

研究报告

华北地区牛源无乳链球菌的分离鉴定及生物学特性

杜琳 周雪 赵红梅 吕天星 崔健 李松建 史晓娜 郝永清*

(内蒙古农业大学兽医学院 内蒙古 呼和浩特 010010)

摘要:【目的】了解华北地区牛源无乳链球菌的生物学特性。【方法】在 2012 到 2015 年间从内蒙古自治区、河北、北京等地隐性乳房炎 557 份奶牛乳样中分离、收集无乳链球菌。采用纸片扩散法和 PCR 的方法对这些菌株分别进行耐药谱测定、荚膜分子分型、表面蛋白基因及毒力因子的检测。【结果】无乳链球菌的分离率为 5.03%，其药物敏感性与其他地区无明显差别。分离到的 28 株无乳链球菌均属于荚膜 Ia 型，且毒力基因基本相同并且其表面蛋白均属于未定型。【结论】华北不同地区的无乳链球菌有相似的药物敏感性和毒力基因。为奶牛乳房炎无乳链球菌疫苗的研制及药物防治提供理论依据。

关键词: 奶牛乳房炎，无乳链球菌，血清型，表面蛋白基因，毒力因子

Isolation, identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* of bovine origin in North China

DU Lin ZHOU Xue ZHAO Hong-Mei LÜ Tian-Xing CUI Jian LI Song-Jian
SHI Xiao-Na HAO Yong-Qing*

(Inner Mongolia Agricultural University, College of Veterinary Medicine, Hohhot, Inner Mongolia 010010, China)

Abstract: [Objective] In order to characterize *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine origin from North China. [Methods] Five hundred and fifty-seven milk samples were collected in 2012–2015 from dairy cows with subclinical mastitis in Inner Mongolia Autonomous Region, Hebei Province and Beijing, and *S. agalactiae* isolates were identified by biochemical analysis and molecular biological methods. Their drug sensitivities were detected using standard disk diffusion method, and the genes for capsular type, surface protein and virulence factors were amplified by PCR. [Results] Twenty-eight streptococcal isolates were identified as *S. agalactiae* with an isolation rate of 5.03% and similar drug sensitivities. All of 28 *S. agalactiae* isolates belonged to capsular type Ia with similar virulence gene patterns and undefined surface protein types. [Conclusion] These data indicate that the *S. agalactiae* isolates of bovine origin in different regions of North China had similar drug sensitivities and virulence gene patterns, which provided the rationale for development of therapeutic strategy and vaccines against bovine mastitis *S. agalactiae*.

Foundation item: Key Technologies R&D Program of China (No. 2012BAD12B09-02)

*Corresponding author: E-mail: haoyq1960@163.com

Received: September 23, 2015; **Accepted:** December 14, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 31, 2015
基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2012BAD12B09-02)

*通讯作者: E-mail: haoyq1960@163.com

收稿日期: 2015-09-23; 接受日期: 2015-12-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-12-31

Keywords: Dairy cow mastitis, *Streptococcus agalactiae*, Serotype, Surface protein gene, Virulence factor

