

张秋玉, 裴文刚, 王俊皓, 等. 新疆双峰驼乳房炎 3 种主要致病菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (4): 113-120.

ZHANG Q Y, PEI W G, WANG J H, et al. Isolation, identification and biological analysis of three main pathogenic bacteria from milk samples of Bactrian camels in Xinjiang [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (4): 113-120.

## 新疆双峰驼乳房炎 3 种主要致病菌的分离鉴定及耐药性分析

张秋玉<sup>1,2</sup>, 裴文刚<sup>1,2</sup>, 王俊皓<sup>1,2</sup>, 冯雅茹<sup>1,2</sup>, 张格<sup>1,2</sup>,  
冉多良<sup>1,2</sup>, 李斌<sup>1,2\*</sup>

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;

2. 新疆草食动物新药研究与创制重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052)

**摘要:** 为调查造成阿勒泰部分地区双峰驼乳房炎的 3 种主要致病菌 (大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌) 及其毒力基因、耐药情况, 本研究通过临床检查及加州乳房炎检测 (CMT) 法调查阿勒泰地区双峰驼乳房炎的流行情况, 采集 388 份乳样进行致病菌的分离鉴定, 通过 PCR 及药敏检测其毒力及耐药情况。调查结果显示, 双峰驼乳房炎总感染率为 15.98%, 其中散养驼临床型和隐型乳房炎平均感染率分别为 4.40%、21.30%, 集约化养殖场分别为 20.00%、17.19%。从 25 份病乳中共分离鉴定出 154 株菌, 其中粪肠球菌 33 株, 占 21.43%; 大肠杆菌 11 株, 占 7.14%; 金黄色葡萄球菌 4 株, 占 2.60%。毒力基因检测结果显示, 随机选择的 4 株大肠杆菌分离株中检测出 *irp2* (75%)、*fyuA* (75%) 2 种毒力因子; 4 株金黄色葡萄球菌分离株中检出 *clfa* (100%)、*sea* (75%)、*fnbB* (75%)、*hla* (50%)、*hly* (50%) 5 种毒力因子; 随机选择的 12 株粪肠球菌中检出 *gelE* (83.30%)、*ace* (83.30%)、*efaA* (75%)、*agg* (50%)、*esp* (25%) 5 种毒力因子。药敏结果显示, 大肠杆菌分离株对阿米卡星耐药率高达 100%, 对哌拉西林与氨苄西林耐药率为 75%, 对头孢唑啉、头孢噻吩、头孢呋辛、头孢哌酮、氧氟沙星、卡那霉素的耐药率为 50%, 对链霉素、妥布霉素和庆大霉素的耐药率为 25%。金黄色葡萄球菌分离株对青霉素 G 耐药率 100%, 对克林霉素耐药率为 50%, 对苯唑西林、红霉素、万古霉素、氯霉素、四环素、诺氟沙星、环丙沙星和左氟沙星的耐药率为 25%, 对米诺环素和呋喃妥因全部敏感。粪肠球菌分离株对青霉素和呋喃妥因较为敏感, 而对万古霉素、四环素、诺氟沙星、环丙沙星敏感的菌株占比均低于 41.70%, 对氯霉素与四环素的耐药菌株占 33.30%, 诺氟沙星和左氟沙星的耐药菌株均占 25%, 耐万古霉素和环丙沙星的菌株均占 16.70%。本研究结果可为双峰驼养殖企业提供帮助, 助力双峰驼养殖业发展。

**关键词:** 双峰驼; 乳房炎; 细菌耐药; 毒力基因; 粪肠球菌

中图分类号: S585.24 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)04-0113-08

## Isolation, identification and biological analysis of three main pathogenic bacteria from milk samples of Bactrian camels in Xinjiang

ZHANG Qiuyu<sup>1,2</sup>, PEI Wengang<sup>1,2</sup>, WANG Junhao<sup>1,2</sup>, FENG Yaru<sup>1,2</sup>, ZHANG Ge<sup>1,2</sup>,  
RAN Duoliang<sup>1,2</sup>, LI Bin<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Xinjiang Key Laboratory of New Drug Research and Development for Herbivores, Urumqi 830052, China)

**Abstract:** The prevalence of Bactrian camel mastitis in Xinjiang's Altay Prefecture was examined using clinical examination and the California Mastitis Test (CMT). Following this, 388 milk samples were collected from the diseased camels for isolation and identification of three pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis*). The virulence genes and drug resistance of the bacteria were detected by PCR and drug sensitivity. The results showed that the average infection rates of clinical and latent mastitis in the free-range camels were 4.40% and 21.30%, respectively, while the infection rates in the intensive farms were 20% and 17.19%, respectively. The 154 bacterial strains isolated and identified from 25 diseased milk samples included 33 strains of *E. faecalis* (21.43%), 11 strains of *E. coli* (7.14%), and 4 strains of *S. aureus* (2.60%). Then some strains were tested for virulence genes and drug sensitivity. The

收稿日期: 2024-04-17; 修回日期: 2025-02-23

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金青年基金项目 (2023D01B33); 阿勒泰地区科技计划项目“骆驼常见病防治及外来病检测技术示范”

