

DOI:10.13350/j.cjpb.221005

• 论著 •

一株牛源 *towneri* 不动杆菌的分离鉴定\*王娅<sup>1</sup>, 岑焱<sup>1</sup>, 张琴<sup>2</sup>, 邓俊良<sup>1</sup>, 才冬杰<sup>1</sup>, 任志华<sup>1</sup>, 苟丽萍<sup>1</sup>, 胡延春<sup>1</sup>, 左之才<sup>1\*\*</sup>

(1. 四川农业大学动物医学院/动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川雅安 625014; 2. 中华人民共和国成都海关)

**【摘要】** 目的 明确四川某肉牛场群发体温升高、高度呼吸困难、流涎等疾病的原因。方法 采集患牛鼻腔拭子、血样、病理组织等样品,通过划线法和革兰氏染色进行细菌分离培养、形态学和生化鉴定;通过 PCR 扩增并测定 16s rRNA 基因序列,再用 MEGA-X 软件进行同源性分析、构建进化树,并进行药敏检测。结果 分离到一株革兰阴性棒状杆菌,生化特性中动力、氧化酶、硝酸盐还原为阴性,过氧化氢酶为阳性,与不动杆菌属相符合;对目的菌进行 RT-PCR 扩增,得到 1 500 bp 目的条带,通过 Blast 分析,16S rRNA 序列与 GenBank 中 *towneri* 不动杆菌株的同源性均达 99%,命名为 ZZC3-9;药敏试验,该菌对亚胺培南、氟苯尼考、阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、强力霉素、多粘菌素 B 高度敏感,对阿奇霉素、头孢他啶、链霉素、亚胺培南、美罗培南、舒巴坦耐药。结论 首次从呼吸道疾病牛分离到 *towneri* 不动杆菌,而且能引起肉牛死亡,但该菌对其他动物是否有致病性及人类生活环境的影响有待进一步探讨。

**【关键词】** 牛源; *towneri* 不动杆菌; 分离鉴定; 药敏

**【中图分类号】** R378

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)10-1136-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Oct.;17(10):1136-1139.]

Isolation and identification of a bovine *Acinetobacter towneri* strain

WANG Ya<sup>1</sup>, CEN Yao<sup>1</sup>, ZHANG Qing<sup>2</sup>, DENG Jun-liang<sup>1</sup>, CAI Dong-jie<sup>1</sup>, REN Zhi-hua<sup>1</sup>, GOU Li-ping<sup>2</sup>, HU Yan-chun<sup>1</sup>, ZUO Zhi-cai<sup>1</sup> (1. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China; 2. Chengdu Customs of the People's Republic of China)

**【Abstract】** **Objective** In order to investigate the cause of beef cattle suffering from respiratory syndrome such as fever, high difficulty in breathing and salivate in a cattle farm in Sichuan Province. **Methods** Samples of Nasal swab, blood and pathological tissue from diseased cattle were collected for bacterial isolation and culture by streaking and Gram staining. and its morphological and biochemical characteristics and 16SrRNA gene sequence were determined, homology analysis was performed using the software MEGA-X, evolutionary tree was constructed, and drug susceptibility was determined. **Results** The isolates were gram-negative Corynebacterium, its biochemical characteristics were negative for motivity, oxidase and nitrate reduction, and positive for catalase, which were consistent with acinetobacter genus. RT PCR was used to amplify the target bacteria and 1500bp target band was obtained. The 16S rRNA sequence had 99% similarity with *A. towneri* strain in GenBank. Therefore, the isolates were identified as *A. towneri* and named ZZC3-9. Drug sensitivity tests indicate that the isolates were highly sensitive to imipenem, fluphenicol, amikacin, gentamicin, kanamycin, doxycycline, polymyxin B, and resistant to azithromycin, ceftazidime, streptomycin, imipenem, meropenem, sulbactam. **Conclusion** *A. towneri* was isolated from cattle with respiratory disease for the first time, and it can cause the death of beef cattle. However, the pathogenicity of *A. towneri* to other animals and the impact of human living environment need to be further discussed.

