

四川部分地区猪肉产业链中沙门氏菌的分离及其鉴定

侯小刚¹, 刘书亮^{1,*}, 韩新锋¹, 吴聪明²

(1.四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014; 2.中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要: 研究四川猪肉产业链中沙门氏菌的污染和传播情况。自2010年5月至2011年5月从四川部分地区的大型养猪场、下游生猪屠宰场和肉类市场采样829份, 采用沙门氏菌科玛嘉显色培养基等分离筛选疑似沙门氏菌, 并应用针对沙门氏菌*invA*和*hut*基因的二重PCR方法鉴定, 再对沙门氏菌分离株进行血清型分析。结果表明: 分离鉴定出沙门氏菌共112株; 养殖场生猪、屠宰场猪肉和销售市场猪肉中沙门氏菌污染率分别为16.40%、10.71%和10.00%; 所检出沙门氏菌共有11种血清型, 以德尔卑(*S.derby*)、鼠伤寒(*S.typhimurium*)、波茨坦(*S.potsdam*)、吉韦(*S.give*)等沙门氏菌为主, 优势血清型沙门氏菌呈现由养猪场向生猪屠宰场和肉类市场传播的趋势, 需要加强卫生监督。

关键词: 沙门氏菌; 猪肉产业链; 分离鉴定; 血清型

Isolation and Identification of *Salmonella* from Pork Industry Chains in Partial Areas of Sichuan Province

HOU Xiao-gang¹, LIU Shu-liang^{1,*}, HAN Xin-feng¹, WU Cong-ming²

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: To investigate the contamination and propagation status of *Salmonella* in pork industry chains from Sichuan province, and to provide a basis for food safety. CHROMagar was used for isolating *Salmonella* from 829 samples collected from large-scale pig farms, downstream slaughterhouses and sale markets in Sichuan during May 2010 to May 2011. These strains were identified by duplex PCR amplification of the *invA* and *hut* genes. Finally, serotyping of these *Salmonella* isolates was performed. The results showed that 112 strains of *Salmonella* were identified from the above samples. Of the samples from pig farms, slaughterhouses and sale markets, 16.40%, 10.71% and 10.00% were found to be positive for *Salmonella*, respectively. A total of 11 *Salmonella* serotypes were found, and the dominant serotypes were *S. derby*, *S. typhimurium*, *S. potsdam* and *S. give*. These dominant serotypes tended to spread from slaughterhouses to sale markets. As a consequence, the hygiene supervision needs to be strengthened.

Key words: *Salmonella*; pork industry chain; isolation and identification; serotype

中图分类号: TS207.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)11-0250-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201311054

沙门氏菌是公共卫生学上有重要意义的一种常见的人畜共患病原菌, 血清型有2463个, 我国共检出287个^[1]。由于环境和宿主的不同, 其血清型呈明显的地域性差异^[2-6]。

近年来, 沙门氏菌大规模污染食品并引起食物中毒的事件时有发生^[7-8]。动物性食品是沙门氏菌污染的主要对象, 动物生前以及后续的屠宰加工、运输、贮藏和销售等环节都容易污染和传播沙门氏菌。猪肉是我国广大居民的主要动物性食品之一, 实时监测猪肉产业链(包括养殖场、屠宰场和销售市场)中沙门氏菌的污染和传播情

况对确保猪肉安全具有重要意义。目前, 对猪肉产业链单个环节中沙门氏菌污染的调查已有较多报道^[2,4,9], 但从猪肉产业链的整体角度, 对沙门氏菌污染的调查报道较少。传统的细菌分离鉴定费时费力, 灵敏度差, 而PCR方法以其快速灵敏、特异性强的特点被广泛应用于细菌检测中, 其中, 针对*invA*基因^[10]和*hut*基因^[11]作为靶基因的PCR方法检测沙门氏菌已得到普遍认可^[12-15]。

本研究旨在对四川省部分地区猪肉产业链主要环节中沙门氏菌进行分离鉴定和血清型分析, 了解优势血清

收稿日期: 2012-03-02

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200903055)

作者简介: 侯小刚(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: houng218@126.com

*通信作者: 刘书亮(1968—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与发酵工程。E-mail: lsliang999@163.com

型的分布与传播,为猪肉安全生产和沙门氏菌食物中毒的防治提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

