牦牛屠宰中金黄色葡萄球菌分离菌株的流行特征

屈云，佟尧，谈永萍，赵燕英，唐俊妮*

（西南民族大学 生命科学与技术学院 四川，成都 610041）

摘要：目的：研究牦牛屠宰过程中金黄色葡萄球菌分离菌株的流行特征。**方法：**在成都市某牦牛屠宰场采集样品共计 150 份。采用 Baird-Parker 选择性培养基初步筛选出金黄色葡萄球菌疑似菌株，通过聚合酶链式反应检测金黄色葡萄球菌特有的耐热核酸酶基因携带菌株。进一步检测分离菌株 21 种肠毒素基因，6 种毒力基因，4 种耐消毒剂基因以及 14 种耐药基因的携带情况。并采用纸片扩散法检测菌株对 24 种抗生素的耐药表型。**结果：**从 150 份牦牛屠宰场采集到的样品中，检出金黄色葡萄球菌 67 株，检出率为 44.67%，其中牦牛胴体拭子和环境拭子采样中金黄色葡萄球菌的分离率较高，分别为 56.67%和 51.61%；分离菌株中共检出 12 种肠毒素基因，其中 *selx* 和 *seu*、*sej* 基因的携带率高；分离菌株检测出溶血毒素基因、杀白细胞素基因以及 *qacA/B*、*qacG*、*qacH* 等耐消毒剂基因；有 11 种耐药基因检测出阳性条带，其中耐甲氧西林基因 *mecA* 检出率为 62.69%，氨基糖苷类耐药基因（*aac6′/aph2′*）和大环内脂类（*ermA*、*ermB*）的检出率较高。采用 K-B 纸片扩散法对 67 株分离菌株进行 24 种抗生素的药敏实验发现大部分受试菌株存在多重耐药性。**结论：**本研究通过对牦牛屠宰过程金黄色葡萄球菌流行特征进行调查，发现牦牛屠宰环节存在携带毒力基因且多重耐药金黄色葡萄球菌的污染，有可能进入食物链对消费者健康存在潜在威胁，该研究结果为评价牦牛屠宰环节金黄色葡萄球菌安全风险提供参考依据。

关键词：牦牛屠宰；金黄色葡萄球菌；分离鉴定；毒力基因；耐药表型

Epidemiological characteristics of isolated strains of *Staphylococcus aureus* in yak slaughter

QU Yun, TONG Yao, TAN Yongping, ZHAO Yanying, TANG Junni*

(College of Life Science and Technology Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: objective: To study the epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from yak slaughterhouse. **Methods**: 150 samples were collected from one of yak slaughterhouse in Chengdu city. *S. aureus* were isolated using Baird-Parker selective medium and identified by polymerase chain reaction (PCR) with *S. aureus* specific heat-resistant nuclease (*nuc*) gene. 21 enterotoxins genes, 6 virulence genes, 4 disinfectant resistance genes, and 14 drug resistance genes were detected. The antimicrobial susceptibility of *S. aureus* isolates to 24 kinds of antibiotics was detected by disk diffusion method. **Results**: 67 *S. aureus* strains were isolated and identified from 150 samples collected from yak slaughterhouse; and the detection rate was 44.67%. The isolation rates of *S. aureus* in carcass swab samplings and environmental swab samplings were relatively high, with 56.67% and 51.61%, respectively.12 kinds of enterotoxins genes were detected, among which the carrying rate of *selx, seu* and *sej* genes was high. The virulence genes *(hlα, hlβ, eta, etb, pvl,* and *tsst-1*), the disinfectant resistance genes (*qacA/B, qacG,* and *qacH*), and 11 drug-resistant genes were all detected. Especially, the detection rate of methicillin-resistant gene (*mecA*) was 64.20%, and the detection rates of *aac6 ′/aph2′* and *erm* genes were very high. The susceptibility test of 67 isolates to 24 antibiotics by K-B disc diffusion method showed that most of the tested strains had multi-drug resistance. **Conclusions**: The epidemiological characteristics of *S. aureus* in the slaughter process of yak were investigated in this study. It was found that the slaughtering process had the toxic and multi-drug resistant *S. aureus* pollution, which may lead to potential threats to consumers' health in the food chain. This study provided a reference for evaluating the safety risks of *S. aureus* in yak slaughter.

Key words: yak slaughter; *Staphylococcus aureus*; isolation and identification; virulence gene; drug-resistant phenotype

中图分类号：TS251.1 文献标志码：A

基金项目：国家重点研发计划（2018YFD0500500）；四川省科技计划项目（2019YJ0261)；西南民族大学研究生创新课题（CX2019SZ121）

第一作者简介：屈云（1996-），女，硕士研究生，研究方向：畜产品加工与安全专业。E-mail：1045233459@qq.com

通讯作者简介：唐俊妮（1971-）（ORCID:0000-0001-7442-2394），女，博士，教授，研究方向：食品安全与食品微生物，E-mail：junneytang@aliyun.com

