奶山羊乳腺炎金黄色葡萄球菌分离鉴定与耐药性检测
——以山东聊城为例

亓爱杰[1]，李 莹[2]，李路胜[3]

1 阳谷县畜牧兽医事业发展中心，山东阳谷 252300
2 聊城市畜牧兽医事业发展中心，山东聊城 252800
3 聊城大学农学院，山东聊城 252800

摘 要：[目的]为了解山东省聊城市奶山羊乳腺炎金黄色葡萄球菌（*S.aureus*）流行现状及其耐药基因分布情况。[方法]采集山东省聊城市部分奶山羊场178 份乳样，通过细菌培养、血浆凝固酶试验和PCR生物学技术进行分离鉴定*S.aureus*，分析分离菌株耐药性。[结果]鉴定出23 株*S.aureus*，检出率为12.92%；分离菌株对青霉素、强力霉素、链霉素、克拉霉素和四环素耐药性较强；耐药基因PCR检测发现，10 种耐药基因均有检出。其中，β–内酰胺类耐药基因mecA，大环内酯类耐药基因ermA、ermB、ermC，四环素类耐药基因tet，氨基糖苷类耐药基因aac（6'）–Ⅰa、aph（2"）–Ⅰb、ant（4'，4"）、aph（3'）–II，磺胺类耐药基因sul1平均携带率分别为30.43%、31.88%、43.48%、21.73%、8.70%，所有菌株至少携带2 种耐药基因，最多7 种耐药基因，以携带4～5 种耐药基因菌株数量最多。[结论]山东省聊城市奶山羊场存在*S.aureus*流行传播风险，且菌株表现不同程度的耐药性，耐药基因携带率较高，应引起重视，加强监测和防控。

关键词：金黄色葡萄球菌（*S.aureus*）；分离鉴定；药敏试验；耐药基因

文章编号：1671–4393（2025）07–0071–07　　DOI:10.12377/1671–4393.25.07.12

中国乳业线上阅读

0 引言

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*，*S.aureus*）是一种革兰氏阳性菌，普遍存在于人和动物的皮肤或黏膜上，与许多疾病有关。在奶山羊养殖中，*S.aureus*是导致奶山羊严重乳腺炎的主要原因[1]，给奶山羊养殖造成重大经济损失，因为它

作者简介：亓爱杰（1978–），女，山东阳谷人，本科，高级兽医师，研究方向为动物疫病防控；
李 莹（1981–），女，山东聊城人，本科，高级兽医师，研究方向为动物疫病防控；
李路胜（1974–），男，山东聊城人，硕士，副教授，研究方向为畜牧兽医。

对羊奶质量产生不利影响，降低羊奶产量，并增加疾病传播、治疗以及扑杀风险。全球奶山羊亚临床乳腺炎患病率5%～50%，据报道中国为45.82%[2]。由此可见，奶山羊乳房炎已成为山羊养殖场最常见的疾病之一。兽医临床上对奶山羊乳腺炎的预防和控制主要以抗生素为主，但是长期使用或者滥用抗生素导致病原菌的耐药性增强，抗生素容易在羊奶中残留，造成严重的食品安全问题。

本文以山东省聊城市部分奶山羊饲养场为研究对象，采集奶样进行*S.aureus*分离鉴定及其耐药性分析，并测试9 种中草药对*S.aureus*的体外抗菌效果，为防治奶山羊乳腺炎提供参考。

1 材料与方法

1.1 奶样采集

2023年8—10月在山东省聊城市部分县（区、市）奶山羊养殖场无菌采集奶样178 份，50 mL/份，奶样标记采样基本信息，装入塑料冰盒保存送检。

1.2 主要试剂和仪器

7.5%氯化钠肉汤、血琼脂平板、LB培养基、Baird-Parker琼脂平板（BP）、胰蛋白胨大豆肉汤（TSB）、脑心浸液肉汤（BHIB）培养基，青岛海博生物技术有限公司；2×Taq Master Mix、DL2000 DNA Marker，天根生化科技（北京）有限公司；细菌基因组DNA提取试剂盒、ProFlex™ PCR仪，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；药敏纸片，杭州贝帮生物科技有限公司；DYCZ-20F电泳仪、WD-9413D型一体式凝胶成像系统，北京六一生物科技有限公司。

