

奶牛乳房炎葡萄球菌的分离鉴定及耐药性检测

戈胜强,柴同杰,秦 梅

(山东农业大学 动物科技学院,山东 泰安 271018)

【摘 要】 【目的】了解引起奶牛乳房炎的最主要病原菌葡萄球菌的耐药性,为奶牛乳房炎的防治提供参考依据。【方法】于 2006~2007 年在泰安地区 5 个规模化奶牛场,采集 128 份临床乳房炎奶牛乳样,用传统的细菌分离、培养和生化鉴定方法,对其中的葡萄球菌进行了分离,用 K-B 纸片扩散法对葡萄球菌的耐药性进行了检测调查。【结果】本次调查中共分离到 29 株葡萄球菌,其中金黄色葡萄球菌 14 株(14/29,47.4%),产色葡萄球菌 3 株(3/29,10.3%),木糖葡萄球菌、腐生葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、表皮葡萄球菌和人葡萄球菌各 2 株(2/29,6.9%),头葡萄球菌和模仿葡萄球菌各 1 株(1/29,3.3%);葡萄球菌对头孢拉定和阿米卡星高度敏感,对临床上常用的林可霉素、红霉素、四环素、复合磺胺均存在不同程度的耐药性。金黄色葡萄球菌对万古霉素的平均抑菌圈直径为 19.1 mm,凝固酶阴性葡萄球菌对万古霉素的平均抑菌圈直径为 20.3 mm。【结论】金黄色葡萄球菌在分离葡萄球菌中仍占主导地位,万古霉素对葡萄球菌具有较强的体外抗菌活性,未发现耐药株。

【关键词】 奶牛;乳房炎;葡萄球菌;药敏试验;万古霉素

【中国分类号】 S858.237.2⁺6 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)11-0040-07

Isolation,identification,medicine sensitivity test of
Staphylococcus of dairy cow mastitis

GE Sheng-qiang,CHAI Tong-jie,QIN Mei

(College of Animal Science & Veterinary Medicine,Shandong Agricultural University,Taian,Shangdong 271018,China)

Abstract: 【Objective】 Mastitis is mainly caused by Staphylococcus. One hundred and twenty-eight milk samples were collected from 5 cattle farms in Taian from 2006 to 2007. 【Method】 Traditional plate culture method and biochemistry experimentation were used to isolate and identify Staphylococcus. Antibiotic Susceptibility Test was evaluated by K-B paper dispersion method. 【Result】 29 Staphylococcus strains were isolated from these samples, including *S. aureus* 14/29 (47.4%), *S. chromogenes* 3/29 (10.3%), *S. xylosus*, *S. cpidermidis*, *S. saproghyticus* and *S. sciuri* 2/29 (6.9%) respectively, *S. caplitis* and *S. simulans* 1/29 (3.3%) respectively. The results indicated that all Staphylococcus was hypersensitive to cephradine and Amikacin and partially resistant to Clindamycin, Teracycline, Trythromycin and TMP/SMZ which are used frequently in clinic. Average diameter of circle that controlled *S. aureus* and Coagulase-negative Staphylococcus for Vancomycin was 19.1 mm and 20.3 mm respectively. 【Conclusion】 *S. aureus* was primarily pathogenic bacteria of Staphylococcus. Staphylococcus which could resist Vancomycin was not found.

Key words: cow; mastitis; Staphylococcus; medicine sensitivity test; Vancomycin

奶牛乳腺炎是对奶业危害最为严重的疾病之一^[1],同时也是导致奶牛淘汰的第三大疾病^[2]。迄

* 【收稿日期】 2007-11-30
【作者简介】 戈胜强(1982—),男,山东青岛人,在读硕士,主要从事奶牛乳房炎研究。
【通讯作者】 柴同杰(1957—),男,山东德州人,教授,博士生导师,主要从事环境微生物与分子细菌学研究。
E-mail: chaitj@sdau.edu.cn

