

研究报告

2019年我国不同地区牧场生牛乳中致病菌污染及抗生素耐药情况研究

甘辛¹,李孟寒¹,闫韶飞¹,孙喜贺²,徐进¹

(1. 国家食品安全风险评估中心,国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室,北京 100021;
2. 北京联合大学生物化学工程学院,北京 100023)

摘要:目的 了解我国不同地区牧场生牛乳中致病菌污染情况和细菌耐药特征。方法 对2019年9—11月采集自43家不同地区牧场的53份生牛乳样品进行6种致病菌的分离鉴定,对分离株开展抗生素耐药性检测。结果 53份样品中大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌和单核细胞增生李斯特氏菌(单增李斯特菌)的污染率分别为62.26%(33/53)、20.75%(11/53)、5.66%(3/53)和3.77%(2/53),克罗诺杆菌和沙门氏菌均未检出。选取117株分离株进行药物敏感性实验,其中58株菌耐药,总体耐药率为49.57%(58/117);90株革兰氏阴性菌中有33株耐药,耐药率为36.67%(33/90);27株革兰氏阳性菌中有25株耐药株,耐药率为92.59%(25/17)。结论 不同地区牧场采集的生牛乳中细菌污染情况差异较大,污染随气温降低呈下降趋势。同时生乳中细菌分离株多重耐药率高,需进一步严格控制兽用抗生素的使用。

关键词:生乳;致病菌;污染率;抗生素耐药

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)06-0709-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.06.012

Contamination and antibiotic resistance of multiple pathogens in raw milk from different farms of different regions of China in 2019

GAN Xin¹, LI Menghan¹, YAN Shaofei¹, SUN Xihe², XU Jin¹

(1. National Health Commission Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China; 2. College of Biochemical Engineering of Beijing Union University, Beijing 100023, China)

Abstract: Objective To understand the contamination of pathogens and the antibiotics resistance characterization in raw milk in China. **Methods** A total of 53 raw milk samples collected from 43 pastures in different regions in China from September to November in 2019 were detected the contamination of six pathogens, and isolates were tested for the antibiotic resistant ability. **Results** The contamination rates of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* were 62.26% (33/53), 20.75% (11/53), 5.66% (3/53) and 3.77% (2/53), respectively. The detection of *Cronobacter* and *Salmonella* were negative. A total of 117 isolates were selected for antibiotics resistance test and 58 strains were resistant to antibiotics, accounted for 49.57% (58/117). 33 of 90 gram-negative strains were resistant strains, accounted for 36.67% (33/90). 25 of 27 gram-positive bacteria were resistant strains, accounted for 92.59% (25/17). **Conclusion** The bacterial contamination in raw milk collected from pastures in different regions was quite different, and showed a downward trend with the decrease of temperature. Isolates from raw milk showed a high multiple antibiotics resistance rate, suggesting a cautious control of veterinary antibiotics should be adopted.

Key words: Raw milk; pathogens; contamination rate; antibiotics resistance

牛乳作为人类摄取营养的重要食物来源之一,

也是加工食品中重要的原辅料,在全球范围内被广泛消费。2020年中国生乳的年供应量约3330万吨,而中国生乳的需求量由2015年的4270万吨逐年上升至2020年的5080万吨。牛乳可以降低哮喘、过敏和特应性湿疹等患病率,但在改善人类生活的同时也为细菌生长提供了理想环境,导致消费者发生细菌性感染^[1-2]。牛乳质量和安全在乳制品工业中受到高度重视,微生物污染目前已成为生乳

收稿日期:2021-10-28

基金项目:国家重点研发计划(2017YFC1601402);国家重点研发计划(2018YFC1604303)

作者简介:甘辛 男 副研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: ganxin@cfsa.net.cn

通信作者:徐进 男 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: xujin@cfsa.net.cn

和乳制品中首要被关注的问题,除对终产品的质地、风味和感官特性以及保质期产生影响外,乳源性致病菌对人类健康也构成了严重威胁,约占所有乳制品相关疾病的90%^[3]。

沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、空肠弯曲菌、大肠埃希氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌(简称单增李斯特菌)和克罗诺杆菌污染的乳与乳制品引起的食品安全事件在国内外屡有发生。研究显示生乳污染的途径比较广泛,包括饲养过程中粪便导致的肠道细菌如沙门氏菌、弯曲菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌等污染,同时奶牛感染乳房炎也是导致牛乳污染多种致病微生物的重要因素之一。生乳在采集、储存和运输等环节也容易发生污染^[4]。此外,原料乳中的微生物危害,如单增李斯特菌、耶尔森菌属、贝氏柯克斯体、布鲁氏菌属和分枝杆菌属可在区域和空间上存在多样性^[5]。自2014年世界卫生组织首次发布《抗生素耐药:全球检测报告》以来,细菌耐药问题已成为全世界关注的焦点。由于抗生素在畜牧业的广泛应用造成了较强的选择压力,导致致病菌和共生细菌耐药性增加,乳与乳制品中的耐药菌相关研究被持续关注。研究显示,耐药菌可以通过质粒、整合子、基因盒或转座子等方式传递耐药基因,从而使人体和环境中的致病菌和非致病菌产生耐药性,通过食用受污染的乳制品,可造成间接暴露于耐药菌和产生耐药性^[6]。