**【Key words】** Cattle; *Acinetobacter towneri*; isolation and identification; drug sensitive test

\*\*\*不动杆菌是一种广泛分布在外界环境中的条件致病菌<sup>[1]</sup>,该菌在动物免疫力低下时引起肺炎、脑膜炎、心内膜炎、败血症<sup>[2]</sup>等严重疾病。至今,关于不动杆菌的相关研究主要集中在人与其他动物<sup>[3-4]</sup>的鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)、约翰不动杆菌(*A. johnsonii*)、醋酸钙不动杆菌(*A. calcoaceticus*)等病原的分离鉴定、耐药基因等方面。如 2006 年引起猫坏死性筋膜炎的<sup>[5]</sup>、2009 年引起马支气管肺炎的鲍曼不动杆菌<sup>[6]</sup>, 2018 年,奉鉴金等<sup>[7]</sup>从呼吸道的肉牛中分离得到约翰

不动杆菌。本实验室首次从体温升高、流涎、流鼻涕、

\* **【基金项目】** 国家重点研发计划资助项目(No. 2021YFD1600200);财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助项目(肉牛牦牛, CARS-37);国家现代农业产业技术体系四川肉牛创新团队项目(No. SCCXTD-2022-13)。

\*\* **【通讯作者】** 左之才, E-mail: zzcj@126.com

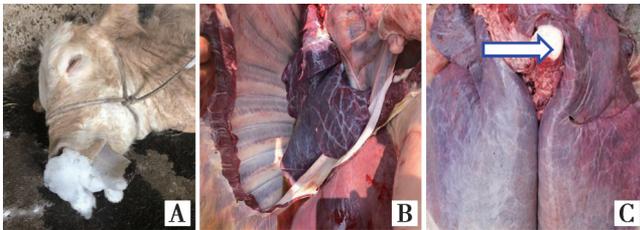
**【作者简介】** 王 娅(1978-),女,四川蒲江人,硕士研究生,副教授,主要研究方向为中西兽医与临床。 E-mail: wangyayang@126.com

呼吸困难等消化和呼吸道疾病症状的患牛分离得到 *Acinetobacter towneri*, 对其进行鉴定及药敏试验, 为后期的致病性实验和建立快速检测方案提供理论基础。

## 材料与方 法

### 1 材 料

**1.1 病料来源** 四川某肉牛养殖场呈现体温升高、流涎、流鼻涕、呼吸困难等消化和呼吸道疾病等症状肉牛 36 头, 病牛常规药物治疗数日无效, 出现死亡。死亡牛口鼻出现细小泡沫样物, 长时间不消散(图 1A), 肺大量淤血(图 1B), 气管内大量泡沫样分泌物(图 1C), 遂采集牛群的血样、病理组织样品及口鼻拭子, 进行细菌的分离、培养与鉴定。



A 病牛鼻腔细小泡沫样物 B 肺大量淤血 C 气管大量泡沫

图 1 病牛呼吸道症状

A Small foamy sample of sick cow's nasal cavity B Massive lung congestion C Lot of foam in the trachea

Fig. 1 Respiratory symptoms of sick cattle

**1.2 主要试剂** 普通琼脂培养基(NA)、血液琼脂基础培养基、革兰染色液购于青岛海博生物技术有限公司; 细菌微量生化鉴定管购于杭州微生物试剂有限公司; 2 × Master Mix、16S rRNA 基因通用引物、ddH<sub>2</sub>O、DL2000 DNA Marker 购于成都擎科梓熙生物技术有限公司; 试验用抗生素购至杭州天和微生物试剂有限公司。

**1.3 主要仪器** SimpliAmp™ PCR 仪(Thermo Fisher)、NanoDrop™ One 超微量紫外分光光度计(Thermo Scientific™)、481HP 落地式恒温制冷摇床(Thermo Scientific)、ST16 大容量高速冷冻离心机(Thermo Scientific)、GelDoc 全自动凝胶成像系统(Bio-Rad)、DYY-6D 电泳仪(北京六一生物科技有限公司)

### 2 方 法

**2.1 病原的分离及纯培养** 取样本划线培养于普通营养琼脂平板, 37 °C 放置 12 h。挑取单个菌落, 在普通营养琼脂和血琼脂培养基纯化培养后, 挑取单个菌落 革兰染色、镜检。

**2.2 生化鉴定** 将分离菌接种于葡萄糖、甘露糖、乳糖、半乳糖、棉子糖、血清菊糖、麦芽糖等生化管, 37 °C

培养 24 h 后观察试验结果。结果判定依据《伯杰细菌鉴定册》<sup>[8]</sup>。

**2.3 16S rRNA 序列的测定及同源性分析** 以提取的 DNA 为模板, 根据参考文献用 16S rRNA 通用引物<sup>[9]</sup> (16S-F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 16S-R: TACGGCTACCTTGTTCGACTT) 对菌株进行 PCR 扩增。

