

湖南省部分地区奶牛源金黄色葡萄球菌分离 鉴定与耐药性分析

丛彬, 杨俊, 王慧, 刘伯承, 周望平, 傅胜才*

(湖南农业大学动物医学院, 湖南长沙 410128)

摘要: [目的] 为了解湖南省部分地区奶牛场金黄色葡萄球菌耐药情况, 制定合理的用药方案, 对来自湖南省不同地区的牛奶样品进行细菌分离与鉴定。 [方法] 得到 19 株金黄色葡萄球菌, 分别进行药敏试验和耐药基因检测。 [结果] 试验结果显示, 19 株金黄色葡萄球菌均呈现多重耐药, 其中对青霉素的耐药率较高, 对万古霉素和利福平的耐药率极低, 耐药基因的结果与耐药表现基本相同。 [结论] 试验结果可以为作为治疗湖南省奶牛场金黄色葡萄球菌感染提供依据。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 耐药基因; 耐药表型; 耐药率

中图分类号: S852.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9111(2020)01-0004-06

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 也称“金葡菌”, 是革兰氏阳性球菌, 常寄居与人和动物的皮肤、鼻咽喉、肠胃道、痈、以及化脓疮口中, 也存在于空气、污水等环境中, 是一种常见的食源性致病微生物^[1]。金黄色葡萄球菌是奶牛乳房炎的主要传染性致病菌之一, 金黄色葡萄球菌感染导致的奶牛乳房炎治愈率低、复发率高, 常引起奶牛产奶量下降、奶质量下降、废弃奶和病死牛的数量增加, 给奶牛生产业带来重大的经济损失^[2]。目前, 临床上奶牛乳房炎的主要预防和治疗措施为抗生素乳房灌注^[3]。但是, 该菌株可以通过自身表型改变以及调节代谢通路对抗生素产生适应性耐药, 同时还可以通过水平等方式转移获得耐药基因从而对各种抗生素产生耐药性^[4], 使抗生素的临床治疗效果大打折扣。2000 年以来, 随着在兽医临床上各种抗生素的广泛使用和不规范应用, 使包括金黄色葡萄球菌在内的各种细菌耐药菌株的种类及数量越来越多, 呈现出耐药范围广、多重耐药、耐药率高的特点, 给临床治疗奶牛乳房炎带来极大阻碍^[5], 因此, 对于金黄色葡萄球菌耐药性研究引起人们广泛关注。本实验通过调查湖南省部分地区奶牛场金黄色葡萄球菌耐药性情况, 检测耐药基因种类, 可为金黄色葡萄球菌的感染提供治疗依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

19 株奶牛金黄色葡萄球菌 (分别编号 1 ~ 19) 均从湖南省多个规模化奶牛养殖场分离得到, 将得到的所有菌株一起进行鉴定培养和耐药基因检测。

1.2 主要药品和试剂盒

15 种药敏试纸及规格: 青霉素 (RA), 10 μg/片; 苯唑西林 (OX), 10 μg/片; 氧氟沙星 (OFX), 30 μg/片; 头孢唑林 (KZ), 15 μg/片; 万古霉素 (VA), 30 μg/片; 克林霉素 (DA), 30 μg/片; 恩诺沙星 (ENR), 100 μg/片; 氨苄西林 (AMP), 10 μg/片; 环丙沙星 (CIP), 5 μg/片; 四环素 (TCY), 30 μg/片; 庆大霉素 (CN), 10 μg/片; 红霉素 (ERY), 15 μg/片; 氯霉素 (C), 10 μg/片; 甲氧苄啶 (W), 30 μg/片; 利福平 (RD), 30 μg/片。所有药敏试纸均购自杭州微生物试剂有限公司 (表 1)。

1.3 主要仪器

津腾针式过滤除菌器购自北京开源国创科技有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器购自上海申安医疗器械厂; 电热恒温鼓风干燥箱购自上海森信实验仪器有限公司; MJP 型恒温培养箱购自北京中兴伟业仪器有限公司; SW - CJ - ID 型单人净化工作台购自苏州净化设备有限公司; 恒温培养振荡器购自上海

