

# 黑龙江省 4 个市肉鸡生产链中沙门菌分子分型研究

遇晓杰 梁雪 白莉 李薇薇 闫军 王开利 李鑫

150030 哈尔滨, 黑龙江省疾病预防控制中心(遇晓杰、梁雪、闫军、王开利、李鑫);

100022 北京, 国家食品安全风险评估中心(白莉、李薇薇)

通信作者: 王开利, Email: 526780481@qq.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.12.015

**【摘要】** 目的 了解黑龙江省 4 个市肉鸡生产链中沙门菌分子分型的情况。方法 参照美国 CDC PulseNet 实验方法, 对 2012 年黑龙江省 4 个市肉鸡生产链环节中(孵化、养殖、屠宰和配送分销)分离到的沙门菌进行 PFGE 分型, 利用 BioNumerics 软件对分离菌株的指纹图谱进行聚类分析并初步建立数据库。结果 4 个环节中屠宰环节的污染最为严重(13.84%)。150 株肠炎沙门菌和 65 株印第安纳沙门菌分别有 89 个和 55 个带型, 带型存在多样性。肠炎沙门菌在不同环节或是不同地区具有相同的带型; 印第安纳沙门菌在所有不同环节和地区没有相同的带型。HLJ2 的肉鸡肠炎沙门菌污染已溯源到孵化环节的种鸡。结论 黑龙江省 4 个市肠炎沙门菌和印第安纳沙门菌的带型有地区差异, 不同环节的优势带型各不相同。屠宰加工过程存在交叉污染, 部分地区污染源可追溯到孵化环节。

**【关键词】** 沙门菌; 分子分型; 溯源

**基金项目:** 黑龙江省卫生厅科技计划项目(2012-433)

## Molecular typing of *Salmonella* isolates from poultry production chains in four cities of Heilongjiang province

Yu Xiaojie, Liang Xue, Bai Li, Li Weiwei, Yan Jun, Wang Kaili, Li Xin

Heilongjiang Center for Disease Control and Prevention, Harbin 150030, China (Yu XJ, Liang X, Yan J, Wang KL, Li X); China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China (Bai L, Li WW)

Corresponding author: Wang Kaili, Email: 526780481@qq.com

**【Abstract】 Objective** To study the PFGE type of *Salmonella* (*S.*) strains isolated from poultry production chains (hatching, breeding, slaughter, distribution and retail) of four cities in Heilongjiang province. **Methods** DNA collected from *S.* strains in 2012 was digested by *Xba* I according to the standard PFGE protocol of US CDC. The PFGE patterns were then analyzed by BioNumerics software. **Results** The contamination of *S.* appeared most serious during the process of slaughtering (13.84%). PFGE was used to determine the genetic relationships between these isolates from poultry production chains, 89 pulsotypes from 150 *S. enteritidis* isolates and 55 pulsotypes from 65 *S. indiana* isolates showed considerable diversity. The same pulsotypes of *S. enteritidis* can be found between different food chains and cities. In contrast, no identical pulsotypes of *S. indiana* were found between different food chain and cities. In these four cities, the above said two kinds of *S.* were from different sources. The source of *S.* contamination in HLJ2 city had been traced back to the chain of poultry hatching. **Conclusions** The distribution of pulsotypes of the *S. enteritidis* and *S. indiana* isolates was from different regions and the dominant bands were also different between the chains of poultry production. Cross contamination existed in slaughterhouses and contamination can be traced back to the poultry hatching.

**【Key words】** *Salmonella*; Molecular typing; Trace

**Fund program:** Science and Technology Planning Project of Heilongjiang Provincial Health Department (2012-433)

我国 70%~80% 的食源性疾病是由沙门菌引起的, 其中污染沙门菌的肉鸡制品是导致人类食物中毒的重要因素<sup>[1-2]</sup>。PFGE 溯源平台(FoodNet)广泛

应用于零售环节肉鸡制品沙门菌的分子分型<sup>[3-4]</sup>, 而对于肉鸡生产链中的孵化、养殖、屠宰环节过程中的应用相对较少<sup>[5-6]</sup>。本研究对黑龙江省 4 个市肉鸡孵

化、养殖、屠宰和配送分销环节中肉鸡、环境和相关工作人员等进行取样,对分离的沙门菌进行分子分型。

## 对象与方法

1. 菌株来源:2012年在黑龙江省选择4个(HLJ1、HLJ2、HLJ3及HLJ4)具有代表性的城市设置6个肉鸡沙门菌专项监测点。针对肉鸡孵化、养殖、屠宰和配送分销环节中胴体及其产品、环境、工作人员进行样本采集和检验。4个市共检测22类3766份样本,检出339株沙门菌,总检出率为9.00%,在样本采集的孵化、养殖、屠宰和配送分销环节分离出的沙门菌菌株分别为22株(2.28%)、11株(2.14%)、220株(13.84%)和86株(9.77%)。将339株沙门菌进行血清型分型,其优势血清型分别为肠炎沙门菌( $n=150$ )和印第安纳沙门菌( $n=65$ )<sup>[7]</sup>,本研究对两种主要的优势血清进行分子分型研究。