PCR 反应总体积为 25 μL, 其中包括 2 × Taq Master MIX 12.5 μL, 上下引物各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL, DNA 模板 2 μL。反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 40 个循环后 72 °C 延伸 10 min。

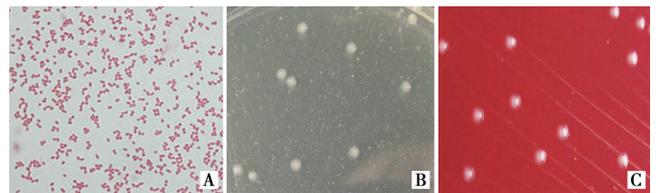
PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min。将有目的条带的扩增产物送往成都擎科股份有限公司测序。将检测结果与 NCBI GenBank 数据库中已有序列进行 BLAST 比对分析, 并选取 GenBank 中已登录的参考菌株, 利用 MEGA-X 制作系统发育树, 分析同源性。

**2.4 药物敏感性试验** 将纯培养菌液接种于 MH 琼脂培养基, 采用亚胺培南、氟苯尼考、阿奇霉素、阿米卡星、亚胺培南、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、强力霉素、等药敏纸片进行药敏试验。依据 CLSI<sup>[10]</sup> 判定标准对试验操作与结果进行判读。

## 结 果

### 1 细菌分离及形态观察、镜检结果

从样品分离得 革兰染色呈阴性、短杆状(图 2A)。在普通琼脂培养基上 37 °C 培养 24 h 能产生腐败气味, 分离菌生长为乳黄色、湿润、光滑、边缘整齐直径约为 1 mm 的菌落(图 2B); 在血琼脂培养基上呈灰白色、凸起、湿润、乳酪样且不产生溶血直径 1—2 mm 的菌落(图 2C)。



A ZC3-9 分离菌形态 B ZC3-9 在普通琼脂培养基上的生长形态 C ZC3-9 在血琼脂培养基上的生长形态

图 2 ZC3-9 分离株镜检及培养形态

A Morphology of ZC3-9 isolates B Growth morphology of ZC3-9 on ordinary agar medium C Growth morphology of ZC3-9 on blood agar medium

Fig. 2 Microscopic examination and culture morphology of ZC3-9 isolates

### 2 生化鉴定结果

分离菌氧化酶、动力、硝酸盐还原为阴性, 过氧化

氢酶为阳性;符合《伯杰细菌鉴定册》<sup>[11]</sup>不动杆菌属细菌的主要生化特点(表1)。

表1 ZZC3-9 生化鉴定结果  
Table 1 Biochemical identification results of ZZC3-9

生化试验 biochemical test	结果 Result	生化试验 biochemical test	结果 Result	生化试验 biochemical test	结果 Result
葡萄糖	-	山梨醇	-	精氨酸双水解酶	-
氧化酶	-	过氧化氢酶	+	硝酸盐还原	-
木糖	-	甘露醇	-	H <sub>2</sub> S	-
蔗糖	-	侧金盏花醇	-	吲哚	-
麦芽糖	+	水杨素	-	动力	-
乳糖	-	枸橼酸盐	-	VP	-
半乳糖	-	丙二酸盐	-	明胶	-
棉子糖	-	尿素	+	精氨酸脱羧	-
血清菊糖	-	苯丙氨酸脱氨酶	-	鼠李糖	-
阿拉伯糖	-	DNA 酶	-	氧化酶	-

注(Notes):“+”表示阳性(Positive);“-”表示阴性(Negative)。

### 3 16S rRNA 分子鉴定及同源性分析

对分离菌进行 PCR 扩增,电泳检测显示有目的条带 1 500 bp (图 3)。将 PCR 产物测序得到基因序列在 NCBI GenBank 数据库中进行 Blast 分析比对,与收录的 *A. towneri* 基因序列同源性达 99%。确定为 *A. towneri*,命名为 ZZC3-9。ZZC3-9 与来源于排泄物的中国河南株 *Acinetobacter towneri* (CP046045) 聚为一支。与来源于生牛乳的中国天津株 *Acinetobacter towneri* (KC212079) 和来源于牛粪便的中国南京株 *Acinetobacter towneri* (CP045129) 处于不同的分支上(图 4、表 2)。

