

网络出版时间:2013-01-25 17:23

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130125.1723.012.html>

猪肉源金黄色葡萄球菌毒力基因检测与耐药性分析

陶晓亚^a, 徐明悦^a, 王 新^a, 周 婷^b,
夏效东^a, 杨保伟^a, 席美丽^a, 孟江洪^a

(西北农林科技大学 a 食品科学与工程学院, b 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】了解陕西关中地区猪肉中金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的污染状况、耐药性及其毒素基因的分布。【方法】采集陕西关中 6 个地区的猪肉 165 份,按国标 GB/T 4789.10-2010 的方法,对其中的金黄色葡萄球菌进行分离,采用 PCR 方法对该菌进行确证并对其相关基因(如 *nuc*、*mecA*、*PVL*、*SEs* 和 *ETs*)进行检测,最后采用琼脂稀释法检测金黄色葡萄球菌对 11 种抗菌药物的耐药性。另外,在 BP 平板中分别添加头孢西丁(4 $\mu\text{g/mL}$)和苯唑西林(4 $\mu\text{g/mL}$),分离耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。【结果】165 份样品的金黄色葡萄球菌污染率为 33.33%(55/165);从中分离出 103 株金黄色葡萄球菌,但未检测出 MRSA,这些菌对甲氧苄啶的耐药性最强,耐药率为 100%;其次对红霉素和四环素的耐药率较高,分别为 57.28%和 34.95%;对苯唑西林、庆大霉素、氯霉素、环丙沙星的耐药率分别为 2.91%、10.68%、2.91%和 3.88%;所有菌株对头孢西丁、头孢哌酮、万古霉素、阿米卡星均敏感,同时得到 21 种耐药谱,多重耐药率达 20.39%。猪肉金黄色葡萄球菌中杀白细胞素基因(*Panton-valentine leukocidin*, *PVL*)的检出率为 34.95%,肠毒素基因(*SEs*)中 *sej* 的检出率最高,为 98.06%,然后依次为 *sea*(50.49%)、*see*(34.95%)、*sed*(31.07%)、*sec*(13.59%)、*seh*(8.74%)、*sei*(8.74%)、*seg*(6.80%)和 *seb*(1.94%);同时得到 71 种毒素基因型,以 *sea+sej*(11.65%)最为流行,分布地区不尽相同,其次为 *PVL+sea+see+sej*(9.71%),耐红霉素的金黄色葡萄球菌含的毒素基因类型比较复杂,*sej* 基因检出率高达 98.68%。在 BP 平板中分别添加头孢西丁和苯唑西林,均未检测出 MRSA。【结论】猪肉存在金黄色葡萄球菌的污染,其污染菌株存在多重耐药性并携带较多毒素基因,提示应加强猪肉金黄色葡萄球菌的监测。在 BP 平板中分别添加头孢西丁(4 $\mu\text{g/mL}$)和苯唑西林(4 $\mu\text{g/mL}$)筛选 MRSA 的方法不一定可靠,其可信度有待证明。

[关键词] 猪肉;金黄色葡萄球菌;毒素基因;耐药性

[中图分类号] TS201.3;TS251.5+1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)03-0165-07

Characterization of toxin genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from pork

TAO Xiao-ya^a, XU Ming-yue^a, WANG Xin^a, ZHOU Ting^b,
XIA Xiao-dong^a, YANG Bao-wei^a, XI Mei-li^a, MENG Jiang-hong^a

(1 College of Food Science and Engineering, 2 College of Veterinary Medicine,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The aim of the study was to investigate contamination, toxin gene properties and antimicrobial profile of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pork in Guanzhong region, Shaanxi province. 【Method】A total of 165 pork samples from six regions in Shaanxi province were collected and

[收稿日期] 2012-06-20

[基金项目] 长江学者讲座教授奖励计划项目(Z111020001);西北农林科技大学博士科研启动费项目(01140407)

