

# 奶牛场沙门氏菌分离株的流行特征及抗性分析

杨若璇, 唐凯伟, 朱成林, 陈娟, 刀筱芳, 唐俊妮\*

(西南民族大学食品科学与技术学院, 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室, 四川成都 610041)

**摘要:** 研究奶牛场沙门氏菌分离株的流行特征及抗性分析。从成都市某规模化奶牛场采集样品, 对菌株进行分离鉴定和血清型分析, 药敏检测, 毒力基因、耐药基因和抗消毒剂基因检测, 对常用消毒剂 MIC 值检测, 以及有效巴氏灭菌温度分析。该研究共采集样品 700 份, 分离 16 株沙门氏菌, 得到 4 种血清型 (肠炎沙门氏菌 6 株、甲型副伤寒沙门氏菌 6 株、鼠伤寒沙门氏菌 3 株、婴儿沙门氏菌 1 株); 菌株对头孢他啶、左氧氟沙星、亚胺培南敏感, 携带 24 种耐药基因, 检出率最高是 *tetB* (93.75%), 其次是 *aaC4* (75.00%); 检出 12 种毒力基因, *sipA* 检测率最高为 62.50%; 抗消毒剂基因检出率最高为 *qacEAI* (56.25%)。16 株沙门氏菌对 9 种不同消毒剂 MIC 值普遍高于厂家推荐使用浓度的 1~3 倍; 菌株在全脂乳和脱脂乳中 100% 杀菌温度分别为 64.00 °C 和 63.50 °C。该奶牛场沙门氏菌分离菌株对消毒剂抗性较强, 但在 64.00 °C 能够对其有效杀灭。建议奶牛场加强沙门氏菌防控, 规范消毒剂使用。

**关键词:** 沙门氏菌; 奶牛场; 血清型; 抗生素; 消毒剂

文章编号: 1673-9078(2022)10-261-271

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.10.1441

## Epidemic Characteristics and Resistance of *Salmonella* Isolates from A Dairy in Chengdu City

YANG Ruoxuan, TANG Kaiwei, ZHU Chenglin, CHEN Juan, DAO Xiaofang, TANG Junni\*

(College of Food Sciences and Technology, Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau, Animal Genetic Resource Reservation and Utilization of Ministry of Education, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** Samples were collected from a large dairy farm in Chengdu city to study the epidemic characteristics and resistance of *Salmonella* isolates. Strains of *Salmonella* were isolated, identified, and serotyped. Drug susceptibility, virulence, drug resistance, and disinfectant resistance genes were tested. Minimum inhibitory concentrations (MIC) to commonly used disinfectants and effective sterilization temperatures were also determined. A total of 700 samples were collected; 16 strains of *Salmonella* and four serotypes were isolated (six strains of *Salmonella enteritidis*, six strains of *S. paratyphoid A*, three strains of *S. typhimurium*, and one strain of *S. infantis*). All strains were sensitive to ceftazidime, levofloxacin, and imipenem. Twenty four drug resistance genes were detected, and the highest detection rate was noted for *tetB* (93.75%), followed by that of *aaC4* (75.00%). There were 12 virulence genes detected, and the highest detection rate was observed for *sipA* (62.50%); *qacEAI* showed the highest detection rate of the disinfectant genes (56.25%). The MIC values of 16 *Salmonella* strains against nine different disinfectants were generally one to three times higher than the recommended concentrations from the manufacturers. The 100% sterilization temperatures of the strains in whole and skim milk were 64.00 °C and 63.50 °C, respectively. The isolated strains of *Salmonella* on this dairy farm were resistant to some disinfectants, but could be effectively controlled at 64.00 °C. It is recommended that dairy farms strengthen the prevention and control of *Salmonella* and the use of disinfectants should be standardized.

**Key words:** *Salmonella*; dairy farms; serotype; antibiotics; disinfectants

引文格式:

杨若璇,唐凯伟,朱成林,等.奶牛场沙门氏菌分离株的流行特征及抗性分析[J].现代食品科技,2022,38(10):261-271

YANG Ruoxuan, TANG Kaiwei, ZHU Chenglin, et al. Epidemic characteristics and resistance of *Salmonella* isolates from a dairy in chengdu city [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(10): 261-271

收稿日期: 2021-12-24

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0500500); 四川省应用基础项目 (2019YJ0261); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2020NTD04)

作者简介: 杨若璇 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1255474486@qq.com

通讯作者: 唐俊妮 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与食品微生物, E-mail: junneytang@aliyun.com

沙门氏菌 (*Salmonella*) 是世界范围内引起食品公共安全问题的主要食源性致病菌之一, 被列为牛乳及其制品中微生物检测的主要对象之一<sup>[1]</sup>。牛乳品质的好坏与否取决于奶牛养殖场的环境以及牛乳生产加工各环节的卫生状况<sup>[2]</sup>。沙门氏菌会引起奶牛腹泻<sup>[3]</sup>, 减低奶牛产奶量, 导致牛乳品质降低, 给奶牛养殖业造成一定的经济损失<sup>[4]</sup>。为了防止奶牛感染致病菌, 在养殖期间使用抗生素、消毒剂, 甚至滥用抗生素成了主要的防控手段<sup>[5,6]</sup>。每年我国在养殖场中都会过量使用抗生素, 导致我国抗生素的使用量在全球的占比很高<sup>[7]</sup>。这也导致养殖场中耐药细菌的广泛存在<sup>[8]</sup>。奶牛养殖业目前呈现出规模化发展, 导致奶牛养殖密度变大, 病原微生物传播途径缩短, 有效的消毒杀菌是奶牛养殖场防控致病性微生物的重要保障<sup>[9]</sup>。Shaibu 等<sup>[10]</sup>通过对屠宰场被屠宰的牛以及加工环境标本中的沙门氏菌进行抗菌谱测定, 发现分离菌株对 3~5 种抗生素产生抗性, 表现为多重耐药。赵俊利等<sup>[11]</sup>针对内蒙古地区奶牛源致病性沙门氏菌的耐药特性及基因分析, 发现内蒙古地区奶牛源致病性沙门氏菌对甲氧苄啶及磺胺甲基异唑的耐药率最高 (97.4%), 对多数 $\beta$ -内酰胺类、氨基糖甙类、氯霉素类及四环素类药物的耐药性也较为严重 (耐药率为 40%~80%), 菌株的多重耐药率为 94.7%, 提示临床抗菌药物不合理使用可能是该地区奶牛源沙门氏菌耐药性产生的主要原因。消毒剂是目前食源性致病菌防控的有效手段<sup>[12]</sup>, 广泛用于控制食品生产设施和环境中的微生物污染<sup>[13]</sup>。但是, 消毒剂的广泛使用同样引起人们对其可能参与抗生素耐药性发展的担忧, 特别是对抗生素共同耐药的关注<sup>[14]</sup>。李帼宁等<sup>[15]</sup>揭示了社区环境中分离鉴定的沙门氏菌以 B 群鼠伤寒沙门氏菌为主要菌型, 其耐消毒剂基因携带率较高, 并且以 *qacEAI* 基因为主要携带类型, 菌株对消毒剂和抗生素抗性具有协同效应。沙门氏菌可从畜禽动物宿主中获得耐药性, 通过食物链引起人类感染<sup>[6]</sup>。只有科学管理和合理使用抗生素, 才能有效控制人畜共患沙门氏菌病, 保障食品安全和人类健康<sup>[17]</sup>。因此, 调查奶牛场沙门氏菌分离株的流行特征和抗性分析, 可为奶牛场沙门氏菌的防控以及抗生素、消毒剂的合理使用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 标准菌株和实验材料

