

奶牛场采奶环节大肠埃希氏菌分离鉴定及对抗生素和消毒剂的抗性分析

穆雨欣, 余锦明, 杨若璇, 朱成林, 刀筱芳, 陈娟, 唐俊妮*

(西南民族大学食品科学与技术学院, 四川成都 610041)

摘要: 为了解奶牛场采奶过程中大肠埃希氏菌污染状况、菌株所携带毒力基因及其对抗生素和消毒剂抗性。选择成都市某奶牛场随机采集 655 份样品, 对致病性大肠埃希氏菌进行分离鉴定, 并检测分离株携带的毒力基因、耐药基因以及抗消毒剂基因, 筛选出毒力强菌株, 分别检测菌株对抗生素和消毒剂的敏感性。结果表明, 一共分离得到 249 株大肠埃希氏菌, 鉴定致病性大肠埃希氏菌有 123 株, 其中, 肠道聚集性大肠埃希氏菌 (EAEC) 为该奶牛场主要致病性大肠埃希氏菌, 占比 77.23%; 16 株携带 2~4 种毒力基因不同来源菌株被挑选出来, 检出了 14 种耐药基因和 1 种耐消毒剂基因。药敏试验中, 耐药性最高为杆菌肽 B (100.00%), 依次是青霉素 (93.75%)、利福平和万古霉素 (87.50%), 菌株呈现多重耐药现象 (2~10 耐); 针对选取的 8 种常用消毒剂, 发现 3 种对奶牛场中绝大多数大肠埃希氏菌有显著抑菌效果, 可推荐使用。该奶牛场致病性大肠埃希氏菌以 EAEC 为主, 菌株对抗生素和消毒剂有一定的抗性, 应引起重视。

关键词: 致病性大肠埃希氏菌; 毒力基因; 耐药基因; 抗生素抗性; 消毒剂抗性

文章编号: 1673-9078(2022)01-50-62

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.1169

Isolation and Identification of *Escherichia coli* and Its Resistance to Antibiotics and Disinfectants during Milk Collection in Dairy Farms

MU Yuxin, YU Jinming, YANG Ruoxuan, ZHU Chenglin, DAO Xiaofang, CHEN Juan, TANG Junni*

(College of Food Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: To determine the state of *Escherichia coli* contamination, virulence genes harbored by *E.coli* isolates, and resistance of *E.coli* to antibiotics and disinfectants during the milk collection process in dairy farms, 655 samples were randomly collected from a dairy farm in Chengdu for the isolation and identification of *E. coli* strains. The virulence genes, drug resistance genes, and disinfectant resistance genes harbored by the isolates were detected, and highly virulent strains were screened for the measurement of susceptibility toward antibiotics and disinfectants. Results showed that a total of 249 *E. coli* strains were isolated, of which 123 were diarrheagenic. Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) was the main diarrheagenic *E. coli* (DEC) in the dairy farm, accounting for 77.23% of all diarrheagenic strains. Sixteen strains from different sources, each carrying two to four virulence genes, were screened, among which 14 drug resistance genes and one disinfectant resistance gene were detected. Susceptibility testing revealed that resistance to bacitracin B was highest (100.00%), followed by penicillin (93.75%), rifampicin, and vancomycin (87.50%). The strains exhibited multidrug resistance (resistant to two to ten types of drugs). When testing was performed with eight selected common disinfectants, it was found that three disinfectants exerted significant bacteriostatic effects on the vast majority of *E. coli*

引文格式:

穆雨欣,余锦明,杨若璇,等.奶牛场采奶环节大肠埃希氏菌分离鉴定及对抗生素和消毒剂的抗性分析[J].现代食品科技,2022,38(1): 50-62

MU Yuxin, YU Jinming, YANG Ruoxuan, et al. Isolation and identification of *Escherichia coli* and its resistance to antibiotics and disinfectants during milk collection in dairy farms [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 50-62

收稿日期: 2021-10-19

基金项目: 国家重点研发计划重点专项 (2018YFD0500500); 四川省科技计划项目 (2019YJ0261); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金 (2020NTD04); 西南民族大学研究生创新项目 (CX2021SZ83)

作者简介: 穆雨欣(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1084386904@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

strains in the dairy farm and could be recommended for use. Our findings indicate that the main DEC in the dairy farm was EAEC, and that certain strains exhibited resistance to antibiotics and disinfectants; these are issues worthy of attention.

Key words: diarrheagenic *Escherichia coli*; virulence gene; drug resistance gene; antibiotic resistance; disinfectant resistance

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 是常见于胃肠道的革兰氏阴性细菌, 致病性大肠埃希氏菌 (Diarrheogenic *E. coli*, 简称 DEC) 主要存在于被污染的食物和水源以及粪便中, 能通过食物链传播给人类和动物, 根据不同的致病机制和流行病学特征, 主要分为肠道聚集性大肠埃希氏菌 (Enteroaggregative *E. coli*, EAEC)、产肠毒素大肠埃希氏菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)、肠道致病性大肠埃希氏菌 (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC)、肠道侵袭性大肠埃希氏菌 (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC) 以及肠出血性大肠埃希氏菌 (Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) 等^[1]。

大肠埃希氏菌的致病力与毒力密切相关, 其通常产生多种致病因子, 包括黏附素、毒素、毒力岛、荚膜和血清抵抗相关因子等^[2]。其中, 肠道聚集性大肠埃希氏菌 EAEC 以特有的“砖块样”聚集粘附于机体肠道上皮细胞而得名, 其侵入肠道并依靠粘附菌毛粘附于肠黏膜, 并在肠上皮细胞表面释放毒素, 引起肠道损伤和炎症, 实验表明, 志愿者经口摄入 10^{10} CFU 的 EAEC 能引起严重腹泻^[3,4]。EAEC 极易通过食物链传播, 发展中国的食品具有很高的污染率, 易感人群主要为儿童和去往发展中国的旅行者, 甚至会造成儿童生长迟缓^[5,6], 其毒力基因研究最多的是 *aggR*, 负责调控质粒和染色体上许多基因的表达^[7]。产肠毒素大肠埃希氏菌 ETEC 是引起犊牛腹泻的主要致病菌, ETEC 含有多个毒力因子, 但决定其致病性的主要为黏附性菌毛和肠毒素^[8], 其中, 热敏肠毒素 (LT) 是一种免疫蛋白, 与霍乱肠毒素 (CT) 有着密切关系, 属于一个毒素家族, LT 是 ETEC 的主要致病因子之一^[9]。ETEC 通过产肠毒素造成肠道屏障功能障碍, 引起急性水样腹泻、霍乱样及发热症状^[10,11]。肠道致病性大肠埃希氏菌 EPEC 是引起婴幼儿腹泻的一类致病性强的病原菌, 婴幼儿严重患者病死率可达 30%, 其携带紧密黏附素基因 *eaeA*, 能使细菌紧密黏附到肠上皮细胞, *eaeA* 与紧密黏附素受体蛋白 Tir 结合可引起进一步的信号传导, 导致细胞内钙离子浓度骤增, 肠内液体分泌增加, 引起特征性的粘附脱落病^[9]。肠道侵袭性大肠埃希氏菌 EIEC 是由侵袭性质粒调节基因 *invE* 主导, *invE* 为编码 EIEC 毒力侵袭蛋白 Ipa 的转录调节子, 引起腹泻、腹痛、脓血便等^[12]。以 O157:H7 为代表的肠出血性大肠埃希氏菌 EHEC 能引起急性肾功能衰竭和溶血性尿毒综合症, 是致病力最强的一类

大肠埃希氏菌^[13,14], 可导致严重腹泻、出血性肠炎、溶血性尿毒症、甚至死亡^[1,15], EHEC 通常检测 *stx*、*esc* 基因等^[1], *stx* 编码的志贺样毒素 (Stx) 是一种志贺毒素, 具有细胞毒性、肠毒性、神经毒性作用, 是毒性最强的细菌毒素之一, 包括 Stx1 和 Stx2 两种亚型, 而 Stx2 较 Stx1 的毒力更强^[9]。