本研究针对2019年9—11月份采集自我国43个牛牧场的53份样品中我国报道污染较多的沙门氏菌、克罗诺杆菌、大肠埃希氏菌、蜡样芽孢杆菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌等6种致病菌的污染情况进行筛查,同时对分离到的菌株进行抗生素敏感性测试,以了解我国生乳中致病菌的耐药性。

1 材料和方法

1.1 样品来源

本研究自2019年9—11月连续采集来自43家牧场的53份牛生乳样品,每份样品不少于150 mL,送样过程中全程采用冷链运输,收到样品后立即进行预增菌。

1.2 主要仪器与试剂

DensiCHEK-plus比浊仪、VITEK 2 COMPACT全自动微生物分析仪、VITEK革兰阴性和阳性细菌鉴定卡及GN09和GP67药敏卡均购自法国生物梅里埃,C1000聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)仪、Gel Doc电泳仪和凝胶成像系统(美国Bio-Rad),基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF/MS) MALDI Biotyper(德国Bruker)。

脑心浸液肉汤(Brian Heart Infusion, BHI)、脑心浸液琼脂(Brain Heart Infusion Agar, BHA)、胰蛋白胍大豆琼脂(Tryptone Soya Agar, TSA)、缓冲蛋白胍水(Buffered Peptone Water, BPW)、四硫磺酸盐煌绿增菌液(Tetrathionate Broth, TTB)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(Selenite Cystine Broth, SC)、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(Xylose Lysine Desoxycholate Agar, XLD)、亚硫酸铋琼脂(Bismuth Sulfite Agar, BS)、改良月桂基硫酸盐胰蛋白胍肉汤(Modified lauryl sulfate tryptose vancomycin medium, mLST/Vm)、麦康凯琼脂(MacConkey Agar, MAC)、伊红美蓝琼脂(Eosin-Methylene Blue Agar, EMB)、磷酸缓冲盐(Phosphate Buffered Saline, PBS)、李氏增菌肉汤1(Listeria Enrichment Broth 1, LB₁)、李氏增菌肉汤2(Listeria Enrichment Broth 2, LB₂)、李斯特氏菌显色培平板、PALCAM琼脂、7.5%氯化钠肉汤、Baird-Parker琼脂、阪崎肠杆菌显色培养基(Brilliance Enterobacter sakazakii Agar, DFI)、血平板(北京陆桥技术股份有限公司);质谱样品处理基质溶液(IVD Matrix HCCA-portioned, IVD HCCA)(德国Bruker)。

1.3 方法

1.3.1 致病菌的分离

本研究致病菌的分离培养按照GB 4789.4—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》、GB 4789.40—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验》、ISO 22964—2017《食物链微生物学-克罗诺杆菌的水平检测方法》、GB 4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》、GB 4789.14—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》、GB 4789.30—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》、GB 4789.10—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》等标准规定的方法操作。

1.3.2 致病菌鉴定

1.3.1分离的致病菌可疑菌落划线接种BHA平板进行菌株纯化备用。采用MALDI-TOF/MS甲酸提取法初筛,刮取菌落至300 μL灭菌超纯水中涡旋1 min。加入900 μL无水乙醇,涡旋1 min后12 470×g离心2 min去上清,重复1次至完全除去乙醇溶液。加入50 μL 70%的甲酸水溶液,涡旋至底部沉淀完全悬浮混匀后加入50 μL乙腈,吹打混匀,12 470×g离心2 min。取1 μL上清液均匀涂布至靶

板上,晾干,加1 μL IVD HCCA(质谱样品处理基质)基质溶液均匀覆盖在样品表面,晾干后上机检测。将MALDI-TOF 鉴定后的菌株使用 VITEK 2 COMPACT 全自动生化鉴定系统对初筛后的菌落进行复核鉴定。

