

新疆焉耆县不同动物源葡萄球菌耐药性及其亲缘关系分析

马木尔·阿克木汗, 姚晓慧, 刘英玉, 王舒丰, 杨紫嫣, 夏利宁*

(新疆农业大学动物医学学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:为了解新疆焉耆县不同动物源葡萄球菌耐药情况和耐药菌株之间的亲缘关系及其潜在的传播机制,对采自焉耆县不同动物粪源中分离的 26 株葡萄球菌通过 PCR 方法进行属的鉴定;并对其进行临床常用 11 种抗菌药物的药敏试验;应用 PCR 方法检测耐药菌株中可能携带的相关耐药基因;对表皮葡萄球菌采用脉冲场凝胶电泳进行分离株的亲缘性分析,对金黄色葡萄球菌进行多位点序列分型。26 株葡萄球菌中有 16 株表皮葡萄球菌,10 株金黄色葡萄球菌;药敏试验结果显示,所有菌株仅对氨基糖苷类抗菌药物庆大霉素和阿米卡星较为敏感,对其他被检药物高度耐药;26 株葡萄球菌均携带 4 种及 4 种以上耐药基因;16 株表皮葡萄球菌通过 PFGE 分型法,得到 7 类基因指纹图谱,PFGE 图谱呈现多样性;10 株金黄色葡萄球菌通过 MLST 分型共获得 7 种 ST 型,其中 ST1、ST22、ST239 均发现 2 株相对优势型。新疆焉耆县不同动物源葡萄球菌耐药率高且携带多种耐药基因,耐药葡萄球菌遗传背景较为复杂,不同养殖场、不同动物源细菌之间存在克隆传播。

关键词:焉耆县;葡萄球菌;耐药性;耐药基因;基因分型

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2020.07.006

中图分类号:S852.611;S859.796

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2020)07-0027-07

葡萄球菌(*Staphylococcus*)是自然界中广泛存在的一类细菌。研究表明,由细菌污染引发的疾病是影响人类公共健康和食品安全的主要问题之一,其中以耐药葡萄球菌污染引发的疾病已成为公共卫生领域研究的重点课题^[1],而携带耐药基因的细菌由于表现出更高的耐药性,成为研究热点之一。

表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, SE)作为葡萄球菌属的成员之一,因其常定居于机体皮肤和粘膜表面^[2],通常情况下致病力很低^[3],故将其作为正常菌群的代表进行研究^[4]。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是葡萄球菌属的重要组成部分,也是造成局部化脓感染、脓毒败血症等感染性疾病的重要致病菌之一^[5],由其引发感染的发病率、病死率都很高^[6]。在环境选择性压力作用下,细菌的耐药性愈发严重,无论是由致病菌引发的感染或是正常菌群将耐药性传播至致病菌,都将引起巨大的损失,因此对其耐药性进行研究和监测的工作已迫在眉睫。

常规的血清学分型法已不能达到通过分型来追溯感染源、监控耐药性等目的。分子生物学分型方法中脉冲场凝胶电泳技术(Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)于 1984 年建立以来,依靠其较好的分辨力和重复性,而被誉为分子生物学分型“金标准”^[7],

多位点序列分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)是一种近年来发展起来的基于核酸序列测定的新型分子生物学分型方法,具有操作简便且结果准确的特点^[8]。目前这两种分子分型方法均广泛应用于疾病感染来源的追溯、耐药性传播的监控等工作。

本研究通过对新疆焉耆县 16 株不同动物源耐药表皮葡萄球菌进行 PFGE 分子分型,10 株不同动物源耐药金黄色葡萄球菌进行 MLST 分子分型来研究不同动物源耐药菌株之间的亲缘关系,以期了解不同动物源耐药菌株间耐药性可能的传播方式,为今后有效阻断耐药传播途径提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 26 株菌均为新疆农业大学动医学院药理实验室 2016 年从新疆焉耆县不同动物源样品中分离保存的葡萄球菌菌株,其中猪源 10 株、羊源 8 株、鸡源 4 株、牛源 4 株。标准质控菌 ATCC 29213,购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.2 培养基及试剂 MH(Mueller-Hinton)培养基,北京奥博星生物技术有限公司产品;BP(Baird-Parker)琼脂基础、亚碲酸盐卵黄增菌液、甘露醇氯化钠琼脂培养基,青岛海博生物技术有限公司产品;氯

收稿日期:2019-08-10

基金项目:国家自然科学基金-新疆联合基金项目(U1503185)

