

动物性饲料中沙门氏菌的分离鉴定与分析

何继军¹, 王彪²

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 国家家畜疫病病原学重点实验室,
农业部畜禽病毒学重点实验室, 兰州 730046; 2. 甘肃省兽药饲料监察所, 兰州 730030)

摘要:通过常规分离培养鉴定技术,对一些饲料厂及养殖场的配合饲料 69 份、浓缩饲料 77 份、鱼粉 44 份、肉骨粉 39 份进行了沙门氏菌的分离鉴定,结果从 229 份样品中分离到沙门氏菌 27 株,分离率 11.8% (27/229)。其中配合饲料分离到 7 株,阳性率 10.1% (7/69);浓缩饲料分离到 6 株,阳性率 7.8% (6/77);鱼粉分离到 8 株,阳性率 18.2% (8/44);肉骨粉分离到 6 株,阳性率 15.4% (6/39)。

关键词:动物性饲料;沙门氏菌;分离鉴定

中图分类号:S816.17 文献标识码:A 文章编号:1008-0864(2009)S1-0056-03

Separation Identification and Analysis of Salmonella in Animal Feedstuff

HE Ji-jun¹, WANG Biao²

(1. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute;
Key Laboratory of Animal Virology, Ministry of Agriculture, Lanzhou 730046;
2. Gansu Supervisory Institute of Veterinary Drugs and Feedstuffs, Lanzhou 730030, China)

Abstract: With the routine culture separation and identification technique, the salmonella was separated, identified and analyzed from 69 copies of formula feed, 77 copies of concentrated feed, 44 copies of fishmeal and 39 copies of meatbone meal that was gathered from some feed factory and plant. As a result, 27 strains of salmonella were separated at the rate of 11.8% (27/229). And they were from 7 copies of formula feed, 6 copies of concentrated feed, 8 copies of fishmeal and 6 copies of meatbone meal which at a positive rate of 10.1% (7/69), 7.8% (6/77), 18.2% (8/44) and 15.4% (6/39).

Key words: animal feed; salmonella; separation and identification

沙门氏菌是人和动物的重要致病菌,近几年来,医院内婴幼儿和动物感染沙门氏菌十分严重。其主要有四类综合症:沙门氏菌病;伤寒;非伤寒型沙门氏菌败血症和无症状带菌者。沙门氏菌胃肠炎是由除伤寒沙门氏菌外任何一型沙门氏菌而所致,通常表现为轻度持久性腹泻。伤寒实际上是由伤寒沙门氏菌所致。未接受过治疗的病人致死率可超过 10%,而对经过适当治疗的病人其致死率低于 1%,幸存者可变成慢性无症状沙门氏菌携带者。这些无症状携带者不显示发病症状仍能将微生物传染给其他人(传统的例子就是玛丽伤寒)。非伤寒型沙门氏菌败血症可由各型沙门

氏菌感染所致,能影响所有器官,有时还引起死亡。幸存者可变成慢性无症状沙门氏菌携带者。

沙门氏菌常引起胃肠炎,潜伏期一般 6~72 h,主要症状为恶心、呕吐、腹绞痛、腹泻、发热寒颤头痛。病程一般 1~2 d 或更长。感染剂量为 15~20 个菌,死亡率达 1~4%。最易感群体是年幼儿童、虚弱者、年老人、免疫缺陷者等。污染源主要是人和家畜的粪便,沙门氏菌常存在于动物中,特别是禽类和猪。在许多环境中也有存在。从水,土壤,昆虫中,从工厂和厨房设施的表面和动物粪便中已发现该类细菌。它们可以存在于多类食品中,包括生肉、禽、奶制品、蛋、鱼、虾和田鸡

收稿日期:2009-08-15;修回日期:2009-10-28

基金项目:国家现代肉羊产业技术体系(nycytx-39)资助。

作者简介:何继军,助理研究员,主要从事动物病毒学研究。Tel:0931-8342615;E-mail:hejijun1979@163.com

腿等食品中。

沙门氏菌属也是嗜温性细菌,在中等温度,中性 pH,低盐和高水活度条件下生长最佳。生长最低水活度为 0.94。兼性厌氧,对中等加热敏感。同样,该菌属能适应酸性环境。通过蒸煮、巴氏消毒等控制以防止二次污染。正常家庭烹调,个人卫生可以防止煮熟食品的二次污染,以及控制时间和温度一般都能充分防止沙门氏菌病的发生^[1]。