第一作者: 张秋玉, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 李斌, 博士, 副教授, 主要从事兽医微生物教学研究, E-mail: libin19921221@126.com。

results of the virulence genes showed that 4 isolates of *E. coli* had 75% of *irp2* and *fyuA*, and 4 isolates of *S. aureus* had *clfa* (100%), *sea* (75%), *fnbB* (75%), *hla* (50%) and *hly* (50%). Twelve strains of *E. faecalis* were found to harbor five virulence factors, including *gelE* (83.30%), *ace* (83.30%), *efaA* (75%), *agg* (50%), and *esp* (25%). The drug sensitivity test showed that the *E. coli* isolates had the most resistant rate to amikacin, as high as 100%; 75% of the isolates has resistance to piperacillin and ampicillin, 50% to cefazolin, cefuroxime, cefoperazone, ofloxacin, and kanamycin, and 25% to streptomycin, tobramycin, and penicillin. The *S. aureus* isolates showed 100% resistance to penicillin G, 50% resistance to clindamycin, 25% resistance to oxacillin, erythromycin, vancomycin, chloramphenicol, tetracycline, norfloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin, and 100% sensitivity to minocycline and nitrofurantoin. Twelve *E. faecalis* strains were more sensitive to levofloxacin and penicillin, while the proportion of strains sensitive to vancomycin, tetracycline, norfloxacin, and ciprofloxacin was less than 41.70%; 33.30% of strains were resistant to ciprofloxacin and tetracycline, 25% to norfloxacin and levofloxacin, and 16.70% to vancomycin and ciprofloxacin. The results of the present study will be helpful in development of the camel breeding industry.

**Keywords:** Bactrian camel; mastitis; pathogenic bacteria; bacterial resistance; virulence gene

骆驼乳房炎 (camel mastitis) 是骆驼乳腺组织受到病原微生物、物理及化学等因素影响而引发的疾病, 一般而言病原微生物感染是最主要的诱因<sup>[1]</sup>。根据是否有临床症状分为临床型乳房炎与隐型乳房炎。该病不仅使骆驼产奶量和乳品质下降, 还会威胁幼驼健康。严重感染时, 可能会破坏乳腺组织, 造成不可逆损伤, 导致停乳或丧失泌乳功能, 给驼乳产业生产造成严重的经济损失<sup>[2]</sup>。此外, 乳汁中的致病菌会污染各类驼乳产品, 进而危害人类身体健康, 威胁公共卫生安全<sup>[3]</sup>。新疆乳用骆驼产业发展迅速, 对于促进地方经济发展发挥了重要的作用。随着骆驼养殖规模不断扩大, 乳房炎广泛流行, 严重制约了产业发展, 造成了严重的经济损失。目前双峰驼乳房炎主要致病菌种类及其耐药情况不明, 严重制约了本病的综合防控。本研究通过多种试验方法分离大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌这 3 种主要致病菌并进行生物学分析, 结果将有助于地方经济及骆驼养殖业发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 乳样采集

乳样均采自阿勒泰地区 (清河县、福海县、吉木乃县) 双峰驼散养户及养殖场。采样时, 先用温水清洗乳房及乳头, 碘液消毒 2 次擦拭整个乳区, 用干净擦拭巾将乳区擦干。双手消毒后弃去每个乳头前 3 把奶, 用无菌采样管采集奶样 5 mL, 注明相关信息 (按照表格编号、时间与场次), 放入冰浴盒中保存, 24 h 内带回实验室。

### 1.2 主要材料

2×*Taq* PCR Master Mix、ddH<sub>2</sub>O 均购自生工生物 (上海) 股份有限公司; 细菌微量生化反应管、药敏片、脑心浸出液肉汤培养基 (BHI 琼脂)、营养肉汤、伊红美兰等培养基购自杭州滨和微生物试剂有限公司; 加州乳房炎检测 (CMT) 法试剂盒购自南京信帆生物有限公司。

### 1.3 双峰驼乳房炎流行情况调查

通过临床观察法、CMT 法对阿勒泰地区 3 个县散养户及规模化养殖场共计 388 峰双峰驼进行乳房炎检测。临床观察法: 视判断乳区有无明显肿大、乳头是否化脓出血、乳汁中是否有血和絮状物等存在; 触判断乳区是否发热、疼痛、存在肿块。根据临床诊断结果综合判定为临床型乳房炎。CMT 法检测采样及结果判定方法按试剂盒说明书操作, 统计数据采用 *t* 检验方法进行差异显著性分析。

### 1.4 主要致病菌的分离培养

#### 1.4.1 大肠杆菌分离培养

将 1 mL 采集的乳样在 10 mL BHI 培养基中扩增培养后, 用无菌接种环蘸取菌液, 在麦康凯固体培养基上平板划线, 37 °C 培养 18~24 h<sup>[4]</sup>。待其长出单菌落, 无菌接种环挑取粉红色单菌落, 划线接种至伊红美蓝琼脂固体平板上, 37 °C 培养 18~24 h。最后, 挑取疑似单个菌落 (黑色带绿色金属光泽), 接种至 BHI 中, 并挑起疑似菌落进行革兰染色, 37 °C 培养 18 h, -20 °C 保菌备用。

#### 1.4.2 金黄色葡萄球菌分离培养

将 1 mL 采集的乳样在 10 mL BHI 培养基中扩增培养后, 使用无菌接种环蘸取扩增液, 接种于 BHI 琼脂培养基 37 °C 培养 12 h 后, 金黄色葡萄球菌在营养肉汤固体培养基上有深黄色色素形成, 挑取疑似菌落进行革兰染色, 将其接种于肉汤琼脂培养基上, 挑单菌落单克隆培养 4 次, 再接种到营养肉汤液体培养基中, 并挑起疑似菌落进行革兰染色, 放置在 37 °C 恒温摇床中培养 8~12 h, 保菌备用。

#### 1.4.3 粪肠球菌分离培养

吸取 500 μL 驼乳样品接种至 5 mL BHI 液体培养基, 120 r/min 37 °C 摇床培养 18 h。同时吸取等量样品接种至含 3 mL BHI 液体培养基的试管中 (液面用液体石蜡封闭), 置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中增菌培养 24 h。增菌培养后蘸取菌液于营养肉汤琼脂平板上划线分离, 待长出单菌落后挑取白色、光滑、边缘整

