

扬州市市售鸡肉中弯曲菌定性定量流行病学分析

邹春香, 张海艳, 杨欣, 唐虹, 徐翔翔, 任方哲, 黄金林*

(农业部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室, 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州大学, 扬州 225009)

摘要: **目的** 调查分析超市和农贸市场零售鸡肉中弯曲菌定量污染水平, 为弯曲菌污染的定量风险评估、危害分析和防控提供数据。**方法** 选择扬州市内各大型超市和农贸市场作为采样点, 采取未分割的鸡胴体, 在3 h内送到实验室开展检测。运用选择性CCDA平板直接计数法对弯曲菌进行定量检测, 涂布平板法计数, 用PCR进行鉴定。**结果** 采集的40只整鸡, 检测出阳性样品19份, 平均阳性率为47.5%, 平均带菌量为229.2 CFU/g。其中超市的8份阳性整鸡中, 平均带菌量为28.3 CFU/g; 农贸市场的11份阳性整鸡中, 平均带菌量为313.6 CFU/g。共分离出56株弯曲菌, 其中空肠弯曲菌29株, 结肠弯曲菌23株, 其他弯曲菌4株。**结论** 定性及定量结果显示, 零售鸡中存在弯曲菌污染, 农贸市场的零售鸡肉比超市的零售鸡肉污染严重, 需要加强防控措施。

关键词: 弯曲菌; 鸡肉; 流行病学; 零售方式

Qualitative and quantitative epidemiological analysis of *Campylobacter* in chicken sold in Yangzhou

ZOU Chun-Xiang, ZHANG Hai-Yang, YANG Xing, TANG Hong, XU Xiang-Xiang,
REN Fang-Zhe, HUANG Jin-Lin*

(Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture of Jiangsu, Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

ABSTRACT: Objective To investigate and analyze the quantitative pollution levels of *Campylobacter* in retail chicken of agricultural markets and large supermarkets, in order to provide data for quantitative risk assessment, hazard analysis and prevention and control of *Campylobacter* contamination. **Methods** The large supermarkets and farm markets in Yangzhou were as sampling sites, undivided chicken carcasses were taken off and they were sent to laboratories for testing within 3 h. The CCDA plate direct counting method was used for quantitative detection of *Campylobacter*. Counting was made by coated plate method and identified by PCR. **Results** In the 40 collected samples, 19 positive samples were detected with the average positive rate of 47.5%. The average bacterial content

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0500500)、国家支撑计划项目(2014BAD13B02)、2017年江苏省重点研发计划(现代农业)项目(BE2017341)、江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(16)1028)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0500500), the Key Project of National Science and Technology Support Plan of China (2014BAD13B02), Key Research and Development Program (Modern Agriculture) Project of Jiangsu Province (BE2017341), and Jiangsu Province Agricultural Science and Technology Independent Innovation Funds (CX(16)1028)

***通讯作者:** 黄金林, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与动物疫病防治。E-mail: jinlin@yzu.edu.cn

***Corresponding author:** HUANG Jin-Lin, Ph.D, Professor, Collage of Life Science, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China. E-mail: jinlin@yzu.edu.cn

was 229.2 CFU/g. Of the 8 positive samples in supermarkets, the average amount of bacteria was 28.3 CFU/g, while among the 11 positive samples in the farmers' markets, and the average amount of bacteria was 313.6 CFU/g. A total of 56 strains of *Campylobacter* were isolated, including 29 strains of *Campylobacter jejunum*, 23 strains of *Campylobacter colon* and 4 strains of other *Campylobacter*. **Conclusion** *Campylobacter* contaminate the retail chicken, and the retail chicken in the farmers' market is more polluted than the retail chicken in the supermarket. Survey results indicate that there is a need for more interventions to minimize the exposure of consumers to *Campylobacter*.

KEY WORDS: *Campylobacter*; chicken; epidemiology; retail

1 引言

弯曲菌(*Campylobacter*)是一种螺旋形的革兰阴性微需氧菌,是导致人细菌性胃肠炎的主要病原菌。其中引起人类感染的主要是空肠弯曲菌和结肠弯曲菌,约 500~800 个细菌即使人感染^[1]。人感染弯曲菌后主要症状为腹泻、腹痛、发热和呕吐等,严重者可引起反应性关节炎和格林巴利综合症,甚至导致死亡^[2-4]。研究表明处理、食用生的或未煮熟的禽肉是人感染弯曲菌的主要原因^[5]。弯曲菌可寄居在禽类、牛、羊及狗等多种动物体内,感染的动物通常无明显病症,但可长期向外界排菌,引起人类感染。其中,家禽是弯曲菌病最重要的传染源^[6],通常认为肉鸡是弯曲菌的天然宿主,弯曲菌在鸡肠道内定殖量可高达 $10^6\sim 10^9$ CFU/g,并保持这种感染状态直至屠宰。欧洲鸡群中弯曲菌的平均流行率高达 70%,而世界各地从 2%~100%不等^[7]。此外由于屠宰过程中的交叉污染,肉鸡胴体的弯曲菌污染率更是高达 75%,减少肉鸡胴体表面的弯曲菌污染会显著降低人类弯曲菌病的罹患率^[8]。

