

谢 昆,蒋成砚,郑秋燕,等. 奶牛隐性乳房炎金黄色葡萄球菌分离鉴定及药敏试验[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):163-165.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.041

# 奶牛隐性乳房炎金黄色葡萄球菌分离鉴定及药敏试验

谢 昆,蒋成砚,郑秋燕,周文树,唐秀华,汪 镜

(红河学院生命科学与技术学院,云南蒙自 661100)

**摘要:**从牛奶中分离引起隐性乳房炎的病原菌,通过细菌培养、形态鉴定、生理生化试验等,对引起奶牛隐性乳房炎的病原菌进行分离及鉴定,并对分离病原菌做药敏试验。采用传统的形态学和生理生化试验,并参照《常见细菌系统鉴定手册》鉴定得到金黄色葡萄球菌。通过药敏试验,得到该分离菌对头孢噻吩(抑菌圈 15.6 mm)、万古霉素(抑菌圈 16.0 mm)敏感性最强;其次是庆大霉素(菌圈 12.0 mm)、红霉素(菌圈 11.3 mm)、青霉素(抑菌圈 10.5 mm);敏感低的是四环素(抑菌圈 9.0 mm)和诺氟沙星(抑菌圈 7.0 mm);最不敏感为环丙沙星(抑菌圈为 3.0 mm)。

**关键词:**奶牛;葡萄球菌;分离鉴定;药敏试验

**中图分类号:** S858.237.2<sup>+</sup>6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)10-0163-03

奶牛乳房炎是奶牛最常见的疾病之一,它一直是困扰奶牛业经济效益及迅速发展的重要原因之一,隐性乳房炎是乳房炎的一种,流行面广,为临床型乳房炎的 15~40 倍,引起奶产量降低 4%~10%,影响牛奶质量,并易转变为临床型乳房炎,造成更为严重的经济损失<sup>[1]</sup>。引起隐性乳房炎的因素有多种,如物理、化学、机械、微生物感染等,其中葡萄球菌是引起奶牛乳房炎的主要病原物之一,据报道约有 1/2 以上的乳房炎都是由该细菌引起的,对奶牛乳腺组织造成损伤,使产奶量降低,奶牛的使用年限大大缩短,牛奶的品质和营养价值受到影响,还制约着乳品加工业的健康发展,给乳制品工业带来巨大损失<sup>[2]</sup>。

近年来,随着我国牛奶业的发展,在葡萄球菌方面关注度越来越高,对于葡萄球菌的研究也越来越深入,基本鉴定方法有 4 种,包括血浆凝固酶法、DNA 分解酶法、甘露醇发酵试验、溶血现象。其中金黄色葡萄球菌不仅影响奶牛的泌乳量而且严重影响乳汁的卫生质量,它与链球菌、大肠杆菌所引起的乳房炎约占奶牛乳房炎的 90% 以上<sup>[3-4]</sup>。

本研究从新鲜牛奶中分离引起隐性乳房炎的金黄色葡萄球菌,通过细菌的培养、染色鉴定、生理生化试验,对病原菌进行鉴定,鉴定后进行药敏试验,以期获得敏感性的抗生素,为隐性乳房炎的治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料为新鲜牛奶,采自蒙自养殖户,无菌采集后带回

试验室在 4℃ 的冰箱中保存备用。

### 1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨普通培养基,血皿普通培养基,麦康卡培养基,甲基红培养基,亚硝酸还原培养基,糖类发酵基础培养基(发酵管)。

### 1.3 细菌分离培养及纯化

将样品按 10 倍梯度稀释后,接种在普通琼脂培养基和血皿培养基上,在 37℃ 条件下无氧培养 24 h,待菌落长出后,经过 2 种培养基上菌落的对比,在血皿培养基上挑出有溶血圈的可疑菌落,将可疑菌落继续接种在以上 2 种培养基上,并同时接种在麦康卡培养基上,而在前 2 种培养基中细菌均能正常生长,在最后一培养基上则不生长,将这种菌株反复在普通培养基上培养,划线分离,直至菌落较纯化。待菌株生长良好后,仔细观察菌落形态。