人的大多数沙门氏菌感染直接或间接地与动物性食品有关,而动物的沙门氏菌感染和带菌与所食用的动物性饲料中的沙门氏菌污染有直接的关系。因此,对动物性饲料中的沙门氏菌进行检测,防止沙门氏菌感染及进一步蔓延扩散具有十分重要的意义^[2,3]。2007年3月~2008年12月对饲料厂和养殖场的成品配合饲料、成品浓缩饲料、鱼粉、肉骨粉以随即抽样进行了沙门氏菌的分离鉴定,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品 配合饲料 69 份、浓缩饲料 77 份、鱼粉 43 份、肉骨粉 39 份,每份样品约 100 g,均随机无菌取自各饲料厂及养殖场仓库。

1.1.2 培养基 缓冲蛋白胨水前增菌培养基,购自于中国进出口商品检验技术研究所(批号:070810);氯化镁孔雀绿,购自于中国腹泻控制上海试剂供应研究中心(批号:070632);亚硝酸盐胱氨酸增菌液,购自于中国腹泻控制上海试剂供应研究中心(批号:20070826);DHL 琼脂,购自于中国腹泻控制上海试剂供应研究中心(批号:20071210);酚红煌绿琼脂由本室自制。

1.1.3 生化试剂 三糖铁培养基,购自于北京双旋微生物培养基制品厂(批号:060704);ONPG 微量管,购自于杭州微生物试剂有限公司(批号:20070916);赖氨酸脱羧酶微量管,购自于兰州荣昌生化试剂厂(批号:20070313);尿素微量管,购自于兰州荣昌生化试剂厂(批号:20070112);V-P 和靛基质由本室自制。

1.1.4 沙门氏菌属诊断血清 A-F 多价因子血清,购自于卫生部兰州生物制品研究所(批号:20070601)。

1.2 方法

1.2.1 前增菌 取上述样品每份 25 g 进行乳化,加入 225 mL 缓冲蛋白胨水增菌液(BP)中置 36℃ 温箱培养 20 h。

1.2.2 选择性增菌 取前增菌液 0.1 mL 转种于 10 mL 氯化镁-孔雀绿增菌液(M.M)中置 42℃ 培养 24 h,同时取 10 mL 转种于 100 mL 亚硝酸盐胱氨酸增菌液(SC)中,置 37℃ 培养 24 h。

1.2.3 分离培养 取上述两种增菌液划线接种于 DHL 琼脂和酚红煌绿琼脂平皿上,置 37℃ 温箱中培养 20~24 h,如生长微弱,或无典型沙门氏菌落出现时,重新培养 18~24 h。

1.2.4 生化试验 挑选生长在酚红煌绿琼脂上,培养基颜色由粉红变红,并且为红色透明和生长在 DHL 上中心为黑色,或黄褐色透明的小型菌的可疑菌落,进行革兰染色镜检,并进行细菌纯化培养。

将纯化后培养物划线穿刺接种在三糖铁培养基斜面上,在 36℃ 培养 24 h。典型的沙门氏菌培养物,斜面显红色(碱性),底部显黄色(酸),有气体产生,有 90% 形成硫化氢(琼脂变黑)。当分离到乳糖阳性沙门氏菌时,斜面为黄色。

同时,将纯化后培养物分别接种于 L-赖氨酸脱羧、ONPG、尿素微量鉴定管及 V-P、靛基质培养基中,置 36℃ 培养 24 h。L-赖氨酸脱羧成紫色为阳性;尿素变成玫瑰红色至桃红色,以后再变成深红色时为阳性;ONPG 成红色为阳性;V-P 形成桃红色为阳性;靛基质形成红色为阳性。而沙门氏菌一般为 L-赖氨酸脱羧为阳性;尿素阴性;ONPG 成阴性;V-P 阴性;靛基质阴性(见表 1)。

