

生猪养殖场环境及屠宰加工环节金黄色葡萄球菌污染及耐药谱状况

聂青¹, 石磊¹, 周臣清², 闫鹤¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

(2. 广东产品质量监督检验研究院顺德基地, 广东顺德 528399)

摘要: 为了探究养殖及流通环节金黄色葡萄球菌污染及其耐药状况, 采集某养殖场环境, 屠宰加工环节及某市场生猪肉等 507 份样本。根据国标 GB 4789.10-2010 分离金黄色葡萄球菌 136 株; 纸片扩散法、E-test 法检测分离菌株耐药谱; 聚合酶链式反应 (PCR) 检测所有菌株携带四环素、大环内酯类、林可酰胺类耐药基因及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA) 特异性基因 *mecA* 与 *mecC* (即 *mecALGA251*) 状况。结果表明, 来自屠宰场生猪肉样本金黄色葡萄球菌污染率达 44.11% (60/136), 与其它来源的分离率相比有显著性差异 ($P < 0.05$); 对临床用于治疗金黄色葡萄球菌感染的青霉素、四环素及克林霉素耐药率分别为 92.64% (126/136)、56.61% (77/136)、50.00% (58/136); 多重耐药达 56.62% (77/136); 耐药谱以 CIP/P/CN/TE/CLR/SXT/DA, P/CLR/DA, CIP/P/TE/CLR/C/SXT/RD/DA 为主; 金黄色葡萄球菌携带耐药基因较为严重, 其中耐四环素基因 *tetK* 检测率为最高, 达 90.44%。研究结果为控制多重耐药金黄色葡萄球菌随食物链的传播提供科学依据。

关键词: 养殖场; 金黄色葡萄球菌; 耐药谱

文章编号: 1673-9078(2016)2-289-295

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.042

Prevalence and Drug Resistant of *Staphylococcus Aureus* from Swine Farm and Processing Chain

NIE Qing¹, SHI Lei¹, ZHOU Chen-qing², YAN He¹,

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Shunde 528399, China)

Abstract: To investigate the prevalence of *Staphylococcus aureus* and drug resistance at pig farms and during slaughter and processing, 507 pork and environmental samples were collected from farms, slaughter and processing, and markets. A total of 136 *Staphylococcus aureus* strains were identified according to the GB.4789.10-2010. All isolates were tested for antimicrobial susceptibility by the disk diffusion and E-test methods. The presence of genes conferring resistances to tetracyclines, macrolides, and lincosamides as well as the *mecA* and *mecC* (*mecALGA251*) genes carried by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains in the isolates was examined by polymerase chain reaction (PCR). The results showed that the *S. aureus* infection rate of fresh pork from slaughterhouses was (44.11%, 60/136), and this value differed significantly from the rates at other sources ($P < 0.05$). The resistance rates to penicillin, tetracycline, and clindamycin, which are used to treat *S. aureus* infection, were (92.64%, 126/136), (56.62%, 77/136), and (50.00%, 68/136), respectively. The multidrug resistance rate was 56.62% (77/136), and the main resistance profiles of *S. aureus* strains were CIP/P/CN/TE/CLR/SXT/DA, P/CLR/DA, and CIP/P/TE/CLR/C/SXT/RD/DA. The drug-resistance genes carried by *S. aureus* stains posed a serious problem, and gene with the highest detection rate was the tetracycline-resistant gene *tetK* (90.44%). This study provides a theoretical basis for controlling the spread of multi-resistant strains of *S. aureus* in the food chain.

Key words: swine farm; *Staphylococcus aureus*; resistance profile

收稿日期: 2015-05-11

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31201363); 广东省科技计划项目 (2014A020214001)

作者简介: 聂青 (1992-), 女, 在读研究生, 主要从事食源微生物食品安全研究

通讯作者: 闫鹤 (1972-), 女, 副研究员, 主要从事食品安全-微生物研究

金黄色葡萄球菌是一种广泛分布于自然界的革兰氏阳性致病菌, 多见于春夏季节, 能够引起人和动物局部性化脓性感染、肺炎、心包炎、脓包败血症等疾病。该菌是猪肉污染的主要食源性致病菌之一, 携带金黄色葡萄球菌的猪肉, 无疑会给食品安全带来潜在的威胁。而随着抗生素在养殖业和畜牧业的大量

