

生牛肉中沙门菌的血清型鉴定与耐药性检测

彭斌¹, 戴小华¹, 阿热阿依·海依拉提¹, 张晓玲¹, 姚刚¹,
克然木·托乎提², 马宾祥², 王金泉^{1*}

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052; 2. 库尔勒市动物卫生监督所, 库尔勒 841000)

摘要: **目的** 了解新疆地区生牛肉中沙门菌的血清型和耐药状况。**方法** 采用沙门菌诊断血清试剂盒检测血清型, 微量肉汤稀释法检测分离菌株的耐药性。**结果** 28株牛肉源沙门菌共检出11种血清型, 其5种优势血清型分别为伦敦沙门菌(17.9%)、德尔卑沙门菌(10.7%)、伤寒沙门氏菌(10.7%)、甲型副伤寒沙门菌(10.7%)和阿贡纳沙门菌(10.7%); 沙门菌对10种抗菌药物耐药结果显示菌株对甲氧苄啶、氯霉素、四环素的耐药率最高, 分别为100%、92.9%和75%, 对氟苯尼考最为敏感, 耐药率为7.1%。所有的菌株可耐2种或2种以上的抗生素。**结论** 新疆地区牛肉源沙门菌存在一定的致病性, 耐药状况比较严重。

关键词: 牛肉; 沙门菌; 血清型; 耐药性

Serotype identification and drug resistance detection of *Salmonella* isolated from raw beef

PENG Bin¹, DAI Xiao-Hua¹, Aray·Hayrat¹, ZHANG Xiao-Ling¹, YAO Gang¹, Keram·Tuohut²,
MA Bin-Xiang², WANG Jin-Quan^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;
2. Korla City Animal Health Supervision, Korla 841000, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the serotype and drug resistance of *Salmonella* isolated from raw beef in Xinjiang. **Methods** The serotype was detected by the *Salmonella* assay kit, and the drug resistance of the isolated strain was detected by the broth dilution method. **Results** The 28 strains of *Salmonella* were isolated from raw beef samples, and 11 kinds of serotypes were identified. The 5 dominant serotypes were *S.london* (17.9%), *S. derby* (10.7%), *S. typhi* (10.7%), *S. paratyphia* (10.7%) and *S.agona* (10.7%), respectively. The antimicrobial susceptibility of *Salmonella* to 10 kinds drugs was showed as follows: the highest drug resistance to trimethoprim (100%), followed by chloramphenicol (92.5%), tetracycline (75%); the lowest drug resistance to florfenicol (7.1%). All the strains were resistant to 2 or more antibiotics. **Conclusion** There is a certain pathogenicity for *Salmonella* isolated from raw beef in Xinjiang, and the drug resistance is serious.

KEY WORDS: beef; *Salmonella*; serum type; drug resistance

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0500500)、库尔勒市科技计划项目(2015051103)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0500500) and Science and Technology Program of Korla City (2015051103)

***通讯作者:** 王金泉, 教授, 主要研究方向为动物生长发育调控及畜产品质量安全。E-mail: wangjinquan163@163.com

***Corresponding author:** WANG Jin-Quan, Professor, College of Veterinary Medicine, Urumqi 830052, China. E-mail: wangjinquan163@163.com

1 引言

沙门菌(*Salmonella*)是一群寄生于人和动物肠道的革兰氏阴性杆菌^[1],是引发人和动物胃肠炎、败血症和食物中毒的重要人兽共患病原菌^[2]。作为世界范围内食源性致病菌的典型代表^[3]和食源性致病菌监测的重要指标菌,沙门菌的血清型目前已有 2600 种以上^[4],目前研究发现在中国引发人畜患病的沙门菌大约分属 20 种血清型^[5],其中危害较大的为鼠伤寒沙门菌、猪霍乱沙门菌以及肠炎沙门菌等^[6]。

