

新疆动物源葡萄球菌多重耐药基因 *cfr* 及其移动元件检测

轩慧勇 夏利宁 姚晓慧 马木尔·阿克木汗 王舒丰 王凯

新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052

摘要 从新疆部分地区采集动物源粪样及鼻腔样共计 1 781 份, 从中分离葡萄球菌 1 667 株, 进行临床常用 11 种抗菌药物的药敏试验, 采用 PCR 方法进行酰胺醇类耐药基因(*cfr*、*fecA* 和 *fecB*)及与 *cfr* 转移相关的移动元件 IS21-558 和转座酶基因 *Tn558* 的检测。结果显示: 新疆动物源葡萄球菌对临床常用抗菌药物耐药严重程度为羊源>宠物源>猪源>禽源>牛源, 对被检抗菌药物中的青霉素耐药最严重, 耐药率为 54.7%~93.6%。除牛源菌外(36.3%), 其余动物源分离的葡萄球菌对苯唑西林的耐药率为 51.1%~98.2%。动物源葡萄球菌对阿米卡星、庆大霉素和克林霉素均有较好的敏感性。多药耐药结果显示, 羊源菌以 4~5 耐为主, 禽源菌和宠物源菌以 3~5 耐为主, 猪源菌以 4 耐和 7 耐为主, 牛源菌以 1 耐为主, 不同动物源分离的葡萄球菌耐药谱型多样化。酰胺醇类耐药基因检测结果显示, 仅在猪源菌中检出 4 株菌携带 *cfr* 基因。除牛源菌外, 在其余动物源中均检出 *fecA* 基因, 检出率为宠物源>猪源>禽源>羊源, 未检出 *fecB* 基因。16S rRNA 序列扩增结果显示 4 株携带 *cfr* 基因的阳性菌都为模仿葡萄球菌。此外, 在 4 株阳性菌中都检出移动元件 IS21-558(包括: *istAS* 和 *istBS*)和 *Tn558* 转座酶基因(*tnpA*、*tnpB*、*tnpC*)。新疆动物源葡萄球菌耐药情况严重, 耐药谱型多样化, 酰胺醇类耐药基因以携带 *fecA* 基因为主。此外, 多重耐药基因 *cfr* 及其移动元件的检出, 提示应加强耐药性的监测, 防止耐药菌的暴发和超级耐药菌出现的概率。

关键词 葡萄球菌; 耐药; *cfr*; 移动元件

中图分类号 S 859.7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)06-0082-09

葡萄球菌广泛分布于自然界中, 同时存在于人和动物的皮肤表面及其鼻、咽和肠道中^[1]。在养殖场周围环境及空气中就含有许多葡萄球菌, 并能引起动物的多种疾病, 而氟苯尼考作为动物专用抗菌药, 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、多种敏感菌和支原体等均有作用, 于 1999 年被我国批准用于兽医临床^[2]。然而, 随着其在兽医临床的广泛应用, 临床上的耐药菌株呈现逐年上升趋势, 并出现新的耐药基因: 编码 23S rRNA 甲基转移酶的 *cfr* 基因和编码特异外排泵的 *fecA* 基因^[3]。并且, *cfr* 基因常与移动元件 IS21-558 和转座酶基因 *Tn558* 一起位于可转移的质粒上, 在不同菌种间进行传播, 对人类的健康和公共卫生造成潜在威胁^[4]。目前该基因已在爱尔兰^[5]、墨西哥^[6]、意大利^[7]、西班牙^[8]、印度^[9]和巴西^[10]等国家有检出, 在我国四川^[11]、广东^[12]和江苏^[13]等地也有报道。新疆有关 *cfr* 基因的流行情

况鲜见报道, 如能对新疆 *cfr* 基因的流传现状和分子传播机制进一步研究, 不仅有利于了解 *cfr* 基因传播扩散的原因, 而且对临床合理用药也有一定的指导意义。因此, 笔者通过对新疆部分地区分离的葡萄球菌进行 11 种抗菌药物的药敏试验和相关耐药基因检测, 分析耐药表型与耐药基因型之间的相关性, 旨在阐明新疆动物源葡萄球菌耐药现状, 为采取合理的用药策略提供科学依据, 并为进一步研究 *cfr* 基因的传播机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验样品

2015—2017 年, 于新疆乌鲁木齐市部分宠物医院采集宠物(犬、猫)粪样 170 份; 伊犁某羊场采集羔羊粪样 110 份; 石河子市采集牛粪样 192 份; 昌吉州某猪场采集猪粪样 400 份, 猪鼻拭子样 200 份; 乌鲁

收稿日期: 2018-05-30

基金项目: 国家自然科学基金-新疆联合基金项目(U1503185)

轩慧勇, 硕士研究生, 研究方向: 兽医药理与毒理学. E-mail: 18935881007@163.com

通信作者: 夏利宁, 博士, 教授, 研究方向: 兽医药理与毒理学. E-mail: xln750530@163.com

木齐市周边部分鸡场采集鸡粪样 429 份;克拉玛依市某鸡场采集鸡粪样 280 份,从以上样品中分离试验用葡萄球菌。

1.2 菌株及培养基

标准质控菌株金黄色葡萄球菌 ATCC29213 购买于杭州天和微生物试剂有限公司;琼脂粉、Mueller-Hinton 培养基和亚硫酸盐卵黄增菌液购买于北京奥博星生物技术有限公司;Baird-Parker 琼脂培养基,购买于青岛高科园海博生物技术有限公司。