### 1.4 细菌形态鉴定

分离的细菌首先进行革兰氏染色,后在显微镜下观察形态结构。

### 1.5 生理生化鉴定

将分离得到的革兰氏染色为阳性的细菌做过氧化氢酶试验,凡是革兰氏染色为阳性、过氧化氢酶产生气泡的细菌均暂定为葡萄球菌属,再进一步做甲基红试验、各种发酵糖试验、硝酸还原试验、血凝固酶试验。根据《常见细菌系统鉴定手册》来确定所属的种。

### 1.6 PCR 鉴定

采用 CTAB 法提取经过生理生化鉴定的细菌 DNA,根据 GenBank 上发表的金黄色葡萄球菌 16S rRNA 序列(NR\_075000),设计 1 对特异性引物如下,预计扩增产物大小为 1 521 bp。

P1:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',

P2:5'-TCCGATACGGCTACCTTGTACG-3'。

以细菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件如下:94℃ 的预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1.5 min,35 个循环,72℃ 延伸 10 min,反应结束后取 5 μL 扩增产物电泳检测。将检测正确的 PCR 产物送交生工生物(上

收稿日期:2017-08-21

基金项目:云南省科技厅应用基础研究面上项目(编号:2010ZC151);红河学院大学生创新创业训练计划项目(编号:DCXL151016);红河学院大学生科技创新项目(编号:SZ1520);红河学院应用型科学研究项目(编号:XJY15Z07);红河学院博士专项项目(编号:XJ15B13)。

作者简介:谢 昆(1975—),男,云南富民人,博士,副教授,主要从事动物生物化学与分子生物学方面的研究。Tel:(0873)3699787;E-mail:xk\_biology2@126.com。

海)股份有限公司测序。将测序结果与 GenBank 上发表的金黄色葡萄球菌 16S rRNA 序列进行同源性比较。

1.7 药敏试验

将经生理生化鉴定后的细菌涂布在培养皿上,并把各种药敏片标记后放在该培养皿中,待培养 24 h 之后观察结果。观察抑菌圈的大小,用抑菌圈大小判定各种药敏片对细菌的敏感程度。

2 结果与分析

2.1 病原菌的形态特征

在血皿培养基上,菌落周围有溶血现象,出现溶血圈,菌落为圆形,平板形成湿润、表面光滑、边缘有些不整齐,呈白色或金黄色,中央有凸起的菌落(图 1)。葡萄球菌的菌体都是圆形的,一般在显微镜下观察是呈葡萄串状,革兰氏染色呈阳性(图 2)。

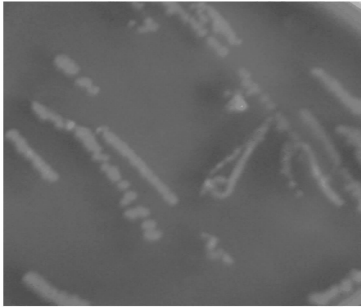


图1 血皿培养基上培养的金黄色葡萄球菌菌落

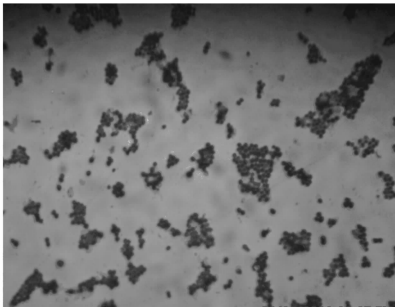


图2 镜检革兰氏染色后金黄色葡萄球菌菌落形态

所分离的葡萄球菌的形态特征,菌落直径在 0.5 ~ 1.5 mm 之间,凸起、圆形、光滑、金黄色,偶尔也为白色;细菌为圆形,通常是以葡萄串状存在,偶尔有单个,缺乏鞭毛。

