

论著

我国4省肉鸡屠宰场沙门氏菌脉冲场凝胶电泳分子分型

白莉<sup>1</sup>,李薇薇<sup>1</sup>,王岗<sup>1</sup>,赵悦<sup>2</sup>,张秀丽<sup>3</sup>,乔昕<sup>4</sup>,杨小蓉<sup>5</sup>,陈玉贞<sup>6</sup>,蒋原<sup>7</sup>,郭云昌<sup>1</sup>

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021; 2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021; 3. 河南省疾病预防控制中心,河南 郑州 450016; 4. 江苏省疾病预防控制中心,江苏 南京 210009; 5. 四川省疾病预防控制中心,四川 成都 610041; 6. 山东省疾病预防控制中心,山东 济南 250014; 7. 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心,江苏 南京 210001)

**摘要:****目的** 了解我国四省肉鸡屠宰场沙门氏菌脉冲场凝胶电泳分子分型情况。**方法** 参照美国疾病预防控制中心 PulseNet 实验方法,对2010年监测4省肉鸡屠宰场分离到的167株沙门氏菌,运用 *Xba* I 酶进行酶切并完成 PFGE 分析,利用 BioNumerics 软件对分离株的指纹图谱进行聚类分析并建立数据库。**结果** 167株沙门氏菌共分为18个群,包括了75个不同的带型。相同血清型具有相似带型,基本归于同一群。65株印地安纳沙门氏菌有38个带型,54株肠炎沙门氏菌有16个带型,16株奥尔巴尼沙门氏菌仅有1个带型。**结论** 各省沙门氏菌的带型具有地区性差异,又具有优势型别的交叉。屠宰场存在严重的交叉污染,加强加工环节中的关键控制点——沙门氏菌的监测和干预,从而降低肉鸡及其产品中沙门氏菌的污染,这是从源头控制污染的根本措施。

**关键词:**沙门氏菌;屠宰场;脉冲场凝胶电泳;分子分型;食源性致病菌

**中图分类号:**R155.5;R378.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2013)04-0303-06

Molecular typing of *Salmonella* isolates from poultry slaughterhouses in four provinces by pulsed-field gel electrophoresis

BAI Li, LI Wei-wei, WANG Gang, ZHAO Yue, ZHANG Xiu-li, QIAO Xin, YANG Xiao-yong, CHEN Yu-zhen, JIANG Yuan, GUO Yun-chang

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To study the pulse-field gel electrophoresis (PFGE) type of *Salmonella* strains isolated from poultry slaughterhouses in four provinces. **Methods** DNA collected from 167 *Salmonella* strains were digested by *Xba*I according to the standard PFGE protocol of US CDC. The PFGE patterns were analyzed with BioNumerics software. **Results** 167 *Salmonella* strains were clustered into 18 groups with 75 different patterns, and the same serotype had the similar PFGE pulse types which could be classified to one group. 65 *S. Indiana* were clustered into 38 patterns. 54 *S. Enteritidis* were clustered into 16 patterns. 16 *S. Albany* were clustered into 1 pattern. **Conclusion** The distribution of pulse types of *Salmonella* isolates was different between regions, but some pulse types were cross-distributed. Cross-contamination was serious in slaughterhouses. Monitoring and intervention of critical control point during processing should be strengthened in order to decrease *salmonella* contamination in poultry products, and that was the basic measure of source control.

**Key words:** *Salmonella*; slaughter house; pulsed-field gel electrophoresis; molecular typing; food-borne pathogen

沙门氏菌是引起人类食物中毒的主要食源性致病菌之一<sup>[1]</sup>。美国1998—2002年大约有164 044例患者<sup>[2]</sup>。我国70%~80%的细菌性食物中毒是由沙

门氏菌引起的<sup>[3]</sup>。其中,污染沙门氏菌的肉鸡制品是导致人类食物中毒的重要因素<sup>[4]</sup>。对零售环节肉鸡制品的研究显示,其存在较高的污染率<sup>[5]</sup>。随着经济的不断发展,我国肉鸡养殖和加工的规模化程度越来越高,了解养殖和屠宰加工环节肉鸡沙门氏菌污染状况是降低零售环节肉鸡沙门氏菌污染的重要途径<sup>[6]</sup>。使用分子分型的方法可为食品安全事件(尤其是暴发疫情调查)中可疑食物及感染病例分离菌株进行有效的溯源<sup>[7]</sup>。脉冲场凝胶电

