

# 肉牛屠宰过程中分离出沙门氏菌的 FAFLP 分子溯源分析

董鹏程<sup>1</sup>, 张一敏<sup>1</sup>, 毛衍伟<sup>1</sup>, 梁荣蓉<sup>1</sup>, 牛乐宝<sup>1</sup>, 李玉林<sup>2</sup>, 朱立贤<sup>1</sup>, 罗欣<sup>1</sup>

(1. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安 270000) (2. 延边畜牧开发集团有限公司, 吉林延吉 133000)

**摘要:** 为确定沙门氏菌在宰前、屠宰过程中的污染情况, 明确沙门氏菌在厂内发生污染的主要环节, 为工厂中沙门氏菌的控制提供数据支持, 本研究采用荧光扩增长度多态性 (FAFLP) 的方法对屠宰过程中 7 个工序分离出的 7 种不同血清型共计 83 株沙门氏菌进行分子分型。结果显示 83 株沙门氏菌在 0.83 的相似度下划分为 6 个大群, 与血清型呈现一定的联系。以 0.86 的相似度进行溯源, 发现 FAFLP 较血清分型具备更高的灵敏度, 与前期的流行率的调查数据吻合。溯源结果表明沙门氏菌在肉牛皮毛、粪便中存在较为严重的交叉污染现象, 同时部分粪便、皮毛分离出的沙门氏菌穿过了屠宰企业的防控屏障, 对工厂内部的胴体造成了污染。肉牛屠宰加工企业应注重宰前动物的规范化管理, 减少宰前交叉污染对工厂内部干预措施的压力, 同时应增加必要的危害控制点, 以降低沙门氏菌检出的风险。

**关键词:** 沙门氏菌; FAFLP; 溯源分析; 肉牛屠宰

文章编号: 1673-9078(2015)9-31-37

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.006

## Molecular Typing of *Salmonella* Species Isolated from Beef in a Processing Plant with Fluorescence Amplified Fragment Length Polymorphism

DONG Peng-cheng<sup>1</sup>, ZHANG Yi-min<sup>1</sup>, MAO Yan-wei<sup>1</sup>, LIANG Rong-rong<sup>1</sup>, NIU Le-bao<sup>1</sup>, LI Yu-lin<sup>2</sup>, ZHU Li-xian<sup>1</sup>, LUO Xin<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271000, China)

(2. Yanbian Livestock Development Group Co. Ltd., Yanji 133000, China)

**Abstract:** Fluorescence amplified fragment length polymorphism (FAFLP) analysis was used for molecular typing of 83 *Salmonella* strains in seven different serotypes isolated from seven different processing points, in order to investigate the contamination of *Salmonella* before and during slaughtering, to specify the main steps involving the contamination of *Salmonella* within the processing plant, and to provide data for the control of *Salmonella* infection within the plant. The results showed that the 83 strains were divided into three groups at the similarity of 0.83, and a certain correlation was observed between the FAFLP gene types and the serotypes. When source tracing was conducted at the similarity of 0.86, FAFLP exhibited a higher sensitivity than traditional serotyping, and the result was consistent with the previous data on the prevalence rate obtained from a previous epidemiological investigation. The source tracing analysis showed a serious cross-contamination of *Salmonella* among animals, which occurred through the feces and fur. Furthermore, some *Salmonella* strains isolated from the feces and fur crossed the protective barrier of the processing plants and infected the downstream carcasses. Hence, processing plants should pay more attention to standardized pre-slaughter management strategies to avoid the cross-contamination problems during in-plant interventions. Additionally, in-plant interventions should include extra critical control points to reduce the risk of *Salmonella* infection.

**Key words:** *Salmonella*; fluorescent amplified fragment length polymorphism; source tracing analysis; beef cattle slaughtering

收稿日期: 2014-11-21

基金项目: 863 (2012AA10160503); 国家肉牛牦牛产业技术体系 (CARS-38); 山东省现代农业产业技术体系 (SDAIT-12-011-09); 食品安全与营养协同创新中心; 特色名校建设工程大学生科技创新项目资助

作者简介: 董鹏程 (1986-), 男, 在读博士研究生, 研究方向畜产品加工  
通讯作者: 罗欣 (1961-), 男, 博士, 教授, 研究方向畜产品加工; 朱立贤 (1975-), 女, 副教授, 博士, 研究方向畜产品加工

