

# 天津地区乳房炎奶样中金黄色葡萄球菌耐药性研究

田晓英<sup>1</sup>, 王军<sup>1</sup>, 于忠娜<sup>2</sup>, 甄天元<sup>1</sup>, 王世清<sup>1</sup>, 韩荣伟<sup>1</sup>

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109) (2. 青岛农业大学海都学院, 山东莱阳 265200)

**摘要:** 为了解天津地区奶牛乳房炎中金黄色葡萄球菌的致病情况以及对抗生素药物的敏感性, 为科学治疗奶牛乳房炎提供参考以及防控兽药残留提供依据, 采用甘露醇高盐培养基和冻干兔血浆对采自天津地区 7 个牛场 50 个样品进行分离鉴定, 采用纸片扩散法进行药敏试验。经分离鉴定确定分离 29 株金黄色葡萄球菌, 4 株其他致病性葡萄球菌。对分离出的金葡菌进行 8 类 29 种常用抗生素的耐药性分析。对金黄色葡萄球菌分离株进行 PCR 扩增耐药基因, 并通过琼脂糖凝胶电泳进行检测。结果表明, 29 株金葡菌分离株对 8 类 29 种常用抗生素均有不同程度耐药性。其中对大环内酯类、林可酰胺类药物耐药率普遍较高, 平均耐药率为 77.01% 和 89.66%, 对  $\beta$ -内酰胺类、喹诺酮类和氨基糖苷类药物耐药率均低于 50%。分离株对青霉素 G、乙酰螺旋霉素和林克霉素表现为完全耐药(100%), 对头孢唑酮、头孢噻肟、阿莫西林、氨苄西林、恩诺沙星、新霉素和大观霉素等耐药率在 20%~40% 之间。分离株的耐药基因检测结果表示, 耐药基因阳性检出率普遍小于耐药基因表型的检出率。

**关键词:** 奶牛乳房炎; 金黄色葡萄球菌; 表型耐药; 耐药基因

文章编号: 1673-9078(2017)10-208-216

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.10.030

## *Staphylococcus aureus* Drug Resistance of Dairy Cow Mastitis in Tianjin Region

TIAN Xiao-ying<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>, YU Zhong-na<sup>2</sup>, ZHEN Tian-yuan<sup>1</sup>, WANG Shi-qing<sup>1</sup>, HAN Rong-wei<sup>1</sup>

(1.College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

(2.Haidu College, Qingdao Agricultural University, Laiyang 265200, China)

**Abstract:** To understand the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* in dairy cow mastitis and the sensitivity to antibiotics in Tianjin area. Mannitol salt medium and high lyophilized rabbit plasma were used for isolation and identification of 50 samples that were collected from seven cattle farms in Tianjin to provide scientific references for treatment of dairy cow mastitis and prevention of veterinary drug residues, and the susceptibility tests were performed by disk diffusion method. 29 *Staphylococcus aureus* and 4 other pathogenic *Staphylococci* were isolated and identified. Drug resistance of isolated *Staphylococcus aureus* were analyzed with 8 categories of 29 species commonly used antibiotics. *Staphylococcus aureus* isolates were amplified by PCR of the drug resistance gene and detected by agarose gel electrophoresis. The result showed that 29 isolates of *Staphylococcus aureus* had different resistance to 8 categories of 29 species antibiotics. The drug resistance rates to macrolides and lincosamides were generally high, which were 77.01% and 89.66% in average, and the drug resistance rates to  $\beta$ -lactams, quinolones and aminoglycoside were all 50% below. The isolates had the complete resistance (100%) to penicillin G, Acetyl-Lo and lincomycin, and the 20%~40% resistance rates to cefoperazone, cefotaxime, amoxicillin, ampicillin, enrofloxacin, neomycin, spectinomycin. Analysis of the drug resistance gene showed that the positive rate of drug resistance gene was generally less than that of phenotypic rate of drug resistance gene.

**Key words:** dairy cow mastitis; *Staphylococcus aureus*; phenotypic resistance; drug resistance gene

收稿日期: 2017-05-03

基金项目: 农业部公益性农业行业科研专项 (201403071-5); 山东省自然科学基金青年基金项目 (2015ZR01095); 山东省重点研发计划 (2016GSF120010); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目 (BS2014NY011); 青岛农业大学高层次人才科研基金项目 (6631115043)

作者简介: 田晓英 (1993-), 女, 在读研究生, 主要从事食品质量与安全方面研究

通讯作者: 韩荣伟 (1981-), 男, 博士, 副教授, 主要从事食品质量与安全方面研究

牛乳是人类日常生活中必不可少的食物之一, 含有除膳食纤维以外人体应摄入的全部营养物质, 具有丰富的营养价值, 是其他食物无法比拟的<sup>[1]</sup>。乳与乳制品是微生物非常好的培养基, 同样也成为致病菌的温床, 这些细菌一旦进入牛乳和乳制品, 可引起食物中毒或传染疾病<sup>[2]</sup>。

