

参考文献

- [1] ATMAR R L, ESTES M K. The epidemiologic and clinical importance of *Norovirus* infection [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2006, 35(2):275-290.
- [2] FERREIRA M S, XAVIER M P, FUMIAN T M, et al. Acute gastroenteritis cases associated with *Noroviruses* infection in the state of Rio de Janeiro [J]. *J Med Virol*, 2008, 80(2):338-344.
- [3] ARON J H, JAN V, LOPMAN B. Updated *Norovirus* outbreak management and disease prevention guidelines [J]. *Recomm Rep*, 2011, 60(3):1-18.
- [4] 宋夏,刘弘. 诺如病毒的流行病学研究进展[J]. *上海预防医学*, 2017, 29(4):261-266.
- [5] VERHOEF L, HEWITT J, BARCLAY L, et al. *Norovirus* genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999-2012[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(4):592-599.
- [6] ESTES M K, PRASAD B V, ATMAR R L. *Noroviruses* everywhere: has something changed? [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2006, 19(5):467-474.
- [7] MAYO M A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV [J]. *Arch Virol*, 2002, 147(8):1655-1663.
- [8] VINJÉ J. Advances in laboratory methods for detection and typing of *Norovirus* [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(2):373-381.
- [9] TSE H, LAU S K, CHAN W M, et al. Complete genome sequences of novel canine *Noroviruses* in Hong Kong[J]. *J Virol*, 2012, 86(22):12435-12436.
- [10] VEGA E, BARCLAY L, GREGORICUS N, et al. Novel surveillance network for *Norovirus* gastroenteritis outbreaks, United States[J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(8):1389-1395.
- [11] LOPMAN B A, REACHER M H, VAN DUYNHOVEN Y, et al. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000[J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(1):90-96.
- [12] JOHNSTON C P, QIU H M, TICEHURST J R, et al. Outbreak management and implications of a nosocomial *Norovirus* outbreak [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 45(5):534-540.
- [13] HAMANO M, KUZUYA M, FUJII R, et al. Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by *Noroviruses* in Okayama, Japan[J]. *J Med Virol*, 2005, 77(2):282-289.
- [14] 韦志光,江世平,张屹,等. 2007年某高校诺如病毒引起感染性腹泻暴发疫情分析[J]. *应用预防医学*, 2007, 13(4):213-215.
- [15] 李晖,方苓,邹丽容,等. 广东省暴发性胃肠炎中诺如病毒的分子流行病学特点分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27(1):5-8.
- [16] 贾宁,谢丽君,索继江,等. 诺如病毒感染性腹泻分子流行病学调查[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(3):536-538.
- [17] VERHOEF L, KOOPMANS M, VAN PELT W, et al. The estimated disease burden of *Norovirus* in the Netherlands [J]. *Epidemiol Infect*, 2013, 141(3):496-506.
- [18] Havelaar A H, VAN DUYNHOVEN Y T, NAUTA M J, et al. Disease burden in the Netherlands due to infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 [J]. *Epidemiology and Infection*, 2004, 132(3):467-484.
- [19] Havelaar A H, HAAGSMA J A, MANGEN M J, et al. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009 [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 156(3):231-238.
- [20] 万壮,黄琼,张永慧,等. 广州市诺如病毒感染性胃肠炎疾病负担评估[J]. *中华疾病控制杂志*, 2016, 20(11):1135-1138.

研究报告

2016年河南省市售生禽肉中沙门菌血清分型和分子分型研究

炊慧霞,吴玲玲,邱正勇,张秀丽,张濛

(河南省疾病预防控制中心,河南 郑州 450016)

摘要:目的 了解河南省市售生禽肉中沙门菌污染状况,并对分离株进行血清型和分子分型研究,为河南省食源性疾病溯源数据库提供基础数据。**方法** 沙门菌检测及血清分型、脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型分析参照国家食品及食源性疾病预防网工作手册。**结果** 165份生禽肉样品中检出41株沙门菌,分属13个血清型,优势血清型是科瓦利斯沙门菌、肯塔基沙门菌、鼠伤寒沙门菌及达布沙门菌。经*Xba*I酶切,获得30种带型,每种带型包括1~5株菌株,相似度为47.5%~100%。部分不同血清型沙门菌PFGE型相似。**结论** 河南省市售生禽肉沙门菌污染严重,沙门菌血清型和基因型呈现多样化,基因型有一定的地区聚集性。

