

狄文婷,杜雄伟,吴 静,等.猪源沙门氏菌的分离与耐药性分析[J].江苏农业科学,2014,42(10):278-280.

# 猪源沙门氏菌的分离与耐药性分析

狄文婷,杜雄伟,吴 静,于凤娟,魏 怡,苏日娜

(大连民族学院,辽宁大连 116600)

**摘要:**采集辽宁省大连市各大农贸批发市场鲜猪肉 68 份,用选择性培养基 SS 琼脂培养基分离沙门氏菌,通过菌落形态及 PCR 方法对分离菌株进行鉴定,利用肉汤微量稀释法药敏试验检测沙门氏菌对 9 大类 15 种抗生素的耐药性。结果表明:共获得鲜猪肉样品沙门氏菌 12 株,检出率为 17.6%;91.7% 鲜猪肉样品中的沙门氏菌至少耐受 1 种抗菌药,耐药率最高的抗生素为氟苯尼考(75.0%)、盐酸沙拉沙星(66.7%)、硫酸新霉素(66.7%)和盐酸多西环素(66.7%),其次为土霉素(58.3%)、硫酸庆大霉素(58.3%)、乙酰甲喹(58.3%),耐药率较低的有乳酸环丙沙星(50.0%)、恩诺沙星(50.0%)、盐酸环丙沙星(50.0%)、硫氰酸红霉素(41.7%)、阿莫西林(16.7%)、硫酸黏菌素(16.7%);大连市农贸批发市场鲜猪肉的沙门氏菌检出率较高,并且沙门氏菌对各类抗生素表现出了很高的耐药性,这种高耐药性也可能通过食物链传递给人类,应该引起足够重视。

**关键词:**猪肉;沙门氏菌;耐药性;大连

**中图分类号:** R155.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0278-02

沙门氏菌属(*Salmonella*)是革兰氏阴性、无芽孢、无荚膜、周身鞭毛、能运动的需氧或兼性厌氧的短杆菌<sup>[1]</sup>。目前可以确定,除沙门氏菌活菌引起感染型中毒以外,沙门氏菌产生的肠毒素也是导致出现中毒症状的原因。沙门氏菌中毒主要是由动物性食品引起的,其中鱼、乳、蛋也极易引发较严重的食源性疾病<sup>[2]</sup>。然而,随着沙门氏菌被不断研究和鉴定及其在养殖业中引发疾病,在养殖过程中为预防沙门氏菌引起的疾病,随意给家禽、家畜投放抗菌药,导致出现耐药菌和多重耐药现象,其耐药谱也越来越广。因此,通过耐药性试验掌握沙门氏菌的耐药谱,从而指导临床医学用药,对食品安全具有重要意义。由于沙门氏菌及其耐药性能够在整个食物链传递,由食品传递到人,因此检测鲜肉中的沙门氏菌,并且通过药敏试验测定某种抗菌药物对其抑菌浓度十分必要。近年来食源性沙门氏菌的鉴定检测已经在国内外相关领域得到重视和研究,马国柱等<sup>[3-6]</sup>研究过陕西省、河南省的食源性沙门氏菌,其他相关研究未见报道<sup>[7]</sup>。本研究对辽宁省大连市猪源性沙门氏菌进行分离,对 9 类 15 种抗生素进行药敏性分析,旨在为做好大连地区猪源性食品安全工作提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** 2012 年 10 月至 2013 年 9 月采集大连市开发区金玛、金发地等大型农贸市场和超市的新鲜猪肉样品 68 份,分离出可疑菌株 12 株。对照菌株为 *E. coli* ATCC25922。

**1.1.2 抗生素** 氯霉素类:Flo 氟苯尼考(98.4%)。氨基糖

苷类:Neo 硫酸新霉素(696 U/mg),Gen 硫酸庆大霉素(610 U/mg)。青霉素类:Amo 阿莫西林(96.4%)。喹诺酮类:Nia 烟诺氟沙星(99%),Sar 盐酸沙拉沙星(98%),CL 乳酸环丙沙星(98.6%),Enr 恩诺沙星(99.1%),CH 盐酸环丙沙星(98.8%)。大环内酯类:Thi 硫氰酸红霉素(780 U/mg)。磺胺类:Sul 磺胺间甲嘧啶钠(99.2%)。多黏菌素:Col 硫酸黏菌素(19 578 U/mg)。四环素类:Oxy 土霉素(96.1%),Dox 盐酸多西环素(合多西环素 92%)。人工合成的抗菌兽药:Meq 乙酰甲喹(99.1%)。

