

论著

江西省食源性沙门菌血清分型及脉冲场凝胶电泳指纹图谱研究

游兴勇,刘成伟,朱应飞,周厚德

(江西省疾病预防控制中心,江西 南昌 330029)

摘要:目的 研究江西省食源性沙门菌的血清型,用脉冲场凝胶电泳(PFGE)方法对优势血清型进行分子分型,建立江西省食源性沙门菌 PFGE 指纹图谱资料库,为食源性疾病溯源提供数据。方法 对 136 株食源性沙门菌进行血清分型,对其中优势血清型德尔卑沙门菌菌株进行 PFGE 分型,获得分子分型指纹图谱,运用 Bionumerics v6.6 软件进行聚类分析。结果 136 株沙门菌分离株血清群以 B 群为主,优势血清型主要是德尔卑沙门菌(49.26%),67 株德尔卑沙门菌可分为 41 个型别的 PFGE 指纹图谱(相似值 100% 的为同一 PFGE 型别),主要集中在 3 个型别中。结论 江西省食源性沙门菌血清型分布呈多样性,优势血清型是德尔卑沙门菌,生肉制品是其主要的来源,同种血清型别的 PFGE 指纹图谱无相关性。

关键词:沙门菌;血清分型;德尔卑沙门菌;脉冲场凝胶电泳;分子分型;食源性致病菌

中图分类号:R155;R378.2+2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)06-0528-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.06.003

Serotyping and PFGE type of *Salmonella* isolates from food in Jiangxi Province

YOU Xing-yong, LIU Cheng-wei, ZHU Ying-fei, ZHOU Hou-de

(Jiangxi Province Center for Disease Control and Prevention, Jiangxi Nanchang 330029, China)

Abstract: Objective To study the serotypes and molecular characteristics of foodborne *Salmonella* in Jiangxi Province by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), and establish the PFGE fingerprint data bank. **Methods** A total of 136 foodborne *Salmonella* strains were identified by biochemical tests and serotyping. The *S. derby* were further typed by PFGE and established the fingerprint data bank, and clustering analysis was conducted by Bionumerics v6.6. **Results** Among 136 *Salmonella* isolated, the main serogroup were group B, and the dominant serotypes were *S. derby* (49.26%). 67 *S. derby* strains were 41 PFGE fingerprint types, 3 PFGE fingerprint types were predominant in the PFGE fingerprint types. **Conclusion** Serotyping of foodborne *Salmonella* were phenotypically diverse. The *S. derby* were predominant. Raw meat products were the main source of foodborne *Salmonella*. PFGE fingerprint types were not related with serotypes.

Key words: *Salmonella*; serotype; *S. derby*; pulsed field gel electrophoresis; molecular typing; foodborne pathogen

病原微生物引起的食源性疾病是影响食品安全的最主要因素之一,而沙门菌被公认为是主要的食源性致病菌,我国每年约 3 亿人因沙门菌感染而患病,占病原菌食源性疾病总数的 70%~80%^[1]。沙门菌血清型的正确鉴定对确定沙门菌病的感染源及控制发病率具有重要意义,但对同一血清型的不同菌株间同源性的鉴定,还需要借助分子生物学的分型方法。脉冲场凝胶电泳(pulse-field gel electrophoresis, PFGE)因其可重复性和可靠性,能对

全菌 DNA 进行分析,并可与其他实验室结果进行比对等优点,已成为沙门菌分子分型的金标准^[2]。本研究对 2009—2013 年从江西省市售食品中分离的 136 株食源性沙门菌开展了血清学分型,并对 67 株优势血清型沙门菌进行了 PFGE 分子分型,通过聚类比较分析菌株间的相关性,建立指纹图谱库,为以后追踪江西省食源性沙门菌污染源,及时处理食源性沙门菌引起的食品安全事件提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

沙门菌共 136 株,2009—2013 年从江西省 3 450 份市售食品中分离,主要来源为生畜肉、生禽肉和熟肉制品。质控菌株布伦登卢普沙门菌(*S. braenderup*, H9812)来自国家食品安全风险评

收稿日期:2014-09-03

基金项目:江西省卫生厅重大科研项目(20104015);江西省科技厅科技支撑项目(20141BBG70095)

