

免疫磁珠法检测食品中的沙门菌及分离菌株的耐药性

许学斌 顾宝柯 金汇明 胡培玉
(上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

摘要:为检测沙门菌在本市食品中的污染和耐药情况,采集各类食品样品 303 件,经增菌后通过特异的免疫磁珠(IMS)吸附并接种 XLD 平板分离沙门菌。分离的菌株按年度分成 2 组,分别以改良 K-B 法测试对 28 种抗生素的耐药性。在 303 件样品中检出 87 件阳性,总阳性率 28.71%。分离到的 112 株沙门菌以德比、肠炎血清型占优势。肉类制品的阳性率 40.20% (82/204) 明显高于其它食品,共分离出 107 株沙门菌(107/112, 95.54%)。菌株耐药率在 2 年中有显著改变的抗生素有环丙沙星、复方新诺明、妥布霉素、二甲胺四环素、氯霉素和链霉素。耐 10 种以上抗生素的多重耐药株有 12 株(12/112, 10.71%),有 4 株头孢哌酮耐药株。IMS 用于食品中沙门菌的分离效果较好。结果显示耐环丙沙星和多重耐药菌株的增多说明加强食源性沙门菌耐药监测的重要性。

关键词:沙门氏菌属;免疫磁化分离;抗药性;食品

Use of Immunomagnetic Separation Technique for Detecting Salmonellae in Foods and Drug Resistance Analysis for Strains Isolated

XU Xue-bin, GU Bao-ke, JIN Hui-ming, HU Pei-yu
(Shanghai Municipal Center for Disease Prevention and Control, Shanghai 200336, China)

Abstract: To investigate the status of food contamination by Salmonellae and the drug resistance of Salmonellae in Shanghai. 303 different food samples were pre-enrichment, then inoculated on XLD plates after special absorbing with IMS to isolate Salmonellae. The isolated strains were divided into 2 groups based on time of isolation and tested with modified K&B method to test the sensitivity to 28 antibiotics. There were 87 Salmonellae positive results in 303 tests. The positive rate was 28.71%. In the 112 Salmonella serotype, *S. derby* and *S. enteritidis* were dominant. The Salmonellae positive rate in meat products was much higher than that in other food products, in which the positive rate was 40.20% (82/204) with 107 different serotypes of Salmonella species (107/112, 95.54%). The drug resistant strains of Salmonellae to ciprofloxacin, co-trimoxazole, tobramycin, minocycline, chloramphenicol and streptomycin were obviously changed in the period of 2 years. There were 12 strains of multiple drug resistance, which resisted more than 10 different antibiotics (12/112, 10.71%), and 4 strains resisted cefoperazone. Using IMS method isolate Salmonellae from foods samples has better result than the traditional method. It provides a new methodology for surveillance of foods. The increase of ciprofloxacin resistant strains and multiple drug resistant strains warn us that the importance of emphasizing the surveillance of foodborne Salmonellae-resistant.

Key word: Salmonella; Immunomagnetic Separation; Drug Resistance; Food

WHO 在 2000 年 1 月组建了沙门菌全球监测网 (Global Salmr surv, GSS),近年来各国政府以及相关技术部门纷纷发展和运用高新技术,建立和完善各自的食源性致病菌以及食源性疾病的主动监测系统和预警系统^[1,2]。为了解沙门菌在上海地区食品(特别是肉制品)中的污染情况和耐药水平,2002 年~2003 年,我们使用免疫磁珠分离技术 (immunomagnetic separation, IMS) 从分步增菌的样品中分离沙门菌,并测试了全部菌株的抗生素敏感性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 均质器(天津四方仪器厂); BeadReatever 自动磁珠分选收集器(Dynal, Norway); VITEK 全微生物分析仪(法国,生物梅里埃公司)。
1.1.2 培养基和试剂 乳糖肉汤(LB,北京陆桥技术有限责任公司);四硫磺酸盐增菌液(TT)、氯化镁孔雀绿增菌液(MM)、肠道双支糖生化鉴别管(上海市疾病预防控制中心试剂供应中心);木糖赖氨酸平板(XLD)和抗生素药敏纸片(Oxoid, England);食品增菌袋(NASCO, USA);抗沙门菌磁珠试剂(anti-Salmonellae beads, Dynal, Norway);沙门菌分型诊断血清(成都生物制品研究所);0.01 mol/L pH 7.4

基金项目:上海市疾病预防控制中心课题基金资助项目(20004-1)
作者简介:许学斌 男 主管技师

(0.05% 吐温 - 20) PBS 缓冲液。

1.1.3 样品来源 样品来自上海市的定点屠宰场、大型超市、农贸批发市场和多家快餐连锁店,采集鸡、鸭、猪、牛等多种冰鲜禽畜肉制品和部分经腌制的鸡肉半加工品(非定型包装),以及部分水果、蔬菜、豆制品和禽蛋,2002年5~10月共采集247件样品,2003年8~12月共采集56件样品,每份样品250g,经冷链保存送实验室检测。

