

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54(1):14-23; 4 January 2014  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.01.003

## 华南四省食品中空肠弯曲菌分离株的毒力相关基因分析和 ERIC-PCR 分型

郑扬云<sup>1,2</sup>, 吴清平<sup>1\*</sup>, 吴葵<sup>1,3</sup>, 张菊梅<sup>1</sup>, 郭伟鹏<sup>1</sup>, 吴克刚<sup>2</sup>

<sup>1</sup>广东省微生物研究所, 广东省华南应用微生物重点实验室一省部共建国家重点实验室培育基地, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070

<sup>2</sup>广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006

<sup>3</sup>中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510632

**摘要:**【目的】了解空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*) 在华南四省食品中的污染状况及其遗传多样性, 为食源性病原菌的风险监测和控制提供基础数据。【方法】采用传统国标和 MPN 组合的方法对华南四省市售生鲜禽畜肉及其制品、生食蔬菜、熟食、水产品、速冻食品、奶制品、食用菌 7 大类食品进行 *C. jejuni* 污染调查, 对分离到的 *C. jejuni* 菌株进行 12 种毒力相关基因检测分析和 ERIC-PCR 分型。【结果】2011-2012 年共检测样品 558 份, 检出阳性样品 14 份, 检出率 2.51%, 其中肉与肉制品的检出率达 13.2%, 污染量达 8.77 MPN/g, 获得 *C. jejuni* 14 株。毒力相关基因分析显示 9 种毒力相关基因的携带率超过 50%, 而 *pldA* 和 *wlaN* 的携带率均为 14.3%, *virB11* 的携带率为 0。ERIC-PCR 分析结果显示 15 株 *C. jejuni* 可分为 3 簇共 10 种基因型, 其中簇 A 中有 4 株的指纹图谱基本相同。【结论】华南四省中的生鲜禽肉类样品, 存在不同程度的空肠弯曲菌污染, 尤其是福州的鸭肉样品, 其 MPN 值大于 110 MPN/g, 应加强生禽肉类的食品安全防控。

**关键词:**空肠弯曲菌, ERIC-PCR 分型, 毒力相关基因

**中图分类号:**Q938   **文献标识码:**A   **文章编号:**0001-6209(2014)01-0014-10

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*) 是一种人畜共患病原菌<sup>[1]</sup>, 是多种动物如禽类、牛、羊及狗的正常寄居菌, 在生殖道或肠道大量存在, 是重要的肠道病原菌, 可通过分娩或排泄物污染食物和饮水。该菌作为肠炎的病因仅次于沙门氏菌和志贺氏菌, 而且有超越之势, 世界卫生组织已将该菌引起的腹泻列为最常见的食源性传染病之一。

近年来我国对于食品中 *C. jejuni* 的污染极为重视, 加强了食品中空肠弯曲菌的监测分析, 如柳勤

2010 对广州天河区 7 大类食品中 *C. jejuni* 进行了调查研究<sup>[2]</sup>。另外, 一些学者还进行了专门的调查研究, 如罗铭等在 2010-2011 年期间开展了玉林市禽畜肉 *C. jejuni* 的专项污染状况调查<sup>[3]</sup>, 袁丹茅等 2010 年对龙岩市市售的 5 大类食品进行空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的监测<sup>[4]</sup>。但是目前食品中 *C. jejuni* 的污染调查都局限于单个省市的定性研究, 尚未见有进行华南四省食品中 *C. jejuni* 污染状况和污染水平调查的研究数据, 而且目前食品中空肠弯曲

基金项目: 国家国际科技合作专项(2013DFH30070); 广东省教育部产学研结合项目(2012B090400017)

\* 通信作者。Tel: +86-20-87688132; E-mail: wuqp203@163.com

作者简介: 郑扬云(1988-), 女, 安徽人, 硕士研究生, 研究方向为空肠弯曲菌污染调查及分布规律。E-mail: zyy88happy@126.com

收稿日期: 2013-04-19; 修回日期: 2013-09-22

菌的调查主要在于其中的禽肉类, 无法全面反映 *C. jejuni* 在食品中总的污染情况和污染水平。另外, 由于消费者食用携带 *C. jejuni* 的食物可导致感染, 而粘附、侵袭和毒素的产生可能是致病的重要因素。薛峰等<sup>[5]</sup> 2010 年对 113 株华东地区不同养殖场的禽畜源 *C. jejuni* 的 12 种独立相关基因的分布情况进行了分析, 为了解这些菌株的致病性提供了依据, 但迄今为止尚未见有华南四省不同食品的 *C. jejuni* 污染状况调查、携带毒力相关基因情况和分子分型的系统分析研究。

本实验室一直致力于食品微生物的安全检测和控制研究, 目前已经建立起了多种食源性病原微生物的分子检测方法<sup>[6-10]</sup>。为了解华南四省(广东、海南、福建、广西)食品中 *C. jejuni* 的污染状况, 我们于 2011 年 11 月-2012 年 8 月随机采集华南四省多家大型超市和农贸市场的 7 大类食品进行 *C. jejuni* 的污染调查, 为食品污染状况提供一些科学依据, 为 *C. jejuni* 检测打下基础。然后为了进一步了解 *C. jejuni* 分离株的遗传特性, 我们选择与粘附和定植相关的致病基因 *flaA*<sup>[11]</sup>、*racR*<sup>[12]</sup>、*cadF* 和 *dnaJ*<sup>[13]</sup>, 与侵袭相关的致病基因 *virB11*<sup>[14]</sup>、*imaA*<sup>[15]</sup>、*ciaB*<sup>[16-17]</sup> 和 *pldA*<sup>[13]</sup>, 编码毒素的 *cdtA*、*cdtB* 和 *cdtC* 基因<sup>[18-19]</sup> 以及与格林巴利综合征 (GBS) 相关的 *wlaN*<sup>[20]</sup> 基因, 对这些分离株进行毒力相关基因的检测和分析, 以得到这些菌株携带不同毒力相关基因的情况。同时采用本实验室前期建立的 ERIC-PCR 方法对分离到的 *C. jejuni* 菌株进行分子分型, 为建立 *C. jejuni* 指纹图谱库打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** *C. jejuni* 标准菌株 CICC22937。

