

乳源中金黄色葡萄球菌的分离鉴定及生物学特性研究

高博¹, 周文彪², 张静³, 潘海婷^{4*}

¹内蒙古医科大学第二附属医院, 内蒙古 呼和浩特

²内蒙古赤峰市宁城县一肯中乡卫生院, 内蒙古 赤峰

³内蒙古医科大学第一附属医院, 内蒙古 呼和浩特

⁴内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2024年5月28日; 录用日期: 2024年6月23日; 发布日期: 2024年6月29日

摘要

目的: 探讨牛源性乳源中分离的金黄色葡萄球菌的分离鉴定及细菌耐药性分析。方法: 从临床型乳房炎患病牛的牛乳中采用传统微生物细菌的分离鉴定, 革兰氏染色及生化鉴定后, 经16S rRNA PCR测序对分离鉴定的金黄色葡萄球菌分型及耐药性分析。结果: 分离鉴定出8株金黄色葡萄球菌, 其中金黄色葡萄球菌对头孢噻肟最敏感, 然后依次是环丙沙星, 左氧氟沙星, 庆大霉素, 阿莫西林, 红霉素, 青霉素, 氨苄西林, 对卡那霉素最不敏感。其中2株金黄色葡萄球菌产生生物被膜能力强。结论: 金黄色葡萄球菌对多种抗菌药物呈耐药趋势, 且牛源性金黄色葡萄球菌的不同菌属对不同药物的耐药性有差异性, 收集的不同来源的样本可为今后人源性金黄色葡萄球菌感染的样本, 进行进化分析。

关键词

金黄色葡萄球菌, 分离鉴定, 耐药性分析, 生物学特性

Research on Isolation, Identification, and Biological Characteristics of *Staphylococcus aureus* from Milk

Bo Gao¹, Wenbiao Zhou², Jing Zhang³, Haiting Pan^{4*}

¹The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia

²Health Centers, Yikenzhong Town, Ningcheng District, Chifeng Inner Mongolia

³The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia

*通讯作者。

⁴Basic Medicine College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia

Received: May 28th, 2024; accepted: Jun. 23rd, 2024; published: Jun. 29th, 2024

Abstract

Objective: To explore the isolation, identification, and antibiotic resistance analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk sources. **Method:** Traditional microbiological bacteria were isolated and identified from the milk of cows with clinical mastitis, followed by Gram staining and biochemical identification. The isolated and identified *Staphylococcus aureus* were classified and analyzed for drug resistance using 16S rRNA PCR sequencing. **Result:** Eight strains of *Staphylococcus aureus* were isolated and identified, among which *Staphylococcus aureus* was the most sensitive to cefotaxime, followed by ciprofloxacin, levofloxacin, gentamicin, amoxicillin, erythromycin, penicillin, ampicillin, and least sensitive to kanamycin. Two strains of *Staphylococcus aureus* have strong biofilm production ability. **Conclusion:** *Staphylococcus aureus* shows a trend of resistance to multiple antibiotics, and different genera of bovine *Staphylococcus aureus* have differences in resistance to different drugs. The collected samples from different sources can be used for evolutionary analysis of future human *Staphylococcus aureus* infections.