沙门氏菌在世界范围内被报道为严重危害公共卫生的首要或次要致病菌, 据美国食源性疾病主动监测网络 (FoodNet) 统计, 在 1996 至 2010 的 15 年间, 由沙门氏菌引发的感染位列 10 种常见致病菌的首位, 每年约有 120 万人感染沙门氏菌, 造成的直接经济损失达到 33 亿美元<sup>[1-2]</sup>。

摄入被污染食物如畜禽肉、蛋奶是引发人类感染

的主要因素。去皮后肉牛的肌肉组织是无菌的,沙门氏菌对冷鲜牛肉的污染主要来源于肉牛的宰前管理以及屠宰厂内部的各个工序中,如宰前动物的大面积交叉污染,屠宰过程中机械去皮、动物胃肠道的破裂、喷淋用水、屠宰设备与人员的交叉污染、工厂内动物粪便的污染等<sup>[3]</sup>。由于肉牛屠宰厂中引发沙门氏菌传播的潜在环节很多,对肉品中沙门氏菌进行溯源分析,确定工厂中沙门氏菌污染的主要环节,并对这些环节制定相关的干预措施,是肉品生产企业控制沙门氏菌污染的重要手段,同时也是危害分析与关键控制(HACCP)的重要组成部分。

与分子生物学相结合的基因分型与溯源技术在流行病学研究中已经广泛使用,这些技术相比传统分型方法提供了更强的分辨能力,是对传统方法的进一步补充。其中扩增片段长度多态性(AFLP)以简单的酶切、连接反应以及PCR反应为基础,对变异的检测范围覆盖了沙门氏菌的全基因组,与脉冲场凝胶电泳相比具有方便、快速的特点。而荧光AFLP(FAFLP)在PCR的扩增过程中加入荧光标记的引物,便于对产物进行自动分析和识别,极大地降低了分析的劳动强度,降低了主观因素的干扰,已经广泛地应用在沙门氏菌、单增李斯特菌以及大肠杆菌O157的分型研究中<sup>[4-6]</sup>。

为追踪最终产品中致病菌的来源,国外学者通过分子分型对牧场、运输工具、宰前环境以及工厂屠宰线上分离的沙门氏菌进行溯源分析,根据溯源结果制定相关干预措施,用以预防沙门氏菌对最终产品的污染。然而我国肉牛产业起步较晚,除了一些市售牛肉样品被沙门氏菌污染的调查数据外<sup>[7]</sup>,鲜见沙门氏菌在工厂内部不同工序中的溯源分析报道,而工厂内部干预措施及关键控制点是防范沙门氏菌进入流通领域的重要防线。本研究对屠宰线上七个工序中分离出的沙门氏菌进行FAFLP溯源分析,旨在找到沙门氏菌在屠宰过程中的传播情况,为工厂制定关键控制点、预防沙门氏菌在工厂中的传播提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株

83株沙门氏菌分离于2010年6月至9月,来源于我国山东省3个肉牛屠宰工厂的7个生产工序中,共有7种血清型,有3株未能分型,其在各工厂、各工序的具体分布如表1所示。

### 1.2 主要试剂和仪器

AFLP试剂盒(PstI/MseI型,包含DNA提取系统、限制性内切酶、连接酶、连接套件、FAFLP引物、PCR反应试剂)、B002-1Marker、DGL2000 Marker购于北京鼎国生物技术有限责任公司;ROX500分子量内标购于ABI公司;甲酰胺购于Sigma公司;PCR仪PTC-200, Bio-RAD公司;DG-III电泳仪、DG-3D电泳槽,北京鼎国生物技术有限责任公司;PRISM 377 sequencer 测序仪,ABI公司。

表1 用于分型的83株沙门氏菌的血清型、来源工厂及来源工序

Table 1 Serotypes, source plants, and source procedures of 83 <i>Salmonella</i> strains isolated for typing			
取样点	工厂 A (n=60)	工厂 B (n=4)	工厂 D (n=19)
粪便	S. Meleagridis (1)		
	S. Derby (1)		
	S. Agona (9)		
	S. Senftenberg (4)		S. Meleagridis (4)
	S. Calabar (1)		
	S. Kingston (1)		
	O10/HMC (1)		
	S. Agona (27)		
	S. Senftenberg (10)		S. Meleagridis (1)
	皮毛	S. Calabar (1)	S. Kottbus (2)
O19 H:g,t (±) (1)		S. Agona (5)	
O19 H (-) (1)			
去皮后			S. Agona (1)
去脏后	S. Derby (1)		
喷淋后	S. Agona (1)	S. Meleagridis (2)	
排酸后	S. Agona (1)		
分割肉	S. Meleagridis (1)		