2010—2011年期间,自四川部分地区的大型养猪场、下游生猪屠宰场和肉类市场采集样品,其中养殖场取育肥猪粪便样、屠宰场取猪胴体分割肉样、肉类市场购买零售肉样。

氯化镁孔雀绿(MM)增菌液、亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液、胆硫乳(DHL)琼脂、营养肉汤均 杭州微生物有限公司;沙门氏菌显色培养基(法国科玛嘉) 郑州博赛生物技术股份有限公司;DL 2000 DNA Marker、PCR反应试剂 宝生物工程(大连)有限公司;Goldview™核酸染料 天根生化科技有限公司;沙门氏菌属诊断血清(60种) 宁波天润生物药业有限公司;其余试剂为分析纯或生化试剂。

1.2 参考菌株

肠炎沙门氏菌CICC21482为阳性对照菌株,大肠杆菌ATCC25922为阴性对照菌株,均由四川农业大学食品微生物实验室保存。

1.3 引物

根据文献[10-11]针对沙门氏菌*invA*基因和*hut*基因设计两对引物(表1),由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表1 靶基因名称及引物序列

Table 1 Target gene and primer sequences

目的基因	引物名称	引物序列	产物大小/bp
<i>invA</i> 基因	<i>invA</i> -F	5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA-3'	284
	<i>invA</i> -R	5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	
<i>hut</i> 基因	<i>hut</i> -F	5'-ACTGGCGTATCCCTTCTCTGCTG-3'	495
	<i>hut</i> -R	5'-ATGTTGTCCTGCCCTGGTAAGAGA-3'	

1.4 仪器与设备

Scientz-04无菌均质器 宁波新芝生物科技股份有限公司;Sorvall离心机 美国科俊仪器有限公司;Milli-Q超纯水系统 美国Millipore公司;MyCycler PCR仪、PowerPac Basic电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像系统 美国Bio-Rad公司。

1.5 方法

1.5.1 样品采集

在猪肉生产加工销售的3个主要环节(即养殖-屠宰加工-销售)分别取样。养猪场,随机采集育肥猪肛拭粪样置于无菌运送培养基中;生猪屠宰场,随机抽取胴体分割车间肉样,每份250g左右装到无菌保鲜袋内;猪肉市场,各摊贩点购买零售猪肉,每份250g左右装到无菌保鲜袋内。所有样品均低温保存运回实验室,待检。

1.5.2 沙门氏菌的分离

无菌条件下,将肛拭粪样约1g分别置于10mL无菌MM增菌液和SC增菌液中混匀,分别在42℃(MM增菌液)和37℃(SC增菌液)条件下培养18~24h;将猪肉样品放在一次性无菌均质袋内用均质器拍打成匀浆,取25g加入225mL无菌水,充分混匀10min,各取1mL浸洗液分别接种于10mL MM增菌液和SC增菌液中混匀,然后分别在42℃(MM增菌液)和37℃(SC增菌液)条件下培养18~24h。将增菌培养液划线接种于DHL琼脂平板和沙门氏菌显色(法国科玛嘉)平板进行分离纯化,筛选出疑似沙门氏菌菌株。

1.5.3 沙门氏菌分离株的二重PCR鉴定

1.5.3.1 细菌DNA的提取

采用热裂解法^[15-16]提取细菌DNA:平板上挑取单个疑似沙门氏菌菌落接种于5mL灭菌营养肉汤中37℃培养18~20h,取培养液1.5mL,10000r/min离心1min,取沉淀,用1mL灭菌超纯水重复洗两次;10000r/min离心1min,取沉淀,加100μL TE(pH8.0)溶液,重悬细胞,98℃水浴10min,再于冰上放置5min;12000r/min离心1min,取上清液,即为细菌DNA,-20℃保存备用。

1.5.3.2 PCR扩增

根据文献[12]和预实验结果,两对引物*invA*与*hut*浓度比例为1:3,PCR反应体系包括:10×PCR Buffer 2.5μL、MgCl₂(25mmol/L)1.5μL、dNTP 2μL,*invA*基因和*hut*基因上下游引物终浓度分别是0.2μmol/L和0.6μmol/L,模板DNA 2μL,补双蒸水至最终体积25μL。PCR反应程序^[16]为:94℃预变性5min;94℃变性40s,60℃退火40s,72℃延伸50s,40个循环;72℃延伸5min,于4℃保存。

1.5.3.3 PCR产物的电泳检测

将PCR产物于1.5%琼脂糖(0.5×TBE)凝胶电泳后,凝胶成像系统分析结果,能扩增出*invA*基因和*hut*基因特异性片段的菌株,即为沙门氏菌阳性菌株^[12]。

