

河南省外环境中沙门菌流行特征和分子分型研究

穆玉皎 张白帆 赵嘉咏 王泽乾 夏胜利 黄学勇 许汴利

450016 郑州,河南省疾病预防控制中心传染病预防控制所(穆玉皎、张白帆、赵嘉咏、夏胜利、黄学勇、许汴利); 456750 淇县疾病预防控制中心(王泽乾)

通信作者:许汴利, Email: xubl@hncdc.com.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.10.017

【摘要】 目的 了解河南省外环境中沙门菌的分布,探讨外环境沙门菌的不同型别分布和同源关系。**方法** 采集动物粪便、生熟肉制品和厨具等各类标本4 488份,进行沙门菌分离培养、生化鉴定及血清学分型;对其中部分优势血清型菌株进行PFGE分子分型研究。**结果** 从18种标本中共分离出324株沙门菌,分离率为7.21%;分离株分属于39种血清型,优势血清型是肠炎沙门菌(24.07%, 78/324)和德尔比沙门菌(20.37%, 66/324)。46株肠炎沙门菌经Xba I酶切后共分为12种带型,其宿主多来自于鸡宿主源;30株德尔比沙门菌Xba I酶切后共分为17种带型,其宿主多来自于猪宿主源。**结论** 河南省外环境沙门菌血清型分布呈多样性,不同来源的沙门菌的血清型有一定的差异;同一克隆菌株在相同地区内流行。

【关键词】 沙门菌; 外环境; 血清型; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10004201, 2013ZX10004203)

Distribution and molecular type of *Salmonella* from external environment in Henan province

Mu Yujiao, Zhang Baifan, Zhao Jiayong, Wang Zeqian, Xia Shengli, Huang Xueyong, Xu Bianli
Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China (Mu YJ, Zhang BF, Zhao JY, Xia SL, Huang XY, Xu BL);
Qixian County Center for Disease Control and Prevention, Qixian 456750, China (Wang ZQ)
Corresponding author: Xu Bianli, Email: xubl@hncdc.com.cn

【Abstract】 Objective To understand the distribution of *Salmonella* in external environment in Henan province, and explore the distribution of different serotypes of the *Salmonella* and their homology. **Methods** A total of 4 488 samples were collected from animal dung, meat products and kitchen utensils, and identified by biochemical tests and serotyped by serum agglutination reaction. The predominant serotypes were further typed by PFGE. **Results** A total of 324 *Salmonella* strains were detected in these samples, the detection rate was 7.21%. The 324 *Salmonella* isolates belonged to 39 serotypes, *S. enteritidis* (24.07%, 78/324) and *S. derby* (20.37%, 66/324) were predominant. Forty six strains of *S. enteritidis* and 30 strains of *S. derby* were divided into 12 and 17 molecular patterns by digestion with Xba I, while chicken and swine were the predominant animal hosts. **Conclusions** Serotyping of external environment *Salmonella* were phenotypically diverse and the serotype of *Salmonella* from different sources were different. The same clone was prevalent in same area. It is necessary to strengthen supervision and surveillance to ensure food safety.

【Key words】 *Salmonella*; External environment; Serotype; Pulsed field gel electrophoresis; Molecular typing

Fund programs: National Science and Technology Major Projects of China (2012ZX10004201, 2013ZX10004203)

沙门菌广泛存在于自然界,能引起多种动物感染。沙门菌是在温、冷血动物肠道保菌,再通过动物粪便污染饲料、食品(蛋、家禽、肉类产品)、水产品 and 污水等外环境的生态循环。受污染的动物肉类和蛋类食品是人类沙门菌病的主要感染源^[1]。为掌握河

南省外环境中沙门菌的流行情况,遂对2011—2013年从部分地区采集的4 488份动物粪便、生熟食品和厨具等标本分离的324株沙门菌进行血清型研究,以了解其流行特征;并用PFGE对流行菌株分子分型以揭示菌株间的同源性,为控制沙门菌环境污

染和防控食源性疾病提供技术依据。

材料与方法

1. 菌株来源:2011—2013年在河南省商丘市、周口市、济源市、睢县、登封市和中牟县动物养殖场、菜市场、饭馆采集动物粪便、生熟食品和厨具等各类标本4 488份。经过SBG增菌、沙门菌科玛嘉培养、系统生化鉴定和血清学鉴定,分离出沙门菌324株。

