

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.01.01

胶东地区不同家禽 MSSA 和 MRSA 的流行分布与耐药性分析

肖震^{1,2}, 刘娜¹, 赵建梅¹, 李彦³, 隋明华⁴, 王娟¹, 段笑笑³, 韩云⁴, 刘俊辉¹,
王琳¹, 张青青⁴, 黄秀梅¹, 高玉斌¹, 王君玮¹, 曲志娜^{1*}, 刘焕奇^{2*}

(1. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032; 2. 青岛农业大学动物医学院, 山东 青岛 266109;

3. 青岛市动物疫病预防控制中心, 山东 青岛 266041; 4. 莱西市农业农村局, 山东 青岛 266600)

[收稿日期] 2022-05-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 12-0001-11 [中图分类号] S859.79

[摘要] 通过了解胶东地区肉鸡、蛋鸡和水禽(鸭、鹅)中甲氧西林敏感/耐药金黄色葡萄球菌(MSSA/MRSA)的流行情况及耐药现状,为临床合理用药、有效控制耐药菌株的流行传播提供依据。采用细菌常规分离培养、质谱/PCR鉴定、微量肉汤稀释法和 *spa* 分型等方法,对 2021 年 8 月至 10 月在青岛地区采集的 2730 份禽源咽拭子进行 MSSA 及 MRSA 分离鉴定、*spa* 分型及药敏试验,利用 SPSS26.0 软件和 BioNumericsv7.6 软件进行数据处理分析。2730 份禽源咽拭子中共获得金黄色葡萄球菌 742 株(27.18%),其中 MSSA 528 株(19.34%),MRSA 214 株(7.84%)。三种家禽菌株分离率依次为水禽(38.33%)、蛋鸡(28.45%)、肉鸡(20.33%)。351 株代表性金黄色葡萄球菌共获得 16 种 *spa* 型别, MSSA (70.80%) 和 MRSA (95.30%) 均是以 t899 为主。部分型别仅在蛋鸡(t10、t1002、t3155)或肉鸡(t571、t1011)或水禽(t1793、t5268、t267)中分离到。MSSA 和 MRSA 对青霉素类、喹诺酮类等多种药物显示出高水平耐药,分别对 8 种和 13 种抗菌药的耐药率在 62.89% 以上,MRSA 对 7 种药物完全耐药(100%)。除磺胺异噁唑、万古霉素、复方新诺明、多西环素、利奈唑胺 5 种药物外($0.24 < P < 0.97$),MRSA 对其余 13 种药物耐药率均极显著高于 MSSA ($P < 0.01$)。199 株代表性菌株中共 191 株多重耐药,总体多重耐药率高达 95.98%。其中,89 株(91.75%) MSSA 多重耐药菌株主要分布在 6~8 耐,102 株 MRSA (100%) 主要分布在 9~10 耐。综上结果表明:金黄色葡萄球菌及 MRSA 在胶东地区家禽中分布较为广泛,且 MRSA 是以 t899 为主的克隆传播;胶东地区不同家禽中金黄色葡萄球菌的携带存在差异,水禽携带 MSSA 和 MRSA 的现象较其它两种家禽更为普遍;胶东地区禽源金黄色葡萄球菌对多种抗菌药普遍耐药,且 MRSA 较 MSSA 耐药更为严重,均为多重耐药菌株。实际临床用药中应尽量减少大环内酯类、喹诺酮类、青霉素类等高度耐药抗生素的使用频率,有针对性地选用敏感抗生素,以缓解严重的耐药现状。

[关键词] MRSA; MSSA; 家禽; *spa* 分型; 流行分布; 耐药性

基金项目: 青岛市科技惠民示范引导专项(21-1-4-ny-11-nsh); 国家重点研发计划(2022YFC2303900)

作者简介: 肖震,硕士,从事细菌耐药性方向研究。

通讯作者: 刘焕奇, E-mail: huanqiliu@126.com; 曲志娜, E-mail: 641117207@qq.com

Prevalence and Antimicrobial Resistance of MSSA and MRSA Isolated from Different Poultry

XIAO Zhen^{1,2}, LIU Na¹, ZHAO Jian - mei¹, LI Yan³, SUI Ming - hua⁴, WANG Juan¹, DUAN Xiao - xiao³,
HAN Yun⁴, LIU Jun - hui¹, WANG Lin¹, ZHANG Qing - qing⁴, HUANG Xiu - mei¹, GAO Yu - bin¹,
WANG Jun - wei¹, QU Zhi - na^{1*}, LIU Huan - qi^{2*}

(1. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China; 2. Qingdao Agricultural University Animal Medicine College, Qingdao, Shandong 266109, China; 3. Qingdao Animal Disease Prevention and Control Center, Qingdao, Shandong 266041, China; 4. Laixi agricultural rural Bureau, Qingdao, Shandong 266600, China)

Corresponding author: LIU Huan - qi, E - mail: huanqiliu@126.com; QU Zhi - na, E - mail: 641117207@qq.com