作者简介:游兴勇 男 主管技师 研究方向为食源性疾病控制
E-mail:jxsdc@163.com

通讯作者:刘成伟 男 主任技师 研究方向为食品安全风险监控
E-mail:liuchengwei718@sina.com

估中心。

1.1.2 主要仪器与试剂

CHEF Mapper XA 脉冲场电泳仪、Gel Doc XR 凝胶成像仪均购自美国 Bio-Rad, Vitek colorimeter 比浊仪(法国梅里埃)。

沙门菌显色平板(法国 CHROMagar), XLD 培养基(北京陆桥技术有限责任公司), API 20E 细菌鉴定(法国梅里埃), 沙门菌诊断血清(宁波天润生物药业有限公司), 限制性内切酶 *Xba*I(日本 TaKaRa), Sea Kem Gold (SKG) 琼脂糖(美国 Cambrex), 蛋白酶 K(美国 Merck), 十二烷基肌氨酸钠、Tris base、EDTA 和硼酸等均购自美国 Sigma, Gel red(美国 Biotium), 以上培养基和试剂均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 沙门菌血清学分型

试验按 GB 4789.4—2010《食品微生物学检验沙门氏菌检验》^[3] 操作, 血清学分型鉴定的结果按 White-Kauffmann-Le Minor 抗原表^[4] 判断。

1.2.2 PFGE 分子分型方法

参照国家食品安全风险评估中心提供的分子分型标准操作方法^[5] 进行: 将试验用菌株和 H9812 标准株进行包埋, 用裂解液使细胞在胶块中原位裂解, 将包埋有菌体基因组的胶块分别用超纯水洗 3 次, 再用 TE 清洗 4 次, 洗涤后的胶块用 *Xba* I 限制性内切酶进行酶切, 处理好的胶块样品进行脉冲场电泳。酶切后的样品胶置于样品梳上, 从胶槽下部中央缓慢倒入 100 ml 熔化的 1% SKG。冷却 20 min 后, 拔去样品梳, 将胶块放入电泳槽中, 加入 2.2 L 0.5 × TBE, 进行脉冲场凝胶电泳。电泳条件: Auto Algorithm 程序 30 kb 低分子量, 700 kb 高分子量, 时间 19 h, 电泳温度 14 ℃, 其它条件选择仪器默认设置。电泳结束后, 将凝胶取出, 用 0.1 μg/ml 的 Gel red 染色 30 min, 置于纯水中脱色 30 min。

1.2.3 PFGE 指纹图谱的聚类分析方法

将试验获取的 DNA 图谱用 Bionumerics v6.6 软件进行处理, 识别图形条带。DNA 图谱以 *Xba* I 酶切的 H9812 作为统一的分子量标准进行校准确定条带位置。PFGE 带型之间的相似度采用 Dice 系数来衡量, 用非加权组平均法(UPGMA) 进行分析, 最后输出亲缘关系树状图谱。

2 结果

2.1 沙门菌血清分型结果

对 136 株沙门菌进行血清学鉴定, 分属 A、B、C、D、E、F 群等 6 个群, 血清群以 B 群为主占 69.12%, 主要包括德尔卑沙门菌、阿贡纳沙门菌、鼠

伤寒沙门菌。其次为 E 群占 13.23%, 这两种血清群占分离菌株的 82.35%。在血清型分布中, 共 18 个血清型, 以德尔卑沙门菌(49.26%) 为主, 其次是火鸡沙门菌(11.76%)、鼠伤寒沙门菌(8.09%)、阿贡纳沙门菌(8.09%), 这些血清型占沙门菌分离株的 77.20%。不常见血清型有伊鲁木沙门菌、布伦登卢普沙门菌、巴基斯坦沙门菌、阿柏丁沙门菌、彻斯特沙门菌等, 见表 1。