为了有效预防控制弯曲菌疾病,了解不同零售环节中鸡肉弯曲菌的污染风险系数,为食品安全风险评估提供数据支持,本研究对扬州市的大型超市和农贸市场中出售零售鸡中弯曲菌污染状况进行了调查。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 样品采集

选择扬州市内各大型超市和农贸市场作为采样点,采取未分割的鸡胴体,置于无菌采样袋,记录采样地点、时间等详细信息,并在 3 h 内送到实验室开展检测。每个采样点(以 1 个超市或 1 个摊位为单位计算)取 10 个样品。

2.1.2 试剂与仪器

CCDA 培养基和 CCDA 培养基添加剂(英国 Oxoid 公司);缓冲蛋白胨水、MH 培养基、Brucella 培养基(美国 BD 公司);头孢哌酮(北京 LKT 公司);甲氧苄氨嘧啶、放线菌酮、多粘菌素 B、利福平(日本 Wako 公司);利福平、两性

霉素(美国 Wake 公司);头孢哌酮(美国 Fluka 公司);无菌脱纤维羊血(青岛日水生物技术有限公司);弯曲菌检测试剂盒(汇智泰康生物技术(北京)有限公司);其他常规试剂为国产或者进口分析纯试剂。

LY-DYCP-31CN 型 PCR 仪、电泳仪(北京六一仪器厂)、GelDoc 2000 凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)、Millipore 纯水仪、Milli-Q 低热原型(法国 Millipore 公司);微需氧产气袋、厌氧罐(日本 MGC 公司);HDPN-150 隔热式热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品处理

采样后的 2 h 内,向装有样品的采样袋中无菌操作加入灭菌缓冲蛋白胨水(按 500 mL/kg 的量加入),反复揉搓鸡胴体 10 min 左右(各个部位均要揉到,包括体腔内部和颈部开口处)。将样品的淋洗液充分混匀后,取 1 mL 加入试管中,另分别取 1 mL 和 0.1 mL 淋洗液,分别置于盛有 9 mL 和 9.9 mL 无菌生理盐水的试管中,并充分混匀。分别吸取鸡淋洗液原液、10 倍稀释液和 100 倍稀释液各 100 μ L,涂布于添加了 3 种抗生素的 CCDA 选择性培养基上,每个稀释度做 2 个平行,42 $^{\circ}$ C 微需氧培养(48 \pm 2) h。

2.2.2 平板计数

培养(48 \pm 2) h 后,选取合适的稀释度,观察菌落形态,对疑似弯曲菌数为 15~300 CFU/皿的平板进行计数。

2.2.3 分离纯化

参照 GB/T 4789.9-2008 进行弯曲菌分离纯化^[9],选取平均每皿可疑菌落数在 15~150 之间的稀释度,用接种针在同一稀释度的平板上挑取 5 个典型菌落,接种于 MH 血平板,42 $^{\circ}$ C 微需氧培养(48 \pm 2) h。

2.2.4 PCR 鉴定

参照 He 等^[10]的多重 PCR 方法进行鉴定,同时用国标方法 GB/T 4789.9-2008 进行比较^[9]。

2.2.5 阳性样品的带菌量计算

数出选取的某个稀释度的 2 块平板上的可疑菌落数,取平均值作为“平板上疑似弯曲菌菌落数”,乘以稀释度即为所涂原液中的可疑菌落数;按 500 mL/kg 的量加入缓冲

蛋白胨水,即向 1 g 鸡肉中加入了 0.5 mL 缓冲蛋白胨水;每个样品挑取 5 个典型菌落进行 PCR 鉴定,所以最终确认为弯曲菌数占可疑菌落的比例为“PCR 鉴定正确数/5”;带菌量(CFU/g)=平板上疑似弯曲菌菌落数×稀释度×0.5×PCR 鉴定正确数/5。

2.2.6 数据分析

运用 SPSS 12.0 软件对检测数据进行处理,用 *t* 检验分析计量资料,用 χ^2 检验分析计数资料,采用方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 提示差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 弯曲菌的污染状况

研究期间在超市和农贸市场各采集 10 份整鸡样品,共计 40 份。检测结果显示,40 份禽肉样品共检测出 19 份阳性样品,阳性率为 47.5%;其中超市样共 20 份,检出 8 份阳性样品,阳性率 40%;农贸市场样 20 份,检出 11 份阳性样品,阳性率 55%。经统计学分析,不同销售方式的整鸡中弯曲菌阳性检出率有显著差异($P < 0.05$)。超市之间无显著差异;各农贸市场之间无显著差异($P > 0.05$)。结果见表 1。弯曲菌定性检测结果显示,农贸市场样品中阳性率大于超市样品。

