

福建省闽北牧区奶源微生物污染及致病菌耐药情况研究

周双辉

福建省产品质量检验研究院, 福州 350002

摘要: 为了了解福建省闽北牧场奶源中微生物污染情况和奶源中所分离致病菌的耐药性特征,对2023年12月—2024年6月采集自闽北14个牧场的46份大罐奶生牛乳样品开展菌落总数和大肠菌群计数以及金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、单增李斯特氏菌、克罗诺杆菌属和克雷伯氏菌等5种致病菌污染情况筛查,同时对试样中分离出的金黄色葡萄球菌、克雷伯氏菌和大肠埃希氏菌进行抗生素药物敏感性试验。46份生牛乳样本的菌落总数平均值为 $5\,500\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$;大肠菌群计数平均值为 $39\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。分离出的致病菌总耐药率为63.5%,金黄色葡萄球菌耐药率为38.3%,克雷伯氏菌耐药率96.6%,大肠埃希氏菌耐药率为84.6%。 β -内酰胺类抗生素耐药比率最高,二重耐药及以上致病菌占比93.2%。福建省闽北牧场生牛乳中菌落总数污染风险较低,达到“特级乳”标准。生牛乳中致病菌对 β -内酰胺类抗生素耐药情况较为严重,存在多重耐药风险。

关键词: 生牛乳; 抗生素耐药; 金黄色葡萄球菌; 克雷伯氏菌; 大肠埃希氏菌

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2024.0164

中图分类号: Q939.9, TS201.3

文献标志码: A

Microbial Contamination and Antibiotic Resistance Characteristics in Raw Milk from Pastures in Northern Fujian Province

ZHOU Shuanghui

Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350002, China

Abstract: To investigate the microbial contamination and antibiotic resistance characteristics of pathogenic bacteria isolated from raw milk in pastures of northern Fujian Province. From December 2023 to June 2024, 46 bulk tank raw milk samples were collected from 14 pastures in northern Fujian. The samples were analyzed for aerobic plate count, coliform count, and screened for contamination by five pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter* spp., and *Klebsiella* spp. Additionally, antibiotic susceptibility tests were conducted on the isolated strains of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., and *Escherichia coli*. The average total bacterial count in the 46 raw milk samples was $5\,500\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the average coliform count was $39\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$. The overall antibiotic resistance rate of the isolated pathogenic bacteria was 63.5%, with resistance rates of 38.3% for *Staphylococcus aureus*, 96.6% for *Klebsiella* spp., and 84.6% for *Escherichia coli*. The highest resistance was observed to β -lactam antibiotics, with 93.2% of the pathogenic bacteria exhibiting multidrug resistance. The microbial contamination risk in the raw milk from northern Fujian pastures is low, meeting the “premium milk” standard. However, there is a significant issue with antibiotic resistance among the pathogenic bacteria, particularly to β -lactam antibiotics, with a high risk of multidrug resistance.

Key words: raw milk; antibiotic resistance; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella* spp.; *Escherichia coli*

生牛乳又称生鲜乳,是未经巴氏消毒或高温灭菌的牛奶。作为乳制品生产最核心的原料来

源,生牛乳通过不同的加工工艺和技术转化为液态奶、奶粉、发酵乳、奶酪、奶油等乳制产品。生牛

收稿日期:2024-10-24; 接受日期:2024-12-03

基金项目:福建省市场监督管理局科技项目(FJMS2022008)。

联系方式:周双辉 E-mail: 675161367@qq.com

乳营养丰富,含有酪蛋白和乳清蛋白等优质蛋白质以及脂肪、乳糖、维生素和矿物质等^[1],在为人类提供营养和能量的同时,也是利于微生物生长的绝佳基质^[2]。生牛乳中包含复杂而多样化的微生物种群,生牛乳中的微生物群落也是科学研究的重要对象,研究意义重大。

现行生乳标准中的微生物检测主要集中在菌落总数及作为外源性污染指示菌的肠杆菌数量的测定上。其中,菌落总数是直接影响牛奶价格的最关键质量和安全指标之一。根据欧盟法规(EC)第853/2004号,一级生牛乳不应含有超过10万CFU·mL⁻¹细菌^[3]。美国的A级生牛乳标准也为10万CFU·mL⁻¹细菌^[4]。我国GB19301-2010《食品安全国家标准 生乳》规定生乳菌落总数不能超过20万CFU·mL⁻¹,农业行业绿色标准NY/T657-2012《绿色食品 乳制品》规定不能超过50万CFU·mL⁻¹,与国际先进水平依然有一定差距^[5]。生乳品质由农业行业标准NY/T4054-2021《生牛乳质量分级》分级评定。

