奶牛临床型乳房炎主要致病菌的分离鉴定及综合防控
——以新疆某规模牧场为例

蔡锦纯，李永健，焦陇玲，张润泽，周　明，齐亚银*

石河子大学动物科技学院，新疆石河子 832003

摘　要：[目的]明确新疆某规模化牧场奶牛临床型乳房炎的主要致病菌种类及其耐药性，为制定针对性防控措施提供科学依据。[方法]无菌采集15 头患病奶牛的乳汁样本，通过细菌分离纯化、形态学观察、生理生化鉴定及16S rRNA分子鉴定确定病原菌种类，并采用K-B药敏试验检测其对12 种常用抗生素的敏感性。[结果]共分离出21 株细菌，其中大肠杆菌11 株（52.38%）、金黄色葡萄球菌7 株（33.33%）和链球菌3 株（14.28%）。药敏试验显示，大肠杆菌对阿莫西林、克林霉素等完全耐药，对庆大霉素、恩诺沙星中度敏感；金黄色葡萄球菌对多粘菌素耐药，但对其他抗生素高度敏感；链球菌对四环素、恩诺沙星等高度敏感。混合菌药敏试验表明，恩诺沙星、氧氟沙星和四环素抑菌效果最佳。[结论]该牧场奶牛乳房炎主要由大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和链球菌混合感染引起，推荐使用恩诺沙星、氧氟沙星和四环素进行治疗，同时结合定期检测、环境改善和科学消毒等综合措施，可有效防控乳房炎的发生与传播。

关键词：奶牛；乳房炎；病原菌；抗生素；综合防控

文章编号：1671-4393（2025）07-0084-06　　DOI:10.12377/1671-4393.25.07.14

0 引言

乳房炎是奶牛养殖业中最常见的疾病，多由环境管理不当、病原菌感染、牛产次过多等因素引起。由于疫苗效果不佳、细菌耐药性强等原因，奶牛乳房炎防控难度大，严重影响奶牛养殖户和牧场的经济效益，也是相关食物产品残留抗生素等兽药

基金项目：国家自然科学基金资助项目（32460898，31760737）；兵团农业关键核心技术攻关项目（2023AA310）；天山英才（2024D14009，“三农骨干人才-2024-97”）

作者简介：蔡锦纯（2000-），女，广东汕头人，硕士，研究方向为预防兽医学；
李永健（1999-），男，山东青岛人，硕士，研究方向为动物临床诊断与防控技术；
焦陇玲（2000-），女，新疆哈密人，在读硕士，研究方向为预防兽医学；
张润泽（2001-），男，新疆奎屯人，硕士，研究方向为兽医临床诊断与防控技术；
周　明（2000-），男，安徽淮北人，硕士，研究方向为预防兽医学。
*通信作者：齐亚银（1980-），男，宁夏隆德人，博士，教授，研究方向为预防兽医学。

中国乳业线上阅读

的主要原因。奶牛乳房炎大多发生在泌乳期，尤其是泌乳的第1个月、干奶早期及接近产犊时，细菌大量进入乳房，迅速增殖引起感染[1]。且在生产过程中，挤奶频繁，乳房长时间遭受挤压，机器负压过高或抽动过快，都会引起乳房皮肤与黏膜损伤。奶牛免疫细胞数下降，更易遭受细菌等病原体侵扰[4]。奶牛乳房炎诱因多样，细菌、病毒、支原体均可诱发[2]，其中细菌感染最普遍。引起奶牛乳房炎的主要病原菌为金黄色葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌，在奶牛乳房炎病例中占比约90%。因金黄色葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌在环境中广泛存在、致病力强、血清型多样、具有多重耐药性，奶牛乳房炎的防控难度巨大，防控方案需不断完善更新。现阶段我国奶牛养殖场仍以抗生素治疗为主要方法，因此精准鉴定奶牛乳房炎致病菌，了解其耐药性等，对科学指导临床用药和减少耐药菌的产生有重要意义。