注: n代表各工厂分离菌株的总数,括号中数字代表采样点中分离出各血清型菌株的数目。

### 1.3 DNA的提取、限制性酶切、接头的连接及预扩增

采用CTAB法对细菌基因组DNA进行提取,限制性酶切、接头的连接操作步骤按试剂盒的说明进行操作,连接套件如表2所示。预扩增采用25 μL预扩增反应体系(2 μL模版、2.5 μL 10×PCR buffer、0.5 μL dNTP、1 μL预扩增引物,见表2、0.5 μL Taq酶、加双蒸水18.5 μL)。扩增程序为:94℃下变性2 min,然后进行30轮扩增,每轮扩增包含94℃变性30 s、56℃退火30 s、72℃延伸80 s。最后以72℃的温度延伸5 min。

### 1.4 选择性 PCR 扩增

将预扩增产物按照 1:20 稀释后, 取 2  $\mu$ L 样品、2.5  $\mu$ L 10X PCR buffer、0.5  $\mu$ L dNTP、1  $\mu$ L PstI 引物、1  $\mu$ L MseI 引物、0.5  $\mu$ L Taq 酶、加双蒸水 17.5  $\mu$ L 最终形成 25  $\mu$ L 反应体系。PCR 扩增程序为首轮扩增 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 80 s; 以后采用降落 PCR, 退火温度递减 0.7  $^{\circ}$ C, 扩增 12 轮; 随后退火温度保持 55  $^{\circ}$ C 再扩增 23 轮; 最终 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

表 2 FAFLP 扩增引物与连接套件序列

Table 2 Sequences of the primers and adapters used in the FAFLP

连接套件/引物	序列
连接套件	
PstI Adapter 1	CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA
PstI Adapter 2	TGT ACG CAG TCT AC
MseI Adapter 1	GAC GAT GAG TCC TGA G
MseI Adapter 2	TAC TCA GGA CTC AT
预扩增引物	
PstI+G	GAC TGC GTA CAT GCA G
MseI+C	GAT GAG TCC TGA GTA A C
选择性扩增引物	
PstI+GAA (149)	MseI+CAA
PstI+GAA (150)	MseI+CTC
PstI+GAG (151)	MseI+CAC
PstI+GTA (151)	MseI+CAA
PstI+GTA (169)	MseI+CAC
PstI+GTG (150)	MseI+CAA
PstI+CTG (161)	MseI+CTA
PstI+GTT (139)	MseI+CAC
PstI+GTT (132)	MseI+CTA

注: 括号中数字代表不同扩增引物对应的多态性片段的数目。

### 1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

取 2  $\mu$ L 选择性扩增产物上样于 4% 的变性聚丙烯酰胺凝胶, 为防止渗样, 每点一组样品预电泳 2 min 直至点完所有样品, 然后关闭测序仪门, 预电泳 2~3 min 后以恒定功率 50 瓦电泳 2.5 h。

### 1.6 数据统计与分析

ABI 377 测序仪电泳检测后的片段大小通过 GENESCAN 软件进行分析, 软件每 2 个碱基读一次数, Marker 片段范围为 70~500 bp, 在 70~500 bp 之间一共读取 216 读数。在原始数据的基础上, 有带的地方

替换为 1, 无带的地方替换为 0, 这样构成了 01 数据表, 使用 NTSYSpc-2.11F 软件导入数据表, 获得 SM 相似矩阵, 使用非加权组平均法 (UPGMA) 绘制聚类图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 83 株沙门菌的 FAFLP 扩增

根据扩增条带的清晰度、多态性, 从 64 对引物中筛选出 9 对引物 (表 2) 进行 83 株分离沙门氏菌的 FAFLP 扩增。每对引物均能够产生 132~169 条多态性片段, 占总扩增条带的 61.11% 至 78.24%, 平均每对引物能够产生 150.22 个条带, 占总条带数的 69.54%, 所有多态性片段的长度为 50~500 bp (图 1)。筛选出的 9 对引物产生多态性片段的数目有一定的差异, 引物组合 PstI-GTA/MseI-CAC 产生多态性片段最多, 多态率为 78.24%, 而引物组合 PstI-GTT/MseI-CTA 产生的多态片段最少, 多态率为 61.11%。挑选 7 株不同血清型沙门氏菌进行重复试验, 其指纹图谱一致, 具有较好的重复性。可见, 筛选出的 9 对引物对 83 株沙门氏菌具有较好的扩增效果, 适合于进一步的聚类分析。

