

杨科岳, 李霆, 蒋乐凡, 等. 南京地区宠物犬猫外耳道炎病原的分离鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (6): 124-129.

YANG K Y, LI T, JIANG L F, et al. Isolation and identification of pathogens of external otitis in pet dogs and cats in the Nanjing area [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (6): 124-129.

南京地区宠物犬猫外耳道炎病原的分离鉴定

杨科岳¹, 李霆², 蒋乐凡¹, 蒋微¹, 刘骏熠^{1,3*}

(1. 南京农业大学, 江苏 南京 210095,

2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081;

3. 新瑞鹏宠物医疗集团有限公司, 广东 深圳 518000)

摘要: 为研究南京地区宠物犬猫外耳道炎的病原种类, 本试验对 12 份患有外耳道炎的犬猫耳分泌物样品进行显微镜检查, 通过 SDA 培养基和改良 Dixon 培养基进行病原的分离纯化培养, 并进行分子生物学鉴定、同源性分析与遗传进化分析。结果显示, 共分离到 10 株细菌, 其中 5 株为葡萄球菌, 5 株为芽胞杆菌; 分离到 5 株真菌菌株, 均为马拉色菌; 分子生物学鉴定、同源性分析与遗传进化分析显示, 细菌病原有伪中间型葡萄球菌和贝莱斯芽胞杆菌, 真菌病原有厚皮马拉色菌。综上, 目前南京地区宠物犬猫外耳道炎病原中, 真菌性病原明确有厚皮马拉色菌, 细菌病原明确有伪中间型葡萄球菌和贝莱斯芽胞杆菌。研究结果对南京地区宠物犬猫外耳道炎的预防与治疗具有一定的参考价值。

关键词: 犬猫外耳道炎; 马拉色菌; 葡萄球菌; 芽胞杆菌

中图分类号: S852. 6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)06-0124-06

Isolation and identification of pathogens of external otitis in pet dogs and cats in the Nanjing area

YANG Keyue¹, LI Ting², JIANG Lefan¹, JIANG Wei¹, LIU Junyi^{1,3*}

(1. Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China;

2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

3. New Ruipeng Pet Healthcare Group, Shenzhen 518000, China)

Abstract: This study aimed to investigate the pathogenic species of external otitis in part of pet dogs and cats in the Nanjing area. The samples of ear secretions were obtained from the pets and examined by microscopy; and the pathogens were isolated, purified, and cultured by SDA medium and modified Dixon medium. Next, molecular biological identification, homology analysis, and genetic evolution analysis were conducted. The identification results showed that 10 strains of the bacteria were isolated, including 5 strains of *Staphylococcus* and 5 strains of *Bacillus*, and 5 strains of fungi, all of which were *Malassezia*. The molecular biological identification, homology analysis, and genetic evolution analysis showed that *Staphylococcus pseudointermedius* and *Bacillus venezensis* existed in bacterial diseases and *Malassezia pachydermatis* existed in fungal diseases. Taken together, *Malassezia pachydermatis* was one of the fungal pathogens, and *Staphylococcus pseudointermedius* and *Bacillus venezensis* were bacterial pathogens of external auditory canal inflammation in part of pet dogs and cats in the Nanjing area. These results might serve as reference for the prevention and treatment of external auditory canal inflammation in pet dogs and cats in Nanjing.

Keywords: external otitis; *Malassezia*; *Staphylococcus*; *Bacillus*

犬猫外耳道炎是一种常见的犬猫外耳道包括耳廓的炎症性疾病。该病通常表现为犬猫耳部瘙痒红肿, 分泌黑色或棕色油性分泌物等症状, 进而影响犬猫外耳道和鼓膜等耳部结构, 严重时向鼓膜深处发展导致中耳炎形成^[1]。犬猫外耳道炎的发病原因很多,

常见并发于其他疾病的内分泌性与过敏性皮肤病、解剖缺陷或角化缺陷等^[2]。马拉色菌作为犬猫真菌性外耳道炎的主要病原, 其定殖于犬猫耳道并大量繁殖, 是真菌性外耳道炎的主要原因之一。在犬猫外耳道中, 马拉色菌可引起皮肤炎症与继发性细菌感染, 导致皮脂溢性皮炎与化脓性外耳炎, 真菌性外耳道炎引起的主要症状有耳道内感染、红斑性、瘙痒性皮肤病损伤, 通常伴有黑色或棕色恶臭油性分泌物的分泌^[3]。