除检测菌落总数和大肠菌群这类卫生指示菌外,生牛乳中致病菌污染导致消费者疾病感染以及微生物耐药因子携带引起的耐药性危害,也是近年来国内外研究关注的重点^[6]。生牛乳中的致病菌既包括引发奶牛乳腺炎的金黄色葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌^[7],也有牛舍环境和挤奶环节等外部带入的沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、假单胞菌、黄曲霉菌等^[8]。目前奶舍多用中药和抗生素联合治疗奶牛乳腺炎,我国批准用于奶牛乳腺炎治疗的抗生素,主要涉及磺胺类药物和 β -内酰胺类等两大类,包括磺胺嘧啶片、磺胺噻唑片、磺胺二甲嘧啶注射液、苄星青霉素、青霉素钾、苯唑西林钠等,此外还有氨基糖苷类和大环内酯类,如乳糖酸红霉素、硫酸链霉素,共计26个品种^[9]。尽管疗效显著,但在牛群中广泛使用抗生素预防疾病和治疗感染,微生物的选择性压力增强,从而导致生牛乳中的共生菌和致病菌的耐药性不断增加,甚至出现多重耐药菌。动物性耐药细菌在乳制品加工过程中产生交叉污染,可通过水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)机制传播耐药基因,使人类产生人源性耐药细菌^[10],对食品安全和公共健康带来了严重威胁。因此,研究原料乳中微生物的耐药特征对于控制其耐药因子通过食物链向消费者进行

转移具有重要意义。

本研究对2023年12月—2024年6月采集自福建省闽北地区14个牧场的46份奶罐车生牛乳样品进行菌落总数和大肠菌群计数,同时对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、克罗诺杆菌属、克雷伯氏菌5种致病菌的污染情况进行筛查。筛查出样品天然存在的野生菌株后对分离的金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯和大肠埃希氏菌进行抗生素药物敏感性试验,以了解福建省闽北牧区生乳中的微生物污染和致病菌耐药情况,为消费者以及监管部门提供技术支持与数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 本研究于2023年12月—2024年6月期间,从福建省闽北地区14个规模化牧场的当日奶罐车中采集了共计46份牛乳样品。

1.1.2 主要培养基和试剂 平板计数琼脂(货号:022070P1,本小节中的产品编号均为货号)、结晶紫中性红胆盐琼脂(022221P1)、7.5%氯化钠肉汤培养基(024010)、Baird-Parker琼脂平板(024040A)、血平板培养基(024070)、冻干血浆(029180)、缓冲蛋白胨水(023130)、肠道菌增菌肉汤(022160)、麦康凯肌醇阿东醇羧苄青霉素琼脂(022147)以及水解酪蛋白胨MH琼脂(028050),以上所有产品均来自广东环凯公司。平板计数琼脂(022070P1)、结晶紫中性红胆盐琼脂(022221P1)、7.5%氯化钠肉汤培养基(024010)、Baird-Parker琼脂平板(024040A)、血平板培养基(024070)、冻干血浆(029180)、缓冲蛋白胨水(023130)、肠道菌增菌肉汤(022160)、麦康凯肌醇阿东醇羧苄青霉素琼脂(022147)以及水解酪蛋白胨MH琼脂(028050),以上所有产品均来自广东环凯公司。药敏纸片青霉素(penicillin, P, CT0043B)、氨苄西林(ampicillin, AMP, CT0003B)、青霉素/新生霉素(penicillin/novobiocin, PNV, CT0161B)、头孢西丁(cefotaxime, FOX, CT0119B)、头孢洛林(ceftriaxone, CPT, CT1941B)、头孢唑林(cephazolin, KZ, CT001B)、美罗培南(meropenem, MEM, CT0774B)、庆大霉素(gentamicin, CN, CT0024B)、红霉素(erythromycin, E, CT0020B)、四环素(tetracycline, TE, CT0054B)、环丙沙星(ciprofloxacin,

cin, CIP, CT0425B)、磺胺甲恶唑/甲氧苄啶(trimethoprim sulfamethorxazole, SXT, CT0052B)、利福平(rifampin, RD, CT0207B)以及克林霉素(clindamycin, DA, CT0064B),均购自美国赛默飞公司。所有培养基和试剂均在有效期内。

1.1.3 质控菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、金黄色葡萄球菌甲氧西林/苯唑西林耐药株 ATCC 43300、大肠埃希氏菌 ATCC 25922、大肠埃希氏菌 β -内酰胺耐药株 ATCC 35218,均购自广东省微生物研究所,并由福建省产品质量检验研究院微生物室保存。

1.1.4 主要仪器 VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统由法国梅里埃公司生产。Oxoid 药敏纸片分配器,由美国赛默飞世尔科技公司生产。