牛奶营养价值高, 是人们生活必需品, 其质量与安全与健康息息相关。四川高温高湿气候环境, 极易导致奶牛乳房炎, 全省奶牛死亡淘汰率高达 20%^[16], 并存在以食物链形式的传播风险。因此, 本研究通过采集奶牛场挤奶环节的相关样品, 对分离的致病性大肠埃希氏菌进行耐药基因和抗消毒剂基因检测, 并对其抗生素和消毒剂敏感性进行测定, 为奶牛场合理使用抗生素、消毒剂提供科学依据, 对降低奶牛场大肠埃希氏菌污染和扩散以及保障乳品品质与安全具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株: 大肠埃希氏菌分离菌株、肠出血性大肠埃希氏菌 O157:H7 (CICC 21530)、指示菌株大肠埃希氏菌 ATCC25922 等均保存于西南民族大学第二实验楼食品微生物与食品安全实验室。

试剂: 伊红美蓝琼脂 (Eosin Methylene Blue Agar Medium, EMB)、麦康凯琼脂 (MacConkey Agar Medium, MAC)、大豆酪蛋白琼脂培养基 (Tryptose Soya Agar Medium, TSA)、MH 琼脂培养基 (Mueller-Hinton Agar, MHA)、mEC 肉汤、胰蛋白胨大豆肉汤 (Trypticase Soy Broth, TSB), 海博生物技术有限公司; Tris-HCl、EDTA, Biotopped 公司; 琼脂糖, BIOWEST 公司; Golden View 核酸染料、DL-2000 DNA Marker、1.1*T3 Super PCR Mix, 北京擎科新业生物技术有限公司; 药敏纸片, Oxiod 公司; 实验用 8 种不同类型的商业消毒剂 (编号为 01~08)。

1.2 仪器与设备

DYY-6C 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; WD800B 微波炉, 佛山市顺德区格兰仕微波炉电器有限公司; PTC-200PCR 仪、Universal Hood II 凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏净

集团苏州安泰空气技术有限公司; UV-6100 光谱仪, 上海美谱达仪器有限公司; HZQ-F160 数显振荡培养箱, 江苏省太仓市实验设备厂; AKHL-III-24 艾柯超纯水机实验室纯水机, 成都市金牛区康宁实验专用纯水设备厂; MLS-3020 立式自动电热压力蒸汽灭菌锅, 日本 SANYO 电机公司; 5804R Eppendorf 冷冻台式离心机, Eppendorf 艾本德中国有限公司; ELX-808 酶标仪, 美国 Bio-Tek 公司; 96 孔聚苯乙烯酶标板, 美国 Corning 公司; 微量移液器, 赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集

选择成都市某奶牛场, 从 2020 年 7 月至 10 月期间, 一共采集样品 655 份, 具体采样信息详见表 1。

1.3.2 大肠埃希氏菌的分离纯化

大肠埃希氏菌的分离纯化参考 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》^[17]进行。

1.3.3 大肠埃希氏菌的毒力基因鉴定及病理类型判别依据

纯化菌株的 DNA 提取和 PCR 检测参考文献^[18-19]方法, 使用水浴法提取大肠埃希氏菌的 DNA, 以大肠埃希氏菌 CICC 21530 作为阳性对照。大肠埃希氏菌的毒力基因引物序列(详见表 2)和 PCR 扩增参考文献^[20-21], 引物由上海生工有限公司合成。PCR 反应体

系 25 μL, 包含 1.1* T3 Super PCR Mix 22 μL, 上、下游引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL。PCR 产物经 1% 琼脂凝胶电泳检测, 同时选择阳性条带产物送至生工生物公司进行测序比对。

根据 PCR 扩增结果对致病性大肠埃希氏菌的病理类型进行判别^[20], 判定依据见表 3。

表 1 样品来源

Table 1 Source of collected samples

样品来源		合计数量/份
牛乳	乳腺炎牛乳 74 份	229
	健康牛乳 155 份	
乳头拭子	消毒前乳头拭子 53 份	101
	消毒后乳头拭子 37 份	
	乳房炎牛乳头拭子 11 份	
器具拭子	挤奶器拭子 71 份	98
	毛巾拭子 27 份	
地面拭子	地面拭子	74
	牛圈环境拭子	14
草料、饮用水	草料 13 份	22
	奶牛饮用水 9 份	
粪便样品	乳房炎牛粪 35 份	64
	腹泻牛粪 6 份	
	健康牛粪 21 份	
牛皮毛拭子	乳房炎牛皮毛 11 份	53
	病牛皮毛 21 份	
	健康奶牛皮毛 21 份	

表 2 致病性大肠埃希氏菌的毒力基因引物序列^[20-21]

Table 2 Sequence information of virulence gene of diarrheogenic *E. coli*

引物名称	引物序列	产物长度/bp	检测菌株	
<i>aggR-F</i>	5'-GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG-3'	400	EAEC	
<i>aggR-R</i>	5'-AATACAGAATCGTCAGCATCAGC-3'			
<i>astA-F</i>	5'-TGCCATCAACACAGTATATCCG-3'	102		
<i>astA-R</i>	5'-ACGGCTTTGTAGTCCTTCCAT-3'			
<i>pic-F</i>	5'-AAATGTCAGTGAACCGACGATTGG-3'	1111		
<i>pic-R</i>	5'-AGCCGTTTCCGCAGAAGCC-3'			
<i>bfpB-F</i>	5'-GACACCTCATGCTGAAGTCG-3'	910		EPEC
<i>bfpB-R</i>	5'-CCAGAACACCTCCGT TATGC-3'			
<i>escV-F</i>	5'-ATTCTGGCTCTCTTCTTTATGGCTG-3'	544		EPEC/EHEC
<i>escV-R</i>	5'-CGTCCCCTTTTACAACTTCATCGC-3'			
<i>stx1-F</i>	5'-CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC-3'	244		EHEC
<i>stx1-R</i>	5'-AATGCCACGCTTCCAGAATTG-3'			
<i>stx2-F</i>	5'-GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG-3'	324		
<i>stx2-R</i>	5'-AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC-3'			
<i>elt-F</i>	5'-GAACAGGAGGTTTCTGCGTTAGGTG-3'	655	ETEC	
<i>elt-R</i>	5'-CTTTCAATGGCTTTTTTTGGGAGTC-3'			

续表 2

引物名称	引物序列	产物长度/bp	检测菌株
<i>estla-F</i>	5'-CTCTTTTAGYCAGACARCTGAATCASTTG-3'	157	ETEC
<i>estla-R</i>	5'-CAGGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG-3'		
<i>estlb-F</i>	5'-TGTCTTTTTTACCTTTCGCTC-3'	171	
<i>estlb-R</i>	5'-CGGTACAAGCAGGATTACAACAC-3'		
<i>invE-F</i>	5'-CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG-3'	766	EIEC
<i>invE-R</i>	5'-CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGA ATCAC-3'		
<i>eaeA-F</i>	5'-TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT-3'	482	共有
<i>eaeA-R</i>	5'-GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG-3'		
<i>uidA-F</i>	5'-ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC-3'	1478	
<i>uidA-R</i>	5'-AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG-3'		

注: EAEC 为肠道集聚性大肠埃希氏菌, EPEC 为肠致病性大肠埃希氏菌, EHEC 为肠出血性大肠埃希氏菌, ETEC 为产肠毒素大肠埃希氏菌, EIEC 为肠侵袭性大肠埃希氏菌。

表 3 五种致泻大肠埃希氏菌病理型别对照表^[20]

Table 3 Virulence genotypes of five diarrheagenic *E. coli*

致病性大肠埃希氏菌分类	基因种类	阳性判定结果组合	共有基因
EAEC	<i>aggR, astA, pic</i>	<i>aggR</i> 阳性, 或者 <i>astA, pic</i> 同时阳性	
EPEC	<i>bfpB, escV</i>	<i>bfpB</i> (+/-), <i>escV</i> (+), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (-)	
EHEC	<i>escV, stx1, stx2</i>	<i>escV</i> (+/-), <i>stx1</i> (+), <i>stx2</i> (-), <i>bfpB</i> (-) <i>escV</i> (+/-), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (+), <i>bfpB</i> (-) <i>escV</i> (+/-), <i>stx1</i> (+), <i>stx2</i> (+), <i>bfpB</i> (-)	<i>uidA</i> (+)
ETEC	<i>elt, estla, estlb</i>	<i>elt, estla, estlb</i> 中一条或一条以上阳性	
EIEC	<i>invE</i>	<i>invE</i> (+)	

