



一例羊金黄色葡萄球菌病的诊治及体会

张 燕,郑添予,金春梅,周博宇,梁晚枫,于龙政*

(延边大学 农学院,吉林 延吉 133002)

中图分类号: S855. 1

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2021) 18-0088-04

摘 要: 2019 年 9 月上旬,吉林延边地区某养羊场羊群陆续出现以精神萎靡、食量减少、流鼻涕、咳嗽、腹泻为主要症状的发病情况。为了确定引起该养羊场发病羊感染的病原菌及筛选有效的治疗药物,试验采集患病羊的鼻拭子样本,进行细菌分离,并对分离菌进行革兰氏染色、形态学观察、生化鉴定、PCR 鉴定、16S rDNA 测序后进行同源性比对和遗传进化分析,对分离菌株进行药敏试验。结果表明: 从患病羊鼻拭子样本中分离得到 1 株在 LB 固体培养基上呈金黄色、隆起、光滑、湿润、边缘整齐的圆形菌落,革兰氏染色阳性,其生化培养特性与金黄色葡萄球菌符合,16S rDNA 核苷酸序列经 BLAST 比对后与金黄色葡萄球菌相似性为 100%。分离菌株对头孢唑肟、卡那霉素、庆大霉素、强力霉素、四环素、氯霉素、红霉素、万古霉素敏感,对螺旋霉素、青霉素、氨苄西林、洁霉素耐药。指导该养羊场使用头孢唑肟后,病羊痊愈。说明通过药敏试验选取敏感药物防治羊金黄色葡萄球菌病非常必要。

关键词: 羊; 金黄色葡萄球菌; 分离; 鉴定; 耐药性

开放科学(资源服务) 标识码
Open Science Identity (OSID)



葡萄球菌广泛存在于环境中,是条件性致病菌,其中金黄色葡萄球菌可引起严重的临床症状,如菌血症和败血症等,对养殖业造成的危害十分严重^[1-3]。近年来,各地葡萄球菌病的发病率均有上升趋势^[4]。葡萄球菌具有广泛的耐药性,这给临床治疗带来诸多困难,而且葡萄球菌可能在动物和人类之间传播,对人类健康造成极大威胁,因此,控制葡萄球菌耐药性是世界公众健康关注的焦点之一^[4-5]。2019 年 9 月上旬,吉林延吉地区某养羊场羊群发生以流鼻涕、咳嗽、腹泻等为主要症状的疾病,笔者对引起该养羊场羊群疾病的病原菌进行分离鉴定并进行耐药性分析,以期临床诊断和有效控制疾病提供依据。

1 发病情况及临床症状

2019 年 9 月上旬,吉林延吉地区某养羊场羊群陆续出现以精神萎靡、食量减少、流鼻涕、咳嗽、腹泻为主要症状的羊只。该养殖场共养殖绵羊 568 只,发病 25 只,发病率 4. 4%。发病期间,曾用青霉素进行治疗,但治疗效果不明显,发病一段时间后迅速传播

蔓延,且出现少量死亡羊只。

2 实验室检测

2. 1 细菌的分离培养与形态学观察

取患病羊鼻拭子,涂布于 LB 固体培养基,37 ℃ 需氧培养 24 h,挑取生长状态良好的单菌落的一部分进行革兰氏染色、镜检。另外,挑取单菌落剩余部分接种于 LB 液体培养基。结果显示: LB 固体培养基上可见金黄色、隆起、光滑、湿润、边缘整齐的圆形菌落,无芽孢,无荚膜(见 152 页彩图 1)。分离菌在 LB 液体培养基中快速生长,最初变混浊,试管中有少量沉淀,缓慢振荡,沉淀上升,然后消散。培养 2~3 d 后,可以形成很薄的菌环,在管底部形成黏稠的沉淀(见 152 页彩图 2)。革兰氏染色结果显示,所分离细菌为革兰氏阳性球菌,呈短链状排列(见 152 页彩图 3)。

2. 2 生化鉴定

分离菌株进行单菌落划线纯化培养,然后对分离菌株进行过氧化氢酶及凝固酶试验,并采用细菌微量生化反应管进行糖发酵试验。生化鉴定结果表明,分离菌过氧化氢酶及凝固酶试验阳性,发酵葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇和蔗糖,产酸不产气。将试验结果与《伯杰氏细菌鉴定手册》对照,符合金黄色葡萄球菌的特性,将该菌株命名为 YanJi 株。

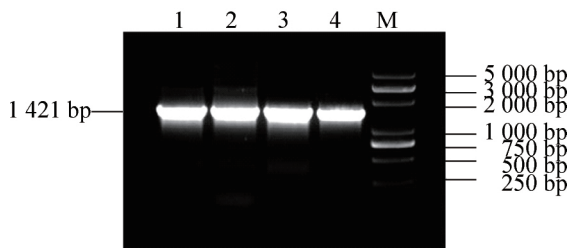
收稿日期: 2021-01-31; 修回日期: 2021-07-06

作者简介: 张 燕(1996—),女,硕士研究生,研究方向为微生物学,1942931200@qq. com.

