

2种检测方法对弯曲菌检出率的影响

余峰玲, 许艳平, 王路梅, 杜阳光, 童晶*

(徐州市疾病预防控制中心, 徐州 221006)

摘要: 目的 比较国标法和双孔滤膜法在生禽肉中弯曲菌的检测率, 探索生禽肉中弯曲菌分离鉴定的有效检测方法。**方法** 随机采集冷冻和新鲜禽肉产品共 102 份, 通过国标法和双孔滤膜法 2 种方法检测, 观察 2 种方法从样品处理、增菌和分离培养过程中的不同, 并比较 2 种方法检测弯曲菌检出率的差异。**结果** 102 份样品中国标法检出弯曲菌的检出率为 28.43%, 其中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的检出率分别为 13.725% 和 14.705%; 双孔滤膜法检出弯曲菌的检出率为 53.92%, 其中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的检出率分别为 26.47% 和 27.45%; 双孔滤膜法检出率显著高于国标法, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 应用双孔滤膜法能显著提高生禽肉食品中弯曲菌的检出率。

关键词: 弯曲菌; 双孔滤膜法; 检出率

Effects of 2 kinds of detection methods on the detection rate of *Campylobacter*

YU Feng-Ling, XU Yan-Ping, WANG Lu-Mei, DU Yang-Guang, TONG Jing*

(Xuzhou Center for Disease Control and Prevention, Xuzhou 221006, China)

ABSTRACT: Objective To compare the detection rate of *Campylobacter* in raw poultry meat by the national standard method and the double-pore filter membrane method, and explore an effective detection methods for the isolation and identification of *Campylobacter* in raw poultry meat. **Methods** A total of 102 samples of frozen and fresh poultry products were randomly collected and tested by the national standard method and the double-pore filter membrane method. The differences of the 2 methods in the process of sample treatment, bacteria increasing and culture separation were observed, and the differences of the 2 methods in the detection rate of *Campylobacter* were compared. **Results** The detection rate of *Campylobacter* in 102 samples by Chinese standard method was 28.43%, *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* were 13.725% and 14.705%, respectively. The detection rate of *Campylobacter* by the double-pore filter membrane method was 53.92%, *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* were 26.47% and 27.45%, respectively. The detection rate of the double-pore filter membrane method was significantly higher than that of the national standard method, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** The application of double-pore filter membrane method can significantly improve the detection rate of *Campylobacter* in raw poultry food.

KEY WORDS: *Campylobacter*; double-pore filter membrane method; detection rate

*通信作者: 童晶, 副主任技师, 主要研究方向为食源性致病菌的检测与研究。E-mail: 53439716@qq.com.

*Corresponding author: TONG Jing, Deputy Chief Technician, Xuzhou Center for Disease Control and Prevention, No.142, Second Ring West Road, Quanshan District, Xuzhou 221006, China. E-mail: 53439716@qq.com.

0 引言

弯曲杆菌(*Campylobacter*), 为食源性人畜共患病病原体, 在发达国家和发展中国家均是导致人类细菌性肠胃炎的主要病原体^[1-3], 其中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌被认为是最常见的弯曲菌, 大多数弯曲菌病均由这 2 种弯曲菌导致^[2,4], 弯曲菌主要引起肠胃炎, 大多数肠胃炎可以自愈, 但有少数可引起严重的急性肠炎和食物中毒, 少数空肠弯曲菌的感染还能导致格林-巴利综合症(Guillain-Barre syndrome, GBS)、反应性关节炎和肝炎等严重的并发症, 对人类健康危害严重。在欧盟, 人的弯曲菌病发病率有不断增加的趋势, 在中国, 随着检测方法的不断改进, 我国弯曲菌的监测也得到国民的重视^[5]。

弯曲菌主要是由于人类通过食用被污染的牛奶、禽畜肉以及相关的产品导致的, 尤其是家禽, 家禽是弯曲菌的主要宿主^[6], 因此开展生禽肉弯曲菌的监测, 可为控制弯曲菌病流行、制定相关防控措施提供科学支撑。目前, 不同研究对于弯曲菌的检测方法的描述有一定差异, 有文献报导采用双孔滤膜法可显著提高弯曲菌的检出率^[7], 但目前我国对于禽肉中弯曲菌的检测主要是国家标准 GB4789.9—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验》^[8], 为进一步确定国标法和双孔滤膜法的检出差异, 本研究对象为 102 份鲜(冻)生禽肉, 并对检测结果进行了统计学分析, 为提高食品中弯曲菌的检出率提供实验室可行的方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要仪器与试剂

