

陈杰,魏勇,王晨豫,等. 新疆部分地区牛源无乳链球菌主要毒力基因和耐药基因的检测与序列分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(22):171-179.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.22.025

新疆部分地区牛源无乳链球菌主要毒力基因和耐药基因的检测与序列分析

陈杰¹, 魏勇², 王晨豫¹, 曹梦园¹, 陈明杰¹, 闫雪琪¹, 齐亚银¹

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832000; 2. 新疆天澳牧业有限公司, 新疆奎屯 833200)

摘要:无乳链球菌作为引起奶牛乳房炎的主要致病菌之一,常常会引起奶牛乳腺组织的局部炎症。随着无乳链球菌分离率的提高和各种抗生素的滥用,会导致其对抗菌药物的耐药性逐渐增强,从而给奶牛场针对乳房炎的临床治疗带来一定的困难,导致奶牛场生产性能下降,经济效益降低。此外,无乳链球菌可在宿主中定殖,持续破坏宿主的免疫系统,导致其自身的毒力因子引起宿主机体致病。为了解新疆部分地区牛源无乳链球菌的毒力因子、感染及耐药情况,对 2021 年 7—8 月采集的 147 份隐性乳房炎和临床型乳房炎牛的乳样进行病原菌的分离培养鉴定,采用 K-B 纸片扩散法和 PCR 技术对分离出的无乳链球菌进行生化鉴定、药物敏感性试验、毒力基因和耐药基因检测。结果可知,从临床型乳房炎牛和隐性乳房炎牛中,共计采集 147 份的乳样中共分离到 6 株无乳链球菌,分离率为 4.1%。药敏试验结果显示,在脱纤维绵羊血琼脂平板中分离出的疑似链球菌菌株对氨基糖苷类药物、头孢类及糖肽类药物高度敏感,对 β -内酰胺类药物耐药,耐药基因检测结果显示,介导 β -内酰胺类药物耐药的 *TEM* 基因、四环素类药物耐药的 *tetL* 基因、青霉素类药物耐药的 *pbp2b* 基因、大环内酯类药物耐药的 *ermB* 基因检出率为 100%,与药敏表型结果也近似一致。毒力基因检测结果显示,除 *bac*、*bca*、*ScpB*、*rib*、*lmb* 基因未检测到外,*cfb*、*hylB*、*cylE*、*fbsA*、*Sip* 基因检出率为 100%,发现在新疆部分地区规模化奶牛场分离出的无乳链球菌具有高度相似的药物敏感性和毒力基因。

关键词:奶牛乳房炎;无乳链球菌;脱纤维绵羊血琼脂平板;耐药基因;毒力基因

中图分类号:S852.61 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)22-0171-09

奶牛乳房炎是奶牛的常见多发病,由于其病因复杂多样、病原种类繁多、易反复发作等特点,目前,已成为奶牛养殖中造成经济损失最严重的疾病^[1]。无乳链球菌更是引起奶牛乳房炎最重要的病原菌之一,常存在于奶牛的皮肤、乳头及乳房内,并通过挤乳人员手或挤乳机械及蝇类的携带而传播。无乳链球菌引起乳房炎后不产生明显免疫力,目前暂无可靠的多价菌苗^[2]。无乳链球菌属革兰氏阳性菌,会对人类和动物造成严重的侵入性感染。无乳链球菌不仅可引起人类脑膜炎、肺炎、新

生儿败血症等,也会引起猪、牛、鱼等动物的链球菌病,这主要是由于该菌具有多种毒力因子,使其能够在宿主中定殖,逃避宿主吞噬从而大量繁殖^[3],具有较高的致病性和致死性。

现阶段采用抗生素治疗仍是最普遍治疗奶牛乳房炎的方法,大量且多种类的抗生素,在临床治疗奶牛乳房炎时被广泛应用。抗生素的疗效与抗生素本身的性质、到达乳房的有效浓度、用药次数及给药时间等有关^[1]。在抗生素治疗奶牛乳房炎的过程中,诸多不利因素也逐渐呈现,易出现抗药性和耐药性;引发其他一些副作用,如肠道菌群失调、影响食欲等;造成牛奶中药物残留及奶牛体内药物积蓄等^[4]。此外,无乳链球菌中存在许多毒力因子,这些毒力因子可黏附聚集在乳腺上皮细胞上,通过破坏乳腺细胞的酶系统来打破乳腺细胞的蛋白平衡,这些毒力因子的免疫调节作用不仅与致病机制具有一定的关系,而且还决定着无乳链球菌的感染方式^[5]。

为更加全面地了解新疆部分地区无乳链球菌的生物学特性,本研究采用实验室传统的细菌学鉴

收稿日期:2021-12-11

基金项目:优质生鲜乳安全生产关键技术集成与应用(编号:SR2020001);万吨规模化奶牛牧场种养产业链提质增效技术集成与示范(编号:SR202101)。

作者简介:陈杰(1996—),男,新疆库尔勒人,硕士研究生,主要从事动物疫病诊断与防控技术研究。E-mail:1771812361@qq.com。

通信作者:齐亚银,教授,主要从事动物传染病的诊断和防治工作研究,E-mail:75997921@qq.com;魏勇,硕士,高级畜牧师,主要从事规模化牧场奶牛饲养管理的研究,E-mail:627606567@qq.com。

定方法与分子生物学技术相结合的方式,对新疆部分地区规模化奶牛场 2021 年 7—8 月所采集目标牛乳样中的无乳链球菌进行分离鉴定。并对目标菌株进行生化鉴定、药物敏感性测定、分子生物学鉴定、耐药基因及毒力基因检测等一系列工作。从而为新疆部分地区的规模化奶牛场中由于无乳链球菌所引发的一系列疾病,提供合理的防治方案、检测方法,为日后研究无乳链球菌致病性及流行病学调查、疫苗的研制提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验样品 试验样品均采自新疆石河子、奎屯地区规模化奶牛场共计 147 份体细胞数 ≥ 300 万个/mL 的奶样, -4 ℃ 运输保存。

