

· 食品监测 ·

2010 年上海市食源性沙门菌菌型分布和药敏分析 以及快速检测方法的建立

张 毅¹ 陈欣钦² 宋昌彦³

(1 上海市浦东新区计量质量检测所检验科 上海 201201 2 上海市质量监督检验技术研究院 上海 200233 ;

3 上海市食品研究所 上海 200002)

摘要 目的 :通过对 2010 年上海市市售食品中食源性沙门菌污染状况、菌型分布及药敏试验进行分析 ,初步确定该地区食源性沙门菌的菌型分布及耐药性 ,为防治因沙门菌感染引起的食源性疾病提供科学依据 ,并摸索建立了针对沙门菌的快速检测方法。方法 :对农贸市场和超市的 5 类 840 份市售食品进行沙门菌分离鉴定及耐药性分析 ,并根据沙门菌的侵袭蛋白 A(invA)基因序列设计保守引物 ,特异性快速检测沙门菌。结果 :本次市售食品沙门菌阳性率检出率为 4.29% ,共 36 株沙门菌 ,生禽畜肉所占比例高达 91%。主要血型为鼠伤寒沙门菌 ,德尔夫沙门菌和都柏林沙门菌。36 株沙门菌药敏分析显示 ,所有菌株对头孢类等抗生素敏感较高 ,但对氨苄西林、麦迪霉素、环丙沙星、呋喃妥因等存在普遍较多耐药菌株 ,并在此基础上通过 PCR 法成功地特异性检测出沙门菌。结论 :上海市市售食品沙门菌污染以生禽畜肉为主 ,对抗菌药物的耐药性较高。目前治疗市售食品中食源性沙门菌引起的食源性疾病应首选头孢类等抗生素。另外 PCR 快速检测方法也操作简单 ,特异性强 ,灵敏度高 ,对食品中沙门菌污染能起到快速检测和监控。

关键词 沙门菌属 药敏分析 耐药性 侵袭蛋白 A

中图分类号 :R155.5 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)20-3938-04

Foodborne Salmonella Serotype Distribution and Sensitivity Analysis in Shanghai in 2010

ZHANG Yi¹, CHEN Xin-qin², SONG Chang-yan³

(1 Inspection department of mass metrology detection institute Shanghai Pudong New Area Shanghai 201201;

2 Quality supervision and inspection technology Research Institute Shanghai, 200233;

3 Food Research Institute Shanghai, 200002)

ABSTRACT Objective: To provide scientific basis for controlling diseases caused by salmonellas through understanding their pollution states, distribution of bacterial types and drug resistances of market foods in Shang Hai, and we establish rapid detection method for Salmonella. **Methods:** 840 food Salmonella isolation identification and drug resistance analysis from The farmers market and supermarket, the primers according to the Salmonella typhi invasion protein A(invA) was designed and was PCR to detect the Salmonella. **Results:** In all food relevance ratio of salmonellas is 4.29%, the highest is 91% in raw livestock meat. Main serotype Salmonella typhimurium is salmonella typhimurium, del weak pulse, duplin. The strains is antibiotics sensitive to ceftazidime, but is resistance to ampicillin, mid-ecamycin, ciprofloxacin, nitrofurantoin. And on this basis through PCR method successfully specificity detection of Salmonella. **Conclusion:** salmonellas pollution of market foods in Shanghai is predominated covered by raw livestock meat. Current treatment of market food in foodborne Salmonella foodborne disease should be the first choice of the antibiotic, and PCR rapid detection method also has the advantages of simple operation, strong specificity, high sensitivity of Salmonella contamination in food can play a quick detection and monitoring.

Key Words: Saimonella; Analysis of drug sensitivity; Drug resistance; InvA

Chinese Library Classification(CLC): R155.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)20-3938-04

沙门菌是肠杆菌科一大类重要致病菌。是一群寄生在人类和动物肠道内的革兰氏阴性菌^[1]。其主要污染动物性食品 ,以禽肉为主 ,因此是引起人类食物中毒的重要病原菌之一。据 WTO

报道 ,即使发达国家 ,每年亦有 30% 以上的人群患有以沙门菌为主的食物源性疾病^[2-5] ,从 2000 年起 ,世界卫生组织就建立起了全球沙门菌监测网 ,在世界范围类进行食源性致病菌及相关食源性疾病的检测和监控。目前 ,我国疾病预防控制中心也建立了全国食品污染物检测体系 ,对视频中的污染物开始进行连续的主动监控^[6]。为了解上海市市售食品中沙门菌污染情况及其