1.3.3 药物敏感性实验

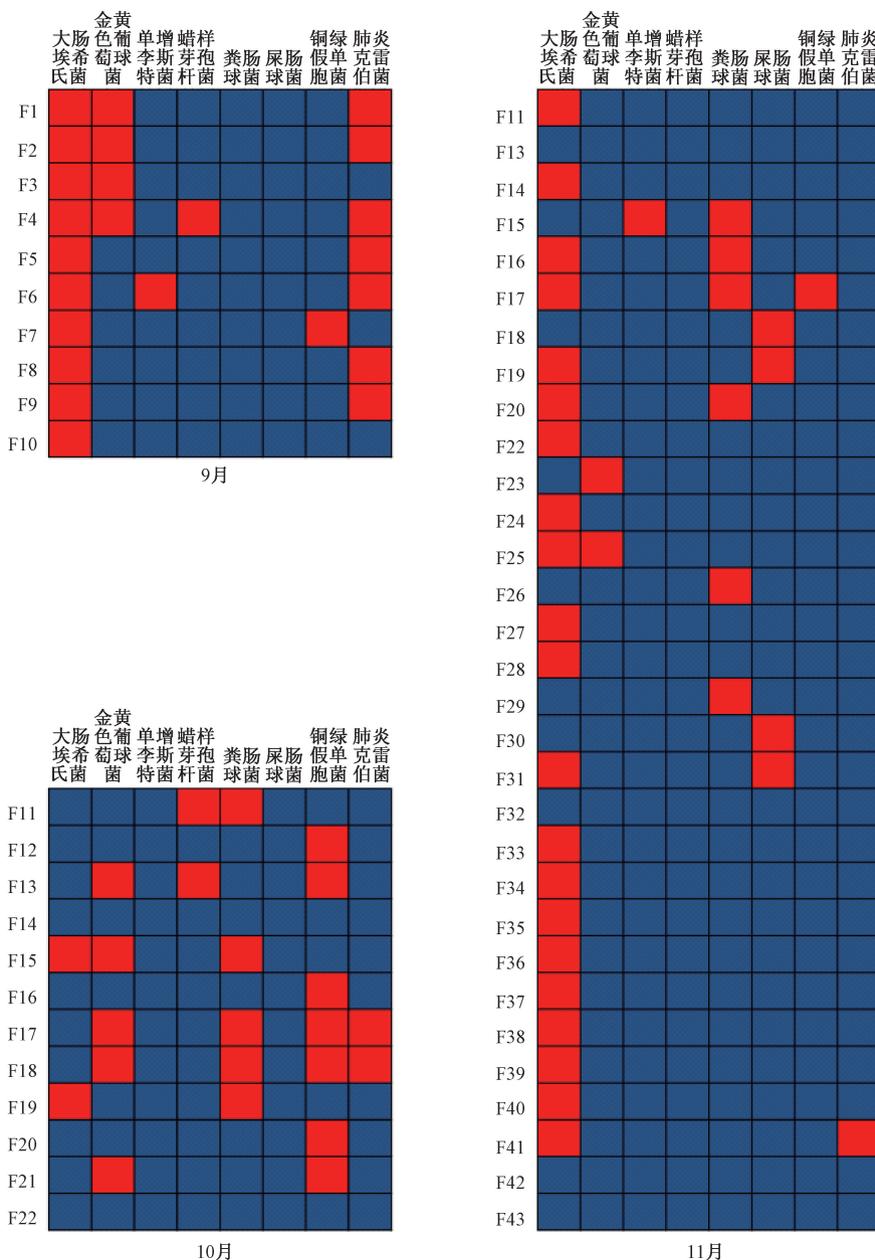
复核鉴定后的致病菌分离株分别使用 VITEK 革兰氏阴性菌药敏鉴定卡 GN09 和革兰氏阳性菌药敏鉴定卡 GP67,按照产品说明书操作进行抗生素耐药性检测。

2 结果

2.1 生乳中的致病菌检测结果

采集自 2019 年 9-11 月 43 家牧场的 53 份样

品中细菌分离情况如图 1 所示,其中 33 份样品检出大肠埃希氏菌(62.26%,33/53),11 份样品检出金黄色葡萄球菌(20.75%,11/53),3 份样品中检出蜡样芽孢杆菌(5.66%,3/53),2 份样品检出单增李斯特菌(3.77%,2/53),53 份样品均未分离出克罗诺杆菌和沙门氏菌。9 月采集的 10 份样品均检出大肠埃希氏菌,4 份样品检出金黄色葡萄球菌(40.00%,4/10),1 份样品检出蜡样芽孢杆菌(10.00%,1/10),1 份样品检出单增李斯特菌(10.00%,1/10)。10 月采集的样品中,2 份检出大肠埃希氏菌(16.67%,2/12),5 份样品检出金黄色葡萄球菌(41.67%,5/12),2 份样品检出蜡样芽孢杆菌(16.67%,2/12),未检出单增李斯特菌。11 月采



注:红色代表检出;蓝色代表未检出

图 1 9-11 月份 43 家牧场样品中细菌分布情况

Figure 1 Bacterial distribution in 43 pasture samples from September to November

集的样品中 21 份检出大肠埃希氏菌 (67.74%, 21/31), 2 份样品检出金黄色葡萄球菌 (6.45%, 2/31), 1 份样品检出单增李斯特菌 (3.23%, 1/31), 未检出蜡样芽孢杆菌, 其中金黄色葡萄球菌污染随气温降低呈下降趋势。