**1.1.2 样品:** 随机采集华南四省(广东、海南、广西、福建) 11 个市(包括深圳、韶关、汕头、湛江、河源、海口、三亚、北海、南宁、福州、厦门) 超市和农贸市场的肉与肉制品(包括猪、鸡、鸭、牛、羊)、生食蔬菜、食用菌、速冻食品、奶制品、水产品、熟食 7 大类食品样品, 共 558 份样品。

**1.1.3 培养基和试剂:** 弯曲菌增菌肉汤 Bolton 肉汤、Bolton 肉汤抗生素添加剂(组分: 头孢哌酮钠、万古霉素、三甲氧苄胺嘧啶乳酸盐、两性霉素 B、多粘

菌素 B)、加血弯曲菌选择性琼脂-Skirrow 琼脂、Skirrow 琼脂抗生素添加剂(组分: 头孢哌酮、两性霉素 B、利福平、丙酮酸钠、焦亚硫酸钠、硫酸亚铁)、血平板、氧化酶试纸等均为广东环凯微生物科技有限公司生产; 无菌脱纤维羊血为广东环凯公司代购; API Campy 生化鉴定条和相关添加试剂为法国生物梅里埃公司产品; 基因组 DNA 快速提取试剂盒为广州东盛科技有限公司产品; 10 × PCR Buffer、dNTPs (2.5 mmol/L)、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 为天根生化科技(北京)有限公司产品; AL2000 为北京艾德莱生物科技有限公司产品; DL5000 为 TaKaRa 公司产品; 微需氧产气剂为日本三菱公司产品; 引物为华大基因合成。

**1.1.4 仪器:** 厌氧培养盒均为日本三菱公司产品; PCR 仪为德国 Biometra 公司产品; 电泳仪为瑞典安玛西亚公司产品; 凝胶成像系统为英国 GE Healthcare 公司产品。

### 1.2 菌株的分离纯化

由于 *C. jejuni* 的检出率较低, 所以参考国标 GB/T4789.9-2008<sup>[21]</sup> 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的 MPN 法检验程序<sup>[22]</sup> 进行检测。

**1.2.1 样品处理:** 无菌操作下将全部样品剪碎、混匀, 然后取 25 g 检样至 225 mL Bolton 肉汤混匀。

**1.2.2 选择性增菌:** 取 1:10 稀释液 10 mL 于空的无菌试管中, 平行 3 管; 取 1:10 稀释液 1 mL 于 9 mL Bolton 肉汤中, 平行 3 管; 另外取 1:10 稀释液 1 mL 于 9 mL 生理盐水中混匀, 然后取 1:100 稀释液 1 mL 于 9 mL Bolton 肉汤中, 平行 3 管。

**1.2.3 分离纯化:** 将肉汤置于 42℃ 微需氧培养 48 h, 然后将肉汤划线接种于 Skirrow 血琼脂平板, 42℃ 微需氧培养 48 h 后挑取灰色、湿润、扁平、沿线生长, 不规则圆形, 或单菌落呈灰色、凸起、沿线生长的可疑菌落转接到血平板上纯化培养, 42℃ 微需氧培养 48 h, 挑取血平板上生长的可疑菌落进行进一步鉴定。

### 1.3 菌的鉴定

**1.3.1 形态观察与染色:** 参照文献<sup>[23]</sup> 进行 Grams 染色, 并在光学显微镜下观察个体形态。

**1.3.2 API 试剂条法对 *C. jejuni* 菌株的鉴定:** 先取培养 24 h 的菌体加入 0.85% 生理盐水混匀, 将混有菌体的 0.85% 生理盐水分别加入第一部分试剂

盒各孔内,再取混有菌体的 0.85% 生理盐水加入 API Campy 培养基混匀,然后将混有菌体的 API Campy 培养基加入第二部分试剂盒各孔内,分别 37 h 静置于常规大气和微需氧条件下培养 24 h,观察试剂盒各孔颜色和浑浊度的变化。

**1.3.3 弯曲菌的多重 PCR 分子鉴定:**取 *C. jejuni* 和结肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 分离株的纯培养物于布氏肉汤中过夜培养,然后取 1 mL 过夜培养液用基因组 DNA 快速提取试剂盒提取 DNA, DNA -20℃ 保存备用。参照何蕊等<sup>[24]</sup> 针对弯曲菌属的 16S rDNA (16S<sub>1</sub> 5'-ATCTAAGGCTTAACCATTAAC-3', 16S<sub>2</sub> 5'-GGACGTAAGTACTAGTTTAGTATT-3', 长度为 857 bp)、*C. jejuni* 的 *mapA* 基因 (*mapA*<sub>1</sub> 5'-CTATTTTATTTTTGAGTGCTTGTG-3', *mapA*<sub>2</sub> 5'-GCTTTATTTGCCATTTGTTTTATTA-3', 长度为 589 bp) 序列设计的引物对分离得到的 *C. jejuni* 进行多重 PCR 鉴定,多重 PCR 反应体系 (25 μL) 为 10 × PCR Buffer 2.5 μL、2 对引物各 (10 μmol/L)

1 μL、dNTPs 2 μL、*Taq*DNA 聚合酶 0.5 μL、模板 2 μL,超纯水补齐。多重 PCR 反应程序为:94℃ 4 min;94℃ 30 s、59℃ 1 min、72℃ 1 min,30 循环;最后 72℃ 7 min。所得 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,然后在凝胶成像仪上观察结果。