收稿日期: 2019-08-13 修回日期: 2019-08-28

作者简介: 丛彬 (1994—), 女, 黑龙江加格达奇人, 硕士研究生, 主要从事重大动物疫病防控研究。E-mail: 736857558@qq.com

* 通讯作者: 傅胜才 (1963—), 男, 湖南娄底人, 研究员, 主要从事重大动物疫病防控研究。E-mail: shcamail@sina.com

智城分析仪器制造有限公司;DYY-6C 型电泳仪购自北京市六一仪器厂;Tanon3500R 型凝胶成像仪购自上海天能科技有限公司。

表 1 主要药品及来源

药品/试剂盒名称	来源
普通琼脂培养基	购自杭州微生物试剂有限公司
伊红美蓝培养基	购自杭州微生物试剂有限公司
营养肉汤培养基	购自杭州微生物试剂有限公司
鲜血琼脂平板	购自江门市凯林贸易有限公司
金黄色葡萄球菌质控菌株 ATCC25923	购于山东拓朴生物工程有限公司
TAE 缓冲液	

1.4 培养基制备

BP 培养基的配制:加入蛋白胨 5 g,磷酸二氢钾 0.75 g,磷酸二氢钠 4.5 g,氯化钠 2.5 g,蒸馏水 500 mL,121 ℃ 高压灭菌 15 min,用无菌烧瓶分装。

1.5 奶牛源金黄色葡萄球菌的分离

从湖南省多个规模化奶牛养殖场采集 78 份样品:用手按摩奶牛乳房,使其有牛奶流出,弃去前 3 把奶,将采样管插入奶牛乳房,取牛奶乳样 10 mL,密封写好编号,低温保存,尽快送至实验室。

用无菌棉拭子在血平板琼脂培养基上划线,37 ℃ 下培养 18 h,取生长状态良好的菌落接种至 BP 培养基上,37 ℃ 下培养 24 h,挑取在培养基上显示特殊光圈的单个菌落进行革兰氏染色,而后镜检。挑取菌落在血平板培养基上进行纯培养。

1.6 革兰氏染色

在高温灭菌后的干燥载玻片上滴加 1 滴生理盐水,用灭菌接种环挑取少量单个菌落,与生理盐水混合后均匀涂抹于载玻片上,载玻片反面用酒精灯灼烧以固定,不可时间过长,在固定的细菌上滴加草酸铵结晶紫染色液,染色 1 min 后水洗;在菌膜上滴加碘液,作用 1 min 后水洗;滴加 95% 酒精脱色 15 ~ 30 s,水洗;滴加复红复染 1 min,水洗;自然干燥或用纸吸干后在显微镜下用油镜观察。

1.7 酶触实验

在无菌干燥的载玻片上滴加 1 滴 3% 的过氧化氢,用无菌棉签挑取纯化细菌滴入过氧化氢溶液中观察其变化。30 s 内产生大量气泡,则判定为阳性,不产生气泡则判定为阴性。

1.8 血浆凝固酶实验

向 3 个无菌 EP 管中加入 1: 4 的新鲜兔血浆 0.5 mL,管 1 加入培养 24 h 的疑似菌株肉汤培养基 0.5 mL,管 2 加入培养 24 h 的金黄色葡萄球菌指控菌株肉汤培养基 0.5 mL,管 3 加入灭菌肉汤培养基

0.5 mL 作为对照。将 3 只 EP 管摇匀,放入 37 ℃ 恒温培养箱中培养,每隔 30 min 观察 1 次,观察 6 h,检查是否有凝固出现,将试管倾斜或倒置,呈现凝固状,则判定为阳性;无凝固现象产生,则判定为阴性。

1.9 16S rRNA 鉴定

16S rRNA 引物为通用引物 27F 和 1492R,引物序列(5'-3')分别为:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 和 GGTACCTTGTACGACTT。

反应体系与条件:按照 Mix 说明书,32 μL 反应体系:

Mix	10 μL	94 ℃ 预变性	5 min	} 30 个循环
上游引物	1 μL	94 ℃ 变性	1 min	
下游引物	1 μL	59 ℃ 退火	1 min	
DNA 模板	2 μL	72 ℃ 延伸	2 min	
ddH ₂ O	18 μL	72 ℃ 再延伸	10 min	

