

衡阳市生畜肉及熟肉制品中沙门菌血清型、分子分型及耐药性研究

颜淑妩¹, 曹赛红², 周奇文¹, 李晟¹, 陈帅³, 陈丽丽²

1. 衡阳市疾病预防控制中心, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学衡阳医学院/公共卫生学院, 湖南 衡阳 421001;
3. 湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005

摘要: 目的 了解 2021 年衡阳市生畜肉及熟肉制品中沙门菌污染状况, 分析沙门菌血清型分布、分子分型特征及耐药情况。方法 采集衡阳市各县区生畜肉及熟肉制品样品, 依照 GB4789.4 进行沙门菌分离鉴定和血清分型; 采用美国临床和实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的微量肉汤稀释法进行药物敏感试验; 用脉冲场凝胶电泳 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 进行分子分型, 结果用 BioNumerics 软件聚类分析。结果 从 52 份生畜肉中检出 18 株沙门菌, 检出率为 34.62% (18/52), 52 份熟肉制品中检出 3 株沙门菌, 检出率为 5.77% (3/52); 21 株沙门菌可分为 7 个血清型, 其中伦敦沙门菌 42.86% (9/21) 和罗森沙门菌 19.05% (4/21) 占主要优势; 21 株沙门菌均对亚胺培南 (IPM) 和多粘菌素 E (CT) 敏感, 对萘啶酸 (NAL)、头孢噻肟 (CTX)、头孢西丁 (CFX)、头孢他啶 (CAZ) 敏感度均达 90.00% 以上, 对四环素 (TET)、氨苄西林 (AMP)、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑 (SXT) 耐药达 50.00% 以上, 多重耐药严重, 最常见的耐药谱为四环素-氨苄西林-甲氧苄啶/磺胺甲噁唑 (TET-AMP-SXT), 耐药率为 52.38%; 21 株沙门菌 PFGE 聚类分析相似度为 48.20%, 罗森、伦敦沙门菌带型最为集中, 但鼠伤寒沙门菌呈现多样性; 各带型与耐药谱之间未见明显相关。结论 衡阳市生畜肉及熟肉制品沙门菌污染及耐药问题严重, 血清型分布广泛, 同一血清型大部分菌株 PFGE 型可聚集成簇。

关键词: 生畜肉; 熟肉制品; 沙门菌; 血清型; PFGE 分子分型; 耐药性

中图分类号: R155.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2023)03-0266-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2023.03.003

Serotype, molecular typing and drug resistance of *Salmonella* in raw livestock meat and cooked meat products in Hengyang City

YAN Shu-wu¹, CAO Sai-hong², ZHOU Qi-wen¹, LI Sheng¹, CHEN Shuai³, CHEN Li-li²

1. Hengyang Municipal Center for Disease Control and Prevention, Hengyang, Hunan 421001, China;
2. School of Public Health/Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China;
3. Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China

Corresponding author: CHEN Shuai, E-mail: 241890558@qq.com

Abstract: Objective To understand the contamination status of *Salmonella* in raw livestock meat and cooked meat products in Hengyang City in 2021, and to analyze the serotype, molecular typing characteristics and drug resistance of *Salmonella*.

Methods Samples of raw livestock meat and cooked meat products were collected in all counties and districts of Hengyang City, and *Salmonella* was isolated, identified and serotyped according to GB4789.4. The micro broth dilution method recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) was used for drug sensitivity test. Molecular typing was performed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), and the results were analyzed by BioNumerics software. **Results** Eighteen strains of *Salmonella* were detected from 52 samples of raw livestock meat, and the detection rate was 34.62% (18/52). 3 strains of *Salmonella* were detected from 52 samples of cooked meat products, and the detection rate was 5.77% (3/52). 21 strains of *Salmonella* were divided into 7 serotypes, of which *Salmonella* London (42.86%, 9/21) and *Salmonella* Rissen (19.05%, 4/21) were dominant serotypes. All the 21 strains of *Salmonella* were sensitive to imipenem (IPM) and polymyxin E (CT). The drug susceptibility rates of the *Salmonella* strains to nalidixic acid (NAL), cefotaxime (CTX), cefoxitin (CFX) and ceftazidime (CAZ) were more than 90.00%, and those to tetracycline (TET), ampicillin (AMP) and trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) were more than 50.00%. Multidrug resistance was fairly serious. The most common drug resistance spectrum was tetracycline-ampicillin-trimethoprim/sulfamethoxazole (TET-AMP-SXT), and the drug resistance rate was 52.38%. PFGE cluster analysis of

