

# 奶源大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析

张鹏飞<sup>1#</sup>, 王婷<sup>1#</sup>, 钟楠<sup>1</sup>, 赵春花<sup>1</sup>, 杨飞<sup>1</sup>, 安晶<sup>2</sup>, 王晓<sup>2</sup>,  
俞英<sup>2</sup>, 王新<sup>1\*</sup>

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100; 2. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100193)

**摘要: 目的** 了解原料乳和乳房炎奶样中大肠杆菌的污染情况及菌株耐药性。**方法** 通过选择培养和聚合酶链式反应方法对 2 个奶牛场采集到的 206 份奶样(129 份乳房炎牛奶样品和 77 份原料乳样品)进行大肠杆菌的分离鉴定, 采用药敏纸片法对分离株进行 25 种常用抗生素耐药特征检测。**结果** 206 份奶样中大肠杆菌的污染率为 8.3%(17/206), 其中乳房炎和原料乳样品的污染率分别为 7.0%(9/129)和 10.4%(8/77)。从 17 份污染的样本中共分离到 34 株大肠杆菌, 其中乳房炎奶样分离到 18 株, 原料乳分离到 16 株。药敏结果显示, 奶样分离株对氨苄西林耐药最为普遍(44.1%, 15/34), 对头孢类抗生素也有较强耐药性[如头孢唑啉和头孢噻吩(20.6%, 7/34)]。最常见的耐药谱为 AMP(11.8%, 4/34), AMP-CXM-CFZ-KF-F 和 AMP-CXM-CFZ-CTX-PRL-CRO-KF(5.9%, 2/34)。此外, A, B 奶牛场分离株的耐药率( $P=0.007$ )和耐药谱总体差异显著( $P=0.043$ )。**结论** 奶样中存在大肠杆菌的污染情况, 菌株普遍对氨苄西林和头孢类抗生素耐药且部分对非兽用抗生素也有一定的耐药性。因此, 为避免耐药大肠杆菌对人类, 尤其是抵抗力较弱的老年人和婴幼儿的感染和中毒, 除应加强对奶源地的管理外, 还需防止抗生素的滥用。

**关键词:** 牛乳乳房炎奶样; 原料乳; 大肠杆菌; 耐药性

## Isolation and identification of *Escherichia coli* in milk and its drug resistance analysis

ZHANG Peng-Fei<sup>1#</sup>, WANG Ting<sup>1#</sup>, ZHONG Nan<sup>1</sup>, ZHAO Chun-Hua<sup>1</sup>, YANG Fei<sup>1</sup>, AN Jing<sup>2</sup>,  
WANG Xiao<sup>2</sup>, YU Ying<sup>2</sup>, WANG Xin<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the contamination and drug resistance of *Escherichia coli* (*E. coli*) in raw milk and mastitis milk samples. **Methods** The *E. coli* strains contained in 206 milk samples (129 samples of mastitis milk and 77 samples of raw milk) from 2 dairy farms were isolated and identified by selective culture and PCR. The drug-sensitive paper method was used to detect the resistance of 25 commonly used antibiotics to isolates. **Results** The contamination rate of *E. coli* in 206 milk samples was 8.3% (17/206), and the contamination rates of

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31871894, 31271858)、国家自然科学基金联合基金项目(U1703119)、陕西省社会发展领域攻关项目(2018SF-110)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31871894, 31271858), the Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (U1703119) and the Project of Science and Technology of Social Development in Shaanxi Province (2018SF-110)

<sup>#</sup>张鹏飞和王婷为共同第一作者。

<sup>#</sup>ZHANG Peng-Fei and WANG Ting are co-first authors.

\*通讯作者: 王新, 博士, 教授, 主要研究方向为食源性病原菌及其分子生物学和食品安全。E-mail: xinwang7516@nwsuaf.edu.cn

\*Corresponding author: WANG Xin, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, No.22, Xiong Road, Yangling District, Xianyang City, 712100, China. E-mail: xinwang7516@nwsuaf.edu.cn

mastitis and raw milk samples were 7.0% (9/129) and 10.4% (8/77), respectively. A total of 34 *E. coli* strains were isolated from 17 contaminated samples, including 18 isolated from mastitis and 16 from raw milk samples. Drug susceptibility results showed that milk sample isolates were the most commonly resistant to ampicillin (44.1%, 15/34) and showed the higher drug resistance cephalosporin antibiotics [such as cefazolin and cefalotin (20.6%, 7/34)]. The most common antimicrobial resistance profiles were AMP (11.8%, 4/34), AMP-CXM- CFZ-KF-F and AMP-CXM-CFZ-CTX-PRL-CRO-KF (5.9%, 2/34). Moreover, the overall differences in drug susceptibility ( $P=0.007$ ) and antimicrobial resistance profiles ( $P=0.043$ ) between A and B dairy isolates were significant.