在 MALDI-TOF/MS 初筛过程中, 除目标菌株外还从 11 份样品中检出粪肠球菌 (20.75%, 11/53), 10 份样品存在肺炎克雷伯菌污染 (18.87%, 10/53), 9 份样品检出铜绿假单胞菌 (16.98%, 9/53), 此外还有 4 份样品存在屎肠球菌污染 (7.55%, 4/53)。全部 53 份样品中共 3 份样品分离到 4 种菌 (5.66%, 3/53), 6 份样品分离到 3 种菌 (11.32%, 6/53), 15 份样品分离到 2 种菌 (28.30%, 15/53), 23 份样品中仅分离到 1 种菌 (43.40%, 23/53), 6 份样品未检出目标菌 (11.32%, 6/53)。

本研究共分离到 231 株菌, 其中一个样品检测过程中同一目标菌的多个可疑菌落鉴定后均被保藏, 用于后续药物敏感性实验, 包括大肠埃希氏菌 138 株, 粪肠球菌 22 株, 金黄色葡萄球菌 21 株, 肺炎克雷伯菌 17 株, 铜绿假单胞菌 17 株, 单增李斯特菌 9 株, 屎肠球菌 4 株, 蜡样芽孢杆菌 3 株。

2.2 药物敏感性实验结果

选取 117 株生乳分离株进行药物敏感性实验,

其中 58 株菌耐药, 总体耐药率为 49.57% (58/117)。有 90 株为革兰氏阴性菌分离自 37 个牧场, 包括 71 株大肠埃希氏菌、12 株肺炎克雷伯菌和 7 株铜绿假单胞菌。耐药结果显示, 90 株革兰氏阴性菌菌株中共有 33 株耐药, 耐药率 36.67% (33/90), 见表 1。全部 12 株肺炎克雷伯菌和 7 株铜绿假单胞菌均为耐药株, 另有 14 株大肠埃希氏菌耐药株, 耐药率 19.72% (14/71)。12 株肺炎克雷伯菌共对 4 种抗生素耐药, 其中氨苄西林和哌拉西林耐药率较高, 分别为 100.00% 和 41.63%, 共有 4 种耐药谱, 主要的耐药谱特征为 AM ($n=7$) (表 3)。7 株铜绿假单胞菌共对 10 种抗生素耐药, 除亚胺培南外对其余 9 种抗生素均耐药, 共有 2 种耐药谱, 主要的耐药谱特征为 AM-SAM-CZ-CXM-CXM (AX)-CTT-CRO-FT-SXT ($n=6$)。14 株大肠埃希氏菌共对 14 种抗生素耐药, 其中氨苄西林、头孢唑林、头孢呋辛酯、头孢呋辛、哌拉西林和头孢曲松耐药率较高, 分别为 18.31%、16.90%、16.90%、15.49%、14.08% 和 12.68%, 共有 12 种耐药谱, 主要的耐药特征谱为 AM-PIP-CZ-CXM-CXM (AX)-CAZ-CRO-ATM ($n=2$) 和 AM-SAM-PIP-CZ-CXM-CXM (AX)-CAZ-CRO-ATM-SXT ($n=2$)。

表 1 90 株革兰氏阴性菌抗生素耐药情况

Table 1 Antibiotic resistance of 90 strains of Gram-negative bacteria

抗生素种类	耐药菌株数/株 (%) *			总耐药率/%
	大肠埃希氏菌 ($n=71$)	肺炎克雷伯菌 ($n=12$)	铜绿假单胞菌 ($n=7$)	
氨苄西林 (AM)	13 (18.31)	12 (100.00)	7 (100.00)	35.56
头孢唑啉 (CZ)	12 (16.90)	0	7 (100.00)	21.11
头孢呋辛酯 (CXM-AX)	12 (16.90)	0	7 (100.00)	21.11
头孢呋辛 (CXM)	11 (15.49)	0	7 (100.00)	20.00
头孢曲松 (CRO)	9 (12.68)	0	7 (100.00)	17.78
哌拉西林 (PIP)	10 (14.08)	5 (41.67)	0	16.67
氨苄西林/舒巴坦 (SAM)	7 (9.86)	1 (8.33)	7 (100.00)	16.67
甲氧苄啉/磺胺甲恶唑 (SXT)	5 (7.04)	0	7 (100.00)	13.33
呋喃妥因 (FT)	0	1 (8.33)	7 (100.00)	8.89
头孢替坦 (CTT)	0	0	7 (100.00)	7.78
头孢他啶 (CAZ)	5 (7.04)	0	0	5.56
庆大霉素 (GM)	2 (2.82)	0	0	2.22
环丙沙星 (CIP)	2 (2.82)	0	0	2.22
左旋氧氟沙星 (LEV)	2 (2.82)	0	0	2.22
妥布霉素 (TM)	1 (1.41)	0	0	1.11
亚胺培南 (IPM)	0	0	1 (14.29%)	1.11
哌拉西林/他唑巴坦 (TZP)	0	0	0	0
头孢吡肟 (FEP)	0	0	0	0
美罗培南 (MEM)	0	0	0	0
阿米卡星 (AN)	0	0	0	0
氨基糖苷 (ATM)	6 (8.45%)	0	/	/