2. 主要试剂和仪器:沙门菌科玛嘉鉴定培养基(法国CHROMAgar公司)、脑心浸液、API20E肠杆菌科细菌鉴定板条(法国bioMérieux公司)、沙门菌诊断血清(丹麦SSI公司)、Seakem Glod琼脂糖(美国LONZA公司)、蛋白酶K(英国Roche公司)、限制性内切酶*Xba* I [宝生物工程(大连)有限公司]、Tris-HCl/EDTA/5 × TBE(北京索莱宝公司)。VITEK浊度仪(法国bioMérieux公司)、去离子水系统(美国Milipore公司)、SHZ-C型水浴摇床(上海博迅仪器公司)、三温水浴锅(北京东方精瑞公司)、Minispin台式离心机(德国Eppendorf公司)、PFGE系统及凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)

3. 实验方法:

(1)菌株的生化鉴定与血清分型:从沙门菌科玛嘉平板上直接挑取淡紫色菌落转种脑心浸液平板,37℃培养16~18h,0.85%生理盐水制备0.5麦氏浊度菌液,API20E肠杆菌科系统生化鉴定,沙门菌诊断血清进行O相玻片凝集分型,再利用0.4%营养琼脂(参见WHO沙门菌鉴定手册)进行H相(1/2相)鞭毛诱导与血清凝集,生理盐水做自凝对照。根据K-W血清分型表确定对应血清型别。

(2)PFGE分型:按照国际Pulsenet网络实验室与美国CDC公布的沙门菌标准分型方法,对324株沙门菌菌株进行PFGE分子分型,沙门菌标准株H9812作为分子质量标记。限制性内切酶*Xba* I (50 U),37℃酶切2h。电泳参数:电压6 V/cm,脉冲时间2.2~63.8 s,线性转换,电场角度120°,电泳时间19h,电泳液温度14℃。电泳结束后胶块用GelRed染料染色20min后纯水清洗30min后凝胶成像仪拍照(曝光时间3.0s,去过饱和成像)。

4. 数据分析:用BioNumerics 6.0软件对电泳图谱进行数据分析,绘制聚类分析树状图。聚类算法为非加权配对平均法(UPGMA),电泳条带位置优化度(position tolerance)1.5%,相似度100%认定为同一PFGE带型。

结果

1. 菌株来源:沙门菌分离率为7.21%(324/4 488);分别分离自18种食品及动物粪便。其中从生鸡肉中分离的沙门菌最多为78株,分离率为16.49%(78/473);其次为生猪肉(64株),分离率为13.88%(64/461);鸡粪分离出56株,分离率为10.93%(56/512),猪粪分离出46株,分离率为9.58%(46/480)。见表1。

表1 外环境中沙门菌来源分布

外环境 样本 样本	份数	检出 菌株数	检出率 (%)	外环境 样本 样本	份数	检出 菌株数	检出率 (%)
生鸡肉	473	78	16.49	熟牛肉	197	4	2.03
生猪肉	461	64	13.88	熟羊肉	81	3	3.70
鸡粪	512	56	10.93	鸭粪	129	3	2.32
猪粪	480	46	9.58	苍蝇	189	3	1.58
熟猪肉	441	25	5.66	熟菜菜板	176	1	0.56
水产品	113	10	8.84	熟鸭肉	267	1	0.37
生牛肉	207	10	4.83	羊粪	101	1	0.99
熟鸡肉	318	8	2.51	豆腐	146	1	0.68
凉菜	93	5	5.37				
生羊肉	104	5	4.80	合计	4 488	324	7.21

2. 菌株血清分型:应用玻片凝集法对324株沙门菌进行血清分型,共分为7个群、39种血清型,其中以B群检出最多(50.61%),有11种血清型164株菌,其次是C群(12.03%)(表2)。每年血清型的分布及种类也不相同,2010年和2011年有20种血清型,2012年有21种,且每年均检出稀有血清型。肠炎沙门菌是最常见的血清型,占24.07%(78/324),其次是德尔卑沙门菌(20.37%,66/324)、鼠伤寒沙门菌(10.80%,35/324)、印第安纳沙门菌(7.09%,23/324)、4,5,12:i:-和阿贡纳沙门菌(4.62%,15/324),这些血清型占沙门菌分离株的(71.6%,232/324),见表3。

表2 324株沙门菌血清型与构成比(%)

血清分群	血清型数	构成比	菌株数	构成比	
B群	O:4	11	28.20	164	50.61
C群	O:7	10	25.64	20	6.17
	O:8	5	12.82	19	5.86
D群	O:9	2	5.12	81	25.00
E群	O:3,10	7	17.94	22	6.79
	O:1,3,19	1	2.56	12	3.70
F群	O:11	1	2.56	4	1.23
G群	O:13	1	2.56	1	0.30
M群	O:28	1	2.56	1	0.30