* 通信作者: 于龙政(1978—),男,副教授,博士,研究方向为动物疫病综合防控,lzyu@ ybu. edu. cn.

2.3 PCR 鉴定

挑取培养基中单个菌落进行液体培养 12 h,以菌液作为模板,27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTACCTTGTACGACTT-3')为引物扩增细菌 16S rDNA。扩增体系(30 μL):引物 27F、1492R 各 2 μL,2×Taq Master Mix 15 μL,ddH₂O 8 μL,菌液 3 μL。扩增程序:94 ℃ 预变性 7 min;94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环;最后 72 ℃ 终延伸 10 min,4 ℃ 保存。PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳,获得约 1 421 bp 的目的片段(见图 4),与预期大小相符。测序结果经 BLAST 比对发现,本试验所分离到细菌与金黄色葡萄球菌序列(MT628673)相似度为 100%。



1~4. 菌液 PCR 产物; M. DL-5 000 Marker。

图 4 菌液 PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 4 PCR amplification products of bacterial solution

2.4 同源性比较

分离到的 YanJi 株经测序后成功获得全长为 1 421 bp 的基因片段,在 NCBI 中经过 BLAST 比对后,选取与本次试验获得的 YanJi 株基因相似性较高的菌株序列利用 DNASTar7.1 软件进行同源性分析,

结果表明,本试验分离的 YanJi 株与金黄色葡萄球菌核苷酸序列(JN102565、MK886615、MN650918、MN660041、MT628673)相似性最高,为 100%。

2.5 进化树分析

结果见图 5。

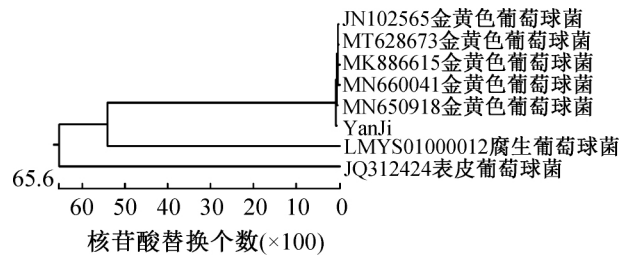


图 5 YanJi 株进化树分析结果

Fig. 5 The phylogenetic tree analysis results of YanJi strain

由图 5 可知: YanJi 株与表皮葡萄球菌(JQ312424)、腐生葡萄球菌(LMYS01000012)处在不同分支上,遗传距离相对较远;而与金黄色葡萄球菌(JN102565、MK886615、MN650918、MN660041、MT628673)均处在同一分支上,遗传距离相对较近。分离菌株 Yanji 与金黄色葡萄球菌处在同一分支上,且同源性最高,说明分离菌株 YanJi 为金黄色葡萄球菌。

3 药敏试验

根据参考文献[6]选取了 12 种常用抗生素,通过 K-B 纸片琼脂扩散法进行药敏试验。结果显示,分离菌株 Yanji 对头孢唑肟、卡那霉素、庆大霉素、强力霉素、四环素、氯霉素、红霉素、万古霉素敏感,对螺旋霉素、青霉素、氨苄西林、洁霉素耐药性,见表 1。

表 1 药敏试验结果

Table 1 Drug sensitivity test results

抗菌药物	药敏纸片含药量/ (μg·片 ⁻¹)	判定标准			抑菌圈直径/mm	判定结果
		R/mm	I/mm	S/mm		
青霉素	10	≤20	20~29	≥29	0	R
氨苄西林	10	≤11	11~15	≥15	0	R
头孢唑肟	30	≤14	14~23	≥23	28	S
卡那霉素	30	≤13	13~18	≥18	21	S
庆大霉素	10	≤12	12~15	≥15	23	S
强力霉素	30	≤12	12~16	≥16	32	S
四环素	30	≤14	14~19	≥19	30	S
氯霉素	30	≤12	12~18	≥18	21	S
红霉素	15	≤13	13~18	≥18	23	S
螺旋霉素	30	≤22	22~30	≥30	17	R
洁霉素	2	≤24	24~30	≥30	14	R
万古霉素	30	≤9	9~12	≥12	18	S