葡萄球菌属细菌作为犬猫细菌性外耳道炎的主要

收稿日期: 2023-10-09; 修回日期: 2024-03-24

基金项目: 上海福贝宠物用品股份有限公司横向合作课题

第一作者: 杨科岳, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 刘骏熠, 硕士, 兽医师, 研究方向为动物疾病诊疗,

E-mail: 1153688338@qq.com。

病原^[4]，主要包括金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、中间葡萄球菌等^[5]。除葡萄球菌属细菌外，芽胞杆菌、变形杆菌、假单胞菌、绿脓杆菌、链球菌等细菌也可引起该病发生^[6]。犬猫耳道、皮肤和黏膜中葡萄球菌属细菌与芽胞杆菌常见，它们均属于条件致病菌^[7]。犬猫具有正常抵抗力的情况下，这些条件致病菌不会造成外耳道感染，但当犬猫出现抵抗力下降的情况时，这些条件致病菌便出现异常增殖，造成感染。由于犬猫外耳道炎的病原众多，且存在地区差异^[8-9]，因此开展区域性的病原学鉴定对该病的针对性预防与治疗具有较高的参考价值。目前江苏地区的犬猫外耳道炎的病原鉴定还鲜有报道。本研究主要对南京地区部分外耳道炎患犬和患猫进行了病原分离和病原形态学、分子生物学鉴定，初步确定了南京地区宠物外耳道炎的主要感染因素为马拉色菌、葡萄球菌和芽胞杆菌等，并确证上述菌株的进化分支，为南京地区宠物外耳道炎的有效诊疗提供了重要的支持。

1 材料与方法

1.1 试验样本

12份样本采集于前来南京农业大学教学动物医院，及新瑞鹏集团旗下艾贝尔宠物医院就诊的患有外耳道炎的犬猫耳道，患病动物常见耳道内油性分泌物的分泌，部分出现耳道皮肤破损、感染，严重病例出现出血。采样犬猫均为本土杂交品种，年龄均为15月龄以上，采样时间为2022年3月至10月份。使用无菌棉拭子进行采集。采集后将样本置于无菌、透明的1.5 mL离心管中。

1.2 试剂及培养基

革兰染色试剂盒、细菌基因组DNA提取试剂盒、真菌DNA提取液、DNA Marker DL2000、Dream Taq Green PCR Master Mix、核酸染料、酚与氯仿异丙醇混合物、溶菌酶、甘油购自北京索莱宝科技有限公司；Diff-quick染色液、乳酸酚棉兰染色液、氢氧化钾溶液、乙醇购自国药集团药物股份有限公司。试验中所有用水均为二级水。

胰蛋白胍琼脂培养基，胰蛋白胍肉汤培养基，改良Dixon琼脂培养基，SDA葡萄糖肉汤培养基，SDB葡萄糖琼脂培养基均购置于北京索莱宝科技有限公司。

固体培养基均需121℃高压蒸汽灭菌30 min，蒸汽灭菌结束后稍稍冷却，降到50℃左右时，无菌倒平板，倒入每个培养皿约5 mL，放入4℃冰箱备用。所有液体培养基，121℃高压蒸汽灭菌30 min，蒸汽灭菌结束后稍稍冷却，放入4℃冰箱备用。

1.3 样本采集

样品采集利用无菌棉拭子进行，将无菌棉拭子伸入患病动物外耳道内，轻轻旋转并刮擦外耳道皮肤后将棉签取出。将取样的棉拭子轻轻压在干净的载玻片表面来回旋转，使耳分泌物均匀地分布在载玻片表面。采样过程为避免外源菌污染，采样过程迅速，器具用品均为一次性无菌用品，或高压后器具。载玻片提前进行高压蒸汽灭菌。待玻片样本干燥后分别进行Diff-quick染色和革兰染色，染好后静置，待玻片干燥后镜检观察。操作时分别对左右耳进行采样并观察。