### 2. 研究方法:

(1)PFGE:参照美国CDC PulseNet实验方法进行的操作<sup>[8]</sup>:挑取新鲜单个菌落;划线接种血琼脂平板;裂解细菌;制备胶块;利用*Xba* I进行DNA酶切;酶切2h后进行PFGE;电泳后用GEL DOC凝胶成像系统获取图像,保存图谱。质控菌株H9812来源于国家食品安全风险评估中心。

(2)PFGE图像和聚类分析:利用BioNumerics 6.6软件对PFGE图谱进行聚类分析,利用算术平均数的非加权成组配对法(UPGMA, unweighted pair-group method using arithmetic average)对沙门菌进行聚类分析,PFGE带型相似度运用Dice系数进行确定,条带位置差异容许度为1.0%,优化值为0.5%。按照PulseNet的命名原则对每种带型进行命名。

## 结 果

1. 不同血清型沙门菌PFGE分子分型:150株肠炎沙门菌共分为89个带型,相似度为47.6%~100.0%,优势带型为CN003( $n=6$ ,来源于孵化、屠宰和配送分销环节)和CN027( $n=6$ ,来源于孵化、屠宰和配送分销环节);次优势带型为CN001( $n=5$ ,来源于孵化和配送分销环节)和CN006( $n=5$ ,来源于屠宰环节),见图1。65株印第安纳沙门菌分为55个带型,相似度为56.5%~100.0%,优势带型为YN009( $n=4$ ),来源于配送分销环节,见图2。

2. 不同环节PFGE分子分型:在孵化、养殖、屠宰和配送分销4个环节分离出的沙门菌中,屠宰环

节分离的肠炎沙门菌和印第安纳沙门菌数量最多。

(1)肠炎沙门菌:存在于各个环节,屠宰环节分离的菌PFGE带型数量居多。孵化、屠宰和配送分销环节分离的菌具有相同带型(CN003、CN027);屠宰和配送分销环节分离的菌有相同带型(CN007、CN023、CN056);孵化和配送分销环节分离的菌有相同带型(CN001);孵化和屠宰环节分离的菌有相同带型(CN035);养殖和屠宰环节分离的菌有相同带型(CN010)(图1)。

(2)印第安纳沙门菌:存在于养殖、屠宰和配送分销3个环节中,优势带型不一致(图2)。

### 3. 不同地区的分型:

(1)肠炎沙门菌:HLJ2:出现于孵化、养殖、屠宰和配送分销环节;HLJ3:出现于养殖、屠宰和配送分销环节;HLJ1:出现于养殖、屠宰和配送分销环节;HLJ4:出现于屠宰环节。HLJ3和HLJ1的配送分销环节和HLJ2的孵化环节分离的菌有相同带型(CN001);HLJ2的孵化、屠宰和HLJ1的配送分销环节分离的菌有相同带型(CN003);HLJ2的屠宰和HLJ3、HLJ1的配送分销环节分离的菌有相同带型(CN008);HLJ2的养殖和HLJ4的屠宰环节分离的菌有相同带型(CN010);HLJ2的屠宰和HLJ1的配送分销环节分离的菌有相同带型(CN023);HLJ2的屠宰和HLJ3的孵化、屠宰、配送分销环节分离的菌有相同带型(CN027),见图1。

(2)印第安纳沙门菌:4个市的印第安纳沙门菌没有相同带型,相同带型不存在于不同市的相同环节,与肠炎沙门菌有明显区别。出现于HLJ2的屠宰环节,带型相似度为87.1%~97.1%;出现于HLJ1的屠宰和配送分销环节,带型的相似度在84.9%~97.6%。出现于HLJ3的养殖、屠宰和配送分销环节,其中配送分销环节分离的沙门菌有相同带型(YN009),3个环节的相似度为78.5%~100.0%。HLJ4的屠宰和配送分销环节分离菌的PFGE带型相似度为83.2%~95.2%,孵化和养殖环节中未发现印第安纳沙门菌(图2)。

4. 黑龙江省肉鸡肠炎沙门菌溯源分析:HLJ2在孵化、养殖、屠宰和配送分销4个环节均有肠炎沙门菌的分型,相似度为46.4%~100.0%,在HLJ2的孵化环节中鸡苗环境粪便样本和养殖环节中养殖场环境粪便样本分离的菌有相同带型(C2N017);孵化环节中鸡苗环境粪便样本和屠宰环节中的分割后冷冻禽肉,分割刀具案板样本分离的菌有相同带型(C2N018);屠宰环节的冷藏后整禽和配送分销环

