

金黄色葡萄球菌 ST398-t571 型在陕西生猪屠宰场的流行传播及其耐药性分析

郝勇航¹, 刘俊峰¹, 刘璐函¹, 王鑫盛¹, 吴秋玲¹, 贺恒旭¹, 黄轶浩¹,
时明真¹, 刘君君¹, 陈丽颖^{1,2*}

(1. 河南农业大学动物医学院, 郑州 450002; 2. 河南省动物性食品安全重点实验室, 郑州 450002)

摘要: **目的** 调查陕西省某生猪屠宰场 ST398-t571 型金黄色葡萄球菌的流行情况及耐药性。**方法** 本研究对陕西省某生猪屠宰链及屠宰场内部环境共采集 485 份样品。使用常规检测方法和分子生物学技术对金黄色葡萄球菌进行分离鉴定, 然后对分离株进行分子分型鉴定和对 15 种抗菌药物进行耐药性试验; 并对其进行 26 种毒力基因和 13 种耐药基因的检测。**结果** 样品中共分离出 62 株金黄色葡萄球菌, 总分离率为 12.8%; 其中 ST398-t571 型分离株为优势克隆型, 占 90.3% (56/62)。耐药试验结果显示, 所有受试菌株均对苯唑西林、阿米卡星、万古霉素和头孢噻肟敏感, 对其余的抗菌药物表现出不同程度的耐药性。26 种毒力基因中 11 种毒力基因(*seb*、*seg*、*sei*、*sek*、*sen*、*seq*、*lukD*、*lukE*、*lukF-PV*、*lukS-PV*、*sasG*)被检出。13 种被检耐药基因除万古霉素耐药基因 *vanA* 基因外均有检出。**结论** 屠宰场生猪屠宰链普遍存在以 ST398-t571 型为主的金黄色葡萄球菌污染, 不同批次分离株基因携带情况存在一定差异且菌株存在较为严重的耐药性。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 屠宰链; 分子分型; 毒力基因; 耐药性

Epidemic spread and drug resistance analysis of *Staphylococcus aureus* ST398-t571 type in swine slaughterhouse in Shaanxi

HAO Yong-Hang¹, LIU Jun-Feng¹, LIU Lu-Han¹, WANG Xin-Sheng¹, WU Qiu-Ling¹,
HE Heng-Xu¹, HUANG Yi-Hao¹, SHI Ming-Zhen¹, LIU Jun-Jun¹, CHEN Li-Ying^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan;
2. Key Laboratory of Animal Food Safety of Henan Province, Zhengzhou 450002, Henan)

ABSTRACT: Objective To investigate the prevalence status and drug resistance of *Staphylococcus aureus* ST398-t571 type in swine slaughterhouse in Shaanxi Province. **Methods** In the current study, 485 samples were collected from a swine slaughter chain and the internal environment of a slaughterhouse in Shaanxi Province. *Staphylococcus aureus* was isolated and identified by conventional detection methods and molecular biological techniques, and then the isolates were identified by molecular typing and resistance test to 15 kinds of antimicrobial drugs; 26 kinds of virulence genes and 13 kinds of drug resistance genes were detected. **Results** A total of 62 strains of *Staphylococcus aureus* were isolated from the samples, and the total isolation rate was 12.8%; among them, the

基金项目: 国家重点研发计划项目(2008YFD0500500)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2008YFD0500500)

*通信作者: 陈丽颖, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为动物源性食品病原微生物检测及其防控。E-mail: chliying@henau.edu.cn

*Corresponding author: CHEN Li-Ying, Ph.D, Professor, Henan Agricultural University, Longzihu Campus of Henan Agricultural University, Jinshui District, Zhengzhou, Henan Province 450002, China. E-mail: chliying@henau.edu.cn

ST398-t571 type isolate was the dominant clonotype 90.3% (56/62). The results of antimicrobial resistance test showed that all tested strains were sensitive to oxacillin, amikacin, vancomycin and cefotaxime, and showed varying degrees of resistance to the rest of the antibiotics. 11 kinds of virulence genes (*seb*, *seg*, *sei*, *sek*, *sen*, *seq*, *lukD*, *lukE*, *lukF-PV*, *lukS-PV*, *sasG*) were detected among the 26 kinds of virulence genes. All the 13 detected drug resistance genes were detected except the vancomycin resistance gene *vanA* gene. **Conclusion** ST398-t571 type is the main type of *Staphylococcus aureus* in the swines slaughtering chain, and there are certain differences in the gene carrying status of isolates from different batches and these strains has serious drug resistance.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*; slaughter chain; molecular typing; virulence gene; drug resistance