1.4 细菌分离纯化培养

首先将采样的棉拭子均匀涂布至胰蛋白胍平板表面。37℃静置培养24 h后，进行菌落形态观察，对边缘整齐的单菌落进行挑取，加入到10 mL胰蛋白胍肉汤培养基中，37℃振荡培养24 h后，用移液枪吸取0.1 mL菌液滴入到胰蛋白胍琼脂平板上，再用无菌接种环进行胰蛋白胍琼脂平板划线纯化。将分离出的细菌菌株按M1、M2……次序命名，分离时间为2022年3—10月。

1.5 真菌分离纯化培养

首先将采样的棉拭子均匀涂布至Dixon培养基表面，若出现不能立即接种的情况，则将样品放入无菌试管中，置于-4℃冰箱中，并于24 h内进行接种。接种结束后将平板用封口膜封闭并倒置，放于霉菌箱培养箱，28℃培养，待长出明显菌落后用一次性消毒棉签挑取单菌落至另一空白Dixon培养基进行纯化培养，每日观察菌落生长形态并做好时间记录。将分离出的真菌菌株按23N、24N……次序命名，分离时间为2022年3—10月。

1.6 分离菌革兰染色与Diff-quick染色

对细菌使用革兰染色法进行染色观察。若油镜视野下观察到细菌数量超过5个，即可诊断为细菌感染。镜检下，革兰阳性菌染色结果为蓝紫色，革兰阴性菌染色结果为红色。

对真菌使用Diff-quick染色试剂进行染色观察。若高倍镜视野下观察到形似花生的菌群数量超过5个即可怀疑为马拉色菌感染。

1.7 分子生物学鉴定

将分离纯化完成的菌种按1:1的比例保存于事先配置好的甘油生理盐溶液中，交由北京擎科生物科技有限公司基于Illumina第二代高通量测序技术对16S rDNA/18S rDNA/ITS等基因进行测序，测序后得到的结果在NCBI上进行BLAST，再利用MEGA 7.0软件构建系统发育树；使用Neighbor-Joining法，所选模型为Kimura 2-parameter model，Bootstrap重复次

数设置为 1 000 次。

2 结果

2.1 临床病例

样品采自于患外耳道炎的动物的患病耳道，患病动物常见耳道内黑色或棕色恶臭油性分泌物、并出现瘙痒症状，部分病例还可出现耳道皮肤破损、感染，

严重病例出现出血。

2.2 细菌性外耳炎病例革兰染色

对犬猫外耳道炎病例的耳部油性分泌物玻片样本进行染色后直接镜检，部分细菌性外耳炎病例经革兰染色后，镜检下可见呈深蓝色的球菌（图 1A）、杆菌（图 1B）或球菌杆菌混合（图 1C）感染。



A. 革兰阳性球菌样本；B. 革兰阳性杆菌样本；C. 革兰阳性球菌和杆菌混合样本。

图 1 病例耳分泌物样本革兰染色结果

2.3 真菌性外耳炎病例

经 Diff-quick 染色后，真菌性外耳炎病例样本镜检下可观察到着色较深并大量形似花生的疑似马拉色菌（图 2）。

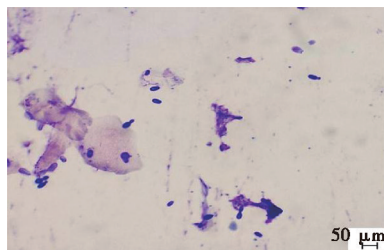
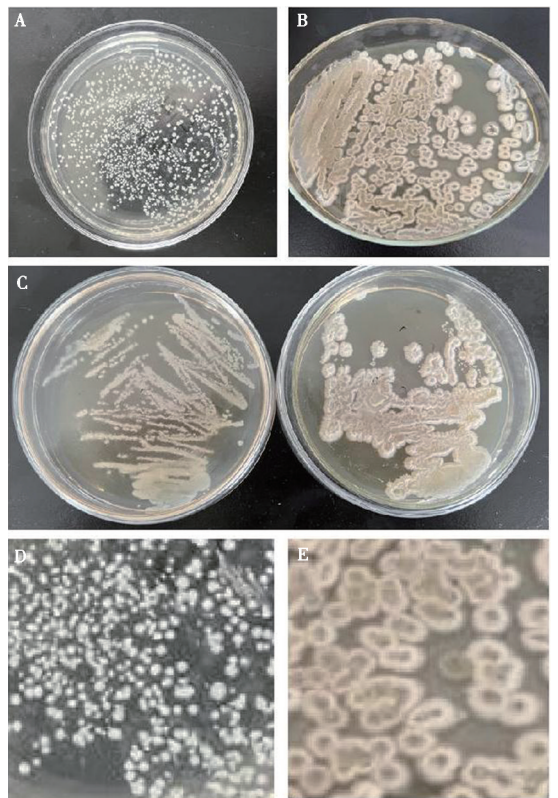