使用和滥用,金黄色葡萄球菌对抗生素呈现越来越广的耐药性,且耐药水平越来越高,菌株携带多重耐药基因的现象越来越严重。

自 1959 年耐青霉素酶的抗菌类药物甲氧西林运用至临床后,不到两年时间,英国 Jevons 发现了第一株对甲氧西林耐药且 *mec* 基因阳性的金黄色葡萄球菌,将其命名为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*methicillin-resistant staphylococcus aureus*, MRSA)。近年来,欧洲、北美等国家陆续报道在养殖环境及动物、工人、兽医身体检测到新型的多重耐药 MRSA,且这种新型的 MRSA 可以通过养殖环节传播到人类^[1]。研究表明,这种新型多重耐药 MRSA 起源于人类携带的甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌,在传播至养殖场环境后,获得对四环素和甲氧西林耐药性^[2]。随着万古霉素在临床治疗过程中的应用,金黄色葡萄球菌对万古霉素敏感性越来越低。继 1997 年日本发现第一例对万古霉素中介耐药的金黄色葡萄球菌之后,美国于 2002 年发现了对万古霉素耐药的菌株^[3]。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的普遍流行及耐万古霉素的金黄色葡萄球菌的出现,使得耐药性成为金黄色葡萄球菌难以控制的原因之一。

由于金黄色葡萄球菌对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类等抗菌药物耐药,且其耐药性逐年上升,了解其耐药性并且对其准确、及时的检出,对于防治疾病的流行和耐药菌的播散极为重要。本文对金黄色葡萄球菌及 MRSA 进行养殖环节污染监测分析,耐药谱测定,为进一步深入研究食源性金黄色葡萄球菌及 MRSA 耐药机制及人、畜、食物链病原菌耐药性及分子流行病学之间的联系和控制细菌耐药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样本来源

采集自某养殖场环境,屠宰加工环节、生猪肉,生产车间的肉制品、豆制品成品,同时采集某超市和某农贸市场生猪肉作对照研究,共 507 份样品。某养殖场环境样品 71 份,猪鼻拭子 97 份,屠宰车间宰杀猪的大肠小肠 40 份、生猪肉样品 136 份;成品豆干 38 份,成品肉松肉丸共 15 份;超市、农贸市场生猪肉样品 110 份。

1.2 仪器与设备

恒温培养箱,德国 Binder 公司;恒温培养摇床,上海一恒科学仪器有限公司;GeneAmp PCR system

2700,美国 Applied Biosystems 公司;Gel Doc EQ 凝胶成像系统,美国 BIO-RAD 公司;核酸电泳仪,美国 BIO-RAD 公司;高速离心机,美国 Thermo 公司。

1.3 培养基和主要试剂

药敏纸片,杭州微生物试剂有限公司;E-test 试纸条,生物梅里埃公司;Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L)、琼脂糖,日本 TaKaRa 公司;细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒,德国 Qiagen 公司;溶菌酶,德国 Sigma 公司;引物,由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成;7.5%氯化钠肉汤、血琼脂平板、脑心浸出液肉汤、MH 肉汤,兔血浆,广州环凯微生物科技有限公司;无菌生理盐水、Baird-Parker 琼脂平板、营养琼脂小斜面为本实验室自制。

1.4 方法

1.4.1 金黄色葡萄球菌的分离

依据 GB-GB4789.10-2010 增菌分离金黄色葡萄球菌,即挑取 Baird-Parker 平板或者血琼脂平板上可疑菌落进行血浆凝固酶试验和革兰氏染色镜检,阳性即为金黄色葡萄球菌;质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 29213。

1.4.2 抗菌药物敏感试验

采用 CLSI 推荐的纸片扩散法(Kirby-Bauer, K-B)进行抗生素药物敏感性试验^[4],结果按照 CLSI(2012)标准进行结果判断^[5]。根据 CLSI 标准,在 K-B 法药敏实验中,对头孢西丁抑菌圈直径 ≤ 21 mm 的金葡萄则认为是 MRSA。

