

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2023.04.003

## 西昌某奶牛场乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏试验

杨克利<sup>1</sup>, 周美琪<sup>1</sup>, 张涛<sup>2</sup>, 邹宏<sup>1</sup>, 何晓露<sup>3</sup>, 韦汉群<sup>1</sup>, 张文丽<sup>1</sup>, 郝桂英<sup>1\*</sup>

(1. 西昌学院动物科学学院, 四川 西昌 615013; 2. 凉山彝族自治州农业科学研究院, 四川 西昌 615000;  
3. 西昌市农业农村局, 四川 西昌 615000)

**摘要:**[目的]为了确定导致西昌市某奶牛场引起乳房炎的病原。[方法]无菌采集患病奶牛乳样 2 份进行细菌分离培养、形态学观察、生化鉴定、溶血毒素基因(*khe*)和 16S rRNA 基因鉴定、小鼠致病性试验以及药敏试验。[结果](1)分离到 1 株菌, 该菌为革兰氏阴性的粗短杆菌, 形态学观察与生化特性均与肺炎克雷伯菌相符合;(2)*khe* 和 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中肺炎克雷伯菌的同源性分别为 99.6%~99.8% 和 99.7%~100%, 因此, 将分离菌确定为肺炎克雷伯菌, 并将其命名为 XC1 分离菌株;(3)小鼠致病性试验结果显示, 4 只接种小鼠均在接种第 3 天全部死亡, 表明 XC1 分离菌株具有较强的毒性;(4)药敏试验结果显示, XC1 分离菌株对恩诺沙星、诺氟沙星、头孢吡肟和头孢他啶高度敏感, 对妥布霉素、庆大霉素和新霉素中度敏感, 对红霉素、氨苄西林和阿莫西林耐药。[结论]该奶牛场发生的乳房炎与肺炎克雷伯菌感染有关, 且 XC1 分离菌株对临床常用的抗生素存在不同程度的耐药性。

**关键词:**奶牛乳房炎; 肺炎克雷伯菌; 分离鉴定; 药敏试验; 西昌

中图分类号:S858.23 文献标志码:A 文章编号:1673-1891(2023)04-0013-07

## Isolation and Identification of Bovine Mastitis Pathogenic Bacteria and Drug Sensitivity Test in a Dairy Farm in Xichang

YANG Keli<sup>1</sup>, ZHOU Meiqi<sup>1</sup>, ZHANG Tao<sup>2</sup>, ZOU Hong<sup>1</sup>, HE Xiaolu<sup>3</sup>, WEI Hanqun<sup>1</sup>,  
ZHANG Wenli<sup>1</sup>, HAO Guiying<sup>1\*</sup>

(1.School of Animal Science, Xichang University, Xichang, Sichuan 615013, China; 2.Agricultural Sciences  
Research Institute of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, Xichang, Sichuan, 615000, China;  
3.Xichang Agricultural and Rural Bureau, Xichang, Sichuan 615000, China)

**Abstract:**[Objective]In order to determine the pathogenic bacteria causing bovine mastitis in a dairy farm in Xichang, [Method]Two milk samples were collected from dairy cows with mastitis for isolation. The isolated strain was further identified by morphological observation, biochemical identification, *khe* and 16S rRNA gene identification, mice pathogenicity test and drug resistance analysis.[Result](1) One strain was isolated, which was gram-negative bacterium, with shot rod-shaped under microscopic examination. The results of morphological identification and biochemical characteristics were consistent with *Klebsiella pneumoniae*. (2) The sequence homologies of *khe* and 16S rRNA genes and *K. pneumoniae* in GenBank were 99.6 %~99.8 % and 99.7 %~100 %, respectively. Therefore, the isolated bacteria can be identified as *K. pneumoniae* and named XC1. (3) The results of the mice pathogenicity test showed that all four mice died on the third day of inoculation, indicating that the isolate of XC1 had strong virulence. (4) The drug sensitivity test results showed that the isolate of XC1 was highly sensitive to enrofloxacin, norfloxacin, cefepime and ceftazidime; moderate sensitive to tobramycin, gentamicin and neomycin; and resistant to erythromycin, ampicillin and amoxicillin.[Conclusion]The results of this study demonstrated that the occurrence of mastitis on the dairy farm was associated with *Klebsiella pneumoniae* infection, and the isolate of XC1 showed different degrees of resistance to commonly used antibiotics.