本研究以新疆某规模牧场为例，采集奶牛乳房炎病例奶样，运用常规微生物学方法，分离鉴定奶样中存留菌种，进行药敏试验，得出治疗方案，帮助该牧场迅速抑制奶牛乳房炎蔓延。

1 试验材料和仪器设备

1.1 样品采集

奶样来自新疆某规模化牧场，从15 头患临床奶牛乳房炎的泌乳期奶牛中采集。

1.2 试剂和仪器

5%绵羊血琼脂培养基、LB培养基、高盐甘露醇琼脂培养基、伊红美蓝培养基，青岛高科园海博生物科技有限公司；脑心浸出液肉汤培养基，南京诺维赞生物科技有限公司；革兰氏染色液，海贝索生物技术有限公司；药敏纸片，杭州微生物试剂有限公司；生化鉴定管，杭州滨和微生物试剂有限公司

超净工作台，上海博讯实业有限公司；倒置显微镜，上海徐来卡显微镜系统贸易有限公司；恒温培养箱，北京市永光明医疗仪器厂；PCR扩增仪，Techne公司；电泳仪，北京市六一仪器厂；凝胶成像系统厂，Biarad公司。

2 方法

2.1 样品采集

选取临床奶牛乳房炎症状典型的泌乳期病牛，无菌条件下采集患病乳区鲜奶样品5～15 mL离心管中，置4 ℃环境保存。

2.2 细菌分离纯化

在超净工作台中，取300 μL奶样加至LB肉汤培养基中恒温培养18～24 h。然后将菌划线接种至LB固体琼脂平板上恒温培养12 h。待菌落长成，挑取合适的单菌落，置于LB液体培养基培养24 h。革兰氏染色后，在显微镜下观察细菌形态及染色特性，初步判断细菌类型与纯度。重复以上步骤直至菌种纯化。纯化完成后，将细菌接种至伊红美蓝培养基、高盐甘露醇琼脂培养基、5%绵羊血琼脂培养基。

2.3 形态学观察

将菌液均匀涂抹在载玻片上，革兰氏染色后，置于显微镜下观察菌落、菌体形态

2.4 PCR 鉴定

菌种分离纯化后，采用特异性引物进行PCR反应。PCR反应体系与反应程序见表1、表2、表3。

2.5 药敏试验

用K-B药敏试验法进行分离菌的药敏试验。药敏纸片包括：阿莫西林、克林霉素、庆大霉素、新霉素、四环素、多粘菌素、链霉素、恩诺沙星、氧氟沙星、复方新诺明、红霉素、万古霉素。将分离菌接种于LB液体培养基，培养至对数期，取100 μL分离菌液均匀涂布于LB固体培养基，用无菌镊子夹取药敏纸片贴在培养基表面，37 ℃静置培养

中国乳业线上阅读

表 1 分离菌的特异性 PCR 引物序列

菌种	特异性引物	引物序列
金黄色葡萄球菌	F	ATGGTTTTGGTAGAATTG–GTCGTTTA
	R	GACATTTCGTTATCATAC–CAAGCTG
链球菌	F	GAAGAGT–CATCTAGTTTAGAATACGAT
	R	AGAGAGTTGTCACTTGCG–CGTTTGATTGCT
大肠杆菌	F	GCCTCGCCTGGAGAATGA
	R	CCTGAGACTGCGGTGGAA

表 2 分离菌的 PCR 反应体系

试剂	20 μL 体系
2 × Taq PCR Master Mix	10
上游引物	1
下游引物	1
模板	2
超纯水	6

表 3 分离菌的 PCR 反应程序

程序	温度（℃）	时间
预变性	95	5 min
变形	94	30 s
退火	55	30 s
延伸	72	45 s
彻底延伸	72	7 min
保存	4	~

16 h。测量抑菌圈直径，根据美国临床实验室标准委员会（Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI）标准判定结果，判定分离菌对不同药物的敏感性。

3 结果与分析

对采集的患乳房炎奶牛的奶样进行细菌分离，挑取菌落进行纯化，以及各种生物学特性鉴定，结果显示，共分离21 株细菌，其中金黄色葡萄球菌7 株（33.33%）、链球菌3 株（14.28%）和大肠杆菌11 株（52.38%）。

3.1 分离菌的形态学结果

菌落形态特征：图1金黄色葡萄球菌在高盐甘露醇琼脂培养基上形成光滑、湿润、黄色、圆形、外围有粉色晕环的菌落，大肠杆菌在伊红美蓝培养基上形成带有蓝绿色金属光泽的菌落，链球菌在5%绵羊血琼脂培养基上形成灰白色、圆形、湿润的小菌落。