1.2 方法

1.2.1 菌落总数和大肠菌群计数 使用无菌吸管吸取 25 mL 生牛乳样品,并将其置于盛有 225 mL 的无菌磷酸盐缓冲液的无菌均质袋中。随后,使用拍击式均质器对样品进行拍打,直至其均匀分散,从而制成 1:10 比例的样品匀液。使用无菌吸管再次吸取 1 mL 的 1:10 样品匀液,并将其注入一个含有 9 mL 无菌稀释液的无菌试管中。轻轻混匀试管内的液体,从而制成 1:100 比例的样品匀液。依次操作,制备 10 倍系列稀释样品匀液。选择适宜稀释度,吸取 1 mL 样品匀液于无菌培养皿中,每个稀释度做两个培养皿,同时分别吸取 1 mL 空白稀释液加入两个无菌培养皿内作空白对照。按照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》(GB 4789.2-2022),向皿内倾注平板计数琼脂培养基,36 °C 培养 48 h,计算样品中菌落总数。按照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》(GB 4789.3-2016)第二法,向皿内倾注结晶紫中性红胆盐琼脂,36 °C 培养 24 h,计算样品中大肠菌群数量。

1.2.2 致病菌检验 ①取 25 mL 生牛乳样品,加入 225 mL BPW 中,在 36 °C 下进行预增菌 18 h,然后,从预增菌的培养液中取 1 mL,分别移入 10 mL RVS(四硫磺酸钠煌绿增菌液)和 TTB(亚硒酸盐胱氨酸增菌液)培养基中,进行选择性的增菌 24 h。之后,将增菌后的培养液划线接种于 BS 琼脂平板和沙门氏菌显色培养基平板上。整个检验过程按照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》(GB 4789.4-2024)的标准进行。②取

25 mL 生牛乳样品,加入 225 mL 7.5% 氯化钠肉汤,36 °C 增菌 24 h 后划线 Baird-Parker 平板和血平板,按照《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》(GB 4789.10-2016)第二法,对样品进行金黄色葡萄球菌检验。③取 25 mL 生牛乳样品,加入 225 mL LB₁ 增菌液中,在 30 °C 下培养 24 h。然后,从 LB₁ 增菌液中取 0.1 mL,移入 10 mL LB₂ 增菌液中,继续在 30 °C 下培养 24 h。之后,将 LB₂ 增菌液划线接种于李斯特氏菌显色平板和 PALCAM(牛津琼脂平板,用于李斯特氏菌的选择性分离)上。按照《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 4789.30-2016)对样品进行单核细胞增生李斯特氏菌检验。④取 100 mL 生牛乳样品,加入 900 mL 无菌蒸馏水,在 36 °C 条件下进行预增菌培养,持续 22 h 之后,取 10 mL 该预增菌液移入 90 mL 肠道菌增菌肉汤培养基中,进行选择性的增菌培养,持续 22 h。培养完成后,采用划线法将培养物接种于 MIAC 培养基平板上。整个检验过程需遵循《乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第 9 部分:克雷伯氏菌检验》(SN/T 2552.9-2010)的标准进行克雷伯氏菌的检验。⑤取 100 mL 生牛乳样品,加入 900 mL BPW 中,在 36 °C 条件下进行预增菌培养,持续 18 h。之后,取 1 mL 该预增菌液移入 10 mL 改良李斯特菌选择性增菌肉汤(mLST-Vm)中,进行选择性的增菌培养,持续 24 h。培养完成后,采用划线法将培养物接种于克罗诺杆菌显色培养基平板上。整个检验过程需严格遵循《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验》(GB 4789.40-2024)的标准进行。

1.2.3 药物敏感性试验 本研究中致病菌的抗菌药物敏感性试验按照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)发布的《抗微生物药物敏感性试验性能标准》(M100-Ed34)^[11]纸片扩散法进行。使用无菌棉拭子挑取 3~5 个形态相似的纯菌落,这些菌落为 36 °C 的条件下培养了 18 h 的纯菌落。然后,用体积分数为 0.85% 的生理盐水将这些菌落调节至 0.5 麦氏比浊度的悬液。接下来,将混匀的菌悬液均匀且无间隙地涂布在表面已经干燥的 MH 琼脂平板。之后,使用药敏纸片分配器将抗生素试验纸片平整地贴于平板上的适当位置。将平板置于 36 °C 环境中培养 18 h。培养结束后,测量抑菌圈

直径,并根据 CLSI-M100 纸片扩散法的标准来读取敏感性结果。在每次测定时,均同步采用新鲜传代的 1.1.3 质控菌株对抗生素试验纸片进行质量控制。质控菌株的抑菌圈直径限度范围参见 M100-Ed34^[11]。