**Conclusion** The contamination of *E. coli* is existed in milk samples, and the strains are generally resistant to ampicillin and cephalosporin, and some are also resistant to non-veterinary antibiotics. Therefore, to avoid the occurrence of infection and poisoning of resistant *E. coli* to humans, especially the elderly and infants with weak resistance, it is suggested not only to strengthen the management of the milk source but also to prevent the abuse of antibiotics.

**KEY WORDS:** mastitis milk samples; raw milk; *Escherichia coli*; antibiotic resistance

## 1 引言

随着乳及其制品的消费需求不断增加, 乳品安全事故也频繁发生, 由食源性致病菌引发的中毒事件更是层出不穷, 这引起了人们的高度关注<sup>[1,2]</sup>。乳房炎是我国奶牛场中发病率最高的疾病<sup>[3]</sup>。据报道, 我国 25%~65%的奶牛患有隐性乳房炎<sup>[4,5]</sup>, 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是我国奶牛乳房炎的主要致病菌之一<sup>[6]</sup>。目前, 养殖户在奶牛乳房炎治疗中主要依赖于抗生素, 而抗生素的大量使用导致了一系列问题, 如药物残留和耐药性<sup>[7]</sup>。乳房炎牛奶中的病原微生物在稍适宜的环境下就会大量繁殖, 造成乳及乳制品的腐败变质, 如果被人食用, 极易引起食源性致病菌感染, 产生发烧、呕吐、腹泻等症状, 严重威胁消费者的健康<sup>[8-10]</sup>。

目前, 大肠杆菌的耐药性已成为一个全球性问题, 几乎所有大肠杆菌都能获得耐药基因, 且耐药谱广<sup>[11]</sup>。各国由于医疗水平及用药背景不同, 大肠杆菌的耐药性呈现出差异, 但总体细菌的耐药性呈现不断加剧和蔓延的趋势<sup>[12]</sup>。大肠杆菌为条件性致病性, 在人和动物肠道中可以通过水平转移方式将耐药基因转移至其他细菌<sup>[13]</sup>, 给食品安全与卫生造成巨大的威胁, 也给大肠杆菌疾病的预防和治疗带来巨大的难题。目前, 国内外对食源性致病菌和动物性食物污染菌耐药的研究报道较多, 但对指示菌(如大肠杆菌)的耐药分析较少。

本研究对 206 份乳房炎和原料牛奶样品进行大肠杆菌的分离鉴定和耐药性检测, 通过分析其污染率和耐药性, 为我国奶牛场乳房炎的合理、有效治疗及乳和乳制品的安全评估提供理论依据, 并为大肠杆菌疾病的临床诊治提供用药指导。

## 2 材料与方法

### 2.1 试剂与仪器

蛋白胨缓冲液(buffered peptone water, BPW)、麦康凯琼脂(MacConkey Agar)、伊红美兰琼脂(eosin-methylene blue, EMB)、LB (luria-bertani, LB)营养琼脂(北京陆桥技术责任有限公司); PCR 所用试剂(Taq 酶、Buffer(Mg<sup>2+</sup>)和 dNTP)、DL 2000 DNA marker[大连宝生物(TaKaRa)公司]; 琼脂糖(Agarose, 美国 Sigma 公司); 四环素、庆大霉素、头孢西丁、头孢哌酮、阿米卡星等 25 种药敏纸片(杭州天和微生物试剂有限公司); 氯化钠(分析纯, 西安化学试剂厂)。大肠埃希氏菌 ATCC 25922 和粪肠球菌 ATCC 29212 为药敏质控菌株, 均由中国食品药品检定研究院崔生辉博士惠赠。

Mycircle PCR 仪、GEL DOC XR 凝胶成像仪(美国伯乐公司); MDF-U5411 高压灭菌锅(上海申安高压仪器设备有限公司)。

### 2.2 样品采集

为了解原料乳及乳房炎奶样被大肠杆菌的污染情况, 本研究于 2012 年 3 月对黑龙江省 2 个奶牛场产奶牛群及患乳房炎牛群随机采集牛奶样本 206 份, 其中乳房炎奶样 129 份, 原料乳样品 77 份, 具体采样信息见表 1。所有的样品保存于 100 mL 无菌管中, 低温运至实验室, 在 4 h 内进行大肠杆菌的分离鉴定, 然后保存于-80 °C 冰箱。

### 2.3 菌株的分离鉴定

参照周陆红等<sup>[14]</sup>描述的方法对大肠杆菌进行分离鉴定。准确吸取 25 mL 采集的牛奶样品于 225 mL BPW 肉汤中, 37 °C 180 r/min 培养 18~24 h。然后将增菌液三笔划线于麦康凯平板, 37 °C 培养 16~18 h。随后每个样品挑取可疑

