

南京地区猪源沙门菌分离鉴定及耐药性检测

耿伟雄^{1,2}, 张颖^{1,2}, 张婷¹, 严昕¹, 韩笑¹, 张萍^{1*}, 晏文梅¹, 张玉红¹

(1. 金陵科技学院动物科学与技术学院, 江苏 南京 210038; 2. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要:为检测南京地区猪源沙门菌的污染状况及耐药性,从南京地区随机采取样品 96 份,PCR 法对猪肉中的沙门菌进行检测,纸片琼脂扩散(K-B)法对分离出的沙门菌分离株进行耐药性检测。结果表明:共检测出阳性菌株 3 份,阳性检测率为 3.1%;所得 3 株阳性菌株均对头孢西丁、头孢曲松、阿米卡星、米诺环素、诺氟沙星 5 种药物敏感。

关键词:沙门菌;分离鉴定;耐药性

中图分类号:S852.61

文献标识码:A

文章编号:1672-755X(2019)03-0089-04

Isolation, Identification and Drug Resistance Detection of Porcine Salmonella from Nanjing Area

GENG Wei-xiong^{1,2}, ZHANG Ying^{1,2}, ZHANG Ting¹, YAN Xin¹, HAN Xiao¹,
ZHANG Ping^{1*}, YAN Wen-mei¹, ZHANG Yu-hong¹

(1. Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China; 2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to detect the contamination and drug resistance of Salmonella in Nanjing, in this experiment, 96 samples were randomly taken in Nanjing area. The positive strains were detected by PCR method, and the drug sensitivity test was carried out by disk Agar diffusion (K-B). The results showed that 3 positive strains were detected, and the positive detection rate was 3.1%. Drug sensitivity analysis showed that the three positive strains were sensitive to cefoxitin, ceftriaxone, amikacin, minocycline and norfloxacin.

Key words: Salmonella; isolation and identification; drug resistance

沙门菌(Salmonella)是一类经粪口途径感染人和动物的革兰氏阴性兼性胞内菌^[1]。作为全球四大人类腹泻病病因之一^[2],沙门菌感染每年可引起约 1.8 亿例腹泻病,人类食用含沙门菌污染的食物后会导致腹痛、腹泻,严重者脱水、出血等^[3]。而被感染的畜禽以及所生产的各种产品是食源性沙门菌传染的重要来源^[4]。在动物养殖、屠宰包装、运输售卖的过程中,容易带动沙门菌的污染及传播。本次实验主要对南京地区的超市、农贸市场和个人摊贩的猪肉生产链中沙门菌进行分离鉴定,并对分离出的菌株进行耐药性检测和分析,为预防沙门菌病的发生提供依据,也为控制沙门菌食物中毒及临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2019 年 3 月—4 月,从南京市的农贸市场、超市和个人摊贩上采集猪肉样本 96 份。

收稿日期:2019-07-11

基金项目:江苏省大学生创新创业训练计划项目(201813573099J)

作者简介:耿伟雄(1995—),男,江苏连云港人,硕士研究生,主要从事动物医学研究。

通信作者:张萍(1979—),女,江苏沛县人,副教授,博士,主要从事新兽药研发。

1.2 细菌分离培养与 PCR 检测

1.2.1 样品处理和增菌培养 将猪肉样本先用灭菌生理盐水清洗,后用镊子夹取猪肉放入均质机中,待猪肉拍打均匀,用移液枪吸取 1.5 mL 均质加入装有 2/3 的缓冲蛋白胨水的试管中(1:10 加入即可),塞上试管塞并做好标记。将上述试管放入 37 ℃ 80 r·min⁻¹ 的摇床中培养 16~18 h(若无混浊,可延长培养时间),从前增菌液中吸取 500 μL 菌液加入装有 2/3 改良 MSR/V 选择性增菌培养基的试管中,置于摇床中 42 ℃ 培养 24 h 进行选择性的增菌培养^[5]。

1.2.2 菌株的分离纯化 用接种环从试管中 MSR/V 培养基的灰白色区域挑取一环,分区划线在 XLT4 平板,做好标记,放入恒温培养箱中 37 ℃ 培养 18~24 h^[6]。18~24 h 后取出,若有特征性菌落(黑色中心周围有透明晕环,表面光滑)出现,则可进行 PCR 鉴定;若出现黑色,但没有菌落则需要继续划线 XLT4 平板纯化培养,直至出现单个典型的小菌落方可进行 PCR 鉴定;若没有黑色出现则放入恒温培养箱中继续培养。