1.2 方法

1.2.1 沙门菌分步增菌流程^[3]和免疫磁珠分离技术(参照仪器使用说明) 参照 AOAC 流程^[4],对每份样品分别经过10倍量LB,4~6h,(35±1) 预增菌和用MM(加0.1ml,(24±2)h,(42±0.2))、TT(加1ml,(24±2)h,(43±0.2))作选择性增菌后,分别吸取1ml用自动磁珠分选收集器富集,取30μl磁珠划种XLD平板,(24±2)h,(35±1) 孵育。

1.2.2 疑似菌株的甄别和药敏试验 观察选择性分离平板并挑取3个疑似菌落(XLD:中心黑色边缘淡红色湿润菌落)接种肠道双糖鉴别管,对初筛符合者(甘露醇+、葡萄糖+、脲酶-、蔗糖-、动力+、靛基质-、硫化氢+)分别进行沙门菌多价血清凝集和VITEK全自动微生物分析仪GNI+生化编码鉴定,符合者按照沙门菌Kuffman-White抗原表(2001年版)用“O”、“H”因子血清凝集或经“H”相位诱导鉴定出抗原式。抗生素敏感试验的操作和结果判断参照NCCLS(2003年版)标准^[5]。

2 结果

2.1 食品中沙门菌的分离结果 在303件食品样品中,有87件不同类别的食品检出沙门菌,总阳性率28.71%,共分离112株沙门菌菌株。检测阳性率和菌型(株)的构成主要集中在肉与肉制食品中,分别为:生鲜肉制品(41/76,53.95%;60/112,53.57%)、冷冻肉制品(34/117,29.06%;39/112,34.82%)、加工肉制品(7/11,63.64%;8/112,7.14%)。其余的食品除禽蛋外也均分离到菌株(表1)。在肉制品中分离到1株以上沙门菌的样品的具体分布情况见表2。

表1 7种食品中沙门菌的分离结果

食品类别	样品数	阳性数(%)	血清型构成(%)
生鲜肉制品	76	41(53.95)	60(53.57)
冷冻肉制品	117	34(29.06)	39(34.82)
加工肉制品 ^a	11	7(63.64)	8(7.14)
水果	28	2(7.14)	2(1.79)
蔬菜	23	1(4.35)	1(0.09)
豆制品	18	2(11.11)	2(1.79)
禽蛋	30	0(0.00)	0(0.00)
合计	303	87(28.71)	112(100.00)

注:a包括香肠、腌制、腊制等肉制品。

表2 肉制品中分离菌株的型别分布情况

生鲜肉制品	血清型别	冷冻肉制品	血清型别	加工肉制品	血清型别
猪小排	肠炎 德比	鸡腿	汤卜逊 旺茨渥	腌鸡快	德比 波茨毛兹
鸡心	肠炎 德比	牛霖	山夫登堡 阿贡纳		
猪肉糜	德比 山夫登堡 伦敦	鸡腿 鸡翅膀	德比 肠炎		
牛肉	鸭沙 山夫登堡	猪腿肉	山夫登堡 鼠伤寒		
猪小排	鸭沙 德比		肠炎		
猪大排	山夫登堡 鸭沙 德比				
猪肉	鸭沙 德比				
猪小排	德比 圣保罗				
猪小排	伦敦 德比 圣保罗				
猪肉片	圣保罗 德比				
猪肉糜	鸭沙 山夫登堡				
猪大肠	德比 肯塔基				
猪大肠	鸭沙 德比 肯塔基				
猪大肠	德比 肯塔基 鸭沙				

2.2 食品中沙门菌株的血清型分布 通过对112株沙门菌的血清分型鉴定,前10位菌型依次为:德比沙门菌(33株);肠炎沙门菌(27株);鼠伤寒沙门菌(8株);鸭沙门菌(8株);里定沙门菌(8株);山夫顿堡沙门菌(7株);阿贡纳沙门菌(4株);圣保罗沙门菌(4株);伦敦沙门菌(3株);肯塔基沙门菌(3株)。菌群以B群沙门菌为优势群(45株),F群以外者有1株旺茨渥沙门菌(39:b:2),较为少见。

2.3 菌株的抗生素敏感试验 112株沙门菌分成2组(其中2002年分离出的70株,2003年分离出的42株),分别测试对28种抗生素的耐药性。菌株耐药率呈显著增加的有环丙沙星、复方新诺明、妥布霉素、二甲胺四环素($\chi^2 > 3.84, P < 0.05$);呈显著下降的是氯霉素和链霉素($\chi^2 > 3.84, P < 0.05$)。有4株沙门菌对第3代头孢菌素中的头孢哌酮出现了耐药,耐10种以上抗生素的多重耐药株有12株(12/112,10.71%)。没有发现同时对磺胺类、喹诺酮类和第3代头孢菌素耐药的菌株(表3)。