16S rRNA 基因测序:上述 PCR 产物由六合华大生物有限公司测序,序列与 Blast 序列比对。

1.10 药敏试验

参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的纸片琼脂扩散法(kirby-bauer, K-B)进行,将金黄色葡萄球菌在 LB 培养基中过夜培养,用麦氏比浊管对照浓度,稀释浓度至 1.5 × 10⁸ cfu/mL 后(约 0.5 麦氏浓度),取 100 μL 于血平板培养基上后涂布均匀静置 5 min,用无菌镊子将 5 片圆形药敏试纸等距贴在血平板培养基上。37 ℃ 培养 16 ~ 18 h,用直尺测量各药敏试纸片抑菌圈直径大小并记录数据,结果判定:以 CLSI 标准进行判定,分为耐药(R)、中介(I)、敏感(S)3 种,每株菌株的药敏试验均进行 3 次重复试验,抑菌圈大小取 3 次试验的平均值后判定耐药结果。

1.11 耐药基因检测

使用 PCR 技术检测分离出的金黄色葡萄球进行耐药基因,耐药基因序列如表 2。

表 2 耐药基因引物序列

耐药基因	引物序列(5'-3')	产物长度 /bp
<i>tetA-F</i>	GCGCCTTTCCTTTGGGTTC	977
<i>tetA-R</i>	CCACCCGTTCCACGTTGTTA	
<i>aac(6')/aph(2'')-F</i>	CCAAGAGCAATAAGGGCATA	189
<i>aac(6')/aph(2'')-R</i>	CACATATCATAACCACTACCG	
<i>Nuc-F</i>	TGAGGATAATCATGTGCTTGGTAG	846
<i>Nuc-R</i>	GACTTTGTACGTTTTTTTGCAGCTG	
<i>Fex-F</i>	TTGGGAAGAATGGTTACAGGG	810
<i>Fex-R</i>	ATCGGCTCAGTAGCATCACC	

反应体系与条件:按照 Mix 说明书,32 μL 反应体系:

Mix	10 μL	94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性	5 min	} 30 个循环
上游引物	1 μL	94 $^{\circ}\text{C}$ 变性	30 s	
下游引物	1 μL	58 $^{\circ}\text{C}$ 退火	30 s	
DNA 模板	2 μL	72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸	45 s	
ddH ₂ O	18 μL	72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸	7 min	

2 结果及分析

2.1 金黄色葡萄球菌革兰氏染色鉴定

革兰氏染色鉴定结果如图 1 所示,显示所鉴定菌株为革兰氏阳性菌,并显示为符合葡萄球菌的菌体形态。

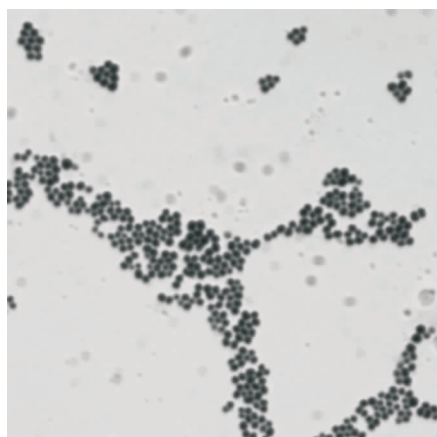


图 1 革兰氏染色后呈紫色葡萄状

2.2 金黄色葡萄球菌酶触试验结果

酶触试验结果如图 2 所示,显示所鉴定菌株为革兰氏阳性球菌。



图 2 酶触反应 30 s 内产生大量气泡

2.3 血浆凝固酶实验

血浆凝固酶实验结果如图 3 所示,显示所鉴定菌株为葡萄球菌,血浆凝固酶实验管 1 和 2 凝固,对照组管 3 无凝固现象。

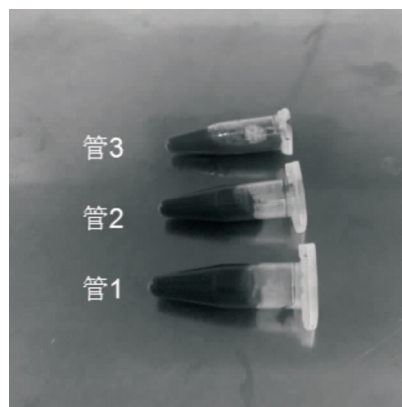
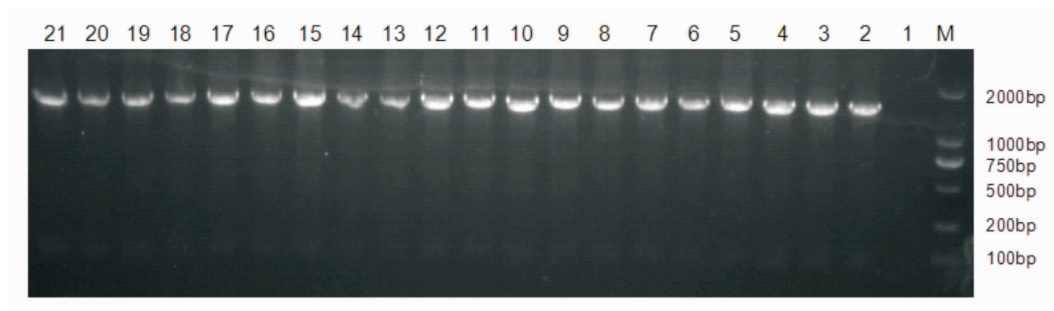