本试验所需主要培养基及试剂见表 1。阳性对照菌株为沙门氏菌 H9812 (*Salmonella* H9812), 由本实验室保存。

表 1 主要培养基及试剂

试剂及培养基名称	生产商
亚硫酸盐胱氨酸增菌液 (SC)	
亚硫酸铋琼脂 (BS)	
缓冲蛋白胨水 (BPW)	青岛海博生物技术有限公司
木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD)	
PALCAM 琼脂	
胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA)	
核酸染料 GELVIEW	
氯化钠 NaCl	
Premix Ex Taq (Probe qPCR)	宝生物工程(大连)有限公司
TB Green Premix Ex Taq II	
Taq PCR Master Mix (2x, blue dye)	
DL 2000 Marker	北京擎科新业生物技术有限公司
G-10 电泳凝胶琼脂糖	Biowest 公司
Tris-HCl	北京博奥拓科技有限公司
EDTA	
沙门氏菌属诊断血清 (60 种)	宁波天润生物药业有限公司

### 1.2 主要仪器

本试验所需主要仪器见表 2。

表 2 主要仪器

仪器及设备名称	制造商
PCR 仪 TSNENEN031445	基因 (美国) 有限公司
VerSaDoc2000 凝胶成像系统	美国 Bio-Rad 有限公司
CFX96 荧光定量 PCR 仪	美国 Bio-Rad 有限公司
HZQ-F160 恒温振荡培养箱	江苏太仓市实验设备厂
5804R 型冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司
DYY-6C 型电泳仪	北京六一仪器厂
TGear Plate 微孔板离心机	天根生化科技有限公司
高压蒸汽灭菌锅	日本三洋公司
低温冰箱	日本三洋公司

### 1.3 样品采集

2020 年 7 月至 11 月, 分五个批次从成都市某规模化奶牛场的环境、产奶过程各环节、以及奶牛粪样中共采集 700 份样品。其中, 奶牛场环境样品 78 份, 健康奶牛粪样 88 份, 健康奶牛乳头 89 份, 健康奶牛奶样 48 份, 挤奶器 89 份, 腹泻奶牛粪样 118 份, 腹泻奶牛环境 97 份, 腹泻奶牛乳头 49 份, 乳房炎奶牛粪样 44 份。

#### 1.4 细菌分离、鉴定与血清型鉴别

参照国标 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学 沙门氏菌检验》方法进行样品分离鉴定。使用水浴法提取沙门氏菌的 DNA 模板<sup>[18]</sup>,以沙门氏菌的特异性 *invA* 基因引物进行 PCR 扩增,具体引物序列为:上游引物:CCCTTTGCGAATAACATCC;下游引物:ATTACTTGTGCCGAAGAGCC<sup>[18]</sup>。PCR 反应体系 20  $\mu$ L: 包含 Taq 1.1 $\times$ T3 Super PCR Mix 17  $\mu$ L, 上、下游引物各 1  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98  $^{\circ}$ C 变性 20 s; 56  $^{\circ}$ C 退火 10 s; 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 共 35 个循环, 72 延伸 2 min。沙门氏菌的血清型参照沙门氏菌属诊断血清说明书进行操作, 鉴定结果参考国家标准 GB/T 4789.4-2010《沙门氏菌检验标准》进行判断。

#### 1.5 药敏试验

药敏试验参考美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推

荐的 Kirby-Bauer 纸片扩散法, 结果按照 CLSI 的标准进行判定<sup>[19]</sup>。药敏纸片购置于赛默飞公司, 抗生素类型与使用剂量见表 3。

#### 1.6 耐药基因、毒力基因、抗消毒剂基因检测

DNA 模板制备同 1.4, 采用 PCR 扩增 27 种耐药基因, 13 种毒力基因, 5 种抗消毒剂基因, 其引物序列、扩增片段长度及退火温度见表 4, PCR 反应体系同 1.4。

#### 1.7 对不同消毒剂 MIC 值的测定

根据消毒剂化学结构以及作用机理特征, 参考 CLSI 推荐方法及判断标准法测定不同消毒剂对沙门氏菌 MIC 值<sup>[19]</sup>, 采用二倍稀释法, 将 9 种消毒剂 (表 5), 以消毒剂厂家推荐喷雾使用浓度为中间值, 分别向上、向下稀释梯度浓度, 将其混合溶解于营养肉汤培养基中, 接种 100  $\mu$ L 制备好的菌悬液, 每株菌做 3 个重复, 根据沙门氏菌的生长情况, 确定不同种类消毒剂抑制受试沙门氏菌生长的最低浓度, 即为 MIC 值。

