

江苏某奶牛场奶牛乳房炎病原细菌的分离鉴定及药敏特性分析

高太春

西南民族大学

DOI:10.32629/as.v9i3.3836

[摘要] 为明确江苏某奶牛场奶牛乳房炎的致病病原菌种类及其药物敏感性,为临床合理用药提供科学依据,本研究采集该奶牛场患病奶牛乳汁样本,通过细菌分离纯化、菌落形态观察、革兰氏染色镜检、PCR扩增鉴定及药敏试验等方法进行系统研究。结果显示,从奶样中分离获得一株优势菌株,该菌株在TSA琼脂培养基上形成直径0.5~1.0 mm、圆形凸起、表面光滑、边缘整齐、呈金黄色或灰白色的不透明菌落;革兰氏染色呈紫色,为革兰氏阳性菌,菌体呈小球形,以葡萄串状、短链状排列或单个存在;PCR扩增获得1492 bp的16S rRNA基因片段,经NCBI数据库BLAST比对,该菌株与葡萄球菌同源性达100%,鉴定为葡萄球菌。药敏试验结果表明,该分离菌株对头孢拉定、头孢氨苄、氟苯尼考、青霉素、头孢噻肟表现为高度敏感;对万古霉素、甲氧氨苄表现为中度敏感;对林可霉素表现为耐药。本研究明确了该奶牛场本次奶牛乳房炎的致病菌为葡萄球菌,且筛选出了有效敏感的抗菌药物,为该场奶牛乳房炎的临床精准用药提供了依据。

[关键词] 奶牛乳房炎;葡萄球菌;分离鉴定;药敏试验;耐药性

中图分类号: TU264+.1 文献标识码: A

Isolation, Identification, and Drug Sensitivity Analysis of Pathogenic Bacteria from Bovine Mastitis in a Dairy Farm in Jiangsu Province

Taichun Gao

Southwest Minzu University

[Abstract] To identify the pathogenic bacteria responsible for bovine mastitis in a dairy farm in Jiangsu Province and analyze their drug sensitivity, thereby providing a scientific basis for rational clinical treatment, this study collected milk samples from infected cows. Pathogen identification was performed through bacterial isolation and purification, colony morphology observation, Gram staining, and PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene. Results showed that a dominant strain was isolated and identified as Staphylococcus. The antimicrobial susceptibility test indicated that the isolate was highly sensitive to cefradine, cefalexin, ampicillin, florfenicol, cefotaxime, and penicillin; intermediately sensitive to vancomycin and trimethoprim; and resistant to lincomycin. This study confirms that the pathogen causing this mastitis case was Staphylococcus, and effective antimicrobial agents were screened, providing a basis for precise clinical treatment.

[Key words] Bovine mastitis; Staphylococcus; Isolation and identification; Drug susceptibility test; Antimicrobial resistance

引言

奶牛乳房炎是由多种病原微生物感染引起的乳腺组织炎症性疾病,是奶牛养殖业中发病率最高、危害最严重的常见疾病之一。该病不仅会导致奶牛产奶量显著下降、牛奶品质恶化,还会引起奶牛发情紊乱、配种率降低,严重时可导致奶牛失去泌乳功能甚至淘汰,给奶牛养殖业和乳品加工业造成巨大的经济损失^[1]。同时,患病奶牛乳汁中可能残留的病原微生物和抗菌药物,也对公共卫生安全构成潜在威胁^[2]。

奶牛乳房炎根据临床症状可分为临床型和隐性型,其中通常具有明显的炎症症状,如乳房红肿、疼痛和乳汁变性,可能出现凝乳块或絮状物,泌乳减少或停止^[3]。隐性乳房炎因症状不明显、不易被察觉,其发病率远高于临床型乳房炎,且成为该病传播的重要传染源^[4]。研究表明,95%以上的奶牛乳房炎由细菌感染引起,常见致病菌包括金黄色葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌等,但不同地区、不同奶牛场的致病菌种类和优势菌群存在显著差异^[5]。例如,近期对甘肃、宁夏部分地区的研究表明,其主要病

原菌为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和肠球菌,这种地域性差异凸显了针对特定牧场进行病原学调查的必要性。随着抗菌药物在奶牛养殖业中的广泛应用,细菌耐药性问题日益突出,导致部分传统抗菌药物治疗效果下降,甚至失效,给奶牛乳房炎的防控带来了严峻挑战。