作者简介:马木尔·阿克木汗(1994-),男(哈萨克族),甘肃酒泉人,硕士研究生,主要从事兽医药理与毒理学研究。*通讯作者

化钠,天津市光复科技发展有限公司产品;50×电泳缓冲液、20×电泳缓冲液、TE缓冲液、TBE缓冲液、蛋白酶K缓冲液、蛋白酶K(>600 U/mL)、10×冲洗缓冲液、溶菌酶缓冲液、胶块模板、溶葡萄球菌酶(2 mg/mL)、*Sma* I缓冲液、限制性内切酶 *Sma* I(5 U/ μ L)、低熔点琼脂糖,Bio-Rad 公司产品;琼脂糖胶回收试剂盒、Marker II、2×Tap PCR Master Mix,北京天根生化科技有限公司产品;Gelgreen、Gelred 核酸染料,上海徕创生物科技有限公司产品;琼脂糖凝胶产地西班牙。

1.1.3 主要仪器设备 超净工作台,苏州净化设备有限公司产品;超纯水仪,成都超纯水科技有限公司产品;自动电热压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂产品;核酸蛋白测定仪,德国 Eppendorf;PCR 扩增仪、脉冲场凝胶电流仪,美国 Bio-Rad 公司产品;凝胶成像系统,培清科技公司产品;台式冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司产品。

1.1.4 药物 氨基糖苷类:庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AMK);喹诺酮类:氧氟沙星(LEV);酰胺醇类:氟苯尼考(FLR);四环素类:四环素(TET);林可胺类:克林霉素(CLDM);安莎霉素类:利福平(RA); β -内酰胺类:阿莫西林/克拉维酸(A/C)、苯唑西林(OX)、头孢噻唑(CFT)、青霉素(BP)。上述药品均购自中国兽医药品监察所。

1.2 方法

1.2.1 细菌的鉴定及药敏试验 将-20℃冰箱冻存的26株菌复苏后,按照专利^[9]提供的DeoR基因序列(表1),使用PCR方法进行表皮葡萄球菌鉴定;并检测金黄色葡萄球菌独有的nuc基因^[10],进行金黄色葡萄球菌的鉴定,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 引物序列

Table 1 The primer sequences

| 基因 Gene | 引物序列 Primer sequence(5'-3') | 大小/bp Length |
|------------|--------------------------------|-----------------|
| DeoR | F:GCTAAACGTGCTGCATGTGA | 759 |
| | R: TGCTTTGCATTGCTTTTTGCG | |
| nuc | F:GCGATTGATGGTGATACGGTT | 279 |
| | R:AGCCAAGCCTTGACGAACATAAAGC | |

DeoR 基因 PCR 扩增反应体系(25 μ L): *Taq* 0.1 μ L, 10×聚合酶缓冲液 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, Mg²⁺ 1.6 μ L, 模板 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 加灭菌超纯水补足 25 μ L; nuc 基因 PCR 扩增反应体系(25 μ L): 2×*Taq* PCR Master Mix 12.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。利用 10 g/L 琼脂糖凝胶进

行电泳检测后将目的片段进行胶回收并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

药敏试验根据欧洲抗菌药物敏感性试验委员会(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)^[11]推荐的微量肉汤稀释法进行,对分离的葡萄球菌进行上述11种抗菌药物最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MICs)值测定,结果判定参照EUCAST(2016)标准。

1.2.2 DNA 模板制备与耐药基因的检测 将葡萄球菌划线接种在MH固体培养基上,37℃培养24 h~48 h,用接种环挑取1个~3个单菌落加入50 μ L Tris-EDTA 缓冲液中,100℃煮沸10 min,12 000 r/min 离心10 min,取上清,置-20℃保存备用。

根据细菌耐药情况,参考相关文献报道^[12-15]合成介导四环素类药物耐药的tetM、tetK基因,介导 β -内酰胺类药物耐药的mecA基因,介导酰胺醇类药物耐药的fexA基因、介导氯霉素类、林可胺类、恶唑烷酮类、截短侧耳素类、链阳菌素A类5种药物耐药的cfr基因、介导红霉素和克林霉素耐药的ermB基因等6种相关耐药基因的引物序列(表2)。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。扩增产物经10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后经凝胶成像系统拍照分析,将目的片段进行胶回收并送生工生物工程(上海)有限公司测序,最后进行序列比对,确定基因型。

PCR 扩增反应体系(20 μ L): 2×*Taq* PCR Master Mix 酶 10 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, 灭菌超纯水 8.5 μ L。PCR 操作按说明书进行。

1.2.3 PFGE 分子分型方法 将表皮葡萄球菌灌注制胶,用溶葡萄球菌素、溶菌酶裂解细胞壁(37℃8 h),用蛋白酶K消化(54℃24 h),*Sma* I 酶切(37℃2 h)后制备电泳,EB染色,使用Bio-Rad Gel Doc TMXR+拍摄图像,用Bionumerics软件进行结果处理。

1.2.4 MLST 分子分型方法 MLST 的7个管家基因位点参照金黄色葡萄球菌MLST网站(<https://pubmlst.org/saureus/>)提供的管家基因信息(arcC、aroE、glpF、gmk、pta、tpi、yqiL)合成的7对扩增引物与测序引物(表3)。