1.3 试验药物

氨基糖苷类:阿米卡星(AMK)、硫酸庆大霉素(GEN);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);氟喹诺酮类:左氧氟沙星(LEV); β -内酰胺类:青霉素(PG);林可胺类:克林霉素(CLDM)、阿莫西林/克拉维酸(A/C)、苯唑西林(OX)、头孢噻唑(CEF)。

上述药物均购自中国兽医药品监察所。

1.4 葡萄球菌分离鉴定方法

按临床常用细菌分离鉴定方法,用生理盐水湿润后的棉拭子轻插入动物肛门 4~5 cm 内以获取适量肠粪便,或插入动物鼻腔内获适量鼻腔分泌物,将沾有样品的棉拭子放入内含 2 mL 灭菌营养肉汤的(加有 7.5% NaCl)EP 管中,置 37 °C 恒温摇床培养 12 h 进行增菌。用接种环蘸取菌液于加亚硫酸盐卵黄增菌液的 Baird-Parker 选择性培养基划线培养,对分离到的疑似葡萄球菌进行革兰氏染色,选取镜下观察为蓝紫色且呈葡萄串状排列的菌株进行触酶试验,方法为:用接种环取培养物于一张洁净玻片中央,滴加体积分数比为 3% H_2O_2 观察,有气泡出现,则为触酶试验阳性;将菌株纯培养后加体积分数比为 60% 的甘油,充分吹打混匀使最终甘油量为 20%,于 -20 °C 保存,用于开展下一步试验。

1.5 药敏试验及结果判定标准

按美国临床实验室标准委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的微量肉汤稀释法对分离的葡萄球菌进行最小抑菌浓度测定,结果判定参照 CLSI 药敏标准,质控菌的结果在 CLSI 标准中的数据范围内,判读待测菌株药敏结果,药敏结果记录为敏感(S)、中介(I)和耐药(R)^[14]。

1.6 葡萄球菌 DNA 模板制备

将葡萄球菌划线接种单菌落于 MH 固体培养基,37 °C 培养 24~48 h,用枪头挑取 1~2 接种环菌

苔于装有 50 μ L 的灭菌超纯水内,经 100 °C 煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 10 min 后取上清,-20 °C 保存,用于开展进一步实验。

1.7 引物的设计及合成

多重耐药基因 *cfr* 及其移动元件的引物序列参考相关文献^[15-19],同时对阳性菌株进行喹诺酮类(*norA*)、大环内酯-林可胺类(*ermB*)、四环素类(*tetA*、*tetM*)和 β -内酰胺类(*mecA*、*femA*)的耐药基因检测,引物序列及片段大小见表 1。由上海生物工程技术服务有限公司合成引物。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像系统拍照,目的片段经胶回收后由上海生物工程技术服务有限公司测序,测序结果经序列比对确定基因型。

2 结果与分析

2.1 葡萄球菌分离鉴定结果

本试验共分离葡萄球菌 1 667 株,其中宠物粪源葡萄球菌 154 株,分离率 90.6%(154/170);羔羊粪源葡萄球菌 110 株,分离率 100.0%(110/110);石河子牛粪源葡萄球菌 168 株,分离率 87.5%(168/192);昌吉州猪粪源葡萄球菌 397 株,分离率 99.2%(397/400),猪鼻拭子源葡萄球菌 200 株,分离率 100.0%(200/200);乌鲁木齐市周边鸡粪源葡萄球菌 377 株,分离率 87.9%(377/429);克拉玛依市鸡粪源葡萄球菌 261 株,分离率 93.2%(261/280)。

2.2 动物源葡萄球菌对 11 种抗菌药物耐药结果

由表 2 可知,新疆部分地区动物源分离的葡萄球菌对被检抗菌药物存在不同程度的耐药,整体耐药严重程度为羊源>宠物源>禽源>猪源>牛源,均对青霉素耐药最严重,对苯唑西林耐药率次之,除牛源外,所有动物源分离的葡萄球菌对苯唑西林的耐药率都超过 51.1%;羊源分离的葡萄球菌对被检抗菌药物中的 5 种抗菌药物耐药率都超过 50.0%,对头孢噻唑、苯唑西林和青霉素的耐药率在 91.8% 以上;宠物源分离的葡萄球菌对被检抗菌药物中的 5 种抗菌药物耐药率在 53.9% 之上,仅对苯唑西林耐药率超过 90.0%,耐药率为 94.2%;禽源分离的葡萄球菌对被检抗菌药物中的 4 种抗菌药物耐药率超过 54.2%,对苯唑西林耐药率最高,耐药率为 74.1%;猪源分离的葡萄球菌对被检抗菌药物中的 2 种抗菌药物耐药率超过 51.1%,对青霉素耐药率最高,为 64.7%;牛源分离的葡萄球菌仅对青霉素耐药率最高(为 93.5%),对其余被检抗菌药物耐药率低