收稿日期:2013-05-27

基金项目:国家科技支撑计划(2012BAK17B10)

作者简介:白莉 女 副研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail: baili@cfsa.net.cn

通讯作者:郭云昌 男 研究员 研究方向为食品微生物检验

E-mail: yunchangguo2006@yahoo.com.cn

泳 (PFGE) 的方法已经广泛的运用到零售环节肉鸡制品沙门氏菌的分子分型,而对于肉鸡生产加工过程中的运用很少<sup>[8]</sup>。本研究通过对屠宰场监测菌株的分子分型,初步建立了河南、江苏、四川、山东 4 省肉鸡屠宰加工环节的分子分型数据库,比较不同地域的优势菌株和其基因指纹图谱,有利于完善从农场到餐桌食物链中沙门氏菌污染的研究,为调查食源性疾病暴发、流行及确定和溯源病原体的传染源提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

2010 年 6 ~ 11 月,在河南、江苏、四川、山东的规模化屠宰场进行沙门氏菌专项调查,共分离到沙门氏菌 167 株,由国家食品安全风险评估中心完成菌株鉴定,血清分型,并进行保存。其中从屠宰场活体肛拭子(养殖场运输到屠宰场,进入屠宰流水线前)分离的菌株有 43 株(检出率为 6.7%),从屠宰场胴体(屠宰流水线预冷池冷藏后)分离的菌株有 124 株(检出率为 16.2%)。各省菌株情况见表 1<sup>[9]</sup>。

1.1.2 仪器与试剂

BioMérieux Vitek 浊度计、恒温振荡器、GEL DOC XR 凝胶成像系统、纯水仪、CHEF-mappe 型脉冲场凝胶电泳仪。

脑心浸液琼脂 (brain heart infusion agar, BHA) 和脑心浸液肉汤 (brain heart infusion broth, BHI) 均购自英国 Oxoid 公司, Tris base 和 Tris-HCl (Promega, 美国), 蛋白酶 K (Merck, 德国)、限制性内切酶 *Xba* I (New England BioLabs, 美国)、C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>NNaO<sub>3</sub> (Sodium lauroyl Sarcosine, SLS)、SDS、Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O、血琼脂平板、比浊管、SeaKem Gold 琼脂糖。质控菌株为 H9812 本室保存。

1.2 方法

1.2.1 脉冲场凝胶电泳分析

参照美国疾病预防控制中心 PulseNet 的统一方法<sup>[10]</sup>, 脉冲场凝胶电泳分型所用标准菌株为 *Salmonella Braenderup* 血清型全球参考菌株 H9812。

1.2.2 电泳图像分析和结果聚类分析

PFGE 图像应用 BioNumerics (Version 4.0) 数据库软件 (Applied Maths BVBA, Belgium) 进行处理, 识别图像条带。在图像识别过程中, 在 Marker 最小片段外的试验菌株条带因为不能为 Marker 校准而被舍去。图像通过统一的 Marker 进行校准, 标定条带位置, 必要时进行人工校正。

聚类方法和参数选择: 聚类图类型选择 UPGMA

(unweighted pair group method using arithmetic averages) 方法, 条带位置差异容许度选择 1.0%, 优化值 0.5%。Band based/Dice 方法计算相似性系数, 即 Dice 系数 ( $F$  值  $\times 100\%$ )。

$$F = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$$

$n_x$ : 菌株  $x$  的总的片段数;

$n_y$ : 菌株  $y$  的总的片段数;

$n_{xy}$ : 菌株  $x$  和菌株  $y$  的相同的片段数。

$F$  值反映的是不同菌株电泳条带的相似性程度, 范围在 0 ~ 1 之间, 0 代表完全不相关, 1 代表完全相同。在限制性内切酶的作用下, 不同的菌株会呈现不同的条带数和片段大小, 按照 PulseNet 的命名原则, 对每一种不同的带型进行命名。