[作者简介] 陶晓亚(1990—),女,河南漯河人,在读本科生,主要从事食品科学与工程研究。E-mail:taoxiaoya00@163.com

[通信作者] 王 新(1973—),男,四川邛崃人,副教授,博士,主要从事食源性病原及分子生物学和食品安全研究。
E-mail:xinwang7516@yahoo.com.cn

screened for the presence of *S. aureus* and MRSA. *S. aureus* isolates were characterized using antimicrobial susceptibility and PCR. Toxin genes including *PVL*, *SEs* and *ETs* were detected as well. In addition, MRSA was isolated by BP plates with cefoxitin (4 $\mu\text{g/mL}$) and oxacillin (4 $\mu\text{g/mL}$), respectively. 【Result】 Of the 165 pork samples, 33.33% were contaminated, 103 *S. aureus* strains were isolated and MRSA was not detected. The observed resistance against erythromycin were highest (100%), followed by erythromycin (57.28%), tetracycline (34.95%), gentamicin (10.68%), ciprofloxacin (3.88%), oxacillin (2.91%) and chloramphenicol (2.91%). All isolates of *S. aureus* were susceptible to cefoxitin, cefoperazone, vancomycin and amikacin. Of the 103 strains of *S. aureus*, 20.39% were multiresistant. The predominant toxin gene was *sej* (98.06%), followed by *sea* (50.49%), *see* and *PVL* (each 34.95%). 68.93% isolates harbored one or more *SE* genes, and the predominant toxin gene pattern was *sea + sej* (11.65%), followed by *PVL + sea + see + sej* (9.71%). Resistance against erythromycin *S. aureus* isolates harboring *sej* was most frequently observed. Finally, MRSA was not detected by BP plates with both cefoxitin (4 $\mu\text{g/mL}$) and oxacillin (4 $\mu\text{g/mL}$). 【Conclusion】 Many *S. aureus* isolated from pork contained different multiple resistances and toxin genes, and we should strengthen the monitoring of *S. aureus* from pork. MRSA was not isolated from pork as we used BP plates with cefoxitin (4 $\mu\text{g/mL}$) and oxacillin (4 $\mu\text{g/mL}$). The credibility of this approach needed to be proved.

Key words: pork; *Staphylococcus aureus*; toxin genes; antimicrobials resistance

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 是人类化脓感染中最常见的病原菌,也是金黄色葡萄球菌肠炎的罪魁祸首^[1]。该菌是猪肉污染的主要食源性致病菌之一,携带有金黄色葡萄球菌的猪肉,无疑会给食品安全带来潜在威胁。

金黄色葡萄球菌可以产生多种致病因子,其中由编码双组份蛋白的 *lukS-PV* 和 *lukF-PV* 2 个基因构成的杀白细胞素 (*Panton-valentine leukocidin*, *PVL*),是导致人类化脓感染和坏死性肺炎的原因之一^[2]。肠毒素 (*Staphylococcal enterotoxins*, *SEs*) 主要有 *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*、*seg*、*seh*、*sei* 和 *sej* 等,是引起食物中毒的主要致病因子。此外,剥脱毒素 (*Exfoliative toxins*, *Ets*) 主要有 *eta* 和 *etb* 等,是引起以皮肤浅表水泡形成为特征的致病因子^[3]。

细菌的耐药性可以通过食物链传播,因此,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) 在不同食品中的检出,已引起社会各界的高度关注。MRSA 由于获得了外源性的遗传决定子 *mecA* 基因 (该基因编码青霉素结合蛋白 2a), 因此对 β -内酰胺类药物耐药,是 MRSA 多重耐药性产生的重要遗传学基础^[4]。

目前,国外对金黄色葡萄球菌的研究较多,而国内的研究则较少。本研究主要对陕西关中地区猪肉中金黄色葡萄球菌进行药敏性研究,旨在为临床正确使用抗菌药物提供指导,并试图通过对其毒力基因和 *mecA* 基因的检测,进而为猪肉及其制品的安

全评估和风险分析提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品及标准菌株来源

2011-06,从陕西关中 6 个地区 (西安、咸阳、宝鸡、武功、兴平和杨凌) 大小型超市及农贸市场采集猪肉样品共计 165 份;标准菌株大肠埃希菌 ATCC25922 和金黄色葡萄球菌 ATCC29213,由中国药品生物制品检定所惠赠。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 试剂 Luria-Bertani (LB) 琼脂培养基,购自北京陆桥技术责任有限公司;抗菌药物均购自 Sigma 公司;氯化钠购自西安化学试剂厂;琼脂糖 (Agarose) 购自 Sigma 公司;PCR 用 *Taq* DNA 聚合酶、buffer (Mg^{2+})、dNTPs、100 bp DNA Marker、DL2000 DNA Marker 和引物等,均购自大连宝生物公司。