图 2 真菌性外耳炎病例 Diff-quick 染色结果

2.4 细菌菌株分离纯化

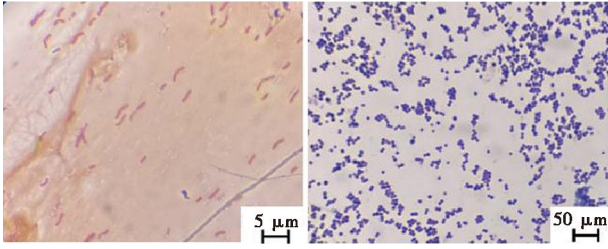
对犬猫外耳道炎病例的耳部油性分泌物样品进行细菌分离纯化，12 份样品中 7 份分离出细菌病原，其分离出样品中共有球菌 5 株（M1, M3, M5, M6, M7）与杆菌 5 株（M2, M4, M8, M9, M10），如图 3 所示，通过形态学观察，球菌菌落形态为乳白色、圆形、光滑、不透明、边缘整齐；杆菌菌落形态为半透明、形状不规则、不光滑、边缘不整齐。部分菌株形态如图 3 所示。

本试验对分离纯化好的菌株进行革兰染色，油镜镜检染色结果如图 4 所示，革兰染色结果部分呈蓝紫色（革兰阳性），部分呈红色（革兰阴性）；菌体形态部分呈球形，部分呈短杆形。



A. M1 球菌菌落；B. M2 杆菌菌落；C. M5 球菌和 M10 杆菌菌落；D. M1 球菌菌落放大图；E. M2 杆菌菌落放大图。

图 3 细菌分离株菌落形态



A. M1 杆菌革兰染色结果; B. M1 球菌革兰染色结果。

图 4 部分分离株革兰染色结果

2.5 真菌菌株分离纯化

对犬猫外耳道炎病例的耳部油性分泌物样品进行真菌菌株分离纯化,真菌在培养 2 周后进行观察。纯化培养结果显示,真菌菌落为乳白色、圆形、不透明、边缘整齐的大型菌落(图 5)。对上述真菌进行 Diff-quick,油镜镜检显示染色呈蓝紫色,菌体形态呈椭圆形似花生(图 6)。

2.6 细菌测序、同源性分析和遗传进化分析结果

5 株球菌形态十分相似,差异不大,选取 3M1 进行了测序;5 株杆菌形态也十分相似,差异不明显,选取了 M2 进行了测序。对纯化菌的基因片段进行扩增后测序,将测序所得的 16S rDNA 结果在 NCBI 上进行 BLAST,经测序后得到的结果在 NCBI 上进行 BLAST,结果如下:分离株 M1 的测序结果与伪中间型葡萄球菌 (*Staphylococcus pseudintermedius*) 的 CP039747.1、CP039746.1、CP039745.1 相似性达到

100%。M2 测序结果与贝莱斯芽胞杆菌 (*Bacillus velezensis*) 的 CP054714.1、CP053377.1、CP051011.1 相似性达到 100%。如图 7 所示 M1 与伪中间型葡萄球菌处于同一发育分支;如图 8 所示,分离株 M2 与贝拉斯芽胞杆菌处于同一发育分支。以测序形态为参照,按照形态学方法鉴定接下来的分离菌株,分别为 4 株葡萄球菌,4 株芽胞杆菌。