采用 E-test 法,具体步骤按照《E-test 细菌定量(MIC)药敏测试盒说明》进行,结果按照 CLSI(2012)标准进行结果判断^[5]。对万古霉素的最小抑菌浓度(MIC) $> 2 \mu\text{g/mL}$ 为耐万古霉素。

抗生素:环丙沙星,青霉素,庆大霉素,四环素,克拉霉素,氯霉素,复方新诺明,呋喃妥因,利福平,克林霉素,头孢噻吩,米诺环素,苯唑西林,头孢西丁和万古霉素。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 29213。

1.4.2 四环素类、林克酰胺类、大环内酯类耐药基因及 MRSA 特异性基因检测

DNA 提取按照 Qiagen 公司 DNA 提取试剂盒说明进行。为了确定耐药基因是否会以沉默的形式存在,所有菌株 PCR 扩增检查四环素类(*tetM*、*tetK*),大环内酯类(*ermA*、*ermB*、*ermC*),林可酰胺类(*linA*'*linA*)及 MRSA 特异性基因 *mecA* 与 *mecC*(即 *mecA*_{LGA251}),PCR 阳性产物送上海美吉生物医药科技有限公司测

序,将测序结果在 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站对测得的序列进行分析,应用 Standard Nucleotide BLAST 对获得的基因序列进行同源性检索。引物及条件见参考文献^[6-10]。

1.4.3 数据处理

采用 spss19.0 软件进行统计学处理,计数资料用 χ^2 检验, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 金黄色葡萄球菌检出情况

本研究共采集 507 份样品,通过分离鉴定得到金黄色葡萄球菌 136 株,分离率为 26.82%。养殖场环境中栅栏门,地面等样本中,金葡分离率为 9.86%;而 97 份猪鼻拭子里中,金葡检出率为 22.68%;屠宰车间生猪肉,金葡分离率达 44.11%;超市及市场生猪肉里金葡的分离率为 30%;在成品储藏间采样的 38 份豆干检出 9 份含有金葡,检出率为 23.68%;肉类成品肉松、肉丸等没有检出。不同来源的样品分离率有显著性差异($P < 0.05$),各种类样品分离率见表 1。

表 1 各类产品中金黄色葡萄球菌分离情况

Table 1 Isolation of *S. aureus* strains from different pork products

样品种类	样品数量	阳性菌株(阳性分离率/%)	P 值
环境样	71	7 (9.86)	
猪鼻拭子	97	22 (22.68)	
生猪肉 ^a	136	60 (44.11)	
猪肠	40	5 (12.50)	
豆干	38	9 (23.68)	
肉松肉丸等	15	0 (0.00)	
生猪肉 ^b	110	33 (30.00)	
总共	507	136 (26.82)	<0.05

注: a.来自屠宰场间生猪肉; b.来自市场超市猪肉。

12 月份养殖场环境中金葡分离为 9.86%,猪鼻拭子金葡分离率为 22.68%,相对于寇芮^[11]在 10 月、12 月及 5 月在养殖场里分离金葡菌的分离率 30.2%、23.3%和 40.0%偏低,可能与养殖场动物密集程度和养殖场内卫生情况有关,也可能与地区流行情况有关,符合金葡流行季节规律。不同来源样本中金葡检出率有显著性差异($P < 0.05$),来自屠宰车间生猪肉和市场流通生猪肉样本分离率偏高,检出率分别为 44.11%、30%。因此,屠宰车间等流通环节作为从农场-餐桌中重要的一环,应加强其原料、生产人员、生产环境、设备清洗、消毒过程,并通过认真、细致卫生检查程序避免流通环节中微生物污染。

2.2 金黄色葡萄球菌对 15 种抗生素的药敏情况

各不同来源金黄色葡萄球菌对抗生素的耐药情况见表 2。136 株菌对 14 种抗生素耐药率分别为青霉素(92.64%),四环素(56.61%),克林霉素(50.00%),克拉霉素(49.26%),复方新诺明(41.91%),环丙沙星(39.71%),庆大霉素(29.41%),氯霉素(24.26%),头孢西丁(17.64%),利福平(12.50%),苯唑西林(12.50%),米诺环素(8.82%),头孢噻吩(8.08%),呋喃妥因(4.41%);所有菌株对万古霉素敏感。对青霉素、四环素、克拉霉素、复方新诺明及环丙沙星具有较高的耐药率,尤其是来自市场超市的生猪肉样本的金葡。K-B 法检出 MRSA24 株,检出率为 17.65%(24/136),低于上海市猪场的检出率 54.22%(45/83)^[12],存在差异的原因可能与各个猪场猪的来源、抗生素的使用及环境等因素有关。