注: “/”为未检测; “*” 括号中为耐药率

表2 27株革兰氏阳性菌抗生素耐药情况
Table 2 Antibiotic resistance of 27 strains of Gram-positive bacteria

抗生素种类	耐药菌株数/株(%) [*]			总耐药率/%
	金黄色葡萄球菌(<i>n</i> =12)	粪肠球菌(<i>n</i> =11)	屎肠球菌(<i>n</i> =4)	
克林霉素(CM)	6 (50.00)	11 (100.00)	4 (100.00)	77.78
奎奴普丁/达福普丁(QDA)	0	11 (100.00)	0	40.74
芩青霉素(P)	8 (66.67)	1 (9.09)	0	33.33
红霉素(E)	5 (41.67)	1 (9.09)	3 (75.00)	33.33
环丙沙星(CIP)	3 (25.00)	1 (9.09)	2 (50.00)	22.22
莫西沙星(MXF)	2 (16.67)	1 (9.09)	3 (75.00)	22.22
万古霉素(VA)	3 (25.00)	1 (9.09)	0	14.81
四环素(TE)	1 (8.33)	2 (18.18)	1 (25.00)	14.81
左旋氧氟沙星(LEV)	2 (16.67)	1 (9.09)	0	11.11
利奈唑胺(LNZ)	1 (8.33)	0	0	3.70
替加环素(TGC)	0	0	0	0
呋喃妥因(FT)	0	0	0	0
诱导性克林霉素耐药(ICR)	1 (POS)	/	/	/
氨苄西林(AM)	/	1 (9.09)	0	/
苯唑西林(OX1)	0	/	/	/
高浓度庆大霉素(协同作用)(HLG)	/	0	0	/
高浓度链霉素(协同作用)(HLS)	/	2 (18.18)	2 (50.00)	/
庆大霉素(GM)	0	/	/	/
头孢西丁平板筛(OXSF)	0	/	/	/
利福平(RA)	0	/	/	/
甲氧苄啶/磺胺甲恶唑(SXT)	0	/	/	/

^{*} /为未检测,括号中为耐药率,POS代表阳性

27株革兰氏阳性菌分离自20个牧场,包括12株金黄色葡萄球菌、11株粪肠球菌和4株屎肠球菌,耐药结果显示,共有25株耐药株(表2),耐药率为92.59%(25/27)。粪肠球菌、屎肠球菌和金黄色葡萄球菌的耐药率分别为100.00%、100.00%和83.33%(10/12)。11株粪肠球菌共对11种抗生素耐药,其中对克林霉素和奎奴普丁/达福普丁均耐药,共有6种耐药谱,主要的耐药谱特征为CM-QDA(*n*=6)。10株金黄色葡萄球菌共对9种抗生素耐药,其中芩青霉素、克林霉素、红霉素的耐药率较高,分别为66.67%、50.00%和41.67%,共有7种耐药谱,主要的耐药谱特征为P-E-CM(*n*=4)。4株屎肠球菌共对6种抗生素耐药,其中克林霉素、红霉素和莫西沙星耐药率较高,分别为100.00%、75.00%和75.00%,共有4种耐药谱。

全部58株耐药菌分别来自33个牧场,占全部牧场的89.19%(33/37),其中33株革兰氏阴性菌耐药菌来自23个牧场占62.16%(23/37),25株革兰氏阳性菌耐药菌来自19个牧场占51.35%(19/37)。其中9月份10个牧场共分离到15株耐药菌,占当月牧场的100.00%(10/10),10月份的9个牧场分离到17株耐药菌,占当月牧场的83.33%(10/12),11月份的21个牧场分离到26株

耐药菌,占当月牧场的67.74%(21/31)。其中F17牧场连续两个月分离到的铜绿假单胞菌具有相同的耐药谱,提示该菌在牧场可能存在持留污染。

3 讨论

抗生素是牧场治疗奶牛乳腺炎等感染性疾病的主要手段,随着细菌感染引发乳腺炎和抗生素治疗在牧场频繁发生,也引起了人们对生乳中耐药细菌的重视。近年来多篇报道发现生乳中分离的大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌等显示了对多种抗生素耐受的特性^[7]。