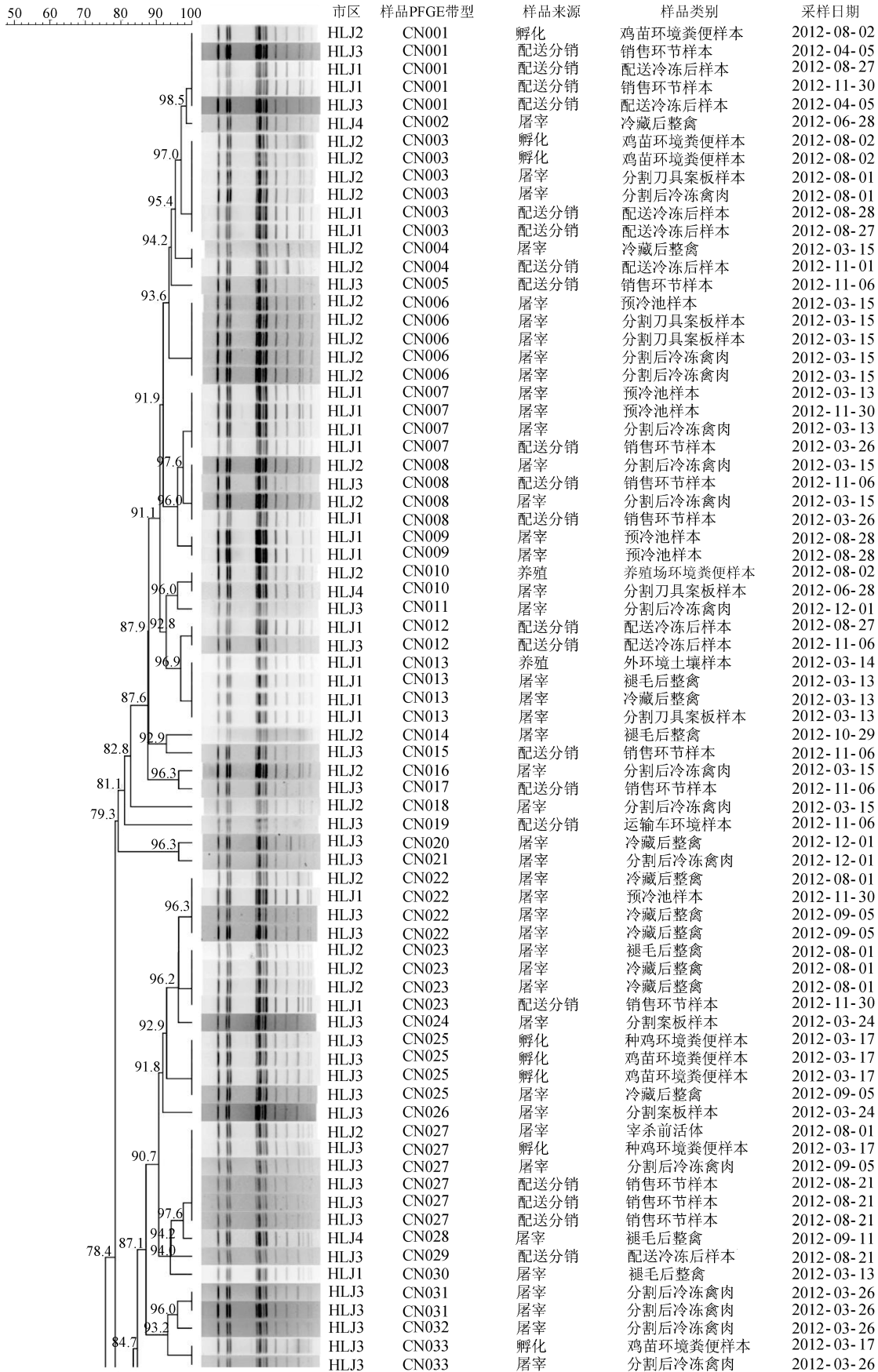
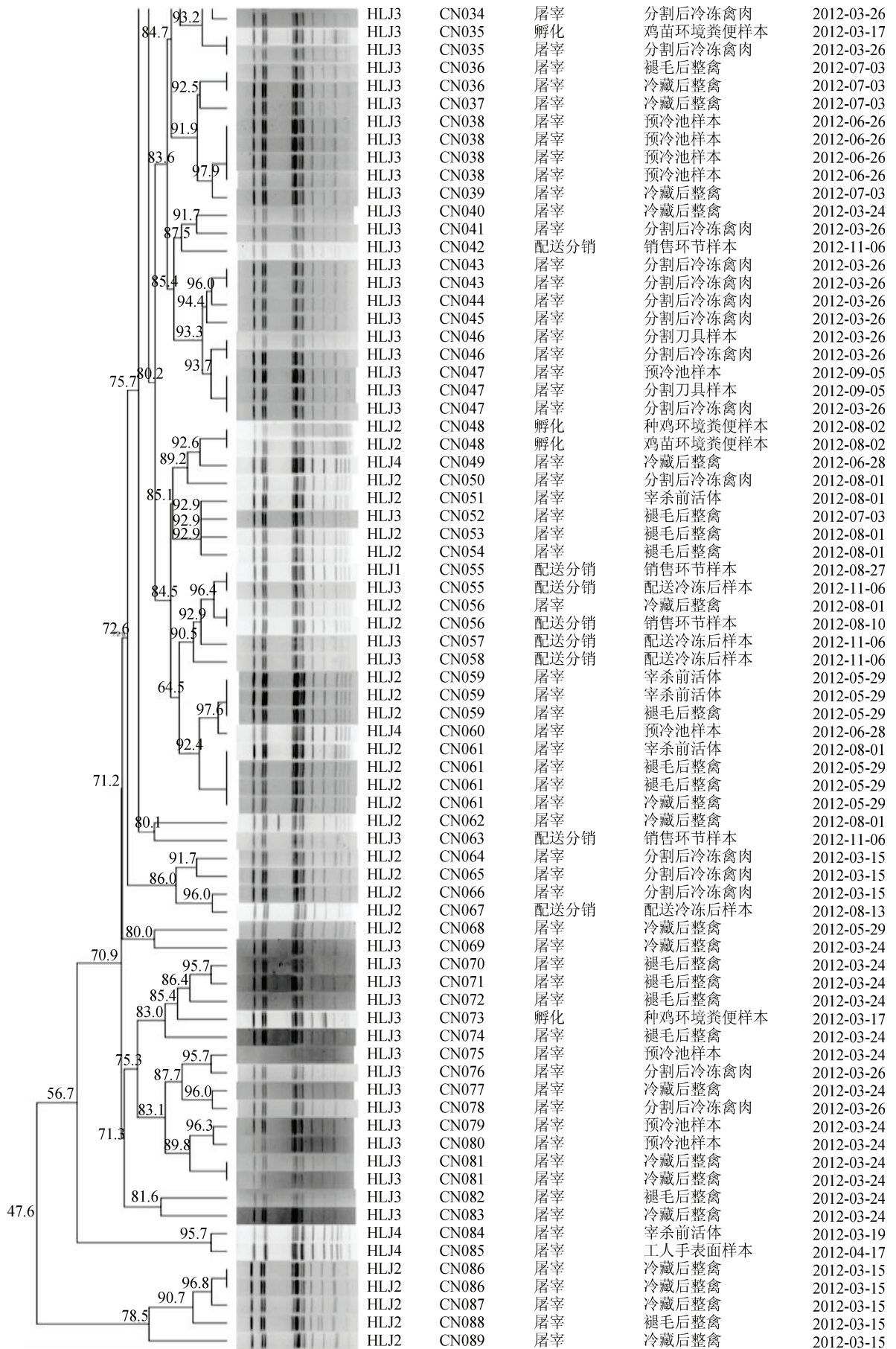