1.3 细菌分离培养

吸取25 mL奶样，倒入含有225 mL的7.5%氯化钠肉汤的锥形瓶，荡混匀，37 ℃增菌培养18～24 h，分别划线接种于血琼脂平板和Baird-Parker琼脂平板，37 ℃培养24～36 h。挑起单个可疑菌落革兰氏染色镜检，显微镜观察分离菌表型特征，并进行血浆凝固酶试验，同时设生理盐水对照和阳性对照（*S.aureus*菌株ATCC 25923）。

1.4 细菌分子生物学鉴定

将单个典型菌落接种于胰蛋白胨大豆肉汤，37 ℃水浴振荡培养12 h以进一步纯化培养，利用细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌DNA，以此为PCR扩展模板，根据已发表*S.aureus*热稳定性核酸酶基因nuc序列设计合成引物[3]，见表1。PCR反应体系：2×Taq Master Mix 10 μL、上、下游引物（10 μmol/L）各1 μL、DNA模板0.5 μL，补足ddH_2O至25 μL。PCR 运行程序：95 ℃ 5 min，95 ℃ 25 s，56 ℃ 20 s，72 ℃ 50 s，共35 个循环；最后，72 ℃终延伸8 min。反应结束后，4 ℃保存，PCR扩增产物用溴化乙锭染色的1.5%琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳后，凝胶成像系统观察记录结果。

1.5 耐药基因检测

参考文献[4，5]设计*S.aureus*耐药基因引物，包括β-内酰胺类mecA，大环内酯类ermA、ermB和ermC，四环素类tet，氨基糖苷类aac（6'）-Ⅰa、aph（2"）-Ⅰb、ant（4'，4"）、aph（3'）-III和磺胺类sul1，各类引物由金唯智生物（北京）科技有限公司合成，序列及其他信息见表1。PCR检测23 株S.aureus分离菌10 种耐药基因携带情况。PCR体系25 μL：12.5 μL 2×Taq Master Mix、1 μL上、下游引物（10 μmol/L）、0.5 μL DNA模板，11.0 μL ddH_2O。PCR运行程序：94 ℃ 10 min，94 ℃ 30 s，55 ℃ 25 s，72 ℃ 3 min，共35 个循环；72 ℃终延伸10 min。扩展产物用1 %琼脂糖凝胶电泳检测，阳性产物送上海生工生物工程有限公司测序，将测序结果序列在GenBank数据库中进行DNA序列BLAST比对分析。

1.6 药敏试验

采用美国临床实验室标准委员会（CLSI-2018）[6]

中国乳业线上阅读

表 1 本研究涉及引物生物信息

基因	序列（5’→3’）	产物大小（bp）	退火温度（℃）	鉴定用途
nuc	F：GCGATTGATGGTGATACGGGT R：AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	270	56	S.aureus
mecA	F：ACTGCTATCCACCCTCAAAC R：CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	533	54	耐药基因
ermA	F：TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA R：CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	643	52	耐药基因
ermB	F：GAAAAGGTACTCAACCAAATA R：AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	635	53	耐药基因
ermC	F：TCAAAACATAATATAGATAAA R：GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	640	55	耐药基因
sul1	F：CATTGCCTGGTTGCTTCAT R：ATCCGACTCGCAGCATTT	238	54	耐药基因

发布的K-B药敏纸片法，对鉴定的*S.aureus*进行15 种抗生素耐药性试验，将分离菌纯培养液接种于TSB，37 ℃过夜培养，调整菌液浓度为0.5 麦氏单位，均匀涂布于LB培养基，然后使青霉素等14 种药敏纸片平贴于培养基表面，37 ℃培养18 h，测量抑菌圈直径，分别判定耐药、中介、敏感。