表 3 抗生素药物及其使用剂量

Table 3 The antibiotic drugs and their dosages

抗生素药物类型	抗生素名称	抗生素代码	每片剂量/ $\mu$ g	
$\beta$ -内酰胺类	头孢西丁	COX	30	
	头孢噻肟	CTX	30	
	头孢他啶	CAZ	30	
	头孢曲松	CRO	30	
	氨苄西林	AMP	1	
	亚胺培南	IPM	10	
氨基糖苷类	庆大霉素	GEN	10	
	阿米卡星	AK	30	
	卡那霉素	KAN	30	
氟喹诺酮类	链霉素	STR	10	
	环丙沙星	CIP	5	
	氧氟沙星	OFLX	5	
	诺氟沙星	NOR	10	
四环素类	左氧氟沙星	LT	5	
	四环素	TET	30	
	苯丙醇类	氯霉素	CHL	30
	多肽类	杆菌肽	B	10
	安沙霉素类	利福平	RFP	5
	硝基咪唑类	呋喃因	F	300
	叶酸代谢途径抑制	甲氧苄啶	TMP	25

表4 耐药基因、毒力基因、抗消毒剂基因引物序列信息

Table 4 Primer sequence information of drug resistance genes, virulence genes and antidisinfectant gene

基因类别	引物名称	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	退火温度/°C	参考文献	
β-内酰胺类	<i>blaTEM-F</i>	ATGAGTATTC AACATTTC CG	643	58	[20]	
	<i>blaTEM-R</i>	CTGACAGTTACCAATGCTTA				
	<i>blaCTX-F</i>	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	532	58	[20]	
	<i>blaCTX-R</i>	TGGGTRAARTARGTSACCAGA				
	<i>blaPSE-F</i>	CGGCGGGATGGAACATT	150	58	[21]	
	<i>blaPSE-R</i>	GCTGTAATACTCCGAGCACCAA				
	<i>blaCMY-2-F</i>	GACAGCCTCTTTCTCCACA	896	57	[20]	
	<i>blaCMY-2-R</i>	TGGAACGAAGGCTACGTA				
	<i>blaSHV-F</i>	GGTTATGCGTTATATTCGCC	860	60	[20]	
	<i>blaSHV-R</i>	TTAGCGTTGCCAGTGCTC				
	<i>blaOXA-F</i>	TCAACTTCAAGATCGCA	591	51	[21]	
	<i>blaOXA-R</i>	GTGTGTTAGAATGGTGA				
四环素类	<i>tetA-F</i>	GTAATCTGAGCACTGTCCG	816	56	[20]	
	<i>tetA-R</i>	CTGCCTGGACAACATTGCTT				
	<i>tetB-F</i>	CTCAGTATCCAAGCCTTTG	486	56	[20]	
	<i>tetB-R</i>	ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG				
	<i>tetC-F</i>	GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC	513	56	[20]	
	<i>tetC-R</i>	CCTCTTGCGGGATAATCGTCC				
	<i>tetG-F</i>	GCAGCGAAAGCGTATTTGCG	226	55	[20]	
	<i>tetG-R</i>	TCCGAAAGCTGTCCAAGCAT				
耐药基因	<i>sul I -F</i>	CGGCGTGGGCTACCTGAACG	486	55	[20]	
	<i>sul I -R</i>	GCCGATCGCGTGAAGTCCG				
	磺胺类	<i>sul II-F</i>	GCGCTCAAGGCAGATGGCAIT	341	55	[20]
		<i>sul II-R</i>	GCGTTTGATAACCGGCACCCGT			
		<i>sul III-F</i>	TCAAAGCAAATGATATGAGC	269	55	[20]
	<i>sul III-R</i>	TTTCAAGGCATCTGATAAAGAC				
	喹诺酮类	<i>qnrS-F</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA	641	60	[22]
		<i>qnrS-R</i>	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC			
		<i>qnrA-F</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	515	65	[22]
		<i>qnrA-R</i>	GATCGGCAAAGGTCAGGTCA			
		<i>qnrB-F</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	263	61	[22]
		<i>qnrB-R</i>	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC			
<i>qnrC-F</i>		GGTTGTACATTTATTGAATC	515	65	[22]	
<i>qnrC-R</i>		TCCACTTACGAGGTTCT				
<i>qnrD-F</i>		AGATCAATTTACGGGGAATA	596	61	[22]	
<i>qnrD-R</i>		AACAAGCTGAAGCGCCTG				
<i>oqxA-F</i>		GATCAGTCAGTGGGATAGTTT	670	55	[23]	
<i>oqxA-R</i>		TACTCGGCGTTAACTGATTA				
氟喹诺酮类	<i>cmlA-F</i>	TGTCATTTACGGCATACTCG	900	59	[23]	
	<i>cmlA-R</i>	ATCAGGCATCCCATTCCCAT				
	<i>stcM-F</i>	CACGTTGAGCCTCTATATGG	890	58	[23]	
	<i>stcM-R</i>	ATGCAGAAGTAGAACGCGAC				
氨基糖苷类	<i>aac(6')-Ib-cr-F</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	63	[23]	
	<i>Aac(6')-Ib-cr-R</i>	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT				