图 1 150 株肠炎沙门菌 PFGE 分型



续图 1 150 株肠炎沙门菌 PFGE 分型

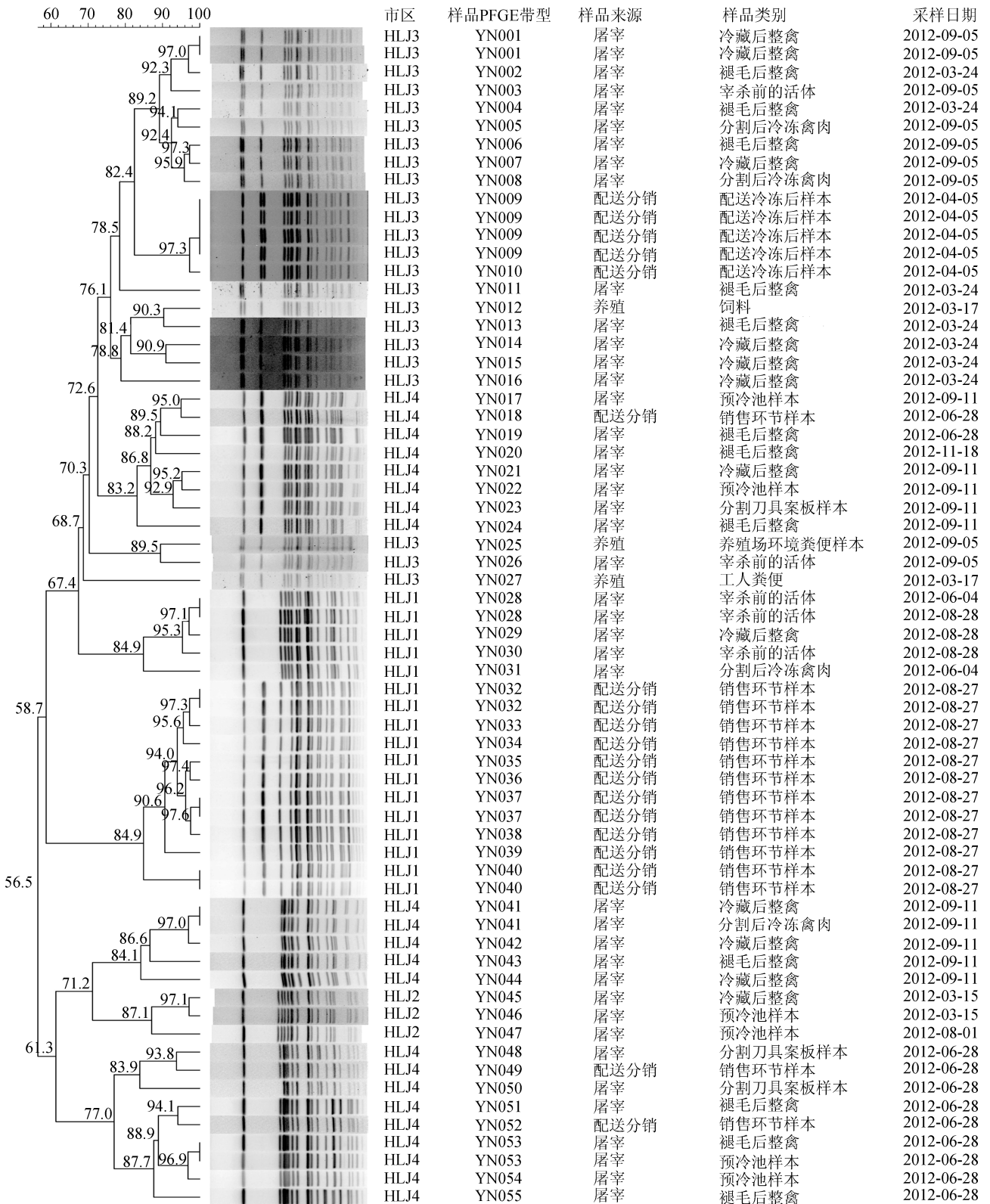


图2 65株印第安纳沙门菌PFGE分型

中配送冷冻后样本分离的菌有相同带型(C2N019); 污染严重的屠宰环节中宰杀前活体,褪毛后整禽和冷藏后整禽分离的菌有相同带型(C2N009),预冷池样本、分割刀具案板和分割后冷冻禽肉分离的菌也

