

网络出版时间:2018-09-06 17:30

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.03.003

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180906.1723.006.html

宠物犬源沙门氏菌和葡萄球菌耐药性及 耐药基因检测

轩慧勇,林亚军,高 超,吾买尔江·牙合甫,夏利宁

(新疆农业大学 动物医学学院,新疆 乌鲁木齐 830052)

【摘 要】 【目的】了解新疆乌鲁木齐市宠物犬源沙门氏菌和葡萄球菌的耐药性及耐药基因携带情况。【方法】从 77 份宠物犬直肠粪便样品中分离沙门氏菌和葡萄球菌,采用琼脂稀释法对分离的菌株进行药敏试验,通过 PCR 方法对沙门氏菌 6 类 23 种耐药基因和葡萄球菌 5 类 9 种耐药基因进行检测。【结果】从 77 份宠物犬粪便样品中分离到沙门氏菌 36 株,葡萄球菌 75 株。除头孢噻唑、安普霉素、阿米卡星、硫酸庆大霉素和多黏菌素外,宠物犬源沙门氏菌对其他被检抗菌药物的耐药率高达 97.0% 以上,多重耐药以 8 耐为主, *tetB*、*bla*_{TEM}、*bla*_{OXA}、*qnrS*、*oqx*A、*oqx*B、*aac*(6')-*Ib-cr*、*ant*(3'')-*Ia* 和 *floR* 基因检出率在 97.0% 以上。宠物犬源葡萄球菌对左氧氟沙星(93.5%)、苯唑西林(90.7%)和氟苯尼考(82.9%)耐药率在 80.0% 以上,多重耐药集中在 4 耐、6 耐和 9 耐,主要检出的基因为 *fexA* (40.0%,30/75)和 *femA*(18.7%,14/75),其次为 *tetM*(16.0%,12/75)、*ermB*(14.7%,11/75)和 *mecA*(1.3%,1/75)。【结论】宠物犬源沙门氏菌和葡萄球菌耐药情况严重,耐药基因携带率高,使宠物犬的细菌性疾病治疗难度加大,应加强耐药菌的监测,降低宠物犬源耐药菌转移给人的潜在风险。

【关键词】 宠物犬;沙门氏菌;葡萄球菌;耐药性;耐药基因检测

【中图分类号】 S859.7

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)03-0014-07

Detection of drug resistance and resistant genes of *Salmonella* and *Staphylococcus* from pet dog

XUAN Huiyong, LIN Yajun, GAO Chao, WUMAIERJIANG · Yahefu, XIA Lining

(College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: 【Objective】 This study investigated the resistance and resistant genes of *Salmonella* and *Staphylococcus* isolates from feces of pet dog against antibacterial drugs in Urumqi, Xinjiang. 【Method】 *Salmonella* and *Staphylococci* were isolated from 77 pet dog rectal feces samples. Agar dilution method was used to test the susceptibility of the isolates. The PCR method was used to detect 23 resistant genes of 6 kinds of *Salmonella* and 9 resistant genes of 5 kinds of *Staphylococcus*. 【Result】 A total of 36 strains of *Salmonella* and 75 strains of *Staphylococcus* were isolated. Except ceftiofur, apramycin, amikacin, gentamicin and polymyxin, the resistant rates of *Salmonella* isolates against other detected antimicrobial agents were above 97.0%. The multidrug resistance strains mainly focused on 8 kinds of drug resistance, and the detection rates of *tetB*、*bla*_{TEM}、*bla*_{OXA}、*qnrS*、*oqx*A、*oqx*B、*aac*(6')-*Ib-cr*、*ant*(3'')-*Ia* and *floR* genes were larger than 97.0%. The resistant rates of *Staphylococcus* against levofloxacin (93.5%), oxacillin (90.7%) and florfenicol (82.9%) were higher than 80.0%. The multidrug resistance results of *Staphylococcus* were

【收稿日期】 2018-01-03

【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】 轩慧勇(1991—),女,新疆乌苏人,硕士,主要从事兽医药理与毒理学研究。E-mail:18935881007@163.com

【通信作者】 夏利宁(1975—),女,湖南宁乡人,教授,博士,主要从事兽医药理与毒理学研究。E-mail:xlx750530@163.com

concentrated on 4 types, 6 types and 9 types. The main detected genes were *fexA* (40.0%, 30/75) and *femA* (18.7%, 14/75), followed by *tetM* (16.0%, 12/75), *ermB* (14.7%, 11/75) and *mecA* (1.3%, 1/75).