表 1 弯曲菌检测结果
Table 1 Detection results of *Campylobacter*

地点	阳性份数/只	阳性率/%
超市 A	3	37.5
超市 B	5	41.7
超市总计	8	40
农贸市场 D	6	54.5
农贸市场 E	5	55.6
农贸市场总计	11	55

3.2 弯曲菌定量检测分析

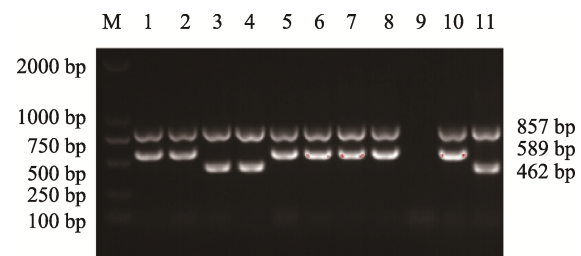
检测结果显示,19 份阳性样品中,平均带菌量为 229.2 CFU/g;超市的 8 份阳性整鸡中,平均带菌量为 28.3 CFU/g;农贸市场的 11 份阳性整鸡中,平均带菌量为 313.6 CFU/g。超市和农贸市场之间的阳性样品平均带菌量之间的差异极显著($P < 0.01$)。各超市之间阳性整鸡中平均带菌量无统计学差异($P > 0.05$),各农贸市场之间也无差异($P > 0.05$),结果见表 2。弯曲菌定量检测结果显示,农贸市场样品的带菌量大于超市样品。

3.3 菌株分离纯化和鉴定

采用多重 PCR 技术对国标方法检出的阳性样品进行菌株鉴定。通过琼脂糖凝胶电泳检测后,结果显示,能扩增出空肠弯曲菌,结肠弯曲菌条带。其结果如图 1。

表 2 各销售地点的弯曲菌阳性样品带菌量
Table 2 Quantitation of *Campylobacter* on positive samples in different markets

地点	阳性份数/只	带菌量/(CFU/g)
超市 A	3	31.6
超市 B	5	28.4
超市总计	8	28.3
农贸市场 D	6	447.3
农贸市场 E	5	324.1
农贸市场总计	11	313.6



注: M: DNA Maker DL2000; 10、11: 阳性对照; 9: 阴性对照
1、2、3、4、5、6、7、8: 阳性样品。

图 1 电泳结果

Fig. 1 Results of electrophoresis

通过琼脂糖凝胶电泳检测出 56 份菌株,其中空肠弯曲菌 29 株,结肠弯曲菌 23 株,其他弯曲菌 4 株,空肠弯曲菌检出率为 51.79%,结肠弯曲菌检出率为 41.07%。另有 4 份琼脂糖凝胶电泳时仅出现 23sRNA 的种特异性条带,未能用试剂盒确定所属种类。其中空肠弯曲菌的分离率最高,其次为结肠弯曲菌,二者占弯曲菌污染的主要部分。

4 结论与讨论

据调查,我国居民每次平均消费鸡肉 50 g,而弯曲菌的致病剂量比较低,人体一次性食入约 10^3 CFU 就足以发生胃肠炎,即鸡肉中弯曲菌的最低带菌量为 20 CFU/g 时可能致病。为了准确分析阳性整鸡的弯曲菌量,参照国家食品为了准确的分析阳性整鸡的弯曲菌量,将带菌量数值分为 < 10 CFU/g、 $[10$ CFU/g, 20 CFU/g)、 $[20$ CFU/g, 10^2 CFU/g)、 $[10^2$ CFU/g, 10^3 CFU/g)、 $> 10^3$ CFU/g 共 5 个区间。

定量检测结果分析显示,19 份阳性整鸡中,4 份弯曲菌带菌量小于 20 CFU/g,15 份弯曲菌带菌量达到或超过 20 CFU/g,比例高达 78.94%,其中超市的 8 份阳性样品中,6 份弯曲菌带菌量达到或超过 20 CFU/g,占超市阳性样品的 75%;农贸市场的 11 份阳性样品中,9 份弯曲菌带菌量达到或超过 20 CFU/g,占农贸市场阳性样品的 81.82%。达到了弯曲菌的致病数量,尤其是农贸市场的现宰杀整鸡污