图 5 27N 真菌分离株菌落形态

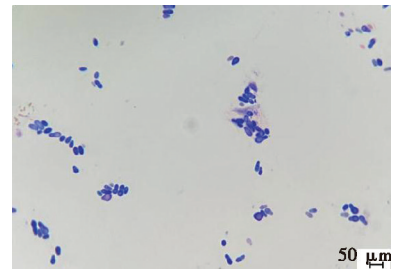


图 6 27N 分离株 Diff-quick 染色结果

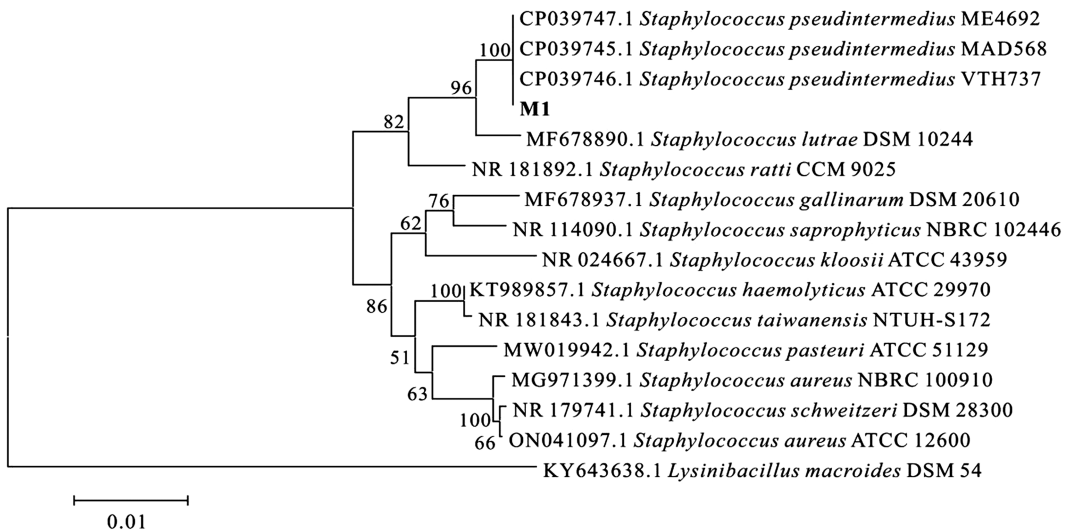


图 7 分离株 M1 系统发育树

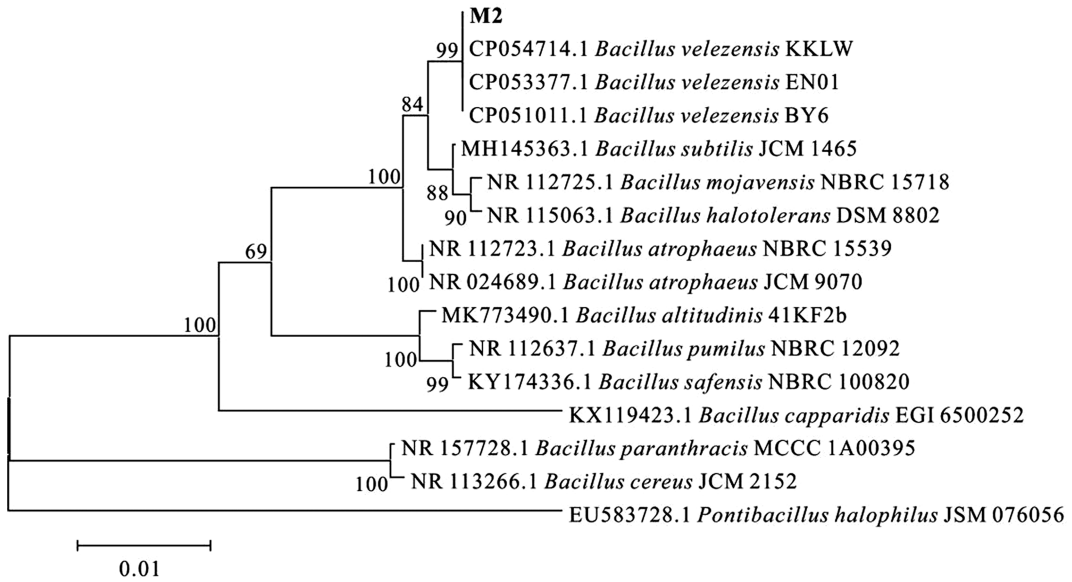


图 8 分离株 M2 系统发育树

2.7 真菌测序、同源性分析和遗传进化分析结果

对纯化菌的基因片段进行扩增后测序，之后将测序所得的 18S rDNA 结果在 NCBI 上进行 BLAST，结果如下：分离株 27N 的测序结果与厚皮马拉色菌 (*Malassezia pachydermatis*) 的 MW874295. 1、KY104148. 1