表 2 GenBank 中公布的相关参考菌株信息

菌株 Strain	来源 Source	登录号 Accession	分离地 separated area	分离时间 separated time
SWBY1	未知	CP026616	中国泸州	2018
WCHA55	污水	CP032286	中国成都	2018
TQ04	牛粪	CP045129	中国南京	2020
ZS207	Zloty Stok 金矿的微生物垫	CP019143	波兰	2012
HZE33-1	粪便	CP044474	中国惠州	2018
19110F47	排泄物	CP046045	中国河南	2019
QS913	未知	MK439529	中国三亚	2020
T-B13C	未知	KJ806489	中国厦门	2014
Z1516	生牛乳	KC212079	中国天津	2011
NF435	排泄物	KF999898	中国广州	2014
AQ-3	水产养殖沉积物	JF751054	中国上海	2011
S-X2D	未知	KJ806429	中国厦门	2014
CULSSDVK_20202	皮肤	MT037172	印度	2020

### 4 药物敏感试验

分离菌株药敏试验结果见表 3,ZZC3-9 对亚胺培南、氟苯尼考、阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、强力霉素、多粘菌素 B 高度敏感,对阿奇霉素、头孢他啶、链

霉素、亚胺培南、美罗培南、舒巴坦耐药。

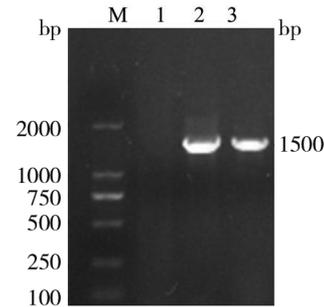


图 3 ZZC3-916S RT-PCR 鉴定结果  
M DL2000 DNA Marker 1 阴性对照 2、3 ZZC3-9 扩增产物的 PCR 产物

图 4 ZZC3-9 系统发育树  
M DL2000 DNA Marker 1 Negative control 2、3 PCR products of ZZC3-9

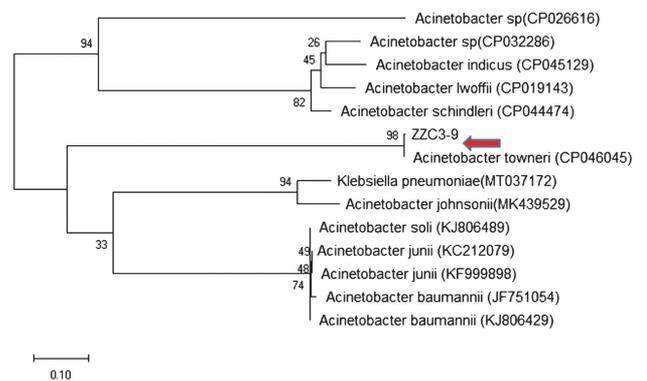


表 3 ZZC3-9 药敏试验结果  
Table 3 Drug susceptibility test results of ZZC3-9

药物名称 Drugname	抑菌环直径/ mm inhibition zone diameter(mm)	药敏试验结果 Result
亚胺培南 IMI	18	R
阿奇霉素 AEI	12	R
红霉素 ERY	22	I
氟苯尼考 FFC	25	S
头孢他啶 CAZ	17	R
链霉素 STR	9	R
阿米卡星 AMI	21	S
庆大霉素 GEN	22	S
美罗培南 MER	15	R
卡那霉素 KAN	22	S
强力霉素 DOX	23	S
头孢噻肟 CTX	20	I
舒巴坦 SUL	14	R
头孢曲松钠 CEF	18	I
头孢吡肟 FEP	21	I
多粘菌素 B AER	15	S

注(Notes):S,高度敏感(Sensitive);I,中度敏感(Intermediate sensitivity);R,耐药(Resistant)。

### 讨论

本实验从患有呼吸道疾病肉牛鼻腔拭子中分离得

到 *A. towneri* (ZCC3-9) 葡萄糖、蔗糖为阴性, 与疑似患有醋酸钙不动杆菌的病死牛肺脏组织进行病原分离的醋酸钙不动杆菌<sup>[3]</sup>以及从奶牛乳房炎中分离出的鲍曼不动杆菌<sup>[11]</sup>的生化试验结果存在差异, 该两株菌葡萄糖、蔗糖为阳性; 但除此以外其他生化试验结果如氧化酶阴性、过氧化酶阳性、动力阴性、硝酸盐试验阴性与牛源醋酸钙不动杆菌和奶牛源鲍曼不动杆菌一致, 符合不动杆菌属的生化特性。这说明不同来源的不动杆菌生化试验结果存在一定的差异, 造成该现象的原因是该菌为了适应生存环境而发生了改变, 这种变化对菌株本身致病性或耐药性是否产生影响尚不可知。其次, ZCC3-9 的生化试验结果除麦芽糖、尿素呈阳性, 其余均呈阴性, 说明该菌生化特性尤为不活泼, 可通过利用的营养物质少, 从而满足自身生长繁殖, 由此推测这可能是其适应能力强, 感染范围广的重要原因之一。