0 引言

肉及肉制品的安全在我国已经成为备受关注的食品安全问题,食源性致病菌造成的食品污染是导致食品安全问题的主要因素^[1]。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)在自然界中广泛存在,是引起人类和动物感染及导致人类食源性患病(food-borne illness)的主要致病菌之一^[2-3],该菌可通过与动物和肉类及肉制品的接触传播给人类^[4]。金黄色葡萄球菌可引起呕吐、发热、腹泻,甚至能致败血症等严重疾病,其致病力与肠毒素(staphylococcal enterotoxin, SE)密切相关,其中共 27 种肠毒素被发现,包括 5 种经典肠毒素(*sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*)和 22 种新型肠毒素^[5]。金黄色葡萄球菌产生的肠毒素能引起人和动物严重的食物中毒,因此该菌一直是重点监管的食源性病原菌^[6-8]。其中,ST398 型是全球金黄色葡萄球菌最主要的克隆型之一^[9],有研究表明猪是金黄色葡萄球菌 ST398 型的最大储存库,且可通过接触而致人感染^[10]。ST398 型金黄色葡萄球菌可引起人的轻度至中度感染,且感染病例数逐年增加^[11-12]。近年来金黄色葡萄球菌的多重耐药问题日渐突出,而细菌通过移动遗传元件(mobile genetic elements, MGE)等机制获得耐药基因和毒力基因,对人类健康和食品安全产生了严重威胁^[13-15]。近几年虽然抗生素在动物养殖过程中受到严格管控,但多重耐药细菌引发的感染却逐年增加^[16]。动物被认为是多重耐药细菌的储存库,其能够通过屠宰场的屠宰环节及整个生产链进一步被传播,研究表明,屠宰场金黄色葡萄球菌的流行率明显高于养殖场^[17]。研究发现大多数细菌的耐药性与其相关耐药基因的携带存在一致性^[4]。多重耐药细菌能够沿着养殖场、屠宰场到肉制品的整个生产链进行传播,构成了严重的食品安全风险,因此加强对屠宰场屠宰环节金黄色葡萄球菌的耐药性及耐药基因的检测具有重要意义。

本研究着眼于金黄色葡萄球菌 ST398-t571 优势克隆型沿着屠宰场生猪屠宰链污染传播及流行规律,检测不同屠宰环节包括待宰生猪、生猪屠宰链及屠宰车间的环境的金黄色葡萄球菌污染情况,评估不同屠宰环节是否存在交叉污染;了解不同屠宰环节分离株的分子特征、基因携带情况及

耐药性,通过对不同环节的监测,识别屠宰环节污染的关键控制点,为屠宰场屠宰链肉及肉制品生产过程中采取有效的安全风险管理和防控提供科学支撑,以及指导抗菌药物在动物饲养过程中的使用,为临床用药提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样本采集

陕西屠宰场不同屠宰环节采集样品数如表 1。

表 1 生猪屠宰场不同屠宰环节采集样品数
Table 1 Number of samples collected from different slaughter links in swine slaughterhouses

样品	采样年份(批次)		
	2020-9 (a)	2020-12 (b)	
环境样品	空气样	5	5
	烫毛水样	10	10
	刀具柄样	/	5
	麻电地面	/	10
	下白脏地面	/	10
	冷却间地面	/	10
屠宰环节样品	待宰生猪猪鼻	40	40
	麻电环节猪鼻	40	40
	卸头环节猪鼻	40	40
	劈半环节体表	30	30
	脱毛环节体表	30	30
	冷库体表	30	30

1.1.2 试验菌株

金黄色葡萄球菌 ATCC25923(中国兽医药品监察所)。

1.1.3 仪器与试剂

CHA-GA 恒温水浴摇床(金坛经济开发区吉特实验仪器厂); GH4500 隔水培养箱(天津泰斯特仪器有限公司); ST16/ST16R 低温冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、脑心浸液肉汤(brain heart infusion broth, BHI)、7.5%氯化钠肉汤、Baird-Parker 琼脂培养基(青岛海博试剂公司); 法国科玛嘉金黄色葡萄球菌显色培养基(青岛海博试剂公司); 金黄色葡萄球菌 PCR 特异性扩增引物、细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒 B518225(上海生工生物工程有限公司); 2×Rapid Taq Master Mix 试剂(诺唯赞生物科技有限公司); 15 种抗菌药物(纯度均大于 90%, 北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 样品处理

样品的预处理、增菌与常规细菌学分离培养按照国家食品微生物检验标准(GB 4789.10—2016《食品安全国家标准 金黄色葡萄球菌检验》)程序和方法进行, 并加以改进。