作者简介: 颜淑妩 (1975-), 女, 湖南衡南县人, 本科学历, 主任技师, 主要从事微生物检验工作。

通信作者: 陈帅, E-mail: 241890558@qq.com。

the 21 strains of *Salmonella* showed a similarity of 48.20%. The bands of Rissen and London serotypes were the most concentrated, but *Salmonella typhimurium* showed diversity. There was no significant correlation between each band pattern and drug resistance spectrum. **Conclusion** Contamination and drug resistance of *Salmonella* in raw livestock meat and cooked meat products in Hengyang City are serious, and the serotypes are widely distributed. The PFGE types of most strains of the same serotype can be clustered.

Keywords: raw livestock meat; cooked meat product; *Salmonella*; serotype; PFGE molecular typing; drug resistance

沙门菌广泛存在于自然界,是全球食源性腹泻最常见的病原菌之一,动物肉类是人沙门菌感染的主要来源^[1]。迄今为止世界上已鉴定出 2 500 多个沙门菌血清型,不同血清型沙门菌的致病性和耐药性不同,加之抗生素的不合理使用,沙门菌耐药现象呈不断上升趋势。为了解衡阳市食品中沙门菌污染状况及分布,本研究对 2021 年衡阳市各市区生畜肉和熟肉制品进行沙门菌检测,并对 21 株沙门菌进行血清学分型、分子分型及耐药分析,为衡阳市食品沙门菌污染防控及溯源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 随机采集衡阳市各县市区农贸市场、百货商场、超市、零售店、零售加工店、批发市场等地的生畜肉及熟肉制品各 52 份。其中生畜肉包括冻牛肉 5 份,鲜牛肉 3 份,冷牛肉 6 份,鲜猪肉 17 份,冷猪肉 10 份,鲜羊肉 6 份和冻羊肉 5 份。

1.1.2 试剂及标准菌株 沙门菌分离培养的 BPW、TTB、SC、XLD、XLT4、BS、SWARM、营养琼脂均购自广东环凯微生物科技有限公司;沙门菌鉴定试剂质谱样本预处理试剂购自郑州安图生物有限公司,革兰氏阴性细菌鉴定卡 21341 购自生物梅里埃有限公司;沙门菌血清分型试剂购自宁波天润生物药业有限公司及 S&A REAGENTS LAB. BANGKOK. THAILAND;脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)分子分型试剂限制性内切酶 *Xba*I 购自 Takapa 公司,proteinase K 购自 SIGMA 公司,Gelred 购自美国Biotium公司;革兰阴性需氧菌药敏检测板购自上海复星长征医学科学有限公司。沙门菌 H9812、大肠埃希氏菌 ATCC25922 均由湖南省疾病预防控制中心提供。

1.1.3 仪器设备 Autof MS1000 全自动微生物质谱检测系统(安图实验仪器郑州有限公司);HFsafe-1200 生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统(bioMerieux, Inc);BIO-RAD 脉冲场凝胶电泳(美国伯乐公司);436-A 耐药检测 VIZION 判读仪(赛默飞公司)。

1.2 方法

1.2.1 沙门菌分离鉴定 依据 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门菌检验》分离培养沙门菌,分离到的沙门菌菌株用 VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定仪及质谱仪进行鉴定。

1.2.2 血清学鉴定 依据 WKLM(White-Kauffmann-Le Minor Serotyping Scheme)抗原表,用沙门菌诊断血清确定血清型,结果从朱超和许学斌编著、同济大学出版社出版的《沙门菌属血清型诊断》中查找。

1.2.3 PFGE 分型 依据《2021 年国家食源性疾病监测工作手册》中食源性致病菌 PFGE 标准操作程序进行沙门菌 PFGE,分子量标准 Braenderup 为沙门菌 H9812,结果用 BioNumerics 软件聚类分析。

1.2.4 药敏试验 依据《2021 年国家食源性疾病监测工作手册》中食源性致病菌药敏试验标准操作程序中的微量肉汤稀释法对沙门菌进行药敏试验,用 VIZION判读仪判读结果,并依据美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)相应标准判读敏感(S)和耐药(R),同时用大肠埃希氏菌 ATCC25922 作质控菌株。