【Conclusion】The drug resistance of *Salmonella* and *Staphylococcus* was severe, and the resistance gene-carrying rates were high, resulting in difficult treatment of bacterial diseases in pet dogs. The monitoring of drug-resistant bacteria should be strengthened to reduce the potential risk of transfer of drug-resistant bacteria from pet dogs.

Key words: pet dog; *Salmonella*; *Staphylococcus*; resistance; detection of resistance genes

沙门氏菌和葡萄球菌是动物肠道菌群的组成部分,分别是革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的典型代表,广泛分布于自然环境,是人医和兽医临床感染中最为重要和常见的致病菌,而肠道内菌群丰富,是共生菌最大的“蓄水库”^[1]。细菌性疾病主要使用抗菌药物治疗,但临床上抗菌药物的长期、大量、不规范使用,导致耐药性问题已成为全世界不得不面对的难题之一。研究表明,沙门氏菌和葡萄球菌携带有大量的耐药基因,并且各种肠道菌间存在分享耐药基因的可能^[1]。

宠物犬作为人们生活中的亲密伙伴,甚至被视为“家庭一员”,但其携带肠道菌的现状及耐药情况不明,人类与宠物犬经常亲密接触,如果宠物犬携带含有耐药基因的肠道菌,在接触过程中传递给人的风险就会比较大,从而威胁人的健康和公共卫生安全。此外,目前在相同用药情况下,对宠物犬体内革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌耐药情况是否存在差异,鲜见报道。因此,本研究对乌鲁木齐市宠物犬源沙门氏菌和葡萄球菌的耐药性及耐药基因进行检测,以期为指导临床合理用药和进一步研究耐药性的传递机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品 2015年3月在新疆乌鲁木齐市多个宠物医院进行样品采集,使用灭菌肛拭子在宠物犬的直肠采集新鲜粪样共77份。从中分离试验用沙门氏菌和葡萄球菌。

1.1.2 菌株与培养基 大肠埃希菌标准质控菌(ATCC25922)和金黄色葡萄球菌标准质控菌(ATCC29213),购自杭州天和微生物试剂有限公司;Mueller-Hinton(MH)培养基、氯化镁孔雀绿增菌液(MM)、麦康凯培养基、SS琼脂、沙门氏菌显色培养基、琼脂粉、亚硫酸盐卵黄增菌液,购自北京奥博星生物技术有限公司;Baird-Parker琼脂基,购自青岛高科园海博生物技术有限公司。

1.1.3 药品 喹诺酮类(PMQR):环丙沙星(Cip)、诺氟沙星(Nof)、左氧氟沙星(Lev)和恩诺沙星(Enr); β -内酰胺类:阿莫西林/克拉维酸(A/C)、头孢噻唑(Cef)、氨苄西林(Amp)和苯唑西林(Ox);氨基糖苷类:安普霉素(Apr)、阿米卡星(Amk)、硫酸庆大霉素(Gen)和卡那霉素(Kana);四环素类:四环素(Tet);酰胺醇类:氟苯尼考(Flr);安莎霉素类:利福平(Ra);多肽类:多黏菌素(Cl)。上述药物标准品均购自中国兽药监察所。

1.2 方法

1.2.1 沙门氏菌的分离鉴定 将采集的粪便样品放入含1 mL灭菌营养肉汤的2 mL EP管中,37℃恒温培养12 h,用接种环将培养液在SS培养基上划线,37℃恒温培养18~24 h后,SS培养基上生长出中间黑色周边无色菌落,挑取单菌落作为疑似沙门氏菌保存备用。

对分离的疑似沙门氏菌进行*invA*基因的PCR检测,检出*invA*基因的菌确定为沙门氏菌。根据文献[2]设计引物,*invA*-F: 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3',*invA*-R: 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA-3',扩增目的片段长度为284 bp。PCR扩增反应体系 25 μ L: 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, 上、下游引物各1 μ L, 模板1 μ L。反应程序: 95℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 58.5℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 34个循环; 最后72℃延伸5 min。PCR产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 葡萄球菌的分离鉴定 将沾有粪样的肛拭子放入内含7.5 g/L NaCl的1 mL灭菌营养肉汤EP管中,置于恒温摇床振荡培养24 h进行增菌。用接种环蘸取增菌培养物,划线于Baird-Parker琼脂培养基(内加有亚硫酸盐卵黄增菌液),于37℃恒温培养24~48 h。葡萄球菌属细菌在Baird-Parker琼脂培养基上的典型菌落形态为:圆形,表明光滑、凸起,菌落颜色从灰色至黑色不等,中等大小,菌落周围可能出现透明的溶卵黄圈。挑取具有典型菌落