利用50 μ L反应体系进行PCR扩增,PCR产物利用10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测,若扩增条带与所需目的条带一致,则将产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。使用DNA Star软件中SeqMan对分离株管家基因的测序结果进行拼

接和校正,将测序所得基因序列提交至金黄色葡萄球菌 MLST 数据库 (<https://pubmlst.org/saureus/>) 中进行等位基因比对,获得其相对应的等位

基因型。使用 eBURST V3 软件对不同分离株的 ST 型进行同源性分析。利用 MEGA6 软件进行聚类分析。

表 2 耐药基因引物序列

Table 2 The primer sequences of drug-resistant genes

| 基因 Gene | 引物序列 Primer sequence(5'-3') | 大小/bp Length | 参考文献 Reference |
|---------|----------------------------------|--------------|----------------|
| cfr | F:TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA | 746 | [12] |
| | R:ACCATATAATTGACCACAAGCAGC | | |
| fexA | F:GTACTTGTAGGTGCAATTACGGCTGA | 1 272 | |
| | R:CGCATCTGAGTAGGACATAGCGTC | | |
| mecA | F:AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC | 533 | [13] |
| | R:AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC | | |
| tetK | F:GTAGCGACAATAGGTAATAGT | 360 | [14] |
| | R:GTAGTGACAATAAACCTCCTA | | |
| tetM | F:AGTGGAGCGATTACAGAA | 158 | |
| | R:CATATGTCCTGGCGTGTCTA | | |
| ermB | F:CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC | 359 | [15] |
| | R:GAATCGAGACTTGAGTGTGC | | |
| | R:TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG | | |

表 3 金黄色葡萄球菌 MLST 管家基因及引物

Table 3 *Staphylococcus aureus* MLST steward genes and primers

| 基因 Gene | 引物序列 Primer sequence(5'-3') | 大小/bp Length |
|---------|-----------------------------|--------------|
| arcC | F:TTGATTCACCAGCGGTATTGTC | 456 |
| | R:AGGTATCTGCTTCAATCAGCG | |
| aroE | F:ATCGGAAATCCTATTTACATTC | 456 |
| | R:GGTGTGTGATTAATAACGATATC | |
| glpF | F:CTAGGAAGTCAATCTTAATCC | 465 |
| | R:TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC | |
| gmk | F:ATCGTTTTATCGGGACCATC | 417 |
| | R:TCATTAACACTACAACGTAATCGTA | |
| pta | F:GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG | 474 |
| | R:GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA | |
| tpi | F:TCGTTTATTCTGAACGTCGTGAA | 402 |
| | R:TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC | |
| yqiL | F:CAGCATACAGGACACCTATTGGC | 516 |
| | R:CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC | |

2 结果

2.1 细菌鉴定及耐药性结果

经鉴定,26 株葡萄球菌中 16 株为表皮葡萄球菌,10 株为金黄色葡萄球菌。药敏试验结果表明,以上菌株均为高度耐药菌株,16 株表皮葡萄球菌仅在庆大霉素和阿米卡星 2 种药物中表现较低的耐药性,10 株金黄色葡萄球菌仅对庆大霉素、阿米卡星和氧氟沙星 3 种药物表现出较低的耐药性,对其他药物均呈高度耐药(表 4)。

2.2 耐药基因检出情况

16 株表皮葡萄球菌中 mecA 基因的检出率较低,仅在 3 株菌中检出,检出率为 18.8%,其余基因检出率均在 50% 以上;10 株金黄色葡萄球菌中 mecA 基因、cfr 基因和 tetK 基因检出率较低,检出率依次为 40.0%、20.0% 和 20.0%,其余基因检出率均在 50% 以上(表 4)。

2.3 表皮葡萄球菌 PFGE 分子分型结果

因细菌在繁殖过程中其所携带的遗传物质极易发生变异^[16-17],故而在判定菌株同源性时有部分差异的存在是被允许的^[18]。Tenover F C 等^[19]提出在使用 PFGE 判断菌株同源性时,若重合度大于 99% 则判定为同一种基因指纹图谱,若重合度大于 85% 则判定为同一型别基因指纹图谱,若重合度低于 50% 则判定为流行病学不相关。

如图 1 所示,本文根据上述原则得到 7 类基因指纹图谱,分别以 A~G 簇进行命名,A 簇包含菌株 P1、P2、P3、P4、P7、P15,其中 5 株猪源表皮葡萄球菌,1 株牛源表皮葡萄球菌;B 簇包含菌株 P5、P10,其中 1 株猪源表皮葡萄球菌,1 株羊源表皮葡萄球菌;C 簇包含菌株 P14(鸡源表皮葡萄球菌);D 簇包含菌株 P6、P8、P9、P12,其中 2 株猪源表皮葡萄球菌,2 株羊源表皮葡萄球菌;E~G 簇分别包含菌株 P11(羊源表皮葡萄球菌)、P13(鸡源表皮葡萄球菌)、P16(牛源表皮葡萄球菌)。其中 A 簇和 D 簇为优势谱型,包含一半以上的菌株。但 A 簇菌株均采自动物肛拭子,且多来源于猪,仅 1 株牛源菌,D 簇