DOI：10.7506/spkx1002-6630-20190730-407

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）在自然界分布十分广泛，无论是空气、水、土壤等外界环境还是人畜皮肤粘膜表面或排泄物中均可存在，该细菌能引起皮肤、软组织感染，造成食物中毒，以及引起心内膜炎、败血症及中毒性休克等多种疾病症状[1-4]。其致病性主要是通过细菌产生的毒素或侵袭性酶，如肠毒素、表皮脱落毒素、溶血毒素、杀白细胞素、中毒性休克综合征毒素等。其中，由肠毒素基因（*sea-selx*）编码的多种肠毒素是引起人类食物中毒的主要毒力因子[5-6]，可与肠道神经细胞受体作用刺激呕吐中枢，导致以呕吐为主要症状的急性肠胃炎[7]；由 *hlα, hlβ* 基因编码的溶血毒素，主要损伤红细胞和血小板，破坏溶酶体，引起机体局部缺血和坏死[8]；由 *eta* 和 *etb* 基因编码的表皮脱落毒素可引起严重的葡萄球菌性烫伤样皮肤综合征[9]；另外，还涉及到由 *pvl* 基因编码的杀白细胞素，由 *tsst-1* 基因编码的中毒性休克综合征毒素，这些毒素通过不同的作用机制引起宿主一系列炎症和疾病。自 20 世纪抗生素被发现以来，抗生素不仅是治疗人类细菌感染最有效的药物，而且也作为预防及治疗用特效药、促生长剂、饲料添加剂等被广泛用于畜牧养殖业[10]。抗生素药物的过度使用甚至滥用导致微生物耐药性问题日益突出。近年来，从畜禽养殖和屠宰环节分离的耐药菌株日益增多，耐药菌的存在、耐药基因的传播、扩散等严重威胁到人类与动物健康[11]。目前，针对牦牛源金黄色葡萄球菌的研究相关文献报道不多，胡萍等[12]针对天祝白牦牛牛肉和鲜乳中金黄色葡萄球菌及其肠毒素污染进行分析，发现牦牛乳中金黄色葡萄球菌的检出率为 26.67%，牦牛肉中金黄色葡萄球菌检出率为 14.70%，说明天祝白牦牛产品中金黄色葡萄球菌污染严重；潘虎等[13]对拉萨市牦牛肉源金黄色葡萄球菌进行鉴定，并对其耐药性进行分析，认为西藏拉萨市牦牛肉源金黄色葡萄球菌携带多种 SEs 基因，且对青霉素类、大环内酯类和磺胺类等多种抗菌药物产生较强耐药性；李稳欣等[14]对送检病死牦牛的病原进行鉴定，发现牦牛死亡的病原为金黄色葡萄球菌。这些研究表明牦牛源金黄色葡萄球菌污染情况日趋严重，且菌株具有较强的耐药性。因此，应加强对牦牛源金黄色葡萄球菌的监测。本研究于成都市某牦牛屠宰场采集样品后进行金黄色葡萄球菌的分离鉴定，对细菌携带的毒力基因、耐消毒剂基因以及耐药基因进行检测，并进一步针对分离菌株进行药敏检测。研究结果为评价牦牛屠宰环节金黄色葡萄球菌安全风险提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

7.5%氯化钠肉汤、Baird-Parker 琼脂培养基、1%亚碲酸钾卵黄增菌液、胰蛋白胨大豆琼脂（TSA）培养基、胰酪胨大豆肉汤（TSB）培养基、Muller-Hinton 琼脂（MHA）培养基 青岛高科园海博生物技术有限公司；SDS 成都市科龙工试剂厂；Tris 饱和酚 北京博奥拓达科技有限公司；无水乙醇 成都海兴化学试剂厂；甘油 天津市瑞金特化学品有限公司；REGULAR AGAROSE G-10 型琼脂糖 BIOWEST 公司；GELVIEW 核酸染料及 DL 2000 Marker 宝生物工程(大连)有限公司；PCR 引物 上海生物工程有限公司；Master Mix 北京擎科新业科技有限公司。1×TAE 缓冲溶液；1×TE 缓冲液；REGULARAGAROSEG-10 型琼脂糖 BIOWESE 公司；GELVIEW 核酸染料、DL2000Marker 宝生物工程(大连)有限公司；含药纸片 Oxiod Limited 公司。

1.2 仪器与设备

DYY-6C 型电泳仪 北京六一仪器厂；WD800B 型微波炉 顺德市格兰仕微波炉电器有限公司；PTC-200PCR 仪、UniversalHood Ⅱ型凝胶成像仪 Bio-Rad 公司；SW-CJ-2FD 洁净工作台 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司；UV-6100 分光光度计 上海美普达仪器有限公司；GHP-9080 水式恒温培养箱 上海齐欣科学仪器有限公司；HZQ-F160 全温振荡培养箱 江苏省太仓市实验设备厂；AKHL-Ⅲ-24 艾柯超纯水机(台湾艾柯) 成都康宁实验专用纯水设备；MLS-3020 电热自动灭菌锅日本 SANYO 公司；5804 R 型 Eppendorf 冷冻离心机 Eppendorf 中国有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集

成都市某牦牛定点屠宰场采集屠宰放血后牦牛的鼻腔样本拭子 60 份；剥皮后牦牛的肩颈及胸部

胴体拭子 30 份；屠宰环境样本（屠宰刀具、屠宰接触地面）拭子 31 份；牦牛皮毛样本拭子 29 份，共计 150 份，采样时间为 2018 年 11 月。

1.3.2 金黄色葡萄球菌的分离纯化

金黄色葡萄球菌的分离纯化参照《食品安全国家标准 食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验》（GB 4789.10-2010）进行[15]。

1.3.3 金黄色葡萄球菌的分子鉴定

将纯化的菌株接种到 TSB 培养基中，37 ℃振荡培养 18-24 h，采用文献报道方法提取菌株 DNA[16]，金黄色葡萄球菌 ATCC6538 为阳性参考菌株。以金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因引物进行 PCR 扩增，具体引物序列为：上游引物：5’- AGTATATAGTGCAACTTCAACTAA-3’；下游引物：5’-ATCAGCGTTGTCTTCGCTCCAAAT-3’[17]。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。PCR 反应体系 20 μL， 包含 Taq 1.1×T3 Super PCR Mix 17μL，上、下游引物各 1μL，DNA 模板 1μL。PCR 反应程序：98 ℃预变性 2 min；98℃变性 20 s；59 ℃退火 10 s；72 ℃延伸 30 s；共 35 个循环，72 ℃延伸 2 min。将 PCR 产物经 1%琼脂凝胶电泳检测，同时随机选择阳性条带产物送至生工生物公司进行测序比对。