Keywords

S. aureus, Separation and Identification, Drug Resistance Analysis, Biological Characteristics

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)是人体皮肤表面、鼻腔及呼吸道黏膜的常见病原菌,能产生多种毒素,引起急性肠胃炎等中毒性综合征[1]-[3]。同时, *S. aureus* 也是引起奶牛乳腺炎的病原之一,可导致产奶量下降。*S. aureus* 通常通过与医护人员直接接触或通过外科手术和植入医疗植入物侵入性医疗过程中来进行传播。细菌的多重耐药性,进一步使医院感染的有效治疗变得复杂,可能由于抗生素耐药的 *S. aureus* 感染,导致医疗行业的巨大经济负担。由于临床上抗生素的大量广泛使用,出现 *S. aureus* 对多种药物产生耐药性,由于抗生素的滥用,在饮用奶中可能会大量蓄积,对人类健康产生影响[4]。*S. aureus* 在生长过程中,不断向外界分泌毒力因子,这些毒力因子包括黏附素(adhesins)、毒素(toxin)、胞外酶、纤连素结合蛋白(FNB)、荚膜多糖(capsular polysaccharide, CP)、葡萄球菌蛋白 A (spa)和生物被膜。这些表面蛋白能够促使 *S. aureus* 黏附到宿主细胞表面,从而发生定殖,引发细菌感染、增殖[4]-[6]。*S. aureus* 生物被膜的形成是一个动态过程,包括细菌自身黏附、成熟和分散期等阶段,其发育阶段已被许多文献定义,并且可以被划分成至少三个主要活动:初始附着,生物被膜成熟和散布。因此本课题组从当地呼市周边 6 个不同地区的牧场中采集患有临床型乳房炎病牛的牛乳,进行细菌的分离鉴定,确定 *S. aureus* 的具体分型,并通过刚果红培养基及结晶紫试验确定金黄色葡萄球菌生物被膜形成能力的检测,最终对其耐药性进行分析。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

样品收集

位于内蒙古呼和浩特市周边规模化奶牛牧场,患有临床性乳腺炎的奶牛,2018年至今,陆续收集乳样共63例,乳样有明显白色絮状沉淀,少数带血。

2.2. 主要试剂

50%甘油,青霉素药敏纸片(QMS),红霉素药敏纸片(HMS),环丙沙星药敏纸片(HBSX),庆大霉素(低)药敏纸片(QDMS),头孢噻肟药敏纸片(TBSW),卡那霉素药敏纸片(KNMS),阿莫西林药敏纸片(AMSL),左氧氟沙星药敏纸片(ZYFSX),氨苄西林药敏纸片(ABSL),丙三醇,普通琼脂培养基,伊红美蓝培养基,高盐甘露醇培养基,脑心浸出液培养基(BHI),纤维素刚果红培养基(青岛海博),蔗糖,麦康凯培养基(依科塞,250g),10%氢氧化钠溶液,蒸馏水,蛋白胨,牛肉膏粉,氯化钠,普通肉汤培养基,革兰氏染液,结晶紫染液,PBS,细菌基因组DNA提取盒(天根),溶菌酶溶液(天根,50mg/ml),DNA Loading Buffer,蛋白酶K,DNA Marker(天根,D2000),核酸染料(百泰克),Taq PCR Master Mix,上游通用引物27F,下游通用引物R,琼脂粉(Agarose),TBE。

2.3. 主要仪器

细胞培养版96孔(BIOFIL),1L锥形瓶,高压锅,玻璃棒,PH试纸,超净台,试管,无菌试管塞,酒精灯,取菌环,75%酒精,300μL移液器,无菌EP管,无菌枪头,高压锅,离心机,恒温培养箱,凝胶成像系统(ChampGe 1500),电泳槽,全波长酶标仪(1510),双层台式空气恒温振荡器(HZQ-C),PCR仪(Gene Company Limited),微波炉。

2.4. 试验方法

将预先采集好的样品在麦康凯、普通琼脂、高盐甘露醇、伊红美蓝培养基上进行分离细菌,再进行多次接种于营养肉汤和营养琼脂培养基,纯化增菌。待得到单克隆菌株后,显微镜面观察菌落形态,发现单个圆形不规则金黄色光滑菌落,直径6~8mm,保存该菌株。按照上述方法,多次分离纯化,根据美国临床与实验室标准化协会(CLSI)2015年版标准进行药敏实验;将菌株接种到纤维素刚果红培养基上进行培养观察;随后将菌液接种到96板孔上进行结晶紫试验,在酶标仪下检测其波长为570nm的OD值;将分离纯化好的菌液进行DNA提取,提取后通过PCR扩增仪进行扩增后,进行琼脂糖凝胶电泳试验,将琼脂糖凝胶在凝胶成像系统下进行观察并将目标区域的进行基因序列对比来确认菌型。