本试验检测的 136 株菌对青霉素,克林霉素以及四环素耐药率高达 50%以上。刘洋^[13]对全国 5 地区的猪源养殖场进行耐药性分析,分离菌株对青霉素及大环内酯类抗生素耐药率达 93.24%~100%,和本研究耐药情况相当。高攀等^[14]对新疆 6 个地区的牛源养殖场分离的 143 株金葡菌的临床药敏试验,其 70%以上的分离菌株对青霉素和四环素耐药,和本研究相比耐药情况严重,表明青霉素类及四环素类耐药菌在环境中已经普遍存在,应引起重视。在中国养殖业内使用抗生素促进动物生长和治疗动物疾病方面存在严重的滥用,有研究报道指出养殖场内抗生素耐药性可以通过食物链向人类传播^[15],为了防止抗生素耐药性的传播,需严控食品源头养殖场内抗生素的使用,加强食品源头致病菌的检测,为临床合理用药提供依据。

临床上用于治疗金葡感染的主要有八大类,分为 β -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、红霉素类及万古霉素类等^[16]。值得注意的是,研究菌株对临床上用于治疗金葡菌感染的青霉素类(青霉素)、磺胺类(复方新诺明)、四环素类(四环素)、林克酰胺类(克林霉素)严重耐药。

2.3 金黄色葡萄球菌的多重耐药性

金葡菌对 15 种抗生素多重耐药情况见图 1。其中,有 10 株(7.35%)金葡对所有抗生素敏感,28 株(20.59%)金葡对 1 种抗生素耐药,多重耐药菌达 77 株,占 56.62%,且多重耐药菌均来自养殖场、屠宰车间环节

以及市场生猪肉样本,表明生猪肉中分离鉴定的金黄色葡萄球菌耐药性高度复杂;在成品的豆制品样本中未发现多重耐药菌的存在。不同来源的金葡对 15 种抗生素显示不同的耐药谱。来源于养殖场的菌株其耐药谱主要为 CIP/P/CN/TE/CLR/SXT/DA;而来自于屠宰的菌株耐药谱为 P/CLR/DA;来自于市场及超市菌株耐药谱为 CIP/P/TE/CLR/C/SXT/RD/DA。林兰^[17]等对我国河北、陕西、湖北和四川的生猪养殖场或屠宰场

采集生猪鼻咽部拭子分离的菌株进行耐药性分析,优势耐药谱为 CIP/CLI/ERY/FOX/GEN/TET/CHL 和 CIP/CLI/ERY/FOX/GEN/TET。这表明微生物为适应环境中抗生素污染变化而进化出各种不同的、应对环境压力的抗生素耐受机制。值得注意的是一株来自屠宰车间生猪肉的菌株 S62,耐药种数达 13 种,耐药谱为 CIP/P/CN/TE/CLR/C/SXT/F/RD/DA/MH/OX/FOX。