### 1.2 方法

**1.2.1 采样 准备工作:**准备封口膜若干,用乙醇棉擦拭内部表面,达到杀菌效果;准备营养肉汤和若干试管,将 9 mL 营养肉汤加到试管内,塞好,并在 121 ℃ 条件下高压灭菌 30 min。去市场上采样时注意杂菌污染,每份样品用 1 个封口膜装好,并标号做相应记录。每次采样完成后,打开超净工作台的紫外灯灭菌 30 min,然后将封口膜内的肉样品剪成 2~3 粒黄豆大小的肉粒放到灭菌后的营养肉汤试管里,最后将试管放到摇床里,36 ℃、150 r/min 条件下培养 18~24 h。

**1.2.2 选择性培养和增菌** (1)准备工作:在无菌操作台内进行紫外灭菌 30 min,将 SS 培养基以及培养皿(进行包扎)在 121 ℃ 条件下高压灭菌 30 min;之后在无菌操作台上倾倒培养基并标号;取出摇床上的试管,在无菌操作台上分别对应标号划线接种于 SS 培养基(现购),在(36±1) ℃ 下倒置培养 18~24 h<sup>[8]</sup>;将无菌操作台进行紫外灭菌 30 min,将若干 EP 管、营养肉汤、移液枪头以及牙签包好,在 121 ℃ 条件下高压灭菌 30 min。(2)一次增菌:在超净台内用移液枪加 1 mL 营养肉汤于 EP 管内,取出恒温培养箱内的培养皿,用接种针挑取单菌落接种到 EP 管内;然后用封口膜包好 EP 管,36 ℃、150 r/min 条件下培养 18~24 h。(3)二次增菌:一次增菌 18~24 h 后,在无菌操作台里用移液枪加 1 mL 营养肉汤到新灭过菌的 EP 管,取出摇床里的 EP 管,用接种环接种到新 EP 管里;然后将旧 EP 管用封口膜包好,与 30%~50% 甘油

收稿日期:2013-11-07

基金项目:大学生创新创业训练计划(编号:S2013010);大连民族学院“太阳鸟项目”(编号:tyn13102)。

作者简介:狄文婷(1989—),女,黑龙江齐齐哈尔人,从事食品质量与安全研究。E-mail:942859228@qq.com。

通信作者:杜雄伟,博士,讲师。E-mail:dxw@dlnu.edu.cn。

按照 3 : 1 比例混匀,在 -20 ℃ 条件下保存备用;将新 EP 管用封口膜包好,36 ℃、150 r/min 条件下培养 18 ~ 24 h。

1.2.3 PCR 试验 准备 1 盆冰块。打开水浴锅烧到 100 ℃,将蒸馏水、移液枪头在 121 ℃ 条件下灭菌 30 min,打开无菌操作台紫外灭菌 30 min。取出二次增菌的 EP 管,1 000 r/min 离心 3 min。取出 EP 管,在超净台里倒出上清液,用移液枪吸取 200 μL 无菌水于 EP 管内,清洗 2 次。再加入 200 μL 无菌水。在水浴锅内煮 10 min,然后在冰块里冷却 5 min,最后在 1 万 r/min 条件下离心 5 min。然后按照 PCR 试剂盒的要求按顺序加样,将处理好的样品加好后放入 PCR 仪中,设定程序:94 ℃ 变性 5 min;94 ℃ 变性,退火(不同引物温度不同),72 ℃ 延伸,30 ~ 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,最后 16 ℃ 保存即可<sup>[9]</sup>。PCR 反应完成后进行电泳试验。凝胶板的制作:TAE × 1 2 mL + 琼脂糖 1 g + 蒸馏水 98 mL,加热使琼脂糖完全融化;将液体倒入电泳槽,冷却成型后即可。用 10 μL 样品和 2 μL Buffer 进行电泳试验点样。点样完成后,在  $U = 400\text{ V}$ 、 $I = 95\text{ mA}$ 、 $W = 38$ 、 $T = 1\text{ h}$  的条件下进行试验。电泳完成后在复红染色液中浸泡 30 min,在紫外灯光下观察、照相、记录<sup>[10]</sup>。结果沙门氏菌的条带长度是 286 bp。