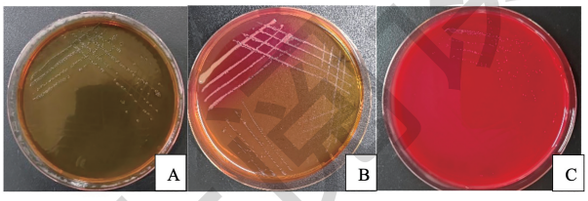


图1 分离菌大肠杆菌（A）、金黄色葡萄球菌（B）、链球菌（C）

菌体形态特征：革兰氏染色后，显微镜下观察。图2（A）细菌呈阳性，排列成葡萄串状，个别2 个或3 个相连，疑似为金黄色葡萄球菌。图2（B）细菌呈阴性，链状排列，疑似为链球菌。图2（C）细菌呈阴性，长杆状，单独存在或成对出现，疑似为大肠杆菌。

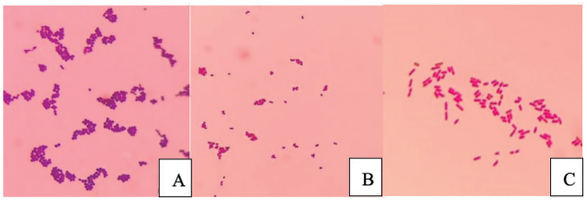


图2 分离菌金色葡萄球菌（A）、链球菌（B）、大肠杆菌（C）

3.2 分离菌生化特性鉴定

试验结果见表4，符合大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌生化特性。

3.3 PCR 鉴定结果

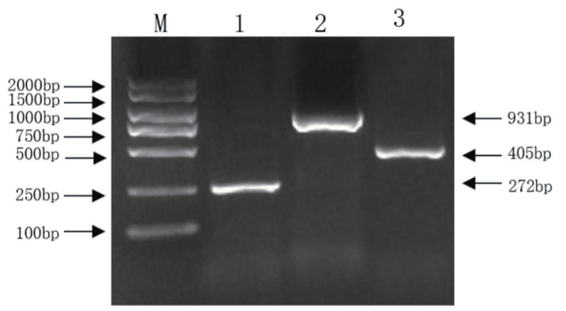
3 种分离菌扩增片段与目的条带大小一致，经GenBank对比，基因与NCBI数据库多数金黄色葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌基因同源率高达98%以上，因此确定该菌为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌。

中国乳业线上投稿

表 4 分离菌生化特性鉴定

菌种	项目	结果	菌种	项目	结果	菌种	项目	结果
大肠杆菌	VP 试验	–	金黄色葡萄球菌	VP 试验	+	链球菌	VP 试验	+
	葡萄糖	+		葡萄糖	+		乳糖	+
	蔗糖	+		精氨酸	+		精氨酸	+
	乳糖	+		蔗糖	+		马尿酸钠	+
	甘露醇	+		甘露醇	+		七叶苷	+

注：“+”为阳性，“–”为阴性



M为DL.2 000 DNA Marker；1–3分别为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌的PCR扩增结果

图 3 分离菌的 PCR 扩增结果

3.4 分离菌药敏试验结果

从分离鉴定得到的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌中各筛选一株细菌进行药敏试验，结果见表5。

药物敏感性试验结果显示，在12 种常用抗生素中，大肠杆菌对阿莫西林、克林霉素、四环素、链霉素、红霉素、万古霉素均表现100%耐药性，对新霉素、多粘菌素中度敏感，对庆大霉素、恩诺沙星、氧氟沙星、复方新诺明高度敏感。金黄色葡萄球菌对多粘菌素耐药，对克林霉素、链霉素、万古霉素中度敏感，对阿莫西林、庆大霉素、新霉素、四环素、恩诺沙星、氧氟沙星、复方新诺明、红霉素高度敏感。链球菌对阿莫西林、庆大霉素、多粘菌素、链霉素、复方新诺明中度敏感，对克林霉素、新霉素、四环素、恩诺沙星、氧氟沙星、红霉素、万古霉素高度敏感。