今为止,已报道的引起乳房炎的致病菌共有 150 多种,其中金黄色葡萄球菌是牛乳房炎的主要病原^[3],近 50% 的乳房炎由该菌引起^[4]。在乳房炎的临床防治中,随着抗生素的滥用,凝固酶阴性葡萄球菌感染的乳房炎也不断增加^[5],因此对凝固酶阴性葡萄球菌的确切认知就显得很有必要。万古霉素是一种极为重要的糖肽类抗生素,是目前人医临床上用于治疗由耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)引起的严重感染疾病的首选药物^[6],但人医临床中,金黄色葡萄球菌对万古霉素的耐药性较弱,日本学者已于 1996 年报告了首例万古霉素中介耐药的金黄色葡萄球菌(VISA)^[7],美国密歇根州也于 2002 年报道了首例对万古霉素完全耐药的金黄色葡萄球菌(VRSA)^[8],目前国内尚未见发现 VISA 和 VRSA 的报道^[9]。MRSA 在医院的感染发生,主要通过医务人员带菌的手以及环境、空气进行传播^[10]。奶牛场员工在挤奶过程中直接和乳房接触,如果奶牛患有乳房炎,病原菌也有可能传播给员工。为了解泰安奶牛场乳房炎奶样中的葡萄球菌分离株,是否存在 VISA 或 VRSA,本研究采集了山东泰安部分奶牛场临床性乳房炎患牛的乳样,对其中的葡萄球菌进行了分离鉴定,并检测了其对万古霉素及其他 12 种常用抗生素的药物敏感性,以期为本地区奶牛乳房炎的防治提供指导,并为人医中耐万古霉素金黄色葡萄球菌病的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

- 1.1.1 乳 样 从泰安周边地区 5 个奶牛场,无菌采取 128 个临床乳房炎奶牛乳样,采样前首先用洁净的湿毛巾擦拭采样乳区,然后用 75% 酒精消毒乳头,采样时先弃去前 3 把奶,每区采集 1 份,采得约 5 mL 置于灭菌试管中低温保存。
- 1.1.2 试 剂 革兰氏染色液按参考文献[11]配制;营养琼脂基础培养基、营养肉汤、高盐甘露醇琼脂培养基、药敏纸片,均由杭州天和微生物试剂有限公司生产。血-葡萄糖-琼脂培养基,按参考文献[11]配制。

1.2 牛乳细菌的分离培养及形态观察

无菌吸取 0.1 mL 乳样,分别平铺于血-葡萄糖-琼脂培养基和高盐甘露醇琼脂培养基,于 37 ℃ 培养 18~24 h。观察菌落形态及培养基颜色变化,并按常规方法涂片、革兰氏染色、镜检,对病原菌种类进行初步分离与鉴定。

1.3 牛乳葡萄球菌属的生化鉴定

对能在高盐甘露醇琼脂培养基生长,菌落细小,呈红色或黄色,对接触酶阳性,呈葡萄串状,成双或单个排列的革兰氏阳性球菌,参照文献[12-13]进行鉴定。其中对葡萄球菌属参照杭州天和微生物试剂有限公司生产的葡萄球菌属生化鉴定编码册(TH-16S)进行分类鉴定。

1.4 金黄色葡萄球菌的 PCR 鉴定

1.4.1 引物设计 金黄色葡萄球菌特异性引物参考文献[14]设计,预计扩增片段长度为 420 bp。引物由上海生物工程有限公司合成,其序列如下:

S. aurous-F: 5'-TCT TCA GAA GAT GCG GAA TA-3';

S. aurous-R: 5'-TAA GTC AAA CGT TAA CAT ACG -3'。

1.4.2 模板 DNA 的提取 将金黄色葡萄球菌接种于 5 mL 普通营养肉汤培养基中,37 ℃ 培养过夜,无菌操作取 1 mL 菌液加入 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清,沉淀加 800 μ L 丙酮振荡混匀,-20 ℃ 冰浴 10 min,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清,风干 5 min,加 100 mL TE(10 mmol Tris-HCl,0.5 mmol/L EDTA,pH 8.0)和 20 μ L 10 mg/mL 溶菌酶振荡混匀,37 ℃ 保温 60 min,10 000 r/min 离心 1 min,弃上清,沉淀加 100 μ L TE 和 3 μ L 10 mg/mL 的蛋白酶 K,55 ℃ 温育 30 min,然后 100 ℃ 煮沸 10 min,取上清液作为 DNA 模板。