表 1 耐药基因的引物序列及目标片段长度

Table 1 Primer sequence and target fragment length of resistance genes

基因名称 Gene name	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequences	退火温度/℃ Annealing temperature	片段大小/bp Fragment length	参考文献 Reference
<i>cfr</i>	<i>cfr</i> -F <i>cfr</i> -R	TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	60	746	
<i>fexA</i>	<i>fexA</i> -F <i>fexA</i> -R	GTAAGTGTAGGTGCAATTACGGCTGA CGCATCTGAGTAGGACATAGCGTC	60	1 272	[15]
<i>fexB</i>	<i>fexB</i> -F <i>fexB</i> -R	TATTGGGTAGAATGTTTCAAGGAGC AAAAGCGATACCTATCCCTAAACTC	60	806	
16S rRNA	27-F 1492-R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGCTACCTTGTACGACTT	59	1 466	
<i>istAS</i>	<i>istAS</i> -F <i>istAS</i> -R	TTGGCTTACAGCAATTACCGG TAGTAATTGGAGAGGTTGATCATGCC	60	203	
<i>istBS</i>	<i>istBS</i> -F <i>istBS</i> -R	GTAAGTGTAGGTGCAATTACGGCTGA CGCATCTGAGTAGGACATAGCGTC	60	680	
<i>tnpA</i>	<i>tnpA</i> -F <i>tnpA</i> -R	TCTGAAATATTAAGGGGACGTGGTG GGCGAAAATCCGTAGATCTGAAGA	60	584	[16]
<i>tnpB</i>	<i>tnpB</i> -F <i>tnpB</i> -R	GCTTATTACAAATGGCGTATACTG CATGATGCTAATTTTCGTGGC	58	459	
<i>tnpC</i>	<i>tnpC</i> -F <i>tnpC</i> -R	ATCTGAAATATTAAGGGGACGTGG GCGAAAATCCGTAGATCTGAAGAG	58	548	
<i>norA</i>	<i>norA</i> -F <i>norA</i> -R	GGATTCATTTTAGGACCAG GTACATCAAATAACGCACC	51	678	[17]
<i>ermB</i>	<i>ermB</i> -F <i>ermB</i> -R	TGGTATTCCAAATGCGTAATG CTGTGGTATGGCGGGTAAGT	60	639	[18]
<i>tetA</i>	<i>tetA</i> -F <i>tetA</i> -R	GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	55	210	[19]
<i>tetM</i>	<i>tetM</i> -F <i>tetM</i> -R	AGTGGAGCGATTACAGAA CATATGCTCTGGCGTGTCTA	50	154	
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> -F <i>mecA</i> -R	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	55	535	[16]
<i>femA</i>	<i>femA</i> -F <i>femA</i> -R	TGCTGGTAATGATTGGTT ATCTCGCTTGTATGTGC	46	468	

表 2 不同动物源分离的葡萄球菌对被检抗菌药物耐药率

Table 2 Resistance of *Staphylococcus* isolated from different animal sources to antibiotics

药物 Drug	宠源源(<i>n</i> =154) Pet source	羊源源(<i>n</i> =110) Sheep source	牛源源(<i>n</i> =154) Cattle source	猪源源(<i>n</i> =597) Pig source	禽源源(<i>n</i> =638) Poultry source	%
阿米卡星 Amikacin	30.5	0.9	0.0	0.6	35.0	
硫酸庆大霉素 Gentamicin	39.0	19.1	0.0	13.6	29.1	
四环素 Tetracycline	60.4	34.5	8.3	41.2	66.4	
氟苯尼考 Florfenicol	53.9	87.3	10.7	36.0	40.0	
利福平 Rifampicin	30.5	50.0	1.8	24.8	49.0	
左氧氟沙星 Levofloxacin	57.1	40.9	1.1	29.5	54.2	
头孢噻吩 Ceftriaxone	48.7	91.8	2.4	11.6	21.2	
阿莫西林/克拉维酸 Amoxicillin/Clavulanic acid	29.9	20.9	1.2	24.1	44.5	
苯唑西林 Oxacillin	94.2	98.2	36.3	51.1	74.1	
青霉素 Penicillin	79.2	93.6	93.5	64.7	54.7	
克林霉素 Clindamycin	29.2	10.0	11.9	45.4	38.9	

于 36.3%。所有动物源分离的葡萄球菌对阿米卡星和庆大霉素有较好的敏感性,耐药率未超过 40.0%。

2.3 动物源葡萄球菌多药耐药结果

新疆部分地区动物源分离的葡萄球菌多药耐药情况见表 3。由表 3 可知,新疆动物源葡萄球菌多药耐药严重程度为羊源>宠物源>禽源>猪源>牛源,羊源葡萄球菌多药耐药在 1~10 耐有分布,以 4 耐和 5 耐为主,5 耐及 5 耐以上菌株占 61.8%;宠物

源葡萄球菌多药耐药在 0~11 耐有分布,以 3~5 耐为主,5 耐及 5 耐以上菌株占 56.5%;禽源葡萄球菌多药耐药在 0~11 耐有分布,以 3~5 耐为主,5 耐及 5 耐以上菌株占 55.2%;猪源葡萄球菌多药耐药在 0~10 耐有分布,以 4 耐和 7 耐为主,5 耐及 5 耐以上菌株占 36.5%;牛源葡萄球菌多药耐药在 0~5 耐和 7 耐有分布,以 1 耐和 2 耐为主,5 耐及 5 耐以上菌株仅占 2.3%。