单菌落于伊红美蓝平板, 37 °C 培养 18~24 h。选取紫黑色带金属光泽的单菌落纯化于 LB 平板, 37 °C 培养 18~24 h。最后采用 PCR 扩增大肠杆菌属特异性 *uidA* 基因对分离株进行鉴定(引物序列见表 2), 每份阳性样本分离两株菌。将 *uidA* 基因阳性的所有菌株用棉签涮于 50% 的 LB-甘油管中, 于 -80 °C 冰箱保存。

表 1 样品采集类型和数量  
Table 1 Sample collection type and quantity

样品来源	A 场	B 场	样品总数
乳房炎奶样	50	79	129
原料乳	49	28	77
总计	99	107	206

## 2.4 药敏性检测

采用美国临床和实验室标准协会 (clinical and laboratory standard institute, CLSI) 推荐的纸片扩散法, 对分离的大肠杆菌进行药敏试验。用无菌镊子夹取药敏纸片均匀贴于涂抹菌液的 Mueller-Hinton 琼脂培养基, 37 °C 培养 24 h。根据 CLSI 抑菌圈大小对结果进行判读。测定的常用抗生素包括氨苄西林 (ampicillin, AMP)、氨曲南 (aztreonam, ATM)、卡拉霉素 (kalamycin, KAN)、链霉素 (streptomycin, S)、氯霉素 (chloramphenicol, CHL)、头孢唑啉 (cefamezin, CFZ)、四环素 (tetracyclines, TET)、头孢呋辛 (cefuroxim, CXM)、头孢噻吩 (cephalothin, KF)、哌拉西林 (piperacillin, PRL)、头孢噻肟 (cefotaxime, CTX)、头孢他啶 (cefotaxime, CAZ)、头孢曲松 (ceftriaxone, CRO)、头孢吡肟 (cefepime, FEP)、诺氟沙星 (norfloxacin, NOR)、呋喃妥因 (nitrofurantoin, F) 等共 25 种。

表 2 PCR 引物序列  
Table 2 Sequences of PCR primers

基因	引物名称	引物序列(5'→3')	扩增产物大小/bp
<i>uidA</i>	UIDF2	CGATTCCGTTTCAGGGTT	194
	UIDR2	TTTCTGATAGGACCGAGCAT	

表 3 A 和 B 两奶场原料乳和乳房炎奶样中大肠杆菌分离情况  
Table 3 Prevalence of *E.coli* in raw milk and milk of clinical mastitis from dairy farms A and B

类别	A 场			B 场			总计		
	样本数	阳性数	阳性率/%	样本数	阳性数	阳性率/%	总样本数	总阳性数	总阳性率/%
乳房炎奶样	50	3	6.0	79	6	7.6	129	9	7.0
原料牛奶样品	49	5	10.2	28	3	10.7	77	8	10.4
总计	99	8	8.1	107	9	8.4	206	17	8.3

## 2.5 数据分析

所有数据采用 Excel 2016 软件进行数据导入与处理, 使用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析 ( $P < 0.05$ , 差异有统计学意义)。

## 3 结果与分析

### 3.1 奶源大肠杆菌的污染情况

如表 3 所示, 对某地 2 个奶场收集的 206 份样本进行选择培养和 *uidA* 基因鉴定, 发现 17 份样品被大肠杆菌污染, 污染率为 8.3% (17/206), 其中乳房炎奶样中有 9 份样本被污染 (7.0%, 9/129), 原料乳中有 8 份样本被污染 (10.4%, 8/77)。对被大肠杆菌污染的乳房炎奶样和原料乳样品做统计分析, 结果显示没有显著性差异 ( $P = 0.390 > 0.05$ )。对两个奶场被大肠杆菌污染的污染率做统计分析, 结果显示没有显著性差异 ( $P = 0.932 > 0.05$ )。此外, 17 份阳性样本中共分离到 34 株大肠杆菌 (每份阳性样本分离 2 株)。

### 3.2 奶源大肠杆菌耐药性检测情况

#### 3.2.1 不同来源菌株的耐药情况

对 34 株分离株进行 25 种常用抗生素耐药性检测, 结果如表 4 所示。研究发现分离株对氨苄西林的耐药最为普遍 (44.1%, 15/34), 其次为头孢唑啉和头孢噻吩 (20.6%, 7/34)、头孢呋辛和呋喃妥因 (11.8%, 4/34), 对氨曲南、头孢噻肟、头孢曲松、头孢吡肟、头孢他啶、链霉素、卡拉霉素、哌拉西林、四环素、诺氟沙星、氯霉素的耐药率均低于 10%。此外, 不同来源的大肠杆菌对 25 种抗生素的耐药性不同, 18 株乳房炎奶样分离株耐药率介于 0% ~ 33.3%, 其中, 对氨苄西林的耐药率最高 (33.3%, 6/18), 其次为头孢噻吩 (22.2%, 4/18)、头孢唑啉 (16.7%, 3/18)、头孢呋辛、头孢噻肟、头孢曲松和哌拉西林都为 (11.1%, 2/18), 而对氨曲南、诺氟沙星、氯霉素的耐药率只有 5.6% (1/18)。16 株

