

四川部分地区鸭蛋沙门氏菌的分离鉴定及药敏实验

刘少文,郭春华,马晓龙,柏雪*,张正帆,李文娟
(西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041)

摘要:为了解四川部分地区不同饲养方式的鸭蛋沙门氏菌(*Salmonella spp.*)污染与耐药情况,本实验采集了集约化养殖(50枚)和农户散养(50枚)的100枚鸭蛋,采用国家标准GB 4789.4-2010对其蛋壳及内容物进行沙门氏菌检测,同时进行血清型鉴定和药物敏感实验。结果发现散养鸭蛋的蛋壳和内容物沙门氏菌污染率分别为28%和30%;集约化养殖的蛋壳污染率为24%,蛋内容物无污染。血清凝集实验共检测出8种血清型,流行菌株为鼠伤寒沙门氏菌(34.1%),其次为肠炎沙门氏菌(22%)和鸭源沙门氏菌(14.6%),其余菌株检出率较低。分离得到的41株沙门氏菌对青霉素(100%)、氨苄西林(87.80%)、阿莫西林(75.61%)、四环素(73.17%)耐药率较高,对链霉素呈现中等敏感,对其余抗生素表现不同程度的耐药。研究结果表明四川地区鸭蛋沙门氏菌污染情况和耐药性已较为严重,应加强沙门氏菌流行病学监测和抗生素的使用监管。

关键词:鸭蛋,沙门氏菌,分离,鉴定,耐药性

Isolation, identification and drug susceptibility experiment of *Salmonella* from duck eggs in some parts of Sichuan

LIU Shao-wen, GUO Chun-hua, MA Xiao-long, BAI Xue*, ZHANG Zheng-fan, LI Wen-juan

(College of life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: In order to understand the *Salmonella spp.* contamination and drug resistance from duck eggs with different rearing methods in some parts of Sichuan, the experiment detected *Salmonella* in eggshell and its contents with the national standard GB 4789.4-2010 detection method after collecting 100 duck eggs from intensive farms (50) and farmers backyard (50), while doing serotype identification and drug susceptibility testing. The results showed that the contamination rates of free-range egg shell were 28% and contents were 30%. Meanwhile, the contamination rates of intensive farming eggshell were 24% and with no *Salmonella* in the contents of intensive farming egg. Serum agglutination test detected out of 8 serotypes, *S. typhimurium* (34.1%) was most prevalent. Besides, *S. enteritidis* (22%) and *S. anatum* (14.6%) were higher than other strains. The 41 isolated *Salmonella* had high drug resistance to Penicillin (100%), Ampicillin (87.80%), Amoxicillin (75.61%), Tetracycline (73.17%), showed moderate sensitivity to streptomycin and suggested that the *Salmonella* had different degrees of resistance to the rest of the antibiotics. These findings indicated that the *Salmonella* from duck eggs contamination and drug resistance had become more serious in Sichuan region, therefore, the epidemiological surveillance of salmonella should be strengthened and the use of antibiotics should be regulated, too.

Key words: duck eggs; *Salmonella*; isolation; identification; drug resistance

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)06-0072-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.06.007

沙门氏菌(*Salmonella spp.*)是肠杆菌科中的一个属,属革兰氏阴性菌,生化特性与抗原结构相似,广泛存在于自然界中^[1]。沙门氏菌是主要的食源性致病菌之一,对人和动物危害极大。可导致鸭传染

性浆膜炎、鸭病毒性肝炎、卵巢炎、仔猪副伤寒、羊流产等多种动物疾病,人一旦摄入含大量沙门氏菌的动物源性食品后会引发肠胃炎、腹泻等^[2-3]。全世界因沙门氏菌造成的食物中毒和食源性疾病案例居高不