关键词:生禽肉;沙门菌;血清型;分子分型;食源性致病菌;食品安全;河南

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)06-0679-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.06.009

Characteristics of serotyping and molecular typing of *Salmonella* isolated from raw poultry in Henan 2016

CHUI Hui-xia, WU Ling-ling, QIU Zheng-yong, ZHANG Xiu-li, ZHANG Meng
(Henan Center for Diseases Prevention and Control, Henan Zhengzhou 450016, China)

Abstract: Objective To learn the status of *Salmonella* contamination in raw poultry sold in Henan, the serotypes and genotypes of the positive isolates were studied to provide basic data for foodborne disease traceability database in Henan.

Methods *Salmonella* detection, serotyping and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) molecular typing were performed by the manual for food and foodborne diseases monitoring network. **Results** Forty-one strains of *Salmonella* were detected from 165 samples and the detection rate was 24.85% (41/165). The 41 strains of *Salmonella* had 13 serotypes, and the dominant serotypes were *Salmonella* *corvallis*, *Salmonella* *kentucky*, *Salmonella* *typhimurium* and *Salmonella* *dabou*. Forty-one strains were divided 30 molecular patterns by *Xba* I digestion and pulsed field gel electrophoresis, and each pattern contained 1-5 strains with similarity ranged from 47.5%-100%. The PFGE patterns were similar in different serotypes.

Conclusion The contamination of *Salmonella* in raw poultry was serious in Henan, the serotypes and genotypes of *Salmonella* were diversified, and genotypes had certain regional aggregation.

Key words: Raw poultry; *Salmonella*; serotype; molecular subtyping; foodborne pathogens; food safety; Henan

沙门菌是一种重要的食源性致病菌,也是国际食品安全风险监测必检项目之一。加拿大国家肠道检测项目(NESP)数据^[1]显示,2013年通过NESP共报告15 569例肠道感染病例,其中63%是由细菌引起的,沙门菌引起的肠道感染病例最多,为6 269例。美国FoodNet(Foodborne Disease Active Surveillance Network)数据^[2]显示,2015年食源性致病菌实验室确证感染病例20 098例,其中住院病例共4 598例,死亡病例共77例,沙门菌引起的感染病例最多,为7 719例,每10万人口发病率为15.74%。在我国,据文献^[3]报道,每年约3亿人因沙门菌感染而患病,占食源性疾病总数的70%~80%。2010—2014年河南省共报道877例沙门菌感染病例,处于腹泻门诊监测肠道感染病例中的首位^[4]。

沙门菌常污染鸡肉、猪肉及牛奶等动物性食品,主要是禽类食品,人类通过食用未煮熟的或生的禽肉及交叉污染感染该菌,引起腹泻和其他肠外感染症状,造成严重的疾病负担^[5-7]。为了解河南省市售生禽肉中沙门菌污染状况,结合2016年度国家食品安全风险监测任务,对分离株进行血清型和分子分型研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品及菌株来源

样品采自河南省食品安全风险监测8个监测点(安阳市、三门峡市、平顶山市、周口市、鹤壁市、洛阳市、驻马店市和开封市)的农贸市场和批发市场,共165份。

脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子量标准用菌株:

沙门菌 H9812(中国科学院微生物研究所)。

1.1.2 主要仪器与试剂

全自动微生物鉴定仪 Vitek 2-compact 30(法国梅里埃),全自动菌液接种仪(Thermo Sensititre™ AIM)、药敏检测仪(Thermo Sensititre™ Vizion)均购自美国电热,脉冲场凝胶电泳仪、凝胶成像系统均购自美国BioRad,高速冷冻离心机,浊度仪,水浴恒温振荡器,三温水浴锅。