1.1.2 主要试剂及药品 试验所需相关试剂见表 1。

表 1 实验试剂

试剂	来源
脑心浸出液肉汤(BHI)	上海生工生物工程股份有限公司
哥伦比亚血琼脂基础培养基、叠氮钠葡萄糖肉汤	青岛高科园海博生物技术有限公司
无菌脱纤维绵羊血	北京索莱宝科技有限公司
革兰氏染色液	珠海贝索生物技术有限公司
2 × Taq Plus Master mix II	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
Trans DNA Marker I、2 000 DNA Marker、2 000 Plus DNA Marker	北京全式金生物技术有限公司
DNA Marker II	北京天根生化科技有限公司
SuperRde 核酸染液	合肥兰杰柯科技有限公司
细菌基因组 DNA 提取试剂盒	北京天根生化科技有限公司
引物	上海生工生物工程股份有限公司
药敏试纸	杭州滨和微生物试剂有限公司

1.1.3 主要仪器与设备 试验所需相关仪器与设备见表 2。

1.2 样品采集

2021 年 7—8 月在新疆石河子、奎屯地区饲养规模均为 1 200 头左右的 2 个规模化奶牛场,在进行奶样采集工作时,首先根据奶牛场最近存档的 DHI 数据中 SCC(体细胞数) ≥ 300 万个/mL 的泌乳牛信息,并通过奶牛场“阿菲金”软件系统,快速、准确的锁定体细胞数 ≥ 300 万个/mL 目标牛,从而准确筛选出 SCC ≥ 300 万个/mL 目标牛的乳样,确保样品的正确性。再通过牛博士体细胞检测仪的联合

表 2 仪器与设备

试剂与仪器名称	购买厂家
光学显微镜	Olympus 公司
纯水机	ThermoFisher 公司
高压灭菌器	Hirayama 公司
电子天平	北京赛多利斯仪器系统有限公司
冰箱	海信集团有限公司
漩涡混合器	Scientific Industries 公司
电子分析天平	赛多利斯科学仪器有限公司
恒温培养箱	北京市永光明医疗仪器厂
超净工作台	上海鸿都电子科技有限公司
离心机	Sigma 公司
隔水式恒温培养箱、电热恒温水浴锅	北京市永光明医疗仪器厂
全自动振荡培养箱	上海智城分析仪器制造有限公司
PCR 扩增仪	Techne 公司
微波炉	广东美的厨房电器制造有限公司
电泳仪	北京市六一仪器厂
凝胶成像仪	Biorad 公司
微量移液器及大容量移液枪	英国 Bibby 科技有限公司
牛博士Ⅲ型体细胞检测仪器	华诚睿光(中国)生物科技有限公司

使用,对 SCC ≥ 300 万个/mL 的奶样进行二次确诊,7—8 月牛场 SCC ≥ 300 万个/mL 奶牛头数共计 134 份。其次,对均处于泌乳期的已确诊为临床型乳房炎成年奶牛进行样品采集(所选牛均未投喂含有抗生素的饲草料并且没有参与兽医治疗),共采集 13 份临床型乳房炎牛奶样。采用 5 mL 无菌 EP 管采集,挤奶时选择已完成前药浴、弃头 3 把奶工作后的奶样,共采集 147 份奶样, -4 ℃ 运输保存。

1.3 无乳链球菌的分离纯化与保藏

1.3.1 分离纯化 将奶样样品管充分涡旋振荡均质,移取 50 μL,转种于 800 μL 叠氮钠葡萄糖肉汤培养基内,在振荡培养箱中 37 ℃、180 r/min 培养 18 ~ 24 h。在脱纤维绵羊血琼脂培养基上划线接种,在 37 ℃ 恒温培养箱中培养 18 ~ 24 h。挑取具有 β 溶血环的单个菌落重复转种于叠氮钠葡萄糖肉汤培养基中振荡培养 18 ~ 24 h。再次在脱纤维绵羊血琼脂培养基上划线接种,在 37 ℃ 恒温培养箱中培养 18 ~ 24 h。挑取具有 β 溶血环的单个菌落进行涂片、革兰氏染色,于显微镜下镜检观察,将镜检呈革兰氏阳性球菌、链状排布的单个菌落再次转种于脑心浸出液肉汤(BHI)培养基振荡培养 18 ~ 24 h。

1.3.2 菌种的保藏 首先将丙三醇(甘油)与蒸馏

水 1 : 1 混匀在锥形瓶中,使得甘油浓度保持在 50%,再通过高压灭菌锅 121 ℃ 条件下高压 20 min。再将经多次分离纯化后的无乳链球菌的菌液与 50% 甘油,按照 1 : 1 比例各取 500 μL 加入无菌冻存管中混匀,最后置于 -20 ℃ 冰箱储存。

1.4 分离菌形态学观察

使用接种环分别将纯化后的链球菌属菌液均匀涂抹在载玻片中央,将载玻片置于乙醇灯外焰上 3 ~ 5 cm 处固定,经革兰染色法染色后,在光学显微镜的 100 倍油镜下观察菌株形态。

1.5 生化反应

参照链球菌生化鉴定手册,吸取 10 μL 纯化后的无乳链球菌菌液,分别依次接种至 V - P、PYR、精氨酸、DPP、PMG、七叶苷、MAG、TMZ、蕈糖、蔗糖、山梨醇生化鉴定管中,置于 34 ℃ 恒温培养箱中培养 36 ~ 48 h 后观察结果。

1.6 CAMP 法检测

无乳链球菌能够产生 CAMP 因子,该因子可与红细胞反应产生溶血现象,而金黄色葡萄球菌中的 β 毒素能够增强这种溶血程度。因此,在这 2 种细菌的交界处溶血现象会大大增强,出现箭头型透明溶血区。具体操作方法为:使用无菌接种环,先以溶血性金黄色葡萄球菌划一横线接种在 5% 脱纤维

绵羊血琼脂平板上,再将待检菌与前一划线作垂直接种,两者应相距 1 cm,于 37 ℃ 培育 18 ~ 24 h 后观察结果,每次试验应做阴、阳性对照。2 种细菌划线交接处出现箭头型溶血区为阳性。

1.7 分子生物学鉴定

依照 DNA 提取试剂盒操作步骤提取链球菌属 DNA,于 -20 ℃ 保存。对提取的分离菌 DNA 进行 PCR 扩增,引物合成参考文献[6 - 7],引物序列及条件见表 3,反应体系为 25.0 μL : 2 \times Taq Plus Master mix II 12.5 μL ,双蒸水 6.5 μL ,上下游引物各 1.0 μL ,细菌 DNA 模板 4.0 μL 。反应程序为:① 95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,56 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,进行 30 个循环;72 ℃ 终延伸 10 min,4 ℃ 保存。② 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 30 s,进行 30 个循环;72 ℃ 终延伸 5 min,4 ℃ 保存。