作者简介 张毅 (1981,6,9-) 本科 ,助理工程师 ,研究方向 :食品检

测 ,电话 :021-58589818 转 2201

(收稿日期 2011-06-06 接受日期 2011-06-30)

耐药性,我们对农贸市场和超市的 5 类 840 份市售食品进行调查。报道如下。

1 材料与方法

1.1 样品来源与种类

2010 年 5-8 月上海市抽检超市、农贸市场销售使用的生肉类、生禽类、水产品、蔬菜、豆制品,共 840 件。

1.2 培养基和试剂

培养基购自江苏博达生物技术公司,科玛嘉沙门菌显色培养基购自郑州博赛生物公司,沙门菌诊断血清(60 种)购自宁波天润生物药业有限公司,药敏纸片购自生物梅里埃公司。PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司,特异性引物委托上海生物工程技术服务公司合成,序列如下:

invA-F:GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA
invA-R:TCATCGCACCGTCAAAGGAAC

1.3 方法

根据 GB4789.4-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》进行样品检测。药敏试验采用纸片琼脂扩散(K-B)法,并按临床实验室标准协会标准判定药敏结果。药敏试验质控菌株为大肠埃希菌 ATcc44828,非沙门菌来源于中国疾病预防控制中心。

1.4 细菌分离与鉴定

无菌称取 25g 样品并接种于 225mL 增菌液(BP)中,37℃

培养 24 h。取培养后的增菌液划线接种在科玛嘉沙门菌显色培养基平板 37℃、24h 分离培养。挑取可疑菌落接种于三糖铁琼脂和动力-吡啶-尿素及其他生化试验培养基,其反应符合沙门菌的,用沙门菌诊断血清进行血清学分型鉴定。

1.5 沙门菌侵袭蛋白 A(invA)基因单基因 PCR 扩增

将 5 种沙门菌单菌落和其他非沙门菌分别接种于增菌液中进行增菌,将培养液分装于离心管中,离心收集沉淀。用细菌 DNA 提取试剂盒提取 DNA,-20℃保存,用于 PCR 鉴定。PCR 反应体系为 30μl: 灭菌去离子水:23.7μl,Taq Buffer:3μl,10mM dNTP:0.3μl,特异性引物:0.25 μl,5U/μl Taq DNA 聚合酶:0.5ul,细菌 DNA 模板:2μl (阴性对照用无菌去离子水 2μl 代替 DNA 模板)。混匀后,放入 PCR 仪,95℃预变性 5min,95℃变性 30s,60℃退火 30s,72℃延伸 30s,30 个循环,最后 72℃延伸 2min。

2 结果

2.1 各类食品沙门菌检出情况

样品 840 件,其中生肉类 210 件,检出沙门菌 13 株,检出率为 6%;生禽类 189 件,检出沙门菌 21 株,检出率为 11%;蔬菜类 150 件,检出沙门菌 2 株,检出率为 1.3%;水产品 167 件,检出沙门菌 0 株,检出率为 0%;豆制品 124 件,检出沙门菌 0 株,检出率 0%。

表 1 各类食品沙门菌检出情况
Table 1 Various types of Salmonella in food

Sample	Number	Detected number	Detection rate (%)
Meat	210	13	6
Avian	189	21	11
Green stuff	150	2	1.3
Aquatic products	167	0	0
Bean products	124	0	0
Total	840	36	4.29%

2.2 沙门菌血清分型

从样品中分离的 36 株沙门菌血清分型经鉴定分述于 5 个血清型,分别为鼠伤寒沙门菌,德尔卑沙门菌和都柏林沙门

菌,雷丁沙门菌,阿伯丁沙门菌。其中鼠伤寒沙门菌,德尔卑沙门菌为主要常见血清型,共占了 57%。

表 2 沙门菌血清分型
Table 2 Salmonella serotyping

Bacteria name	O antigen	H antigen		Strain number	Ratio(%)
		First phase	Second phase		
Salmonella Typhimurium	4 [5],12	i	1,2	12	32
Salmonella Del weak pulse	4 [5],12	F,g	[1,2]	10	25
Salmonella dublin	1,9,12	g,p	-	5	15
Salmonella Radin	4,5,12	e,h	1,5	5	15
Salmonella bardo	8	e,h	1,2	4	13

2.3 药敏试验

36 株沙门菌用 13 种抗生素进行药敏试验 结果显示 对至少一种抗生素有耐药性的菌株数达到了 41.66% , 对至少两种抗生素有耐药性的比例达到了 22.22% 。从图中可知 所有菌株