2 结果与分析

2.1 菌落总数和大肠菌群计数

如图 1 所示,46 份生牛乳样本的菌落总数范围为 410~23 000 CFU·mL⁻¹,平均值为 5 500 CFU·mL⁻¹ (即 3.74 log₁₀ CFU·mL⁻¹),中位数为 4 100 CFU·mL⁻¹ (即 3.61 log₁₀ CFU·mL⁻¹)。其中,26.1% (12/46) 的样品菌落数 ≤1 000 CFU·mL⁻¹,87.0% (40/46) 的样品菌落数 ≤10 000 CFU·mL⁻¹。所有样本 (100%,46/46) 均达到农业行业标准《生牛乳质量分级》(NY/T 4054-2021) 中的“特优级”要求 (≤50 000 CFU·mL⁻¹)。此外,本次检测的菌落总数平均值低于我国 17 个省(市、自治区)的 18 家乳品企业生牛乳平均值 (32 700 CFU·mL⁻¹)^[12],中位数也低于全国的规模化牧场的中位数 (10 CFU·mL⁻¹)^[12]。菌落总数平均值低于欧美文献报道,如美国 4.06 log₁₀ CFU·mL⁻¹^[13]、芬兰 4.11 log₁₀ CFU·mL⁻¹^[14]、比利时 3.96 log₁₀ CFU·mL⁻¹^[15]。

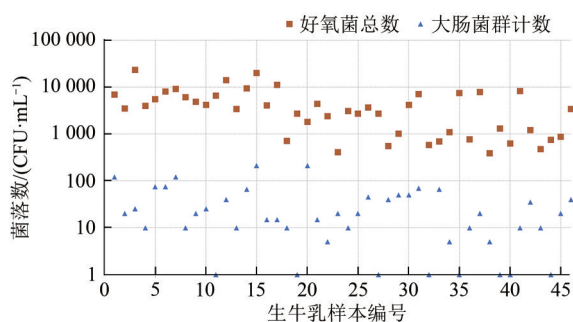


图 1 闽北地区生牛乳样品中菌落总数和大肠菌群计数情况

Fig. 1 Aerobic plate count and coliforms count in 46 raw milk samples from northern Fujian Province

大肠菌群计数范围为 0~210 CFU·mL⁻¹,平均值 39 CFU·mL⁻¹。17.4% (8/46) 的样品大肠菌群为 0 CFU·mL⁻¹,82.6% (36/46) 的样品大肠菌群 ≤100 CFU·mL⁻¹。

2.2 致病菌检测结果

在 46 份大罐奶样品中,共分离出 60 株金黄色

葡萄球菌、29 株克雷伯氏菌。同时,经过严格的检测,未在这些样品中分离出沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌以及克罗诺杆菌属的任何菌株。此外,对计数得到的大肠菌群进行了 VITEK 生化鉴定,从中分离出 26 株大肠埃希氏菌。

2.3 致病菌药物敏感性分析

选取 115 株分离菌株进行药物敏感性试验。结果显示,中介(intermediate,I)和耐药(resistant,R)菌株共有 73 株,总体耐药率为 63.5%。其中,中介(I)结果表示微生物对某种抗生素的敏感性介于敏感(susceptible,S)和耐药(R)之间,临床上治疗时需要采用比常规剂量更高的抗生素剂量才能达到预期效果。在本研究中,为了全面评估致病菌的耐药风险,将中介(I)视为潜在的耐药,并将其与耐药(R)结果合并计算耐药率,从而避免低估致病菌耐药性的实际情况。然而,在进行致病菌耐药谱的分析时,采用了更为严格的评价标准,即忽略中介(I)结果,仅统计耐药(R)的抗生素结果。

2.3.1 金黄色葡萄球菌药物敏感性结果 如表 1 所示,在 60 株金黄色葡萄球菌中,共有 23 株表现出耐药性,耐药率为 38.3%。其中,青霉素和氨苄西林耐药率最高,均为 28.3%,红霉素耐药率为 21.7%,克林霉素的耐药率为 15.0%。分离出 1 株 6 重耐药性的金黄色葡萄球菌。在耐药谱中,2 重耐药谱 P-AMP 的出现频率最高,共有 12 株,占 20.0%。其他抗生素如头孢西丁、头孢洛林、头孢唑林和美罗培南的耐药率均较低或为零。

2.3.2 克雷伯氏菌药物敏感性结果 如表 2 所示,在 29 株克雷伯氏菌中,共有 28 株出现耐药,耐药率为 96.6%。其中,氨苄西林耐药率最高,仅有 1 株敏感,耐药率达到 96.6%。头孢唑林和环丙沙星耐药率均为 44.8%,磺胺甲恶唑/甲氧苄啶耐药率为 27.6%,头孢洛林耐药率为 20.7%。9 种测试抗生素中,所有克雷伯氏菌仅对头孢西丁全部敏感,未出现头孢西丁耐药情况。29 株克雷伯氏菌共有 10 种耐药谱型,其中 2 株 5 重耐药,2 株 4 重耐药,3 株 3 重耐药,5 株 2 重耐药。