奶牛乳房炎是由于微生物感染或经过理化刺激而引起的一种奶牛乳腺炎症, 会造成奶牛养殖业的极大经济损失<sup>[3]</sup>。数据统计, 荷兰地区 25% 的乳牛患有临

床型乳房炎<sup>[4]</sup>, 而我国的奶牛隐性乳房炎检出率更是高达 50%~70%, 远高于荷兰地区, 全国每年由奶牛乳房炎导致的损失达 100 多亿<sup>[5]</sup>。

迄今为止, 已有一百多种微生物被成功从奶牛乳房中分离, 包括多种细菌、真菌、病毒和支原体等, 其中金黄色葡萄球菌是奶牛乳房炎的重要病原菌之一<sup>[6]</sup>。金黄色葡萄球菌会对乳腺上皮细胞和腺泡的功能造成了永久性的损伤, 导致产奶量永久性的下降 10%~25%<sup>[7]</sup>。在 2009 年仅北京地区, 由金葡菌引起的各类乳房炎的发病率分别高达 37.8%和 33.3%<sup>[8]</sup>。而在上海地区奶牛乳房炎分离株中, 金黄色葡萄球菌占 69.16%<sup>[9]</sup>, 内蒙古、四川、甘肃和上海部分奶牛场金黄色葡萄球菌分离比例也比较高, 为 30.19%<sup>[10]</sup>。其他地区, 由金黄色葡萄球菌导致的乳房炎比例平均约 50%左右。

在我国, 目前治疗奶牛乳房炎的主要方法为抗生素治疗, 但多数人对于抗生素的使用没有系统的认识, 所以在使用方面存在很多误区。抗生素加大用量势必会给生物体带来损害, 而随意更换用药, 又会造成新药物的耐药性, 最终无药可医。基于利益的驱使, 抗生素在养殖业的使用状况愈发严重。由于抗生素的广泛使用, 很多细菌已经产生耐药性, 并由单药耐药发

展到多重耐药。据日本明治制药 1996 年统计数据可知<sup>[11]</sup>, 从动物体内分离得到的沙门氏菌, 对四环素的耐药比例分别为: 家禽 10%、猪 58%和牛 85%; 对链霉素的耐药比例分别为: 家禽 8.8%、猪 44%和牛 34%。可见抗生素的滥用形势严峻, 必须采取有效措施应对抗生素的滥用。

研究牛乳中金黄色葡萄球菌的耐药性, 对于乳房炎防治和牛乳质量的改善有着十分重要的积极作用。本试验通过对乳房炎奶样中金葡菌耐药性的研究, 确定其对多种类常用抗生素的耐药率, 从而可以科学指导用药, 减少兽药残留。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 材料

牛乳样品采自天津市宝坻区 5 个牧场以及天津市宁河区 2 个牧场共 50 个样品, 取样情况如表 1, 均为患乳腺炎奶牛。采样时, 用温水拭净乳房, 用 75%酒精对乳头消毒, 无菌标准操作挤奶, 弃去前两把奶, 收集样品于灭菌试管中 40~50 mL, 密封, 标明样品编号, 放置于冰盒中冷藏, 待验。

表 1 天津地区患乳房炎奶牛牛乳样品来源

Table 1 Milk samples of mastitis dairy cow from Tianjin area

牛场编号	A	B	C	D	E	F	G
样品编号	TJ01-05	TJ06-10	TJ11-15	TJ16-23	TJ24-33	TJ34-38	TJ39-50

#### 1.1.2 主要试剂

胰蛋白大豆肉汤培养基 (TSB)、甘露醇高盐琼脂培养基、MH 琼脂培养基和冻干兔血浆购自青岛高科园海博生物技术有限公司; 琼脂糖购自 Biowest 公司; Taq DNA polymerase、10×PCR Buffer(with MgCl<sub>2</sub>)、D2000 DNA Ladder、6×DNA Loading Buffer 和 Tris 购自 Solarbio 公司; dNTPs Mix、4s Red Pius 核酸染色剂购自 BBI Life Sciences; 特异性引物购自 Sangon Biotech; 乙二酸四乙酸二钠购自天津市永大化学试剂有限公司; 冰醋酸、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 和吐温 20 购自莱阳市康德化工有限公司; 0.5 麦氏比浊管。

PBST 配方: NaCl 2 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 g/L、KCl 0.2 g/L、吐温 200.5 mL/L, 使用前调 pH 值 7.4±0.2。