特征的疑似菌落,进行纯培养。菌落纯化后,对分离出的疑似葡萄球菌进行革兰氏染色镜检,选取镜下观察为革兰氏阳性,呈葡萄串状排列的菌株(无芽胞,无荚膜,直径为 0.5~1 μm),用接种环取镜检培养物在一张洁净玻片中央,滴加质量分数 3% 过氧化氢后观察,若有气泡出现则为触酶试验阳性,即确定为葡萄球菌。

1.2.3 药敏试验 按美国临床实验室标准委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute,CL-SI)推荐的琼脂稀释法,对分离的沙门氏菌和葡萄球菌进行临床常用抗菌药物的最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration,MIC)测定,以 ATCC25922 大肠埃希菌作为沙门氏菌的标准质控,ATCC29213 金黄色葡萄球菌作为葡萄球菌的标准质控,如上述标准质控菌对被检抗菌药物的 MIC 在质控范围内,且阳性对照有细菌生长,阴性对照无细菌生长,则试验测得的 MIC 结果有效。判定方法为:能形成菌落的菌判定为耐药菌,未能形成菌落的菌判定为敏感菌,介于耐药菌和敏感菌之间的判定为中介菌^[3]。

1.2.4 DNA 模板的制备 将试验用沙门氏菌和葡萄球菌划线接种于 LB 平板,37 ℃ 培养 18~24 h,刮取 1~2 接种环菌苔加入 150 μL 灭菌超纯水中,涡旋混匀,100 ℃ 煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-20 ℃ 保存。

1.2.5 耐药基因的检测 根据文献[4-15],对分离出的沙门氏菌进行耐氟喹诺酮类药物基因(包括 *qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrS*、*oqxA*、*oqxB* 和 *aac(6′)-Ib*)、耐 β 内酰胺类药物基因(包括 *bla_{TEM}*、*bla_{CTX-M}*、*bla_{SHV}*、*bla_{LAP-1}*、*bla_{KPC}*、*bla_{OXA}* 和 *bla_{CMY-2}*)、耐氨基糖苷类药物基因(包括 *armA*、*rmtB*、*aadA2* 和 *ant(3′′)-Ia*)、耐四环素类药物基因(包括 *tetA* 和 *tetB*)、耐酰胺醇类药物基因(*floR*)和耐多肽类药物基因(*mcr-1*) PCR 检测。根据文献[16],对分离出的葡萄球菌进行耐酰胺醇类药物基因(包括 *cfr*、

fexA 和 *fexB*) PCR 检测;根据文献[13,17-18]对分离出的葡萄球菌进行耐喹诺酮类药物基因(*norA*)、耐大环内酯类-林可胺类药物基因(*ermB*)、耐四环素类药物基因(*tetM* 和 *tetA*)及耐 β 内酰胺类药物基因(*mecA* 和 *femA*) PCR 检测。试验所用引物均由上海生物工程股份有限公司合成。

扩增产物经 1.0% 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上海生物工程股份有限公司测序,进行比对,确定基因型。对检测出 *aac(6′)-Ib* 基因的 PCR 产物进一步用 *BstF5 I* 酶进行酶切,若有-*cr* 变异存在,则 *aac(6′)-Ib* 基因丢失 *BstF5 I* 酶的酶切位点,通过凝胶电泳图的条带情况即可得知 *aac(6′)-Ib* 基因是否存在-*cr* 变异。

2 结果与分析

2.1 沙门氏菌和葡萄球菌的分离鉴定

对采集的 77 份宠物犬粪便样品进行沙门氏菌和葡萄球菌的分离鉴定,结果显示:分离出沙门氏菌 36 株,分离率为 46.7%;分离出葡萄球菌 75 株,分离率为 97.4%。

2.2 沙门氏菌和葡萄球菌的耐药性检测

由表 1 可知,宠物犬源沙门氏菌对被检药物的耐药情况普遍较为严重,对诺氟沙星、恩诺沙星、氨苄西林、卡那霉素、四环素和氟苯尼考的耐药率均高达 100%,对环丙沙星和阿莫西林/克拉维酸的耐药率高达 97.2%(35/36)。对头孢噻唑、安普霉素、阿米卡星、硫酸庆大霉素和多黏菌素高度敏感。