3.5 混合菌药敏试验结果

将奶样混合后涂布于平板，选取具有代表性的

表 5 分离菌药敏试验结果

药物名称	菌种					
	大肠杆菌		金黄色葡萄球菌		链球菌	
	抑菌圈平均直径(mm)	敏感程度	抑菌圈平均直径(mm)	敏感程度	抑菌圈平均直径(mm)	敏感程度
阿莫西林	0	R	32	S	13	I
克林霉素	0	R	15	I	25	S
庆大霉素	23	S	24	S	12	I
新霉素	16	I	21	S	20	S
四环素	0	R	28	S	20	S
多粘菌素	14	I	9	R	11	I
链霉素	0	R	13	I	15	I
恩诺沙星	22	S	26	S	21	S
氧氟沙星	22	S	28	S	20	S
复方新诺明	20	S	23	S	18	I
红霉素	0	R	25	S	23	S
万古霉素	0	R	15	I	20	S

注：R为耐药，I为中度敏感，S为高度敏感

中国乳业线上阅读

抗生素再次进行药敏试验。如表6所示，混合菌种对四环素、恩诺沙星，氧氟沙星高度敏感，对阿莫西林、庆大霉素、林可霉素中度敏感，多粘菌素、复方新诺明耐药。

表 6 混合菌药敏试验结果

药物种类	药物名称	抑菌圈平均直径（mm）	敏感程度
β－内酰胺类	阿莫西林	15	I
氨基糖苷类	庆大霉素	17	I
四环素类	四环素	25	S
多肽类	多粘菌素	10	R
喹诺酮类	恩诺沙星	23	S
	氧氟沙星	23	S
磺胺类	复方新诺明	10	R
林可酰胺类	林可霉素	17	I

注：R为耐药，I为中度敏感，S为高度敏感。

4 讨论

奶牛乳房炎是影响奶牛养殖业的重要疾病之一，其发病率和病原菌分布因地区、牧场管理及环境条件而异。本研究通过对新疆某规模化牧场临床型乳房炎病例的病原菌分离鉴定和药敏试验，发现主要致病菌为大肠杆菌（52.38%）、金黄色葡萄球菌（33.33%）和链球菌（14.28%），与国内外相关研究结果基本一致[3，6]。

4.1 病原菌分布与耐药性分析

本研究发现，大肠杆菌对阿莫西林、克林霉素等抗生素表现出完全耐药性，而对庆大霉素、恩诺沙星等药物中度敏感。这一结果与赵敏等[8]在河南地区的研究相似，表明大肠杆菌的耐药性问题日益严重，可能与抗生素滥用及耐药基因的水平传播有关。金黄色葡萄球菌对多粘菌素耐药，但对其他抗生素（如恩诺沙星、氧氟沙星）高度敏感，与罗阳等[3]在湖南地区的研究结果一致。链球菌对四环素类及喹诺酮类药物高度敏感，提示此类药物可作为临床治疗的首选。

4.2 临床用药建议

基于药敏试验结果，本研究推荐使用恩诺沙星、氧氟沙星和四环素进行治疗。喹诺酮类药物（如恩诺沙星）具有广谱抗菌活性、组织穿透力强及低耐药性等优势，适合乳房炎的治疗[1，7]。此外，四环素类药物在乳腺组织中分布广泛，可有效抑制病原菌增殖[2]。值得注意的是，不同地区的耐药性存在差异，如湖南地区的金黄色葡萄球菌对环丙沙星高度敏感[3]，而本研究中链球菌对同类药物（氧氟沙星）也表现出较高敏感性，提示需结合本地药敏数据制定精准用药方案。

4.3 综合防控措施

除抗生素治疗外，牧场管理在乳房炎防控中至关重要。研究建议：（1）定期检测隐性乳房炎，早发现、早干预[4]；（2）优化挤奶流程，确保设备清洁及操作规范，减少病原菌传播[7]；（3）改善牛舍环境，如保持卧床干燥、加强消毒，降低环境性病原菌的感染风险[6]；（4）干奶期科学用药，如使用长效抗生素或乳头封闭剂，预防新感染[4]。此外，补充维生素A、E和硒可增强奶牛免疫力，减少发病[5]。

4.4 减少抗生素依赖的替代策略

鉴于耐药性问题日益严峻，探索非抗生素疗法具有重要意义。中药制剂（如公英散、双丁散）具有抗菌、抗炎和调节免疫的作用，且无药物残留风险，可作为辅助治疗手段[5]。未来研究可进一步评估益生菌、噬菌体疗法等新型防控技术的应用潜力[6，8]。

5 结论

本研究明确了新疆某牧场奶牛乳房炎的主要病原菌及其耐药特征，提出了以喹诺酮类和四环素类药物为核心的治疗方案，并结合管理优化和免疫增强措施，为牧场提供了科学防控依据。未来需持续监测耐药性变化，推动绿色防控技术的应用，以实

中国乳业线上阅读

现奶牛乳房炎的高效、可持续防控。

参考文献

[1] 吴伟.奶牛乳房炎的预防及治疗措施[J].中国畜牧杂志，2007（18）：54–58.