1.4.3 PCR 鉴定 PCR 反应体系为 25 μ L:10 $\times$ PCR buffer 2 μ L, dNTP (0.2 mmol/L) 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ L,上下游引物(25 μ mol/L) 各 1 μ L,模板 1 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.3 μ L,三蒸水 15.7 μ L。PCR 循环参数:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 1 min,57.5 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 40 s,36 个循环;72 ℃ 反应 7 min。用 10 g/L 凝胶电泳检测 PCR 产物,在紫外灯下观察,使用照相系统记录试验结果。

1.5 葡萄球菌的药物敏感试验

1.5.1 常用药物敏感性试验的测定 选用奶牛场常用的头孢拉定和阿米卡星等 12 种抗生素的药敏纸片,按纸片扩散法进行试验测定。

1.5.2 万古霉素最低抑菌浓度试验 取 9 支灭菌试管,每管加入 1 mL 营养肉汤,第一个试管加入万古霉素 1 mL,混匀后吸取 1 mL 到第 2 管内,依次类推到第 8 管(混匀后吸 1 mL 弃去),以第 9 管为对

照,然后每管内加入 0.1 mL 菌液。具体试验设计 如表 1 所示。

表 1 葡萄球菌对万古霉素的药敏试验

Table 1 Medicine sensitivity test of Staphylococcus strains by Vancomycin

管号 Test tube	肉汤/mL Broth	万古霉素/mL Vancomycin	药物浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) Drug concentration	葡萄球菌菌液/mL Staphylococcus
1	1	1	32	0.1
2	1	1	16	0.1
3	1	1	8	0.1
4	1	1	4	0.1
5	1	1	2	0.1
6	1	1	1	0.1
7	1	1	0.5	0.1
8	1	1	0.25	0.1
9	1	0	0	0.1

万古霉素最低抑菌浓度(MIC)的判断标准:经培养后的试管澄清透明,摇匀后仍澄清透明者,认为该管无细菌生长;若培养基呈现浑浊状态,表明有菌生长。从无菌生长的各管中找出最低药物浓度的试验管,即为该药的 MIC。MIC $\leq 4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的葡萄球菌为敏感菌株;MIC $\geq 32\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的葡萄球菌为耐药菌株;MIC 为 8~16 $\mu\text{g/mL}$ 的葡萄球菌定为中介耐万古霉素菌株。

2 结果与分析

2.1 牛乳中葡萄球菌属的鉴定

由表 2 可见,经生化鉴定,共分离出 14 株金黄色葡萄球菌,15 株凝固酶阴性葡萄球菌,另包括产色葡萄球菌 3 株,木糖葡萄球菌、腐生葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、表皮葡萄球菌和人葡萄球菌各 2 株,头葡萄球菌和模仿葡萄球菌各 1 株。

表 2 牛乳中葡萄球菌属的生化试验结果

Table 2 Results of biochemical test for identification of Staphylococcus

葡萄球菌编号 number of Staphylococcus	尿素 Carbamide	蔗糖 Saccharose	精氨酸水解酶 Hydrolyzing enzyme of arginine	木糖 Xylose	乳糖 Lactose	甘糖 Seminose	木醇 Methanol	麦芽糖 Maltose	蕈糖 D-(+)- Trehalose
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	+	+	d	—	+	+	—	+	+
木糖葡萄球菌 <i>S. xylosus</i>	+	+	—	—	+	+	—	+	d
表皮葡萄球菌 <i>S. cpidermidis</i>	+	+	+	—	+	+	—	+	—
头葡萄球菌 <i>S. caplitis</i>	+	—	—	—	—	—	—	—	—
腐生葡萄球菌 <i>S. saproghyticus</i>	+	+	—	—	—	—	+	+	+
松鼠葡萄球菌 <i>S. sciuri</i>	—	+	—	+	+	+	—	+	+
产色葡萄球菌 <i>S. chromogenes</i>	+	+	+	—	+	+	—	+	+
人葡萄球菌 <i>S. hominis</i>	+	+	+	—	—	—	—	+	—
模仿葡萄球菌 <i>S. simulans</i>	+	+	+	—	+	—	—	—	—

葡萄球菌编号 number of Staphylococcus	甘露醇 Mannitol	乙酰葡胺 Acetylglucosamine	硝酸盐还原 Nitrate of reverting	蜜二糖 Melibiose	果糖 Fructose	VP Vopes- prokauer	山梨醇 Sorbitol	株数 Total
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	+	+	+	—	+	d	—	14
木糖葡萄球菌 <i>S. xylosus</i>	+	+	—	—	+	—	d	2
表皮葡萄球菌 <i>S. cpidermidis</i>	—	—	—	—	+	+	—	2
头葡萄球菌 <i>S. caplitis</i>	—	—	+	—	+	+	—	1
腐生葡萄球菌 <i>S. saproghyticus</i>	+	+	—	—	+	—	—	2