**1.3.4 查阅 MPN 表:**根据以上试验确定 *C. jejuni* 阳性的管数,查阅 MPN 检索表<sup>[22]</sup> 得出样品 MPN 值 (*C. jejuni* 最大可能数)。

#### 1.4 毒力基因 PCR 扩增

合成 12 个毒力基因的引物:*cadF*<sup>[25]</sup>、*racR*<sup>[26]</sup>、*flaA*<sup>[27]</sup>、*cdtA*<sup>[27]</sup>、*cdtB*<sup>[26]</sup>、*cdtC*<sup>[26]</sup>、*wlaN*<sup>[20]</sup>、*virB11*<sup>[26]</sup>、*ciaB*<sup>[26]</sup>、*pldA*<sup>[26]</sup>、*dnaJ*<sup>[26]</sup> 和 *imaA*<sup>[28]</sup>。引物序列、反应条件见表 1,在凝胶成像仪上观察结果。

反应体系为 25 μL,其中含 *C. jejuni* 基因组 DNA 2 μL;10 × PCR Buffer 2.5 μL;10 μmol/L 上下游引物各 1 μL;2.5 U/μL *Taq*DNA 聚合酶为 0.4 μL;2.5 mmol/L dNTPs 4 μL;超纯水补齐。

表 1. 毒力相关基因的 PCR 引物序列

Table 1. PCR primers for virulence-associated genes detection

target gene	sequence (5'→3')	PCR products/bp	PCR reaction program
<i>cadF</i>	TTGAAGGTAATTTAGATATG CTAATACCTAAAGTTGAAAC	400	94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 45℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 cycles, 72℃ 10 min
<i>racR</i>	GATGATCCTGACTTTG TCTCCTATTTTTACCC	584	94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 45℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles, 72℃ 10 min
<i>flaA</i>	AATAAAAATGCTGATAAAAACAGGTG TACCGAACCAATGTCTGCTCTGATT	855	94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles, 72℃ 10 min
<i>cdtA</i>	CCTFGTGATGCAAGCAATC ACACTCCATTTGCTTTCTG	370	94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 cycles, 72℃ 10 min
<i>cdtB</i>	CAGAAAAGCAAATGGAGTGT AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT	620	94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles, 72℃ 10 min
<i>cdtC</i>	CGATGAGTAAAAACAAAAAGATA TTGGCATTATAGAAAATACAGTT	182	94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 57℃ 40 s, 72℃ 40 s, 30 cycles, 72℃ 10 min
<i>wlaN</i>	TAAAGAGCAAGATATGAAGGTG CCATTTGAATTGATTTTTTG	672	94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles, 72℃ 10 min
<i>virB11</i>	TCTGTGAGTTGCCTTACCCTTTT CCTGCCTGTCTGTGTTATTTACCC	494	94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 cycles, 72℃ 10 min
<i>ciaB</i>	TTTTTATCAGTCCTTA TTTCGGTATCATTAGC	986	94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 42℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 cycles, 72℃ 10 min
<i>pldA</i>	AAGCTTATGCGTTTTT TATAAGGCTTTCTCCA	913	94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles, 72℃ 10 min
<i>imaA</i>	GCACAAAATATATCATTACA TTCAGACTACTATGAGG	518	94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles, 72℃ 10 min
<i>dnaJ</i>	AAGGCTTTGGCTCATC CTTTTTGTCATCGTT	720	94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 46℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles, 72℃ 10 min

## 1.5 空肠弯曲菌分离株的 ERIC-PCR 分子分型

**1.5.1 引物的设计和合成:** 参考文献 Versalovic J 等<sup>[29]</sup>所述的 ERIC-PCR 扩增引物序列, 上游引物 ERIC1R: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' 和下游引物 ERIC2R: 5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGC G-3' 由华大基因公司合成。

**1.5.2 空肠弯曲菌的 ERIC-PCR 扩增:** 反应体系 25  $\mu$ L, 其中含 DNA 模板 1  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 引物各 2  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTPs 2.5  $\mu$ L、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L、10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L *Taq* DNA 酶 0.3  $\mu$ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min、94 $^{\circ}$ C 30 s、35 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 4 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min, 扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.5.3 DNA 多态性分析:** 记录 ERIC-PCR 电泳条带, 采用聚类软件 Gel-Pro Analyzer 4.0 进行计算分析并做遗传分析树状图。

## 2 结果

### 2.1 食品样品中空肠弯曲菌的污染状况

由表 2 可知, 558 份食品样品共检出 14 份阳性样品, 检出率为 2.51%。其中阳性样品全为肉与肉制品类, 检出率为 13.20%, 其它样品均未检出。

表 2. 食品样品中空肠弯曲菌的检出状况

Table 2. Prevalence of *C. jejuni* in seven kinds of foods

type	number of tested samples	number of positive samples	positive rate / %
Meat product	106	14	13.20
Vegetables	44	0	0
Edible fungi	99	0	0
Frozen food	77	0	0
Seafood	109	0	0
Cooked food	109	0	0
Dairy product	14	0	0
Total	558	14	2.51

### 2.2 禽畜类肉与肉制品中空肠弯曲菌的检出情况及 MPN 值

由表 3 可知, 肉与肉制品当中的鸭肉检出率较高, 达到 34.80%; 其次为鸡肉, 检出率为 27.40%; 其它牛、猪类样品均未检出。由表 4 可知, 阳性样品的 MPN 普遍低于 1 MPN/g, 表明样品中 *C. jejuni* 污染水平较低, 但是韶关、汕头和福州鸭肉样品的 MPN 大于 1 MPN/g, 其中福州鸭肉样品 MPN 大于 110 MPN/g, 表明其污染水平较高, 应加强食品安全