2 结果

2.1 细菌分离培养

共有23 株分离菌在Baird-Parker琼脂平板形成表型特征为光滑、湿润、中部黑色、灰白色边缘的圆形菌落。在血平板上的形态特征为金黄或白色菌落，光滑，周围有溶血现象。镜检发现菌株为葡萄状排列、紫色的革兰氏阳性菌。血浆凝固酶试验为阳性。判定分离菌株为*S.aureus*。

2.2 细菌分子生物学鉴定

利用*S.aureus*特异性引物对23 株分离菌株nuc基因进一步PCR鉴定，得到大小为270 bp的PCR扩增阳性产物，符合预期目的条带（图1），证实为*S.aureus*。分离率为12.92%（23/178）。

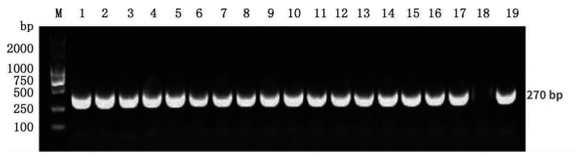


图 1 部分 *S.aureus* nuc 基因 PCR 扩增产物电泳图

M：DNA 2 000 Marker，1～17：部分*S.aureus*菌株，18：阴性对照，19：阳性对照

2.3 药敏性检测

采用K-B药敏纸片法对23 株*S.aureus*进行15 种抗生素耐药性检测，结果显示，菌株对青霉素（69.57%）、强力霉素（65.22%）、链霉素（60.87%）、克拉霉素（52.17%）和四环素（56.52%）耐药性较强，对其他药物耐药率较低，（17.39%～39.13%）。除磺胺类耐药率较低外，其他几类抗生素的表型耐药率差别不大。具体见表2。

多重耐药率（耐3 种及3 种以上定义为多重耐药）分析，23 株*S.aureus*耐药种类为1～7 种，其中耐3～4 种菌株最多（均为6 株），耐5、6、7 种菌株分别为3、2、1 株，因此，18 株为多重耐菌株，多重耐药率为78.26%。表明*S.aureus*存在较高的多重耐药性。

2.4 细菌携带耐药基因检测

结果显示，23 株*S.aureus*均能扩增出特异性目的片段，且阳性基因序列同源性在95%以上，表明阳性产物目的基因符合本研究测定目的基因。统计检测结果显示，β-内酰胺类耐药基因mecA，大环内酯类耐药基因ermA、ermB、ermC，四环素类耐药基因tet，氨基糖苷类耐药基因aac（6'）-Ⅰa、

中国乳业线上阅读

表 2 23 株 *S.aureus* 对 15 种抗生素耐药性检测结果

抗生素类		菌株数（株）			耐药率（%）	表型耐药率（%）
		耐药	中介	敏感		
β－内酰胺类	青霉素	16	4	3	69.57	40.22
	头孢氨苄	7	5	11	30.43	
	氨苄西林	9	12	2	39.13	
	头孢西丁	5	4	14	21.74	
大环内酯类	克拉霉素	12	5	6	52.17	38.04
	阿奇霉素	8	7	8	34.78	
	罗红霉素	9	6	8	39.13	
	红霉素	6	2	15	26.09	
四环素类	强力霉素	15	8	0	65.22	53.62
	四环素	13	6	4	56.52	
	土霉素	9	1	13	39.13	
氨基糖苷类	庆大霉素	8	5	10	34.78	39.13
	链霉素	14	0	9	60.87	
	阿米卡星	5	3	15	21.74	
磺胺类	复方新诺明	4	2	17	17.39	17.39

注：表型耐药率=同类药物所有菌株耐药率之和/同类药物数

表 3 23 株 *S.aureus* 携带耐药基因情况

抗生素类	耐药基因	阳性菌株数（株）	耐药基因携带率（%）	耐药基因平均携带率（%）	耐药基因与表型耐药相符率（%）
β－内酰胺类	mecA	7	30.43（7/23）	30.43	75.65
大环内酯类	ermA	8	34.78（8/23）	31.88	83.81
	ermB	5	21.74（5/23）		
	ermC	9	39.13（9/23）		
四环素类	tet	10	43.48（10/23）	43.48	81.09
氨基糖苷类	aac（6’）－Ⅰa	3	13.04（3/23）	21.73	55.53
	aph（2’’）－Ⅰb	4	17.39（4/23）		
	ant（4’，4’’）	6	26.09（6/23）		
	aph（3’）–III	7	30.43（7/23）		
磺胺类	sul1	2	8.70（2/23）	8.70	50.03