由表 1 还可知,宠物犬源葡萄球菌对左氧氟沙星耐药率最高(93.5%,70/75);其次对苯唑西林(90.7%,68/75)和氟苯尼考(82.9%,62/75)耐药率较高;对阿米卡星(34.1%,25/75)和硫酸庆大霉素(32.8%,24/75)耐药率相对较低。

表 1 宠物犬源沙门氏菌和葡萄球菌对被检药物的耐药性

Table 1 Resistance rates of <i>Salmonella</i> and <i>Staphylococcus</i> from pet dogs against antimicrobial agents %						
药物 Drug	沙门氏菌(<i>n</i> =36) <i>Salmonella</i> (<i>n</i> =36)			葡萄球菌(<i>n</i> =75) <i>Staphylococcus</i> (<i>n</i> =75)		
	敏感率 Sensitive rate	中介率 Intermediate sensitivity	耐药率 Resistant rate	敏感率 Sensitive rate	中介率 Intermediate sensitivity	耐药率 Resistant rate
环丙沙星 Ciprofloxacin	2.8	0	97.2	—	—	—
诺氟沙星 Norfloxacin	0	0	100	—	—	—
恩诺沙星 Enrofloxacin	0	0	100	13.3	22.7	64.0
左氧氟沙星 Levofloxacin	—	—	—	2.7	3.8	93.5
阿莫西林/克拉维酸 Amoxicillin/clavulanic acid	2.8	0	97.2	45.3	0	54.7
苯唑西林 Oxacillin	—	—	—	9.3	0	90.7

表 1(续) Continued Table 1

药物 Drug	沙门氏菌(<i>n</i> =36) <i>Salmonella</i> (<i>n</i> =36)			葡萄球菌(<i>n</i> =75) <i>Staphylococcus</i> (<i>n</i> =75)		
	敏感率 Sensitive rate	中介率 Intermediate sensitivity	耐药率 Resistant rate	敏感率 Sensitive rate	中介率 Intermediate sensitivity	耐药率 Resistant rate
头孢噻呋 Ceftiofur	100	0	0	53. 3	5. 1	41. 6
氨苄西林 Ampicillin	0	0	100	—	—	—
安普霉素 Apramycin	100	0	0	—	—	—
阿米卡星 Amikacin	100	0	0	50. 7	15. 2	34. 1
硫酸庆大霉素 Gentamicin	100	0	0	50. 7	16. 5	32. 8
卡那霉素 Kanamycin	0	0	100	—	—	—
四环素 Tetracycline	0	0	100	17. 3	15. 2	67. 5
氟苯尼考 Florfenicol	0	0	100	13. 3	3. 8	82. 9
多黏菌素 Polymyxin	100	0	0	—	—	—
利福平 Rifampin	—	—	—	30. 7	13. 9	55. 4

注:“—”代表未做此抗菌药物。
Note:“—” representative did not do the antibacterial.

2.3 沙门氏菌和葡萄球菌的多重耐药性检测

对试验结果进行多重耐药统计。统计方法为:对被检抗菌药物中的 1 种抗菌药物耐药统计为 1 耐,对被检抗菌药物中的 2 种抗菌药物耐药统计为 2 耐,以此类推。多重耐药结果(表 2)表明,宠物犬源沙门氏菌对被检药物存在严重的多重耐药性,多

重耐药以 8 耐为主,为 97. 2%(35/36);宠物犬源葡萄球菌多重耐药在 0~10 耐均有分布,其中以 4 耐(13. 3%, 10/75)、6 耐(13. 3%, 10/75)和 9 耐(16. 0%, 12/75)为主,其次为 5 耐(12. 0%, 9/75)、8 耐(10. 7%, 8/75)和 10 耐(10. 7%, 8/75)。

表 2 宠物犬源沙门氏菌和葡萄球菌多重耐药性检测结果

指标 Index	耐药种数 Resistance number											%
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
沙门氏菌多重耐药率 Resistant rates in <i>Salmonella</i>	0	0	0	0	0	0	2. 8	0	97. 2	0	0	
葡萄球菌多重耐药率 Resistant rates in <i>Staphylococcus</i>	2. 7	1. 3	4. 0	9. 3	13. 3	12. 0	13. 3	6. 7	10. 7	16. 0	10. 7	