风险防控。

表 3. 肉与肉制品中空肠弯曲菌的检出状况

Table 3. Prevalence of *C. jejuni* in meat foods

type	number of tested samples	number of positive samples	positive rate / %
Pork	40	0	0
Beef	21	0	0
Chicken	22	6	27.30
Duck	23	8	34.80
Total	106	14	13.20

表 4. 空肠弯曲菌 MPN 检测试验结果

Table 4. Results of MPN detection of *C. jejuni*

No. of strain	source	MPN / g
<i>C. jejuni</i> (01)	Shaoguan Duck	3.60
<i>C. jejuni</i> (02)	Beihai Chicken	0.36
<i>C. jejuni</i> (03)	Fuzhou Duck	> 110
<i>C. jejuni</i> (04)	Zhanjiang Duck	0.30
<i>C. jejuni</i> (05)	Beihai Chicken	0.74
<i>C. jejuni</i> (06)	Beihai Duck	0.36
<i>C. jejuni</i> (07)	Nanning Chicken	0.30
<i>C. jejuni</i> (08)	Heyuan Chicken	0.30
<i>C. jejuni</i> (09)	Shantou Duck	3.60
<i>C. jejuni</i> (10)	Beihai Duck	0.92
<i>C. jejuni</i> (11)	Heyuan Duck	0.74
<i>C. jejuni</i> (12)	Shaoguan Chicken	0.62
<i>C. jejuni</i> (13)	Xiamen Chicken	0.92
<i>C. jejuni</i> (14)	Xiamen Duck	0.30
Average value		8.77

### 2.3 PCR 分子鉴定

分别以弯曲菌属的 16S rDNA、*C. jejuni* 的 *mapA* 基因序列合成的引物对 *C. jejuni* 进行多 PCR 分子鉴定 (图 1)。由图 1 可知, *C. jejuni* 出现大小为 857 bp 和 589 bp 大小的特异片段, 分别与对照的标准菌株的结果一致。将 PCR 鉴定结果与 API 生化鉴定结果进行比较, 两者一致。

### 2.4 空肠弯曲菌的毒力相关基因分析

由图 2 的 *C. jejuni* 分离株毒力相关基因分析显示, 黏附相关基因 *cadF* 和 *racR* 的携带率为 100%, 鞭毛蛋白基因 *flaA* 的携带率为 85.70%; 毒素调节基因 *cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 的携带率分别为 92.90%、100%、85.70%; *C. jejuni* 其脂多糖外核心寡糖 (LOS) 合成相关基因 *wlaN* 的携带率为 14.30%; 热休克蛋白和转运相关蛋白基因 *dnaJ* 的携带率为 92.90%; *ciaB* 和 *pldA* 的基因携带率分别为 57.10% 和 14.30%; 侵袭蛋白基因 *imaA* 的携带率分别为 71.40%; 质粒基因 *virB11* 的携带率为 0。不同来源的毒力相关基因统计 (表 5) 显示, 鸭源 *C. jejuni* 携

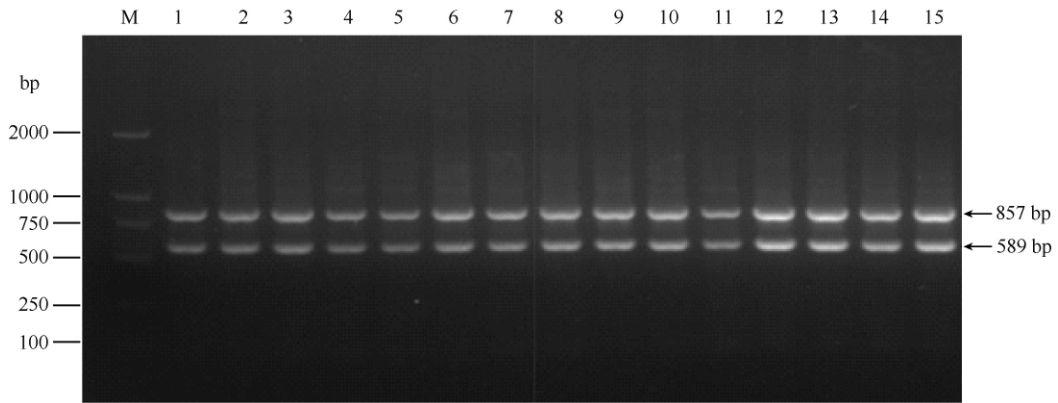


图 1. 分离株及标准株多重 PCR 电泳图

Figure 1. Multiplex PCR products for identification of *Campylobacter* isolates and standard strains. M: AL2000; lane 1 – 14: *C. jejuni* isolates; lane 15: *C. jejuni* standard strains CICC22937.

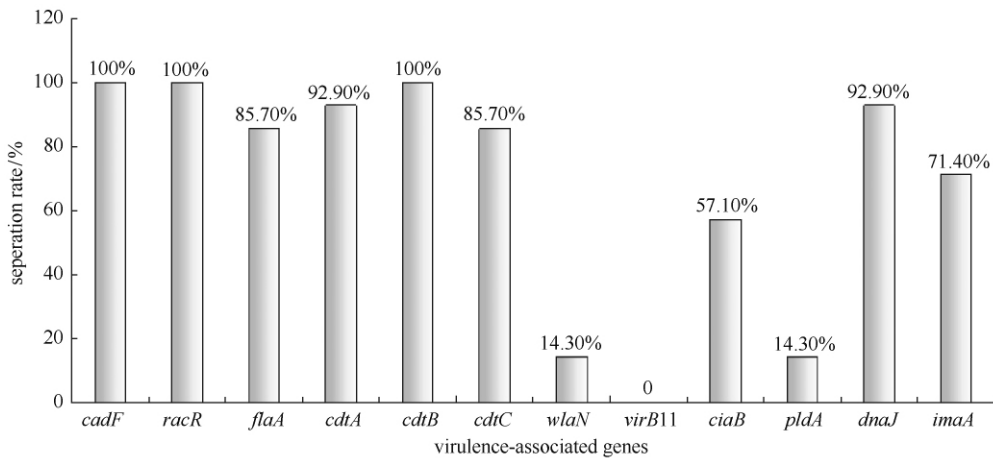


图 2. 空肠弯曲菌毒力相关基因检测结果

Figure 2. Test results of virulence-associated genes in *C. jejuni* isolates.