1.2.5 血清学鉴定 按沙门氏菌属诊断血清操作说明书进行反应。A-F 多价血清菌体试验结果分类如下:

阳性反应:混合物试验凝集,而在盐水对照中不凝集;

阴性反应:混合物试验不凝集,而在盐水对照中也不凝集。

2 结果与分析

分离到沙门氏菌 27 株,分离率 11.8% (27/229)(见表 2)。其中配合饲料沙门氏菌阳性 7 份,阳性率 10.1% (7/69);浓缩饲料沙门氏菌阳

表 1 沙门氏菌试验鉴定标准

Table 1 Standard of Salmonella by biochemical and serological test.

可疑菌在培养基上的反应 Suspicious reaction of bacteria in the culture medium	阳性或阴性 Positive or negative	出现沙门氏菌株可能性 Possibility
葡萄糖形成酸 Glucose turn to acid	+	100%
三糖铁 3 Sugar corporation		
葡萄糖产气 Glucose turn to gas	+	91.9%
乳糖 Lactose	-	99.2%
蔗糖 Sucrose	-	99.5%
硫化氢 Hydrogen sulfide	+	91.6%
尿素分解 Decomposition of Urea	-	100%
赖氨酸脱羧反应 Reaction of Lysine Decarboxylation	+	94.6%
ONPG	-	98.5%
V-P	-	98.5%
靛基质 Indole	-	98.5%

表 2 动物性饲料中沙门氏菌检出结果

Table 2 Detection results of Salmonella in animal feedstuff.

样品名称 Sample name	样品数 Sample number	分离沙门氏菌株数 Positive separation of salmonella number of trees	阳性份数 Positive number of copies	阳性率 Positive incidence
配合饲料 Mixed feed	69	21	7	10.1%
浓缩饲料 Concentrate feed	77	18	6	7.8%
鱼粉 Fishmeal	44	28	8	18.2%
肉骨粉 Meat and bone meal	39	24	6	15.4%

性 6 份,阳性率 7.8% (6/77);鱼粉沙门氏菌阳性 8 份,阳性率 18.2% (8/44);肉骨粉沙门氏菌阳性 6 份,阳性率 15.4% (6/39)。并且同一样品中可能分离到几株沙门氏菌菌株。

3 讨论

本次分离到沙门氏菌 27 株,阳性分离率 11.8%,说明国产饲料的沙门氏菌污染问题比较严重,仍然令人担忧。

在分离的 27 株沙门氏菌中,配合饲料分离到 7 株,阳性率 10.1% (7/69);浓缩饲料分离到 6 株,阳性率 7.8% (6/77);鱼粉分离到 8 株,阳性率 18.2% (8/44);肉骨粉分离到 6 株,阳性率 15.4% (6/39)。经检验,配合饲料、浓缩饲料分别与鱼粉、肉骨粉之间差异显著,鱼粉与肉骨粉之间差异不显著,鱼粉与肉骨粉沙门氏菌污染高于配合饲料、浓缩饲料。

严格执行饲料生产良好操作程序,注意灭蝇,加强对饮水、食品等的卫生监督管理,以切断传染途径。对饲料加工和加工人员定期进行健康检查,及时发现带菌者并给以治疗或调离工作岗位。加强卫生监督及各种饲料运输、加工等方面的卫生措施,防止沙门氏菌污染。在动物性食品方面要严格控制污染途径,切断肉品运输、加工、经营环节的再次污染^[4]。

参 考 文 献

- [1] 温群文,袁 梦,俞慕华. 三种方法检测沙门氏菌的比较研究[J]. 中国热带医学,2006,6(11):1960-1963.
- [2] 张艳红,吴延功,杜元钊,等. 沙门氏菌快速检测方法研究进展[J]. 动物医学进展,2001,22(2):39-41.
- [3] 刘佩红,屠益平,徐 锋,等. 沙门氏菌检测技术研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯,2005,6:2-3.
- [4] 阚秋霞,马增晖. 浅谈沙门氏菌的检测方法[J]. 山东畜牧兽医,2007,30:46-47.