表 3 不同动物源葡萄球菌多药耐药结果

Table 3 The multidrug resistance rate of *Staphylococcus* from different animals

动物源 Animals	0 耐 0 resistant	1 耐 1 resistant	2 耐 2 resistant	3 耐 3 resistant	4 耐 4 resistant	5 耐 5 resistant	6 耐 6 resistant	7 耐 7 resistant	8 耐 8 resistant	9 耐 9 resistant	10 耐 10 resistant	11 耐 11 resistant	%
宠物源葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i> isolated from pet	0.7	2.6	7.1	16.9	16.2	13.6	10.4	7.2	6.5	5.8	7.8	5.2	
羊源葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i> isolated from sheep	0.0	0.9	0.9	9.1	27.3	25.4	11.8	7.3	1.8	10.0	5.5	0.0	
牛源葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i> isolated from cattle	3.0	55.4	25.0	8.3	6.0	1.7	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	
猪源葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i> isolated from pig	24.6	10.9	8.7	9.0	11.0	7.0	7.2	13.2	5.4	2.8	0.2	0.0	
禽源葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i> isolated from poultry	2.5	5.5	11.6	13.3	11.9	12.9	10.7	7.8	4.7	3.3	2.8	13.0	

注:0 耐是指对被检的所有抗菌药物都不耐药,1 耐是指对被检的其中 1 种抗菌药物耐药,2 耐是指对被检的 2 种抗菌药物同时耐药,3 耐至 11 耐以此类推。Note: 0 resistance means that all antimicrobial agents tested are not resistant, 1 resistance means that resistance to one of the antibiotics tested. 2 resistance refers to the simultaneous resistance of two antibiotics tested. 4 Resistance refers to the four types of different structure (different mechanism of action) of antibacterial drugs at the same time resistant, 3 resistance to 11 resistance and so on.

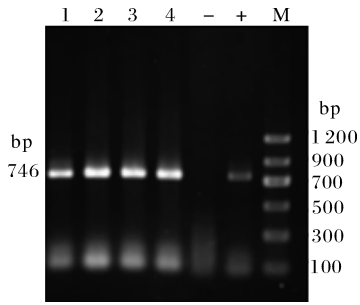
2.4 动物源葡萄球菌耐药谱型结果

新疆部分地区动物源分离的葡萄球菌耐药谱型多样化,羊源分离的葡萄球菌共有 37 种谱型,以 4 耐、5 耐和 6 耐谱型为主,4 耐谱型中以 FLR-CEF-OX-PG(18.2%, 20/110) 较为常见,5 耐谱型中以 FLR-RE-CEF-OX-PG(18.2%, 20/110) 较为常见;宠物源分离的葡萄球菌共有 81 种谱型,以 4 耐谱型为主,4 耐谱型中以 AMK-CEF-OX-PG(3.2%, 5/154) 和 TET-FLR-LEV-OX(3.2%, 5/154) 较为常见;禽源葡萄球菌共 187 种谱型,以 11 耐谱型为主(13.0%, 83/638);猪源分离的葡萄球菌共 168 种谱型,以 8 耐谱型为主,8 耐谱型中以 TET-FLR-RA-LEV-A/C-OX-PG-CLDM(2.5%, 15/597) 较为常

见;牛源分离的葡萄球菌共有 20 种谱型,以耐青霉素的 1 耐(54.2%, 91/168) 谱型为主。

2.5 动物源葡萄球菌酰胺醇类耐药基因检测结果

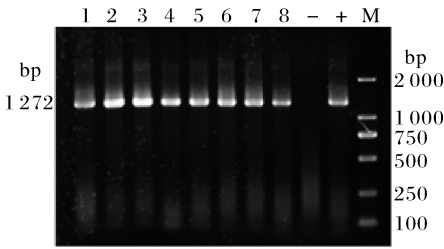
采用 PCR 方法对 1 667 株不同动物源葡萄球菌进行 *cfr*、*fexA* 和 *fexB* 基因的检测,片段大小与预期条带大小一致,部分电泳检测结果见图 1 和图 2,不同动物源中均未检测出 *fexB* 基因,酰胺醇类耐药基因 *cfr*、*fexA* 和 *fexB* 检出率分别是 0.2% (4/1667)、24.2% (403/1667) 和 0。其中 *cfr* 基因仅在妊娠母猪鼻拭子样品分离的葡萄球菌中有检出,*fexA* 耐药基因在除牛源菌外不同动物源葡萄球菌中均有检出,不同动物源 *fexA* 耐药基因检出率见表 4。



1~4: *cfr* 扩增条带; -, 阴性对照; +: 阳性对照; M: DNA marker. 1-4: The *cfr* amplification electrophoresis; -, Negative control; +: Positive control; M: DNA marker.

图 1 *cfr* 基因 PCR 扩增电泳图

Fig.1 PCR amplification of *cfr* gene



1~8: *fexA* 扩增条带; -, 阴性对照; +: 阳性对照; M: DNA marker; 1-8: The *fexA* amplification electrophoresis; -, Negative control; +: Positive control; M: DNA marker.