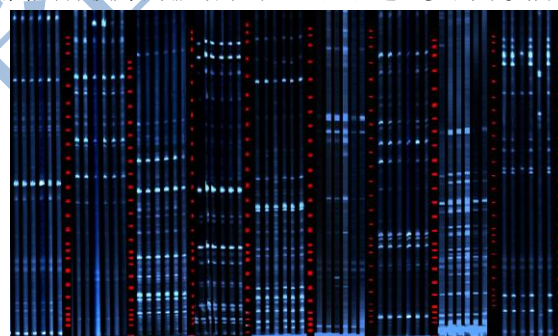


图 1 以 9 对引物对部分沙门氏菌 (6 株) 的 FAFLP 扩增图谱

Fig.1 FAFLP profile of genomic DNA of six *Salmonella* strains using nine primer combination

注: 自左至右扩增引物组合分别为 (P-GAA/M-CAA, P-GAA/M-CTC, P-GAG/M-CAC, P-GTA/M-CAA, P-GTA/M-CAC, P-GTG/M-CAA, P-CTG/M-CTA, P-GTT/M-GAC, P-GTT/M-CTA), 红色荧光为分子量内标, 自上而下片段大小依次为: 70、80、90、100、120、140、160、180、190、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、425、450、475、490、500 (bp)。

### 2.2 83 株沙门菌的 FAFLP 分子分型及聚类分析

对每对引物扩增后的片段分别电泳检测后, 将检测后的片段大小转化为 0、1 数据并进行合并, 最后导



入 NTSYSpc 软件进行聚类分析及聚类图的制作, 获得聚类图如图 2 所示。由图可以看出, 在相似系数为 0.83 的水平上, 83 株沙门菌可以分为 13 个大簇, 其中 I 至 VI 簇包含多株细菌, 而其他簇由单株细菌组成。全部山夫登堡、卡拉巴尔沙门氏菌归为 IV 簇, II、III 簇全部为阿贡纳沙门氏菌, V 簇主要为阿贡纳沙门氏菌, 还包括全部的两株科特布斯沙门氏菌及两株火鸡沙门氏菌。其余的火鸡、得尔卑、金斯敦沙门氏菌归为 I、VI 及其他簇 (图 2)。该结果表明 FAFLP 对不同血清型沙门氏菌具有一定的区分能力, FAFLP 型与传统血清型具有一定的对应关系。AFLP 基因型与血清型存在一定的联系已经被很多研究者所证明<sup>[4, 8]</sup>, 然而由于 O 抗原基因在细菌基因组中仅占 0.5% 的比重, 加上选择性碱基的使用使得仅 6% 的片段得以检测, 所以进一步找到不同血清型沙门氏菌的特征条带仍较为困难<sup>[9]</sup>。进一步提高相似水平, 相似度设置为 0.86 时, 83 株沙门氏菌进一步划分为 40 个基因型, 其中

17 种基因型包含 2 种以上菌株 (图 2, A-Q)。在此相似度下, FAFLP 对沙门氏菌不同血清型的区分效果更为明显, 随着相似度标准的提高, 不仅更多的血清型从每一大簇分离出来, 具有同种血清型的大簇也被划分为不同的小簇 (图 2)。该结果表明仅靠血清分型并不能区分不同工序乃至不同批次、来源肉牛的沙门氏菌菌株, 亦不能提供足够的溯源信息<sup>[10]</sup>, 借助于 AFLP 技术, 对同种血清型沙门氏菌进行进一步区分, 获得基因亚型, 辅以流行病学调查数据, 才能够对沙门氏菌在工厂中的传播进行有效的追踪。与此同时, 分型结果与前期已经获得的不同工厂沙门氏菌的流行率的调查也逐渐吻合起来, 适合进行初步的溯源分析。例如在 II 簇中的 15 株阿贡纳沙门氏菌中, 有 11 株来源于 A 厂而另外 4 株来源于距离较远的 (大于 200 km) 的 D 厂, 当相似水平提高至 0.86 时, 这 4 株菌能够被分离出来, 此外 I、IV、V 和 VI 簇不同地域、不同血清型的沙门氏菌也得以分离。