2.3.3 大肠埃希氏菌药物敏感性结果 如表 3 所示,在 26 株大肠埃希氏菌中,共有 22 株出现耐药,耐药率 84.6%。其中,氨苄西林耐药率最高,达到 65.4%。环丙沙星耐药率为 38.5%,头孢洛林和头孢唑林耐药率均为 30.8%,四环素耐药率为

表1 60株金黄色葡萄球菌抗微生物类药物敏感情况

Table 1 Antimicrobial susceptibility testing results of 60 *Staphylococcus aureus* strains

抗生素名称	含量/($\cdot$ 片 $^{-1}$)	敏感株	中介株	耐药株	中介+耐药比率
青霉素(P)	10 IU	43	0	17	28.3%
氨苄西林(AMP)	10 μ g	43	0	17	28.3%
青霉素/新生霉素(PNV)	10 IU+30 μ g	60	0	0	0.0%
头孢西丁(FOX)	30 μ g	59	0	1	1.7%
头孢洛林(CPT)	30 μ g	60	0	0	0.0%
头孢唑林(KZ)	30 μ g	60	0	0	0.0%
美罗培南(MEM)	10 μ g	60	0	0	0.0%
庆大霉素(CN)	10 μ g	58	1	1	3.3%
红霉素(E)	15 μ g	47	9	4	21.7%
四环素(TE)	30 μ g	58	1	1	3.3%
环丙沙星(CIP)	5 μ g	59	0	1	1.7%
磺胺甲恶唑/甲氧苄啶(SXT)	23.5 μ g+1.5 μ g	53	6	1	11.7%
利福平(RD)	5 μ g	60	0	0	0.0%
克林霉素(DA)	2 μ g	51	6	3	15.0%

表2 29株克雷伯氏菌抗微生物类药物敏感情况

Table 2 Antimicrobial susceptibility testing results of 29 *Klebsiella* spp. strains

抗生素名称	含量/($\cdot$ 片 $^{-1}$)	敏感株	中介株	耐药株	中介+耐药率
氨苄西林(AMP)	10 μ g	1	2	26	96.6%
头孢西丁(FOX)	30 μ g	29	0	0	0.0%
头孢洛林(CPT)	30 μ g	23	1	5	20.7%
头孢唑林(KZ)	30 μ g	16	7	6	44.8%
美罗培南(MEM)	10 μ g	26	2	1	10.3%
庆大霉素(CN)	10 μ g	24	0	5	17.2%
四环素(TE)	30 μ g	25	0	4	13.8%
环丙沙星(CIP)	5 μ g	16	11	2	44.8%
磺胺甲恶唑/甲氧苄啶(SXT)	23.5 μ g+1.5 μ g	21	6	2	27.6%

表3 26株大肠埃希氏菌抗微生物类药物敏感情况

Table 3 Antimicrobial susceptibility testing results of 26 *Escherichia coli* strains

抗生素名称	含量/($\cdot$ 片 $^{-1}$)	敏感株	中介株	耐药株	中介+耐药率
氨苄西林(AMP)	10 μ g	9	3	14	65.4%
头孢西丁(FOX)	30 μ g	23	0	3	11.5%
头孢洛林(CPT)	30 μ g	18	0	8	30.8%
头孢唑林(KZ)	30 μ g	18	4	4	30.8%
美罗培南(MEM)	10 μ g	23	2	1	11.5%
庆大霉素(CN)	10 μ g	20	0	6	23.1%
四环素(TE)	30 μ g	19	0	7	26.9%
环丙沙星(CIP)	5 μ g	16	9	1	38.5%
磺胺甲恶唑/甲氧苄啶(SXT)	23.5 μ g+1.5 μ g	24	0	2	7.7%

表4 分离菌株耐药谱
Table 4 Resistance profile of isolated strains

名称	多重耐药数	耐药谱	株数	占比
金黄色葡萄球菌	6	P-AMP-TE-CIP-SXT-DA	1	1.7%
	5	P-AMP-CN-E-DA	1	1.7%
	3	P-AMP-FOX	1	1.7%
		P-AMP-E	2	3.3%
	2	P-AMP	12	20.0%
		E-DA	1	1.7%
克雷伯氏菌	5	AMP-CPT-KZ-CN-CIP	1	3.4%
		AMP-CPT-KZ-CN-TE	1	3.4%
	4	AMP-CPT-KZ-TE	1	3.4%
		AMP-KZ-CN-TE	1	3.4%
	3	AMP-CPT-KZ	2	6.9%
		AMP-CN-TE	1	3.4%
	2	AMP-MEM	1	3.4%
		AMP-CIP	1	3.4%
		AMP-CN	1	3.4%
		AMP-SXT	2	6.9%
大肠埃希氏菌	7	AMP-FOX-CPT-KZ-CN-TE-SXT	1	3.8%
	4	AMP-CPT-CN-TE	1	3.8%
		AMP-FOX-KZ-TE	1	3.8%
	3	AMP-CPT-CN	3	11.5%
		AMP-CPT-CIP	1	3.8%
		AMP-CPT-KZ	1	3.8%
		AMP-FOX-KZ	1	3.8%
		CN-TE-SXT	1	3.8%
	2	AMP-TE	1	3.8%
		CPT-TE	1	3.8%
	1	AMP	4	15.4%
		TE	1	3.8%

