

金黄色葡萄球菌分离鉴定及耐药性分析

刘保光^{1,2}, 董颖¹, 孙华润², 卢帅菲¹, 汪保英¹, 胡功政^{2*}, 许二平^{1*}

(1. 河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046; 2. 河南农业大学动物医学院, 郑州 450002)

摘要: 本试验对河南省南阳某鸡场病死鸡肝脏分离出的疑似金黄色葡萄球菌进行分离鉴定, 并对鸡源金黄色葡萄球菌的耐药情况进行分析。用微量肉汤稀释法测定分离菌对 11 种抗菌药物的敏感性, 利用 PCR 扩增对分离菌进行氨基糖苷类耐药基因 *aphA*、*acc(6')-aph(2'')* 和 *ant(4')-Ia*, 大环内酯类耐药基因 *ermA*、*ermB* 和 *ermC* 及四环素类耐药基因 *tetK* 和 *tetM* 的检测。结果表明, 分离鉴定出 15 株金黄色葡萄球菌, 这些菌株除对替加环素、万古霉素敏感率为 100% 外, 对其他抗生素药物均呈现不同程度的耐药, 其中青霉素、红霉素的耐药率达 100%。有 66.7% 菌株呈现多重耐药性, 分离菌株最少耐 2 种药物, 最多耐 9 种药物。耐药基因检测结果显示, *ermC* 检出率达 80%, *tetK* 检出率 20%, 其余在 50% 左右。本研究显示, 该鸡场分离菌耐药性比较严重, 因此, 临床应加强耐药性及耐药基因的检测。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 最小抑菌浓度; 耐药性

中图分类号: S852.61+1

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)04-0092-04

Isolation, Identification and Resistance Analysis of *Staphylococcus aureus*

LIU Baoguang^{1,2}, DONG Ying¹, SUN Huarun², LU Shuaifei¹, WANG Baoying¹, HU Gongzheng^{2*}, XU Erping^{1*}

(1. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046; 2. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this experiment, the strain were isolated and identified from clinical samples which were collected from the chicken farm in Nanyang City of Henan Province, and the resistance of *Staphylococcus aureus* from chickens was analyzed. The sensitivity of the isolated bacteria to 11 antimicrobial agents was determined by the microdilution broth method, the related resistance genes such as aminoglycoside modifying enzyme genes (*aphA*, *acc(6')-aph(2'')*, *ant(4')-Ia*), erythromycin ribosomal methylase genes (*ermA*, *ermB*, *ermC*) and tetracycline-resistant genes (*tetK*, *tetM*) were detected by PCR. The results showed that 15 *S. aureus* strains were identified, the resistance rates to penicillin and erythromycin were 100%, and the tested strains were susceptible to both tigecycline and vancomycin with the susceptibility rate 100%. Also, 66.7% of the strains were multi-resistant, the resistances varied from 2 to 9 kinds of the above drugs. The 80% of the isolates harbored *ermC* gene, 20% harbored *tetK* gene, and the rest was about 50%. This research shows that antimicrobial resistance of *S. aureus* is relatively serious. Therefore it is necessary that drug resistance and resistance gene should be enhancement of monitoring.

Key words: *Staphylococcus aureus*; Minimum inhibitory concentrations (MICs); Resistance

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为革兰氏阳性菌, 属典型人畜共患病原菌^[1]。在兽医和人医临床上较为多见, 人畜化脓性感染部位常成为污染源^[2]。据报道, 该菌可能成为耐药基因

的储库, 能够在不同动物或动物与人之间进行相互传播或传递, 给动物和人造成潜在威胁^[3]。鸡葡萄球菌病主要是由金黄色葡萄球菌引起的重要传染病, 一年四季都可以发生, 是严重危害养鸡业的疾病之一^[4]。虽报道的青霉素、红霉素、土霉素、庆大霉素等对该菌具有良好的抗菌作用, 但药物大剂量、不规范使用, 尤其药物滥用现象严重, 导致产生一定耐药菌株, 主要是多重耐药菌株逐年增加, 细菌耐药问题变得愈加突出^[5], 加重了该菌对畜牧业发展及人类健康的威胁^[6]。

鉴于此, 本试验对南阳某鸡场疑似金黄色葡萄

收稿日期: 2019-10-23

基金项目: 河南省博士后科研项目启动经费(19030075); 河南省中医药科学研究专项课题(2019ZY1019、20-21ZY2144); 河南省自然科学基金(222300420481)