50×TAE 配方: Tris 242 g/L、乙二酸四乙酸二钠 37.2 g/L、冰醋酸 57.1 mL/L, pH 值 8.3±0.2。

#### 1.1.3 药敏片及判定标准

此试验针对奶牛乳房炎常用的 8 类 29 种抗生素进行测试, 均购自杭州滨河微生物试剂有限公司。

#### 1.1.4 氨基酸引物

根据 GeneBank 已公布的乳房炎致病菌的基因组序列, 参考国内外文献<sup>[12-16]</sup>, 设计 7 类抗生素耐药基因引物, 见表 3。

#### 1.1.5 主要仪器

SW-CJ-1F (标准型) 单人双面垂直净化工作台 (苏州智净净化设备有限公司); TGL-16M 台式高速冷冻离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); BXM-30R 立式压力蒸汽灭菌器 (上海博讯事业有限公司医疗设备厂); FCD-211XZ 海尔电冰柜 (青岛海尔特种电器有限公司); DHP-9082 型电热恒温培养箱 (龙口市先科仪器公司); 电子万用调温炉 (龙口市先科仪器公司); QL-866 旋涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 电子分析天平 (奥豪斯仪器 (上海) 有限公司); MJ Mini 小型 PCR 仪 (Bio-Rad); 170-1100 小型多功能制胶器 (Tanon); HE-120 电泳仪 (Tanon); 凝胶成像系统 (Quantum Design)。培养皿、试管、锥形瓶、酒精灯、接种环、接种针、涂布器、移液枪和分装器等。

表 2 药敏试验判定标准

Table 2 Standards for the sensitivity of *Staphylococcus aureus* to antibacterial drugs

抗生素名称	抗生素类别	纸片含量/( $\mu\text{g}/\text{片}$ )	抑菌圈直径/mm		
			耐药 (R)	中介 (I)	敏感 (S)
青霉素 G	$\beta$ -内酰胺类	10	$\leq 28$	-	$\geq 29$
头孢唑酮	$\beta$ -内酰胺类	75	$\leq 15$	-	$\geq 21$
头孢噻肟	$\beta$ -内酰胺类	30	$\leq 14$	-	$\geq 23$
阿莫西林	$\beta$ -内酰胺类	10	$\leq 13$	-	$\geq 18$
氨苄西林	$\beta$ -内酰胺类	10	$\leq 13$	-	$\geq 17$
头孢西丁	$\beta$ -内酰胺类	30	$\leq 14$	-	$\geq 18$
头孢噻吩	$\beta$ -内酰胺类	30	$\leq 14$	-	$\geq 18$
苯唑西林	$\beta$ -内酰胺类	1	$\leq 10$	-	$\geq 13$
红霉素	大环内酯类	15	$\leq 15$	-	$\geq 19$
乙酰螺旋霉素	大环内酯类	30	$\leq 22$	-	$\geq 30$
阿奇霉素	大环内酯类	15	$\leq 13$	-	$\geq 18$
环丙沙星	喹诺酮类	5	$\leq 15$	-	$\geq 21$
诺氟沙星	喹诺酮类	10	$\leq 12$	-	$\geq 17$
左氧氟沙星	喹诺酮类	5	$\leq 13$	-	$\geq 17$
恩诺沙星	喹诺酮类	5	$\leq 15$	-	$\geq 19$
四环素	四环素类	30	$\leq 11$	-	$\geq 15$
强力霉素	四环素类	30	$\leq 12$	-	$\geq 16$
甲氧胺嘧啶	磺胺类	5	$\leq 10$	-	$\geq 16$
磺胺异恶唑	磺胺类	300	$\leq 23$	-	$\geq 33$
链霉素	氨基糖苷类	10	$\leq 11$	-	$\geq 15$
庆大霉素	氨基糖苷类	10	$\leq 12$	-	$\geq 15$
新霉素	氨基糖苷类	30	$\leq 12$	-	$\geq 17$
大观霉素	氨基糖苷类	100	$\leq 14$	-	$\geq 18$
妥布霉素	氨基糖苷类	10	$\leq 12$	-	$\geq 15$
丁胺卡纳	氨基糖苷类	30	$\leq 14$	-	$\geq 17$
卡那霉素	氨基糖苷类	30	$\leq 13$	-	$\geq 18$
林可霉素	林可酰胺类	2	$\leq 14$	-	$\geq 21$
克林霉素	林可酰胺类	2	$\leq 14$	-	$\geq 21$
氯霉素	氯霉素类	30	$\leq 12$	-	$\geq 18$

表 3 PCR 扩增各耐药基因的引物序列及扩增长度

Table 3 PCR amplification for primer sequence and amplification length of each resistance gene

耐抗生素种类	目的基因	基因序列(5'→3')	扩增长度/bp
氨基糖苷类	<i>muc</i>	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT	280
		R: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	
	<i>aadE</i>	F: AGTTAGATAATTACCTAAAGGGCG	564
		R: ATATCAGCGGCATATGTGCTATCC	
<i>spc</i>	F: ACCAAATCAAGCGATTA	561	
	R: GTCAGTGTGGCCACATTCG		
<i>ant(6)-Ia</i>	F: ACTGGCTTAATCAATTTGGG	577	
	R: GCCTTTCCGCCACCTCACCG		