1.3.4 金黄色葡萄球菌毒力基因、耐消毒剂基因及耐药基因检测

DNA 模板制备同上，金黄色葡萄球菌各检测基因的引物序列，扩增片段长度，及退火温度详见表 1，PCR 反应体系同上。

表 1 本研究检测基因的引物序列

Table 1 The primers used in this study

基因类别	引物名称	引物序列（5’→3’）	退火温度（℃）	片段长度（bp）	参考文献
肠毒素基因	sea-F	ATGGTTATCAATGTGCGGGTGGTACACCAAACAAAAC	55℃	344	[18]
	sea-R	TGAATACTGTCCTTGAGCACCAAATAAATCGTAATTAAC			
	seb-F	TGGTATGACATGATGCCTGCACCAGGAGATAAATTTGAC	55℃	196	[18]
	seb-R	AGGTACTCTATAAGTGCCTGCCTTAATTACTAACTCTT			
	sec-F	GATGAAGTAGTTGATGTGTATGGATCAAATTACTATGTAAAC	55℃	399	[18]
	sec-R	AGATTGGTCAAACTTATCGCCTGGTGCAGGCATCATATC			
	sed-F	CTGAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATGAAAC	60℃	451	[18]
	sed-R	TCCTTTTGCAAATAGCGCCTTGCTTGTGCATCTAATTC			
	see-F	CGGGGGTGTAACATTACATGATAATAACCGATTGACC	50℃	286	[18]
	see-R	CCCTTGAGCATCAAACAAATCATAACTTACCGTGGACCCTTC			
	seg-F	ATAGACTGAATAAGTTAGAGGAGGTTTTATGAAGAAATTATC	55℃	594	[18]
	seg-R	TTAGTGAGCCAGTGTCTTGCTTTGTAATCTAGTTC			
	seh-F	CATTCACATCATATGCGAAAGCAGAAGATTTACACG	55℃	218	[18]
	seh-R	CTTCTGAGCTAAATCAGCAGTTTGCAAACTTTACTCTC			
	sei-F	AGGCGTCACAGATAAAAACCTACCTATTGCAAATCAACTC	55℃	154	[18]
	sei-R	ACAAGGACCATTATAATCAATGCCAAAAATATCCAGTTTC			
	sej-F	TGATGGTGGAGTAACACTGCATGAAAACAATCAACTTTATG	55℃	102	[18]
	sej-R	CTAGCGGAACAACAGTTCTGATGCTATCAATCCATAAAT			
	sek-F	GTGTCTCTAATAATGCCAGCGCTCAAGGCGATATAGG	55℃	282	[18]
	sek-R	CGTTAGTAGCTGTGACTCCACCATATATGTATTTAG			
	sel-F	ATTCACCAGAATCACACCGCTTAGAATACTCGTA	60℃	469	[18]
	sel-R	GTGTAAAATAAATCATACGAGAAATTAGAACCATCATTC			
	sem-F	CGCAACCGCTGATGTCGGACTTTTGAATCTTAGG	50℃	572	[18]
	sem-R	CAGCTTGTCCTGTTCCAGTATAAATAAGTCATAAG			

	sen-F	TCATGCTTATACGGAGGAGTTACGATACATGATGGAAATC	60℃	103	[18]
	sen-R	AACCTTCTTGTTGGACACCATCTTTAAATACATTAACGC			
	seo-F	GTGGAATTTAGCTCATCAGCGATTTCTAAAGAATTTCTAGG	55℃	116	[18]
	seo-R	GTACAGGCAGTATCCACTTGATGCTCACCATGACAATGTGC			
	sep-F	ATCATAACCAACCGAATCACCAGAAGAAGGGTGAACTC	50℃	547	[18]
	sep-R	GTCTGAATTGCAGGGAACTGCTTTAAGCAATCTTAG			
	seq-F	GGTGGAATTACGTTGGCGAATCAAAATTTAGATAAACC	55℃	330	[18]
	seq-R	CTCTGCTTGACCAGTTCCGGTGTAAAACAAATCGTATG			
	ser-F	TTCAGTAAGTGCTAAACCAGATCCAAGGCCTGGAGAATTG	55℃	368	[18]
	ser-R	CTGTGGAGTGCATTGTAACGCCCCCGTATATGCAAACTCC			
	ses-F	TTTTTGTTGAGAGCCCGTCTTT	60℃	333	[18]
	ses-R	ACTTCATATTCGCAGGACA			
	set-F	AGATCACAAGCTACTCAAGACT	55℃	539	
	set-R	CCATCAATAACATCACCCA			
	seu-F	ATGGCTCTAAAATTGATGGTTCTAAAATTTTAAAAACAG	55℃	410	[18]
	seu-R	GCCAGACTCATAAGGCGAACTATTAAATTCATATAAA			
	selx-F	CTATCGCTAGGTATCATCTATG	60℃	275	[19]
	selx-R	GCAACTCTGTATGTTCCTTC			
其他毒力基因	hlα-F	AGCAAAGTCTGGTGAGAATCCTGA	54℃	704	[20]
	hlα-R	GAAGTCTGGTGAAAACCCTGA			
	hlβ-F	CAATAGTGCCAAAGCCGAAT	55℃	496	[20]
	hlβ-R	TCCAGCACCACAACGAGAAT			
	eta-F	CATTTGGTGCAGGTGTTGATTT	52℃	412	[20]
	eta-R	TCCACGGATTTTTATTTTATTTATTAC			
	etb-F	ATATTATTTTTACACCCGCTCAA	53℃	481	[20]
	etb-R	TTCCCCAAAGTGTCTCCAAAAGTA			
	tsst1-F	TGCAAAAGCATCTACAAACGA	55℃	499	[21]
	tsst1-R	TGTGGATCCGTCATTCATTG			
	pvl-F	ATGAAAAAAATAGTCAAATCAT	55℃	761	[22]
	pvl-R	GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG			
耐药基因	oxa-F	GTCTTTCAGAGTACGGCATTA	55℃	822	[23]
	oxa-R	GATTTTCTTAGCGGCAACTTA			
	aac6'/aph2'-F	CCAAGAGCAATAAGGGCATA	45℃	220	[23]
	aac6'/aph2'-R	CACTATCATAACCACTACCG			
	tetM-F	GTGTGACGAACTTTACCGAA	55℃	501	[23]
	tetM-R	GCTTTGTATCTCCAAGAACAC			
	ermA-F	GTTCAAGAACAATCAATACAGAG	52℃	421	[24]
	ermA-R	GGATCAGGAAAAGGACATTT TAC			
	ermB-F	CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC	55℃	359	[24]
	ermB-R	GAATCGAGACTTGAGTGTGC			
	msrA-F	GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG	50℃	940	[24]
	msrA-R	AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT			
	mefA-F	ACTATCATTAATCACTAGTGC	55℃	346	[23]
	mefA-R	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG			

