

我国东北与西部地区乳房炎牛奶中链球菌的鉴定及耐药性比对

于忠娜¹, 于雷¹, 甄天元², 王军², 韩荣伟²

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

摘要: 为了了解我国奶牛由链球菌引起的乳房炎感染现状, 本论文系统地分离鉴定了我国两个地区(东北和西部)170个乳房炎乳的链球菌, 并对它们进行了抗生素的耐药性比对。结果表明: 我国东北和西部地区的乳房炎乳中分别分离出18株和11株链球菌; 药敏试验显示, 这两个地区的所有链球菌对29种抗生素药物均表现出不同程度的耐药性, 其中, 在东北地区链球菌中甲氧苄啶耐药菌(90.0%)、磺胺异噁唑耐药菌(80.0%)、苯唑西林耐药菌(78.5%)、林可霉素耐药菌(74.6%)、克林霉素耐药菌(66.9%)和头孢西丁耐药菌(62.3%)检出率较高; 西部地区链球菌检出菌对甲氧苄啶(90.9%)、苯唑西林(81.8%)、青霉素G和磺胺异噁唑(72.7%)耐药性较高; 这两个地区的乳房炎乳对抗生素都表现出多重的耐药现象。

关键词: 乳房炎; 链球菌; 分离鉴定; 耐药性

文章编号: 1673-9078(2018)07-112-122

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.017

Identification and Antimicrobial Resistance of *Streptococcus* Isolated from Mastitis Milk in Northeast and Western Areas of China

YU Zhong-na¹, YU Lei¹, ZHEN Tian-yuan², WANG Jun², HAN Rong-wei²

(1. Haidu College Qingdao Agricultural University, Laiyang 265200, China) (2. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: The *Streptococci* was systematically identified in 170 mastitis milks from two areas (northeastern and western) of China, with the aim to understand the present situation of mastitis caused by *Streptococci* in Chinese cow. The drug susceptibility of isolated *Streptococci* strains against 29 commonly used antibiotics was compared. The results showed that 18 and 11 strains of *Streptococcus* were isolated from the northeastern and western areas, respectively, and there were differences in drug susceptibility between the northeastern and the western region. All the isolated *Streptococci* strains showed a drug resistance against 29 kinds of drugs, but to a varying extent. *Streptococcus* in northeastern region showed a high drug resistance against trimethoprim(90.0%), sulfonamides(80.0%), oxacillin(78.5%), lincomycin(74.6%), clindamycin(66.9%) and cefoxitin(62.3%), while *Streptococcus* in western region showed a high drug resistance against trimethoprim(90.9%), oxacillin(81.8%), penicillin G and sulfamethoxazole(72.7%). All the isolated *Streptococci* strains in both the regions showed multiple drug resistance to antibiotics.

Key words: mastitis; *Streptococcus*; isolation and identification; drug resistance

抗生素治疗费用的提高、奶牛生产性能的下降以

收稿日期: 2018-02-04

基金项目: 山东省高等学校科学技术计划项目(J17KA131); 农业部公益性农业行业科研专项(201403071-5); 国家奶产品质量安全风险评估重大专项(GJFP201800804); 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: 于忠娜(1981-), 女, 讲师, 硕士研究生, 从事乳品质量安全控制的研究

通讯作者: 韩荣伟(1981-), 男, 博士研究生, 副教授, 从事乳品质量安全控制的研究

及牛奶中兽药残留风险的提升等使得牛乳腺炎成为奶牛行业中最具经济意义的疾病^[1]。据世界粮农组织统计, 2017年1~7月份欧盟28国累计生产原料奶9,262.4万吨, 1~9月份我国乳制品累计产量为2,282.8万吨, 我国累计进口液奶468,174吨^[2], 2016年我国全年牛奶产量为3,602.2万吨^[3]。但是牛奶生产受到众多因素的影响, 例如疾病等等, 其中最主要的是乳腺炎。

乳链球菌是最常分离到的乳腺炎致病菌之一^[4], 分为致病性和非致病性两大类。致病性链球菌主要分为无乳链球菌, 停乳链球菌和乳房链球菌三大类, 其中无乳链球菌的致病性最高^[5,6], Z. Zhang等^[7]从全国

30个城市分离到的无乳链球菌占有乳房炎致病菌的38.6%。甚至在牛奶产量全球第四的巴西,也已在60.0%的奶牛群中发现无乳链球菌^[8-10]。

因为细菌自身具有抗药性,另外生物在进化中为抵御外来侵害,在复制过程中不断经历基因突变,从而衍生出不受抗生素作用的下一代,产生耐药菌。当今抗生素的广泛应用及滥用,扩大和加速了这一过程,“超级细菌”的出现就是明证。目前日益严重的细菌耐药性已成为一个非常棘手的问题^[11],尤其跟人类密切相关的食品方面,耐药性直接影响到了人类健康。

我国对奶牛乳房炎的研究起步较晚,查阅资料发现,针对奶牛乳房炎致病菌的研究,目前较为深入的是金黄色葡萄球菌和大肠杆菌,而关于链球菌的研究较少而且不透彻。目前乳腺炎是用抗生素治疗,当不加选择地使用抗生素时,可导致细菌出现耐药性,同时牛奶中也会有兽药残留等安全隐患。本研究主要对我国东北地区(黑龙江内蒙古)和西部(新疆)地区的乳房炎奶样进行链球菌的分离鉴定及药敏试验,对其耐药性进行比对,得出东北与西部地区耐药菌分离情况及耐药性的差异,从而为链球菌性乳房炎的防治和控制兽药残留提供依据,同时为患链球菌性乳房炎的牛奶收集者提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料