转下页

接上页

	<i>ant(4)-Ia</i>	F: CTGCTAAATCGGTAGAAGC R: CAGACCAATCAACATGGCACC	420
	<i>dfiG</i>	F: TGCTGCGATGGATAAGAA R: TGGGCAAATACCTCATTCC	405
磺胺类	<i>dfiK</i>	F: CAAGAGATAAGGGGTTTCAGC R: ACAGATACTTCGTTCCACTC	229
	<i>dfiSI(dfA)</i>	F: CACTTGTAATGGCACGGAAA R: CGAATGTGTATGGTGGAAAG	573
	<i>mecA</i>	F: ACTGCTATCCACCCTCAAAC R: CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	163
β-内酰胺类	<i>mecC</i>	F: TAGTTGTAGTTGTCGGGTTTGG R: CCGTTCTCATATAGCTCATCATA	160
	<i>cfxA</i>	F: GCT CAA ACA GAT AGT TTT AT R: GAG CTC ACA ATG ATG TTG CC	312
	<i>blaZ</i>	F: ACGTCTAAAAGAAGACTAGGAGATAAAGTAACAA R: CGAAAGCAGCAGGTGTTGAA	173
	<i>ermA</i>	F: GTTCAAGAACAATCAATACA GAG R: GGATCAGGAAAAGGACATTT TAC	120
	<i>ermB</i>	F: CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC R: GAATCGAGAC TTGAGTGTGC	639
	<i>ermC</i>	F: GCTAATATTG TTAAATCGTCAATTCC R: GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	642
大环内酯类	<i>erm(T)</i>	F: ATTGGTTCAGGGAAAGGTCA R: GCTTGATAAAATTGGTTTTTGGGA	536
	<i>msrA</i>	F: GGCACAATAAGAGTGTTTAA AGG R: AAGTTATATC ATGAATAGAT TGTCCTGTT	940
	<i>msrB</i>	F: TATGATATCCATAATAATTATCCAATC R: AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT	595
	<i>lnuA</i>	F: GGTGGCTGGGGGTAGATGTATTAAGTGG R: GCTTCTTTTGAAATACATGGTATTTTTCGA	323
林可酰胺类	<i>lnuB</i>	F: CCTACCTATTGTTTGTGGAA R: ATAACGTTACTCTCCTATTTTC	450
	<i>tet(L)</i>	F: TCGTTAGCGTGTCTCATTCC R: GTATCCCACCAATGTAGCCG	267
四环素类	<i>tetM</i>	F: GTTAAATAGTGTCTTTGGAG R: CTAAGATATGGCTCTAACAA	158
	<i>tetK</i>	F: TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC R: GCAAACCTCATTCCAGAAGCA	360
氟霉素类	<i>cat::pC223</i>	F: AGGATATGAACTGTATCCTGCTTTG R: AATAATGAAACATGGTAACCATCAC	145

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 样品增菌

用灭菌的移液枪取 1 mL 采集的样品，接种于 20

mL 已灭菌的胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 试管中做增菌用，过程中移液枪应保持运动平稳，不漏液不碰壁。将接种结束的试管置于试管架上，于培养箱内 37 °C 培养 24 h，观察结果，重复 50 次，使全部样品完成增菌。

### 1.2.2 金黄色葡萄球菌的分离

执接种环于超净台中, 将上述接种菌液分区划线于灭菌的甘露醇高盐琼脂平板上, 置于培养箱内 37 °C 培养 24 h, 观察结果。挑取颜色呈黄色且其外围有一黄色的晕环的可疑单个菌落置于 20 mL 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 中, 震荡摇匀, 37 °C 培养 24 h, 待用。

### 1.2.3 金黄色葡萄球菌的鉴定

掀开并撕下冻干兔血浆西林瓶上的铝箔盖, 每支西林瓶中加入 0.8 mL 肉汤培养物, 轻微摇晃至完全溶解, 置 37 °C 培养箱培养, 每半小时观察一次, 持续 6 h, 如呈现凝固 (即倾斜或倒置时, 呈现凝块) 或凝固体积大于原体积的 1/2, 判定为血浆凝固酶阳性结果。致病性葡萄球菌能产生血浆凝固酶。

### 1.2.4 金黄色葡萄球菌的药敏试验

按美国临床试验标准委员会标准<sup>[12]</sup>, 采用纸片扩散方法进行药敏试验, 取血浆凝固酶阳性的肉汤培养物 2 mL, 用灭菌的移液枪向其中缓慢加入无菌水, 震荡摇匀, 稀释至 0.5 麦氏浊度, 用灭菌的无菌棉蘸取稀释液, 均匀涂布在灭菌的 MH 琼脂培养基上, 用无菌镊子取药敏片轻贴在平板上, 每个平板上贴 3 个不同药敏片, 呈正三角形, 37 °C 倒置培养 24 h, 观察现象, 以游标卡尺测量记录抑菌圈直径, 根据《抗菌药物敏感性试验执行标准》<sup>[13]</sup>将试验结果分成三个等级: 敏感 (S)、中介 (I) 和耐药 (R)。