注：耐药基因与表型耐药相符率=耐药基因平均携带率/表型耐药率

aph（2''）－Ⅰb、ant（4'，4''）、aph（3'）–III，磺胺类耐药基因sul1平均携带率分别为30.43%、31.88%、43.48%、21.73%、8.70%。分析耐药基因与表型耐药两者之间关系，可见大环内酯类耐药基因型与表型耐药的相符率最高（83.81%），磺胺类最低（50.03%）。见表3。多重耐药基因检测

中国乳业线上阅读

结果显示，所有菌株至少携带2 种耐药基因、最多7 种耐药基因，以携带4～5 种耐药基因菌株数量最多。

3 讨论

*S.aureus*是一种重要的人畜共患病原体，在世界范围内分布。由于毒力因子广谱且能够产生抗生素耐药性，*S.aureus*感染导致高发病率和死亡率。在人类中，*S.aureus*通常与皮肤和软组织感染、血管内感染、肺炎、化脓性关节炎、心内膜炎、骨髓炎和败血症有关[7]。*S.aureus*在动物体内的定殖一直受到广泛关注，严重威胁公共卫生安全，因为动物可能成为人类感染耐甲氧西林*S.aureus*的储存库[8]，威胁人类健康。虽然多种细菌病原体可引起乳腺炎，但*S.aureus*是小反刍动物乳腺炎的主要病原体之一，乳房是*S.aureus*的主要储存库[9, 10]。本文对山东省聊城市部分奶山羊场178 份乳样，通过细菌培养、血浆凝固酶试验和PCR生物学技术进行鉴定出23株*S.aureus*，检出率为12.92%。杨雪娇等[11]从40 份奶山羊乳房炎乳样中分离并鉴定出14 株*S.aureus*，检出率为35.00%。何冰梅等[12]报道，西藏仲巴县帕江乡羊场*S.aureus*的检出率为16.24%。推测不同地方*S.aureus*流行分布存在差异可能与饲养管理、地理环境、动物生理阶段和试验方法等密切相关。此外，本研究针对*S.aureus*的nuc特异性基因设计引物，因为nuc是*S.aureus*特有毒力基因，且在不同菌株之间具有较高的保守性，同时不需要测序，缩短细菌鉴定时间和成本，所以可以作为特定的靶标基因用于*S.aureus*鉴定[13]。本研究结果表明，山东省聊城市奶山羊存在*S.aureus*流行，构成潜在的公共卫生风险，应加强监测，采取综合防控技术措施。

用于治疗乳腺炎的主要抗生素类别是β－内酰胺类、四环素类、喹诺酮类、磺胺类等[11]。然而，随着抗生素广泛使用，*S.aureus*通过改变表型、调节代谢途径、水平转移耐药质粒等方式获得对多种抗生素的耐药性。本研究分离鉴定所得的所有*S. aureus*对15 种抗生素具有不同程度耐药性，其中，对青霉素类、强力霉素、链霉素、克拉霉素和四环素耐药性较强，耐药率均在50.00%以上，多重耐药率为78.26%。与杨雪娇等[11]、何冰梅等[12]报道的结果存在差异，而与王巧梅等[14]报道的*S.aureus*耐药性结果基本一致。Ning等[15]从湖南省长沙等地奶牛场681 份原料奶样品中分离出76 株*S.aureus*，多重抗菌药物耐药率为26.75%，分离菌株对青霉素耐药率最高，对其他药物表现不同程度耐药性。不同地方研究结果显示，*S.aureus*耐药性可能与临床用药习惯、菌株致病力、样本来源等有关。因此，科学合理用药、轮换用药和加强临床分离菌的耐药性监测有助于提高抗生素治疗效果，降低细菌耐药性。