2.4 沙门氏菌和葡萄球菌的耐药谱型

宠物犬源沙门氏菌耐药谱型单一,以 8 耐谱型为主,其耐药谱型为 Cip-Nof-Enr-A/C-Amp-Kana-Tet-Flr。宠物犬源葡萄球菌共有 37 种耐药谱型,以 4 耐、6 耐和 9 耐谱型为主,4 耐谱型中以 Tet-Flr-Lev-Ox(5. 3%, 4/75)和 Flr-Lev-Ox-Enr(5. 3%, 4/75)

较为常见,6 耐谱型中以 Tet-Flr-Ra-Lev-Ox-Enr(8. 0%, 6/75)较为常见,9 耐谱型中以 Gen-Tet-Flr-Ra-Lev-Cef-A/C-Ox-Enr(9. 3%, 7/75)较为常见。

2.5 沙门氏菌和葡萄球菌耐药基因检测

对 36 株沙门氏菌进行 23 种耐药基因检测,结果如表 3 所示。

表 3 宠物犬源沙门氏菌耐药基因检测结果

Table 3 Detection of resistant genes in <i>Salmonella</i> from pet dog						%
药物 Drug	基因 Gene	检出率 Relevance ratio		药物 Drug	基因 Gene	检出率 Relevance ratio
β-内酰胺类 β-lactams	<i>bla</i> _{TEM}	97. 2(35/36)		氟喹诺酮类 (PMQR) Quinolones	<i>qnrA</i>	0
	<i>bla</i> _{SHV}	0			<i>qnrB</i>	0
	<i>bla</i> _{CMY-2}	0			<i>qnrC</i>	0
	<i>bla</i> _{KPC}	0			<i>qnrD</i>	0
	<i>bla</i> _{LAP-1}	0			<i>qnrS</i>	97. 2(35/36)
	<i>bla</i> _{OXA}	97. 2(35/36)			<i>oqx</i> <i>A</i>	97. 2(35/36)
多肽类 Polymyxins	<i>bla</i> _{CTX-M}	0			<i>oqx</i> <i>B</i>	97. 2(35/36)
	<i>mcr-1</i>	0			<i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i>	97. 2(35/36)
	<i>armA</i>	0		四环素类 Tetracyclines	<i>tetA</i>	0
氨基糖苷类 Aminoglycoside	<i>rmtB</i>	0			<i>tetB</i>	100. 0(36/36)
	<i>aadA2</i>	72. 2(26/36)		酰胺醇类 Amide alcohols	<i>floR</i>	97. 2(35/36)
	<i>ant</i> (3″)- <i>Ia</i>	97. 2(35/36)				

由表 3 可知,宠物犬源沙门氏菌对被检耐药基因的携带率较高。*bla*_{TEM}和*bla*_{OXA} β-内酰胺酶基因

的检出率均为 97.2%; *qnrS*、*oqx*A、*oqx*B 和 *aac*(6′)-*Ib-cr* 基因的检出率均为 97.2%; 对 *aac*(6′)-*Ib* 的 PCR 产物用 *Bst*F5 I 酶进行酶切, 结果全部存在-*cr* 变异, *aadA2* 和 *ant*(3′′)-*Ia* 氨基糖苷类基因的检出率分别为 72.2% 和 97.2%; *tetB* 四环素类基因的检出率为 100.0%; *floR* 酰胺醇类基因的检出率为 97.2%。未检出 *bla*_{SHV}、*bla*_{CMY-2}、*bla*_{KPC}、*bla*_{LAP-1}、*bla*_{CTX-M}、*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*armA*、*rmtB*、*tetA* 和 *mcr-1* 基因。

对 75 株葡萄球菌进行 9 种耐药基因检测结果见表 4。由表 4 可知, 葡萄球菌中 *fexA* 基因检出率最高(40.0%, 30/75); *femA*、*tetM*、*ermB* 和 *mecA* 耐药基因检出率依次为 18.7%, 16.0%, 14.7%, 1.3%; 未检出 *cfr*、*fexB*、*norA* 和 *tetA* 基因。

表 4 宠物犬源葡萄球菌耐药基因检测结果
Table 4 Detection of resistant genes in *Staphylococcus* isolated from pet dog

药物 Drug	基因 Gene	检出率/% Relevance ratio
酰胺醇类 Amide alcohols	<i>cfr</i>	0
	<i>fexA</i>	40.0(30/75)
	<i>fexB</i>	0
喹诺酮类 Quinolones	<i>norA</i>	0
大环内酯类-林可胺类 Macrolide -lincomamines	<i>ermB</i>	14.7(11/75)
四环素类 Tetracyclines	<i>tetA</i>	0
	<i>tetM</i>	16.0(12/75)
β-内酰胺类 β-lactams	<i>mecA</i>	1.3(1/75)
	<i>femA</i>	18.7(14/75)