本研究对2019年9-11月份采集的来自43家牧场的53份生乳中沙门氏菌、克罗诺杆菌、大肠埃希氏菌等6种致病菌的污染情况进行研究,其中大肠埃希氏菌的污染率最高,为62.26%(33/53),高于RANJBAR等^[8]2018年报道的生乳和乳制品中30.16%的污染率。大肠埃希氏菌作为人和多种动物的肠道内共生菌,其致病型菌株引起的腹泻等疾病可使患者虚弱甚至死亡,而乳和乳制品作为该菌向人传播的一条重要途径,受到了企业、科研及食品安全机构的广泛关注^[9-10]。大肠埃希氏菌10月污染率为16.67%(2/12),11月污染率为67.47%(21/31)低于9月100.00%(10/10)的污染率,提

表 3 6 种耐药菌的耐药谱

Table 3 Drug resistance spectrum of 6 resistant bacteria

菌株	耐受抗生素数量	耐药谱	菌株数/株
大肠埃希氏菌	1	AM	1
	3	AM-SAM-SXT	1
	3	CZ-CXM-CXM(AX)	1
	4	AM-PIP-CZ-CXM(AX)	1
	5	AM-SAM-CZ-CXM-CXM(AX)	1
	6	AM-PIP-CZ-CXM-CXM(AX)-CRO	1
	7	AM-PIP-CZ-CXM-CXM(AX)-CRO-ATM	1
	8	AM-SAM-PIP-CZ-CXM-CXM(AX)-CRO-GM	1
	8	AM-PIP-CZ-CXM-CXM(AX)-CAZ-CRO-ATM	2
	10	AM-SAM-PIP-CZ-CXM-CXM(AX)-CAZ-CRO-ATM-SXT	2
	12	AM-SAM-PIP-CZ-CXM-CXM(AX)-CRO-GM-TM-CIP-LEV-SXT	1
	12	AM-SAM-PIP-CZ-CXM-CXM(AX)-CAZ-CRO-ATM-CIP-LEV-SXT	1
肺炎克雷伯菌	1	AM	7
	2	AM-PIP	3
	3	AM-SAM-PIP	1
	3	AM-PIP-FT	1
铜绿假单胞菌	9	AM-SAM-CZ-CXM-CXM(AX)-CTT-CRO-FT-SXT	6
	10	AM-SAM-CZ-CXM-CXM(AX)-CTT-CRO-IMP-FT-SXT	1
金黄色葡萄球菌	1	VA	1
	2	P-CIP	1
	2	P-VA	1
	3	P-E-CM	4
	3	CM-LNZ-VA	1
	5	P-CIP-LEV-MXF-TE	1
	6	P-CIP-LEV-MXF-E-CM	1
粪肠球菌	2	CM-QDA	6
	3	E-CM-QDA	1
	3	HLS-CM-QDA	1
	4	HLS-CM-QDA-TE	1
	5	P-AM-CM-QDA-VA	1
	6	CIP-LEV-MXF-CM-QDA-TE	1
屎肠球菌	2	E-CM	1
	3	MXF-E-CM	1
	4	HLS-CIP-MXF-CM	1
	6	HLS-CIP-MXF-E-CM-TE	1

示除采集和储存过程中的卫生条件外,季节温度对生乳中大肠埃希氏菌污染也存在潜在的相关性。此外存在,9月20.00%(2/10)的牧场存在耐药大肠埃希氏菌污染,10月存在大肠埃希氏菌污染的牧场中100.00%(2/2)存在耐药大肠埃希氏菌污染,11月存在大肠埃希氏菌污染的牧场中47.62%(10/21)存在耐药大肠埃希氏菌污染,提示菌株耐药与季节温度变化无关。金黄色葡萄球菌是一种重要的人畜共患病致病菌,是引起奶牛乳房炎的重要致病菌之一,感染奶畜后可随着奶一同排出从而威胁消费者的安全^[11]。样品中金黄色葡萄球菌的污染率为20.75%(11/53),低于KOU等^[11]2021年报道的144份新疆采集的生乳中43.1%的污染率,但高于柳海宾等^[12]报道的432份生乳中3.24%的污染率。金黄色葡萄球菌9-11月的污染率分别为40.00%(4/10)、41.67%(5/12)和6.45%(2/31),这与奶牛乳房炎发病率夏季高,秋冬季低的特点一

致^[13]。9月存在金黄色葡萄球菌污染的牧场中75.00%(3/4)存在耐药现象,10月存在污染的牧场中80.00%(4/5)存在耐药现象,11月存在污染的牧场中100.00%(2/2)为耐药金黄色葡萄球菌污染。

药敏结果显示,33株革兰氏阴性耐药菌中66.67%(22/33)的菌株至少对3种抗生素耐受,其中8株大肠埃希氏菌和全部7株铜绿假单胞菌对3个以上不同类型的抗生素耐药,为多重耐药菌株。肺炎克雷伯菌生乳分离株不同于呼吸道分离菌株多重耐药率高的特点,除一株同时对青霉素类和硝基呋喃类抗生素耐药外,都只对青霉素类耐药且主要的耐药谱为AM($n=7$),这与课题组之前报道的腹泻病例粪便标本来源的肺炎克雷伯菌主要耐药谱为AM结果相似^[14]。氨苄西林被广泛应用于革兰氏阴性菌引起的人畜肺部感染、泌尿道感染及牛乳腺炎等,近年来随着产 β -内酰胺酶菌株的增多导致的氨苄西林耐药,临床上常与人工合成的 β -内酰