抗生素在畜牧生产和兽医诊疗中的广泛使用导致沙门菌产生耐药性且耐药程度逐渐加大^[7]。由于沙门菌可能将相同的耐药性通过食物链传递给人体内的病原菌,故而会导致人类治疗由沙门菌引发的疾病时难度加大甚至失败^[8]。因此沙门菌耐药性的检测具有一定的意义。

本研究对分离自新疆地区热鲜牛肉中的沙门菌的血清型进行鉴定,对其耐药性进行调查,了解新疆地区热鲜牛肉中沙门菌的血清型和耐药状况,以期新疆地区沙门菌的有效防控和耐药趋势的评估提供依据和基础。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

2.1.1 菌株来源

从新疆库勒勒市销售终端热鲜牛肉中分离鉴定到的 28 株沙门菌,28 株均通过沙门菌保守基因 *invA* 的 PCR 鉴定和生化试验确认为沙门菌。大肠杆菌 ATCC25922 (杭州天和微生物试剂有限公司)

2.1.2 试剂与仪器

四环素类:四环素(含量 95%); β -内酰胺类:阿莫西林(含量 98%);磺胺类:磺胺异噁唑(含量 98%)均购自中国食品药品检定研究院。磺胺类:甲氧苄啶(含量 98%);酰胺醇类:氯霉素(含量 98%)、氟苯尼考(含量 98%);氨基糖苷类:链霉素(含量 77.4%); β -内酰胺类:氨苄西林(含量 86.5%);喹诺酮类:诺氟沙星(含量 98%)、环丙沙星(含量 98%)均购自北京索莱宝生物公司;沙门菌 30 种血清(O 多价 A-F 血清、Vi 因子血清、O 因子血清 9 种、H 复合因子血清 4 种)鉴定试剂盒(宁波天润生物药业有限公司)。

REF-703632 八道移液器(德国 Transferpette 公司);UV1900 紫外可见分光光度计(上海菁华公司);DHP-9162 恒温生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);LDZX-50KB 卧式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);SW-CJ-2FD 超净工作台(上海博讯有限公司);DW-40L275 冰箱(青岛海尔集团)。

2.2 实验方法

2.2.1 血清型鉴定

参照食品安全国家标准 GB 4789.4-2016《食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验》^[9]和血清鉴定试剂盒(30 种)说明对沙门菌分离菌株进行血清型鉴定。

2.2.2 药敏实验及耐药率统计方法

采用美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的微量肉汤稀释法,对 28 株牛肉源沙门菌进行 10 种常见抗菌药物(甲氧苄啶、氯霉素、磺胺异噁唑、四环素、氨苄西林、阿莫西林、链霉素、环丙沙星、诺氟沙星、氟苯尼考)耐药性实验,并分析其耐药情况。主要包括菌悬液的制备、抗菌药物的制备和测定最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。参照 CLSI 标准(2016 年版)读取质控菌株的 MIC 值,并检查质控菌株的 MIC,确保不同浓度抗菌药物下的质控菌的 MIC 值结果在可接受范围内。判读过程中将 96 孔板置于不反光条件下,记录生长完全受抑制菌落的对应孔的抗菌药物浓度,即对细菌的 MIC。如果质控菌的 MIC 值符合药敏范围,则继续读取待测菌的 MIC 值,按表 1 对药敏结果进行判读,药敏结果记录为敏感、中介和耐药 3 种。据判读结果统计出牛肉产业链中沙门氏菌的耐药菌株数,计算沙门氏菌对各种抗菌药物的耐药率:

耐药率=(对该药物耐药的菌株数/菌株总数) $\times$ 100%。

表 1 抗菌药物及 ATCC25922 质控范围的 MICs 结果判定标准
Table 1 MICs results criterion of antimicrobial agents and quality control range of ATCC25922