**Keywords:**bovine mastitis; *Klebsiella pneumoniae*; isolation and identification; drug sensitivity test; Xichang

收稿日期:2023-08-29

基金项目:攀西动物疫病检测与防控四川省高校重点实验室基本科研业务费项目(341)。

作者简介:杨克利(2002—),女,四川内江人,本科生,主要研究方向:动物疫病检测,e-mail: m17828266422@163.com。\*通信作者:郝桂英(1980—),女,四川荣县人,教授,博士,主要研究方向:动物疫病检测及防控,e-mail:haoguiying@163.com。

## 0 引言

奶牛乳房炎(bovine mastitis)是奶牛乳腺组织受到物理、化学因素刺激或病原微生物感染后发生的炎症反应,是奶牛常见的一种多发性疾病。该病可导致奶牛产奶量下降,影响乳制品品质,严重时可使奶牛泌乳机能丧失,最终使患牛淘汰,给奶牛养殖业造成巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。

引起奶牛乳房炎的病原菌达 150 余种,其中肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是肠杆菌科、克雷伯菌属中常见的致奶牛乳房炎环境病原菌之一,其引发的乳房炎症状尤为严重,具有发病急、死淘率高、产奶量大幅下降、抗生素治疗效果不佳等特点<sup>[2]</sup>。我国黑龙江、辽宁、山东、河南<sup>[3]</sup>、甘肃<sup>[4]</sup>、宁夏<sup>[5]</sup>、江苏<sup>[6]</sup>、陕西<sup>[7]</sup>、上海<sup>[8]</sup>、广东、安徽、山西、浙江<sup>[9]</sup>、河北<sup>[10]</sup>、内蒙古<sup>[11]</sup>、四川<sup>[12]</sup>、湖北<sup>[13]</sup>、云南<sup>[14]</sup>和湖南<sup>[15]</sup>多地均有从奶牛乳房炎病例或生牛乳中分离到该菌的报道,并且其造成的全身性感染甚至可以导致奶牛的急性死亡<sup>[16]</sup>。因此,肺炎克雷伯菌引起的动物感染及其潜在的公共卫生安全危害引起了科研人员越来越多的关注。

2023 年 4 月,四川省凉山彝族自治州西昌市某奶牛场有 3 头奶牛在产后 7 d 内出现了以乳房炎为主要特征的症状,病牛精神沉郁、喜卧、体温升高、食欲不佳、呼吸加快、流少量浓稠鼻涕、排淡黄色稀便。触摸其乳房有硬块,乳房或乳头肿胀,乳汁呈水样,部分乳中带血。症状严重的 1 头奶牛在发病第 2 天死亡。对死亡奶牛进行剖检,可见肺脏、肋胸膜出血,肝脏、脾脏出血,真胃黏膜、肠黏膜出血,空肠有水样黄色内容物。为查明导致该病发生的主要致病菌,本研究对该奶牛场发病未死亡的 2 头奶牛的乳样进行了细菌的分离培养和鉴定、药敏试验等,以期为该奶牛场科学防治奶牛乳房炎提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 乳样

采集西昌某奶牛场经临床诊断为乳房炎的奶牛乳样 2 份。清洗消毒病牛乳头,弃去前 3 把奶,采集 20~30 mL 乳汁于灭菌离心管中,标记好采样日期、牛号后置于带冰盒的采样箱内,迅速带回实验室 4 °C 保存,24 h 内分别进行细菌培养。

### 1.2 主要试剂与仪器

主要试剂:麦康凯琼脂培养基、营养琼脂培养

基、营养肉汤、革兰氏染色试剂均购自北京索莱宝科技有限公司;细菌微量生化管、药敏纸片(恩诺沙星、诺氟沙星、红霉素、头孢比肟、头孢他啶、妥布霉素、氨苄西林、庆大霉素、阿莫西林和新霉素)均购自杭州微生物试剂有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;2×Easy Taq PCR Super Mix、Trans2K DNA Marker、GelStain 核酸染料购自北京全式金生物科技有限公司。