收稿日期: 2014-06-23

作者简介: 刘少文(1990-),男,硕士研究生,研究方向:动物营养与饲料科学。

* 通讯作者: 柏雪(1985-),女,在读博士,实验师,主要从事动物营养研究。

基金项目: 西南民族大学研究生创新型科研项目(CX2014SZ79)。

下。同时,畜牧业长期以来大剂量不合理使用抗生素,也使沙门氏菌的耐药性日趋增强。研究表明,各国相关部门纷纷对食源性致病菌的耐药性进行了监测,该菌的多重耐药率已从上世纪90年代的20%~30%增加到了本世纪初的70%^[4]。目前国内有关鸡蛋沙门氏菌的检测较多,而鸭蛋沙门氏菌检测较少。因此,本实验对来自四川部分地区集约化养殖和农户散养的共100枚鸭蛋蛋壳及内容物进行沙门氏菌检测与鉴定,同时进行药物敏感实验。旨在了解2014年四川地区鸭蛋沙门氏菌的污染情况和耐药情况,为该地区食品安全和沙门氏菌的耐药性安全评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸭蛋 2014年3月至2014年5月,从四川省成都市等10个地区随机采集来自集约化养殖(50枚)和农户散养(50枚)的100枚鸭蛋,采集的每枚样品蛋分别放入无菌食品塑料袋内,4h内送回西南民族大学生命科学与技术学院动物营养实验室,立即检测蛋壳表面和内容物沙门氏菌污染情况;缓冲蛋白胨水(BPW)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)、亚硫酸铋琼脂(BS)、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂、三糖铁琼脂(TSD)、杆菌科生化鉴定培养基、肠杆菌科细菌生化鉴定管 均由杭州微生物试剂有限公司生产;沙门氏菌属诊断血清 由宁波天润生物药业有限公司生产;药敏试纸片(青霉素类:青霉素、阿莫西林、氨苄西林,氨基糖苷类:庆大霉素、卡那霉素、链霉素,喹诺酮类:洛美沙星、诺氟沙星、环丙氟哌酸,四环素类:四环素。) 均由杭州微生物试剂有限公司生产。

SYQ-DSX-280B手提式不锈钢压力蒸汽灭菌锅

由上海申安医疗器械厂生产;THZ-98C恒温振荡培养箱 由上海科学仪器有限公司生产;SW-CJ-2FD洁净工作台 由苏净集团苏州安泰空气技术有限公司生产。

1.2 检测方法

参照国家标准GB 4789.4-2010《食品微生物学检验沙门氏菌检验》方法对100枚鸭蛋的蛋壳及内容物进行生化检测。药敏实验参照WHO推荐的K-B琼脂纸片扩散法,药敏结果按NCCLS标准作出判断。

1.3 数据统计与分析

实验数据采用SPSS18.0软件进行卡方检验。 $p < 0.05$ 为差异显著, $p < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 鸭蛋沙门氏菌污染情况

表1 鸭蛋沙门氏菌污染情况

Table 1 The duck eggs, contamination of *Salmonella*

养殖方式	数量(枚)	部位	阳性蛋(枚)	检出率(%)	p值
集约化养	50	蛋壳	12	24	0.001
		内容物	0	0	
农户散养	50	蛋壳	14	28	1
		内容物	15	30	

不同检测部位的鸭蛋沙门氏菌检出结果见表1,由表1可知,来自集约化养殖的鸭蛋内容物未检出沙门氏菌,蛋壳检出率为24%;来自农户散养的鸭蛋蛋壳及内容物检出率均高于集约化养殖的鸭蛋,分别为28%和30%,且二者无显著差异($p=1.00$)。

赵磊等^[5]检测发现北京市售集约化鸡蛋的蛋壳表面沙门氏菌平均污染率为15%,内容物为3.3%。本实验研究结果与其一致。这可能是因为禽蛋从泄殖腔产出,被粪便污染,沙门氏菌可能主要寄生在蛋壳表面,故使得禽蛋表面带菌率较高。但同时本研究发现来自农户散养型鸭蛋蛋壳与内容物沙门氏菌污染率均较高。游洋等^[6]对某地区来自农贸市场和超市的市售鲜鸭蛋进行沙门氏菌检测,结果显示在该地区抽样的15批次鲜鸭蛋中,内容物未检测出沙门氏菌,蛋壳污染率为13.3%。本研究结果与其相比,差异较大。分析原因可能是市售鲜鸭蛋经过某些消毒处理,而本研究采集的散养型鸭蛋全部来自农户,样品采集时发现农户储存的鸭蛋大多表面不清洁,污渍较多,部分鸭蛋可能储存时间较长,加之未经过任何消毒处理。因此,这类鸭蛋极易受沙门氏菌的污染,且污染率较高。赵瑞宏等^[7]对皖南山区散养土鸡蛋蛋壳及内容物进行了沙门氏菌检测,结果表明蛋壳检出率为27.5%,内容物蛋黄检出率2.5%,蛋清为5.0%。鸡蛋内容物沙门氏菌污染率较低可能是因为鸡蛋蛋清中的溶菌酶含量较多,具有较好的杀菌作用^[8]。而本实验中造成散养型鸭蛋内容物沙门氏菌污染率较高的可能原因除散养型鸭蛋未经任何消毒处理,沙门氏菌可通过气孔进入内容物外,还可能由于鸭蛋内容物含溶菌酶较鸡蛋少或鸭蛋储存时间较长而使溶菌酶含量下降所致^[9]。因此,禽蛋在销售和食用前应保持蛋壳表面清洁,作合理的消毒处理,同时注意保质期。