1.2.4 药敏试验 将营养肉汤、试管、培养皿、移液枪头在 121 ℃、30 min 条件下灭菌;96 孔板用 75% 乙醇进行杀菌,再在无菌操作台上用紫外线杀菌 30 min<sup>[11]</sup>;所有药品浓度均配制成 5.12 g/L, -20 ℃ 保存于 10 mL EP 管中<sup>[12]</sup>。取 1 mL 药品加入含 9 mL 营养肉汤的试管中,此时药品浓度为 512 mg/L。取 20 μL 菌液和约 20 mL 营养肉汤于培养皿中备用。96 孔板中的所用孔都用移液排枪加 100 μL 营养肉汤,取 100 μL 的 512 mg/L 药品加到 96 孔板第 1 排,搅匀,取第 1 排溶液 100 μL 加到第 2 排,以此类推,使最后所有孔均为 100 μL。最后每孔加入 100 μL 菌液。此时第 1 排药品浓度为 128 mg/L,第 2 排药品浓度为 64 mg/L。以此类推,第 3 ~ 12 排药品浓度分别为 32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5 mg/L。将 96 孔板放在 36 ℃ 恒温箱中培养 12 h,观察结果。

2 结果与分析

2.1 鲜猪肉样品沙门氏菌的分离鉴定结果

由表 1 可知,所采集的鲜猪肉样品中共分离 12 株沙门氏菌,可见大连市开发区农贸市场鲜猪肉的沙门氏菌污染率较高,为 17.6%。

表 1 鲜猪肉样品沙门氏菌的鉴定结果

采样点	采集样品数 (个)	鉴定菌株数 (株)	污染率 (%)
大连市开发区农贸市场 A	11	2	18.2
大连市开发区农贸市场 B	16	3	18.8
大连市开发区农贸市场 C	16	3	18.8
大连市开发区农贸市场 D	25	4	16.0
合计	68	12	17.6

2.2 猪源沙门氏菌的耐药性

由表 2 可知,沙门氏菌对各种抗生素的耐药率为 0 ~ 75%。其中对氟苯尼考、硫酸新霉素、盐酸沙拉沙星、盐酸多西环素的耐药率较高,分别为 75.0%、66.7%、66.7%、66.7%;对其他抗菌药物的耐药率大小依次是:土霉素、硫酸

庆大霉素、乙酰甲喹(58.3%) > 乳酸环丙沙星、恩诺沙星、盐酸环丙沙星(50.0%) > 硫氰酸红霉素(41.7%) > 阿莫西林、硫酸黏菌素(16.7%);对烟酸诺氟沙星、磺胺间甲嘧啶钠的耐药率均为 0,这些药物对沙门氏菌有极强的抗菌作用。

表 2 猪源沙门氏菌的耐药率

药品名称	分离菌株数(株)	耐药菌株数(株)	耐药率(%)
氟苯尼考	12	9	75.0
硫酸新霉素	12	8	66.7
阿莫西林	12	2	16.7
烟酸诺氟沙星	12	0	0.0
硫氰酸红霉素	12	5	41.7
磺胺间甲嘧啶钠	12	0	0.0
盐酸沙拉沙星	12	8	66.7
乳酸环丙沙星	12	6	50.0
硫酸黏菌素	12	2	16.7
土霉素	12	7	58.3
恩诺沙星	12	6	50.0
硫酸庆大霉素	12	7	58.3
盐酸多西环素	12	8	66.7
盐酸环丙沙星	12	6	50.0
乙酰甲喹	12	7	58.3