和 LC317633. 1 相似性分别达到 100%、99.48%、99.1%。如图 9 所示 27N 与厚皮马拉色菌处于同一发育分支。同样，按照此方法鉴定接下来的分离菌株，同为 5 株厚皮马拉色菌。

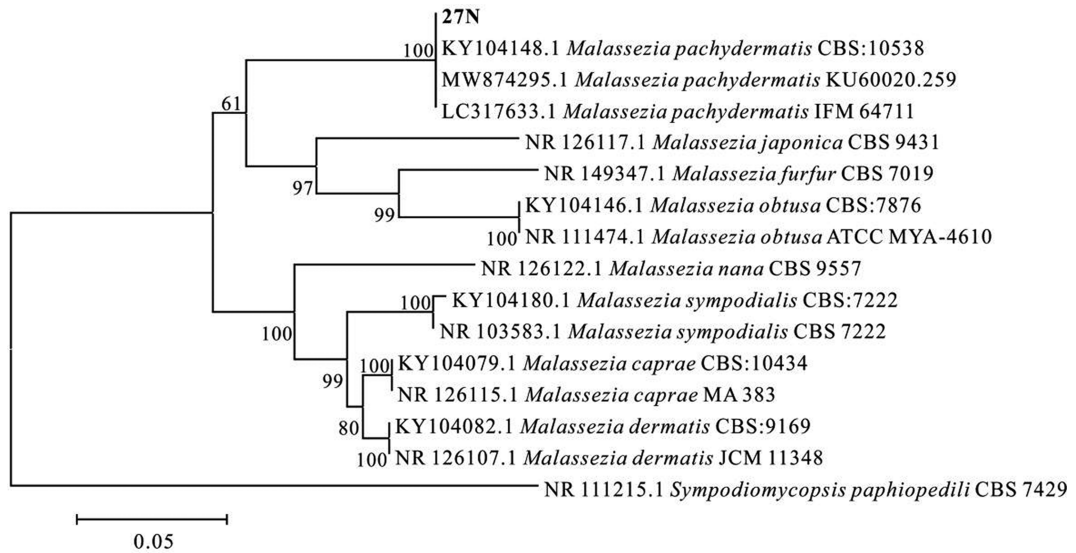


图 9 分离株 27N 系统发育树

3 讨论

犬猫外耳道炎作为小动物临床上常见的炎症性疾病，可分为细菌性与真菌性。该病会引起犬猫外耳道瘙痒、耳部皮肤破损、出血、耳道内皮肤出现破损和感染，严重可出现耳血肿，外耳道炎会对犬猫的外耳道、耳廓和鼓膜产生影响，若症状严重不及时治疗可

导致中耳炎的发生。细菌性外耳道炎是由多种细菌导致的，包括葡萄球菌、变形杆菌、假单胞菌、链球菌及芽胞杆菌。真菌性外耳道炎多由马拉色菌、念珠菌、隐球菌及酵母菌引起^[3]，其中马拉色菌属真菌多为主要病原。病原的确定是开展犬猫外耳道炎治疗的关键。本研究首先利用细菌培养进行初步鉴定，该法通过对菌落进行形态学观察可以大致对菌落进行判