26.9%,庆大霉素耐药率为23.1%。大肠埃希氏菌耐药谱包含1株7重耐药,2株4重耐药,7株3重耐药。

3 讨论

本研究采用的牛乳样本来自福建省闽北地区14个规模化奶牛牧场当日采样的奶罐车。46份样品菌落总数均符合美国A级生牛乳^[4]和欧盟一级生牛乳限值^[3],达到农业行业标准《生牛乳质量分级》(NY/T 4054-2021)中“特优级”要求($\leq 50\,000\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$),体现了闽北规模化牧场奶牛养殖微生物控制方面良好的综合卫生管理水平,符合市场对高质量原料乳的要求。由于我国幅员辽阔,牧区分布广泛,奶牛养殖模式呈现多样化特点,散户养殖和养殖小区众多。因此,现行的

生乳国家标准《食品安全国家标准 生乳》(GB 19301-2010)采用了较为宽松的限量值。而生乳的具体品质,则由农业行业标准《生牛乳质量分级》(NY/T 4054-2021)进行更为细致和科学的分级评定。

此外,生乳中的菌落总数受到多种外界因素的影响,包括挤奶过程、牧场环境、气候条件、储存和运输方式等。其中,季节是影响生鲜乳卫生水平与质量安全的重要风险因子之一^[16]。特别是在我国南方地区,夏季普遍高温高湿,这种环境不仅有利于微生物的生长繁殖,还可能导致奶牛经历热应激,导致免疫力下降,更容易感染牛乳腺炎等疾病,从而使生牛乳中菌落总数升高^[17]。本研究使用的生牛乳样本主要采集于冬、春两季,夏季的数据尚待后续研究。可以预见的是,菌落总数的数值可能会随着气温升高而出现上升的趋势。

规模化牧场的大罐奶,是牧场对当日泌乳奶牛进行机械自动化采奶后,经过过滤收集的混合样本。因此,同一份大罐奶样本中有可能分离出同一种致病菌的不同菌株。相较于单一奶牛生牛乳样本,大罐奶样本的致病菌检出率并不能科学地反映整个样本群的致病菌污染情况。因此,本研究并未计算致病菌的检出率,而是仅报告了致病菌的分离株数。本研究依照检测标准,成功分离出了金黄色葡萄球菌和克雷伯氏菌,这两种菌均为引发临床型牛乳腺炎的主要致病菌,这与之前的文献报道一致^[18]。其中,金黄色葡萄球菌的分离株数最多($n=60$),它是一种在原料乳中很常见的引发牛乳腺炎的传染性致病菌。该菌会通过污染的挤奶设备、饲料等途径传染给健康奶牛^[19],一旦进入食物链,将对人们的健康构成严重威胁^[20]。此外,本研究还分离出了克雷伯氏菌($n=29$),它是一种引发牛乳腺炎的环境致病微生物,其主要来源是牧场的垫料和土壤^[21-22]。

现阶段,我国牧场针对牛乳房炎通常采用抗生素联合中药散剂进行治疗^[9]。然而,细菌先天具有耐药性并可通过质粒、转座子、整合子等机制来获得并传播耐药基因^[23],这使得食物链中的耐药菌成为全球公共卫生领域的一大挑战。本研究依照 CLSI 指南执行,针对金黄色葡萄球菌,选择了 10 大类共 14 种抗生素进行药物敏感性试验;而对于克雷伯氏菌和大肠菌群,则选择了 7 大类共 9 种抗生素进行药物敏感性试验。试验结果表明,闽北地区生牛乳中的微生物对多种抗菌药物表现出了较强的耐药性。具体而言,革兰氏阴性肠道菌的耐药比例高达 92.6% (50/54),这一比例显著高于革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌的 38.3% (23/60)。在不同大类抗生素耐药程度上,我们发现以下规律:对于金黄色葡萄球菌, β -内酰胺类>大环内酯类>林克酰胺类>磺胺类>喹诺酮类;对于克雷伯氏菌, β -内酰胺类>喹诺酮类>磺胺类>氨基糖苷类>四环素类>碳青霉烯类;而对于大肠埃希氏菌, β -内酰胺类>喹诺酮类>四环素类>氨基糖苷类>碳青霉烯类>磺胺类。在这三类微生物的耐药性中, β -内酰胺类均表现出最高的耐药比率,这一结果与何源等^[24]、张从超^[25]、刘慧敏^[26]、邓波等^[21]、吴香云^[27]等研究者的结果相一致。然而,在耐药率的具体数值上,本研究发现金黄色葡萄球菌的耐药率为 38.3%,这一数值低于何源等