2.4.1. 细菌的分离鉴定

将2018年4月~2022年11月采集的牛乳样,共63样。在无菌条件下,用取菌环蘸取奶样,每种分别接种于麦康凯固体培养基,普通琼脂固体培养基,高盐甘露醇固体培养基,伊红美蓝固体培养基。倒置于37℃恒温培养箱培养24小时。同批次未长出菌落的进行重复实验。

2.4.2. 纯化增菌及鉴定

在无菌条件下,用取菌环挑取预增菌中,典型的单克隆菌落接种于相应固体培养基上进行纯化,37℃恒温培养箱培养18h观察。选取平板上典型菌落接种于预先配置好的肉汤中继续纯化增菌,重复上述步骤3~4次。肉眼观察菌落,疑似*S. aureus*进行革兰染色法染色,油镜下,呈单个球形蓝紫色单克隆,直径6~8mm,保存该菌株。

2.4.3. 生化试验

对分离出的疑似 *S. aureus* 进行生化鉴定, 包括过氧化氢试验, 葡萄球菌血浆凝固酶实验等。挑取待检菌落进行革兰氏染色镜检, 将新鲜菌苔接种于普通肉汤 37℃ 培养 18~24 h 或用 0.9% 无菌生理盐水稀释 0.5 McFarland (约 10 cfu/mL), 各吸取 0.05~0.08 mL (约 1~2 滴) 的肉汤培养物或菌悬液加入每种微量西林瓶内。将已接种的西林瓶再套上胶塞, 一般采用全加塞。在无菌条件下, 将肉汤培养物分别加入葡萄糖、5% 乳糖、甘露醇微量西林瓶内, 次日后观察。挑取固体培养基上的菌落, 置于试管内, 滴加 3% 过氧化氢溶液 2 ml, 观察是否有气泡产生。无菌条件下, 冻干血浆西林瓶内加入适量生理盐水, 溶解后加入 *S. aureus* 肉汤培养物, 2 h~6 h 后观察。未出现预期现象的进行重复实验。

2.4.4. 药敏试验

吸取配置好的菌液 50 μL, 滴在培养基上, 用灭菌的玻璃推棒均匀涂布于固体琼脂板上, 将平板平均分为四区, 每区用无菌镊放置一片药敏片, 置于 37℃ 恒温培养箱培养 18 h, 测量菌环直径。目前, *S. aureus* 呈现多重耐药、强耐药, 临床治疗 *S. aureus* 引起的感染十分困难, 为减少 *S. aureus* 耐药菌株的出现, 达到最好的治疗效果, 在药敏实验的基础上, 合适地选用有效首选药十分重要。

2.4.5. 金黄色葡萄球菌分离株的基因 16S rRNA 鉴定

运用 16S rRNA 基因的通用扩增引物, 见表 1, 上游引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 下游引物: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 扩增目的片段大小约为 1500 bp。PCR 反应体系为: PCR MasterMix 10.0 μL, 模板 1.0 μL, 上下游引物各 0.5 μL, ddH₂O 补充至 20 μL。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 53℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 90 s, 共 35 个循环; 72℃ 再延伸 10 min; 4℃ 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

Table 1. Universal primers for gene amplification

表 1. 基因扩增通用引物

Lot No	Oligo Name	Sequence (5' to 3')
2600292577	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
2600292578	27R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA

3. 结果

3.1. 金黄色葡萄球菌的分离及形态学观察

疑似患病样本中, 分离菌株在选择性培养基上培养 24 h 后, 多个表面隆起的金黄色菌落, 革兰氏染色后, 有 6 株为典型的革兰氏阳性菌, 镜检, 呈葡萄串状排列, 见图 1。