表 1 136 株沙门菌进行血清学鉴定结果汇总表

血清群	血清型	菌株数 /株	构成比 /%
A 群	甲型副沙门菌(<i>S. paratyphi A</i>)	4	2.94
	德尔卑沙门菌(<i>S. derby</i>)	67	49.26
	阿贡纳沙门菌(<i>S. agona</i>)	11	8.09
B 群	鼠伤寒沙门菌(<i>S. typhimurium</i>)	11	8.09
	斯坦利沙门菌(<i>S. stanley</i>)	1	0.74
	里定沙门菌(<i>S. reading</i>)	2	1.47
	彻斯特沙门菌(<i>S. chester</i>)	2	1.47
	猪霍乱沙门菌(<i>S. choleraesuis</i>)	1	0.74
C1 群	伊鲁木沙门菌(<i>S. irumu</i>)	1	0.74
	布伦登卢普沙门菌(<i>S. braenderup</i>)	1	0.74
C2 群	纽波特沙门菌(<i>S. newport</i>)	3	2.21
C3 群	巴基斯坦沙门菌(<i>S. pakistan</i>)	1	0.74
	巴尔多沙门菌(<i>S. bardo</i>)	1	0.74
D 群	肠炎沙门菌(<i>S. enteritidis</i>)	8	5.88
	伦敦沙门菌(<i>S. london</i>)	3	2.21
E1 群	火鸡沙门菌(<i>S. meleagridis</i>)	16	11.76
	鸭沙门菌(<i>S. anatum</i>)	2	1.47
F 群	阿柏丁沙门菌(<i>S. aberdeen</i>)	1	0.74
合计	—	136	100

注:—为无统计

2.2 脉冲场凝胶电泳结果

采用 Bionumerics v6.6 软件对 67 株德尔卑沙门菌 DNA 酶切图谱进行类聚分析, 条带位置差异容许度选择 1.5%, 优化值选择 1.0%。根据电泳产生条带的位置和数量的不同, 共分为 41 个型别(相似值 100% 的为同一 PFGE 型别), 分别命名为 S1 ~ S41 型。其中 S3 包含 8 株菌, S1 包含 6 株菌, S11 包含 5 株菌, S7、S9、S15、S21、S22、S25、S26、S28、S36、S40 型各包含 2 株菌, 其余各型均为 1 株菌, 不同菌株的相似系数在 57.3% ~ 100% 之间(见图 1), 其中优势带型为 S3(8 株), S1(6 株), S11(5 株)。67 株德尔卑沙门菌的地区来源及食品来源见表 2、3。

3 讨论

血清学分型结果显示, 食品中的 136 株沙门菌共分属 8 个血清群或亚群、21 个血清型, 表明江西省食源性沙门菌血清型存在多态性, 其中以 B 群的德尔卑沙门菌为优势血清型(49.26%), 其次是 E1 群的火鸡沙门菌、B 群的鼠伤寒沙门菌和阿贡纳沙