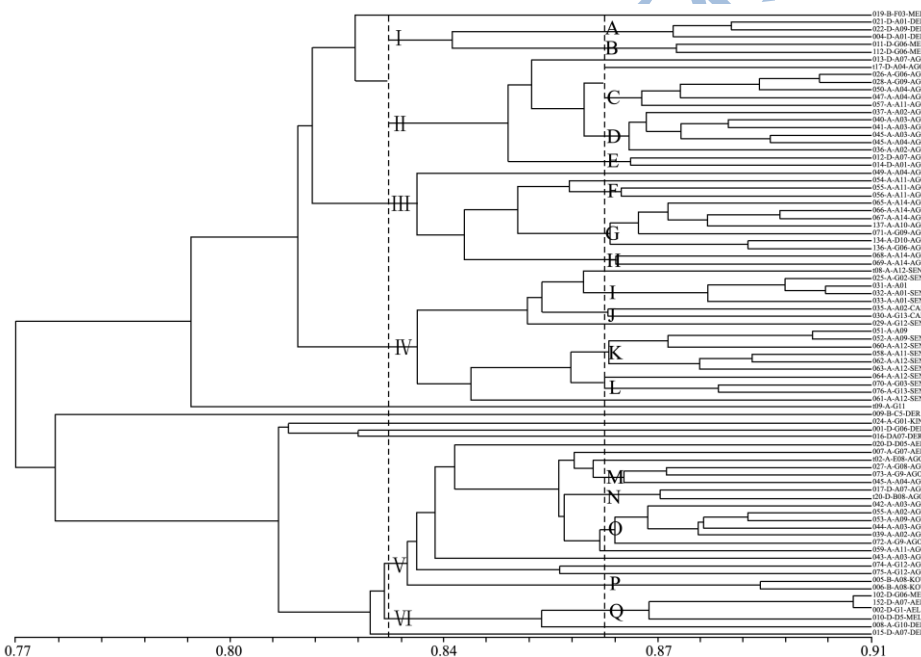


图 2 83 株沙门氏菌的聚类图

Fig.2 Dendrogram of 83 *Salmonella* strains

注: 细菌编号包含 4 个字段表示为: 菌株号-分离工厂-取样点-血清型, 在分离工厂字段字母 A、B、D 代表不同的取样工厂, 在取样点字段以 A、B、C、D、E、F、G 代表皮毛、去皮后、去内脏后、喷淋后、排酸后、分割肉、及粪便 7 个取样点, 血清型字段 AGO、SEN、CAL、KIN、DER、MEL、KOT 分别代表阿贡纳、山夫登堡、卡拉巴尔、金斯敦、德尔卑、火鸡、科特布斯 7 种不同的血清型。

### 2.3 屠宰过程中不同工序分离出沙门菌的溯源

我国对生鲜肉品中存在的沙门氏菌施行“零容忍”制度, 其中 2014 年新实施的《食品安全国家标准-食

品中致病菌限量》中明确规定: 按照二级采样方案, 在被检的 5 份样品中, 不允许任一样品检出沙门氏菌。然而沙门氏菌可以被肉牛等反刍动物无症状地携带, 因此无法通过宰前检疫进行鉴别。动物的肠道内容物在屠宰去脏的过程中极易扩散, 进而污染刀具、屠宰线, 造成其它胴体的交叉污染; 除肠道内容物的威

胁外,皮毛中的沙门氏菌主要来源于动物与粪便、环境以及其他动物之间相互接触,在动物去皮的过程中,由于强大的机械力的作用,皮毛中的沙门氏菌可能从皮毛中逃逸,附着在胴体上,对下游产品造成威胁;在喷淋过程中,由于生产用水的不洁净或喷淋设备的不规范都会造成沙门氏菌在牛胴体的重分配与交叉污染;在胴体的排酸过程中,胴体的摆放间隔、与其他胴体、排酸间环境的接触都会造成致病菌的感染;在屠宰线的末端分割车间,由于胴体与工作面的接触机会增大,不洁净的工作面会引发沙门氏菌的污染,由于沙门氏菌具有形成菌膜的特性,加上分割车间具备较为丰富的有机物质,一旦清洁不彻底,很容易在车间形成菌膜,导致洁净牛肉的二次污染。总之,屠宰线是宰后胴体、分割肉与宰前动物连接的媒介,非常容易被致病微生物所污染,并且在缺乏适当的干预措施下,很可能成为致病菌污染的中间媒介甚至成为致病菌污染的源头,危害下游生鲜肉制品安全。