图 2 *fexA* 基因 PCR 扩增电泳图

Fig.2 PCR amplification of *fexA* gene

表 4 不同动物源 *fexA* 基因检测结果

Table 4 Results of *fexA* gene detection from different animal sources

不同动物来源	检测率/%
Different source of animal	Detection rate
宠物源 Pet source	31.2(48/154)
羊源 Sheep source	12.7(14/110)
牛源 Cattle source	0.0
猪源 Pig source	28.1(168/597)
禽源 Poultry source	25.8(173/638)

2.6 *cfr* 阳性菌株 16S rRNA 鉴定结果及其移动元件检测

采用 PCR 方法,通过 16S rRNA 通用引物扩增携带 *cfr* 基因的 4 株阳性葡萄球菌的 16S rRNA 并测序,然后将测序获得的序列与 NCBI 数据库已知的序列进行比对,结果显示,携带 *cfr* 基因的 4 株菌株全部为模仿葡萄球菌。移动元件 IS21-558 和转座酶基因 *Tn558* 检测结果显示:这 4 株模仿葡萄球菌都含有 *cfr* 移动元件 IS21-558(*istAS* 和 *istBS*) 和完整的 *Tn558* 转座酶基因(*tnpA*、*tnpB*、*tnpC*)。此外,有趣的是,这 4 株模仿葡萄球菌同时携带 *fexA* 基因。检测结果详见表 5。

2.7 携带 *cfr* 基因的葡萄球菌耐药表型及耐药基因型确认

对携带 *cfr* 基因的 4 株模仿葡萄球菌进行耐药

表 5 *cfr* 基因转移的移动元件检测

Table 5 Detection of *cfr* gene transfer by mobile element

菌株编号 Strain number	16S rRNA	<i>cfr</i>	IS21-558		<i>Tn558</i>			<i>fexA</i>	<i>fexB</i>
			<i>istAS</i>	<i>istBS</i>	<i>tnpA</i>	<i>tnpB</i>	<i>tnpC</i>		
M ₅₅	模仿葡萄球菌 <i>Staphylococcus simulans</i>	+	+	+	+	+	+	-	
M ₆₀	模仿葡萄球菌 <i>Staphylococcus simulans</i>	+	+	+	+	+	+	-	
M ₁₅₀	模仿葡萄球菌 <i>Staphylococcus simulans</i>	+	+	+	+	+	+	-	
M ₁₆₆	模仿葡萄球菌 <i>Staphylococcus simulans</i>	+	+	+	+	+	+	-	

表型及耐药基因型的确认,检测结果显示:模仿葡萄球菌 M₅₅ 为 4 耐菌株,耐药表型为四环素-氟苯尼考-青霉素-克林霉素,耐药基因型除携带 *cfr* 基因和 *fexA* 基因外,还携带 2 个四环素基因 *tetK* 和 *tetM*;模仿葡萄球菌 M₆₀ 仅对青霉素耐药,耐药基因型为同时携带 *cfr* 基因、*fexA* 基因和 *tetM* 基因;模仿

葡萄球菌 M₁₅₀ 为 5 耐菌株,耐药表型为庆大霉素-四环素-氟苯尼考-青霉素-克林霉素,耐药基因检测结果显示,同时携带酰胺醇类耐药基因 *cfr* 和 *fexA*,喹诺酮类耐药基因 *norA* 和四环素类耐药基因 *tetK*;模仿葡萄球菌 M₁₆₆ 为 3 耐菌株,耐药表型为氟苯尼考-青霉素-克林霉素,耐药基因检测结果显示

表6 携带 *cfr* 基因的葡萄球菌对被检抗菌药物的耐药情况及基因携带情况Table 6 Drug resistant and gene carrying status of *Staphylococcus* carrying *cfr* gene to antimicrobial agents tested

菌株编号 Strains number	16S rRNA 鉴定结果 16S rRNA identification results	多药耐药 Multidrug resistance	耐药表型 Drug resistance pattern	携带耐药基因 Carrying drug resistance gene
M ₅₅	模仿葡萄球菌 <i>Staphylococcus simulans</i>	4 耐 4-resistant	TET-FLR-GP-CLDM	<i>cfr</i> + <i>fexA</i> + <i>tetK</i> + <i>tetM</i>
M ₆₀	模仿葡萄球菌 <i>Staphylococcus simulans</i>	1 耐 1-resistant	GP	<i>cfr</i> + <i>fexA</i> + <i>tetM</i>
M ₁₅₀	模仿葡萄球菌 <i>Staphylococcus simulans</i>	5 耐 5-resistant	GEN-TET-FLR-GP-CLDM	<i>cfr</i> + <i>fexA</i> + <i>norA</i> + <i>tetK</i>
M ₁₆₆	模仿葡萄球菌 <i>Staphylococcus simulans</i>	3 耐 3-resistant	FLR-GP-CLDM	<i>cfr</i> + <i>fexA</i> + <i>femA</i> + <i>tetK</i>