本研究耐药基因检测结果显示，10 种耐药基因在分离菌株中均匀分布，所有菌株至少携带2 种耐药基因、最多7 种耐药基因。同时，分析对比耐药基因与耐药表型之间的关系，四环素类耐药性最高，而其耐药基因与表型耐药相符率仅次于大环内酯类，其两者之间表现一定的差异，推测原因是表型耐药性不是细菌遗传获得引起，生物膜或多药外排泵在细菌耐药性中为主导地位[16]。甲氧西林耐药性是由mecA基因获得引起。该基因编码一种称为PBP2A的替代青霉素结合蛋白，它对 β－内酰胺抗生素具有低亲和力。*S.aureus*对β－内酰胺抗生素表现明显耐药性，可能因为*S.aureus*产生β－内酰胺酶，该酶会分解药物的β－内酰胺环。*S.aureus*形成生物膜与抗生素敏感性降低有关[17]。红霉素耐药性主要由erm基因引起，而四环素类耐药性由tet基因编码[18]。

4 结论

在本研究条件中，山东省聊城市奶山羊*S.aureus*检出率为12.92%，所有检出的*S.aureus*对15 种抗生素表现不同程度耐药性，携带多种耐药基因，表明普遍存在耐药性。本研究结果为当地制定奶山羊乳腺炎防治方案提供临床资料。

中国乳业杂志社版权所有

参考文献

[1] Rainard P，Gitton C，Chaumeil T，et al.Host factors determine the evolution of infection with *Staphylococcus aureus* to gangrenous mastitis in goats[J].Veterinary Research，2018，49（1）：1–17.

[2] Liu X Q，Zuo J R，Teng J，et al.Antibiofilm potential of luteolin against multidrug–resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dairy goats and farm environments[J].Environmental Pollution，2023，335：122274.

[3] Yang Y，Su X D，Yuan Y W，et al.Detection of *Staphylococcus aureus* in dairy products by polymerase chain reaction assay[J].Agricultural Sciences in China，2007，6（7）：857–862.

[4] 杜伟伟.河北省乳源金黄色葡萄球菌耐药性检测及耐药基因的研究[D].保定：河北农业大学，2015.

[5] 刘慧敏.我国奶业主产区生鲜乳中金黄色葡萄球菌耐药性及分子特征研究[D]. 北京：中国农业科学院，2018.

[6] CLSI.Performance standards for antimicrobial susceptibility testing；Twenty–second informational supplement[S]. Pennsylvania，USA：Clinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）.Document M100–S22.2018.

[7] Tong S Y C，Davis J S，Eichenberger E，et al.Staphylococcus aureus infections：Epidemiology，pathophysiology，clinical manifestations，and management[J].Clinicl Microbiology Reviews，2015，28（3）：603–661.

[8] 黄雨婷，杨华，周炜，等.2007至2020年浙江省动物源细菌耐药性监测进展[J].畜牧与兽医，2022，54（5）：146–152.

[9] Andrade N C，Laranjo M，Costa M M，et al.Virulence factors in *Staphylococcus* associated with small ruminant mastitis：Biofilm production and antimicrobial resistance genes[J]. Antibiotics（Basel），2021，10（6）：633.

[10] Karzis J，Petzer I M，Naidoo V.The spread and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* in South African dairy herds：A review[J].Onderstepoort Journal of Veterinary Research，2021，88（1）：e1–e10.

[11] 杨雪娇，王一涵，项勋，等.奶山羊隐性乳房炎金黄色葡萄球菌的分离鉴定及毒力基因的检测[J].中国兽医科学，2024，54（5）：650–657.

[12] 何冰梅，马弘财，德吉.扎布耶盐山羊金黄色葡萄球菌分离鉴定及药敏试验[J].畜牧与饲料科学，2018，39（11）：107–109.

[13] 廖光华，代佳君，邓钰湜，等.基于nuc基因的奶牛乳房炎性金黄色葡萄球菌PCR检测方法的建立[J].塔里木大学学报，2019，31（4）：7–11.

[14] 王巧梅，王子杰，操义恒，等.一株分离于生鲜乳的金黄色葡萄球菌毒力与耐药性分析[J].中国奶牛，2024（6）：32–36.