1.2.2 仪器 主要有微量取样枪 (10, 100, 200, 1 000 μL)、振荡机、离心机、多孔接种器、BHW-8C 型恒温加热器、PCR 扩增仪、电泳设备、凝胶成像仪、电子天平、美的牌微波炉、高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、冷冻冰箱。

1.3 SA 和 MRSA 的分离与鉴定

依据 GB/T 4789.10-2010《金黄色葡萄球菌检验》方法分离金黄色葡萄球菌;另外,依据朱以军等^[5]报道的方法,在 BP 平板中分别添加头孢西丁

(4 μg/mL)和苯唑西林(4 μg/mL)来分离 MRSA。按照 Merlino 等^[6]报道的方法,对分离的金黄色葡萄球菌、MRSA 的 *nuc* 基因和 *mecA* 基因,进行多重 PCR 扩增及 SA 或 MRSA 菌株确证。

1.4 SA 基因组 DNA 的提取

用灭菌棉签蘸取经 LB 培养基活化的纯培养

SA,置于装有 1 000 μL 去离子水的离心管中,混匀。加热煮沸 20 min 后,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,于-40 ℃冰箱中保存备用。

1.5 PCR 扩增引物

PCR 扩增引物如表 1 所示。

表 1 试验用的 PCR 扩增引物
Table 1 The primers used in PCR

基因 Genes	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	产物大小/bp Product size	参考文献 Reference
<i>mecA</i>	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	310	[7]
<i>PVL</i>	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACAT-GATCCA	GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAA-AGC	433	[8]
<i>eta</i>	ATATCAACGTGAGGGCTCTAGTAC	ATGCAGTCAGCTTCTTACTGCTA	1 155	[9]
<i>etb</i>	CACACATTACGGATAATGCAAG	TCAACCGAATAGAGTGAAC TTATCT	604	[9]
<i>sea</i>	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	102	[10]
<i>seb</i>	GTATGGTGTTGTAAGTACG	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164	[10]
<i>sec</i>	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	CACACTTTTAGAATCAACCG	451	[10]
<i>sed</i>	CCAATAATAGGAGAAAAATAAAAAG	ATTGGTATTTTTTTTCG TTC	278	[10]
<i>see</i>	AGGTTTTTTTCACAGGTCATCC	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	209	[10]
<i>seg</i>	TGCTATCGACACACTACAACC	CCAGATTCAAATGCAGAACC	704	[10]
<i>seh</i>	CGAAAGCAGAAGATTTACACG	GACCTTTACTTATTTTCGCTGTC	495	[10]
<i>sei</i>	GACAACAAAAGTGTGAAACTG	CCATATTCTTTGCCTTTACCAG	630	[10]
<i>sej</i>	CATCAGAAGTGTGTTCCGCTAG	CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC	142	[10]

PCR 反应条件:94 ℃ 5 min,1 个循环;94 ℃ 50 s,57 ℃ 50 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min,1 个循环;4 ℃ 保温 90 min。

1.6 电泳

在 PCR 仪上扩增完毕后,对产物进行 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,利用标准大小的 DNA Marker 作比对,电泳完毕后在凝胶成像仪上照相并记录电泳结果。

1.7 分离 SA 的药敏试验

参照 CLSI 推荐的琼脂稀释法,对分离的 103 株 SA 进行药敏试验。用于药敏试验的抗菌药物红霉素(ERY)、苯唑西林(OXA)、头孢西丁(CE-FOX)、头孢哌酮(CEFOP)、万古霉素(VAN)、四环素(TET)、氯霉素(CHL)、甲氧苄啶(TMP)、阿米卡星(AMI)、环丙沙星(CIP)和庆大霉素(GEN),均购自 Sigma 公司。

2 结果与分析

2.1 市售猪肉中 SA 和 MRSA 的分离与鉴定

对 165 份猪肉样品采用 GB/T 4789.10-2010 《金黄色葡萄球菌检验》的方法,共检测出 55 个 SA 污染样品,检出率为 33.33%,从中鉴定出 103 株 SA,但未鉴定出 MRSA 菌株;165 份样品使用 BP 平板中分别添加头孢西丁(4 μg/mL)和苯唑西林(4

μg/mL)的方法,分别分离出 4 株和 36 株可疑 MR-SA 菌株,但经多重 PCR 扩增 *nuc* 基因和 *mecA* 基因,均未鉴定出 MRSA 菌株。