1.5.4 沙门氏菌的血清分型

参考食品安全国家标准GB4789.4—2010《食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验》^[17]中的方法,用沙门氏菌属诊断血清(60种)对沙门氏菌分离株进行血清分型。

2 结果与分析

2.1 疑似沙门氏菌分离结果

829份样品通过选择性培养基筛选得到疑似沙门氏菌阳性样品116份。

2.2 疑似沙门氏菌的二重PCR产物鉴定结果

采用参考菌株和空白实验对所设计的两对引物进行特异性验证,结果表明肠炎沙门氏菌CICC21482扩增出两条目的片段,其余对照均未扩增出任一目的片段,说明所设计的两对引物特异性可靠。

从不同样品中检出的116株疑似沙门氏菌的二重PCR产物的部分电泳结果如图1所示。同时扩增出*invA*基因和*hut*基因的特异性片段(284bp和495bp)的疑似菌株(如图1中条带1~5、8~12)共有112株,判断为沙门氏菌阳性^[12],其余4株疑似沙门氏菌均未扩增出任一目的片段(如图1中条带6、7),判断为沙门氏菌阴性。由此得出,所采集的样品有112份呈沙门氏菌阳性。



M. DL2000 DNA Marker; 1~12. 部分疑似沙门氏菌菌株。

图1 部分疑似沙门氏菌二重PCR产物的电泳图

Fig.1 Electrophoresis of duplex PCR amplified products from suspected *Salmonella*

2.3 四川部分地区猪肉产业链中沙门氏菌的污染情况

表2 四川部分地区猪肉产业链中沙门氏菌的污染率

Table 2 Percentage of *Salmonella* contamination from pork industry chains in partial areas of Sichuan province

样品来源	养殖场育肥猪粪样	屠宰场猪肉	销售市场猪肉	合计
采样量/份	433	196	200	829
阳性量/份	71	21	20	112
污染率/%	16.40	10.71	10.00	13.52

四川部分地区猪肉产业链中沙门氏菌的污染情况见表2。养殖场育肥猪沙门氏菌污染率最高,达到16.40%(71/433),而生猪屠宰场和猪肉市场的猪肉样品沙门氏菌污染率分别是10.71%(21/196)和10.00%(20/200)。

2.4 四川部分地区猪肉产业链中沙门氏菌的血清型分布情况

112株沙门氏菌的血清鉴定结果见表3,共有102株沙门氏菌被定型,可分为11种血清型;另有10株未定型沙门氏菌菌株不自凝,且均与沙门氏菌属诊断血清O多价(A~F)呈阳性反应,具体血清型种类还有待采用更多的血清因子进一步确定。已定型的沙门氏菌:德尔卑沙门氏菌占58.04%(65/112),鼠伤寒沙门氏菌占12.50%(14/112),波茨坦沙门氏菌占6.25%(7/112),其余血清型占少数。养殖场育肥猪中检出的沙门氏菌共分为7种血清型,其中德尔卑沙门氏菌占63.38%(45/71),鼠伤寒沙门氏菌占16.90%(12/71),波茨坦沙门氏菌占5.63%(4/71),其余血清型占少数;生猪屠宰场猪肉中检出的沙门氏菌共分为4种血清型,其中德尔卑沙门氏菌

占61.90%(13/21),鼠伤寒沙门氏菌和吉韦沙门氏菌各占9.52%(2/21),茨昂威沙门氏菌占4.76%(1/21),另有3株未定型;销售市场猪肉中检出沙门氏菌共有6种血清型,其中德尔卑沙门氏菌占35.00%(7/20),波茨坦沙门氏菌和吉韦沙门氏菌各占15.00%(3/20),圣保罗沙门氏菌和猪霍乱或丙型副伤寒沙门氏菌各占10.00%(2/20),鸭沙门氏菌占5.00%(1/20),另有两株未定型。

表3 四川部分地区猪肉产业链中沙门氏菌的血清型分布情况

Table 3 Serotype distribution of *Salmonella* from pork industry chains in partial areas of Sichuan province