沙门菌的增菌、分离、鉴定试剂和培养基均购自北京陆桥技术有限责任公司和郑州人福博赛生物技术股份有限公司,革兰阴性菌鉴定卡(法国梅里埃),沙门菌分型血清(丹麦国家血清研究院),Seakem® Gold琼脂(瑞士LONZA),蛋白酶K(英国Roche),限制性内切酶 *Xba* I(大连宝生物公司)。

1.2 方法

参照2016年国家食品微生物监测工作手册^[8]进行沙门菌的检测、分型,参照2016年国家食源性疾病监测工作手册^[9]进行沙门菌PFGE分子分型。

1.3 统计学分析

参照国家食源性疾病分子溯源网络使用手册^[10],将PFGE图像导入BioNumerics 7.6软件包进行处理,选择Dice相关系数和非加权组平均(UPGMA)法,设置位置优化度和容许度为1.5%,相似度100%认定为同一PFGE带型。

2 结果

2.1 各监测点沙门菌检测情况

165份市售生禽肉样品中,41份检出沙门菌,检出率为24.85%。其中,开封市有14份样品检出沙门菌,检出率为70.00%;洛阳市有15份样品检出

沙门菌,检出率为60.00%;周口市有11份样品检出沙门菌,检出率为55.00%;平顶山市有1份样品检出沙门菌,检出率5.00%;安阳市、三门峡市、鹤壁市和驻马店市均未检出沙门菌,具体见表1。

表1 各监测点沙门菌检测结果

地区	总样品份数	阳性样品份数	检出率/%
安阳市	20	0	0.00
三门峡市	20	0	0.00
平顶山市	20	1	5.00
周口市	20	11	55.00
鹤壁市	20	0	0.00
洛阳市	25	15	60.00
驻马店市	20	0	0.00
开封市	20	14	70.00
合计	165	41	24.85

2.2 沙门菌血清分型

对检出的41株沙门菌进行血清学分型,分属13个血清型,血清型检出较多的为科瓦利斯沙门菌(19株)、肯塔基沙门菌(4株)、鼠伤寒沙门菌(3株)和达布沙门菌(3株),具体见表2。19株科瓦利斯沙门菌在开封市(6株)、洛阳市(9株)和周口市(4株)3个监测点检出,4株肯塔基沙门菌在周口市(1株)、开封市(2株)和洛阳市(1株)3个监测点检出,3株鼠伤寒沙门菌在开封市(1株)和洛阳市(2株)2个监测点检出,3株达布沙门菌在洛阳市(2株)和开封市(1株)2个监测点检出,2株阿拉莫沙门菌均仅在周口市检出,2株肠炎沙门菌在洛阳市(1株)和平顶山市(1株)检出;印第安纳沙门菌(1株)、瓦那塔沙门菌(1株)和德尔卑沙门菌(1株)均只在周口市检出,拉巴迪沙门菌(1株)、雷希伏特沙门菌(1株)、阿富拉沙门菌(1株)和沙门菌Ⅱ(6,7:g,m,s,t:1,5)(1株)均只在开封市检出。

表2 沙门菌血清分型结果

血清型	菌株数
科瓦利斯沙门菌	19
肯塔基沙门菌	4
鼠伤寒沙门菌	3
达布沙门菌	3
阿拉莫沙门菌	2
肠炎沙门菌	2
印地安纳沙门菌	2
沙门菌Ⅱ(6,7:g,m,s,t:1,5)	1
阿富拉沙门菌	1
德尔卑沙门菌	1
拉巴迪沙门菌	1
雷希伏特沙门菌	1
瓦那塔沙门菌	1
合计	41

2.3 沙门菌 PFGE 分型结果

41株沙门菌PFGE分型分为30种带型,每种带型包含1~5株菌株,不同菌株间的PFGE带型相似度为47.5%~100%。其中5种带型包含多于1株菌株,其余25种带型只包含1株菌株,具体见图1。来源于周口市的11株沙门菌分属10种带型,每种带型包含1~2株,不同菌株间的PFGE带型相似度为47.5%~100%。来源于洛阳市的15株沙门菌分属7种带型,每种带型包括1~5株,不同菌株间的PFGE带型相似度为47.5%~100%。来源于开封市的14株沙门菌分属12种带型,每种带型包括1~2株,不同菌株间的PFGE带型相似度为47.5%~100%。