表 4 耐药基因以及耐消毒剂基因的引物序列信息

Table 4 Primer sequence information of resistance genes to antibiotics and disinfectants

类型	引物名称	引物序列	产物长度/bp	退火温度/°C	文献
β-内酰胺类	<i>blaTEM-F</i>	5'-CAGCGGTAAGATCCTTGAGA-3'	734	48	[22]
	<i>blaTEM-R</i>	5'-ACTCCCCGTCGTGTAGATAA-3'			
	<i>blaOXA-F</i>	5'-TCAACTTTCAAGATCGCA-3'	591	47	[23]
	<i>blaOXA-R</i>	5'-GTGTGTTTAGAATGGTGA-3'			
	<i>blaCTX-M-F</i>	5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3'	550	54	[23]
	<i>blaCTX-M-R</i>	5'-ACCGGATATCGTTGGT-3'			
	<i>blaCMY-2-F</i>	5'-TAATTACGGAAGTATTTC-3'	1250	54	[22]
<i>blaCMY-2-R</i>	5'-CCTTGCTGTATTTTGTGA-3'				
喹诺酮类	<i>qnrA-F</i>	5'-ATTTCTCACGCCAGGATTTG-3'	519	56	[23]
	<i>qnrA-R</i>	5'-GATCGGCAAAGGTCAGGTCA-3'			
	<i>qnrD-F</i>	5'-AGATCAATTACGGGGAATA-3'	984	52	[23]
	<i>qnrD-R</i>	5'-AACAAGCTGAAGCGCCTG-3'			
	<i>qnrS-F</i>	5'-ACGACATTCGTCAACTGCAA-3'	417	55	[23]
	<i>qnrS-R</i>	5'-TAAATTGGCACCCCTGTAGGC-3'			
氨基糖苷类	<i>acc(6)-Ib-cr-F</i>	5'-ITGCGATGCTCTATGAGTGGCTA-3'	482	59	[24]
	<i>acc(6)-Ib-cr-R</i>	5'-CTCGAATGCCTGGCGTGTTC-3'			
	<i>aac(3)-II-F</i>	5'-ACTGTGATGGGATACGCGTC-3'	237	58	[25]
	<i>aac(3)-II-R</i>	5'-CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA-3'			

续表 4

类型	引物名称	引物序列	产物长度/bp	退火温度/°C	文献
氨基糖苷类	<i>aac(3)-IV-F</i>	5'-CTTCAGGATGGCAAGTTGGT-3'	286	56	[26]
	<i>aac(3)-IV-R</i>	5'-TCATCTCGTTCTCCGCTCAT-3'			
四环素类	<i>tetA-F</i>	5'-GCGCCTTTCCTTTGGGTTCT-3'	831	55	[27]
	<i>tetA-R</i>	5'-CCACCCGTTCCACGTTGTTA-3'			
磺胺类	<i>sul1-F</i>	5'-TGGTGACGGTGTTCGGCATTTC-3'	789	64	[27]
	<i>sul1-R</i>	5'-GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG-3'			
	<i>sul3-F</i>	5'-AGATGTGATTGATTTGGGAGC-3'	443	53	[28]
	<i>sul3-R</i>	5'-TAGTTGTTTCTGGATTAGAGCCT-3'			
氯霉素类	<i>cmlA-F</i>	5'-CTGAGGGTGTTCGTCATCTAC-3'	517	55	[29]
	<i>cmlA-R</i>	5'-GCTCCGACAATGCTGACTAT-3'			
耐消毒剂	<i>qacEA1-F</i>	5'-AATCCATCCCTGTCCGGTGT-3'	175	62	[30]
	<i>qacEA1-R</i>	5'-CGCAGCGACTTCCACGATGGGGAT-3'			
	<i>qacE-F</i>	5'-AAGTAATCGCAACATCCG-3'	258	50	[30]
	<i>qacE-R</i>	5'-CTACTACACCACTAATATGAG-3'			

表 5 抗生素的使用剂量与判定标准

Table 5 Dosage and judging standard of antibiotics

抗生素类型	抗生素名称	抗生素代码	剂量/ μg	判定标准/mm		
				敏感	中介	耐药
β -内酰胺类	头孢曲松	CRO	30	≥ 23	20~22	≤ 19
	头孢噻肟	CTX	30	≥ 26	23~25	≤ 22
	头孢他啶	CAZ	30	≥ 21	18~20	≤ 17
	头孢西丁	FOX	30	≥ 18	15~17	≤ 14
	氨苄西林	AMP	10	≥ 17	14~16	≤ 13
	青霉素	PEN	10	≥ 15		≤ 14
	亚胺培南	IMP	10	≥ 23	20~22	≤ 19
氨基糖苷类	卡那霉素	KAN	30	≥ 18	14~17	≤ 13
	阿米卡星	AK	30	≥ 17	15~16	≤ 14
	链霉素	STR	10	≥ 15	12~14	≤ 11
	庆大霉素	GEN	10	≥ 15	13~14	≤ 12
四环素类	四环素	TET	30	≥ 15	12~14	≤ 11
喹诺酮类	环丙沙星	CIP	5	≥ 21	16~20	≤ 15
	诺氟沙星	NOR	10	≥ 17	13~16	≤ 12
	左氧氟沙星	LEV	5	≥ 17	14~16	≤ 13
氯霉素类	氯霉素	CHL	30	≥ 18	13~17	≤ 12
叶酸途径抑制剂	甲氧苄啶	TMP	1.25	≥ 16	11~15	≤ 10
硝基咪唑类	呋喃妥因	F	300	≥ 17	15~16	≤ 14
糖肽类	万古霉素	VAN	30	≥ 17		≤ 14
大环内酯类	红霉素	ERY	15	≥ 23		≤ 13
多肽类	杆菌肽 B	B	10	≥ 14		≤ 10
安沙霉素类	利福平	RFP	5	≥ 20		≤ 16

1.3.4 大肠埃希氏菌毒力基因、耐药基因及耐消毒剂基因检测

对筛选到的部分大肠埃希氏菌,进行耐药基因和耐消毒剂基因的检测,耐药基因和耐消毒剂基因的引物信息见表4。PCR反应体系同1.3.3。

1.3.5 药敏试验

根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的方法^[31],对筛选的致病性大肠埃希氏菌进行了11类22种抗生素的药敏试验,实验结果按照CLSI的标准进行判定,详见表5。

1.3.6 消毒剂MIC值测定

选择市面上常用的8种消毒剂(代号为01~08),按主要成分进行分类并编号区别:01、08属于A类消毒剂,主要有效成分为次氯酸钠;02属于B类消毒剂,主要有效成分为苯扎氯铵;03、04属于C类消毒剂,主要有效成分为对氯间二甲苯酚;05属于D类消毒剂,主要有效成分为异丙醇;06属于E类消毒剂,主要有效成分为十二烷基二甲基苄基氯化铵;07属于F类消毒剂,主要有效成分为二氯异氰尿酸钠。

根据商品推荐的最佳配比浓度向上、下各取3个浓度梯度,用灭菌超纯水稀释制成消毒剂不同浓度的稀释液。用TSB液体培养液将筛选得到的大肠埃希氏菌稀释至0.5麦氏浊度(625 nm,吸光值0.08~0.1)备用。

参考张箬等^[32]和苏梦茹等^[33]的方法,制备最小抑菌浓度(MIC, Minimal Inhibitory Concentration)测定板。MIC值测定具体方法:将筛选得到的菌悬液和各消毒剂稀释液加入96孔无菌微量板中(对照组不加菌液),每个稀释度重复测定三次。分别在经过5个时间点后,将测定板放入37℃培养箱内培养16 h。利用酶标仪测定微量板各孔OD₆₀₀值,并按照下列公式计算透光率,以透光率来反映抑菌率,测定出MIC值,并进一步通过细菌平板计数法验证消毒剂的实际抑菌效果。计算公式如下:

$$L/\% = \frac{(P-C)-(D-W)}{(P-B)} \times 100\%$$

式中:

L——透光率;

P——实验组阳性孔;

C——实验组对照孔;

D——实验组消毒剂孔;

W——对照组阴性孔;

B——对照组空白孔。

1.3.7 数据分析

数据采用Microsoft Excel软件初步进行整理分析,统计学分析采用SPSS 26.0软件,消毒剂抑菌率采用GraphPad Prism 8(v8.0.0.22)软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 大肠埃希氏菌的分离与鉴定

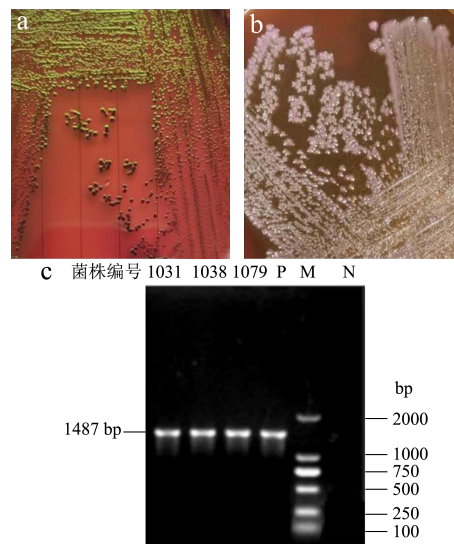


图1 大肠埃希氏菌的分离及 *uidA* 基因的PCR鉴定

Fig.1 Isolation of *E. coli* and PCR identification of *uidA* gene

注: a 为大肠埃希氏菌在EMB平板上形态, b 为大肠埃希氏菌在MAC平板上形态, c 为PCR检测携带 *uidA* 基因阳性凝胶电泳图片。

如图1所示,大肠埃希氏菌在伊红美蓝琼脂培养基(Eosin Methylene Blue Agar Medium,简称EMB)上典型菌落形态为菌落圆润饱满,中心呈紫黑色、并伴有绿色金属光泽;在麦康凯琼脂培养基(MacConkey Agar,简称MAC)上,菌落圆润饱满,颜色呈砖红色或桃红色。如图2所示,致病性大肠埃希氏菌携带的共有特征基因 *uidA*,其PCR产物长度为1487 bp。通过分离与鉴定,从655份样品中共检出携带 *uidA* 基因的大肠埃希氏菌249株,奶牛场采奶环节各种样品中大肠埃希氏菌的分离率为38.02%。

249株菌株中,采奶地面分离到34株(13.65%),挤奶器分离到32株(12.85%),乳房炎牛粪分离到31株(12.45%),消毒前乳头拭子分离到28株(11.24%),健康牛乳样品中分离到22株(8.84%),消毒后乳头拭子分离到17株(6.83%),毛巾分离到16株(6.43%),乳房炎牛乳样品中分离到10株(4.02%),健康奶牛皮毛分离到9株(3.61%),乳房炎牛乳头拭子分离到8株(3.21%),牛圈分离到8株(3.21%),健康牛粪分离到8株(3.21%),乳房炎牛皮毛分离到8株(3.21%),腹泻牛粪分离到6株(2.41%),病牛皮毛

分离到 6 株 (2.41%)，草料分离到 3 株 (1.20%)，奶牛饮用水分离到 3 株 (1.20%)，具体来源及分离率见图 2。

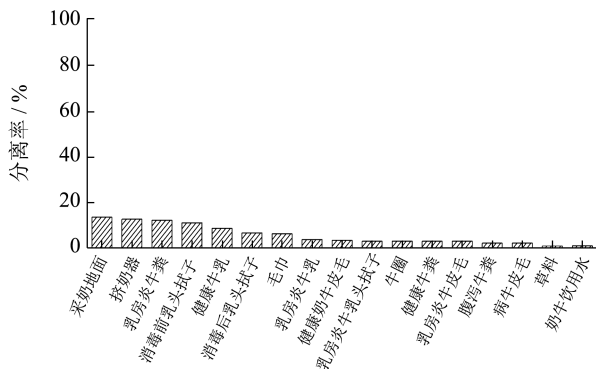


图 2 249 株大肠埃希氏菌的菌株来源及分离率

Fig.2 Source and Isolation rate of 249 *E. coli*

牛源大肠埃希氏菌是引起奶牛乳房炎、子宫内膜炎和犊牛腹泻的主要病原菌，其检出率高低与环境污染程度有关，牛场粪便及环境中滋生的大肠埃希氏菌，是主要的传染源^[34]。本文中奶牛场挤奶不同环节样品中大肠埃希氏菌的总分离率为 38.02%。张莉莉^[35]从甘肃、宁夏、青海和内蒙古的 12 个奶牛场采集奶牛乳房炎样本 202 份，鉴定出 18 种病原菌，其中大肠埃希氏菌检出率最高为 34.5%，与本研究的分离率较为接近。近些年来，我国由大肠埃希氏菌引起犊牛腹泻的发病率高达 90%，病死率为 40%~50%，给我国的养殖业造成了巨大的经济损失^[36]。奶牛在分娩前后和泌乳早期较易感染大肠埃希氏菌，可引起乳房炎和产后子宫内膜炎。对乳房炎而言，即使治愈后大肠埃希氏菌被完全清除，但对乳腺组织造成的损伤仍需很长时间才能恢复，奶产量很难恢复到发病前的正常水平^[34]。因此，对致病性大肠埃希氏菌的防控具有重要意义。

2.2 致病性大肠埃希氏菌的鉴别及毒力基因

检测结果

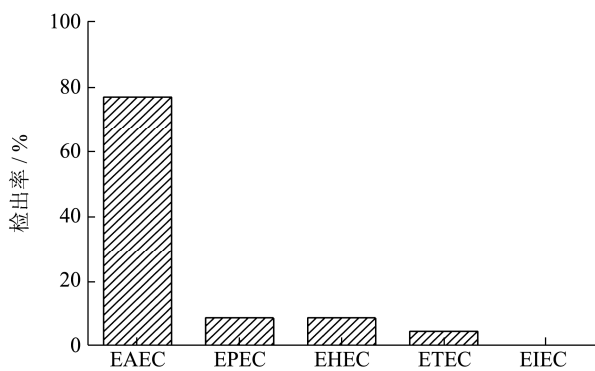


图 3 123 株致病性大肠埃希氏菌的检出率

Fig.3 Detection rate of 123 pathogenic *E. coli* strains

表 6 致泻性大肠埃希氏菌的检出来源及数量

Table 6 The detection source and numbers of diarrheogenic *E. coli*

<i>coli</i>		
类别	来源	数量/株
EAEC (95 株)	牛乳	14
	粪便样品	25
	草料	2
	牛皮毛拭子	18
	器具拭子	11
	乳头拭子	18
	地面拭子	5
	牛圈环境拭子	2
	EPEC (11 株)	牛乳
粪便样品		1
乳头拭子		4
EHEC (11 株)	器具拭子	3
	牛乳	1
	地面拭子	2
	粪便样品	4
	器具拭子	1
ETEC (6 株)	奶牛水槽水	1
	乳头拭子	2
	粪便样品	1
EIEC (0 株)	牛乳	2
	草料	1

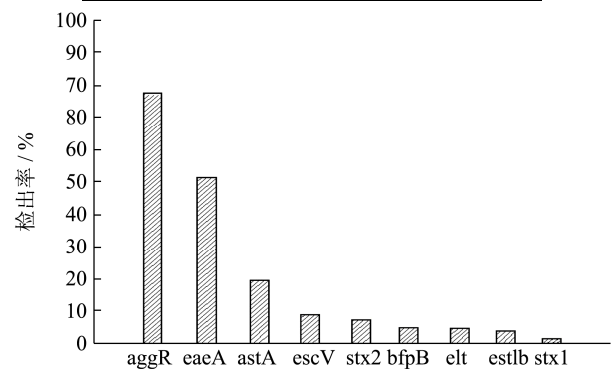


图 4 毒力基因检出率

Fig.4 Detection rate of virulence genes

通过毒力基因检测和判定比对，一共检测出致病性大肠埃希氏菌 123 株，占携带 *uidA* 基因大肠埃希氏菌的 49.40%，123 株致病性大肠埃希氏菌的检出率见图 3，病理型别判定结果详见表 6，其中，EAEC 检出 95 株，占比 77.23%，分别从牛乳、粪便、草料等 8 种不同来源的样品中检出；EPEC 检出 11 株，占比 8.94%，分别从牛乳、粪便、乳头拭子、器具拭子样