奶牛乳房炎是奶牛的常见多发病, 由于其病因复杂多样、病原种类繁多、易反复发作等特点, 目前已成为奶牛养殖中造成经济损失最严重的疾病。无乳链球菌是引起奶牛乳房炎最重要的病原菌之一^[1], 常存在于乳牛的皮肤、乳头及乳房内, 通过挤乳人员的手或挤乳机械以及蝇类的携带而传播。其引起乳房炎后不产生明显免疫力, 尚无可靠的多价菌苗。目前抗生素治疗是最普遍的治疗方法, 大量抗生素在乳房炎的治疗中得到广泛应用。抗生素的疗效与抗生素本身的性质、到达乳房的有效浓度、用药次数、及给药时间等有关。在抗生素治疗奶牛乳腺炎的过程中诸多不利因素也逐渐呈现出来: 易出现抗药性和耐药性; 引发其他一些副作用, 如肠道菌群失调、影响食欲等; 造成牛奶中药物残留及奶牛体内药物积蓄等^[2]。用疫苗防治奶牛乳房炎的优点是乳汁无药物残留、操作简便、费用低廉, 但是该方法最常见的问题是细菌抗原的变异, 细菌不断地改变表面蛋白、致病因子的结构使得免疫系统在产生新的抗体时总是落后于细菌。传统的无乳链球菌血清型分型是根据细菌的荚膜多糖能与特异性抗体发生反应而设计的。在某些血清型还没有商品化的诊断血清时则无法鉴定, 比如血清型 IX 型。而且传统方法无法确定细菌是表达了不能与已有血清发生反应的荚膜多糖还是细菌根本就没有表达荚膜多糖, 这时荚膜多糖分子鉴定的方法就可以避免上述问题。Imperi 等^[3]根据已发现的 10 种血清型设计了针对荚膜多糖相关基因的多重 PCR, 根据 PCR 扩增条带的大小可以快速准确地确定细菌的荚膜分子类型。无乳链球菌的 Alp 蛋白家族包括 Alpha-C、Rib、Epsilon、Alp2、Alp3、Alp4 6 个由等位基因编码的表面蛋白, 通过对这几个蛋白成员进行测序发现, 它们的基因序列非常稳定, 根据这一特点, Creti 等^[4]设计了多重 PCR 来鉴定这 6 种表面蛋白。因为该方法简便、快速、特异性好,

所以被广泛用来鉴定无乳链球菌的表面蛋白亚型。细菌的分子鉴定的目的是判断流行中的菌株是否具有相关性, 通过研究长期性或者全球流行的菌株之间的相关性, 为分析病原菌的传播机制、确定不同菌株的基因型与耐药性的关系, 以及采取有效措施降低无乳链球菌的感染提供流行病学依据^[5]。

本研究采用传统细菌学鉴定方法与分子生物学技术相结合, 对华北地区 2012 年至 2015 年采集的隐形乳房炎乳样中的无乳链球菌进行分离鉴定。并对这些菌株进行耐药谱测定、分子血清型、表面蛋白基因及毒力因子的检测等工作。从而为华北地区的无乳链球菌引发疾病的防治、监测、致病及流行病学调查、疫苗研制提供必要的基础。

1 材料与方法

1.1 病料采集

采集内蒙古自治区、河北、北京等地共 557 份隐性乳房炎病牛乳样。其中内蒙古自治区 298 份, 河北地区 76 份, 北京地区 183 份。

1.2 主要试剂

培养基: 含 5% 绵羊脱纤血的 M-H 琼脂培养基、胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB 培养基), 均购于青岛海博生物技术有限公司。

药敏纸片: 克林霉素、红霉素、青霉素、氨苄西林、头孢噻肟、万古霉素、氯霉素、氧氟沙星、四环素, 均购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 2×EasyTaq[®] PCR SuperMix、Trans DNA Marker I, 购于北京全式金生物技术有限公司; DL2000 DNA Marker、Agarose、细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0), 购于宝生物工程(大连)有限公司; Api strep 链球菌鉴定试剂盒, 购于生物梅里埃中国有限公司。

1.3 细菌的分离培养

将无菌采集到的乳样用棉拭子于绵羊脱纤血

琼脂培养基划线培养。37 °C 培养 16 h 后观察菌落形态。挑取疑似菌落染色镜检、进行纯培养。并对分离获得的流行菌株编号, 对其分离时间、分离地点等信息进行记录归档。

1.4 生化鉴定

无菌挑取上述纯培养物, 采用 API 20 STREP 链球菌及有关种类的鉴定系统进行生化鉴定, 具体步骤如下: 将 5 mL 无菌水放入培养盒内, 然后将试纸条放入培养盒。将菌液接种至小管, 利用石蜡油覆盖指定的生化孔。把培养盖盖好, 将试纸条放入恒温培养箱, 37 °C 培养, 6 h 观察一次结果。然后按操作说明书规定, 将附加试剂加进适当生化孔, 继续培养 18 h, 观察结果。将鉴定结果经编码手册或 Apilab plus 软件处理, 判断其是否为无乳链球菌。