3 讨 论

3.1 宠物犬源沙门氏菌和葡萄球菌耐药性

本试验从临床同一批宠物犬粪样中同时分离沙门氏菌(革兰氏阴性菌)和葡萄球菌(革兰氏阳性菌), 进行药敏试验和相关耐药基因的检测, 耐药结果显示: 36 株宠物犬源沙门氏菌对 6 种被检抗菌药物全部耐药, 耐药率(0~100%) 远高于王元兰^[19]报道的犬源沙门氏菌对被检药物耐药率(0~30%); 对被检抗菌药物安普霉素、阿米卡星、硫酸庆大霉素和多粘菌素完全敏感。75 株宠物犬源葡萄球菌对被检药物的耐药率在 32.8%~93.5%, 且对被检抗菌药物中的 7 种抗菌药物耐药率均高于 50%, 与冯言言等^[20]报道的广东省宠物源葡萄球菌部分耐药结果(对克林霉素和四环素耐药率在 80.0% 以上, 对硫酸庆大霉素和阿米卡星有较好的敏感性)一致, 但高于周传铎等^[21]报道的北京犬源葡萄球菌耐药率

(对阿莫西林、阿米卡星和氟苯尼考全部敏感, 对克林霉素耐药率也仅为 8.7%)。

由于革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌在临床治疗时用药有差别, 因此本试验根据临床用药特点, 分别对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌各自侧重的窄谱抗菌药物进行药敏试验, 对试验结果进一步的分析发现, 当沙门氏菌对被检抗菌药物耐药率很高时, 葡萄球菌对该药的耐药率也高于 50%(如: 恩诺沙星、阿莫西林/克拉维酸、四环素和氟苯尼考), 反之当沙门氏菌对被检抗菌药物高度敏感时, 葡萄球菌对该药的耐药率也会相对较低(如: 头孢噻唑、阿米卡星和硫酸庆大霉素), 由此可以看出, 当使用抗菌药物进行疾病治疗时, 对动物体内革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌同时会产生影响。虽然宠物犬粪源分离的沙门氏菌和葡萄球菌耐药结果略有差异, 但革兰氏阴性菌的耐药结果与革兰氏阳性菌的耐药性呈正相关, 且整体来看耐药结果都很严重。故建议在今后的治疗过程中, 不仅要根据药敏试验结果合理选用抗菌药物, 还要规范使用抗菌药物^[22]。

3.2 宠物犬源沙门氏菌和葡萄球菌多重耐药性

本试验中分离的宠物犬源沙门氏菌多重耐药谱型宽, 以 8 耐为主, 与黄凯等^[23]对动物源沙门氏菌多重耐药的报道(6 耐及 6 耐以上占 90.16%) 一致, 但是耐药谱型单一, 分析原因可能是沙门氏菌分离率较低, 造成样品数量偏少, 导致耐药谱型单一。但同一批样品中分离的 75 株宠物犬源葡萄球菌多重耐药在 0~10 耐均有分布, 其中 4 耐、6 耐和 9 耐的多重耐药率占 42.6%(32/75), 低于曾婉秋等^[24]对成都地区犬源葡萄球菌的报道(80.0% 以上的菌为多重耐药菌)。整体来说, 宠物犬源沙门氏菌和葡萄球菌的多重耐药严重。此外, 本研究发现, 宠物犬源葡萄球菌(革兰氏阳性菌)耐药谱型多样化, 这可能与革兰氏阳性菌遗传背景多样化有关; 也可能是用药背景比较复杂所导致, 如未明确病因盲目用药, 用药疗程不足、见好就停药, 反复多次用药, 这些行为在增加耐药率的同时, 也会造成多重耐药严重、谱型多样化^[25]。

3.3 宠物犬源沙门氏菌和葡萄球菌耐药基因检测

耐药基因检测结果表明: 宠物犬源沙门氏菌中携带耐药基因的现象比较普遍, *bla*_{TEM}、*bla*_{OXA}、*qnrS*、*oqx*A、*oqx*B、*aac*(6′)-*Ib-cr*、*ant*(3′′)-*Ia*、*tetB* 和 *floR* 基因的检出率均在 97.0% 以上, 而 *aadA2* 基因的检出率也在 72.0% 以上, 表明新疆宠物犬源沙门氏菌携带多种耐药基因且携带率很高, 而且耐