19株科瓦利斯沙门菌分为9种带型,每种带型包含1~5株,不同菌株间的PFGE带型相似度为61.9%~100%。4株肯塔基沙门菌分为4种带型,每种带型包含1株,不同菌株间的PFGE带型相似度为47.5%~54.5%。3株鼠伤寒沙门菌分为3种带型,每种带型包含1株,不同菌株间的PFGE带型相似度为54.1%~72.7%。3株达布沙门菌为3种带型,每种带型包含1株,不同菌株间的PFGE带型相似度为62.3%~97.2%。

3 讨论

2016年河南省市售生禽肉沙门菌监测结果显示,165份样品中共有41份样品检出沙门菌,检出率为24.85%,与其他省份检出率不同,2017年黑龙江省生鸡肉中沙门菌的检出率为9.77%^[11],2010年8月—2012年3月北京市生鲜整鸡中沙门菌检出率为49.9%^[12],2011年7月—2012年3月广东省生鸡肉中沙门菌检出率为37.14%^[13],可能与地区差异或者样品采集及种类有关。2016年河南省市售生禽肉沙门菌监测结果与2008年河南省监测结果^[14](127份样品中共有58份样品检出沙门菌,检出率45.67%)比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 13.88, P < 0.05$),2016年生禽肉中沙门菌检出率有所下降,生禽肉中沙门菌污染状况有所改善,但也存在因监测点的变化及样品数量变化造成检出率降低的可能。另外,安阳市、三门峡市、鹤壁市和驻马店市均未检出沙门菌,存在采样及检测技术问题,有待于进一步的确认及督导,加强培训及考核。

2016年生禽肉中沙门菌血清分型结果中优势菌型是科瓦利斯沙门菌,该菌型是沙门菌中不常见的血清型之一,2010—2015年美国FoodNet数据报告中没有此菌型,加拿大NESP数据报告中也未出现该型沙门菌,2008—2015年河南省食品安全风