2.2 不同饲养方式对鸭蛋沙门氏菌污染的影响

蛋壳或内容物任一部位检出沙门氏菌均视为阳性样品。不同饲养方式对鸭蛋沙门氏菌污染的影响见表2。由表2可知,集约化养殖与农户散养的鸭蛋沙门氏菌检出率分别为24%和48%,农户散养检出率显著高于集约化养殖($p=0.021$)。

表2 不同饲养方式的鸭蛋沙门氏菌污染情况

Table 2 The duck eggs, contamination of *Salmonella* with different rearing methods

养殖方式	数量(枚)	阳性蛋(枚)	检出率(%)	p值
集约化养殖	50	12	24	0.021
农户散养	50	24	48	

尹晓楠等^[10]对北京地区散养鸡蛋进行沙门氏菌检测,结果表明该地区散养鸡蛋污染率为40%。陈飞等^[11]对江苏省不同地区的集约化鸡蛋进行沙门氏菌检测,结果显示该地区鸡蛋沙门氏菌污染率为18.24%。以上研究表明农户散养型禽蛋更易受到沙门氏菌侵染。除上述可能原因外,还可能与禽蛋保存条件较差、散养母鸭产蛋环境不清洁易于沙门氏菌

的滋生,从而导致垂直传播等因素有关^[2]。本研究采集的集约化鸭蛋均来自农贸市场和超市,部分农贸市场环境潮湿,货物流通量较大,鸭蛋在销售过程中不可避免地感染沙门氏菌。此外,集约化鸭蛋蛋壳表面可能经过某些消毒处理,但大多数鸭蛋仍然不清洁,表面污垢清晰可见。故这类鸭蛋内容物受到沙门氏菌的污染可能性较大。因此,在饲养家禽时,应该保证饲养环境以及孵化、产蛋环境的干净清洁,定期消毒。除此之外,洁净、通风和有序的销售市场也至关重要。

2.3 血清型鉴定

100枚鸭蛋蛋壳及内容物共检测出41株沙门氏菌,8种血清型,流行菌株为鼠伤寒沙门氏菌,占分离菌株总数的34.1%。此外,肠炎沙门氏菌、鸭沙门氏菌比例较高,分别为22.0%和14.6%。其余结果见表3。

表3 100枚鸭蛋蛋壳及内容物沙门氏菌血清型鉴定结果
Table 3 The results of identification of the *Salmonella* serotype from 100 duck eggshells and its contents

沙门氏菌血清型	菌株数量	血清型比例 (%)
鼠伤寒沙门氏菌 (<i>S.typhimurium</i>)	14	34.1
肠炎沙门氏菌 (<i>S.enteritidis</i>)	9	22.0
甲型副伤寒沙门氏菌 (<i>S.paratyphi A</i>)	3	7.3
伤寒沙门氏菌 (<i>S.typhi</i>)	3	7.3
雷丁沙门氏菌 (<i>S.reading</i>)	2	4.9
沙门氏菌IV (<i>S.IV</i>)	1	2.4
鸭沙门氏菌 (<i>S.anatum</i>)	6	14.6
白痢沙门氏菌 (<i>S.pullorum</i>)	3	7.3
总计	41	100.0

鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鸭沙门氏菌、白痢沙门氏菌 (*Salmonella Pullorum*) 等具有广泛的宿主性,能够引起人畜共患,是鸭沙门氏菌病的主要病原菌。余晓龙等^[3]在2012年对四川省7个地区规模化鸭场中疑似沙门氏菌病的患病鸭中展开了血清型调查,结果共分离出6种血清型,流行菌株为鼠伤寒沙门氏菌,占分离菌株的37.5%,肠炎沙门氏菌占

14.6%,本研究结果与其一致。而程平等^[4]在2013年对四川、重庆地区部分鸭场的死胚、弱雏进行沙门氏菌检测,结果发现鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌检出率较低,均不超过3%,本研究的其他血清型未检出。这说明时间、地点、实验材料等因素可能对沙门氏菌血清型影响较大。但值得注意的是雷丁沙门氏菌很少在禽蛋中检测出来,而本研究在集约化鸭蛋中检测出该菌属,说明目前畜牧业养殖环境与以前相比有所改变,可能有利于一些不常见的血清型生长。这提示沙门氏菌的流行病学发生了变化,应加强跟踪监管。