1.5 细菌 DNA 的提取

参照细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒说明书, 提取无乳链球菌基因组 DNA。

1.6 PCR 扩增

以提取出的无乳链球菌基因组 DNA 为模板, 根据参考文献[3-4,6-7]及 GenBank 中的 DNA 基因序列, 应用 Primer 5.0 软件分析合成引物。其中无乳链球菌特异性引物为 S.aga-F 和 S.aga-R; 用于荚膜多糖分子分型的引物为 cpsI-Ia-6-7-F、cpsI-6-R、cpsI-7-R、cpsL-F、cpsL-R、cpsG-F、CpsG-R、CpsG-2-3-6-R、CpsN-5-F、CpsN-5-R、CpsJ-8-F、CpsJ-8-R、cpsJ-2-4-F、cpsJ-2-R、cpsJ-4-R、cpsI-7-9-F、cpsI-9-R、cpsJ-Ib-F、cpsJ-Ib-R; 用于检测表面蛋白基因的引物为 Un-forward、Alpha-C-R、Rib-R、Epsilon-R、Alp2/3-R、Alp4-R; 用于相关毒力因子检测的引物为: bac-F、bac-R、cylE-F、cylE-R、cfb-F、cfb-R、hylB-F、hylB-R、FbsA-F1、FbsA-R1、 α -enolase-F、 α -enolase-R、Lmb-F、Lmb-R。其详细内容见表 1。

1.7 小鼠致病性试验

选取 HHHT05 作为代表性菌株接种于 TSB 液

体培养基中, 37 °C、150 r/min 恒温培养 16 h。4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 用灭菌生理盐水洗涤菌体沉淀。用灭菌生理盐水调整菌液浓度为 1×10^9 CFU/mL。

选取 10 只 7 周龄的健康 BALB/c 小鼠, 随机分为两组(试验组与对照组), 每组 5 只。试验组按 0.3 mL/只腹腔注射菌液, 对照组注射等量的生理盐水。每隔 12 h 观察小鼠的发病和死亡情况, 并进行剖检。进行细菌的分离、鉴定, 确定各脏器中细菌的分布。

1.8 药敏试验

采用世界卫生组织(WHO)推荐的 Kirby-Bauer (K-B)纸片扩散法, 测定地方分离菌对抗菌药物的敏感性。

在绵羊脱纤血平板上挑取培养 18-24 h 的纯培养物均匀溶解于 2 mL 无菌营养肉汤中, 用比浊仪调校浓度至 0.5 麦氏标准; 校正后的菌液应在 15 min 内接种。

用无菌棉拭子蘸取调好的菌液, 在管内壁将多余菌液旋转挤去后在加入 5%绵羊脱纤血的 MH 琼脂平板表面均匀涂布接种, 每旋转平板 60°涂布接种一次, 如此反复 3 次, 最后沿平板边缘涂抹 2 周。接种好的平板在室温下放置 3-5 min, 用无菌镊子将药敏纸片紧贴于琼脂表面。每个平板均匀贴 4 个。每个菌株设置 3 个重复。

接种好的平板放置 37 °C 恒温培养, 18-24 h 后用游标卡尺测量抑菌圈直径, 取 3 个重复的平均值。参照美国临床实验室标准化协会(CLSI, 2009)推荐标准进行判定^[8], 用肺炎双球菌标准菌株(ATCC49619)作为质控菌, 通过测定抑菌圈直径大小判定病原菌对药物的敏感性, 分为耐药(R)、中度敏感(I)和高度敏感(S)。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离培养及鉴定

对 557 份乳样进行分离鉴定: 其中内蒙古地区 298 份乳样, 共分离得到金黄色葡萄球菌 82 株, 大

表 1 文中所用引物信息
Table 1 Primer sequence of genes, the reaction conditions and the fragment length