5.0%无菌脱纤维羊血培养基:取1 L蒸馏水加入33.0 g普通营养琼脂培养基(NA)粉末中,加热溶解沸腾三次后,分装到三角瓶中,加几粒玻璃珠,121℃灭菌15 min。待培养基温度降至50℃左右,加入5.0%无菌脱纤维羊血,充分混匀后倒入灭菌的平板内,现配现用。**6.5% NaCl 琼脂培养基:**将蒸馏水加入普通营养琼脂培养基(NA)和6.5% NaCl 于电炉上加热融化,煮沸3次后分装,121℃灭菌15 min,等温度降到约50℃倒入灭菌的平板中,现用现配。**5.0%绵羊鲜血 Mueller-Hinton 琼脂(MHA)培养基:**取1 L蒸馏水加入42.0 g MHA 培养基粉末中,加热溶解,沸腾三次后,分装到三角瓶中,加入几粒玻璃珠,121℃灭菌15 min。待培养基温度降至约50℃时无菌加入5.0%的无菌脱纤维羊血,充分混匀倒入灭菌的平板内,现配现用。**胰蛋白胨大豆肉汤(TSB 液体培养基):**取1 L蒸馏水加入30.0 g TSB 粉末中,加热搅拌至完全溶解后分装到三角瓶装中置于高压灭菌锅内121℃灭菌15 min,分装到试管(20 mL/个)中备用。

HB4117-4 冻干兔血浆, GB124 1%马尿酸钠细菌

微量生化鉴定管, SN012 七叶苷细菌微量生化鉴定管, 抗微生物药物敏感性试验试纸片。试验所用生化试剂材料和药敏片均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

1.2 主要仪器及设备

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; QL-866 旋涡混合器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 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。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集

采集患乳房炎奶牛乳样, 其中黑龙江地区50个, 内蒙古地区50个, 新疆地区70个。采样时, 用温水拭净乳房, 用75.0%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。

1.3.2 链球菌的分离和纯化

无菌吸取2 mL奶样于20 mL TSB 液体培养基中, 振荡均匀, 36℃±1℃恒温培养箱中培养24 h 增菌。挑取增菌液划线接种于5.0%绵羊鲜血琼脂培养基上, 36℃±1℃培养24 h。观察血平板上菌落的生长情况和形态特征, 根据菌落的形态和溶血情况初步判断有无链球菌。挑取表面湿润光滑, 灰色并且有溶血现象的单个菌落进行增菌并纯化培养, 36℃±1℃下培养18 h~24 h 后进行触酶试验。

1.3.3 生化鉴定

1.3.3.1 触酶试验

从纯化后的 TSB 液体培养基中无菌吸取1 mL 菌液于无菌离心管中, 10,000 r/min 离心5 min。用一次性滴管向离心管中滴加3.0% H₂O₂ 2滴, 立即观察结果。若立即出现大量气泡则触酶试验阳性, 若无气泡则为阴性。试验过程中以金黄色葡萄球菌作为对照。

1.3.3.2 血浆凝固酶试验

排除金黄色葡萄球菌对试验结果的影响, 用冻干兔血浆进行检验。每支西林瓶中加入0.8 mL 触酶试验阴性的菌悬液轻微摇晃至完全溶解, 置36℃±1℃下培养, 6 h 或12 h 后观察, 若凝固则被判定为阳性。

1.3.3.3 6.5% NaCl 生长试验

将血浆凝固酶试验阴性的菌悬液划线接种于事先配置好的6.5% NaCl 琼脂培养基上, 36℃±1℃下, 培

养 24 h 后观察细菌生长情况。注意：本试验是排除肠球菌的干扰，肠球菌能在血平板上生长良好，触酶试验和凝固酶试验均为阴性，耐高浓度盐，而链球菌在高浓度盐环境中不生长。

1.3.3.4 Christie-Atkins-Munch- Petersen (CAMP)试验

经过筛选的触酶试验阴性、血浆凝固酶试验阴性以及 6.5% NaCl 生长试验阴性的菌悬液确定是链球菌属。用接种环将金黄色葡萄球菌 (ATCC25923) 培养物在血琼脂培养基上划一条直线，将被检菌悬液在垂直于金黄色葡萄球菌培养物的方向划一条线，二者相距 3~5 mm，各链球菌划线间距 10~20 mm；37 °C 温

箱内培养 24 h，观察结果。能在两菌种垂直处出现箭头状溶血者为阳性，否则为阴性。

1.3.3.5 生化鉴定管鉴定

纯化培养物经触酶试验、凝固酶试验、6.5% NaCl 生长试验初步鉴定为链球菌后，进一步进行生化鉴定。若结果符合触酶试验阴性，血浆凝固酶试验阴性和 6.5% NaCl 生长试验阴性，即鉴定为链球菌属。无乳链球菌为 CAMP 阳性，不水解七叶苷和 1.0% 马尿酸钠；停乳链球菌为 CAMP 阴性，不水解七叶苷和 1.0% 马尿酸钠；乳房链球菌为 CAMP 阴性，水解七叶苷和 1.0% 马尿酸钠。