菌株则分别来自同一种动物源的肛拭子和鼻拭子 因指纹图谱, A簇包含猪源菌株和牛源菌株, B、D
 样。此外, 从不同动物源分离株发现存在相同的基 簇包含猪源菌株和羊源菌株。

表4 葡萄球菌来源、耐药结果及耐药基因携带情况

Table 4 *Staphylococcus* source and drug resistance rate and drug resistance gene carrying rate

| 类别 Sort | 编号 No | 来源 Source | 耐药谱型 Drug resistance rate | 耐药基因 Drug resistance gene |
|------------|----------|--------------|---------------------------------------|------------------------------|
| SE | P1 | 猪 Swine | TET-GEN-CLDM-OX-FLR-LEV-CFT-RA-A/C-BP | cfr-fexA-tetM-ermB |
| | P2 | 猪 Swine | TET-CLDM-OX-FLR-LEV-CFT-RA-A/C-BP | fexA-tetK-tetM-ermB |
| | P3 | 猪 Swine | TET-CLDM-OX-FLR-LEV-CFT-RA-A/C-BP | fexA-tetK-tetM-ermB |
| | P4 | 猪 Swine | TET-CLDM-OX-FLR-LEV-CFT-RA-A/C-BP | fexA-tetK-tetM-ermB |
| | P5 | 猪 Swine | CLDM-OX-LEV-CFT-BP | mecA-tetM-ermB |
| | P6 | 猪 Swine | TET-CLDM-OX-CFT-BP | cfr-fexA-tetM-ermB |
| | P7 | 猪 Swine | TET-GEN-CLDM-OX-FLR-LEV-RA-BP | fexA-tetK-tetM-ermB |
| | P8 | 猪 Swine | TET-GEN-CLDM-OX-FLR-LEV-RA-A/C-BP | cfr-fexA-tetK-tetM-ermB |
| | P9 | 绵羊 Sheep | GEN-CLDM-OX-FLR-LEV-CFT-AMK-A/C-BP | cfr-fexA-tetM-ermB |
| | P10 | 绵羊 Sheep | TET-OX-LEV-CFT-A/C-BP | fexA-mecA-tetK-tetM-ermB |
| | P11 | 绵羊 Sheep | TET-CLDM-OX-LEV-AMK-BP | fexA-tetK-tetM-ermB |
| | P12 | 绵羊 Sheep | TET-GEN-OX-FLR-CFT-BP | cfr-fexA-tetK-tetM-ermB |
| | P13 | 鸡 Chicken | TET-GEN-CLDM-OX-FLR-LEV-CFT-AMK-BP | cfr-fexA-tetM-ermB |
| | P14 | 鸡 Chicken | TET-CLDM-OX-FLR-LEV-CFT-RA-A/C-BP | cfr-fexA-mecA-tetM-ermB |
| | P15 | 牛 Cattle | TET-CLDM-OX-FLR-LEV-CFT-RA-A/C-BP | cfr-fexA-tetM-ermB |
| | P16 | 牛 Cattle | TET-CLDM-OX-FLR-LEV-CFT-RA-A/C-BP | fexA-tetM-ermB |
| SA | M1 | 猪 Swine | TET-CLDM-OX-LEV-RA-BP | fexA-mecA-tetM-ermB |
| | M2 | 猪 Swine | TET-GEN-CLDM-OX-FLR-LEV-RA-A/C-BP | fexA-mecA-tetM-ermB |
| | M3 | 牛 Cattle | TET-CLDM-OX-LEV-CFT-RA-A/C-BP | fexA-tetM-ermB |
| | M4 | 牛 Cattle | TET-CLDM-OX-FLR-CFT-BP | fexA-tetM-ermB |
| | M5 | 绵羊 Sheep | TET-CLDM-OX-FLR-RA-A/C | fexA-tetK-tetM-ermB |
| | M6 | 绵羊 Sheep | CLDM-OX-FLR-RA-A/C-BP | fexA-mecA-tetM-ermB |
| | M7 | 绵羊 Sheep | GEN-CLDM-OX-FLR-BP | fexA-tetM-ermB |
| | M8 | 绵羊 Sheep | TET-CLDM-OX-CFT-BP | fexA-mecA-tetK-tetM-ermB |
| | M9 | 鸡 Chicken | TET-GEN-OX-FLR-LEV-CFT-RA-A/C-BP | cfr-fexA-tetM-ermB |
| | M10 | 鸡 Chicken | TET-CLDM-OX-FLR-CFT-RA-A/C-BP | cfr-fexA-tetM-ermB |

注: GEN. 庆大霉素; AMK. 阿米卡星; LEV. 氧氟沙星; FLR. 氟苯尼考; TET. 四环素; CLDM. 克林霉素; RA. 利福平; A/C. 阿莫西林/克拉维酸; OX. 苯唑西林; CFT. 头孢噻呋; BP. 青霉素。

Notes: GEN. Gentamicin; AMK. Amikacin; LEV. Ofloxacin; FLR. Florfenicol; TET. Tetracycline; CLDM. Clindamycin; RA. Rifampicin; A/C. Amoxicillin/Clavulanic acid; OX. Oxacillin; CFT. Ceftiofur; BP. Penicillin.