注: R 表示耐药, I 表示中度敏感, S 表示敏感。

4 临床诊断及治疗

结合临床症状、流行病学调查、实验室诊断结果,

确诊该养羊场发病羊群感染了金黄色葡萄球菌。对患病羊只用头孢唑肟按体重 2 mg/kg 颈部肌肉注射,



每天 1 次,治疗 2 d 后病情得到缓解,治疗 5 d 后病情得到控制。同时在饮水中适量添加电解多维给予辅助治疗。

5 讨论

本试验对送检的羊鼻拭子进行了病原菌的分离鉴定及生化试验,结果表明,分离得到 1 株菌株 Yan-Ji。PCR 鉴定、同源性比较及遗传进化分析结果表明,分离菌株 YanJi 与金黄色葡萄球菌处在同一进化分支上,并且同源性达到 100%,而与表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌处在不同分支上,遗传距离相对较远,由此确定为金黄色葡萄球菌。药敏试验结果表明,该病原菌的耐药水平较高,对青霉素、氨苄西林、螺旋霉素和洁霉素均具有耐药性。本试验结果解释了畜主给患病羊只使用青霉素没有疗效的原因,是分离菌株产生了耐药性。因此,在临床诊疗中先对病原菌进行药敏试验是非常必要的^[1]。

对葡萄球菌病的诊断,根据临床症状和病理变化不足以确诊,需要通过细菌的分离、生化试验及 PCR 鉴定等进行辅助诊断。本研究测定了分离菌株 YanJi 的 16S rDNA 核苷酸序列,通过比对确定分离菌株为金黄色葡萄球菌。用 16S rDNA 基因序列相似性来鉴别原核生物的属种是目前普遍使用的方法,核苷酸

序列相似性大于 97% 的基本可判定属于一个种^[2]。

葡萄球菌病是条件性致病菌,该病的发生与流行与各种诱发因素有关,在家畜饲养条件差、管理不善、气候变化、营养不良、皮肤损伤、机体抵抗力减弱时均可诱发本病。因此,养殖场应加强饲养管理、保持清洁和消毒工作,减少诱发因素。

参考文献:

- [1] FRANKLIN D, LOWY M D. *Staphylococcus aureus* infection [J]. N Engl J Med, 1998, 339: 520-532.
- [2] 赵鹤庭,严红亚,何辉,等. 一例鸡源金黄色葡萄球菌的分离鉴定与耐药性分析 [J]. 云南畜牧兽医, 2019(4) : 5-7.
- [3] 吴聪明,汪洋. 动物源细菌耐药性监测与流行病学研究 [J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(1) : 23-25.
- [4] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1) : 3-9.
- [5] WULF M, VOSS A. Mrsa in livestock animals: An epidemic waiting to happen? [J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(6) : 519-521.
- [6] 杜琳,王丽芳,冯小慧,等. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 中国动物传染病学报, 2019, 27(3) : 82-85.
- [7] 王一之,王永,韩笑,等. 山羊金黄色葡萄球菌健康带菌情况的调查及耐药性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(3) : 167-170.
- [8] 郭兴华,凌代文. 乳酸细菌现代研究实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2018.

Diagnosis, treatment and experience of a case of sheep *Staphylococcus aureus*

ZHANG Yan, ZHENG Tianyu, JIN Chunmei, ZHOU Boyu, LIANG Wanfeng, YU Longzheng*

(Agricultural College, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: In early September 2019, the main symptoms of malaise, reduced appetite, runny nose, cough, and diarrhea appeared in the flock of a sheep farm in Yanbian area, Jilin Province. In order to determine the pathogenic bacteria affecting sheep in the sheep farm and to screen effective treatment drugs, the test was carried out on the nasal swab samples of the diseased sheep, and the bacteria were separated; and Gram staining, morphological observation, biochemical identification, PCR identification, 16S rDNA sequencing were performed on the isolated bacteria. Homology comparison and genetic evolution analysis were carried out, and drug sensitivity test was used for the isolated bacteria. The results showed that one strain was isolated from the nasal swab samples of the diseased sheep, which was golden yellow, raised, smooth, moist, neat edge, and round colonies on the LB solid medium and Gram-positive. The bacteria were consistent with the biochemical culture characteristics of *Staphylococcus aureus*. BLAST alignment with 16S rDNA nucleotide sequence showed 100% similarity with *Staphylococcus aureus*. The isolated strain was sensitive to cefquinome, kanamycin, gentamicin, doxycycline, tetracycline, chloramphenicol, erythromycin, vancomycin, and resistant to spiramycin, penicillin, ampicillin, lincomycin. After instructing the sheep farm to use cefquinome, the sick sheep recovered. The results suggested that it was very necessary to select sensitive drugs to prevent and treat sheep *Staphylococcus aureus* through drug susceptibility test.