续表 2 Continued table 2

葡萄球菌编号 number of Staphylococcus	尿素 Carbamide	蔗糖 Saccharose	精氨酸水解酶 Hydrolyzing enzyme of arginine	木糖 Xylose	乳糖 Lactose	甘糖 Seminose	木醇 Methanol	麦芽糖 Maltose	蕈糖 D-(+)- Trehalose
松鼠葡萄球菌 <i>S. sciuri</i>	+	—	+	—	+	d	+	2	
产色葡萄球菌 <i>S. chromogenes</i>	—	—	+	—	+	—	—	3	
人葡萄球菌 <i>S. hominis</i>	—	+	+	—	+	—	—	2	
模仿葡萄球菌 <i>S. simulans</i>	+	+	+	—	+	—	—	1	

注:“d”表示菌株之间有差异。
Note:“d” indicates that there are differences between strains.

2.2 PCR 鉴定结果

由图 1 可见,PCR 检测结果与葡萄球菌生化鉴

定结果完全吻合,共分离到金黄色葡萄球菌 14 株,
而凝固酶阴性葡萄球菌全部为阴性。

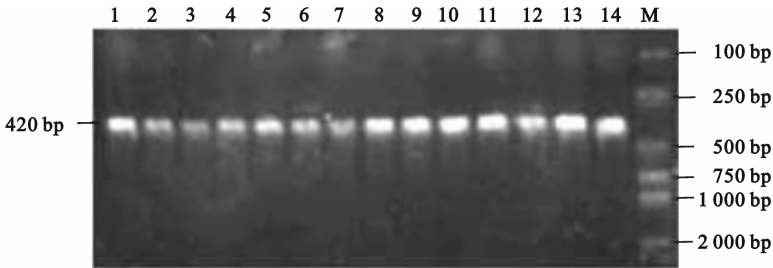


图 1 14 株金黄色葡萄球菌的 PCR 检测

1~14. 金黄色葡萄球菌分离株;M. 标准 Marker 2000

Fig. 1 PCR amplications from all of 14 *S. aureus*

1—14. *S. aureus*; M. Marker 2000

2.3 药物敏感试验

试验 应用 12 种临床常见抗生素对 14 株金黄色葡

2.3.1 金黄色葡萄球菌对 12 种常用抗生素的药敏

萄球菌进行了药敏试验,其结果见表 3。

表 3 12 种临床常用抗生素对金黄色葡萄球菌的药敏试验结果

Table 3 Medicine sensitivity test of 14 *S. aureus* strains by 12 drugs

抗生素名称 Durg name	含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$) Content	抑菌圈直径/mm Inhibitory diameter			菌株数目 Number of bacteria			
		耐药 Resistant	中敏 Intermediate sensitivity	敏感 Sensitivity	无抑菌圈 Non-Inhibitory	耐药 Resistant	中敏 Intermediate sensitivity	敏感 Sensitivity
林可霉素 Clindamycin	2	≤ 14	15~20	≥ 21	5	0	2	7
链霉素 Streptomycin	10	≤ 11	12~14	≥ 15	2	1	4	7
四环素 Teracycline	30	≤ 14	15~18	≥ 19	0	4	2	8
红霉素 Trythromycin	15	≤ 13	14~22	≥ 23	14	0	0	0
复合磺胺 TMP/SMZ	1.25/37.5	≤ 10	11~15	≥ 16	8	0	0	6
头孢拉定 Cephhradine	30	≤ 10	11~14	≥ 15	0	0	0	14
恩诺沙星 Enrofloxacin	30	≤ 14	15~17	≥ 18	0	3	1	11
阿米卡星 Amikacin	30	≤ 14	15~16	≥ 17	0	0	0	14
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	≤ 15	16~20	≥ 21	0	2	2	10
庆大霉素 Gentamicin	10	≤ 12	13~14	≥ 15	0	1	1	12
氧氟沙星 Ofloxacin	5	≤ 12	13~15	≥ 16	0	0	5	7
头孢噻肟 Cefotaxime	30	≤ 14	15~22	≥ 23	0	1	10	3