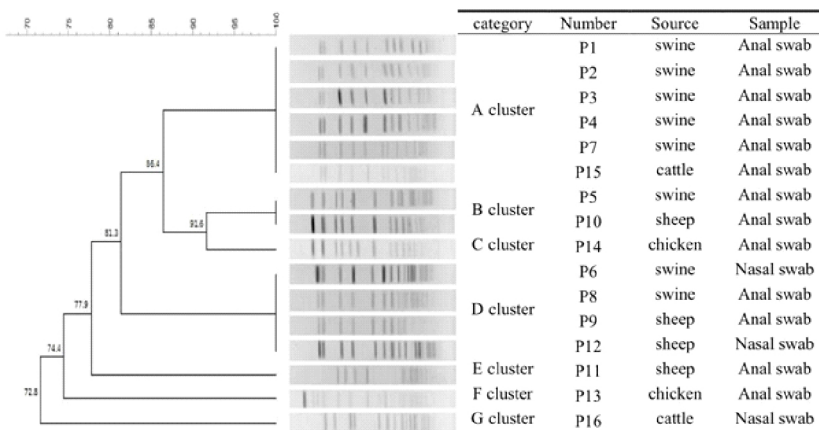


图1 表皮葡萄球菌 PFGE 聚类分析图

Fig. 1 PFGE cluster analysis of *S. epidermidis* isolates

2.4 金黄色葡萄球菌 MLST 分子分型结果

将测序得到的金黄色葡萄球菌的 7 个管家基因序列分别上传至金黄色葡萄球菌 MLST 数据库 (<https://pubmlst.org/saureus/>), 进行对比后得到相应的序列型和等位基因型(表 5)。由表 5 可知, 10 株金黄色葡萄球菌通过 MLST 分型共获得 7 种 ST 型, 其中 ST1、ST22、ST239 为相对优势型, 均发现 2 株, 其余 ST 型均只含有 1 株菌。

2.4.1 金黄色葡萄球菌同源性分析 从图 2 可知, 不同动物源分离金黄色葡萄球菌中 ST188 型以 ST1 为核心型并互为 DLVs, 有较近的同源关系。其他 5 个 ST 型 (ST9、ST22、ST239、ST2373、ST2700) 均独立于各自的谱系组中, 相互关系并不密切。但是在该图中无法直观看出本试验各金黄色

葡萄球菌菌株之间的联系。

表 5 金黄色葡萄球菌 MLST 分型结果

Table 5 Multilocus sequence types of *Staphylococcus aureus*

| 编号 No | arcC | aroE | glpF | gmk | pta | tpi | yqiL | STs |
|-------|------|------|------|-----|-----|-----|------|-------|
| M1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| M2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 4 | 4 | 3 | 239 |
| M3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 | 9 |
| M4 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 19 | 3 | 237 3 |
| M5 | 4 | 1 | 1 | 14 | 1 | 1 | 1 | 270 0 |
| M6 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| M7 | 3 | 1 | 1 | 8 | 1 | 1 | 1 | 188 |
| M8 | 2 | 3 | 1 | 1 | 4 | 4 | 3 | 239 |
| M9 | 7 | 6 | 1 | 5 | 8 | 8 | 6 | 22 |
| M10 | 7 | 6 | 1 | 5 | 8 | 8 | 6 | 22 |

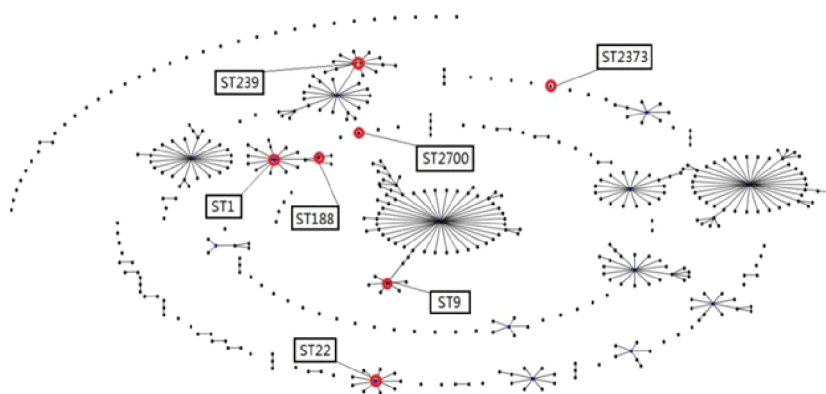


图 2 MLST 数据库中金黄色葡萄球菌分离株相关 ST 型的种群图

Fig. 2 Population snapshots of *Staphylococcus aureus* strains of related STs in MLST database