2 结果

2.1 沙门菌检测结果 52 份生畜肉中检出 18 株沙门菌,总检出率为 34.62%(18/52),其中冻牛肉检出率最高为 60.00%(3/5),鲜牛肉和冷牛肉检出率均为 33.33%(3/9),鲜猪肉 47.06%(8/17),冷猪肉检出率为40.00%(4/10),鲜羊肉和冻羊肉均未检出;52 份熟肉制品中检出 3 株沙门菌,检出率为 5.77%(3/52),见表 1。

表 1 2021 年衡阳市生畜肉和熟肉制品中沙门菌检测结果

食品类别	份数	菌株数	检出率(%)
生畜肉			
冻牛肉	5	3	60.00
鲜牛肉	3	1	33.33
冷牛肉	6	2	33.33
鲜猪肉	17	8	47.06
冷猪肉	10	4	40.00
鲜羊肉	6	0	0.00
冻羊肉	5	0	0.00
熟肉制品	52	3	5.77

2.2 沙门菌血清型分布 对 21 株沙门菌进行血清分

型,共检出 7 个血清型,包括伦敦沙门菌 9 株(42.86%, 9/21),罗森沙门菌 4 株(19.05%,4/21),德尔卑沙门菌、鸭沙门菌和鼠伤寒沙门菌各 2 株,阿贡纳沙门菌和肯塔基沙门菌各 1 株,见表 2。

表 2 沙门菌血清型分布(n=21 株)

血清型	抗原式	菌株数	占比/%
伦敦沙门菌	3,10:L,V:1,6	9	42.86
罗森沙门菌	6,7:f,g:-	4	19.05
鸭沙门菌	3,10:e,h:1,6	2	9.52
德尔卑沙门菌	4,12:f,g:1	2	9.52
鼠伤寒沙门菌	4,5,12:i:1,2	2	9.52
阿贡纳沙门菌	4,12:f,g,s:-	1	4.76
肯塔基沙门菌	8,20:i,Z6	1	4.76

2.3 药敏试验结果

2.3.1 耐药情况 21 株沙门菌均对亚胺培南(IPM)和多粘菌素 E(CT)敏感,对萘啶酸(NAL)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)敏感率均为 95.24%,对头孢西丁(CFX)敏感率为 90.48%,对四环素(TET)、氨苄西林(AMP)、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑(SXT)耐药率分别为 76.19%、66.67%、52.38%,见表 3。

表 3 沙门菌耐药情况(n=21 株)

抗生素	敏感(S)		耐药(R)	
	菌株数	百分比(%)	菌株数	百分比(%)
环丙沙星(CIP)	13	61.90	5	23.81
氯霉素(Chl)	11	52.38	10	47.62
萘啶酸(NAL)	20	95.24	1	4.76
庆大霉素(GEN)	14	66.67	7	33.33
四环素(TET)	5	23.81	16	76.19
头孢噻肟(CTX)	20	95.24	1	4.76
头孢西丁(CFX)	19	90.48	1	4.76
氨苄西林(AMP)	7	33.33	14	66.67
氨苄西林/舒巴坦(AMS)	8	38.10	5	23.81
头孢他啶(CAZ)	20	95.24	1	4.76
头孢唑林(CFZ)	8	38.10	7	33.33
亚胺培南(IPM)	21	100.00	0	0.00
阿奇霉素(AZM)	16	76.19	5	23.81
甲氧苄啶/磺胺甲噁唑(SXT)	10	47.62	11	52.38
多粘菌素 E(CT)	21	100.00	0	0.00

2.3.2 多重耐药情况 21 株沙门菌中,4 株对 15 种抗生素完全敏感(19.05%),15 株对 3 种及以上抗生素耐药,耐药率达 71.43%(15/21),最常见的耐药谱为 TET-AMP-SXT、CHL-TET-AMP、CHL-GEN-TET-AMP-SXT,耐药率分别是 52.38%、33.33%、23.81%,

最强耐药谱为 CIP-CHL-NAL-GEN-TET-CTX-CFX-AMP-AMS-CAZ-CFZ-AZM-SXT,耐 13 种抗生素,见表 4。

表 4 沙门菌多重耐药谱(n=21 株)