主要仪器:超净工作台(SJ-CJ-2D 型,苏洁医疗器械(苏州)有限公司);高速冷冻离心机(5810R,ependorf);PCR 仪(Nexus GSX, ependorf);凝胶成像系统(Molecular Imager®Gel Doc™ XR+, BIO-RAD);核酸电泳仪(JY600E,北京君意电泳仪科技有限公司);恒温生化培养箱(LRH-250,上海一恒科学仪器有限公司);显微镜(Motic BA200,麦克奥迪实业集团有限公司)。

### 1.3 实验动物

体质量 15~20 g 的小白鼠 8 只,供致病性试验使用。

### 1.4 细菌的分离纯化

将 1.1 采集的 2 份待检乳样在超净工作台中分别取 1 000 μL 到灭菌的 EP 管中,8 000 r/min 离心 3 min,弃去上层 800 μL 液体,将剩余的乳液混匀后,吸取上述混悬液分别接种到麦康凯琼脂培养基上,37 °C 培养 24 h 后观察菌落生长情况<sup>[7]</sup>。挑取疑似菌落进行革兰氏染色,观察菌体形态及染色特性;然后挑取疑似单菌落接种于营养肉汤中纯化培养。

### 1.5 生化鉴定

将纯化培养后的菌液分别接种于葡萄糖、乳糖、蔗糖、阿拉伯糖、甘露醇、硫化氢、尿素、枸橼酸盐、尿素酶生化管以及氧化酶试纸,37 °C 培养 24 h,观察其生化反应特性<sup>[13]</sup>。

### 1.6 分子生物学鉴定

#### 1.6.1 细菌 DNA 的提取

无菌条件下吸取 1.4 中纯化培养的菌液 1 mL,10 000 r/min 离心 1 min,弃去上清液,参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA。

#### 1.6.2 PCR 检测及送检测序

先用 *khe* 基因特异性引物<sup>[5]</sup>进行 PCR 检测,再用细菌 16S rRNA 通用引物对有目的条带的阳性菌株进行 PCR 扩增。

*khe* 基因引物序列分别为 *khe*-F:5'-ATG AAA CGA CCT GAT TGC ATT CGC-3', *khe*-R:5'-TTA CTT TTC CGC GGC TTA CCG TC-3'。16S rRNA 通

用引物序列分别为:27F:5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', 1492R:5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。引物序列均由生工生物工程(成都)股份有限公司合成。

PCR反应条件:(1)*khe*基因:95℃预变性3 min;94℃变性25 s,58℃退火45 s,72℃延伸1 min,共35个循环;72℃延伸5 min。目的条带约480 bp。(2)16S rRNA基因:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸90 s,共35个循环;72℃延伸5 min。目的片段约1500 bp。ddH<sub>2</sub>O作阴性对照。

PCR扩增产物分别用1%琼脂糖凝胶进行电泳,待电泳结束后,通过凝胶成像系统观察电泳结果。将PCR阳性产物送生工生物工程(成都)股份有限公司进行双向测序。

### 1.6.3 序列分析

通过BLAST软件比对确定待测细菌,同时检索GenBank收录的肺炎克雷伯菌*khe*基因序列和肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)与大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)16S rRNA基因序列并下载,用DNASTAR中的MegAlign程序进行序列同源性分析。

### 1.7 药敏试验

采用K-B琼脂平板扩散法对分离纯化的菌株进行药敏试验。将纯化培养的菌液加到营养琼脂培养基上并涂布均匀,在超净工作台内晾2 min后,用镊子无菌取药敏纸片放置在涂布好细菌的培养基上,不同纸片相距15~20 mm。37℃培养24 h后用直尺测量抑菌圈的直径,记录数据。

依据马越等<sup>[17]</sup>的报道结果判定分离菌对抗菌药物的敏感性:抑制圈>15 mm为高度敏感(S);抑制圈10~15 mm为中度敏感(I);抑制圈<10 mm为耐药(R)。