Abstract: To understand the prevalence and antimicrobial resistance of methicillin - sensitive / resistant *S. aureus* (MSSA / MRSA) in broiler, layer and waterfowl (duck and goose) in Jiaodong region, so as to provide basis for clinical rational drug use and effective control of the epidemic and transmission of drug - resistant strains. A total of 2730 avian derived throat swabs collected in Qingdao area from August to October 2021 were screened for MSSA and MRSA isolation and identification, *spa* type and susceptibility testing by routine isolation and culture of bacteria, mass spectrometry / PCR identification, microbroth dilution and *spa* typing methods, and SPSS26.0 and BioNumerics v7.6 waresoft were used to analyze the experimental data. A total of 742 isolates (27.18%) of *S. aureus* were obtained from 2730 throat swabs of avian origin, including 528 isolates of MSSA (19.34%) and 214 isolates of MRSA (7.84%). The isolation rates of the three poultry strains were waterfowl (38.33%), laying hens (28.45%), broilers (20.33%). A total of 16 *spa* types were obtained from 351 *S. aureus* isolates, and t899 were predominant in MSSA (70.80%) and MRSA (95.30%). Some types were isolated only in laying hens (t010, T002, t3155) or broilers (t571, t011) or waterfowl (t1793, t5268, t267). MSSA and MRSA showed high - level resistance to many antimicrobials including penicillins and quinolones, with resistance rates above 62.89% against eight and 13 antimicrobials, respectively, and MRSA was completely resistant to seven drugs (100%), which was more highly resistant ($P < 0.01$) to all 13 drugs tested than MSSA, with the exception of five drugs: sulfaisoxazole, vancomycin, Compound sulfamethoxazole doxycycline and linezolid ($0.24 < p < 0.97$). 191 multiple - drug resistant (MDR) strains, and the overall MDR rate was up to 95.98%. Among them, 89 strains (91.75%) of MSSA are MDR strains, which are mainly resistant to 6 ~ 8 classes of antibiotics and 102 MDR strains (100%) of MRSA are mainly resistant to 9 ~ 10 classes of them. In summary, the results show that *S. aureus* and MRSA are widely distributed in poultry in Jiaodong region, and MRSA is clonally transmitted with t899 predominance; There were differences in the carriage of *S. aureus* among different poultry in Jiaodong region, and the phenomenon of MSSA and MRSA carriage among waterfowl was more prevalent than that among the other two poultry species; Avian origin *S. aureus* in Jiaodong region was generally resistant to several antimicrobials, and MRSA was more severely resistant than MSSA, all of which were MDR strains. The frequency of highly resistant antibiotics, such as macrolides, quinolones, and penicillins, should be minimized in the actual clinical use, and sensitive antibiotics should be selected in a targeted manner to alleviate the severe resistance status.

Key words: MSSA; MRSA; poultry; *spa* prevalence; antimicrobial resistance

金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)广泛分布于世界各地,是人类和其他动物多种感染病的主要病原菌,包括轻微的细菌感染甚至到危及生命的菌血症^[1-2]。金黄色葡萄球菌的来源报道最早可以追溯到 1880 年,当时亚历山大·奥斯顿(Alexander Ogston)从手术伤口感染中分离出金黄色葡萄球菌。这种分离的微生物能够在注射到豚鼠和小鼠体内时产生脓肿。^[3-4]近年来,随着全球范围内抗生素药物的广泛使用,金黄色葡萄球菌耐药状况日趋严重,以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)为典型代表的多重耐药菌株的相关报道渐增。有研究显示,全球不同地区 MRSA 的感染率占到金黄色葡萄球菌总检出数量的 30%~60%,且呈逐年上升趋势^[5]。MRSA 主要是由 *mecA* 编码低亲和力青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)而产生耐药性^[6],该蛋白对所有 β -内酰胺类抗菌素(青霉素、头孢菌素、碳青霉烯类)具有低亲和力,使葡萄球菌对这一大型和关键的抗菌素类产生耐药性^[7-8];也有一小部分由于质粒介导产生的 β_2 内酰胺酶而产生耐药性。有分析证实家畜接触和人类耐甲氧西林金黄色葡萄球菌传播之间呈正相关,农场人员和职业接触猪或家禽的工人也面临着被家畜相关 MRSA(LA-MRSA)感染的高风险。^[9-11]因 MRSA 感染率高,致死率高,对多种抗生素耐药,成为全球性临床治疗难点,不仅严重威胁人类公共卫生安全,而且畜禽携带耐药菌,也会因治疗困难给养殖业生产带来巨大的经济损失。由于动物源细菌耐药性存在时间、空间、动物间等流行分布差异,且 MRSA 的报道多以牛源、猪源为主,禽源报道较少。因此,本研究通过分析青岛地区不同禽源 MSSA 和 MRSA 的流行及耐药情况,采取有针对性的干预措施。本研究旨在评估青岛地区蛋鸡、肉鸡、水禽三种不同家禽共 2730 份咽拭子样品中 MSSA 和 MRSA 的流行情况、耐药特征及 *spa* 优势型别,为该地区防控 MRSA 及临床合理用药提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 金黄色葡萄球菌显色培养基、MRSA 显色培养基购于上海欣中生物工程有限

公司;7.5%氯化钠肉汤、胰蛋白胨大豆琼脂,购于北京陆桥技术股份有限公司;基质、裂解液,均购于郑州安图生物工程股份有限公司,Go Taq Green Master Mix、DNA Marker DL1 000 购于 TaKaRa 公司,核酸染料、琼脂糖;96 孔药敏板,购于上海星佰生物技术有限公司;生物安全柜;细菌恒温培养箱;MS1000 全自动微生物质谱检测系统;PTC200 基因扩增仪;电泳仪、XR 凝胶成像分析仪;比浊仪;涡旋混匀仪等。金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 和 MRSA ATCC 33591 均由中国动物卫生与流行病学中心致病微生物监测室提供。

1.2 样品来源 2021 年 8 月至 10 月期间,在胶东地区从 49 个养殖场(蛋鸡场 15 个、肉鸡场 22 个、水禽(肉鸭、鹅)场 12 个)采集 2730 份咽拭子,用于本实验研究。

1.3 金黄色葡萄球菌、MRSA 的分离与鉴定 将采集的咽拭子置于预先盛有 7.5%氯化钠肉汤的离心管中,37℃恒温培养 18 h 后,三区划线分别接种于金黄色葡萄球菌显色培养基和 MRSA 显色培养基,37℃培养 18~24 h,挑取疑似阳性单菌落,再次划线于上述两种显色培养基中,重复操作 3 次,挑取单菌落接种于胰蛋白胨大豆培养基中,37℃培养 18~24 h 后,挑取单菌落涂布到 96 孔靶板上,使用 MS1000 全自动微生物质谱检测系统鉴定。上述步骤同时以质控菌株 ATCC 29213 做阳性对照。