沙门氏菌血清型	产业链各环节沙门氏菌分离株的数量			总计
	养殖场育肥猪	屠宰场猪肉	市场猪肉	
德尔卑沙门氏菌(<i>S. derby</i>)	45	13	7	65
鼠伤寒沙门氏菌(<i>S. typhimurium</i>)	12	2	0	14
波茨坦沙门氏菌(<i>S. potsdam</i>)	4	0	3	7
吉韦沙门氏菌(<i>S. give</i>)	0	2	3	5
茨昂威沙门氏菌(<i>S. tshiongwé</i>)	1	1	0	2
圣保罗沙门氏菌(<i>S. saintpaul</i>)	0	0	2	2
猪霍乱或丙型副伤寒沙门氏菌(<i>S. choleraesuis</i> 或 <i>paratyphi-C</i>)	0	0	2	2
奥凯福科沙门氏菌(<i>S. okefoko</i>)	2	0	0	2
阿贡纳沙门氏菌(<i>S. agona</i>)	1	0	0	1
布伦登鲁普沙门氏菌(<i>S. braenderup</i>)	1	0	0	1
鸭沙门氏菌(<i>S. anatum</i>)	0	0	1	1
未定型(untyped)	5	3	2	10

2.5 四川部分地区猪肉产业链中沙门氏菌血清群的分布情况

表4 四川部分地区猪肉产业链中沙门氏菌血清群的分布

Table 4 Serogroup distribution of *Salmonella* from pork industry chains in partial areas of Sichuan province

样品名称	血清群分布		
	B群	C群	E群
养殖场育肥猪	58	6	2
屠宰场猪肉	15	1	2
市场猪肉	9	5	4
总计	82	12	8

由表4可知,四川部分地区猪肉产业链中沙门氏菌血清型分布在B、C、E群,而产业链各个环节沙门氏菌都以B群为优势血清群,但是在市场猪肉中,B群沙门氏菌所占的比例(9/18)明显低于养殖场育肥猪和屠宰场猪肉中B群沙门氏菌所占的比例(58/66、15/18)。

3 讨论

目前,沙门氏菌的检测方法主要有传统标准方法、PCR方法和免疫学方法。免疫学方法虽然准确,但成本较高、灵敏度较低;传统标准方法费时、操作繁琐,难以应对大规模样品中沙门氏菌的快速检测^[18-19];而PCR方法快速、灵敏、准确。本研究检测沙门氏菌采用的是传统方法分离、PCR方法鉴定的方式,实现了快速准确从

大批量样品中收集沙门氏菌的目的。根据*invA*基因和*hut*基因设计的两对引物鉴定沙门氏菌分离株的结果与血清学结果一致,说明这两个特异性基因在检测沙门氏菌时可靠,与文献[12-15]等的结论相符。

从本研究的结果来看,在所涉及地区猪肉产业链中沙门氏菌的污染率比较高,而不同的采样环节污染率有一定差异。养殖场育肥猪沙门氏菌污染率最高,达到了16.40%,而张玮^[9]对安徽部分猪场生猪调查的结果表明沙门氏菌检出率总体达到4.07%,其中安庆地区猪场检出率达到18.89%,说明不同采样点生猪沙门氏菌检出率差异明显。屠宰场和销售市场猪肉沙门氏菌污染率相近,分别为10.71%和10.00%,都远远低于某些报道中的74.6%^[20],而张静等^[21]对某定点生猪屠宰场的研究中指出生猪胴体体表和肉样沙门氏菌检出率分别为5%和0%,席昭雁等^[22]在对陕西食品的调查中指出生猪肉中沙门氏菌的检出率达到19.10%。本研究中所采集生猪肉样大部分来自卫生条件不规范的屠宰场和市场,其中多个环节冷链系统不够完备,加之相关从业人员疏忽和来自环境的污染,造成了所采生肉样品沙门氏菌的污染率较高。可见,在猪肉屠宰场和销售市场,不同的卫生条件下沙门氏菌的污染率差异很大,卫生条件严格的情况下沙门氏菌污染率很低甚至可以达到零污染,卫生条件不规范的情况下容易出现沙门氏菌大规模污染食品。

从本研究中沙门氏菌的血清型统计结果看,所涉及地区猪肉产业链中沙门氏菌分离株以德尔卑沙门氏菌为优势血清型,与杨保伟等^[2]的研究结果一致,而在国内其他的相关研究报道中,有以肠炎沙门氏菌占优势^[23],也有以鼠伤寒沙门氏菌占优势^[24],表明沙门氏菌优势菌血清型的分布存在很大的区域性差异。本研究中德尔卑沙门氏菌虽然在各产业链中均占优势,但随着产业链条的递进(养殖场-屠宰场-销售市场),优势血清型在各产业链条中所占比例有所下降,渐变过程为63.38%、61.90%、35.00%,与此同时在上游产业链中占劣势的血清型到下游产业链中其比例有所上升;另外,某些在上游产业链中检出的血清型在下游产业链中并未检出,而有些在上游产业链中并未检出的血清型却出现在下游产业链中。说明沙门氏菌在本研究所涉及地区猪肉产业链中主要以垂直传播的途径污染生猪,即多数沙门氏菌来源于生猪本身,同时在产业链下游环节中外源性沙门氏菌又进一步污染生猪肉。