由表 3 可以看出,对头孢拉定和阿米卡星敏感的菌株最多,其次是庆大霉素、恩诺沙星和环丙沙星。部分菌株对林可霉素、链霉素、复合磺胺完全耐药,金黄色葡萄球菌对红霉素的抑菌圈直径均为 0,说明金黄色葡萄球菌对红霉素完全耐药,故红霉素是不可选择的治疗药物。

表 4 12 种临床常用抗生素对凝固酶阴性葡萄球菌的药敏试验结果

Table 4 Medicine sensitivity test of Coagulase-negative Staphylococcus strains by 12 drugs

抗生素名称 Drug name	抑菌圈直径/mm Inhibitory diameter							
	表皮葡萄球菌 (2 株)	木糖葡萄球菌 (2 株)	头葡萄球菌 (1 株)	腐生葡萄球菌 (2 株)	松鼠葡萄球菌 (2 株)	产色葡萄球菌 (3 株)	人葡萄球菌 (2 株)	模仿葡萄球菌 (1 株)
	<i>S. cpidemidis</i> (2 plant)	<i>S. xylosus</i> (2 plant)	<i>S. caplitis</i> (1 plant)	<i>S. saproghyticus</i> (2 plant)	<i>S. sciuri</i> (2 plant)	<i>S. chromogenes</i> (3 plant)	<i>S. hominis</i> (2 plant)	<i>S. simulans</i> (1 plant)
林可霉素 Clindamycin	32,28	0,0	0	7,40	20,22	0,27,0	21,22	32
链霉素 Streptomycin	12,14	15,17	22	20,16	28,26	15,17,16	12,14	15
四环素 Teracycline	24,6	5,15	27	5,21	15,17	28,28,25	15,17	4
红霉素 Trythromycin	32,0	5,7	4	5,0	6,8	0,0,0	14,17	22
复合磺胺 TMP/SMZ	20,18	14,15	10	24,0	17,19	0,15,17	16,17	23
头孢拉定 Cephradine	23,31	39,36	19	36,34	38,35	33,34,32	12,12	32
恩诺沙星 Enrofloxacin	26,32	29,26	27	29,29	28,26	28,28,27	15,17	28
阿米卡星 Amikacin	25,32	24,23	16	24,25	28,26	23,25,24	15,16	30
环丙沙星 Ciprofloxacin	24,29	23,26	26	22,31	26,26	28,34,30	18,18	26
庆大霉素 Gentamicin	25,17	19,23	21	25,22	32,28	17,24,19	12,14	30
氧氟沙星 Ofloxacin	26,26	29,28	26	28,23	28,25	28,26,27	12,15	26
头孢噻肟 Cefotaxime	36,26	30,28	22	26,26	32,30	24,27,25	18,16	26

注:敏感性判断标准同表 3。

Note:Evaluated by the above sensitivity criterion.

2.4 万古霉素(30 μg/片)对葡萄球菌属的药敏试验

根据美国国家临床实验室标准委员会(NC-CLS)的规定,30 μg 万古霉素纸片抑菌环直径≥15 的为高度敏感,抑菌圈直径≤14 mm 的葡萄球菌

2.3.2 凝固酶阴性葡萄球菌对 12 种常用抗生素的药敏试验 由表 4 可知,大多数凝固酶阴性葡萄球菌对头孢拉丁、恩诺沙星、阿米卡星、氧氟沙星敏感,部分凝固酶阴性葡萄球菌对林可霉素、红霉素完全耐药。人葡萄球菌对大部分抗生素都中度敏感,应引起临床上的重视。

株,应测其最小抑菌浓度(MIC)以判定其敏感性。由表 5 可见,本试验所有葡萄球菌对万古霉素的耐药性检测中,只有 1 株木糖葡萄球菌的抑菌圈直径小于 14 mm,因而除其以外均为高度敏感。