### 1.2.5 DNA 模板提取

在无菌环境下, 取 1 mL 充分振荡摇匀的菌液于灭菌的离心管中。在 10000 r/min, 5 °C 的条件下用冷冻离心机离心 5 min, 弃去上清液。再加入 200  $\mu$ L 的 PBST 缓冲液, 摇匀。沸水浴 10 min, 立刻冰浴 5 min。继续在 10000 r/min, 5 °C 的条件下离心 5 min, 留上清液。上清液即为 DNA 模板, -80 °C 冷冻待用。

### 1.2.6 PCR 扩增

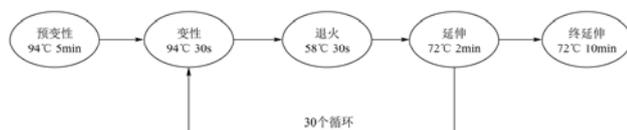


图 1 PCR 反应条件

Fig.1 Conditions of PCR reaction

PCR 试验用 25  $\mu$ L 体系: 2.5  $\mu$ L 的 10 $\times$ PCR Buffer (with MgCl<sub>2</sub>); 2.2  $\mu$ L 的 2.5 mmol/L dNTPs Mix; 人工合成的两个寡聚核苷酸引物各 1.0  $\mu$ L; 1.0  $\mu$ L 的 DNA 模板; 0.3  $\mu$ L 的 Taq DNA polymerase; 加双馏水至 25  $\mu$ L。充分混匀后在 PCR 仪中进行 PCR 扩增 (扩增条件见图 1), 扩增后产物-80 °C 冷冻待用。

### 1.2.7 琼脂糖凝胶电泳 (Agarose Gel

### Electrophoresis, AGE)

取 60 mL 1 $\times$ TAE, 加入 0.48 g 的琼脂糖, 配制成为 0.8% 的琼脂糖凝胶溶液。煮沸三次后将温至 60~70 °C, 加入 5% 的 4S Red Plus 核酸染色剂并混匀, 倒入制胶器中凝固。将配制好的凝胶置于电泳槽中, 倒入 1 $\times$ TAE 至没过胶面 2~3 mm。

取 6  $\mu$ L 的 PCR 扩增液与 2  $\mu$ L 的 1 $\times$ DNA Loading Buffer 混匀, 注入至凝胶电泳孔, 在最左侧电泳孔加入 6  $\mu$ L D2000 DNA Ladder 与 2  $\mu$ L 1 $\times$ DNA Loading Buffer 的混合液。电泳条件为 80 V, 130 mA 运行 50 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 金黄色葡萄球菌分离结果与分析

采 TJ001~TJ050 共 50 个试样, 以分区划线的方式进行金黄色葡萄球菌分离试验, 由于甘露醇高盐培养基中, D-甘露醇为可发酵糖, 在金黄色葡萄球菌作用下, 会被发酵, 改变 pH 值, 在酚红做指示剂的条件下, 失去培养基原有红色, 呈现金黄色葡萄球菌菌落的黄色。试验采用 ATCC6538 金黄色葡萄球菌标准菌株为对照, 进行平行试验, 以保证试验的准确性。挑取单个菌落增菌后, 进行血浆凝固酶试验。自天津地区采集 50 个样品中分离疑似单个菌落共 39 株, 包括 TJ01~04、TJ07~08、TJ10~15、TJ20、TJ22~23、TJ25~30 和 TJ33~50。

### 2.2 金黄色葡萄球菌血浆凝固酶鉴定结果与分析

分离出 39 株单一菌落后, 用营养肉汤进行增菌, 进行血浆凝固酶试验, 除 TJ023、TJ026、TJ027、TJ028、TJ030 和 TJ049 分离培养时菌落颜色为白色的 6 个样品呈血浆凝固酶阴性, 其余均为血浆凝固酶阳性, 其中菌落颜色呈金黄色的 29 株判定为金黄色葡萄球菌, 菌落颜色为白色的 4 株 (TJ01、TJ07、TJ25 和 TJ33) 判定为其他致病性葡萄球菌。结合不同牛场采样情况可知, 七个牛场由金葡菌导致牛乳腺炎的比例分别为 80%、60% 和 100%、25%、30%、100% 和 91.67%, 由此可知, 天津地区金葡菌性乳房炎平均比例达到 58%。

### 2.3 药敏试验结果与分析

#### 2.3.1 药敏试验结果

使用牛场常用的 8 类 29 种抗生素对 29 株奶牛乳

表4 天津地区金黄色葡萄球菌药敏试验结果

Table 4 Sensitivity of *Staphylococcus aureus* from Tianjin area to antibacterial drugs