扩增 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳条件为:0.5 \times TBE 电泳液,120 V,90 mA,45 min。采用凝胶成像仪对电泳后的琼脂糖凝胶进行分析。无乳链球菌目的基因预期扩增片段约 345 bp、乳房链球菌目的基因预期扩增片段约 330 bp。将扩增产物送至睿博兴科生物技术有限公司测序,并在 NCBI 上对序列进行在线比对。

表 3 PCR 扩增条件及引物序列

检测菌	序列(5'→3')	退火温度 (℃)	延伸时间 (s)	产物大小 (bp)
无乳链球菌	F:GGGATTGGGATAACTAAG;R:TGAAGTGCTGCTTGTAAATG	56	120	345
乳房链球菌	F:TAAGGAACACGTTGGTTAAG;R:TCCAGTCCTTAGACCTTCT	55	30	330

1.8 无乳链球菌药物敏感性试验

根据 CLSI 推荐的药敏纸片扩散法(K - B 法)选取 β - 内酰胺类(青霉素、氨苄西林、阿莫西林);氨基糖苷类(链霉素、卡那霉素、庆大霉素、新霉素);喹诺酮类(恩诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星);头孢类(头孢氨苄、头孢噻肟);糖肽类(万古霉素);四环素类(四环素);林可霉素类(克林霉素)测定各分离株对 15 种抗生素的敏感性。药敏纸片,均购自杭州滨和微生物试剂有限公司。将多次分离纯化后得到的无乳链球菌,接种与 BHI 肉汤培养基中,置于恒温摇床内增菌培养 24 h 后,采用生理盐水将菌液浓度调节至 $(1 \sim 2) \times 10^8$ CFU/mL。按照纸片法操作,吸取适量菌液涂布在 LB 琼脂平板上,取出不同药敏纸片,贴于琼脂表面,不同药敏纸片的间

距至少 24 mm。将平板置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后,测量琼脂上的抑菌环直径。评判结果均参照美国临床实验室国家标准化管理委员会标准(CLSI2008)。

1.9 无乳链球菌主要耐药基因 PCR 检测

对下列 8 种耐药性基因进行 PCR 检测:氨基糖苷类耐药基因 *aphA* 和 *aad - 6*;四环素类耐药基因 *tetO*、*tetL*;青霉素类耐药基因突变 *pbp2b*;大环内酯类耐药基因 *erm (A/T)*、*ermB*; β - 内酰胺类耐药基因 *TEM*;并对其进行序列测定。以提取的基因组 DNA 作为模板,采用上述引物 PCR 扩增各基因目的条带。PCR 反应体系 25.0 μL : 2 \times Rapid Taq MasterMix 12.5 μL ,上、下游引物各 1.0 μL ,DNA 模板 2 μL ,ddH₂O 8.5 μL 。PCR 反应条件:95 ℃ 预变

性 5 min;95 ℃ 变性 30 s (*pbp2b* 1 min、*TEM* 20 s),按照表 4 退火温度 30 s (*tetL* 1 min、*pbp2b45* s、*TEM* 20 s),72 ℃ 延伸 1 min(*aphA* 延伸 1 min、*aad-6* 延伸 1 min、*tetL* 延伸 1 min、*pbp2b* 延伸 1.5 min、*TEM* 延伸 45 s),共 30 个循环(*ermB* 25 个循环、*TEM* 34 个循环);72 ℃ 终延伸 10 min(*TEM* 延伸 7 min);4 ℃ 保存。各基因的特异性引物合成参考相关文献^[8-10],相关信息见表 4。

1.10 无乳链球菌主要毒力基因 PCR 检测

参考已有研究^[11-14]中的引物序列,利用表 5 中的特异性引物对无乳链球菌 9 种主要毒力基因进行 PCR 检测。*scpB*(*cps* 编码的 C5a 肽酶)、*hylB*(透明

质酸盐裂解酶)、*bac*(β -C 蛋白基因)、*bca*(α -C 蛋白基因)、*cfb*(CAMP 因子)、*cylE*(β -溶血素)、*fbsA*(纤维蛋白原结合蛋白 A)、*lmb*(黏连蛋白结合蛋白)、*Sip*(表面免疫原性蛋白),并对其进行序列测定。以提取的基因组 DNA 作为模板,采用上述引物 PCR 扩增各基因目的条带。PCR 反应体系同“2.8”节。PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s (*Sip* 1 min),按照表 5 退火温度 30 s (*Sip* 1 min、*cylE* 40 s),72 ℃ 延伸 30 s(*Sip* 延伸 1 min),共 30 个循环(*cfb*、*fbsA*、*cylE*、*hylB* 35 个循环);72 ℃ 终延伸 10 min;4 ℃ 保存。各基因的特异性引物和相关信息见表 5。

表 4 耐药基因引物序列

基因	引物序列(5'→3')	退火温度 (℃)	延伸时间 (s)	产物大小 (bp)
<i>aphA</i>	F:GGGGTACCTTTAAATACTGTAG;R:TCTGGATCCTAAAACAATTCATCC	51	60	848
<i>aad-6</i>	F:AGAAGATGTAATAATATAG;R:CTGTAATCACTGTTCGCCCT	46	60	978
<i>tetO</i>	F:GCGGAACATTGCATTGAGGG;R:CTCTATGGACAACCCGACAGAAG	57	30	538
<i>tetL</i>	F:GGATCGATACTAGCCATGGG;R:GTATCCCACCAATGTAGCCG	46	60	516
<i>pbp2b</i>	F:GATCCTCTAAATGATTCTCAGGTGG;R:CCATTAGCTTAGCAATAGGTGTTGG	55	90	1 500
<i>erm(A/T)</i>	F:TCAGGAAAAGGACATTTTACC;R:ATACTTTTTGTAGTCTTCTT	47	30	423
<i>ermB</i>	F:GGTAAAGGGCATTTAACGAC;R:CGATATTCTCGATTGACCCA	47	30	454
<i>TEM</i>	F:CATTTCGGTGTGCGCCCTTAT;R:GACCGAGTTGCTCTTGCC	55	45	259