为防止沙门氏菌在生鲜肉制品中的流行,应该在肉品生产企业各个工序对沙门氏菌进行溯源,确定易感环节,并针对易感环节制定良好的消毒、减菌措施。然而由于致病菌较小的发生率和潜在的生物危害,在肉品生产环境中对其追踪并评估消减措施一直缺乏快速、简便的方法。本研究对肉牛屠宰过程中七个取样点(粪便、皮毛、去皮后、去脏后、喷淋后、排酸后、分隔肉)分离出沙门氏菌进行 FAFLP 分子分型,试图找到沙门氏菌在工厂内部传播特点。以 0.86 的相似水平为参照,对划分为同一基因型的沙门氏菌进行溯源,结果发现沙门氏菌在待宰动物的粪便、皮毛中存在较为严重的交叉污染,部分菌株穿越了工厂的干预措施,对胴体产生了污染。

本研究对分离于胴体、分割生产线的 7 株沙门氏菌进行了溯源分析,其中有 3 株追溯到了粪便和皮毛(基因型 G、N、Q)。在基因型 G 中,065、066、067、071、137 号菌株具有 86.7% 的相似性,说明沙门氏菌在 9 号牛的粪便、10 号牛的皮毛以及 14 号牛的皮毛间存在交叉污染的现象,同时 134-A-D10-AGO 和 136-A-G06-AGO(相似度 89.1%)与上述 5 株菌有 86.35% 的相似性,因此可以推断 A 厂喷淋后 10 号牛分离出的沙门氏菌有可能来源于 6 号肉牛的粪便,或者由于去皮工序中存在交叉污染的缘故,来源于该牛自身的皮毛(137-A-A10-AGO),而由于宰前交叉污染的存在,该牛皮毛中的沙门氏菌可进一步追溯至 14 号牛的皮毛或 9 号牛的粪便。虽然在屠宰线设置喷淋设备能够有效地降低胴体微生物污染,然而,本次取样的 3 个工厂中喷淋设备较为简陋,存在水压、水温

不足的问题,个别厂家仅以普通高压水枪代替,这样不符合规范的喷淋不仅不会产生减菌的效果,反而会导致细菌在胴体的再分配,甚至产生胴体的二次交叉污染<sup>[11]</sup>;同样的现象在 D 工厂也有发生,例如在基因型 Q 中,沙门氏菌 152-D-A7-MEL 和 002-D-G1-MEL 具有 91% 的相似度,同时,102-D-G06-MEL 与上述两菌株有 90.45% 的相似度,可以判断 D 厂中皮毛和粪便的交叉污染;喷淋后胴体分离出的火鸡沙门氏菌(010-D-D5-MEL)可能来源于 7 号牛的皮毛,同样,由于宰前交叉污染的存在,该火鸡沙门氏菌可能来源于 1 号、6 号牛的粪便。在基因型 N 中,菌株 T20-D-B08-AGO 与 017-D-A07-AGO 具有 87.2% 的相似性,表明 D 工厂去皮后分离出的这株阿贡纳沙门氏菌很可能来源于该工厂 7 号牛的皮毛,很多学者通过流行调查指出去皮工序是沙门氏菌感染胴体的重要途径,本次试验的结果证实了上述结论。总之,对胴体沙门氏菌的溯源结果表明粪便、皮毛中沙门氏菌已经穿过了肉牛屠宰企业的屏障,对屠宰生产线中的“洁净区”造成了污染。由于沙门氏菌在粪便、皮毛中的天然携带,肉牛在屠宰过程中应该以“去皮”操作为分界点,设置由“脏区”到“洁净区”的物理分隔屏障,并在去皮后辅以必要的干预措施,减少沙门氏菌由粪便、皮毛向胴体的污染。本次分离取样的三家肉牛屠宰厂均未设置物理分隔屏障及后续减菌措施,而在肉牛屠宰比较发达的澳大利亚、美国,不仅“脏区”与“洁净区”具有严格的物理屏障,每一步屠宰工序均有对应的消毒减菌措施,如宰前淋浴、化学去毛、真空去污、乳酸喷淋、热水喷淋等,我国肉牛加工企业干预措施的欠缺一定程度上导致了沙门氏菌由“脏区”向“洁净区”的扩散。