耐药谱	菌株数	耐药率(%)
TET-AMP-SXT	11	52.38
CHL-TET-AMP	7	33.33
CHL-GEN-TET-AMP-SXT	5	23.81
TET-AMP-AMS-CFZ-SXT	4	19.05
CHL-TET-AMP-CFZ-SXT	2	9.52
CIP-CHL-GEN-TET-AMP-CFZ-SXT	2	9.52
CHL-GEN-TET-AMP-CFZ-AZM-SXT	3	14.29
CIP-CHL-GEN-TET-AMP-AMS-AZM-SXT	1	4.76
CIP-GEN-TXT-AMP-AMS-CFZ-AZM-SXT	2	9.52
CIP-CHL-NAL-GEN-TET-CTX-CFX-AMP-AMS-CAZ-CFZ-AZM-SXT	1	4.76

2.4 PFGE 聚类分析 21 株沙门菌经 XbaI 酶切后得到 PFGE 图谱,用 BioNumerics 软件聚类分析,相似度 48.20%~96.00%,没有完全相同的条带(编号 S1~S21),同一血清型大部分菌株可聚集成簇,但鼠伤寒沙门菌相似度不高。2 株相似度为 90.90%的罗森沙门菌耐药谱完全一致,其余的没有相同耐药谱,各带型与耐药谱之间未见明显相关,见图 1。



图 1 21 株沙门菌 PFGE 聚类分析图谱

3 讨论

沙门菌是广泛存在的食源性致病菌,在我国食源性疾病中,80.00%由沙门菌感染导致^[2]。开展食品中沙门菌的监测及耐药性分析,对预防沙门菌引起的食物中毒具有重要的意义。

本研究对 2021 年衡阳市各县区生畜肉和熟肉制品进行沙门菌检测。从 52 份生畜肉中检出 18 株沙门菌,污染率高达 34.62%,比陕西省渭南市^[3]9.52%、上海市^[4]6.70%、江西省^[5]13.70%、郑州市^[6]15.30%均高;其中冻牛肉检出率最高(60.00%),其次是鲜猪肉(47.06%)。结果提示衡阳市生畜肉沙门菌污染率高于其他地区,应在屠宰、加工、销售等各个环节严格加强卫生管理工作,降低沙门菌引起食源性疾病的潜在危险。52 份熟肉制品中检出 3 株沙门菌,检出率为

5.77%,与陕西省渭南市^[3]3.91%、江西省^[5]1.46%的结果接近。熟肉制品作为即食食品,不需要再加工烹调,制作和销售过程应生熟分开,器具消毒彻底,生肉烧熟煮透,储藏得当,减少二次污染。

21 株沙门菌可分为 7 个血清型,优势血清型为伦敦沙门菌和罗森沙门菌,与成都市^[7]、新疆^[8]等的报道基本一致,与江西省^[5]、郑州市^[6]、淮安市^[9]不同,表明生畜肉和熟肉制品中沙门菌血清型分布可能存在地域性差异。

近年来,兽用抗生素的滥用导致了許多耐药菌的出现,本研究结果显示,只有 19.05% 的沙门菌株对 15 种抗生素完全敏感,与济南市^[10]20.00%相似;所有菌株均对亚胺培南(IPM)敏感,与成都市^[7]、北京市^[11]、长沙市^[12]、武汉市^[13]、成都市^[14]、福建省^[15]、云南省^[16]报道结果一致,说明亚胺培南对治疗沙门菌感染有效;萘啶酸(NAL)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)敏感率均为 95.24%,头孢西丁(CFX)敏感率为 90.48%,与武汉市^[13]、成都市^[14]、福建省^[15]接近,提示这些抗生素可供该地区临床用药选择;四环素(TET)、氨苄西林(AMP)、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑(SXT)耐药率分别为 76.19%、66.67%、52.38%,与上海市、济南市、武汉市、福建省泉州市、成都市等多地区耐药率相似^[4,7,10,13,15]。四环素目前在临床使用不多,但在农业领域应用广泛,易在食品中残留间接导致人体对四环素的耐药;21 株沙门菌对 3 种及以上抗生素耐药率达 71.43%,耐药图谱多样,比北京市^[11]50.50%要高。本次耐药监测提示衡阳市沙门菌的耐药形势非常严峻,应对耐药结果进行深入调查研究,了解其原因,为解决沙门菌的耐药问题提供理论依据。