选取部分金黄色葡萄球菌菌株,煮沸法粗提细菌 DNA 作为 PCR 模板,参考文献^[12]设计 *mecA* 引物,见表 1。反应体系:Go Taq Green Master Mix 12.5 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,模板 2 μ L,DDH₂O 补足 25 μ L。反应程序:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环,72℃再延伸 5 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖进行凝胶电泳,电泳缓冲液浓度为 1 $\times$ TAE,130V,25 min,凝胶成像仪观察结果。同时以质控菌株 ATCC33591 作为阳性对照同步进行。

1.4 *spa* 分型 选取 214 株 MRSA 和 137 株 MSSA 进行 *spa* 分型实验。查阅文献^[13]并参照设计引物如表 1 所示。由擎科生物科技有限公司合成。反

应体系设置为 Go Taq Green Master Mix 12.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,DNA 模板 2 μL,DDH₂O 补足 25 μL。PCR 扩增程序:95 ℃ 预变性 2 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。扩增后产物送由擎科生物科技有限公司测序。*spa* 基因重复序列区域 5' 端的标志序列为 RCAMCAAAA,3' 端的标志序列为 TAYATGTCGT。按此规则截取 *spa* 基因重复序列区域,并按照 24 bp 分割成不同的重复单元,结果提交至 *spa* 分型数据库 (<http://www.ridom.de/spaserver/>) 进行分型分析。

表 1 引物序列及目的片段大小

Tab 1 Primer sequences and target fragment sizes		
引物名称	引物序列	长度
<i>mecA</i>	F: AAAATCGATGCTAAAGGTTGGC	533 bp
	R: AGTTCTGCA GTACCGGATTTGC	
<i>spa</i>	F: AGACGATCCTTCGGTGAGC	/
	R: GCTTTTGCAATGTCATTTACTG	

1.5 药敏试验 选取 97 株 MSSA 和 102 株 MRSA,采用美国临床实验室标准化委员会(CLSI)推荐的微量肉汤稀释法,使用 96 孔药敏板测定 13 大类 18 种抗菌药的最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC),并根据 CLSI 的判定标准获得

实验菌株敏感(S)、中介(I)和耐药(R)的结果。同时使用质控菌株 ATCC 29213 同步进行,质控菌株在质控范围内,且阳性对照有菌生长、阴性对照无菌生长,则结果判读有效。对 3 类及 3 类以上抗菌药同时耐药即为多重耐药。

1.6 数据统计及处理 使用 SPSS 26.0 软件、卡方检验进行统计及差异显著性分析, $P\leq 0.01$,则差异极显著,用“**”表示; $0.01 < P\leq 0.05$,差异显著,用“*”表示; $P > 0.05$,则差异不显著,用“ns”表示。利用 BioNumerics 7.6 软件构建了基于 *spa* 型别的最小生成树。在最小生成树中,一个圈代表一个 *spa* 型,圈的大小代表菌株数量的多少,圆圈之间的距离代表亲缘关系远近。

2 结果与分析

2.1 MSSA 和 MRSA 菌株分布情况 2730 份咽拭子样品中,共分离到金黄色葡萄球菌 742 株,总体分离率为 27.18%。其中 MSSA 528 株,MRSA 214 株,分离率分别为 19.34% 和 7.84%。从不同家禽看,水禽源菌株总体分离率最高(38.33%),其次是蛋鸡(28.45%)、肉鸡(20.33%)。无论是 MSSA 还是 MRSA 在水禽中分离率均为最高(27.58%、10.76%)且青岛地区蛋鸡、肉鸡、水禽三种不同来源的菌株分离率均有极显著差异。详见表 2。

表 2 青岛地区不同家禽 MSSA 和 MRSA 分离率(菌株数/采样量)

Tab 2 MSSA and MRSA isolation rates in different poultry species in Qingdao, China (number of strains / sample size)					
菌株种类	总分离率	蛋鸡	肉鸡	水禽	P 值
MSSA		20.83% (175/840)	13.90% (171/1230)	27.58% (182/660)	<0.01 **
MRSA	7.62% (64/840)	6.42% (79/1230)	10.76% (71/660)	<0.01 **	
合计	27.18% (742/2730)	28.45% (239/840)	20.33% (250/1230)	38.33% (253/660)	<0.01 **

2.2 *spa* 分型结果 对 214 株 MRSA 和 137 株 MSSA 的 PCR 扩增产物进行凝胶电泳和测序比对,获得 16 种 *spa* 型别,详见表 3。对不同禽源分离菌株建立了基于 *spa* 型别的最小生成树,展示了肉鸡、蛋鸡及水禽分离菌株的种群结构及菌株间亲缘关系,详见图 1~图 3。其中,MRSA 有 7 种 *spa* 型,分别为 t899 (204,95.30%)、t1939 (1.87%)、t034 (0.93%)、t4558 (0.47%)、t1250 (0.47%)、t1793

(0.47%)、t15591 (0.47%)。MSSA 有 12 种 *spa* 型,分别为 t899、t034、t002、t010、t011、t1793、t2247、t267、t3041、t3155、t5268、t571,其中 t899 共 97 株(70.80%),t034 有 11 株(8.00%)、t010、t2247 均有 6 株(各占 4.40%)、t3041、t002、t5268 均有 3 株(各占 2.20%)、t1793、t267、t571 均有 2 株(各占 1.46%)、t011、t3155 均有 1 株(各占 0.73%)。

表 3 青岛地区不同家禽来源 MSSA 和 MRSA *spa* 分型结果

Tab 3 Results of MSSA and MRSA *spa* typing from different poultry sources in Qingdao, China