表 5 毒力基因引物序列

基因	引物序列(5'→3')	退火温度 (℃)	延伸时间 (s)	产物大小 (bp)
<i>ScpB</i>	F:AGCCATATGCTGCGATCTCT;R:GGGTGAACCAAGTGTGCTT	56	30	198
<i>hylB</i>	F:TCCATTTAAAGCCCTTGGTG;R:GGCGCCAGTATAAGCAACAT	54	30	199
<i>bac</i>	F:CTATTTTGGATATTGACAATGCAA;R:GTCGTTACTTCCTTGAGATGTAAC	60	36	592
<i>bca</i>	F:TAACAGTTATGATACTTCACAGAC;R:ACGACTTTCCTCCGTCCTTAGG	68	30	535
<i>Sip</i>	F:CAAGGATCCGAAACAGATACGACG;R:CTGAAGCTTGATATTGGAGCCCTGC	55	60	879
<i>cfb</i>	F:AAGCGTGATTCCAGATTTCC;R:AGACTTCATTGCGTGCCAAC	58	30	317
<i>cylE</i>	F:CATTGCGTAGTCACCTCCC;R:GGGTTTCCACAGTTGCTTGA	58	30	380
<i>fbsA</i>	F:GAACCTTCTTGTACACTTG;R:TTGATCCTAGCACTCCCA	58	30	556
<i>lmb</i>	F:CCGTCTGTAAATGATGTGGC;R:GAAATACCCGAGATACCAAG	55	45	473
<i>rib</i>	F:CAGGAAGTGCTGTTACGTAAAC;R:CGTCCCATTAGGGTCTTCC	58	30	369

2 结果与分析

2.1 无乳链球菌分离鉴定

2.1.1 形态学特征 从 147 份乳样中共分离出 6 株无乳链球菌,分离率为 4.1%。观察分离菌的培

养特征,纯化后的无乳链球菌菌液划线于脱纤维无菌绵羊血琼脂平板上的菌落出现灰白色,表面光滑、露滴状菌落,菌落周围出现透明的 β 溶血环(图 1-a);经革兰氏染色后该菌在显微镜下呈现蓝紫色的革兰氏阳性球菌,短链或长链排列(图 1-b)。

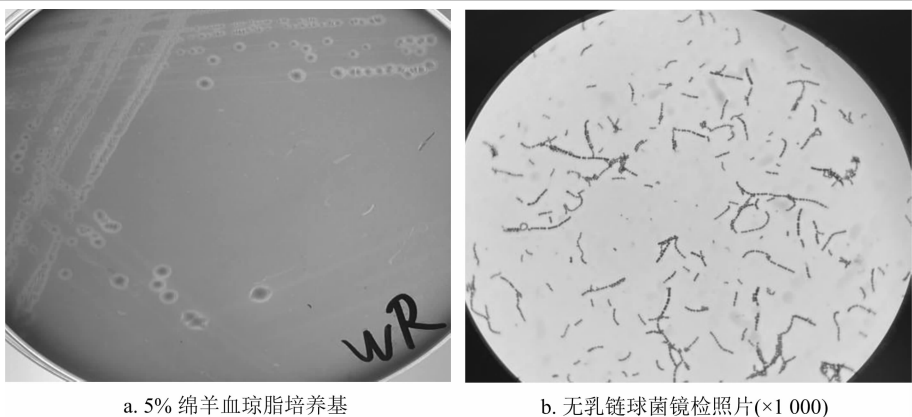


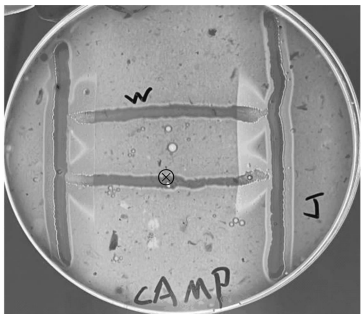
图1 无乳链球菌的菌落特征和形态结构

2.1.2 分离菌生化试验鉴定结果 生化试验参照链球菌生化鉴定手册,生化试验结果见表6。由表6可知,分离菌的V-P、精氨酸、PMG、蕈糖、蔗糖和CAMP试验结果均为阳性,PYR、GPP、七叶灵、MAG、TMZ、山梨醇及触酶试验均为阴性。分离菌的试验结果结合链球菌生化鉴定手册与无乳链球菌的生化反应一致。

表6 无乳链球菌生化鉴定

试验	阳性	阴性	需添加的试剂	结果
PYR	红色	黄色	添加 PYR 试剂	-
V-P	红色	无色	添加 V-P 试剂甲液 2 滴 乙液 1 滴	+
精氨酸	紫色	黄色	需添加无菌液体石蜡覆盖	+
GPP	黄色	无色	无需添加试剂	-
PMG	黄色	红色	无需添加试剂	+
七叶灵	黑色	不变色	无需添加试剂	-
MAG	黄色	红色	无需添加试剂	-
TMZ	黄色	红色	无需添加试剂	-
蕈糖	黄色	红色	无需添加试剂	+
蔗糖	黄色	红色	无需添加试剂	+
山梨醇	黄色	红色	无需添加试剂	-
溶血	乙型溶血	非乙型	无需添加试剂	+

2.1.3 CAMP 试验结果 CAMP 反应结果见图2。

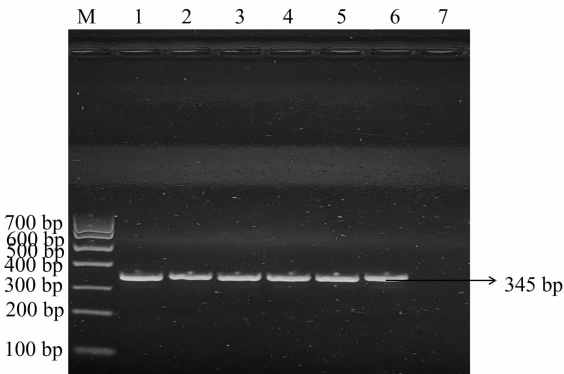


J—溶血性金黄色葡萄球菌; W—无乳链球菌标准株;
⊗—无乳链球菌新疆分离株

图2 CAMP 试验结果

2.2 分离菌株的 PCR 鉴定结果和系统发育进化树构建结果

对 147 份样品纯化后的链球菌属菌液进行 PCR 鉴定。由电泳结果(图3)可知,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,产物大小与预期大小一致,其中,6 株经无乳链球菌特异性引物 PCR 扩增后,在 345 bp 处出现特异性扩增条带,但未分离出乳房链球菌。147 份乳样病原菌分离率见表7,将 PCR 产物送至睿博兴科生物技术有限公司测序,并在 NCBI 上对序列进行在线比对,6 株分离菌与无乳链球菌的相似度均在 97% 以上,由此可确定其中 6 株菌为无乳链球菌。