对头孢类等抗生素敏感较高 ,但对氨苄西林、麦迪霉素、环丙沙辛、呋喃妥因存在耐药菌株 ,其中对氨苄西林的耐药性达到了 36%。

表 3 36 株沙门菌对 14 种抗生素的敏感度
Table 3 36 strains of Salmonella susceptibility to 14 antibiotics

Antibiotics	Abbreviation	Sensitivity(%)	Medium sensitivity(%)	Resistance(%)
Ceftazidime	CAZ	94	2	2
Cefoxitin	FOX	93	3.1	3.9
Ceftriaxone	CRO	96	2	2
Ampicillin	AMP	42.2	21.8	36
Ciprofloxacin	CIP	56.5	10.3	33.2
Midecamycin	MDM	63.2	8.5	28.3
Nitrofurantoin	F	66.8	20	13.2
Gentamicin	CN	87.6	1.5	10.9
Chloramphenicol	C	75.6	11	13.4
Streptomycin	S	75.2	11.5	12.3
Tetracycline	TE	70.6	16.9	12.5
Sulfanilamide	S3	80.3	5.6	13.1
Amoxicillin	AMC	77.3	12.3	10.4
Levofloxacin	LEV	73.9	11.9	14.2

表 4 36 株沙门菌耐药总数分布
Table 4 36 strains of Salmonella resistant total distribution

Antibiotics total	Total plants	Resistance plants	Ratio(%)
1	36	15	41.66
2	36	8	22.22
3	36	5	13.88
4	36	3	8.33
5	36	2	5.55
6	36	1	2.77
7	36	0	0.00
8	36	0	0.00
9	36	0	0.00
10	36	0	0.00
11	36	0	0.00
12	36	0	0.00
13	36	0	0.00
14	36	0	0.00

2.4 特异性实验

由图 1 可见 ,所有 5 种沙门菌的 PCR 检测结果均为阳性 ,扩增产物为 279 bp 其他菌株和阴性对照均为阴性。

沙门菌是重要的肠道病原菌 ,是我国主要的细菌性食物中毒食源性致病菌。从对上海市市售食品的检测结果来看 ,生肉生禽类中沙门菌污染最为严重 ,占了总检出率的 91% ,可见作为沙门菌的主要携带者 ,生肉生禽类产品是沙门菌中毒的重要来源。所以 ,食品监管部门应该改进和加强畜禽类农贸产品的

3 结 论

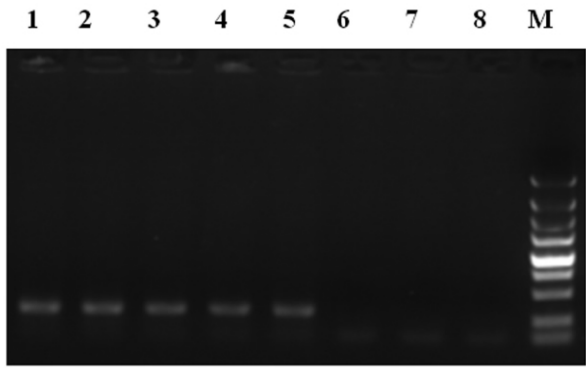


图 1 不同型沙门菌 PCR 检测结果

Fig.1 Different type of Salmonella PCR detection results

1 salmonella typhimurium 2 salmonelladel weak pulse 3 salmonella dublin 4 salmonella radin 5 Salmonella bardo 6 staphylococcus aureus 7 escherichia coli ;8 negative control ;9 DNA Mark(5000bp)

卫生管理工作 杜绝沙门菌菌株的产生源头。

微生物耐药性是指对通常能抑制其生长繁殖的某种浓度的抗菌药物产生的耐受性。其耐药性主要受到自身或外界导入的耐药基因的影响^[7]。长期研究表明,微生物耐药性现象日趋普遍,特别是病原微生物,其不仅耐受的抗生素范围越来越大,耐受剂量也越来越高,并且越来越多的菌株产生了多重耐药性。目前,由耐药菌株引起的沙门菌病爆发流行,在发达国家和发展中国家都时有报道^[8-9]。本次检测结果显示,对至少一种抗生素有耐药性的菌株数达到了 41.66%,对至少两种抗生素有耐药性的比例达到了 22.22%。而且部分沙门菌对氨苄西林、麦迪霉素、环丙沙星的耐受率特别严重,分别高达 36%、33.2%、28.3%。这些证据表明,在动物中滥用抗生素,只会导致沙门菌耐药性越来越严重,其对人类健康和公共卫生都会具有潜在的巨大危险,对此我们建议:一方面加强沙门菌耐药性的检测和动态监控,另一方面规范家禽养殖中抗生素标准使用原则,切勿滥用抗生素,避免耐药菌株引起的沙门菌病的爆发。