<i>spa</i> 型别	MSSA			MRSA			合计	各型别占比
	蛋鸡(52)	肉鸡(44)	水禽(41)	蛋鸡(64)	肉鸡(79)	水禽(71)		
t899	38	30	29	64	74	66	301	85.75% (301/351)
t034	1	6	4	0	0	2	13	3.70% (13/351)
t010	6	0	0	0	0	0	6	1.71% (6/351)
t2247	2	4	0	0	0	0	6	1.71% (6/351)
t1939	0	0	0	0	4	0	4	1.14% (4/351)
t1793	0	0	2	0	0	1	3	0.85% (3/351)
t002	3	0	0	0	0	0	3	0.85% (3/351)
t3041	1	1	1	0	0	0	3	0.85% (3/351)
t5268	0	0	3	0	0	0	3	0.85% (3/351)
t267	0	0	2	0	0	0	2	0.57% (2/351)
t571	0	2	0	0	0	0	2	0.57% (2/351)
t4558	0	0	0	0	1	0	1	0.28% (1/351)
t1250	0	0	0	0	0	1	1	0.28% (1/351)
t15591	0	0	0	0	0	1	1	0.28% (1/351)
t011	0	1	0	0	0	0	1	0.28% (1/351)
t3155	1	0	0	0	0	0	1	0.28% (1/351)

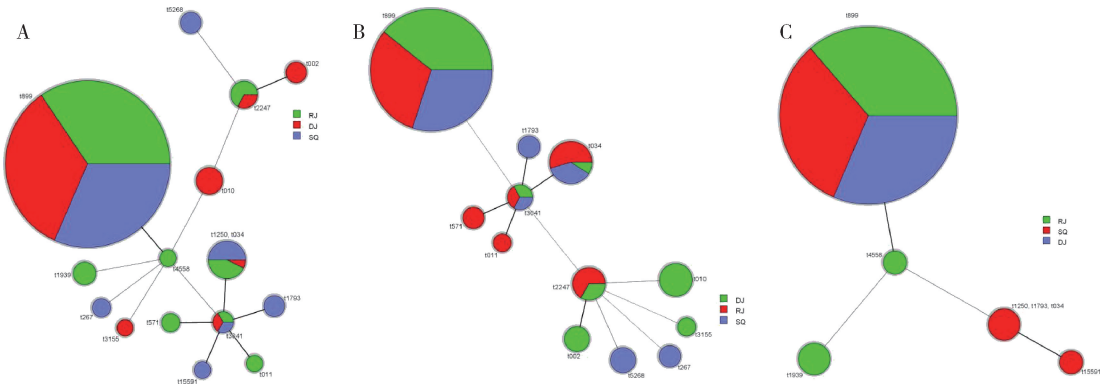


图 1 137 株 MSSA 与 214 株 MRSA 基于不同家禽来源和 *spa* 型别的最小生成树

Fig 1 Minimum spanning tree of 137 MSSA and 214 MRSA by different poultry and *spa* type

(注: A:所有菌株;B:MSSA;C:MRSA DJ: 蛋鸡 RJ: 肉鸡 SQ:水禽)

从不同家禽看,蛋鸡来源的菌株共得到 7 种 *spa* 型,t899 共 102 株(MSSA 38 株,MRSA 64 株),其次是 t010 共 6 株,t002 共 3 株,t2247 共 2 株,t034、t3041、t3155 各 1 株,其中,t010、t002、t3155 仅在蛋鸡中分布,t034、t3041 在蛋鸡、肉鸡、水禽来源的样品中均有分布。蛋鸡来源的 MRSA 菌株均为 t899 型别。肉鸡来源的菌株共得到 8 种 *spa* 型,

MSSA 中,t899 共有 30 株,t034 共 6 株,t2247 共 4 株,t571 共 2 株,t3041、t011 各 1 株。MRSA 中,t899 共有 74 株,t1939 共 4 株,t011、t4558 各 1 株。t571、t011 仅在肉鸡中分布。水禽来源的菌株共得到 8 种 *spa* 型,MSSA 中 t899 共有 29 株,t034 共有 4 株,t5268 共有 3 株,t1793、t267 各有 2 株,t3041 有 1 株。MRSA 中,t899 共有 66 株,t034 共有 2 株,

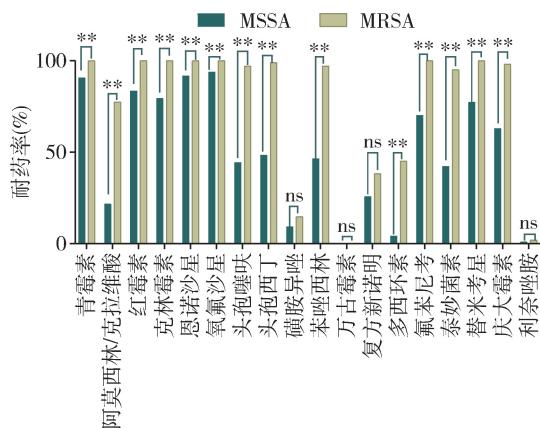


图 2 青岛地区禽源 MSSA 与 MRSA 的耐药率比较

Fig 2 Comparison of resistance rates between avian derived MSSA and MRSA in Qingdao, China

t1793、t1250、t15591 各有 1 株。其中 t1793、t5268、t267 仅在水禽中有分布。

2.3 药敏实验结果 根据 CLSI 的判定标准,97 株 MSSA 及 102 株 MRSA 对 18 种药物的耐药情况见表 4。青岛地区分离到的禽源 MSSA 和 MRSA 均对 18 种药物均有不同程度的耐药。97 株 MSSA 对青霉素、红霉素、喹诺酮类药物(恩诺沙星、氧氟沙星)的耐药已十分严重,耐药率均已达到 80% 以上,对磺胺异噁唑、利奈唑胺、多西环素较为敏感,耐药率均在 10% 以下。对克林霉素、氟苯尼考、替米考星、庆大霉素均表现中等程度以上的耐药,耐药率在 60% ~ 80% 之间。对其余药物的耐药率在 20% ~ 50% 之间。102 株 MRSA 对青霉素、红霉素、克林霉素、喹诺酮类药物(恩诺沙星、氧氟沙星)、氟苯尼考、替米考星等药物耐药严重,耐药率均达到 100%,对头孢类、苯唑西林、泰妙菌素、庆大霉素耐药率也在 90% 以上,对阿莫西林/克拉维酸表现中等程度以上的耐药,耐药率为 77.45%。对利奈唑胺、多西环素同样敏感,耐药率均低于 5%。对磺胺类药物的耐药率在 10% ~ 50% 之间。MSSA 与 MRSA 中均未分离到万古霉素耐药菌株。表 4 和图 2 显示,除磺胺异噁唑、万古霉素、复方新诺明、多西环素、利奈唑胺 5 种药物外,MRSA 对其余 13 种药物耐药率均极显著高于 MSSA ($P < 0.01$)。