染较为严重。

本研究选取扬州市区的超市以及农贸市场为采样点, 这两种销售地点是我国居民购买整鸡的主要场所, 具有一定的代表性。结果表明, 在所有样品中, 超市阳性样品的平均带菌量为 28.3 CFU/g, 农贸市场阳性样品的平均带菌量为 313.6 CFU/g, 二者存在显著差异, 农贸市场的鸡肉比超市的鸡肉污染更严重, 造成此现象的原因是多方面的。供应超市的整鸡一般来自规模较大的养殖场, 生物安全措施的落实比较到位, 肉鸡屠宰前的携带量就比较低^[11,12], 而且从屠宰到烹饪所经历的时间也比较短, 弯曲菌增殖缓慢甚至没有增殖, 如果各环节控制严格, 发生食物中毒的危险较低。而农贸市场现宰杀活禽后并无消毒这一环节, 加工过程中暴露出的肠内容物经常会导致弯曲菌经加工器具和其他禽体传播^[13], 造成弯曲菌污染严重。从本研究的鸡肉中分离到的弯曲菌主要为空肠弯曲菌和结肠弯曲菌, 它们与人类感染的关系最为密切^[14], 而且空肠弯曲菌几乎占据了美国报道病例的 88%^[15], 但并不意味着其他属的弯曲菌不会造成人类感染^[16]。

本研究首次对扬州市不同销售方式的零售整鸡进行了弯曲菌的定量流行病学研究, 这种对比的结果及这些污染水平的基础数据将为开展鸡肉弯曲菌定量风险评估以及制定有效的鸡肉源性弯曲菌病防治方针提供了一定的数据支持, 为有效预防控制弯曲菌疾病做准备。

参考文献

- [1] Black RE, Levine MM, Clements ML, et al. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans [J]. J Infect Dis, 1988, 157(3): 472-479.
- [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] Silva J, Leite D, Fernandes M, et al. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: A review [J]. Front Microbiol, 2011, 2: 1-12.
- [4] Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, et al. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms [J]. Int J Med Microbiol, 2010, 300(4): 205-211.
- [5] Havelaar AH, Haagsma JA, Mangen MJ, et al. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009 [J]. Int J Food Microbiol, 2012, 156(3): 231-238.
- [6] 黄金林, 许海燕, 郑国军, 等. 部分省市鸡群空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的流行状况分析[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(1): 72-75.
Huang JL, Xu HY, Zheng GJ, et al. Epidemiological survey of *Campylobacter* spp. in chickens in parts of China [J]. Prev Vet J China, 2008, 30(1): 72-75.
- [7] European Food Safety Association (EFSA). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008 [J]. EFSA J, 2010, 8(3): 1503-1504.
- [8] 张小燕, 唐梦君, 杜雪晴, 等. 家禽生产中弯曲菌防控技术研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(11): 4282-4287.
Zhang XY, Tang MJ, Du XQ, et al. Research progress on the control strategies against *Campylobacter* in poultry production [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(11): 4282-4287.
- [9] GB/T 4789.9-2008 食品卫生微生物学检验-空肠弯曲菌检验[S].
GB/T 4789.9-2008 Microbiological examination of food hygiene-Detection of *Campylobacter jejuni* [S].
- [10] He R, Huang JL, Xu HY, et al. Development and application of multiplex PCR assay for the detection of *Campylobacter* spp. [J]. J Yangzhou Univ (Agric Life Sci Ed), 2007, 28(1): 5-7.
- [11] Bolder NM, Wagenaar JA, Putirulan FF, et al. The effect of flavophospholipol (Flavomycin) and salinomycin sodium (SacoX) on the excretion of *Clostridium perfringens*, *Salmonella enteritidis*, and *Campylobacter jejuni* in broilers after experimental infection [J]. Poult Sci, 1999, 78: 1681-1689.
- [12] Hansson I, Engvall EO, Vågsholm I, et al. Risk factors associated with the presence of *Campylobacter* -positive broiler flocks in Sweden [J]. Prev Vet Med, 2010, 96(1): 114-121.
- [13] Ansari-Lari M, Hosseinzadeh S, Shekarforoush SS, et al. Prevalence and risk factors associated with campylobacter infections in broiler flocks in Shiraz, southern Iran [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 144(3): 475-479.
- [14] Kärenlampi R, Rautelin H, Schönbergnorio D, et al. Longitudinal study of finnish *Campylobacter jejuni* and *E. coli* isolates from humans, using multilocus sequence typing, including comparison with epidemiological data and isolates from poultry and cattle [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(1): 148-155.
- [15] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). FoodNet surveillance report for 2011 (final report) [Z]. 2012.
- [16] Ganan M, Silván JM, Carrascosa AV, et al. Alternative strategies to use antibiotics or chemical products for controlling *Campylobacter* in the food chain [J]. Food Control, 2012, 24: 6-14.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



邹春香, 主要研究方向为人兽共患病, 食品安全。
E-mail: 1091067099@qq.com



黄金林, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与动物疫病防治。
E-mail: Jinlin@yzu.edu.cn