GRP-9270 型隔水式培养箱(上海森信实验仪器有限公司); DME 型显微镜(德国 Leicac 公司); Bugbox M 型厌氧培养箱(英国 Ruskinn 公司); Smasher 舒适型均质器(法国 Smasher 公司); ESCOIIA2 型生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); 7500 Real Time PCR System 型实时 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

0.1%蛋白胨水(广东环凯生物科技有限公司); 弯曲菌培养检测试剂盒(双孔双孔滤膜法食品样本)、弯曲菌生化检测试剂盒、空肠弯曲菌核酸扩增荧光检测试剂盒(青岛中创汇科生物科技有限公司); 脱纤维羊血(青岛海博生物技术有限公司); mCCDA 琼脂、Skirrow 血琼脂、Bolton 肉汤、哥伦比亚血琼脂培养基(北京陆桥有限公司); 结肠弯曲菌核酸扩增荧光检测试剂盒(硕世生物科技有限公司); NH 鉴定卡(法国生物梅里埃公司)。本实验用到的所有试剂均经质量鉴定, 均在有效期内使用。

1.1.2 样品信息

随机采集徐州市区零售(超市或农贸市场)新鲜生禽

肉和冷冻生禽肉各 51 份, 共 102 份, 每份样品不少于 500 g, 将采集的样品放入无菌密封袋中, 并立即送至实验室, 检测前将每份被检样品无菌分割, 随机均分成 2 份, 进行检测。

1.2 方 法

1.2.1 国标法(现行有效)

按照 GB 4789.9—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验》方法进行样品处理、增菌、分离、鉴定。

(1)样品处理

用适当的 0.1%的蛋白胨水冲洗样品, 振荡 2 min 后经无菌纱布过滤, 再 1600g 15 min 离心后弃上清, 0.1%蛋白胨水 10 mL 悬浮, 吸取 3 mL 于 100 mL Bolton 肉汤中进行培养。

(2)预增菌和增菌

36 °C±1 °C微需氧下培养 4 h, 42 °C±1 °C继续培养 24 h~48 h。

(3)分离

将 24 h 增菌液、48 h 增菌液及对应的 1:50 稀释液划线接种 Skirrow 血琼脂与 CCDA 琼脂平板, 微需氧条件下 42 °C培养 24 h~48 h; 挑取可疑菌落 3~5 个, 接种于哥伦比亚血平板, 重复几次直到分离得到单个纯菌落。

(4)鉴定

挑取单个可疑菌落进行革兰染色镜检、荧光 PCR 以及生化实验。生化实验有: 过氧化氢酶、氧化酶、马尿酸盐水解、吲哚乙酸脂水解。

1.2.2 双孔滤膜法

(1)样品处理

将整块禽肉放入无菌自封袋中, 加入缓冲蛋白胨水培养液至淹没样本, 反复揉搓 5 min(各个部位均揉到), 无菌操作取出样品, 漂洗液用于检测。

(2)选择性增菌

取 2 mL 的漂洗液加到 4 mL 弯曲菌增菌(促生长增菌液)培养液中, 充分混匀, 置微需氧(5% O₂, 10%CO₂, 85%N₂)环境, 42 °C培养 24 h。

(3)选择性分离培养

取出冷藏保存的双孔平板, 室温平衡 30~60 min。无菌操作, 用镊子取一片滤膜, 将滤膜轻轻贴在平板的中央表面(光滑面朝上), 使滤膜与培养基的表面充分贴合, 取 300~500 μL 的增菌培养物分成 6 点, 呈梅花样滴加于滤膜上, 注意滴加的液体不能超过滤膜的边缘, 等待滤膜上的液体充分透过滤膜(约 45~60 min), 无菌环境下迅速揭掉滤膜, 翻转培养平板, 置于微需氧环境中 42 °C, 培养 24~48 h, 挑取可疑菌落, 接种哥伦比亚血平板中, 置于微需氧环境中 42 °C, 培养 24~48 h。双孔板取出平衡至室温, 挑

取生长于双孔皿上的单个菌落做鉴定, 典型菌落为不溶血、扁平、湿润、有光泽, 边缘完整发亮, 弯曲菌鉴定方法同国标法。

1.2.3 统计分析

用 SPSS16.0 软件, 卡方检验(χ^2)方法对试验结果进行分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 2种方法检测程序差异

双孔滤膜法在样品处理时无需纱布过滤, 直接用缓冲蛋白胨水漂洗, 方法更简便, 在增菌时使用的促生长增菌液更适合弯曲菌的生长, 不需要再经过预增菌, 只需要培养 24 h, 缩短了增菌时间, 在分离培养时滤膜有效的隔离了杂菌, 通过滤膜后双孔板上培养的细菌基本都是单个纯菌, 省去了反复分纯的步骤。