2.3 猪源沙门氏菌的多重耐药谱

本研究分离的 91.7% 沙门氏菌至少可以耐受 1 种抗菌药物,有的菌株可以耐受 9 种甚至 10 种抗菌药物,表现了很高的耐药性。由表 3 可知,12 株沙门氏菌中,有 11 株具有耐药性,其中 9 株菌至少耐受 4 种抗生素,7 株菌至少耐受 5 种抗生素,个别菌株可耐受 7 种抗生素。由表 3 还可知,有 4 株菌分别来自 2 个相同样品,但其耐药谱型却相差甚远。出现这种现象的原因有很多,例如试验误差导致 2 株来自同一样品的菌株耐药谱不同,这种误差包括增菌误差和接种时菌含量误差等;此外,这 2 株来自同一样品的菌可能本身就不是同一个血清型,导致其耐药结果不同,它们是否为同一株菌还需要进一步验证。多重耐药菌的出现已经成为普遍现象,应该引起足够重视,以降低沙门氏菌感染人的风险。

表 3 沙门氏菌的多重耐药谱

多重 耐药型	多重耐药谱	菌株数 (株)	菌株标号	样品标号
7 耐	Flo/Neo/Thi/Oxy/Enr/Gen/Dox	1	5	36
	Flo/Neo/Thi/Sar/Oxy/Gen/Dox	1	6	37
6 耐	Flo/Thi/Sar/Col/Oxy/Gen	1	9	39
5 耐	Flo/Neo/Sar/Dox/Meq	1	2	32
	Flo/Thi/Sar/Oxy/Gen	1	7	38
	Flo/Neo/Amo/Sar/Gen	1	10	41
	Flo/Sar/Col/Oxy/Gen	1	11	41
4 耐	Flo/Sar/Oxy/Meq	1	3	33
	Thi/Sar/Oxy/Dox	1	4	34
3 耐	Neo/Thi/Sar	1	1	31
	Enr/Gen/Dox	1	12	42
0 耐		1	8	38

3 结论与讨论

本研究共获得鲜猪肉样品 68 份,分离 12 株沙门氏菌,分

王多娇,周 玮,颜春荣,等. 快速 SPE-UPLC-MS/MS 同时测定茶叶中的 5 种农药残留[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):280-282.

# 快速 SPE-UPLC-MS/MS 同时测定 茶叶中的 5 种农药残留

王多娇<sup>1</sup>, 周 玮<sup>2</sup>, 颜春荣, 徐春祥<sup>1</sup>

(1. 江苏省食品药品监督检验研究院, 江苏南京 210008; 2. 江苏省产品质量监督检验研究院食品检测中心, 江苏南京 210006)

**摘要:**建立了同时快速分析茶叶中 5 种农药残留的方法。茶叶经粉碎后,乙腈提取,低温离心后,取乙腈层过 Cleanert NANO CARB 净化柱,采用超高压液相色谱-串联质谱法分离、测定。结果表明灭多威、多菌灵、噻虫嗪、吡虫啉在 2~50  $\mu\text{g/L}$ 、杀螟丹在 10~200  $\mu\text{g/L}$  范围内呈良好的线性关系,不同浓度(1、2、5、10 倍定量限浓度)回收率为 82.9%~106.0%,相对标准偏差( $n=5$ )小于 15%,灭多威、多菌灵、噻虫嗪、吡虫啉和杀螟丹的定量限分别为 3.0、1.0、5.0、5.0、20.0  $\mu\text{g/kg}$ 。本方法简便、快速、重现性好,适用于茶叶中多种农药残留的测定。