表 5. 不同来源 *C. jejuni* 毒力相关基因的携带率 (%)

Table 5. The percentage of virulence-associated genes in *C. jejuni* isolates from different sources (%)

virulence-associated genes	chicken	duck
<i>cadF</i>	100	100
<i>racR</i>	100	100
<i>flaA</i>	100	75
<i>cdtA</i>	100	87.50
<i>cdtB</i>	100	100
<i>cdtC</i>	100	75
<i>wlaN</i>	0	25
<i>virB11</i>	0	0
<i>ciaB</i>	83.30	37.50
<i>pldA</i>	0	25
<i>dnaJ</i>	100	87.50
<i>imaA</i>	83.30	62.50

带有 *virB11* 以外的所有毒力相关基因。其中 *cadF*、*racR* 和 *cdtB* 的携带率较高,均达到 100%;鸡源 *C.*

*jejuni* 未检出 *virB11*、*wlaN* 和 *pldA* 基因, *cadF*、*racR*、*flaA*、*cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 和 *dnaJ* 的携带率均达到 100%。

## 2.5 空肠弯曲菌的 ERIC-PCR 分子分型

将分离得到的 *C. jejuni* 分离株和 CICC22937 的 DNA 模板进行 ERIC-PCR 扩增、电泳,ERIC-PCR 指纹图谱显示每株菌产生 4–9 条条带,大小在 250–3000 bp,如图 3 所示。将电泳结果用聚类软件进行分析(图 4),软件分析显示 15 株空肠弯曲菌表现为 10 种基因型,分成 3 簇,簇 A 包含 12 株菌,相似性在 59%–100%。其中菌株 C2、V5、V6、V10 来源于同一个地区不同样品,且具有相同的指纹图谱,按照相似度在 80% 以上的菌株认为是相同的菌株或同一来源菌株,表明这 4 株菌可能为同一株菌。另外 C1 和 V13、V8 和 V12 分别为同一支,表明它们可能

为同类菌株,但它们分别来自不同的样品,说明这两类样品受到同一来源菌株的污染。簇 B 包含 2 株菌,来源于不同地区不同样品,相似性在 75% - 80% 之间,表明这 2 株菌亲缘关系较远。标准菌株 CICC22937 单独成簇,其与簇 A 和簇 B 菌株之间的

相似性小于 59%,表明其与这 2 簇菌株之间的亲缘关系远。

通过分析可以发现 ERIC-PCR 基于基因组上的特定重复序列能够很好地把不同来源的 *C. jejuni* 菌株进行区分和归类,进而达到溯源的目的。

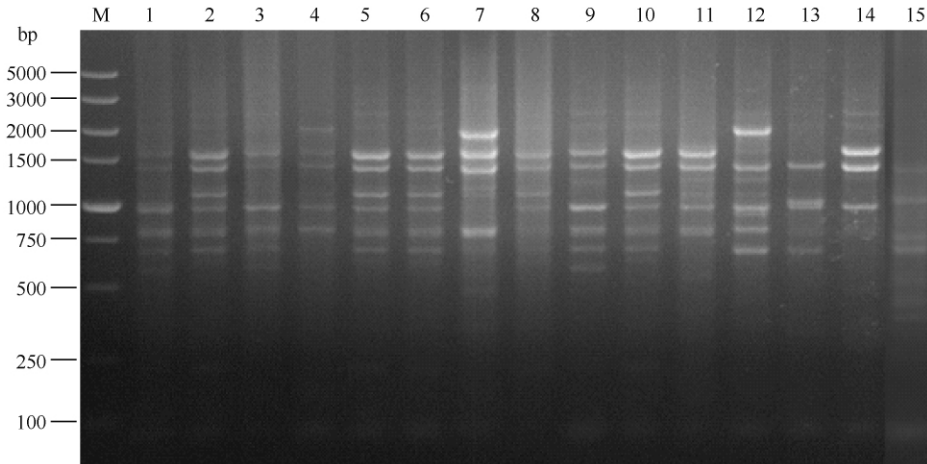


图 3. 空肠弯曲菌 ERIC-PCR 电泳图

Figure 3. The subtype of ERIC-PCR for *C. jejuni*. Note: M: DL5000 marker; 1 - 14: ERIC-PCR profiles of *C. jejuni* from different sources; 15: ATCC33291.