空气样: 将装有 10 mL 灭菌缓冲蛋白胨水的无菌 50 mL 离心管中敞口放置于不同采样点, 约 30 min 后收管, 样品放置冰盒内低温运送到实验室。水样: 用无菌注射器吸取 10 mL 水样, 样品放置冰盒内低温运送至实验室。体表、鼻腔拭子: 将用灭菌 BPW 肉汤浸润的无菌棉拭子在屠宰猪胴体上擦拭和插入猪鼻腔内旋转 3~4 圈, 将棉签后端剪断, 随即将样品投入含有 5 mL BPW 肉汤的 10 mL 离心管中。取上述 BPW 预增菌液 1 mL, 接种于 10 mL 7.5%氯化钠肉汤, 36 °C 180 r/min 振荡培养 20 h; 或者对上述处理后的含有样品的 7.5%氯化钠肉汤, 36 °C 180 r/min 振荡培养 20 h。

1.3 菌株的分离鉴定

用无菌接种环蘸取过夜振荡培养的增菌培养物, 划线接种于 Baird-Parker 琼脂平板上进行培养, 挑取单个可疑菌落接种于 BHI 营养肉汤中, 37 °C 过夜培养后, 再将菌液在金黄色葡萄球菌显色培养基上划线, 在 37 °C 温箱中 18~24 h 进行纯化培养, 之后挑取疑似菌落接种于 BHI 营养肉汤 37 °C 过夜培养, 通过 PCR 方法对金黄色葡萄球菌特异性基因 *femB* 进行鉴定, 并将鉴定为阳性菌株配制成 25%甘油菌于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.4 DNA 提取

从显色培养基平板挑单个菌落于无菌 BHI 肉汤中 160 r/min, 37 °C 振荡培养过夜, 取 1 mL 细菌培养液于无菌 1.5 mL 的 EP 管内, 10000 r/min 离心 1 min, 弃上清液, 后严格按细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒说明书进行 DNA 提取。最后将提取的 DNA 模板置于 -20 °C 冰箱保存。

1.5 分子分型

对所有金黄色葡萄球菌分离株进行多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)和葡萄球菌 A 蛋白(staphylococcal protein A, spa)分型。MLST 分型: 通过对 7 个管家基因(*arcC*、*aroE*、*glpF*、*gmk*、*pta*、*tpi* 和 *yqiL*)进行扩增和测序, 将测序序列与 MLST 数据库(<http://saureus.mlst.net/>)比对获得 ST 型。spa 分型: 通过扩增 *spa* 基因并对扩增产物

进行测序, 将序列与 spa 数据库(<https://www.spaserver.ridom.de/>)进行比对分析, 获得 spa 分型。7 个管家基因(*arcC*、*aroE*、*glpF*、*gmk*、*pta*、*tpi* 和 *yqiL*)和 *spa* 基因的引物序列及反应条件分别在 <http://saureus.mlst.net/> 和 <https://www.spaserver.ridom.de/> 中获取。

1.6 分离株药敏试验

使用琼脂稀释法进行微生物药敏试验, 并根据美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准对试验结果进行判定。以金黄色葡萄球菌 ATCC25923 作为对照菌株。具体使用药物及最小抑制浓度(minimum inhibitory concentrations, MICs)见表 2。每次试验均平行进行 3 次。

表 2 药敏试验所用抗生素及最小抑菌浓度
Table 2 Antibiotics and MICs of drug-resistant

抗菌药物	英文缩写/英文全称	最小抑菌浓度/($\mu\text{g/mL}$)
苯唑西林	OXA/oxacillin	4
林可霉素	LCM/lincomycin	4
卡那霉素	KAN/kanamycin	64
氯霉素	CHL/chloramphenicol	32
氧氟沙星	OFL/ofloxacin	4
环丙沙星	CIP/ciprofloxacin	4
红霉素	ERY/erythromycin	8
庆大霉素	GEN/gentamicin	16
四环素	TET/tetracycline	16
诺氟沙星	NOR/norfloxacin	16
头孢噻肟	CTX/cefotaxime	64
氟苯尼考	FFC/florfenicol	16
多西环素	DOX/doxycycline	16
阿米卡星	AMK/amikacin	64
万古霉素	VAN/vancomycin	16

1.7 金黄色葡萄球菌毒素编码基因及耐药基因检测

运用 PCR 技术对分离的菌株进行 26 种毒力基因和 13 种耐药基因进行检测。其中 26 种毒力基因包括: 肠毒素编码基因(*sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*、*seg*、*seh*、*sei*、*sej*、*sek*、*sel*、*sem*、*sen*、*seo*、*sep*、*seq*、*ser*、*ses*、*seu*、*sev*)、杀白细胞毒素编码基因(*lukD*、*lukE*、*lukF*、*lukS*)、细胞壁锚定蛋白基因(*sasX*、*sasG*); 13 种耐药基因包括 *MLS_B*(大内环脂类-林可酰胺类-链阳菌素 B 类)耐药基因[*erm(C)*、*erm(T)*]、四环素耐药基因[*tet(M)*、*tet(L)*]、氨基糖苷类耐药基因[*aac(6')*-*aph(2')*]、*ant(6')*-*Ia*、*aadD*]、氯霉素耐药基因(*fexA*)、甲氧苄啶耐药基因(*dfpG*)、 β -内酰胺类耐药基因(*blaZ*)、对林可酰胺类-截短侧耳素类-链菌素 A 类耐药基因[*lsa(E)*、*vga(A)*]和万古霉素耐药基因(*vanA*)。