续表 4

基因类别	引物名称	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	退火温度/°C	参考文献
耐药基因	<i>aaC1-F</i>	ACCTACTCCCAACATCAGCC	528	58	[23]
	<i>aaC1-R</i>	ATATAGATCTCACTACGCGC			
	<i>aaC2-F</i>	ACTGTGATGGGATACGCGTC	482	62	[23]
	<i>aaC2-R</i>	CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA			
	<i>aaC3-F</i>	CACAAGAACGTGGTCCGCTA	185	61	[23]
	<i>aaC3-R</i>	AACAGGTAAGCATCCGCATC			
	<i>aaC4-F</i>	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT	286	60	[23]
	<i>aaC4-R</i>	TCACTCGTTCTCCGCTCAT			
链霉素类	<i>strB-F</i>	GCGGACACCTTTTCCAGCCT	680	67	[24]
	<i>strB-R</i>	TCCGCCATCTGTGCAATGGCG			
毒力基因	<i>hilA-F</i>	CGTGAAGGGATTATCGCAGT	296	60	[23]
	<i>hilA-R</i>	GTCCGGGAATACATCTGAGC			
	<i>pefA-F</i>	TTGCACTGGGTGGTTCTGG	485	61	[23]
	<i>pefA-R</i>	TGTAACCCACTGCGAAAG			
	<i>rck-F</i>	AACGGACGGAACACAGAGTC	189	60	[23]
	<i>rck-R</i>	TGTCCTGACGAAAGTGCATC			
	<i>sefA-F</i>	GCAGCGTTACTATTGCAGC	321	60	[23]
	<i>sefA-R</i>	TGTGACAGGGACATTTAGCG			
	<i>sipA-F</i>	CCATTCGACTAACAGCAGCA	449	59	[23]
	<i>sipA-R</i>	CGGTCGTACCGGCTTTATTA			
	<i>sipC-F</i>	AGACAGCTTCGCAATCCGTT	446	62	[23]
	<i>sipC-R</i>	ATTCATCCCTTCGCGCATCA'			
	<i>sopB-F</i>	CCTCAAGACTCAAGATG	1 987	55	[23]
	<i>sopB-R</i>	TACGCAGGAGTAAATCGGTG			
	<i>sopE-F</i>	CGAGTAAAGACCCCGCATAC	362	61	[23]
	<i>sopE-R</i>	GAGTCGGCATAGCACACTCA'			
	<i>spvC-F</i>	ACTCCTTGCACAACCAAATGCGGA	571	66	[23]
	<i>spvC-R</i>	TGTCCTCTGCATTTGCCACCATCA			
	<i>ssaR-F</i>	GTTCGGATTGCTTCGG	1 628	59	[23]
	<i>ssaR-R</i>	TCTCCAGTGACTAACCCCTAACCAA			
<i>ssrA-F</i>	CTTACGATTACGCCATTTACGG	706	63	[23]	
<i>ssrA-R</i>	ATTTGGTGGAGCTGGCGGGACT				
<i>stnPI-F</i>	TTGTCTCGTATCACTGGCAACC	617	64	[23]	
<i>stnPI-R</i>	ATTCGTAACCGCTCTCGTCC				
<i>gipA-F</i>	GCAAGCTGTACATGGCAAAG	543	55	[20]	
<i>gipA-R</i>	GGTATCGGTGACGAACAAAT				
<i>qacEΔ1-F</i>	AATCCATCCCTGTCGGTGTT	175	56	[21]	
<i>qacEΔ1-R</i>	CGCAGCGACTTCCACGATGGGGAT				
<i>qacE-F</i>	AAGTAATCGCAACATCCG	258	50	[21]	
<i>qacE-R</i>	CTACTACACCACTAACTATGAG				
<i>qacF-F</i>	GTCGTCGCAACTCCGCACTG	229	60	[21]	
<i>qacF-R</i>	TGCCAACGAACGCCACA				
<i>qacG-F</i>	TCGCCTACGCATTTGGT	122	56	[21]	
<i>qacG-R</i>	AACGCCGCTGATAATGAA				
<i>sugE(p)-F</i>	GTCTTACGCCAAGCATTATCACTA	190	57	[21]	
<i>sugE(p)-R</i>	CAAGGCTCAGCAAACGTGC				
抗消毒剂基因					

表5 9种消毒剂成分以及使用浓度

Table 5 The ingredients of 9 disinfectants and concentration

消毒剂	主要有效成分	厂家推荐使用浓度
A 消毒剂	对氯间二甲苯酚 (PCMX) 2.30%~2.80% (m/m)	1:50~1:100
B 消毒剂	次氯酸钠 11.0~14.9 g/L	1:30~1:50
C 消毒剂	次氯酸钠有效氯含量 8 000~10 500 mg/L	1:9~1:29
D 消毒剂	异丙醇 67%~73% (V/V)	适量
E 消毒剂	苯扎氯铵 0.45%~0.55% (m/V)	1:100
F 消毒剂	EDTA-4Na、松油醇、异丙醇、乙醇、对氯间二甲苯酚	1:400~1:500
G 消毒剂	对氯间二甲苯酚 4.3%~5.3% (m/V)	1:30~1:50
H 消毒剂	二氯异氰尿酸钠有效氯含量 13%~15%	1:250
I 消毒剂	十二烷基二甲基苄基氯化铵 2.5%±0.25% (m/m)	1:120~1:200

## 1.8 数据统计分析

数据采用 Microsoft Excel 软件初步进行整理分析, 统计学分析采用 SPSS 20.0 软件, 作图采用 GraphPad Prism 8 (v8.0.2.263) 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌分离鉴定及血清型分布

通过选择性培养基以及沙门氏菌特异基因 *invA* 检测, 从成都地区规模化奶牛场环境中各环节及牛乳在生产过程中采集 700 份样品, 共分离鉴定出 16 株沙门氏菌 (2.29%, 16/700)。从奶牛场环境 1 株 (1.28%, 1/78); 健康奶牛粪样 1 株 (1.14%, 1/88); 腹泻奶牛粪样 6 株 (5.08%, 6/118); 腹泻奶牛环境 5 株 (5.15%, 5/97); 腹泻奶牛乳头 2 株 (4.08%, 2/49); 乳房炎奶牛粪样 1 株 (2.27%, 1/44), 结果显示该奶牛场采奶环节中沙门氏菌的污染范围较为广泛。冯兰等<sup>[23]</sup>对四川省阿坝州红原县采集腹泻牦牛样品, 16 份样品共计分离出 16 株沙门氏菌, 沙门氏菌检出率达到 100%。说明密集的养殖场环境可致使病原菌在奶牛场之间的传播风险更高, 感染率高且造成的影响和危害更为严重<sup>[24]</sup>。奶牛养殖业是我国畜牧养殖重要的产业之一, 其中, 细菌性腹泻中的沙门氏菌是严重危害养殖场中畜禽健康的一类致病菌, 且在奶牛养殖环节以及牛乳生产过程中也经常会发生食源性微生物的污染进而引起人的传染。

进一步, 采用沙门氏菌属诊断血清试剂盒从分离菌株中鉴定出 4 种血清型, 包括肠炎沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、婴儿沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌,

详见表 6。其中甲型副伤寒沙门氏菌为优势血清 ( $n=6$ , 37.50%)、肠炎沙门氏菌 ( $n=6$ , 37.50%), 其次, 鼠伤寒沙门氏菌 ( $n=3$ , 18.75%)、婴儿沙门氏菌 ( $n=1$ , 6.25%)。在中国, 沙门氏菌流行的血清型众多<sup>[25]</sup>。张树栋等<sup>[26]</sup>发现牛源沙门氏菌的血清型多为鼠伤寒沙门氏菌或者都柏林沙门氏菌, 这与本试验研究结果大致相似, 血清型的差异可能是由于地理区域、季节和采样方法的不同导致, 也表明奶牛场中沙门氏菌容易在各种环境中交叉污染。