从不同家禽看,蛋鸡、肉鸡、水禽三种家禽来源的 MSSA 菌株对克林霉素、磺胺异噁唑、替米考星耐药差异极显著 ($P < 0.01$),对红霉素、头孢噻唑、头孢西丁、苯唑西林差异显著 ($P < 0.05$),对其余 11 种药物无统计学差异。蛋鸡、肉鸡、水禽三种家禽来源的 MRSA 菌株对阿莫西林/克拉维酸、磺胺异噁唑、泰妙菌素差异极显著 ($P < 0.01$),对庆大霉素差异显著 ($P < 0.05$),对其余药物无统计学差异。

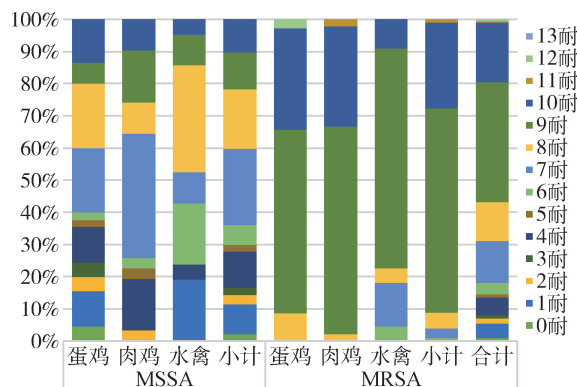


图 3 青岛地区三种家禽来源 MSSA 与 MRSA 的多重耐药结果

Fig 3 Multi drug resistance results of MSSA and MRSA from three poultry sources in Qingdao, China

2.4 多重耐药结果 191 株金黄色葡萄球菌多重耐药,总体多重耐药率为 95.98% (191/199)。其中,97 株 MSSA 中多重耐药株共有 89 株,占比为 91.75%,集中分布在 6 ~ 8 耐,未分离到 10 耐以上菌株。102 株 MRSA 菌株均为多重耐药株,且均在 5 耐以上,集中分布在 9 ~ 10 耐。多重耐药结果见图 3 及表 5。

从不同家禽看,MSSA 中,蛋鸡耐药重数较为分散,从 0 耐到 10 耐均有分布,其中 7 耐、8 耐占比最多,肉鸡耐药重数分布较为集中,7 耐所占比例最多,水禽耐药重数多集中在 8 耐,其次是 6 耐,均无 10 耐及以上菌株。MRSA 中,蛋鸡、肉鸡、水禽三种家禽来源的菌株耐药重数均很集中,均有过半比例 (64.44%、68.18%、68.25%) 为 9 耐菌株。

表 4 97 株 MSSA 及 102 株 MRSA 对 18 种抗菌药的耐药率 (%)

Table 4 Resistance rate of 97 strains of MSSA and 102 strains of MRSA to 18 antibiotics (%)

药物名称	MSSA			耐药率			MRSA			耐药率		总体耐药率	
	蛋鸡	肉鸡	水禽				蛋鸡	肉鸡	水禽			MSSA	MRS
青霉素	86.67	100	85.71	91.79±8.08 ^a	100	100	100	100	100	100 ^a		90.72%	100 ^g
米唑西林	37.78	41.94	71.43	50.99±19.08 ^{cd}	97.10	97.80	95.50	96.8±1.19 ^a				46.39%	97.06
恩诺沙星	88.89	96.77	90.48	91.53±4.81 ^a	100	100	100	100	100	100 ^a		91.75%	100 ^g
氧氟沙星	88.89	100.00	95.40	92.66±7.32 ^a	100	100	100	100	100	100 ^a		93.81%	100 ^g
头孢噻唑	37.78	35.48	71.43	50.30±20.52 ^d	97.10	97.80	95.50	96.8±1.19 ^a				44.33%	97.06
头孢西丁	42.22	38.71	76.19	50.99±19.08 ^{cd}	100	97.80	100	99.27±5.62 ^a				48.45%	99.02
磺胺异噁唑	4.44	22.58	0	9.16±12.20 ^{cd}	28.60	4.40	13.60	15.53±13.04 ^c				9.28%	14.71
复方新诺明	26.67	35.48	9.52	24.25±13.38 ^e	20.00	24.40	13.60	19.33±5.80 ^c				25.77%	19.33
红霉素	75.56	96.77	80.95	87.60±9.59 ^{ab}	100	100	100	100	100	100 ^a		83.51%	100 ^g
替米考星	66.67	96.77	71.43	77.75±17.82 ^{ab}	100	100	100	100	100	100 ^a		77.32%	100 ^g
莫西林/克拉维酸	22.22	12.90	33.33	23.27±10.66 ^e	77.10	95.60	68.20	80.30±14.51 ^b				21.65%	77.45
	68.89	96.77	76.19	82.40±14.11 ^{ab}	100	100	100	100	100	100 ^a		79.38%	100 ^g
万古霉素	0	0	0	0 ^f	0	0	0	0 ^d				0%	0%
多西环素	2.22	9.68	0	4.34±5.32 ^{cd}	2.80	11.11	0	4.64±5.61 ^d				4.12%	4.63 ^g
氟苯尼考	62.22	80.65	71.43	71.69±8.64 ^{abc}	100	100	100	100	100	100 ^a		70.10%	100 ^g
泰妙菌素	46.67	45.16	38.10	43.83±4.81 ^d	100	100	77.30	92.43±13.26 ^{a *}				42.27%	95.10
庆大霉素	66.67	58.06	61.90	65.49±4.35 ^{bcd}	100	100	90.90	96.97±3.85 ^a				62.89%	98.04
利奈唑胺	0	0	4.76	1.57±2.80 ^f	2.80	2.20	0	1.67±1.54 ^d				1.03%	1.96 ^g