表 5 万古霉素(30 μg/片)对葡萄球菌属的药敏试验结果

Table 5 Vancomycin sensitivity test of Staphylococcus strains

分类 Bacterum	抑菌圈直径/mm Inhibitory diameter	菌株数目 Number of bacteria			总数 Total
		耐药	中敏	敏感	
		Resistant	Intermediate sensitivity	Sensitivity	
金黄色葡萄球菌(14 株) <i>S. aureus</i> (14 plant)	19.1(平均) 19.1(Average)	0	4	10	14
木糖葡萄球菌(2 株) <i>S. xylosus</i> (2 plant)	12,22	1	0	1	2
表皮葡萄球(2 株) <i>S. cpidermidis</i> (2 plant)	16,18	0	1	1	2
头葡萄球菌(1 株) <i>S. caplitis</i> (1 plant)	20	0	0	1	1

续表 5 Continued table 5

分类 Bacterum	抑菌圈直径/mm Inhibitory diameter	菌株数目 Number of bacteria			总数 Total
		耐药 Resistant	中敏 Intermediate sensitivity	敏感 Sensitivity	
腐生葡萄球(2 株) <i>S. saproghyticus</i> (2 plant)	21,16	0	1	1	2
松鼠葡萄球菌(2 株) <i>S. sciuri</i> (2 plant)	20,22	0	0	2	2
人葡萄球菌(2 株) <i>S. hominis</i> (2 plant)	26,26	0	0	2	2
模仿葡萄球菌(1 株) <i>S. simulans</i> (1 plant)	24	0	0	1	1
产色葡萄球菌(3 株) <i>S. chromogenes</i> (3 plant)	18,21,23	0	0	3	3

2.5 万古霉素最小抑菌浓度的测定

测定了对万古霉素抑菌圈直径为 12 mm 的木糖葡萄球菌的 MIC,结果表明,试验管与对照管对比第 5 管有浑浊,第 6 管振荡后仍然澄清,说明此菌对万古霉素的最小抑菌浓度为第 5 管的浓度,即 2 μg/mL。

3 讨 论

1) 本试验共分离到 29 株葡萄球菌,其中金黄色葡萄球菌 14 株,凝固酶阴性葡萄球菌 15 株,包括产色葡萄球菌 3 株,木糖葡萄球菌、腐生葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、表皮葡萄球菌和人葡萄球菌各 2 株,头葡萄球菌和模仿葡萄球菌各 1 株。可以看出,金黄色葡萄球菌仍然是奶牛乳房炎主要的葡萄球菌属致病菌。但凝固酶阴性葡萄球菌总体所占比例与金黄色葡萄球菌相当,可见凝固酶阴性葡萄球菌的总体比例逐渐上升,是近年奶牛乳房炎病原菌的新特点。

2) 引起奶牛乳房炎的病原种类非常复杂,与地域、季节和饲养管理条件等密切相关,即使是同一奶牛场,不同时期的病原菌种类及比例也不一样。调查结果显示,在春末至秋初季节,奶牛发生细菌性乳房炎的几率较高。尽管本病一般无大流行趋势,但在一个奶牛场内,如果有该病的发生,就证明该场奶牛的体质及该场的饲养管理状况,有待于进一步提高。

从药敏试验结果可知,引起乳房炎的葡萄球菌对头孢拉定、阿米卡星、庆大酶素均较为敏感。部分菌株对林可霉素、链霉素、复合磺胺呈现耐药性,其中金黄色葡萄球菌对红霉素完全耐药,说明这些药物已不再适用于治疗和预防本地奶牛乳房炎。14 株金黄色葡萄球菌对同一种抗生素的敏感程度不同,说明金黄色葡萄球菌的流行性不同。在本试验中,检测出 1 株木糖葡萄球菌对万古霉素的抑菌圈

直径较低,对此株可以作进一步的调查与研究。

3) MRSA 的治疗之所以棘手,主要在于该菌除对甲氧西林耐药外,还对其他所有 β-内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、喹诺酮类、磺胺类抗生素及利福平等有不同程度的耐药性。但该菌仅对万古霉素敏感,在目前尚无其他有效治疗方法的情况下,普遍将万古霉素作为治疗 MRSA 感染的“最后防线”。但随着万古霉素在临床条件下应用的增加,金黄色葡萄球菌对万古霉素也会出现耐药性^[15]。尽管本次试验尚未发现耐药菌株,但由于采样量少,还不能完全代表真实情况,故仍需进一步进行流行病学调查。如果临床中发现耐万古霉素菌株,应立即送往上一级实验室核定,追踪传染源,了解传播途径及扩散范围,并采取有效措施以防止传播,并应对菌种进行保存,以便对其耐药机理进行深入研究。

[参考文献]

[1] Demelash B,Etana D,Fekadu B. Prevalence and risk factors of mastitis in lactating dairy cows in southern ethiopia [J]. Appl Res Vet Med,2005,3:189-198.