1 材料与方法

1.1 病料来源

病料取自江苏某奶牛场确诊为乳房炎的患病奶牛乳汁,共采集3份样本,采集1.2主要仪器与试剂。

1.1.1 仪器设备

PCR扩增仪(BYQ60781709-1958,杭州博日科技有限公司)、超净工作台(SW-CJ-2FD,苏州安泰空气科技有限公司)、热恒温培养箱(DHP-9162,上海齐欣科学仪器有限公司)、光学显微镜(10X-100X,ALC-210.2,北京赛多利斯仪器系统有限公司)、电冰箱(2-4℃、-20℃、-80℃,海尔集团)、电子天平(0.1g,ACCULAB ALC-210-2,北京赛多利斯仪器系统有限公司)、高压蒸汽灭菌锅(致微仪器有限公司)、离心机(Eppendorf 5418R,德国艾本德公司)、凝胶成像系统(Tanon-1600,上海天能科技有限公司)。

1.1.2 试剂

DL2000 DNA Marker、2×Taq Master Mix(南京诺唯赞生物技术有限公司);大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA)、LB琼脂培养基(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司、广东环凯微生物科技有限公司);抗菌药物药敏纸片(头孢拉定、林可霉素、万古霉素、头孢氨苄、氨苄西林、氟苯尼考、头孢噻肟、青霉素、甲氧氨苄,杭州微生物试剂有限公司);TIANamp Bacteria DNA Kit(天根生化科技有限公司);革兰氏染色液(北京索莱宝科技有限公司);无水乙醇、香柏油等常规化学试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌分离纯化

在超净工作台内,无菌操作吸取3 mL乳汁样本,均匀涂布于TSA琼脂培养基表面,置于37℃恒温培养箱中培养8-12 h。挑取培养基上形态各异的单个菌落,采用划线分离法接种于新的TSA琼脂培养基上,37℃培养8-12 h,重复划线纯化3次,获得纯种细菌。将纯化后的菌株接种于TSA斜面培养基,37℃培养12 h后,4℃冷藏保存备用。

1.2.2 菌落形态观察

观察纯化菌株在TSA琼脂培养基上的菌落形态、大小、颜色、透明度、边缘特征、隆起度等特征,并进行记录。

1.2.3 革兰氏染色镜检

将纯化后的菌株涂片,按照革兰氏染色常规方法进行染色:涂片干燥后滴加结晶紫染液染色1 min,水洗;滴加革兰氏碘液媒染1 min,水洗;95%乙醇脱色30 s,水洗;番红染液复染1 min,水洗干燥后,滴加香柏油,在光学显微镜100倍油镜下观察细菌的染色特性、形态及排列方式。

1.2.4 细菌DNA提取

采用TIANamp Bacteria DNA Kit提取细菌基因组DNA,具体

操作按照试剂盒说明书进行。提取的DNA溶液经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,-20℃保存备用。

1.2.5 PCR扩增与测序鉴定

采用细菌16S rRNA通用引物进行PCR扩增,引物序列如下:上游引物27F(5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'),下游引物1492R(5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'),目的片段大小约1492 bp,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

PCR反应体系(25 μL):2×Taq Master Mix 12.5 μL,上游引物(10 μmol/L)1 μL,下游引物(10 μmol/L)1 μL,DNA模板2 μL,ddH₂O 8.5 μL。

PCR反应条件:94℃预变性2 min;94℃变性30 s,53℃退火30 s,68℃延伸1 min,共36个循环;72℃终延伸8 min;4℃保存。

PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的条带清晰的产物送成都擎科生物科技有限公司测序。测序结果通过NCBI数据库中的BLAST工具与已知序列进行同源性比对分析,确定菌株的分类地位。

2 结果与分析

2.1 细菌分离培养与菌落形态特征

从患病奶牛乳汁样本中分离获得一株优势纯种细菌,该菌株在TSA琼脂培养基上生长良好,菌落呈圆形凸起,表面光滑有光泽,边缘整齐,颜色为金黄色或灰白色,不透明,直径0.5~1.0 mm,部分菌落呈串状或成对分布(图1)。



图1 分离菌株在TSA培养基上的菌落形态
2.2 革兰氏染色镜检结果

光学显微镜100倍油镜下观察,该分离菌株经革兰氏染色后呈紫色,判定为革兰氏阳性菌;菌体呈小球形,主要以典型的葡萄串状排列为主,部分呈短链状排列或单个存在(图2)。