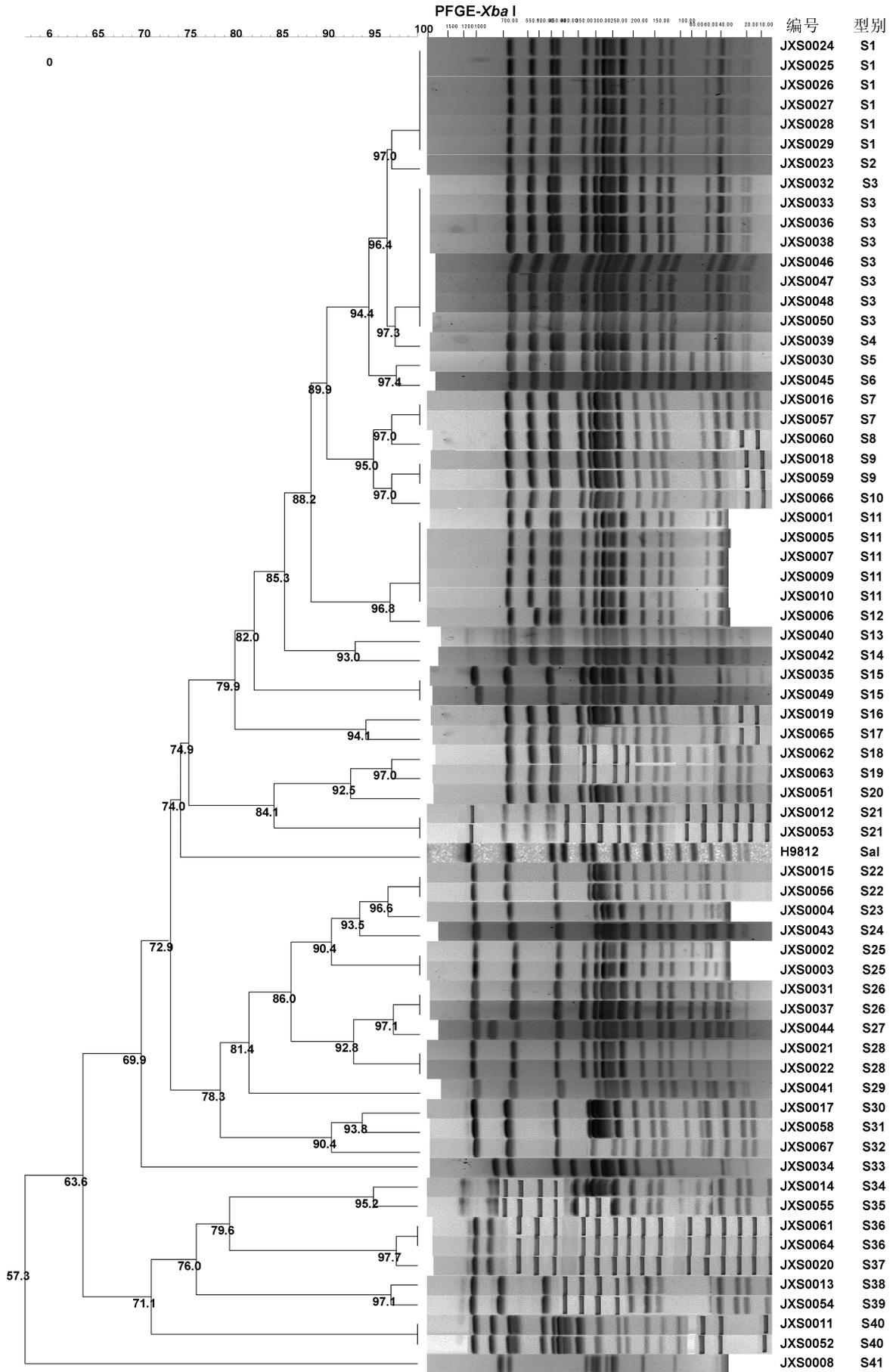


图1 江西省67株德尔卑沙门菌PFGE指纹图谱

Figure 1 Dendrogram of PFGE patterns of 67 *S. derby* stains

表2 67株德尔卑沙门菌的区域来源

Table 2 Regional sources of 67 *S. derby* stains

来源	数量	菌株编号
标准菌株	1	H9812
南昌市	15	JSXS0013 ~ 15, 22, 24, 26, 28, 30, 43, 49, 51, 54, 55, 56, 62
上饶市	9	JSXS0025, 32, 39, 41, 42, 45, 47, 66, 67
抚州市	24	JSXS001 ~ 12, 16 ~ 20, 52, 53, 57 ~ 61
九江市	7	JSXS0023, 27, 31, 34, 37, 48, 63
吉安市	6	JSXS0033, 35, 36, 38, 44, 46
宜春市	3	JSXS0021, 29, 50
景德镇市	1	JSXS0040
新余市	1	JSXS0064
萍乡市	1	JSXS0065

表3 67株德尔卑沙门菌的食品来源

Table 3 Food sources of 67 *S. derby* stains

来源	数量	菌株编号
猪肉	28	JSXS001 ~ 20, 28, 29, 41, 42, 49, 61, 62, 66
鸡肉	17	JSXS0021, 22, 25, 27, 30, 34, 35, 37, 43, 44, 48, 50, 52, 53, 54, 58, 67
鸭肉	9	JSXS0024, 31, 32, 36, 40, 47, 51, 64, 65
牛肉	4	JSXS0045, 55, 56, 57
熟肉	5	JSXS0023, 26, 33, 39, 63
其他	4	JSXS0038, 39, 46, 60