抗生素名称	菌株数量/个			敏感菌株比例/%	中介菌株比例/%	耐药菌株比例/%
	敏感(S)	中介(I)	耐药(R)			
青霉素 G	0	0	29	0	0	100
头孢唑酮	15	6	8	51.72	20.69	27.59
头孢噻肟	13	8	8	44.83	27.59	27.59
阿莫西林	17	6	6	58.62	20.69	20.69
氨苄西林	15	8	6	51.72	27.59	20.69
头孢西丁	12	2	15	41.38	6.90	51.72
头孢噻吩	8	2	19	27.59	6.90	65.52
苯唑西林	8	4	17	27.59	13.79	58.62
红霉素	6	0	23	20.69	0	79.31
乙酰螺旋霉素	0	0	29	0	0	100
阿奇霉素	12	2	15	41.38	6.90	51.72
环丙沙星	12	6	11	41.38	20.69	37.93
诺氟沙星	12	3	14	41.38	10.34	48.28
恩诺沙星	10	8	11	34.48	27.59	37.93
左氧氟沙星	12	4	13	41.38	13.79	44.83
四环素	6	2	21	20.69	6.90	72.41
强力霉素	12	4	13	41.38	13.79	44.83
甲氧胺嘧啶	2	0	27	6.90	0	93.10
磺胺异恶唑	0	3	26	0	10.34	89.66
链霉素	8	2	19	27.59	6.90	65.52
庆大霉素	10	6	13	34.48	20.69	44.83
新霉素	21	2	6	72.41	6.90	20.69
大观霉素	13	8	8	44.83	27.59	27.59
妥布霉素	14	1	14	48.28	3.45	48.28
卡那霉素	8	0	21	27.59	0	72.41
丁胺卡纳	15	2	12	51.72	6.90	41.38
林可霉素	0	0	29	0	0	100
克林霉素	6	0	23	20.69	0	79.31
氯霉素	8	1	20	27.59	3.45	68.97

房炎金黄色葡萄球菌分离株进行药敏试验, 试验结果如表4所示。

### 2.3.2 不同类抗生素耐药结果分析

不同类抗生素耐药率结果如图2。综合表3和图1可知, 29株金黄色葡萄球菌对青霉素G表现为完全耐药, 高于王桂琴关于宁夏地区奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌对青霉素耐药率86%的调查<sup>[6]</sup>, 而金葡菌对阿莫西林敏感性较好, 敏感率达到58.62%。分离菌株对大环内酯类药物的耐药率偏高, 其中对乙酰螺旋霉素达到完全耐药, 红霉素和阿奇霉素分别为79.31%和51.72%; 对氨基糖苷类药物中的新霉素敏感度较高, 敏感率为72.41%, 但对链霉素和卡那霉素有较高的耐

药性, 耐药率达到65.52%和72.41%, 明显高于湖北地区的金葡菌分离株对卡拉霉素耐药率27.3%的结果<sup>[14]</sup>; 对林可酰胺类药物和氯霉素类药物的耐药性偏高, 对林可霉素表现为完全耐药, 对克林霉素和氯霉素耐药率均79.31%和68.97%; 对喹诺酮类药物耐药率与徐勤研究结果相近<sup>[15]</sup>, 对磺胺类药物表现较高的耐药率。

结果表明, 随着抗生素的广泛使用, 奶牛乳房炎病原菌产生普遍耐药性。此外, 数据显示, 不同牛场的金葡菌耐药结果也不相同, 可能与不同牛场用药种类、剂量和频率不同有关, 也可能是因为金黄色葡萄球菌存在多种基因型。

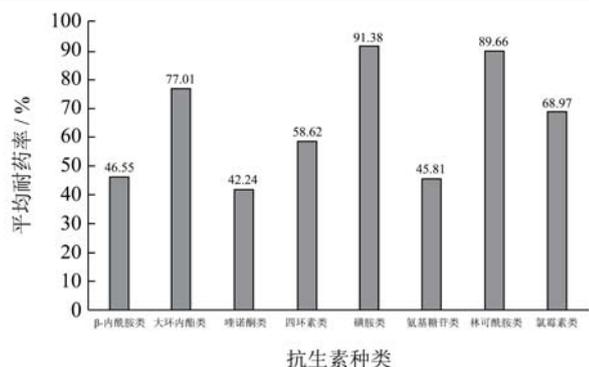


图2 天津地区患乳房炎牛乳中金黄色葡萄球菌对不同抗生素的耐药情况

Fig.2 Drug resistance of *Staphylococcus aureus* to different antibiotics in mastitis milk from Tianjin area