### 2.2 药敏试验

16 株沙门氏菌对 20 种常见抗生素的耐药表型如表 7 所示, 分离菌株对杆菌肽和利福平的耐药性最高, 为 100.00% (16/16), 其次是氨苄西林, 检出率为 93.75% (15/16), 对亚胺培南、氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星、左氧氟沙星和头孢他啶这 6 种药物的耐药率均为 0。此外, 分离菌株还对多种抗生素表现为中介, 如对链霉素 (75.00%)、庆大霉素 (62.50%)、阿米卡星 (62.50%) 等。本研究结果与何名扬等<sup>[27]</sup>及加春生等<sup>[28]</sup>的研究结果相似, 包东武等<sup>[29]</sup>研究指出在对沙门氏菌及各类细菌传染性疾病预防治疗过程中, 需要谨慎性用药。因为按规定使用抗生素能够有效降低沙门氏菌耐药性的产生<sup>[30]</sup>。该奶牛场在针对治疗沙门氏菌引起的患病奶牛时, 建议使用氟喹诺酮类抗生素药物。

从表 8 可以看出 16 株沙门氏菌分离菌株的耐药表型均为多重耐药性, 分离菌株对 3 种以上抗生素表现为耐药。优势多重耐药谱为: 杆菌肽 (B)、氨苄西林 (AMP)、利福平 (RFP), 说明该奶牛场沙门氏菌分离菌株存在多重耐药现象。

表 6 沙门氏菌血清型分布情况

Table 6 Distribution of *Salmonella* serotypes

血清型	分离的菌株数/%	环境样品	健康牛粪	腹泻牛粪	腹泻环境样品	腹泻牛乳头	乳房炎奶牛牛粪
<i>S. paratyphi</i>	6 (37.50)	1	-	2	2	1	-
<i>S. enteritidis</i>	6 (37.50)	-	-	3	2	1	-
<i>S. infantis</i>	1 (6.25)	-	-	-	-	-	1
<i>S. typhimurium</i>	3 (18.75)	-	1	1	1	-	-
总计	16 (100)	1	1	6	5	2	1

表 7 沙门氏菌分离株对 20 种抗生素的药敏结果

Table 7 The results of susceptibility of *Salmonella* isolates to 20 antibiotics

药物名称	敏感 S	敏感率/%	中介 I	中介率/%	耐药 R	耐药率/%
头孢西丁 (COX)	2	12.50	8	50.00	6	37.50
头孢噻肟 (CTX)	11	68.75	3	18.75	2	12.50
头孢他啶 (CAZ)	14	87.50	2	12.50	0	0
头孢曲松 (CRO)	14	87.50	1	6.25	1	6.25
庆大霉素 (GEN)	0	0	10	62.50	6	37.50
阿米卡星 (AK)	5	31.25	10	62.50	1	6.25
卡那霉素 (KAN)	3	18.75	9	56.25	4	25.00
链霉素 (STR)	1	6.25	12	75.00	3	18.75
环丙沙星 (CIP)	12	75.00	4	25.00	0	0
氧氟沙星 (OFLX)	10	66.67	6	37.50	0	0
诺氟沙星 (NOR)	14	87.50	2	12.50	0	0
左氧氟沙星 (LT)	16	100	0	0	0	0
氯苄西林 (AMP)	1	6.25	0	0	15	93.75
亚胺培南 (IPM)	15	93.75	1	6.25	0	0
四环素 (TET)	1	6.25	6	37.50	9	56.25
氯霉素 (CHL)	8	50.00	2	12.50	6	37.50
杆菌肽 (B)	0	0	0	0	16	100
利福平 (RFP)	0	0	0	0	16	100
呋喃妥因 (F)	9	56.25	2	12.50	5	31.25
甲氧苄啶 (TMP)	8	50.00	1	6.25	7	43.75

注：S 表示敏感；I 表示中度敏感；R 表示耐药。

表 8 分离菌株多重耐药谱

Table 8 Multidrug resistance profiles of *Salmonella* isolates

种类	耐药谱	菌株数	耐药率/%
3	GEN-RFP-B	1	6.25
4	GEN-AMP-RFP-B	4	25.00
5	GEN-AMP-COX-RFP-B	2	12.50
6	GEN-TET-AMP-TMP-RFP-B	1	6.25
6	TET-CHL-AMP-COX-RFP-B	1	6.25
6	TET-AMP-TMP-F-RFP-B	1	6.25
8	TET-CHL-AMP-TMP-RFP-STR-KAN-B	1	6.25
8	GEM-CTX-CTX-TET-AMP-RFP-KAN-B	1	6.25
9	GEN-TET-CHL-AMP-TMP-F-RFP-KAN-B	1	6.25
9	GEN-TET-CHL-AMP-TMP-RFP-STR-KAN-B	1	6.25
10	GEN-TET-CHL-AMP-TMP-F-COX-RFP-AK-B	1	6.25
13	GEN-CTX-TET-CHL-AMP-TMP-F-COX-RFP-STR-KAN-B-LT	1	6.25

### 2.3 抗生素耐药基因检测结果

27种耐药基因检测到24种,检出率最高的是*tetB* (93.75%),其次是*aacA4* (75.00%),未检测到*qnrC*、*aacC3*和*tetG*耐药基因。检测结果如图1。四环素类耐药基因中,*tetB*基因的携带率高达93.75%,分析原因可能跟早期使用四环素类抗生素有关。16株沙门氏菌分离菌株中有一半以上的分离菌株携带磺胺类耐药基因,经询问磺胺类药物也是该奶牛场主要的治疗用药。氯霉素类耐药基因中*stcM*携带率为50.00%,*cmlA*携带率为12.50%。分离菌株中携带率较低的是链霉素类*strB*基因,仅1株分离菌株携带。通过分析耐药基因检测结果发现与张文字<sup>[30]</sup>、冯兰<sup>[31]</sup>等研究结果存在一定差异,表明不同地区、不同时间采样的沙门氏菌耐药性存在不同。