胺酶抑制剂舒巴坦联合使用。本研究的33株革兰氏阴性耐药菌中32株对氨苄西林耐药,其中15株对氨苄西林舒巴坦也耐受,提示包括大肠埃希氏菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌在内的部分生乳分离株可能 β -内酰胺酶活性较高。他唑巴坦作为 β -内酰胺酶抑制剂与哌拉西林协同用药时效果优于氨苄西林舒巴坦,包括15株哌拉西林耐药株在内的全部菌株均对哌拉西林他唑巴坦敏感。33株耐药菌中头孢类药物耐药率整体较高,19株大肠埃希氏菌和铜绿假单胞菌至少对2种头孢类药物耐药。16株对1-3代头孢均耐药的菌株中,6株大肠埃希氏菌在此基础上还对4代头孢菌素-头孢吡肟中介,显示出了一定的耐药趋势,也提示头孢类药物之间存在交叉耐药的情况,牧场用药时需要进一步优化治疗方案。目前食品中铜绿假单胞菌耐药情况十分严重,研究发现食源性假单胞菌对不同种类的抗生素耐药,本研究的7株铜绿假单胞菌均为多重耐药^[15-16]。

25株阳性耐药菌中24株对两种以上抗生素耐药,其中62.50%的菌株对3种以上抗生素耐药且均为多重耐药菌株。本研究检测的12株金黄色葡萄球菌中10株为耐药菌包括7株多重耐药菌,其中苜青霉素、克林霉素和红霉素耐药所占的比例分别为66.67%、50.00%和41.67%,这与KOU等^[11]报道的生乳中金黄色葡萄球菌青霉素类药物耐药率高且菌株多重耐药率高的结果一致。此外万古霉素一直被认为是抵抗革兰氏阳性菌感染的最后一道防线,本研究25.00%的金黄色葡萄球菌万古霉素耐药,而利奈唑胺临床上用于治疗万古霉素耐药的肠球菌血液感染,而本研究分离到1株金黄色葡萄球菌对万古霉素和利奈唑胺同时耐受,该菌的传播将给牧场和临床治疗带来更大的挑战。15株包括粪肠球菌和屎肠球菌在内的肠球菌全部为耐药菌,但与CHINGWARU等^[17]报道的96%~97%的氨苄西林耐药率不同,本研究分离的菌株中仅1株粪肠球菌对青霉素类的氨苄西林和苜青霉素耐药。15株粪肠球菌对克林霉素全部耐药,其中粪肠球菌和屎肠球菌具有不同的耐药特征,11株粪肠球菌对奎奴普丁/达福普丁全部耐药外对其他抗生素的耐药率不高,而4株粪肠菌中有3株对喹诺酮类和大环内酯类耐药。此外有4株粪肠菌存在高浓度链霉素(协同作用)耐受的现,可能与牧场链霉素使用不当有关。

综上所述,不同牧场采集的生乳中细菌的污染情况呈现多样性,但是具有一定的季节特征,随着气温降低污染呈现降低的趋势。此外生乳中的细

菌分离株多重耐药率高,并存在万古霉素、利奈唑胺耐药,可能与牧场抗生素治疗不当或耐药菌之间的传递有关。为了降低生乳中致病菌和耐药菌对消费者健康的危害,需要管理部门加强对牲畜饲养、生乳采集、运输和销售环节的管控,特别是对于兽用抗生素使用标准需要进一步进行规范和管理,防止抗生素滥用带来的耐药菌加速传播的威胁。

