_CjeM_los1, isolated from a slaughterhouse in Ireland [J]. *Archi Virol*, 2018, 163(8): 2139–2154.
- [24] KROPINSKI AM, DENIS A, MARY F, *et al.* Genome and proteome of *Campylobacter jejuni* bacteriophage NCTC 12673 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(23): 8265–8271.
- [25] BRATHWAITE KJ, PATCHARIN S, CONNERTON PL, *et al.* Host adaptation to the bacteriophage carrier state of *Campylobacter jejuni* [J]. *Res Microbiol*, 2015, 166(6): 504–515.
- [26] JANEŽ N, PETERKA MZ, ACCETTO TZZ. Complete genome sequences of group III *Campylobacter* bacteriophages PC5 and PC14 [J]. *Genome Announc*, 2016, 4(6): e01030–16.
- [27] HUNGHSIN H, YU Z, NANAMI A, *et al.* Complete genome sequence of *Campylobacter coli* bacteriophage CAM-P21 [J]. *Microbiol Res Announc*, 2021, 10(15): e00223–21.
- [28] STEVEN H, DANIELA DA, YANG H, *et al.* *Campylobacter* bacteriophage DA10: An excised temperate bacteriophage targeted by CRISPR-cas [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 400.
- [29] SAILS AD, WAREING DRA, BOLTON FJ, *et al.* Characterisation of 16 *Campylobacter jejuni* and *C. coli* typing bacteriophages [J]. *J Med Microbiol*, 1998, 47(2): 123–128.
- [30] ADAMS MJ, LEFKOWITZ EJ, KING AMQ, *et al.* Ratification vote on taxonomic proposals to the international committee on taxonomy of viruses (2016) [J]. *Arch Virol*, 2016, 161(10): 2921–2949.
- [31] AYMAN ES, ANDREW S, ANDREW T, *et al.* Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens [J]. *J Food Protect*, 2009, 72(4): 733–740.