表 1 药敏试验判定标准

Table 1 Drug susceptibility test to determine the standard

药品类别	兽药及简称	纸片含量/($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈直径/mm		
			R	I	S
β -内酰胺类	头孢哌酮 SCF	10	≤ 28	--	≥ 29
	青霉素 G PEN G	75	≤ 15	--	≥ 21
	头孢噻肟 CTX	30	≤ 14	--	≥ 23
	氯苄西林 AMPI	10	≤ 13	--	≥ 18
	头孢西丁 FOX	10	≤ 13	--	≥ 17
	阿莫西林 AMOX	30	≤ 14	--	≥ 18
	头孢噻吩 CEF	30	≤ 14	--	≥ 18
	苯唑西林 OXAC	1	≤ 10	--	≥ 13
	大环内酯类	红霉素 ERY	15	≤ 15	--
乙酰螺旋霉素 ASP		30	≤ 22	--	≥ 30
阿奇霉素 AZM		15	≤ 13	--	≥ 18
喹诺酮类	环丙沙星 CIP	5	≤ 15	--	≥ 21
	恩诺沙星 ENR	10	≤ 12	--	≥ 17
	诺氟沙星 NOR	5	≤ 13	--	≥ 17
	氧氟沙星 OFX	5	≤ 15	--	≥ 19
四环素类	多西环素 DOX	30	≤ 11	--	≥ 15
	四环素 TET	30	≤ 12	--	≥ 16
磺胺类	甲氧苄啶 TMP	5	≤ 10	--	≥ 16
	磺胺异噁唑 SF	300	≤ 23	--	≥ 33
氨基糖苷类	庆大霉素 GEN	10	≤ 11	--	≥ 15
	链霉素 STR	10	≤ 12	--	≥ 15
	大观霉素 SH	30	≤ 12	--	≥ 17
	妥布霉素 TOB	100	≤ 14	--	≥ 18
	新霉素 NEO	10	≤ 12	--	≥ 15
	卡那霉素 KAN	30	≤ 14	--	≥ 17
	阿米卡星 AK	30	≤ 13	--	≥ 18
林可酰胺类	林可霉素 LIN	2	≤ 14	--	≥ 21
	克林霉素 CLI	2	≤ 14	--	≥ 21
氯霉素类	氯霉素 CHP	30	≤ 12	--	≥ 18

注：S-敏感；I-中介；R-耐药。

1.3.4 药敏试验

药敏试验采用方法是纸片扩散法。根据抗菌药物抑菌圈直径的大小来推断细菌的耐药性。药物抑菌圈直径的判定如表 1 所示。

2 结果与分析

2.1 链球菌的分离结果与分析



图 1 链球菌的 α 溶血现象和 β 溶血现象

Fig.1 alpha-hemolysis and β -hemolysis of streptococcus

绵羊鲜血琼脂培养基结果见图 1。

挑取表面湿润光滑，灰色并且有溶血现象的单个菌落进行增菌并纯化培养，利用触酶试验和血浆凝固酶试验排除了金黄色葡萄球菌，用 6.5% NaCl 生长试验排除肠球菌。去除杂菌后试验结果如下。

2.1.1 东北地区链球菌分离结果与分析

经过增菌分离纯化试验后，黑龙江地区 50 个患病乳样样品共分离出 5 株链球菌，分离率为 10.0%，明显低于沈阳地区的 23.1%^[12]。内蒙古地区 50 个患病乳样共分离出 13 株链球菌，分离率为 26.0%，比丁月霞等^[13]报道的该地区链球菌分离率 22.5%要稍高。

2016 年下半年东北地区共采集 100 个患乳房炎奶牛乳样，分离出 18 株链球菌，平均分离率为 18.0%。

2.1.2 西部地区链球菌分离结果与分析

生化鉴定项	培养时间/h	结果判断		备注
		阳性	阴性	
七叶苷	18~24	棕黑色	不变色	-
1.0%马尿酸钠	2	深紫色	浅紫色或不变色	培养后，加入 0.2 mL 茚三酮溶液，培养 10 min，观察

东北（黑龙江、内蒙古）与西部（新疆）两个地区三个省份共分离出 29 株链球菌，具体鉴定结果见表 3、表 4 和表 5。

2.2.3.1 东北地区链球菌生化鉴定结果与分析

(1) 黑龙江地区链球菌生化鉴定结果与分析
分离的 5 株链球菌菌株，与无乳链球菌、停乳链球菌和乳房链球菌标准菌株试验结果对比得出，5 株试验结果不符合以上三种链球菌，均为其他链球菌。