1.2.3 PCR 鉴定 按照 25 μL PCR 扩增反应体系进行加样。阴性对照为 PCR 反应的空白对照(用 ddH₂O 代替模板),阳性对照(鼠伤寒沙门菌)采用含有检测序列的纯菌 DNA 作为 PCR 反应的模板。

1.2.4 PCR 产物检测 用 1×TAE 配置 1.5% 的琼脂糖凝胶,取 PCR 扩增产物、Marker 上样,用凝胶成像分析系统观察结果并保存。

1.3 药敏试验

采用纸片琼脂扩散法(K-B)进行实验。选用青霉素类药物氨苄西林(Ampicillin, Am)、哌拉西林(Piperacillin, PRL)、阿莫西林(Amoxicillin, AML),头孢类药物头孢西丁(Cefoxitin, FOX)、头孢曲松(Ceftriaxone, CTRX)、头孢他啶(Ceftazidime, CAZ)、头孢噻吩(Cefalotin, KF),氨基糖苷类药物庆大霉素(Gentamicin, CN)、链霉素(Streptomycin, S)、阿米卡星(Amikacin, AK),四环素类药物米诺环素(Minocycline, MH),氟喹诺酮类药物环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、诺氟沙星(Norfloxacin, NOR),磺胺类药物磺胺甲噁唑(Sulfamethoxazole, SMZ)、复方新诺明(Compound Sulfamethoxazole, STX),共 15 种药敏纸片。按照美国临床实验室标准委员会(CLSI/NCCLS)2010 年标准进行药敏试验结果判定^[7]。

2 结果与分析

2.1 细菌分离培养与 PCR 鉴定结果分析

在 XLT4 培养基上长出特征为中心黑色、四周有透明晕环、表面光滑的菌落,可视为疑似沙门菌,挑取特征菌落进行 PCR 鉴定。由图 1 和图 2 的 PCR 扩增产物电泳结果可以看出,将南京地区的 96 份猪肉样品中分离培养出的疑似沙门菌进行 PCR 鉴定,结果表明 16 号、8 号和 29 号样品为阳性沙门菌菌株。



M:Marker 1:阴性对照 2:阳性对照 3:7 号样品
4:16 号样品 5:43 号样品 6:11 号样品 7:13 号样品

图 1 农贸市场猪肉样本疑似沙门菌 PCR 产物电泳图



M:Marker 1:阴性对照 2:阳性对照 3:12 号样品
4:8 号样品 5:39 号样品 6:29 号样品 7:21 号样品

图 2 个人摊贩猪肉样本疑似沙门菌 PCR 产物电泳图

由表 1 可知,从南京各主城区采集样品猪肉共 96 份,分离出 3 株沙门菌,阳性检出率为 3.1%。超市、农贸市场和个人摊贩各 32 份,其中从农贸市场所采样品中分离出 1 株沙门菌,阳性检出率为 3.1%;从个人摊贩所采样品中分离出 2 株沙门菌,阳性检出率为 6.2%。

表 1 南京地区猪源沙门菌的污染情况

样品来源	采集样品/份	阳性样品/份	阳性检出率/%
超市	32	0	0
农贸市场	32	1	3.1
个人摊贩	32	2	6.2
合计	96	3	3.1

2.2 药敏试验结果分析

将贴有药敏纸片的平板培养后置于黑底桌面观察,结果如图 3—图 5 所示。

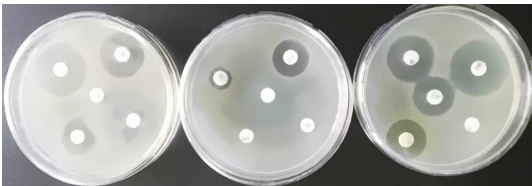


图 3 8 号沙门菌药敏试验结果



图 4 16 号沙门菌药敏试验结果



图 5 29 号沙门菌药敏试验结果

根据药敏试验标准对表 2 进行分析判断,结果如下:1)本试验所分离出的 3 株沙门菌对不同抗生素有不同的耐药性。8 号沙门菌对头孢西丁、头孢曲松、头孢他啶、阿米卡星、米诺环素、诺氟沙星等 6 种药物敏感,对氨苄西林、阿莫西林、庆大霉素、链霉素、磺胺甲噁唑和复方新诺明 6 种药物耐药。2)分离出的 16 号沙门菌对头孢西丁、头孢曲松、头孢他啶、头孢噻吩、阿米卡星、米诺环素、环丙沙星、诺氟沙星 8 种药物敏感,对氨苄西林、阿莫西林、庆大霉素、链霉素、磺胺甲噁唑和复方新诺明 6 种药物耐药。3)分离出的 29 号沙门菌对哌拉西林、阿莫西林、头孢西丁、头孢曲松、头孢噻吩、庆大霉素、阿米卡星、米诺环素、环丙沙星、诺氟沙星 10 种药物敏感,对磺胺甲噁唑和复方新诺明 2 种药物耐药。

表 2 不同沙门菌的耐药性

抗生素类型	药物	16 号沙门菌的 耐药性	29 号沙门菌 的耐药性	8 号沙门菌 的耐药性
青霉素类	氨苄西林	R	I	R
	哌拉西林	I	S	I
β-内酰胺类	阿莫西林	R	S	R
头孢类	头孢西丁	S	S	S
	头孢曲松	S	S	S
	头孢他啶	S	I	S
	头孢噻吩	S	S	I
氨基糖苷类	庆大霉素	R	S	R
	链霉素	R	I	R
	阿米卡星	S	S	S