Keywords: sheep; *Staphylococcus aureus*; isolation; identification; drug resistance

(021)

· 兽医科学 ·

一例 17 岁母马双侧后肢肿胀的中兽医治疗

(作者 王雪帆等,正文见第 82-83,87 页)



图 1 两后肢肿胀

Fig. 1 Swelling of both hind limbs

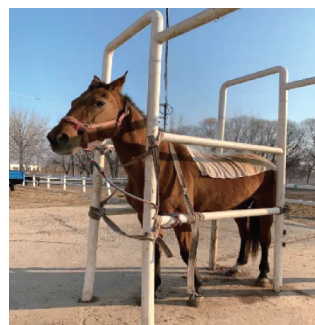


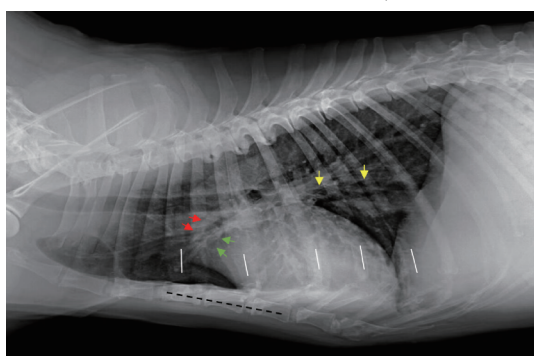
图 2 醋酒灸

Fig. 2 Vinegar wine moxibustion

· 兽医科学 ·

一例犬Ⅲ度房室传导阻滞并发心力衰竭和肾衰竭的诊疗报告

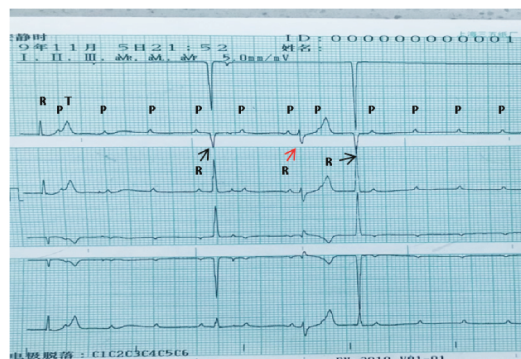
(作者 周志新等,正文见第 84-87 页)



注: 黑色虚线示胸骨,白色实线示 5 个肋间走向,黄色箭头示戒指征,红色箭头示左肺前叶动脉,绿色箭头示左肺前叶静脉。

图 1 X 射线检查结果

Fig. 1 X-ray examination results



注: 红色箭头示室性逸搏波群,黑色箭头示 QRS 波倒置。

图 2 心电图检查结果

Fig. 2 Electrocardiographic examination results

· 兽医科学 ·

一例羊金黄色葡萄球菌病的诊治及体会

(作者 张 燕等,正文见第 88-90 页)

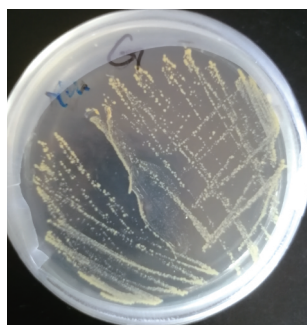


图 1 普通琼脂培养基上的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of the isolated bacteria on common agar medium



图 2 分离菌在 LB 液体培养基中形态

Fig. 2 Morphology of the isolated bacteria in LB liquid medium

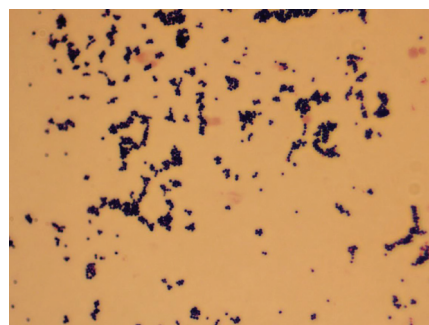


图 3 分离菌革兰氏染色结果(1 000×)

Fig. 3 Results of Gram staining of the isolated bacteria(1 000×)