[2] Shook G E. Selection for disease resistance [J]. Dairy Sci, 1989,72:1349.

[3] Elina Reinoso,Gabriel Magnano,Jose Giraudo. Bovine and rabbit models for the study of a *Staphylococcus aureus* a virulent mutant strain,RC122 [J]. Can J Vet Res,2002,66(4):285-288.

[4] Talbot,Brian C,Lacasse. Progress in the development of mastitis vaccines [J]. Livestock Production Science,2005,98(1/2):101-113.

[5] Harmon R J,Langlois B E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species [J]. Agri-Practice,1989,10:29-34.

[6] 陈代杰. 抗菌药物与细菌耐药 [M]. 上海:华东理工大学出版社,2001:138-148.

Chen D J. Antibacterial drugs and bacterial resistance [M]. Shanghai:East China Technology University Press,2001:138-148. (in Chinese)

[7]

Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility [J]. J Antimicrob Chemother, 1997, 40:135.

[8]

Chang S, Suvert D M, Hageman J C, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the van-A resistance gene [J]. N Engl J Med, 2003, 348:1342-1347.

[9]

孙光明. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌检测方法 & 耐药机制的研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2006.
Sun G M. Study on the detecting methods and the resistance mechanism of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2006. (in Chinese)

[10]

Edet E Udo, Noura Al-Sweih, Eiman Mokaddas, et al. Anti-bacterial resistance and their genetic location in MRSA isolated in Kuwait hospitals, 1994-2004 [J]. BMC Infectious Diseases, 2006, 6:1-8.

[11]

姚火春. 兽医微生物学实验指导 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
Yao H C. Guidance of veterinary microbiology experiment [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002. (in Chinese)

[12]

廖文, 何颖, 高海燕, 等. 临床常见革兰阳性菌属简易鉴定法的研究 [J]. 中国公共卫生, 2003(7): 874-875.
Liao W, He Y, Gao H Y, et al. Research on facility identification of common clinical Gram-positive bacteria [J]. Chinese Journal of Public Health, 2003(7): 874-875. (in Chinese)

[13]

徐迪诚, 马俊才, 王艳, 等. 细菌编码鉴定手册(葡萄球菌) [M]. 黑龙江: 黑龙江人民出版社, 2000.
Xu D C, Ma J C, Wang Y, et al. Numerical identification manual for *Staphylococcus* [M]. Heilongjiang: Heilongjiang Renmin Press, 2000. (in Chinese)

[14]

马保臣, 蔡玉梅, 秦卓明, 等. 多重 PCR 检测奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌和酵母菌方法的建立与应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(11): 1202-1208.
Ma B C, Cai Y M, Qin Z M, et al. Development of multiplex PCR for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and Yeasts in bovine mastitis milk samples [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2006, 37(11): 1202-1208. (in Chinese)

[15]

和生琦. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)PBP2aC-末端的克隆、表达以及拮抗 MRSA 中药的筛选 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2007.
He S Q. Clone and expression of PBP2aC-terminal fragment, and screening anti-Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) components from traditional Chinese herbs [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2007. (in Chinese)

(上接第 39 页)

[12]

林彤, 杜惠芬, 吴海波, 等. 抗 O 型口蹄疫病毒单克隆抗体的制备及其生物学特性分析 [J]. 中国兽医科学, 2007, 37(3): 227-231.
Lin T, Du H F, Wu H B, et al. Development of monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus O type and analysis of their biological characteristics [J]. Veterinary Science in China, 2007, 37(3): 227-231. (in Chinese)

[13]

van Maanen C. A complex-trapping-blocking (CTB) ELISA, using monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies directed against foot-and-mouth disease types A, O and C. II. Application [J]. Veterinary Microbiology, 1990, 24(2): 171-191.

[14]

Smitsaart E N, Saiz J C, Yedloutschnig R J, et al. Detection of foot-and-mouth disease virus by competitive ELISA using a monoclonal antibody specific for the 12S protein subunit from six of the seven serotypes [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1990, 26(3): 251-265.