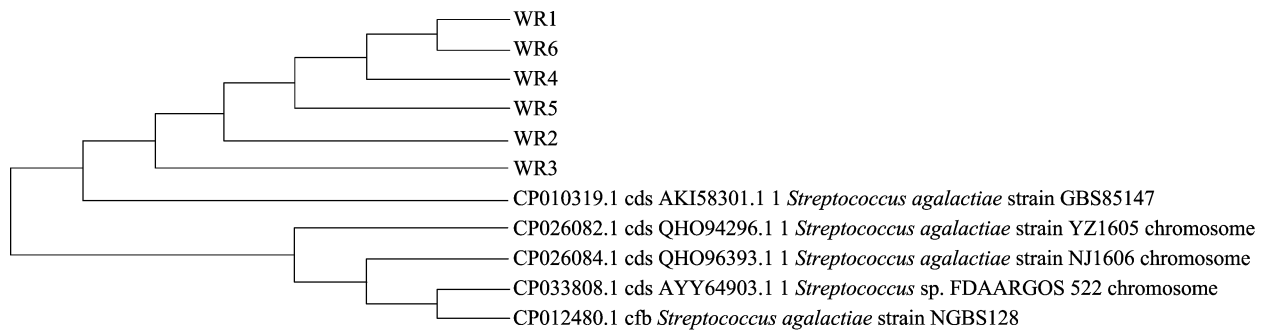
Marker 为 DL700 marker; M—Marker; 1~6—无乳链球菌 PCR 鉴定; 7—阴性对照

图3 6 株无乳链球菌 PCR 结果

表7 147 份乳样细菌分离鉴定

病原菌	PCR 鉴定结果	所占比率 (%)
无乳链球菌	6	4.1
乳房链球菌	0	0.0

试验分离菌扩增的片段经测序后分别与不同的 5 种基因片段比对,由图4、图5 可知,6 株无乳链



WR1~WR6 为分离菌
图4 6 株无乳链球菌序列进化树构建结果

Percent Identity											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		99.3	99.6	99.5	99.6	97.6	97.4	98.2	98.8	99.1	97.7
2	0.7		99.7	99.6	99.2	98.2	98.0	98.8	99.4	99.7	98.3
3	0.4	0.3		99.9	99.2	98.2	98.0	98.8	99.4	99.7	98.3
4	0.5	0.4	0.1		99.1	98.2	98.0	98.8	99.7	99.4	98.6
5	0.4	0.8	0.8	0.9		97.3	97.1	97.9	98.6	98.8	97.4
6	2.4	1.8	1.8	1.8	2.7		99.7	99.1	98.5	98.8	99.7
7	2.6	2.0	2.0	2.0	2.9	0.3		99.4	98.6	98.5	99.1
8	1.8	1.2	1.2	1.2	2.1	0.9	0.6		99.1	98.8	98.5
9	1.2	0.6	0.6	0.3	1.5	1.5	1.5	0.9		99.7	98.3
10	0.9	0.3	0.3	0.6	1.2	1.2	1.5	1.2	0.3		98.2
11	2.3	1.8	1.8	1.5	2.6	0.3	0.9	1.5	1.7	1.8	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

WR1~WR6 为分离菌
图5 6 株无乳链球菌序列同源性比对结果

球菌（WR1 - 6）的测序片段与 GenBank 编号 CP033808. 1、CP012480. 1、CP026084. 1、CP010319. 1、CP026082. 1 的无乳链球菌基因组的片段同源性较高。

2.3 分离菌药敏试验结果

由表 8 可知,分离得到的无乳链球菌主要对万

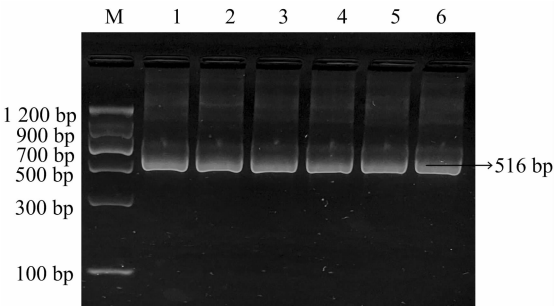
表 8 无乳链球菌对常见抗生素的药敏试验结果

抗生素名称	药物敏感程度(%)		
	敏感(S)	中敏(I)	耐药(R)
青霉素	0/6(0.0%)	2/6(33.3%)	4/6(66.6%)
链霉素	0/6(0.0%)	0/6(0.0%)	6/6(100.0%)
卡那霉素	0/6(0.0%)	6/6(100.0%)	0/6(0.0%)
万古霉素	6/6(100.0%)	0/6(0.0%)	0/6(0.0%)
恩诺沙星	6/6(100.0%)	0/6(0.0%)	0/6(0.0%)
诺氟沙星	3/6(50.0%)	3/6(50.0%)	0/6(0.0%)
环丙沙星	4/6(66.6%)	2/6(33.3%)	0/6(0.0%)
头孢氨苄	0/6(0.0%)	3/6(50.0%)	3/6(50.0%)
氨苄西林	0/6(0.0%)	2/6(33.3%)	4/6(66.6%)
克林霉素	4/6(66.6%)	1/6(16.6%)	1/6(16.6%)
四环素	1/6(16.6%)	4/6(66.6%)	1/6(16.6%)
庆大霉素	0/6(0.0%)	4/6(66.6%)	2/6(33.3%)
阿莫西林	0/6(0.0%)	0/6(0.0%)	6/6(100.0%)
头孢噻肟	6/6(100.0%)	0/6(0.0%)	0/6(0.0%)
新霉素	6/6(100.0%)	0/6(0.0%)	0/6(0.0%)