2.4 耐药性

采用肉汤微量稀释法对上述检出的沙门氏菌进行抗生素药敏实验,结果见表4。由表4可知,41株鸭源性沙门氏菌对青霉素、氨苄西林、阿莫西林、四环素耐药率较高,分别为100%、87.80%、75.61%、73.17%;链霉素的中等敏感率较高,为75.61%。对其余抗生素的耐药率在10%以下。

周佳等^[5]对四川省动物性食品源沙门氏菌的耐药性监测与分析中显示,分离到的沙门氏菌对青霉素类、氨苄西林 (60.53%) 和阿莫西林 (56.58%) 耐药率较高,本研究结果与其相比,耐药率相对偏高。赵爱华等^[6]在2010~2011年江苏泰州周边地区分离的肠炎沙门氏菌对氨苄西林和四环素的耐药率分别为74.2%和64.5%。但与廖成水等^[7]报道的61.22%和19.39%相比差异较大。除上述几种抗生素外,本研究中分离到的沙门氏菌对其余抗生素也表现不同程度耐药性。沙门氏菌耐药性增加可能与细菌耐药性存在地区差异、抗菌药物广泛使用、菌体本身因素(产生耐药质粒或突变)等因素有关。

3 结论

本研究对四川地区动物源性沙门氏菌的污染情况和血清型作了较为系统的调查,并对沙门氏菌耐药性进行了抗生素敏感性实验。结果发现该地区集约化养殖的鸭蛋内容物未检测出沙门氏菌,蛋壳污染率显著 ($p=0.01$) 高于内容物;农户散养型鸭蛋蛋壳与内容物沙门氏菌污染率均较高,且二者无显著差异。同时,农户散养型鸭蛋沙门氏菌污染率明显

表4 鸭源性沙门氏菌耐药性实验结果

Table 4 The results of drug resistance of the *Salmonella* from duck eggs

抗生素	药物含量($\mu\text{g}/\text{片}$)	耐药菌株数	耐药率 (%)	中等敏感菌株数	中等敏感率 (%)	敏感菌株数	敏感率 (%)
青霉素	10	41	100.00	0	0.00	0	0.00
氨苄西林	10	36	87.80	4	9.76	1	2.44
阿莫西林	10	31	75.61	10	24.39	0	0.00
庆大霉素	10	2	4.88	8	19.51	31	75.61
卡那霉素	30	3	7.32	8	19.51	30	73.17
链霉素	10	4	9.76	31	75.61	6	14.63
诺氟沙星	10	1	2.44	7	17.07	33	80.49
洛美沙星	10	3	7.32	8	19.51	30	73.17
环丙氟哌酸	5	0	0.00	11	26.83	30	73.17
四环素	30	30	73.17	8	19.51	3	7.32

(下转第85页)

- [3] 张彩芳,李翠翠,岳燕霞. 姜黄色素提取及其性质研究[J]. 中国调味品, 2013, 38(11): 89-94.
- [4] 王文凤,袁兵兵,徐玲. 红曲的研究现状[J]. 发酵科技, 2014, 43(1): 39-50.
- [5] 王金宇,董文宾,杨春红,等. 红曲色素的研究及应用新进展[J]. 食品科技, 2010, 35(1): 245-248.
- [6] 李慧琴,曾永青. 天然色素在面制品中的应用及推广[C]. “科技创新与食品产业可持续发展”学术研讨会暨2008年广东省食品学会年会论文集, 2008: 80-82.
- [7] 赵燕,温辉梁,胡晓波. 红曲色素及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2004(4): 28-30.
- [8] 张皓雪,吴俐勤,徐杰,等. 分离制备红曲单一色素标准品[J]. 化学试剂, 2013, 35(4): 359-363.
- [9] Izawa S, Harada N, Watanabe T, et al. Inhibitory effects of food-coloring agents derived from monascus on the mutagenicity of heterocyclic amines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 3980-3984.
- [10] Sang-aaron W, Saekow S, Amornkitbamrung V. Density functional theory study on the electronic structure of monascus dyes as photosensitizer for dye-sensitized solar cells[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2012, 236: 35-40.
- [11] Huang Z B, Xu Y, Li L S, et al. Two new monascus metabolites with strong blue fluorescence isolated from red yeast rice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56: 112-118.
- [12] 李秀娟,钟敏. 菠萝蜜种子淀粉颗粒性质的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(6): 69-74.
- [13] Mapari S, Meyer A S, Thrane U. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(14): 6253-6261.
- [14] Sheu F, Wang C L, Shyu Y T. Fermentation of monascus purpureus on bacterial cellulose-nata and the color stability of monascus-nata complex[J]. Journal of Food Science, 2000, 65(2): 342-345.
- [15] Jung H, Choe D, Nam K Y, et al. Degradation patterns and stability predictions of the original reds and amino acid derivatives of monascus pigments[J]. European Food Research and Technology, 2011, 232(4): 621-629.
- [16] 王昌禄,王莹,陈勉华,等. 红曲色素不同成分的光稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(10): 189-192.
- [17] 夏光辉,朱旭. 红薯玉米面包的研制[J]. 通化师范学院学报:自然科学版, 2014, 35(1): 15-16.
- [18] 赵建春,史秀丽,张鹏,等. 持续烘烤对面包硬化过程的影响研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 56-59.
- [19] 朱运平,袁佐云,吕跃刚. 油炸时间及温度对方便面水分及含油量的影响[J]. 北京工商大学学报:自然科学版, 2011, 29(1): 15-17.
- [20] 刁恩杰,李向阳,丁晓雯. 油炸温度-时间对鸡肉中丙烯酰胺含量的影响[J]. 肉类研究, 2009(6): 42-45.