2016 年下半年西部地区共采集 70 个患病乳样，分离出 11 株链球菌，分离率为 15.7%，高于傅江涛等^[14]报道的昌吉地区 4.8% 的分离率。

2.2 生化鉴定结果与分析

2.2.1 6.5% NaCl 生长试验结果与分析

6.5%NaCl 生长试验结果见图 2。有细菌生长为阳性，没有细菌生长为阴性。

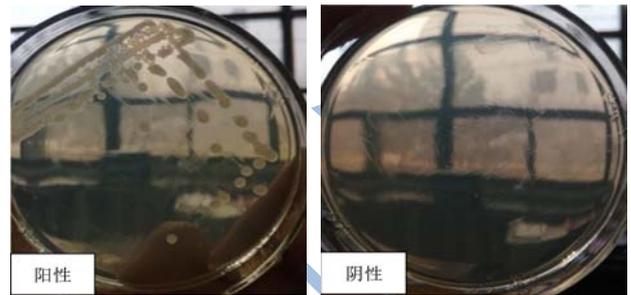


图 2 6.5% NaCl 生长试验

Fig.2 6.5% NaCl growth test

2.2.2 CAMP 试验结果与分析

CAMP 试验结果见图 3。



图 3 CAMP 试验

Fig.3 CAMP test

2.2.3 链球菌生化鉴定结果与分析

链球菌生化鉴定结果比对见表 2。

表 2 链球菌生化鉴定结果比对表

Table 2 Comparison of biochemical identification results of Streptococcus

生化鉴定试验结果见表 3。

(2) 内蒙古地区链球菌生化鉴定结果与分析
内蒙古地区链球菌菌株生化鉴定结果见表 4。13 株链球菌菌株中，1 株乳房链球菌，12 株其他链球菌。而丁月霞等^[13]2015 年报道该地区无乳链球菌占 70.4%，停乳链球菌占 11.1%，乳房链球菌占 18.5%。考虑到在乳房炎奶样中链球菌发生一定类型的改变，也有可能在不同牧场致病性菌株有一定差异。

表3 黑龙江地区链球菌菌株生化鉴定结果

Table 3 Biochemical identification results of *Streptococcus* strains in Heilongjiang

生化鉴定项	CAMP 试验	七叶苷水解实验	1%马尿酸钠水解实验
无乳链球菌	+	-	-
停乳链球菌	-	-	-
乳房链球菌	-	+	+
HLJ05	+	+	+
HLJ17	+	+	-
HLJ41	+	+	-
HLJ43	+	+	+
HLJ46	+	+	-

注：“+”为阳性，“-”为阴性。

表4 内蒙古地区链球菌菌株生化鉴定结果

Table 4 Biochemical identification of *Streptococcus* strains in Inner Mongolia

生化鉴定项	CAMP 试验	七叶苷水解试验	1%马尿酸钠水解试验
无乳链球菌	+	-	-
停乳链球菌	-	-	-
乳房链球菌	-	+	+
NM51	+	+	-
NM60	+	+	-
NM59	-	+	-
NM70	+	+	-
NM85	-	+	-
NM57	-	+	-
NM78	-	+	-
NM94	-	+	-
NM67	+	+	+
NM53	-	+	-
NM79	+	+	+
NM98	-	+	+
NM69	+	+	+

注：“+”为阳性，“-”为阴性。

由表3和表4可知，东部地区两省份共分离18株链球菌，其中乳房链球菌1株，平均分离率5.6%，无乳链球菌和停乳链球菌为0，其他链球菌17株，平均分离率94.4%。而Z. Zhang等^[7]报道的无乳链球菌分离率为38.6%，与本文相差较大，考虑跟检测、管理、预防，甚至其他病原体的存在有关^[15]。

2.2.3.2 西部地区链球菌生化鉴定结果与分析

生化鉴定结果见表5。11株链球菌菌株中，4株乳房链球菌，平均分离率为36.4%；无乳链球菌和停乳链球菌为0；7株其他链球菌，分离率63.6%。而傅江涛等^[14]2015年报道分离的分别为无乳链球菌、停乳链球菌和乳房链球菌，考虑到致病性方面，可能链球

菌发生一定类型的转化或者有新的致病类型出现。

综合表3~表5，我国东北部和西部地区致病性链球菌的分离率普遍较低。在分离的链球菌中，79.0%以上是除了无乳链球菌、停乳链球菌和乳房链球菌之外其他链球菌，无乳链球菌、停乳链球菌鉴定均为0。

2.3 药敏试验结果与分析

2.3.1 东北地区（黑龙江、内蒙古）药敏试验结果与分析

黑龙江地区分离的5株链球菌和内蒙古地区分离的13株链球菌分别进行药敏试验，对29种常用兽药的药敏结果见表6。

表 5 西部地区链球菌菌株生化鉴定结果

Table 5 Biochemical identification results of *Streptococcus* strains in the western region

生化鉴定项	CAMP 试验	七叶苷水解试验	1%马尿酸钠水解试验
无乳链球菌	+	-	-
停乳链球菌	-	-	-
乳房链球菌	-	+	+
XJ01	-	+	-
XJ04	+	+	+
XJ13	-	+	-
XJ15	-	+	+
XJ36	-	+	-
XJ42	-	+	-
XJ46	-	+	-
XJ59	-	+	+
XJ63	-	+	+
XJ68	-	+	+
XJ69	+	+	+