作者简介: 刘保光(1983-), 男, 实验师, 博士, 主要从事病原生物分离与耐药机制研究。

通讯作者: 胡功政, 男, 博士, 教授, E-mail: yaolilab@163.com

许二平, 男, 博士, 教授, E-mail: xuerping0371@163.com

萄球菌进行分离、鉴定,并进行药物敏感性测定及耐药基因的检测,分析耐药性的耐药程度和耐药基因的检测情况,以期为兽医临床合理使用抗菌药物、降低耐药菌株的传播提供参考价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

2018年11月~2019年3月从南阳某养鸡场采集疑似金黄色葡萄球菌感染的病死鸡肝脏样品50份。

1.1.2 培养基和试剂

脑心浸液肉汤、革兰氏染色试剂盒等均购自北京陆桥技术有限责任公司;金黄色葡萄球菌显色培养基购自法国科玛嘉公司。2×Taq Master Mix等购自北京康为世纪有限公司;溶菌酶购自北京索莱宝有限公司。

1.1.3 药品和仪器

试验用抗菌药物为标准品或对照品,购自中国兽医药品监察所。PCR仪(杭州晶格科学仪器有限公司),电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 样品采集、分离与鉴定

无菌条件下取病料接种于脑心浸液琼脂培养基上,于37℃过夜培养,挑单个菌落接种于营养肉汤后,再划线于脑心浸液琼脂平板,置37℃培养18~24 h,观察各平板上细菌菌落大小及形态。将纯化后的细菌在金黄色葡萄球菌显色培养基上进

行鉴别。革兰氏染色后镜检,利用PCR扩增金黄色葡萄球菌耐热核酸酶编码基因(*nuc*)进行鉴定。

1.2.2 药物敏感性试验

1.2.2.1 药液配制

用电子分析天平精确称取11种药物溶解于无菌水中,配成浓度为1 280 μg/mL的储备液(青霉素浓度为2 560 μg/mL,庆大霉素和四环素浓度为5 120 μg/mL),使用前按比例稀释,4℃保存。

1.2.2.2 菌液准备

挑取纯培养菌液接种于脑心浸液琼脂培养基上,于37℃过夜培养,挑取3~5个纯菌落于5 mL去离子水中,经比浊使其浓度达到0.5麦氏单位(浓度约为 1×10^8 CFU/mL),使用前将菌液稀释1 000倍。

1.2.2.3 药物敏感性测定

采用微量肉汤稀释法,测定青霉素等11种抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC),替加环素结果按照欧洲药物敏感性检测委员会(EUCAST)标准来判读,其他药物结果按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准^[7]来判读。此后,进行MIC范围及耐药率统计。

1.2.3 耐药基因检测

对氨基糖苷类、大环内酯类及四环素类药物的耐药基因进行PCR扩增(见表1)。PCR反应体系为20 μL,其中,Taq Master Mix 10 μL,DNA模板2 μL,上下游引物各1 μL,去离子水6 μL。反应条件:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,72℃延伸30 s,循环30次,最后72℃延伸10 min,引物序

表1 金黄色葡萄球菌分离株耐药基因的引物序列

基因	引物	序列(5'→3')	扩增长度(bp)	退火温度(℃)
<i>aphA</i>	aphA-F	CCAAGAGCAATAAGGGCATACC	382	60
	aphA-R	ACCCCTCAAAAACACTGTTGTTGC		
<i>acc(6')-aph(2'')</i>	<i>acc(6')-aph(2'')</i> -F	GGAAGCAGAGTTCAGCCATG	675	60
	<i>acc(6')-aph(2'')</i> -R	TGCCTGCATATTCAAACAGC		
<i>ant(4')-Ia</i>	<i>ant(4')-Ia</i> -F	ACAGCCGGTATAAAGGGACCACC	266	60
	<i>ant(4')-Ia</i> -R	AAAATCATAACAGCTCGCGCGGATC		
<i>ermA</i>	<i>ermA</i> -F	TAGGGGGAATAATAGCACATT	421	55
	<i>ermA</i> -R	AATCCGCCCATAAACAAATA		
<i>ermB</i>	<i>ermB</i> -F	GAACTCGAACAAGAGGAAAGC	639	55
	<i>ermB</i> -R	ATGGAAGCCCAGAAAGGAT		
<i>ermC</i>	<i>ermC</i> -F	GTTCAAGAACAATCAATACAGAG	572	55
	<i>ermC</i> -R	GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC		
<i>tetK</i>	<i>tetK</i> -F	GAAAAGGTACTCAACCAAATA	587	57
	<i>tetK</i> -R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC		
<i>tetM</i>	<i>tetM</i> -F	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC	717	57
	<i>TetM</i> -R	GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC		

注:F为上游引物;R为下游引物

列及其他参数见表1。PCR扩增后分别取8 μL产物用1%琼脂糖电泳分析,利用凝胶成像系统观察结果。经PCR鉴定为阳性的基因进行测序,并在NCBI进行BLAST分析。