除上述 3 株可以溯源的沙门氏菌外,另外 4 株沙门氏菌在同一取样时间内并未找到对应的污染源头,其可能的原因是这 4 株沙门氏菌来源于工厂内部环境中,如工人及其使用的工具、喷淋用水、排酸库的墙面等,工厂内源性污染也是造成胴体沙门氏菌检出的一个重要原因,沙门氏菌具有形成生物膜的能力,由于屠宰厂营养较为丰富,工厂内部环境一旦被污染,沙门氏菌能快速生长并诱发产生群体效应,形成的菌膜的沙门氏菌很难被常规清洗消毒程序所去除,成为工厂内部污染的一个重要源头。

通过溯源分析发现宰前皮毛、粪便是胴体沙门氏菌的一个重要来源,减少宰前动物沙门氏菌的携带也是抑制沙门氏菌向胴体传播的重要方法。本次对分离菌株的溯源结果表明沙门氏菌在待宰动物的粪便、皮毛中存在较为严重的交叉污染,肉牛屠宰企业具备较

大的改进空间。例如,基因型 D 中 36、37、40、41、45、46 六株阿贡纳沙门氏菌具有 86.6% 的相似性,这些菌株分离于 A 工厂的 3 头不同的牛的皮毛 (A02、A03、A04),这表明沙门菌在这 3 头牛的皮毛间存在交叉污染的现象。类似的,基因型 K 包含 51、52、58、60、62、63 六株相似度为 86.3% 的山夫登堡沙门氏菌,而这 6 株菌同样分离于 A 工厂的 3 头不同牛的皮毛上 (A09、A11、A12),这表明沙门菌在这 3 头牛的皮毛间也存在交叉污染的现象。在 D 工厂,基因型 A、E 中也发现类似的现象 (图 2),表明沙门氏菌在动物的皮毛间相互传播也存在于 D 工厂。沙门氏菌在不同动物间不仅通过皮毛间的接触进行传播,还可能通过粪便与皮毛间的相互接触进行传播。例如基因型 O 中,38、39、42、44、53 五株沙门氏菌具有 86.85% 的相似性,而这五株菌分别来自 A02、A02、A03、A03、A09 牛的皮毛,可以判断沙门氏菌在 A02、A03、A09 三头牛间存在着交叉污染的现象,同时,72 号菌与上述菌株存在 86.42% 的相似性,说明这三头牛皮毛中的沙门氏菌很可能来源于 9 号牛的粪便,沙门氏菌同时在 9 号牛的粪便和皮毛中检出说明 9 号牛在此次沙门氏菌的传播中充当了散播媒介。同样,基因型 C、G、I、J、L、M 中均同时包含来源于不同动物的粪便、皮毛的沙门氏菌 (图 2),这说明沙门氏菌能在不同动物间可能通过粪便与皮毛进行交叉污染。同样,粪便-皮毛的交叉污染模式也在 D 厂发现 (基因型 Q)。

沙门氏菌粪便、皮毛交叉污染现象的出现与肉牛宰前管理影响密切,由于沙门氏菌在肉牛的肠道中可以无症状携带<sup>[12]</sup>,在宰前运输、待宰的过程中,粪便中的沙门氏菌很有可能通过动物的动物卧地休息、相互接触的过程中通过粪便-皮毛/粪便-皮毛-皮毛的模式进行交叉污染,从单头带菌牛扩散到整个牛群。我国肉牛屠宰企业对动物宰前管理重视不够,未能对待宰密度进行有效控制,导致动物在待宰圈中过度拥挤,加剧了沙门氏菌在个体间的交叉污染。肉牛宰前的禁食处理能够减少屠宰时牲畜胃中残留的食物量,降低动物运输、待宰过程中粪便的残留量,进而减少沙门氏菌在牛个体间、胴体间交叉污染的可能性<sup>[13]</sup>,由于屠宰场对动物宰前管理控制不够严格,加之农户为了增加屠宰动物的活体重,提高利润,往往在屠宰前给肉牛饲喂大量饲料,导致肉牛在运输、待宰过程中大量粪便的产生,加剧了沙门氏菌在宰前动物的皮毛、粪便间的交叉污染。良好的宰前管理如宰前淋浴、合理禁食、饲料结构的调整和避免应激能够减少沙门氏菌在肠道中的流行率,减少交叉污染的可能,降低待宰动物初始带菌量,降低工厂内部干预措施的压力,