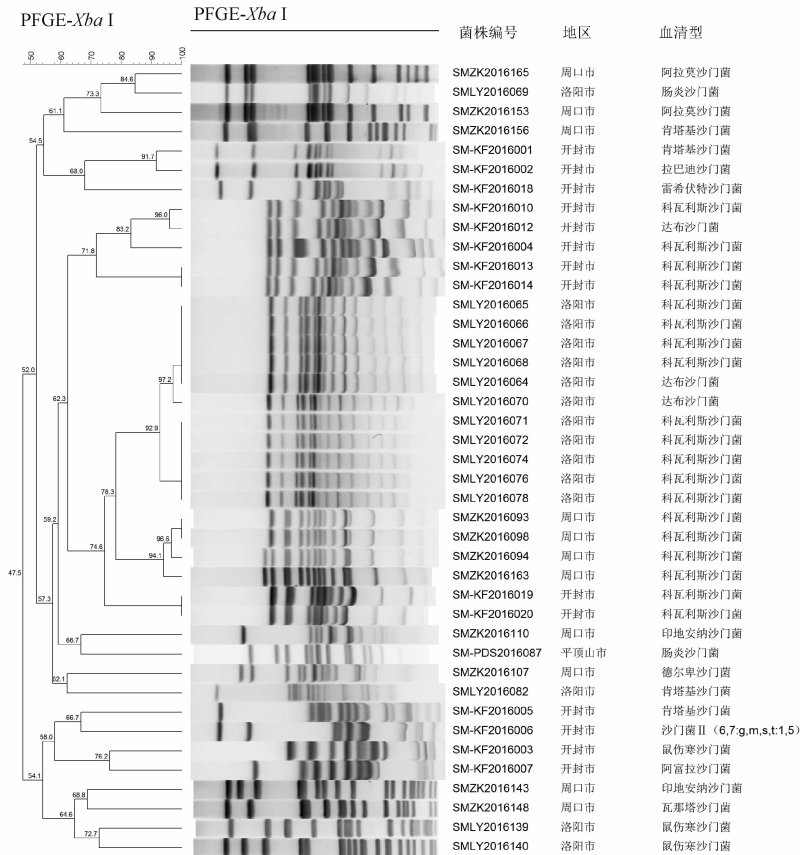


图1 41株沙门菌聚类分析结果

Figure 1 Results of cluster analysis of 41 strains of *Salmonella*

险监测网中均未检出该血清型沙门菌,但在河南省肉鸡养殖和屠宰加工环节沙门菌污染状况专项监测中开封市首次检出该血清型^[15],是从一份加工环节中的鸡胴体中分离出来的。通过文献搜索,发现该血清型沙门菌在国内于2006年由李映霞等^[16]从广东省健康人群体检中首次分离出并进行文献报道,同年广东省黄焕宜等^[17]从患者血液中也分离出该型沙门菌。近年来,河南省门诊腹泻患者中也有该型沙门菌检出,顺位排序位次逐年攀升,现居第四^[4]。虽现无证据表明腹泻患者中该型沙门菌来源于生鸡肉污染,但其风险却不容忽视,提醒相关部门予以重视,采取相关措施。另外,本次监测沙门菌血清分型结果显示19株科瓦利斯沙门菌仅在开封市、洛阳市和周口市检出,河南省腹泻门诊病例监测中该型菌则在郑州市、商丘市、周口市、睢县、登封市和中牟县检出,二者检出地区有出入,推测与不同监测体系所设监测点不同有关。印第安纳沙门菌、瓦那塔沙门菌和德尔卑沙门菌均只在周口市检出,拉巴迪沙门菌、雷希伏特沙门菌、阿富汗沙门菌和沙门菌 II (6,7:g,m,s,t:1,5)均只在开封市检出,推测某些血清型有一定的地域分布特征,是下一步关注的重点。2016年河南省沙门菌血清型多样化,分布相对集中,有些菌型仅在一个监测

点检出。

PFGE是近年来国家食品安全风险监测与食源性疾病溯源中要求的一项分子分型及溯源技术,该技术依托于网络化实验室实时监测、交换和比对数据,从而及时发现、识别聚集性,追踪可疑食品,确认暴发^[18-20]。本研究41株沙门菌PFGE分子分型分为30个带型,部分菌株存在地区聚集性,提示同一采样地区的生禽肉中存在共同来源或者交叉污染现象,有待于进一步的追踪调查。另外,有文献^[21]报道部分沙门菌的血清型不同,但分型后仍表现出较高的基因同源性和相似的基因型,与本次不同血清型沙门菌聚类分析结果相似,血清型为达布沙门菌(8,20;Z4,Z23:l,w)和科瓦利斯沙门菌(8,20;Z4,Z23:Z6)二者抗原式很相似,仅H抗原第二相不同,其PFGE带型相似,相似度达62.3%~100%,存在地区聚集性,同时来源于开封市科瓦利斯沙门菌SM-KF2016010与达布沙门菌SM-KF2016012的PFGE带型相似度达96.0%,同时来源于洛阳达布沙门菌SMLY2016064与科瓦利斯沙门菌SMLY2016065、SMLY2016066、SMLY2016067、SMLY2016068的PFGE带型相似度达100%。沙门菌有114个H抗原,鞭毛抗原结构是由2个基因编码(*fliC*和*fljB*),*fliC*基因编码I相鞭毛蛋白,*fljB*基

因编码 II 相鞭毛蛋白,这 2 个基因具有高度保守的 5' 和 3' 末端及易变的中部区域,鞭毛抗原复合物中的抗原通常表现出高度同源的基因序列^[22],推测这就是血清型抗原式非常相近的达布沙门菌和科瓦利斯沙门菌其 PFGE 带型相近或相同的原因之一,另外,PFGE 是对细菌整个基因的酶切,酶切之后产生的都是大片段 DNA,结果比较粗糙,不能区分小的基因序列差别。所以,建议在溯源分析过程中将血清分型与分子分型相结合,即表型和基因型相结合,通过多种表型和基因型的聚类分析,获得更加准确的溯源分析结果,从而更加准确查找原因食品或关键环节。