表 5 青岛地区三种家禽来源 MSSA 与 MRSA 的多重耐药结果

Tab 4 Multi drug resistance results of MSSA and MRSA from three poultry sources in Qingdao, China									
耐药重数	MSSA				MRSA				合计
	蛋鸡	肉鸡	水禽	小计	蛋鸡	肉鸡	水禽	小计	
0 耐	4.40%	0.00%	0.00%	2.06%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.00%
1 耐	11.11%	0.00%	19.05%	9.28%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.52%
2 耐	4.44%	3.23%	0.00%	3.09%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.51%
3 耐	4.44%	0.00%	0.00%	2.06%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.00%
4 耐	11.11%	16.13%	4.76%	11.34%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	5.53%
5 耐	2.22%	3.23%	0.00%	2.06%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.00%
6 耐	2.22%	3.23%	19.05%	6.20%	0.00%	0.00%	4.55%	0.98%	3.52%
7 耐	20%	38.71%	9.52%	23.71%	0.00%	0.00%	13.64%	2.94%	13.07%
8 耐	20%	9.68%	33.33%	18.56%	8.57%	2.22%	4.55%	4.90%	12.06%
9 耐	6.67%	16.13%	9.52%	11.34%	57.14%	64.44%	68.18%	62.75%	37.19%
10 耐	13.33%	9.68%	4.76%	10.31%	31.43%	31.11%	9.09%	26.47%	18.59%
11 耐	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	2.22%	0.00%	0.98%	0.50%
12 耐	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	2.86%	0.00%	0.00%	0.00%	0.50%
13 耐	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

3 讨 论

金黄色葡萄球菌广泛分布于世界各地、各类动物体内,随着抗菌药的广泛使用导致耐药菌株不断增多,以 MRSA 为代表的耐药菌株报道较多,尤以猪源、牛源为主,近年来禽源样品也有报道。范丽霞等人针对山东地区畜禽粪污进行了金黄色葡萄球菌的分离鉴定,结果显示 80 份样品中有 3 份检出有金黄色葡萄球菌,分离率达到 3.75%。^[14] 低于本研究,推测原因在于粪样样本与咽拭子样本等不同样本形式对最终分离率存在影响,咽拭子分离率较高而粪样较低。王龙光对胶东地区生猪生产链各环节分离鉴定,2556 份样品共分离出 MSSA 386 株(15.10%),MRSA 122 株(4.77%),SA 的分离率为 19.87%,^[15] 低于本文禽源样本分离率。陈瑶等对重庆市多个动物源(猪、鸡、牛、羊、兔)进行粪样采集及金黄色葡萄球菌分离鉴定,其中猪源分离率较高,而鸡源金黄色葡萄球菌分离率仅占 7.6%^[16]。四川省不同地区养禽场(鸡、鸭)MRSA 检出率在 22.95%^[17]。韩国学者 Song 等在一份报告中指出,奶牛乳腺炎乳样中,MRSA 的检出率有逐年上升的趋势,从 1.3%(2003)、2.5%(2007)、

4.3%(2011)上涨到 13.9%(2012)^[18]。在 Saliha Bounar – Kechih 的一项研究中,从阿尔及利亚北部地区的蛋鸡和肉鸡屠宰场采集了共 8375 份样品,其中金黄色葡萄球菌在蛋鸡和肉鸡中分离率分别为 42% 和 12%^[19]。本实验所用样品均来源于青岛地区的三种不同家禽,具有广泛代表性。2730 份咽拭子样品中,金黄色葡萄球菌、MSSA、MRSA 分离率分别为 27.18%、19.34% 和 7.84%。其中,水禽来源的金黄色葡萄球菌的整体分离率及 MRSA 分离率均显著高于蛋鸡和肉鸡来源菌株。综上所述,不同国家及地区、不同动物甚至不同品种家禽来源的 MSSA 及 MRSA 分离率不尽相同,原因可能在于不同国家、不同地区的细菌流行情况、养殖规模化程度以及畜禽饲养管理不同,导致分离率出现差异。

spa 分型结果显示,无论是从不同家禽来源来看还是从青岛不同市区来看,t899 在 MSSA 和 MRSA 菌株中均为优势型别。葡萄球菌 A 蛋白(Staphylococcal protein A)是金黄色葡萄球菌细胞壁的重要组成部分和重要的毒力因子,包括 Fc 结合区,X 区和 C 末端 H 区域。X 区是由 24 bp 重复序列串联而成

的可变重复区域^[20],基因呈现高度多态性^[21],良好的重复性及稳定性,广泛用于金黄色葡萄球菌的分型研究。颜文光等人在研究中发现 62 株动物源(猪、牛、羊、鸭)金黄色葡萄球菌菌株中共检测到 17 种基因型,检测到最多的型别为 t899 (30.65%)^[22]。何文强等人对青岛省相关鸡肉产品调查后发现,主要的 MRSA 克隆是 ST9 - t899 SCCmecIVb/PFGE A (70.0%, 14/20)。在 MSSA 分离株中,ST9 - t899/PFGE A 最为普遍(27.6%),均与本文结果相近^[23],说明青岛地区家禽源金黄色葡萄球菌也是以 t899 型别为主的克隆传播。但应注意,部分型别仅在蛋鸡(t010、t002、t3155)或肉鸡(t571、t011)或水禽(t1793、t5268、t267)中分离到。