2.2 分离 SA 中毒素基因和 PVL 基因的检测

从表 2 可以看出,PVL 基因的检出率为 34.95%;肠毒素基因中,*sej* 的检出率最高,为 98.06%,其次为 *sea*、*see*、*sed*、*sec*、*seh*、*sei*、*seg*、*seb*,其检出率分别为 50.49%,34.95%,31.07%,13.59%,8.74%,8.74%,6.80%,1.94%;未检测出 *eta* 和 *etb* 基因。

表 3 显示,携带多重毒素基因(≥2)的菌株共检测出 71 株,多重毒素基因检出率高达 68.93%,且多重毒素基因谱中有 97.18%含有 *sej* 基因。其中有 1 株菌(0.97%)同时含有 7 种毒素基因(*PVL*+*sea*+*sed*+*see*+*seg*+*sei*+*sej*),1 株菌(0.97%)同时含有 6 种毒素基因(*PVL*+*sec*+*sed*+*see*+*seg*+*sei*),6 株菌(5.83%)同时含有 5 种毒素基因,其余 63 株携带 4 种以下毒素基因。

由表 4 可知,在 71 株多重(≥2)毒素基因型中,各地区多重基因型统计结果以宝鸡地区的检出率最高,为 53.52%,然后依次为西安(22.54%)、杨凌(12.68%)、咸阳(5.63%)、武功(2.82%)和兴平(2.82%)。

表 2 猪肉中 103 株金黄色葡萄球菌 *Ets*、*PVL* 和 *SEs* 基因的检测结果

Table 2 Separate results of *Ets*, *PVL* and *SEs* genes from 103 stains *S. aureus* isolated from pork

基因 Genes	检出数 Detection number	检出率/% Detection rate	基因 Genes	检出数 Detection number	检出率/% Detection rate
<i>mecA</i>	0	0.00	<i>seg</i>	7	6.80
<i>PVL</i>	36	34.95	<i>seh</i>	9	8.74
<i>sea</i>	52	50.49	<i>sei</i>	9	8.74
<i>seb</i>	2	1.94	<i>sej</i>	101	98.06
<i>sec</i>	14	13.59	<i>eta</i>	0	0.00
<i>sed</i>	32	31.07	<i>etb</i>	0	0.00
<i>see</i>	36	34.95			

表 3 猪肉中金黄色葡萄球菌多重毒素基因型(≥ 2)的检测结果

Table 3 Multiple toxin genes profiles (≥ 2) of *S. aureus* from pork

基因类型 Genotypes	检出数 Detection number	检出率/% Detection rate	基因类型 Genotypes	检出数 Detection number	检出率/% Detection rate
<i>PVL</i> + <i>sea</i> + <i>sed</i> + <i>see</i> + <i>seg</i> + <i>sei</i> + <i>sej</i>	1	0.97	<i>sec</i> + <i>sed</i> + <i>seg</i> + <i>sei</i> + <i>sej</i>	1	0.97
<i>PVL</i> + <i>sec</i> + <i>sed</i> + <i>see</i> + <i>seg</i> + <i>sei</i>	1	0.97	<i>sea</i> + <i>sed</i> + <i>see</i> + <i>sej</i>	1	0.97
<i>PVL</i> + <i>sea</i> + <i>seb</i> + <i>see</i> + <i>sej</i>	1	0.97	<i>sea</i> + <i>see</i> + <i>seh</i> + <i>sej</i>	1	0.97
<i>PVL</i> + <i>sea</i> + <i>sed</i> + <i>see</i> + <i>seh</i>	1	0.97	<i>sed</i> + <i>seg</i> + <i>sei</i> + <i>sej</i>	2	1.94
<i>PVL</i> + <i>sea</i> + <i>sed</i> + <i>see</i> + <i>sej</i>	2	1.94	<i>sea</i> + <i>seb</i> + <i>sej</i>	1	0.97
<i>PVL</i> + <i>sec</i> + <i>sed</i> + <i>sei</i> + <i>sej</i>	1	0.97	<i>sea</i> + <i>sed</i> + <i>sej</i>	1	0.97
<i>PVL</i> + <i>sed</i> + <i>seg</i> + <i>sei</i> + <i>sej</i>	1	0.97	<i>sea</i> + <i>see</i> + <i>sej</i>	5	4.85
<i>PVL</i> + <i>sea</i> + <i>see</i> + <i>sej</i>	10	9.71	<i>sec</i> + <i>sed</i> + <i>sej</i>	2	1.94
<i>PVL</i> + <i>sec</i> + <i>sed</i> + <i>sej</i>	1	0.97	<i>sec</i> + <i>seg</i> + <i>sej</i>	1	0.97
<i>PVL</i> + <i>sec</i> + <i>sei</i> + <i>sej</i>	1	0.97	<i>sed</i> + <i>see</i> + <i>sej</i>	3	2.91
<i>PVL</i> + <i>sed</i> + <i>see</i> + <i>sej</i>	1	0.97	<i>sed</i> + <i>sei</i> + <i>sej</i>	1	0.97
<i>PVL</i> + <i>sed</i> + <i>sej</i>	1	0.97	<i>sea</i> + <i>sej</i>	12	11.65
<i>PVL</i> + <i>sei</i> + <i>sej</i>	1	0.97	<i>sec</i> + <i>sej</i>	1	0.97
<i>PVL</i> + <i>sej</i>	6	5.83	<i>sed</i> + <i>sej</i>	4	3.88
<i>sea</i> + <i>sec</i> + <i>sed</i> + <i>see</i> + <i>seh</i> + <i>sej</i>	1	0.97	<i>see</i> + <i>sej</i>	1	0.97
<i>sea</i> + <i>sec</i> + <i>see</i> + <i>seh</i> + <i>sej</i>	2	1.94	<i>seh</i> + <i>sej</i>	1	0.97
<i>sea</i> + <i>sed</i> + <i>see</i> + <i>seh</i> + <i>sej</i>	1	0.97	总计 Total	71	68.93