引物 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	片段大小 Fragment length (bp)
S.aga-F	CGCTGAGGTTTGGTGTTTACA	55	406
S.aga-R	CACTCCTACCAACGTTCTTC		
cpsI-Ia-6-7-F	GAATTGATAACTTTTGTGGATTGCGATGA	56	I a: 688, 272 I b: 688, 621, 272 II: 688, 465, 272 III: 688, 352 IV: 688, 538, 272 V: 688, 582, 272 VI: 688, 470, 352 VII: 688, 272, 179 VIII: 688, 438 IX: 688, 272, 229
cpsI-6-R	CAATTCTGTGCGACTATCCTGATG		
cpsI-7-R	TGTCGCTTCCACACTGAGTGTTGA		
cpsL-F	CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT		
cpsL-R	TAGGAACATGTTCAATTAACATAGC		
cpsG-F	ACATGAACAGCAGTTCAACCGT		
CpsG-R	ATGCTCTCCAAACTGTTCTTGT		
CpsG-2-3-6-R	TCCATCTACATCTTCAATCCAAGC		
CpsN-5-F	ATGCAACCAAGTGATTATCATGTA		
CpsN-5-R	CTCTTCACTCTTTAGTGTAGGTAT		
CpsJ-8-F	TATTTGGGAGGTAATCAAGAGACA		
CpsJ-8-R	GTTTGGAGCATTCAAGATAACTCT		
cpsJ-2-4-F	CATTTATTGATTACAGACGATTACATTGA		
cpsJ-2-R	CCTCTTTCTCTAAAATATTCCAACC		
cpsJ-4-R	CCTCAGGATATTTACGAATTCTGTA		
cpsI-7-9-F	CTGTAATTGGAGGAATGTGGATCG		
cpsI-9-R	AATCATCTTCATAATTATCTCCCAT		
cpsJ-Ib-F	GCAATTCTTAACAGAATATTCAGTTG		
cpsJ-Ib-R	GCGTTTCTTTATCACATACTCTTG		
Un-forward	TGATACTTCACAGACGAAACAACG	58	Alpha-C: 398 Rib: 295 Epsilon: 200 Alp2/3: 334 Alp4: 110
Alpha-C-R	TACATGTGGTAGTCCATCTTCACC		
Rib-R	CATACTGAGCTTTTAAATCAGGTGA		
Epsilon-R	CCAGATACATTTTTTACTAAAGCGG		
Alp2/3-R	CACTCGGATTACTATAATATTTAGCAC		
Alp4-R	TTAATTTGCACCGGATTAACACCAC	55	604
bac-F	AAGGCTATGAGTGAGAGCTTGAG		
bac-R	CTGCTCTGGTGTTTTAGGAACTTG		
cylE-F	AGTCGTAGTGGACAGGCAATCAC		697
cylE-R	GGCTGCCATTTGGAGAGATAAGTA		
cfb-F	GCGTCGACATGAACGTTACACATATGATGT		763
cfb-R	GCGGATCCATTATAATGCTGTTTGAAG		
hylB-F	CACCAATCCCCACTCTACTA		444
hylB-R	TGTGTCAAACCATCTATCAG		
FbsA-F1	TTGTTCAATAAAATAGGTTTTAG		1 041
FbsA-R1	TTAATTTTCATTGCGTCTCAAAC		
α -enolase-F	ATGTCAATTATTACTGATGTTTACGC	55	1 038
α -enolase-R	CTATTTTTTAAAGTTGTAGAATGATTTG		
Lmb-F	GGGTACCCATGTCTTTACTTTAGCTCCTGTT		813
Lmb-R	CCTCGAGGTTTCTCATGGCTATGGTTGTG		

肠杆菌 54 株,链球菌 28 株;河北地区 76 份乳样,共分离得到金黄色葡萄球菌 29 株,大肠杆菌 37 株,链球菌 3 株;北京地区 183 份乳样,共分离得到金黄色葡萄球菌 73 株,大肠杆菌 133 株,链球菌 5 株。以上地区共分离得到链球菌 36 株,其中 11 份为链球菌混合其他细菌感染,25 株为链球菌单一感染。

2.1.1 形态学特征:在普通培养基上生长不良,在 5%绵羊脱纤血琼脂平板上呈淡灰白色、隆起、闪光的小菌落,有 β 溶血现象。其菌落形态如图 1 所示。分离株经革兰氏染色,在光学显微镜油镜下观察,呈革兰氏阳性,长链状。