图 3 血浆凝固酶实验结果

2.4 金黄色葡萄球菌 16S rRNA 鉴定

16S rRNA 鉴定显示结果如图 4 所示,所有被鉴定菌株均为金黄色葡萄球菌,序列与 Genbank 金黄色葡萄球菌序列比对相似度均大于 99%。



注:M 为 Marker;1 为阴性对照;2 为阳性对照;3~21 为样品。

图 4 19 株金黄色葡萄球菌 16S rRNA 鉴定结果

2.5 药敏试验结果及多重耐药分析

药敏试验结果如表 3 所示,所选菌株对所有抗

生素均表现出 S、I 和 R 3 种不同的敏感程度。耐药谱结果见表 4 显示。

表 3 19 株金黄色葡萄球菌药敏试验结果

菌株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
RA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
OX	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S
OFX	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S
KZ	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
VA	S	R	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
DA	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S
ENR	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
AMP	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S
CIP	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R
TCY	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S
CN	R	S	I	R	R	I	R	S	R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R
ERY	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	R	R
C	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	S
W	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
RD	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

注:R 表示耐药,I 表示中介,S 表示敏感。

表 4 19 株金黄色葡萄球菌耐药谱

菌株编号	多重耐药表型	耐药数
1	RA/AMP/CIP/TCY/CN/C	6
2	RA/VA/DA/ERY/W	5
3	RA/OFX/ENR/CIP/ERY	5
4	RA/DA/AMP/CN/C	5
5	RA/KZ/ENR/CN/ERY/C	6
6	RA/AMP/ERY/C	4
7	RA/OX/OFX/CIP/CN/ERY	6
8	RA/DA/ERY/C	4
9	RA/OX/ENR/CN/ERY/C/W	7
10	RA/OFX/DA/TCY/CN	5
11	RA/AMP/TCY/C	4
12	OX/KZ/DA/AMP/CIP/CN/ERY/C	8
13	RA/DA/ENR/W	4
14	RA/OX/OFX/AMP/CIP/TCY/ERY/CN	8
15	DA/CIP	2
16	RA/OX/OFX/KZ/CN/ERY/C/W	8
17	RA/OX/DA/ERY	4
18	RA/OX/CIP/CN/ERY/C	6
19	RA/CIP/CN/ERY	4

某种抗生素的耐药率定义为对此种抗生素耐药的菌株数占试验菌株总数的比率,进一步对菌株耐药率进行探索分析,19 株金黄色葡萄球菌对 15 种抗生素的耐药率各不相同,其中对青霉素的耐药率达到 89.5%,对红霉素、庆大霉素均大于 50%,对万古霉素较为敏感,未发现有耐利福平的菌株(图 5)。