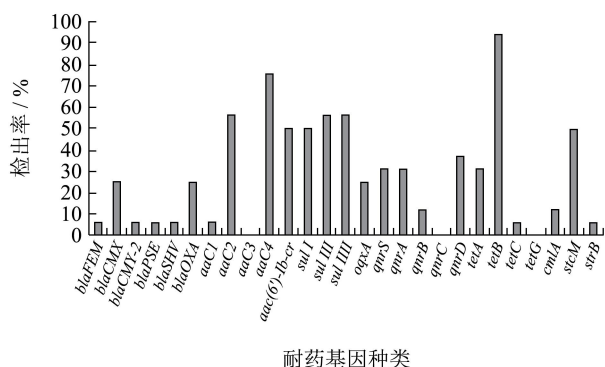


图1 沙门氏菌不同耐药基因检测结果

Fig.1 Results of different drug resistance genes in *Salmonella*

### 2.4 毒力基因检测结果

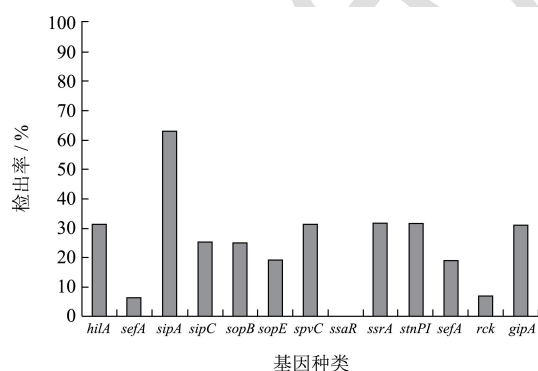


图2 沙门氏菌不同毒力基因检测结果

Fig.2 The results of different virulence genes in *Salmonella*

针对13对毒力基因,检测结果显示,详见图2,分离菌株携带12种不同的毒力基因,未检测到*ssaR*毒力基因。Dlamini等<sup>[32]</sup>从牛粪便和生牛肉样本中分离出300株沙门氏菌,27.10%的分离株具有*spvC*基因,来源不一样的沙门氏菌携带相同的毒力基因时,所表现出的致病性不同<sup>[33]</sup>。研究发现质粒上携带的毒

力基因更加具有致病性<sup>[34]</sup>,如*spvC*基因在质粒上,可发生转移。此外*spvC*基因的产物与毒力表型具有一定的相关性,有利于沙门氏菌在肠外组织细胞内生长<sup>[21]</sup>。宋雪等<sup>[35]</sup>研究发现,毒力基因的携带情况与宿主的健康程度相关,进一步证实了毒力基因的携带率与致病性呈正相关<sup>[36]</sup>,毒力基因检出率越高,沙门氏菌潜在致病性就越强。可以确定该奶牛场奶牛腹泻的原因与携带多种毒力基因的沙门氏菌有关,这些毒力基因的存在可能会促进沙门氏菌向宿主的入侵,并且奶牛的发病率相关。

### 2.5 抗消毒剂基因检测结果

抗消毒剂基因的检测结果显示如图3,除*qacG*未被检出外,16株沙门氏菌分离菌中4种基因均有检出,其中*qacEA1*基因检出率最高为56.25%。杨盛智等<sup>[37]</sup>在研究鸡蛋生产链中沙门氏菌对抗生素及消毒剂的耐药性中也仅检测出*qacEA1*消毒剂耐药基因,且发现所有检测出*qacEA1*基因的菌株均对抗生素产生抗性。本研究结果与之相似,说明*qacEA1*基因在不同来源、不同环境中的沙门氏菌分离菌株中的检出率均较高。

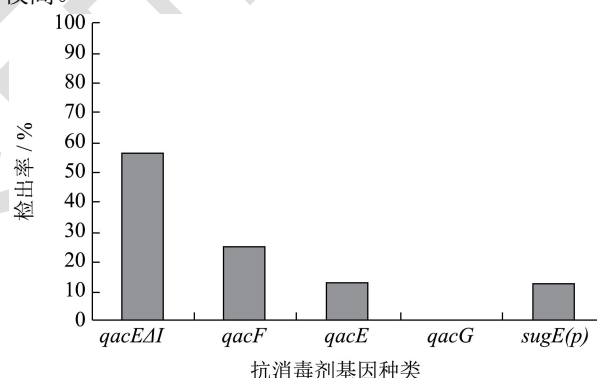


图3 沙门氏菌抗消毒剂基因检测结果

Fig.3 The results of different anti-disinfectant genes in *Salmonella*

### 2.6 不同消毒剂对分离出的16株沙门氏菌

#### MIC值分析

9种消毒剂对16株沙门氏菌分离菌株消毒效果MIC值的比较,结果如表9所示,除了G消毒剂,其它8种消毒剂的最小抑菌浓度均高于厂家推荐使用浓度。

分离菌株对9种消毒剂敏感程度都较为广泛,稀释的浓度梯度跨度也较大。研究发现,消毒剂成分相同但品牌不同的消毒剂MIC值也存在差异,分析与消毒剂原始浓度有关,从消毒剂对受试菌株的抑菌效果可以看出,消毒剂A、C、D、H在30min内可以



就能够达到杀菌率 100%；消毒剂 B、E、F、G、I 均在 60 min 内可以达到 100%的杀菌率，详见图 4。

表 9 消毒剂厂家推荐使用浓度与试验使用浓度

Table 9 Recommended concentration and test concentration of disinfectant manufacturer

消毒剂种类	厂家推荐使用浓度	实际使用 MIC 浓度
A 消毒剂	1:50~1:100 (9~20 µg/mL)	1:40~1:120 (8~24.5 µg/mL)
B 消毒剂	1:30~1:50 (20~32.5 µg/mL)	1:1 (500 µg/mL)
C 消毒剂	1:9~1:29 (33~100 µg/mL)	1:1 (500 µg/mL)
D 消毒剂	适量 (适量)	1:1~1:2 (333~500 µg/mL)
E 消毒剂	1:100 (10 µg/mL)	1:40~1:60 (16~24.5 µg/mL)
F 消毒剂	1:400~1:500 (1.9~2.5 µg/mL)	1:1~1:20 (16~24.5 µg/mL)
G 消毒剂	1:30~1:50 (32~20 µg/mL)	1:80~1:300 (3~12.5 µg/mL)
H 消毒剂	1:250 (4 µg/mL)	1:100 (10 µg/mL)
I 消毒剂	1:120~1:200 (5~8.5 µg/mL)	1:80~1:200 (5~12.5 µg/mL)