### 1.8 小鼠致病性试验

将分离纯化的菌株菌液浓度调节约为 $1 \times 10^8$  CFU/mL,每株菌接种4只小白鼠,腹腔注射0.2 mL/只,对照组小白鼠接种营养肉汤0.2 mL/只。每天观察小鼠的临床症状,记录死亡数,72 h后处死全部存活小鼠。无菌采集心脏、肝脏、脾脏用于分离细菌,对分离菌进行染色、镜检、生化试验,并使用肺炎克雷伯菌*khe*基因特异性引物进行分子鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 肺炎克雷伯菌的菌落形态

从2份乳样中分离到1株疑似肺炎克雷伯菌菌株,命名为XC1分离菌株。菌株在麦康凯琼脂培养

基上形成粉红色、圆形、光滑、边缘整齐、湿润、黏稠的菌落(图1),用接种环挑取菌落有明显的拉丝现象,与高兴等<sup>[18]</sup>报道的肺炎克雷伯菌菌落形态相似。



图1 麦康凯培养基上的菌落

### 2.2 肺炎克雷伯菌的菌体形态

镜检菌体为革兰氏阴性的粗短杆菌,呈单个、成对或短链状排列(图2),与田维嘉<sup>[19]</sup>报道的肺炎克雷伯菌菌体形态相似。

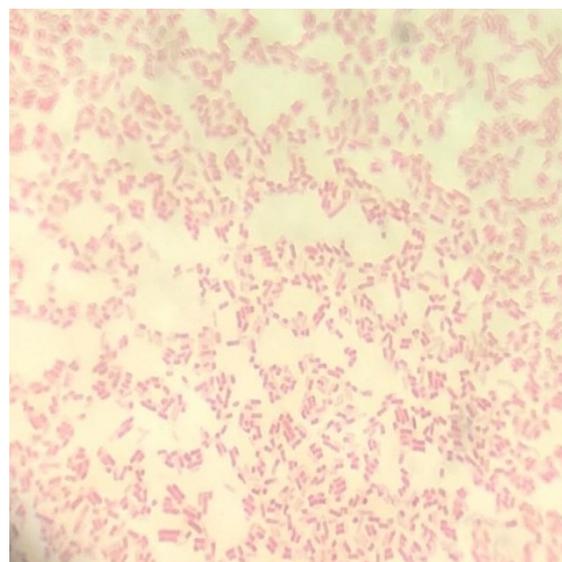


图2 革兰氏染色的菌体( $\times 1000$ 倍)

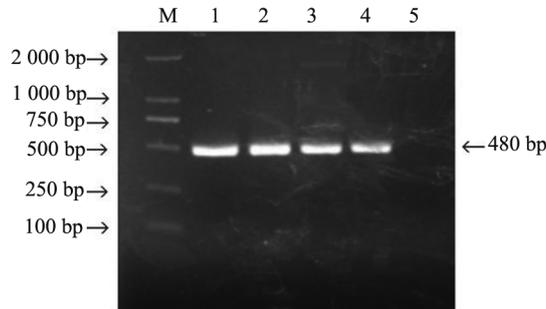
### 2.3 肺炎克雷伯菌的生化鉴定

分离菌株发酵葡萄糖、乳糖、蔗糖、阿拉伯糖和甘露醇,产酸或产酸产气;分解尿素;不产生硫化氢;枸橼酸盐、氧化酶阴性;尿素酶阳性。与刘冬霞<sup>[20]</sup>报道的肺炎克雷伯菌生化结果基本一致。

2.4 肺炎克雷伯菌的分子生物学鉴定

目的条带,与预期目的片段大小基本一致(图3)。

电泳结果显示,XC1分离菌株可扩增出 *khe* 基因



注:M为DNA Marker;1为XC1分离菌株;2为XC1分离菌株接种小白鼠心脏中分离的菌液(XC1-1菌液);3为XC1分离菌株接种小白鼠肝脏中分离的菌液(XC1-2菌液);4为XC1分离菌株接种小白鼠脾脏中分离的菌液(XC1-3菌液);5为阴性对照。

图3 肺炎克雷伯菌 *khe* 基因PCR电泳结果

XC1分离菌株及接种小白鼠心脏中分离的菌液(XC1-1菌液)、肝脏中分离的菌液(XC1-2菌液)、脾脏中分离的菌液(XC1-3菌液)的 *khe* 基因测序序列长度均为454 bp,核苷酸同源性为100%,与肺炎克雷伯菌参考序列同源性为99.6%~99.8%(图4);XC1分离菌株16S rRNA基因测序序列长度为1 411 bp,