药基因携带率与药敏试验结果相吻合,说明耐药基因的存在是细菌产生耐药性的重要原因之一。此外,有研究表明^[26-27],沙门氏菌中所携带的耐药基因能从不同动物源、食品源和人源分离菌中检测到,这暗示携带耐药基因的菌株可通过食物链或接触动物在动物与人之间传递和传播。同批样品中宠物犬源葡萄球菌耐药基因检出率相对较低,且有部分耐药基因未检出,氟苯尼考耐药基因 *fexA* 检出率最高,也仅为 40.0%(30/75),分析其原因可能是宠物犬源葡萄球菌被检基因偏少(仅对 9 种耐药基因进行检测),存在其他未检或未知的耐药基因。此外,有可能存在其他非耐药基因介导的耐药机制,导致的宠物犬源葡萄球菌对临床常用抗菌药物耐药。有研究表明^[28],氟苯尼考并未批准用于宠物临床的治疗,但本试验中却检出氟苯尼考耐药基因,其原因还需要进一步研究。由本研究结果可知,宠物犬源沙门氏菌和葡萄球菌耐药情况严重,耐药基因携带率高,使宠物犬的细菌性疾病治疗难度加大,今后应加强耐药菌的监测,降低宠物犬源耐药菌转移给人的潜在风险。

[参考文献]

- [1] 李 鹏. 藏猪源大肠杆菌和肠球菌耐药性调查及其耐药机制的研究 [D]. 北京:中国农业大学,2015.
Li P. Antimicrobial resistance characteristics and mechanisms of *Escherichia coli* & *Enterococcus* from Tibetan pigs [D]. Beijing:China Agricultural University,2015.
- [2] Zishiri O T, Mkhize N, Mukaratirwa S. Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens and human clinical isolates from South Africa and Brazil [J]. Onderstepoort J Vet Res, 2016, 83 (1): 1-11.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-third informational supplement, M100-S23 [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
- [4] Guerra B, Helmuth R, Thomas K, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Salmonella* spp. isolates from reptiles in Germany [J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65(9): 2043-2045.
- [5] Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-typhi serotypes of *Salmonella enterica* [J]. Clinical Infectious Diseases, 2006, 43(3): 297-304.
- [6] Wang M, Guo Q, Xu X, et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53 (5): 1892-1897.
- [7] 刘海燕, 张 平. 家禽沙门氏菌病的流行现状及防控方法 [J]. 畜牧市场, 2009(11): 30-32.
- [8] Liu H Y, Zhang P. Prevalence and control of *Salmonella* in poultry [J]. Stockbreeding Market, 2009(11): 30-32.
- [8] Rodriguez-Martinez J M, Díaz de Alba P, Briaies A, et al. Contribution of *oqxAB* efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(1): 68-73.
- [9] Monstein H J, Ostholm-Balkhed A, Nilsson M V, et al. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* and *bla_{CTX-M}* genes in *Enterobacteriaceae* [J]. APMIS, 2007, 115(12): 1400-1408.
- [10] Xia L N, Tao X Q, Shen J Z, et al. A survey of β -lactamase and 16S rRNA methylase genes among fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates and their horizontal transmission in Shandong, China [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(12): 1241-1248.
- [11] Lim K T, Yeo C C, Yasin R M, et al. Characterization of multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from Malaysian hospitals [J]. Journal of Medical Microbiology, 2009, 58(11): 1463-1469.
- [12] Prasertsee T, Khantaprab N, Yamsakul P, et al. Repetitive sequence-based PCR fingerprinting and the relationship of antimicrobial-resistance characteristics and corresponding genes among *Salmonella* strains from pig production [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2016, 6(5): 390-395.
- [13] Bacci C, Boni E, Alpiqiani I, et al. Phenotypic and genotypic features of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolated from chicken meat and chicken and quail carcasses [J]. International Journal Food Microbiology, 2012, 160(1): 16-23.
- [14] 曹 塋, 王元兰, 刘宗梁, 等. 实时荧光定量 PCR 检测沙门菌 *flor* 基因和 *sul2* 基因方法的建立 [J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(7): 531-537.
Cao K, Wang Y L, Liu Z L, et al. Establish the detecting method of *Salmonella flor* and *sul2* genes by Real-Time quantitative PCR [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2015, 40 (7): 531-537.
- [15] 俞林锋. 上海某猪场大肠杆菌中 *mcr-1* 基因的传播机制研究 [D]. 广州:华南农业大学, 2016.
Yu L F. Transfer mechanism of colistin resistance gene *mcr-1* among *Escherichia coli* isolates from a livestock farm of Shanghai [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [16] 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]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2017.
Cai J X. Analysis of *cfr* and *fexA* genes and their genetic elements *Staphylococci* from pigs in Xinjiang [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2017.
- [17] 杜伟伟. 河北省乳源金黄色葡萄球菌耐药性检测及耐药基因的研究 [D]. 保定:河北农业大学, 2015.
Du W W. Research on drug resistance and resistant genes of