2.6 耐药基因检测结果

对金黄色葡萄球菌的耐药基因检测结果如图 6。

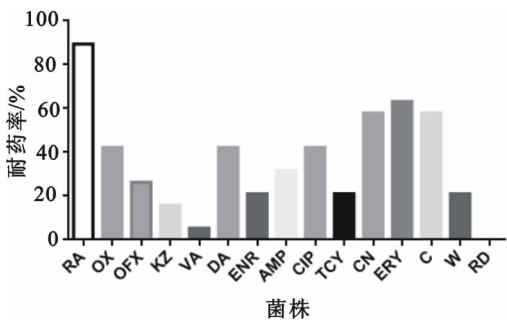
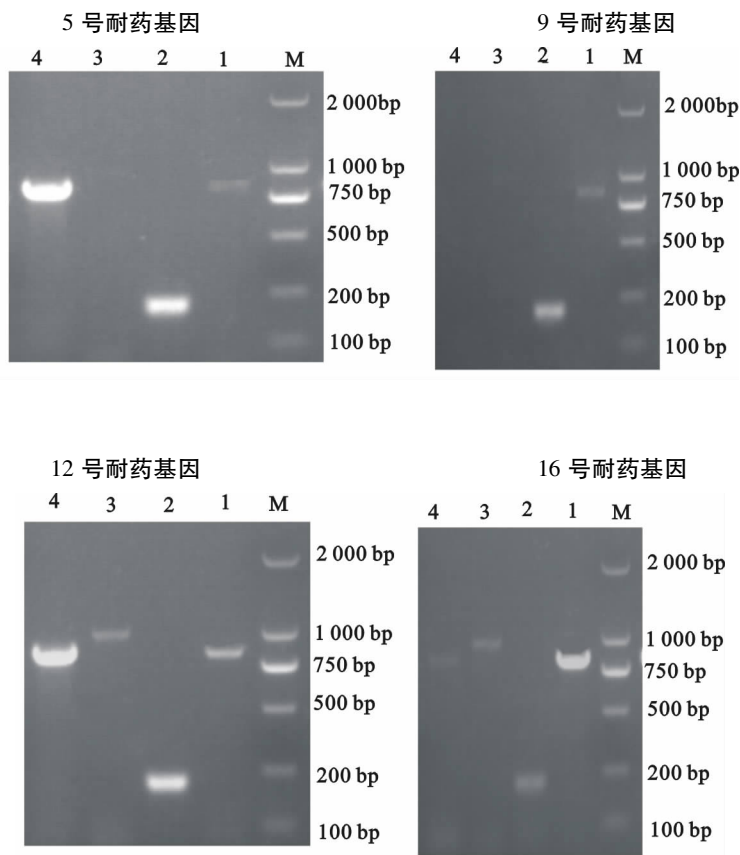


图 5 19 株金黄色葡萄球菌耐药率



注:M 为 DNA marker;数字 1 为 *fexA*;数字 2 为 *aac(6')/aph(2'')*;数字 3 为 *tetA*;数字 4 为 *Nuc*。

图6 金黄色葡萄球菌的耐药基因检测结果

3 讨论

在本次试验中,共采集了湖南省多地 78 份样品,检测到金黄色葡萄球菌 19 株,检出率为 24.35%,赵效南等^[6]在检测山东省 400 多份牛乳样品中,金黄色葡萄球菌的检出率为 35.8%,分离率明显高于本试验。刘保光等^[7]对河南省 350 份牛奶样品中,分离到 80 余株金黄色葡萄球菌,分离率达到 22.86%,与本试验的分离率接近;王登峰等人^[5]在采集的 6 个省市 1 069 份奶样中,分离了金黄色葡萄球菌 219 株,分离率为 20.49%,提示各地区的感染情况可能有所差异。19 株金黄色葡萄球菌对抗生素的耐药情况各不相同,所有细菌均呈现多重耐药,最低为 2 耐,最高为 8 耐,3 株金黄色葡萄球菌对 8 种抗生素耐药。其中,对 β -内酰胺类抗生素青霉素的耐药率为 89.3%,这与杜琳等^[8]检测 5 个省市金黄色葡萄球菌提到的青霉素 80% 的耐药率保持一致。对红霉素和庆大霉素的耐药率大于 50%。对万古霉素普遍敏感,万古霉素是特殊耐药抗生素,对耐药金黄色葡萄球菌有效^[9],但只有经过严格的审核程序后才可使用,这与 OSMAN 等^[10]在调查埃及牛奶样品的耐药性试验中,对万古霉素

的耐药率为 9.5% 情况相同。未发现有耐利福平的菌株,可将万古霉素与利福平联合用药治疗金黄色葡萄球菌感染。耐药情况不同提示可能与各地区用药习惯有关,由于动物饲料中抗菌药物的过度使用,存在多重抗药性(MDR)病原体正日益成为目前较严重的问题^[11]。这也提醒养殖人员应合理选择用药,加强对环境的管理,并继续对动物源细菌耐药药进行监测,进一步防止动物源耐药细菌传播至人类。

试验共检测了 4 种耐药基因,分别为四环素耐药基因 *TetA*、氨基糖苷类耐药基因 *aac(6')/aph(2'')*、喹诺酮类耐药相关基因 *Nuc*、氯霉素类抗菌耐药基因 *fexA*^[12]。4 株所选菌株均具有氯霉素类抗菌耐药基因 *fexA*,与药敏试验的结果一致。细菌的耐药机制形成原因众多,如药物捕获、酶失活和主动外排系统等,最重要的机制细菌运用主动外排系统,将药物通过外排泵对抗抗生素,金黄色葡萄球菌的外排系统主要包括 *NorA*、*NorB*、*NorC*、*MsrA*、*MepA* 等^[13]。在筛选氯霉素耐药基因 *fexA* 的预试验中,*fexA* 的检出率低于抗氯霉素药敏试验的检出率,这可能是由于耐药基因并非唯一决定细菌耐药性原因。