表 2 金黄色葡萄球菌对抗生素的耐药情况

Table 2 Drug susceptibility testing of *S. aureus* isolates

药物种类	抗生素	细菌耐药数/%				总数 (n=136)
		环境样 ^a (n=29)	生鲜肉 ^b (n=65)	生鲜肉 ^c (n=33)	生肉制品 ^d (n=9)	
氟喹诺酮类	CIP	28(96.55)	16 (24.61)	10 (30.33)	0 (0.00)	54(39.71)
氨基糖苷类	CN	21(72.41)	13 (20.00)	6 (18.18)	0 (0.00)	40(29.41)
大环内酯类	CLR	27(93.10)	26 (40.00)	14(42.42)	0 (0.00)	67(49.26)
苯丙醇类	C	1(3.44)	10 (15.38)	20(60.61)	2(22.22)	33(24.26)
叶酸代谢途径抑制剂	SXT	28(96.55)	13 (20.00)	16(48.48)	0 (0.00)	57 (41.91)
硝基咪唑类	F	0(0.00)	3 (4.61)	3(9.09)	0 (0.00)	6 (4.41)
利福平	RD	1(3.44)	2 (3.07)	14(42.42)	0 (0.00)	17(12.50)
林可霉素类	DA	29 (100.00)	19 (29.23)	20(60.61)	0 (0.00)	68(50.00)
头孢类	KF	0 (0.00)	0 (0.00)	11(33.33)	0 (0.00)	11(8.08)
四环素类	MH	0 (0.00)	1 (1.53)	11(33.33)	0 (0.00)	12(8.82)
β-内酰胺类	TE	28 (96.55)	20 (30.76)	29(87.88)	0 (0.00)	77(56.61)
	OX	0 (0.00)	2 (3.07)	15(45.45)	0 (0.00)	17(12.50)
	P	29 (100.00)	55 (84.61)	33(100)	9(100.00)	126(92.64)
	FOX	2 (6.89)	7 (10.76)	13(39.39)	2(22.20)	24(17.64)
	VAN	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

注: 1、缩写符号表示 CIP-环丙沙星, CN-庆大霉素, CLR-克拉霉素, C-氯霉素, SXT-复方新诺明, F-呋喃妥因, RD-利福平, DA-克林霉素, KF-头孢噻吩, MH-米诺环素, TE-四环素, OX-苯唑西林, P-青霉素, FOX-头孢西丁, VAN-万古霉素; 2、a,某养殖场的土壤环境及猪鼻拭子; b,某屠宰车间生鲜肉; c,某市场生鲜肉, d,来自某养殖场生鲜制品。

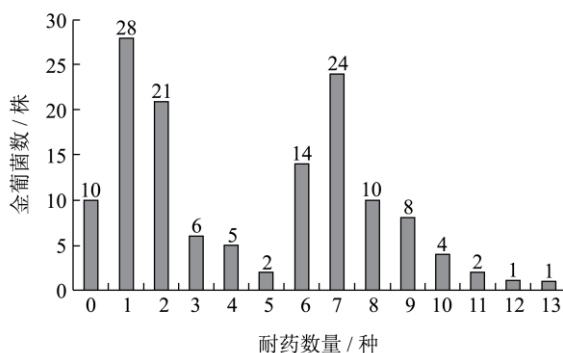


图 1 多重耐药菌情况

Fig.1 Multidrug resistance

2.4 耐药基因的检测

本试验检测的 136 株菌中四环素基因 *tetK* 检出率

最高,达 90.44%,且有 6 株来自市场的耐四环素菌株同时携带 *tetM* 和 *tetK*,携带 *tetK* 或 *tetM* 基因的菌株中表型符合率为 53.98%,表明部分菌株携带沉默的四环素耐药基因。不同样本来源中检出 *tetM* 基因有显著性差异,来自市场生猪肉样本的金葡检出 *tetM* 携带率最高,为 24.24%,具有统计学意义 ($P<0.05$)。耐大环内酯类抗生素菌株中检出耐药基因 *ermA/B/C* 携带率为 16.42%,其中 *ermB* 携带率较高 (11.76%, 16/136),5 株对大环内酯类抗生素敏感菌株中检出携带 *ermB* 基因。

根据 PCR 检测结果,共检测携带 *mecA* 基因的 21 株,检测率为 15.44% (21/136)。未检测到与 *mecA* 有 70%同源的 *mecC* 基因。金黄色葡萄球菌耐药基因的检测见表 3。

表 3 不同来源耐药基因的分布率

Table 3 Detection rate of antibiotic resistance genes in different *S. aureus* strains (%)