品中检出; EHEC 检出 11 株, 占比 8.94%, 从牛乳、地面拭子、粪便样品等 6 种样品中检出; ETEC 检出 6 株, 占比 4.88%, 分别从乳头拭子、粪便样品、牛乳、草料样品中检出; EIEC 未检出。由此可见, EAEC 为该奶牛场存在的主要致病性大肠埃希氏菌。

吴少鹏等^[37]从山东省某地区奶牛场 194 份新鲜粪便样品中分离到 171 株大肠埃希氏菌, 其中致病性为 19.9%, 侵袭性为 17.0%, 溶血性为 9.4%; 可见国内大部分奶牛场均存在较高致病性大肠埃希氏菌污染。本研究中, 一共鉴定出 5 种致病性大肠埃希氏菌中的 4 种, 其中, 以 EAEC 为主, 其次是 EPEC 和 EHEC, 以及 ETEC, 未鉴定出 EIEC。Zhou 等^[21]对中国 2009~2018 年腹泻病人分离的大肠埃希氏菌进行检测, 同样也发现引起腹泻最普遍的是肠聚集性大肠埃希氏(EAEC), 其次是肠致病性大肠埃希氏菌(EPEC)和产肠毒素大肠埃希氏菌(ETEC), 与本研究的结果非常类似, 说明 EAEC 是大肠埃希氏菌引起我国人群腹泻的主要病原。

上述 123 株分离菌株的毒力基因总的检出率结果详见图 4。从图 4 可以看出, *aggR* 基因携带率最高, 为 77.24% (95/123), *eaeA* 基因携带率为 51.22%

(63/123), *astA* 为 19.51% (24/123), *escV* 为 8.94% (11/123), *stx2* 为 7.32% (9/123), *bfpB* 为 4.88% (6/123), *elt* 为 4.88%(6/123), *estIb* 为 4.07%(5/123), *stx1* 为 1.63% (2/123)。

2.3 16 株分离菌株的抗性基因检测结果

根据毒力基因携带情况, 从不同来源的样品中, 筛选了 16 株大肠埃希氏菌进行抗性基因检测, 16 株大肠埃希氏菌毒力基因携带情况详见表 7。

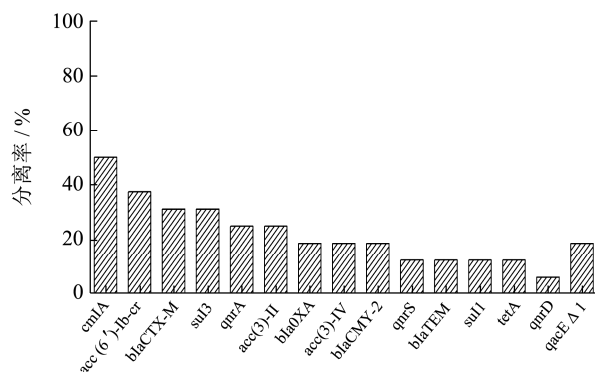


图 5 16 株致病性大肠埃希氏菌分离株抗性基因检出率
Fig.5 Detection rates of resistance genes for 16 isolated diarrheogenic *E. coli* strains

表 7 筛选的 16 株分离菌株毒力基因携带信息

Table 7 Information for 16 isolated strains carrying virulence genes

来源	编号	毒力基因名称											合计	
		<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>pic</i>	<i>bfpB</i>	<i>escV</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>elt</i>	<i>estIa</i>	<i>estIb</i>	<i>invE</i>		<i>eae</i>
粪便样品	1031	+							+				+	3
	1038		+										+	3
乳头拭子	1079	+								+				2
	1095	+										+	3	
	1097	+								+			3	
	1100	+										+	4	
	1101	+										+	4	
	1103	+										+	4	
器具拭子	1104	+										+	3	
	1106		+								+		4	
	1123	+										+	3	
	1124	+										+	3	
牛乳	1125	+										+	3	
	1142	+										+	3	
	1173	+										+	3	
草料	1156	+										+	3	

针对上述筛选的 16 株菌进行耐药基因检测, 共检出 6 类 14 种基因, 分别为 β -内酰胺类 (*blaTEM*, *blaOXA*, *blaCTX-M*, *blaCMY-2*), 喹诺酮类 (*qnrA*, *qnrD*, *qnrS*), 氨基糖苷类 (*acc(6)-Ib-cr*, *acc(3)-II*,

acc(3)-IV), 四环素类 (*tetA*), 磺胺类 (*sul1*, *sul3*) 和氯霉素类 (*cmlA*), 详见图 5。由图 5 可知, *cmlA* 基因检出率最高(50%), 依次为 *acc(6)-Ib-cr*(37.5%)、*blaCTX-M* 和 *sul3* (均为 31.25%), *blaTEM*、*blaOXA*、

*bla*CMY-2、*qnrA*、*qnrD*、*qnrS*、*acc(3)-II*、*acc(3)-IV*、*tetA*、*sulI* 基因的检出率在 6.25%~25%之间；耐消毒剂基因仅检出 *qacEΔ1* (18.75%)。李宇涵等^[38]检测牦牛源和藏猪源大肠杆菌 28 个耐药基因，耐药基因的携带情况主要为 *acc(6)-Ib-cr*、*sulI* 等；邓珊珊等^[39]对贵州省某规模化猪场大肠杆菌的耐药基因进行检测，也检出了 β-内酰胺类，喹诺酮类和氨基糖苷类，共 3 类 9 种耐药基因。本研究中，β-内酰胺类，喹诺酮类和氨基糖苷类等耐药基因也是奶牛场环境中大肠杆菌主要携带的基因，说明这些耐药基因在大肠杆菌中比较常见，应引起注意。

2.4 16 株分离菌株的药敏检测结果

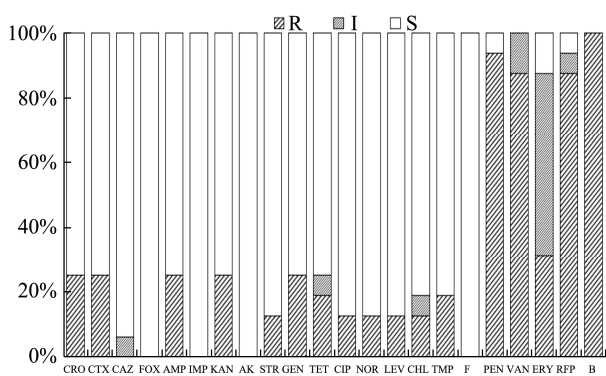


图 6 16 株分离菌株的药敏试验结果

Fig. 6 Susceptibility test results for 16 isolates

上述 16 株分离菌株的药敏检测结果详见图 6，由图 6 可知，16 株分离菌株对杆菌肽 B 的耐药率最高，为 100%，依次是青霉素 (93.75%)、利福平 (87.50%) 和万古霉素 (87.50%)，对其它抗生素的耐药率相对较低；56.25% (9/16) 的菌株对红霉素表现为中介；分离菌株对头孢西丁、亚胺培南、阿米卡星和呋喃妥因全部表现为敏感。

16 株分离菌株呈现多重耐药现象 (2~10 耐)，耐药谱详见表 8。目前，乳制品加工行业常采用抗生素和消毒剂等手段控制致病性大肠埃希氏菌的传播，但是抗生素和消毒剂的大量使用不仅会造成乳制品中的药物残留，还诱导了大肠埃希氏菌耐药菌株产生，对奶牛养殖业和消费者健康造成了严重威胁。大肠埃希氏菌是 2017 年世界卫生组织 (WHO) 发布的全球重要耐药细菌之一^[40]。本研究中，分离菌株呈现多重耐药现象 (2~10 耐)，说明该奶牛场分离的大肠埃希氏菌耐药性较严重。