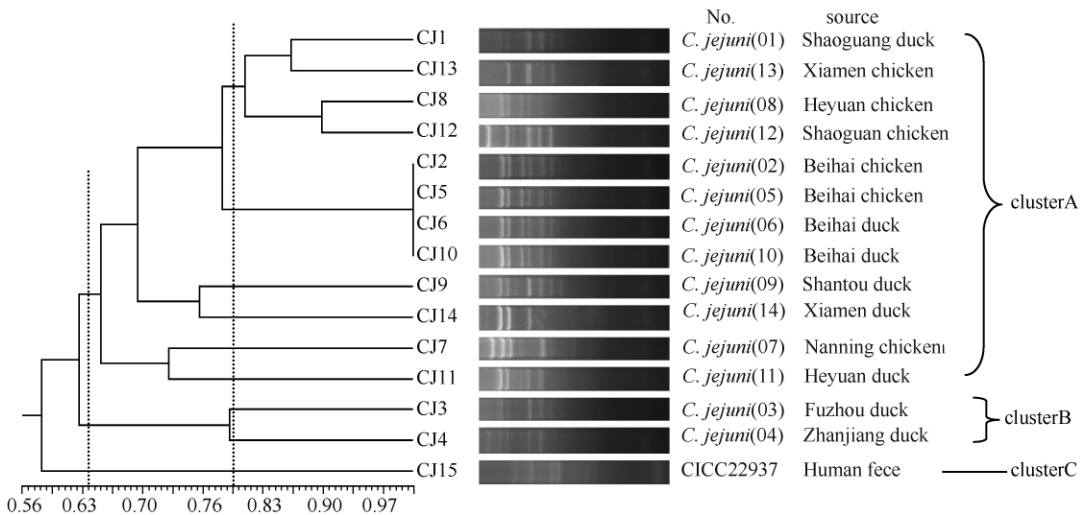


图 4. 空肠弯曲菌分离株 ERIC-PCR 分型结果

Figure 4. Results of ERIC-PCR typing of *C. jejuni* strains.

### 3 讨论

本研究通过对华南四省的污染调查,在 22 份鸡肉中 6 份检出 *C. jejuni*,阳性率达到 27.30%;23 份鸭肉中 8 份检出 *C. jejuni*,阳性率达到 34.80%,肉

与肉制品的阳性率为 13.20%,其平均 MPN 值为 8.77 MPN/g,其中来源于福州的鸭肉样品的 MPN 值大于 110 MPN/g。国外研究报道肉类制品的 *C. jejuni* 检出率为 15.10% - 57%,而近年来国内报道肉类制品 *C. jejuni* 检出率低于 15.10%,国内某些省份如福建省肉类 *C. jejuni* 检出率为 6.72%<sup>[30]</sup>,龙

岩市肉类样品中 *C. jejuni* 的检出率为 11.80%<sup>[4]</sup>, 本次调查中肉类样品阳性率为 13.20%。7 大类样品 *C. jejuni* 总阳性率为 2.51%, 低于目前已有相似种类样品污染调查研究<sup>[2]</sup>, 本次调查中样品总阳性率较低, 可能与样品种类有关, *C. jejuni* 生长条件苛刻, 主要存在于温血动物体内, 而水产品、食用菌类和蔬菜类等食品的污染率极低; 也可能是因为采集的样品出售前经过检验检疫和比较规范严格的卫生管理, 所以比较干净; 也可能与样品未能及时送检有关, 由于样品采集的地点较远, 造成抽样、送样到检测过程间隔超过 12 h, 甚至超过 1 d 时间, 期间样品又未进行保菌处理, 在此环境下, 容易造成 *C. jejuni* 死亡, 从而导致阳性检出率低; 另外, 由于本次调查不仅想知道食品中 *C. jejuni* 存在情况, 还想知道 *C. jejuni* 的污染水平, 因此检测时没有进行传统国标中的前增菌过程, 这就导致那些本来污染率就极低的样品无法检出, 出现假阴性情况。另外, 本次调查中鸡肉和鸭肉的阳性率较高而猪肉、牛肉无检出, 表明家禽是 *C. jejuni* 的主要传染源, 应采取从农场到餐桌的全程控制, 对禽肉食品加工过程采用危害分析与关键控制点 (HACCP) 方法, 减少 *C. jejuni* 污染。家庭应注意厨房卫生, 避免禽肉对熟食的交叉污染, 不吃生的或未熟透的禽肉, 注意饮水安全, 避免与带菌动物直接接触, 减少感染的机会。

虽然迄今为止人们对 *C. jejuni* 的致病机理尚未完全明了, 但是粘附、侵袭和毒素的产生是 *C. jejuni* 致病的重要因素, 已有研究证实了一些与该菌致病性相关的基因及调控机制。本文选择了国内外研究较多的 12 种相关基因, 对华南四省 14 株不同来源的 *C. jejuni* 分离株毒力相关基因的携带情况进行了调查分析。Konkel 等<sup>[25]</sup> 和 Brás 等<sup>[12]</sup> 研究结果表明, *cadF* 和 *racR* 在 *C. jejuni* 与宿主细胞的粘附和定植过程中起重要作用, 广泛存在于 *C. jejuni* 中, 本研究中这两种基因的平均携带率高达 100%。鞭毛蛋白 *flaA* 基因为 *C. jejuni* 粘附、侵袭和定植宿主肠道细胞必需的, 与细菌的侵袭力和致病性存在密切关系。本文中 *flaA* 的携带率为 85.7%, 略低于已有研究<sup>[31]</sup>。细胞溶胀毒素 CDT 可使非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞) 和海拉细胞 (HeLa 细胞) 膨胀, 2-4 d 后发生崩解, 其基因簇由 *cdtA*、*cdtB* 和 *cdtC* 组成, 而这 3 个基因在不同菌株中的分布也不尽一致。本研究中 *cdtA*、*cdtB* 和 *cdtC* 的携带率分别为 92.90%、

100% 和 85.70%。有研究证实作为 *C. jejuni* 主要毒力因子之一的 pVir 质粒上的 *virB11* 的突变能引起细菌的粘附与侵袭率的下降<sup>[13]</sup>, 而本研究中所有 *C. jejuni* 均没有携带 *virB11*, 其原因有待于进一步探讨。本次调查中, 鸭源 *C. jejuni* 毒力相关基因的携带率普遍大于鸡源 *C. jejuni* 的。另外, 83.30% 的 *C. jejuni* 分离株同时含有 8 个以上毒力基因, 这些结果表明本研究获得的 *C. jejuni* 分离株可能具有较强的致病性。