毒力基因	阳性菌株分离率分布范围/%	阳性检测率% (阳性菌株数)							p
		环境样 ^a	猪鼻拭子 ^a	生猪肉 ^b	猪肠 ^b	豆干 ^b	生猪肉 ^c	总共	
<i>mecA</i>	0.00~29.00	28.57(2)	0.00(0)	15.00(9)	0.00(0)	22.22(2)	24.24(8)	15.44(21)	>0.05
<i>ermA</i>	0.00~12.00	0.00(0)	0.00(0)	1.67(1)	0.00(0)	11.11(1)	3.03(1)	2.21(3)	>0.05
<i>ermB</i>	6.00~23.00	14.29(1)	18.18(4)	6.67(4)	20.00(1)	22.22(2)	12.12(4)	11.76(16)	>0.05
<i>ermC</i>	0.00~10.00	0.00(0)	9.09(2)	1.67(1)	0.00(0)	0.00(0)	0.00(0)	2.21(3)	>0.05
<i>tetK</i>	84.00~100.00	85.71(6)	95.45(21)	91.67(55)	100.00(5)	88.89(8)	84.85(28)	90.44(123)	>0.05
<i>tetM</i>	0.00~24.24	0.00(0)	0.00(0)	1.67(1)	0.00(0)	0.00(0)	24.24(8)	6.62(9)	<0.05
<i>linA/linA</i>	0.00~67.00	0.00(0)	0.00(0)	3.33(2)	0.00(0)	66.67(6)	33.33(11)	13.97(19)	<0.05

注: a,某养殖场样本; b,某屠宰车间样本; c,某市场样本。

本研究中 *ermA* 和 *ermC* 检出率均低于 *ermB* 的检出率,其中 *ermC* 检出率为 2.21%, 低于广东省^[18]猪体内 *ermC* 的检出率 36.80%; 耐四环素 *tetK* 基因携带率较高, 为 90.44%, 高于浙江省^[19]猪肉生产链中猪 *tetK* 的检出率 35.80%。可能存在地区性差异, 也可能与标本来源有关, 有待进一步研究。MRSA 对环丙沙星、青霉素、庆大霉素、四环素、氯霉素及克林霉素耐药率都超过 50%, 比非 MRSA 有更严峻的耐药性。MRSA 菌株对 β-内酰胺类抗菌药物有不同程度的耐药, 耐药率为 17%~93%, 可能与染色体携带 *mecA* 基因编码与 β-内酰胺类抗菌药物亲和力极低的替代性青霉素结合蛋白有关, 由于其携带的 *mec* 基因可整合大环内酯类、四环素等多种耐药基因, 导致其对克拉霉素和四环素呈现高度的耐药性^[20]。

根据 CLSI 2012 标准中定义 MRSA 是指携带 *mecA* 基因或具有其他甲氧西林耐药机制金黄色葡萄

球菌, 如青霉素结合蛋白 2a (PBP2a) 与苯唑西林的亲和力发生改变。由于少数临界的 MRSA 表现为与 PBP2a 结合力下降而不表达 PBP2a, 表现为甲氧西林耐药而不携带 *mecA* 基因。

2.5 药敏试验与耐药基因检测结果的对比

对分离的 136 株菌检测 6 种耐药基因, 携带有两种耐药基因的为 25.00%(34/136), 含三种耐药基因及以上为 5.15%(7/136), 其中来自某市场里猪肉中分离的携带三种耐药基因的菌株里均分离到 *tetM* 和 *tetK*, 说明市场里耐药机制的复杂性, 且这 7 株来自不同样本的菌株都分离到 *tetK*。耐四环素、大环内酯类及林克酰胺类抗生素的菌株综合耐药基因分析符合率分别为 53.98%, 16.42%, 11.77%。检测到的含有三种耐药基因的菌株其表型和所携带的耐药基因保持一致, 具体见表 4。

表 4 金黄色葡萄球菌耐药谱及携带的耐药基因

Table 4 Antimicrobial resistance profiles of *S. aureus* isolates and the resistance genes carried

编号	样品	采样地点	耐药表型	耐药基因
S44	槽头肉	屠宰间	CIP-P-TE-CLR-C-SXT-DA	<i>ermA,ermB,tetK</i>
S101	烧烤二连干	成品	P-TE-CLR-DA	<i>ermB,linA'/A,tetK</i>
S103	美味香干	成品	P-TE-CLR-DA-FOX	<i>ermB,linA'/A,tetK</i>
S104	瘦肉	市场	CIP-P-TE-CLR-C-SXT-RD-DA-KF-MH-OX-FOX	<i>ermA,tetK,tetM</i>
S105	瘦肉	市场	P-CN-TE-C-SXT-RD-DA-KF-MH-OX-FOX	<i>linA'/A,tetK,tetM</i>
S122	瘦肉	市场	P-TE-CLR-C-SXT-DA	<i>ermB,tetK,tetM</i>
S126	瘦肉	市场	P-CN-TE-CLR-C-DA	<i>ermB,linA'/A,tetK</i>