续表 2

抗生素	药物	16 号沙门菌的 耐药性	29 号沙门菌 的耐药性	8 号沙门菌 的耐药性
四环素类	米诺环素	S	S	S
氟喹诺酮类	环丙沙星	S	S	I
	诺氟沙星	S	S	S
磺胺类	磺胺甲噁唑	R	R	R
	复方新诺明	R	R	R

注:R 表示耐药,I 表示中介,S 表示敏感。

3 结 语

本次试验是对南京地区猪源沙门菌的分离鉴定及耐药性检测,从南京市 8 个区(江宁、秦淮、雨花台、玄武、鼓楼、栖霞、浦口、建邺)的农贸市场、超市和个人摊贩随机采集猪肉样本,采集总样本量 96 份,对其进行增菌培养和分离鉴定,最终分离鉴定沙门菌阳性菌株 3 株(3.1%)。根据不同来源随机抽取样本,超市样品量 32 份,鉴定分离 0 株;农贸市场样品量 32 份,鉴定分离 1 株(3.1%);个人摊贩 32 份,鉴定分离 2 株(6.2%)。刘永成等^[8]对西宁市农贸市场鲜猪肉沙门菌污染调查,其检出率为 16.22%;郝心等^[9]对泰安地区冷鲜猪肉中沙门菌污染情况调查,其检出率为 13.3%。这两地的沙门菌的检出率均高于南京地区猪肉沙门菌的检出率,可以看出南京地区对猪肉沙门菌的检验检疫工作还是有保障的及时跟进,但对于检出率高的样本采集地需加强沙门菌的危害宣传工作并做好相关的预防措施,以从源头上杜绝沙门菌对人体产生危害。

选用 15 种药敏纸片,对分离出的 3 株沙门菌进行药敏试验。结果表明,对氨苄西林、阿莫西林、庆大霉素、链霉素的耐药率均为 66.7%,对磺胺甲噁唑和复方新诺明的耐药率为 100%。对米诺环素、头孢曲松、头孢西丁、诺氟沙星、阿米卡星等 5 种抗生素均敏感。方忠意等^[10]对河南省猪源沙门菌进行分离鉴定及药物敏感性分析,将分离到的菌株进行奥格门丁等 16 种抗生素药物敏感性试验,发现分离的 45 株沙门菌对四环素、磺胺异恶唑、大观霉素、氨苄西林耐药比较严重,耐药率分别为 82.22%、75.56%、73.33%、73.33%,因此在临床用药中尽量避免选择这几类抗生素。侯小刚^[11]在猪肉生产链中研究沙门菌的耐药性,发现分离的沙门菌对四环素耐药率最高(89.29%),对头孢噻吩不耐药。因此,在临床用药中应避免选择耐药率高的抗生素,注意轮换用药,从而降低耐药沙门菌产生的可能性。

参考文献:

- [1] 焦新安. 沙门菌病[M]. 北京:中国农业出版社,2015:14-15
- [2] 罗薇,黄翠颖,王洋,等. 某规模化种鸡场沙门菌流行病学调查和耐药性分析[J]. 中国家禽,2019,41(2):49-52
- [3] 加春生,毛泽明,王晓楠,等. 猪沙门菌的分离鉴定及其耐药性分析[J]. 东北农业大学学报,2014,45(8):49-54
- [4] 刘秀梵. 我国动物疫病和动物性食品安全控制的几个关键问题[J]. 中国农业科技导报,2003(4):7-11
- [5] 王军,郑增忍,王晶钰. 动物源性食品中沙门菌的风险评估[J]. 中国动物检疫,2007(4):23-25
- [6] 魏静萍. 猪沙门菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 养殖与饲料,2015(2):16-19
- [7] 贾爱卿. 猪沙门菌的临床分离鉴定及耐药性消除研究[D]. 武汉:华中农业大学,2006
- [8] 刘永成,王晓玲,李承钰,等. 西宁市农贸市场鲜猪肉沙门菌污染调查[J]. 青海畜牧兽医杂志,1992(1):29-30
- [9] 郝心,陈正涛,王方昆,等. 泰安地区冷鲜猪肉中沙门菌污染情况调查[J]. 山东畜牧兽医,2015,36(9):60-62
- [10] 方忠意,李金磊,董鹏,等. 河南省猪源沙门菌分离鉴定、血清分型及药物敏感性分析[J]. 中国动物检疫,2019,36(4):74-78
- [11] 侯小刚. 四川主要肉品生产链中沙门菌的分离鉴定、耐药性分析及 PFGE 分型[D]. 雅安:四川农业大学,2012

(责任编辑:谭彩霞)