通过对 16 株分离菌株的耐药基因和耐药表型进行测定，分析发现耐药基因和抗生素抗性之间有一定的关联性，如 *bla*TEM、*bla*OXA、*bla*CTX-M、*bla*CMY-2 与 β-内酰胺类抗性之间，以及 *acc(6)-Ib-cr*、

aac(3)-II、*aac(3)-IV* 与氨基糖苷类抗性有一定的相关性。

表 8 16 株菌株耐药谱

Table 8 Drug resistance spectrum of 16 strains

耐药重数	菌株数量	耐药谱型
10	2	β+A+T+Q+C+F+G+M+S+D
8	1	β+A+T+F+G+M+S+D
6	1	β+A+G+M+S+D
4	8	β+G+S+D
3	1	G+S+D
3	1	β+G+D
3	1	β+S+D
2	1	β+D

注：β：β-内酰胺类；A：氨基糖苷类；T：四环素类；Q：喹诺酮类；C：氯霉素类；F：叶酸途径抑制剂；N：硝基咪唑类；G：糖肽类；M：大环内酯类；S：安莎霉素类；D：多肽类。

2.5 消毒剂对奶牛场大肠埃希氏菌的杀菌效果

各不同稀释度消毒剂对筛选的 16 株大肠埃希氏菌抑菌率测定结果详见图 7。由图 7 可知，8 种消毒剂的抑菌率都随着浓度降低而降低。5 种常用消毒剂 (01、04、05、07、08) 整体抑菌率低于 95%，说明这 5 种消毒剂对该奶牛场大肠埃希氏菌的抑菌效果不佳。另外 3 种常用消毒剂 02 (稀释比 1/10)、03 (稀释比 1/80) 和 06 (稀释比 1/25) 对分离菌株抑菌率可达到 95% 以上，有显著的抑菌效果。

进一步对上述 3 种消毒剂 (02、03 和 06) 的相关 MIC 孔细菌计数，发现 2MIC 和 MIC 孔均无细菌生长，0.5MIC 孔平板中会有细菌生长。上述 3 种常用消毒剂分别为：02、03 和 06，在测定的 MIC 浓度下均能有效抑制 16 株大肠埃希氏菌的生长。可见，02 (1/10, 5 min)、03 (1/80, 5 min) 和 06 (1/25, 20 min) 这三种消毒剂对该奶牛场中绝大多数大肠埃希氏菌有显著抑菌效果，可推荐使用。

02 的有效成分为苯扎氯铵 (0.45%~0.55%)，钟瑜等^[41]对苯扎氯铵的抗菌性能研究表明满足美国药典 (USP32) 的苯扎氯铵复方消毒剂对大肠杆菌有显著的抑菌效果；本实验中 02 以 1/10 稀释比达到广泛的抑菌效果。03 的有效成分为对氯间二甲苯酚 (4.3%~5.3%)，徐红等^[42]用浓度为 2200 mg/L 的对氯间二甲苯酚消毒液作用 3 min 时，对悬液内大肠杆菌的杀灭对数值均 ≥5.00；本实验中 03 以 1/80 稀释比 (约 12.5 mg/L) 对大肠杆菌分离株有非常好的抑

菌效果,即该批分离菌株对对氯间二甲苯酚消毒液较为敏感。06 的有效成分为十二烷基二甲基苄基氯化铵 (2.5%±0.25%)。叶小莉等^[43]对十二烷基二甲基苄基氯化铵复合物的制备和抗菌性能研究,证明其对大肠杆菌具有良好的抗菌性能;刘心建等^[44]用自制的质量分数为 1% (十二烷基二甲基苄基氯化铵) 抑菌洗涤液处理大肠杆菌 2 min, 发现抑菌率达到 94.51%。本实验中 06 以 1/25 稀释比可产生良好的抑菌效果。

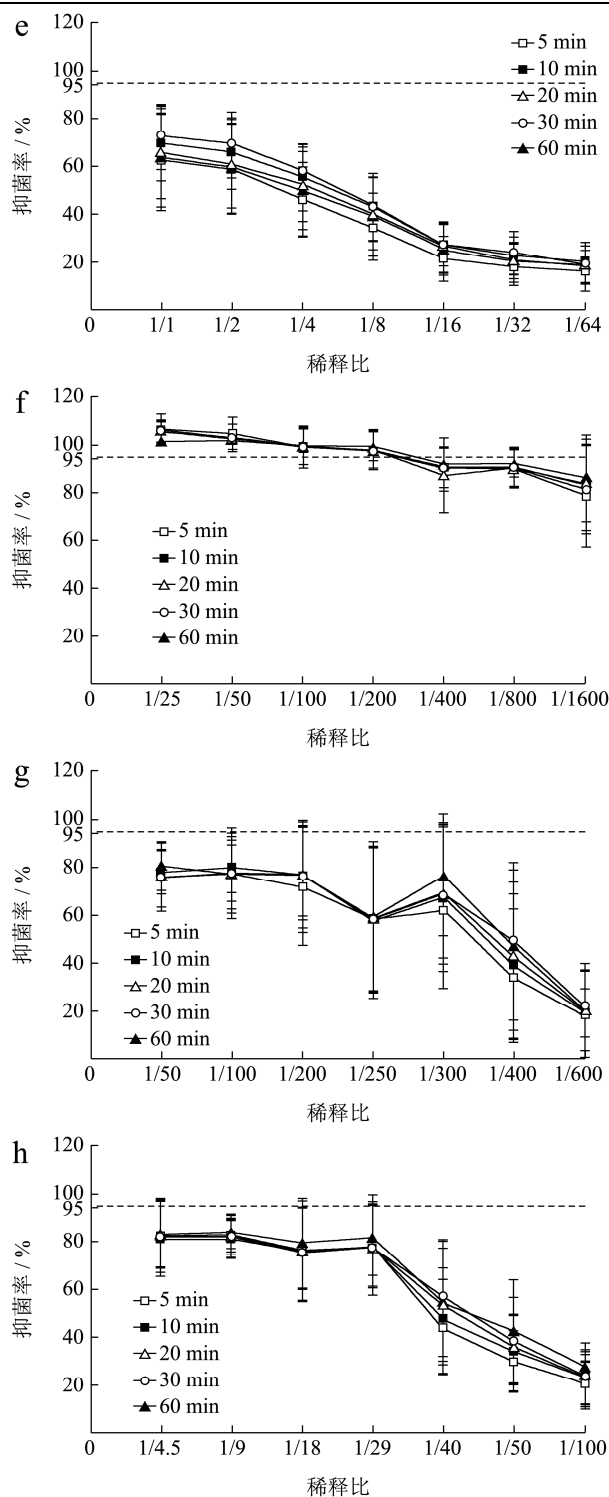
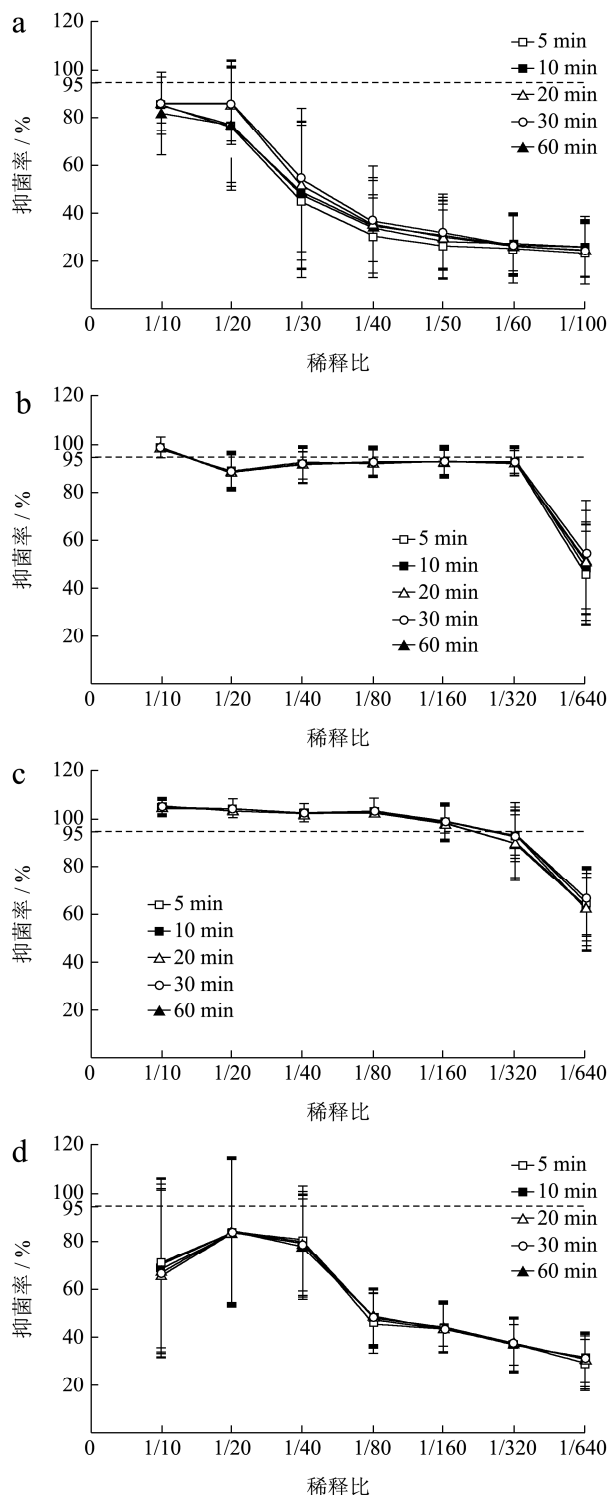