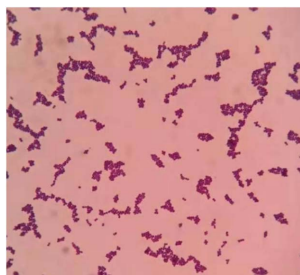


Figure 1. Microscopy of morphology of isolates (10 × 100)

图 1. 分离菌形态的镜下观察(10 × 100)

3.2. 金黄色葡萄球菌分离株在刚果红培养基上的菌落特性

金黄色葡萄球菌的分离菌株在刚果红培养板上可见白色隆起的菌落，且菌落光滑，表面该鉴定菌株可能有产生生物被膜的能力，有待进一步验证，见图 2。

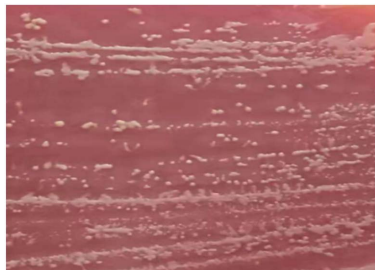


Figure 2. Colony growth morphology of isolates on Congo red culture medium

图 2. 分离菌在刚果红培养基上的菌落形态

3.3. 分离菌株的生化试鉴定

结果显示，甘露醇试验阳性率为 33.33%，葡萄糖试验阳性率为 66.67%，5%乳糖试验阳性率为 100%，过氧化氢试验阳性率为 100%，葡萄球菌血浆凝固酶试验阳性率为 100%，见图 3。

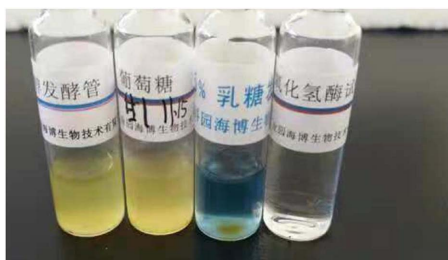


Figure 3. Biochemical identification results of isolated bacteria

图 3. 分离菌生化鉴定结果

3.4. 分离株药物敏感性试验

结果显示 *S. aureus* 对头孢噻肟最敏感，然后依次是环丙沙星，左氧氟沙星，庆大霉素，阿莫西林，红霉素，青霉素，氨苄西林，对卡那霉素最不敏感。见图 4。

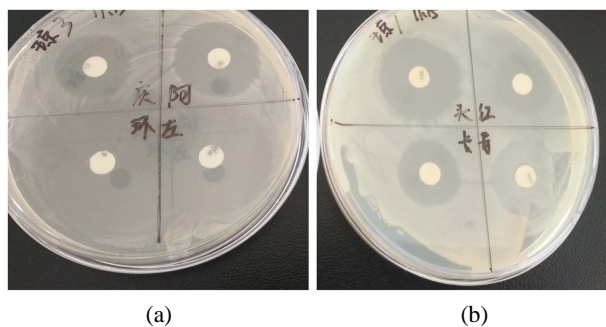


Figure 4. Drug sensitivity test results

图 4. 药物敏感试验结果

3.5. 分离株 16s rRNA 序列的检测

将分离株经过 16s rRNA 基因 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见在 1500 bp 的条带附近, 有明显的目的条带, 扩增产物序列与金黄色葡萄球菌大小与预期一致, 见图 5。