齐且湿润的单菌落单克隆培养数次，再次接种于 BHI 中，并挑起疑似菌落进行革兰染色，放置在 37 °C 恒温摇床中培养 8~12 h，保菌备用。

其他细菌依照微生物学方法，挑取单菌落进行 16S rRNA 测序分析。

### 1.5 主要致病菌的鉴定

#### 1.5.1 生化鉴定

将分离到的细菌根据镜检结果进行初步判断，再根据相应的细菌微量生化反应管说明书进行试验，确认细菌的种类<sup>[5]</sup>。

#### 1.5.2 PCR 鉴定

在配制的液体 BHI 中接种要检测的菌种，在 37 °C 摇床 120 r/min 培养 12~14 h；使用细菌基因组提取试剂盒提取细菌基因组 DNA，按照文献报道的细菌 16S rRNA 通用引物（27F：5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3'，1492R：5'-CGGTACCTTGT-TACGACTTC-3'）进行 PCR 扩增<sup>[6]</sup>。扩增体系：上下游引物各 1 μL，菌液 DNA 2 μL，2×Taq Master Mix 12.5 μL，dd H<sub>2</sub>O 8.5 μL。扩增条件：95 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s，54 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 90 s，30 个循环；72 °C 延伸 10 min，取出进行琼脂糖凝胶电泳。

DNA 片段的琼脂糖凝胶电泳检测：取 5~7 μL PCR 产物用 1.00% 琼脂糖凝胶在 1×TAE 电泳液中电泳 30 min，在紫外凝胶成像后记录结果，随后将产物送北京擎科生物股份有限公司测序。测序结果在 NCBI 进行比对分析，后用 MEGA 7.0 软件绘制进化树。

### 1.6 分离菌株毒力基因检测

采用 25 μL 反应体系进行毒力基因的检测，反应体系：上下游引物各 1 μL，DNA 模板 1 μL，2×Taq Master Mix 12.5 μL，ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 μL。根据参考文献中报道的引物序列，合成大肠杆菌毒力基因 *irp2*、*hlyA*、*astA*、*fyuA*、*SepA*<sup>[7-11]</sup> 引物，见表 1；金黄色葡萄球菌毒力基因 *hla*、*hlyB*、*sea*、*seb*、*fnbB*、*pvl*、*clfa*<sup>[12-15]</sup> 引物，见表 2；粪肠球菌毒力基因 *gelE*、*efaA*、*ace*、*agg*、*esp*、*cylA*<sup>[16-18]</sup> 引物，见表 3，总共 18 对特异性引物。

### 1.7 药敏试验

K-B 纸片法检测菌株药物敏感性<sup>[19-20]</sup>，用游标卡尺量取抑菌圈直径，依据临床实验室标准研究所 (CLSI) 制定的标准进行判定。

表 1 大肠杆菌毒力基因检测引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度/°C	片段长度/bp
<i>irp2</i>	F: AAGGATTCGCTGTTACCCGA	52	301
	R: TCGGCCAGGATGATTCCTCG		
<i>hlyA</i>	F: ACGATGTGGTTTATTCTGGA	46	165
	R: CTTCACGTGACCATACATAT		
<i>astA</i>	F: CCATCAACACAGTATATCCGA	59	111
	R: GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT		
<i>fyuA</i>	F: ACACGGCTTTATCCTCTGGC	58	953
	R: GGCATCTTGACGATTAACGAA		
<i>SepA</i>	F: TAAAACCCGCCCTGAGTA	62	611
	R: TGCCGGTGAACAGGAGTTT		

表 2 金黄色葡萄球菌毒力基因检测引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度/°C	片段长度/bp
<i>hla</i>	F: CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	54	209
	R: CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		
<i>hlyB</i>	F: GTGCCTTACTGACAATAGTGC	55	309
	R: GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT		
<i>sea</i>	F: GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA	55	560
	R: CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTT		
<i>seb</i>	F: ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA	54	404
	R: ATCCCGTTTCATAAGCGGAGT		
<i>fnbB</i>	F: GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT	57	524
	R: CAAGTTCGATAGGACTACTATGTTT		
<i>pvl</i>	F: ATCATTAGGTAATAATGTCTGGACATGATCCA	56	433
	R: GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC		
<i>clfa</i>	F: ATTGCGCTGGCTTCAGTGC	57	292
	R: CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG		

表 3 粪肠球菌毒力基因检测引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度/°C	片段长度/bp
<i>clyA</i>	F: TTGCTGGACTAATAGACACG	56	504
	R: CTTTGCCTAGTGGAGAAAAC		
<i>gelE</i>	F: ACCCCGTATCATTGGTTT	52	419
	R: ACGCATTGCTTTTCCATC		
<i>esp</i>	F: TTGCTAATGCCTAGTCCACGACC	63	933
	R: GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA		
<i>agg</i>	F: AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	55	1 553
	R: AAACGGCAAGACAAGTAAATA		
<i>ace</i>	F: AAAGTAGAATTAGATCCACAC	56	320
	R: TCTATCACATTCCGTTGCG		
<i>efaA</i>	F: GACAGACCCTCAGGAATA	52	705
	R: AGTTCATCATGCTGTAGTA		

## 2 结果与分析

### 2.1 双峰驼乳房炎流行情况调查

由表4可知,阿勒泰部分地区(清河县、福海县、吉木乃县)乳用双峰驼乳房炎总体感染率为15.98%(62/388),其中临床型乳房炎为3.09%(12/388),隐型乳房炎为12.89%(50/388),表明双峰驼乳房炎以隐型为主。集约化养殖由于有规范的操作及养殖要求,因此整体患病率低于散养方式。此外使用挤奶器可以有效地减少细菌感染乳房,降低乳房炎患病率。