参考文献

- [1] National Enteric Surveillance Program (NESP) 2013 annual report executive summary [EB/OL]. 2013 [2017-07-26]. <https://www.nlm-lnm.gc.ca/NESP-PNSME/surveillance-2013-eng.html>.
- [2] FoodNet. 2015 annual foodborne illness surveillance report [EB/OL]. 2015 [2017-07-26]. <https://www.cdc.gov/foodnet/reports/annual-reports-2015.html>.
- [3] 毛雪丹,胡俊峰,刘秀梅. 2003—2007 年中国 1 060 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.
- [4] 穆玉姣,张白帆,赵嘉咏,等. 河南省腹泻患者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.
- [5] 毛雪丹,胡俊峰,刘秀梅,等. 用文献综述法估计我国食源性非伤寒沙门氏菌疾病负担 [J]. 中华疾病控制杂志, 2011, 15(7): 622-625.
- [6] 黄嫫,刘卫国,马飞,等. 沙门氏菌病的防控 [J]. 内蒙古畜牧科学, 2010, 31(11/12): 163-165.
- [7] 刘海燕,张平. 家禽沙门氏菌病的流行现状及防控方法 [J]. 畜牧市场, 2009, 12(11): 30-32.
- [8] 2016 年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册 (内部资料) [Z]. 国家食品安全风险评估中心, 2016.
- [9] 2016 年食源性疾病监测工作手册 (内部资料) [Z]. 国家食品安全风险评估中心, 2016.
- [10] 国家食源性疾病分子溯源网络 (TraNet China) 使用手册 (内部资料) [Z]. 国家食品安全风险评估中心, 2016.
- [11] 何桢然,沈旭,遇晓杰,等. 黑龙江省生鸡肉中沙门菌污染调查和耐药分析 [J]. 中国公共卫生管理, 2017, 33(3): 313-315.
- [12] 林兰,王晔茹,徐潇,等. 零售生鲜整鸡中沙门氏菌分离与耐药性分析 [J]. 药物生物技术, 2014, 21(4): 343-348.
- [13] 杨小鹏,吴清平,张菊梅,等. 广东部分零售畜禽产品沙门菌生化型和血清型分析 [J]. 卫生研究, 2013, 42(4): 615-618.
- [14] 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]. 中国人兽共患病杂志, 2010, 26(3): 292.
- [15] 刘杰,杨如璞,黄淑华,等. 河南省首次发现的科瓦利斯沙门菌的鉴定与探讨 [J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(2): 278-280.
- [16] 李映霞,余晓娜,孙凤琪,等. 国内首次从健康人群体检中检出一株科瓦利斯沙门菌 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(6): 1567.
- [17] 黄焕宜,许小婵,唐金龙. 血液中分离出罕见的科瓦利斯沙门菌 [J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(8): 862.
- [18] LIU X Y, LIU Q, XIAO K P, et al. Attenuated *Salmonella typhimurium* delivery of a novel DNA vaccine induces immune responses and provides protection against duck enteritis virus [J]. Vet Microbiol, 2016, 186(3): 189-198.
- [19] GAUL S B, WEDEL S, ERDMAN M M, et al. Use of pulsed-field gel electrophoresis of conserved *Xba*I fragments for identification of swine *Salmonella* serotypes [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(2): 472-476.
- [20] YAMAZAKI W, UEMURA R, SEKIGUCHI S, et al. *Campylobacter* and *Salmonella* are prevalent in broiler farms in Kyushu, Japan: results of a 2-year distribution and circulation dynamics audit [J]. Appl Microbiol, 2016, 120(6): 1711-1722.
- [21] 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.
- [22] KRISTYN F, ERIKA J L, CATHERINE Y, et al. Rapid genoserotyping tool for classification of *Salmonella* serovars [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8): 2954-2965.