表 4 不同地区猪肉中金黄色葡萄球菌携带多重毒素基因(≥ 2)的检测结果

Table 4 Prevalence of *S. aureus* carrying multiple toxin genes (≥ 2) from different regions

菌种采样地区 Sampling areas	检出数 Detection number	检出率/% Detection rate	菌种采样地区 Sampling areas	检出数 Detection number	检出率/% Detection rate
陕西宝鸡 Baoji in Shaanxi	38	53.52	陕西咸阳 Xianyang in Shaanxi	4	5.63
陕西武功 Wugong in Shaanxi	2	2.82	陕西兴平 Xingping in Shaanxi	2	2.82
陕西西安 Xi'an in Shaanxi	16	22.54	陕西杨凌 Yangling in Shaanxi	9	12.68

2.3 分离 SA 的药敏测试结果

由表 5 知,不同 SA 菌株对抗菌药物的耐药性不同,其中全部菌株对甲氧苄啶(TMP)耐药,有 59 株菌对红霉素(ERY)耐药,耐药率高达 57.28%,然后依次为四环素(TET,34.95%)、庆大霉素(GEN,10.68%)、环丙沙星(CIP,3.88%)、苯唑西林(OXA,2.91%)、氯霉素(CHL,2.91%),所有菌株对头孢西丁(CEFOX)、头孢哌酮(CEFOP)、万古霉素(VAN)和阿米卡星(AMI)敏感。

由表 6 可得到 21 种耐药谱,多重耐药率达 20.39%,其中从来自陕西武功的样本中检出 1 株菌,其同时对 6 种抗菌药物有抗性;从来自陕西杨凌的样本中检出 2 株菌,同时对 5 种抗菌药物有抗性。来自杨凌、咸阳、西安的样本中同时对 4 种抗菌药物有抗性的菌株比例为 2:1:2。在这些耐药谱中,含有红霉素的有 95.24%(20/21),含有四环素的有 90.48%(19/21)。

表 5 猪肉中 103 株金黄色葡萄球菌的耐药性检测结果

Table 5 Separate results of antimicrobials resistance from 103 stains *S. aureus* isolated from pork

抗菌药物 Antimicrobials	耐药菌株数 Resistance number	耐药率/% Resistance rate	抗菌药物 Antimicrobials	耐药菌株数 Resistance number	耐药率/% Resistance rate
ERY(≥8)	59	57.28	CHL(≥32)	3	2.91
OXA(≥4)	3	2.91	TMP(≥8)	103	100.00
CEFOX(≥4)	0	0.00	AMI(≥32)	0	0.00
CEFOP(≥64)	0	0.00	CIP(≥4)	4	3.88
VAN(≥2)	0	0.00	GEN(≥8)	11	10.68
TET(≥16)	36	34.95			

表 6 猪肉中 103 株金黄色葡萄球菌的多重耐药性检测结果

Table 6 Multiple results of antimicrobials resistance from 103 stains *S. aureus* isolated from pork