表4 双峰驼乳房炎调查结果统计 份

采样地点	养殖方式	挤奶方式	采样数	临床型乳房炎数	隐型乳房炎数
清河县	散养	手工	10	1	6
	散养	挤奶器	20	2	5
	散养	挤奶器	14	1	4
	散养	挤奶器	9	0	2
福海县	散养	手工	7	1	2
	集约化养殖	挤奶器	35	0	7
吉木乃县	集约化养殖	挤奶器	293	7	24
总计			388	12	50

### 2.2 双峰驼乳房炎主要致病菌分离培养

从388份乳样中选出25份病乳进行细菌分离鉴定,共分离出154株菌。其中,疑似金黄色葡萄球菌4株,占2.60%;疑似大肠杆菌11株,占7.14%;疑似粪肠球菌33株,占21.43%。

### 2.3 主要致病菌的鉴定

#### 2.3.1 细菌生化鉴定情况

11株疑似大肠杆菌生化鉴定结果:分离菌株葡萄糖、赖氨酸、鸟氨酸、乳糖、吡啶试验和甲基红试验为阳性;硫化氢、苯丙氨酸、尿素、V-P试验和枸橼酸盐试验均为阴性。结合肠杆菌科细菌生化鉴定编码册进行菌种判定<sup>[5]</sup>,分离菌均符合大肠杆菌生化特性。

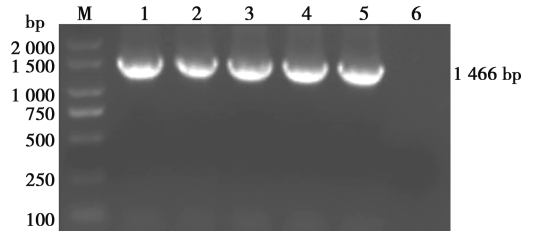
4株疑似金黄色葡萄球菌生化鉴定结果:分离菌株均可发酵蔗糖、甘露醇、甘露糖、果糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖,V-P试验、血浆凝固酶试验和硝酸盐还原试验均为阳性;木糖为阴性。结合葡萄球菌属细菌生化鉴定编码册进行菌种判定,分离菌均符合葡萄球菌属生化特性。

33株疑似粪肠球菌生化鉴定结果:分离菌株葡萄糖、胆汁七叶苷、硫化氢、山梨醇、甘露醇、触媒试验均为阳性;阿拉伯糖为阴性。根据肠杆菌生化鉴

定编码册鉴定为粪肠球菌。

#### 2.3.2 PCR鉴定

以分离菌株基因组DNA为模板,以16S rRNA为通用引物,进行PCR方法扩增,结果在1466 bp处出现与预期目的片段大小相符的明亮条带,部分结果如图1所示。将测序结果经BLAST分析比对,确定分离菌株种类。



M. DL2000 Marker; 1~5. 分离菌株; 6. 阴性对照。

图1 16S rRNA 测序电泳图

11株疑似大肠杆菌分离菌株测序结果经NCBI比对分析可知,其与大肠杆菌NBRC、U 5/41 (ID: NR. 114042.1、NR. 024570.1)等的16S rRNA基因序列相似性为99.00%以上,且与GenBank中其他大肠杆菌分离株均有较高的相似性,据此可以确定分离菌均为大肠杆菌。

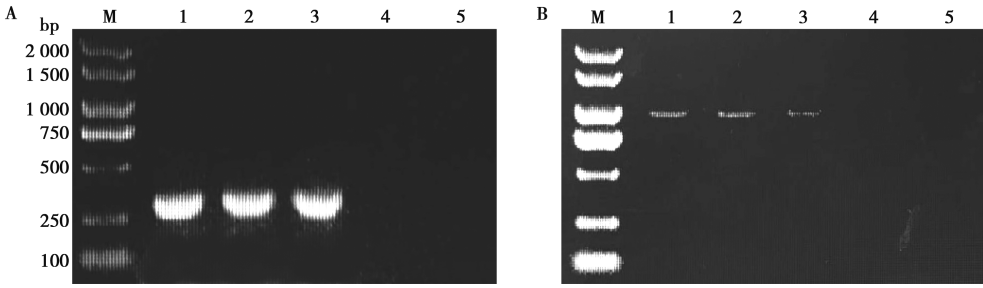
4株疑似金黄色葡萄球菌分离菌株测序结果经NCBI比对分析可知,其与金黄色葡萄球菌ATCC、S33 (ID: NR. 115606.1、NR. 037007.2)等的16S rRNA基因序列相似性为99.00%以上,且与GenBank中其他分离株均有较高的相似性,据此可以确定分离菌均为金黄色葡萄球菌。

测序结果经NCBI比对分析可知,33株疑似粪肠球菌分离菌株与粪肠球菌ATCC、LMG、IMAU (ID: NR. 115765、NR. 114782、MW135200)等的16S rRNA基因序列相似性为99.00%以上,且与GenBank中其他分离株均有较高的相似性,据此可以确定分离菌均为粪肠球菌。

### 2.4 分离菌株毒力基因检测

#### 2.4.1 大肠杆菌毒力基因PCR检测

采用PCR方法对随机选择的4株驼源乳房炎大肠杆菌分离株*E. coli* 2021.1~*E. coli* 2021.4的毒力基因进行检测,电泳结果见图2。5种毒力基因中检出了*irp2* (75%)、*fyuA* (75%) 2种毒力基因,目的条带大小分别为302、953 bp; *astA*、*hlyA*、*SepA*基因未检测出。*E. coli* 2021.1、*E. coli* 2021.2和*E. coli* 2021.3都检出了*irp2*及*fyuA*两种毒力基因,而*E. coli* 2021.4未检测到。