3. PFGE分析:对排名前两位的部分肠炎沙门菌和德尔比沙门菌进行PFGE分型。46株肠炎沙门菌经*Xba* I酶切后共分为12种带型,分别命名为EN1~12,各带型包含菌株数为1~12株不等,带型

表3 外环境中沙门菌菌株宿主-血清分布

血清型	生 鸡肉	生 猪肉	鸡粪	猪粪	熟 猪肉	水产品	生 牛肉	熟 鸡肉	凉菜	生 羊肉	熟 牛肉	熟 羊肉	鸭粪	苍蝇	熟菜 菜板	熟 鸭肉	羊粪	豆腐	合计
肠炎沙门菌	37	5	35					0			1								78
德尔比沙门菌	6	20		27	4	2	4			1					1	1			66
鼠伤寒沙门菌	1	20	3	1	1		3	1		2			3						35
印第安纳沙门菌	10	1	7		1			3	1										23
4,5,12:i:-沙门菌	5		0	10															15
阿贡纳沙门菌	1	4	3		6							1							15
山夫登堡沙门菌	2			3	4		1				1						1		12
哈达尔沙门菌	4		4															1	9
火鸡沙门菌		1			6														7
伦敦沙门菌	1	2	0	3								1							7
丘古沙门菌	1	3					2												6
科瓦利斯沙门菌	3	1								1									5
阿伯丁沙门菌			2			2													4
桑给巴尔沙门菌	2	2																	4
汤卜逊沙门菌					1	2			1										4
伊斯托里亚沙门菌	2							1											3
贝塔沙门菌			1	1				1											3
舒卜拉沙门菌				1				2											3
埃斯卡纳巴沙门菌						2													2
婴儿沙门菌			1							1									2
斯坦利沙门菌	2																		2
埃森沙门菌	1											1							2
其他		5	0		2	2			3		2				3				17
合计	78	64	56	46	25	10	10	8	5	5	4	3	3	3	1	1	1	1	324

相似度为 80% ~ 100%。其中 EN1 有 5 株菌, EN4 有 12 株菌, EN6 和 EN7 各有 6 株菌, EN9 有 9 株菌, 为该血清型的优势带型, 其余 7 种带型各有 1 ~ 2 株菌。对 46 株肠炎沙门菌的宿主分析发现, 绝大多数来自于鸡宿主源(鸡胴体、鸡内脏、鸡粪等)(图 1)。30 株德尔比沙门菌 *Xba* I 酶切后共分为 17 种带型, 分别命名为 DER1 ~ 17, 各带型包含菌株数为 1 ~ 8 株不等, 带型相似度为 46.7% ~ 100.0%。其中 DER3 有 6 株菌, DER7 有 8 株菌, 为该血清型的优势带型, 其余 15 种带型各有 1 株菌。对 30 株德尔比沙门菌的宿主分析发现, 大多数来自于猪宿主源(猪肉和猪粪)(图 2)。

讨 论

对 2011—2013 年河南省外环境分离的 324 株沙门菌的宿主、血清型及其分子分型分析发现, 生熟肉制品、水产品、动物粪便及厨房用具中均有检出, 以生鸡肉和生猪肉中菌株的分离率较高, 其次是鸡粪和猪粪。分离菌株血清型分布广泛, 且不同宿主血清型的分布特征也有很大差异。324 株沙门菌经血清学鉴定分属于 7 个群 39 种血清型, 表明河南省外环境中沙门菌血清型分布具有多样性。以 B 群沙门

菌检出最高, 其次是 D 群沙门菌。血清型位于第一位的是肠炎沙门菌, 其次是德尔卑沙门菌和鼠伤寒沙门菌, 与临床流行病学调查基本相符^[2]。但与省内腹泻病例及生肉食品中分离的前五位沙门菌血清型略有不符^[3-4], 说明不同来源的沙门菌的血清型有一定差异。通过对宿主分析发现, 肠炎沙门菌绝大多数来自于鸡宿主源(鸡胴体、鸡内脏、鸡粪等), 而德尔比沙门菌大多数来自于猪宿主源(猪肉和猪粪), 结合国内相关研究数据^[5-9], 表明肠炎沙门菌是污染家禽产品的优势血清型, 而德尔比沙门菌是生猪养殖及屠宰环节中的优势血清型。提示河南省肉类食品沙门菌污染与养殖场的卫生条件有很大关联。

