

新疆乌鲁木齐市生鲜乳中金黄色葡萄球菌污染状况及耐药性分析

吴星星, 蔡扩军

(乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心, 新疆乌鲁木齐 830063)

摘要: 为了解新疆乌鲁木齐市生鲜乳中金黄色葡萄球菌的污染及耐药情况, 采集该地区生产与销售环节生鲜乳 104 份, 利用 Baird-Parker 培养基平板和显色培养基, 分离培养、纯化细菌; 采用革兰氏染色、荧光 PCR、全自动微生物鉴定系统, 对可疑菌落进行鉴定。结果显示: 检出金黄色葡萄球菌阳性乳 35 份, 阳性率为 33.7%; 分离菌株对青霉素等 15 种抗生素存在不同水平的耐药性。结果表明, 乌鲁木齐市生鲜乳中金黄色葡萄球菌污染与耐药情况较严重。结果提示, 要加强乳品安全生产管理, 规范动物饲料和兽药生产, 以及动物饲养管理中抗生素的使用与添加, 以保证乳品品质安全, 维护公共卫生健康。

关键词: 生鲜乳; 金黄色葡萄球菌; 分离鉴定; 污染状况; 耐药性

中图分类号: S852.61 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X (2018) 01-0017-04

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.01.005

Contamination Status and Resistance Analysis of *Staphylococcus aureus* in Fresh Milk in Urumqi City of Xinjiang

Wu Xingxing, Cai Kuojun

(Urumqi Animal Disease Control and Diagnosis Center, Urumqi, Xinjiang 830063, China)

Abstract: In order to investigate the contamination status and drug resistance of *Staphylococcus aureus* of fresh milk in Urumqi City of Xinjiang, a total number of 104 fresh milk samples were collected in production and sale process. The bacteria were isolated, cultured and purified by Baird-Parker agar and chromogenic medium. The suspected colonies were identified by Gram staining, fluorescence PCR and automatic microorganism identification system. The results showed that 35 positive samples of *Staphylococcus aureus* were detected, and the positive rate was 33.7%. The isolated strains were resistant to 15 kinds of antibiotics including Penicillin. The results indicated that the infection and drug resistance conditions of *Staphylococcus aureus* in fresh milk of Urumqi City were severe. It was suggested that the management of dairy production in this area should be strengthened, and the usage and addition of antibiotics in animal feed, veterinary drug production and animal raising management should be regulated, so as to ensure the quality and safety of dairy products and to maintain the public health.

Key words: fresh milk; *Staphylococcus aureus*; isolation and identification; contamination status; drug resistance

金黄色葡萄球菌广泛存在于空气、水、灰尘, 以及人和动物的皮肤、化脓性病灶、排泄物等处^[1], 是引起奶牛乳房炎、造成牛奶产量和品质下降的主要致病菌。该菌产生的肠毒素可耐受 100 °C 30 min 而不被破坏, 并仍有致病性^[2]。

基金项目: 乌鲁木齐市科技局应用开发研究计划渝乌科技合作项目 (Y161220001)

通信作者: 蔡扩军

有研究报道, 100 g 食物中的肠毒素含量达 18 μg 时, 即可引起食物中毒^[3-4]。牛奶营养丰富, 非常适合金黄色葡萄球菌生长与繁殖。人食用金黄色葡萄球菌污染的牛奶后, 会表现呕吐、发热、脱水, 甚至休克等症状, 对食用者身体健康危害极大^[5]。本实验采集乌鲁木齐市生产与销售环节生鲜乳样 104 份, 从中分离鉴定金黄色葡萄球菌, 并对其耐药性进行分析。

1 材料

1.1 样品

采集乌鲁木齐市生产与销售环节生鲜乳 104 份, 包括牛乳 82 份、驼乳 22 份。另外, 以 6 份巴氏及超高温消毒牛乳作为对照。

1.2 培养基和试剂

氯化钠肉汤 (7.5%)、革兰氏染色液: 北京陆桥生物技术有限公司; 金黄色葡萄球菌显色培养基: 法国科玛嘉公司; 金黄色葡萄球菌荧光 PCR 检测试剂盒: 深圳澳东生物科技有限公司。