2.1.2 生化鉴定结果:用 API 20 STREP 链球菌及有关种类的鉴定系统对 36 株链球菌分离株进行生化鉴定。将鉴定结果经编码手册或 Apilab plus 软件处理,其中有 26 株与无乳链球菌的相似率为 99.9%,2 株菌与无乳链球菌的相似率为 99.4%,可以初步认为这 28 株菌均为无乳链球菌。

2.1.3 PCR 扩增结果:用无乳链球菌 16S rRNA 基因特异性引物对 28 个菌株进行基因的扩增。所得 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,均扩增出 406 bp 大小的片段(图 2),与预期的目的片段大小相同。

2.1.4 毒力基因鉴定结果:对分离得到的 28 株菌进行 7 种毒力基因: β 蛋白(β -Antigen gene)、 β -溶血素(β -Haemolysin, cyle)、CAMP 因子(CAMP

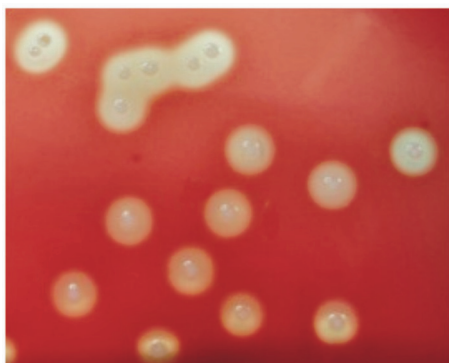


图 1 5%绵羊脱纤血培养基上生长的无乳链球菌
Figure 1 *Streptococcus agalactiae* grown on 5% defibrinated sheep blood agar plate

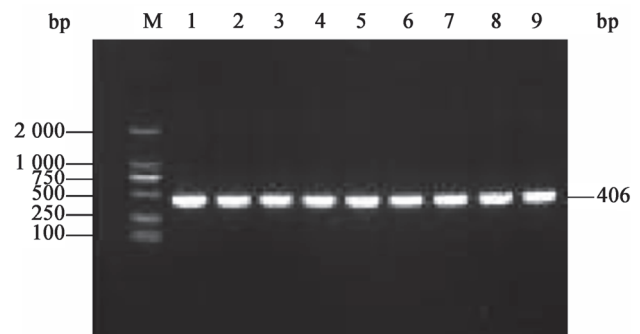


图 2 9 株无乳链球菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增
Figure 2 PCR amplification of 16S rRNA gene segments of 9 *Streptococcus agalactiae* isolates

注: M: DL2000 DNA marker; 1-9: 9 株无乳链球菌的 16S rRNA PCR 产物。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-9: PCR products of 16S rRNA gene segments of 9 *Streptococcus agalactiae* isolates.

factor, cfb)、透明质酸酶(Hyaluronate lyase, hylB)、纤维蛋白原结合蛋白(Fibrinogen binding proteins A, FbsA)、 α -烯醇化酶(α -Enolase)、黏连蛋白结合蛋白(Laminin-binding protein, Lmb)的 PCR 鉴定。结果表明 7 种毒力基因在 28 株无乳链球菌之间分布无差异。其中 cyle、cfb、hylB、FbsA、 α -Enolase、基因的检出率为 100%, bac、Lmb 基因的检出率为 0 (图 3)。

2.1.5 荚膜多糖分子分型的鉴定结果:对分离得到的 28 株菌进行多重 PCR 扩增,均得到 272 bp 和 688 bp 的两条特异性条带(图 4),与 Imperi 等^[3]研究中的血清型 Ia 型相同,因此华北地区无乳链球菌的血清型均为 Ia 型。

2.1.6 表面蛋白分型结果:对分离得到的 28 株菌进行多重 PCR 扩增,未出现与 Creti 等^[4]中一致的条带。不能确定其 Alp 蛋白的型。结果表明,28 株菌的表面蛋白均为未定型。

2.2 小鼠致病性试验结果

试验组小鼠,在 24 h 内均发病,表现为精神沉郁,呼吸急促,蜷缩于角落,36 h 内试验组小鼠 4 只死亡,48 h 内试验组小鼠全部死亡。无菌解剖小鼠,观察到肝脏与脾脏有充血现象。感染死亡小鼠的肝、脾、肾、心、脑中均有无乳链球菌分出。