四川部分地区猪肉产业链中沙门氏菌污染情况不容乐观,并且产业链上游环节中沙门氏菌向产业链下游环节垂直传播;生猪屠宰场和销售市场卫生规范执行不严格,导致加工、销售中的生猪肉再次感染沙门氏菌。因此,需要政府及相关部门加强对猪肉产业链的生产卫生监督,确保卫生措施有效执行。

参考文献:

- [1] 蒋原. 食源性病原微生物检测指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [2] 杨保伟, 张秀丽, 曲东, 等. 2007—2008陕西部分零售畜禽肉沙门氏菌血清型和基因型[J]. 微生物学报, 2010, 50(5): 654-660.
- [3] ESPIGARES E, BUENO A, ESPIGARES M, et al. Isolation of *Salmonella* serotypes in wastewater and effluent: effect of treatment and potential risk[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2006, 209(1): 103-107.
- [4] 李郁, 焦新安, 魏建忠, 等. 屠宰生猪肉沙门氏菌分离株的血清型和药感受性分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(1): 67-70.
- [5] 赵志伟, CHIESA F, 韦平, 等. 2009—2010年广西南宁畜禽食品及家禽中沙门氏菌的血清型调查[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 198-200.
- [6] BELI E, DURAKU E, TELO A. *Salmonella* serotypes isolated from chicken meat in Albania[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71(2/3): 263-266.
- [7] US: FDA. Recall of shell eggs[RO/OL]. (2010-10-18) [2011-01-02]. <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/MajorProductRecalls/ucm223522.htm>.
- [8] 魏玲, 武会娟, 李宝明, 等. 4种食源性致病菌污染情况及其新型检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(19): 302-306.
- [9] 张玮. 安徽省部分猪场生猪沙门氏菌带菌情况与耐药性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [10] RAHN K, GRANDISD, CLARKE R C, et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*[J]. Mol Cell Probes, 1992(6): 271-279.
- [11] COHEN N D, NEIBERGS H L, McGRUDER E D, et al. Genus-specific detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction (PCR)[J]. J Vet Diagn Invest, 1993, 5(3): 368-371.
- [12] 邵碧英, 陈彬, 汤敏英, 等. 沙门氏菌多重PCR检测方法的建立[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 489-492.
- [13] 许会会, 雷连成, 谢芳, 等. 沙门氏菌PCR检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(4): 94-97.
- [14] 刘书花, 张瑞凌, 丁尚志, 等. 3类食品中沙门氏菌PCR快速检测方法的建立[J]. 现代农业科技, 2010(23): 324-325.
- [15] 黄金林, 焦新安, 文其乙, 等. 应用聚合酶链反应快速检测沙门氏菌[J]. 扬州大学学报, 2002, 23(3): 5-7.
- [16] 邵碧英, 陈彬, 汤敏英, 等. 沙门氏菌DNA提取及PCR反应条件的优化[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 331-334.
- [17] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB 4789.4—2010 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [18] CROCIL L, DELIBATO E, VOLPE G, et al. Comparison of PCR, electrochemical enzyme-linked immunosorbent assays, and the standard culture method for detecting *Salmonella* in meat products[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3): 1393-1396.
- [19] VANESSA S, EDWARD T M, MICHAEL B. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* species including three new chromogenic plating media[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 123(1/2): 61-66.
- [20] 郑克新, 赵广海. 猪胴体沙门氏菌污染严重应予重视[J]. 猪业科学, 2006, 23(7): 80-81.
- [21] 张静, 周源, 韩玉虎, 等. 屠宰场生猪肉主要细菌学指标的调查研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(5): 89-90.
- [22] 席昭雁, 张阿峰, 吴荣, 等. 陕西省食品中沙门氏菌检测研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2011, 15(8): 671-673.
- [23] 黄照清, 黄祖华, 黄裕, 等. 肉菜超市销售肉品沙门氏菌污染状况及血清型分布[J]. 肉品卫生, 2003(8): 34-35.
- [24] 黄晔. 健康猪分割肉沙门氏菌的菌型调查[J]. 肉品卫生, 2003(3): 16-18.