食源性致病菌的分型与溯源一直是食品安全风险监测的核心问题,PFGE 分辨率高,重复性好,是国际上公认的细菌分型技术的金标准,常用于识别、追踪致病菌来源。本研究发现,9 株伦敦沙门菌作为优势血清型在本次聚类分析中的相似度为 71.90%~96.00%,命名 S13-S21 型、4 株罗森沙门菌条带相似度为 84.80%~90.90%,命名为 S1-S4 型,没有 100.00%一致的条带,提示 21 株沙门菌分子分型整体呈现多样性,无明显的地域或时间聚集性,多呈现散发流行。结合 PFGE 分型和药敏结果发现,只有 2 株相似度 90.90%的罗森沙门菌耐药谱完全一致,其余未见相同耐药谱,各带型与耐药谱之间未见明显相关,推测耐药基因多在质粒上,很少涉及酶切位点,与 PFGE 带型相关不明显。

本研究对衡阳市生畜肉和熟肉制品沙门菌污染进行调查,发现存在较高的食品安全隐患,应加强对食品,尤其是肉制品的沙门菌监测,同时对阳性分离株进行分型分析和耐药监测,为临床和畜牧业抗生素合理使用提供依据;建立衡阳市食品沙门菌分子分型数据库,为食源性沙门菌感染疾病的预防、控制及治疗提供科学指导。

参考文献

- [1] 朱超,许学斌.沙门菌属血清型诊断[M].上海:同济大学出版社,2009.
- [2] 邓国兴,姜随意,高志贤.1999—2014 年全国重大食物中毒通报资料的汇总与分析[J].食品研究与开发,2015,36(10):149-152.
- [3] 沈托,焦莉萍,魏惠琴,等.2011—2019 年陕西省渭南市市售食品中沙门菌污染状况及血清分型调查结果分析[J].预防医学情报杂志,2021,37(10):1325-1336
- [4] 李欣,喻佳莉,乔雪飞,等.沙门菌在食品与食源性疾病中分布及病原特征分析[J].实用预防医学,2020,27(7):801-806.
- [5] 孙吉昌,游兴勇,曾艳兵,等.2009—2011 年江西省食品中沙门菌污染状况调查[J].实验与检验医学,2012,30(2):126-129.
- [6] 炊慧霞,张秀丽,廖兴广,等.2008 年郑州市生肉类食品中沙门菌血清型分布和抗生素药物敏感分析[J].中国人兽共患病学报,2010,26(3):292-293.
- [7] 李荧,潘美玲,赵婉好,等.成都市猪肉源沙门菌优势血清型及耐药性研究[J].现代预防医学,2022,49(5):802-807.
- [8] 彭斌,戴小华,张晓玲,等.生牛肉中沙门菌的血清型鉴定与耐药性检测[J].食品安全质量检测学报,2018,9(17):4671-4674.
- [9] 李兵兵,刘纯成,刘靓,等.2015—2016 年淮安市售禽畜肉中沙门菌污染及其病原学特征[J].卫生研究,2018,47(2):260-265.
- [10] 李娜,刘辉,李健,等.济南市腹泻患者沙门菌 PFGE 分子分型及耐药特征研究[J].中国人兽共患病学报,2021,37(10):893-902.
- [11] 刘伟,尹可欣,白婧,等.北京市海淀区食源性疾病沙门氏菌血清型分布和耐药性分析[J].中国卫生检验杂志,2022,32(1):64-67.
- [12] 苏良,杨柳青,宋迎春,等.2015—2019 年长沙市食源性疾病沙门菌血清分型和耐药情况分析[J].实用预防医学,2022,29(1):82-84.
- [13] 何名扬,朱必婷,王鸣秋,等.武汉地区食源性沙门菌耐药特征分析[J].食品安全质量检测学报,2021,12(1):78-85.
- [14] 黎明,孔喜梅,袁齐武,等.成都市未成年人群腹泻沙门菌血清型、耐药及分子分型研究[J].现代预防医学,2021,48(21):3996-4000.
- [15] 庄春红,吴小凤,郑迎翔,等.福建省泉州地区 2013—2016 年沙门菌的 PFGE 分子分型及耐药性研究[J].医学动物防制,2019,35(6):540-543.
- [16] 田云屏,邹颜秋硕,金莉,等.云南省鼠伤寒沙门菌 PFGE 分子分型及耐药情况[J].昆明医科大学学报,2018,39(8):23-27.

收稿日期:2022-04-05