2 结果与分析

2.1 细菌分离鉴定

本研究分离获得的菌株在显色培养基上呈现表面光滑、湿润、凸起的粉红色菌落;革兰氏染色镜检显示紫色、葡萄串状;耐热核酸酶编码基因(*nuc*)扩增显示均能扩增出678 bp片段,由此确认为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。

2.2 药物敏感性测定

MIC测定显示,有66.7%分离株呈现多重耐药,分离株最少耐2种药物,最多耐9种药物,有46.7%对8种及8种以上药物耐药。青霉素、红霉素对100%的分离菌的MIC值超出耐药折点标准8倍以上,庆大霉素有46.7%超出8倍以上,新霉素、泰乐菌素、土霉素有66.7%超出4倍以上,结果详见表2。分离株除对替加环素和万古霉素敏感率100%外,对其他9种药物呈现不同程度的耐药,其中对青霉素和红霉素耐药率达100%,对阿米卡星、泰乐菌素、四环素的耐药率均在45%以上。

表2 菌株的耐药情况总结

药物	MIC范围	MIC折点标准(μg/mL)		敏感率(%)	耐药率(%)
		S	R		
青霉素	8~128	≤0.12	≥0.25	0	100
庆大霉素	2~>512	≤4	≥16	40	60
阿米卡星	2~>512	≤16	≥64	40	60
新霉素	0.25~>128	≤16	≥32	33	67
泰乐菌素	0.25~>128	≤8	≥32	27	73
红霉素	128~>128	≤0.5	≥8	0	100
四环素	0.5~>128	≤4	≥16	40	60
土霉素	0.25~128	≤4	≥16	27	67
多西环素	0.125~32	≤4	≥16	47	47
替加环素	1.125~2	≤4	≥16	100	0
万古霉素	1~4	≤4	≥32	100	0

2.3 耐药基因检测结果

耐药基因检测结果见表3。氨基糖苷类耐药基因*aphA*、*acc(6')-aph(2'')*、*ant(4')-Ia*的携带率分别为47%、53%、40%,大环内酯类耐药基因中,*ermC*携带率最高(80%),其次是*ermB*(53%)、*ermA*(40%)。四环素类耐药基因*tetK*携带率较低(20%)。

表3 耐药基因检测结果 %

基因	携带率	基因	携带率
<i>aphA</i>	47	<i>ermB</i>	53
<i>acc(6')-aph(2'')</i>	53	<i>ermC</i>	80
<i>ant(4')-Ia</i>	40	<i>tetK</i>	20
<i>ermA</i>	40	<i>tetM</i>	47

3 讨 论

3.1 分离鉴定

金黄色葡萄球菌是典型革兰氏阳性菌代表^[8]。该菌在革兰氏染色后在油镜下观察应为紫色、葡萄串状球菌,在科玛嘉显色培养基上应为表面光

滑不透明的红色或粉红色菌落。本次试验还采用PCR扩增金黄色葡萄球菌耐热核酸酶编码基因的方法进一步确认^[9],结果显示15株分离的菌株均能扩增出678 bp的目的片段。

3.2 耐药性分析

关于金黄色葡萄球菌的耐药性报道逐年增多,本次药敏试验中有10株菌多重耐药严重,对替加环素、万古霉素外的其余9种药物产生较为严重的耐药,这与李德喜等^[6]的研究结果相似,疑似MRSA,如确认还需进一步试验验证。鸡源金黄色葡萄球菌对大多数抗生素具有耐药性,其中对青霉素、红霉素耐药率较高,甚至接近于100%,对万古霉素敏感率为100%^[1, 10],这与本次试验结果相似,可以看出青霉素和红霉素在治疗鸡金黄色葡萄球菌病上长期应用,导致金黄色葡萄球菌对青霉素、红霉素产生较为严重的耐药。国内不同地区所报道的鸡源金黄色葡萄球菌对庆大霉素、阿米卡星、四环素、土霉素耐药率有所不同,这可能与地方用药习惯有关^[1],新霉素、泰乐菌

素、多西环素、替加环素鲜有报道。其他动物源(如牛、猪)对抗生素药物的耐药性都表现出较强的复杂性,不同地区同一起来源(如牛)的菌株,对同一种药物与鸡源也不相同,表明金黄色葡萄球菌耐药性非常普遍,只是程度存在差异,造成差异的原因可能是地方用药习惯不同^[6-7, 11]。