(上接第74页)

高于集约化鸭蛋。本研究共分离出8种沙门氏菌血清型,流行菌株为鼠伤寒沙门氏菌,其次为肠炎沙门氏菌、鸭沙门氏菌。分离得到的沙门氏菌对一些抗生素如青霉素类、四环素类等耐药性较严重,对其余抗生素存在不同程度的耐药性。

参考文献

- [1] 龙冬梅,卓菲,黎剑华,等. 2012年深圳市罗湖区沙门菌菌型分布及耐药情况分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(2): 285-291.
- [2] 钟传德,程安春,汪铭书,等. 规模化鸭场鸭源致病性沙门氏菌的耐药敏感性检测及耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(1): 35-37.
- [3] 丁孟建,高继业,唐好,等. 肉鸡源肠炎沙门氏菌的分离与鉴定及生物学特性观察[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(5): 203-205.
- [4] 任学兵,汤德,杨泽平,等. 猪沙门氏菌耐药性的研究进展[J]. 猪业科学, 2009, 26(12): 36-39.
- [5] 赵磊,罗红霞,黄彦芳,等. 市售鸡蛋三种主要致病微生物的检测与分析[J]. 现代食品科技, 2010, 26(2): 200-202.
- [6] 游洋,彭义,刘力,等. 市售鲜鸭蛋细菌污染的调查[J]. 畜禽业, 2013(4): 60-61.
- [7] 赵瑞宏,詹凯曲,鲁江,等. 散养土鸡蛋内外沙门氏菌和大肠杆菌的检测[J]. 中国动物检疫, 2008, 25(7): 41.
- [8] 王金玉,平福增,黄志荣,等. 鸡蛋中溶菌酶含量变化及与其他性状关系的研究[J]. 江苏农业学报, 1983, 4(2): 35-40.
- [9] 韩冷,韩妙君,冯婷,等. 不同来源溶菌酶的性质比较[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(3): 73-75.
- [10] 尹晓楠,陈晶,田祥宇,等. 北京郊区散养鸡及鸡蛋沙门氏菌带菌情况调查[J]. 中国动物检疫, 2013(10): 61-65.
- [11] 陈飞,成大荣,田志高,等. 鸡蛋中沙门氏菌的快速检测[J]. 江苏农业科学, 2009(5): 284-285.
- [12] 刘素英. 鸡伤寒沙门氏菌的分离鉴定及药物敏感性实验[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2011: 41.
- [13] 余晓龙. 四川地区鸭源沙门氏菌分离与血清型分析及其药敏性与耐药基因相关性研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2012: 112.
- [14] 程平. 四川、重庆地区鸭源沙门氏菌分离鉴定及耐药性研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2013: 62.
- [15] 周佳,刘书亮,侯小刚,等. 四川省动物性食品源沙门氏菌的耐药性监测与分析[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(3): 188-191.
- [16] 赵爱华,还红华. 鸡肠炎沙门氏菌的分离和药物敏感性分析[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(6): 207-209.
- [17] 廖成水,程朝朝,张春杰,等. 鸡源致病性沙门氏菌新近分离株的耐药性与耐药基因[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(7): 751-755.