国内外研究显示, ERIC-PCR 作为一种分子分型手段有着不逊于 RAPD-PCR、RFLP、PFGE、MLST 等其他分型技术的分辨力, 可以满足对 *C. jejuni* 及其他致病菌进行鉴定分型的要求<sup>[32]</sup>。本次研究选择 1 对国际上广泛使用的引物进行 ERIC-PCR 分型, 对 14 株不同来源的 *C. jejuni* 样本进行 ERIC-PCR 分析, 共得到了 9 个基因型, 显示了良好的分辨力。分析结果显示 14 株 *C. jejuni* 分为两簇, 按照相似度在 80% 以上的菌株认为是相同的菌株或同一来源菌株, 簇 A 中 C1 和 V13、V8 和 V12 分别具有很近的亲缘性。这些结果表明本研究前期建立的 ERIC-PCR 技术可应用于 *C. jejuni* 分离株的分子分型。

## 参考文献

- [1] Ekdahl K, Normann B, Andersson Y. Could flies explain the elusive epidemiology of Campylobacteriosis. *BMC Infectious Diseases*, 2005, 5: 11.
- [2] Liu Q. Surveillance of foodborne pathogens in Tianhe district of Guangzhou in 2010. *Contemporary Medicine*, 2011, 17(34): 157-158. (in Chinese)  
柳勤. 2010 年广州天河区食源性致病菌监测. 当代医学, 2011, 17(34): 157-158.
- [3] Luo M, Liang J, Jiang N, Ye R, Lu Y, Song B, Zhang Y, Ye X. Special surveillance and analysis of farming and slaughtering process of poultry and livestock in Yulin city in 2010-2100. *Occupation and Health*, 2012, 28(16): 1979-1981. (in Chinese)  
罗铭, 梁炯明, 蒋宁, 叶瑞国, 陆运龙, 宋斌, 张耀平, 叶晓燕. 玉林市 2010-2011 年禽、畜养殖和屠宰过程专项监测分析. 职业与健康, 2012, 28(16): 1979-1981.
- [4] Yuan D, Jin J, Liu S. Surveillance of *Campylobacter*

- jejuni* and *Campylobacter coli* in five kinds of food in Longyan city. *Journal of Preventive Medicine Informat*, 2010, 26 (3) : 182 - 184. (in Chinese)
- 袁丹茂, 金建潮, 刘素意. 龙岩市 5 类食品中空肠和结肠弯曲菌监测. *预防医学情报杂志*, 2010, 26 (3) : 182-184.
- [5] Xue F, Xu F, Zhang X, Zhu C, Luan J, Jiang Y, Lu C. RAPD-PCR molecular typing and virulence-associated gene analysis of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2010, 18 (3) : 586-591. (in Chinese)
- 薛峰, 徐飞, 张小荣, 祝长春, 栾军, 蒋原, 陆承平. 空肠弯曲菌 RAPD-PCR 分子分型及其毒力相关基因分析. *农业生物技术学报*, 2010, 18 (3) : 586-591.
- [6] Xu X, Wu Q, Zhang J, Deng M, Zhou Y. Studies on specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods by duplex PCR. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2009, 19 (6) : 1199-1221. (in Chinese)
- 徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 邓梅清, 周艳红. 食品中单核细胞增生李斯特菌特异性二重 PCR 检测方法的研究. *中国卫生检验*, 2009, 19 (6) : 1199-1221.
- [7] Xu X, Wu Q, Zhang J, Zhou Y, Yang X. Studies on specific detection of *Shigella* spp. in foods by duplex PCR. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2010, 20 (11) : 2667-2670. (in Chinese)
- 徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 周艳红, 杨小鹃. 食品中志贺菌特异性二重 PCR 检测方法的研究. *中国卫生检验*, 2010, 20 (11) : 2667-2670.
- [8] Xu X, Wu Q, Zhang J, Zhou Y, Yang X. Studies on detection of *Staphylococcus aureus* in foods by multiplex PCR. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30 (1) : 84-89. (in Chinese)
- 徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 周艳红, 杨小鹃. 食品中金黄色葡萄球菌多重 PCR 检测方法的研究. *食品与生物技术学报*, 2011, 30 (1) : 84-89.
- [9] Zhang S, Wu Q, Xu X, Zhang J, Guo W. The application of loop mediated isothermal amplification (LAMP) technique for rapid detection of *Enterobacter sakazakii*. *Food & Machinery*, 2011, 27 (5) : 111-114. (in Chinese)
- 张淑红, 吴清平, 徐晓可, 张菊梅, 郭伟鹏. LAMP 法在阪崎肠杆菌快速检测中的应用. *食品与机械*, 2011, 27 (5) : 111-114.
- [10] Fan H, Wu Q, Liu H, Long B. Establishment of a LAMP method in detecting *Enterobacter sakazakii* and its comparison with PCR. *Modern Preventive Medicine*, 2012, 39 (2) : 383-385. (in Chinese)
- 范宏英, 吴清平, 刘欢, 龙北国. LAMP 法和 PCR 法快速检测阪崎肠杆菌的比较. *现代预防医学*, 2012, 39 (2) : 383-385.
- [11] Nuijten PJ, van den Berg AJ, Formentini I, van der Zeijst BA, Jacobs AA. DNA rearrangements in the flagellin locus of an *flaA* mutant of *Campylobacter jejuni* during colonization of chicken ceca. *Infection and Immunity*, 2000, 68 (12) : 7137-7140.
- [12] Brás AM, Chatterjee S, Wren BW, Newell DG, Ketley JM. A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (10) : 3298-3302.
- [13] Ziprin RL, Young CR, Byrd JA, Stanker LH, Hume ME, Gray SA, Kim BJ, Konkel ME. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. *Avian Diseases*, 2001, 45 (3) : 549-557.
- [14] Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, Hu L, Kopecko DJ, Ewing CP, Trust TJ, Guerry P. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infection and Immunity*, 2000, 68 (8) : 4384-4390.
- [15] Carvalho AC, Ruiz-Palacios GM, Ramos-Cervantes P, Cervantes LE, Jiang X, Pickering LK. Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39 (4) : 1353-1359.
- [16] Konkel ME, Kim BJ, Rivera-Amill V, Garvis SG. Identification of proteins required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Advances in Experimental Medicine and Microbiology*, 1999 (473) : 215-224.
- [17] Rivera-Amill V, Kim BJ, Seshu J, Konkel ME. Secretion of the virulence-associated campylobacter invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *Infectious and Diseases*, 2001, 183 (11) : 1607-1616.
- [18] Purdy D, Buswell CM, Hodgson AE, McAlpine K, Henderson I, Leach SA. Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medicine and Microbiology*, 2000, 49 (5) :