2.4.2 金黄色葡萄球菌聚类分析结果 从菌株亲缘关系的最小生成树整体来看(图 3), 鸡源金黄色葡萄球菌与其他动物源金黄色葡萄球菌之间同源性关系不大, 而羊源菌和猪源菌之间联系十分密切, 甚至有 2 个 ST 型同时包含这两种动物源菌株, 证明其同出一源。牛源菌虽未出现这种情况, 但是可以明显看出其与羊源菌、猪源菌之间有较近的遗传进化关系。

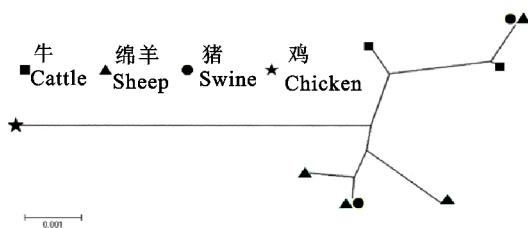


图 3 金黄色葡萄球菌聚类分析

Fig. 3 Clustering of *Staphylococcus aureus*

3 讨论

3.1 耐药性及耐药基因携带情况分析

经 PCR 鉴定后的金黄色葡萄球菌和表皮葡萄

球菌对临床常用的 11 种抗菌药物中的 88 种~9 种呈高度耐药, 均对庆大霉素、阿米卡星表现较低的耐药性。该地区分离的葡萄球菌对苯唑西林、青霉素等药物表现为完全耐药, 与董志民等^[20]和朱娇玲等^[21]的研究结果一致。针对以上耐药菌株, 只有被检药物中的庆大霉素和阿米卡星尚有临床治疗价值。

根据耐药基因检出情况分析, cfr、mecA、tetK 3 种基因的检出率较低, 而对被检的其他基因检出率高达 92.3% 以上。结合耐药性试验结果, 推测酰胺醇类、林可胺类、四环素类药物的高度耐药可能并非由 cfr、mecA、tetK 耐药基因引起, 也许存在其他未检测或未知的耐药基因, 或者是存在其他的耐药机制。

3.2 表皮葡萄球菌 PFGE 分子分型结果分析

新疆焉耆县不同动物源 16 株表皮葡萄球菌 PFGE 分型结果发现存在 7 种 PFGE 图谱, 其中一半以上被检菌株属于 A 簇和 D 簇, 为优势谱型。董志民等^[20]对同一地区不同养殖场 32 株牛源耐药表

皮葡萄球菌中发现9种不同谱型。表明耐药菌株来源并非单一,结果高度分化,提示细菌极易产生耐药性且造成耐药性产生的原因也复杂多样。猪源菌P1、P2、P3、P4、P7和牛源菌P15的相似度接近100%,猪源菌P5和羊源菌P10的相似度接近100%,猪源菌P6、P8和羊源菌P9、P12的相似度接近100%,提示在相同地区不同农场的不同动物源菌存在克隆传播。曾淑仪^[22]在2016年发现在相同地区不同动物源之间发现PFGE图谱完全相同的菌株,说明随着人员的流动等因素,不同养殖场耐药菌可能来自于同一个污染源。观察发现D簇中P6(猪鼻拭子源)、P8(猪肛拭子源)、P9(羊肛拭子源)、P12(羊鼻拭子源)四株菌定殖环境截然不同,却拥有相同的PFGE谱型,提示耐药菌不仅分布广泛,对生存环境也具有较高的适应性。结合实地调研,分析造成以上结果的原因可能是当地牛、羊、猪养殖场用药不规范,导致产生大量耐药菌。此外,在人员制度管理上可能存在较大的问题,部分人也起到传播媒介的作用,在不同养殖场中进行传播;而鸡场由于管理水平较高,在耐药性相对较低的同时,PFGE图谱相对独立,耐药菌克隆传播性较低。

3.3 金黄色葡萄球菌 MLST 分子分型结果分析

本研究对新疆焉耆县不同动物源10株金黄色葡萄球菌进行MLST分型分析,结果显示10株金黄色葡萄球菌共存在7个ST型,其中ST1、22、239均发现2株为相对优势型,其余ST型均只含有一株菌,菌株母源和进化情况较为复杂。