2 结果

2.1 167 株沙门氏菌 PFGE 聚类结果

167 株沙门氏菌 DNA 经 *Xba* I 限制性内切酶酶切后, 进行脉冲场凝胶电泳, 分析结果显示, 167 株沙门氏菌共分为 18 个群, 包括 75 个不同的带型, 菌株相似度为 50.91% ~ 100%。PFGE 指纹图谱与血清具有一定的相关性, 相同血清型的菌株聚类后, 都能分到同一群。本研究获得的 65 株印地安纳沙门氏菌有 38 个带型, 依次命名为 JFPX01. C0001 ~ JFPX01. C00038。54 株肠炎沙门氏菌有 16 个带型, 依次命名 JEGX01. C0001 ~ JEGX01. C0016。16 株奥尔巴尼沙门氏菌有 1 个带型, 命名为 TDCX01. C0001, 其他血清型依次类推 (包括罗米纳沙门氏菌、斯坦利沙门氏菌、巴森海德沙门氏菌、雷摩沙门氏菌、内科拉沙门氏、菌舒卜拉沙门氏菌、维也纳沙门氏菌、胥瓦增格隆沙门菌共计 8 种血清型)。6 株布利丹沙门氏菌有 2 个带型, 5 株哈达尔沙门氏菌有 3 个带型, 3 株山夫登堡沙门氏菌有 1 个带型。其余的 18 株包括 8 个血清型有 14 个带型见表 1。

2.2 主要血清型 PFGE 分型结果

65 株印地安纳沙门氏菌有 38 个带型, 相似度为 61.94% ~ 100% 间, 具有相同带型的型别有 12 个。其中江苏省的优势带型为 JFPX01. C0001 (5)、JFPX01. C0004 (4)、JFPX01. C0005 (4) 及 JFPX01. C0034 (4), 河南省的优势带型为 JFPX01. C0027 (4), JFPX01. C0012 在河南和江苏省都有分布, 分离株 38 个带型的型别及聚类关系图见图 1。54 株肠炎沙门氏菌分成了 8 个带型, 相似度为 79.52% ~ 100%, 部分菌株相差 2 ~ 3 个条带。具有相同带型的型别有 8 个, 河南省的优势带型为 JEGX01. C0001 (8)、JEGX01. C0004 (8) 及 JEGX01. C0012 (8), 江苏省的优势带型为 JEGX01. C0005

表 1 4 省屠宰场活体肛拭和肉鸡胴体的沙门氏菌分离株不同血清型与 PFGE 带型数构成

Table 1 Distribution of *Salmonella* serovars and PFGE patterns recovered from anal swab and broiler carcasse of slaughter poultry in four provinces.

血清型	菌株数	PFGE 带型数	活体肛拭 (菌株数)				肉鸡胴体 (菌株数)			
			河南	江苏	四川	山东	河南	江苏	四川	山东
印地安纳沙门氏菌	65	38	13	15	—	—	16	20	—	1
肠炎沙门氏菌	54	16	13	1	—	—	24	13	—	3
奥尔巴尼沙门氏菌	16	1	—	—	—	—	—	16	—	—
布利丹沙门氏菌	6	2	—	—	—	—	—	—	6	—
哈达尔沙门氏菌	5	3	—	—	—	—	5	—	—	—
山夫登堡沙门氏菌	3	1	—	—	—	—	—	—	3	—
其他	18	14	—	—	—	1	2	2	2	11
合计	167	75	26	16	—	1	47	51	11	15

注:—代表未检出。

(13),其中 JEGX01. C0001 在河南和山东都有分布,JEGX01. C0005 在河南和江苏省都有分布。16 个带型分离株的型别及聚类关系图见图 2。奥尔巴尼沙门氏菌只在江苏省分离到,且都是一个带型为 TDCX01. C0001。四川省的优势血清型为布利丹沙门氏菌 BLEX01. C0001。山东省分离的菌株数量少、血清型别数量较多,没有优势带型。

同一屠宰场在同一时间点最多可以分离到 5 种血清型,9 种不同的带型。同一屠宰场在不同的采样时间点可以分离到相同血清型不同带型的菌株(如 HN-A JEGX01. C0001、C0002、C0004、C0009、C0010、C0012、C0014、C0016),也分离到相同血清型相同带型的菌株(如 HN-C JEGX01. C0004、C0012)。在同一屠宰场屠宰前后分到相同血清型相同带型的菌株(如 HN-A JEGX01. C0004)。不同省份之间也分离到相同带型的菌株(如 JFPX01. C0012, JEGX01. C0001、C0005)。