[2] 伍义行，黄利权.奶牛乳房炎防治的免疫学和药理学机制[J].中国兽医杂志，2003，39（3）：40–44.

[3] 罗阳，田维嘉，何芳，等.湖南省部分地区奶牛乳房炎微生物分离鉴定及致病菌耐药性分析[J].中国兽医学报，2023，43（1）：79–84.

[4] 张涛.浅谈泌乳期奶牛乳房炎综合防治[J].中国畜牧业，2021（21）：65–66.

[5] 张艳，石强，周庆民，等.奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定、药物敏感性及致病性研究[J].黑龙江畜牧兽医，2020（23）：85–88，167–168.

[6] 申纪饶，李新圃，武小虎，等.奶牛乳房炎疫苗研发现状及面临的挑战[J].中兽医医药杂志，2021，40（6）：36–42.

[7] 叶雯，麻柱，俞英，等.我国奶牛乳房炎发病现状及防治措施[J].中国畜牧杂志，2023，59（9）：343–348.

[8] 赵敏，杨涛，朱金凤，等.河南省部分规模化奶牛场奶牛乳房炎源大肠杆菌耐药性分析与耐药基因检测[J].黑龙江畜牧兽医，2023（6）：84–88，142.

[9] 钟华晨，王丽芳，郭晨阳，等.内蒙古地区乳房炎奶样与环境中细菌的分离鉴定及耐药性分析[J].中国畜牧兽医，2023，50（2）：817–826.

[10] 陶晓丽.河南省临颍县奶牛乳房炎病原菌感染情况调查与药敏分析[J].中国兽医杂志，2020，56（3）：107–108.

Isolation and Identification of the Main Pathogenic Bacteria of Clinical Mastitis in Dairy Cows in a Large-scale Farm and Comprehensive Prevention and Control

CAI Jinchun，LI Yongjian，JIAO Longling，ZHANG Runze，ZHOU Ming，QI Yayin*

Shihezi University，Shihezi Xinjiang 832003

Abstract：[Objective] To identify the main pathogenic bacteria causing clinical mastitis in dairy cows at a large-scale farm in Xinjiang and determine their antibiotic resistance profiles，providing a scientific basis for targeted prevention and control strategies.[Method] Aseptically collected milk samples from 15 cows with clinical mastitis were subjected to bacterial isolation and purification，morphological observation，physiological and biochemical identification，and 16S rRNA molecular characterization. The antibiotic susceptibility of the isolated strains was assessed using the Kirby-Bauer（K-B）disk diffusion method against 12 commonly used antibiotics.[Result]A total of 21 bacterial strains were isolated，including *Escherichia coli*（11 strains，52.38%），*Staphylococcus aureus*（7 strains，33.33%），and *Streptococcus spp*.（3 strains，14.28%）. Antibiotic susceptibility testing revealed that *E. coli* exhibited complete resistance to amoxicillin and clindamycin but moderate sensitivity to gentamicin and enrofloxacin. *S. aureus* was resistant to polymyxin but highly sensitive to most other antibiotics. *Streptococcus spp*. showed high sensitivity to tetracycline and enrofloxacin. Mixed bacterial susceptibility testing indicated that enrofloxacin，ofloxacin，and tetracycline were the most effective treatments.[Conclusion] Clinical mastitis in this farm was primarily caused by mixed infections of *E. coli*，*S. aureus*，and *Streptococcus spp*. The recommended treatment regimen includes enrofloxacin，ofloxacin，and tetracycline，complemented by comprehensive measures such as regular screening for subclinical mastitis，environmental management improvements，and strict disinfection protocols to effectively control the occurrence and spread of mastitis.

Keywords：dairy cow；mastitis；pathogenic bacteria；antibiotic；comprehensive prevention and control

中国乳业线上阅读