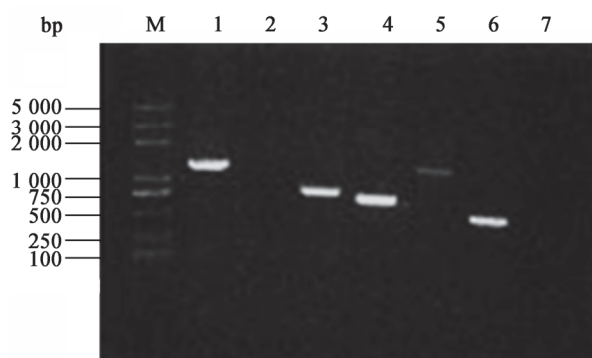


图3 HHHT05株无乳链球菌7种毒力基因的PCR扩增
Figure 3 Amplification of 7 virulence genes of HHHT05 strain *Streptococcus agalactiae*

注: M: DL5000 DNA marker; 1: α -Enolase 基因 PCR 产物; 2: bac 基因 PCR 产物; 3: cfb 基因 PCR 产物; 4: cylE 基因 PCR 产物; 5: FbsA 基因 PCR 产物; 6: hylb 基因 PCR 产物; 7: Lmb 基因 PCR 产物。

Note: M: DL5000 DNA marker; 1: PCR product of α -enolase gene; 2: PCR product of bac gene; 3: PCR product of cfb gene; 4: PCR product of cylE gene; 5: PCR product of FbsA gene; 6: PCR product of hylb gene; 7: PCR product of Lmb gene.

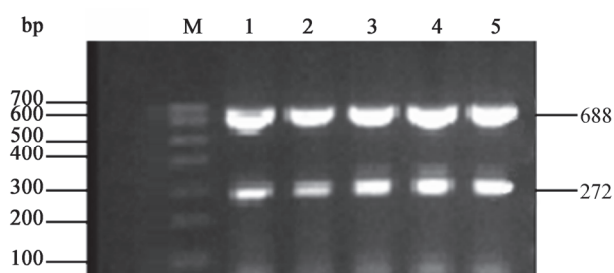


图4 5株无乳链球菌荚膜多糖基因的PCR扩增
Figure 4 PCR amplification of capsular genes of 5 *Streptococcus agalactiae* isolates

注: M: Trans DNA marker I; 1-5: 荚膜多糖相关基因 PCR 产物。

Note: M: Trans DNA marker I; 1-5: PCR product of capsular genes.

对照组小鼠未发生死亡。

2.3 药敏试验结果

结果表明华北地区无乳链球菌对大部分抗生素均较敏感。对无乳链球菌有较强抑菌作用的药物为: 青霉素 G、头孢噻肟、氨苄西林、红霉素、氧氟沙星、克林霉素、万古霉素。其敏感性达到 90%–100%。对其有较强耐药性的药物为四环素,

其菌株耐药率达 82.14%。其常见药物敏感性试验结果如表 2 所示。

3 讨论

3.1 细菌的分离鉴定

调查的牧场中 557 份乳样中, 有 134 份乳样中未分到细菌, 可能与支原体、酵母或者藻类等感染乳腺相关。在分离到的细菌中, 其中有 184 株为金黄色葡萄球菌, 分离率为 33.03%, 该结果与之前报道的分离率 30.19%一致^[9]。目前对于金黄色葡萄球菌的疫苗和噬菌体治疗的研究已日趋成熟。例如本实验室的 CP8-FnBPB-ClfA 偶联蛋白对金黄色葡萄球菌性奶牛乳房炎已取得良好的免疫效果。

目前在我国针对无乳链球菌的研究较少。本试验中共分离得到无乳链球菌 28 株, 其分离率为 5.03%。无乳链球菌是引起奶牛乳房炎的重要病原菌, 因其营养要求相对较高, 故传统的病原菌分离方法存在繁琐、实验周期长的缺点。研究人员需要探求更方便、快捷、准确的鉴定病原菌的方法。随着分子生物学和生物统计学的发展, 细菌 16S rRNA

表2 牛源无乳链球菌对常见药物的敏感性试验结果
Table 2 Drug sensitivity test of the isolated bacterial strain