同时携带酰胺醇类耐药基因 *cfr*、*fexA*、 β -内酰胺类耐药基因 *femA* 和四环素类耐药基因 *tetK*, 具体检测结果详见表 6。

3 讨论

3.1 新疆动物源葡萄球菌耐药结果分析

本试验通过对新疆部分地区不同动物源进行采样, 从中分离试验用葡萄球菌, 药敏试验结果显示, 新疆动物源分离的葡萄球菌耐药情况严重, 除牛源菌对阿米卡星和庆大霉素高度敏感外, 其余动物源葡萄球菌整体耐药率在 1.1%~98.2%, 不同动物源葡萄球菌耐药严重程度为羊源>宠物源>禽源>猪源>牛源, 羊源菌耐药率在 0.9%~98.2%, 宠物源菌耐药率在 29.2%~94.2%, 禽源菌耐药率在 21.2%~74.1%, 猪源菌耐药率在 0.6%~64.7%, 牛源菌除对青霉素耐药率为 93.5%外, 对阿米卡星和庆大霉素无耐药菌检出, 对其余被检抗菌药物耐药率在 1.1%~36.3%。值得思考的是, 新疆羊的养殖方式一般是以放牧形式进行饲养, 少有规模化或集中化的养殖, 但是耐药率却是所有动物源中最高的, 分析原因可能是: 本次所采集羊源样品较少, 不能反映整体的耐药情况; 此外, 仅对羔羊进行样品采集, 羔羊抵抗力差, 易生病, 抗菌药物使用频率相对较高, 随着生长, 抗菌药物使用减少, 耐药率会随之降低^[20]。宠物源的高耐药率应引起关注, 宠物作为人类的亲密伙伴, 在与人类亲密接触过程中, 将耐药菌传递给人类的机率很大, 并且, 宠物源的耐药谱型十分多样化, 154 株菌中就有 81 种耐药谱型, 复杂的耐药谱型在导致临床治疗失败的同时, 更增加超级耐药菌产生的概率, 因此, 规范临床用药亟不可待。

猪源和禽源作为高密度集中饲养的典范, 超高的耐药率与饲养过程中抗菌药物的添加密不可分, 虽然整体耐药率没有羊源和宠物源高, 但是耐药谱型多样化, 仅禽源就有 187 种耐药谱型, 猪源有 168 种耐药谱型, 相关研究表明, 耐药菌可通过食物链向人类传递, 对人类健康造成威胁^[21]。

3.2 动物源葡萄球菌酰胺醇类耐药基因检测结果分析

本试验采用 PCR 方法对新疆部分地区分离的 1 667 株动物源葡萄球菌进行酰胺醇类耐药基因的检测, 仅在猪源分离的葡萄球菌中检出 4 株携带 *cfr* 基因的菌株, *cfr* 基因检出率低于刘小琴^[22]的报道(6 个猪场分离的葡萄球菌中 *cfr* 基因检出率为 15.8%)。本研究 *fexA* 基因的检出率相对较高, 所分离的葡萄球菌中 *fexA* 基因整体检出率为 24.2%, 低于曾淑仪等^[23]的报道。本研究不同动物源分离的葡萄球菌中, 以宠物源 *fexA* 基因检出率最高, 为 31.2%(48/154), 其次是猪源(28.1%, 168/597)和禽源(27.1%, 173/638), 羊源 *fexA* 基因检出率为 12.7%(14/110), 未在牛源菌中检出 *fexA* 基因。应引起注意的是, 氟苯尼考并未允许用于宠物疾病的治疗^[24], 但是宠物源分离的葡萄球菌 *fexA* 基因携带率最高, 分析原因可能是, 氟苯尼考是氯霉素替代物, 而氯霉素因其严重的毒副作用, 仅用于非食品动物的治疗, 宠物源 *fexA* 基因的超高携带率, 是否与宠物临床氯霉素的使用有关, 有待进一步研究。猪源、禽源和羊源 *fexA* 基因的检出, 可能与氟苯尼考的使用有关, 相关研究表明^[25], 抗菌药物的使用频率与基因检出率成正相关。此外, 所有动物源都未检出 *fexB* 基因, 一方面说明新疆动

物源葡萄球菌以携带 *cfr* 和 *fexA* 基因为主,另一方面,可能是由于 *fexB* 基因的检出率也相对较低,如沈应博^[26]的报道。

3.3 *cfr* 阳性菌株耐药表型和耐药基因型及移动元件检测分析

对携带 *cfr* 基因的 4 株阳性菌进行耐药表型与耐药基因型的检测,发现耐药表型与耐药基因型关系紧密,如模仿葡萄球菌 M₅₅ 和模仿葡萄球菌 M₁₅₀ 都携带四环素类耐药基因和酰胺醇类耐药基因,耐药表型结果显示对四环素类中的四环素和酰胺醇类中的氟苯尼考耐药;模仿葡萄球菌 M₁₆₀ 携带酰胺醇类耐药基因和 β -内酰胺类耐药基因,耐药表型结果显示对酰胺醇类中的氟苯尼考和 β -内酰胺类中的青霉素耐药,以上结果可以看出,细菌耐药性的产生与耐药基因的携带联系紧密。但模仿葡萄球菌 M₆₀ 仅表现出对青霉素耐药,却同时携带酰胺醇类耐药基因和四环素类耐药基因,造成此现象的原因可能是携带其他未检测的耐药基因。此外,虽然携带酰胺醇类耐药基因和四环素耐药基因,却未表现出对氟苯尼考或四环素耐药,推测被检耐药基因可能介导低水平耐药。相关研究表明,在某些敏感菌中也可检出耐药基因,虽携带耐药基因但并不表现对该抗菌药物的耐药,进一步研究发现,是由于敏感菌中的耐药基因仅介导低水平耐药,并不表现出对被检抗菌药物的耐药;而不携带被检耐药基因的耐药菌株可能存在其他未知的可介导高水平耐药的耐药基因或耐药机制^[27]。