药物名称	MIC 解释标准/(μ g/mL)			
	ATCC25922	敏感(S)	中介(I)	耐药(R)
氯霉素 C	2~8	≤ 8	16	≥ 32
甲氧苄啶 TMP	0.5~2	≤ 8	—	≥ 512
四环素 TE	0.5~2	≤ 4	8	≥ 16
磺胺异噁唑 SIZ	8~32	≤ 256	—	≥ 512
链霉素 S	—	—	—	—
阿莫西林 AMX	2~8	≤ 8	16	≥ 32
氨苄西林 AM	2~8	≤ 8	16	≥ 32
氟苯尼考 FFC	0.5~2	≤ 4	8	≥ 16
诺氟沙星 NOR	0.03~0.12	≤ 2	4	≥ 8
环丙沙星 CIP	0.004~0.015	≤ 0.06	0.12~0.5	≥ 1

3 结果与分析

3.1 沙门菌血清分型结果

28 株牛肉源沙门菌经血清鉴定试剂盒鉴定共检出 11 种血清型(见表 2),其中,有 3 株利用该血清鉴定试剂盒无

法鉴定出血清型, 剩余 25 株沙门菌共检出 11 种血清型。前 5 种优势血清型依次为伦敦沙门菌、德尔卑沙门菌、伤寒沙门氏菌、甲型副伤寒沙门菌和阿贡纳沙门菌, 所占比例依次为 17.9%(5/28)、10.7%(3/28)、10.7%(3/28)、10.7%(3/28)和 10.7%(3/28)。

3.2 沙门菌耐药结果

本研究中 28 株牛肉源沙门菌对 10 种药物的耐药结果如表 3 所示。结果表明: 菌株对甲氧苄啶、氯霉素耐药率

最高, 分别为 100%(28/28)和 92.9%(26/28); 对四环素、阿莫西林和磺胺异噁唑的耐药率也较高, 耐药率均超过 50%; 对链霉素、氨苄西林、诺氟沙星和环丙沙星的耐药率相对较低; 对氟苯尼考的耐药率最低。

28 株牛肉源沙门菌的多重耐药情况如表 4 所示。结果显示: 四重耐药的菌株占比最多, 为 25%(7/28); 其次为三重、五重、八重、六重和九重耐药的菌株; 七重耐药和二重耐药的菌株占比最少。

表 2 牛肉沙门菌血清型分布 Table 2 Serotypes distribution of <i>Salmonella</i> from raw beef		
沙门氏菌血清型	菌株数	百分比/%
肠炎沙门菌(<i>S.enteritidis</i>)	2	7.1
伦敦沙门菌(<i>S.london</i>)	5	17.9
德尔卑沙门菌(<i>S.derby</i>)	3	10.7
伤寒沙门氏菌(<i>S.typhi</i>)	3	10.7
甲型副伤寒沙门菌(<i>S.paratyphiA</i>)	3	10.7
鼠伤寒沙门菌(<i>S.typhimurium</i>)	1	3.6
都柏林沙门菌(<i>S.dublin</i>)	1	3.6
阿贡纳沙门菌(<i>S.agona</i>)	3	10.7
印第安纳沙门菌(<i>S.indiana</i>)	2	7.1
林登堡沙门菌(<i>S.lindenburg</i>)	1	3.6
习志野沙门菌(<i>S.narashino</i>)	1	3.6
<i>unknown</i>	3	10.7
合计	28	100

表 3 牛肉沙门菌的耐药率 Table 3 Drug resistance rate of <i>Salmonella</i> from raw beef		
抗菌药物	耐药菌株数	耐药率/%
甲氧苄啶 TMP	28	100.0
氯霉素 C	26	92.9
四环素 TE	21	75.0
磺胺异噁唑 SIZ	16	53.6
链霉素 S	15	42.9
阿莫西林 AMX	12	57.1
氨苄西林 AM	10	35.7
诺氟沙星 NOR	7	25.0
环丙沙星 CIP	6	21.4
氟苯尼考 FFC	2	7.1