注: 1、缩写符号表示 CIP-环丙沙星, CN-庆大霉素, CLR-克拉霉素, C-氯霉素, SXT-复方新诺明, DA-克林霉素, KF-头孢噻吩, MH-米诺环素, TE-四环素, OX-苯唑西林, P-青霉素, FOX-头孢西丁。

结果显示, 有部分敏感菌株检测到耐药基因, 说明存在隐秘的耐受基因; 而由于金黄色葡萄球菌耐药性具有异质性^[21], 在耐药基因作用强大时使表型呈现不稳定性, 易造成假阴性, 将药敏实验结合 PCR 检测耐药基因能够更全面的对耐药水平作出更精确的

评价。引起注意的是, 在养殖场屠宰场及市场中检测到 MRSA, 但检测率都低于国外报道的养殖场 MRSA 检出率^[22]。近几年国外不断有报道发现在 MRSA 中除了 *mecA* 之外还有 *mecC*, 为更全面的防控 MRSA 的奠定了基础^[23]。国内尚未有报道, 实验也尚未检测到

mecC,但并不能代表在国内就没有 *mecC* 主导的 MRSA,仍需进一步扩大采样范围,增大样本量进行分析研究。

3 结论

3.1 通过对某养殖场环境、屠宰车间及市场采集样本分离金黄色葡萄球菌分离率的比较,屠宰场和市场中生猪肉分离金黄色葡萄球菌分离率最高,说明养殖场源头及生鲜肉中金黄色片葡萄球菌的感染比较严重。

3.2 所有菌株对临床用于治疗金黄色葡萄球菌的青霉素,克林霉素以及四环素耐药率高达 50% 以上,对万古霉素敏感。

3.3 不同来源的金葡萄菌对 15 种抗生素显示不同的耐药谱。分离自养殖场菌株其耐药谱主要为 CIP/P/CN/TE/CLR/SXT/DA; 来源于屠宰车间的菌株耐药谱为 P/CLR/DA; 来自于市场及超市的金葡萄菌株耐药谱为 CIP/P/TE/CLR/C/SXT/RD/DA, 说明环境胁迫导致了微生物的获得性抗性。

3.4 运用 K-B 法检测屠宰车间、超市及市场生猪肉样中 MRSA24 株,用 PCR 法检测到 MRSA 菌株 21 株。MRSA 对环丙沙星、青霉素、庆大霉素、四环素、氯霉素及克林霉素耐药率都超过 50%,比甲氧西林敏感金葡萄菌有更严峻的耐药性。