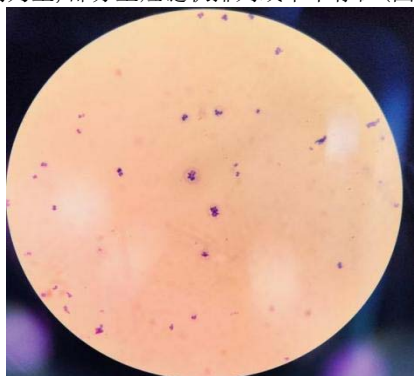


图2 分离菌株的革兰氏染色镜检结果(10×100)

2.3 PCR扩增与测序鉴定结果

PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,在1000~2000 bp之间出现一条清晰的特异性条带,与预期目的片段大小(1492 bp)一致(图3)。将测序结果进行NCBI BLAST同源性比对,发现该分离菌株的16S rRNA基因序列与GenBank中葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.)的同源性高达100%,结合菌落形态和革兰氏染色特征,确定该分离菌株为葡萄球菌。

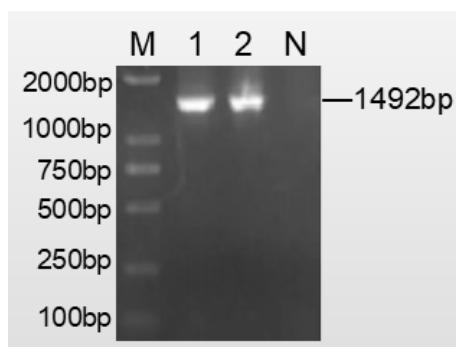


图3 PCR扩增产物凝胶电泳图

注: M: DL2000 DNA Marker; 1-2: PCR扩增产物; 2: 阴性对照

2.4 药敏试验结果

药敏试验结果显示,该葡萄球菌菌株对不同抗菌药物的敏感性存在显著差异(表1)。其中,头孢拉定、头孢氨苄、氟苯尼考、青霉素、头孢噻肟的抑菌圈直径均大于20 mm,表现为高度敏感;万古霉素、甲氧氨苄的抑菌圈直径分别为17 mm和16 mm,表现为中度敏感;林可霉素的抑菌圈直径仅为10 mm,表现为耐药。

表1 葡萄球菌对不同抗菌药物的药敏试验结果

抗菌药物	抑菌圈直径(mm)	药敏判定
头孢拉定	29.5±0.5	高度敏感(S)
头孢氨苄	28.3±0.7	高度敏感(S)
氟苯尼考	30.1±0.3	高度敏感(S)
青霉素	40.2±0.8	高度敏感(S)
头孢噻肟	29.8±0.4	高度敏感(S)
万古霉素	17.0±0.5	中度敏感(I)
甲氧氨苄	16.0±0.3	中度敏感(I)
林可霉素	10.0±0.2	耐药(R)

注: 数据以“平均值±标准差”表示, n=3

3 结论

本研究从江苏某奶牛场患病奶牛乳汁中分离鉴定出一株葡萄球菌。该菌株为引起该场奶牛乳房炎的致病菌。该分离菌株对头孢拉定、头孢氨苄、氟苯尼考、青霉素、头孢噻肟高度敏感,对万古霉素、甲氧氨苄中度敏感,对林可霉素耐药。结果表明,该场本次乳房炎由葡萄球菌引起,临床治疗可选用敏感的β-内酰胺类药物,但需警惕林可酰胺类药物的耐药性。本研究为该奶牛场奶牛乳房炎的精准防控和临床合理用药提供了参考依据。

[参考文献]

[1]Ashraf A,Imran M.Causes,types,etioloical agents,prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis[J]. Anim Health Res Rev,2020,21(1):36-49.

[2]Cressier B, Bissonnette N. Assessment of an extraction protocol to detect the major mastitis-causing pathogens in bovine milk[J].Journal of Dairy Science,2011,94(5):2171-2184.

[3]Pokorska J,Sawicki S,Gabrys J,et al.The use of stem cells in the treatment of mastitis in dairy cows[J].Sci Rep,2024,14(1):10349.

[4]Cobirka M,Tancin V,Slama P.Epidemiology and classification of mastitis[J].Animals,2020,10(12):2212.

[5]王淑娟.奶牛乳房炎的病因、症状及防治[J].畜牧兽医科技信息,2016,(12):47-48.

作者简介:

高太春(1999--),女,藏族,四川盐源人,硕士研究生,主要研究方向为动物病原微生物学。