药敏结果显示,MSSA 对多种药物显示出高水平耐药,MSRA 更甚。二者对青霉素、红霉素、喹诺酮类药物(恩诺沙星、氧氟沙星)耐药率均已超过 80%。三种家禽来源中,肉鸡来源的菌株对克林霉素、恩诺沙星、氧氟沙星、氟苯尼考、替米考星的敏感性低于其余两种来源,蛋鸡来源的菌株对泰妙菌素、庆大霉素的敏感性低于其余两种来源,水禽对头孢类药物(头孢噻呋、头孢西丁)、苯唑西林的敏感性低于其余两种来源,因此,在临床用药的选择上,对不同家禽应注意规避上述对应低敏性药物的使用。国内有研究报道显示,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%^[24]。本文结果显示,实验菌株对利奈唑胺、多西环素耐药率较低,低于 10%,且未发现万古霉素耐药菌株。此结果与李淑敏^[25] Nelisiwe Mkize^[26] 等人的研究结果相近。颜敏等采集了病鸭的关节渗出液、肝脏、脾脏组织,使用纸片扩散法对分离的金黄色葡萄球菌进行药敏实验,结果显示分离株对青霉素、链霉素、环丙沙星、氧氟沙星、林可霉素、克林霉素高度耐药;对庆大霉素、四环素、卡那霉素、新霉素中度耐药,对阿莫西林、氟苯尼考、强力霉素、红霉素、阿米卡星较为敏感,对米诺环素、头孢拉定、头孢噻肟高度敏感^[27],与本文结果略有差异。究其原因,可能由于

不同养殖场具体用药情况差异所致。因此,临床使用抗生素药物时应减少青霉素、大环内酯类、喹诺酮类、克林霉素等低敏性药物的使用频率。

本文研究结果显示,金黄色葡萄球菌多重耐药情况严重。MSSA 和 MRSA 多重耐药率分别高达 91.75%、100%,耐药重数集中分布在 6~8 耐、9~10 耐。林杰等的研究中显示,鸡源心肝脾组织分离到的金黄色葡萄球菌的绝大多数(73.9%)同时对 5 种以上抗生素耐药,表现显著的多重耐药现象^[28],结果与本文相似。刘茜从安徽皖中地区采集的病禽肝脏组织中分离金黄色葡萄球菌并采用 K-B 法进行药敏试验,结果显示,耐药重数以 5 耐、6 耐居多^[29],耐药重数略低于本文。值得注意的是,本文中 MSSA 和 MRSA 菌株均对多西环素的中介率较高,分别达到 19.59% 和 82.35%,暗示二者对其的耐药率在未来有上升的可能性。总的来说,国内外各研究中 MSSA 与 MRSA 耐药及多重耐药结果虽有出入,但均显示二者对多种抗菌药的耐药情况严峻,多重耐药菌株耐药性上升,未来防控更加艰难,给养殖业的发展及公共卫生问题带来巨大阻碍。

金黄色葡萄球菌在青岛地区不同家禽中均有不同程度的分布,且分离菌株耐药现象较为普遍,其中 MRSA 耐药尤为严重,存在耐药菌株传播给人的风险,对人类健康具有安全隐患。耐药菌株虽然呈现“型多面广”的现象,但主要是以 t899 型别为主的克隆传播,因此应通过分子溯源技术深入了解各地区中金黄色葡萄球菌的流行趋势,结合耐药表型监测,规范兽用抗菌药的使用,为 MSSA 和 MRSA 的有效防控提供依据。

4 结 论

金黄色葡萄球菌(MSSA、MRSA)在青岛地区家禽中分布较为广泛,且在不同家禽中的携带情况存在差异,水禽携带 MSSA 和 MRSA 的现象较其它两种家禽更为普遍;MSSA 和 MRSA 均是以 t899 为主的克隆传播;青岛禽源金黄色葡萄球菌对多种抗菌药普遍耐药,且 MRSA 较 MSSA 耐药更为严重,均为多重耐药菌株。综上所述,应加强家禽养殖过程

中耐药菌株的流行病学调查与分析,规范兽用抗菌药的合理使用与监管,以有效遏制耐药菌株的产生与传播。

参考文献:

- [1] Yadav R, Kumar A, Singh V K, *et al.* Prevalence and antibiotyping of *S. aureus* and methicillin - resistant *S. aureus* (MRSA) in domestic animals in India - ScienceDirect [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2018, 15: 222 - 225.
- [2] Sahreena L, Zhang K. Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus*; Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2018, 31(4).
- [3] Aires - De - Sousa M. Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview [J]. Clinical Microbiology & Infection the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2017, 23(6): 373 - 380.
- [4] Kittler S, Seinige D, Meemken D, *et al.* Characteristics of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* from broiler farms in Germany are rather lineage - than source - specific [J]. Poultry Science, 2019, 98(12): 6903 - 6913.
- [5] Rodrigues S, Conceição T, Silva I Santos *et al.* Frequent MRSA nasal colonization among hospitalized children and their parents in Angola and São Tomé and Príncipe. [J]. J Hosp Infect, 2018, 100: 344 - 349.
- [6] Velasco V, Buyukcangaz E, Sherwood J S, *et al.* Characterization of *S. aureus* from humans and a comparison with isolates of animal origin, in North Dakota, United States [J]. PloS one, 2015, 10(10): e0140497.
- [7] Hsu B M, Chen J S, Hsu G J, *et al.* Role of Bioaerosols on the Short - Distance Transmission of Multidrug - Resistant Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Chicken Farm Environment [J]. Antibiotics, 2022, 11(1): 81.
- [8] Weese J S. Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* in animals [J]. ILAR journal, 2010, 51(3): 233 - 244.
- [9] Liu Y, Han C, Chen Z, *et al.* Relationship between livestock exposure and methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* carriage in humans: A systematic review and dose - response meta - analysis [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 55(1).
- [10] Pantosti, Annalisa. Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health [J].

Frontiers in Microbiology, 2012, 3:127 - .