M. DL2000 Marker; 1~4. 大肠杆菌分离株 *E. coli* 2021.1~*E. coli* 2021.4; 5. 阴性对照。

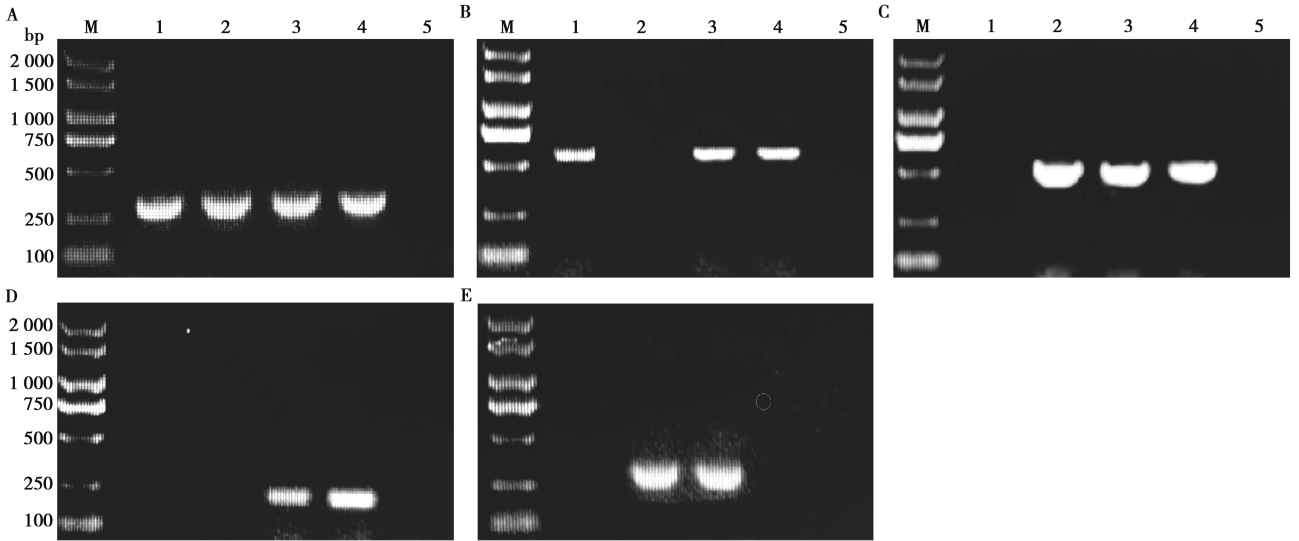
图2 大肠杆菌毒力基因 *irp2* (A) 和 *fyuA* (B) 检测

2.4.2 金黄色葡萄球菌毒力基因 PCR 检测

采用 PCR 方法对 4 株驼源乳房炎金黄色葡萄球菌分离株 SaC01~SaC04 的毒力基因进行检测, 电泳结果见图 3。PCR 检测结果显示, 7 种毒力基因中检测出了 *clfa*、*sea*、*fnbB*、*hla*、*hly* 共 5 种, 目的条带大小分别为 292、560、524、209、309 bp; *seb*、*pvl* 基

因未检测出。

各毒力基因检出率分别为: *clfa* 100%, *sea* 75%, *fnbB* 75%, *hla* 50%, *hly* 50%, 其中从 SaC03 中检出 5 种毒力基因组合, SaC04 同时检出 *clfa*、*sea*、*fnbB* 及 *hla* 共 4 种毒力基因, SaC02 检出 *clfa*、*fnbB* 及 *hla* 毒力基因, SaC01 中检出 *clfa* 和 *sea* 毒力基因。



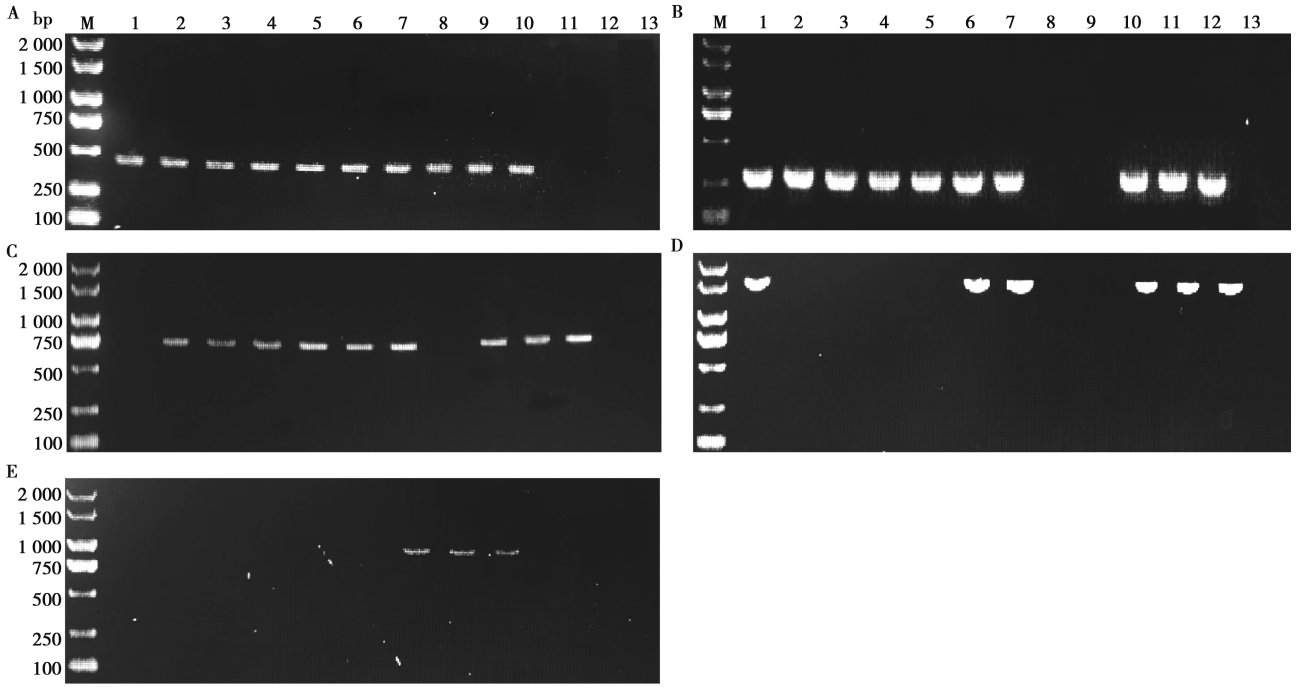
M. DL2000 Marker; 1~4. 金黄色葡萄球菌分离株 SaC01~SaC04; 5. 阴性对照。