PFGE 聚类分析显示, 46 株肠炎沙门菌分为 12 个带型, 优势带型为 EN4 和 EN9, 其次是 EN6、EN7 和 EN1; 30 株德尔比沙门菌分为 17 种带型, 优势带型为 DER7 和 DER3。分析这些优势带型的宿主和分离地, 发现同一带型大多源自同一个地区和同一宿主源。提示相同的污染源可能持续存在, 并且来源于同一养殖场或同一家屠宰场。在食品生产加工和流通环节中, 污染来源很可能相近或相同, 极易引起食源性疾病, 所以人感染的沙门菌和外环境中存在

的沙门菌是否具有同源性还有待进一步分析,但相关监管部门应从控制传染源的角度进一步加强对畜禽类行业的监督检查,以减少沙门菌的感染。

利益冲突 无

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.
Zhu C, Xu XB. Serological diagnosis of salmonella-species[M]. Shanghai: Tongji University Press, 2009.
- [2] 刘力彰,卢珊,赵素莲,等.中国非伤寒沙门菌主要血清型临床分离株耐药特征分析[J].疾病监测,2013,28(6):459-463. DOI:10.3784/j.issn.1003-9961.2013.6.011.
Liu LZ, Lu S, Zhao SL, et al. Drug resistance of major *Salmonella* of different serotypes other than *Salmonella* typhoid in China[J]. Dis Surveill, 2013, 28(6):459-463. DOI:10.3784/j.issn.1003-9961.2013.6.011.
- [3] 穆玉姣,张白帆,赵嘉咏,等.河南省腹泻病人沙门菌血清型及其耐药性变迁研究[J].中国卫生检验杂志,2016,26(9):1335-1338.
Mu YJ, Zhang BF, Zhao JY, et al. Study on the changes of *Salmonella* serotypes and drug resistance in patients with diarrhea in Henan[J]. Chin J Health Lab Technol, 2016, 26(9):1335-1338.
- [4] 张秀丽,廖兴广,郝宗宇,等.2006—2007年河南省生肉食品中沙门菌的主动监测及其DNA指纹图谱库的建立[J].中国卫生检验杂志,2009,19(7):1545-1548.
Zhang XL, Liao XG, Hao ZY, et al. Pro-active monitoring and establishment of DNA fingerprint database of *Salmonella* in raw meat food in Henan province during 2006-2007 [J]. Chin J Health Lab Technol, 2009, 19(7):1545-1548.
- [5] 孙吉昌,游兴勇,曾艳兵,等.江西省零售畜禽肉中分离的136株沙门菌血清学鉴定与分析[J].实验与检验医学,2012,30(1):10-12. DOI:10.3969/j.issn.1674-1129.2012.01.004.
- Sun JC, You XY, Zeng YB, et al. Study on the serotype distribution of 136 *Salmonella* stains isolated from retail meats in Jiangxi province[J]. Exp Lab Med, 2012, 30(1):10-12. DOI:10.3969/j.issn.1674-1129.2012.01.004.
- [6] 赵建梅,王娟,王君玮,等.山东地区生猪和家禽屠宰环节沙门菌血清型分布[J].中国食品卫生杂志,2015,27(5):503-508. DOI:10.13590/j.cjfh.2015.05.004.
Zhao JM, Wang J, Wang JW, et al. Research on serotype distribution of *Salmonella* isolated from pig and poultry slaughter processes in Shandong province[J]. Chin J Food Hygiene, 2015, 27(5):503-508. DOI:10.13590/j.cjfh.2015.05.004.
- [7] 韩新锋,刘书亮,侯小刚,等.四川部分地区2010—2011年猪肉生产链中沙门菌耐药特征及分子分型研究[J].中华流行病学杂志,2014,35(5):519-523. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.011.
Han XF, Liu SL, Hou XG, et al. Characterization of antimicrobial resistances and molecular characteristics of *Salmonella* isolates from the pork production chain in Sichuan province, 2010-2011 [J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35(5):519-523. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.011.
- [8] 张旭,邵祝军,刁保卫.辽宁省鸡肉中沙门菌PFGE分子分型及耐药性研究[J].中国卫生检验杂志,2014,24(20):3004-3005, 3009.
Zhang X, Shao ZJ, Diao BW. Study on PFGE molecular typing and drug resistance of *Salmonella* from chicken in Liaoning province [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(20):3004-3005, 3009.
- [9] 赵薇,刘桂华,遇晓杰.2013年吉林省食源性沙门菌脉冲场凝胶电泳分型研究[J].中国卫生检验杂志,2015,25(13):2171-2172,2175.
Zhao W, Liu GH, Yu XJ. Study on the PFGE genotyping of foodborne *Salmonella* in Jilin in 2013 [J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, 25(13):2171-2172, 2175.

(收稿日期:2016-05-20)

(本文编辑:张林东)