3 讨论

PFGE 分型技术基于细菌的 DNA 指纹原理确认菌株之间的相似性、确定传染来源和传播途径,最终为暴发疫情提供准确的实验室诊断依据,对公共卫生监测具有重要的意义。与其他分子生物学分型技术相比,PFGE 分型技术具有可重复性强、结果稳定可靠、区分能力强等优点<sup>[7]</sup>。

3.1 沙门氏菌 PFGE 指纹分析图谱分型与血清学分型

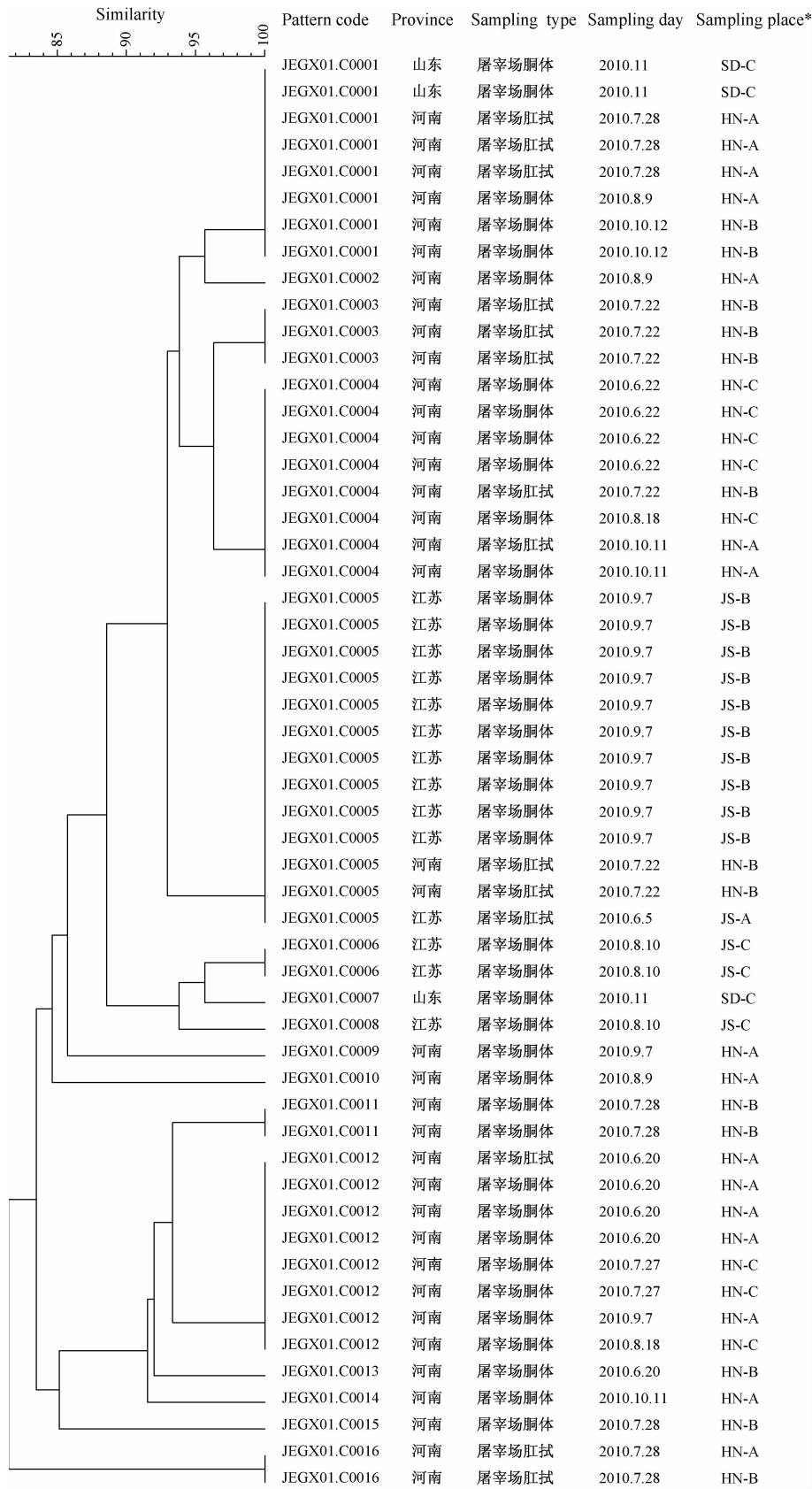
本文对 4 省屠宰加工环节肉鸡分离的沙门氏菌进行 PFGE 分子分型,发现相同血清型菌株基本可以分到同一群,这与先前报道一致<sup>[11]</sup>。同一血清型,根据不同的遗传背景,可以分成不同的带型。说明该方法可以在沙门氏菌表型分型的基础上,进一步分析其差别,从而在沙门氏菌食源性疾病暴发调查及监测中发挥作用。