表 4 牛肉中沙门菌多重耐药结果 Table 4 Multi-drug resistance results of <i>Salmonella</i> from raw beef		
多重耐药	耐药菌株数	多重耐药率/%
二重	1	3.6(1/28)
三重	6	21.4(6/28)
四重	7	25.0(7/28)
五重	5	17.9(5/28)
六重	2	7.1(2/28)
七重	1	3.6(1/28)
八重	4	14.3(4/28)
九重	2	7.1(2/28)

4 结论与讨论

在沙门菌的流行性病学调查中, 沙门菌的血清分型可为监测食源性沙门菌传播提供基础数据。本研究中牛肉源沙门菌共检出 11 种血清型, 血清型种类涵盖较多。其中最常见血清型为伦敦沙门菌、德尔卑沙门菌、伤寒沙门氏菌、甲型副伤寒沙门菌和阿贡纳沙门菌, 德尔卑沙门菌和伤寒沙门氏菌是我国引发食物中毒的主要血清型^[10], 在本研究中作为常见血清型检出(均为 3 株), 应引起食品卫生监督部门的重视。2015 年尹明远等^[11]对新疆乌鲁木齐零售牛肉沙门菌血清分型结果显示, 其牛肉源沙门菌涵盖 8 种血清型, 优势血清型以伦敦沙门菌、肠炎沙门菌、德尔卑沙门菌为主。2016 年黄裕等^[12]对深圳市畜禽产品中沙门菌血清型的鉴定结果发现 70 株沙门菌分属 18 种血清型, 其中牛肉源沙门菌的优势血清型为纽波特沙门氏菌(40%)。对比发现, 牛肉源沙门菌血清型种类涵盖较多与本研究一致, 但优势血清型不尽相同。

沙门菌等食源性致病菌的耐药状况日益严重, 已威胁到人类疾病的治疗^[13]。本研究中 28 株牛肉源沙门菌对甲氧苄啶、氯霉素、四环素、阿莫西林和磺胺异噁唑的耐药率分别为 100%(28/28)、92.9%(26/28)、75%(21/28)、57.10%(12/28)和 53.6% (16/28), 100%的菌株可耐 2 种或 2

种以上的抗生素,耐药状况严重。通过对乌鲁木齐肉源沙门菌耐药性的研究,尹明远等^[11]发现:其分离鉴定的沙门菌对甲氧苄啶、氯霉素、四环素、阿莫西林和磺胺异恶唑的耐药率分别为100%、88.9%、63.6%、25.6%和57.6%。100%的菌株可耐1种抗生素。葛琨等^[14]对牛羊肉源沙门菌耐药检测的结果表明其对甲氧苄啶、氯霉素、四环素、阿莫西林和磺胺异恶唑的耐药率分别为100%、86.7%、60.0%、26.7和6.7%。对照发现,本研究与上述研究的沙门菌除了在阿莫西林和磺胺异恶唑耐药状况有差异外,对甲氧苄啶、氯霉素、四环素均表现出较高的耐药性。沙门菌总体上的高耐药率可能与在畜牧兽医领域大量使用抗生素有关。肉源耐药菌株可直接或间接感染人,导致抗菌药物在治疗人类疾病时可能失效^[15]。相关职能机构应该加强规范使用抗生素的监管,强化细菌耐药性的监测,积极应对细菌的耐药性对人类健康带来的威胁。