2.2 病原菌的生理生化鉴定

本试验对牛奶中分离得到的葡萄球菌进行生理生化鉴定,由表 1 可知,革兰氏染色试验、过氧化氢酶试验、血凝固酶试验、甲基红试验、硝酸还原试验等均为阳性,根据形态特征和常规的生理生化鉴定结果,试验分离出的细菌确定为葡萄球菌属。

表 1 分离细菌的生理生化试验结果

试验项目	革兰氏染色 试验	过氧化氢 试验	甲基红 试验	血凝固酶 试验	硝酸还原 试验
MZ-1	+	+	+	+	+

注: + 为阳性反应, - 为阴性反应。

2.3 病原菌发酵特性分析

将分离到的葡萄球菌属的菌株,做进一步的发酵试验,试

验结果见表 2,参照《常见细菌系统鉴定手册》进行种的鉴定。

由表 2 可知,所分离出来的葡萄球菌是金黄色葡萄球菌。

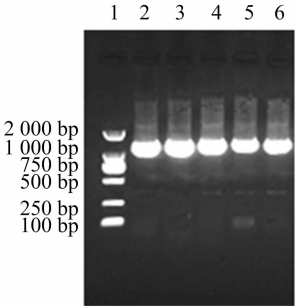
表 2 分离株的糖发酵试验结果

试验项目	阿拉伯糖	果糖	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	蔗糖	木糖
MZ-1	+	+	+	+	+	+	+	+

注: + 为阳性反应, - 为阴性反应。

2.4 病原菌的 PCR 鉴定

经生理生化鉴定的病原菌,设计 1 对金黄色葡萄球菌 16S rRNA 特异性引物,以病原菌 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。由图 3 可知,PCR 产物大小 1 521 bp,与预期大小一致。由图 4 可知,PCR 产物经测序后发现与 GenBank 登录的金黄色葡萄球菌 16S rRNA (NR\_075000) 有 2 个核苷酸的差异,证明分离的病原菌为金黄色葡萄球菌。



1—DL2000 DNA marker; 2~6—病原菌 16S rRNA 的 PCR 扩增结果  
图3 病原菌 16S rRNA 的 PCR 扩增结果

2.5 病原菌药敏试验结果

参照美国临床实验室标准委员会 1994 年制定的抗生素敏感度判断标准 (NCCLS1994) 判断抑菌结果。抑菌圈直径 >15 mm 为高敏感度抑菌作用,用“+++”表示;10 mm < 抑菌圈直径 <15 mm 为中敏感度抑菌作用,用“++”表示;抑菌圈直径 <10 mm 为低敏感度抑菌作用,用“+”表示;抑菌圈直径 <5 mm 的为无抑菌作用,用“-”表示。

由表 3 可知,分离得到的葡萄球菌对万古霉素和头孢噻吩敏感度高,对庆大霉素、四环素、青霉素为中度敏感,对于四环素和诺氟沙星敏感度低,而对于环丙沙星不敏感。

3 讨论

3.1 分离培养基的选择

从不同的基质中分离葡萄球菌时,据葡萄球菌的生长环境条件以及它在不同培养基上生长的情况进行培养基的组分选择<sup>[5]</sup>。对于葡萄球菌的分离,多数人选择有色培养基进行细菌的培养。本试验所用的培养基是普通培养基(培养细菌),而一些常见的病原菌也可以在普通培养基上生长,如链球菌、大肠杆菌等在普通培养基上生长,但链球菌生长差,有时不生长。大肠杆菌虽然生长旺盛,但是它的菌落大小和形态与葡萄球菌是完全不同的,因此降低了分离的难度。

3.2 细菌的分离鉴定

细菌的分离鉴定方法很多,可以是常规的生化鉴定,也可以是分子生物学鉴定,包括 DNA 测定、PCR 技术、血清鉴定等。得益于现在技术的发达,较多的人是采用分子鉴定方法,