表 4 原料乳和乳房炎奶样大肠杆菌药敏结果  
Table 4 Antimicrobial susceptibility of *E.coli* isolated from raw milk and milk of clinical mastitis

抗菌药物	不同来源菌株数(株)/耐药率/%		总计(n=34)
	乳房炎奶样(n=18)	原料乳样品(n=16)	
氨苄西林(≡13)	6(33.3)	9(56.3)	15(44.1)
氨曲南(≡15)	1(5.6)		1(2.9)
头孢唑啉(≡14)	3(16.7)	4(25.0)	7(20.6)
头孢噻吩(≡14)	4(22.2)	3(18.8)	7(20.6)
头孢呋辛(≡14)	2(11.1)	2(12.5)	4(11.8)
头孢哌酮(≡15)			
头孢噻肟(≡14)	2(11.1)	1(6.3)	3(8.8)
头孢曲松(≡13)	2(11.1)		2(5.9)
头孢吡肟(≡14)		1(6.3)	1(2.9)
头孢他啶(≡14)		1(6.3)	1(2.9)
头孢西丁(≡14)			
氧氟沙星(≡12)			
链霉素(≡11)		2(12.5)	2(5.9)
妥布霉素(≡12)			
卡拉霉素(≡13)		3(18.8)	3(8.8)
哌拉西林(≡17)	2(11.1)		2(5.9)
庆大霉素(≡12)			
阿米卡星(≡14)			
四环素(≡11)		2(12.5)	2(5.9)
环丙沙星(≡15)			
诺氟沙星(≡12)	1(5.6)		1(2.9)
呋喃妥因(≡14)		4(25.0)	4(11.8)
左氟沙星(≡13)			
米诺环素(≡12)			
氯霉素(≡12)	1(5.6)	1(6.3)	2(5.9)

原料乳样品分离株耐药率介于 0%~56.3%, 其中对氨苄西林的耐药率最高, 达 56.3%(9/16), 其次为头孢唑啉和呋喃妥因(25.0%, 4/16)、头孢噻吩和卡拉霉素(18.8%, 3/16)、头孢呋辛、链霉素和四环素(12.5%, 2/16), 而对头孢噻肟、头孢吡肟、头孢他啶、氯霉素较为敏感, 耐药率仅为 6.3%(1/16)。所有分离株对头孢哌酮、头孢西丁、氧氟沙星、妥布霉素、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、左氟沙星和米诺环素敏感。

### 3.2.2 不同来源菌株的多重耐药情况

如表 5 所示, 34 株分离株共有 12 种不同的耐药谱, 每株菌株耐受 0~7 种抗生素不等, 其中最常见耐药谱为

AMP(11.8%, 4/34), AMP-CXM-CFZ-KF-F 和 AMP-CXM-CFZ-CTX-PRL-CRO-KF(5.9%, 2/34)。此外, 18 株乳房炎奶样大肠杆菌中有 6 株对所测抗生素耐药, 共表现为 4 种耐药谱: AMP(11.1%, 2/18)、AMP-KF(5.6%, 1/18)、AMP-ATM-CFZ-NOR-CHL-KF(1/18, 5.6%) 和 AMP-CXM-CFZ-CTX-PRL-CRO-KF(2/18, 11.1%)。16 株原料乳样品大肠杆菌中 11 株对所测抗生素耐药, 共表现为 9 种耐药谱: AMP(12.5%, 2/16)、KAN(6.3%, 1/16)、TET-S(6.3%, 1/16)、AMP-KAN(6.3%, 1/16)、AMP-TET-S(6.3%, 1/16)、AMP-CFZ-F(6.3%, 1/16)、AMP-CHL-KAN(6.3%, 1/16)、AMP-CXM-CFZ-KF-F(12.5%, 2/16) 和 AMP-CFZ-CTX-CAZ-FEP-KF-F(6.3%, 1/16)。

表 5 原料乳样品和乳房炎奶样大肠杆菌耐药表型谱  
Table 5 Antimicrobial resistance profiles of *E.coli* from raw milk and mastitis milk