参考文献

- [1] 陆承平. 兽医微生物学(第五版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013.
Lu CP. Veterinary microbiology (fifth edition) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013.
- [2] 陈龙, 孟庆峰, 康元环, 等. 沙门菌III型分泌系统组成与装配研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(7): 753–756.
Chen L, Meng QF, Kang YH, et al. Advances in composition and assembly of type III secretion system of *Salmonella* [J]. Chin J Zoon, 2014, 30(7): 753–756.
- [3] 牛莉娅, 徐保红, 蔡文华, 等. 人食物中毒、屠宰及市售禽肉样品中沙门菌毒力基因结果分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(7): 637–641.
Niu LY, Xu BH, Cai WH, et al. *Salmonella* virulence gene analysis in poisoning food, slaughtering and commercial samples [J]. Chin J Zoon, 2017, 33(7): 637–641.
- [4] 张小平, 吴忠华, 魏莹. 食品中沙门菌检测技术研究进展[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2016, (1): 72–75.
Zhang XP, Wu ZH, Wei Y. Research progress on detection technology of *Salmonella* in foods [J]. Chin J Front Health Quarant, 2016, (1): 72–75.
- [5] 黄凯, 陈素娟, 黄骏, 等. 动物源性沙门氏菌的耐药性分析及氟苯尼考类耐药基因的鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(2): 459–466.
Huang K, Chen SJ, Huang J, et al. Analysis of antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from animal and identification of its florfenicol resistant gene [J]. China Anim Husband Veter Med, 2015, 42(2): 459–466.
- [6] 侯小刚, 刘书亮, 韩新峰, 等. 四川部分地区猪肉产业链中沙门氏菌的分离及其鉴定[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 250–253.
Hou XG, Liu SL, Han XF, et al. Isolation and Identification of *Salmonella* from pork industry chains in partial areas of Sichuan province [J]. Food Sci, 2013, 34(11): 250–253.
- [7] 杨保伟, 曲东, 申进玲, 等. 陕西食源性沙门氏菌耐药及相关基因[J]. 微生物学报, 2010, 50(6): 788–796.
Yang BW, Qu D, Shen JL, et al. Antimicrobial susceptibility and related genes of *Salmonella* serovars from retail food in Shaanxi province [J]. Acta Microbiol Sin, 2010, 50(6): 788–796.
- [8] Kariuki S, Revathi G, Kariuki N, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant non-typhoidal *Salmonellae*, Kenya, 1994–2003 [J]. Int J Antimicrob Agent, 2005, 25(1): 38–43.
- [9] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2016 National standard for food safety-Food microbiological examination of *Salmonella* test [S].
- [10] 张霆, 郭志勤, 王凤平, 等. 72株沙门菌血清型分布及药敏试验结果分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(6): 532–534.
Zhang T, Guo ZQ, Wang FP, et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of 72 strains of *Salmonella* [J]. Chin J Infect Chemoth, 2014, 14(6): 532–534.
- [11] 尹明远. 新疆乌鲁木齐地区食源性沙门氏菌的检测及特性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.
Yin MY. Detection and characterization of foodborne *Salmonella* enterica serovar in Urumqi, Xinjiang [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2015.
- [12] 黄裕, 阚式斌, 汪清, 等. 深圳市畜禽产品中沙门氏菌血清型与耐药性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(6): 2252–2257.
Huang Y, Kan SF, Wang Q, et al. Serotype and drug resistance of *Salmonella* from livestock and poultry products in Shenzhen [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(6): 3480–3484.
- [13] 曹明慧, 赵凤菊. 猪源大肠埃希菌磺胺类药物主要耐药基因的检测与分析[J]. 动物医学进展, 2017, 38(7): 46–48.
Cao MH, Zhao FJ. Detection and analysis of sulfonamides resistance gene in *Escherichia coli* from swine [J]. Progress Veter Med, 2017, 38(7): 46–48.
- [14] 葛琨, 武运, 杨保伟, 等. 乌鲁木齐牛羊肉源沙门氏菌对喹诺酮类药物的耐药状况及相关基因分析[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 107–112.
Ge K, Wu Y, Yang BW, et al. Quinolone resistance characteristics and related gene analysis of *Salmonella* in beef and mutton retailed in Urumqi [J]. Food Sci, 2017, 38(4): 107–112.
- [15] Normanno G, La SG, Dambrosio A, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products [J]. Int J Food Microbiol, 2007, 115(3): 290–296.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



彭斌, 主要研究方向为畜产品质量安全。

E-mail: pengbinwho@163.com



王金泉, 教授, 主要研究方向为动物生产发育调控与畜产品质量安全。

E-mail: wangjinqun163@163.com