注：“+”为阳性，“-”为阴性。

黑龙江地区平均耐药率最高的是林可酰胺类 (80.0%)，其中林可霉素、克林霉素耐药率均为 80.0%；其次是磺胺类药物 (70.0%)，其中甲氧苄啶耐药率最高，为 80.0%；氨基糖苷类耐药率为 22.9%，其中阿米卡星耐药率最高为 60.0%；β-内酰胺类耐药率 22.5%，其中苯唑西林耐药率为 80.0%；四环素类和氯霉素类平均耐药性均为 20.0%；对大环内酯类耐药性较低为 6.7%，而对氨基苄西林和喹诺酮类没有耐药性。引起内蒙古地区奶牛乳房炎的链球菌全部具有不同程度的耐药性，该地区菌株对磺胺类药物平均耐药性最高，两种药物均 100%耐药；其次对林可酰胺类 (61.5%) 和四环素类 (57.7%) 耐药性都很高，两大类四种药物的耐药性都在 50.0%以上，林可霉素的耐药性甚至接近 70.0%；大环内酯类平均耐药性为 51.3%，乙酰螺旋霉素耐药性最高为 69.3%；β-内酰胺类 (41.4%) 和氨基糖苷类 (39.6%) 平均耐药性相差

不大，两大类药中耐药性最高的是头孢西丁 (84.6%)；氯霉素类耐药性为 23.1%；喹诺酮类平均耐药性最低，为 9.6%。众多药物中氨基苄西林、阿莫西林、环丙沙星、恩诺沙星和氧氟沙星均无耐药性检出。而 Yuexia Ding 等^[6]报道 β-内酰胺类的耐药率最高，在 80.0%以上，与本文检测结果 (41.4%) 相差较大；丁月霞等^[13]检测对氟喹诺酮类的耐药率相对较低，这与本文检测值较接近。而刘琪等^[17]报道分离菌对林可霉素耐药率 (68.8%) 与本文接近。考虑到不同牛场因为用药习惯的差异，菌株对不同药物耐药性并不相同，每个牛场实际用药前都应该进行细菌药物敏感性检测。

数据分析显示，东北地区链球菌对甲氧苄啶耐药菌最多 (94.4%)、磺胺异噁唑耐药菌 (88.9%)、苯唑西林耐药菌 (77.8%)、林可霉素耐药菌 (72.2%) 和头孢西丁耐药菌 (72.2%)、克林霉素和链霉素、克林霉素耐药菌 (61.1%) 检出率较高。

表 6 东北地区乳房炎奶样中链球菌药敏试验结果

Table 6 Sensitivity of *Streptococcus* from Northeast China to antibacterial drugs

药物名称	菌株数/株							耐药率/%		
	敏感 (S)		中介 (I)		耐药 (R)			黑龙江	内蒙	平均
头孢哌酮 SCF	4	6	0	4	1	3	20	23.1	21.5	
青霉素 G PEN G	4	5	0	0	1	8	20	61.5	40.8	
β-内酰胺类	头孢噻肟 CTX	4	7	1	1	0	5	0	38.5	19.2
	氨基苄西林 AMPI	5	12	0	1	0	0	0	0	0
	头孢西丁 FOX	2	0	1	2	2	11	40	84.6	62.3

转下页

接上页

	阿莫西林 AMOX	5	13	0	0	0	0	0	0	0
	头孢噻吩 CEF	4	7	0	0	1	6	20	46.2	33.1
	苯唑西林 OXAC	1	3	0	0	4	10	80	76.9	78.5
大环内酯类	红霉素 ERY	5	7	0	1	0	5	0	38.5	19.2
	乙酰螺旋霉素 ASP	4	1	0	3	1	9	20	69.2	44.6
	阿奇霉素 AZM	5	7	0	0	0	6	0	46.2	23.1
喹诺酮类	环丙沙星 CIP	5	10	0	3	0	0	0	0	0
	恩诺沙星 ENR	5	13	0	0	0	0	0	0	0
	诺氟沙星 NOR	2	6	3	2	0	5	0	38.5	19.2
	氧氟沙星 OFX	5	13	0	0	0	0	0	0	0
四环素类	多西环素 DOX	4	5	0	0	1	8	0	61.5	30.8
	四环素 TET	4	5	0	1	1	7	0	53.9	26.9
磺胺类	甲氧苄啶 TMP	0	0	1	0	4	13	80	100	90
	磺胺异噁唑 SF	2	0	0	0	3	13	60	100	80
氨基糖苷类	庆大霉素 GEN	3	9	0	0	2	4	40	30.8	35.4
	链霉素 STR	3	2	1	1	1	10	20	76.9	48.5
	大观霉素 SH	4	11	1	0	0	2	0	15.4	7.7
	妥布霉素 TOB	4	9	0	2	1	2	20	15.4	17.7
	新霉素 NEO	5	9	0	1	0	3	0	23.1	11.6
	卡那霉素 KAN	3	3	1	2	1	8	20	61.5	40.8
	阿米卡星 AK	2	4	0	2	3	7	60	53.9	56.9
林可酰胺类	林可霉素 LIN	0	2	1	2	4	9	80	69.2	74.6
	克林霉素 CLI	0	2	1	4	4	7	80	53.9	66.9
氯霉素类	氯霉素 CHP	4	9	0	1	1	3	20	23.1	21.5

注: S-敏感; I-中介; R-耐药。

表 6 可见, 黑龙江地区奶牛乳房炎乳中所分离的 5 株链球菌, 全部具有不同程度的耐药性, 且均为多重耐药菌, 最少的同时耐受 3 种药物, 最多的能耐受 13 种药物, 具体所耐受兽药组合形式及对应菌株数见表 7。内蒙古地区耐药情况中, 本文中所分离链球菌与 Yuexia Ding、刘琪等所分菌均为多重耐药菌; 在多