- [11] Wendlandt S, Kadlec K, *et al.* Transmission of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* isolates on broiler farms [J]. Veterinary Microbiology, 2013, 167(3 - 4): 632 - 637.
- [12] 王金波,李海英,张亚妮,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子特征研究 [J]. 检验医学与临床, 2021, 18(12): 1728 - 1732 + 1735.
- Wang J B, Li H Y, Zhang Y N, *et al.* Molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Laboratory medicine and clinical, 2021, 18(12): 1728 - 1732 + 1735.
- [13] 赵芳,洪小柳,万志刚,等. 进出口食品中金黄色葡萄球菌 spa 基因的分型 [J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(11): 3462 - 3466. DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11 - 5956/ts.014.11.019.
- Zhao F, Hong X L, Wan Z G, *et al.* Typing of *Staphylococcus aureus* spa genes in imported and Exported Foods [J]. Acta food safety and quality inspection, 2014, 5(11): 3462 - 3466. DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11 - 5956/ts.014.11.019.
- [14] 范丽霞,苑学霞,李鸳鸯,郭元娟,赵善仓,张丙春,王文博. 畜禽粪污中金黄色葡萄球菌和大肠埃希氏菌的 LAMP 检测及其耐药性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(07): 2325 - 2335. DOI: 10.16431/j.cnki.1671 - 7236.2020.07.039.
- Fan L X, Yuan X X, Li Y Y, *et al.* Lamp detection and resistance analysis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in livestock manure decontamination. Animal husbandry and veterinary medicine of China, 2020, 47(07): 2325 - 2335 DOI: 10.16431/j.cnki.1671 - 7236.2020.07.039.
- [15] 王龙光,黄秀梅,逢春华,李玉清,刘焕奇,曲志娜. 胶东地区 MSSA 与 MRSA 的分离鉴定与耐药性分析 [J]. 中国兽医学报, 2018, 38(06): 1151 - 1156. DOI: 10.16303/j.cnki.1005 - 4545.2018.06.17.
- Wang L G, Huang X M, Peng C H, *et al.* Isolation and identification of MSSA and MRSA and drug resistance analysis in colladong, China [J]. Journal of veterinary medicine, China, 2018, 38(06): 1151 - 1156. DOI: 10.16303/j.cnki.1005 - 4545.2018.06.17.
- [16] 陈瑶. 重庆市动物源金黄色葡萄球菌耐药性分析及 ESBLs 与肠毒素基因的检测 [D]. 西南大学, 2018.
- Chen Y. *Staphylococcus aureus* resistance analysis and detection of ESBLs and enterotoxin genes from animal sources in Chongqing, China [D]. Southwestern University, 2018.
- [17] 马驰,林居纯,陈雅莉,等. 禽源金黄色葡萄球菌耐药性监测 [J]. 中国兽医杂志, 2010(9): 10 - 12.
- Ma C, Lin J C, Chen Y L, *et al.* Avian origin *Staphylococcus*

- aureus drug resistance surveillance [J]. Journal of veterinary medicine, China, 2010(9):10-12.
- [18] Song J W, Yang S J, Shin S, *et al.* Genotypic and Phenotypic Characterization of Methicillin - Resistant *S. aureus* Isolated from Bovine Mastitic Milk in Korea[J]. Journal of food protection, 2016, 79(10):1725-1732(8).
- [19] Saliha B K, Mossadak T H, Hebib A, *et al.* Carriage Methicillin - Resistant *S. aureus* in PopuLtry and Cattle in Northern Algeria[J]. Veterinary Medicine International, 2018, 2018;1-5.
- [20] Falugi F, Kim HK, Missiakas DM. Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *S. aureus*. MBio, 2013, 27(5): e00575-00613.
- [21] Zou ZY, Han L, Xiong J, *et al.* Spa typing and resistance profile of *S. aureus* isolated from clinical specimens [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2014, 14 (2): 142 - 145.
- [22] 颜文光. 不同来源金黄色葡萄球菌的肠毒素基因分布与 SCCmec, spa 及 MLST 分型研究. 扬州大学, 2015.
Yan W G. Enterotoxin gene distribution and SCCmec, spa and MLST typing of *Staphylococcus aureus* isolates from various origins. Yangzhou University, 2015.
- [23] He W, Liu Y, Qi J, *et al.* Food - Animal Related *S. aureus* M μ Ltidrug - Resistant ST9 Strains with Toxin Genes [J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2013, 10(9):782-788.
- [24] 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.
Wang G Q, Xing Z H, Wei Y Z. Resistance analysis of *S. aureus* isolates of chicken origin [J]. Journal of Agricultural Sciences, 2011, 32(1): 43-45
- [25] 李淑敏, 方亮星, 李 亮, 等. 食品动物源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MLS_B 类抗生素耐药性调查 [J]. 中国农业科学, 2019, 52(09):1646-1656.
- Li S M, Fang LX, Li L, *et al.* Food animal sources methicillin resistant *Staphylococcus aureus* MLS_ Class B antibiotic resistance survey [J]. Chinese Agricultural Sciences, 2019, 52 (09): 1646-1656.
- [26] Mkize N, Zishiri O T, Mukaratirwa S. Genetic characterisation of antimicrobial resistance and vir μ Lence genes in *S. aureus* isolated from commercial broiler chickens in the Durban metropolitan area, South Africa [J]. Journal of the South African Veterinary Association, 2017, 88(1): 1-7.
- [27] 颜 敏. 鸭源金黄色葡萄球菌的分离鉴定及致病性研究 [D]. 青岛农业大学, 2015.
Yan M. Isolation, identification and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* from duck origin [D]. Shandong Agricultural University, 2015.
- [28] 林 杰, 陆俊贤, 龚建森. 规模化鸡场金黄色葡萄球菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 中国家禽, 2011, 33(02):61+63. DOI:10.16372/j. issn. 1004-6364. 2011. 02. 024.
Lin J, Lu J X, Gong J S. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from scaled chicken farms and susceptibility testing [J]. China Poultry, 2011, 33(02):61+63. DOI:10.16372/j. issn. 1004-6364. 2011. 02. 024.
- [29] 刘 茜. 安徽地区禽源金黄色葡萄球菌耐药性分析和分子分型 [D]. 安徽农业大学, 2018.
Liu Q. Resistance analysis and molecular typing of avian origin *Staphylococcus aureus* in Anhui, China [D]. Anhui Agricultural University, 2018.

(编辑:陈 希)