本试验同时对携带 *cfr* 基因的阳性菌株进行移动元件 IS21-558 和转座酶基因 *Tn558* 的检测,4 株阳性菌中全部携带移动元件和转座酶相关的基因,相关研究曾表明,*cfr* 基因多数位于质粒上,而移动元件和转座酶基因的携带,更利于携带 *cfr* 基因的阳性菌在不同的菌种之间进行转移和传播,从 2000 年发现 *cfr* 基因至今,短短十几年的时间内,*cfr* 基因从最初在革兰氏阳性菌中检出,如葡萄球菌^[28]、肠球菌^[29]等,到近年来,在多种革兰氏阴性菌中也有检出,如大肠杆菌^[30]、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、粪产碱菌^[31]等,是否是由于移动元件的存在造成 *cfr* 基因这么迅速的传播,有待进一步研究与确认。

新疆动物源分离的葡萄球菌耐药情况严重,除牛源菌外,整体耐药情况介于 20.0%~98.0%之间,

所有动物源分离的葡萄球菌都对青霉素耐药率很高,耐药率高于 54.7%;多药耐药情况严重,耐药谱型多样化,应加大耐药性的检测力度,严格监控耐药菌,防止耐药菌的暴发。此外,新疆动物源葡萄球菌酰胺醇类耐药基因以携带 *fexA* 基因为主,有多重耐药基因 *cfr* 的检出,且阳性菌同时携带移动元件和转座酶基因,规范使用抗菌药物的同时,应对检出 *cfr* 基因的猪场进行连续性的耐药性检测,为进一步探究 *cfr* 基因的传播机制奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 柴鑫妍,余仲佳,陈瑶瑶,等.动物医院环境源性葡萄球菌耐药性分析与毒力基因检测[J].中国兽医杂志,2014,50(12):73-76.
- [2] 刘蔚雯,汪洋.细菌对氟苯尼考的耐药机制研究进展[J].中国动物传染病学报,2018,26(1):1-6.
- [3] 保雨,刘亚娟,刘力,等.动物源性葡萄球菌多重耐药基因 *cfr* 研究进展[J].动物医学进展,2015,36(6):122-125.
- [4] 李德喜.恶唑烷酮类耐药基因 *cfr* 和 *oprA* 在猪源 MRSA 和 CoNS 中流行及传播机制的研究[D].北京:中国农业大学,2016.
- [5] SHORE A C, BRENNAN O M, EHRICHT R, et al. Identification and characterization of the multidrug resistance gene *cfr* in a Pantone-Valentine leukocidin-positive sequence type 8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* IVa (USA300) isolate[J]. Antimicrob agents and chemotherapy, 2010, 54(12): 4978-4984.
- [6] FARRELL D J, MENDES R E, ROSS J E, et al. Linezolid surveillance program results for 2008 (LEADER Program for 2008)[J]. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2009, 65(4):392-403.
- [7] JONES R N, ROSS J E, BELL J M, et al. Zyvox annual appraisal of potency and spectrum. program: linezolid surveillance program results for 2008[J]. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2009, 65(4):404-413.
- [8] LOZANO C, RUIZ-GARCIA M, GOMEZ-SANZ E, et al. Characterization of a *cfr*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain of the lineage ST22 implicated in a life-threatening human infection[J]. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2012, 73(4):380-382.
- [9] RAJAN V, KUMAR V G, GOPAL S, et al. A *cfr*-positive clinical *staphylococcal* isolate from India with multiple mechanisms of linezolid-resistance[J]. Indian journal of medical research, 2014, 139(3):463-467.
- [10] GALAS A C, DESHPANDE L M, DE SOUZA A G, et al. MSSA ST398/t034 carrying a plasmid-mediated Cfr and Erm