3.3 耐药基因检测

金黄色葡萄球菌对氨基糖苷类抗生素产生耐药的原因主要是携带 *acc(6')-aph(2'')* 和 *aph(3')-III* 基因,使氨基糖苷类药物失去了结合部位^[6]。携带 *acc(6')-aph(2'')* 或 *aphA* 的部分菌株对 3 种氨基糖苷类药物均耐药,由此可知, *aphA*、*acc(6')-aph(2'')* 对菌株耐药相关性较大。红霉素耐药基因 *ermA*、*ermB* 和 *ermC* 可编码 N6-甲基转移酶,通过二甲基化 23S rRNA 上的腺嘌呤,降低其对抗生素的亲和力^[11]。所有菌株对红霉素均耐药,对泰乐菌素耐药的菌株与携带 *ermB* 的菌株相近,推测 *ermB* 可能与金黄色葡萄球菌对泰乐菌素的耐药性有较大相关。试验中发现,菌株表型耐药但未检测到相关耐药基因,可能与其他耐药机制有关^[12];表型敏感却含有相关耐药基因,可能是由于该耐药基因未表达^[13]。四环素耐药基因 *tetK* 通过激活外排泵将药物排出菌体而达到耐药效果, *tetM* 编码核糖体保护蛋白,阻止四环素与靶点发生结合^[11]。所有对四环素类抗生素耐药的菌株含均有 *tetM*,携带 *tetK* 的菌株只有 2 株,表示 *tetM* 基因对菌株的耐药性影响比 *tetK* 大,由此推测,金黄色葡萄球菌对四环素类抗生素的耐药机制还需深入研究。

鸡源金黄色葡萄球菌的耐药基因检测在国内鲜有报道,其他来源(如牛^[11]、兔^[14]、水产品^[15])的金黄色葡萄球菌耐药基因检测结果报道与本次试验结果既相似又有差异。牛源金黄色葡萄球菌的耐药基因检测报道指出,红霉素耐药表型菌株含有 *ermB* 或 *ermC*,所有菌株均未检测到 *ermA*,大环内酯类和四环素类耐药基因中仅有 *tetK* 与耐药表型存在相关性,这与本试验结果存在差异。本试验结果显示 *tetM* 检出率比 *tetK* 低,这与水产品中的报道相反。兔源金黄色葡萄球菌研究显示,耐药表型与 8 种耐药基因检出率基本呈正相关。

参考文献:

- [1] Wang X, Meng J H, Zhou T, et al. Antimicrobial susceptibility testing and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* from food and food animals[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2012, 9(2): 95-101.
- [2] 董晓琳,李志萍,高玮村,等.基于适配体的金黄色葡萄球菌流式细胞术检测方法[J].东北农业科学,2016,41(3):81-86.
- [3] 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分布研究[J].华南农业大学学报,2012,33(4):550-555.
- [4] 刘新金,周宝坤.鸡金黄色葡萄球菌的分离鉴定及药敏试验[J].家禽科学,2007,6(2):34-35.
- [5] Wu H, Liu B G, Liu J H, et al. Phenotypic and molecular characterization of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase and plasmid-mediated ACT-like AmpC β -lactamase produced by *Klebsiella pneumoniae* isolates from chickens in Henan Province, China[J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11(3): 3357-3364.
- [6] 李德喜,李新生,杜向党,等.动物源耐甲氧西林葡萄球菌的研究进展[J].江西农业学报,2009(6):122-124.
- [7] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Suseptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals[S]. Approved Standard-Fouth Edition. CLSI document VET01-A4. Wayne, P A: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
- [8] 胡春红,乔 琳,古红梅,等.常用食品防腐剂的抑菌效果[J].吉林农业科学,2013,38(1):83-86.
- [9] Weigel L M, Donlan R M, Shin D H, et al. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(1): 231-238.
- [10] 王桂琴,邢智华,魏永智.鸡源金黄色葡萄球菌耐药性分析[J].农业科学研究,2011,32(1):43-45.
- [11] 杨 峰,王旭荣,李新圃,等.牛源金黄色葡萄球菌耐药性与相关耐药基因和菌株毒力基因的相关性研究[J].中国兽医科学,2016,46(2):247-252.
- [12] Croes S, Ruud H Deurenberg, Marie-Louise L Boumans, et al. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage[J]. BMC Microbiology, 2009, 9(1): 1-9.
- [13] Hammad A M, Shimamoto, Toshi, et al. Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish[J]. Food Microbiology, 2014, 38(2): 62-66.
- [14] 邓钊宾,余 滔,耿 毅,等.兔源金黄色葡萄球菌的耐药性及耐药基因分析[J].中国预防兽医学报,2016,38(1):45-48.
- [15] 周向阳,江玲丽,相兴伟,等.水产品中金黄色葡萄球菌的药敏分析和耐药基因的检测[J].中国抗生素杂志,2014,39(12):942-945.

(责任编辑:王 昱)