	grlA-F	ACTTGAAGATGTTTTAGGTGAT	55℃	618	[25]
	grlA-R	TTAGGAAATCTTGATGGCAA			
	vanA-F	ATGAATAGAATAAAAGTTGC	62℃	1032	[26]
	vanA-R	TCACCCCTTTAACGCTAATA			
	chlA-F	CCTGCTAACAATAGACCTGA	52℃	768	[19]
	chlA-R	CGCTTTAACATTTGCGATAT			
	blaZ-F	TGAACCGTATGTTAGTGC	53℃	681	[23]
	blaZ-R	GTCGTGTTAGCGTTGATA			
	tetA-F	CTAAAGAGGACCAGAAGACT	55℃	512	[19]
	tetA-R	ATAACCCGGTACTAATAACA			
	norA-F	TATCGGTTTAGTATTACCAGTC	53℃	406	[19]
	norA-R	AACTTCTGCCATAAATCCAC			
	mecA-F	TCCACCCTCAAACAGGTGAA	56℃	139	[27]
	mecA-R	TGGAACTTGTTGAGCAGAGGT			
耐消毒剂基因	qacA/B-F	GCAGAAAGTGCAGAGTTCG	55℃	361	[28]
	qacA/B-R	CCAGTCCAATCATGCCTG			
	qacC-F	GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA	55℃	195	[28]
	qacC-R	GACTACGGTTGTTAAGACTAAACCT			
	qacE-F	ATGAAAGGCTGGCTTTTTCTT	55℃	332	[28]
	qacE-R	TTAGTGGGCACTTGCTTTGG			
	qacG-F	CAACAGAAATAATCGGAACT	55℃	275	[28]
	qacG-R	TACATTTAAGAGCACTACA			
	qacH-F	ATAGTCAGTGAAGTAATAG	55℃	295	[28]
	qacH-R	AGTGTGATGATCCGAATGT			

1.3.5 金黄色葡萄球菌耐药表型检测

药敏实验根据美国临床和实验室标准协会（Clinical and laboratory standards in stitute，CLSI）推荐的 K-B 纸片扩散法进行操作，实验结果按照 CLSI 的标准进行判定，所用抗菌药物及浓度见表 2。

表 2 本研究 24 种抗生素药物及其使用浓度

Table2 The concentration of different drugs used in this study

抗菌药物类型	药物名称	抗菌药物代码	纸片含量(μg）
头孢类	头孢西丁	FOX	30
	头孢噻肟	CTX	30
	头孢他啶	CAZ	30
	头孢曲松	CTRX	30
氨基糖苷类	庆大霉素	GEN	10
	阿米卡星	AK	30
	卡那霉素	KAN	30
	链霉素	SM	10
氟喹诺酮类	环丙沙星	CIP	5
	左氧氟沙星	LEV	5
	氧氟沙星	CIP	5
	诺氟沙星	NOR	10
β-内酰胺类	青霉素	PEN	10

	苯唑西林	OXA	1
青霉素类	氨苄西林	AMP	1
碳青霉烯类	亚胺培南	IPM	10
大环内酯类	红霉素	ERY	15
四环素类	四环素	TCY	30
苯丙醇类	氯霉素	CHL	30
多肽类	万古霉素	VAN	30
林可胺类	克林霉素	CLI	2
安沙霉素类	利福平	RFP	5
硝基呋喃类	呋喃妥因	F	300
叶酸代谢途径抑制	甲氧苄啶	TMP	25
多肽类	杆菌肽 B	B	10

1.3.6 数据处理分析

药敏实验每株菌和每个药片平行重复 3 次，结果以平均值±SD 表示，数据采用 SPSS 19.0 统计软件处理，采用 Microsoft Excel 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 牦牛屠宰环节金黄色葡萄球菌分离、鉴定结果

金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板的菌落形态为圆形黑色菌落，光滑凸起，表面湿润，菌落周围有透明环。本研究共采集样品 150 份，其中，鼻腔拭子样本 60 份，牦牛肉胴体样本拭子 30 份，环境样本拭子 31 份，皮毛样本拭子 29 份。通过 PCR 检测得到携带 *nuc* 基因的金黄色葡萄球菌株 67 株，总检出率约为 44.67%（67/200）。其中，鼻腔拭子样本检出 22 株，检出率约为 36.67%（22/60）；牦牛肉胴体样本拭子检出 17 株，检出率约为 56.67%（17/30）；环境样本拭子检出 16 株，检出率约为 51.61%（16/31）；皮毛样本拭子检出 12 株，检出率约为 41.38%（12/29）。