3.2 优势血清型 PFGE 指纹分析图谱分型结果

在此次调查中,优势血清型主要来自于河南省和江苏省,这与该血清型已是当地的优势血清型有关<sup>[12]</sup>。对本次监测的主要血清型进行分析发现,印地安纳沙门氏菌的型别最多,可能与菌株在不同生存环境中发生的适应性变异,并由此产生大量亲缘关系相近的子代有关<sup>[13]</sup>,相同型别在省份之间有交叉,如 JFPX01. C0012。其次是肠炎沙门氏菌,也具有较多的型别。条带间相似度差异较小,都在 80% 左右,且部分菌株条带差异基本为 2~3 条,按照 Tenover<sup>[14]</sup>的观点,菌株间存在 2~3 条差异(提示高度相关),这可能是由酶切位点的点突变、缺失或者插入引起的。但是 Barrett<sup>[7]</sup>关于 PFGE 带型解释中提出了新的观点,对于 2~3 条条带差异的解释,一种可能性是由于沙门氏菌基因组中质粒的稳定性导致;另外一种情况认为由点突变、缺失或插入导致的条带太小,跑出了胶外。所以对于条带相同或高度相似的菌株还应该结合流行病学资料进行分析。

3.3 屠宰前后沙门氏菌污染情况和 PFGE 型别的情况

在屠宰的过程中,肉鸡会通过各种途径被污染,可能通过破损的喙囊、肠道,不同养殖场来源的肉鸡之间的交叉污染,也可能通过不洁净的流水式屠宰场的器械、环境、人员交叉污染<sup>[15-17]</sup>。本次研究中,屠宰后肉鸡胴体沙门氏菌的污染率远远高于屠宰前活体肛拭子沙门氏菌的污染率,说明屠宰场存在严重的交叉污染现象。同一屠宰场在屠宰前活体肛拭子没有分离到菌株,但是屠宰后胴体却分离到不同带型或相同带型的菌株,说明肉鸡在进入屠宰场后,可能通过上面提到的途径被污染。2008 年,Rasschaert G 等<sup>[15]</sup>关于养殖场肉鸡肠道沙门氏菌定植情况与屠宰场胴体沙门氏菌污染情况进行调查,发现屠宰以后,所有鸡群都污染了沙门氏菌,且屠宰场的沙门氏菌 PFGE 带型与养殖场的沙门氏菌 PFGE 带型不一定一致。说明屠宰场在操作过程