参考文献

- [1] BERGE A C, BAARS T. Raw milk producers with high levels of hygiene and safety[J]. *Epidemiology and Infection*, 2020, 148: e14.
- [2] QUIGLEY L, O'SULLIVAN O, STANTON C, et al. The complex microbiota of raw milk [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37 (5): 664-698.
- [3] BERHE G, WASIHUN A G, KASSAYE E, et al. Milk-borne bacterial health hazards in milk produced for commercial purpose in Tigray, northern Ethiopia[J]. *BMC Public Health*, 2020, 20 (1): 894.
- [4] 张竞丰, 王丽, 陈洵, 等. 乳及乳制品中常见“活的非可培养态”食源致病菌研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(3): 300-306.
- [5] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk[J]. *EFSA Journal*, 2015, 13 (1): 3940.
- [6] 姜竹茂, 艾春梅, 王琳茹, 等. 食品中耐药细菌风险评估的研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(5): 282-288.
- [7] MENG L, LIU H M, LAN T, et al. Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from raw milk revealed by whole genome sequencing [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1005.
- [8] RANJBAR R, SAFARPOOR DEHKORDI F, SAKHAEI SHAHREZA M H, et al. Prevalence, identification of virulence factors, O-serogroups and antibiotic resistance properties of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from raw milk and traditional dairy products[J]. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2018, 7 (1): 1-11.
- [9] BÉLANGER L, GARENAUX A, HAREL J, et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli* [J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2011, 62 (1): 1-10.
- [10] CAINE L A, NWODO U U, OKOH A I, et al. Occurrence of virulence genes associated with diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw cow's milk from two commercial dairy farms in the Eastern Cape Province, South Africa [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2014, 11 (11): 11950-11963.
- [11] KOU X M, CAI H X, HUANG S D, et al. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw milk in northern Xinjiang, China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 705947.
- [12] 柳海滨, 张燕, 杜欣军, 等. 生鲜乳中金黄色葡萄球菌检测及性状分析[J]. *中国乳品工业*, 2017, 45(9): 17-21.

- [13] 郭昕. 奶牛乳房炎的发病规律及危害与预防措施[J]. 畜牧兽医科技信息, 2008, 12:52-53.
- [14] 甘辛, 许学斌, 王伟, 等. 临床病例痰液和腹泻病例粪便标本来源的肺炎克雷伯菌分离株的耐药特征分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(12): 4889-4894.
- [15] BEZANSON G S, MACINNIS R, POTTER G, et al. Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 127 (1-2): 37-42.
- [16] CARMINATI D, BONVINI B, ROSSETTI L, et al. Investigation on the presence of blue pigment-producing *Pseudomonas* strains along a production line of fresh mozzarella cheese [J]. Food Control, 2019, 100:321-328.
- [17] CHINGWARU W, MPUCHANE S F, GASHE B A. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from milk, beef, and chicken and their antibiotic resistance [J]. Journal of Food Protection, 2003, 66(6):931-936.

研究报告

小麦粉中细交链孢菌酮酸和腾毒素标准物质的研制

谢继安¹, 刘柏林¹, 赵紫微¹, 杨欣², 张磊², 杨大进², 赵云峰²

(1. 安徽省疾病预防控制中心, 安徽 合肥 230601; 2. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100050)

摘要:目的 研制小麦粉中细交链孢菌酮酸和腾毒素标准物质。方法 利用天然污染交链孢霉毒素的小麦样籽粒制备, 按照规定的定值程序, 形成符合国家相关要求的小麦粉中细交链孢菌酮酸和腾毒素标准物质。结果 研制成功2个不同浓度水平的小麦粉中细交链孢菌酮酸和腾毒素标准物质, 并获批国家二级标准物质[标准号: GBW(E) 100547 和 GBW(E) 100548]。结论 该标准物质是目前国际上唯一的天然污染细交链孢菌酮酸和腾毒素的小麦粉标准物质, 研制过程为我国开展粮食中新型真菌毒素基体标准物质的研制提供重要方法学借鉴。

关键词:小麦粉; 细交链孢菌酮酸; 腾毒素; 交链孢霉毒素; 标准物质

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2021)06-0716-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2021.06.013

Preparation and certification of wheat flour reference material for tenuazonic acid and tentoxin using isotope dilution- liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIE Ji'an¹, LIU Bolin¹, ZHAO Ziwei¹, YANG Xin², ZHANG Lei²,
YANG Dajin², ZHAO Yunfeng²

(1. Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hefei 230601, China;
2. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective A method for the preparation and certification of the reference material of tenuazonic acid (TeA) and tentoxin (TEN) in wheat flour was developed. **Methods** The reference material of TeA and TEN in wheat flour was prepared from grain which naturally contaminated alternaria toxins, characterized with national standard regulation. **Results** The reference materials of TeA and TEN in wheat flour which contains two values were developed. The reference materials were approved the second class of National Certified Reference Materials [GBW (E) 100547 and GBW (E) 100548]. **Conclusion** The reference materials are currently the only National Certified Reference Materials of wheat flour that naturally contaminate TeA and TEN. The reference materials provides important method ological reference for the development of matrix reference materials with new mycotoxins in grain in China.

Key words: Wheat flour; tenuazonic acid; tentoxin; alternaria toxins; reference material

收稿日期: 2021-10-21

基金项目: 科技部国家重点研发计划 (2017YFC1601302); 安徽省卫生计生委公共卫生与预防医学科研课题 (2017jk009)

作者简介: 谢继安 男 副主任技师 研究方向为食品理化检验和研究工作 E-mail: 16615925@qq.com

通信作者: 杨大进 男 研究员 研究方向为食品安全风险监测 E-mail: yangdajin@ cfsa. net. cn

赵云峰 男 研究员 研究方向为食品理化检验技术研究 E-mail: zhaoyf@ cfsa. net. cn