通过ST型种群图无法直观看出各金黄色葡萄球菌菌株之间的联系,但是可以确定菌株M1、M6(ST1型)和M7(ST188型)互为DLVs,且其他ST型均独立于各自的谱系组中,相互关系并不密切。通过进化树分析发现部分菌株(M1~M8)有较近的亲缘性关系,而菌株M9、M10自成一体,与其他菌株亲缘性较远。通过聚类分析我们发现鸡源菌与其他动物源菌之间同源性关系不大,而羊源菌、猪源菌和牛源菌之间联系十分密切,相互之间有较近的遗传进化关系,这与PFGE试验得出的结论十分一致,说明用药管理制度和人员管理制度十分重要。

本文中出现的ST188、ST9、ST1、ST2373、ST2700这5种ST型在孟丹等^[23]于2014年—2016年在新疆奶牛源金黄色葡萄球菌的研究中也被报道,孟丹等^[24]在2018年关于新疆金黄色葡萄球菌的研究中也发现ST188、ST9、ST2373、ST2700等四种ST型,说明以上ST型可能为新疆耐药金黄色葡萄球菌中的主要流行型。王登峰等^[25]在对浙江、

山东、新疆、内蒙古、上海等地的耐药金黄色葡萄球菌进行研究时也发现ST9型,说明该型金黄色葡萄球菌扩散情况较为严重。而本试验中发现的ST239、ST22型目前尚未见其在新疆动物源中的报道,但是在人源金黄色葡萄球菌中有报道。袁文常等^[26]在研究2011年6月—2016年3月期间新疆军区总医院内科病区临床分离株时,确定ST239、ST22在人源金黄色葡萄球菌中呈优势型,刘建华等^[27]在研究2012年6月—2016年4月新疆军区总医院重症监护病房分离的金黄色葡萄球菌时也得出相同结论,上述现象提示在同一地区分离的不同来源菌株可能存在克隆传播的情况,耐药菌会在人与动物之间相互传播,这种现象加大了临床治疗的难度,甚至不同地区菌群之间可以通过耐药质粒的转导、转化和接合等方式传递耐药性导致临床上选择合适的抗菌药物用以预防和治疗细菌感染的难度成倍增加^[28]。

新疆焉耆县不同动物源耐药表皮葡萄球菌遗传背景较为复杂,表明耐药菌株来源并非单一,结果高度分化,提示细菌获得耐药性的风险较大。且不同养殖场、不同动物源细菌之间可能存在克隆传播,进一步使同一PFGE谱型菌株在不同地点、宿主之间进行传播的风险加大。新疆焉耆县不同动物源耐药金黄色葡萄球菌的ST型分布复杂,羊源菌、猪源菌和牛源菌之间联系密切,提示耐药金黄色葡萄球菌不仅在同一养殖场内存在克隆传播,在相同地区不同动物源养殖场之间也可能存在克隆传播的机制。结合实地调研情况,养殖场应加强用药制度和人员管理制度,从而有效遏制耐药菌的扩散。

参考文献:

- [1] 徐振波,刘晓晨,李琳,等.金黄色葡萄球菌肠毒素在食源性微生物中的研究进展[J].现代食品科技,2013,29(9):2317-2324.
- [2] 张青,雷呈祥,赵旭.表皮葡萄球菌生物膜形成分子机制的研究进展[J].微生物学报,2003,43(5):681-685.
- [3] 邢铭友.表皮葡萄球菌细胞间多糖粘附素合成的分子机制及耐药性研究[D].湖北武汉:华中科技大学,2006.
- [4] 李柳琴,饶富顺.表皮葡萄球菌112株耐药性分析[J].检验医学与临床,2013,10(6):739-740.
- [5] 黄东红,范春梅,朱炎,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的MLST分型及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2016,26(23):5312-5314.
- [6] 徐修礼,周珊,白露,等.ICU患者分离金黄色葡萄球菌的耐药性及分子流行病学特征[J].中国感染控制杂志,2016,15(5):294-298.
- [7] 田素飞,褚云卓,年华,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的SPA基因分型研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2010,30(10):900-901.