[15] Ning K M，Zhou R S，Li M X.Antimicrobial resistance and molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk in Hunan Province[J].Peer J，2023，11：e15847.

[16] 马晓姣，赵艳坤，邵伟，等.新疆部分地区生乳中金黄色葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析[J].中国畜牧兽医，2023，50（2）：789–797.

[17] Fenta M D，Tafere F A，Mebratu A S，et al.Quarter–wise proportion and beta–lactam resistance rate of bovine mastitis associated–*Staphylococcus aureus* among infectious episodes in Ethiopia：Systematic review and meta–analysis[J].Heliyon，2023，9（7）：e18180.

[18] Rusenova N，Vasilev N，Rusenov A，et al.Comparison between some phenotypic and genotypic methods for assessment of antimicrobial resistance trend of bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from Bulgaria[J].Veterinary Sciences，2022，9（8）：401.

Identification and Drug Resistance Analysis of *Staphylococcus aureus* from Dairy Goat Mastitis--A Case Study of Liaocheng, Shandong Province

QI Aijie[1]，LI Ying[2]，LI Lusheng[3]

[1]Yanggu County Animal Husbandry and Veterinary Development Center，Yanggu Shandong 252300

[2]Liaocheng City Animal Husbandry and Veterinary Development Center，Liaocheng Shandong 252800

[3]Agricultural College of Liaocheng University，Liaocheng Shandong 252800

下转83页

中国乳业线上阅读

Yicheng Animal Husbandry and Veterinary Workstation，Yishui County，Linyi Shandong 276400

Abstract：Common abomasum diseases in dairy cows include abomasum food accumulation，abomasum gastritis，abomasum displacement，etc.The loss of appetite and rumination of sick dairy cows cause abomasum，epigastrium secret knot and rumen gas，which seriously affects production performance and service life.In order to improve the prevention and treatment effect of common abomasum diseases in dairy cows，this paper summarized the causes，clinical symptoms，diagnosis and treatment methods of these diseases，in order to help the healthy breeding of dairy cows in pasture.

Keywords：cow；abomasum food accumulation；wrinkled gastritis；displacement of abomasum；prevent and cure

▲上接76页

Abstract：[Objective]In order to understand the distribution of *Staphylococcus aureus*（*S.aureus*） and its drug resistance genes from dairy goat mastitis.[Method]178 milk samples were collected from some dairy goat farms in Liaocheng city，Shandong Province，and *S.aureus* was isolated and identified by bacterial culture，plasma coagulase test and PCR biological technology，and the drug resistance of the isolated strains was further analyzed.[Result]23 strains of *S.aureus* were identified，and the detection rate was 12.92%.The results of drug sensitivity test showed that the isolated strains were resistant to penicillin，doxycycline，streptomycin，clarithromycin and tetracycline.PCR detection of drug resistance genes showed that 10 kinds of drug resistance genes were detected，including β-lactam drug resistance gene mecA，macrolide drug resistance genes ermA，ermB，ermC，tetracycline drug resistance gene tet，aminoglycoside drug resistance genes AAC（6'）-1A，APH（2"）-1B，ant（4'，4"）.β-lactam resistance gene mecA, macrolide resistance genes ermA, ermB, ermC, tetracycline resistance gene tet, aminoglycoside resistance genes aac（6'）-Ⅰa, aph（2"）-Ⅰb, ant（4',4"）, aph（3'）-III, and sulfonamide resistance gene sul1 had average carriage rates of 30.43%, 31.88%, 43.48%, 21.73%, and 8.70%, respectively.All strains carried at least 2 kinds of drug resistance genes and up to 7 kinds of drug resistance genes，with the largest number of strains carrying 4～5 kinds of drug resistance genes.[Conclusion]The results suggested that there was a risk of *S.aureus* epidemic transmission in Liaocheng city dairy goat farms，Shandong Province，and the strains showed different degrees of drug resistance，and the drug resistance gene carrying rate was high，which should be paid attention to and strengthened monitoring and prevention.

Keywords：*Staphylococcus aureus*（*S.aureus*）；separation and identification；drug sensitivity test；drug resistance gene

中国乳业线上阅读