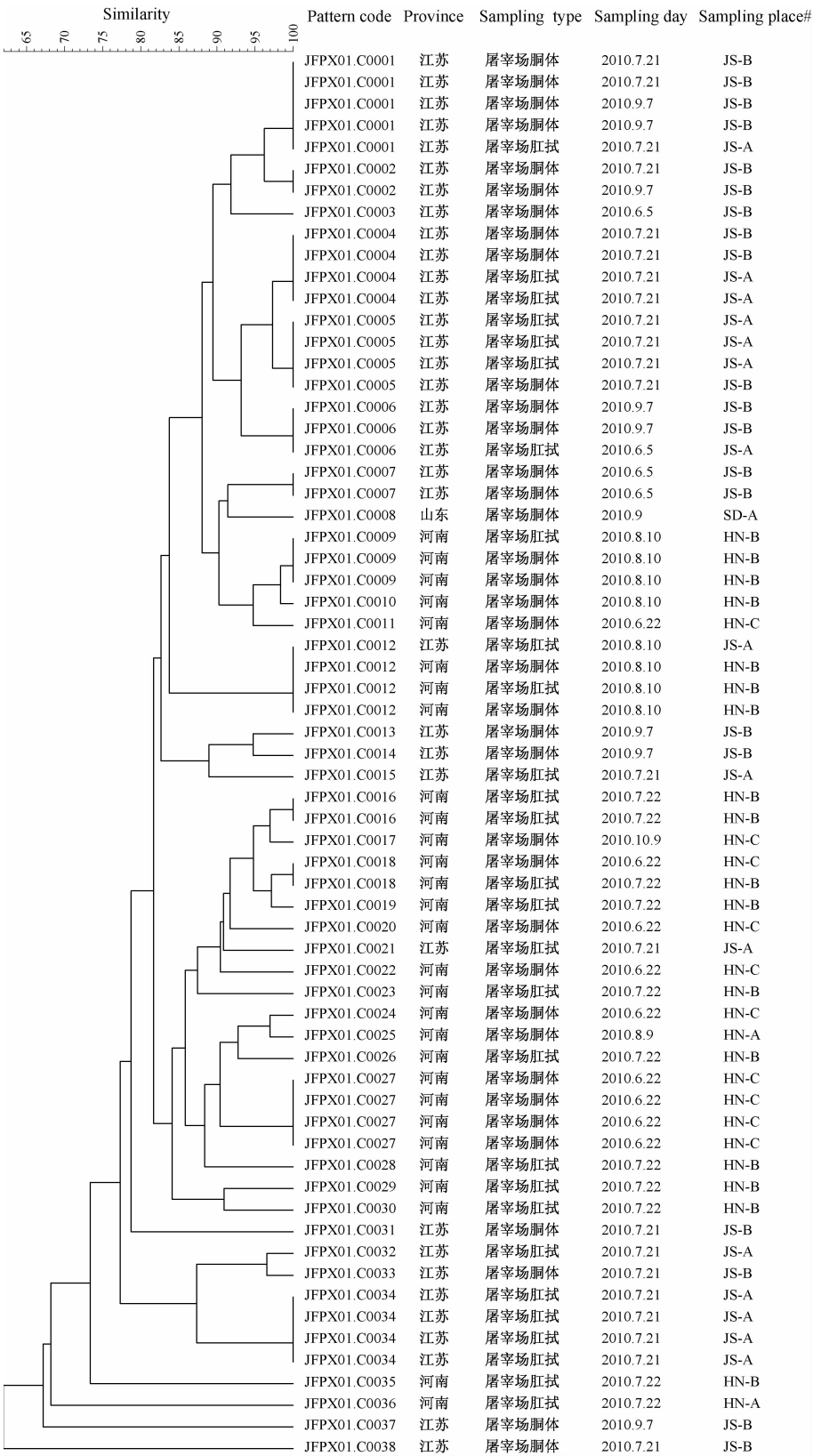
注: HN: 河南; JS: 江苏; SD: 山东; A、B、C 依次代表不同的屠宰场。

图 1 三省屠宰场分离肠炎沙门氏菌分离株 PFGE 带型聚类图

Figure 1 Dendrogram of PFGE patterns of *S. Enteritidis* isolates from slaughter poultry in three provinces

中存在严重的交叉污染现象。在同一屠宰场的不同采样时间分离到相同带型的菌株 (JEGX01.C0004、C0012), 在同一屠宰场同一天分离得到相同

带型的菌株 (TDCX01.C0001), 提示同一批肉鸡胴体或活体, 可能在进入屠宰场之前就因相同的饲养环境被污染<sup>[16]</sup>, 也可能是流水式屠宰场没有做到很



注:HN:河南;JS:江苏;SD:山东;A、B、C 依次代表不同的屠宰场。

图 2 三省屠宰场分离印第安纳沙门氏菌分离株 PFGE 带型聚类图

Figure 2 Dendrogram of PFGE patterns of *S. Indiana* isolates from slaughter poultry in three provinces

好的消毒处理,没有完全按照危险分析关键控制点 (HACCP) 进行实施,使得菌株在屠宰环节中长期存在,造成交叉污染。流水式屠宰场有较多的环节可能造成交叉污染,本文只采集了冷藏后的样本,还