(89.19%)^[24]、刘慧敏(72.2%)^[26]、张从超(87.72%)^[25]的研究结果。这可能与不同地区牧场在抗生素用药的品种和用量选择上存在差异有关。相比之下,克雷伯氏菌的耐药率和邓波等(98.5%)^[21]、吴香云(95.6%)^[27]的研究结果相近,说明在不同地区,克雷伯氏菌的耐药趋势基本相同,耐药比例超过九成。此外,闽北地区生乳中致病菌的多重耐药性也较为严重。具体而言,二重耐药及以上的比例达到 93.2% (68/73),四重耐药及以上比例达到 12.3%,更令人担忧的是,有一株大肠埃希氏菌更是高达七重耐药。这种多重耐药性的存在,无疑加大了牛乳腺炎的防控和治疗中抗生素的合理用药的难度。在所有测试的抗生素中,氨苄西林的耐药情况最为严重。3 种致病菌对氨苄西林的平均耐药率高达 53.9%,其中革兰氏阴性肠道菌耐药率更是达到了 81.8%。氨苄西林作为一种广泛使用的 β -内酰胺类抗生素,在奶牛牧场中常被用于治疗乳腺炎、呼吸道感染、泌尿系统感染、消化道感染及其他系统性感染。研究表明,闽北牧场在抗生素用药时,应在兽医指导下限制氨苄西林的使用,以降低奶源性细菌耐药性发生的风险。

综上所述,福建省闽北牧区的规模化牧场的 46 份生牛乳样品微生物污染程度较低,菌落总数全部达到农业行业标准“特优级”要求,符合市场对高品质原料乳的需求。生牛乳样品中的致病菌主要是金黄色葡萄球菌和克雷伯氏菌,对以氨苄西林为代表的 β -内酰胺类抗生素耐药情况较为严重,存在多重耐药风险。牧场应从改善饲养环境、加强奶牛健康营养管理等方面预防牛乳腺炎的发生,在兽医的指导下合理使用抗生素,注意药物剂量和疗程,减少耐药风险的发生,确保从牧场到餐桌全链条食品安全。

参 考 文 献

- [1] 宫春颖,孙健,粘靖祺,等.生牛乳质量影响因素的研究进展[J].中国乳业,2020(6):68-70.
- [2] FUSCO V, CHIEFFI D, FANELLI F, et al. Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century[J]. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 2020, 19(4): 2013-2049.
- [3] EU. Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council laying down specific hygiene rules for the hygiene of foodstuffs[S]. European Union: European Parliament and of the Council, 2023.
- [4] USPHS/FDA. Grade “A” Pasteurized milk ordinance[S]. USA: Department of Health and Human Services, 2015.