1.8 统计学分析

利用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。采用 χ^2 检验对不同环节金黄色葡萄球菌阳性样本数、毒素基因、耐药基因和耐药分离株数进行差异分析。

2 结果与分析

2.1 金黄色葡萄球菌总体流行情况

经常规细菌学检测, 从 485 份生猪与环境样本中分离出 62 株金黄色葡萄球菌, 其中批次 a 和批次 b 检出率分别为 15.6% (35/225) 和 10.4% (27/260), 总体分离率为 12.8% (62/485), 如表 3 所示。其中, 在猪鼻腔中金葡萄菌分离率最高 21.3% (51/240), 而屠宰环节胴体体表分离率较低, 为 4.4% (8/180); 在空气样和刀具样本中也检测到金黄色葡萄球菌的存在。

对 62 株金黄色葡萄球菌分离株进行 MLST 和 spa 分型的结果显示, 上述分离株分别属于 5 种克隆型(表 4), 其

中 ST398-t571 型占据绝对优势(90.3%, 56/62), 且在屠宰场各个环节猪体以及环境中广泛分布; 其余四型 ST398-t034 型、ST398-t1456 型、ST5-t002 型和 ST9-t899 型分别只检出 2 株(3.2%, 2/62)、2 株(3.2%, 2/62)、1 株(1.6%, 1/62)和 1 株(1.6%, 1/62), 且均来猪体(待宰猪鼻腔, 劈半、脱毛和麻电致昏环节)。

2.2 ST398-t571 型金黄色葡萄球菌污染情况

MLST 和 spa 分型的结果显示, 批次 a 和批次 b 样本中 ST398-t571 型金黄色葡萄球菌分离率分别为 13.3% (30/225) 和 10.0% (26/260), 且主要来自猪鼻腔, 分别占比 90.0% (27/30) 和 80.8% (21/26), 显著高于猪胴体体表检出率 10% (3/30) 和 7.7% (2/26) ($P < 0.01$)。在鼻腔样本中, 待宰环节、麻电致昏环节和卸头环节 ST398-t571 型分离率分别为 25.0% (20/80)、10.0% (8/80)、25.0% (20/80), 具有降低-升高的趋势。在胴体体表样本中, 脱毛、劈半和冷库环节的分离率分别为 1.7% (1/60)、3.3% (2/60) 和 3.3% (2/60), 整体检出水平均较低, 且彼此没有明显变化。

表 3 不同屠宰环节中金黄色葡萄球菌的检出情况(%)
Table 3 Prevalence of *Staphylococcus aureus* in different stages of slaughter (%)

屠宰场	来源	批次 a	批次 b	合计
屠宰环节样品	待宰生猪猪鼻	22.5 (9/40)	32.5 (13/40)	27.5 (22/80)
	麻电环节猪鼻	10.0 (4/40)	12.5 (5/40)	11.3 (9/80)
	卸头环节猪鼻	40.0 (16/40)	10.0 (4/40)	25.0 (20/80)
	劈半环节体表	10.0 (3/30)	3.3 (1/30)	6.7 (4/60)
	脱毛环节体表	3.3 (1/30)	3.3 (1/30)	3.3 (2/60)
	冷库体表	6.7 (2/30)	0 (0/30)	3.3 (2/60)
	空气	0 (0/5)	20.0 (1/5)	10.0 (1/10)
环境样品	烫毛水	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/20)
	刀具柄	\	40.0 (2/5)	40.0 (2/5)
	麻电地面	\	0 (0/10)	0 (0/10)
	下白脏地面	\	0 (0/10)	0 (0/10)
	冷却间地面	\	0 (0/10)	0 (0/10)
	合计	15.6 (35/225)	10.4 (27/260)	12.8 (62/485)

表 4 62 株金葡萄菌分离株 spa 分型结果
Table 4 Spa type results of 62 *Staphylococcus aureus* isolates

spa 分型	重复编码	重复单元数	菌株数量
t571	r08-r16-r02-r25-r02-r25-r34-r25	8	56
t1456	r08-r16-r02-r25	4	2
t034	r08-r16-r02-r25-r02-r25-r34-r24-r25	9	2
t002	r26-r23-r17-r34-r17-r20-r17-r12-r17-r16	10	1
t899	r07-r16-r23-r02-r34	5	1