表3 112株沙门菌对28种抗生素的耐药率分布(2002年~2003年)^a

%

药物	2002年	2003年	药物	2002年	2003年
亚胺硫霉素	0.00	0.00	头孢拉定	0.00	0.00
优力欣	11.43	19.05	头孢克罗	0.00	0.00
奥格门丁	11.43	14.29	头孢哌酮	4.26	2.38
奈替米星	0.00	0.00	头孢噻肟	0.00	0.00
吡哌酸	21.43	28.57	头孢呋新	0.00	0.00
氟喹酸	5.71	2.38	头孢噻甲羧肟	0.00	0.00
氟哌酸	5.71	4.76	头孢三嗪	0.00	0.00
环丙沙星	5.71 ^b	21.43 ^c	复方新诺明	14.29 ^b	30.95 ^c
妥布霉素	0.00 ^b	16.67 ^c	新霉素	1.43	2.38
庆大霉素	5.71	4.76	链霉素	31.43 ^c	11.90 ^b
丁胺卡那霉素	2.86	0.00	多粘菌素B	2.86	0.00
四环素	41.43	59.52	二甲胺四环素	25.71 ^b	57.14 ^c
强力霉素	41.43	59.52	氨基南	0.00	0.00
氯霉素	31.43 ^c	7.14 ^b	氨基青霉素	20.00	26.19

注:a:2002年70株,2003年42株沙门菌。b~c为升高;c~b为降低,²>3.84,P<0.05。

3 讨论

通过数据比分析初步发现,本地区肉制品中沙门菌分离率为40.20%(82/204),远高于文献报道的数据^[6-8]。由于本地区因沙门菌引发的食源性病例与食品(特别是肉制品)的高分离率并不呈比例,所以我们认为是IMS方法的高敏感性所产生的差异,对部分样品的平板典型菌落的鉴定结果产生有2个、最多3个不同型别菌株的现象也可验证;鉴于IMS可以敏感、客观表现增菌液中的沙门菌情况,并且由于TT所加入增菌的菌量(1ml)比MM的菌量(0.1ml)多,因此在结果统计时发现的阳性数也较多。虽然IMS检测增加了成本,但是灵敏、操作简单,能节省分离平板和提高筛检效率。

本次所分离的112株菌型分布(前10位)与食品污染物监测年度总结的菌型分布有高度一致性。反映出沙门菌属虽然型别多而复杂,但是其在自然界的微生态循环仍是有优势菌型的,因此加强高危食品监控、减少摄入量、监控菌株的耐药性突变等措施是有效的、常规的防制措施^[9]。

对分离菌株的耐药性分析发现,部分菌株除了对氨基青霉素、四环素、氯霉素、链霉素和磺胺类等传统药物耐药外,少数菌已经对目前常用的环丙沙星等三代喹诺酮类和头孢类药物产生耐药,而王茂起报道2000年44株沙门菌食源株中未见耐10种以上的菌株,且未见耐环丙沙星菌株(仅有部分中度敏感)。此结果可通过喹诺酮类药物(吡哌酸)的耐药机制(即累加效应)来解释。据美国全国临床实验标准委员会(NCCLS)对非临床沙门菌耐药监测要求:耐氨基青霉素和磺胺类药物的菌株需加试对任意1种喹诺酮类和三代头孢菌素类抗生素的敏感性,虽然本次监测没有发现同时耐前4种抗生素的沙门菌,耐10种以上的菌株也非优势(10.71%),但

由其导致新的食源性疾病出现的潜在威胁,因此是值得研究的公共卫生问题之一。

参考文献

- [1] 侯为道,张丽,杨梅,等.食源性疾病的流行因素及监测与控制进展[J].预防医学情报杂志,2003,19(2):118-121.
- [2] 冉陆.食源性致病菌及食源性疾病的监测动态[J].中国食品卫生杂志,2001,13(4):42-44.
- [3] Agin J, Allaert C, Asmundson R, et al. Detection of *salmonella* in fresh cheese, poultry products, and dried egg products by the ISO 6579 *salmonella* culture procedure and the AOAC official method: collaborative study[J].J of AOAC Int,2003,86:275-295.
- [4] Cudjoe KS, Krona R. Detection of *Salmonella* from raw food samples using Dynabeads^R anti-*Salmonella* and a conventional reference method[J].Int J of Food Microbiol,1997,37:55-62.
- [5] National Committee of Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing [M]. Approved standard-eighth edition. NCCLS document, M2-A8. Wayne. Pennsylvania: NCCLS, 2003. 1-70.
- [6] 王茂起,王竹天,包大跃,等.中国2000年食品污染状况监测与分析[J].中国食品卫生杂志,2002,14(2):3-8.
- [7] 陈伟伟,林升清,马群飞,等.福建省2000年~2002年食品中沙门菌的监测与分析[J].中国食品卫生杂志,2003,15(5):406-409.
- [8] 李秀桂,蒋震铃,吕素玲,等.广西部分地区食源性致病菌污染状况调查[J].广西预防医学,2003,9(4):222-224.
- [9] 冉陆.食源性致病菌及其耐药性[J].预防医学文献信息,2001,7(5):609-612.

[收稿日期:2005-11-30]

中图分类号:R15;QR378.22 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2006)03-0202-03