图 7 8 种消毒剂的抑菌率

Fig.7 Bacteriostatic rates of eight disinfectants

注: a: 消毒剂 01; b: 消毒剂 02; c: 消毒剂 03; d: 消毒剂 04; e: 消毒剂 05; f: 消毒剂 06; g: 消毒剂 07; h: 消毒剂 08。横坐标表示为消毒剂的稀释比, 纵坐标为抑菌率。

3 结论

奶牛乳房炎大肠埃希氏菌的耐药性呈逐年增加趋势, 且具有多重耐药性。本研究通过对奶牛场采奶环

节进行采样和细菌分离鉴定,揭示了奶牛场牛奶生产环节致病性大肠埃希氏菌携带的毒力基因、抗性基因,以及部分菌株对抗生素和消毒剂的抗性。对奶牛场大肠杆菌病的防治和乳品安全具有指导意义。通过开展和监测奶牛场致病性大肠埃希氏菌的抗性是有效预防和治疗大肠埃希氏菌性奶牛乳房炎,保障人类食品安全的一个重要措施。

参考文献

- [1] 刘栓奎,李明,党荣理,等.致病性大肠杆菌和出血性大肠杆菌研究进展[J].现代预防医学,2011,38(24):5123-5124
LIU Shuankui, LI Ming, DANG Rongli, et al. Progress of enteropathogenic *Escherichia coli* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* [J]. Mod Prev Med, 2011, 38(24): 5123-5124
- [2] 严勇,李新圃,武小虎,等.牛源大肠杆菌研究进展[J].中兽医医药杂志,2020,39(5):35-41
YAN Yong, LI Xinpu, WU Xiaohu, et al. Advances in *Escherichia coli* of bovine origin [J]. J Tradit Chin Vet Med, 2020, 39(5): 35-41
- [3] Nataro J P. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis [J]. Current Opinion in Gastroenterology, 2005, 21(1): 4-8
- [4] Nataro J P, Deng Y, Cookson S, et al. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers [J]. The Journal of Infectious Diseases, 1995, 171(2): 465-468
- [5] Boisen N, Østerlund M T, Joensen K G, et al. Redefining enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): genomic characterization of epidemiological EAEC strains [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2020, 14(9): e0008613
- [6] Huang D B, Mohanty A, Dupont H L, et al. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli* [J]. The American Journal of Gastroenterology, 2006, 55(Pt 10): 1303-1311
- [7] Morin N, Tirling C, Ivison S M, et al. Autoactivation of the AggR regulator of enteroaggregative *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo* [J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2010, 58(3): 344-355
- [8] 周婷婷,凌晨,张慧敏,等.新疆某牛场大肠杆菌的分离鉴定及16S rRNA序列分析[J].中国奶牛,2021,3:30-35
ZHOU Tingting, LING Chen, ZHANG Huimin, et al. Identification and 16S rRNA sequence homology of *Escherichia coli* isolates in Xinjiang [J]. China Dairy Cattle, 2021, 3: 30-35
- [9] 周倩,王嘉福,冉雪琴,等.致病性大肠杆菌全基因组测序及毒力基因分析[J].工业微生物,2021,51(3):10-19
ZHOU Qian, WANG Jiafu, RAN Xueqin, et al. Whole genome sequencing and virulence gene analysis of pathogenic *Escherichia coli* [J]. Ind Microbiol, 2021, 51(3): 10-19
- [10] Hanevik K, Chen W H, Talaat K R, et al. The way forward for ETEC controlled human infection models (CHIMs) [J]. Vaccine, 2019, 37(34): 4794-4799
- [11] 徐倩倩,郭时金,王玉波,等.ETEC破坏肠上皮细胞紧密连接作用的研究进展[J].中国兽医杂志,2019,55(12):79-82
XU Qianqian, GUO Shijin, WANG Yubo, et al. Research progress on destruction of tight junction of intestinal epithelial cells by ETEC [J]. Chin J Vet Med, 2019, 55(12): 79-82
- [12] Detzner J, Krojnewski E, Pohlentz G, et al. Shiga toxin (Stx)-binding glycosphingolipids of primary human renal cortical epithelial cells (pHRCEpiCs) and stx-mediated cytotoxicity [J]. Toxins (Basel), 2021, 13(2): 139
- [13] Gomes T A T, Elias W P, Scaletsky I C A, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47: 3-30
- [14] Croxen M A, Law R J, Scholz R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli* [J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(4): 822-880
- [15] 巴鹏斌,孟琼,白向宁,等.非O157产志贺毒素大肠埃希菌研究进展[J].中国人兽共患病学报,2017,33(2):156-162
BA Pengbin, MENG Qiong, BAI Xiangning, et al. Research progress of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. Chin J Zoonoses, 2017, 33(2): 156-162
- [16] 甘佳,易礼胜,易军,等.四川奶牛业现状及发展对策分析[C]//第十一届(2016)中国乳业发展大会,2016
GAN Jia, YI Lisheng, YI Jun, et al. Analysis on the current situation and development countermeasures of Sichuan dairy industry [C]// The 11th (2016) China Cattle Industry Development Conference, 2016
- [17] GB4789.6-2016.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[S]
GB4789.6-2016. National food safety standard microbiological examination of food examination of diarrhoeal *Escherichia coli* [S]
- [18] 邵碧英,陈彬,汤敏英,等.沙门氏菌DNA提取及PCR反应条件的优化[J].食品科学,2007,7:331-334
SHAO Biying, CHEN Bin, TANG Mingying, et al. Optimization of DNA extraction and PCR reaction conditions of *Salmonella* [J]. Food Chem, 2007, 7: 331-334