- [32] HAMMERL JA, JÄCKEL C, ALTER T, *et al.* Reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chicken by successive application of group II and group III phages [J]. PLoS One, 2017, 9(12): e114785.
- [33] LU L, CARRIGY NB, KARIUKI S, *et al.* Development of a lyophilization process for *Campylobacter* bacteriophage storage and transport [J]. Microorganisms, 2020, 8(2): 282.
- [34] LEUNG SSY, PARUMASIVAM T, GAO FG, *et al.* Effects of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders [J]. Int J Pharmaceut, 2017, 521(1-2): 141-149.
- [35] ALVIN L, CARRIGY NB, HUI W, *et al.* Atmospheric spray freeze drying of sugar solution with phage D29 [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 488.
- [36] CARRIGY NB, LIANG L, WANG H, *et al.* Trileucine and pullulan improve anti-*Campylobacter* bacteriophage stability in engineered spray-dried microparticles [J]. Ann Biomed Eng, 2020, 48(4): 1169-1180.
- [37] EMRE GY, TINA B, HOLST SMC, *et al.* Methods for isolation, purification, and propagation of bacteriophages of *Campylobacter jejuni* [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1512: 19-28.
- [38] HOLST SMC, EMRE GY, LONE B. Methods for initial characterization of *Campylobacter jejuni* bacteriophages [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1512: 91-105.
- [39] PATRICK ADJ, NOBREGA FL, BROUNS SJJ, *et al.* Molecular and evolutionary determinants of bacteriophage host range [J]. Trends Microbiol, 2019, 27(1): 51-63.
- [40] NAIR A, GHUGARE GS, KHAIRNAR K. An appraisal of bacteriophage isolation techniques from environment [J]. Microbial Ecol, 2021: 1-17. DOI: 10.1007/s00248-021-01782-z. Online ahead of print
- [41] HYMAN P. Phages for phage therapy: Isolation, characterization, and host range breadth [J]. Pharmaceuticals, 2019, 12(1): 35.
- [42] CLAUDIA J, HAMMERL JA, JÖRG R, *et al.* A multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of *Campylobacter* phages [J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0190240.
- [43] IBAI N, ESTIBALIZ M, KATHERINE M, *et al.* Isolation, host specificity and genetic characterization of *Campylobacter* specific bacteriophages from poultry and swine sources [J]. Food Microbiol, 2021, 97: 103742-103742.
- [44] PICHARDS PJ, CONNERTON PL, CONNERTON IF. Phage biocontrol of *Campylobacter jejuni* in chickens does not produce collateral effects on the gut microbiota [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 476.
- [45] WAGENAAR JA, BERGEN MAPV, MUELLER MA, *et al.* Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers [J]. Vet Microbiol, 2005, 109(3): 275-283.
- [46] STEFANIE O, GRETA G, STEFAN H, *et al.* Control of *Campylobacter* spp. and yersinia enterocolitica by virulent bacteriophages [J]. J Mol Genet Med, 2012, 6: 273-278.
- [47] KITTLER S, FISCHER S, ABDULMAWJOOD A, *et al.* Effect of bacteriophage application on *Campylobacter jejuni* loads in commercial broiler flocks [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(23): 7525-7533.
- [48] FIRLIEYANTI AS, CONNERTON PL, CONNERTON IF. *Campylobacter*s and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol [J]. Int J Food Microbiol, 2016, 237: 121-127.
- [49] ZAMPARA A, SØRENSEN MCH, ELSSER-GRAVESEN A, *et al.* Significance of phage-host interactions for biocontrol of *Campylobacter jejuni* in food [J]. Food Control, 2017, 73: 1169-1175.
- [50] ATTERBURY RJ, DILLON E, SWIFT C, *et al.* Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(8): 4885-4887.
- [51] JOHNSON TJ, SHANK JM, JOHNSON JG. Current and potential treatments for reducing *Campylobacter* colonization in animal hosts and disease in humans [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 487.
- [52] HUANG HH, FURUTA M, NASU T, *et al.* Inhibition of phage-resistant bacterial pathogen regrowth with the combined use of bacteriophages and EDTA [J]. Food Microbiol, 2021, 100: 103853-103853.
- [53] HÜLSMANN M, HECKENDORFF M, LENNON Á. Chelating agents in root canal treatment: Mode of action and indications for their use [J]. Inter Endod J, 2003, 36(12): 810-830.
- [54] MASTROMATTEO M, LUCERA A, SINIGAGLIA M, *et al.* Synergic antimicrobial activity of lysozyme, nisin, and EDTA against *Listeria monocytogenes* in ostrich meat patties [J]. J Food Sci, 2010, 75(7): 422-429.
- [55] HAMOUD R, ZIMMERMANN S, REICHLING J, *et al.* Synergistic interactions in two-drug and three-drug combinations (thymol, EDTA and vancomycin) against multi drug resistant bacteria including *E. coli* [J]. Phytomedicine, 2014, 21(4): 443-447.
- [56] CARLA P, PEDRO C, JOÃO D, *et al.* Phage therapy as a potential approach in the biocontrol of pathogenic bacteria associated with shellfish consumption [J]. Inter J Food Microbiol, 2021, 338: 108995.
- [57] CULOT A, GROSSET N, GAUTIER M. Overcoming the challenges of phage therapy for industrial aquaculture: A review [J]. Aquaculture, 2019, 513: 734423.
- [58] LUCÍA F, DIANA G, ANA R, *et al.* Application of bacteriophages in the agro-food sector: A long way toward approval [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 296.
- [59] CATARINA M, NÁDIA O, CARLA P, *et al.* Protein expression modifications in phage-resistant mutants of aeromonas salmonicida after AS-A phage treatment [J]. Antibiotics (Basel), 2018, 7(1): 21.
- [60] FRANK O. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy [J]. Viruses, 2018, 10(7): 351.
- [61] PEDRO C, CARLA P, GOMES ATPC, *et al.* Efficiency of single phage suspensions and phage cocktail in the inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: An *in vitro* preliminary study [J]. Microorganisms, 2019, 7(4): 94.
- [62] HARADA LK, SILVA EC, CAMPOS WF, *et al.* Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art [J]. Microbiological Res, 2018, 212: 38-58.
- [63] DUARTE J, PEREIRA C, MOREIRINHA C, *et al.* New insights on phage efficacy to control aeromonas salmonicida in aquaculture systems: An *in vitro* preliminary study [J]. Aquaculture, 2018, 495: 970-982.
- [64] USHANOV L, LASAREISHVILI B, JANASHIA I, *et al.* Application of *Campylobacter jejuni* phages: Challenges and perspectives [J]. Animals, 2020, 10(2): 279.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介

倪娟, 硕士研究生, 主要研究方向为动物源细菌耐药性研究。
E-mail: nijuan0320@163.com

唐标, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为动物源细菌耐药性研究。
E-mail: tb_411@163.com