与肺炎克雷伯菌参考序列同源性为99.7%~100%,与产酸克雷伯菌(*K. oxytoca*)参考序列同源性为97.1%~98.1%,与大肠埃希氏菌(*E. coli*)参考序列同源性为96.5%(图5)。因此, *khe* 基因和16S rRNA基因均确定XC1分离菌株为肺炎克雷伯菌。

		同源性/%												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
变异度/%	1	■	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	99.3	99.8	99.8	99.8	99.8	1	CP030072 <i>K. pneumoniae</i> strain DA12090
	2	0.0	■	100.0	100.0	99.6	100.0	99.3	99.8	99.8	99.8	99.8	2	CP035210 <i>K. pneumoniae</i> strain TH164
	3	0.0	0.0	■	100.0	99.6	100.0	99.3	99.8	99.8	99.8	99.8	3	CP043859 <i>K. pneumoniae</i> strain MRK9
	4	0.0	0.0	0.0	■	99.6	100.0	99.3	99.8	99.8	99.8	99.8	4	CP044033 <i>K. pneumoniae</i> strain FDAARGOS
	5	0.4	0.4	0.4	0.4	■	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	5	CP044389 <i>K. pneumoniae</i> strain 2018N17-0
	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	■	99.3	99.8	99.8	99.8	99.8	6	CP052320 <i>K. pneumoniae</i> strain E16KP0035
	7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.2	0.7	■	99.6	99.6	99.6	99.6	7	KX842080 <i>K. pneumoniae</i> strain YZ
	8	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	■	100.0	100.0	100.0	8	XC1-1
	9	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.0	■	100.0	100.0	9	XC1-2
	10	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.0	0.0	■	100.0	10	XC1-3
	11	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0	■	11	XC1

图4 肺炎克雷伯菌 *khe* 基因序列同源性比对结果

		同源性/%															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
变异度/%	1	■	99.1	97.1	97.1	97.1	97.1	98.7	96.5	96.2	96.5	97.0	97.1	97.1	99.7	1	AB681870 <i>K. oxytoca</i> strain NBRC 102593
	2	0.9	■	97.8	97.8	97.8	97.8	99.6	96.8	96.7	96.7	97.8	97.8	97.8	99.2	2	AJ871863 <i>K. oxytoca</i> strain SB3051
	3	3.0	2.2	■	100.0	100.0	100.0	98.1	96.5	96.5	96.5	99.7	100.0	100.0	97.2	3	CP124220 <i>K. pneumoniae</i> strain Z
	4	3.0	2.2	0.0	■	100.0	100.0	98.1	96.5	96.5	96.5	99.7	100.0	100.0	97.2	4	CP129799 <i>K. pneumoniae</i> strain 2020C07-2
	5	3.0	2.2	0.0	0.0	■	100.0	98.1	96.5	96.5	96.5	99.7	100.0	100.0	97.2	5	CP129835 <i>K. pneumoniae</i> strain 2020N17-1
	6	3.0	2.2	0.0	0.0	0.0	■	98.1	96.5	96.5	96.5	99.7	100.0	100.0	97.2	6	CP129849 <i>K. pneumoniae</i> strain 2020S06-1
	7	1.3	0.4	1.9	1.9	1.9	1.9	■	96.5	96.5	96.5	98.1	98.1	98.1	98.8	7	HE650838 <i>K. oxytoca</i> strain LPPA 985
	8	3.6	3.3	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	■	99.5	99.6	96.4	96.5	96.5	96.3	8	LC571936 <i>E. coli</i> JCM 20071
	9	3.9	3.3	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	0.5	■	99.5	96.3	96.5	96.5	96.2	9	LC654896 <i>E. coli</i> JCM 20375
	10	3.6	3.3	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	0.4	0.5	■	96.3	96.5	96.5	96.4	10	LC682250 <i>E. coli</i> JCM 16946
	11	3.0	2.2	0.3	0.3	0.3	0.3	1.9	3.7	3.8	3.8	■	99.7	99.7	97.1	11	MF953265 <i>K. pneumoniae</i> strain VM18
	12	3.0	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	3.6	3.6	3.6	0.3	■	100.0	97.2	12	OQ927599 <i>K. pneumoniae</i> strain KP2211
	13	3.0	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	3.6	3.6	3.6	0.3	0.0	■	97.2	13	XC1
	14	0.3	0.9	2.9	2.9	2.9	2.9	1.2	3.8	3.9	3.7	3.0	2.9	2.9	■	14	Y17655 <i>K. oxytoca</i> strain ATCC13182T