此外,在批次 b 空气样中和刀具样中分别检测出 1 株和 2 株 ST398-t571 型金黄色葡萄球菌,提示该菌存在着环境中交叉污染的风险。

2.3 分离株耐药情况分析

2.3.1 分离株耐药表型检测结果

抗菌药物耐受试验结果(表 5)显示,所有金葡菌 ST398-t571 型分离株均表现出广泛的耐药性和多重耐药性,其中对林可霉素、氧氟沙星、环丙沙星、红霉素、四环素、氟苯尼考和多西环素表现出普遍耐药性,耐药率均高于 80%,尤其是批次 a 分离株对于氧氟沙星、环丙沙星、四环素和诺氟沙星表现为 100%耐药;另一方面,所有菌株对苯唑西林、阿米卡星、万古霉素和头孢噻肟均敏感。总体上,批次 a 分离株对受试抗菌药物的耐药性略高于批次 b,而批次 b 分离株对卡那霉素和庆大霉素耐药率更高。

表 5 不同批次金黄色葡萄球菌分离株对抗菌药物耐药率(%)
Table 5 Resistance rates of different batches of *Staphylococcus aureus* isolates to antibacterial drugs (%)

抗菌药物	缩写	批次 a	批次 b
苯唑西林	OXA	0	0
林可霉素	LCM	93.3 (28/30)	84.6 (22/26)
卡那霉素	KAN	13.3 (4/30)	53.8 (14/26)
氯霉素	CHL	23.3 (7/30)	11.5 (3/26)
氧氟沙星	OFL	100 (30/30)	80.8 (21/26)
环丙沙星	CIP	100 (30/30)	88.5 (23/26)
红霉素	ERY	93.3 (28/30)	96.2 (25/26)
庆大霉素	GEN	10.0 (3/30)	42.3 (11/26)
四环素	TET	100 (30/30)	88.5 (23/26)
诺氟沙星	NOR	100 (30/30)	19.2 (5/26)
头孢噻肟	CTX	0	0
氟苯尼考	FFC	96.7 (29/30)	96.2 (25/26)
多西环素	DOX	96.7 (29/30)	96.2 (25/26)
阿米卡星	AMK	0	0
万古霉素	VAN	0	0

2.3.2 分离株耐药基因检测结果

基因检测结果显示,在 ST398-t571 型分离株中共检测出 12 个耐药基因(12/13)。其中, β -内酰胺类抗性基因 *blaZ*、四环素耐药基因 *tet(M)* 和氟苯尼考耐药基因 *fexA* 在 ST398-t571 型分离株中存在广泛,其检出率均达到 90%左右。相反,万古霉素耐药基因 *VanA* 在所有分离株中未有检出。

从菌株来源批次来看,如表 6 所示。耐药基因的分布在批次 a 和批次 b 的分离株之间存在明显差异。在两批次菌株间差异最为显著的是 MLS_B(大内环脂类-林可酰胺类-链阳菌素 B 类)耐药基因 *erm(C)*,其携带率分别为 96.7%和 23.1% ($P<0.01$);而耐药基因 *erm(T)*、*tet(L)*、*aac(6')-aph(2'')*、

ant(6')-Ia、*aadD*、*dfrG*、*lsa(E)*在批次 b 更为常见($P<0.01$)。此外,林可酰胺类-截短侧耳素类-链菌素类耐药基因 *vga(A)V* 只在批次 a 麻电鼻腔的 1 个分离株中检出。

表 6 不同批次金黄色葡萄球菌分离株耐药基因携带率(%)
Table 6 Resistance genes carrier rates of different batches of *Staphylococcus aureus* isolates (%)

耐药基因名称	批次 a	批次 b
<i>vga(A)V</i>	3.3 (1/30)	0
<i>erm(C)</i>	96.7 (29/30)	23.1 (6/26)
<i>dfrG</i>	3.3 (1/30)	73.1 (19/26)
<i>lsa(E)</i>	3.3 (1/30)	73.1% (19/26)
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	3.3 (1/30)	53.8% (14/26)
<i>aadD</i>	3.3 (1/30)	76.9% (20/26)
<i>ant(6')-Ia</i>	3.3 (1/30)	76.9% (20/26)
<i>fexA</i>	96.7 (29/30)	84.6 (22/26)
<i>blaZ</i>	100 (30/30)	84.6 (22/26)
<i>erm(T)</i>	3.3 (1/30)	80.8% (21/26)
<i>tet(M)</i>	93.3 (28/30)	84.6 (22/26)
<i>tet(L)</i>	3.3 (1/30)	65.4% (17/26)