图3 金黄色葡萄球菌毒力基因 *clfa* (A)、*sea* (B)、*fnbB* (C)、*hla* (D)、*hly* (E) 检测

2.4.3 粪肠球菌毒力基因 PCR 检测

采用 PCR 方法对随机选择的 12 株驼源乳房炎粪肠球菌分离株的毒力基因进行检测。6 种毒力基因中检测出了 *gelE*、*ace*、*efaA*、*agg*、*esp* 这 5 种毒力基因, 目的条带大小分别为 419、320、705、1 553、933 bp; *cylA* 基因未检测出, 电泳结果见图 4。

所选粪肠球菌菌株毒力基因检出率分别是: *gelE* 83.30%, *ace* 83.30%, *efaA* 75.00%, *agg* 50%, *esp* 25%, 且有 58.30% 的粪肠球菌菌株中同时检出 3 种毒力基因, 16.70% 的粪肠球菌菌株中同时检出 4 种毒力基因。



M. DL2000 Marker; 1~12. 粪肠球菌分离株; 13. 阴性对照。

图 4 粪肠球菌毒力基因 *gelE* (A)、*ace* (B)、*efaA* (C)、*agg* (D) 和 *esp* (E) PCR 检测

### 2.5 分离菌株药敏试验

#### 2.5.1 大肠杆菌分离株耐药性检测

对 4 株大肠杆菌分别选用 4 类 12 种抗菌药物进行药敏试验, 结果显示, 所有分离株最少耐 1 种抗生素, 最多耐 12 种抗生素; 对阿米卡星耐药率最高, 高达 100%; 对哌啶西啉与氨苄西林耐药率较高, 耐药率为 75%; 头孢唑啉、头孢噻吩、头孢呋辛、头

孢哌酮、氧氟沙星、卡那霉素的耐药率为 50%; 链霉素、妥布霉素和庆大霉素的耐药率为 25%。进一步对分离菌株进行药敏分析可知, 4 株菌株中, *E. coli* 2021.1 及 *E. coli* 2021.3 两株出现了多重耐药 (对 3 种及以上抗菌药物耐药), 占 50%。各抗菌药物耐药结果见图 5。

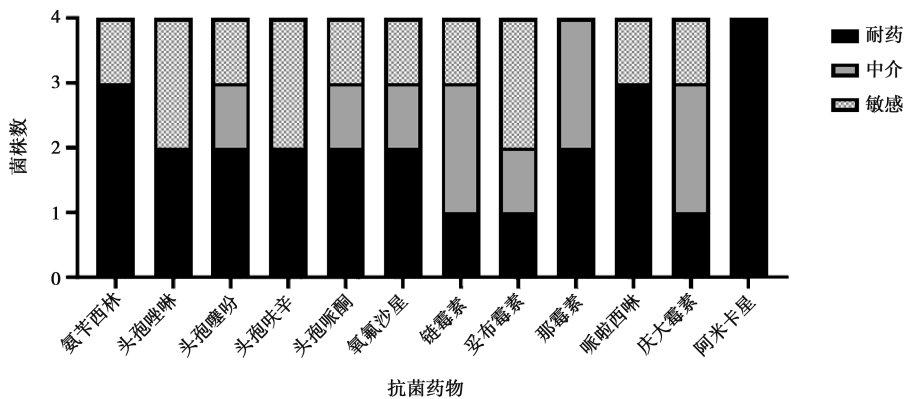


图 5 大肠杆菌药敏试验结果

#### 2.5.2 金黄色葡萄球菌分离株耐药性检测

对 4 株金黄色葡萄球菌分离株选用 8 大类 12 种抗菌药物分别进行药敏试验, 结果见图 6。结果显示, 所有分离株最少耐 1 种抗生素, 最多耐 10 种抗生素; 对青霉素 G 耐药率均高达 100%; 对克林霉素耐药率较高, 耐药率为 50%; 对苯唑西林、红霉素、

万古霉素、氯霉素、四环素、诺氟沙星、环丙沙星和左氟沙星的耐药率为 25%; 对米诺环素和呋喃妥因全部敏感。进一步对分离菌株进行药敏分析可知, 4 株分离菌中, SaC04 出现了多重耐药 (对 3 种及以上抗菌药物耐药), 占 25%。

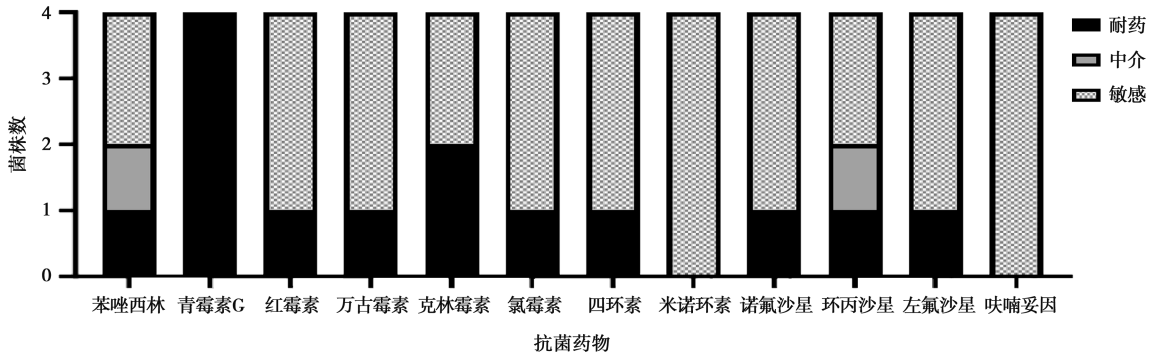


图6 金黄色葡萄球菌药敏试验结果

### 2.5.3 粪肠球菌分离株耐药性检测

对12株粪肠球菌使用6大类8种抗菌药物进行药敏试验,结果见图7。所有分离株最少耐1种抗生素,最多耐8种抗生素;12株粪肠球菌对青霉素和呋喃妥因较为敏感,而对万古霉素、四环素、诺氟沙星、环丙沙星敏感的菌株占比均低于41.70%。氯霉素与四环素的耐药菌株最多,占分离株的33.30%;