- 473-479.
- [19] Lara-Tejero M, Galán JE. CdtA, CdtB, CdiC from a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infection and Immunity*, 2001, 69 (7) : 4358-4365.
- [20] Linton D, Gilbert M, Hitchen PG, Dell A, Morris HR, Wakarchuk WW, Gregson NA, Wren BW. Phase variation of a  $\beta$ -1, 3 galactosyltransferase involved in generation of the ganglioside GM1-like lipo-oligosaccharide of *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, 2000, 37 (3) : 501-514.
- [21] 全国标准化委员会. GB/T 4789.9-2008 食品卫生微生物学检验. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [22] 全国标准化委员会. GB/T 4789.10-2010 食品卫生微生物学检验. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [23] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986, 65-70, 178-180.
- [24] He R, Huang J, Xu H, Su J, Pan Z, Jiao X. Development and application of multiplex PCR assay for the detection of *Campylobacter* spp.. *Journal of Yangzhou University*, 2007, 28 (1) : 5-8. (in Chinese)  
何蕊, 黄金林, 许海燕, 苏洁, 潘志明, 焦新安. 弯曲菌多重 PCR 检测方法的建立及其初步应用. 扬州大学学报, 2007, 28 (1) : 5-8.
- [25] Konkel M, Gray S, Kim B, Garvis S, Yoon J. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37 (3) : 510-517.
- [26] Datta S, Niwa H, Itoh K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *Journal of Medical Microbiology*, 2003, 52 (4) : 345-348.
- [27] Hickey TE, McVeigh AL, Scott DA, Michielutti RE, Bixby A, Carroll SA, Bourgeois AL, Guerry P. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 2000, 68 (12) : 6535-6541.
- [28] Müller J, Schulze F, Müller W, Hänel I. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Veterinary Microbiology*, 2006, 113:123-129.
- [29] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19 (24) : 6823-6831.
- [30] Yang Q, Ma Q, Chen W, Hong J, Lin S. Surveillance and analysis on food contamination by *C. jejuni* and *C. coli* in Fujian province from 2003 to 2005. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2009, 19 (1) : 15-18. (in Chinese)  
杨毓环, 马群飞, 陈伟伟, 洪锦春, 林升清. 福建省 2003-2005 年食品中空肠和结肠弯曲菌的监测与分析. 中国食品卫生杂志, 2009, 19 (1) : 15-18.
- [31] Zhang M, Gu Y, Ran L, Zhang J. Multi-PCR identification and virulence genes detection of *Campylobacter jejuni* isolated from China. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2007, 28 (4) : 377-380. (in Chinese)  
张茂俊, 顾一心, 冉陆, 张建新. 空肠弯曲菌多重聚合酶链反应基因鉴定及其独立相关基因分析. 中华流行病学杂志, 2007, 28 (4) : 377-380.
- [32] Jia A, Li C, Wang G, Yang D. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of ERIC-PCR. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30 (3) : 337-339. (in Chinese)  
贾爱卿, 李春玲, 汪贵平, 杨冬霞. 副猪嗜血杆菌 ERIC-PCR 指纹图谱多样性研究. 中国兽医学报, 2010, 30 (3) : 337-339.

# Virulence-associated gene detection and ERIC-PCR typing of *Campylobacter jejuni* strains isolated from foods in four Southern Chinese provinces

Yangyun Zheng<sup>1,2</sup>, Qingping Wu<sup>1\*</sup>, Kui Wu<sup>1,3</sup>, Jumei Zhang<sup>1</sup>, Weipeng Guo<sup>1</sup>, Kegang Wu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Guangdong Institute of Microbiology; State Key Laboratory of Applied Microbiology, Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base, South China; Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application; Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology; Guangzhou 510070, Guangdong Province, China

<sup>2</sup> Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

<sup>3</sup> South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

**Abstract:** [Objective] To know food contamination and genetic diversity of *Campylobacter jejuni* in four provinces of South China, and to provide data for *C. jejuni*-associated foodborne disease prevention and control. [Methods] According to the national standard and the most probable number (MPN) method, we detected the contamination of *C. jejuni* from 558 food samples including vegetables, meat product, cooked food, seafood, frozen food, dairy product and edible fungi during 2011 and 2012. The isolates were used to detect 12 virulence-associated genes with PCR methods and construct ERIC-PCR fingerprints. [Results] Fourteen positive samples were determined from 558 samples, and all positive samples come from meat product samples. The average value of MPN of positive samples was 8.77 MPN/g. Virulence-associated gene analysis reveals that more than 50% of the *C. jejuni* isolates had at least 9 virulence genes. Interestingly, *virB11* gene was not found and the genes of *pldA* and *wlaN* were 14.30% in all isolates. Total of 15 *C. jejuni* isolates could be divided into 10 genotypes belonging to 3 clusters by ERIC-PCR fingerprints. [Conclusion] Meat product was the main source of *C. jejuni* food contamination in four provinces of South China. More control measures must be taken to avoid *C. jejuni* contamination.

**Keywords:** *Campylobacter jejuni*, ERIC-PCR typing, virulence-associated genes

(本文责编: 张晓丽)