抗菌药物 Antimicrobial drugs	药物敏感程度 Sensitive degree (%)		
	S	I	R
青霉素 G Penicillin G	96.43	3.57	0.00
头孢噻肟 Cefotaxime	100.00	0.00	0.00
氨苄西林 Amoxicillin	92.86	7.14	0.00
红霉素 Erythromycin	100.00	0.00	0.00
氧氟沙星 Ofloxacin	96.43	3.57	0.00
克林霉素 Clindamycin	100.00	0.00	0.00
四环素 Tetracycline	10.71	7.14	82.14
万古霉素 Vancomycin	100.00	0.00	0.00

注: S: 高度敏感; I: 中度敏感; R: 耐药。

Note: S: High sensitivity; I: Moderate sensitivity; R: Low or no sensitivity.

基因和 API 鉴定系统已广泛应用于细菌的检测与鉴定中, 在实践生产中为病原菌的检测提供了方法, 且该方法特异性强, 操作方便, 灵敏性高^[10]。本试验针对无乳链球菌 16S rRNA 基因可变区设计特异性引物, 对无乳链球菌进行特异性 PCR 反应, 可以用作牛群中无乳链球菌感染的早期流行病学调查。

3.2 荚膜分子分型、表面蛋白及毒力因子分析

奶牛乳房炎无乳链球菌的荚膜较复杂, 目前已知的有 Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX 10 种^[3,11]。本试验结果显示, 华北地区不同牛场、不同年份分离到的 28 株无乳链球菌血清型全部为 Ia 型, 表明 Ia 型为华北地区的优势血清型。本结果与巴西学者^[12]的研究结果不同, 该学者研究发现在巴西, 无乳链球菌优势血清型以 III 型为主。此结果说明地理位置、气候等的差异, 可能是不同国家和地区无乳链球菌的优势血清型存在差异的原因。

无乳链球菌的表面蛋白是重要的毒力因子和疫苗候选物质, 也是分子分型方法之一^[13]。根据文献资料表明, 人源无乳链球菌至少含有 Epsilon (Alp1)、Alp2、Alp3、Alp4、Alpha-C、Rib 中的一种表面蛋白^[14]。

本研究中对 28 株无乳链球菌采用多重 PCR 技术对 Alp 基因进行鉴定。其结果显示表面蛋白均为未定型。此结果表明, 牛源和人源无乳链球菌的 Alp 蛋白并不相同, 可能是细菌在适应宿主的过程中丢失了 Alp 基因, 也可能是牛源无乳链球菌含有与所检基因不相同的 Alp 基因。

对无乳链球菌进行 7 种毒力因子的检测, 结果表明 7 种毒力基因在 28 株牛源无乳链球菌之间分布无差异。且小鼠致病性试验结果表明, 这 28 株无乳链球菌毒力较强, 为华北地区引起奶牛乳房炎的主要菌种之一。

综上所述, 被检菌株血清型均为 Ia 型, 表面蛋白均为未定型, 所具有的毒力因子相同, 这进一步说明了不同年份、华北不同地区的无乳链球菌在基因水平上为同一分子类型, 可能因为华北不同地

区地理位置相对较近, 处于同一气候区。并说明华北地区无乳链球菌在这几年内未发生明显的遗传变异。有西班牙学者对 2004–2010 年 7 年间的无乳链球菌进行调查, 无乳链球菌在 7 年间没有显著变化^[15]。本试验结果与其相同, 这说明了可能无乳链球菌的变异较为缓慢。

3.3 耐药性

选择性应用青霉素 G 等 β -内酰胺类抗生素化学预防是奶牛养殖场常用的预防手段之一。尽管采集乳样的牧场之前防治应用过一段时间的 β -内酰胺类药物, 但本次试验结果表明, 华北地区牛源无乳链球菌对青霉素 G 等 β -内酰胺类药物仍高度敏感, β -内酰胺类药物仍可作为无乳链球菌单纯感染治疗的首选药物。此与保加利亚学者^[16]的研究结果相同。但我国人医方面可能由于抗生素的使用方法不同, 以及人源与牛源无乳链球菌存在一定差异等原因, 其耐药情况较为复杂^[17]。该结果表明, 可能无乳链球菌较难对 β -内酰胺类药物产生耐药。同时本次分离结果中部分乳样为链球菌和其他细菌混合感染, 其他细菌可能对 β -内酰胺类药物存在一定的耐药性。因此对牧场的抗生素耐药性应进行连续监测, 及时调整治疗方案。