重耐药数上, 本文所测菌株最少的耐受 7 种药物, 最多的耐受 19 种药物, Yuexia Ding 等^[16]报道最少的耐两种药物, 最多的耐 7 种药物; 刘琪等^[17]报道最少的耐 1 种, 最多的耐 5 种药物。所有结果表明奶牛场中病原菌的多重耐药性问题非常严峻。具体结果见表 8。

表 7 黑龙江地区患乳房炎奶牛乳中链球菌多重耐药情况

Table 7 Multiple drug resistance of *Streptococcus* in milk mellitus in Heilongjiang Province

同时耐受兽药数/种	菌株所耐受兽药种类	耐药菌株数(株)及比例/%
3	FOX, OXAC, CLI	1 (20.0)
5	OXAC, TMP, SF, AK, LIN	1 (20.0)
6	FOX, TMP, SF, AK, LIN, CLI	1 (20.0)
8	SCF, PEN G, CTX, OXAC, ASP, TMP, GEN, CLI	1 (20.0)
13	OXAC, DOX, TET, TMP, SF, GEN, STR, TOB, KAN, AK, LIN, CLI, CHP	1 (20.0)

表8 内蒙古地区患乳房炎奶牛乳中链球菌多重耐药情况

Table 8 Multiple drug resistance of *Streptococcus* in milk mellitus in Inner Mongolia

同时耐受兽药数 /种	菌株所耐受兽药种类	耐药菌株数(株)及比例/%
7	PENG, OXAC, TMP, SF, KAN, LIN, CLI OXAC, NOR, DOX, TET, TMP, SF, STR	2 (15.4)
8	FOX, ASP, NOR, TMP, SF, AK, LIN, CLI	1 (7.7)
9	FOX, CEF, ASP, AZM, NOR, DOX, TET, TMP, SF	1 (7.7)
11	PEN G, CTX, FOX, CEF, OXAC, TMP, SF, STR, TOB, KAN, AK FOX, OXAC, ASP, TMP, SF, GEN, STR, KAN, LIN, CLI, CHP	2 (15.4)
13	SCF, PENG, CTX, FOX, CEF, OXAC, TMP, SF, GEN, STR, TOB, KAN, AK FOX, OXAC, ERY, ASP, AZM, NOR, DOX, TET, TMP, SF, AK, LIN, CLI	2 (15.4)
15	SCF, PENG, FOX, CEF, ERY, ASP, AZM, DOX, TMP, SF, STR, AK, LIN, CL I, CHP PENG, FOX, DXAC, CEF, ASP, AZM, NOR, DOX, TET, TMP, SF, EN, STR, KAN, LIN, CLI	1 (7.7)
16	PENG, CTX, FOX, CEF, OXAC, ASP, DOX, TET, TMP, SF, STR, SH, NEO, KAN, AK, LIN	2 (15.4)
19	SCF, PENG, CTX, FOX, CEF, OXAC, ASP, AZM, DOX, TET, TMP, SF, GEN, STR, SH, NEO, KAN, AK, LIN PEN, CTX, FOX, CEF, OXAC, ERY, ASP, AZM, DOX, TET, TMP, SF, STR, SH, NEO, KAN, LIN, CLI, CHP	2 (15.4)

2.3.2 西部地区(新疆)药敏试验结果与分析

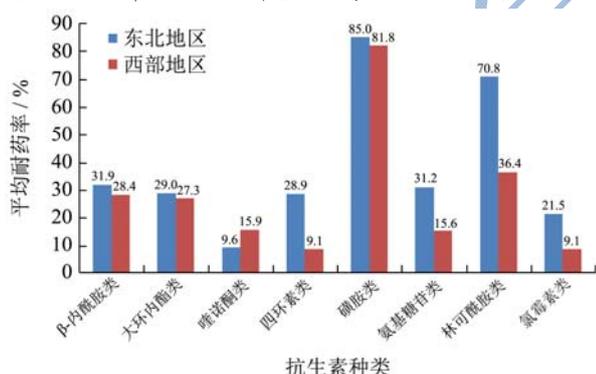


图4 西部地区与东北地区乳房炎奶样中链球菌对八大类药物耐药情况比较

Fig.4 Comparison of resistance of *Streptococcus* to eight major drugs in mellitus milk in western China and Northeast China

西部地区乳房炎奶样中所分离 11 株链球菌药敏试验结果见表 9。数据分析表明,西部地区链球菌检出菌对青霉素 G (72.7%)、甲氧苄啶 (90.9%)、苯唑西林 (81.8%)、磺胺异噁唑 (72.7%) 耐药性较高。

而傅江涛等^[12]报道昌吉地区某牛场的耐药性对头孢唑啉敏感率最高(50.0%),庆大霉素敏感率最低(31.3%),本试验显示耐药性最高的是甲氧苄啶(90.9%),耐药性最低的是头孢哌酮、氨苄西林、头孢噻肟、多西环素、大观霉素和新霉素,均未有耐药性检出。该地区所测菌株最少的耐受 3 种药物,最多的耐受 12 种药物,具体结果见表 10。