古霉素、恩诺沙星、头孢噻肟、新霉素高度敏感,对其他药物表现中度敏感或耐药。

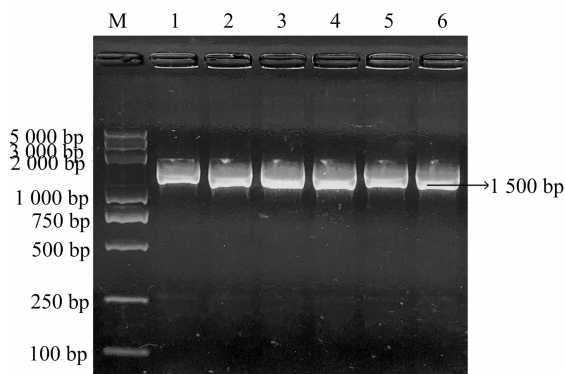
2.4 分离菌耐药基因检测

对分离的 6 株无乳链球菌分别进行氨基糖苷类耐药基因 *aphA* 和 *aad-6*,四环素类耐药基因 *tetO*、*tetL*,青霉素类耐药基因突变 *pbp2b*,大环内酯类耐药基因 *erm(A/T)*、*ermB*, β -内酰胺类耐药基因 *TEM* 共 8 种耐药基因进行 PCR 检测,并对其进行测序比对。由图 6 至图 9 可知,从分离株中检测到四环素类耐药基因 *tetL*、青霉素类耐药基因突变 *pbp2b*、大环内酯类耐药基因 *ermB* β -内酰胺类耐药基因 *TEM*,检出率为 100%,其余耐药基因均未检出。



Marker 为 DNA Marker II；M—Marker；1~6—无乳链球菌 *tetL* 耐药基因 PCR 鉴定

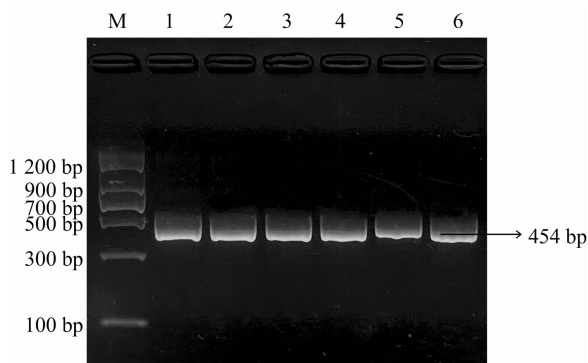
图6 6 株无乳链球菌 *tetL* 耐药基因 PCR 结果



Marker 为 Trans 2K plus DNA Marker; M—Marker;

1~6—无乳链球菌 *pbp2b* 耐药基因 PCR 鉴定

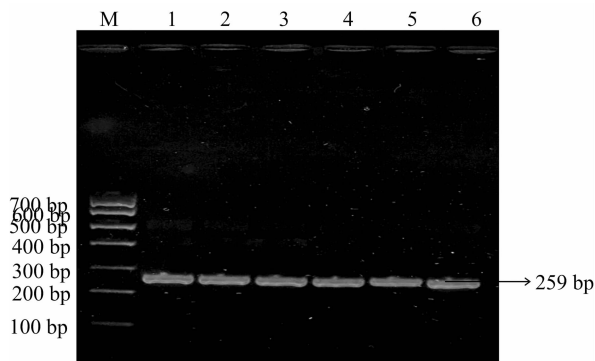
图7 6株无乳链球菌 *pbp2b* 耐药基因 PCR 结果



Marker为DNA Marker II; M—Marker;

1~6—无乳链球菌 *ermB* 耐药基因 PCR 鉴定

图8 6株无乳链球菌 *ermB* 耐药基因 PCR 结果



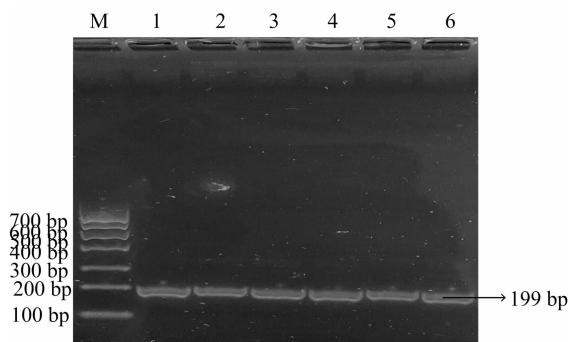
Marker 为 Trans DNA Marker I; M—Marker;

1~6—无乳链球菌 *TEM* 耐药基因 PCR 鉴定

图9 6株无乳链球菌 *TEM* 耐药基因 PCR 结果

2.5 分离菌毒力基因检测

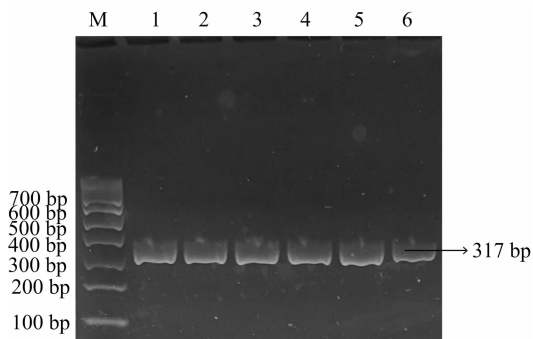
由图 10 至图 14 可知,对分离的 6 株无乳链球菌进行 9 种毒力基因 *scpB* (cps 编码的 C5a 肽酶)、*hlyB* (透明质酸)、*bac* (β -C 蛋白基因)、*bca* (α -C 蛋白基因)、*cfb* (CAMP 因子)、*cylE* (β -溶血素)、*fbsA* (纤维蛋白原结合蛋白)、*lmb* (黏连蛋白 lmb 蛋白)、*Sip* (侵袭蛋白) PCR 检测,并对其进行测序比对。其中 *cfb*、*cylE*、*fbsA*、*hlyB* 和 *Sip* 基因检出率达 100%,其余毒力基因均未检出。



Marker 为 Trans DNA Marker I; M—Marker;

1~6—无乳链球菌 *hlyB* 毒力基因 PCR 鉴定

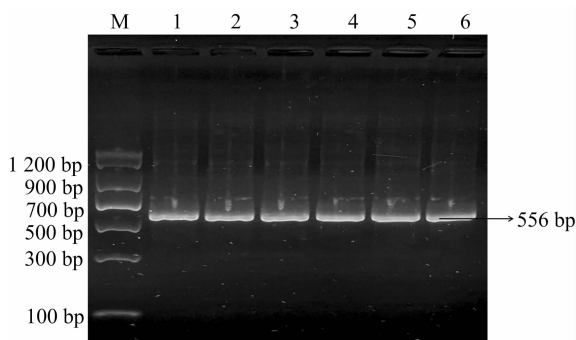
图10 6株无乳链球菌 *hlyB* 毒力基因 PCR 结果



Marker 为 Trans DNA Marker I; M—Marker;