### 2.4 耐药基因鉴定结果

对 29 株金黄色葡萄球菌分离株进行耐药基因进

行扩增,通过琼脂糖凝胶电泳得到耐药基因鉴定结果,如表 5, 部分琼脂糖凝胶电泳结果如图 3。

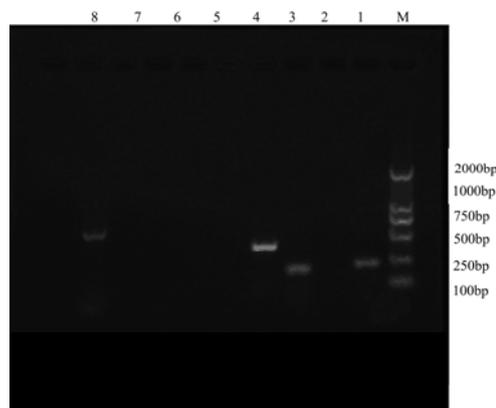


图3 部分琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.3 Results of partial agarose gel electrophoresis

注: M 表示 Maker; 1~8 表示部分金黄色葡萄球菌分离株

对 dfrG 的 PCR 扩增结果。

表 5 耐药基因鉴定结果

Table 5 Identification of drug resistance gene

	nuc	aadE	spc	ant(6)-la	ant(4)la	dfrG	dfrK	dfrS1	mecA	mecC	cfxA	blaZ
TJ02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ03	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
TJ04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ08	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TJ10	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
TJ11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TJ12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TJ13	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
TJ14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TJ15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TJ20	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TJ22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ29	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ34	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
TJ35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TJ37	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TJ38	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
TJ39	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ40	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
TJ41	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ42	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
TJ43	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TJ44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ45	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

转下页

接上页

TJ46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TJ47	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TJ50	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	ermA	ermB	ermC	ermT	msrA	msrB	lnuA	lnuB	tetL	tetM	tetK	cat::pC223	
TJ02	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TJ03	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
TJ04	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
TJ08	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
TJ10	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ13	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ29	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ34	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
TJ35	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TJ36	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ39	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TJ40	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TJ41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

采用 PCR 法对 29 株金黄色葡萄球菌进行七类抗生素耐药基因的检测，所有检测结果中只有 aadE、mecA、cfxA、ermA、msrA 和 lnuB 未检出，其余耐药基因均有不同程度的检出率。在检测的 29 株金黄色葡萄球菌中，对于大多数菌株来讲其耐药表现型与基因型之间有密切联系一般耐药表现型不同程度上高于相应基因型的阳性率。根据表 X 数据显示：耐氨基糖苷类抗生素的金葡菌，他们携带相关耐药基因的阳性率为 16.19%，耐药表型为 45.81%，相符率为；耐磺胺类相关耐药基因的阳性率为 12.8%，耐药表型为

91.38%；耐  $\beta$ -内酰胺类的相关耐药基因的阳性率为 30.36%，耐药表型为 46.55%；耐大环内酯类相关耐药基因的阳性率为 6.82%，耐药表型为 77.01%；耐林可酰胺类相关耐药基因的阳性率为 13.46，耐药表型为 89.66%；耐四环素类相关耐药基因的阳性率为 7.84%，耐药表型为 58.62%；耐氯霉素相关耐药基因的阳性率为 5%，耐药表型为 68.57%。

### 3 结论

3.1 奶牛乳房炎是一种主要由病原微生物引起的，在

奶牛中可以相互传染的疾病, 不仅影响养殖业发展, 也会使食品安全产生隐患。目前国内外治疗乳房炎的主要方法是使用抗生素, 在治疗奶牛疾病中, 频繁使用抗生素常造成细菌耐药<sup>[16]</sup>。本试验采集天津地区 7 个牧场 50 份样品, 分离鉴定出了 29 株金黄色葡萄球菌, 检出率为 58%, 且对各类抗生素表现为多数耐药, 结果不容乐观, 建议在今后的奶牛乳房炎治疗中, 能够参考致病菌对各类药物的耐药性结果合理用药。例如, 减少磺胺类药物、林可酰胺类药物和大环内酯类药物的使用, 对表现为完全耐药的青霉素 G、乙酰螺旋霉素和林克霉素应避免使用, 而对于敏感性较好的阿莫西林和新霉素可以适量使用, 这样既能减轻治愈乳牛病情, 又能减少牛乳中兽药残留。

3.2 以上结果证明, 天津地区的奶牛养殖业仍存在很多不足, 应该通过改善奶牛的生存环境以及食料饲养情况来增强奶牛的自身免疫能力, 经常消毒清洁, 还应对奶牛进行定期检查, 分批治疗以防交叉感染。在今后的奶牛养殖业中应以防御为主, 治疗为辅, 尽量减少抗生素的使用, 降低耐药性, 避免兽药残留对人体造成的危害。

3.3 天津地区乳房炎奶样的金黄色葡萄球菌分离株耐药性基因检测结果显示, 耐药基因型普遍低于耐药表型, 造成这种结果的原因可能是耐药表型不仅由耐药基因型决定, 还与环境或其他条件共同作用有关。若要得出具体耐药表型与基因型的关系, 还需进行大量的试验与分析。对表现耐药性的金葡菌进行基因分型, 可以找出该地区流行的优势基因型, 对乳房炎的防治具有十分重要的意义。