2.2 牦牛屠宰环节金黄色葡萄球菌分离菌株毒力基因携带情况

PCR 检测结果显示，67 株分离菌株中，传统肠毒素（*sea-see*）未检出，新型肠毒素中 *seg*、*sei*、*sej*、*sek*、*sem*、*seo*、*sep*、*ser*、*ses*、*set*、*seu* 共计 11 种肠毒素基因被检出，其中 *sej*、*set*、*seu* 和 *selx* 的检出阳性率较高，*selx* 和 *seu* 检出率高达 97.01%和 91.04%，*sej* 检出率为 64.18%，*set* 的检出率为 31.34%（见图 1）。针对其他毒力基因检测结果详见图 2，溶血素基因 *hlα* 和 *hlβ* 的检出率分别为 76.12%（51/67）和 38.81%（26/67）；表皮剥脱毒素基因 *eta*、*etb* 的检出率为 4.48%（3/67），11.94%（8/67）；杀白细胞素基因 *pvl* 的检出率为 5.97%（4/67），中毒休克征毒素基因 *tsst-1* 阳性检出率为 11.94%（8/67），所有菌株携带两种及以上毒力基因。

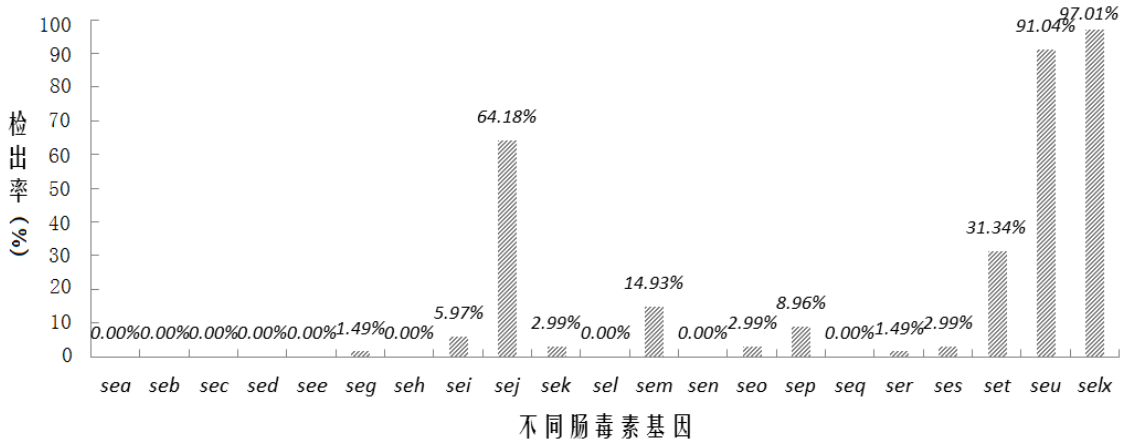


图 1 肠毒素基因的检出结果

Fig.1 The detection rates for 21enterotoxin genes

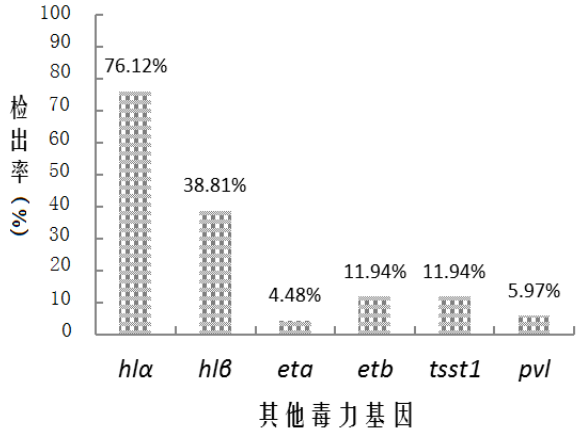


图 2 其他毒力基因的检出结果

Fig.2 Detection rates for other virulence genes

2.3 金黄色葡萄球菌耐消毒剂基因携带情况检出结果

耐消毒剂基因 *qacA/B* 的检出率为 28.36%（19/67）、*qacG*、*qacH* 的阳性率均较高，分别为 70.15%（47/67）和 71.64%（48/67）；其中 *qacC/D* 的检测率最高，达到 95.52%（64/67），详见图 3。

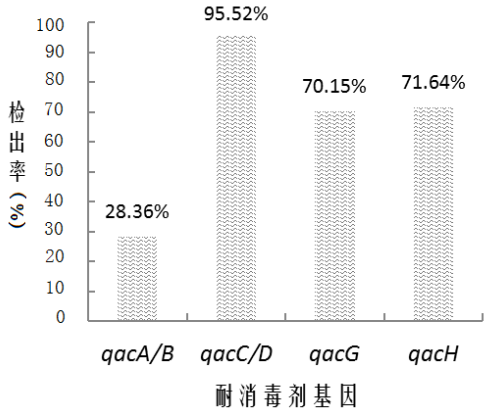


图 3 耐消毒剂基因的检出结果

Fig.3 Detection rates for disinfectant resistance genes

2.4 金黄色葡萄球菌耐药基因携带情况检测结果

67 株分离菌株的 14 种耐药基因检测结果中，氨基糖苷类耐药基因（*aac6'/aph2'*）和大环内脂类（*ermB*）的阳性检出率均高达到 86.57%(58/67)；其次是 *blaZ*（76.12%，51/67）、*mecA*（62.69%，42/67）、*tetM*（64.18%，43/67）、ermA（61.19%，41/67）、*chlA*（50.75%，34/67）、*tetA*（40.30%，27/67）、*norA*（35.82%，24/67）和 *grlA*（25.37%，17/67）；只有 1 株分离菌株携带 *vanA* 基因（1.49%，1/67），*oxa*、*msrA* 和 *mefA* 基因未检出，结果详见图 4。