断,但由于真菌自身也具有可变异性且易污染,因此准确性有待提高^[1]。进一步采用临床上常用的 Diff-quick 染色法与革兰染色法来鉴定外耳道炎病原菌^[10]。上述两种方法具有简便快捷的特点,能对病原菌种类做出初步判断,但由于染色过程中样本容易被污染,若要准确地鉴定出病原菌种类需要进一步的检查^[11]。分子生物学鉴定病原具有特异性强、灵敏度高的特点^[12]。本研究采用 16S rDNA 基因序列鉴定细菌,ITS 鉴定真菌,序列结果在 GenBank 数据库中进行相似对比、同源性分析和遗传进化分析,即可准确地诊断出外耳道炎病原菌的种类^[13]。

本研究利用微生物涂布分离法对南京地区的犬猫细菌性、真菌性外耳道炎病原进行分离纯化,并通过核酸测序对纯化的病原进行了鉴定。在犬猫真菌性外耳道炎病原分离中,发现采样的病例中真菌性病原主要为马拉色菌,并未分离出许多文献提及的念珠菌与隐球菌^[14]。在犬猫细菌性外耳道炎病原分离中,发现采样的病例中主要病原为葡萄球菌与芽胞杆菌,也并未分离出文献中提及的变形杆菌、假单胞菌与链球菌^[15]。猜测可能是由于各地气候的不同导致此结果,可能也与温度和湿度有一定的关系。另外,不同菌株在不同地区的流行性也不一致。

犬猫外耳道炎病因复杂,准确地鉴定外耳道炎病原菌对于预防控制犬猫外耳道炎以及制定有效的抗菌治疗方案至关重要。本研究对南京地区的细菌性和真菌性外耳道炎进行了病原学鉴定,为南京地区犬猫外耳道炎的临床防治提供了重要的参考。

参考文献:

- [1] MACPHAIL C. Current treatment options for auricular hematomas [J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2016, 46 (4): 635-641.
- [2] CHANDRA S H V, SRINIVAS R, DAWSON T L J, et al. Cutaneous *Malassezia*: commensal, pathogen, or protector? [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 10: 614446.
- [3] GUILLOT J, BOND R. *Malassezia* yeasts in veterinary dermatology: an updated overview [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 79.
- [4] FISCHER N, ROSTAHER A, ZWICKL L, et al. A *Toxocara canis* infection influences the immune response to house dust mite allergens in dogs [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2018, 202: 11-17.
- [5] AVBERSEK J, PAPIĆ B, KUSAR D, et al. Feline otitis externa caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with mixed hemolytic phenotype and overview of possible genetic backgrounds [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10 (5): 599.
- [6] ZAMANKHAN M H, JAMSHIDI S, ZAHRAEI S T. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs [J]. *Vet Res Commun*, 2010, 34 (5): 435-444.
- [7] DEVRIESE L A, VANCANNEYT M, BAELE M, et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005, 55 (Pt 4): 1569-1573.
- [8] 龚寒春, 曾芸, 黄晓玲, 等. 南宁市宠物猫外耳炎细菌分离鉴定及药敏试验 [J]. *广西畜牧兽医*, 2015, 31 (2): 102-104.
- [9] 王恩超. 深圳宠物医院犬外耳炎的病因调查及 150 例患犬的诊疗实践 [D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
- [10] BAJWA J. Canine otitis externa: treatment and complications [J]. *Can Vet J*, 2019, 60 (1): 97-99.
- [11] KISS G, RADVANYI S, SZIGETI G. New combination for the therapy of canine otitis externa. I. microbiology of otitis externa [J]. *J Small Anim Pract*, 1997, 38 (2): 51-56.
- [12] CAFARCHIA C, ROMITO D, CAPELLI G, et al. Isolation of *Microrosporium canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis [J]. *Vet Dermatol*, 2006, 17 (5): 327-331.
- [13] BUGDEN D L. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia [J]. *Aust Vet J*, 2013, 91 (1/2): 43-46.
- [14] SONG J E, HABERKAMP T J, PATEL R, et al. Fungal otitis externa as a cause of tympanic membrane perforation: a case series [J]. *Ear Nose Throat J*, 2014, 93 (8): 332-336.
- [15] DER GAAG I V. The pathology of the external ear canal in dogs and cats [J]. *Vet Q*, 1986, 8 (4): 307-317.