具有相同带型(C2N015),见图3。

肠炎沙门菌存在于HLJ3存在于孵化、屠宰和配送分销环节,带型相似度为68.0%~100.0%,屠宰环节的褪毛后整禽和冷藏后整禽和预冷池样本、分割

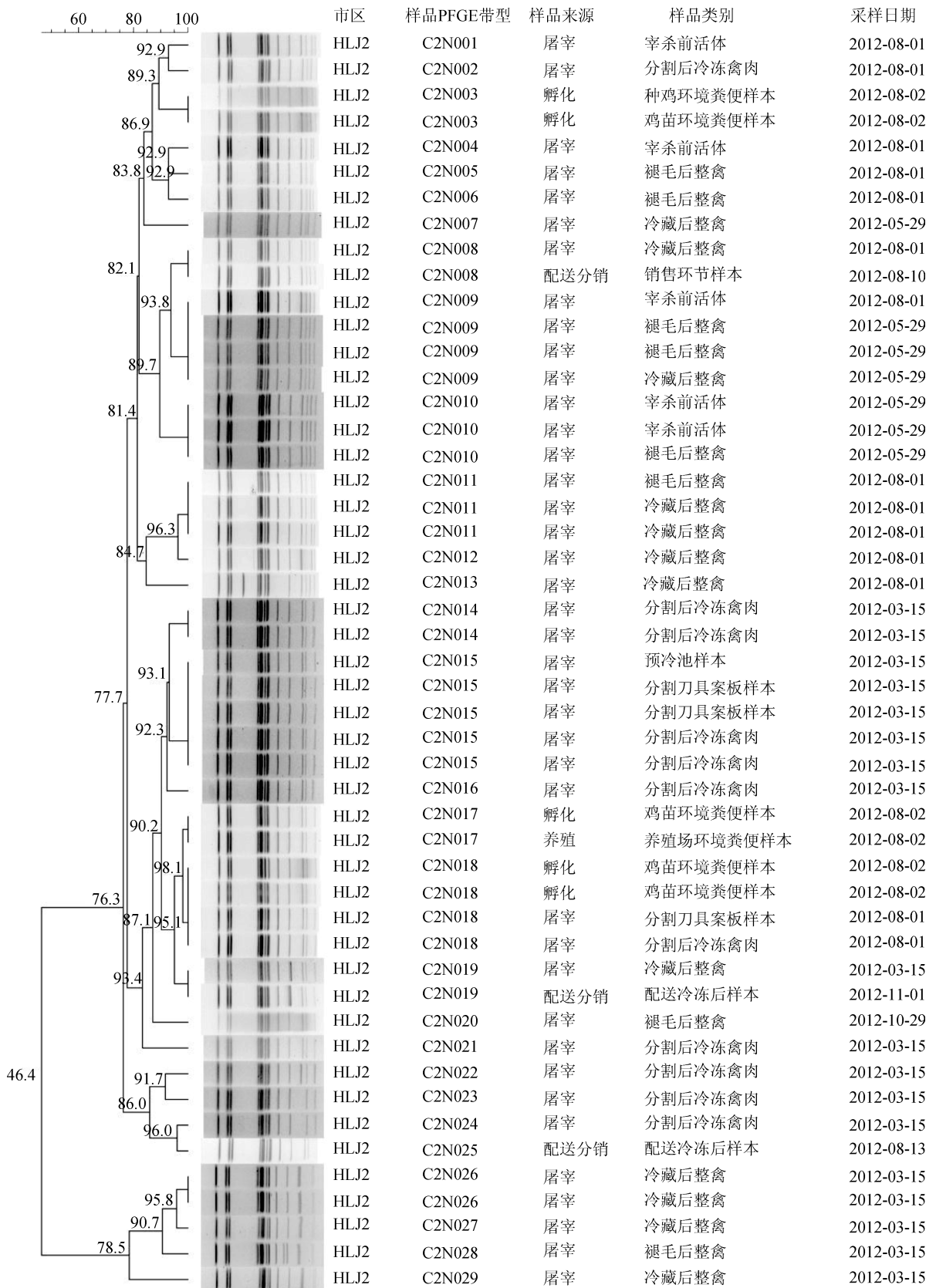


图3 黑龙江省HLJ2肠炎沙门菌PFGE分析

刀具样本、分割后冷冻禽肉分离的菌有相同带型(C3N012和C3N040);孵化环节的鸡苗环境粪便样本和屠宰环节的分割后冷冻禽肉分离的菌有相同带

型(C3N024);配送分销环节的配送冷冻后样本和销售样本分离的菌有相同带型(C3N047);在孵化环节的种鸡环境粪便样本、屠宰环节中分割后冷冻禽肉

和配送分销环节的销售环节样本分离的菌有相同带型(C3N020),见图4。