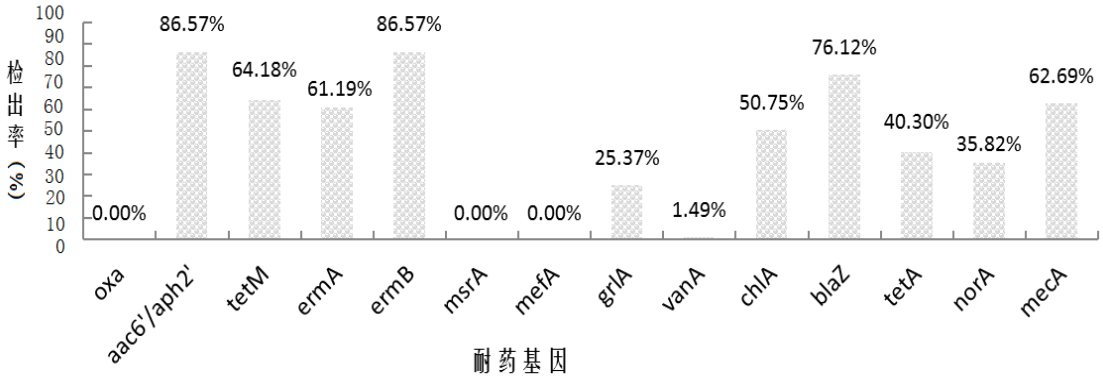


图 4 耐药基因的检出结果

Fig.4 The detection rates for 14 drug resistance genes

2.5 金黄色葡萄球菌的药敏实验结果

67 株分离菌株对 24 种抗生素有不同的耐药谱，如表 3 所示。金黄色葡萄球菌对克林霉素（62/67，92.54%）耐药率最高，其次是青霉素（57/67，85.07%）、利福平（55/67，82.09%）、氨苄西林（52/67，77.61%）、左氧氟沙星（48/67，71.64%）、四环素 43/67，64.18%）、红霉素（42/67，62.69%）、甲氧苄啶（37/67，55.22%）、阿米卡星（37/67，55.22%）、庆大霉素（30/67，44.78%）和环丙沙星（27/67，40.30%）。对头孢类抗生素头孢西丁（47/67，70.15%）、头孢噻肟（44/76，65.67%）、头孢曲松（41/67，61.19%）和头孢他啶（36/67，53.73%）的抗性较强。相较之下，对卡那霉素（19/67，28.36%）、氯霉素（15/67，22.39%）、杆菌 B（15/67，22.39%）、诺氟沙星（11/67，16.42%）、万古霉素（11/67，16.42%）和呋喃妥因（9/67，13.43%）的抗性较低，所有分离菌株对亚胺培南敏感。64 株（64/67，95.52%）具有多重耐药性（抗 3 种及以上抗生素）。82.09%（55/67）菌株抗 5 种以上抗生素，59.70%（40/67）菌株抗 10 种以上抗生素，9.00%（6/67）菌株对 18 种抗生素有抗性。

表 3 金黄色葡萄球菌菌株对 24 种抗生素的药敏检测结果

Table3 The results of antimicrobial susceptibility test to 24 drugs for *S. aureus* isolates

抗生素名称	耐药		中介		敏感	
	菌株数	耐药率（%）	菌株数	中介率（%）	菌株数	敏感率（%）
克林霉素	62	92.54	5	7.46	0	0.00
青霉素	57	85.07	2	2.99	8	11.94
利福平	55	82.09	11	16.42	1	1.49
氨苄西林	52	77.61	7	10.45	8	11.94
左氧氟沙星	48	71.64	15	22.39	4	5.97
头孢西丁	47	70.15	10	14.93	10	14.93
头孢噻肟	44	65.67	14	20.90	9	13.43
四环素	43	64.18	21	31.34	3	4.48
红霉素	42	62.69	21	31.34	4	5.97
头孢曲松	41	61.19	14	20.90	12	17.91
甲氧苄啶	37	55.22	19	28.36	11	16.42
阿米卡星	37	55.22	25	37.31	5	7.46
头孢他啶	36	53.73	3	4.48	28	41.79
庆大霉素	30	44.78	30	44.78	7	10.45
环丙沙星	27	40.30	28	41.79	12	17.91
万古霉素	11	16.42	52	77.61	4	5.97

卡那霉素	19	28.36	41	61.19	7	10.45
氯霉素	15	22.39	38	56.72	14	20.90
杆菌肽 B	15	22.39	18	26.87	34	50.75
诺氟沙星	11	16.42	38	56.72	18	26.87
呋喃妥因	9	13.43	33	49.25	25	37.31
链霉素	0	0.00	26	38.81	41	61.19
苯唑西林	0	0.00	7	10.45	60	89.55
亚胺培南	0	0.00	0	0.00	67	100.00

3 讨论

本研究从牦牛屠宰场共采集样本 150 份，分离出金黄色葡萄球菌 67 株，分离率为 44.67%，说明牦牛屠宰环节存在较高的金黄色葡萄球菌污染。现有的研究表明其他畜产品中也存在较高的金黄色葡萄球菌检出率，例如谷晓红[29]等在山东地区生鲜乳中金黄色葡萄球菌的检出率为 44.62%-64.28%；宋明辉等[30]在市售生鲜肉样品中分离金黄色葡萄球菌，分离率为 37.84%。本研究取样的牦牛养殖屠宰场长期处于完全暴露的环境条件下，为金黄色葡萄球菌的生长提供了有利的条件。