2.2 全部样品在 2 种检测方法中的检测结果

102 份样品在国标法和双孔滤膜法中对弯曲菌的检出率分别为 28.43%、53.92%, 样品在双孔滤膜法中的检出率明显高于国标法, 差异有统计学意义($\chi^2=13.681$, $P < 0.05$); 其中空肠弯曲菌在 2 种方法检出率分别为 13.725%、26.47%; 样品在双孔滤膜法中空肠弯曲菌的检出率明显高于国标法, 差异有统计学意义($\chi^2=4.995$, $P < 0.05$); 结肠弯曲菌在 2 种方法检出率分别为 14.705%、27.45%; 样品在双孔滤膜法中结肠弯曲菌的检出率明显高于国标法, 差异有统计学意义($\chi^2=4.980$, $P < 0.05$); 见表 1。

2.3 新鲜和冷冻禽肉在 2 种检测方法中的检测结果

51 份新鲜禽肉在国标法和双孔滤膜法中弯曲菌的检出率分别为 39.22%、84.31%, 新鲜禽肉在双孔滤膜法中的检出率明显高于国标法, 差异有统计学意义($\chi^2=21.961$, $P < 0.05$); 冷冻禽肉在 2 种检测方法中弯曲菌的检出率分别为 17.65%、23.53%, 冷冻禽肉在 2 种检测方法中检出率相近, 差异无统计学意义。

3 结论与讨论

弯曲菌的检出率受到的影响因素较多, 有研究发现不同的增菌液及增菌时间会影响到弯曲菌的检出率^[9], 我国对分离培养弯曲菌方法中的样品处理和增菌液成分以及分离纯化菌落的方法一直在不断的改进, 本研究结果显示 102 份样品在使用双孔滤膜法中弯曲菌检出率明显高于国标法, 差异有统计学意义, 且空肠弯曲菌和结肠弯曲菌使用双孔滤膜法在新鲜禽肉中检出率均高于国标法, 差异均有统计学意义, 提示双孔滤膜法在弯曲菌的检测中优于国标法, 比较适合用于弯曲菌的分离培养。

弯曲菌为革兰阴性微需氧菌, 对温度, 氧气以及 pH 值等因素较敏感, 有研究发现, 弯曲菌在不利于其生长的条件下, 容易形成球型, 进入不可培养状态^[10], 冷冻禽肉中弯曲菌的检出率明显低于新鲜禽肉中的检出率, 可能与此性状有关。本研究结果表明冷冻禽肉在 2 种检测方法中检出率差异无统计学意义, 而新鲜禽肉双孔滤膜法检出率明显高于国标法, 表明弯曲菌在相同样品不同状态中生长存在一定差异, 可能弯曲菌在冷冻样品中不容易存活或不容易培养, 其机制值得进一步探讨研究, 这对研究弯曲菌有一定的意义。

与国标的方法相比, 双孔滤膜法同样需要进行增菌培养, 但增菌效果显著提高。虽然目前该方法增菌液成分不确定(商业试剂), 但该方法从样品处理的程序上首先减少了样本处理所需时间和步骤, 同时本方法基于弯曲菌菌体较小, 可以滤过一定孔径滤膜的特性, 除了通过增菌步骤筛除杂菌外, 再次对样本中的菌体较大的“杂菌”进行有效选择^[11-14]。本研究中经滤膜过滤处理后, 双孔板上生长的所有菌落经过鉴定后, 大多为弯曲菌属, 应用该方法, 本实验室在 2016 年采用双孔滤膜法在徐州市市售生禽肉样品中第一次检出空肠弯曲菌, 与相关报道一致^[15]。而国标法在选择性分离弯曲菌时生长的杂菌较多, 弯曲菌生长较慢, 容易被杂菌覆盖, 尤其是有蔓延生长的细菌会掩盖整个平板表面, 分离难度较大, 容易漏检。

表 1 2 种方法检测弯曲菌的检出率

Table 1 Detection rate of *Campylobacter* by 2 methods

样品/份	空肠弯曲菌(国标法)		结肠弯曲菌(国标法)		空肠弯曲菌(双孔滤膜法)		结肠弯曲菌(双孔滤膜法)	
	检出数	检出率/%	检出数	检出率/%	检出数	检出率/%	检出数	检出率/%
新鲜禽肉(51)	9	17.65	11	21.57	21	39.22	22	43.14
冷冻禽肉(51)	5	9.80	4	7.84	6	11.76	6	11.76
总计(102)	14	13.725	15	14.705	27	26.47	28	27.45