图5 肺炎克雷伯菌16S rRNA基因序列同源性比对结果

## 2.5 药敏试验结果

XC1分离菌株对恩诺沙星、诺氟沙星、头孢比肟和头孢他啶高度敏感;对妥布霉素、庆大霉素和新霉素中度敏感;对红霉素、氨苄西林和阿莫西林耐药(表1)。

表1 药敏试验结果

药敏片	抑制圈大小/mm	药物敏感性
恩诺沙星	26	S
诺氟沙星	26	S
红霉素	0	R
头孢比肟	27.5	S
妥布霉素	15	I
氨苄西林	7	R
头孢他啶	25	S
庆大霉素	12	I
阿莫西林	0	R
新霉素	14	I

## 2.6 小鼠致病性试验

XC1分离菌株组小白鼠在接种第1天出现精神沉郁、蜷缩一角;第2天出现腹泻、排便便;第3天全部死亡。剖检发现死亡小白鼠胸腔有积液,肝脏出血,肠臌气,直肠末端有血液。对照组小白鼠精神正常,全部存活。剖检无明显病变。

感染小鼠心脏、肝脏、脾脏等组织中分离的细菌为革兰氏阴性、较粗短的直杆菌,生化试验结果与XC1分离菌株一致,PCR检测均在约480 bp处出现特异性条带(图3)。对照组未分离出细菌。小鼠致病性试验表明XC1分离菌株具有较强的毒性。

## 3 讨论与结论

### 3.1 讨论

牛群品种、饲养管理、地域环境、季节气候等的不同,会影响奶牛乳房炎的发生率以及病原菌种类。肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)作为我国常见的奶牛乳房炎环境性致病革兰氏阴性菌之一,不同地方分离率有差异。Gao等<sup>[3]</sup>报道黑龙江、辽宁、河北、山东、河南、天津、北京等21省161个大型奶牛场(>500头)*K. pneumoniae*平均分离率为13.0%;冯小慧等<sup>[8]</sup>报道上海和河北患病牛乳*K. pneumoniae*分离率分别为18%(18/100)和14%(14/100);曹菲菲等<sup>[9]</sup>报道福建、江苏、广州、河北、安徽、山西、内蒙

古、浙江等地区的11个规模化牧场*K. pneumoniae*平均分离率为14.55%(119/818);Gao等<sup>[21]</sup>报道我国13省123个奶牛场临床型乳房炎奶样*K. pneumoniae*平均分离率为51.5%(124/241);He等<sup>[22]</sup>报道山东、黑龙江和河北3家规模化奶牛场临床型乳房炎奶样*K. pneumoniae*平均分离率为2.9%(183/6301);石玉祥等<sup>[10]</sup>报道河北某大规模奶牛场*K. pneumoniae*分离率为18.4%(45/245);Cheng等<sup>[23]</sup>报道中国南北部2个奶牛场*K. pneumoniae*平均分离率为27.0%(365/1354);Yang等<sup>[24]</sup>报道江苏、山东生乳*K. pneumoniae*分离率分别为7.8%(65/830)和0.4%(1/233);吴香云<sup>[13]</sup>报道湖北省5个奶牛场*K. pneumoniae*平均分离率为26.9%(239/887),临床乳房炎和隐性乳房炎牛乳*K. pneumoniae*分离率分别为25.4%(35/138)和24.5%(12/49);高兴等<sup>[18]</sup>报道全国大型规模化牧场乳房炎奶样*K. pneumoniae*分离率约11%(212/2000),说明全国各地奶牛场的卫生防护措施参差不齐。