- [8] 吕国平,卫沛楠,徐保红,等.多位点序列分型在食源性金黄色葡萄球菌分型中的应用研究[J].微生物学杂志,2013,33(3):30-34.
- [9] 毛小琴,刘有福,贾雄飞,等.一种快速检测表皮葡萄球菌的方法[P].中国专利:CN104726565A,2015-06-24.
- [10] 杨洋,张伟,袁耀武,等.PCR检测乳品中金黄色葡萄球菌[J].中国农业科学,2006,39(5):990-996.
- [11] 刘玉庆.EUCAST 欧盟药敏试验标准[M].北京:中国质检出版社,2016.
- [12] 蔡建星.新疆猪源葡萄球菌 *cfr* 和 *fexA* 基因及其遗传元件的检测分析[D].新疆乌鲁木齐:新疆农业大学,2017.
- [13] 杨守深,王晶,范克伟,等.福建地区猪源葡萄球菌耐药性分析及耐药基因检测[J].中国人兽共患病学报,2016,32(11):976-982.
- [14] 张志军,曹海燕,刘延媛,等.医院感染金黄色葡萄球菌耐药表型与耐药基因研究[J].中华医院感染学杂志,2015,25(9):1924-1926.
- [15] LINA G,QUAGLIA A,REVERDY ME,et al. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among *Staphylococci*[J]. Antimicrob Agent Chemoth,1999,43(5):1062-1066.
- [16] CHEN X,ZHANG W,PAN W,et al. Prevalence of *qnr*,*aac*(6)-Ib-cr,*qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from Humans, Animals, and the Environment[J]. Antimicrob Agent Chemotherapy,2012,56(6):3423-3427.
- [17] 张爱民.细菌遗传物质的传递机理概述[J].生物学教学,2012,37(1):6-7.
- [18] 王超.肠炎沙门氏菌耐药特征及 PFGE 分子分型研究[D].江苏扬州:扬州大学,2018.
- [19] TENOVER FC,ARBEIT RD,GOERING RV,et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol,1995,33(9):2233-2239.
- [20] 董志民,张万江,刘琪,等.东北地区奶牛乳房炎表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌的分子流行病学及耐药性研究[J].中国预防兽医学报,2016,38(4):307-311.
- [21] 朱娇玲,乔霞,李雪,等.奶牛乳腺炎表皮葡萄球菌耐药性及生物被膜形成相关基因的研究[J].内蒙古农业大学学报(自然科学版),2015,36(2):1-8.
- [22] 曾淑仪.广东地区葡萄球菌中耐药基因 *cfr* 的流行性研究[D].广东广州:华南农业大学,2016.
- [23] 孟丹,孟庆玲,乔军,等.奶牛源金黄色葡萄球菌新疆流行株的耐药特性、毒力基因及分子分型[J].畜牧兽医学报,2018,49(1):181-194.
- [24] 孟丹,孟庆玲,乔军,等.奶牛临床型乳房炎 MRSA 新疆流行株耐药基因的检测及 MLST 分型研究[J].家畜生态学报,2018,39(2):66-70.
- [25] 王登峰,段新华,吴建勇,等.牛源金黄色葡萄球菌耐药性及甲氧西林敏感和耐甲氧西林菌株演化相关性研究[J].畜牧兽医学报,2011,42(10):1416-1425.
- [26] 袁文常,常萍,李晓玲,等.内科病区金黄色葡萄球菌耐药性及分子流行特征分析[J].中华医院感染学杂志,2017,27(13):2900-2903.
- [27] 刘建华,李晓玲,刘正祥,等.某医院 ICU 病房金黄色葡萄球菌分子特征及耐药致病性分析[J].新疆医学,2016,46(8):949-953.
- [28] 吴奎海.临床分离非发酵 G-杆菌 I 类整合子及 ISCR1 的结构研究[D].广东广州:南方医科大学,2011.

Analysis of Drug Resistance and Genetic Relationship of *Staphylococcus* from Different Animal Sources in Yanqi County of Xinjiang

MAMUER · Akemkhan, YAO Xiao-hui, LIU Ying-yu, WANG Shu-feng, YANG Zi-yan, XIA Li-ning
(College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang, 830052, China)

Abstract: In order to understand the drug resistance of *Staphylococcus* from different animal sources and the genetic relationship among drug-resistant isolate and its potential transmission mechanism in Yanqi county, Xinjiang. 26 isolate of *Staphylococcus* isolated from different animal manure in Yanqi county were identified by PCR, then tested 11 kinds of antibacterial drugs by drug sensitivity test and detected the relevant resistant genes that might be carried in the resistant strains. The affinity of analyzed by pulsed field gel electrophoresis and multisite sequence typing of *Staphylococcus*. Results showed 16 isolate of *Staphylococcus epidermidis* and 10 isolate of *Staphylococcus aureus* in 26 isolate of *Staphylococcus*. The drug sensitivity test showed all isolate were only sensitive to aminoglycoside antibiotics gentamicin and amikacin, and were highly resistant to other tested drugs. All 26 isolate of *Staphylococcus* carry 4 or more drug resistance genes. The fingerprints of 7 kinds of genes were obtained by PFGE molecular typing of 16 isolate of *Staphylococcus epidermidis*, and the PFGE maps showed diversity. 7 kinds of STs were obtained by MLST typing of 10 isolate of *Staphylococcus aureus*, ST1, ST22, ST239 had two relatively dominant isolate. The results showed the drug resistance rate of *Staphylococcus* from different animal sources was high and carried a variety of drug resistance genes in Yanqi county, Xinjiang. The genetic background of drug resistant *Staphylococcus* was more complex, and clonal transmission exists between bacteria in different farms and different animal sources.

Key words: Yanqi county; *Staphylococcus*; drug resistance; drug resistance gene; gene typing