耐药谱	不同来源菌株数(株)/耐药率/%		总计(n=34)
	乳房炎奶样(n=18)	原料乳样品(n=16)	
AMP	2(11.1)	2(12.5)	4(11.8)
KAN		1(6.3)	1(2.9)
TET-S		1(6.3)	1(2.9)
AMP-KF	1(5.6)		1(2.9)
AMP-KAN		1(6.3)	1(2.9)
AMP-TET-S		1(6.3)	1(2.9)
AMP-CFZ-F		1(6.3)	1(2.9)
AMP-CHL-KAN		1(6.3)	1(2.9)
AMP-CXM-CFZ-KF-F		2(12.5)	2(5.9)
AMP-ATM-CFZ-NOR-CHL-KF	1(5.6)		1(2.9)
AMP-CFZ-CTX-CAZ-FEP-KF-F		1(6.3)	1(2.9)
AMP-CXM-CFZ-CTX-PRL-CRO-KF	2(11.1)		2(5.9)

### 3.2.3 不同奶牛场菌株耐药情况

对某地 2 个不同奶场分离株的耐药性进行比较, 结果如表 6 所示。总体来看, 2 个奶场分离株耐药情况差异显著 ( $P=0.007$ ), A 场分离株对 12 种抗生素耐药, 主要是青霉素类(氨苄西林), 头孢类(头孢唑啉, 头孢噻吩, 头孢呋辛和头孢噻肟)及硝基咪唑类抗生素, 而 B 场分离株仅对 5 种抗生素耐药, 主要是青霉素类(氨苄西林), 氨基糖甙类(链霉素)和四环素类抗生素。综上说明即使位于同一地区, 不同奶牛场菌株的耐药性也存在较大差异。

### 3.2.4 不同奶牛场菌株多重耐药情况

对黑龙江省两个不同奶场分离株的耐药谱进行比较, 结果如表 7 所示。不同奶场分离株的耐药谱总体差异显著 ( $P=0.043$ ), 其中 A 场分离株耐药谱丰富, 共有 8 种不同的耐药谱, 最常见的耐药谱为 AMP, AMP-CXM-CFZ-KF-F 和 AMP-CXM-CFZ-CTX-PRL-CRO-KF(12.5%, 2/16)。B 场分离株只存在 4 种耐药谱, 且菌株最多只对 3 种抗生素耐药。

## 4 结论与讨论

大肠杆菌是我国奶牛乳房炎的主要致病菌之一。目前, 由大肠杆菌耐药菌株引起感染的现象日趋严重, 耐药菌可以通过食物链感染人和动物, 具有较大的潜在风险。研究表明, 抗生素在动物中的使用对细菌耐药性的产生有潜在影响<sup>[15]</sup>。

本研究对黑龙江省 2 个奶场中原料乳和乳房炎奶样进行大肠杆菌检测, 结果表明, 奶样中大肠杆菌的检出率为 8.3%, 其中乳房炎奶样和原料乳样品的检出率分别为 7.0%和 10.4%, 两者差异不显著。近年来各个地区对奶牛场乳房炎病原菌的研究日益成熟, 但地区之间的差异十分明显。对于大肠杆菌, 本溪<sup>[16]</sup>(25.6%)、川渝<sup>[17]</sup>(5.23%)、渭南<sup>[18]</sup>(29.2%)、石河子<sup>[19]</sup>(17.05%)、大连<sup>[20]</sup>(40.5%)、上

海<sup>[21]</sup>(14.4%)、山西<sup>[22]</sup>(21.4%)以及中原<sup>[5]</sup>(15.6%)与本次实验某地某奶牛场的检出率 7.0%均有较大差别, 但和石润佳等<sup>[23]</sup>关于华北地区(河北、天津、山东、北京)乳房炎奶样的研究结果类似, 反映出同一国家不同地区大肠杆菌的流行情况有所差别。欧美国家在奶牛场建设上经验丰富, 近年来也对乳房炎牛奶大肠杆菌做了系统的调查, 如法国<sup>[24]</sup>(16%)、瑞典<sup>[25]</sup>(16.5%)、英格兰和威尔士<sup>[26]</sup>(19.8%)、荷兰<sup>[27]</sup>(15.5%)、比利时<sup>[28]</sup>(8.0%)和早些年加拿大安大略省<sup>[29]</sup>(17.2%), 这些国家和地区大肠杆菌流行情况与我国某些地区比较相近, 提示我们对于条件致病菌的监控还应加强。

此外, 本研究对 34 株分离株进行了 25 种抗生素的药敏试验, 结果显示: 分离菌株对氨苄西林耐药严重, 对所试大部分头孢类抗菌素耐药, 包括非兽用抗生素头孢唑啉、头孢噻吩、头孢呋辛、头孢曲松、头孢噻肟和头孢他啶, 在原料乳奶样中, 甚至出现对第四代头孢菌素头孢吡肟产生抗性的菌株, 提示我们应对牛奶中大肠杆菌抗生素耐药性增强的问题予以重视。所有分离株均对头孢哌酮、头孢西丁、氧氟沙星、妥布霉素、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、左氟沙星和米诺环素敏感, 与相关报道的氨基糖苷类和喹诺酮类药物对大肠杆菌有良好的抗菌性基本相一致<sup>[30,31]</sup>, 但与吴明光<sup>[32]</sup>研究乳房炎奶样分离株对庆大霉素、阿米卡星等 7 种药物耐药有较大出入, 可能与菌株采集区域有关。乳房炎奶样分离株有 4 种耐药谱, 少于原料乳奶样分离株耐药谱(9 种), 可能受奶场长期或者反复使用一种或者多种抗生素的影响。此外, 本研究分离自 A 牛场与 B 牛场的菌株耐药性( $P=0.007$ )和耐药谱( $P=0.043$ )的差异显著, 主要表现为 A 牛场分离株耐受的物种种类更多, 耐药谱更广, 因此在对不同牛场奶牛乳房炎的治疗时, 不能一概而论, 结合药敏试验的结果能取得更好的治疗效果。