本研究中，牦牛屠宰环节来源的金黄色葡萄球菌携带毒力基因以及抗消毒剂基因的情况较为严重，所分离的 67 株菌株共携带 11 种肠毒素基因，尽管传统肠毒素基因 *sea-see* 未检出，但所有菌株都携带两种及以上毒力基因，说明牦牛屠宰环境分离株具有潜在的致病性。本研究结果与刘保光[31]等针对牛奶源金黄色葡萄球菌的毒力基因检测结果有一定的一致性。另外，本研究分离菌株对耐消毒剂基因具有较高的携带率，几乎大多数分离菌株都携带 *qacC/D* 基因，携带率最低的 *qacA/B* 基因的检出率也有 28.36%。这可能与屠宰环境长期频繁的使用各类消毒剂有关。学者认为亚洲地区对细菌抗消毒剂基因检出率普遍较高，且发现 *qacA/B* 基因检出率明显高于 *qacC/D* 基因，认为 *qacA/B* 基因是亚洲地区介导消毒剂抗性的主要因素[32]。另有文献报道美洲地区金黄色葡萄球菌的 *qacA/B* 的检出率较低（2%），*qacC/D* 检出率（7%）相对稍高于 *qacA/B* 基因[33]。本研究中检测得出 *qacC/D* 基因远远高于 *qacA/B* 基因，这可能与菌株来源不同有关，我们检测的是牦牛源金黄色葡萄球菌，关于牦牛源金黄色葡萄球菌抗消毒剂基因的检测报道不多，以后应加大这方面的研究力度。目前，屠宰企业采用的常用化学消毒剂主要有：醛类消毒剂、过氧化物类消毒剂、卤素类消毒剂、酚类消毒剂、季铵盐类消毒剂、复方化学消毒剂等[34]。其中，季铵盐类消毒剂是一种阳离子表面活性剂，其杀灭微生物的机制主要是通过破坏菌体的通透性，使菌体内的蛋白质变性，导致病原微生物死亡。此类消毒剂使用范围广泛，通常可用于畜禽栏舍的喷雾消毒[35]。可见，抗消毒剂基因携带率高低与该地区消毒剂的使用情况可能具有密切关系。

本研究中分离菌株对克林霉素、青霉素、利福平、氨苄西林、左氧氟沙星、头孢西丁、头孢噻肟、四环素、红霉素、头孢曲松、甲氧苄啶、头孢他啶、阿米卡星、庆大霉素和环丙沙星等抗生素的抗性较强，耐药基因检测结果也显示分离菌株携带的 7 种耐药基因检出率超过 50%，表明牦牛屠宰源分离的金黄色葡萄球菌耐药情况十分严重。与余璐[36]对食源性金黄色葡萄球菌的耐药分析以及潘虎等[13]对西藏拉萨市牦牛肉源金黄色葡萄球菌耐药分析结果相符。近年来，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）逐渐成为多重耐药性金黄色葡萄球菌的代名词，*mecA* 作为 MRSA 的判定基因，在本次研究中 *mecA* 的检出率为 64.20%，这说明了本研究分离出的大部分菌株属于 MRSA 菌株，存在多重耐药性。与姚咏明[37]等报道金黄色葡萄球菌耐药谱广，耐药性强一致。管程程[38]等研究认为，金黄色葡萄球菌的耐药机制是由于抗生素、消毒剂的使用不当造成的。有文献报道细菌消毒剂抗性与抗菌药物耐药性存在相关性，并且感染细菌抗性已从抗菌药物扩展到抗消毒剂[39]。由于近年来金黄色葡萄球菌的耐药菌株大幅增加，耐药谱也越来越广泛，提示抗生素、消毒剂合理使用的重要性，避免细菌的耐药情况进一步加重。本研究结果揭示了金黄色葡萄球菌牦牛屠宰环节分离菌株耐药基因、毒力基因的分布和耐药情况，对食品安全风险评估提供参考。

参考文献

[1]王璇,王娉,葛毅强,等.食品中金黄色葡萄球菌致病性研究进展[J].中国人兽共患病学报,2017,33(06):553-558. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2017.06.016.

[2] STEFANIA S, RYEON D, JODI A, et al. (2012). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. International Journal of Antimicrobial Agents, 39(4), 273-282. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030.

[3]NATHWANI D, MORGAN M, MASTERTON RG, et al. Guidelines for UK practice for the diagnosis and management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections presenting in the community.[J]. Chinese Journal of Infection & Chemotherapy, 2008, 61(5):976-994. DOI: 10.1093/jac/dkn096.

[4] VERGNANO S , MENSON E , SMITH Z , et al. Characteristics of Invasive *Staphylococcus aureus* in United Kingdom Neonatal Units[J]. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2011, 30(10):850-854. DOI: 10.1097/inf.0b013e318224546d.

[5]张林吉,张小荣,曹永忠,等.金黄色葡萄球菌肠毒素基因与 MLST 及 spa 分子克隆相关性研究[J].中国病原生物学杂志,2018,13(05):449-456. DOI: 10.13350/j.cjpb.180501.

[6]ARGUDIN M Á, MENDOZA M C, RODICIO M R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins[J]. Toxins, 2010, 2(7):1751-1773. DOI: 10.3390/toxins2071751.

[7]CHEN Q, XIE SM. Genotypes, Enterotoxin Gene Profiles, and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Associated with Foodborne Outbreaks in Hangzhou, China.[J]. Toxins, 2019, 11(6). DOI: 10.3390/toxins11060307.

[8] KWAK YK, VIKSTROM E, MAGNUSSON KE, et al. The *Staphylococcus aureus* Alpha-Toxin Perturbs the Barrier Function in Caco-2 Epithelial Cell Monolayers by Altering Junctional Integrity[J]. Infection & Immunity, 2012, 80(5):1670. DOI: 10.1128/IAI.00001-12.

[9]蔡双启，黄莹莹，陈一强. 金黄色葡萄球菌毒力因子的研究进展[J]. 国际呼吸杂志，2015，35(16):1242-1245. DOI： 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2015.16.009.

[10]史晓敏,王少林.食品动物养殖环境中细菌耐药性研究进展[J].生物工程学报,2018,34(08):1234-1245. DOI:10.13345/j.cjb.180177.

[11]张阳,周文渊,张志刚,等.养殖源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 SCCmec 耐药元件、毒力危害和流行性分析[J].中国人兽共患病学报,2018,34(02):109-117. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2018.00.016.