要做到正确防治金黄色葡萄球菌,避免奶牛乳

房炎所造成的损失,首先应该正确使用抗生素,避免滥用、错用;其次,奶牛场应建立健全的消毒规范,从源头防治;最后,在治疗方面,中药对于金黄色葡萄球菌的治疗也有相关报道,王双双等^[14]研究了黄连等5种中药对金黄色葡萄球菌具有抑制作用,在这方面可以进行深入研究。

参考文献:

- [1] 宋洁. 金黄色葡萄球菌致病的秘密武器[J]. 兽医导刊, 2018(23):33.
- [2] 哈爱日,樊宏亮,关红,等. 内蒙古地区奶牛乳源金黄色葡萄球菌耐药性研究[J]. 中国兽医杂志, 2018(5):90-93.
- [3] 郭慧琴,李田,肖鹏,等. 牛源金黄色葡萄球菌的分离鉴定、耐药性分析及木糖醇对生物被膜形成的干预[J]. 中国兽医学报, 2019(5):889-893.
- [4] 袁文常. 金黄色葡萄球菌适应性耐药及 MRSA 耐药调控机制的研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2013.
- [5] 王登峰. 奶牛乳腺炎性金黄色葡萄球菌耐药基因检测、分子分型和耐甲氧西林菌株全基因组测序[D]. 北京:中国农业大学, 2016.
- [6] 赵效南,苑晓萌,张印,等. 山东省生鲜牛乳中金黄色葡萄球菌的污染状况及耐药性分析[J]. 山东农业科学, 2019(12):1-8.
- [7] 刘保光,蔡田,李小申,等. 牛奶源金黄色葡萄球菌血清型、毒力基因及 PFGE 分型[J]. 食品科学, 2019(2):281-286.
- [8] 杜琳,王丽芳,冯小慧,等. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国动物传染病学报, 2019, 27(3):82-85.
- [9] GARDETE S, TOMASZ A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Clinical Investigation, 2014, 124(7):2836-2840.
- [10] OSMAN K M, PIRES A D S, FRANCO O L, et al. Enterotoxigenicity and antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from raw buffalo and cow milk [J]. Microbial Drug Resistance, 2019(1):2142-2154.
- [11] PEREZ-RODRIGUEZ F, MERCANOGLU TABAN B. A state-of-art review on multi-drug resistant pathogens in foods of animal origin: Risk factors and mitigation strategies [J]. Frontiers in Microbiology, 2019(10):56-69.
- [12] WENDLANDT S, FELER A T, MONECKE S, et al. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2013, 303(6/7):338-349.
- [13] TRUONG-OLDUC Q C, HOOPER D C. The transcriptional regulators NorG and MgrA modulate resistance to both quinolones and beta-lactams in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(8):2996-3005.
- [14] 王双双,吴胜奎,孙江洋,等. 5种中药提取物对金黄色葡萄球菌抑制作用的研究[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(12):55-57.

Isolation, Identification and Drug Resistance Analysis of *Staphylococcus aureus* in Some Area of Hunan Province Dairy Cattle

CONG Bin, YANG Jun, WANG Hui, LIU Bo-cheng, ZHOU Wang-ping, FU Sheng-cai *

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract: [Objective] In order to find out the drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy farms in Hunan province, a reasonable medication plan was developed to isolate and identify the bacteria in milk samples from different areas of Hunan province. [Method] Drug susceptibility test and drug resistance gene test were conducted on 19 strains of *Staphylococcus aureus*. [Result] The results show that: All 19 strains of *Staphylococcus aureus* showed multiple drug resistance. The drug resistance rate to penicillin was high, while the drug resistance rate to vancomycin and rifampicin was very low. [Conclusion] The results of drug resistance genes were basically the same as the resistance performance, which could provide a basis for the treatment of *Staphylococcus aureus* infection in dairy farms in Hunan province.

Key words: *Staphylococcus aureus*; drug resistance gene; drug resistance phenotype; drug resistance rate