综上所述, 本研究发现徐州市禽肉污染弯曲菌的状况不容乐观, 采用双孔滤膜法检测效率明显高于国标法, 提高了徐州市生禽肉中弯曲菌的检出率, 近些年来, 食品的检测方法不断改进, 有沙门氏菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌等检测的国家标准方法的变更; 对弯曲菌的检测方法也需要不断探索改进; 双孔滤膜法检测周期短, 可提高弯曲菌的检测效率并具可行性, 操作简便; 因此双孔滤膜法检测弯曲菌可在食品检测中得到广泛推广。

参考文献

- [1] TAYLOR EV, HERMAN KM, AILES EC, *et al.* Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997-2008 [J]. *Epidemiol Infect*, 2013, 141: 987-996.
- [2] KAAKOUSH NO, CASTAÑO-RODRÍGUEZ N, MITCHELL HM, *et al.* Global epidemiology of *Campylobacter* infection [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(3): 687-720.
- [3] NOHRA A, GRINBERG A, MIDWINTER AC, *et al.* Molecular epidemiology of *Campylobacter coli* strains isolated from different sources in New Zealand between 2005 and 2014 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82: 4363-4370.
- [4] COKER AO, ISOKPEHI RD, THOMAS BN, *et al.* human campylobacteriosis in developing countries [J]. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(3): 237-244.
- [5] ZHANG ZK, LAI SJ, YU JX, *et al.* Etiology of acute diarrhea in the elderly in China: A six-year observational study [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173881.
- [6] VERKADE E, ELBERTS S, VERHULST C, *et al.* Performance of Oxoid Brilliance TM MRSA medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An *in vitro* study [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009, 28(12): 1443-1446.
- [7] 李颖, 贾巧玲, 周贵兰, 等. 2016—2018年北京市顺义区成年人腹泻患者弯曲菌感染监测及病原学特征分析[J]. *疾病监测*, 2020, 35(1): 21-28.
LI Y, JIA QL, ZHOU GL, *et al.* 2016-2018 *Campylobacter* infection surveillance and pathogenic characteristics analysis of adult diarrhea patients in Shunyi district, Beijing [J]. *Dis Surveill*, 2020, 35(1): 21-28.
- [8] GB4789.9—2014 食品卫生微生物学检验-空肠弯曲菌检验[S].
GB4789.9—2014 Food hygiene microbiological examination-*Campylobacter jejuni* examination [S].
- [9] 熊海平, 张伟, 许海燕, 等. 增菌液及增菌时间对空肠弯曲菌检测率的影响[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 23: 3397-3399.
XIONG HP, ZHANG W, XU HY, *et al.* The effect of enrichment liquid and enrichment time on the detection rate of *Campylobacter jejuni* [J]. *Chin J Health Lab Tech*, 2014, 23: 3397-3399.
- [10] GANGAIAH D, KASSEM II, LIU Z, *et al.* Importance of polyphosphate kinase 1 for *Campylobacter jejuni* viable-but-nonculturable cell formation, natural transformation, and antimicrobial resistance [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(24): 7838-7849.
- [11] LI Y, ZHANG S, HE, *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Campylobacter* spp. isolated from patients with diarrhea in shunyi, Beijing [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 52.
- [12] 张茂俊, 顾一心, 李颖, 等. 空肠弯曲菌、结肠弯曲菌检验方法团体标准解读[J]. *中华流行病学杂志*, 2019, 40(9): 1052-1054.
ZHANG MJ, GU YX, LI Y, *et al.* Interpretation of the group standards for the test methods of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* [J]. *Chin J Epidemiol*, 2019, 40(9): 1052-1054.
- [13] QU M, ZHANG MJ, ZHANG X, *et al.* Molecular and epidemiological analysis of a *Campylobacter jejuni* outbreak in China, 2018 [J]. *J Infect Dev Count*, 2019, 13(12): 1086-1094.
- [14] 李颖, 梁昊, 王苗, 等. 北京市顺义区零售鸡胴体中弯曲菌分布与分子特征研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(4): 351-355.
LI Y, LIANG H, WANG M, *et al.* Distribution and molecular characteristics of *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Shunyi district, Beijing [J]. *Chin J Food Hyg*, 2019, 31(4): 351-355.
- [15] 李婵媛. 辽宁省首次在分割禽肉中分离出 2 株空肠弯曲菌[J]. *中国卫生检验杂志*, 2019, 9: 1066-1067.
LI CY. Two strains of *Campylobacter jejuni* were isolated from cut poultry meat for the first time in Liaoning province [J]. *Chin J Health Lab Tech*, 2019, 9: 1066-1067.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

余峰玲, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食源性致病菌的检测与研究。
E-mail: 1297721853@qq.com

童晶, 副主任技师, 主要研究方向为食源性致病菌的检测与研究。
E-mail: 53439716@qq.com