表 6 不同奶场大肠杆菌的耐药率  
Table 6 Antimicrobial resistant rate of *E. coli* isolated different cattle farm

抗生素	耐药菌株数(株)/耐药率/%		
	A(n=16)	B(n=18)	总计(n=34)
氨苄西林(≅13)	11(68.8)	4(22.2)	15(44.1)
氨基糖苷类(≅15)	1(6.3)		1(2.9)
头孢唑啉(≅14)	7(43.8)		7(20.6)
头孢噻吩(≅14)	6(37.5)	1(5.6)	7(20.6)
头孢呋辛(≅14)	4(25.0)		4(11.8)
头孢哌酮(≅15)			
头孢噻肟(≅14)	3(18.8)		3(8.8)
头孢曲松(≅13)	2(12.5)		2(5.9)
头孢吡肟(≅14)	1(6.3)		1(2.9)
头孢他啶(≅14)	1(6.3)		1(2.9)
头孢西丁(≅14)			
氧氟沙星(≅12)			
链霉素(≅11)		2(11.1)	2(5.9)
妥布霉素(≅12)			
卡拉霉素(≅13)	2(12.5)	1(5.6)	3(8.8)
哌拉西林(≅17)	2(12.5)		2(5.9)
庆大霉素(≅12)			
阿米卡星(≅14)			
四环素(≅11)		2(11.1)	2(5.9)
环丙沙星(≅15)			
诺氟沙星(≅12)	1(6.3)		1(2.9)
喹诺酮类(≅14)	4(25.0)		4(11.8)
左氟沙星(≅13)			
米诺环素(≅12)			
氯霉素(≅12)	2(12.5)		2(5.9)

表 7 不同奶场大肠杆菌耐药谱  
Table 7 Antimicrobial resistance profiles of *E. coli* strains from different cattle farm

耐药谱	耐药菌株数(株)/耐药率/%		
	A(n=16)	B(n=18)	总计(n=34)
AMP	2(12.5)	2(11.1)	4(11.8)
KAN		1(5.6)	1(2.9)
TET-S		1(5.6)	1(2.9)
AMP-KF		1(5.6)	1(2.9)
AMP-KAN	1(6.3)		1(2.9)
AMP-TET-S		1(5.6)	1(2.9)
AMP-CFZ-F	1(6.3)		1(2.9)
AMP-CHL-KAN	1(6.3)		1(2.9)
AMP-CXM-CFZ-KF-F	2(12.5)		2(5.9)
AMP-ATM-CFZ-NOR-CHL-KF	1(6.3)		1(2.9)
AMP-CFZ-CTX-CAZ-FEP-KF-F	1(6.3)		1(2.9)
AMP-CXM-CFZ-CTX-PRL-CRO-KF	2(12.5)		2(5.9)

综上所述,本次检测的大肠杆菌耐药率低,广谱耐药虽然尚在合理范围,但菌株对非兽用抗生素的耐药应当引起关注,在抗生素使用的选择上应多加注意,最好同一时段使用多种菌株较为敏感的抗生素,不仅能达到杀灭病原微生物并降低病原微生物耐药性增长的目的,还能在有效治疗奶牛乳房炎的同时减少奶牛场经济损失,增加乳及乳制品的安全系数。此外,本研究与上述不同区域奶场中大肠杆菌分离株耐药结果有较大差异,说明我国在奶牛场的建设上依旧有地区性的差异,且不同的牛场在管理运营上也存在差别,应结合实际情况进行分析。总体卫生状况仍有待提高,病原微生物依旧是我国乳及乳制品行业的主要威胁之一。