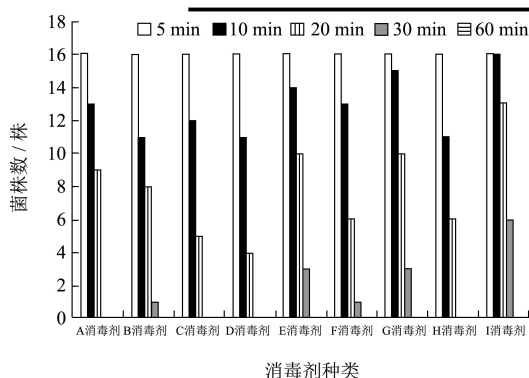


图 4 9 种消毒剂不同时间抑菌效果

Fig.4 Antibacterial effect of 9 kinds of disinfectants at different times

针对牛乳加工环节和环境消毒灭菌尤为重要，有效的消毒是奶农场疫病防控的重要保障。质粒型消毒剂抗性基因家族中 *qac* 基因最为常见，其编码的外排泵蛋白可排出双胍类消毒剂和季铵盐类消毒剂。李帼宁等<sup>[15]</sup>揭示沙门氏菌抗消毒剂基因携带率较高与多重耐药菌株消毒剂抗性较高密切相关。何雪萍等<sup>[37]</sup>研究认为长期使用消毒剂会导致动物养殖场中沙门氏菌对喹诺酮类药物的耐药性增强。针对该奶牛场的日常环境、器具消毒，建议多种类消毒剂定期交替规范使用，可减少致病菌耐药性的产生。

### 2.7 不同巴氏杀菌温度对沙门氏菌的杀菌效果

通过查阅相关文献<sup>[38]</sup>，在不影响牛乳品质和风味的情况下，选择低温保持式杀菌法对全脂乳和脱脂乳中的沙门氏菌进行巴氏杀菌，针对巴氏杀菌中的低温保持式杀菌法进行了温度的探究试验。如图 5 所示，全脂鲜牛乳中沙门氏菌菌落数随温度升高而减少，16 株沙门氏菌分离菌株 64.0 °C 时可以达到杀菌率 100%。在图 6 中可知，在脱脂乳中沙门氏菌菌落数也随着温度的升高而减少，16 株沙门氏菌分离菌株在 63.5 °C 杀

菌率能够达到 100%，在脱脂乳中巴氏杀菌效果显著。温度变化对 16 株沙门氏菌分离菌株的影响较大，热处理强度不同，其杀菌效果不同。

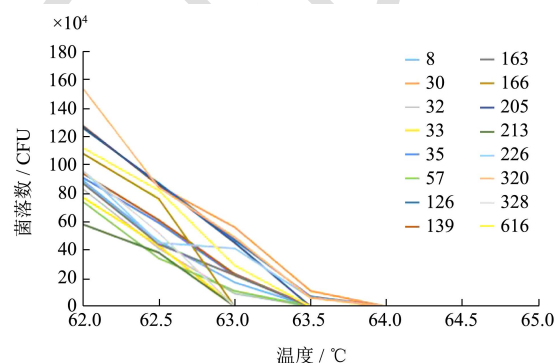


图 5 全脂乳中不同巴氏杀菌温度对 16 株沙门氏菌抑菌效果

Fig.5 The sterilization effect of different pasteurization temperatures in whole milk on 16 strains of *Salmonella*

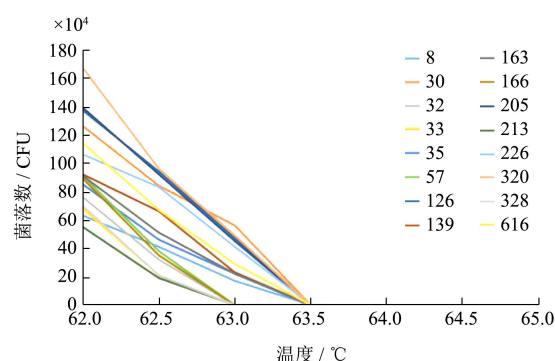


图 6 脱脂乳中不同巴氏杀菌温度对 16 株沙门氏菌抑菌效果

Fig.6 The sterilization effect of different pasteurization temperatures in skimmed milk on 16 *Salmonella* strains

### 3 结论

本研究以奶农场沙门氏菌分离菌株为研究对象，从牛乳生产链中采集 700 份样品，分离鉴定出 16 株沙门氏菌，检出率为 2.29%；血清型鉴定结果显示，分

离菌株中有 4 种血清型,以甲型副伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌为优势血清型,其次是鼠伤寒沙门氏菌;16 株沙门氏菌分离菌株对杆菌肽和利福平的耐药性高达 100.00%,其次是氨苄西林为 93.75%,对头孢他啶、氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星、左氧氟沙星和青霉素这 6 种药物敏感,16 株沙门氏菌分离菌株表现出多重耐药性;共检测到 24 种抗生素耐药基因,检出率最高的是 *tetB* (93.75%),其次是 *aaC4* (75.00%)。分离菌株中共检测到 12 种不同的毒力基因,检出率最高的是 *sipA* 毒力基因,检出率为 62.50% (10/16),未检测到 *ssaR* 毒力基因。抗消毒剂基因中,除 *qacG* 未被检出外,其他 4 种基因均有检出,其中 *qacEΔ1* 基因检出率最高为 56.25%。16 株沙门氏菌对 9 种不同种类消毒剂的 MIC 值基本都高于厂家推荐使用浓度的 1~3 倍。巴氏杀菌条件,在 64.0 °C、30 min 时,不管是在全脂乳还是脱脂乳中杀菌率都能达到 100%,建议加强对奶牛场中沙门氏菌的防控,严格规范使用抗生素和消毒剂以及加强监督管理牛乳生产链条中卫生质量管理。