2.4 毒力基因检出情况

PCR 检测结果显示,在金黄色葡萄球菌 26 种被检毒力基因中,共检出了 6 个肠毒素编码基因(6/20)、4 个杀白细胞毒素编码基因(4/4)和 1 个细胞壁锚定蛋白基因(1/2),不同环节样本分离株毒素编码基因携带情况在两个批次间无显著性差异($P>0.05$)。其中所有杀白细胞毒素编码基因 *lukS-PV* 存在于所有 ST398-t571 型分离株中,*lukF-PV* 也广泛存在(94.6%, 53/56),而 *lukD* 和 *lukE* 仅检出于批次 a 分离株(均为 26.7%, 8/30)。6 种肠毒素基因(*seb*、*seg*、*sei*、*sek*、*sen*、*seq*)的分布为,少数菌株有携带肠毒素基因 *seg*、*sei*、*sen*,而肠毒素基因 *seb-sek-seq* 仅在批次 b 中有检出。细胞壁锚定蛋白基因 *sasG* 在分离株中检出率为 75.0% (42/56),但另一个基因 *sasX* 未检出。

3 讨论与结论

随着社会的发展和人民的物质生活水平的提高,对肉及肉制品的需求不断增加,因此肉及其制品相关的食品安全问题也引起人们的高度关注。在我国,猪肉作为第一大肉类消费品,其安全生产显得尤为重要。目前,屠宰加工环节被认为是食物污染的关键环节^[18-19]。本研究对陕西省某屠宰场金黄色葡萄球菌的传播情况进行了调查,其分离率低于谷立惠^[20]和 HE 等^[21]在生猪屠宰场金黄色葡萄球菌检出率的报道。从屠宰链中检测出的金黄色葡萄球菌中 ST398-t571 型占据绝对优势,这与国内相关报

道一致^[22-23]。猪鼻腔分离株检出率明显高于胴体体表和环境样等环节的检出率,与张静^[24]的研究相近。可能与样本采集地域、数量、生猪来源、屠宰场的规模及管理模式的不同等原因有关。在空气样和屠宰刀具也检出了金黄色葡萄球菌,表明该屠宰场存在金黄色葡萄球菌交叉污染传播以及感染工作人员和随猪肉流入市售环节的风险,从而引发食源性金黄色葡萄球菌中毒隐患。

金黄色葡萄球菌的定殖、感染与其携带的毒力因子有关且其毒素量的多少与致病性有密切的关系^[25]。其中,杀白细胞素编码基因 *PVL* 产生两种毒素部分(*lukF-PV* 和 *lukS-PV*)组成,两者都是细胞溶解活性所必需成分,其致病机制与引发细胞凋亡或使中性粒细胞溶解有关^[26]。本研究发现 *lukF-PV* 和 *lukS-PV* 广泛存在于分离株中,这与 KARKI 等^[27]研究结果相一致。细胞壁锚定蛋白 *sasX* 与金黄色葡萄球菌的黏附聚集以及定植能力有关,菌体通过获得 *sasX* 基因可以更加容易地定植于宿主的易感部位而引发感染^[28]。但是在本研究并未检测出 *sasX* 这种常见基因,而是发现了一种与鼻鳞状上皮细胞结合的细胞壁锚定蛋白基因 *sasG* (LPXTG 基序),且该基序在 t571 型分离株中广泛分布,这也可能解释了猪鼻腔是金黄色葡萄球菌的主要检出部位。此外,ST398-t571 型分离株中仅携带少量的肠毒素基因 *seb*、*seg*、*sei*、*sek*、*sen*、*seq*,这与 LI 等^[29]等报道结果接近。

近年来,随着抗生素在动物生产和养殖过程中的广泛使用,多重耐药金黄色葡萄球菌亦不断出现^[30-31]。本研究中大多数菌株对4种及以上抗菌药物具有耐药性,且普遍表现出对林可霉素、氧氟沙星、红霉素、四环素、氟苯尼考和多西环素等的耐药性,而上述分离株中普遍携带耐药基因 *blaZ*、*erm(C)*、*fexA* 和 *tet(M)*,大多数分离株的耐药基因型和表型之间存在一致性。有相关研究,由于四环素毒副作用小且价格便宜等优点,曾广泛应用于家畜养殖过程中^[32],*tet(M)* 耐药基因是家畜相关金黄色葡萄球菌 ST398 型的一个众所周知的遗传标记^[33],与本研究结果相一致。*erm* 基因有编码核糖体甲基化酶的作用,可以使细菌核糖体靶位点发生甲基化,从而使金黄色葡萄球菌对红霉素产生耐药性^[34],位于质粒上的 *erm(C)* 基因能够介导金黄色葡萄球菌的耐药。由于红霉素是人类因细菌感染的常用治疗药物,推断出定植于人类的致病菌可能通过屠宰环节污染猪肉制品。此外,研究发现部分菌株对于氯霉素、卡那霉素和庆大霉素的耐药表型和耐药基因型并不总是一致的,造成此结果的原因不仅涉及耐药基因表达情况以及是否携带其他耐药基因,还应该考虑到可能还存在其他因素如外排泵等。