目前沙门菌的检测方法主要还是以 White Kauffmann 抗原表为基础,通过生化反应和血清学实验进行鉴定^[10]。整个检验步骤繁琐,检验周期较长,并且灵敏度也较低。在应对突发公共卫生事件时,达不到诊断及时,结果特异性高等要求。近十年,分子生物学技术中的 PCR 技术以其敏感、特异性高、快速等优点被广泛应用于医学检测领域。我们在针对沙门菌 PCR 检测过程中,选用了来源于沙门菌属侵袭性抗原保守基因 invA。大量实验也证明了 invA 基因是沙门菌致病力所必须的关键因子^[11-14],因此利用其保守序列进行 PCR 特异性扩增能够对食品中的沙门菌进行准确快速的诊断和监控,尤其在应对突发公共卫生事件中能起到重要作用,是食品安全检测的理想工具。

参考文献(References)

[1] Brenner FW,Villar RG ,Angulo FJ,et al.Salmonella nomene lature[J]. Clin Microbiol,2000,38: 2465-2467

[2] Javier Garaizar,Nuria L pez-Molina,Idoia Laconcha,et al.Suitability of PCR Fingerprinting,Infrequen Restriction-Site PCR,and PulsedField Gel Electr0Dhoresis,Combined withComputerized Gel Analysis. In Library Typing of Salmonella enteriea Serovar Enteritidis [J].Appl Eviron Microbiol,2000,66:5273-5281

[3] Mcad PS,Slutsker L,Dietz V,et al.Food related illness anddeath in the United States[J].Emerg Infect Dis,1999,5:607-625

[4] Lsen SJ, MacKinnon LC, Goulding JS,et al.Surveillance forfoodborn-e-disease outbreaks-United States, 1993-1997 [R]. Morb M ortal Wk-ly Rep CDe Surveil1.Summ, 2000, 49: 1-62

[5] JRoeourt, GMoy, KVierk, et al. The Present state of food borne disease in OECD countries[J]. WHO, 2003

[6] 刘秀梅,陈艳,王晓英. 1992-2001 年食源性疾病暴发资料分析—国家食源性疾病监测网[J].卫生研究, 2004, 33(6):725 -727

Liu Xiumei,Chen Yan,Wang Xiaoying. Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001 national foodborne disease surveillance system[J].Journal of hygiene research,2004,33(6):725 -727

[7] 梁志宏. 微生物耐药性对食品安全的影响 [J]. 食品科学, 2004, 25: 288-290

Liang Zhi-hong. Microbial resistance to the effects on food safety[J]. Food Science, 2004, 25: 288-290

[8] 冉陆. 食源性致病菌及其耐药性[J].预防医学文献信息, 2001, 7(5): 609-612

Ran Lu. Drug resistance of food-borne pathogenic bacteria [J]. Literature and information on preventive medicine,2001,7(5):609-612

[9] 冉陆,张静. 全球食源性疾病监测及监测网络[J].中国食品卫生杂志, 2005,17(4):385-386

Ran Lu, Zhang Jin. Monitoring network of food-borne disease in world[J].Chinese Journal of Food Hygiene,2005,17(4):385-386

[10] AOAC/BAM(Bacteri0l0gical Analytical Manual,FDA).berger bacter-ia identification manual [M]

[11] Kary Mullis.Enzymatic amplification of beta-globin genomicsequ-ences and restriction site analysis for diagnosis of sicklelecl anemia[J]. Science,1985,230(4732):1350-1354

[12] Galan J E,Curtiss R 3rd.Distribution of the invA,-B,-C-and-D genes of Salmo nella typhimurium among otherSalmo nella serovars:invA mu-tants of Salmo nella trphi are deficient for entry into mammalian ceils [J].Infect Immun, 1991, 59(9): 2901-2908

[13] Bulte M, Jakob P. The use of a PCR-generated invA probe for the detection of Salmonella spp. in artificially and naturally contaminat-ed foods[J]. Int J Food Microbiol, 1995, 26(3): 335-344

[14] Cadi K T.Detection of Samonellae in chicken feces by acombination of tetrathionate broth enrichment,capillary PCR,and capillary gel ele-ctrophoresis[J]. Journal of clinicalmicrobiology, 2001: 1871-1876