## 参考文献

- [1] Holschbach C L, Peek S F. Salmonella in dairy cattle [J]. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2018, 34(1): 133-154
- [2] Lobacz A, Zulewska J. Fate of *Salmonella* spp. in the fresh soft raw milk cheese during storage at different temperatures [J]. Microorganisms, 2021, 9(5): 938
- [3] Navajas-benito E V, Alonso C A, Sanz S, et al. Molecular characterization of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains from a dairy cattle farm and its surroundings [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(1): 362-365
- [4] Chen W, Fang T, Zhou X, et al. IncHI2 plasmids are predominant in antibiotic-resistant salmonella isolates [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(1): 1566
- [5] 郭锐,田永祥,周丹娜,等.规模化养殖场带畜消毒剂的选择和使用方法[J].养猪,2018,3:87-88
- [6] 刘楠,张静,龚月生.养殖场滥用抗生素的危害与防范对策[J].现代畜牧科技,2020,7:72-73
- [7] Okorie-kanu O J, Ezen-duka E V, Okorie-kanu C O, et al. Occurrence and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in retail raw table eggs sold for human consumption in Enugu state, Nigeria [J]. Veterinary World, 2016, 9(11): 1312-1319
- [8] Anastasiadou M, Michailidis G. Cytokine activation during embryonic development and in hen ovary and vagina during reproductive age and *Salmonella* infection [J]. Research in Veterinary Science, 2016, 109: 86-93
- [9] Cooper A L, Low A J, Koziol A G, et al. Systematic evaluation of whole genome sequence-based predictions of *Salmonella* serotype and antimicrobial resistance [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 549
- [10] Shaibu A O, Okolocha E C, Maikai B V, et al. Isolation and antibiogram of *Salmonella* species from slaughtered cattle and the processing environment in Abuja abattoirs, Nigeria [J]. Food Control, 2021, 125: 107972
- [11] 赵俊利,石瑞丽,李志芳,等.内蒙古地区奶牛源致病性沙门氏菌耐药性分析及 ESBLs 基因检测[J].中国畜牧兽医,2015,42(8):2150-2159
- [12] Vohra P, Vrettou C, Hope J C, et al. Nature and consequences of interactions between *Salmonella enterica* serovar Dublin and host cells in cattle [J]. Veterinary Research, 2019, 50(1): 99
- [13] 齐建军,孙红霞,赵建利.食品工业中常用消毒剂的分析与应用[J].中国洗涤用品工业,2021,5:70-73
- [14] 吴上,杨阳,孙嘉笛,等.消毒剂胁迫鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028s 的抗性及其耐药性测定[J].山东农业大学学报(自然科学版),2021,52(1):13-18
- [15] 李帼宁,黄校樑,何杏欣,等.沙门菌耐药性及其耐消毒剂基因的分析[J].热带医学杂志,2021,21(1):40-43
- [16] 潘航,李肖梁,方维焕,等.美国近 20 年主要食源性致病菌的分布及耐药性分析-对我国细菌耐药性监控工作的启示[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2018,44(2):237-246
- [17] Li Y C, Pan Z M, Kang X L, et al. Prevalence characteristics and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* in retail pork in Jiangsu Province, Eastern China [J]. Journal of Food Protection, 2014, 77(2): 236-245
- [18] 陈光丽,刘海林,马健.煮沸法提取细菌 DNA 在布病病原检测中的应用[J].畜牧兽医科技信息,2015,1:28-29
- [19] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th informational supplement [S]. Wayne, PA: CLSI,2015
- [20] 张芬,周秀娟,宋启发,等.宁波地区沙门氏菌耐药性监测及毒力基因筛查[J].中国食品学报,2019,19(2):216-222
- [21] 郭莉娟.动物性食品源沙门氏菌对抗生素和消毒剂的耐药性研究[D].雅安:四川农业大学,2015
- [22] 冯林,王旭东,李九彬,等.重庆部分羊场沙门氏菌的分离鉴定、耐药表型分析及耐药基因检测[J].中国畜牧兽医,2020,47(7):2256-2263
- [23] 刘青霄.芦花鸡鸡胚源沙门氏菌的分离鉴定及其耐药与毒力相关基因分析[D].泰安:山东农业大学,2020

- [24] 胡雷凤,段合波,吴清,等.神农架林区食源性沙门氏菌血清型、耐药性和毒力特征分析[J].武汉轻工大学学报,2019,38(6):1-7
- [25] Hayward M R, Abuoun M, Wooward M J, et al. Temperature and oxygen dependent metabolite utilization by *Salmonella enterica* Serovars Derby and Mbandaka [J]. PLOS One, 2015, 10(3): e0120450
- [26] 张树栋,李豪,万强,等.由沙门氏菌引起的犊牛腹泻病的实验室诊断及防治[J].中国畜牧兽医,2017,44(8):2424-2430
- [27] 何名扬,朱必婷,王鸣秋,等.武汉地区食源性沙门氏菌耐药特征分析[J].食品安全质量检测学报,2021,12(1):78-85
- [28] 加春生,毛泽明,王晓楠,等.猪沙门氏菌的分离鉴定及其耐药性分析[J].东北农业大学学报,2014,8:49-54
- [29] 包东武,李建华.临床分离沙门氏菌的耐药性分析[J].中国实用医药,2014,24:184-185
- [30] 张文宇,杜雄伟,岳威威.大连地区食源性沙门氏菌耐药性检测[J].畜牧兽医科技信息,2012,2:35-36
- [31] 冯兰,安添午,崔鹏飞,等.牦牛德乐沙门氏菌的分离、鉴定及致病性研究[J].四川大学学报(自然科学版),2020,57(5):1022-1028
- [32] Dlamini B S, Montso P K, Kumar A, et al. Distribution of virulence factors, determinants of antibiotic resistance and molecular fingerprinting of *Salmonella* species isolated from cattle and beef samples: suggestive evidence of animal-to-meat contamination [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2018, 25(32): 32694-32708
- [33] 程琼,庞瑞亮,王若晨,等.不同源沙门氏菌对小鼠致病力的比较与毒力基因检测[J].中国人兽共患病学报,2013,29(5):460-465
- [34] 刘芳萍,王德宁,李昌文,等.鸡源沙门氏菌耐药性的分析及毒力基因的检测[J].中国兽医科学,2013,43(12):1236-1239
- [35] 宋雪,赵格,刘文化,等.不同来源沙门氏菌的毒力基因检测与耐药性分析[J].中国动物检疫,2017,34(5):40-46
- [36] 杨盛智,吴国艳,龙梅,等.鸡蛋生产链中沙门氏菌对抗生素及消毒剂的耐药性研究[J].遗传,2016,38(10):948-956
- [37] 何雪萍,许学斌,刘爱平,等.鼠伤寒沙门氏菌对抗生素和消毒剂耐药性研究[J].中国食品卫生杂志,2020,32(4):356-363
- [38] Ngai D G, Nyamache A K, Ombor O. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species and *Escherichia coli* isolates from poultry feeds in Ruiru Sub-County, Kenya [J]. BMC Research Notes, 2021, 14(1): 41