S.aureus.seq	AGAGTTTGATCTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGAT	120
Gen S.aureus.seq	AGAGTTTGATCTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGAT	120
S.aureus.seq	AACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGGCTTCTGCTGCTACTTATAGATGGAATCCGCGCT	240
Gen S.aureus.seq	AACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGGCTTCTGCTGCTACTTATAGATGGAATCCGCGCT	240
S.aureus.seq	GCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAAGGCTTACCAAGGCAACGATGCAATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAATCGAGACACGGTCCAGACTCTCTACGGGAGGCAGCATAG	360
Gen S.aureus.seq	GCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAAGGCTTACCAAGGCAACGATGCAATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAATCGAGACACGGTCCAGACTCTCTACGGGAGGCAGCATAG	360
S.aureus.seq	GGAATCTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAAGTAAGTGTGCACATCTT	480
Gen S.aureus.seq	GGAATCTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAAGTAAGTGTGCACATCTT	480
S.aureus.seq	GACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAATACGTGCCACGACGCCGCGTAAATCGTAGGCTGCGCAGCGTTATCCGGAATTAITGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTTTTTAAAGTCT	600
Gen S.aureus.seq	GACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAATACGTGCCACGACGCCGCGTAAATCGTAGGCTGCGCAGCGTTATCCGGAATTAITGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTTTTTAAAGTCT	600
S.aureus.seq	GATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGAACCTTGAAGTGCAGAAAGGAGGAAAGTGGAAITTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGAACACC	720
Gen S.aureus.seq	GATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGAACCTTGAAGTGCAGAAAGGAGGAAAGTGGAAITTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGAACACC	720
S.aureus.seq	AGTGGCGAAGGCGAGCTTTCTGCTCTGTAATGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGATCAACAGGATTAGATACCTCGGTAGTCCACGCCCTTAACGATGAGTGCTAAGTTTGAAGGGG	840
Gen S.aureus.seq	AGTGGCGAAGGCGAGCTTTCTGCTCTGTAATGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGATCAACAGGATTAGATACCTCGGTAGTCCACGCCCTTAACGATGAGTGCTAAGTTTGAAGGGG	840
S.aureus.seq	TTTCGCCCTTTAGTGCTGCGAGCTAACGCAITTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAGGAATTTGACGGGGACCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGTTTAA	960
Gen S.aureus.seq	TTTCGCCCTTTAGTGCTGCGAGCTAACGCAITTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAGGAATTTGACGGGGACCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGTTTAA	960
S.aureus.seq	TTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAACTCTTGACATCCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTCTCGGGGACAAAGTGACAGCTGGTGCAATGTTGTCGTCAGCTCGTGTG	1080
Gen S.aureus.seq	TTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAACTCTTGACATCCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTCTCGGGGACAAAGTGACAGCTGGTGCAATGTTGTCGTCAGCTCGTGTG	1080
S.aureus.seq	TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGCTGACAAACCGGAGGAAAGTGGGATGACGCTCAA	1200
Gen S.aureus.seq	TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGCTGACAAACCGGAGGAAAGTGGGATGACGCTCAA	1200
S.aureus.seq	TCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACGCTGCTACAAATGGAACCAAAAGGCGCAGCAAAACCGTGAGGTCAAGCAAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTGCGATTGTAGTCTGCA	1320
Gen S.aureus.seq	TCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACGCTGCTACAAATGGAACCAAAAGGCGCAGCAAAACCGTGAGGTCAAGCAAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTGCGATTGTAGTCTGCA	1320
S.aureus.seq	ACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAACTGATAGATCAGCATGCTACGGTGACTACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGCG	1440
Gen S.aureus.seq	ACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAACTGATAGATCAGCATGCTACGGTGACTACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGCG	1440
S.aureus.seq	GTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTGCAAGGTGGGACAAATGATTGGGGTGAAGTCGTAACCAAGGTAGCCGTATCGGA	1521
Gen S.aureus.seq	GTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTGCAAGGTGGGACAAATGATTGGGGTGAAGTCGTAACCAAGGTAGCCGTATCGGA	1521

Gen S.aureus 为 GenBank 登录的金黄色葡萄球菌 16S rRNA 核苷酸序列, S.aureus 为 PCR 产物测序结果, 阴影部分为核苷酸差异  
图4 PCR 产物测序结果与 GenBank 登录的金黄色葡萄球菌 16S rRNA 核苷酸同源性比较