抗菌药物类型 Antimicrobials types	检出数 Detection number	检出率/% Detection rate	抗菌药物类型 Antimicrobials types	检出数 Detection number	检出率/% Detection rate
TMP+ERY+TET+OXA+CHL+GEN	1	0.97	TMP+ERY+OXA	1	0.97
TMP+ERY+TET+CIP+GEN	2	1.94	TMP+ERY+GEN	1	0.97
TMP+ERY+TET+OXA	1	0.97	TMP+ERY+TET	10	9.71
TMP+ERY+TET+CHL	1	0.97	TMP+TET+CIP	1	0.97
TMP+ERY+TET+GEN	3	2.91	总计 Total	21	20.39

从表 7 可以看出,猪肉中金黄色葡萄球菌的多重耐药率以西安地区最高,达到 61.90%;然后依次为杨凌(23.81%)、武功(9.52%)、咸阳(4.76%);在来自宝鸡和兴平的样本中,未检测到有多重耐药性的 SA 菌株。

表 7 不同地区猪肉中金黄色葡萄球菌的耐药性检测结果

Table 7 Results of antimicrobials resistance from *S. aureus* isolated from pork in different regions

菌种采样地区 Sampling areas	检出数 Detection number	总计 Total	检出率/% Detection rate	菌种采样地区 Sampling areas	检出数 Detection number	总计 Total	检出率/% Detection rate
陕西武功 Wugong in Shaanxi	2	21	9.52	陕西西安 Xi'an in Shaanxi	13	21	61.90
陕西咸阳 Xianyang in Shaanxi	1	21	4.76	陕西杨凌 Yangling in Shaanxi	5	21	23.81

3 讨论

金黄色葡萄球菌是一种重要的食源性致病菌,特别是近年来,“超级细菌”耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的出现,使金黄色葡萄球菌更加引起了世界各地的高度关注。有报道称,用添加有头孢西丁和苯唑西林的 BP 平板可以筛选 MRSA^[5]。在本试验中,用 BP 平板以及分别添加有头孢西丁和苯唑西林的 BP 平板对猪肉中的金黄色葡萄球菌和 MRSA 进行初步筛选,分别得到 130 株可疑 SA、4 株和 36 株可疑 MRSA 菌,对筛选出的菌株进行 *nuc* 基因和 *mecA* 基因检测,结果显示,130 株可疑 SA 菌株中有 103 株为 SA 阳性,未检测出 MRSA 菌株;40 株可疑 MRSA 菌株则均为 MRSA 阴性菌株。试验结果说明,用 BP 平板中添加头孢西丁和苯唑西林的方法筛选 MRSA,值得进一步研究。在本研究中,虽然没有发现 MRSA 菌株,但不能因此

放松对 MRSA 菌株的检测。据报道^[11],MRSA 菌株的产生可能是在临床用药过程中使用了 β-内酰胺类抗菌药物所致,这提醒人们在临床中应合理使用抗菌药物。

从本研究结果可以看出,猪肉中 PVL 的检出率为 34.95%,这与 Udo 等^[12]和 Gillet 等^[9]报道的人分离株的 PVL 检出率小于 4.5%和 9%存在较大差异;毒素基因的污染以 *sej* 基因最严重,为 98.06%,这与曹虹^[13]报道的金黄色葡萄球菌肠毒素中以 *sea* 为主的现象并不一致,说明不同来源的金黄色葡萄球菌毒素基因携带程度不同。不同地区猪肉中金黄色葡萄球菌多重毒素基因型的统计结果表明,陕西宝鸡地区检出率最高,远高于排在第 2 位的西安,说明宝鸡地区金黄色葡萄球菌存在较高的安全隐患,同时也说明不同地区的金黄色葡萄球菌携带的毒素基因也不同。因此,在肉及其制品的检测中,相关部门应加强毒素基因的检测,为消费者提

供放心的肉制品。

另外,金黄色葡萄球菌基因组含有多种 IS 元件、原噬菌体序列和致病基因岛等可移动元件,这些可移动元件的转移,是导致金黄色葡萄球菌肠毒素基因和高致病力毒株不断产生的主要原因^[14]。据报道,金黄色葡萄球菌的 *sed* 和 *sej* 基因在同一个质粒 pIB485 上,检测时都会同时检测到^[15];也有报道指出,金黄色葡萄球菌的 *seg* 和 *sei* 基因同属于一个肠毒素基因族(the same enterotoxin gene cluster, egc),检测时都会同时检测到^[16]。在本试验的检测中,*seg* 和 *sei* 基因同时检测到的概率达 54.55%(6/11),*sed* 和 *sej* 基因同时检测到的概率达 18.31%(13/71),这与报道的 *sed* 和 *sej*、*seg* 和 *sei* 具有连锁关系的现象并不一致,具体原因有待深入研究。