不动杆菌种属众多<sup>[12]</sup>, 之前常用 Vitek 2 system、API 与 Phoenix 等方法通过表型进行鉴别不同种属的不动杆菌效果大多不能令人满意<sup>[13]</sup>, 因此目前实验室常用 16S rRNA 比对分析进行基因鉴定。本研究通过对 ZCC3-9 进行 16S rRNA 序列及其同源性分析发现: 该优势菌株与来源于排泄物的中国河南株 *A. towneri* (CP046045) 同源性最近, 相似率高达 99%。由 ZCC3-9 的药物敏感性试验结果可知, 该分离菌对阿奇霉素、头孢他啶、链霉素、亚胺培南、美罗培南、舒巴坦显著耐药, 其中亚胺培南、美罗培南均属于碳青霉烯类药物, 产生该现象的原因可能与不动杆菌可以产生碳青霉烯酶如 D 类苯唑西林酶<sup>[14]</sup>和 B 类金属  $\beta$ -内酰胺酶<sup>[15-16]</sup>, 破坏了碳青霉烯类药物中的  $\beta$ -内酰胺环从而达到对其耐药。由于有关 *A. towneri* 的耐药研究较少, 该类菌株的具体耐药性特点还有待进一步研究。

本实验从患有呼吸道疾病的肉牛鼻腔拭子中获得一株优势菌株 ZCC3-9, 经对分离株的染色形态、生化试验、16S rRNA 测序, 确定该菌为 *A. towneri*。该菌对碳青霉烯类的亚胺培南、美罗培南耐药。该菌可能为引起肉牛呼吸道感染发病, 甚至引起死亡的主要病菌或继发性感染菌, 应引起高度重视。

#### 【参考文献】

- [1] 杨淑霞, 范晓华, 钟晓莉, 等. 不动杆菌属的研究进展[J]. 中国医学创新, 2010, 7(28): 192-194.
- [2] 王清, 刘琪. 837 株鲍曼不动杆菌感染临床分布及耐药性调查[J]. 中国消毒学杂志, 2014, 31(4): 377.
- [3] 李晨, 王思月, 稽少泽, 等. 一株牛源醋酸钙不动杆菌的分离鉴定、药敏试验及耐药基因检测[J]. 华北农学报, 2019, 34(S1): 318-323.
- [4] 饶桂波, 曹颖颖, 王力波, 等. 黑山羊醋酸钙不动杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国兽医杂志, 2015(5): 9-11.
- [5] Brachelente C, Wiener D, Malik Y, et al. A case of necrotizing fasciitis with septic shock in a cat caused by *Acinetobacter baumannii* [J]. Vet Dermatol, 2007, 18(6): 432-438.
- [6] Jokisalo J, Bryan J, Legget B, et al. Multiple-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bronchopneumonia in a colt following intensive care treatment[J]. Equine Vet Educ, 2010, 22(6): 281-286.
- [7] 奉鉴金, 张玉龙, 左之才, 等. 一株牛源约翰逊不动杆菌的分离鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(1): 1-11.
- [8] Kriegen R. Bergey's Manual of systematic bacteriology [M]. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, 1986.
- [9] 姚洪礼, 李兴江, 郑志, 等. 基于 16SrDNA 的醋酸菌筛选及其发酵特性[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 12-18.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, nineteenth informational supplement [J]. M100-S21, 2011.
- [11] 王旭荣, 王孝武, 李建喜, 等. 一株与奶牛子宫内膜炎相关的鲍曼不动杆菌的分离与鉴定 [C]. 中国畜牧兽医学学会学术年会, 2014.
- [12] Peleg A Y, Seifert H, Paterson D L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen [J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3): 538-582.
- [13] Lee CR, Lee JH, Park M, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017 (7): 55.
- [14] 杨秋. 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌耐药基因及分子诊断研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2016.
- [15] Fu Y, Du X, Ji J, et al. Epidemiological characteristics and genetic structure of bla<sub>NDM-1</sub> in non-baumannii *Acinetobacter spp.* in China [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(9): 2114-2122.
- [16] Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China [J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(6): 1255-1259.

【收稿日期】 2022-05-24 【修回日期】 2022-08-12