1.3 金黄色葡萄球菌标准菌株

标准菌株由新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心提供。

1.4 药敏纸片

药敏纸片购自杭州滨和微生物试剂有限公司。

1.5 主要仪器设备

荧光 PCR 仪 (7500 型): 美国 ABI 公司; 全自动微生物鉴定系统 (VITEK-2-Compact 型): 法国梅里埃公司; 电子微生物显微镜: 美国赛默飞世尔科技有限公司。

2 方法

2.1 分离培养

试验中, 均以金黄色葡萄球菌标准菌株作为参考对照。具体操作如下: 待样品采回后, 立即将其按照 1:10 的比例, 加入到 7.5% 的氯化钠肉汤中, 充分混匀, 37 °C 增菌培养 18~24 h; 接种增菌液至 Baird-Parker 平板, 37 °C 培养 2 d; 挑取可疑菌落接种至科玛嘉显色培养基上, 37 °C 培养 18~24 h; 挑取粉色单菌落, 再次划线接种于科玛嘉显色培养基, 进行细菌纯化, 37 °C 培养 18~24 h; 挑取粉色单菌落, 进行细菌鉴定及药敏试验。

2.2 鉴定

2.2.1 革兰氏染色镜检 挑取纯化的单菌落进行革兰氏染色镜检, 观察分离菌落的染色特征。

2.2.2 荧光 PCR 鉴定 用接种环挑取纯化单菌落至装有 100 μL 生理盐水的洁净离心管中, 分别加入 10 μL 蛋白酶 K 溶液、200 μL 裂解液, 充分混匀, 12 000 r/min 离心 1 min; 废弃收集管内液体,

加入洗液 500 μL , 12 000 r/min 离心 1 min; 弃去管中废液, 加入 500 μL 无水乙醇, 12 000 r/min 离心 1 min; 弃去管中废液, 继续 12 000 r/min 离心 3 min; 弃去废液, 将提取柱放入另一干净离心管中, 放置 3 min; 在柱膜中央, 加入 50~100 μL 洗脱液, 放置 1 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集提取的 DNA。反应体系配置: 在干净灭菌的离心管内, 依次加入反应液、荧光探针、酶, 以及提取的 DNA, 混匀成 25 μL 反应体系, 置于荧光 PCR 反应仪中作用 90 min, 然后读取实验结果。结果判定: 阳性对照 C_t 值小于 30.0, 阴性对照 C_t 值为 none, 被检样品呈现出明显的 S 型曲线, 且 C_t 值 ≤ 30.0 时, 判为阳性。

2.2.3 生化鉴定 挑取纯化单菌落进行细菌麦氏浊度配比; 待菌液麦氏浊度测定值达到 1.2 时, 放入全自动微生物鉴定系统 VITEK-2-Compact 中生化反应 1 h。结果判定: 鉴定报告单英文显示金黄色葡萄球菌全称即 “*Staphylococcus*” 时, 表示分离的细菌为金黄色葡萄球菌。

2.3 药敏试验

采用 K-B 纸片扩散法^[6], 对分离鉴定株进行 17 种抗菌药物的耐药性检测: 将待检菌落划线接种至 MH 液体培养基, 37 °C 培养 18~24 h; 次日, 用生理盐水调整菌液浓度至 10^8 CFU/mL; 吸取 100 μL 菌液至 MH 琼脂平板; 用涂布器涂抹均匀, 室温放置 5 min; 在琼脂平板上贴上药敏纸片, 室温放置吸收 5 min; 37 °C 倒置培养 18~24 h 后, 测量形成的抑菌圈直径。

3 结果

3.1 革兰氏染色镜检

显微镜下可观察到呈紫红色的, 形态呈葡萄串状、链状, 单个或成对存在的革兰氏阳性菌 (图 1)

3.2 荧光 PCR 鉴定

对分离纯化的可疑菌落进行荧光 PCR 鉴定。结果显示, 阴阳性对照成立, 被检样品与阳性对照一致, 阳性样品呈现出明显的 S 型检测曲线, 且检测样品 C_t 值小于 30.0, 说明符合试验判定标准 (图 2)。