参考文献

- [1] Bisdorff B, Scholhoelter J L, Claussen K, et al. MRSA-ST398 in livestock farmers and neighbouring residents in a rural area in Germany [J]. *Epidemiology and Infection*, 2012, 140(10): 1800-1808
- [2] Price L B, Stegger Marc, Hasman Henrik, et al. *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock [J]. *Mbio*, 2012, 3(1): e00305-11
- [3] Centers for Disease, C. and Prevention, Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*-Pennsylvania [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2002, 51(40): 902
- [4] Bauer A W, Kirby W M, Sherris J C, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method [J]. *Technical bulletin of the Registry of Medical Technologists*, 1966, 36(3): 49-52
- [5] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M31 A2 [S]. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA 2012
- [6] Fluit A C, Wielders C L C, Verhoef J, et al. Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study [J]. *Journal Of Clinical Microbiology*, 2001, 39(10): 3727-3732
- [7] Stegger M, Andersen P S, Kearns A, et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA(LGA251)* [J]. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, 18(4): 395-400
- [8] Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(11): 2562-6
- [9] Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, et al. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(9): 4089-4094
- [10] Lina G, Quaglia A, Reverdy M E, et al. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43(5): 1062-1066
- [11] 寇芮.动物源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性分析及分子流行病学研究[D],南京:南京农业大学,2010
KOU Rui. Study on antibiotic resistance analysis and molecular epidemiology of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* from animals [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010
- [12] 王雪敏,姚建楠,李蓓蓓,等.上海市猪源与人源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分离及分子分型[J].*中国兽医科学*, 2013, 43(03): 252-255
WANG Xue-min, YAO Jian-nan, LI Bei-bei, et al. Isolation and molecular typing of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* from swine and human in Shanghai [J]. *Chinese Veterinary Science*. 2013, 43(03): 252-255
- [13] 刘洋,梁耀峰,焦新安,等.中国部分地区猪源和牛源金黄色葡萄球菌耐药性及凝固酶分型研究[J].*中国农业科学*, 2012,45(17): 3608-3616
LIU Yang, LIANG Yao-feng, JIAO Xin-an, et al. Antibiotic resistance and coagulase typing of *staphylococcus aureus* isolates from pigs and cows in part of China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(17): 3608-3616
- [14] 高攀,王登峰,李建军,等.新疆牛源金黄色葡萄球菌抗菌素敏感性调查[J].*新疆农业科学*,2012,49(11):2134-2139
GAO Pan, Wang Deng-feng, Li Jian-jun, et al. Investigation of the drug resistance of *staphylococci aureus* isolates from bovine mastitis of Xinjiang [J]. *Xinjiang Agricultural Science*, 2012, 49(11): 2134-2139

- [15] Durso L M, D N Miller, B J Wienhold. Distribution and quantification of antibiotic resistant genes and bacteria across agricultural and non-Agricultural metagenomes [J]. *Plos One*, 2012,7(11)
- [16] 许艳子,袁梦,袁月明.金黄色葡萄球菌抗生素耐药相关基因检测[J].*中国热带医学*,2013,13(12): 1464-1467
XU Yan-zi, YUAN Meng, YUAN Yue-ming. Detection of antibiotic-resistant genes of staphylococcus aureus [J]. *China Tropical Medicine*, 2013, 13(12): 1464-1467
- [17] 林兰,徐潇,甘辛,等.我国猪源甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌的分离与分子分型研究[J].*药物分析志*,2012,32(3): 455-460
LIN Lan, XU Xiao, GAN Xin, et al. Isolation and characterization of methicillin-resistant staphylococcus aureus from swine in China [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2012, 32(3): 455-460
- [18] 林大川,刘健华,王晶,等.猪体内金黄色葡萄球菌及凝固酶阴性葡萄球菌耐药性调查及耐药基因布研究[J].*华南农业大学学报*,2012,33(04): 550-555
LIN Da-chuan, LIU Jian-hua, WANG Jin, et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci isolated from swine [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2012, 33(4): 550-555.
- [19] 吴艺影,曲道峰,韩剑众.猪肉生产链细菌耐药性及其耐药基因调查研究[J].*中国畜牧杂志*,2015,51(6):78-83
WU Yi-ying, QU Dao-feng, HAN Jian-zhong. Investigation on antibiotic resistance and resistance genes in bacteria isolated from pork chain [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2015, 51(6): 78-83
- [20] 庞绍新.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的检测及药敏结果分析[J].*中外医学研究*,2012,18(13): 43-44
PANG Shao-xin. Detection of MRSA and analysis of drug resistance [J]. *Chinese and Foreign Medical Research*, 2012, 18(13): 43-44
- [21] 美国临床和实验室标准协会.需氧菌的稀释法抗菌药物敏感性试验 CLSIM07-A9[S].*中华检验医学杂志*,2012,29(增刊): 27-28
National Committee for Clinical Laboratory. Dilution antimicrobial susceptibility testing for oxygenBacteria CLSI M07-A9 [S]. *Chinese Journal of laboratory medicine*, 2012, 29: 27-28
- [22] Frana T S, Beahm A R, Hanson B M, et al. Isolation and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from pork farms and visiting veterinary students [J]. *PLoS One*, 2013. 8(1): e53738
- [23] Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, et al. Guidelines for reporting novel mecA gene homologues [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. 56(10):4997-4999