奶源安全问题是食品安全问题的重中之重,受到人们的广泛关注。乳汁微生物鉴定常被认为是乳房炎诊断的“金标准”,但肺炎克雷伯菌与大肠埃希氏菌形态相似,难以区别。由于*khe*基因只在肺炎克雷伯菌中检出,因此,*khe*基因可作鉴定该菌的特异性基因<sup>[5]</sup>。16S rRNA基因由于片段大小适中,能体现出不同种属细菌间的差别,现常用于细菌分类鉴定。因此,本试验通过细菌形态学观察、生化鉴定、分子生物学鉴定、小鼠致病性试验等对分离菌株进行鉴定,确定该场奶牛乳房炎与肺炎克雷伯菌感染有关,这与张明国等<sup>[25]</sup>、周国燕等<sup>[12,26]</sup>的研究结果不完全一致,这些研究认为葡萄球菌为凉山州奶牛乳房炎优势菌。药敏试验结果显示,XC1分离菌株对头孢比肟、恩诺沙星、诺氟沙星和头孢他啶4种药物敏感,对红霉素、氨苄西林和阿莫西林3种药物耐药。近年来,各地区奶牛乳房炎源*K. pneumoniae*耐药率和耐药谱均存在差异,甚至出现多重耐药的现象<sup>[27-28]</sup>。张颖欣等<sup>[2]</sup>报道国内13省耐药型*K. pneumoniae*流行率约为13.7%。曹菲菲等<sup>[9]</sup>报道分离自奶牛乳房炎的119株*K. pneumoniae*对氨苄西林的耐药率达到了94.96%。He等<sup>[22]</sup>报道分离自奶牛乳房炎的183株*K. pneumoniae*对复方新诺明的耐药率均在90.0%以上,显著高于其他药物的耐药率(25.0%以下);对多西环素中等耐药(15.4%~25.0%);对庆大霉素、氟苯尼考、环丙沙星、头孢曲松、替加环素、阿莫西林/克拉维酸钾和卡那霉素表现出较低水平耐药(1.0%~7.7%),其中环丙沙星、

替加环素、阿莫西林/克拉维酸钾和卡那霉素维持在 1.0% 左右的低耐药率,而对美罗培南和多黏菌素尚未耐药。*K. pneumoniae* 可产生水解头孢菌素的超广谱  $\beta$ -内酰胺酶,且编码基因可以通过质粒分布在奶牛场的细菌中<sup>[29]</sup>,为临床治疗 *K. pneumoniae* 引起的奶牛乳房炎带来困难。因此,在生产中应积极开展肺炎克雷伯菌的分子流行病学调查,及时监控该菌的流行趋势。在临床治疗中,应加强对该菌耐药性的监测,规范治疗流程,减少抗生素的误用和滥用,从而减少耐药菌株的产生和传播,以免引起公共卫生安全危害。

### 3.2 结论

本研究通过细菌形态学观察、生化试验、分子生物学方法对乳房炎乳样进行细菌分离鉴定,分离出 1 株肺炎克雷伯菌,命名为 XC1 分离菌株;小鼠致病性试验表明 XC1 分离菌株具有较强的毒力,证明该场奶牛乳房炎与肺炎克雷伯菌感染有关。药敏试验结果表明 XC1 分离菌株对临床常用的抗生素存在不同程度的耐药性,其中对红霉素、氨苄西林和阿莫西林耐药。研究结果可为该奶牛场防治乳房炎提供参考。