HLJ1 肉鸡沙门菌存在于养殖、屠宰和配送分销环节,相似度为 92.0%~100.0%,屠宰环节的褪毛后

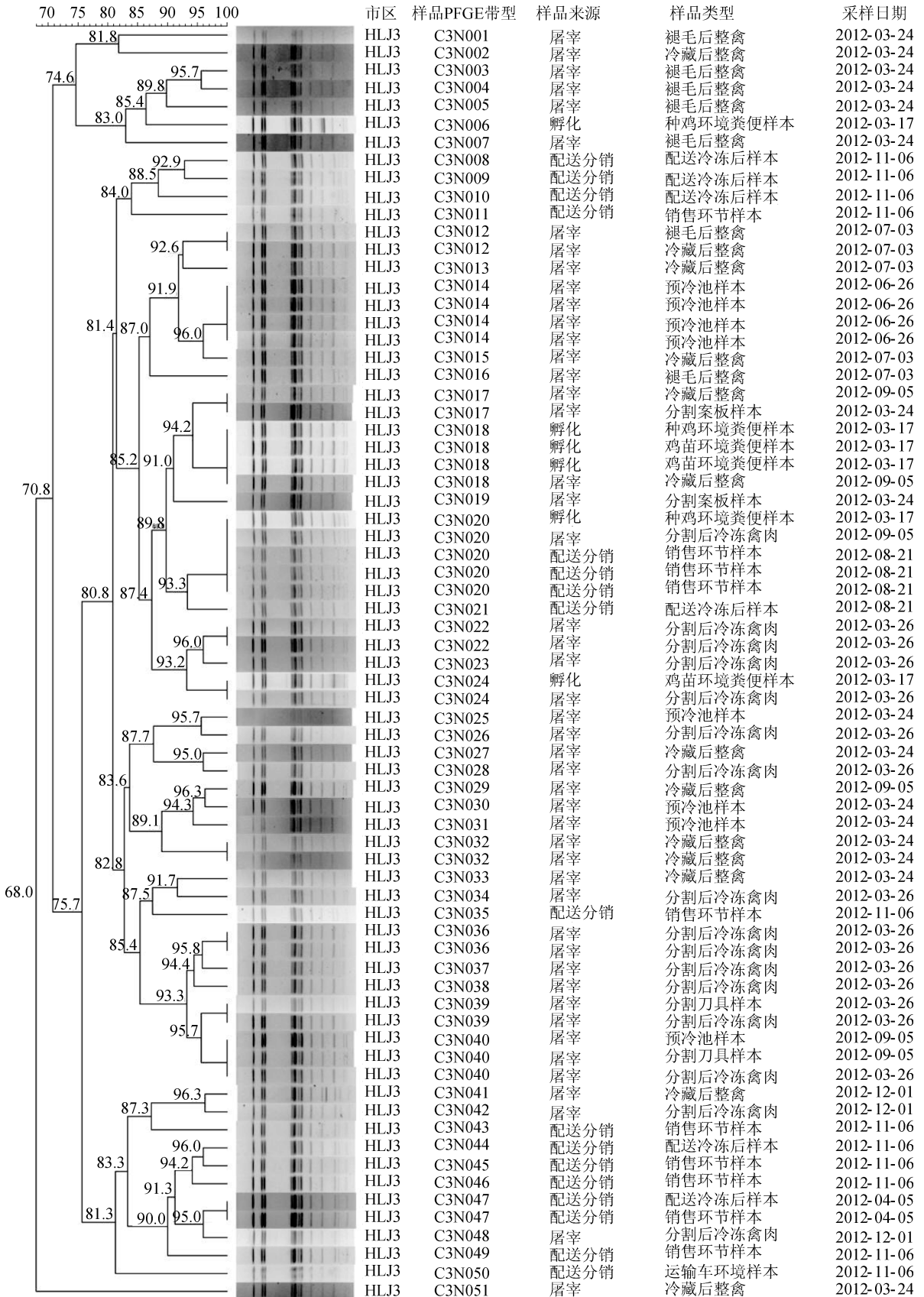


图4 黑龙江省HLJ3肠炎沙门菌的PFGE分析

整禽和配送分销环节的销售样本分离的菌有相同带型(C1N001);养殖环节中的外环境土壤样本、屠宰环节中的褪毛后整禽、冷藏后整禽、预冷池样品、分割刀具案板样本及分割后冷冻禽肉和配送分销环节中的配送后冷冻样本、销售环节样本分离的菌具有相同带型(C1N002),见图5。

### 讨 论

PFGE 具有结果稳定、重复性好等优点,是细菌病原菌分子分型的金标准<sup>[9-12]</sup>。它还可以确认菌株之间的相似度、追溯传染来源和传播途径,在疫情暴发时为实验室诊断提供重要依据,对公共卫生监测具有重要意义<sup>[4,6]</sup>。