门菌,这对了解江西省食品中沙门菌血清型别,进行食源性疾病调查研究、病因溯源等均有重要意义。德尔卑沙门菌血清型与袁宝君^[6]、王岚^[7]、吕素玲^[8]、陈玲^[9]等对江苏省、湖南省、广西壮族自治区、南方四省八市食品中沙门菌的优势血清型研究结果一致。席昭雁^[10]、陈玉贞^[11]、马妮^[12]等对陕西省、山东省、辽宁省食源性沙门菌的研究表明优势血清型分别为山夫登堡、肠炎和布利丹沙门菌。这些研究和本结果有一定的区别,是否表明食源性沙门菌的优势血清型存在南北地域分布上存在一定差异,还有待进一步研究。本研究中85%的沙门菌分离自生畜肉、生禽肉和熟肉制品中,这与美国^[13]、欧盟^[14]等对沙门菌来源的调查结果一致。本次研究也表明江西省肉类食品中沙门菌污染较为严重,存在较高的食品安全隐患,应将肉类食品作为高危食品,在屠宰、加工、销售等各个环节严格加强卫生管理。

PFGE方法作为国际通用的分子分型方法,为进一步研究优势血清型沙门菌间的基因同源性提供了有效的支撑。目前,国际上运行良好的是基于美国分子分型国家电子网络(PulseNet)重点实验室基础上的国际PulseNet分子溯源实验室^[15],所有参与的实验室都应用标准化基因分型方法,子类型化和流行病学信息在参与的实验室之间实时信息共享,这种“网中网”可有效地界定国际范围内食源性疫情的暴发,国际PulseNet分子溯源实验室通过监测特定子类型相关的案例集群,为食源性和水源性疾病的暴发提供了早期预警。目前PFGE方法在我

国多数应用于医院内感染及菌株耐药性的分析研究,在食源性疾病溯源方面的研究工作起步较晚。国家食品安全风险评估中心在2013年初搭建起国家食源性疾病分子溯源网络,完成了国家数据库和30个省级数据库的建设和网络对接,将可实现跨省细菌、病毒等食源性疾病致病因素的识别和溯源。梅玲玲^[16]、王岚^[17]等分别对浙江省56株、湖南省47株德尔卑沙门菌进行PFGE分型,结果分为35种和32种PFGE型别。本研究的PFGE聚类分析结果显示,67株德尔卑沙门菌分为41种PFGE型别。这些结果表明,德尔卑沙门菌的PFGE型别较多,变异较大,充分体现了德尔卑沙门菌的基因多态性。优势带型为S3(8株),S1(6株),S11(5株)也说明了有同源菌株存在,表明这些菌株来源于同一克隆系。其中,8株S3型和6株S1型分别来自不同的地区,主要携带者是生猪肉和生鸡肉。畜肉和禽肉作为沙门菌的重要传播载体,在沙门菌引起的食物中毒中起到了重要的作用,所以,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,减少沙门菌感染的发生。5株S11型别的菌株来源于同一地区、样品均为生猪肉,提示可能有相同的污染来源,可能来自于同一家屠宰场,应对污染源头开展进一步的追踪监测。

PFGE方法对同一血清型的沙门菌,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菌表型分型的基础上,进一步分析其差别,从而在沙门菌食源性疾病暴发调查及监测中发挥作用。本研究对2009—2013年从江西省3450份市售食品中分离的食源性沙门菌做了血清分型并对优势血清型德尔卑的PFGE型别做了特征分析,为构建江西省食源性沙门菌分子分型数据库提供了技术支持。

参考文献

- [1] 毛雪丹,胡俊峰,刘秀梅. 2003—2007年中国1060起细菌性食源性疾病流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 224-228.
- [2] De Lappe N, Connor J O, Doran G, et al. Role of subtyping in detecting *Salmonella* cross contamination in the laboratory[J]. BMC Microbiol, 2009, 9(1): 155.
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 4—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [4] 朱超,许学斌. 沙门菌属血清型诊断[M]. 2007版. 上海: 同济大学出版社, 2009: 145-292.
- [5] 国家食品安全风险评估中心. 2014年食源性疾病监测工作手册(第七部分实验室检验标准操作程序)[Z]. 2014: 84-92.
- [6] 袁宝君,戴建华,乔昕,等. 2007年江苏省食源性致病菌监测分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(2): 114-116.
- [7] 王岚,贾华云,张红,等. 湖南省食源性沙门菌血清型分布及