诺氟沙星和左氟沙星的耐药菌株均占25.00%,耐万古霉素和环丙沙星的菌株均占16.70%,值得注意的是这2种抗生素中介耐药菌株较多,有发展为潜在耐药的趋势。进一步对分离菌株进行药敏分析可知,12株分离菌中1株对所选8种抗生素均敏感(占比8.30%),5株出现了多重耐药(对3种及以上抗菌药物耐药),占41.70%。

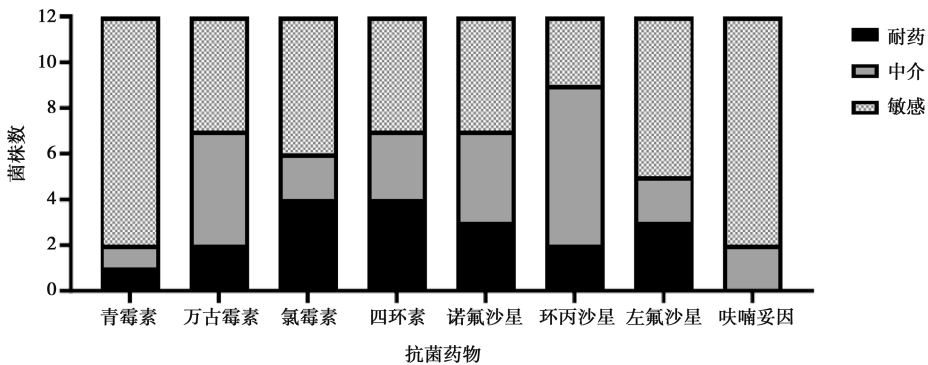


图7 粪肠球菌药敏试验结果

## 3 讨论

乳房炎是危害双峰驼养殖业健康发展的重要疾病,严重制约着驼乳产业的发展。本研究结果表明,金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和大肠杆菌是引起双峰驼乳房炎主要致病菌,乳房炎样品中粪肠球菌的分离率最高,也是引发乳房炎的重要条件致病菌之一。Osman等<sup>[21]</sup>关于单峰驼乳房炎主要致病菌的分离结果显示,金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、无乳链球菌等是主要的致病菌。

流行病学调查结果显示,阿勒泰部分地区(清河县、福海县、吉木乃县)乳用双峰驼乳房炎总体感染率为15.98%,其中临床型乳房炎为3.09%,隐型乳房炎为12.89%,表明双峰驼乳房炎以隐型为主;散养方式下临床型乳房炎和隐型乳房炎感染率均高于舍饲条件;采用人工挤奶方式的双峰驼,临床型和隐型乳房炎感染率均高于采用挤奶器的双峰驼。其

原因主要为散养户的双峰驼大多是半野生状态,活动范围较大,乳房炎水平传播的机会较低。然而,集约化后饲养密度较高,活动范围较小,挤奶频次增高,并且存在共用一个挤奶器接奶嘴,增加了乳房炎水平传播的机会。本研究从25份患乳房炎双峰驼乳汁样本中共分离出大肠杆菌11株,金黄色葡萄球菌4株,粪肠球菌33株,耐药性结果表明,目前新疆部分地区双峰驼养殖场乳房炎大肠杆菌、金黄色葡萄球菌与粪肠球菌耐药性不强,如粪肠球菌耐药性低于王瞳等<sup>[18]</sup>对牛源粪肠球菌的耐药性检测结果,可能与乳用骆驼养殖场抗生素使用频率低而未产生耐药性有关。

Asfaw等<sup>[1]</sup>对埃塞俄比亚的3个不同地区进行了骆驼乳房炎流行病学调查,其乳房炎患病率分别为26.30%、26.00%和22.40%,且泌乳后期的乳房异常和乳房炎发病率明显高于泌乳早期。乳房炎的发病往往伴随着骆驼生产胎次的增加而增加<sup>[3]</sup>。Seligsohn

等<sup>[22]</sup>对肯尼亚部分地区进行了骆驼乳房炎流行病学调查, 结果患病率为 26.00%, 调查发现当地牧民对骆驼养殖知识相对匮乏, 在挤奶过程中并未采取任何形式的消毒处理, 从而增加了骆驼乳房炎的发病率。由上述数据可知, 非洲地区的骆驼乳房炎患病率普遍在 22.00%~27.00%<sup>[21]</sup>。Durrani 等<sup>[23]</sup>对巴基斯坦旁遮普南部的沙漠地区进行了骆驼乳房炎流行病学调查, 结果显示骆驼乳房炎的患病率为 44.00%, 并且当地饲养骆驼主要是为了获得驼奶, 但骆驼乳房炎的发病率在近 10 年来有所增加, 在巴基斯坦, 锥虫病和乳腺炎是对骆驼产生威胁的主要疾病。在我国, 苏晨等<sup>[24]</sup>对新疆部分地区骆驼亚临床型乳房炎患病情况进行调查, 结果显示骆驼乳房炎患病率为 7.50%; 玛依拉等<sup>[25]</sup>在 2015 年对新疆阿勒泰福海县进行了骆驼乳房炎调查, 患病率为 26.00%。造成新疆地区骆驼乳房炎患病率差异的原因可能与圈舍环境卫生、季节和泌乳阶段有关。