本研究对黑龙江省4个市孵化、养殖、屠宰和配送分销环节肉鸡分离的沙门菌进行PFGE分子分型,PFGE带型显示印第安纳沙门菌和肠炎沙门菌具有多样性,屠宰环节的带型较多,提示污染源广泛。

不同环节的分析结果显示,在4个环节有相同带型,在孵化环节与其他环节出现相同带型,提示在最初的源头就出现了污染,此类污染在后续加工过程中可能进一步扩大。也可能某一优势克隆群已经在某个环节定殖,且通过不同的环节传播开。与肠炎沙门菌不同的是,3个环节中印第安纳沙门菌相互之间没有相同带型,具有相同带型的印第安纳沙门菌仅存在于各自的环节中,如配送分销环节(YN009、YN032、YN037)和屠宰环节(YN028、YN041、YN053)。印第安纳沙门菌的污染未通过各环节进行传播。屠宰过程中任何一个环节(宰杀前

的活体、褪毛后整禽、冷藏后整禽、预冷池、分割刀具案板、分割后冷冻禽肉、工人粪便和工人手表面)肉鸡均可能被污染,肠炎沙门菌和印第安纳沙门菌污染都比较严重,建议相关监管部门应当加强对宰杀环节中每个操作步骤的流水加工线都应该进行彻底消毒和卫生管理,降低交叉污染的机会。

本研究中HLJ2肉鸡的PFGE分型结果显示从肉鸡的孵化环节(鸡苗环境粪便样本,种鸡环境粪便样本)检出沙门菌,这是鸡群源头发生污染造成的结果,既从孵化环节产蛋鸡到鸡蛋,再从小鸡到肉鸡的沙门菌污染一直存在,贯穿着养殖、屠宰环节的交叉污染到最后配送分销环节;追溯到的HLJ2肉鸡肠炎沙门菌污染的源头,为下一步降低污染源头的肉鸡沙门菌污染,并制定相关防控措施提供了理论依据。这些结果有助于完善从孵化场到餐桌食物链中肉鸡沙门菌污染的研究,可以结合流行病学资料,为调查食源性疾病暴发及溯源细菌性传染病的源头提供强有力的理论依据。

HLJ1和HLJ2地理位置相距不远,肠炎沙门菌的优势带型出现在HLJ2屠宰环节和HLJ1的屠宰、配送分销环节,提示鸡群的源头污染可能来自某一地方或是由于两个地区间肉鸡的流通引起肠炎沙门菌的迁移,宰杀前的活体引入屠宰环节;也可能是两个地区均属于肠炎沙门菌的流行区域。

黑龙江省肉鸡沙门菌整体溯源分析中,具有相同带型的肠炎沙门菌PFGE分型显示,HLJ2的部分肉鸡从鸡苗养殖、屠宰、配送分销到售卖环节存在肠炎沙门菌。HLJ3的肉鸡在孵化环节中可能被肠炎

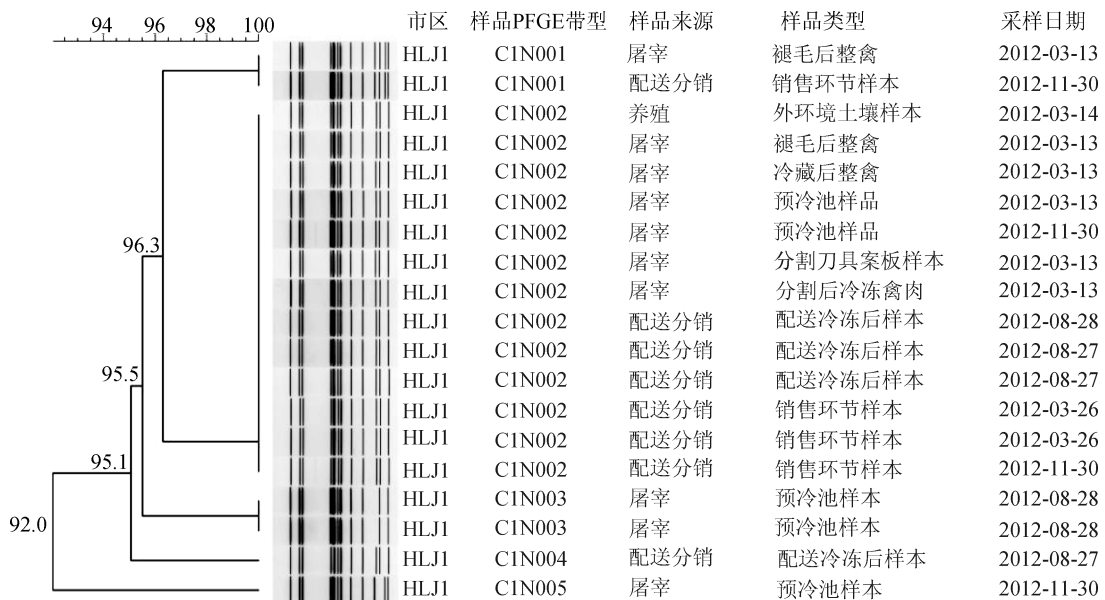


图5 黑龙江省HLJ1肠炎沙门菌PFGE分析



沙门菌污染,而养殖场的整体环境消毒措施较完善,防范了肠炎沙门菌在养殖环节的污染,但在后续的屠宰和配送分销环节并未完全杜绝肠炎沙门菌的污染,肠炎沙门菌的污染源很可能是由屠宰环节操作步骤繁多,存在交叉污染,继而肠炎沙门菌持续污染到了配送分销环节。HLJ1 虽然未在孵化环节检测出肠炎沙门菌的 PFGE 分型,但在养殖、屠宰和配送分销环节的每个环节均检出,提示应从养殖场整体环境、饲料存储等方面加强卫生管理,降低 HLJ1 肉鸡源头肠炎沙门菌污染的概率。