- (B) in Brazil[J].Journal of antimicrobial chemotherapy,2015,70(1):303-305.
- [11] WANG Y, HE T, SCHWARZ S, et al. Multidrug resistance gene *cfr* in methicillin-resistant coagulase-negative *staphylococci* from chickens, ducks, and pigs in China[J].International journal of medical microbiology,2013,303(2):84-87.
- [12] ZENG Z L, WEI H K, WANG J, et al. High prevalence of Cfr-producing *Staphylococcus* species in retail meat in Guangzhou [J].BMC Microbiology,2014,14(1):1-13.
- [13] HUANG Y, XU Y, LIU G, et al. Emergence of linezolid resistance in a clinical *Staphylococcus capitis* isolate from Jiangsu Province of China in 2012[J].Journal of thoracic disease,2014,6(5):E48-E53.
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement, M100-S23 [S]. Pennsylvania: Wayne, 2013.
- [15] 蔡建星.新疆猪源葡萄球菌 *cfr* 和 *fecA* 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.
- [16] 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.
- [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.
- [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.
- [19] 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 of food microbiology,2012,160(1):16-23.
- [20] 江萍.新疆动物源沙门氏菌耐药性及 MLST 分析[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2017.
- [21] WANG J, LIN D C, GUO X M, et al. Distribution of the multi-drug resistance gene *cfr* in *Staphylococcus* isolates from pigs, workers, and the environment of a hog market and a slaughterhouse in Guangzhou, China[J].Foodborne pathogens and disease,2014,12(7):598-605.
- [22] 刘小琴.多重耐药基因 *cfr* 在养殖场中的分布[C]//中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会.中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会第十一届会员代表大会暨第十三次学术讨论会与中国毒理学会兽医毒理专业委员会第五次学术研讨会论文集.长沙:中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会,2015.
- [23] 曾淑仪,邓辉,孙坚,等.广东不同地区葡萄球菌 *cfr* 基因的流行性调查[J].中国兽医学报,2016,36(8):1376-1382.
- [24] 冯世文,曾芸,李军,等.细菌对氟苯尼考的耐药机制研究[J].黑龙江畜牧兽医,2014(5):52-54.
- [25] HE T, SHEN Y B, SCHWARZ S, et al. Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolates of human and animal origin [J].Journal of antimicrobial chemotherapy,2016,71(6):1466-1473.
- [26] 沈应博.宠物源氟苯尼考耐药菌的筛查和确证研究[C]//中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会.中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会第十一届会员代表大会暨第十三次学术讨论会与中国毒理学会兽医毒理专业委员会第五次学术研讨会论文集.长沙:中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会,2015.
- [27] 罗永乾.动物源大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌耐药表型与氯霉素类抗菌药物耐药基因型的研究[D].重庆:西南大学,2017.
- [28] DAI L, WU C M, WANG M G, et al. First report of the multi-drug resistance gene *cfr* and the phenicol resistance gene *fecA* in a *Bacillus* spp. strain from swine feces[J].Antimicrobial agents and chemotherapy,2010,54(9):3953-3955.
- [29] 牟迪,王秀梅,初胜波,等.多重耐药基因 *cfr* 在广东地区猪源肠球菌中的流行特点[J].中国预防兽医学报,2014,36(11):859-862.
- [30] 赵丽青,刘小琴,李伟.食品源大肠杆菌中 *cfr* 检出率及耐药情况[J].中国兽医学报,2016,46(11):1464-1468.
- [31] 刘小琴,刘建华,马振振,等.*cfr* 基因在某一猪场的流行特征研究[C]//中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会.中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会第十四次学术讨论会暨30周年纪念大会论文集.青岛:中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会,2017.

Detection of multidrug resistance gene *cfr* and their mobile element of *Staphylococci* from animals in Xinjiang

XUAN Huiyong XIA Lining YAO Xiaohui
MAMUER • Akemuhan WANG Shufeng WANG Kai

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

Abstract In order to understand the clinical antimicrobial resistance of *Staphylococci* and their multidrug resistance gene *cfr* from animals in Xinjiang, and to provide guidance for clinical medication and further study of the *cfr* gene transmission mechanism, a total of 1 781 animal feces and nasal samples were collected from some areas of Xinjiang Uygur Autonomous Region. A total of 1 667 strains of *Staphylococci* were isolated from the samples, and then drug sensitivity tests of 11 kinds of clinical antibiotics were carried out. The PCR method was used to detect the amide-alcohol resistance genes (*cfr*, *fexA*, and *fexB*), the mobile elements IS21-558 and transposase gene Tn558, which were related to the transfer of *cfr*. The results showed that the order of severity of drug resistance of *Staphylococci* to clinical commonly used antimicrobial agents was sheep source > pet source > pig source > poultry source > cattle source. The penicillin resistance was the most serious among the tested antibiotics, and the drug resistance rate was between 54.7% and 93.6%. Except for *Staphylococci* isolated from cattle (36.3%), the resistance rate of *Staphylococci* isolated from other animals to oxacillin was 51.1%-98.2%. *Staphylococcus* from animals showed good sensitivity to amikacin, gentamicin and clindamycin. Among the 11 clinical antibiotics, the multidrug resistance rate of *Staphylococcus* was concentrated in 4-5 from the sheep source, was concentrated in 3-5 from the poultry and pet source, was mainly 4 and 7 from the pig source, and was 1 from the bovine source. *Staphylococcus* isolated from different animal sources had a wide range of antibiotics resistance spectrum. The detection results of amide-alcohol resistance gene showed that, only 4 strains of *Staphylococcus* isolated from pigs carried *cfr* gene. Except for bovine source *Staphylococcus*, *fexA* gene was detected in other animal sources with the order of detection rate of pet source > pig source > poultry source > sheep source, but the *fexB* gene was not detected. The 16S rRNA sequence amplification results showed that the 4 strains carrying the *cfr* gene were all *Staphylococcus simulans*. In addition, mobile element IS21-558 (including *istAS* and *istBS*) and Tn558 transposase gene (*tnpA*, *tnpB*, *tnpC*) were detected in 4 positive bacteria. From above, the resistance of *Staphylococcus* from animal origin was serious in Xinjiang, the spectrum of resistance was diverse, and the main gene of amide-alcohol resistance was the *fexA* gene. In addition, multidrug resistance gene *cfr* and its mobile components were detected. It is suggested that the surveillance of drug resistance should be strengthened to prevent the outbreak of drug resistance bacteria and the probable emergence of super resistant bacteria.

Keywords *Staphylococcus*; drug resistance; *cfr*; mobile element