近年来,细菌的耐药性问题已成为公共关注的社会性问题,从本研究结果可以看出,金黄色葡萄球菌存在着严重耐药和多重耐药的状况,由于细菌的质粒可以在细菌个体间相互转移,所以位于金黄色葡萄球菌质粒上的多重耐药性基因也可转移^[17],因此必须对这些菌株加以重视并深入研究。本次试验结果显示,金黄色葡萄球菌对甲氧苄啶的耐药情况最为严重,已达到 100.00%,这与刘冬香等^[18]报道的金黄色葡萄球菌对甲氧苄啶的耐药率为 80.7% 有一定差距,可能与生猪生产过程中过度使用甲氧苄啶,从而导致高耐药率的产生有关。因此,在生猪生产过程中,相关部门应监管抗菌药物的使用,为消费者提供放心的肉制品。

药敏试验对临床用药有着指导性意义,试验菌株对头孢西丁、头孢哌酮、万古霉素和环丙沙星敏感,说明这 4 种抗菌药物在临床治疗中可优先选用,但应避免滥用、乱用,以减缓菌株耐药性的蔓延。通过对陕西关中地区猪肉中金黄色葡萄球菌菌株的耐药性分析可知,来自西安地区的样本分离出来的菌株多重耐药性最强,概率高达 61.90%,然后依次为杨凌(23.81%)、武功(9.52%)、咸阳(4.76%)。这些数据说明,不同地区菌株的多重耐药率不同,西安地区的猪肉制品耐药性较强,对抗菌药物敏感性较低,这可能是由于在临床上使用的抗菌药物比较多,导致该地区猪肉中金黄色葡萄球菌的耐药性比其他地区强,因此,应该对抗菌药物的使用加以控制,避免猪肉中金黄色葡萄球菌耐药性的进一步增强。

从本次研究结果还可以看出,在多重耐药谱中,含有红霉素的有 95.24%(20/21),而耐红霉素的菌

株中含有 *sej* 基因的有 98.68%(75/76),为什么比例会接近于 1:1,红霉素的使用和含 *sej* 基因的毒素携带之间是否存在某种联系,还有待进一步探究。

[参考文献]

- [1] 赵富玺,姜国枢. 医学微生物学 [M]. 北京:人民军医出版社,1999:16-39.
Zhao F X, Jiang G S. Medical microbiology [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 1999: 16-39. (in Chinese)
- [2] 林居纯,马 驰,陈雅莉,等. 禽源金黄色葡萄球菌耐药性检测 [C]. 北京:中国畜牧兽医学会,2009.
Lin J C, Ma C, Chen Y L, et al. Characterization of antimicrobial susceptibility of Avian *Staphylococcus aureus* [C]. Beijing: China Animal Husbandry and Veterinary Association, 2009. (in Chinese)
- [3] 肖异珠,杨致邦. 金黄色葡萄球菌表皮剥脱毒素致病作用与机体防御机制研究进展 [J]. 中国皮肤性病学杂志,2009,23(7): 443-445.
Xiao Y Z, Yang Z B. Pathogenic effects of *Staphylococcus aureus* exfoliation toxin and the progress of the body's defense mechanisms [J]. Chinese Journal of Dermatology and Venereology, 2009, 23(7): 443-445. (in Chinese)
- [4] Fuda C, Suvorov M, Vakulenko S B, et al. The basis for resistance to β lactam antibiotics by penicillin binding protein 2a of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. J Biol Chem, 2004, 279(39): 40802.
- [5] 朱以军,李向阳. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌五种表型检测法的评价 [J]. 江西医学检验,2007,25(2): 122-124.
Zhu Y J, Li X Y. The evaluation of five phenotypic detection methods of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Jiangxi Journal of Medical Laboratory Sciences, 2007, 25(2): 122-124. (in Chinese)
- [6] Merlino J, Watson J, Rose B, et al. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia [J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 49: 793-801.
- [7] Zhang K, Sparling J, Chow B L, et al. New quadruplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(11): 4947-4955.
- [8] 王 琴,杨丽美,骆方军,等. 金黄色葡萄球菌耐药性及 *mecA*、*qacA/B* 和 *pvl* 基因检测 [J]. 中华临床感染病杂志,2009,2(2): 102-105.
Wang Q, Yang L M, Luo F J, et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and genetic testing of *mecA*, the *qacA/B* and the *pvl* [J]. China Clinical Infectious Diseases, 2009, 2(2): 102-105. (in Chinese)
- [9] Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for *Panton-Valentine leukocidin* and highly lethal necrotising pneumonia in young im-

munocompetent patients [J]. Lancet, 2002, 359 (9308): 753-759.