## 参考文献

- [1] 马永征, 马冬, 白婉斯, 等. 巴氏杀菌乳特点及饮用价值综述 [J]. 乳业科学与技术, 2012, 35(3): 35-38  
MA Yong-zheng, MA Dong, BAI Di-si, et al. An overview of pasteurized milk and its suitability for drinking [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2012, 35(3): 35-38
- [2] 李晓东. 乳品工艺学 [M]. 北京: 科学出版社, 2011  
LI Xiao-dong. Dairy technology [M]. Beijing: Science Press, 2011
- [3] Kerro-Dego O, Prysliak T, Potter A A, et al. DNA-protein immunization against the GapB and GapC proteins of a mastitis isolate of *Staphylococcus aureus* [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006, 113(1-2): 125-138
- [4] Kawaty R, Brouwer E C, Jansen M D, et al. Characterization of Dutch *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis using a multiple locus variable number tandem repeat analysis [J]. Veterinary Microbiology, 2009, 136(3-4): 277-284
- [5] 史冬燕. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌耐药性及以黏附素为靶位的疫苗的基础研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010  
SHI Dong-yan. The study of vaccine targeting adhesins and antimicrobial resistance of *S. aureus* induced mastitis in dairy cows [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2010
- [6] 王桂琴, 杨萌萌, 邢燕, 等. 宁夏地区奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌耐药性分析 [J]. 动物医学进展, 2011, 32(10): 59-62  
WANG Gui-qin, YANG Meng-meng, XING Yan, et al. Resistant analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in ningxia [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2011, 32(10): 59-62
- [7] Kerro-Dego O, Prysliak T, Potter A. DNA-protein immunization against the GapB and GapC proteins of a mastitis isolate of *Staphylococcus aureus* [J]. Vet. Immunol. Immunopathol., 2006, 113(1-2): 1125-138
- [8] 高健, 刘修权, 陈立本, 等. 北京地区奶牛乳房炎的流行状况调查 [J]. 中国科技论文在线精品论文, 2010, 3(11): 1180-1185  
GAO Jian, LIU Xiu-quan, CHEN Li-ben, et al. Epidemiological survey about prevalence of bovine mastitis in Beijing region [J]. Highlights of Science Paper Online, 2010, 3(11): 1180-1185
- [9] 易明梅, 黄奕倩, 朱建国, 等. 上海地区奶牛乳房炎主要病原菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. 中国兽药学报, 2009, 29(3): 360-363  
YI Ming-mei, HUANG Yi-qian, ZHU Jian-guo, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of main pathogenic bacteria causing dairy cow mastitis in Shanghai area [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2009, 29(3): 360-363
- [10] 倪春霞, 蒲万霞, 胡永浩, 等. 奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. 西北农业学报, 2010, 34(2): 20-24  
NI Chun-xia, PU Wan-xia, HU Yong-hao, et al. Isolation, identification and drug sensitive test of pathogenic bacteria causing dairy cattle mastitis [J]. Acta Agriculture Boreali-occidentalis Sinica, 2010, 34(2): 20-24
- [11] 李银生, 曾振灵. 兽药残留的现状与危害 [J]. 中国兽药杂志, 2002, 36(1): 29-33  
LI Yin-sheng, ZENG Zhen-ling. Status and harm of veterinary drug residues [J]. Chinese Journal of Veterinary Drugs, 2002, 36(1): 29-33
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document

- M100-S21 performance standards for antimicrobial susceptibility tests [S]
- [13] 抗菌药物敏感性试验执行标准[J].中华检验医学杂志. CLSI 文件 M100-S22,2012,32(3),62-91  
Standard for the implementation of antimicrobial susceptibility testing [J]. CLSI file of Chinese Journal of Laboratory Medicine M100-S22, 2012, 32(3): 62-91
- [14] 刘朝,王京仁,张成栋,等.湖北地区奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定与耐药性分析[J].中国奶牛,2007,7:35-38  
LIU Chao, WANG Jing-ren, ZHANG Cheng-dong, et al. Isolation, identification and drug resistance analysis of mastitis pathogens in dairy cows in Hubei province [J]. Chinese Cow, 2007, 7: 35-38
- [15] 徐勤,巢国祥.生牛奶中金黄色葡萄球菌污染状况及耐药性研究[J].中国卫生检验杂志,2005,15(8):972-973  
XU Qin, CHAO Guo-xiang. Study on the pollution status and drug resistance of *Staphylococcus aureus* in raw milk [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2005, 15(8): 972-973
- [16] 杨平满,周建英.常见多重耐药菌的耐药机制及防治对策[J].中华医院感染学杂志,2006,16(12):1434-1437  
YANG Ping-man, ZHOU Jian-ying. Drug resistance mechanism of common multi-drug resistant bacteria and its control [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2006, 16(12): 1434-1437