## 4 结论

本试验结果表明, 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌是引起阿勒泰地区双峰驼乳房炎的重要致病菌。药敏试验结果表明, 大肠杆菌分离株对氨基糖苷类(青霉素类)有明显的耐药现象, 对  $\beta$ -内酰胺类较为敏感; 金黄色葡萄球菌分离株对所检测的 8 大类 12 种抗生素均有明显的耐药现象; 粪肠球菌分离株对所检测的 6 大类 8 种抗生素中, 对氯霉素类与四环素类具有明显的耐药现象, 对青霉素类和硝基咪唑类较为敏感。由于不同场区分离菌株耐药性有差异, 本研究结果可为菌株来源场选择有效治疗乳房炎药物提供参考。

## 参考文献:

- [1] ASFAW G M, ABERA S, GALMA W. Camel mastitis: prevalence, risk factors, and isolation of major bacterial pathogens in Gomole district of Borena Zone, Southern Ethiopia [J]. *Veterinary Medicine International*, 2021, 2021: 9993571.
- [2] ALJUMAAH R S, ALMUTAIRI F F, AYADI M. et al. Factors influencing the prevalence of subclinical mastitis in lactating dromedary camels in Riyadh Region, Saudi Arabia [J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2011, 43 (8): 1605-1610.
- [3] ALEBIE A, MOLLA A, ADUGNA W, et al. Prevalence, isolation, identification, and risk factors of major bacterial cause of camel subclinical mastitis [J]. *Biomed Research International*, 2021, 2021: 5522331.
- [4] 赖文韬, 余茂林, 姜中其. 杭州地区牛乳源大肠杆菌的分离鉴定及木糖醇联用抗菌肽对生物被膜形成的干预 [J]. *畜牧与兽医*, 2024, 56 (4): 78-83.
- [5] 夏颖. 河北部分区域奶牛乳房炎主要致病菌鉴定及多重 PCR 检测方法的建立 [D]. 保定: 河北农业大学, 2019.
- [6] 朱静. 寡营养条件下阿特拉津降解菌株的分离、鉴定及特性研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [7] 张锦, 马宏, 夏胜利, 等. 产志贺毒素大肠杆菌毒力基因检测 [J]. *中国公共卫生*, 2003 (12): 56-57.
- [8] ERIC M, BAUTISTA A C, REYL C G, et al. Virulence gene transcription, phylogroups, and antibiotic resistance of cervico-vaginal pathogenic *E. coli* in Mexico [J]. *PLoS One*, 2020, 15 (6): e0234730.
- [9] PIETRO B, FABRIZIO A, ILENIA D, et al. Virulence gene profiles of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Northern Italy [J]. *Veterinaria Italiana*, 2018, 54 (3): 189-196.
- [10] 李仕林. 规模化羊场致羔羊腹泻大肠杆菌的分离鉴定及部分生物学特性研究 [D]. 塔里木: 塔里木大学, 2021.
- [11] 张金宝. 宁夏地区牛源大肠杆菌优势血清型和毒力基因检测及耐药性分析 [D]. 银川: 宁夏大学, 2015.
- [12] 杨小庆. 辽宁地区奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌分离株耐药性研究及毒力基因检测 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- [13] 吴博威. 奶牛乳腺炎源金黄色葡萄球菌的耐药基因和毒力基因检测分析 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.
- [14] 陈云. 牛源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性和毒力基因的检测 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- [15] 孙峥. 金黄色葡萄球菌的毒力基因检测及耐药性分析 [D]. 大连: 大连医科大学, 2018.
- [16] 幸文定. 江西部分地区猪源粪肠球菌耐药性及毒力基因检测与分析 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2016.
- [17] 阚威. 奶牛乳房炎链球菌和肠球菌的分离鉴定及毒力基因的检测 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [18] 王瞳, 万佳宏, 常佳伟, 等. 宁夏地区牛源肠球菌分离鉴定及耐药性与毒力基因检测 [J]. *中国兽医学报*, 2020, 40 (3): 562-567.
- [19] 尚月丽, 滑志民, 钱佳梅, 等. 上海地区奶牛乳房炎大肠杆菌鉴定及耐药性检测 [J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55 (6): 114-117.
- [20] 牛冬梅, 周万青, 洪骏, 等. 自动化药敏系统与 K-B 纸片扩散法在肠杆菌科细菌中对阿米卡星药敏结果差异的探讨 [J]. *东南国防医药*, 2015, 17 (2): 131-134.
- [21] OSMAN K M, SAMIR A, ORABI A, et al. Confirmed low prevalence of *Listeria* mastitis in she-camel milk delivers a safe, alternative milk for human consumption [J]. *Acta Tropica*, 2014, 130: 1-6.
- [22] SELIGSOHN D, NYMAN A K, YOUNAN M, et al. Subclinical mastitis in pastoralist dairy camel herds in Isiolo, Kenya: prevalence, risk factors, and antimicrobial susceptibility [J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103 (5): 4717-4731.
- [23] DURRANI A Z, BASHIR Z, RASHEED I, et al. Epidemiological study of common diseases and their risk factors in camels in South Punjab, Pakistan [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 108: 6-12.
- [24] 苏晨, 蔡扩军, 徐敏. 骆驼隐性乳房炎检测报告 [J]. *中国畜牧业*, 2021 (19): 42.
- [25] 玛依拉, 叶尔肯, 阿德里江, 等. 福海县奶牛用骆驼隐性乳房炎的检测调查 [J]. *新疆畜牧业*, 2015 (S1): 22-23.