- 耐药性研究[J]. 实用预防医学, 2011, 18(6): 994-997.
- [8] 吕素玲, 韦程媛, 姚雪婷, 等. 2010年广西食品中沙门菌污染状况和血清型分布及耐药谱的研究[J]. 应用预防医学, 2012, 18(3): 137-140.
- [9] 陈玲, 张菊梅, 杨小鹏, 等. 南方食品中沙门菌污染调查及分型[J]. 微生物学报, 2013, 53(12): 1326-1332.
- [10] 席昭雁, 张阿峰, 吴荣, 等. 陕西省食品中沙门菌监测研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2011, 15(8): 671-673.
- [11] 陈玉贞, 邵坤, 关冰, 等. 2003—2010年山东省食源性沙门菌血清分型及药敏分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(1): 9-12.
- [12] 马妮, 孙葳, 郑洪, 等. 辽宁省食源性沙门菌血清分布及耐药分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 15(23): 3144-3146.
- [13] Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2008 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2011, 60(35): 1197-1202.
- [14] Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A; *Salmonella* prevalence estimates [J]. European Food Safety Authority Journal, 2009, 7(12): 1377-1457.
- [15] Boxrud D, Monson T, Stiles T, et al. The role, challenges, and support of PulseNet laboratories in detecting foodborne disease outbreaks [J]. Public Health Reports, 2010, 125(Suppl 2): 57-62.
- [16] 梅玲玲, 罗芸, 叶菊莲, 等. 浙江省209株沙门菌PFGE指纹图谱研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 11(19): 2478-2482.
- [17] 王岚, 贾华云, 张红, 等. 湖南省食源性德乐卑沙门菌耐药谱及PFGE分型研究[J]. 实用预防医学, 2013, 8(20): 915-918.

论著

采用高级微生物基因分型系统对食品中单核细胞增生李斯特菌进行同源性分析

曾静¹, 周雪婷^{1,2}, 张锡全¹, 张琳³, 张西萌¹, 魏海燕¹, 周熙城¹, 马丹¹, 倪元颖²
(1. 北京出入境检验检疫局, 北京 100026; 2. 中国农业大学, 北京 100193;
3. 河北出入境检验检疫局, 河北 石家庄 050051)

摘要:目的 采用高级微生物基因分型系统(DiversiLab系统)对食品中单核细胞增生李斯特菌进行基因型分析, 将分型结果与血清型和菌株的耐药性进行比对研究。方法 DiversiLab系统是基于rep-PCR原理对微生物进行分型, 将分型结果与菌株的血清型进行比较研究, 同时对菌株的耐药性与rep-PCR型别进行研究。结果 采用DiversiLab系统将46株单核细胞增生李斯特菌分为9个型别A~I。血清型为1/2a的分离株以A型为主, 所测试的6株血清型为4b的分离株均为H型; 14株喹诺酮耐药菌株9株为A型、1株为B型、3株为C型、1株为F型, 除2株血清型为3a外, 其余均为1/2a。结论 DiversiLab系统分析结果, 揭示了46株从食品中分离的单增细胞增生李斯特菌间的亲缘关系, rep-PCR分型结果与H抗原结合位点存在一定联系, 喹诺酮耐药菌株的DNA指纹图谱相似度高, 与耐药基因有关。

关键词:单核细胞增生李斯特菌; DiversiLab系统; 同源性分析; 食源性致病菌

中图分类号: R155; R378 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)06-0532-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.06.004

Typing *Listeria monocytogenes* isolated from food by DiversiLab system

ZENG Jing, ZHOU Xue-ting, ZHANG Xi-quan, ZHANG Lin, ZHANG Xi-meng,
WEI Hai-yan, ZHOU Xi-cheng, MA Dan, NI Yuan-ying
(Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

Abstract: Objective *L. monocytogenes* isolates were typed by DiversiLab system. The result was compared with the results of serotype and the antibiotic resistance. **Methods** The DiversiLab system was based on the principle of rep-PCR. **Results** The 46 isolates were classified as nine types, type A to I. The 1/2a serotype isolates mainly belonged to A type. Six 4b serotype isolates belonged to H type. Among 14 nitrofurantoin resistance isolates, nine of them were A type, one isolate was B type, three isolates were C type, and one isolate was F type. Most of the nitrofurantoin resistance isolates