1~6—无乳链球菌 *cfb* 毒力基因 PCR 鉴定

图11 6株无乳链球菌 *cfb* 毒力基因 PCR 结果



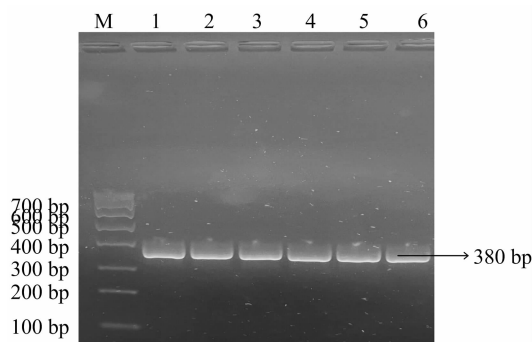
Marker 为 DNA Marker II; M—Marker;

1~6—无乳链球菌 *fbsA* 毒力基因 PCR 鉴定

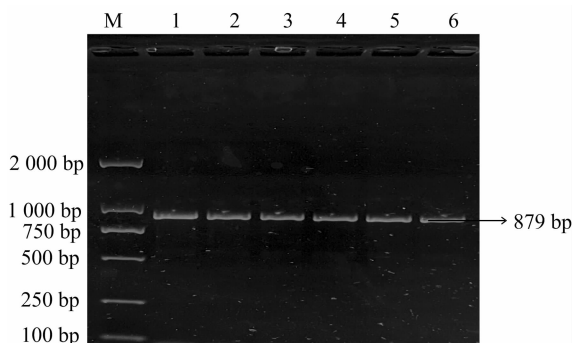
图12 6株无乳链球菌 *fbsA* 毒力基因 PCR 结果

3 讨论与结论

无乳链球菌作为乳房炎主要病原之一,是一种传染性很强的乳腺炎病原体。它往往定殖于受感染奶牛的乳房组织、乳头和生殖道中,一般是由于挤奶工的手或挤奶机中的吸奶杯消毒不够彻底或消毒剂杀菌率较低而导致接触性传播的。李宏胜等对我国 6 个城市的乳房炎奶样进行细菌学调查发现,无乳链球菌总分离率为 15.56%^[15]。刘琪等对内蒙古部分地区奶牛乳房炎奶样的分离结果表明,



Marker 为 Trans DNA Marker I; M—Marker;
1~6—无乳链球菌 *cyIE* 毒力基因 PCR 鉴定
图13 6 株无乳链球菌 *cyIE* 毒力基因 PCR 结果



Marker 为 Trans 2000 DNA Marker; M—Marker;
1~6—无乳链球菌 *Sip* 毒力基因 PCR 鉴定
图14 6 株无乳链球菌 *Sip* 毒力基因 PCR 结果

无乳链球菌的感染率为 4.24%^[16]。杜琳等对华北地区奶牛场隐性乳房炎病牛乳样进行细菌学调查发现,无乳链球菌的分离率为 5.03%^[1]。王蒯等对新疆 4 个地区牛场的乳房炎奶样检测结果表明,无乳链球菌的感染率为 17.27%^[17],尹欣悦等对新疆某牛场的乳房炎奶样检测结果表明,无乳链球菌的分离率为 3.33%^[18]。因无乳链球菌感染引起的具有高度传染性的乳房炎病例广泛存在于我国各地区,故对无乳链球菌的耐药表型及毒力因子的研究具有重大意义。本研究从临床型乳房炎牛和隐性乳房炎牛中,共计采集 147 份的乳样中共分离到 6 株无乳链球菌,分离率为 4.1%。低于李宏胜等在不同地区检测的无乳链球菌的分离率^[15],同样也低于王蒯等在新疆地区的分离率^[17],但与刘琪等、杜琳等、尹欣悦等对内蒙古部分地区、华北地区、新疆某牛场中无乳链球菌的分离率^[16,1,18]近似。引起奶牛乳房炎主要病原菌的分离率之所以存在一定差异,可能与不同地域环境、不同季节、不同饲养管理方式、采用不同抗菌药物的治疗有关。

现阶段,虽已具有针对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌等病原菌引起的奶牛乳房炎的一

系列相关疫苗应用于奶牛乳房炎的防控中,但是抗生素治疗仍是首选的治疗方法。Zigo 等的研究结果显示,3 株无乳链球菌对苯唑西林、链霉素的耐药率分别为 8.7% 和 30.4%,对青霉素和头孢噻吩高度敏感^[19],本研究结果与之有一定差异,表明新疆部分地区的规模化奶牛场在临床上治疗奶牛乳房炎使用抗生素时,应优先选择万古霉素、头孢噻吩、新霉素及喹诺酮类药物。张保海等的研究结果显示,对青霉素耐药的 105 株无乳链球菌中, β -内酰胺类的 *TEM* 耐药基因的检出率为 98%^[10]。杨明伟等研究结果显示,4 种氨基糖苷类耐药基因 *aph(3')* *Ia*、*aac(3')* *Ib*、*aac(6')* *Ib* 和 *ant(3')* *I* 的检出率分别为 0.0%、0.0%、31.3% 和 75.0%^[20],本研究结果与之基本一致。

结合耐药表型和耐药基因分析,新疆部分地区的规模化奶牛场中分离出的无乳链球菌对 β -内酰胺类药物具有较高的耐药性,但对喹诺酮类药物及头孢类、糖肽类、氨基糖苷类药物敏感,这与尹欣悦等研究的无乳链球菌的耐药表型^[18]基本一致,在今后的治疗中可优先选择喹诺酮类药物并且配合头孢类和氨基糖苷类药物交替使用。