[10] Peles F, Wagner M, Varga L, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary [J]. Int J Food Microbiol, 2007, 118(2): 186-193.

[11] 申颖娇. 革兰阳性球菌耐药性监测分析及金黄色葡萄球菌耐药基因与耐消毒剂基因的检测 [D]. 太原: 山西医科大学, 2011.

Shen Y J. Analysis of drug resistance surveillance of Gram-positive cocci and the detection of resistance genes and disinfectant-resistant genes of *Staphylococcus aureus* [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2011. (in Chinese)

[12] Udo E E, Al-Mufti S, Albert M J. The prevalence of antimicrobial resistance and carriage of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food handlers in Kuwait City restaurants [J]. BMC Res Notes, 2009, 2: 108.

[13] 曹虹. 金黄色葡萄球菌肠毒素基因的检测及耐药性分析 [D]. 长沙: 中南大学, 2009.

Cao H. Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* [D]. Changsha: Central South University, 2009. (in Chinese)

[14] 李琳, 黄金海, 赵耘, 等. 葡萄球菌肠毒素基因分型 PCR 检测技术的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(7): 340-344.

Li L, Huang J H, Zhao Y, et al. The research of the enterotoxin genotyping PCR detection of *Staphylococcus* [J]. Food Science, 2008, 29(7): 340-344. (in Chinese)

[15] Zhang S, Iandolo J J, Stewart G C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*) [J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 168(2): 227-233.

[16] Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, et al. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(3): 857-862.

[17] Fernando C, Julian D. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria [J]. Trends Microbiol, 2000, 133: 128-133.

[18] 刘冬香. 动物性食品源金黄色葡萄球菌的耐药分析及 *blaZ*、*mecA* 和 *nuc* 基因的多重 PCR 检测 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.

Liu D X. Characterization of antimicrobial susceptibility of animal food sources of *Staphylococcus aureus* and multiple PCR detection of *blaZ*, *mecA* and *nuc* genes [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2009. (in Chinese)

(上接第 164 页)

[17] 潘英华, 康绍忠. 灌溉水在灌水沟的渗漏和作物在交替隔沟灌下对水分的利用 [J]. 农业工程学报, 2000, 16(1): 39-43.

Pan Y H, Kang S Z. Irrigation water infiltration in furrows and crop water use of alternative furrow irrigation [J]. Trans of CSAE, 2000, 16(1): 39-43. (in Chinese)

[18] 康绍忠, 潘英华, 石培泽, 等. 控制性作物根系分区交替灌溉的理论与试验 [J]. 水利学报, 2001, 11(11): 80-86.

Kang S Z, Pan Y H, Shi P Z, et al. Controlled root-divided alternative irrigation: theory and experiments [J]. Journal of Hydraulic, 2001, 11(11): 80-86. (in Chinese)

[19] Ben-Asher J, Silberbush M. Root distribution under trickle irrigation: Factors affecting distribution and comparison among methods of determination [J]. Plant Nutr, 1992, 15(4): 783-794.

[20] 王韶唐. 植物抗旱的生理机理 [J]. 植物生理生化进展, 1983(2): 120-133.

Wang S T. Plant drought-resistance physiology [J]. Plant Physiological and Biochemical Progress, 1983(2): 120-133. (in Chinese)

[21] Nakamoto T. Effect of soil water content on the gravitropic behavior of nodal roots in maize [J]. Plant and Soil, 1993, 15(3): 261-267.

[22] 冯广龙, 刘昌明, 王立. 土壤水分对作物根系生长及分布的调控作用 [J]. 农业生态研究, 1996, 9(3): 5-9.

Feng G L, Liu C M, Wang L. Roles of soil water in regulating root growth and distribution [J]. Eco-Agricultural Research, 1996, 9(3): 5-9. (in Chinese)