大类药物药敏结果见图 4。东北地区分离得到的链球菌除了对磺胺类(85.0%)和林可酰胺类(70.8%)药物耐药性非常高外,对其他类别药物都有不同程度耐药性,均在 15.0%~32.0%之间,而喹诺酮类耐药性相对较低(9.6%)。西部地区检出率较高的耐药菌主要是磺胺类耐药菌(81.8%),其次是林可酰胺类耐药菌(70.8%),其他种类均在 16.0%~37.0%之间,四环素类和氯霉素类相对较低(9.1%)。然而,分离得到的耐药菌对氨基糖苷类(15.6%)、四环素类(9.7%)、喹诺酮类(15.9%)和氯霉素类(9.1%)等药物却较为敏感。

表9 西部地区乳房炎奶样中链球菌药敏试验结果

Table 9 Sensitivity of *Streptococcus* from western region of China to antibacterial drugs

药物名称	菌株数/株			耐药率/%	
	敏感 (S)	中介 (I)	耐药 (R)		
β-内酰胺类	头孢哌酮 SCF	9	2	0	0
	青霉素 G PEN G	3	0	8	72.7
	头孢噻肟 CTX	6	5	0	0
	氨苄西林 AMPI	7	4	0	0
	头孢西丁 FOX	7	0	4	36.4
	阿莫西林 AMOX	8	0	3	27.3
	头孢噻吩 CEF	7	3	1	9.1
	苯唑西林 OXAC	2	0	9	81.8
大环内酯类	红霉素 CEF	6	1	4	36.4
	乙酰螺旋霉素 ASP	4	4	3	27.3
	阿奇霉素 AZM	8	1	2	18.2
喹诺酮类	环丙沙星 CIP	8	1	2	18.2
	恩诺沙星 ENR	10	0	1	9.1
	诺氟沙星 NOR	8	1	2	18.2
	氧氟沙星 OFX	9	0	2	18.2
四环素类	多西环素 DOX	11	0	0	0
	四环素 TET	9	0	2	18.2
磺胺类	甲氧苄啶 TMP	1	0	10	90.9
	磺胺异噁唑 SF	1	1	8	72.7
氨基糖苷类	庆大霉素 GEN	8	1	2	18.2
	链霉素 STR	7	1	3	27.3
	大观霉素 SH	11	0	0	0
	妥布霉素 TOB	8	0	3	27.3
	新霉素 NEO	11	0	0	0
	卡那霉素 KAN	8	1	2	18.2
	阿米卡星 AK	8	1	2	18.2
林可酰胺类	林可霉素 LIN	6	2	3	27.3
	克林霉素 CLI	6	0	5	45.5
氯霉素类	氯霉素 CHP	10	0	1	9.1

注: S-敏感; I-中介; R-耐药。

表10 西部地区患乳房炎奶牛乳中链球菌多重耐药情况

Table 10 Multiple drug resistance of *Streptococcus* in milk mellitus in western region of China

同时耐受兽 药数/种	菌株所耐受兽药种类	耐药菌株数 (株) 及比例/%
3	PEN G,OXAC,TMP	1(9.1)
4	PEN G,OXAC,TMP,SF	1(9.1)

转下页

接上页		
5	AMOX,CIP,ENR,NOR,OFX	1(9.1)
6	PEN G,OXAC,TMP,SF,CLI,CHP	2(18.2)
	PEN G,OXAC,TMP,SF,LIN,CLI	
7	PEN G,OXAC,ASP,TMP,SF,KAN,CLI	1(9.1)
8	OXAC,ERY,ASP,AZM,TMP,SF,STR,AK	1(9.1)
9	PEN G,FOX,OXAC,ERY,AZM,NOR,TET,TMP,SF	1(9.1)
10	PEN G,OXAC,TMP,SF,GEN,STR,TOB,AK,LIN,CLI	1(9.1)
12	PEN G,FOX,AMOX,CEF,ERY,ASP,TET,TMP,SF,GEN,TOB,LIN	2(18.2)
	FOX,AMOX,OXAC,ERY,CIP,OFX,TMP,SF,STR,TOB,KAN,CLI	

3 结论

3.1 综上所述可见,我国东北地区与西部地区 170 批患乳房炎奶样中总共分离出 29 株 (17.1%) 链球菌,分离率较高,东北地区分离率 (18.0%) 略高于西部地区;所分离菌株呈现高耐药性和多重耐药性特点,最高可同时耐受 19 种兽药,东北地区链球菌平均耐药性高于西部地区;两个地区对磺胺类药物和林可酰胺类药物耐药性最高,同时对 β -内酰胺类和大环内酯类也保持较高的耐药性。乳房炎奶样中链球菌的高分离率、强耐药性和多重耐药等问题,给我国西部地区和东北地区奶牛健康养殖和生鲜乳中兽药残留带来了安全隐患。针对这些问题,提出如下建议:

3.2 针对患乳房炎奶牛金黄色葡萄球菌感染率高的问题,有针对性开展奶牛养殖和管理培训,使饲养者和管理者的认识和技术得到提升,避免因饲养管理不当造成感染;对奶牛进行定期体检,避免因隐性乳房炎或感染初期的乳房炎未被发现,而造成群体之间的感染。邀请专业机构对养殖场的卫生环境进行评估,严格消毒制度,从根本上消灭潜在的污染源。依据风险评估结果,对奶牛乳房炎易发季节和易感染地区加大对链球菌的预警和防控,逐步降低链球菌的感染率。