进而使胴体感染率得到控制<sup>[12, 13]</sup>。本次研究发现同种基因型沙门菌在宰前动物间的广泛流行,揭示了在肉牛屠宰企业中宰前管理这一环节函待加强,如何做到品质控制与企业、农户生产效益的均衡仍需进一步探索。

### 3 结论

随着生鲜牛肉制品消费需求增加及人们对牛肉制品生物安全的重视,特别是 2014 年食品中致病菌限量国家标准的实施,如何有效消除沙门氏菌对肉类生产企业的威胁已经成为越来越多的工厂、企业所关注的焦点。本研究对肉牛屠宰线上 7 个工序分离出 83 株沙门氏菌进行 FAFLP 分子分型,发现分型结果不仅与前期血清分型、流行病学数据有较好的吻合,并能提供出更为详尽的溯源数据。溯源分析表明沙门氏菌在宰前动物间存在较为严重的交叉污染,这种宰前的沙门氏菌的传播加重了工厂内部干预措施的压力。同时,部分皮毛、粪便分离出的菌株已经穿过工厂内部的干预屏障,对最终产品的生物安全造成严重威胁。由于缺乏规范的宰前管理与动物追溯体系,调查 3 家工厂均无详细的屠宰动物的来源数据,导致本次致病菌的追溯在牧场与屠宰厂之间无法完成。建议肉牛屠宰工厂严格宰前管理制度,在去皮、去脏后添加规范的喷淋减菌措施,在“脏区”与“洁净区”设立严格的物理隔离措施与人员消毒措施,以避免沙门氏菌在工厂内部的散播。

### 参考文献

- [1] Centers for Disease Control and Prevention. Vital signs: incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food--foodborne diseases active surveillance network, 10 US sites, 1996-2010. MMWR [R]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2011, 60(22): 749
- [2] Hoffmann S, Batz M B, Glenn Morris J. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens [J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(7): 1292-1302
- [3] Rhoades J R, Duffy G, Koutsoumanis K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review [J]. Food Microbiol., 2009, 26(4): 357-376
- [4] Kober M V, Abreu M B, Bogo M R, et al. Differentiation of *Salmonella Enteritidis* isolates by fluorescent amplified fragment length polymorphism [J]. Foodborne Pathogens and



- Disease, 2011, 8(1): 19-26
- [5] Parisi A, Latorre L, Fraccalvieri R, et al. Occurrence of *Listeria spp.* in dairy plants in Southern Italy and molecular subtyping of isolates using AFLP [J]. Food Control, 2013, 29(1): 91-97
- [6] Iyoda S, Wada A, Weller J, et al. Evaluation of AFLP, a high-resolution DNA fingerprinting method, as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 isolates [J]. Microbiology and Immunology, 1998, 43(8): 803-806
- [7] YANG Bao-wei, Qu Dong, Zhang Xiu-li, 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): 63-72
- [8] Lindstedt B, Heir E, Vardund T, et al. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica subsp. enterica* serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(4): 1623-1627
- [9] Aarts H J M, Lith L A J T, Keijer J. High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting [J]. Letters in Applied Microbiology, 1998, 26(2): 131-135
- [10] Wang Bing, Wang Chong, McKean J D, et al. *Salmonella enterica* in swine production: assessing the association between amplified fragment length polymorphism and epidemiological units of concern [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(22): 8080-8087
- [11] McEvoy J M, Doherty A M, Sheridan J J, et al. The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157: H7 at a commercial beef abattoir [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(2): 256-266
- [12] Pointon A, Kiermeier A, Fegan N. Review of the impact of pre-slaughter feed curfews of cattle, sheep and goats on food safety and carcass hygiene in Australia [J]. Food Control, 2012, 26(2): 313-321
- [13] Jacobson L H, Nagle T A, Gregory N G, et al. Effect of feeding pasture-finished cattle different conserved forages on *Escherichia coli* in the rumen and faeces [J]. Meat Science, 2002, 62(1): 93-106