综上所述结果显示在陕西省某屠宰场屠宰过程中普遍存在着金黄色葡萄球菌的污染,不同屠宰环节存在交叉污染,其中猪鼻腔是金黄色葡萄球菌污染的关键部位。不同屠宰环节优势克隆型 ST398-t571 型在本研究中具有较高的检

出率。金黄色葡萄球菌对多种抗菌药物表现出耐药性;不同季节分离菌株耐药基因携带存在差异性。本研究对生猪屠宰及肉制品加工过程中的食品安全防控提供数据支持,并提示应加强对生猪屠宰及肉制品加工过程中猪源金黄色葡萄球菌的定期检测,实施良好的生产规范,以降低人类感染的风险。

参考文献

- [1] AL-KHAROUSI ZS, GUIZANI N, AL-SADI AM, *et al.* Hiding in fresh fruits and vegetables: Opportunistic pathogens may cross geographical barriers [J]. *Inter J Microbiol*, 2016, 2016: 4292417.
- [2] SERGELIDIS D, ANGELIDIS AS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A controversial food-borne pathogen [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2017, 64(6): 409-418.
- [3] FOWLER VG, OLSEN MK, COREY GR, *et al.* Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia [J]. *Arch Int Med*, 2003, 163: 2066-2072.
- [4] SUN CT, CHEN BL, HULTH A, *et al.* Genomic analysis of *Staphylococcus aureus* along a pork production chain and in the community, Shandong Province, China [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2019, 54: 8-15.
- [5] AUNG MS, URUSHIBARA N, KAWAGUCHIYA M, *et al.* Prevalence and genetic diversity of staphylococcal enterotoxin (-like) genes *sey*, *selw*, *selx*, *selz*, *sel26* and *sel27* in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Toxins*, 2020, 12(5): 347.
- [6] ZHANG Z, LIU W, XU H, *et al.* Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(3): 1625-1633.
- [7] ALVES VF, NIO-ARIAS FC, PITONDO-SILVA A, *et al.* Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* from some artisanal Brazilian dairies [J]. *Int Dairy J*, 2018, 85: 247-253.
- [8] 徐重新, 陈蔚, 谢雅晶, 等. 食品中金黄色葡萄球菌检测及防控技术研究[J]. *农产品质量与安全*, 2019, (3): 49-56.
- [9] XU CX, CHEN W, XIE YJ, *et al.* Research on detection and prevention and control technology of *Staphylococcus aureus* in food [J]. *Qual Saf Agric Prod*, 2019, (3): 49-56.
- [10] VOSS A, LOEFFEN F, BAKKER J, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming [J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11: 1965-1966.
- [11] KRZIWANEK K, METZ-GERCEK S, MITTERMAYER H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from human patients, upper Austria [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 766-769.
- [12] DECLERCQ P, PETRE D, GORDTS B, *et al.* Complicated community-acquired soft tissue infection by MRSA from porcine origin [J]. *Infection*, 2008, 36: 590-592.
- [13] RASIGADE JP, LAURENT F, HUBERT P, *et al.* Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* strain [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17: 1152-1153.
- [14] JANSEN W, MULLER A, GRABOWSKI N, *et al.* Foodborne diseases do not respect borders: Zoonotic pathogens and antimicrobial resistant bacteria in food products of animal origin illegally imported into the European Union [J]. *Veter J*, 2019, 244: 75-82.