本试验中部分菌株产生了不同程度的耐药性, 尤其是四环素, 这与中国奶牛场长期频繁滥用四环素作为饲料添加剂有很大的关系。为了防止耐药菌株的产生, 应当科学规范合理的使用药物, 并连续监测, 及时调整治疗方案。随着人们对于耐药性的重视, 未来生物制剂和疫苗可能将成为治疗乳房炎的主要有效手段。

参考文献

- [1] Yan CP, Zhang X, Guan P, et al. Advanced in prevention and cure of Cow's mastitis[J]. China Dairy Cattle, 2004(3): 47-48 (in Chinese)
闫常平, 张序, 关萍, 等. 奶牛乳房炎的防治进展[J]. 中国奶牛, 2004(3): 47-48
- [2] Song YP, Yang LG. Advance of prevention and cure of dairy Cow in China[J]. China Dairy Cattle, 2010(12): 48-54 (in Chinese)
宋亚攀, 杨利国. 中国奶牛乳房炎防治研究进展[J]. 中国奶牛, 2010(12): 48-54

- [3] Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G, et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 80(2): 212-214
- [4] Creti R, Fabretti F, Orefici G, et al. Multiplex PCR assay for direct identification of group B streptococcal alpha-protein-like protein genes[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(3): 1326-1329
- [5] van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2007, 13(Suppl 3): 1-46
- [6] Nagano N, Nagano Y, Taguchi F. High expression of a C protein β antigen gene among invasive strains from certain: clonally related groups of type Ia and Ib group B streptococci[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(8): 4643-4649
- [7] Sørensen UBS, Poulsen K, Ghezzi C, et al. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones[J]. mBio, 2010, 1(3): e00178-10
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLIS), 2009, 29(3): 72-75
- [9] Ni CX, Pu WX, Hu YH, et al. Isolation, identification and drug sensitive test of pathogenic bacteria causing dairy cattle mastitis[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2010, 19(2): 20-24 (in Chinese)
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, 19(2): 20-24
- [10] Li X, Gao Q. Application of 16S rRNA gene sequence in clinical microbiology[J]. Journal of Microbes and Infection, 2006, 1(3): 184-186 (in Chinese)
李霞, 高谦. 16S rRNA 基因序列分析在临床微生物学中的应用[J]. 微生物与感染, 2006, 1(3): 184-186
- [11] Bohnsack JF. Serotype III *Streptococcus agalactiae* from bovine milk and human neonatal infections[J]. Emerging Infectious Diseases, 2004, 10(8): 1412-1419
- [12] Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, et al. Serotype IX, a Proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(9): 2929-2936
- [13] Ramaswamy SV, Ferrieri P, Flores AE, et al. Molecular characterization of nontypeable group B streptococcus[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(7): 2398-2403
- [14] Moyo SR, Maeland JA, Bergh K. Typing of human isolates of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus, GBS) strains from Zimbabwe[J]. Journal of Medical Microbiology, 2002, 51(7): 595-600
- [15] Giménez M, Sanfeliu I, Sierra M, et al. Evolución de la sepsis neonatal precoz por *Streptococcus agalactiae* en el área de Barcelona (2004-2010). Análisis de los fallos del cumplimiento del protocolo de prevención[J]. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2014, 10(7): 446-450
- [16] Decheva A, Zlatkov V, Pandev K, et al. Screening study on pregnant women and neonatal infection with *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci)[J]. Akusherstvo i ginekologija, 2014, 52(7): 4-7
- [17] Wu TT, Min XC, Wang W. Drug resistance of clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* causing infection in patients[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2015(1): 42-44 (in Chinese)
伍婷婷, 闵小春, 王威. 临床患者感染无乳链球菌分离株的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015(1): 42-44

编辑部公告

邀请您关注《微生物学通报》微信公众号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通微信公众服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