- [19] 孟含,陈娟,龙虎,等.牦牛屠宰环境中大肠杆菌分离菌株的病原学特征研究[J].黑龙江畜牧兽医,2020,3:80-84,88
MENG Han, CHEN Juan, LONG Hu, et al. Study on pathogenic characteristics of *Escherichia coli* isolated from yak slaughtering environment [J]. Heilongjiang Anim. Sci. Vet. Med, 2020, 3: 80-84, 88
- [20] 吕虹,黄伟峰,黄玉兰,等.四川省腹泻患者和食品加工从业人员致泻性大肠埃希菌监测分析[J].中国卫生检验杂志,2016,26(8):1182-1184,1202
LYU Hong, HUANG Weifeng, HUANG Yulan, et al. Monitoring and analysis of diarrheogenic *Escherichia coli* of patients with diarrhoeal and food processing in Sichuan [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2016, 26(8): 1182-1184, 1202
- [21] Zhou S X, Wang L P, Liu M Y, et al. Characteristics of diarrheogenic *Escherichia coli* among patients with acute diarrhea in China, 2009-2018 [J]. Journal of Infection, 2021, 83(4): 424-432
- [22] 姚伟,高锋,曹明慧,等.辽宁地区奶牛乳房炎源大肠杆菌毒力基因及耐药基因检测分析[J].中畜牧兽医,2017,44(6):1832-1839
YAO Wei, GAO Feng, CAO Minghui, et al. Detection and analysis of virulence genes and drug resistance genes of *Escherichia coli* from dairy cow mastitis in Liaoning [J]. China Anim. Husb Vet Med, 2017, 44(6): 1832-1839
- [23] Ahmed A M, Motoi Y, Sato M, et al. Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(20): 6686-6690
- [24] 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
LIU Qingxiao. Isolation and identification of *Salmonella* from chicken embryo of Luhua chicken and analysis of drug resistance and virulence related genes [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2020
- [25] 张伟,崔冰冰,孙武文,等.北方不同地区犊牛腹泻大肠杆菌耐药性和耐药基因携带率的检测分[J].黑龙江畜牧兽医,2016,21:162-165
ZHANG Wei, CUI Bingbing, SUN Wuwen, et al. Detection and analysis of drug resistance and drug resistance gene carrying rate of *Escherichia coli* from calf diarrhea in different areas of north China [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2016, 21: 162-165
- [26] 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 & Agriculture, 2017, 97(1): 362-365
- [27] 刘艳红.沙门氏菌和大肠杆菌耐药性及耐药基因的研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2016
LIU Yanhong. Study on drug resistance and drug resistance genes of *Salmonella* and *Escherichia coli* [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016
- [28] Zhang A Y, Wang H N, Tian G B, et al. Phenotypic and genotypic characterisation of antimicrobial resistance in faecal bacteria from 30 giant pandas [J]. International Journal of Antimicrobial, 2009, 33(5): 456-460
- [29] 卢婷.牛源大肠杆菌耐药性和耐药基因检测及对喹诺酮类药物防突变浓度的测定[D].哈尔滨:东北农业大学,2015
LU Ting. Detection of drug resistance and drug resistance genes of bovine *Escherichia coli* and determination of anti mutation concentration of quinolones [D]. Haibin: Northeast Agricultural University, 2015
- [30] 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].成都:四川农业大学,2015
GUO Lijuan. Study on the resistance of *Salmonella isolated* from animal food to antibiotics and disinfectants [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2015
- [31] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [S]. 31st Edition, M100Ed31E, Includes Correction; Wayne, PA, USA, 2021
- [32] 张箬,赵俊杰,李运喜,等.微量肉汤稀释法药敏试验的误差分析[J].中国抗生素杂志,2016,41(11):858-864
ZHANG Zheng, ZHAO Junjie, LI Yunxi, et al. Error analysis of drug sensitivity test by micro broth dilution method [J]. Chin J Antibiot, 2016, 41(11): 858-864
- [33] 苏梦茹,马培培,李鑫鑫,等.9种抗菌药物对大肠埃希菌最小抑菌浓度的测定[J].动物医学进展,2020,41(3):52-56
SU Mengru, MA Peipei, LI Xinxin, et al. Determination of minimum inhibitory concentration of 9 antibiotics against *Escherichia coli* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(3): 52-56
- [34] 严勇,李新圃,武小虎,等.牛源大肠杆菌研究进展[J].中兽医医药杂志,2020,39(5):35-41
YAN Yong, LI Xinpu, WU Xiaohu, et al. Advances in *Escherichia coli* of bovine origin [J]. J Tradit Chin Vet Med, 2020, 39(5): 35-41
- [35] 张莉莉.奶牛乳房炎主要病原菌药物敏感性及其分子特性研究[D].兰州:兰州大学,2018

- ZHANG Lili. Study on drug susceptibility and molecular characteristics of main pathogens in dairy cow mastitis [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2018
- [36] 关一凡,李妍,高亚桃,等.河北省部分地区犊牛腹泻大肠杆菌优势血清型筛选及兼性菌毛株的致病性[J].中国兽医学报,2021,41(7):1282-1289
- GUAN Yifan, LI Yan, GAO Yatao, et al. Screening of predominant serotypes of *Escherichia coli* from calf diarrhea and isolation and identification of facultative fimbriae strains in some areas of Hebei province [J]. Chin J Vet Sci, 2021, 41(7): 1282-1289
- [37] 吴少鹏,王国华,赵效南,等.山东省某地区奶牛源大肠埃希菌的血清型、耐药特性及分子特性[J].微生物学报,2020,60(3):486-498
- WU Shaopeng, WANG Guohua, ZHAO Xiaonan, et al. Serotype, drug resistance and molecular characteristics of *Escherichia coli* from dairy cows in an area of Shandong province [J]. Acta Microbiol. Sin, 2020, 60(3): 486-498
- [38] 李宇涵.牦牛和藏猪源大肠杆菌生物被膜形成能力、耐药基因及毒力基因检测[D].成都:西南民族大学,2020
- LI Yuhan. Detection of biofilm formation ability, drug resistance genes and virulence genes of *Escherichia coli* from yak and Tibetan pigs [D]. Chengdu: Southwest Minzu University, 2020
- [39] 邓珊珊,张海,蔺俐仲,等.规模化猪场猪大肠杆菌的耐药性及相关耐药基因检测[J].养猪,2021,1:113-115
- DENG Shanshan, ZHANG Hai, LIN lizhong, et al. Detection of drug resistance and related drug resistance genes of *Escherichia coli* from pigs in large-scale pig farms [J]. Swine Production, 2021, 1: 113-115
- [40] 严勇,李新圃,丁学智,等.致奶牛乳房炎大肠杆菌免疫生物学特性[J].中国兽医学报,2021,41(3):596-602
- YAN Yong, LI Xinpu, DING Xuezi, et al. Immunobiological and biological characteristics of *Escherichia coli* in dairy mastitis [J]. Chin J Vet Sci, 2021, 41(3): 596-602
- [41] 钟瑜,林少婷,覃芳敏,等.苯扎氯铵消毒剂的抗菌性能研究[J].广东化工,2019,46(15):36-38
- ZHONG Yu, LIN Shaoting, Qin Fangmin, et al. Study on antibacterial properties of benzalkonium chloride disinfectant [J]. Guangdong Chemical Industry, 2019, 46(15): 36-38
- [42] 徐红,李傲,卫亚,等.一种对氯间二甲苯酚消毒剂中和剂选择及杀菌效果观察[J].中国消毒学杂志,2020,37(9):662-663, 666
- XU Hong, LI Ao, WEI Ya, et al. Choice of neutralizer and observation on bactericidal effect of a chloro-m-xyleneol disinfectant [J]. Chinese Journal of Disinfection, 2020, 37(9): 662-663, 666
- [43] 叶小莉,施庆珊,谭绍早.氧化石墨烯/十二烷基二甲基苄基氯化铵复合物的制备和抗菌性能研究[J].工业微生物,2016, 46(4):49-52
- YE Xiaoli, SHI Qinshan, TAN Shaozao. Preparation and antibacterial properties of graphene oxide/dodecyldimethylbenzylammonium chloride complex [J]. Industrial Microbiology, 2016, 46(4): 49-52
- [44] 刘心建,王泽云,贾彦瑜,等.十二烷基二甲基苄基氯化铵在抗抑菌洗衣液中的应用[J].日用化学工业,2016,46(10):576-579,590
- LIU Xinjian, WANG Zeyun, JIA Yanyu, et al. Application of dodecyldimethylbenzylammonium chloride in antibacterial laundry [J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2016, 46(10): 576-579, 590

(上接第 397 页)

- [72] Chinnam N, Dadi P K, Sabri S A, et al. Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(5): 478-486
- [73] 李利红,魏志华,吕乐园,等.板栗壳的提取工艺优化及其抑菌活性研究[J].现代牧业,2019,3(2):22-26
- LI Lihong, WEI Zhihua, LYU Leyuan, et al. Optimization of antibacterial activity [J]. Modern Animal Husbandry, 2019, the extraction process of chestnut shell and the studies on 3(2): 22-26
- [74] 李云雁,宋光森.板栗壳提取物抑菌作用研究[J].林产化学与工业,2004,24(4):61-64
- LI Yunyan, SONG Guangsen. Study on bacteriostasis of chestnut shell extract [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2004, 24(4): 61-64