无乳链球菌为常见的条件性致病菌,对人、牛及水生动物均表现易感,对无乳链球菌致病力起促进作用的包括多种表面蛋白和内毒素,这些致病因子使无乳链球菌具有很强的吸附力、抗吞噬及免疫逃避能力^[21]。祝宇等对云南地区牛源无乳链球菌 *cfb* 和 *CAMP* 这 2 种毒力基因的检出率分别为 100.0% 和 8.8%,其中, *cfb* 的检出率^[9]与本试验一致。Carvalho - Castro 等对巴西奶牛源无乳链球菌 *cfb* 的检出率为 100.0%, *bac* 检出率为 0.0%^[22],本试验结果与之一致,但 *fbsA* 检出率(42.37%)低于本研究的 100%。张阳等对河南牛无乳链球菌 *hylB* 的检出率为 20.65%,低于本研究的 100.00%, *ScpB* 和 *bca* 的检出率分别为 48.39%、56.77%,均高于本研究结果(0.00%),但 *bac* 的检出率为 0.00%^[8],本研究结果与之一致。高菊梅等对宁夏地区牛源无乳链球菌 *Sip* 的检出率为 31.8%^[7],低于本研究的 100%。张保海等对四川部分地区奶牛源无乳链球菌 *cyIE* 的检出率为 100%^[10],本试验结果与之一致。Lmb 蛋白不仅是调节细菌体内金属稳态的关键,而且能识别黏连蛋白从而发挥黏附作用,但这类蛋白仅存在于人源无乳链球菌,在牛源菌上基本不存在^[23]。这些毒力因子为病原体侵入宿主提供

了必要的帮助,也可能直接参与宿主感染的过程。

本研究从新疆部分地区规模化奶牛场因无乳链球菌感染所引起的奶牛乳房炎的奶牛中分离出 6 株无乳链球菌携带 *cfb*、*cylE*、*fbsA*、*hylB*、*Sip* 毒力基因和介导 β -内酰胺类药物耐药的 *TEM* 基因、四环素类药物耐药的 *tetL* 基因、青霉素类药物耐药的 *pbp2b* 基因、大环内酯类药物耐药的 *ermB* 基因,且对喹诺酮类药物和氨基糖苷类、头孢类、糖肽类药物敏感,对 β -内酰胺类的多种药物表现高度耐药。

参考文献:

- [1] 杜琳,周雪,赵红梅,等. 华北地区牛源无乳链球菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 微生物学通报,2016,43(3):567-574.
- [2] 闫常平,张序,关萍,等. 奶牛乳房炎的防治进展[J]. 中国奶牛,2004(3):47-48.
- [3] 王爱媛,郑立新,蒲文渊,等. 海南无乳链球菌的毒力基因与耐药特性分析[J]. 水产科学,2020,39(1):117-123.
- [4] 宋亚攀,杨利国. 中国奶牛乳房炎防治研究进展[J]. 中国奶牛,2010(12):48-54.
- [5] 范雪,邵伟,赵艳坤,等. 无乳链球菌毒力基因与耐药性的相关性研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2021,48(1):375-384.
- [6] 王丹. 奶牛乳房炎主要病原菌多重 PCR 诊断方法的建立与应用[D]. 北京:中国农业科学院,2018.
- [7] 高菊梅. 宁夏地区牛源无乳链球菌主要毒力基因和耐药基因的检测与序列分析[D]. 银川:宁夏大学,2015.
- [8] 张阳,胡云,李搏珍,等. 河南牛无乳链球菌耐药性分析和毒力基因检测[J/OL]. 中国动物传染病学报. (2021-08-18) [2021-11-26]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=ZSJB20210817006&uniplatform=NZKPT&v=ozQHRCMdoKobbNXe5jBUBkDGPg6MGtVMetxbJNFND6UELJ9F5KQu0h8fDN4-9nJA>.
- [9] 祝宇,路璐,颜兴琼,等. 云南地区牛源无乳链球菌分离鉴定及毒力基因和耐药性的检测[J]. 中国畜牧兽医,2018,45(11):3261-3270.
- [10] 张保海,罗梓丹,芦彪,等. 四川部分地区奶牛源无乳链球菌的分离鉴定、毒力基因检测及耐药性分析[J]. 西北农业学报,2020,29(3):327-333.
- [11] Bidet P, Brahimi N, Chalas C, et al. Molecular characterization of serotype III group B - Streptococcus isolates causing neonatal meningitis[J]. The Journal of Infectious Diseases,2003,188(8):

1132-1137.

- [12] Manning S D, Ki M, Marrs C F, et al. The frequency of genes encoding three putative group B streptococcal virulence factors among invasive and colonizing isolates [J]. BMC Infectious Diseases,2006,6:116.
- [13] Ding Y X, Zhao J L, He X L, et al. Antimicrobial resistance and virulence-related genes of Streptococcus obtained from dairy cows with mastitis in Inner Mongolia, China[J]. Pharmaceutical Biology, 2016,54(1):162-167.
- [14] Godoy D T, Carvalho - Castro G A, Leal C A G, et al. Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic Streptococcus agalactiae [J]. Letters in Applied Microbiology, 2013,57(6):476-483.
- [15] 李宏胜,郁杰,罗金印,等. 我国部分地区个体奶牛场乳房炎细菌学调查[J]. 中兽医医药杂志,2002,21(6):14-17.
- [16] 刘琪,王秋东,崔彪,等. 内蒙古部分地区致奶牛乳房炎链球菌的流行病学及生物学特性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2017,39(11):875-879.
- [17] 王萌,杨学云,李建军,等. 奶牛乳房炎无乳链球菌的分离鉴定与特异、快速检测方法[J]. 新疆农业科学,2014,51(7):1328-1334.
- [18] 尹欣悦,吴鹏,马忠臣,等. 一株无乳链球菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2020(22):99-101,168.
- [19] Zigo F, Vasil' M, Elečkov J, et al. Mastitis pathogens isolated from samples of milk in dairy cows and their resistance against antimicrobial agents[J]. Journal of Food Science and Engineering, 2017,7(2):110-113.
- [20] 杨明伟,韦慕兰,罗福广,等. 罗非鱼源无乳链球菌对氨基糖苷类耐药性及耐药基因检测[J]. 西南农业学报,2018,31(11):2438-2444.
- [21] Tevdorashvili G, Tevdorashvili D, Andghuladze M, et al. Prevention and treatment strategy in pregnant women with group B streptococcal infection[J]. Georgian Medical News,2015(241):15-23.
- [22] Carvalho - Castro G A, Silva J R, Paiva L V, et al. Molecular epidemiology of Streptococcus agalactiae isolated from mastitis in Brazilian dairy herds[J]. Brazilian Journal of Microbiology,2017, 48(3):551-559.
- [23] Sridharan U, Ragunathan P, Spellerberg B, et al. Molecular dynamics simulation of metal free structure of Lmb, a laminin-binding adhesin of Streptococcus agalactiae; metal removal and its structural implications [J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics,2019,37(3):714-725.