**关键词:**茶叶;农药残留;Cleanert NANO CARB 固相萃取柱;超高压液相色谱-串联质谱;前处理

**中图分类号:** TS207.5<sup>+</sup>3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0280-03

茶叶是我国的传统饮料,但是农药残留问题影响了人们对茶叶的消费信心,甚至阻碍了茶叶出口贸易,研究茶叶中农药残留检测方法对于茶叶质量安全具有重要意义。目前,茶

叶中农药残留的分析检测方法主要有气相色谱法<sup>[1]</sup>、气相色谱-质谱联用法<sup>[2-5]</sup>、液相色谱-质谱联用法<sup>[6-9]</sup>,气相色谱-质谱联用法仅在应用于有机氯的分析时相对于液相色谱-质谱联用法有一定的优势<sup>[10]</sup>,且气相色谱法分析周期较长,而液相色谱-串联质谱法具有灵敏度高、特异性强、适于高通量检测的特点。样品的前处理方法主要有基质固相分散法<sup>[2,9]</sup>、凝胶色谱净化<sup>[3]</sup>、有机溶剂提取或采用有机溶剂提取后经固相萃取小柱净化<sup>[1,4,7]</sup>等。凝胶色谱净化法主要用于去除大分子量的物质如油脂、蛋白等,前处理时间较长、溶剂消耗量大,在茶叶的农残分析中应用不多;固相萃取法

收稿日期:2014-06-11

基金项目:江苏省质量技术监督局资助项目(编号:KJ112505)。

作者简介:王多娇(1985—),女,江苏丰县人,硕士,助理工程师,主要从事食品安全检测。E-mail: dodocpu@163.com。

通信作者:颜春荣,硕士,工程师,主要从事食品安全检测技术研究。E-mail: chryan2@hotmail.com。

离率为 17.6%。在大连市开发区农副产品批发市场,沙门氏菌表现出了很高的污染率,其他时间在其他农贸市场采集的样品未出现被沙门氏菌污染情况。沙门氏菌是引发食源性疾病最常见的致病菌之一,本研究结果表明,应对市场流通的鲜肉产品引起高度重视。本研究中分离样品污染沙门氏菌的主要原因有 2 个:其一,农贸市场环境为沙门氏菌的生长创造了良好条件,未经消毒而使用的工具污染鲜肉;其二,生猪在宰杀前已经感染沙门氏菌。从 68 份市场猪肉中分离 12 株沙门氏菌,可见市场猪肉污染十分严重,应该加强猪肉屠宰、运输、加工、贮存及销售等环节的管理,防止病原菌污染。

猪源沙门氏菌显示了很高的耐药性,至少可以耐受 1 种抗菌药物,有的甚至可以耐受 6~7 种抗菌药物,虽然耐药率较低,但是沙门氏菌的多重耐药已经成为普遍现象。沙门氏菌的高耐药性不止表现在食品、畜禽上,还会通过食物链传递到人类,使人产生对抗生素的耐药性,从而加大对食源性疾病的治疗难度,因此应加强对食品和药品的监测。

## 参考文献:

- [1] Yang B W, Qu D, Zhang X L, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella serovars* in retail meats of marketplace in Shaanxi, China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 141 (1/2): 63-72.

- [2] 张 华. 动物性产品中沙门氏菌的危害及控制措施[J]. 中国动物保健, 2004(6): 8-10.
- [3] 马国柱, 王安礼, 刘长宏, 等. 2002 年陕西省食品中食源性致病菌监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(6): 489-491.
- [4] 张 芳, 马国柱, 潘 立, 等. 陕西省 2002—2006 年食源性致病菌污染状况[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(2): 222-224.
- [5] 张秀丽, 廖兴广, 郝宗宇, 等. 2006—2007 年河南省生肉食品中沙门氏菌的主动监测及其 DNA 指纹图谱库的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(7): 1545-1548.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 刘华伟, 马立农, 郭蔼光, 等. 畜禽及环境中沙门氏菌的 PCR 快速检测与控制[J]. 家畜生态学报, 2005, 26(2): 59-62.
- [9] 刘 渠, 刘衡川, 李灶平, 等. 食品中沙门氏菌的耐药性研究[J]. 现代预防医学, 2004, 31(3): 330-332.
- [10] 陈弟诗, 郭万柱, 徐志文, 等. 猪霍乱沙门氏菌的分离与鉴定以及 PCR 检测方法的建立[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(20): 6020-6023.
- [11] 关文英, 申志新, 张淑红, 等. 河北省食品中沙门氏菌的耐药性研究[J]. 现代预防医学, 2006, 33(10): 1761-1763.
- [12] 王 娟, 曲志娜, 赵思俊, 等. 禽源大肠杆菌和沙门氏菌耐药性研究[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(5): 64-65.