### 参考文献

- [1] Harvey RR, Zakhour CM, Gould LH. Foodborne disease outbreaks associated with organic foods in the United States [J]. *J Food Prot*, 2016, 79(11): 1953–1958.
- [2] Patel K, Joshi C, Nauriyal D, *et al.* Genotypic identification of methicillin resistance and virulence factors in *Staphylococcus spp.* from bovine mastitis milk [J]. *Comparat Clin Pathol*, 2017, 26(6): 1–7.
- [3] 许有盼. 奶牛乳房炎源大肠杆菌的分离鉴定[J]. *中兽医学杂志*, 2017, 199(6): 45.  
Xu YP. Isolation and identification of *E. coli* from bovine mastitis [J]. *Chin J Tradit Veter Sci*, 2017, 199(6): 45.
- [4] 高惊. 河南省新蔡县奶牛隐性乳房炎发病情况调查与分析[J]. *中国兽医杂志*, 2019, 55(4): 59–60.  
Gao L. Investigation and analysis of the incidence of cow subclinical mastitis in Henan province [J]. *Chin J Veter Med*, 2019, 55(4): 59–60.
- [5] 齐永华, 陈桂香, 王承民, 等. 中原地区奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *安徽农业科学*, 2006, 34(14): 3379–3380.  
Qi YH, Chen GX, Wang CM, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity test of the pathogenic bacteria of cow mastitis [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2006, 34(14): 3379–3380.
- [6] Kempf F, Slugocki C, Blum SE, *et al.* Genomic comparative study of bovine mastitis *Escherichia coli* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147954.
- [7] 于伟伟, 乔军, 孟庆玲, 等. 奶牛乳房炎大肠杆菌新疆分离株系统分群及其耐药特性与毒力因子分布研究[J]. *中国奶牛*, 2017, (10): 34–39.  
Yu WW, Qiao J, Meng QL, *et al.* Phylogenetic grouping, antimicrobial resistance and virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Xinjiang [J]. *China Dairy Cattl*, 2017, (10): 34–39.
- [8] 黄学坤. 奶牛乳房炎的危害及其防治[J]. *中兽医学杂志*, 2018, (2): 30.  
Huang XK. Harm of bovine mastitis and its prevention [J]. *Chin J Tradit Veter Sci*, 2018, (2): 30.
- [9] 崔利华, 蒋作吉, 李静溪, 等. 奶牛乳房炎的危害及防治[J]. *新疆畜牧业*, 2017, (6): 55–56.  
Cui LH, Jiang ZJ, Li JX, *et al.* Harm of bovine mastitis and its prevention [J]. *J Xinjiang Anim Husband*, 2017, (6): 55–56.
- [10] 李红春. 奶牛乳房炎的病因及其防治[J]. *中国畜禽种业*, 2019, 15(5): 86.  
Li HC. Etiology and prevention of bovine mastitis [J]. *Chin Livestock Poul Breed*, 2019, 15(5): 86.
- [11] Ibrahim ME. Class 1 Integrons and multi-drug resistance patterns among *Escherichia coli* isolated from clinical specimens of patients at hospitals in Sudan and Saudi Arabia [Z]. 2015.
- [12] 闫国栋. 不同源大肠杆菌耐药性及整合子-基因盒研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2015.  
Yan GD. Study on drug resistance and integron gene cassette of *Escherichia coli* from different sources [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2015.
- [13] Hwang D, Kim SM, Kim HJ. Modelling of tetracycline resistance gene transfer by commensal *Escherichia coli* food isolates that survived in gastric fluid conditions [J]. *Int J Antimicrobial Agents*, 2016, 49(1): 81–87.
- [14] 周陆红, 张鹏飞, 张杰, 等. 屠宰猪中大肠杆菌毒力基因检测及耐药性分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(2): 272–276.  
Zhou LH, Zhang PF, Zhang J, *et al.* Virulence genes and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from slaughtered pigs [J]. *Food Sci*, 2019, 40(2): 272–276.
- [15] 罗娟, 姬华, 王庆玲, 等. 新疆部分地区食源性大肠杆菌耐药性的研究[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(8): 271–277.  
Luo J, Ji H, Wang QL, *et al.* Drug resistance of *Escherichia coli* isolated from different foods in Xinjiang [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2016, 32(8): 271–277.
- [16] 王志强, 陆秀玉. 本溪地区奶牛乳房炎病原分离鉴定及药敏试验研究[J]. *现代畜牧兽医*, 2011, (6): 73–75.  
Wang ZQ, Lu XY. Study on isolation and identification of bovine mastitis pathogen and drug susceptibility test in Benxi area [J]. *Mod J Animal Husband Veter Med*, 2011, (6): 73–75.
- [17] 王裕文, 曾兴艳, 聂奎, 等. 川渝地区奶牛隐性乳房炎调查和主要病原菌分离鉴定及药敏试验[J]. *中兽医医药杂志*, 2010, 29(3): 16–19.  
Wang YW, Zeng XY, Nie K, *et al.* Prevalence, isolation, identification and drug sensitivity test of pathogenic bacteria in dairy cow mastitis in Chuanyu area [J]. *J Tradit Chin Veter Med*, 2010, 29(3): 16–19.
- [18] 李娟娟, 魏恒, 王伟华. 奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *中国草食动物科学*, 2013, 33(3): 53–54.  
Li JJ, Wei H, Wang WH. Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogenic bacteria in dairy cow mastitis [J]. *China Herbivore Sci*, 2013, 33(3): 53–54.
- [19] 宋华容, 李正国, 罗瑞卿, 等. 石河子地区奶牛乳房炎病原菌分离鉴定及中药抑菌试验[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(9): 4044–4047.  
Song HR, Li ZG, Luo RQ, *et al.* Isolation and identification on mastitis pathogen of cow in shihezi area and bacteriostatic test with Chinese herbal medicine [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2009, 37(9): 4044–4047.
- [20] 刘耀川, 张冰, 朱江巍, 等. 大连某奶牛场奶牛乳房炎病原菌分离及鉴定[J]. *现代畜牧兽医*, 2014, (12): 37–39.  
Liu YC, Zhang B, Zhu JW, *et al.* Pathogenic bacteria isolation and identification of dairy cow with mastitis in a dairy farm in Dalian [J]. *Mod J Animal Husband Veter Med*, 2014, (12): 37–39.
- [21] 高潮, 刘国庆, 连英琪, 等. 奶牛隐性乳房炎病原菌的分离鉴定与 DGGE 追溯[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2013, 31(3): 88–94.  
Gao C, Liu GQ, Lian YQ, *et al.* Isolation and identification of the cow subclinical mastitis pathogens and DGGE retrospective analysis [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ (Agric Sci Ed)*, 2013, 31(3): 88–94.
- [22] 武守艳, 韩一超, 陈剑波, 等. 山西省奶牛乳腺炎病原菌调查研究[J].