本研究通过监测黑龙江省 4 个市沙门菌株的分子分型,初步建立了 HLJ1、HLJ2、HLJ3 和 HLJ4 肉鸡孵化、养殖、屠宰和配送分销环节的分子分型数据库,为食源性沙门菌疾病的预防提供了技术支持,也为黑龙江省肉鸡饲养加工过程中沙门菌 PFGE 分子分型数据库的建立奠定基础。

本研究显示黑龙江省 4 个市肉鸡沙门菌的污染情况不容忽视,屠宰环节存在交叉污染,根据本研究结果明确关键控制点,完善肉鸡加工过程的 HACCP 体系,加大消毒力度,采用国际领先的设备和科学方法,降低污染率。建议下一步扩大样本的采集量,加强信息交流,针对肉鸡中沙门菌的污染进行风险评估,制定行之有效的预防措施,确保食用肉鸡的安全性。

利益冲突 无

#### 参 考 文 献

- [1] 王军,郑增忍,王晶钰. 动物源性食品中沙门氏菌的风险评估[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(4): 23-25. DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2007.04.012.  
Wang J, Zheng ZR, Wang JY. Risk assessment of salmonella in animal derived food [J]. Chin J Anim Quarant, 2007, 24(4): 23-25. DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2007.04.012.
- [2] 白莉,张秀丽,甘辛,等. 肉鸡养殖场中环丙沙星和头孢噻肟双重耐药沙门菌耐药机制的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(5): 487-494. DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.05.001.  
Bai L, Zhang XL, Gan X, et al. Molecular characteristics of ciprofloxacin and cefotaxime co-resistant *Salmonella* isolates in broiler flocks[J]. Chin J Food Hyg, 2015, 27(5): 487-494. DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2007.04.012.
- [3] 叶蕊,石丽媛,王鹏,等. 脉冲场凝胶电泳技术简介及其在细菌分子分型中的应用[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, 24(2): 182-185.  
Ye R, Shi LY, Wang P, et al. Brief introduction of pulsed-field gel electrophoresis and its application in bacterial molecular typing[J]. Chin J Vector Biol Cont, 2013, 24(2): 182-185.
- [4] Barrett TJ, Gerner-Smidt P, Swaminathan B. Interpretation of

pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance[J]. Foodborne Pathog Dis, 2006, 3(1): 20-31. DOI: 10.1089/fpd.2006.3.20.

- [5] 乔昕,王燕梅,沈赞,等. 江苏省食品中沙门菌的监测及其脉冲场凝胶电泳分型研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(3): 514-516.  
Qiao X, Wang YM, Shen Y, et al. *Salmonella* surveillance in foods in Jiangsu province and the identification of molecular type with pulsed field gel electrophoresis[J]. Chin J Health Lab Technol, 2012, 22(3): 514-516.
- [6] 白莉,李薇薇,王岗,等. 我国 4 省肉鸡屠宰场沙门氏菌脉冲场凝胶电泳分子分型[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(4): 303-308.  
Bai L, Li WW, Wang G, et al. Molecular typing of *Salmonella* isolates from poultry slaughterhouses in four provinces by pulsed-field gel electrophoresis [J]. Chin J Food Hyg, 2013, 25(4): 303-308.
- [7] 朱丹丹,遇晓杰,薛成玉,等. 黑龙江省肉鸡养殖和屠宰加工环节中沙门菌调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(4): 485-488. DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.04.016.  
Zhu DD, Yu XJ, Xue CY, et al. Investigation on contamination of *Salmonella* from broiler cultivation, slaughter and processing production chain in Heilongjiang province [J]. Chin J Food Hyg, 2016, 28(4): 485-488. DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.04.016.
- [8] Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet [J]. Foodborn Pathog Dis, 2006, 3(1): 59-67. DOI: 10.1089/fpd.2006.3.59.
- [9] Sandt CH, Krouse DA, Cook CR, et al. The key role of pulsed-field gel electrophoresis in investigation of a large multiserotype and multistate food-borne outbreak of *Salmonella* infections centered in Pennsylvania [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(9): 3208-3212. DOI: 10.1128/JCM.01404-06.
- [10] Ross TL, Merz WG, Farkosh M, et al. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11): 5642-5647. DOI: 10.1128/JCM.43.11.5642-5647.2005.
- [11] Strandén A, Frei R, Widmer AF. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis? [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(7): 3181-3186. DOI: 10.1128/JCM.41.7.3181-3186.2003.
- [12] Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, et al. Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant *enterococci* [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(11): 4242-4245. DOI: 10.1016/j.tsf.2008.04.052.

(收稿日期: 2016-06-29)

(本文编辑: 万玉立)