- the *Staphylococcus aureus* from raw milk in province of Hebei [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2015.
- [18] 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.
- Yang S S, Wang J, Fan K W, et al. Antimicrobial resistance analysis and resistance genes detection in *Staphylococcus* isolated from swine in Fujian province, China [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2016, 32(11): 976-982.
- [19] 王元兰. 合肥市宠物犬与犬粮携带沙门氏菌情况调查及耐药性研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- Wang Y L. Investigation on the carrying situation of *Salmonella* from pet dogs and food in Hefei and analysis of their antibiotic resistance [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2013.
- [20] 冯言言,田 伟,罗倩怡,等. 广东省宠物源伪中间型葡萄球菌的耐药性调查研究 [J]. 动物医学进展, 2012, 33(6): 6-10.
- Feng Y Y, Tian W, Luo Q Y, et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from pets in Guangdong province [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2012, 33(6): 6-10.
- [21] 周传铎,赵 然,金艺鹏,等. 北京地区警犬皮肤伪中间型葡萄球菌药敏试验及耐药基因筛查 [J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(11): 100-103.
- Zhou C D, Zhao R, Jing Y P, et al. Isolation, identification and drug resistance test of *Staphylococcus* from the skin of police dogs in Beijing [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016, 52(11): 100-103.
- [22] 罗倩怡,徐燕莉,邓玉婷,等. 宠物源细菌耐药性研究进展 [J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(3): 57-59.
- Luo Q Y, Xu Y L, Deng Y T, et al. Research progress in drug resistance of pet source bacteria [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 45(3): 57-59.
- [23] 黄 凯,陈素娟,黄 骏,等. 动物源性沙门氏菌的耐药性分析及氟苯尼考类耐药基因的鉴定 [J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(2): 459-466.
- Huang K, Chen S J, Huang J, et al. Analysis of antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from animals and identification of its florfenicol resistant gene [J]. China Animal Husbandry &. Veterinary Medicine, 2015, 42(2): 459-466.
- [24] 曾婉秋,杨晓农,陈 瑞,等. 成都地区健康犬及其畜主鼻腔金黄色葡萄球菌和中间型葡萄球菌的分离及耐药性研究 [J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2017, 43(1): 13-19.
- Zeng W Q, Yang X N, Chen R, et al. Investigation of carrying rates and drug resistance of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* in healthy dogs and their owners in Chengdu city [J]. Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition), 2017, 43(1): 13-19.
- [25] 孙 洋,冯书章. 宠物在病原菌耐药性形成过程中的作用 [J]. 动物医学进展, 2007, 28(12): 106-109.
- Sun Y, Feng S Z. The role of pets in the pathogenesis of pathogen resistance [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2007, 28(12): 106-109.
- [26] 陈耀能,梁景涛,陈爱贞,等. 佛山市食源性和人源沙门氏菌血清型分布与耐药性研究 [J]. 热带医学杂志, 2012, 12(8): 955-959.
- Chen Y N, Liang J T, Chen A Z, et al. Serotype distribution and drug resistance of food-borne and human origin *Salmonella* in Foshan [J]. Journal of Tropical Medicine, 2012, 12(8): 955-959.
- [27] 杨怀珍,牟 亚,罗 薇. 食源性沙门氏菌的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(7): 69-71, 75.
- Yang H Z, Mou Y, Luo W. Research progress of food-borne *Salmonella* [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2016(7): 69-71, 75.
- [28] 张万江. 猪源葡萄球菌和芽孢杆菌 cfr 基因流行病学及传播机制研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2011.
- Zhang W J. The epidemiological study on the multi-resistance gene cfr and its transmission mechanism among *Staphylococcus* and *Bacillus* sp. isolates from swine [D]. Beijing: China Agricultural University, 2011.