3.3 针对耐药性强,且均为多重耐药菌的问题,建议采用新型的抗生素,解决链球菌对原抗生素产生的耐药性;在对患病奶牛进行用药之前,请专业机构对奶牛感染的致病菌进行分析鉴定,做到有的放矢,科学用药;邀请科研单位对奶牛养殖场链球菌耐药性情况研究,为防止耐药基因产生和转移提供科学指导。

参考文献

- [1] M S Perrig, M B Ambroggio, F R Buzzola, et al. Genotyping and study of the pauA and sua genes of Streptococcus uberis isolates from bovine mastitis [J]. Revista Argentina De Microbiologia, 2015, 47(4): 282-294
- [2] 王玉庭,杜欣蔚,王晶晶,等.2017 年前三季度奶业市场监测

分析报告[J].中国乳业,2017,10:2-11

WANG Yu-ting, DU Xin-wei, WANG Jing-jing, et al. Milk market monitoring analysis report for the first three quarters of 2017 [J]. China Dairy, 2017, 10: 2-11

- [3] 中华人民共和国国家统计局.中华人民共和国 2016 年国民经济和社会发展统计公报[1] [N].人民日报,2017-3-1(010) National Bureau of Statistics of the People's Republic of China. Statistical Bulletin of the People's Republic of China on National Economic and Social Development in 2016 [1] [N]. People's Daily, 2017-3-1(010)
- [4] JianGao, Herman W Barkema, Limei Zhang, et al. Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms [J]. J. Dairy Sci., 2017, 100: 1-10
- [5] 农业部关于印发《奶牛乳房炎防治技术指南(试行)》的通知[J].新疆畜牧业,2010,8:43-48
The Ministry of Agriculture issued the notification "Dairy Cow Mastitis Prevention and Control Technology Guide (Trial)" [J]. Xinjiangxumuye, 2010, 8: 43-48
- [6] 杨有武.青海地区奶牛无乳链球菌的分离与鉴定[J].中国畜牧兽医,2012,39(2):191-193
YANG You-wu. Isolation and identification of streptococcusagalactiae from dairy cow mastitis in Qinghai provincde [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 39(2): 191-193
- [7] Z Zhang, X P LI, F Yang, et al. Influences of season, parity, lactation, udder area, milk yield, and clinical symptoms on intramammary infection in dairy cows [J]. J. Dairy Sci., 2016, 99(8): 1-10
- [8] Neiwert O, Holst O, Duda K A. Structural investigation of rhamnose-rich polysaccharides from Streptococcus dysgalactiae bovine mastitis isolate [J]. Carbohydr Res., 2014, 389: 192-195
- [9] 袁永隆,张礼华,刘纯传,等.我国奶牛乳房炎常见病原菌的区系调查[J].中国农业科学,1992,25(4):70-76
YUAN Yong-long, ZHANG Li-hua, LIU Chun-chuan, et al.

- A survey of the pathogens of bovine mastitis in China [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 1992, 25(4): 70-76
- [10] 邢杰,王金良.无乳链球菌三种简易鉴定试验[J].临床检验杂志,1996,2:93
XING Jie, WANG Jin-liang. Three simple identification tests of *Streptococcus lactobacillus* [J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 1996, 2: 93
- [11] 高美英.抗生素耐药性的起源、传播和对策[J].抗感染药学, 2005,2(1):1-3
GAO Mei-ying. Origins, transfer and countermeasures of antibiotic resistances in bactetria [J]. *Anti-infection ph-armacy*, 2005, 2(1): 1-3
- [12] 朱江巍,刘耀川,张雅为.奶牛乳房炎病原菌分离及药物敏感性试验[J].黑龙江畜牧兽医,2016,2:111-113
ZHU Jiang-wei, LIU Yao-chuan, ZHANG Ya-wei. Isolation and drug susceptibility test of pathogenic bacteria of cow mastitis [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016, 2: 111-113
- [13] 丁月霞,李嫚,赵俊利.内蒙古地区奶牛乳房炎链球菌毒力基因检测及耐药性研究[J].中国兽医学报,2015,35(3):477-483
DING Yue-xia, LI Man, HAO Jun-li, et al. Characterization of antimicrobial resistance and virulence-related genes of *Streptococcus* isolates from bovin mastitis in Inner Mongolia [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2015, 35(3): 477-483
- [14] 傅江涛,贾林军,柳旭伟.昌吉地区致奶牛乳房炎链球菌的调查与分析[J].黑龙江畜牧兽医,2015,5:98-100
FU Jiang-tao, JIA Lin-jun, LIU Xu-wei. Investigation and analysis of *Streptococcus* isolates from bovin mastitis in Chang Ji area [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2015, 5: 98-100
- [15] Pamela L Ruegg. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention [J]. *Dairy Sci.*, 2017, 100: 10381-10397
- [16] Yuexia Ding, Junli Zhao, Xiuling He, et al. Antimicrobial resistance and virulence-related genes of *Streptococcus* obtained from dairy cow with mastitis in Inner Mongolia, China [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2016, 54(1): 162-167
- [17] 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): 875-880
LIU Qi, WANG Qiu-dong, CUI Biao, et al. Molecular epidemiology and characteristics of *Streptococcus* of dairy cow in Inner Mongolia area [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 39(11): 875-880