- [14] DIENE SM, CORVAGLIA AR, FRANCOIS P, *et al.* Prophages and adaptation of *Staphylococcus aureus* ST398 to the human clinic [J]. BMC Genom, 2017, 18: 133.
- [15] WALTHER B, KLEIN KS, BARTON AK, *et al.* Equine methicillin-resistant sequence type 398 *Staphylococcus aureus* (MRSA) harbor mobile genetic elements promoting host adaptation [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2516.
- [16] OKORIE-KANU OJ, ANYANWU MU, EZENDUKA EV, *et al.* Molecular epidemiology, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken and pig carcasses, and carcass handlers [J]. PLoS One, 2020, 15(5): e0232913.
- [17] 谢建华, 叶洁莹, 王棋, 等. 屠宰环节禽产品中金黄色葡萄球菌污染状况调查[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(20): 163-165.
XIE JH, YE JY, WANG Q, *et al.* Investigation on *Staphylococcus aureus* contamination in poultry products during slaughtering [J]. J Agric Sci, 2020, 48(20): 163-165.
- [18] MCINTYRE L, PENG D, HENDERSON SB. Retraining effectiveness in food safe trained food handlers in British Columbia, Canada [J]. Food Control, 2014, 35(1): 137-141.
- [19] JAJA IF, JAJA CJI, CHIGOR NV, *et al.* Antimicrobial resistance phenotype of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolates obtained from meat in the formal and informal sectors in South Africa [J]. Bio Med Res Inter, 2020, (11): 1-11.
- [20] 谷立惠. 猪肉生产链中金黄色葡萄球菌耐药性、耐药基因和分子分型研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
GU LH. Study on the resistance, resistance genes and molecular typing of *Staphylococcus aureus* in the pork production chain [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018.
- [21] HE W, LIU Y, QI J, *et al.* Food-animal related *Staphylococcus aureus* multidrug-resistant ST9 strains with toxin genes [J]. Foodborne Pathog Dis, 2013, 10(9): 782-788.
- [22] 张鹏飞. 苯唑西林敏感、*mecA* 基因阳性的猪源金黄色葡萄球菌的流行、分子分型及耐药性研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(11): 3607-3618.
ZHANG PF. Study on the prevalence, molecular typing and drug resistance of oxacillin-sensitive and *mecA* gene-positive *Staphylococcus aureus* [J]. Acta Microbiol, 2021, 61(11): 3607-3618.
- [23] 王海军. 徐州市奶牛乳房炎流行病学调查及防治[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
WANG HJ. Epidemiological investigation and prevention of dairy cow mastitis in Xuzhou City [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [24] 张静. 不同来源金黄色葡萄球菌污染状况调查及药敏性、毒力基因、PFGE 分型研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
ZHANG J. Investigation of *Staphylococcus aureus* contamination from different sources and study of drug susceptibility, virulence genes and PFGE typing [D]. Yangling: Northwest Agriculture & Forestry University, 2012.
- [25] 周信云, 胡龙华. 携带杀白细胞素基因金黄色葡萄球菌的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(8):763-764, 766.
ZHOU XY, HU LH. Research progress of *Staphylococcus aureus* carrying the leukocidin gene [J]. Chin J Microecol, 2010, 22(8): 763-764, 766.
- [26] 赖奋强, 郭庆昕, 杨滨. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌杀白细胞素基因检测[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(8): 726-731.
LAI FQ, GUO QX, YANG B. Leukocidin gene detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Zoonoses, 2019, 35(8): 726-731.
- [27] KAPKI AB, NEYAZ L, FAKHR MK. *Staphylococcus aureus* comparative genomics of plasmid-bearing strains isolated from various retail meats [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 574923.
- [28] YU FY, LI TJ, HUANG XY, *et al.* Virulence gene profiling and molecular characterization of hospital-acquired *Staphylococcus aureus* isolates associated with bloodstream infection [J]. Diagnost Microbiol Infect Dis, 2012, 74(4): 363-368.
- [29] LI GH, WU CM, WANG X, *et al.* Prevalence and characterization of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from retail foods [J]. Int J Food Microbiol, 2015, 196: 94-97.
- [30] 张鹏飞, 张杰, 刘心雨, 等. 上海市食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子特征及耐药性[J]. 食品科学, 2020, 41(20): 285-291.
ZHANG PF, ZHANG J, LIU XY, *et al.* Molecular characteristics and drug resistance of food-borne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Shanghai [J]. Food Sci, 2020, 41(20): 285-291.
- [31] LI SX, WANG PP, ZHAO JL, *et al.* Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* from retail raw chicken meat [J]. J Food Protect, 2018, 81(4): 528-533.
- [32] MKIZE N, ZISHIRI OT, MUKARATIRWA S. Genetic characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from commercial broiler chickens in the Durban metropolitan area, South Africa [J]. J South Afr Vet Assoc, 2017, 88: e1-e7.
- [33] STEGGER M, LIU CM, LARSEN J, *et al.* Rapid differentiation between livestock-associated and livestock-independent *Staphylococcus aureus* CC398 clades [J]. PLoS One, 2013, 8: e79645.
- [34] DI MV, GUERRINI M, SHAH S, *et al.* Low level resistance to oleandomycin as a marker of *erm A* in staphylococci [J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 49(2): 425-427.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介



郝勇航, 硕士, 主要研究方向为动物疾病分子病原学与免疫学的研究。

E-mail: 2567450474@qq.com



陈丽颖, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为动物源性食品病原微生物检测及其防控。

E-mail: chliying@henau.edu.cn