表 3 药敏试验抑菌圈的平均直径

试验项目	万古霉素	环丙沙星	头孢噻吩	庆大霉素	红霉素	四环素	诺氟沙星	青霉素
MZ-1	16	3	15.6	12	11.3	9	7	10.5
MZ-1	+++	-	+++	++	++	+	+	++

注:直径长度用 mm 表示。

利用分子鉴定能更快速地鉴定出结果<sup>[6]</sup>。本试验是用的常规生化鉴定方法结合分子生物学方法,能快速准确鉴定出分离的病原菌。

### 3.3 分离菌的耐药性

根据所查的资料,刘军等是用菌株数来表示该菌对各种药敏片的耐药性,他们试验的结果是青霉素、四环素的耐药性较差,本研究是用抑菌圈表示各种药片对该菌的敏感程度,根据抑菌圈的大小判断可知,青霉素和四环素的抑菌圈较小,表示耐药性较强;诺氟沙星和环丙沙星的抑菌圈最小,耐药性最差,由此可见该细菌对于这几种药已经产生了抗性<sup>[7-8]</sup>。为了在今后的治疗中不让菌株产生抗药性,应扩大抗生素应用的广谱性,抗生素之间试行交叉使用。本研究结果说明在不同地区葡萄球菌对各种抗生素的抗性不同,耐药性也是有差别的,研究结果可以为当地预防奶牛乳房炎的发生与流行奠定基础<sup>[9-10]</sup>。

本试验采用传统的形态学和生理生化鉴定方法,再根据《常见细菌系统鉴定手册》鉴定出从牛奶中分离出来的葡萄球菌,并根据各种生理生化试验鉴定出它是致病性金黄色葡萄球菌。根据本试验药敏片产生的抑菌圈大小可知,万古霉素和头孢噻吩的抑菌圈最大,平均在 15 mm 以上,对细菌的敏感度高;庆大霉素、红霉素和青霉素的抑菌圈在 10 ~ 15 mm 之间,敏感度中;四环素和诺氟沙星的抑菌圈在 5 ~ 10 mm 之间,敏感度低;环丙沙星的抑菌圈在 5 mm 以下,对细菌不

敏感。

### 参考文献:

- [1] 史冬艳,郝永清,张爱荣,等. 奶牛金黄色葡萄球菌性乳房炎研究进展[J]. 动物医学进展,2010,31(7):82-86.
- [2] 李明杰. 奶牛乳房炎的危害及综合防治措施[J]. 畜牧与饲料科学,2009,30(3):172-172.
- [3] 李淑芳,张继东,李茜,等. 奶牛乳房炎乳致病性葡萄球菌的分离鉴定及生化分型[J]. 今日畜牧兽医,2008,24(5):7-8,56.
- [4] 柳旭伟,王精梅,刻根强. 牛源金黄色葡萄球菌的分离培养及鉴定[J]. 当代畜牧,2005,28(11):16-17.
- [5] 梁璐,陈冰. 乳腺脓肿分离到葡萄球菌的鉴定和药敏分析[J]. 现代医药卫生,2009,25(11):1671-1673.
- [6] 尹柏双,李国江. 奶牛乳房炎的研究新进展[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(2):182-184.
- [7] 杨有武. 青海地区奶牛乳房炎葡萄球菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(10):171-174.
- [8] 秦梅. 奶牛乳房炎葡萄球菌的分离鉴定及万古霉素等其它抗生素耐药性情况调查[D]. 泰安:山东农业大学,2007:6-8.
- [9] 覃艳华,谢和,胡萍,等. 原料奶中金黄色葡萄球菌分离鉴定及产毒菌株的快速检测[J]. 贵州农业科学,2011,39(5):140-143,146.
- [10] 鲁怀伟,马筱玲. 葡萄球菌的分离鉴定及药敏分析[J]. 蚌埠医学院学报,2003,28(4):358-360.