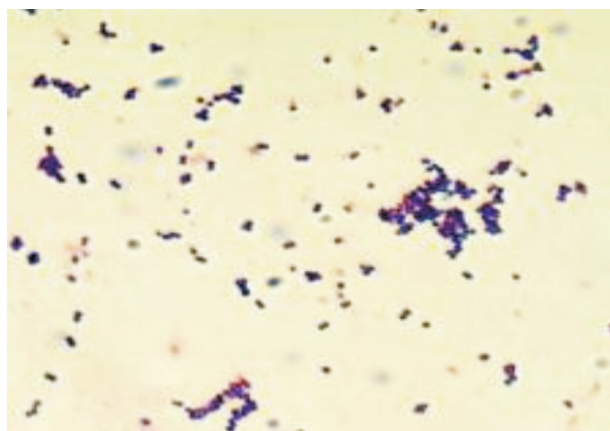


图1 分离纯化细菌革兰氏染色结果

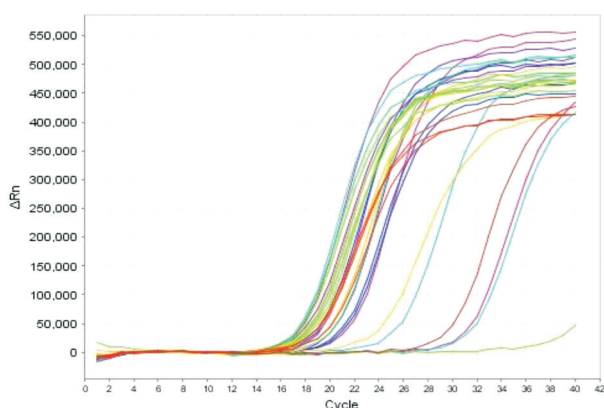


图2 分离纯化菌荧光 PCR 鉴定结果

3.3 生化鉴定

利用全自动微生物鉴定系统 VITEK-2-Compact, 对分离纯化菌进行生化鉴定, 发现报告单显示英文 “*Staphylococcus*”, 即检测细菌被鉴定为金黄色葡萄球菌。

3.4 药敏试验

对分离的 35 株金黄色葡萄球菌进行 17 种抗生素药物的敏感实验。结果显示, 分离鉴定的金黄色葡萄球菌对 15 种抗生素存在一定程度的耐药。其中, 对青霉素、红霉素、甲氧嘧啶、四环素 4 种抗生素敏感性较高, 耐药率分别为 91.4%、40.0%、40.3%、40.0%、31.4%, 对万古霉素和利奈唑胺无耐药性。具体耐药情况见表 1。

4 讨论

食源性致病菌污染是导致出现食品安全问题的重要原因之一。本次共检测 104 份乳样,

表 1 35 株金黄色葡萄球菌药敏试验结果

序号	药物名称	英文缩写	耐药数 / 株	耐药率 / %
1	环丙沙星	CIP	7	20.0
2	苯唑西林	OXA	3	8.6
3	氯霉素	CAP	8	22.9
4	甲氧嘧啶	TMP	14	40.0
5	左氟沙星	LEV	6	17.1
6	青霉素	PEN	32	91.4
7	红霉素	EM	14	40.0
8	四环素	TET	11	31.4
9	头孢西丁	CFX	8	22.9
10	呋喃妥因	FD	6	17.1
11	利福平	RD	1	2.9
12	替考拉宁	TEC	1	2.9
13	克林霉素	DA	8	22.9
14	庆大霉素	CN	4	11.4
15	万古霉素	VA	0	0
16	氟苯尼考	FFC	4	11.4
17	利奈唑胺	LZD	0	0

检出金黄色葡萄球菌阳性样品 35 份 (阳性率为 33.7%), 均为生鲜散乳, 包括 34 份生鲜散牛乳和 1 份驼乳, 而市售 6 份企业巴士消毒奶和超高温消毒奶检测均无菌。这提示乌鲁木齐市生鲜乳中存在金黄色葡萄球菌污染。分析原因可能为:

(1) 金黄色葡萄球菌是引发奶牛乳房炎的重要病原之一。据文献报道, 全球奶牛乳房炎发病率高达 33%。我国是养殖奶牛乳房炎的高发国家, 其中隐性乳房炎发生率占 50%。隐性乳房炎病牛乳房组织和所产牛奶的肉眼变化不明显, 因此挤奶时多不易被发现。但由于挤出的牛奶中含有金黄色葡萄球菌, 因此对食用者身体健康会造成一定威胁^[7]。为此, 建议在日常饲养管理中, 养殖(场)户应加强卫生消毒工作, 坚决不挤患病牛的奶; 对于健康牛, 挤奶前应注意对乳区进行彻底消毒, 并对挤出的奶及时冷藏保存, 以防止细菌大量繁殖并产生相应毒素^[8]。(2) 在乳品生产与销售环节, 由于资金限制, 散养户、部分养殖场均采用传统手工方式挤奶。当日产的鲜奶多盛装于塑料或铝制桶中, 然后送至奶吧、农贸市场、小区超市等居民区就近零售点, 或交于乳品收购点, 由其用一次性食品袋打包销售给市民。乳品从产出到餐桌经历了手工挤奶、运输、储藏、销售等多个环节, 在销售过程中, 又反复打开奶桶, 导致鲜奶与空气多次直接接触, 因而增加了乳品污染的机会。相比之下, 大型乳品企业资金

充足,均采用机械方式挤奶;生产的鲜奶先经巴氏或超高温消毒,再经抽检合格独立包装后上市销售,因而保证了乳品无菌,降低了食用乳品中毒的风险。

本次药敏试验显示,分离鉴定的35株金黄色葡萄球菌对17种抗生素存在一定的耐药性。其中,对青霉素耐药水平最高,达91.4%;其次是红霉素、甲氧苄啶和四环素,耐药率分别为40.0%、40.0%、31.4%;耐药水平最低的为利福平和替考拉宁,耐药率均为2.9%;剩余的9种抗生素耐药范围为8.6%~22.9%。青霉素耐药率最高,表明日常奶牛疾病治疗当中,存在养殖场(户)不合理使用青霉素现象。青霉素的不合理使用促使耐药菌株大量繁殖,使其产生B-内酰胺酶。B-内酰胺酶可水解青霉素的B-内酰胺酶环,形成青霉素噻唑酸,从而使其失去抗菌活性^[9]。为规范抗生素的合理使用,保证乳品安全及动物疫病的科学防治,首先建议相关部门要加大抗生素生产及使用的管理力度,规范动物饲料、兽药的生产销售,杜绝随意添加和使用抗生素。其次,养殖场(户)在日常饲养管理用药中,应减少对抗生素的滥用和依赖,尤其是青霉素;在疾病治疗中,应根据实际药敏检测结果,科学选择抗生素,并根据药物使用说明书,严格遵守用药与休药时间;在进行动物疾病监测的同时,应开展病原菌药物敏感性动态监测,实时追踪病原菌耐药情况,因地制宜,优化药物使用方案,在提高疫病防治的同时,避免同种抗生素的多次使用,以防耐药菌株的产生和增加^[10]。

另外,研究显示,一些中药对细菌有较好的

抑制作用,且不易产生耐药性^[11],因此利用中药治疗耐药细菌性疾病也是今后选择和研究的一个方向。

参考文献:

- [1] 胡晓宁,苏诚玉,权玉玲,等.甘肃省生鲜乳中金黄色葡萄球菌及肠毒素污染状况调查[J].中国卫生检验杂志,23:984-985.
- [2] 周正任.医学微生物学[M].6版.北京:人民卫生出版社,2004:135-142.
- [3] MARTIN M, DINGE S, PAUL M, et al. Schlievert exotoxins of *Staphylococcus aureus*[J]. Clinical microbiology reviews, 2000, 13(1): 16-34.
- [4] 柳旭伟,葛文霞.金黄色葡萄球菌肠毒素[J].微生物学杂志,2008,28(5):86-89.
- [5] 高攀.新疆奶牛乳房炎病例中金黄色葡萄球菌耐药性、血清型调查和乳头灌注治疗实验[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,1-2.
- [6] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:896-901.
- [7] 杜银忠.散装鲜乳中金黄色葡萄球菌的检出及耐药性监测[J].中国兽医杂志,2008,44(4):63-65.
- [8] 陈佳.生奶中金黄色葡萄球菌的污染状况、耐药性状分析[J].中国医药指南,2016,14(6):296.
- [9] 陈杖榴.兽医药理学[M].2版.北京:中国农业出版社,2007:201.
- [10] 王娟,黄秀梅,崔晓娜,等.生鲜牛奶中不同类型金黄色葡萄球菌污染差异性分析[J].中国动物检疫,2015(4):18-21.
- [11] 李树明,张凤鸣,雷燕,等.50味中药对8种畜禽病原菌抑菌对比研究[J].中兽医学杂志,2000(4):5-8.

(责任编辑:朱迪国)