[12]胡萍,苏诚玉,权玉玲,等.天祝白牦牛牛肉和鲜乳中金黄色葡萄球菌及其肠毒素污染的分析研究[J].中国卫生检验杂志,2005(07):840-841. DOI:10.3969/j.issn.1004-8685.2005.07.034.

[13]潘虎,达娃卓玛,次顿,等.拉萨市牦牛肉源金黄色葡萄球菌的鉴定及其耐药性分析[J].南方农业学报,2018,49(05):956-962.

[14]李稳欣,范秀兰,蔡其刚,等.牦牛金黄色葡萄球菌的分离鉴定及药敏试验[J].黑龙江畜牧兽医,2018(02):91-93+97+242. DOI： 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.01.0271.

[15]中华人民共和国卫生部. GB 4789.10-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验[S].北京：中国标准出版社，2010.

[16]唐俊妮,龙飞,史贤明,等.金黄色葡萄球菌基因组 DNA 提取方法的比较研究[J].中国卫生检验杂志,2008(08):1467-1469. DOI:10.3969/j.issn.1004-8685.2008.08.001.

[17]TANG J, CHEN J, LI H, et al. Characterization of adhesin genes, staphylococcal nuclease, hemolysis, and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from different sources.[J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2013, 10(9):757-763. DOI：10.1089/fpd.2012.1474.

[18]HWANG SY, KIM SH, JANG EJ, et al. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(1):99-105. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.013.

[19]马伊萨兰，张荣，王洪志,等. 食品中金黄色葡萄球菌生物被膜形成基因分析及影响因素研究[J]. 食品工业科技，2017(15):135-139+145. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2017.15.025.

[20] DUIJKEREN EV, IKAWATY R, BROEKHUIZEN-STINS MJ., et al. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 126(4):383-389. DOI:10.1016/j.vetmic.2007.07.021

[21] XIE Y, HE Y, GEHRING A, et al. Genotypes and Toxin Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from China[J]. PLoS ONE, 2011, 6(12):e28276. DOI:10.1371/journal.pone.0028276.

[22] PAPADOPOULOS P, PAPADOPOULOS T, ANGELIDIS AS, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece [J]. Food Microbiology, 2018, 69:43-50. DOI:10.1016/j.fm.2017.07.016.

[23] XU J, SHI C, SONG M, et al. Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance Traits of Foodborne *Staphylococcus aureus* Isolates from Shanghai[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(4):M635-M642. DOI:10.1111/1750-3841.12405.

[24] LINA G, QUAGLIA A, REVERDY ME, et al. Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among *Staphylococci*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(5):1062. DOI:http://dx.doi.org/.

[25] SCHMITZ FJ, JONES ME, HOFMANN B, et al. Characterization of *grlA*, *grlB*, *gyrA*, and *gyrB* mutations in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* and effects of mutations on ciprofloxacin MIC.[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 1998, 42(5):1249-1252. DOI:10.1345/aph.17390.

[26] SAHA B, SINGH AK, GHOSH A, et al. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia)[J]. Journal of Medical Microbiology, 2008, 57(1):72-79. DOI:10.1099/jmm.0.47144-0.

[27]ATSHAN SS, SHAMSUDIN MN, KARUNANIDHI A, et al. Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm developm ent of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2013, 18:106-112. DOI:10.1371/journal.pone.0082814 .

[28] IGNAK S, NAKIPOGLU Y, GURLER B. Frequency of antiseptic resistance genes in clinical staphycocci and enterococci isolates in Turkey[J]. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 2017, 6(1):88. DOI: 10.1186/s13756-017-0244-6.

[29]谷晓红,张从超,陈玲,等.山东部分地区生牛乳中金黄色葡萄球菌的检测与分析[J].食品与药品,2016,18(06):411-414. DOI:10.3969/j.issn.1672-979X.2016.06.012.

[30]宋明辉,秦峰,刘浩等.市售生鲜肉食品中金黄色葡萄球菌基因分型与毒素基因检测[J].上海预防医学,2019(06):461-465. DOI:10.19428/j.cnki.sjpm.2019.19478

[31]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,2019,40(02):281-286. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180110-124.

[32]卢中一,陈勇,陈伟,等.金黄色葡萄球菌对消毒剂的抗性及其流行病学研究进展[J].中国感染控制杂志,2014,13(07):442-446. DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2014.07.020.

[33]MCNEIL JC, HULTEN KG, KAPLAN SL, et al. *Staphylococcus aureus* infections in pediatric oncology patients: high rates of antimicrobial resistance, antiseptic tolerance and complications. Pediatr Infect Dis J. 2013; 32(2):124-8. DOI:10.1097/INF.0b013e318271c4e0.

[34]李其松,吴玉龙,吴春阳,等.养猪场常用的化学消毒剂及其优缺点分析[J].猪业科学,2019,36(07):136-137.

[35]张波.畜禽养殖场消毒剂的选择[J].畜牧兽医科技信息,2016(08):47-48.

[36]余璐.食品源金黄色葡萄球菌耐药基因的检测[J].现代食品,2017(11):121-125. DOI：10.16736/j.cnki.cn41-1434/ts.2017.11.041.

[37]姚咏明,盛志勇.金黄色葡萄球菌肠毒素与多器官功能障碍综合征[J].中国危重病急救医学,2001(09):517-519. DOI:10.3760/j.issn:1003-0603.2001.09.002.

[38] 管程程, 于美美. 金黄色葡萄球菌的致病和耐药机制研究进展[J]. 实验与检验医学, 2017(1). DOI:10.3969/j.issn.1674-1129.2017.01.001.

[39]袁丽美,吴坚敏,周黎.临床分离金黄色葡萄球菌的耐药性及其对消毒剂抗性研究[J].中国消毒学杂志,2018,35(11):850-852. DOI:CNKI:SUN:ZGXD.0.2018-11-016.