- [5] 王娟. 生牛乳国内外法规与标准及相关技术要求质量安全指标比对分析研究[J]. 中国标准化, 2021(19): 179-185.
WANG J. Comparative analysis and research of quality and safety indicators of domestic and foreign regulations, standards and related technical requirements of raw milk[J]. China Stand., 2021(19): 179-185.
- [6] 肖沙, 赵格, 赵建梅, 等. 生鲜乳中致病微生物污染来源、危害与消减措施[J]. 中国乳业, 2023(5): 65-70, 76.
XIAO S, ZHAO G, ZHAO J M, *et al.* Sources, hazards and abatement measures of pathogenic microbial contamination in raw milk[J]. China Dairy, 2023(5): 65-70, 76.
- [7] 赵祎云, 隋国燕, 唐峰, 等. 兰州地区奶牛临床型乳房炎主要病原菌分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(3): 91-94.
ZHAO Y Y, SUI G Y, TANG F, *et al.* Isolation, identification and drug resistance of pathogenic bacteria isolated from a cow with clinical mastitis in Lanzhou area[J]. Chin. J. Vet. Med., 2020, 56(3): 91-94.
- [8] 梁雨, 邱志刚, 李辰宇, 等. 冬季天津典型集约化畜禽养殖场粪便微生物污染调查[J]. 环境与健康杂志, 2019, 36(7): 595-598.
LIANG Y, QIU Z G, LI C Y, *et al.* Microbial contamination in feces of typical intensive livestock and poultry farms in Tianjin in winter[J]. J. Environ. Health, 2019, 36(7): 595-598.
- [9] 刘桂兰, 邓旭明, 刘爱玲, 等. 牛乳房炎用药国内外制剂审批情况[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(10): 117-120.
- [10] FLOREZ-CUADRADO D, MORENO M A, UGARTE-RUÍZ M, *et al.* Antimicrobial resistance in the food chain in the European union[J]. Adv. Food Nutr. Res., 2018, 86: 115-136.
- [11] Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - 30th Edition: CLSI M100-Ed30[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [12] 李雨哲, 王君. 我国生牛乳菌落总数和体细胞数调查及其影响因素分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(3): 257-263.
LI Y Z, WANG J. Investigation on situation of aerobic plate count and somatic cell count of raw milk in China and analysis of its influential factors[J]. Chin. J. Food Hyg., 2018, 30(3): 257-263.
- [13] VAN SCHAİK G, LOTEM M, SCHUKKEN Y H. Trends in somatic cell counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999-2000[J]. J. Dairy Sci., 2002, 85(4): 782-789.
- [14] RUUSUNEN M, SALONEN M, PULKKINEN H, *et al.* Pathogenic bacteria in Finnish bulk tank milk[J]. Foodborne Pathog. Dis., 2013, 10(2): 99-106.
- [15] PIEPERS S, ZRIMŠEK P, PASSCHYN P, *et al.* Manageable risk factors associated with bacterial and coliform counts in unpasteurized bulk milk in Flemish dairy herds[J]. J. Dairy Sci., 2014, 97(6): 3409-3419.
- [16] DOYLE C J, GLEESON D, O'TOOLE P W, *et al.* Impacts of seasonal housing and teat preparation on raw milk microbiota: a high-throughput sequencing study[J/OL]. Appl. Environ. Microbiol., 2016, 83(2): e02694-16[2024-10-15]. <https://doi.org/10.1128/AEM.02694-16>.
- [17] 罗伦穗. 湖南省生鲜乳菌落总数、大肠菌群检测及微生物多样性研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2023.
LUO L S. Research on total bacteria count, coliform detection and microbial diversity of raw milk in Hunan Province[D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2023.
- [18] WARETH G, NEUBAUER H. The animal-foods-environment interface of *Klebsiella pneumoniae* in Germany: an observational study on pathogenicity, resistance development and the current situation[J]. Vet. Res., 2021, 52(1): 16.
- [19] 王慧, 刘伯承, 段洪峰, 等. 湖南部分地区奶牛乳房炎主要病原菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国奶牛, 2019(8): 36-39.
WANG H, LIU B C, DUAN H F, *et al.* Isolation, identification and drug susceptibility test for the main pathogenic bacteria of cow mastitis in some local areas of Hunan[J]. China Dairy Cattle, 2019(8): 36-39.
- [20] 陈威风, 崔丽伟, 常惟丹, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B、C、D、E 重组载体的构建及表达[J]. 生物技术进展, 2022, 12(2): 313-317.
CHEN W F, CUI L W, CHANG W D, *et al.* Construction and expression of recombinant vectors of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E[J]. Curr. Biotechnol., 2022, 12(2): 313-317.
- [21] 邓波, 王晓旭, 刘洋, 等. 上海地区生乳中肺炎克雷伯氏菌毒力基因和耐药性分析[J]. 中国奶牛, 2021(6): 35-40.
DENG B, WANG X X, LIU Y, *et al.* Analysis of virulence genes and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* in raw milk in Shanghai[J]. China Dairy Cattle, 2021(6): 35-40.
- [22] 李梦娇, 彭晨, 徐绍忠, 等. 克雷伯氏菌在农业与环境治理上的应用[J]. 生物技术进展, 2014, 4(6): 415-420.
LI M J, PENG S, XU S Z, *et al.* Application of *Klebsiella* spp. in agriculture and environmental management[J]. Curr. Biotechnol., 2014, 4(6): 415-420.
- [23] EYOH A B, TOUKAM M, ATASHILI J, *et al.* Relationship between multiple drug resistance and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from medical and non-medical personnel in Yaounde, Cameroon[J]. Pan. Afr. Med. J., 2014, 17: 186.
- [24] 何源, 王红, 刘晓朋, 等. 重庆市生牛乳中金黄色葡萄球菌的污染状况及耐药性调查的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(19): 2858-2859.
HE Y, WANG H, LIU X P, *et al.* Survey and study on the pollution and drug resistance of golden *Staphylococcus* in fresh milks of Chongqing[J]. Chin. J. Health Lab. Technol., 2014, 24(19): 2858-2859.
- [25] 张从超. 生牛乳中金黄色葡萄球菌的快速检测及耐药性研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2017.
ZHANG C C. Rapid detection of staphylococcus aureus and antibiotic resistance in raw milk[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2017.
- [26] 刘慧敏. 我国奶业主产区生鲜乳中金黄色葡萄球菌耐药性及分子特征研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
LIU H M. Antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *staphylococcus aureus* isolated from raw milk in China[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018.
- [27] 吴香云. 湖北地区奶牛乳房炎源肺炎克雷伯菌毒力和耐药分子特征研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
WU X Y. Study on molecular characteristics of virulence and resistance of *Klebsiella pneumoniae* from mastitis cows in Hubei[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022.