### 参考文献:

- [1] 赵柯杰. 奶牛源肺炎克雷伯菌耐药特性分析及强毒血清型菌株筛选[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [2] 张颖欣, 陈友涵, 李树梅, 等. 奶牛乳房炎源性肺炎克雷伯菌 ESBLs 基因型分布特征[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(11): 10-12.
- [3] GAO J, BARKEMA H W, ZHANG L M, et al. Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(6): 4797-4806.
- [4] 王丹. 奶牛乳房炎主要病原菌多重 PCR 诊断方法的建立与应用[D]. 兰州: 中国农业科学院, 2018.
- [5] 张超. 宁夏地区牛源肺炎克雷伯氏菌分离鉴定及部分毒力基因与耐药基因分析[D]. 银川: 宁夏大学, 2018.
- [6] 周明旭, 左晓昕, 徐悦, 等. 江苏某牧场奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定、耐药性及保守抗原分析[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2019, 40(6): 54-60.
- [7] 王乐, 王晶, 王丽娟, 等. 6 株奶牛乳房炎肺炎克雷伯菌的分离、鉴定及生物学特性[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(6): 1202-1207.
- [8] 冯小慧, 杜琳, 王丽芳, 等. 2017 年上海、河北地区奶牛乳房炎克雷伯菌分离鉴定及耐药性分析[J]. 畜牧与饲料科学, 2019, 40(1): 108-112.
- [9] 曹菲菲, 刘康军, 孙莹慧, 等. 规模化牧场奶牛乳腺炎病原菌感染流行病学调查及肺炎克雷伯菌耐药性分析[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(10): 117-121.
- [10] 石玉祥, 赵文鹏, 刘洋, 等. 奶牛乳房炎源性肺炎克雷伯杆菌的分离鉴定和耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(3): 95-98.
- [11] 崔琦. 奶牛乳房炎源性肺炎克雷伯菌 MrkD 基因原核表达以及对乳腺上皮细胞黏附的研究[J]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- [12] 周国燕, 陈鲁喜, 孙艳, 等. 四川凉山地区奶牛乳房炎主要病原菌分离鉴定及药敏情况分析[J]. 中国乳业, 2021(8): 88-95.
- [13] 吴香云. 湖北地区奶牛乳房炎源肺炎克雷伯菌毒力和耐药分子特征研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [14] 买尔哈巴·吾斯曼. 国内部分地区奶牛乳腺炎源肺炎克雷伯菌生物学特性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2022.
- [15] 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.
- [16] 周玉龙, 李国军, 李阳, 等. 奶牛肺炎克雷伯氏菌的分离与鉴定[J]. 中国奶牛, 2007(6): 36-38.
- [17] 马越, 李景云, 金少鸿. 美国临床实验室标准委员会推荐药敏试验操作方法和判断标准(2005 年修订版)[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(17): 1182-1184.
- [18] 高兴, 赵柯杰, 于勇, 等. 奶牛乳房炎源肺炎克雷伯菌耐药特性分析[J]. 南京农业大学学报, 2023, 46(2): 306-315.
- [19] 田维嘉. 湖南省奶牛乳房炎主要病原菌分离与 LAMP 法快速检测的建立[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021.
- [20] 刘冬霞. 陕西地区奶牛乳房炎主要病原菌多重 PCR 检测方法的建立及耐药性分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- [21] GAO J, LI S M, ZHANG J, et al. Prevalence of potential virulence genes in *Klebsiella* spp. isolated from cows with clinical mastitis on large Chinese dairy farms[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2019, 16(12): 856-863.
- [22] HE W J, MA S Z, LEI L, et al. Prevalence, etiology, and economic impact of clinical mastitis on large dairy farms in China [J]. Veterinary Microbiology, 2020, 242: 108570.

- [23] CHENG J, ZHOU M, NOBREGA D B, et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* mastitis on two large Chinese dairy farms[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(1): 762-775.
- [24] YANG Y, PENG Y L, JIANG J Y, et al. Isolation and characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from raw cow milk in Jiangsu and Shandong provinces, China[J]. Transboundary Emerging Diseases, 2021, 68(3): 1033-1039.
- [25] 张明国,安燕,张涛,等.四川攀西地区奶牛乳房炎病原菌调查与敏感药物筛选试验[J].中国草食动物科学,2016,36(4): 46-49.
- [26] 周国燕,张涛,陈鲁喜,等.2020-2021年凉山地区奶牛乳房炎主要病原菌抽样调查报告[J].中国奶牛,2022(12):37-40.
- [27] 葛东红,周明旭,朱纯,等.江苏某牛场生牛乳中肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌的分离鉴定、耐药性和毒力分析[J].中国兽医学报,2019,39(6):1140-1162.
- [28] 何文娟,刘云祥.奶牛肺炎克雷伯菌乳房炎发生情况及其耐药性[J].中国牛业科学,2022,48(6):67-69.
- [29] SAISHU N, OZAKI H, MURASE T. CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from cases of bovine mastitis in Japan[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2014, 76(8): 1153-1156.