- 中国奶牛, 2013, (16): 28–30.
- Wu SY, Hang YC, Chen JB, *et al.* Investigation on pathogenic bacteria of dairy cow mastitis in Shanxi province [J]. *China Dairy Cattle*, 2013, (16): 28–30.
- [23] 石润佳, 韩荣伟, 王军, 等. 华北地区乳房炎奶样中大肠杆菌的耐药性研究[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(5): 274–280, 213.
- Shi RJ, Hang RW, Wang J, *et al.* Study on antibiotics resistance of *Escherichia coli* in milk samples from cows with mastitis in north China [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2019, 35(5): 274–280, 213.
- [24] Botrel MA, Haenni M, Morignat E, *et al.* Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France [J]. *Foodborne Pathogens Dis*, 2010, 7(5): 479.
- [25] Bengtsson B, Unnerstad HE, Ekman T, *et al.* Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows [J]. *Veter Microbiol*, 2008, 136(1–2): 142–149.
- [26] Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, *et al.* Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales [J]. *Veter Record*, 2007, 160(8): 253–258.
- [27] Verbeke J, Piepers S, Supré, Karlien, *et al.* Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene [J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(11): 6926–6934.
- [28] Supré K, Lommelen K, Meulemeester LD. Antimicrobial susceptibility and distribution of inhibition zone diameters of bovine mastitis pathogens in Flanders, Belgium [J]. *Veter Microbiol*, 2014, 171(3–4): 374–381.
- [29] Sargeant JM, Scott HM, Leslie KE, *et al.* Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: Frequency of occurrence and bacteriological isolates [J]. *Canadian Veter J*, 1998, 39(1): 33–38.
- [30] 刘渠, 刘衡川, 李灶平, 等. 食品中大肠埃希菌的耐药性与质粒图谱研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2004, 14(3): 278–281.
- Liu Q, Liu HC, Li ZP, *et al.* Drug resistance and plasmid spectrum of *E. coli* in food [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2004, 14(3): 278–281.
- [31] 张金宝, 马春芳, 余婷, 等. 宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌毒力基因检测和耐药性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(1): 177–182.
- Zhang JB, Ma CF, Yu T, *et al.* Detection of virulence genes and antimicrobial resistance analysis of *Escherichia coli* isolated from dairy cow mastitis in Ningxia [J]. *Chin J Anim Veter Sci*, 2016, 47(1): 177–182.
- [32] 吴明光. 奶牛乳房炎源大肠杆菌分离鉴定[J]. *中国畜禽种业*, 2017, 13(12): 58.
- Wu MG. Isolation and identification of *E. coli* from cow mastitis [J]. *Chin Livestock Poultry Breed*, 2017, 13(12): 58.

(责任编辑: 韩晓红)

### 作者简介



张鹏飞, 博士研究生, 主要研究方向为食品质量安全(微生物)检测。  
E-mail: 540395587@qq.com



王 婷, 主要研究方向为病原微生物检测。  
E-mail: 2627500426@qq.com



王 新, 博士, 教授, 主要研究方向为食源性病原菌及其分子生物学和食品安全。  
E-mail: xinwang7516@nwsuaf.edu.cn