Figure 5. Electrophoretic profile of PCR product of 16S rRNA

图 5. 16S rRNA PCR 产物电泳图

4. 讨论

随着抗生素的滥用, 细菌的多重耐药性, 进一步使医院感染的有效治疗变得复杂, 耐药性不断增强 [1] [7] [8]。食物、水源、医院及社区感染金黄色葡萄球菌的风险也在提高, 随着人民生活水平提高, 食物来源的污染, 是否也增加了人类对于金黄色葡萄球菌耐药性的问题, 始终是困扰人们的问题 [9]-[12]。因此, 对于不同感染来源的菌株收集十分有必要, 今后是对细菌进化分析的基础 [13]-[15]。本研究对呼市周边疑似患有乳腺炎的奶牛, 其乳源来源的样本进行收集, 从 63 个样本中, 进行生化检测、免疫学检测法及分子生物学检测等分离鉴定出 8 金黄色葡萄球菌, 其中药物敏感性试验发现对头孢噻肟最敏感, 然后依次是环丙沙星, 左氧氟沙星, 庆大霉素, 阿莫西林, 红霉素, 青霉素, 氨苄西林, 对卡那霉素最不敏感。其中 2 株金葡萄菌能产生生物被膜, 且能力较强, 有待进一步对分离株进行进化分析及致病性研究。

基金项目

本文受内蒙古医科大学青年培育项目(YKD2021QN010), 内蒙古医科大学科研项目(YKD2024MS004)资助。

参考文献

- [1] 徐贝, 李萍, 张青松. 金黄色葡萄球菌分离株在住院患者中的临床分布及耐药性分析[J]. 热带病与寄生虫学, 2023, 21(3): 174-177.
- [2] 李伦, 张丽娜, 王兵, 等. 金黄色葡萄球菌对万古霉素的耐药性及耐药基因检测分析[J]. 安徽医药, 2023, 27(7): 1338-1342.
- [3] 刘玲, 陈晓聪, 李璟, 等. 某院金黄色葡萄球菌耐药性分析及毒素基因与耐药基因检测[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(16): 1967-1973.

-
- [4] 张小玉, 杨洁, 张晗楚, 等. 奶牛乳房炎源金黄色葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2024(9): 53-59.
- [5] 姜斌, 彭娜, 周海健, 等. 血流感染中分离的耐甲氧西林溶血葡萄球菌的药物敏感性、SCCmec 基因分型及同源性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(4): 332-338. <https://doi.org/10.13461/j.cnki.cja.007128>
- [6] 尹莎莎, 戴月如, 修瑜, 等. 金黄色葡萄球菌毒力和耐药基因分布与耐药相关性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2024, 49(2): 199-207.
- [7] 龚玲玉, 罗青梅, 冯莉, 等. 金黄色葡萄球菌引发食源性疾病的溯源分析[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2024, 47(2): 167-170.
- [8] 王嘉悦, 潘果, 钟忻桐, 等. 抗金黄色葡萄球菌肠膜明串珠菌细菌素的生物学特性分析[J/OL]. 微生物学通报, 1-11. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.231084>, 2024-06-27.
- [9] 李焕英, 郭庆昕, 饶华春, 等. 金黄色葡萄球菌血流感染患者的临床特征及发生脓毒性休克的危险因素和预测指标分析[J]. 国际检验医学杂志, 2024, 45(6): 716-721.
- [10] 朱琪, 逢凤. 金黄色葡萄球菌感染对特应性皮炎患者色氨酸代谢的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2024, 34(7): 1064-1069.
- [11] 杨雪娇, 王一涵, 项勋, 等. 奶山羊隐性乳房炎金黄色葡萄球菌的分离鉴定及毒力基因的检测[J]. 中国兽医科学, 2024, 54(5): 650-657.
- [12] 李玲, 熊华利, 蒋远娅, 等. 30 株不同来源的金黄色葡萄球菌耐药性及分型分析[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(15): 2281-2283.
- [13] 沈进, 孙少君, 马军, 等. 骨科创伤患者伤口金黄色葡萄球菌的分子特征及耐药性分析[J]. 中国热带医学, 2023, 23(9): 988-993.
- [14] 李洁群, 余静贵, 饶洁, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的临床分布和耐药性分析[J]. 中国当代医药, 2023, 30(22): 120-123.
- [15] 闫文慧, 李红斌, 王硕, 等. 临床分离金黄色葡萄球菌药物敏感性及其生物膜形成能力的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(7): 826-829.