需要对屠宰场各个关键环节点进行采样,才能更有效说明污染的环节以及帮助企业找到关键控制点。2007 年,Rasschaert G<sup>[17]</sup> 等人研究证明屠宰场流水线上的污染是屠宰场胴体污染的主要原因,只有对

屠宰流水加工线进行彻底的消毒才可以根本降低沙门氏菌的污染率。不同省份分离得到相同带型的菌株,这可能是鸡群源头发生了污染造成的(从孵化场产蛋鸡到鸡蛋,从小鸡到肉鸡的沙门氏菌的水平传播已经得到了证实<sup>[15]</sup>),也有可能是某种型别的菌株在两个省份都存在。本次研究没有追查鸡群的来源,所以无法结合流行病学资料进行分析,将来的研究需要结合这部分数据进行分析。

本研究通过对屠宰场监测菌株的分子分型,比较河南、江苏和山东 3 省的优势带型,发现其具有地区性差异,又具有优势型别的交叉。初步建立了 3 省肉鸡屠宰加工环节的分子分型数据库,为沙门氏菌食源性疾病的预防控制提供技术支撑,为食品污染监测中肉鸡生产加工过程沙门氏菌 PFGE 分子分型数据库建立奠定了基础。有利于完善从农场到餐桌食物链中沙门氏菌污染的研究,为调查食源性疾病暴发流行及确定和溯源细菌性传染病传染源提供依据。

通过分析屠宰前后肉鸡分离菌株的带型,发现屠宰场存在严重的交叉污染。建议加强生产加工环节多个关键控制点及生产环境沙门氏菌的监测,掌握交叉污染的关键环节。加强信息交流,帮助企业建立和完善 GMP、GHP、HACCP,对交叉污染的关键环节进行干预,降低肉鸡及其产品中沙门氏菌的污染,这是从源头控制的根本措施。

参考文献

[ 1 ] Olsen S J, Bishop R, Brenner F W, et al. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987 – 1997 [ J ]. J Infect Dis, 2001, 183: 753-761.

[ 2 ] Lynch M, Painter J, Woodruff R, Braden C. Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1998 – 2002 [ J ]. Surveillance Summaries, 2006, 55( SS10 ): 1-34.

[ 3 ] 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.

[ 4 ] Callaway T R, Edrington T S, Anderson R C, et al. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella* [ J ]. J Anim Sci, 2008, 86: E163-172.

[ 5 ] YANG B W, QU D, ZHANG X L, et al. Prevalence and

characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shanxi, China [ J ]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 141: 63-72.

[ 6 ] Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU, 2008 Part B: Analysis of factors associated with *Salmonella* contamination of broiler carcasses [ J ]. EFSA Journal 2011, 9( 2 ): 2017.

[ 7 ] Barrett T J, 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.

[ 8 ] 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.

[ 9 ] 李薇薇,白莉,郭云昌. 我国四省肉鸡生产加工环节沙门氏菌的污染情况和耐药分布研究 [ J ]. 中华预防医学杂志, 2013, 47( 5 ): 435-438.

[ 10 ] Ribot E M, Fair M A, 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 Pathogens and Disease, 2006, 3: 59-67.

[ 11 ] CUI S H, LI J Y, SUN Z Y, et al. Characterization of *Salmonella* enterica isolates from infants and toddlers in Wuhan, China [ J ]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009, 63: 87-94.

[ 12 ] 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性分析 [ J ]. 中国人兽共患杂志, 2010, 26( 3 ): 292-293.

[ 13 ] Francino M P. The Ecology of Bacterial Genes and the Survival of the New [ J ]. International Journal of Evolutionary Biology, Volume 2012 ( 2012 ), Article ID 394026, doi: 10. 1155/ 2012/394026.

[ 14 ] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing [ J ]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 9: 2233-2239.

[ 15 ] Rasschaert G, Houk K, Godard C, et al. Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter [ J ]. J Food Prot, 2008, 71( 1 ): 146-152.

[ 16 ] Crump J A, Griffin P M, Frederick J A. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness [ J ]. Clin Infect Dis, 2002, 35( 7 ): 859-865.

[ 17 ] Rasschaert G, Houk K, De-Zutter L. Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses [ J ]. J Appl Microbiol, 2007, 103( 2 ): 333-341.